

# 中华人民共和国国家标准

## 工业循环冷却水中铁细菌的测定 MPN 法 GB/T 14643.6—93

Industrial circulating cooling water—Examination of iron bacteria

—MPN test

### 1 主题内容与适用范围

本标准规定了工业循环冷却水中铁细菌的测定方法。

本标准适用于工业循环冷却水中铁细菌的测定,也适用于原水、生活用水及粘泥中的铁细菌的测定。

### 2 引用标准

GB 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备

GB 6682 分析实验室用水规格和试验方法

### 3 方法提要

本法采用多试管发酵技术,在  $29\pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 14d,如果试管内棕色消失而且形成褐色或黑色沉淀,表明阳性反应,采用 MPN 技术,对被测试样中的铁细菌进行计数。

### 4 试剂和材料

本试验方法中,除特殊规定外,应使用分析纯试剂和符合 GB 6682 中三级水规格的水。

- 4.1 硫酸镁(GB 671);
- 4.2 硫酸铵(GB 1396);
- 4.3 磷酸氢二钾(HG 3—1228);
- 4.4 氯化钙;
- 4.5 硝酸钠(GB 636);
- 4.6 柠檬酸铁铵;
- 4.7 氯化钠(GB 1266);
- 4.8 氢氧化钠(GB 629)溶液:40g/L;
- 4.9 盐酸(GB 622)溶液:1+11;
- 4.10 硫代硫酸钠(GB 637);
- 4.11 乙醇(GB 678)溶液:75%(V/V);
- 4.12 牛皮纸;
- 4.13 医学脱脂棉。

### 5 仪器和设备

- 5.1 无菌箱(室)或超净工作台;
- 5.2 蒸汽压力灭菌器;

国家技术监督局 1993-08-06 批准

1994-07-01 实施

- 5.3 生化培养箱;
- 5.4 电热干燥箱:温度可控制在 $(60\sim 280)\pm 2^{\circ}\text{C}$ ;
- 5.5 刻度吸管:1mL;
- 5.6 刻度吸管:5mL;
- 5.7 试管:150mm $\times$ 15mm;
- 5.8 试管架;
- 5.9 磨口三角瓶:100mL;
- 5.10 磨口试剂瓶:1 000mL;
- 5.11 容量瓶:1 000mL。

## 6 试验前准备

### 6.1 培养基的制备

称取下列试剂:

- 硫酸镁 0.5g;
- 硫酸铵 0.5g;
- 硫酸氢二钾 0.5g;
- 氯化钙 0.2g;
- 硝酸钠 0.5g;
- 柠檬酸铁铵 10.0g。

将上述试剂溶解在1 000mL水中,用氢氧化钠溶液(4.8)或盐酸溶液(4.9)调节pH至 $6.8\pm 0.2$ ,并分装在试管中,每管5mL,塞上棉塞,数支一捆,每捆管口用牛皮纸包扎,用蒸汽压力灭菌器 $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ 灭菌15min。

### 6.2 无菌稀释水的制备

6.2.1 生理盐水的配制:称取8.50g氯化钠溶解在1 000mL水中,混匀。

6.2.2 将生理盐水(6.2.1)分装在100mL磨口三角瓶中,每瓶45mL。每个三角瓶塞子和瓶口间插入一小纸片,塞紧瓶塞,每个瓶子的瓶口用牛皮纸包扎以防污染,用蒸汽压力灭菌器 $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ 灭菌15min。

### 6.3 刻度吸管的灭菌

6.3.1 将洗净并烘干后的刻度吸管粗端塞上医用脱脂棉,棉花量要适宜,长度大约10~15mm,棉花不宜露在口外,多余的棉花可以用火焰烧掉。

6.3.2 每支刻度吸管用一条约40~50mm宽的牛皮纸条,以 $45^{\circ}$ 左右角度螺旋形卷起来,吸管的尖端在头部,粗端用多余的纸条折叠打结,不使散开,标上量度,若干支扎成一束,置电热干燥箱中,于 $160\pm 2^{\circ}\text{C}$ 灭菌2h。

### 6.4 采样瓶的灭菌

将洗净并烘干后的1 000mL磨口试剂瓶瓶口和瓶颈用牛皮纸裹好,扎紧,置电热干燥箱中,于 $160\pm 2^{\circ}\text{C}$ 灭菌2h。

### 6.5 硫代硫酸钠灭菌

将硫代硫酸钠放入无菌箱(室)内,并均匀地摊在离紫外线灯30cm处,灭菌30min。

## 7 测定步骤

### 7.1 水样的采集

7.1.1 用无菌采样瓶采集被测样品,在采样过程中,要保护瓶口和颈部,防止这些部分受杂菌污染,瓶内要留下足够的空间,以备测定之前摇匀。

7.1.2 若采集的水中有余氯,应在采样前,在无菌操作下,于无菌采样瓶(6.4)中加入灭过菌的硫代硫

酸钠(6.5),加入的量为每升水样约0.1g。

7.1.3 水样采集后立即进行测定,如果在2h内不能进行测定,应把水样放在冰箱中,4~10℃保存,存放时间不宜超过24h。经冷冻保存后的水样需测定时,从冰箱中取出,30℃左右活化4~5h,再进行测定。

## 7.2 无菌箱(室)灭菌

把试验所用的无菌培养基、无菌稀释水、无菌吸管等用品放入无菌箱(室)内,打开紫外线灯灭菌30min。

## 7.3 水样的稀释和接种

7.3.1 水样放入灭过菌的无菌箱(室)(7.2)中,立即用75%(V/V)乙醇溶液的医用脱脂棉球擦手,点燃无菌箱(室)内的酒精灯。

7.3.2~7.3.6的操作应在无菌箱(室)内的火焰区进行。

7.3.2 选择适宜的稀释度,应使最后一个稀释度接种培养后无铁细菌生长,在空白稀释水样瓶(6.2)上标上稀释度数。

7.3.3 用10倍稀释法稀释水样,即用5mL无菌吸管(6.3)吸取5mL水样注入到45mL空白稀释水中充分摇匀,此时稀释度为 $10^{-1}$ 。

7.3.4 另取一支5mL无菌吸管吸取5mL稀释度为 $10^{-1}$ 水样注入到第二个稀释水中,充分摇匀,此时稀释度为 $10^{-2}$ ,依次类推,直至需要的稀释度为止。

7.3.5 将水样(包括稀释水样)分别接种于装有培养基的试管中(6.1),试管置试管架上,每个稀释度重复接种5管(根据需要也可重复接种3管或4管),每管接种1mL,每接一个稀释度更换一支无菌吸管。

7.3.6 另取一组试管培养基(6.1)不接水样,作为空白。

## 7.4 培养

在生化培养箱中 $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养14d。

## 8 计数与报告

8.1 凡产生褐色或黑色沉淀且原培养基中棕色消失变为透明状者,表明有铁细菌存在,以“+”(阳性)表示,其余试管以“-”(阴性)表示。

8.2 如果空白出现阳性反应,表明测定过程中有污染,本次测定无效。

8.3 算出10进位稀释管中阳性试管数,以阳性组合指数记录下来。

8.4 在10进位稀释中多于三个稀释度时,阳性组合的指数只需要用其中依次的三个稀释度,对这三个稀释度的决定是先选出5管全部阳性反应的最大稀释度,然后选出其次相连的两个更高的稀释度,算出阳性组合指数(见表例1、2、4)。

8.5 若依照8.4所规定的原则选出三个稀释度后,有更高的稀释仍然产生一个阳性试管,就应该将这个阳性试管并入所选择的最高稀释的阳性结果中(见表1例3)。

8.6 根据阳性组合的指数,查表(附录A)得出最大可能的菌数(MPN)除以阳性组合指数的第一位数字的稀释度数,即为每毫升水样中铁细菌的菌数(如果每个稀释度重复接种4管或3管,根据阳性组合的指数查附录B表B1或附录C表C1)。

例表

| 例次 | 稀释度、生长情况及阳性试管数 |            |             |             |            | 阳性组合指数 | 报告方式<br>个/mL                  |
|----|----------------|------------|-------------|-------------|------------|--------|-------------------------------|
|    | $10^0$         | $10^{-1}$  | $10^{-2}$   | $10^{-3}$   | $10^{-4}$  |        |                               |
| 1  | +++++<br>5     | +++++<br>5 | ++---<br>2  | -----<br>0  | -----<br>0 | 520    | $5.0/10^{-1}=50$              |
| 2  | +++++<br>5     | ++++-<br>4 | ++---<br>2  | -----<br>0  | -----<br>0 | 542    | $25/10^0=25$                  |
| 3  | +++++<br>5     | +++--<br>3 | +-----<br>1 | +-----<br>1 | -----<br>0 | 532    | $14/10^0=14$                  |
| 4  | +++++<br>5     | +++++<br>5 | +++++<br>1  | +-----<br>1 | -----<br>0 | 510    | $3.5/10^{-2}=3.5 \times 10^2$ |

## 9 精密度

9.1 由于微生物是不稳定的,精确的试验不能实现,精密度的表达仅能按 MPN 程序。

9.2 在样品中细菌的分布是不规则的,有时细菌成倍地吸附到小颗粒上,MPN 正确度随着平行管的增加而增加,当使用 5 个平行管,每管加 1mL 样品时,测定结果的置信度为 95%。

**附 录 A**  
**五个平行管最大可能的菌数**  
**(补充件)**

表 A1

| 指数  | 个/mL | 指数  | 个/mL | 指数  | 个/mL | 指数  | 个/mL  |
|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-------|
| 000 | 0.0  | 203 | 1.2  | 400 | 1.3  | 513 | 8.5   |
| 001 | 0.2  | 210 | 0.7  | 401 | 1.7  | 520 | 5.0   |
| 002 | 0.4  | 211 | 0.9  | 402 | 2.0  | 521 | 7.0   |
| 010 | 0.2  | 212 | 1.2  | 403 | 2.5  | 522 | 9.5   |
| 011 | 0.4  | 220 | 0.9  | 410 | 1.7  | 523 | 12.0  |
| 012 | 0.6  | 221 | 1.2  | 411 | 2.0  | 524 | 15.0  |
| 020 | 0.4  | 222 | 1.4  | 412 | 2.5  | 525 | 17.5  |
| 021 | 0.6  | 230 | 1.2  | 420 | 2.0  | 530 | 8.0   |
| 030 | 0.6  | 231 | 1.4  | 421 | 2.5  | 531 | 11.0  |
| 100 | 0.2  | 240 | 1.4  | 422 | 3.0  | 532 | 14.0  |
| 101 | 0.4  | 300 | 0.8  | 430 | 2.5  | 533 | 17.0  |
| 102 | 0.6  | 301 | 1.1  | 431 | 3.0  | 534 | 20.0  |
| 103 | 0.8  | 302 | 1.4  | 432 | 4.0  | 535 | 25.0  |
| 110 | 0.4  | 310 | 1.1  | 440 | 3.5  | 540 | 13.0  |
| 111 | 0.6  | 311 | 1.4  | 441 | 4.9  | 541 | 17.0  |
| 112 | 0.8  | 312 | 1.7  | 450 | 4.0  | 542 | 25.0  |
| 120 | 0.6  | 313 | 2.0  | 451 | 5.0  | 543 | 30.0  |
| 121 | 0.8  | 320 | 1.4  | 500 | 2.5  | 544 | 35.0  |
| 122 | 1.0  | 321 | 1.7  | 501 | 3.0  | 545 | 45.0  |
| 130 | 0.8  | 322 | 2.0  | 502 | 4.0  | 550 | 25.0  |
| 131 | 1.0  | 330 | 1.7  | 503 | 6.0  | 551 | 35.0  |
| 141 | 1.1  | 331 | 2.0  | 504 | 7.5  | 552 | 60.0  |
| 200 | 0.5  | 340 | 2.0  | 510 | 3.5  | 553 | 90.0  |
| 201 | 0.7  | 341 | 2.5  | 511 | 4.5  | 554 | 160.0 |
| 202 | 0.9  | 350 | 2.5  | 512 | 6.0  | 555 | 180.0 |

**附录 B**  
**四个平行时管最大可能菌数**  
(补充件)

表 B1

| 指数  | 个/mL | 指数  | 个/mL | 指数  | 个/mL | 指数  | 个/mL  |
|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-------|
| 000 | 0.0  | 113 | 1.3  | 231 | 2.0  | 402 | 5.0   |
| 001 | 0.2  | 120 | 0.8  | 240 | 2.0  | 403 | 7.0   |
| 002 | 0.5  | 121 | 1.1  | 241 | 3.0  | 410 | 3.5   |
| 003 | 0.7  | 122 | 1.3  | 300 | 1.1  | 411 | 5.5   |
| 010 | 0.2  | 123 | 1.6  | 301 | 1.6  | 412 | 8.0   |
| 011 | 0.5  | 130 | 1.1  | 302 | 2.0  | 413 | 11.0  |
| 012 | 0.7  | 131 | 1.4  | 303 | 2.5  | 414 | 14.0  |
| 013 | 0.9  | 132 | 1.6  | 310 | 1.6  | 420 | 6.0   |
| 020 | 0.5  | 140 | 1.4  | 311 | 2.0  | 421 | 9.5   |
| 021 | 0.7  | 141 | 1.7  | 312 | 3.0  | 422 | 13.0  |
| 022 | 0.9  | 200 | 0.6  | 313 | 3.5  | 423 | 17.0  |
| 030 | 0.7  | 201 | 0.9  | 320 | 2.0  | 424 | 20.0  |
| 031 | 0.9  | 202 | 1.2  | 321 | 3.0  | 430 | 11.5  |
| 040 | 0.9  | 203 | 1.6  | 322 | 3.5  | 431 | 16.5  |
| 041 | 1.2  | 210 | 0.9  | 330 | 3.0  | 432 | 20.0  |
| 100 | 0.3  | 211 | 1.3  | 331 | 3.5  | 433 | 30.0  |
| 101 | 0.5  | 212 | 1.6  | 332 | 4.0  | 434 | 35.0  |
| 102 | 0.8  | 213 | 2.0  | 333 | 5.0  | 440 | 25.0  |
| 103 | 1.0  | 220 | 1.3  | 340 | 3.5  | 441 | 40.0  |
| 110 | 0.5  | 221 | 1.6  | 341 | 4.5  | 442 | 70.0  |
| 111 | 0.8  | 222 | 2.0  | 400 | 2.5  | 443 | 140.0 |
| 112 | 1.0  | 230 | 1.7  | 401 | 3.5  | 444 | 160.0 |

**附 录 C**  
**三个平行管最大可能的菌数**  
**(补充件)**

表 C1

| 指数  | 个/mL | 指数  | 个/mL | 指数  | 个/mL  |
|-----|------|-----|------|-----|-------|
| 000 | 0.0  | 201 | 1.4  | 302 | 6.5   |
| 001 | 0.3  | 202 | 2.0  | 310 | 4.5   |
| 010 | 0.3  | 210 | 1.5  | 311 | 7.5   |
| 011 | 0.6  | 211 | 2.0  | 312 | 11.5  |
| 020 | 0.6  | 212 | 3.0  | 313 | 16.0  |
| 100 | 0.4  | 220 | 2.0  | 320 | 9.5   |
| 101 | 0.7  | 221 | 3.0  | 321 | 15.0  |
| 102 | 1.1  | 222 | 3.5  | 322 | 20.0  |
| 110 | 0.7  | 223 | 4.0  | 323 | 30.0  |
| 111 | 1.1  | 230 | 3.0  | 330 | 25.0  |
| 120 | 1.1  | 231 | 3.5  | 331 | 45.0  |
| 121 | 1.5  | 323 | 4.0  | 332 | 110.0 |
| 130 | 1.6  | 300 | 2.5  | 333 | 140.0 |
| 200 | 0.9  | 301 | 4.0  |     |       |

**附加说明:**

本标准由中华人民共和国化学工业部提出。

本标准由化学工业部天津化工研究院归口。

本标准由南京大学和南京中山水处理公司负责起草。

本标准主要起草人曾昭琪、丁美芳、解正宽、蒋振祥。