

中华人民共和国国家标准

工业循环冷却水中硫酸盐还原菌的测定 MPN 法

GB/T 14643.5—93

Industrial circulating cooling water—Sulfate-reducing 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硫酸盐还原菌的测定方法。

本标准适用于工业循环冷却水中硫酸盐还原菌的测定,也适用于原水、生活用水及粘泥中硫酸盐还原菌的测定。

2 引用标准

GB 603 化学试剂 试验方法所用试剂及制品的制备

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 21d,如果试管内产生黑色沉淀并伴有硫化氢臭味的表明阳性反应,采用 MPN 技术对被测试样中的硫酸盐还原菌进行计数。

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 中三级水的规格。

- 4.1 磷酸氢二钾(HG 3—1228);
- 4.2 氯化铵(GB 658);
- 4.3 硫酸钠(GB 9853);
- 4.4 氯化钙;
- 4.5 硫酸镁(GB 671);
- 4.6 乳酸钠;
- 4.7 酵母汁:生化试剂;
- 4.8 硫酸亚铁铵(GB 661);
- 4.9 维生素 C;
- 4.10 氯化钠(GB 1266);
- 4.11 氢氧化钠(GB 629):40g/L 溶液;
- 4.12 盐酸(GB 622):1+11 溶液;
- 4.13 硫代硫酸钠(GB 637);
- 4.14 乙醇(GB 678):75%(V/V)溶液;
- 4.15 牛皮纸;
- 4.16 医用脱脂棉。

国家技术监督局 1993-08-06 批准

1994-07-01 实施

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;
- 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 电热恒温水浴锅:恒温范围 $(37\sim 100)\pm 1^{\circ}\text{C}$;
- 5.6 刻度吸管:1mL;
- 5.7 刻度吸管:5mL;
- 5.8 试管:150mm \times 15mm 并配上密封的塞子;
- 5.9 试管架;
- 5.10 刻度三角瓶:500mL;
- 5.11 磨口三角瓶:100mL;
- 5.12 磨口试剂瓶:1 000mL;
- 5.13 容量瓶:1 000mL。

6 试验前准备

6.1 无菌水的制备

将水分装在 100mL 磨口三角瓶中,每瓶 40mL,每个三角瓶塞子和瓶口间插入一小纸片来防止粘连,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 $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15min。

6.2 培养基的制备

6.2.1 称取下列试剂:

| | |
|-------|-------|
| 磷酸氢二钾 | 0.5g; |
| 氯化铵 | 1.0g; |
| 硫酸钠 | 0.5g; |
| 氯化钙 | 0.1g; |
| 硫酸镁 | 2.0g; |
| 乳酸钠 | 3.5g; |
| 酵母汁 | 1.0g; |

将上述试剂溶解在 1 000mL 水中,用氢氧化钠溶液(4.11)或盐酸溶液(4.12)调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,并分装在 500mL 刻度三角瓶中,每瓶不超过 350mL,瓶口塞上棉塞,并用牛皮纸包好,用蒸汽压力灭菌器 $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15min。

6.2.2 硫酸亚铁铵溶液:在培养基使用的当天称取 1.2g 硫酸亚铁铵,在无菌箱(室)内均匀地摊在离紫外线灯 30cm 处灭菌 30min,在无菌操作下,把硫酸亚铁铵溶解于事先准备好的无菌水(6.1)中,混匀。

6.2.3 维生素 C 溶液:在培养基使用的当天称取 0.4g 维生素 C,在无菌箱(室)内均匀地摊在离紫外线灯 30cm 处灭菌 30min。在无菌操作下,把维生素 C 溶解于事先准备好的无菌水(6.1)中,混匀。

6.2.4 在无菌操作下,按每 100mL 培养基(6.2.1)各加入 1.0mL 硫酸亚铁铵溶液(6.2.2)和 1.0mL 维生素 C 溶液(6.2.3)。

6.3 无菌稀释水的制备

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

6.3.2 将生理盐水(6.3.1)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,每个瓶子的瓶口均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。

6.4 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 10~15mm,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 40~50mm 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,粗端用多余纸条折叠打结,不使散开。标上度量,若干支扎成一束,置电热干燥箱中,于 $160 \pm 2^\circ\text{C}$ 灭菌 2h。

6.5 试管的灭菌

将洗净并烘干后的试管塞上密封的塞子,数支一捆,每捆管口用牛皮纸包扎,置电热干燥箱中,于 $160 \pm 2^\circ\text{C}$ 灭菌 2h。

6.6 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。

6.7 硫代硫酸钠灭菌

将硫代硫酸钠放在无菌箱(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,在取样过程中,要保护瓶口和颈部,防止这些部分受杂菌污染,瓶内要灌满水样。

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(6.6)中加入硫代硫酸钠(6.7),加入量为每升水样约 0.1g。

7.1.3 水样采集后,应立即进行测定,如果在 2h 内不能进行测定,应把水样放在冰箱中,于 $4 \sim 10^\circ\text{C}$ 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,于 30°C 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)乙醇溶液浸泡的医用脱脂棉球擦手,点燃无菌箱(室)内的酒精灯。

7.3.2~7.3.7 条操作应在无菌箱(室)内火焰区进行。

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硫酸盐还原菌生长,在空白稀释水样瓶(6.3)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(6.4)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)分别接种于无菌试管(6.5)中,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 另取一组试管不接水样作为空白。

7.3.7 用事先在水浴上加热至 60°C ,并迅速冷却到 20°C 的无菌培养基(6.2.4)灌满试管(7.3.5)(7.3.6)盖上密封盖子。

7.4 培养