

ICS 13.060.50

Z 16

SL

中华人民共和国水利行业标准

SL 355—2006

水质 粪大肠菌群的测定—— 多管发酵法

**Water quality—Determination of multi—tube
zymotechnique fecal coliform group**

2007-02-02 发布

2007-05-02 实施

中华人民共和国水利部 发布

https://www.sljzjxx.com
水利造价信息网

中华人民共和国水利部

关于批准发布水利行业标准的公告

2007 年第 1 号

中华人民共和国水利部批准以下 12 项标准为水利行业标准，现予以公布。

二〇〇七年二月二日

<http://www.slzjxx.com>
水利造价信息网

序号	标准名称	标准编号	替代标准号	发布日期	实施日期
1	沙棘原果汁	SL 353—2006		2007.02.02	2007.05.02
2	水质 初级生产力测定——“黑白瓶”测定法	SL 354—2006		2007.02.02	2007.05.02
3	水质 粪大肠菌群的测定——多管发酵法	SL 355—2006		2007.02.02	2007.05.02
4	水泵模型及装置模型验收试验规程	SL 140—2006	SL 140—97	2007.02.02	2007.05.02
5	小型水电站建设项目建议书编制规程	SL 356—2006		2007.02.02	2007.05.02
6	农村水电站可行性研究报告编制规程	SL 357—2006		2007.02.02	2007.05.02
7	农村水电站施工环境保护导则	SL 358—2006		2007.02.02	2007.05.02
8	水利水电工程环境保护概估算编制规程	SL 359—2006		2007.02.02	2007.05.02
9	地下水监测站建设技术规范	SL 360—2006		2007.02.02	2007.05.02
10	大坝观测仪器 位移计	SL 361—2006		2007.02.02	2007.05.02
11	大坝观测仪器 测斜仪	SL 362—2006		2007.02.02	2007.05.02
12	大坝观测仪器 锚杆测力仪	SL 363—2006		2007.02.02	2007.05.02

<http://www.slzjxx.com>
 水利造价信息网

目 次

前言

1 范围	6
2 方法原理	6
3 试验条件与环境	6
4 仪器设备	6
5 培养基	6
6 革兰氏染色试剂	7
7 试验步骤	8
8 结果计算	9
9 注意事项	9

http://www.slzjxx.com
水利造价信息网

前 言

本标准是根据中华人民共和国水利部技术标准编制工作计划安排进行制定的。

本标准的体例格式遵循 GB/T 1.1—2000 《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写规则》的规定。

本标准的主要内容包括：范围、方法原理、试验条件与环境、仪器设备、培养基、革兰氏染色试剂、试验步骤、结果计算及注意事项。

本标准批准部门：中华人民共和国水利部。

本标准由水利部水文局提出并归口。

本标准主持机构：水利部水文局。

本标准解释单位：水利部水文局。

本标准主编单位：北京市水文总站。

本标准出版、发行单位：中国水利水电出版社。

本标准主要起草人：秦斌、王建厅、高俊杰、冯伶亲、武佃卫。

本标准审查会议技术负责人：齐文启。

本标准体例格式审查人：曹阳。

http://www.slzjxx.com
水利造价信息网

水质 粪大肠菌群的测定——多管发酵法

1 范围

本标准规定了水中粪大肠菌群的多管发酵测定方法。

本标准适用于地表水、地下水、生活饮用水等，特别是浑浊度高的水中粪大肠菌群的测定。

2 方法原理

用提高培养温度的方法将自然环境中的大肠菌群与粪便中的大肠菌群区分开。在 44.5°C 仍能生长的大肠菌群，称为粪大肠菌群。

3 试验条件与环境

试验环境应符合《实验室 生物安全通用要求》(GB 19489—2004) 要求，试验过程要在无菌条件下进行。

4 仪器设备

4.1 显微镜

4.2 高压蒸汽灭菌器

4.3 干热灭菌箱

4.4 恒温培养箱 ($37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$)

4.5 恒温培养箱 ($44.5^{\circ}\text{C}\pm 0.2^{\circ}\text{C}$)

4.6 玻璃器皿 (需置于干热灭菌箱中, 160°C 灭菌 2h)

包括: 试管、平皿 (9cm)、锥形瓶、刻度吸管、倒管等。

4.7 接种针、载玻片等

4.8 酒精灯

4.9 紫外灭菌灯

4.10 pH 计

5 培养基

5.1 乳糖蛋白胨培养液

5.1.1 成分

蛋白胨: 10g

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 制备方法

将蛋白胨、牛肉膏、乳糖及氯化钠置于 1000mL 蒸馏水中加热溶解, pH 值调整为 7.2~7.4, 再加入 1mL 1.6% 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, 115°C 灭菌 20min, 储存于冷暗处备用。

5.2 浓乳糖蛋白胨培养液

按 5.1 中乳糖蛋白胨培养液组成，蛋白胨、牛肉膏、乳糖、氯化钠的 3 倍用量配制。

5.3 EC 培养液

5.3.1 成分

胰蛋白胨：20g
乳糖：5g
3 号胆盐或混合胆盐：1.5g
磷酸氢二钾：4g
磷酸二氢钾：1.5g
氯化钠：5g
蒸馏水：1000mL

5.3.2 制备方法

将 5.3.1 中各成分加热溶解于蒸馏水中，pH 值调整为 6.9 ± 0.2 ，然后分装于带有倒管的试管中，置高压蒸汽灭菌器， 115°C 高压灭菌 20min，储存于冷暗处备用。

5.4 伊红美蓝琼脂培养基

5.4.1 成分

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，再以蒸馏水补足至 1000mL，pH 值调整为 7.2~7.4。趁热用脱脂棉或多层纱布过滤，再加入乳糖，混匀后定量分装于锥形瓶内，置高压蒸汽灭菌器中， 115°C 灭菌 20min，储存于冷暗处备用。

5.4.3 平皿培养基的配制

将按 5.4.2 制备的储备培养基加热融化，无菌操作，根据锥形瓶内培养基的容量，用灭菌吸管按比例分别吸取已灭菌的 2% 伊红水溶液和 0.5% 美蓝水溶液，加入已融化的储备培养基内，并充分混匀（防止产生气泡），待其冷却至 44.5°C 后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，倒置于冰箱内备用。

6 革兰氏染色试剂

6.1 染色液

结晶紫溶液：结晶紫乙醇饱和溶液（取结晶紫约 4~8g，溶于 95% 乙醇 100mL 中）20mL，1% 草酸铵溶液 80mL，将两种溶液混合，过滤。

6.2 助染剂

碘：1g
碘化钾：2g
蒸馏水：300mL

将碘与碘化钾先行混合，加入少许蒸馏水，充分振摇，待完全溶解后再加入其余的蒸馏水，当溶液由棕黄色变为淡黄色时即应弃取。

6.3 脱色剂

95%乙醇。

6.4 复染剂

沙黄：0.25g

95%乙醇：10mL

蒸馏水：90mL

将沙黄溶于乙醇中，待完全溶解后加入蒸馏水。

7 试验步骤**7.1 水样的采集和保存****7.1.1 水样的采集**

采样瓶使用 500mL 已灭菌的磨口玻璃塞广口瓶，采集水样时，应避免瓶盖及瓶子颈部受杂菌污染。

灭菌后的采样瓶 2 周内未使用，需重新灭菌。

7.1.2 水样的保存

采集好的水样需放置约 4℃ 冷藏设备内保存运输。一般要求在采集 4h 内测定。

7.2 水样接种量**7.2.1 生活饮用水**

接种水样总量 300mL，在 2 个装有已灭菌 50mL 浓乳糖蛋白胨培养液的大试管或锥形瓶中（内有倒管），以无菌操作各加入水样 100mL，在 10 支装有已灭菌 5mL 浓乳糖蛋白胨培养液的试管中（内有倒管），以无菌操作各加入水样 10mL。

7.2.2 受到不同程度污染的水

将水样充分混匀后，根据水样污染程度确定水样接种量。每个水样至少用 3 个不同的水样量接种。同一接种量要有 5 管。

未受污染的水样接种量为 10mL、1mL、0.1mL。受污染水样接种量应根据污染程度加大稀释度，可接种 1mL、0.1mL、0.01mL 或接种 0.1mL、0.01mL、0.001mL 等。

如果体积为 10mL，则试管内应装有浓乳糖蛋白胨培养液 5mL，如接种量不多于 1mL，则可接种于乳糖蛋白胨培养液 10mL 中。使用的水样量可参考表 1。

表 1 接种用水量参考表

水样种类	接种量 (mL)							
	10	1	0.1	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
较清洁水	✓	✓	✓					
一般污染水		✓	✓	✓	✓	✓		
严重污染水					✓	✓	✓	

以接种水样量 10mL、1mL、0.1mL 为例：

于各装有 5mL 浓乳糖蛋白胨培养液的 5 个试管中（内有倒管），以无菌操作各加入 10mL 水样；于各装有 10mL 乳糖蛋白胨培养液的 5 个试管中（内有倒管），以无菌操作各加入 1mL 水样；于各装有 10mL 乳糖蛋白胨培养液的 5 个试管中（内有倒管），以无菌操作各加入 1mL 1:10 稀释水样。共计 15 管，3 个稀释度。

7.3 初发酵试验

将已接种的水样混匀后置于 37℃ 恒温内培养 24h±2h。产气和产酸的发酵管表明试验阳性。如果

倒管产气不明显，可轻拍试管，有小气泡升起的为阳性。

7.4 复发酵试验

轻微振荡初发酵试验阳性结果的发酵管，用 3mm 接种环或灭菌棒将培养物转接到 EC 培养液中，在 44.5℃ 恒温培养 24h±2h，培养后立即观察，发酵管产气表明确信试验阳性。

7.5 平板分离

将产气发酵管接种于伊红美蓝培养基上，置 44.5℃ 培养 18~24h，凡出现下列特征的典型菌落，证实为粪大肠菌群阳性：

- 深紫黑色，具有金属光泽的菌落；
- 紫黑色，不带或略带金属光泽的菌落；
- 淡紫黑色，中心色较深的菌落。

挑取菌落的一小部分进行涂片，革兰氏染色，显微镜下镜检。

8 结果计算

8.1 以 7.2.1 为水样接种量，根据试管有粪大肠菌群存在的阳性管数查表 2，报告每升水样中的粪大肠菌群数。

表 2 粪大肠菌群检数表

10mL 水量的阳性管数	100mL 水量的阳性管（瓶）数		
	0	1	2
	每 1L 水样中粪大肠菌群数	每 1L 水样中粪大肠菌群数	每 1L 水样中粪大肠菌群数
0	<3	4	11
1	3	6	18
2	7	13	27
3	11	18	36
4	14	24	52
5	18	30	70
6	22	36	92
7	27	43	120
8	31	51	161
9	36	60	230
10	40	69	>230

注：接种水样总量 300mL，其中 2 份 100mL、10 份 10mL。

8.2 以 7.2.2 为水样接种量，根据试管有粪大肠菌群存在的阳性管数查表 3，报告每 100mL 水样中的粪大肠菌群数。

如果接种的水样量不是 10mL、1mL、0.1mL，而是较低或较高的 3 个浓度的水样量，也可根据粪大肠菌群最可能数检数表，按照 3 个浓度阳性管数，查表 3 求得粪大肠菌群最可能数（MPN 指数），再经式（1）换算成每 100mL 的粪大肠菌群最可能值（MPN 值）：

$$MPN \text{ 值} = MPN \text{ 指数} \times \frac{10(\text{mL})}{\text{接种量最大的一管}(\text{mL})} \dots\dots\dots (1)$$

报告 1L 水样粪大肠菌群数，MPN 值再乘 10，即为 1L 水样中的粪大肠菌群数。

9 注意事项

9.1 水样在采集、运输、保存、测定过程中应不受污染。

表 3 粪大肠菌群最可能数 (MPN) 检数表

出现阳性份数			每 100mL 水样中粪大肠 菌群数的最可能数	出现阳性份数			每 100mL 水样中粪大肠 菌群数的最可能数
10mL 管	1mL 管	0.1mL 管		10mL 管	1mL 管	0.1mL 管	
0	0	0	<2	4	2	1	26
0	0	1	2	4	3	0	27
0	1	0	2	4	3	1	33
0	2	0	4	4	4	0	34
1	0	0	2	5	0	0	23
1	0	1	4	5	0	1	34
1	1	0	4	5	0	2	43
1	1	1	6	5	1	0	33
1	2	0	6	5	1	1	46
2	0	0	5	5	1	2	63
2	0	1	7	5	2	0	49
2	1	0	7	5	2	1	70
2	1	1	9	5	2	2	94
2	2	0	9	5	3	0	79
2	3	0	12	5	3	1	110
3	0	0	8	5	3	2	140
3	0	1	11	5	3	3	180
3	1	0	11	5	4	0	130
3	1	1	14	5	4	1	170
3	2	0	14	5	4	2	220
3	2	1	17	5	4	3	280
3	3	0	17	5	4	4	350
4	0	0	13	5	5	0	240
4	0	1	17	5	5	1	350
4	1	0	17	5	5	2	540
4	1	1	21	5	5	3	920
4	1	2	26	5	5	4	1600
4	2	0	22	5	5	5	≥2400

注：接种水样总量 55.0mL，其中 5 份 10mL、5 份 1mL、5 份 0.1mL。

9.2 试验过程中所用玻璃器皿均应要求无菌。

9.3 带菌培养基应灭菌后再弃去，其他遵守实验室安全制度。

9.4 检验开始前应充分振摇混合水样，以保证粪大肠菌群数量的准确性。

9.5 对于污染严重的水样，为了保证在接种后得到一个合适范围的阳性结果，应设置不少于 4 个的连续稀释度；当 4 个连续稀释度的最低管或全部呈现阳性，应加大稀释度。

9.6 若复发酵试验阳性结果明显，平板分离试验可以省略。