

ICS 71.040.40
G 76



中华人民共和国国家标准

GB/T 14643.3—2009
代替 GB/T 14643.3—1993

工业循环冷却水中菌藻的测定方法 第3部分：黏泥真菌的测定 平皿计数法

Examination of bacteria and algae in industrial circulating cooling water—
Part 3: Examination of slime formed fungi—
Standard of plate count

2009-05-18 发布

2010-02-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

GB/T 14643《工业循环冷却水中菌藻的测定方法》分为以下几个部分：

- 第1部分：黏液形成菌的测定 平皿计数法
- 第2部分：土壤菌群的测定 平皿计数法
- 第3部分：黏泥真菌的测定 平皿计数法
- 第4部分：土壤真菌的测定 平皿计数法
- 第5部分：硫酸盐还原菌的测定 MPN法
- 第6部分：铁细菌的测定 MPN法

本部分为 GB/T 14643 的第3部分。

本部分代替 GB/T 14643.3—1993《工业循环冷却水中黏泥真菌的测定 平皿计数法》。

本部分与 GB/T 14643.3—1993 相比，在技术内容上并无变化，只是对文本结构和文字进行了修改。

本部分由中国石油和化学工业协会提出。

本部分由全国化学标准化技术委员会水处理剂分会(SAC/TC 63/SC 5)归口。

本部分负责起草单位：中海油天津化工研究设计院、上海未来企业有限公司。

本部分主要起草人：邵宏谦、刘昕、张全、李琳、朱传俊。

本部分于1993年首次发布。

工业循环冷却水中菌藻的测定方法

第3部分：黏泥真菌的测定

平皿计数法

1 范围

GB/T 14643 的本部分规定了工业循环冷却水中黏泥真菌的测定方法。

本部分适用于工业循环冷却水中黏泥真菌的测定，也适用于原水、生活用水及其他水中黏泥真菌的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 14643 的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本部分，然而，鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

GB/T 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备 (GB/T 603—2002, ISO 6353-1:1982, NEQ)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法 (GB/T 6682—2008, ISO 3696:1987, MOD)

3 方法提要

本方法采用 25 号浮游生物网收集循环冷却水中的黏泥，所得的黏泥用石英砂充分研磨使细胞分散，再利用平皿计数技术在 $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 72 h 来测定黏泥中真菌总数。

4 试剂和材料

本部分所用试剂，除非另有规定，应使用分析纯试剂和符合 GB/T 6682 三级水的规定。

试验中所需制剂及制品，在没有注明其他要求时，均按 GB/T 603 之规定制备。

- 4.1 马铃薯：市售新鲜（无芽），去皮后切成约 $20\text{ mm} \times 20\text{ mm} \times 20\text{ mm}$ 小块。
- 4.2 葡萄糖。
- 4.3 琼脂：生物试剂。
- 4.4 石英砂： $210\text{ }\mu\text{m} \sim 150\text{ }\mu\text{m}$ (70 目 $\sim$ 100 目)。
- 4.5 氯化钠。
- 4.6 乳酸。
- 4.7 乙醇溶液：75% (体积分数)。
- 4.8 牛皮纸。
- 4.9 医用脱脂棉。
- 4.10 医用脱脂纱布。

5 仪器、设备

- 5.1 无菌箱（室）或超净工作台。
- 5.2 蒸汽压力灭菌器。

- 5.3 生化培养箱。
- 5.4 鼓风电热干燥箱:温度可控制在 60℃~280℃。
- 5.5 铝锅:φ200 mm。
- 5.6 25 号浮游生物网。
- 5.7 转子流量计(0~2 m³/h)。
- 5.8 瓷研钵。
- 5.9 搪瓷量杯:1 000 mL。
- 5.10 磨口三角瓶:1 000 mL。
- 5.11 培养皿:φ90 mm。
- 5.12 容量瓶:1 000 mL。
- 5.13 刻度吸管:1 mL。
- 5.14 刻度吸管:5 mL。
- 5.15 三角瓶:500 mL。
- 5.16 量筒:500 mL。
- 5.17 量筒:25 mL。

6 试验前的准备

6.1 培养基的制备

称取约 200 g 的马铃薯于铝锅中,加水约 1 000 mL 于电炉上加热,煮沸 10 min 并不断搅拌,趁热用四层医用脱脂纱布过滤于搪瓷量杯中,收集到约 900 mL 滤液,滤液搅匀待用。

于上述滤液中加入 20.0 g 琼脂和 20.0 g 葡萄糖,并放在电炉上加热,不断地搅拌,待琼脂完全溶化后,趁热用四层医用脱脂纱布过滤,待滤液不再滴出时,用水补充至 1 000 mL,并用乳酸调节 pH 至 4.0±0.1,并分装在 500 mL 三角瓶中,每瓶分装量不超过其总量的三分之二,塞上棉塞再用牛皮纸把瓶口包好,用蒸汽压力灭菌器于(121±1)℃灭菌 15 min。

6.2 无菌稀释水的制备

6.2.1 生理盐水的配制:称取 8.5 g 氯化钠,溶解在 1 000 mL 水中,混匀。

6.2.2 将生理盐水分装在 100 mL 磨口三角瓶中,每瓶 45 mL,每个三角瓶塞子和瓶口间插入一小纸片,塞紧瓶塞,每个瓶子的瓶口均用牛皮纸包扎以防污染,用蒸汽压力灭菌器于(121±1)℃灭菌 15 min。

6.3 刻度吸管的灭菌

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

6.3.2 每支刻度吸管用 1 条约 40 mm~50 mm 宽的牛皮纸条,以 45°左右角度螺旋形卷起来,吸管的尖端在头部,粗端将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℃±2℃灭菌 2 h。

6.4 培养皿的灭菌

将洗净并烘干后的培养皿 10 个左右叠在一起,用牛皮纸卷成一筒,置电热干燥箱中于(160±2)℃灭菌 2 h。

6.5 石英砂的灭菌

将洗净并烘干后的石英砂装入磨口三角瓶中,按“无菌稀释水的制备”中三角瓶包扎及灭菌步骤进行包扎,灭菌。

7 测定步骤

7.1 样品的采集

7.1.1 采集黏泥的装置见图 1。

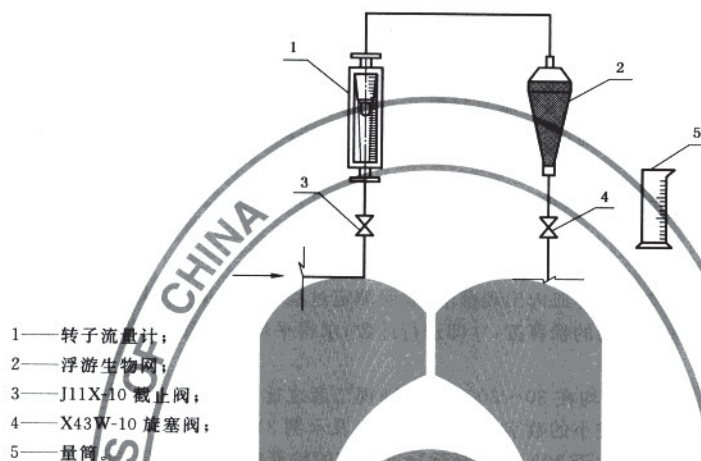


图 1 采集黏泥装置图

7.1.2 调节采样装置中的阀门,使冷却水的流速控制在 0.8 m/s 左右,水流量在 $1 \text{ m}^3/\text{h}$ 左右,然后关上浮游生物网的旋塞阀,过滤 1 m^3 水。

7.1.3 关闭水阀,取下浮游生物网,打开旋塞阀,将黏泥收集在一个 500 mL 量筒内,沉淀 30 min 后倾出上层清液。将剩余浊液转至 25 mL 量筒内,静置 30 min ,记录沉淀出的黏泥体积。

黏泥量以 V 计,单位为毫升每立方米(mL/m^3),按式(1)计算:

$$V = \frac{V_2}{V_1} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

V_2 ——量筒中黏泥体积的数值,单位为毫升(mL);

V_1 ——通过浮游生物网过滤的循环水量的体积的数值,单位为立方米(m^3)。

7.1.4 用无菌吸管移去 25 mL 量筒内的上清液,将量筒内的黏泥或部分黏泥转移至洗净并烘干后的瓷研钵中,加入约 2 g 灭过菌的石英砂,充分研磨后转移至 1000 mL 洗净并烘干后的容量瓶中,用无菌稀释水稀释至刻度,充分混匀,并立即进行测定。

7.2 无菌箱(室)灭菌

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

7.3 水样的稀释和接种

7.3.1 关掉紫外线灯,打开荧光灯,将黏泥水样放入无菌箱(室)中,立即用 75% 的乙醇溶液浸泡的医用脱脂棉球擦手,点燃无菌箱(室)内的酒精灯。

以下对水样的稀释和接种的操作应在无菌箱(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后,培养皿中生长的菌落数小于 300 个,在空白稀释水样瓶上标上稀释度数。

7.3.3 用 10 倍稀释法稀释水样,即用 5 mL 无菌吸管吸取 5 mL 水样注入到 45 mL 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 5 mL 无菌吸管吸取 5 mL 10^{-1} 水样移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 将不同稀释度的水样分别接种到无菌培养皿中,每个稀释度重复接种 3~5 个皿,每皿接种 1 mL,接种时左手掌托住培养皿,大拇指和食指轻轻将培养皿提起,吸管与培养皿底成 45° 角相接。移开吸管时吸管不宜再碰到培养皿,接种时间不宜超过 4 s。每接种一个稀释度更换一支无菌吸管。

7.3.6 另取一组培养皿不接水样,作为空白。同时操作。

7.3.7 将灭过菌的培养基冷却至 $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$,按 7.3.5 的方法掀开培养皿盖,将培养基灌入培养皿内,每皿应灌 15 mL~20 mL。灌皿时不要使培养基直接灌在水样上,灌皿后要将融化的培养基和皿中水样彻底混合,小心勿使混合液溅到培养皿的边缘。测定一个水样从接种到灌皿不得超过 20 min。

7.4 培养

待培养皿中培养基固化后,倒置平皿,在生化培养箱中于 $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 72 h。

8 计数与报告

8.1 培养之后,取出培养皿,若空白培养皿内出现菌落,表明测定过程中有污染,本次测定无效。

8.2 选择平均菌落数在 30~300 之间的稀释度,立即进行计数,求得平均菌落数,并修约成二位有效数字(见表 1 示例 1)。

8.3 若有两个稀释度,其生长菌落数均在 30~300 之间,则视二者之比值来决定,若其比值小于 2,应报告其平均数;若大于 2 则报告其中较小的数字(见表 1 示例 2 及示例 3)。

8.4 若所有稀释度的平均菌落数均大于 300,则选择稀释度最高的培养皿计数(见表 1 示例 4)。

8.5 若所有稀释度的平均菌落数均小于 30,则应选择稀释度最低的培养皿计数(见表 1 示例 5)。

8.6 若所有稀释度均无菌落生长,则以“小于 1 乘以最低稀释倍数”报告之(见表 1 示例 6)。

8.7 若所有稀释度的平均菌落数均不在 30~300 之间,其中一部分大于 300 而另一部分小于 30 时,则选择最接近 30 或 300 的培养皿计数(见表 1 示例 7)。

8.8 黏泥真菌的数量以 ρ 表示,单位为个每毫升(个/mL),按式(2)计算:

$$\rho = \frac{1\,000 X_1}{1\,000\,000 F V_1} = \frac{k X_1 V}{F V_3 \times 1\,000} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X_1 ——按(8.2)计数得出的培养皿上生长的平均菌落数,个;

V ——按(7.1.3)计算的黏泥量的数值,单位为毫升每立方米(mL/m^3);

V_3 ——按(7.1.4)测定时所取的黏泥体积的数值,单位为毫升(mL);

k ——按(7.1.4)测定时,所取黏泥体积(V_3)与黏泥总体积(V_2)之比($V_3 = k \cdot V_2$);

F ——计数组的样品稀释度数。

表 1

示 例	稀释度及菌落数			两稀释度 菌落数之比	黏泥真菌总数 个/mL	报告方式 个/mL
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}			
1	—	164	20	—	16 400	1.6×10^4
2	—	295	46	1.6	37 750	3.8×10^4
3	—	271	60	2.2	27 100	2.7×10^4
4	$>6\,500$	3 475	313	—	313 000	3.1×10^5
5	27	11	5	—	270	2.7×10^2
6	0	0	0	—	$<1 \times 10$	<10
7	—	306	12	—	30 600	3.1×10^4

9 精密度

9.1 由于微生物能以单独个体、双双成对、链状、成簇或一团团等形式存在,而且没有单独一种培养基能满足一个水样中所有细菌的生理要求。所以,由此法所得的菌落数可能要低于其正常存在的活细胞的数目。

9.2 标准平皿计数的正确度随着平行样皿的增加而增加,当使用 5 个平行皿,每皿加 1 mL 样品时测定结果的置信度为 95%。
