

中华人民共和国城镇建设行业标准

生活垃圾渗沥水 总大肠菌群的检测 多管发酵法

Leachate—Detection for members of
the coliform group—Multiple—tube
fermentation method

CJ/T 3018.15—93

1 主题内容与适用范围

本标准规定了用多管发酵法检测渗沥水中总大肠菌群的方法。
本标准适用于从生活垃圾中渗出来的液体。

2 引用标准

GB 5750 生活饮用水标准检验法 总大肠菌群
GB 4789.3 食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定

3 术语

总大肠菌群系指一群需氧及兼性厌氧的，在37℃生长时能使乳糖发酵，在24h内产酸、产气的革兰氏阴性无芽孢杆菌。

总大肠菌群数系以每升渗沥水样品内，总大肠菌群的最可能数（MPN）表示。

4 原理

根据总大肠菌群具有的生物特征，如革兰氏阴性无芽孢杆菌，在37℃于乳糖内培养能发酵，并在24h内产酸、产气的特点，将不同稀释度的试样接种到具有选择性的乳糖培养基中，经培养后根据阳性反应结果，测出原试样中总大肠菌群的MPN值。

5 培养基和试剂

本标准所用试剂，除另有说明外，均为符合国家标准或行业标准的化学纯试剂和生化试剂，均用蒸馏水或去离子水。

5.1 乳糖蛋白胨培养液

5.1.1 成份： 蛋白胨 10g

中华人民共和国建设部 1993-05-03 批准

1993-09-07 实施

牛肉膏	3g
乳糖	5g
氯化钠	5g
1.6%溴甲酚紫乙醇溶液	1mL
蒸馏水	1000mL

5.1.2 制法

将蛋白胨、牛肉膏、乳糖及氯化钠置于1000mL蒸馏水中加热溶解，调整pH为7.2~7.4，再加入1mL1.6%溴甲酚紫乙醇溶液，充分混匀，分装于装有倒管的试管中，置高压蒸汽灭菌器中，以115℃灭菌20min，贮存于冷暗处备用。

5.2 三倍浓缩乳糖蛋白胨培养液

按上述乳糖蛋白胨培养液（5.1）浓缩三倍配制。

5.3 品红亚硫酸钠培养基

5.3.1 成份：	蛋白胨	10g
	乳糖	10g
	磷酸氢二钾	3.5g
	琼脂	15~30g
	蒸馏水	1000mL
	无水亚硫酸钠	~5g
	5%碱性品红乙醇溶液	20mL

5.3.2 储备培养基的制备

先将琼脂加至900mL蒸馏水，加热溶解，然后加入磷酸氢二钾及蛋白胨，混匀使其溶解。再用蒸馏水补足到1000mL，调整pH为7.2~7.4，趁热用脱脂棉或绒布过滤，再加入乳糖，混匀后定量分装于烧瓶内，置高压蒸汽灭菌器中以115℃灭菌20min，贮存于冷暗处备用。

5.3.3 平板培养基的配制

将上法制备的储备培养基（5.3.2）加热融化，根据烧瓶内培养基的容量，用灭菌吸管按比例吸取一定量的5%碱性品红乙醇溶液，置于灭菌空试管中，再按比例称取所需的无水亚硫酸钠置于另一个灭菌空试管内，加灭菌水少许使其溶解后，置于沸水浴中煮沸10min以灭菌。

用灭菌吸管吸取已灭菌的亚硫酸钠溶液，滴加于碱性品红乙醇溶液内至深红色褪成淡粉红色为止。将此亚硫酸钠与碱性品红的混合液全部加入已融化的储备培养基内，并充分混匀（防止产生气泡），立即将此培养基适量倾入于已灭菌的空平皿内，待其冷却凝固后，倒置冰箱内备用。此种已制成的培养基于冰箱内保存应小于两星期，如培养基已由淡红色变成深红色，则不能再用。

5.4 伊红美蓝培养基

5.4.1 成份：	蛋白胨	10g
	乳糖	10g

磷酸氢二钾	2g
琼脂	20~30g
蒸馏水	1000mL
2%伊红水溶液	20mL
0.5%美蓝水溶液	13mL

5.4.2 储备培养基的制备

先将琼脂加至900mL蒸馏水，加热溶解，然后加入磷酸氢二钾及蛋白胨，混匀使之溶解，再用蒸馏水补足到1000mL，调整pH为7.2~7.4，趁热用脱脂棉或绒布过滤，再加入乳糖，混匀后定量分装于烧瓶内，置高压蒸汽灭菌器中以115℃灭菌20min，贮存于冷暗处备用。

5.4.3 平板培养基的配制

将上法制备的储备培养基（5.4.2）加热融化，根据烧瓶内培养基的容量，用灭菌吸管按比例分别吸取一定量已灭菌的2%伊红水溶液及一定量已灭菌的0.5%美蓝水溶液，加入已融化的储备琼脂内，并充分混匀（防止产生气泡），立即将此种培养基适量倾入于已灭菌的空平皿内，待其冷却凝固后，倒置冰箱内备用。

5.5 生理盐水

将8.50~9.50g氯化钠（NaCl）溶于水中，稀释成1000mL，摇匀。pH值应为4.5~7.0。

6 仪器、设备

- 6.1 高压蒸汽灭菌器。
- 6.2 干燥箱：最高工作温度300℃。
- 6.3 恒温培养箱： $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 。
- 6.4 冰箱。
- 6.5 恒温水浴： $46 \pm 1^\circ\text{C}$ 。
- 6.6 生物显微镜。
- 6.7 稀释瓶：125mL小口玻璃方瓶。
- 6.8 玻璃试管：18×180mm。
- 6.9 玻璃倒管：3×30mm
- 6.10 刻度吸管：1mL，10mL，分度至0.1mL。
- 6.11 载玻片。
- 6.12 平皿：直径90mm。
- 6.13 接种环：直径3mm。
- 6.14 酒精灯。

7 样品

供总大肠菌群检测的渗沥水实验室样品量约需100mL，用经灭菌处理过的玻璃瓶采集。采样后应尽快检测，在2h内不能处理时，应置于2~5℃冷藏，最长保存时间为6h。