

DB37

山东省地方标准

DB37/T 4156—2020

水质 放线菌的测定 涂布平板法

Water quality—Determination of actinomycetes—Plate coating method

2020 – 09 – 25 发布

2020 – 10 – 25 实施

山东省市场监督管理局 发布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 方法原理 1

4 试剂和材料 1

5 仪器和设备 2

6 样品 2

7 分析步骤 3

8 结果计算与报告 3

9 精密度 4

10 质量保证和质量控制 4

11 废物处理 4

附录 A（资料性附录） 常见放线菌图片 5

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由山东省住房和城乡建设厅提出并组织实施。

本标准由山东省城镇给水排水标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：山东省城市供排水水质监测中心、潍坊市公用事业产品质量监测中心、国家城市供水水质监测网福州监测站、国家城市供水水质监测网武汉监测站、泰安市自来水有限公司水质检测中心、威海市水务水质检测中心有限公司。

本标准主要起草人：逯南南、贾瑞宝、孙韶华、赵清华、褚福敏、石近淼、田立平、朱光进、张颖、孙婷婷、陶妍、王涛、逯凯、肖润泽、兰榕星、邢峰杰。

水质 放线菌的测定 涂布平板法

1 范围

本标准规定了测定水中放线菌的涂布平板法。
本标准适用于生活饮用水及其水源水中放线菌的测定。
处理水样为1 L时，本方法的检测限为1 CFU/L。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。
GB/T 5750.2—2006 生活饮用水标准检验方法 水样的采集与保存
GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 方法原理

放线菌是一类革兰氏染色阳性、具有菌丝、菌丝直径为0.5 μm~0.8 μm的原核细胞型微生物，属于细菌范畴。用孔径为0.2 μm的聚碳酸酯膜过滤水样，对水中的放线菌进行浓缩富集，并用磷酸盐缓冲液（PBS）洗脱截留在膜上的放线菌，将洗脱液涂布于选择性培养基上，经28℃±1℃培养7 d后，计数平板上生长的典型放线菌菌落。

4 试剂和材料

- 4.1 重铬酸钾，纯度≥98%。
- 4.2 硫代硫酸钠，纯度≥98%。
- 4.3 硫代硫酸钠溶液：称取0.5 g 硫代硫酸钠（4.2），精确至0.1 g，溶于适量水中，定容至100 mL，121℃高压灭菌20 min，备用。
- 4.4 革兰氏染色试剂盒（市售）。
- 4.5 无菌水：实验用水，水质满足GB/T 6682 二级及以上分析实验室用水要求，经121℃高压蒸汽灭菌20 min，备用。
- 4.6 高氏一号培养基：每1 L培养基中其成分及含量如下：

淀粉	20 g
琼脂	20 g
硫酸亚铁	0.01 g
硫酸镁	0.5 g
磷酸氢二钾	0.5 g
氯化钠	0.5 g
硝酸钾	1 g

纯水 1 000 mL

将上述成分混合后，加热溶解，加入0.1 g重铬酸钾（4.1），混匀后分装，121 °C高压灭菌20 min。临用时加热融化琼脂，冷却至50 °C~55 °C，倾注平皿，冷凝备用。

也可以采用市售商品化培养基制品。

4.7 磷酸盐缓冲液：

氯化钠	8.01 g
氯化钾	0.2 g
磷酸氢二钠	1.44 g
磷酸二氢钾	0.24 g

上述成分溶解于950 mL的无菌水（4.5）中，用盐酸调节溶液pH值到7.4后加纯水定容至1 000 mL，121 °C高压灭菌20 min，备用。

4.8 聚碳酸酯滤膜：孔径 0.2 μm，直径 47 mm；121 °C高压灭菌 20 min。

4.9 链霉菌标准菌株，有证标准菌株。

4.10 大肠埃希氏菌标准菌株，有证标准菌株。

5 仪器和设备

5.1 恒温培养箱：允许温度偏差 28 °C±1 °C。

5.2 高压蒸汽灭菌器：121 °C可调。

5.3 真空抽滤装置。

5.4 显微镜：配备 10 倍目镜，10 倍、40 倍物镜。

5.5 电子天平：精确至 0.001 g。

5.6 移液枪：0 μL~200 μL。

5.7 漩涡振荡器。

5.8 镊子。

5.9 离心管：15 mL 和 1.5 mL。

6 样品

6.1 样品采集与保存

使用灭菌处理的玻璃瓶（也可选用有效期内市售无菌采样瓶和采样袋）采集水样，采样量不少于1 L。加入硫代硫酸钠溶液（4.3）去除残留余氯（每125 mL容积加入20 μL硫代硫酸钠溶液，水源水放线菌测定忽略此步），样品采集与保存按照GB/T 5750.2—2006中微生物指标要求执行。

6.2 样品富集

用无菌镊子（5.8）夹取滤膜（4.8）的边缘部分，贴放在灭菌的滤床上，稳妥的固定好真空抽滤装置（5.3）。将1 L水样注入滤器中，打开真空泵抽滤。

注：针对富集困难的样品，抽滤过程中可以更换滤膜（2~3张），或者适当减少抽滤体积。

6.3 洗脱

抽滤完毕，取下滤膜放到已灭菌的15 mL离心管（5.9）中，加入5 mL磷酸盐缓冲液（4.7）后，漩涡振荡器（5.7）上充分振荡5 min，使放线菌从膜上完全解离下来，得到浓缩液，待测。

7 分析步骤

7.1 梯度稀释

吸取100 μL 浓缩液（6.3）加入到盛有900 μL 磷酸盐缓冲液（4.7）的1.5 mL离心管（5.9）中，充分混匀配制成1:10的稀释液；吸取1:10的稀释液100 μL 加入到盛有900 μL 磷酸盐缓冲液（4.7）的1.5 mL离心管（5.9）中，充分混匀配制成1:100的稀释液；按同样方法稀释成1:1 000的稀释液备用。

7.2 涂布平板

分别取浓缩液原液、1:10的稀释液、1:100的稀释液、1:1 000的稀释液100 μL ，用无菌涂布器均匀涂布于高氏一号平板上，涂布时可转动培养皿，使菌液分布均匀。所有稀释度均需设置平行。

7.3 培养

将涂布好的平板放到隔水式恒温培养箱（5.1）中 $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倒置培养7 d。

7.4 染色与镜检

7.4.1 采用革兰氏染色试剂盒（4.4）对平板上生长的典型菌落进行革兰氏染色，并在显微镜（5.4）下对革兰氏阳性菌株进行菌丝体确认。能否产生菌丝体及由菌丝体分化产生的各种形态特征是放线菌分类鉴定的重要依据。

7.4.2 典型菌落通常具有以下特征，满足其一即可认定为典型菌落：

- a) 圆形、光滑或表面褶皱；
- b) 絮状、粉状或颗粒状；
- c) 菌落和培养基结合较紧密，菌落质地致密。

7.5 计数

根据染色结果对放线菌菌落进行计数。

8 结果计算与报告

8.1 稀释度的选择

8.1.1 选取放线菌菌落数在30~300之间的平板计算菌落数，若只有一个稀释度的平均菌落数符合此范围，则将该稀释度计数值按照公式计算报出结果。

8.1.2 若有两个稀释度，其菌落数均在30~300之间，则视两者之比值来决定，若其比值小于2，则取两者的平均数按照公式计算报出结果；若大于或等于2，则取其中稀释度较小的平均菌落数按照公式计算报出结果。

8.1.3 若所有稀释度的菌落数均大于300，则取稀释度最高的平均菌落数值按照公式计算报出结果。

8.1.4 若所有稀释度的菌落数均小于30，则取稀释度最低的平均菌落数值按照公式计算报出结果。

8.1.5 若所有稀释度的平板上均无菌落生长，则以“未检出”报告。

8.2 结果计算

根据鉴定结果，按照公式（1）计算放线菌菌落数，以每1 L水样中的放线菌菌落数报告。

$$\text{放线菌菌落数(CFU/L)} = \frac{M \times N \times V_1}{V \times V_2} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

M ——鉴定出的放线菌菌落数, CFU;

N ——浓缩液的稀释倍数;

V ——过滤水样体积, L;

V_1 ——浓缩液体积, mL;

V_2 ——涂板体积, mL。

8.3 结果报告

测定结果保留两位有效数字。当测定结果 ≥ 100 CFU/L时, 以科学计数法表示; 当测定结果低于检测限时, 则报“未检出”。

9 精密度

6家实验室对放线菌浓度 < 20 CFU/L的样品定性结果一致, 对浓度为 (20 ± 10) CFU/L、 (200 ± 100) CFU/L的两个样品7次重复测定, 相对标准偏差分别为3.2%~14.6%和0.8%~8.5%。

注: 微生物检测数据为偏态分布, 其测定结果全部以10取对数后进行计算。

10 质量保证和质量控制

10.1 空白对照

每批样品进行空白对照测定, 选用无菌水(4.5)按照6.2~6.3、7.2~7.5步骤进行空白对照测定。

10.2 阳性对照和阴性对照

定期使用链霉菌标准菌株(4.9)和大肠埃希氏菌标准菌株(4.10)作为阳性和阴性对照菌株, 对检测质量进行控制。将标准菌株制备成菌浓度 > 10 CFU/L的菌悬液, 按照6.2~6.3、7.2~7.5步骤进行分析测定, 阳性菌株呈阳性反应, 阴性菌株呈阴性反应。

10.3 干扰和消除

放线菌检测的过程中, 需在选择性培养基中加入重铬酸钾抑制其他细菌的生长, 重铬酸钾的加入量约为100 mg/L。

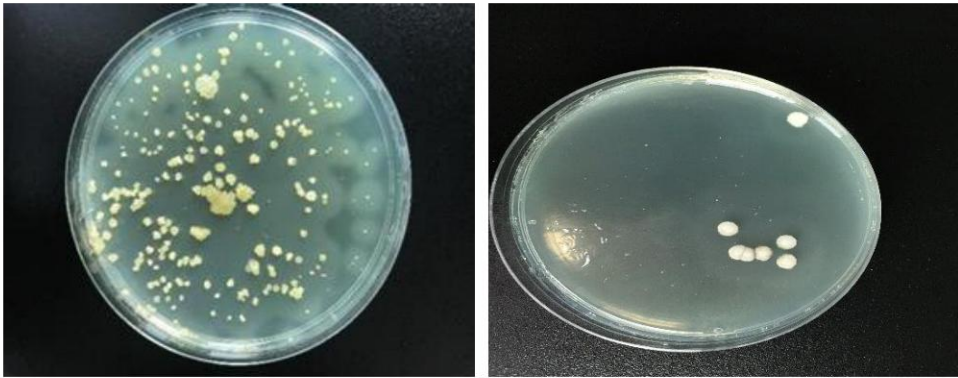
10.4 培养基质控

对每批次培养基须选用标准菌株进行培养基质量检验。

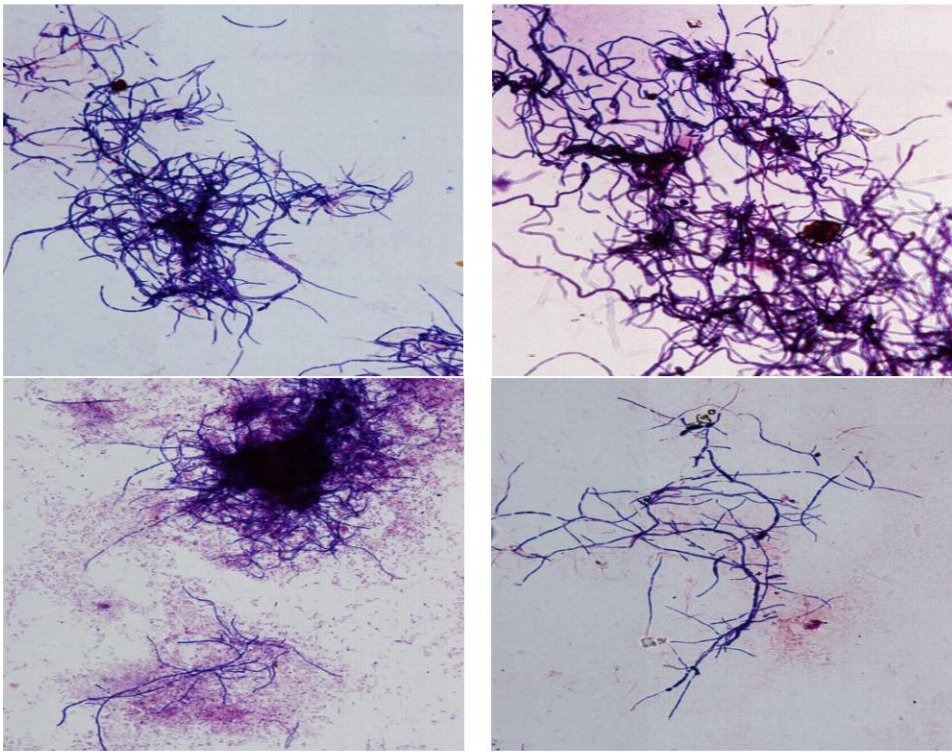
11 废物处理

实验中产生的废物经高压蒸汽灭菌器(5.2)121℃灭菌20 min后, 作为一般废物处理。

附 录 A
(资料性附录)
常见放线菌图片



表A. 1 放线菌菌落



表A. 2 放线菌镜检图片