

前 言

为贯彻执行《公共场所卫生管理条例》和 GB 9663~9673—1996、GB 16153—1996《公共场所卫生标准》，加强对公共场所卫生监督管理，特制定本标准。本标准中的方法是与 GB 9663~9673—1996、GB 16153—1996 相配套的监测检验方法。

本标准第一法为仲裁法。

本标准为首次发布。

本标准由中华人民共和国卫生部提出。

本标准起草单位：天津市卫生防疫站、中国预防医学科学院环境卫生监测所、江苏省卫生防疫站、北京市卫生防疫站、广东省卫生防疫站。

本标准主要起草人：张淑兰、陈西平、路金爽、封幼玲、高晖。

中华人民共和国国家标准

游泳池水微生物检验方法 大肠菌群测定

GB/T 18204.10—2000

Methods of microbiological examination for water in swimming pool
—Determination of *Coliform bacteria*

1 范围

本标准规定了游泳池水大肠菌群的测定方法。

本标准适用于游泳池水大肠菌群的测定。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB/T 18204.2—2000 公共场所茶具微生物检验方法 大肠菌群测定

3 定义

本标准采用下列定义。

大肠菌群 *coliform bacteria*

指一群在 36℃±1℃培养 24 h 能发酵乳糖、产酸、产气的需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽胞杆菌。

第一法 多管发酵法

4 仪器

见 GB/T 18204.2—2000 中第 3 章。

5 培养基和试剂

5.1 乳糖蛋白胨培养液

5.1.1 成分:蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
乳糖	5 g
氯化钠	5 g
1.6%(V/V)溴甲酚紫乙醇溶液	1 mL
蒸馏水	1 000 mL

三倍浓缩乳糖蛋白胨培养液按上述乳糖蛋白胨培养液浓缩三倍配制。

5.1.2 配法:将蛋白胨、牛肉膏、乳糖及氯化钠置于 1 000 mL 蒸馏水中加热溶解,调 pH 到 7.2~7.4。

国家质量技术监督局 2000-09-30 批准

2001-01-01 实施

再加入 1 mL 1.6% 溴甲酚指示剂,充分混匀,分装到含有倒管的试管中,115℃ 高压灭菌 15 min。

5.2 伊红美兰琼脂

见 GB/T 18204.3—2000 中第 4 章第 2 节。

5.3 革兰氏染色液

见 GB/T 18204.3—2000 中第 4 章第 4 节。

5.4 染色法

见 GB/T 18204.3—2000 中第 4 章第 5 节。

6 推测性试验

6.1 在 2 个装有 50 mL 三倍浓缩乳糖胆盐培养液的大试管或烧杯内各加入水样 100 mL。

6.2 在 10 支装有 5 mL 三倍浓缩乳糖胆盐培养液的试管里各加入水样 10 mL。

6.3 轻摇试管,使液体充分混匀,置 36℃ ± 1℃ 培养箱中,培养 24 h。

6.4 观察每管是否产气,如不产气则报告为大肠菌群阴性;若有气体产生则为推测性试验阳性,需做进一步的证实试验。

7 证实试验

7.1 平板分离

自推测性检验阳性管中取一接种环培养液,接种到伊红美蓝琼脂平板上,置 36℃ ± 1℃ 培养箱培养 18~24 h,观察菌落形态,典型的大肠菌群菌落为黑紫色或红紫色,具有金属光泽。

7.2 复发酵试验

挑取可疑大肠菌群菌落 1 或 2 个进行革兰氏染色,同时接种乳糖发酵管,于 36℃ ± 1℃ 培养箱中,培养 24 h。

7.3 凡乳糖发酵管最终产酸、产气,革兰氏染色为阴性的无芽胞杆菌,为大肠菌群阳性。记下证实试验的阳性管数,查总大肠菌群(MPN)检索表得出 1 000 mL 水样中总大肠菌群的 MPN 值。

表 1 总大肠菌群(MPN)检索表

100 mL 水量的 阳性管(瓶)数 10 mL 水量的 阳性管数	0	1	2
	每升水样中 总大肠菌群数	每升水样中 总大肠菌群数	每升水样中 总大肠菌群数
0	<3	4	11
1	3	8	18
2	7	13	27
3	11	18	38
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

第二法 滤膜法

8 仪器

8.1 滤器。

8.2 滤膜:孔径 0.45 μm 。直径根据滤器规格,目前常用的有 35 mm 和 47 mm 两种。

8.3 抽滤设备。

8.4 无齿镊子。

8.5 其他仪器见 GB/T 18204.2—2000 中第 3 章。

9 培养基

9.1 品红亚硫酸钠培养基

9.1.1 成分:

蛋白胨	10 g
酵母浸膏	5 g
牛肉膏	5 g
乳糖	10 g
琼脂	10~20 g
磷酸氢二钾	3.5 g
无水亚硫酸钠	5 g
5%碱性品红乙醇溶液	20 mL
蒸馏水	1 000 mL

9.1.2 储备培养基的制备

将磷酸氢二钾、酵母浸膏、牛肉膏及蛋白胨加到含有 900 mL 蒸馏水的烧杯中,溶解后调 pH 值到 7.2~7.4,加入琼脂加热溶解,用蒸馏水补足至 1 000 mL,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,115 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 20 min,置冷暗处备用。

9.1.3 平皿培养基的制备

将上述培养基加热融化,根据培养基的用量,碱性品红乙醇溶液与培养基按 1:50 的比例,用灭菌吸管吸取一定量的碱性品红溶液置于灭菌空试管中。再按 1:200 的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,在沸水浴中煮沸灭菌 10 min。

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中,并充分混匀(防止产生气泡),立即将此培养基适量倾入灭菌的空平皿内,待其冷却凝固后置冰箱内备用。此培养基于冰箱中保存不宜超过两周,如培养基已由淡红色变成深红色,则不能再用。

9.2 乳糖蛋白胨培养液

见 5.1。

10 操作步骤

10.1 滤膜灭菌:将滤膜放入含蒸馏水的烧杯中,煮沸灭菌三次,每次 15 min。前两次煮沸后需更换水洗涤 2~3 次,以除去残留溶剂。

10.2 滤器灭菌:用 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 20 min 或用点燃的酒精棉球火焰灭菌。

10.3 水样过滤:用无菌镊子夹取灭菌滤膜边缘部分,将粗糙面向上,贴放在滤床上。固定好滤器,将 100 mL 水样(如水样含菌数较多,可减少滤水样量或将水样稀释)注入滤器中,打开滤器阀门,在 $-0.5 \times 10^5 \text{ Pa}$ (-0.5 大气压)下抽滤。

10.4 培养:水样滤完后,再抽气约 5 s,关上滤器阀门,取下滤器。用灭菌镊子夹取滤膜边缘部分,移放在乳糖琼脂分离培养基上,滤膜截留细菌面向上,滤膜应与培养基完全贴紧,两者之间不得留有气泡。然后将平皿倒置,放入 36 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内培养 18~24 h。

10.5 挑取滤膜上符合下列特征的菌落进行革兰氏染色、镜检。

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。

10.6 将革兰氏染色为阴性的无芽胞杆菌接种到乳糖蛋白胨培养液中,于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。产酸产气者证实为大肠菌群阳性。

11 检验结果报告

计算滤膜上生长的证实为大肠菌群的菌落数,再乘以 10 即为每 1 000 mL 水样中的大肠菌群数。
