

表 1

示 例	稀释度及菌落数			两稀释度 菌落数之比	土壤真菌总数 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	—	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%。



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 14643.4—2009  
代替 GB/T 14643.4—1993

## 工业循环冷却水中菌藻的测定方法 第 4 部分:土壤真菌的测定 平皿计数法

Examination of bacteria and algae in industrial circulating cooling water—  
Part 4: Examination of soil fungi—Standard of plate count



GB/T 14643.4—2009

版权专有 侵权必究

\*

书号:155066·1-38015

定价: 14.00 元

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

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 ℃~10 ℃ 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 ℃左右活化 4 h~5 h 再进行测定。

7.2 无菌箱(室)灭菌

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倍数。

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<sup>-1</sup>。

7.3.4 另取一支 5 mL 无菌吸管吸取 5 mL 10<sup>-1</sup>水样注入到第二个稀释水中,充分摇匀,此时稀释度为 10<sup>-2</sup>,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±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 土壤真菌的总数以 ρ 表示,单位为个每毫升(个/mL),按式(1)计算:

ρ = X<sub>1</sub> / F ..... (1)

式中:

X<sub>1</sub>——计数得出的培养皿上长出的平均菌落数,个;

F——计数组的样品稀释倍数。

中华人民共和国  
国家标准  
工业循环冷却水中菌藻的测定方法  
第 4 部分:土壤真菌的测定 平皿计数法  
GB/T 14643.4—2009  
\*  
中国标准出版社出版发行  
北京复兴门外三里河北街 16 号  
邮政编码:100045  
网址 www.spc.net.cn  
电话:68523946 68517548  
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷  
各地新华书店经销  
\*  
开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 9 千字  
2009 年 7 月第一版 2009 年 7 月第一次印刷  
\*  
书号:155066·1-38015 定价 14.00 元  
  
如有印装差错 由本社发行中心调换  
版权专有 侵权必究  
举报电话:(010)68533533

- 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 搪瓷量杯:1 000 mL。
- 5.7 磨口三角瓶:1 000 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 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 在电炉上加热溶解后,趁热用四层医用脱脂纱布过滤到搪瓷量杯中,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于搪瓷量杯中,用热水补充至 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 2/3,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,若干支捆成一束,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 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,置电热干燥箱中于(160±2)℃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,以备测定前摇动。

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中加入灭过菌的硫代硫酸钠,加入量为每升水样约 0.1 g。

## 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 4 部分。

本部分代替 GB/T 14643.4—1993《工业循环冷却水中土壤真菌的测定 平皿计数法》。

本部分与 GB/T 14643.4—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:白莹、张全、邵宏谦。

本部分于 1993 年首次发布。