

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。

8 步骤

8.1 准备工作

8.1.1 工作室及操作台经清扫后,用紫外线灭菌10min。

8.1.2 玻璃器皿置于干燥箱中于160℃灭菌2h。

8.1.3 将装有90mL生理盐水的稀释瓶和9mL生理盐水的试管,前者瓶口橡皮塞衬上滤纸条,后者管口塞上棉花球,置高压蒸汽灭菌器(6.1)内,于121℃灭菌20min,冷却待用。

8.2 试样稀释

8.2.1 以无菌操作,吸取经充分混匀的试样10mL于盛有90mL灭菌生理盐水的稀释瓶(8.1.3)中,充分混匀后就成了1:10的稀释液。

8.2.2 吸取1:10稀释液1mL,沿管壁徐徐注入盛有9mL灭菌生理盐水的试管中,混匀成1:100的稀释液。

8.2.3 按上述操作进行10倍递增稀释,每递增稀释1次,随即换用1支1mL灭菌刻度吸管。

8.3 发酵试验

以无菌操作,选择适宜的四个连续稀释试样1mL,接种到各装有10mL乳糖蛋白胨培养液(5.1)的试管(内有倒管)中,若其中取10mL原试样,则需注入装有5mL三倍浓缩乳糖蛋白胨培养液(5.2)的试管(内有倒管)中,混匀后置于 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 的恒温培养箱内培养 $24 \pm 2\text{h}$ 。

8.4 平板分离培养

取出经培养24h后的发酵试管,将产酸产气及只产酸的发酵管,分别接种于品红亚硫酸钠平板培养基(5.3.3)或伊红美蓝平板培养基(5.4.3)上,再置于 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温培养箱内培养18~24h。挑选符合下列特征的菌落,取菌落的一半进行涂片。革兰氏染色、镜检(见附录A)。

品红亚硫酸钠培养基上的菌落:

紫红色,具有金属光泽的菌落。

深红色,不带或略带金属光泽的菌落。

淡红色,中心色较深的菌落。

伊红美蓝培养基上的菌落:

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。

淡紫红色,中心色较深的菌落。

8.5 证实试验

上述涂片、镜检的菌落,如为革兰氏阴性无芽孢杆菌,则挑取该菌落的另一半再接种于装有10mL普通浓度乳糖蛋白胨培养液(5.1)的试管(内有倒管)中,然后置于 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 $24 \pm 2\text{h}$ 。有产酸产气者,即证实有总大肠菌群存在。

9 报告方式

根据证实试验有总大肠菌群存在的阳性管数，查MPN检索表（表1），MPN值在100以内时，按实际取值表示，大于100时，用10的指数形式表示，并以每升渗沥水样品中的总大肠菌群的MPN值报告。

10 本标准未作规定的按GB 5750和GB 4789.3执行

表 1 大肠菌群最可能数(MPN)检索表

接种量, mL					MPN/1000mL			
$\times 10^2$...								
$\times 10^1$	10	1	0.1	0.01	$\times 10^{-2}$...	$\times 10^{-1}$	$\times 1$	$\times 10^1$... $\times 10^2$
$\times 1$	1	0.1	0.01	0.001				
$\times 10^{-1}$	0.1	0.01	0.001	0.0001				
...								
$\times 10^{-2}$								
—	—	—	—	—	9×10	$< 9 \times 10^2$	$< 9 \times 10^3$	
—	—	—	—	+	9×10	9×10^2	9×10^3	
—	—	—	+	—	9×10	9×10^2	9×10^5	
—	+	—	—	—	9.5×10	9.5×10^2	9.5×10^3	
—	—	—	+	+	1.8×10^2	1.8×10^3	1.8×10^4	
—	+	—	—	+	1.9×10^2	1.9×10^3	1.9×10^4	
—	+	—	+	—	2.2×10^2	2.2×10^3	2.2×10^4	
+	—	—	—	—	2.3×10^2	2.3×10^3	2.3×10^4	
—	+	—	+	+	2.8×10^2	2.8×10^3	2.8×10^4	
+	—	—	—	+	9.2×10^2	9.2×10^3	9.2×10^4	
+	—	—	+	—	9.4×10^2	9.4×10^3	9.2×10^4	
+	—	—	+	+	1.8×10^3	1.8×10^4	1.8×10^5	
+	+	—	—	—	2.3×10^3	2.3×10^4	2.3×10^5	
+	+	—	+	—	9.6×10^3	9.6×10^4	9.6×10^5	
+	+	+	—	—	2.38×10^4	2.38×10^5	2.38×10^6	
+	+	+	+	+	$> 2.38 \times 10^4$	$> 2.38 \times 10^5$	$> 2.38 \times 10^6$	

附录 A

革兰氏染色和镜检

(补充件)

A1 革兰氏染色

A1.1 染色液配制

A1.1.1 结晶紫染色液

结晶紫	1.0g
95%乙醇	20.0mL
1%草酸铵水溶液	80.0mL

将结晶紫完全溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

结晶紫溶液放置过久产生沉淀，不能再用。

A1.1.2 碘助染液

碘	1.0g
碘化钾	2.0g
蒸馏水	300.0mL

将碘和碘化钾先行混合，加少许蒸馏水充分振摇，待完全溶解后，再用蒸馏水稀释至300mL。

此溶液二星期内有效。当溶液由棕黄色变成淡黄色时，即应弃去。

A1.1.3 乙醇脱色液，95% (V/V) 乙醇。

A1.1.4 沙黄复染液

沙黄	0.25g
95%乙醇	10.0mL
蒸馏水	90.0mL

将沙黄溶于乙醇中，待完全溶解后，加入90mL蒸馏水。

A1.2 染色黄步骤

A1.2.1 涂片

用灼烧冷却后的接种环挑一环2%生理盐水于清洁无脂的载玻片上，再用接种环从培养18~24h符合菌落特征的平板中取菌落的一半沾于盐水滴的上端，烧去接种环上多余的菌落。然后用接种环将菌种在盐水中均匀涂开，要涂得薄些（形成可见的薄层），然后将标本向上，在火焰上方加温固定，干燥、冷却。

A1.2.2 染色

滴加结晶紫染色液，染色1min，倾去染色液，水洗。

滴加碘助染液，作用1min后倾去，水洗。

滴加乙醇脱色液，摇动载玻片，直至无紫色脱落为止（约30s），水洗。

滴加沙黄复染液，染色1min后倾去，水洗。

晾干，镜检。

A2 镜检

滴香柏油，在高倍油镜下观察，呈深紫色为革兰氏阳性菌，呈淡红色为革兰氏阴性菌。

附加说明：

本标准由建设部标准定额研究所提出。

本标准由建设部城镇环境卫生技术标准归口单位上海市环境卫生管理局归口。

本标准由上海市环境卫生设计科研所负责起草。

本标准主要起草人庄启化、章莉娜。

本标准委托上海市环境卫生设计科研所负责解释。

(京)新登字 035 号

中华人民共和国城镇建设行业标准
生活垃圾渗沥水理化分析和细菌学检验方法
CJ/T 3018.1~15—93

*

中国建筑工业出版社出版、发行(北京西郊百万庄)
新华书店经销
北京市顺义县燕华印刷厂印刷

*

开本: 787×1092 毫米 1/16 印张: 4 字数: 94 千字
1993 年12月第一版 1993 年12月第一次印刷
印数: 1—700册 定价: 2.75元
ISBN7—112—02158—8/TU·1656

(7178)

CJ/T 3018.1~15—93

ISBN7—112—02158—8/TU·1656
(7178) 定价：2.75 元

