

ICS 13.060.70
G 76
备案号:34608—2012

HG

中华人民共和国化工行业标准

HG/T 4207—2011

工业循环冷却水异养菌菌数测定 平皿计数法

Examination of heterotrophic bacteria in industrial circulating
cooling water—standard of plate count

2011-12-20 发布

2012-07-01 实施

中华人民共和国工业和信息化部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国石油和化学工业联合会提出。

本标准由全国化学标准化技术委员会水处理剂分技术委员会(SAC/TC63/SC5)归口。

本标准由中海油天津化工研究设计院、深圳市华测检测技术股份有限公司、上海未来企业有限公司、天津正达科技有限责任公司负责起草。

本标准主要起草人：张全、郭勇、刘昕、朱传俊、邵宏谦。

工业循环冷却水异养菌菌数测定 平皿计数法

1 范围

本标准规定了工业循环冷却水异养菌菌数的测定方法。

本标准适用于工业循环冷却水中异养菌菌数的测定,也适用于原水、生活用水及其他水中异养菌菌数的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

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

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

3 方法提要

本方法采用平皿计数法,将待测水样用10倍稀释法稀释至需要的稀释度,用移液管将不同稀释度试样1 mL分别接种到无菌培养皿中,将冷却至 $(45\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 灭菌后的培养基10 mL~15 mL灌入培养皿内,混合均匀。待固化后置于 $(29\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中培养72 h,培养期满后按照计数方法进行计数。

4 试剂和材料

- 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 氢氧化钠溶液(40 g/L)。
- 4.5 乙醇溶液[75%(体积分数)]。
- 4.6 氯化钠。
- 4.7 牛皮纸。
- 4.8 医用脱脂棉。
- 4.9 医用脱脂纱布。
- 4.10 硫代硫酸钠。

5 仪器、设备

- 5.1 常规微生物实验设备。
- 5.2 无菌箱(室)或超净工作台。
- 5.3 蒸汽压力灭菌锅。
- 5.4 生化培养箱: $(0\sim 50)^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.5 电热干燥箱:温度可控制在 $(60\sim 280)^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.6 玻璃培养皿或一次性灭菌塑料培养皿; $d90\text{ mm}$ 。
- 5.7 刻度吸管:1 mL。
- 5.8 刻度吸管:10 mL。

5.9 试管(做盐水管用) $d20\text{ mm}\times 200\text{ mm}$ 。

5.10 磨口试剂瓶:1 000 mL。

5.11 搪瓷量杯:1 000 mL。

5.12 锥形瓶:500 mL。

6 实验前的准备

6.1 培养基的制备

6.1.1 称取下列试剂:牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 10.0 g,氯化钠 5.0 g,琼脂 15 g~20 g。

6.1.2 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 值至 7.2~7.4,并分装在 500 mL 锥形瓶中,每瓶分装量不超过其容积的三分之二。塞上棉塞,用牛皮纸把瓶口包好,用蒸汽压力灭菌锅于 $(121\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min~30 min。

注:亦可直接购买市售的营养琼脂作为培养基。

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 将生理盐水分装在试管中,每管 9 mL,塞上棉塞,用牛皮纸把试管口包好,用蒸汽压力灭菌锅于 $(121\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min~30 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 mm~50 mm 宽的牛皮纸条,以 45° 左右螺旋形卷起来,吸管的尖部在头部,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 $(160\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 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 $(160\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 灭菌 2 h。

6.5 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包好,扎紧,置电热干燥箱中,于 $(160\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 灭菌 2 h。

6.6 硫代硫酸钠的灭菌

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

7 测定步骤

7.1 将待测试样放入无菌箱(室)中,立即用 75 % (体积分数)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。对试样的稀释和接种的操作均应在无菌箱(室)内的火焰区进行。

7.2 用 10 倍稀释法稀释试样,即用 1 mL 无菌刻度吸管吸取 1 mL 待测试样注入 9 mL 无菌生理盐水管中,充分摇匀,此时稀释度为 10^{-1} 。

7.3 另取一支 1 mL 无菌刻度吸管吸取 1 mL 稀释度为 10^{-1} 的试样移到第二个生理盐水管中,充分摇匀,此时稀释度为 10^{-2} ,依此类推,直至需要的稀释度为止。

7.4 将不同稀释度的试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盖提起,刻度吸管和培养皿底成 45° 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。

7.5 将灭菌后的培养基冷却至 $(45\pm 1)^{\circ}\text{C}$,按 7.4 的方法掀开培养皿盖,将培养基灌入培养皿内,每皿

应灌 10 mL~15 mL。灌皿时不要使培养基直接灌到水样上,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。

7.6 培养

待培养皿中培养基固化后,倒置平皿,在生化培养箱中 (29 ± 1) ℃培养 72 h。

8 计数方法及报告方式

8.1 选择平均菌数在 30~300 之间的稀释度,立即进行计数,求得平均菌落数,并修约成两位有效数字(见表 1 之例 1)。

8.2 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 之例 2 和例 3)。

8.3 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,并修约成两位有效数字(见表 1 之例 4)。

8.4 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,并修约成两位有效数字(见表 1 之例 5)。

8.5 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 之例 6)。

8.6 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 之例 7)。

表 1

例次	稀释度及菌落数			两稀释度菌落之比	菌落群总数 (个/mL)	报告方式 (个/mL)
	$\times 10^{-1}$	$\times 10^{-2}$	$\times 10^{-3}$			
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	—	<10	<10
7	0	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活的活细胞的数目。

9.2 标准平皿计数的正确度随着平行样皿的增加而增加,当使用五个平行皿、每皿加 1 mL 样品时测定结果的置信度为 95 %。

中 华 人 民 共 和 国
化 工 行 业 标 准
工业循环冷却水异养菌菌数测定 平皿计数法
HG/T 4207—2011
出版发行:化学工业出版社
(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)
化学工业出版社印刷厂
880mm×1230mm 1/16 印张 1/2 字数 7 千字
2012 年 3 月北京第 1 版第 1 次印刷
书号:155025·1215

购书咨询:010-64518888
售后服务:010-64518899
网址:<http://www.cip.com.cn>
凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定价:10.00 元

版权所有 违者必究