



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 14643.2—2009  
代替 GB/T 14643.2—1993

## 工业循环冷却水中菌藻的测定方法 第 2 部分：土壤菌群的测定 平皿计数法

Examination of bacteria and algae in industrial circulating cooling water—  
Part 2: Examination of soil micro-biots—  
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 发布  
中国国家标准化管理委员会

## 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2部分。

本部分代替 GB/T 14643.2—1993《工业循环冷却水中土壤菌群的测定 平皿计数法》。

本部分与 GB/T 14643.2—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、天津正达科技有限责任公司。

本部分主要起草人：李琳、张全、白莹。

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2部分：土壤菌群的测定

### 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土壤菌群的测定方法。

本部分适用于工业循环冷却水中土壤菌群的测定,也适用于原水、生活用水及其他水中土壤菌群的测定。

#### 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

本部分采用混合培养基,利用平皿计数技术,在 $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 72 h,测定循环冷却水中土壤菌群总数。

#### 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 中三级水的规定。

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 牛肉膏:生物试剂。
- 4.2 蛋白胨:生物试剂。
- 4.3 琼脂:生物试剂。
- 4.4 氯化钠。
- 4.5 硝酸钠。
- 4.6 磷酸氢二钾。
- 4.7 氯化钾。
- 4.8 硫酸镁。
- 4.9 硫酸亚铁。
- 4.10 蔗糖。
- 4.11 土壤(果园土、菜园土)。
- 4.12 氢氧化钠溶液:40 g/L。
- 4.13 乙醇溶液:75%(体积分数)。

- 4.14 硫代硫酸钠。
- 4.15 牛皮纸。
- 4.16 医用脱脂棉。
- 4.17 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 °C~280 °C。
- 5.5 铝锅:φ200 mm。
- 5.6 搪瓷量杯:1 000 mL。
- 5.7 磨口三角瓶:100 mL。
- 5.8 培养皿:φ90 mm。
- 5.9 磨口试剂瓶:1 000 mL。
- 5.10 刻度吸管:1 mL。
- 5.11 刻度吸管:5 mL。
- 5.12 三角瓶:500 mL。

## 6 试验前的准备

### 6.1 土壤浸出液的制备

称取约 100 g 土壤加入 300 g 水中,采用蒸汽压力灭菌器在(121±1)°C 灭菌 15 min,静置 24 h 后第二次灭菌,再静置 24 h 后进行第三次灭菌。瓶中的上层清液为土壤浸出液。

### 6.2 培养基的制备

称取下列试剂:

- 牛肉膏:1.5 g。
- 蛋白胨:5.0 g。
- 氯化钠:2.5 g。
- 硝酸钠:2.5 g。
- 磷酸氢二钾:0.5 g。
- 氯化钾:0.2 g。
- 硫酸镁:0.25 g。
- 硫酸亚铁:0.005 g。
- 蔗糖:20.0 g。
- 土壤浸出液:5 mL。
- 琼脂:15.0 g。

将上述试剂加水约 950 mL,在电炉上加热溶解后,趁热用四层医用脱脂纱布过滤于搪瓷量杯中,用热水补充至 1 000 mL,用氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.0±0.2,并分装在 500 mL 三角瓶中,每瓶分装量不超过其总容量的 2/3。塞上棉塞,用牛皮纸把瓶口包好,用蒸汽压力灭菌器于(121±1)°C 灭菌 15 min。

### 6.3 无菌稀释水的制备

6.3.1 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。

6.3.2 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  $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$  灭菌 15 min。

#### 6.4 刻度吸管的灭菌

6.4.1 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,棉花不宜露在口外,多余的棉花可以用火焰烧掉。

6.4.2 每支刻度吸管用 1 条约 40 mm~50 mm 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 2 h。

#### 6.5 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  $(160 \pm 2)^\circ\text{C}$  灭菌 2 h。

#### 6.6 采样瓶的灭菌

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

#### 6.7 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 30 cm 处,灭菌 30 min。

### 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,要保护瓶口和瓶颈,防止这些部分受杂菌污染。瓶内要留下足够的空间,以备测定之前摇晃。

7.1.2 若采集的水中有余氯,应于采样前在无菌操作下于无菌采样瓶中加入灭过菌的硫代硫酸钠,加入量为每升水样约 0.1 g。

7.1.3 水样采集后应立即进行测定,如果 2 h 内不能进行测定,应把水样放在冰箱中,于  $4^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$  保存,保存时间不宜超过 24 h。经冷冻保存后的水样需测定时,从冰箱中取出于  $30^\circ\text{C}$  左右活化 4 h~5 h,再进行测定。

#### 7.2 无菌箱(室)灭菌

7.2.1 把实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,将待测水样放入无菌箱(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条的操作应在无菌箱(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  $45^\circ$  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±1)℃,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(7.3.7)固化后,倒置平皿,在生化培养箱中(29±1)℃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 若有二个稀释度,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,则应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 土壤菌群的总数以ρ表示,单位为个每毫升(个/mL),按式(1)计算:

$$\rho = \frac{X_1}{F} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X<sub>1</sub>——计数得出的培养皿中长出的平均菌落数,个;

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	土壤菌群总数 个/mL	报告方式 个/mL
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>			
1	—	164	20	—	16 400	1.6×10 <sup>4</sup>
2	—	295	46	1.6	37 750	3.8×10 <sup>4</sup>
3	—	271	60	2.2	27 100	2.7×10 <sup>4</sup>
4	>6 500	3 475	313	—	313 000	3.1×10 <sup>5</sup>
5	27	11	5	—	270	2.7×10 <sup>2</sup>
6	0	0	0	—	<1×10	<10
7	0	306	12	—	30 600	3.1×10 <sup>4</sup>

## 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%。

---