

# 中华人民共和国国家标准

GB/T 5750.12—2023

代替 GB/T 5750.12—2006

## 生活饮用水标准检验方法 第 12 部分：微生物指标

Standard examination methods for drinking water—  
Part 12: Microbiological indices

2023-03-17 发布

2023-10-01 实施

国家市场监督管理总局 发布  
国家标准化管理委员会

## 目 次

前言 .....	I
引言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 菌落总数 .....	2
5 总大肠菌群 .....	9
6 耐热大肠菌群 .....	22
7 大肠埃希氏菌 .....	24
8 贾第鞭毛虫 .....	27
9 隐孢子虫 .....	44
10 肠球菌 .....	45
11 产气荚膜梭状芽孢杆菌 .....	53

## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件是 GB/T 5750《生活饮用水标准检验方法》的第12部分。GB/T 5750 已经发布了以下部分：

- 第1部分：总则；
- 第2部分：水样的采集与保存；
- 第3部分：水质分析质量控制；
- 第4部分：感官性状和物理指标；
- 第5部分：无机非金属指标；
- 第6部分：金属和类金属指标；
- 第7部分：有机物综合指标；
- 第8部分：有机物指标；
- 第9部分：农药指标；
- 第10部分：消毒副产物指标；
- 第11部分：消毒剂指标；
- 第12部分：微生物指标；
- 第13部分：放射性指标。

本文件代替 GB/T 5750.12—2006《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》，与 GB/T 5750.12—2006 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 增加了6个检验方法(见4.2、8.2、9.2、10.1、10.2、11.1)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华人民共和国国家卫生健康委员会提出并归口。

本文件起草单位：中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、中国科学院生态环境研究中心、吉林省疾病预防控制中心、北京市科学技术研究院分析测试研究所。

本文件主要起草人：施小明、姚孝元、张岚、唐宋、丁理、李霞、张晓、李红岩、刘思洁、高丽娟、张艳芬、赵薇、马凯。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 1985年首次发布为 GB/T 5750—1985，2006年第一次修订为 GB/T 5750.12—2006；
- 本次为第二次修订。

## 引 言

GB/T 5750《生活饮用水标准检验方法》作为生活饮用水检验技术的推荐性国家标准,与 GB 5749《生活饮用水卫生标准》配套,是 GB 5749 的重要技术支撑,为贯彻实施 GB 5749、开展生活饮用水卫生安全性评价提供检验方法。

GB/T 5750 由 13 个部分构成。

- 第 1 部分:总则。目的在于提供水质检验的基本原则和要求。
- 第 2 部分:水样的采集与保存。目的在于提供水样采集、保存、管理、运输和采样质量控制的基本原则、措施和要求。
- 第 3 部分:水质分析质量控制。目的在于提供水质检验检测实验室质量控制要求与方法。
- 第 4 部分:感官性状和物理指标。目的在于提供感官性状和物理指标的相应检验方法。
- 第 5 部分:无机非金属指标。目的在于提供无机非金属指标的相应检验方法。
- 第 6 部分:金属和类金属指标。目的在于提供金属和类金属指标的相应检验方法。
- 第 7 部分:有机物综合指标。目的在于提供有机物综合指标的相应检验方法。
- 第 8 部分:有机物指标。目的在于提供有机物指标的相应检验方法。
- 第 9 部分:农药指标。目的在于提供农药指标的相应检验方法。
- 第 10 部分:消毒副产物指标。目的在于提供消毒副产物指标的相应检验方法。
- 第 11 部分:消毒剂指标。目的在于提供消毒剂指标的相应检验方法。
- 第 12 部分:微生物指标。目的在于提供微生物指标的相应检验方法。
- 第 13 部分:放射性指标。目的在于提供放射性指标的相应检验方法。

# 生活饮用水标准检验方法

## 第 12 部分：微生物指标

### 1 范围

本文件描述了生活饮用水和水源水中菌落总数、总大肠菌群、耐热大肠菌群、大肠埃希氏菌、贾第鞭毛虫、隐孢子虫、肠球菌和产气荚膜梭状芽孢杆菌的测定方法。

本文件适用于生活饮用水和水源水中微生物指标的测定。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**菌落总数** *standard plate-count bacteria*

在一定条件下，经一定时间培养后所得 1 mL 水样中的微生物菌落个数。

#### 3.2

**总大肠菌群** *total coliforms*

一群在 37 ℃ 培养，24 h 内能发酵乳糖、产酸产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌。

#### 3.3

**耐热大肠菌群** *thermotolerant coliform bacteria*

一群在 44.5 ℃ 培养，24 h 内能发酵乳糖、产酸产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌。

#### 3.4

**大肠埃希氏菌** *Escherichia coli*

一群能发酵多种糖类、产酸产气、周身鞭毛、能运动、无芽孢的革兰氏阴性短杆菌，存在于人和温血动物肠道中。

#### 3.5

**贾第鞭毛虫** *Giardia*

一种可在水中或其他介质中发现的原虫类寄生虫，可感染人类致病。

注：贾第鞭毛虫孢囊呈椭圆形，长度为 8 μm~14 μm，宽度为 7 μm~10 μm，孢囊形成初期内部有 2 个细胞核，成熟后增加至 4 个细胞核。

3.6

**隐孢子虫 *Cryptosporidium***

一种可在水中或其他介质中发现的原虫类寄生虫,可感染人类致病。

注:隐孢子虫卵囊为稍微椭圆的圆形,直径 $4\ \mu\text{m}\sim 8\ \mu\text{m}$ ,成熟卵囊内部有4个细胞核。

3.7

**肠球菌 *Enterococcus***

一类成双或呈链状排列、兼性厌氧、无芽孢和荚膜的革兰氏阳性球菌,属D族链球菌,存在于人和温血动物的肠道中。

3.8

**产气荚膜梭状芽孢杆菌 *Clostridium perfringens***

一类能还原亚硫酸盐,具有芽孢的革兰氏阳性厌氧杆菌,存在于人和温血动物肠道中。

3.9

**最可能数 most probable number;MPN**

基于泊松分布,利用统计学原理,根据一定体积不同稀释度样品经培养后产生的目标微生物阳性数,估算一定体积样品中目标微生物存在的数量,即单位体积存在目标微生物的最大可能数。

4 菌落总数

4.1 平皿计数法

4.1.1 原理

1 mL水样在营养琼脂培养基上、在有氧条件下 $36\ \text{℃}\pm 1\ \text{℃}$ 培养48 h后,所得1 mL水样中的菌落总数的方法。

4.1.2 营养琼脂培养基

4.1.2.1 成分

按如下成分配制:

a) 蛋白胨	10.0 g
b) 牛肉膏	3.0 g
c) 氯化钠	5.0 g
d) 琼脂	10.0 g~20.0 g
e) 纯水	1 000 mL

4.1.2.2 制法

将上述成分混合后,加热溶解,调整pH为7.4~7.6,分装于玻璃容器中,经 $121\ \text{℃}$ 高压蒸汽灭菌20 min, $0\ \text{℃}\sim 4\ \text{℃}$ 冷藏保存。

4.1.3 仪器设备

4.1.3.1 高压蒸汽灭菌器。

4.1.3.2 培养箱: $36\ \text{℃}\pm 1\ \text{℃}$ 。

4.1.3.3 电炉。

4.1.3.4 电子天平。

4.1.3.5 冰箱。

4.1.3.6 放大镜或菌落计数器。

4.1.3.7 pH 计或精密 pH 试纸。

4.1.3.8 无菌试管、平皿(直径为 9 cm)、无菌吸管或移液器、采样瓶等。

#### 4.1.4 试验步骤

##### 4.1.4.1 生活饮用水

4.1.4.1.1 以无菌操作方法用无菌吸管或移液器吸取 1 mL 充分混匀的水样,注入无菌平皿中,倾注约 15 mL 已融化并冷却到 45 ℃ 左右的营养琼脂培养基,并立即旋摇平皿,使水样与培养基充分混匀。每次检验时应做一平行接种,同时另用一个平皿只倾注营养琼脂培养基作为空白对照。

4.1.4.1.2 待冷却凝固后,翻转平皿,使底面向上,置于 36 ℃ ± 1 ℃ 培养箱内培养 48 h ± 2 h,进行菌落计数,即为 1 mL 水样中的菌落总数。

##### 4.1.4.2 水源水

4.1.4.2.1 以无菌操作方法用无菌吸管或移液器吸取 1 mL 充分混匀的水样,注入盛有 9 mL 无菌生理盐水的试管中,混匀成 1:10 稀释液。

4.1.4.2.2 用无菌吸管或移液器吸取 1:10 的稀释液 1 mL 注入盛有 9 mL 无菌生理盐水的试管中,混匀成 1:100 稀释液。按同法依次稀释成 1:1 000、1:10 000 等稀释度的液体备用。每稀释一个稀释度,须更换一次 1 mL 无菌吸管或吸头。

4.1.4.2.3 用无菌吸管或移液器吸取 2 个~3 个适宜稀释度的水样 1 mL,分别注入无菌平皿内。以下操作同生活饮用水的检验步骤。

#### 4.1.5 试验数据处理

##### 4.1.5.1 结果报告

做平皿菌落计数时,可用眼睛直接观察,必要时用放大镜检查,以防遗漏。在记下各平皿的菌落数后,应求出同稀释度的平均菌落数,供下一步计算时使用。在求同稀释度的平均数时,若其中一个平皿有较大片状菌落生长时,则不宜采用,而应以无片状菌落生长的平皿作为该稀释度的平均菌落数。若片状菌落不到平皿的一半,而其余一半菌落数分布又很均匀,则可将此半皿计数后乘 2 以代表全皿菌落数。然后再求得该稀释度的平均菌落数。

##### 4.1.5.2 不同稀释度的选择及报告方法

4.1.5.2.1 选择平均菌落数在 30~300 之间者进行计算,若只有一个稀释度的平均菌落数符合此范围,则将该菌落数乘以稀释倍数报告结果(见表 1 中实例 1)。

4.1.5.2.2 若有两个稀释度,其生长的菌落数均在 30~300 之间,则视两者之比值来决定,若其比值小于 2,应报告两者的平均数(如表 1 中实例 2)。若大于或等于 2,则报告其中稀释度较小的菌落总数(如表 1 中实例 3 和实例 4)。

4.1.5.2.3 若所有稀释度的平均菌落数均大于 300,则应按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数报告结果(见表 1 中实例 5)。

4.1.5.2.4 若所有稀释度的平均菌落数均小于 30,则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数报告结果(见表 1 中实例 6)。

4.1.5.2.5 若所有稀释度的平均菌落数均不在 30~300 之间,则应以最接近 30 或 300 的平均菌落数乘以稀释倍数报告结果(见表 1 中实例 7)。

4.1.5.2.6 若所有稀释度的平板上均无菌落生长,则以未检出报告结果。

4.1.5.2.7 如果所有平板上都菌落密布,不要用“多不可计”报告,而应在稀释度最大的平板上,任意计数其中2个平板 $1\text{ cm}^2$ 中的菌落数,除2求出每平方厘米内平均菌落数,乘以皿底面积 $63.6\text{ cm}^2$ ,再乘其稀释倍数报告结果。

4.1.5.2.8 菌落计数的报告:菌落数在100以内时按实有数报告,大于100时,采用两位有效数字,在两位有效数字后面的数值,以四舍五入方法计算,为了缩短数字后面零的个数也可用10的指数来表示(见表1)。

表1 稀释度选择及菌落总数报告方式

实例	不同稀释度的平均菌落数			两个稀释度菌落数之比	菌落总数/(CFU/mL)	报告方式/(CFU/mL)
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$			
1	1 365	164	20	—	16 400	16 000 或 $1.6\times 10^4$
2	2 760	295	46	1.6	37 750	38 000 或 $3.8\times 10^4$
3	2 890	271	60	2.2	27 100	27 000 或 $2.7\times 10^4$
4	150	30	8	2	1 500	1 500 或 $1.5\times 10^3$
5	多不可计	1 650	513	—	513 000	510 000 或 $5.1\times 10^5$
6	27	11	5	—	270	270 或 $2.7\times 10^2$
7	多不可计	305	12	—	30 500	31 000 或 $3.1\times 10^4$

## 4.2 酶底物法

### 4.2.1 原理

利用复合酶技术,在培养基中加入多种独特的酶底物,每一种酶底物都针对不同的细菌酶设计,且包含最常见的介水传播的细菌,所有的酶底物在被分解时均产生相同的信号。水样检测过程中,水样中存在的细菌分解一种或者多种酶底物,之后产生一个相同的信号,在检测菌落总数时,这个信号即为在波长 $366\text{ nm}$ 紫外灯下所产生的荧光。使用基于复合酶底物技术(Multiple Enzyme Technology)的培养基,其中酶底物被微生物的酶水解,在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养48 h后能够最大限度地释放4-甲基伞形酮,4-甲基伞形酮在 $366\text{ nm}$ 紫外灯照射下发出蓝色荧光,对呈现蓝色荧光的培养盘孔槽计数并查阅MPN表,可以确定原始水样中最可能的菌落总数。本方法未稀释水样的检测范围为 $<738\text{ MPN/mL}$ 。

### 4.2.2 培养基与试剂

#### 4.2.2.1 复合酶底物培养基

##### 4.2.2.1.1 成分

可根据如下成分配制,也可选用符合质控要求的制品:

- |                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| a) 葡萄糖                      | 1.25 g    |
| b) 无水硫酸镁                    | 0.2 g     |
| c) 蛋白胨                      | 5.0 g     |
| d) 酵母提取物                    | 3.5 g     |
| e) 4-甲基伞形酮磷酸酯               | 0.037 5 g |
| f) 4-甲基伞形酮- $\beta$ -D-葡萄糖苷 | 0.03 g    |
| g) 纯水                       | 1 000 mL  |



#### 4.2.2.1.2 制法

将上述成分溶解于纯水中,调整 pH 为 6.7~7.3,经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌。制备好的培养基于 2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$  条件下保存备用。

#### 4.2.2.2 生理盐水

##### 4.2.2.2.1 成分

按如下成分配制:

- |        |          |
|--------|----------|
| a) 氯化钠 | 8.5 g    |
| b) 纯水  | 1 000 mL |

##### 4.2.2.2.2 制法

充分溶解后,经 121  $^{\circ}\text{C}$  高压蒸汽灭菌 20 min。

#### 4.2.3 仪器设备

4.2.3.1 采样容器:100 mL 无菌玻璃瓶、无菌塑料瓶或无菌塑料袋。

4.2.3.2 电子天平。

4.2.3.3 滤膜:孔径 0.22  $\mu\text{m}$ 。

4.2.3.4 高压蒸汽灭菌器。

4.2.3.5 无菌吸管:1 mL、5 mL 及 10 mL。

4.2.3.6 移液器。

4.2.3.7 试管:约 15 mm $\times$ 160 mm。

4.2.3.8 涡旋混合器。

4.2.3.9 培养盘:定量培养用无菌塑料盘,含有 84 个孔槽,每个孔槽容纳 0.06 mL 待测水样。

4.2.3.10 培养箱:36  $^{\circ}\text{C}$   $\pm$  1  $^{\circ}\text{C}$ 。

4.2.3.11 紫外灯:波长为 366 nm。

#### 4.2.4 试验步骤

##### 4.2.4.1 水样稀释

检测所需水样为 1 mL。若水样污染严重,可对水样进行稀释。以无菌操作方法用无菌吸管或移液器吸取 1 mL 充分混匀的水样,注入盛有 9 mL 无菌生理盐水的试管中,充分振荡混匀后取 1 mL 进行检测,必要时可加大稀释度,以 10 倍逐级稀释。

##### 4.2.4.2 接种培养

向一无菌试管中加入 9 mL 制备好的液体培养基;如选用符合要求的成品培养基,则向装有 0.1 g 培养基的试管中加入 9 mL 无菌生理盐水。取 1 mL 水样加入上述试管中,涡旋振荡混匀。

将混匀后的水样倒入培养盘中心位置,将培养盘盖好,放置在水平桌面上,紧贴桌面顺时针轻柔晃动培养盘,将待测水样分配到培养盘的所有孔槽中。

将培养盘 90  $^{\circ}$ ~120  $^{\circ}$  竖起,使多余的水样由盘内海绵条吸收,将培养盘缓慢翻转过来,倒置放于 36  $^{\circ}\text{C}$   $\pm$  1  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中,培养 48 h。可叠放培养,不宜超过 10 层。

## 4.2.4.3 结果计数

将培养后的培养盘取出,倒置于暗处或紫外灯箱内,在 6 W 366 nm 紫外灯下约 13 cm 处观察,记录产生蓝色荧光的孔数。如未放置在紫外灯箱内,观察时需佩戴防紫外线的护目镜。培养盘中的 84 个孔,无论荧光强弱,只要呈现蓝色荧光即为阳性,但海绵条的荧光不计入结果。

## 4.2.5 试验数据处理

## 4.2.5.1 结果报告

根据显蓝色荧光的孔数,对照表 2 查出孔数对应的每毫升样品中的菌落总数的 MPN 值。如果样品进行了稀释,读取的结果应乘以稀释倍数并报告之,结果以 MPN/mL 表示。如果所有孔均未显荧光,则可报告为菌落总数未检出。

表 2 菌落总数 MPN 表

阳性孔数	菌落总数/(MPN/mL)	95%置信区间	
		下限	上限
0	<2	<0.3	<14
1	2	0.3	14
2	4	1	16
3	6	2	19
4	8	3	22
5	10	4	25
6	12	6	27
7	15	7	30
8	17	8	33
9	19	10	36
10	21	11	39
11	23	13	42
12	26	15	45
13	28	16	48
14	30	18	51
15	33	20	54
16	35	22	58
17	38	23	61
18	40	25	64
19	43	27	67
20	45	29	70
21	48	31	74
22	51	33	77

表 2 菌落总数 MPN 表 (续)

阳性孔数	菌落总数/(MPN/mL)	95%置信区间	
		下限	上限
23	53	35	80
24	56	38	84
25	59	40	87
26	62	42	91
27	65	44	94
28	68	47	98
29	71	49	102
30	74	51	106
31	77	54	109
32	80	56	113
33	83	59	117
34	86	62	121
35	90	64	126
36	93	67	130
37	97	70	134
38	100	73	139
39	104	76	143
40	108	79	148
41	112	82	152
42	116	85	157
43	120	88	162
44	124	91	167
45	128	95	173
46	132	98	178
47	137	102	183
48	141	106	189
49	146	109	195
50	151	113	201
51	156	117	207
52	161	121	213
53	166	125	220
54	171	130	227
55	177	134	234

表 2 菌落总数 MPN 表 (续)

阳性孔数	菌落总数/(MPN/mL)	95%置信区间	
		下限	上限
56	183	139	241
57	189	144	249
58	195	149	257
59	202	154	265
60	209	159	273
61	216	165	282
62	223	171	292
63	231	177	302
64	239	183	312
65	248	190	323
66	257	197	335
67	266	204	347
68	276	212	361
69	287	220	375
70	299	229	390
71	311	238	407
72	324	248	425
73	339	258	444
74	355	270	466
75	372	282	491
76	392	296	519
77	414	311	551
78	440	328	589
79	470	348	636
80	507	371	695
81	555	398	775
82	623	432	899
83	738	476	1 146
84	>738	>476	>1 146

## 4.2.5.2 不同稀释度的选择及报告方法

选择菌落总数在<738 MPN/mL 范围内的稀释度,如果只有一个稀释度的结果符合此范围,则将结果乘以稀释倍数报告结果。

若有两个或两个以上稀释度的结果均落在 $<738$  MPN/mL 范围内,则选择稀释度最小的结果乘以稀释倍数报告结果。

若所有稀释度的培养盘上均无蓝色荧光,则以未检出报告结果。

#### 4.2.6 质量控制

##### 4.2.6.1 阳性对照

每新购或新配制一批培养基,都应做阳性对照,可选用有证的菌落总数质控标样,按其标准证书要求配制标准样品。接种培养步骤应符合 4.2.4.2 的要求,按照 4.2.4.3 进行结果计数,试验数据处理应符合 4.2.5 的要求。计数结果与标样的标准值相比,生长率应 $\geq 0.7$ 。

##### 4.2.6.2 阴性对照

每新购或新配制一批培养基,都应做阴性对照,用 1 mL 无菌水代替实际水样。接种培养步骤应符合 4.2.4.2 的要求,结果计数应符合 4.2.4.3 的要求,试验数据处理应符合 4.2.5 的要求。如无荧光产生则为阴性。

## 5 总大肠菌群

### 5.1 多管发酵法

#### 5.1.1 原理

经  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 24 h,发酵乳糖产酸产气、经证实试验和革兰氏染色检测水中总大肠菌群的方法。

#### 5.1.2 培养基与试剂

##### 5.1.2.1 乳糖蛋白胨培养液

###### 5.1.2.1.1 成分

按如下成分配制:

a) 蛋白胨	10.0 g
b) 牛肉膏	3.0 g
c) 乳糖	5.0 g
d) 氯化钠	5.0 g
e) 溴甲酚紫乙醇溶液(16 g/L)	1 mL
f) 纯水	1 000 mL

###### 5.1.2.1.2 制法

将蛋白胨、牛肉膏、乳糖及氯化钠溶于纯水中,调整 pH 为 7.2~7.4,再加入 1 mL 16 g/L 的溴甲酚紫乙醇溶液,充分混匀,分装于装有小倒管的试管中,经  $115\text{ }^{\circ}\text{C}$  高压蒸汽灭菌 20 min 后,于  $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏避光保存。

##### 5.1.2.2 二倍浓缩乳糖蛋白胨培养液

除纯水为 500 mL,其他成分应符合 5.1.2.1 的要求。

### 5.1.2.3 伊红美蓝培养基

#### 5.1.2.3.1 成分

按如下成分配制：

a) 蛋白胨	10.0 g
b) 乳糖	10.0 g
c) 磷酸氢二钾	2.0 g
d) 琼脂	20.0 g~30.0 g
e) 纯水	1 000 mL
f) 伊红水溶液(20.0 g/L)	20 mL
g) 美蓝水溶液(5.0 g/L)	13 mL

#### 5.1.2.3.2 制法

将蛋白胨、磷酸盐和琼脂溶解于纯水中，校正 pH 为 7.2，加入乳糖，混匀后分装，经 115 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。临用时加热融化琼脂，冷至 50 ℃~55 ℃，加入伊红和美蓝水溶液，混匀，倾注平皿。

### 5.1.2.4 革兰氏染色液

#### 5.1.2.4.1 结晶紫染色液

##### 5.1.2.4.1.1 成分

按如下成分配制：

a) 结晶紫	1.0 g
b) 乙醇[ $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})=95\%$ ]	20 mL
c) 草酸铵溶液(10.0 g/L)	80 mL

##### 5.1.2.4.1.2 制法

将结晶紫溶于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

注：结晶紫不可用龙胆紫代替，前者是纯品，后者不是单一成分，易出现假阳性。结晶紫溶液放置过久会产生沉淀，不能再用。

#### 5.1.2.4.2 革兰氏碘液

##### 5.1.2.4.2.1 成分

按如下成分配制：

a) 碘片	1.0 g
b) 碘化钾	2.0 g
c) 纯水	300 mL

##### 5.1.2.4.2.2 制法

将碘片和碘化钾混合，再加入纯水少许，充分振摇，待完全溶解后，再加纯水。

#### 5.1.2.4.3 脱色剂

乙醇[ $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})=95\%$ ]。

#### 5.1.2.4.4 沙黄复染液

##### 5.1.2.4.4.1 成分

按如下成分配制：

a) 沙黄	0.25 g
b) 乙醇[ $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})=95\%$ ]	10 mL
c) 纯水	90 mL

##### 5.1.2.4.4.2 制法

将沙黄加入乙醇中，待完全溶解后加入纯水。

#### 5.1.2.4.5 染色法

5.1.2.4.5.1 将培养 18 h~24 h 的培养物涂片。

5.1.2.4.5.2 将涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染 1 min，水洗。

5.1.2.4.5.3 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。

5.1.2.4.5.4 滴加脱色剂，摇动玻片，直至无紫色脱落为止，约 30 s，水洗。

5.1.2.4.5.5 加沙黄复染液，复染 1 min，水洗，待干，镜检。

#### 5.1.3 仪器设备

5.1.3.1 培养箱： $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.1.3.2 冰箱。

5.1.3.3 电子天平。

5.1.3.4 显微镜。

5.1.3.5 平皿：直径 9 cm。

5.1.3.6 试管。

5.1.3.7 无菌吸管：1 mL、10 mL。

5.1.3.8 锥形瓶。

5.1.3.9 小倒管。

5.1.3.10 载玻片。

#### 5.1.4 试验步骤

##### 5.1.4.1 乳糖发酵试验

5.1.4.1.1 用无菌吸管或移液器吸取 10 mL 水样接种到 10 mL 双料乳糖蛋白胨培养液中，取 1 mL 水样接种到 10 mL 单料乳糖蛋白胨培养液中，另取 1 mL 水样注入到 9 mL 无菌生理盐水中，混匀后取 1 mL（即 0.1 mL 水样）注入到 10 mL 单料乳糖蛋白胨培养液中，每一稀释度接种 5 管；对已处理过的出厂自来水，需经常检验或每天检验一次的，可直接接种 5 份 10 mL 水样双料培养基，每份接种 10 mL 水样。

5.1.4.1.2 检验水源水时，如污染较严重，应加大稀释度，可接种 1 mL、0.1 mL、0.01 mL，甚至 0.1 mL、0.01 mL、0.001 mL，每个稀释度接种 5 管单料乳糖蛋白胨培养液，每个水样共接种 15 管。接种 1 mL 以下水样时，应作 10 倍递增稀释后，取 1 mL 接种，每递增稀释一次，换用 1 支 1 mL 无菌吸管。

5.1.4.1.3 将接种管置于  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱内，培养  $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ ，如所有乳糖蛋白胨培养管都不产气产酸，则可报告为总大肠菌群未检出，如有产酸产气者，则按下列步骤进行。

## 5.1.4.2 分离培养

将产酸产气的发酵管分别转种在伊红美蓝琼脂平板上,于  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱内培养  $18\text{ h}\sim 24\text{ h}$ ,观察菌落形态,挑取符合下列特征的菌落进行革兰氏染色镜检:

- 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、中心较深的菌落。

## 5.1.4.3 证实试验

经上述染色镜检为革兰氏阴性无芽孢杆菌,同时接种乳糖蛋白胨培养液,置  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养  $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ ,有产酸产气者,即证实有总大肠菌群存在。

## 5.1.5 试验数据处理

根据证实为总大肠菌群阳性的管数,查 MPN 表(见表 3 和表 4),报告每 100 mL 水样中的总大肠菌群 MPN 值。稀释样品查表后所得结果应乘稀释倍数。如所有乳糖发酵管均为阴性时,可报告总大肠菌群未检出。

表 3 总大肠菌群 5 管法 MPN 表

5 个 10 mL 管中阳性管数	MPN 值
0	<2.2
1	2.2
2	5.1
3	9.2
4	16.0
5	>16.0

表 4 总大肠菌群 15 管法 MPN 表

接种量/mL			总大肠菌群/ (MPN/100 mL)	接种量/mL			总大肠菌群/ (MPN/100 mL)
10	1	0.1		10	1	0.1	
0	0	0	<2	0	2	0	4
0	0	1	2	0	2	1	6
0	0	2	4	0	2	2	7
0	0	3	5	0	2	3	9
0	0	4	7	0	2	4	11
0	0	5	9	0	2	5	13
0	1	0	2	0	3	0	6
0	1	1	4	0	3	1	7
0	1	2	6	0	3	2	9
0	1	3	7	0	3	3	11
0	1	4	9	0	3	4	13
0	1	5	11	0	3	5	15



表 4 总大肠菌群 15 管法 MPN 表 (续)

接种量/mL			总大肠菌群/ (MPN/100 mL)	接种量/mL			总大肠菌群/ (MPN/100 mL)
10	1	0.1		10	1	0.1	
0	4	0	8	1	4	0	11
0	4	1	9	1	4	1	13
0	4	2	11	1	4	2	15
0	4	3	13	1	4	3	17
0	4	4	15	1	4	4	19
0	4	5	17	1	4	5	22
0	5	0	9	1	5	0	13
0	5	1	11	1	5	1	15
0	5	2	13	1	5	2	17
0	5	3	15	1	5	3	19
0	5	4	17	1	5	4	22
0	5	5	19	1	5	5	24
1	0	0	2	2	0	0	5
1	0	1	4	2	0	1	7
1	0	2	6	2	0	2	9
1	0	3	8	2	0	3	12
1	0	4	10	2	0	4	14
1	0	5	12	2	0	5	16
1	1	0	4	2	1	0	7
1	1	1	6	2	1	1	9
1	1	2	8	2	1	2	12
1	1	3	10	2	1	3	14
1	1	4	12	2	1	4	17
1	1	5	14	2	1	5	19
1	2	0	6	2	2	0	9
1	2	1	8	2	2	1	12
1	2	2	10	2	2	2	14
1	2	3	12	2	2	3	17
1	2	4	15	2	2	4	19
1	2	5	17	2	2	5	22
1	3	0	8	2	3	0	12
1	3	1	10	2	3	1	14
1	3	2	12	2	3	2	17
1	3	3	15	2	3	3	20
1	3	4	17	2	3	4	22
1	3	5	19	2	3	5	25

表 4 总大肠菌群 15 管法 MPN 表 (续)

接种量/mL			总大肠菌群/ (MPN/100 mL)	接种量/mL			总大肠菌群/ (MPN/100 mL)
10	1	0.1		10	1	0.1	
2	4	0	15	3	4	0	21
2	4	1	17	3	4	1	24
2	4	2	20	3	4	2	28
2	4	3	23	3	4	3	32
2	4	4	25	3	4	4	36
2	4	5	28	3	4	5	40
2	5	0	17	3	5	0	25
2	5	1	20	3	5	1	29
2	5	2	23	3	5	2	32
2	5	3	26	3	5	3	37
2	5	4	29	3	5	4	41
2	5	5	32	3	5	5	45
3	0	0	8	4	0	0	13
3	0	1	11	4	0	1	17
3	0	2	13	4	0	2	21
3	0	3	16	4	0	3	25
3	0	4	20	4	0	4	30
3	0	5	23	4	0	5	36
3	1	0	11	4	1	0	17
3	1	1	14	4	1	1	21
3	1	2	17	4	1	2	26
3	1	3	20	4	1	3	31
3	1	4	23	4	1	4	36
3	1	5	27	4	1	5	42
3	2	0	14	4	2	0	22
3	2	1	17	4	2	1	26
3	2	2	20	4	2	2	32
3	2	3	24	4	2	3	38
3	2	4	27	4	2	4	44
3	2	5	31	4	2	5	50
3	3	0	17	4	3	0	27
3	3	1	21	4	3	1	33
3	3	2	24	4	3	2	39
3	3	3	28	4	3	3	45
3	3	4	32	4	3	4	52
3	3	5	36	4	3	5	59

表 4 总大肠菌群 15 管法 MPN 表 (续)

接种量/mL			总大肠菌群/ (MPN/100 mL)	接种量/mL			总大肠菌群/ (MPN/100 mL)
10	1	0.1		10	1	0.1	
4	4	0	34	5	2	0	49
4	4	1	40	5	2	1	70
4	4	2	47	5	2	2	94
4	4	3	54	5	2	3	120
4	4	4	62	5	2	4	150
4	4	5	69	5	2	5	180
4	5	0	41	5	3	0	79
4	5	1	48	5	3	1	110
4	5	2	56	5	3	2	140
4	5	3	64	5	3	3	180
4	5	4	72	5	3	4	210
4	5	5	81	5	3	5	250
5	0	0	23	5	4	0	130
5	0	1	31	5	4	1	170
5	0	2	43	5	4	2	220
5	0	3	58	5	4	3	280
5	0	4	76	5	4	4	350
5	0	5	95	5	4	5	430
5	1	0	33	5	5	0	240
5	1	1	46	5	5	1	350
5	1	2	63	5	5	2	540
5	1	3	84	5	5	3	920
5	1	4	110	5	5	4	1 600
5	1	5	130	5	5	5	>1 600

注：总接种量 55.5 mL，其中 5 份 10 mL 水样，5 份 1 mL 水样，5 份 0.1 mL 水样。

## 5.2 滤膜法

### 5.2.1 原理

用孔径为  $0.45\ \mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤水样后,将滤膜贴在选择性培养基上培养后,能形成典型菌落,经革兰氏染色和证实试验,来检测水中总大肠菌群的方法。

### 5.2.2 培养基与试剂

#### 5.2.2.1 品红亚硫酸钠培养基

##### 5.2.2.1.1 成分

按如下成分配制:

a) 蛋白胨	10.0 g
b) 酵母浸膏	5.0 g
c) 牛肉膏	5.0 g
d) 乳糖	10.0 g
e) 琼脂	15.0 g~20.0 g
f) 磷酸氢二钾	3.5 g
g) 无水亚硫酸钠	5.0 g
h) 碱性品红乙醇[ $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})=95\%$ ]溶液(50.0 g/L)	20 mL
i) 纯水	1 000 mL

##### 5.2.2.1.2 制法

###### 5.2.2.1.2.1 储备培养基的制法

先将琼脂加到 500 mL 纯水中,煮沸溶解,于另 500 mL 纯水中加入磷酸氢二钾、蛋白胨、酵母浸膏和牛肉膏,加热溶解,倒入已溶解的琼脂,补足纯水至 1 000 mL,混匀后调 pH 为 7.2~7.4,再加入乳糖,分装,经  $115\ ^\circ\text{C}$  高压蒸汽灭菌 20 min 后,于  $0\ ^\circ\text{C}\sim 4\ ^\circ\text{C}$  冷藏保存。

本培养基也可不加琼脂,制成液体培养基,使用时加 2 mL~3 mL 于灭菌吸收垫上,再将滤膜置于垫上培养。

###### 5.2.2.1.2.2 平皿培养基的制法

将上法制备的储备培养基加热融化,用无菌吸管或移液器按比例吸取一定量的 50.0 g/L 的碱性品红乙醇溶液置于无菌空试管中,再按比例称取所需的无水亚硫酸钠置于另一无菌试管中,加无菌水少许,使其溶解后,置沸水浴中煮沸 10 min 以灭菌。

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退成淡粉色为止,将此亚硫酸钠与碱性品红的混合液全部加到已融化的储备培养基内,并充分混匀(防止产生气泡),立即将此种培养基 15 mL 倾入无菌的空平皿内。待冷却凝固后置冰箱内备用。此种已制成的培养基于  $0\ ^\circ\text{C}\sim 4\ ^\circ\text{C}$  冷藏保存不宜超过两周。如培养基已由淡粉色变成深红色,则不能再用。

###### 5.2.2.2 乳糖蛋白胨培养液

应符合 5.1.2.1 的要求。

### 5.2.3 仪器设备

5.2.3.1 过滤设备：配备滤器和抽滤装置。

5.2.3.2 滤膜：孔径 0.45 μm。

5.2.3.3 无齿镊子。

5.2.3.4 其他仪器设备应符合 5.1.3 的要求。

### 5.2.4 试验步骤

#### 5.2.4.1 准备工作

5.2.4.1.1 滤膜灭菌：将滤膜放入烧杯中，加入纯水，置于沸水浴中煮沸灭菌 3 次，每次 15 min。前两次煮沸后需更换纯水洗涤 2 次～3 次，以除去残留溶剂。或使用符合要求的一次性无菌滤膜。

5.2.4.1.2 滤器灭菌：用点燃的酒精棉球火焰灭菌。也可用高压蒸汽灭菌器 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。

#### 5.2.4.2 过滤水样

用镊子夹取无菌滤膜边缘部分，将粗糙面向上，贴放在已灭菌的滤床上，固定好滤器，将 100 mL 水样（如水样含菌数较多，可减少过滤水样量，或将水样稀释）注入滤器中，打开滤器阀门，在  $-5.07 \times 10^4$  Pa（-0.5 大气压）下抽滤。

#### 5.2.4.3 培养

过滤完水样后，再抽气约 5 s，关上滤器阀门，取下滤器，用镊子夹取滤膜边缘部分，移放在品红亚硫酸钠培养基上，滤膜截留细菌面向上，滤膜应与培养基完全贴紧，两者间不得留有气泡，然后将平皿倒置，放入 36 ℃ ± 1 ℃ 恒温箱内培养 24 h ± 2 h。

### 5.2.5 试验数据处理

5.2.5.1 挑取紫红色且具有金属光泽的菌落、深红色不带或略带金属光泽的菌落和淡红中心色较深的菌落进行革兰氏染色、镜检。

5.2.5.2 凡革兰氏染色为阴性的无芽孢杆菌，再接种乳糖蛋白胨培养液，于 36 ℃ ± 1 ℃ 培养 24 h ± 2 h，有产酸产气者，则判定为总大肠菌群阳性。

5.2.5.3 按公式(1)计算滤膜上生长的总大肠菌群数，以每 100 mL 水样中的总大肠菌群菌落数(CFU/100 mL)报告结果。

$$\text{总大肠菌群菌落数(CFU/100 mL)} = \frac{\text{数出的总大肠菌群菌落数} \times 100}{\text{过滤的水样体积(mL)}} \quad \dots\dots\dots(1)$$

## 5.3 酶底物法

### 5.3.1 原理

总大肠菌群在选择性培养基上能产生 β-半乳糖苷酶(β-D-galactosidase)，通过分解色原底物释放出色原体使培养基呈现颜色变化，以此原理来检测水中总大肠菌群的方法。

### 5.3.2 培养基与试剂

#### 5.3.2.1 MMO-MUG 培养基

采用 Minimal Medium ONPG-MUG(MMO-MUG)培养基，可按下述成分配制培养基或选用符合

质控要求的制品。每 1 000 mL MMO-MUG 培养基所含基本成分为：

a) 硫酸铵	5.0 g
b) 无水硫酸锰	0.5 mg
c) 无水硫酸锌	0.5 mg
d) 无水硫酸镁	100 mg
e) 氯化钠	10.0 g
f) 氯化钙	50 mg
g) 亚硫酸钠	40 mg
h) 两性霉素 B(Amphotericin B)	1 mg
i) 邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷(ONPG)	500 mg
j) 4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷(MUG)	75 mg
k) 茄属植物萃取物(Solanium 萃取物)	500 mg
l) N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸钠盐(HEPES 钠盐)	5.3 g
m) N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(HEPES)	6.9 g
n) 纯水	1 000 mL

### 5.3.2.2 生理盐水

#### 5.3.2.2.1 成分

按如下成分配制：

a) 氯化钠	8.5 g
b) 纯水	1 000 mL

#### 5.3.2.2.2 制法

溶解后，分装到稀释瓶内，每瓶 90 mL，121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。

### 5.3.3 仪器设备

5.3.3.1 量筒：100 mL、500 mL、1 000 mL。

5.3.3.2 无菌吸管：1 mL、5 mL 及 10 mL 管。

5.3.3.3 稀释瓶：100 mL、250 mL、500 mL 及 1 000 mL。

5.3.3.4 无菌试管：约 15 mm×160 mm。

5.3.3.5 培养箱：36 ℃±1 ℃。

5.3.3.6 高压蒸汽灭菌器。

5.3.3.7 定量盘：定量培养用无菌塑料盘，含 51 个孔穴，每一孔穴可容纳 2 mL 水样。

5.3.3.8 封口机：用于 51 孔定量盘。

### 5.3.4 试验步骤

#### 5.3.4.1 水样稀释

检测所需水样为 100 mL。若水样污染严重，可对水样进行稀释，取 10 mL 水样加入到 90 mL 无菌生理盐水中，必要时可加大稀释度。

#### 5.3.4.2 定性反应

将 100 mL 水样加入 100 mL 无菌稀释瓶中,加入 2.7 g MMO-MUG 培养基粉末,混合均匀使之完全溶解后,放入  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  的培养箱内培养 24 h。

#### 5.3.4.3 10 管法

5.3.4.3.1 将 100 mL 水样加入 100 mL 无菌稀释瓶中,加入 2.7 g MMO-MUG 培养基粉末,混合均匀使之完全溶解。

5.3.4.3.2 准备 10 支无菌试管,用无菌吸管分别从前述稀释瓶中取 10 mL 水样至各试管中,放入  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  的培养箱中培养 24 h。

#### 5.3.4.4 51 孔定量盘法

5.3.4.4.1 将 100 mL 水样加入 100 mL 无菌稀释瓶中,加入 2.7 g MMO-MUG 培养基粉末,混摇使之完全溶解均匀。

5.3.4.4.2 将前述 100 mL 水样全部倒入 51 孔无菌定量盘内,以手抚平定量盘背面,去除孔穴内气泡,然后用程控定量封口机封口。放入  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  的培养箱中培养 24 h。

#### 5.3.5 试验数据处理

##### 5.3.5.1 结果判读

将水样培养 24 h 后进行结果判读,如果结果为可疑阳性,可延长培养时间到 28 h 进行结果判读,超过 28 h 之后出现的颜色反应不作为阳性结果。

##### 5.3.5.2 定性反应

水样经 24 h 培养之后如果颜色变成黄色,判断为阳性反应,表示水中含有大肠菌群。水样颜色未发生变化,判断为阴性反应。定性反应结果以总大肠菌群检出或未检出报告。

##### 5.3.5.3 10 管法

5.3.5.3.1 将培养 24 h 之后的试管取出观察,如果试管内水样变成黄色则表示该试管含有总大肠菌群。

5.3.5.3.2 计数有黄色反应的试管数,对照表 5 查出其代表的总大肠菌群 MPN 值。结果以 MPN/100 mL 表示。如所有管均未产生黄色,则可报告为总大肠菌群未检出。

表 5 总大肠菌群 10 管法 MPN 表

阳性试管数	总大肠菌群/ (MPN/100 mL)	95%置信区间	
		下限	上限
0	<1.1	0	3.0
1	1.1	0.03	5.9
2	2.2	0.26	8.1
3	3.6	0.69	10.6
4	5.1	1.3	13.4

表 5 总大肠菌群 10 管法 MPN 表 (续)

阳性试管数	总大肠菌群/ (MPN/100 mL)	95%置信区间	
		下限	上限
5	6.9	2.1	16.8
6	9.2	3.1	21.1
7	12.0	4.3	27.1
8	16.1	5.9	36.8
9	23.0	8.1	59.5
10	>23.0	13.5	—

## 5.3.5.4 51 孔定量盘法

5.3.5.4.1 将培养 24 h 之后的定量盘取出观察,如果孔穴内的水样变成黄色则表示该孔穴中含有总大肠菌群。

5.3.5.4.2 计算有黄色反应的孔穴数,对照表 6 查出其代表的总大肠菌群 MPN 值。结果以 MPN/100 mL 表示。如所有孔均未产生黄色,则可报告为总大肠菌群未检出。

表 6 总大肠菌群 51 孔定量盘法 MPN 表

阳性孔数	总大肠菌群/ (MPN/100 mL)	95%置信区间	
		下限	上限
0	<1	0	3.7
1	1.0	0.3	5.6
2	2.0	0.6	7.3
3	3.1	1.1	9.0
4	4.2	1.7	10.7
5	5.3	2.3	12.3
6	6.4	3.0	13.9
7	7.5	3.7	15.5
8	8.7	4.5	17.1
9	9.9	5.3	18.8
10	11.1	6.1	20.5
11	12.4	7.0	22.1
12	13.7	7.9	23.9
13	15.0	8.8	25.7
14	16.4	9.8	27.5
15	17.8	10.8	29.4
16	19.2	11.9	31.3



表 6 总大肠菌群 51 孔定量盘法 MPN 表 (续)

阳性孔数	总大肠菌群/ (MPN/100 mL)	95%置信区间	
		下限	上限
17	20.7	13.0	33.3
18	22.2	14.1	35.2
19	23.8	15.3	37.3
20	25.4	16.5	39.4
21	27.1	17.7	41.6
22	28.8	19.0	43.9
23	30.6	20.4	46.3
24	32.4	21.8	48.7
25	34.4	23.3	51.2
26	36.4	24.7	53.9
27	38.4	26.4	56.6
28	40.6	28.0	59.5
29	42.9	29.7	62.5
30	45.3	31.5	65.6
31	47.8	33.4	69.0
32	50.4	35.4	72.5
33	53.1	37.5	76.2
34	56.0	39.7	80.1
35	59.1	42.0	84.4
36	62.4	44.6	88.8
37	65.9	47.2	93.7
38	69.7	50.0	99.0
39	73.8	53.1	104.8
40	78.2	56.4	111.2
41	83.1	59.9	118.3
42	88.5	63.9	126.2
43	94.5	68.2	135.4
44	101.3	73.1	146.0
45	109.1	78.6	158.7
46	118.4	85.0	174.5
47	129.8	92.7	195.0
48	144.5	102.3	224.1
49	165.2	115.2	272.2
50	200.5	135.8	387.6
51	>200.5	146.1	—

## 6 耐热大肠菌群

### 6.1 多管发酵法

#### 6.1.1 原理

经 44.5 ℃ 培养 24 h, 发酵乳糖产酸产气, 经证实试验和革兰氏染色检测水中耐热大肠菌群的方法。

#### 6.1.2 培养基与试剂

##### 6.1.2.1 EC 培养基

###### 6.1.2.1.1 成分

按如下成分配制:

a) 胰酶消化酪蛋白胨	20.0 g
b) 乳糖	5.0 g
c) 3 号胆盐或混合胆盐	1.5 g
d) 磷酸氢二钾	4.0 g
e) 磷酸二氢钾	1.5 g
f) 氯化钠	5.0 g
g) 纯水	1 000 mL

###### 6.1.2.1.2 制法

将上述成分溶解于纯水中, 分装到带有小倒管的试管中, 115 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min, 最终 pH 为 6.7~7.1。

##### 6.1.2.2 伊红美蓝培养基

应符合 5.1.2.3 的要求。

#### 6.1.3 仪器设备

6.1.3.1 恒温水浴箱或恒温培养箱: 44.5 ℃ ± 0.5 ℃。

6.1.3.2 其他仪器设备应符合 5.1.3 的要求。

#### 6.1.4 试验步骤

6.1.4.1 自总大肠菌群乳糖发酵试验中的阳性管(产酸产气)中取 1 滴转种于 EC 培养基中, 置 44.5 ℃ ± 0.5 ℃ 水浴箱或隔水式恒温培养箱内(水浴箱的水面应高于试管中培养基液面), 培养 24 h ± 2 h, 如所有管均不产气, 则可报告为未检出, 如有产气者, 则转种于伊红美蓝琼脂平板上, 置 44.5 ℃ ± 0.5 ℃ 培养 18 h~24 h, 凡平板上有典型菌落者, 则证实为耐热大肠菌群阳性。

6.1.4.2 如检测未经含氯消毒剂消毒的水, 且只想检测耐热大肠菌群时, 或调查水源水的耐热大肠菌群污染时, 可直接用多管发酵方法, 可按照 5.1.4.1 的要求, 接种乳糖蛋白胨培养液后直接在 44.5 ℃ ± 0.5 ℃ 培养, 以下步骤按照 6.1.4.1 的要求进行。

### 6.1.5 试验数据处理

根据证实为耐热大肠菌群阳性的管数,对照 MPN 表,报告每 100 mL 水样中耐热大肠菌群的 MPN 值。

## 6.2 滤膜法

### 6.2.1 原理

用孔径为 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤水样,细菌被阻留在膜上,将滤膜贴在添加乳糖的选择性培养基上,44.5  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 能形成特征性菌落,以此来检测水中耐热大肠菌群的方法。本方法适用于生活饮用水及低浊度水源水中耐热大肠菌群的测定。

### 6.2.2 培养基与试剂

#### 6.2.2.1 MFC 培养基

##### 6.2.2.1.1 成分

按如下成分配制:

a) 胰胨	10.0 g
b) 多胨	5.0 g
c) 酵母浸膏	3.0 g
d) 氯化钠	5.0 g
e) 乳糖	12.5 g
f) 3 号胆盐或混合胆盐	1.5 g
g) 琼脂	15.0 g
h) 苯胺蓝	0.2 g
i) 纯水	1 000 mL

##### 6.2.2.1.2 制法

在 1 000 mL 纯水中先加入玫红酸(10.0 g/L)的氢氧化钠溶液[ $c(\text{NaOH})=0.2 \text{ mol/L}$ ] 10 mL,混匀后,取 500 mL 加入琼脂煮沸溶解,于另外 500 mL 纯水中,加入除苯胺蓝以外的其他试剂,加热溶解,倒入已溶解的琼脂,混匀调 pH 为 7.4,加入苯胺蓝煮沸,迅速离开热源,待冷却至 60  $^{\circ}\text{C}$  左右,制成平板,不可高压蒸汽灭菌。制好的培养基应存放于 2  $^{\circ}\text{C}$ ~10  $^{\circ}\text{C}$ ,不超过 96 h。

本培养基也可不加琼脂,制成液体培养基,使用时加 2 mL~3 mL 于灭菌吸收垫上,再将滤膜置于垫上培养。

#### 6.2.2.2 EC 培养基

应符合 6.1.2.1 的要求。

### 6.2.3 仪器设备

6.2.3.1 恒温水浴箱或隔水式恒温培养箱;44.5  $^{\circ}\text{C}$   $\pm$  0.5  $^{\circ}\text{C}$ 。

6.2.3.2 玻璃或塑料平皿;直径 6 cm 或 5 cm。

6.2.3.3 其他仪器设备应符合 5.2.3 的要求。

## 6.2.4 试验步骤

6.2.4.1 准备工作应符合 5.2.4.1 的要求。

6.2.4.2 过滤水样应符合 5.2.4.2 的要求。

6.2.4.3 培养:过滤完水样后,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 MFC 培养基上,滤膜截留细菌面向上,滤膜应与培养基完全贴紧,两者间不得留有气泡,然后将平皿倒置,44.5 ℃±0.5 ℃培养 24 h±2 h。耐热大肠菌群在此培养基上菌落为蓝色,非耐热大肠菌群菌落为灰色至奶油色。

6.2.4.4 对可疑菌落转种 EC 培养基,44.5 ℃±0.5 ℃培养 24 h±2 h,如产气则证实为耐热大肠菌群。

## 6.2.5 试验数据处理

按公式(2)计算滤膜上生长的耐热大肠菌群数,以每 100 mL 水样中的耐热大肠菌群菌落数(CFU/100 mL)报告结果。

$$\text{耐热大肠菌群菌落数(CFU/100 mL)} = \frac{\text{所计得的耐热大肠菌群菌落数} \times 100}{\text{过滤的水样体积(mL)}} \quad \dots\dots\dots(2)$$

## 7 大肠埃希氏菌

### 7.1 多管发酵法

#### 7.1.1 原理

将总大肠菌群多管发酵法在初发酵时阳性的培养物,接种在含有荧光底物的培养基上,37 ℃培养 24 h 产生 β-葡萄糖醛酸酶(β-glucuronidase),分解荧光底物释放出荧光产物,在紫外光下产生特征性荧光的细菌,以此来检测水中大肠埃希氏菌的方法。

#### 7.1.2 EC-MUG 培养基

##### 7.1.2.1 成分

按如下成分配制:

a) 胰酶消化酪蛋白胨	20.0 g
b) 乳糖	5.0 g
c) 3号胆盐或混合胆盐	1.5 g
d) 磷酸氢二钾	4.0 g
e) 磷酸二氢钾	1.5 g
f) 氯化钠	5.0 g
g) 4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷(MUG)	0.05 g
h) 纯水	1 000 mL

##### 7.1.2.2 制法

将上述成分加入纯水中,充分混匀,加热溶解,在 366 nm 紫外灯下检查无自发荧光后分装于试管中,115 ℃高压蒸汽灭菌 20 min,最终 pH 为 6.7~7.1。

### 7.1.3 仪器设备

7.1.3.1 紫外灯:6 W,波长为 366 nm。

7.1.3.2 培养箱。

7.1.3.3 电子天平。

7.1.3.4 平皿:直径 9 cm。

7.1.3.5 无菌试管:约 15 mm×160 mm。

7.1.3.6 无菌吸管:1 mL,10 mL。

7.1.3.7 移液器:1 mL。

7.1.3.8 锥形瓶:1 000 mL。

7.1.3.9 小倒管。

7.1.3.10 接种环。

7.1.3.11 冰箱。

### 7.1.4 试验步骤

7.1.4.1 接种:用无菌接种环或无菌棉签将总大肠菌群多管发酵法在初发酵时产酸产气的试管中液体接种到 EC-MUG 管中。实验室生物安全要求应依据 GB 19489。

7.1.4.2 培养:将已接种的 EC-MUG 管在培养箱中  $44.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。

### 7.1.5 试验数据处理

将培养后的 EC-MUG 管在暗处用紫外灯照射,如果有蓝色荧光产生则表示水样中含有大肠埃希氏菌。

计算 EC-MUG 阳性的管数,查对应的 MPN 表得出大肠埃希氏菌的 MPN 值,结果以 MPN/100 mL 报告。

## 7.2 滤膜法

### 7.2.1 原理

将总大肠菌群滤膜法检测阳性的滤膜,置于含有荧光底物的培养基上培养,能产生  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶,分解荧光底物释放出荧光产物,使菌落能够在紫外光下产生特征性荧光,以此来检测水中大肠埃希氏菌的方法。

### 7.2.2 MUG 营养琼脂培养基(NA-MUG)

#### 7.2.2.1 成分

按如下成分配制:

a) 蛋白胨	5.0 g
b) 牛肉浸膏	3.0 g
c) 琼脂	15.0 g
d) 4-甲基伞形酮- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷(MUG)	0.1 g
e) 纯水	1 000 mL

#### 7.2.2.2 制法

将上述成分加入纯水中,充分混匀,加热溶解,经 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min,最终 pH 为 6.6~7.0。在无菌操作条件下倾倒入平板备用。倾倒入好的平板可于 0 ℃~4 ℃ 冷藏保存 2 周。

#### 7.2.3 仪器设备

7.2.3.1 紫外灯:6 W,波长为 366 nm。

7.2.3.2 其他仪器设备应符合 5.2.3 的要求。

#### 7.2.4 试验步骤

7.2.4.1 接种:在无菌操作条件下将有典型菌落生长的滤膜转移到 NA-MUG 平板上,细菌截留面朝上,进行培养。实验室生物安全要求应符合 GB 19489 的要求。

7.2.4.2 培养:将已接种的 NA-MUG 平板于 36 ℃±1 ℃ 培养 4 h。

#### 7.2.5 试验数据处理

将培养后的 NA-MUG 平板在暗处用波长为 366 nm 功率为 6 W 的紫外灯照射,如果菌落边缘或菌落背面有蓝色荧光产生则表示该菌落为大肠埃希氏菌。

记录有蓝色荧光产生的菌落数并报告,报告格式按总大肠菌群滤膜法的要求。

### 7.3 酶底物法

#### 7.3.1 原理

大肠埃希氏菌在选择性培养基上能产生  $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -D-galactosidase),可分解色原底物后释放出色原体使培养基呈现颜色变化,并能产生  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶( $\beta$ -glucuronidase),分解荧光底物释放出荧光产物,使菌落能够在紫外光下产生特征性荧光,以此技术来检测大肠埃希氏菌的方法。

#### 7.3.2 培养基与试剂

应符合 5.3.2 的要求。

#### 7.3.3 仪器设备

7.3.3.1 紫外灯:6 W,波长为 366 nm。

7.3.3.2 其他仪器设备应符合 5.3.3 的要求。

#### 7.3.4 试验步骤

应符合 5.3.4 的要求。

#### 7.3.5 试验数据处理

##### 7.3.5.1 结果判读

结果判读应符合 5.3.5.1 的要求,对照表同总大肠菌群酶底物法中表 5 与表 6。水样变为黄色同时有蓝色荧光判断为大肠埃希氏菌阳性,水样未变黄色而有荧光产生不判定为大肠埃希氏菌阳性。

### 7.3.5.2 定性反应

将经过 24 h 培养颜色变成黄色的水样,在暗处用波长为 366 nm 的紫外灯照射,如果有蓝色荧光产生判断为阳性,表示水中含有大肠埃希氏菌。水样如未产生蓝色荧光,判断为阴性。结果以大肠埃希氏菌检出或未检出报告。

### 7.3.5.3 10 管法

7.3.5.3.1 将培养 24 h 水样颜色变成黄色的试管,在暗处用波长为 366 nm 的紫外灯照射,如果有蓝色荧光产生,则表示大肠埃希氏菌为阳性。

7.3.5.3.2 计算有荧光反应的试管数,对照表 5 查出其代表的大肠埃希氏菌 MPN 值。结果以 MPN/100 mL 表示。如所有管均未产生荧光,则可报告大肠埃希氏菌未检出。

### 7.3.5.4 51 孔定量盘法

7.3.5.4.1 将培养 24 h 颜色变成黄色的水样的定量盘在暗处用波长为 366 nm 的紫外灯照射,如果有蓝色荧光产生,则表示该定量盘孔穴中大肠埃希氏菌为阳性。

7.3.5.4.2 计算有荧光反应的孔穴数,对照表 6 查出其代表的大肠埃希氏菌 MPN 值。结果以 MPN/100 mL 表示。如所有孔均未产生荧光,则可报告大肠埃希氏菌未检出。

## 8 贾第鞭毛虫

### 8.1 免疫磁分离荧光抗体法

#### 8.1.1 原理

采用过滤和反向冲洗技术从水样中富集贾第鞭毛虫孢囊,借助免疫磁分离技术将贾第鞭毛虫孢囊从其他杂质中分离出来,再经过酸化脱磁、异硫氰酸荧光素酯/4',6-二脒基-2-苯基吲哚(FITC/DAPI)染色,最后经过显微镜检确认和计数的方法。

#### 8.1.2 培养基与试剂

##### 8.1.2.1 磷酸盐缓冲液(PBS 溶液)

###### 8.1.2.1.1 成分

按如下成分配制:

a) 氯化钠	8.0 g
b) 氯化钾	0.2 g
c) 磷酸氢二钠	1.44 g
d) 磷酸二氢钾	0.24 g
e) 纯水	1 000 mL

###### 8.1.2.1.2 制法

上述成分混合溶解于纯水中后,用 1 mol/L 盐酸或氢氧化钠溶液将 pH 调到 7.1~7.3,于 0 ℃~4 ℃冷藏保存可储存 1 周。

#### 8.1.2.2 贾第鞭毛虫/隐孢子虫免疫磁分离试剂盒

所含试剂如下：

- a) 抗隐孢子虫单克隆抗体磁微粒；
- b) 抗贾第鞭毛虫单克隆抗体磁微粒；
- c) 缓冲液 A(15 mL)；
- d) 缓冲液 B(10 mL)。

免疫磁分离试剂盒，于 0℃~4℃ 冷藏保存。

#### 8.1.2.3 免疫荧光染色试剂盒

抗隐孢子虫/贾第鞭毛虫单克隆抗体-异硫氰酸盐荧光素试剂盒，于 0℃~4℃ 冷藏保存。

#### 8.1.2.4 封固剂(2% DABCO/甘油)

##### 8.1.2.4.1 成分

按如下成分配制：

- |                          |        |
|--------------------------|--------|
| a) 甘油/PBS 缓冲盐溶液(60%/40%) | 100 mL |
| b) DABCO                 | 2.0 g  |

##### 8.1.2.4.2 保存

室温条件下可储存 12 个月。

#### 8.1.2.5 Tris 溶液(1 mol/L)

在 1 000 mL 纯水中溶解 132.2 g 的 Tris 盐酸( $C_4H_{12}ClNO_3$ )，然后再加 19.4 g 的 Tris 碱( $C_4H_{11}NO_3$ )。用 1 mol/L 盐酸或氢氧化钠溶液将 pH 调到 7.3~7.5。用孔径 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤灭菌后，移到一个无菌的塑料容器中。在室温条件下可储存 6 个月。

#### 8.1.2.6 $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 二水合物溶液 (0.5 mol/L)

将 37.22 g 乙二胺四乙酸二钠盐二水合物( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )溶解到 200 mL 的纯水中，然后用 1 mol/L 盐酸或氢氧化钠溶液将 pH 调到 7.9~8.1，室温条件下可储存 6 个月。

#### 8.1.2.7 淘洗缓冲液

##### 8.1.2.7.1 淘洗液 A

按如下成分配制：

- |   |                   |
|---|-------------------|
| a) 月桂醇聚醚-12(Laureth-12)                                 | 4.0 g             |
| b) Tris 溶液(1 mol/L)                                     | 40 mL             |
| c) 0.5 mol/L $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 二水合物溶液(0.5 mol/L) | 8 mL              |
| d) A 型止泡剂   | 600 $\mu\text{L}$ |
| e) 纯水   | 1 000 mL          |

称取 1.0 g 月桂醇聚醚-12 到玻璃烧杯中，然后加 100 mL 纯水。用电炉将烧杯加热，使月桂醇聚醚-12 溶解，然后再将其转移到 1 000 mL 有刻度的量筒中。用纯水将烧杯冲洗几次，确保所有的冲洗



液都转移到量筒中。加 10 mL pH 为 7.4 的 Tris 溶液、2 mL pH 为 8.0 的  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  二水合物溶液和 150  $\mu\text{L}$  A 型止泡剂。最后用纯水稀释到 1 000 mL。室温条件下可储存 1 个月。

#### 8.1.2.7.2 淘洗液 B

按如下成分配制：

a) 磷酸氢二钠	1.44 g
b) 磷酸二氢钾	0.2 g
c) 氯化钾	0.2 g
d) 氯化钠	8.0 g
e) 吐温-20	0.1 mL
f) 纯水	1 000 mL

将 1.44 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾及 8.0 g 氯化钠加入 900 mL 纯水，搅拌 20 min 至完全溶解，加入 0.1 mL 吐温-20 并继续搅拌 10 min，然后用纯水稀释至 1 000 mL。

#### 8.1.2.7.3 淘洗液 C

按如下成分配制：

a) 焦磷酸四钠	0.2 g
b) EDTA 柠檬酸三钠	0.3 g
c) Tris-HCl(1 mol/L)	10 mL
d) 吐温-80	0.1 mL
e) 纯水	1 000 mL

将 0.2 g 焦磷酸四钠、0.3 g EDTA 柠檬酸三钠加入 900 mL 纯水，搅拌 10 min 至完全溶解，加入 10 mL Tris-HCl(1 mol/L) 并搅拌 5 min 使之混合。再加入 0.1 mL 吐温-80 并继续搅拌 10 min，然后用纯水稀释至 1 000 mL，并调节 pH 为 7.2~7.6。

#### 8.1.2.8 盐酸溶液(0.1 mol/L)

量取 0.1 mol 盐酸，缓慢加入 1 000 mL 纯水中，混匀后备用。

#### 8.1.2.9 氢氧化钠溶液(1 mol/L)

称取 1 mol 氢氧化钠，加入 1 000 mL 纯水中，完全溶解后备用。

#### 8.1.2.10 分析级甲醇

甲醇含量大于 99.5% 的分析级甲醇。

#### 8.1.2.11 DAPI 储备溶液

在微型离心管中加入 1 mg DAPI，然后加入 500  $\mu\text{L}$  的甲醇(2 mg/mL)。可于 0  $^{\circ}\text{C}$ ~4  $^{\circ}\text{C}$  冷藏避光保存 15 d。

#### 8.1.2.12 DAPI 染色溶液

用 50 mL PBS 稀释 10  $\mu\text{L}$  DAPI 母液，用时配制，于 0  $^{\circ}\text{C}$ ~4  $^{\circ}\text{C}$  冷藏避光保存。

#### 8.1.2.13 次氯酸钠溶液(50.0 g/L)

称取 50.0 g 次氯酸钠,溶于 1 000 mL 水中,完全溶解后备用。

### 8.1.3 仪器设备

#### 8.1.3.1 采样仪器设备

##### 8.1.3.1.1 滤囊过滤的仪器设备

该方法所需器材如下。

- a) 蠕动泵;流量为 2 L/min。
- b) 泵管。
- c) 滤囊(醚酮滤膜,有效过滤面积 1 300 cm<sup>2</sup>,孔径 1.0 μm)。
- d) 夹子。
- e) 水表。
- f) 流量控制阀;压力为 0.21 MPa(对于处理水可任意选择)。
- g) 过滤管。
- h) 塑料连接。

##### 8.1.3.1.2 多孔海绵滤膜模块过滤的仪器设备

该方法所需器材如下。

- a) 滤芯;压缩后的多孔海绵滤膜模块(600 mm 压缩到 30 mm 的 60 层多孔海绵滤膜,其中单层多孔海绵滤膜厚 10 mm,外径 55 mm,内径 18 mm)。
- b) 滤器;带进出水样接口及配套软管和辅助工具。
- c) 蠕动泵。
- d) 泵管。
- e) 夹子。
- f) 水表。
- g) 流量控制阀(1 L/min~4 L/min)。

#### 8.1.3.2 淘洗/浓缩/纯化仪器设备

##### 8.1.3.2.1 滤囊的淘洗/浓缩/纯化设备

该方法所需器材如下。

- a) 水平振荡器;有臂的水平振荡装置,臂上有垂直安装的过滤夹,最大频率 600 r/min。
- b) 250 mL 锥形离心管。
- c) 离心机;1 500 g 离心力。
- d) 旋涡搅拌器。
- e) 塑料洗耳球。

- f) 10 mL 吸管。
- g) 50 mL 吸管。
- h) 100 mL 的量筒。
- i) Leighton 管:一侧平面试管,125 mm×16 mm,带管塞,一侧为 60 mm×10 mm 平面。
- j) 磁粒浓缩器 1:适合 Leighton 管内液体磁分离。
- k) 磁粒浓缩器 2:适合微型离心管内液体磁分离。
- l) 锥形具塞 5 mL 微量离心管。

#### 8.1.3.2.2 多孔海绵滤膜模块的淘洗/浓缩/纯化设备

该方法所需器材如下。

- a) 手动或自动多孔海绵滤膜模块淘洗主设备及配套装置(浓缩管及底座,洗涤管及不锈钢虹吸管)。
- b) 真空泵。
- c) 磁力搅拌器和搅拌棒。
- d) 滤膜(孔径 3.0  $\mu\text{m}$ ,直径 73 mm)。
- e) 磁粒浓缩器 1:适合 Leighton 管内液体磁分离。
- f) 磁粒浓缩器 2:适合微型离心管内液体磁分离。

#### 8.1.3.2.3 多孔海绵滤膜模块快速淘洗/浓缩/纯化的设备

该方法所需器材如下。

- a) 多孔海绵滤膜模块快速淘洗装置:可压缩空气与淘洗液,自动完成 8 次及以上反向冲洗程序。
- b) 空气压缩机:压力大于 0.5 MPa,可压缩 15 L 空气。
- c) 离心机:2 000 g 离心力。
- d) 锥形离心管:500 mL。
- e) 蠕动泵。
- f) 磁粒浓缩器 1:适合 Leighton 管内液体磁分离。
- g) 磁粒浓缩器 2:适合微型离心管内液体磁分离。

#### 8.1.3.3 染色仪器设备

##### 8.1.3.3.1 三通真空泵。

##### 8.1.3.3.2 湿度孵化盒。

##### 8.1.3.3.3 载玻片。

##### 8.1.3.3.4 盖玻片。

##### 8.1.3.3.5 培养箱。

##### 8.1.3.3.6 荧光显微镜。

##### 8.1.3.3.7 450 nm~480 nm 的蓝色滤光片。

##### 8.1.3.3.8 330 nm~385 nm 的紫外光滤光片。

##### 8.1.3.3.9 测微计。

##### 8.1.3.3.10 移液器:5 $\mu\text{L}$ ~20 $\mu\text{L}$ 、20 $\mu\text{L}$ ~200 $\mu\text{L}$ 、200 $\mu\text{L}$ ~1 000 $\mu\text{L}$ 。

##### 8.1.3.3.11 巴斯德玻璃吸管。

8.1.3.3.12 小口塑料瓶或玻璃瓶;20 L。

所有玻璃器皿和塑料器皿都应在使用后及洗涤前经高压消毒。用热浓洗涤剂溶液清洁器材,然后将它们放到不低于 50.0 g/L 的次氯酸钠溶液中,至少在室温浸泡 30 min。用纯水冲洗器材,然后将其放到没有卵囊的环境中干燥。宜尽可能使用一次性物品。

8.1.4 试验步骤

8.1.4.1 采样/淘洗/浓缩

8.1.4.1.1 采样量

因水样中的卵囊数量很少,因此需要浓缩较大体积的水样,采样的体积取决于水样的类型;水源水可采集 20 L;生活饮用水采集 100 L。

8.1.4.1.2 滤囊采样和淘洗步骤

8.1.4.1.2.1 采样

按以下步骤采样。

- a) 连接滤囊以外的采样系统。
- b) 打开蠕动泵的开关,并将流量调到 2 L/min。
- c) 在作业线上安装滤囊,用适当的夹子将滤囊的进口和出口分别连接固定。
- d) 记录水表上指示的体积。
- e) 将采样系统连接到自来水龙头或其他水源上。
- f) 通过滤囊过滤适当体积的水样。
- g) 在过滤结束的时候,记录滤囊过滤的水样体积。
- h) 将连接在水源上的采样系统取下。
- i) 打开泵,尽快把滤囊放空。

过滤后,可于 0 ℃~4 ℃ 冷藏避光保存滤囊,一般不要超过 72 h。

8.1.4.1.2.2 淘洗

选用符合技术参数要求的设备,并参考该设备的说明书进行操作。举例说明如下。

- a) 取下滤囊进水口的乙烯帽,用量筒加 110 mL 淘洗液 A 到每个滤囊的外腔中。
- b) 将滤囊插到有臂的水平振荡器夹子上,滤囊的出水阀在 12 点钟的位置。
- c) 打开振荡器的开关,将样本振荡 10 min。
- d) 将滤囊中的淘洗液 A 倾注到 250 mL 的锥形离心管中,再将 110 mL 淘洗液 A 加入滤囊的外腔中。
- e) 将过滤器插到振荡器的夹钳上,出水阀转到 3 点钟位置。在 80% 的功率下,再摇 10 min。
- f) 重复操作步骤 d),将乙烯帽小心取下,将滤囊中的淘洗液倾注到 250 mL 的锥形离心管中。

8.1.4.1.2.3 浓缩

按以下步骤浓缩。

- a) 将装有淘洗液样本的锥形离心管置于 1 500 g 离心 15 min。自然减速,以免搅起沉淀物。
- b) 用移液器小心地将上清液吸掉,使上清液刚好到沉淀物的上面(不要搅起沉淀物)。
- c) 如果压实的沉淀物体积小于或等于 0.5 mL,加纯水到离心管中,使其总体积为 10 mL。将试

管置于旋转式搅拌器上 10 s~15 s,以便使沉淀物再悬浮。

- d) 如果压实的沉淀物体积大于 0.5 mL,用公式(3)确定在离心管中需要的总体积:

$$\text{总需要体积(mL)} = \text{沉淀物体积} \times 10 \text{ mL}/0.5 \text{ mL} \quad \dots\dots\dots(3)$$

将再悬浮的沉淀物调整到一个 0.5 mL 相同压实的沉淀物体积,加纯水到离心管中,使其总体积到上面计算的水平。将试管旋转搅拌 10 s~15 s,以便使沉淀物再悬浮。记录这个再悬浮物的体积。

#### 8.1.4.1.3 多孔海绵滤膜模块采样和淘洗步骤

##### 8.1.4.1.3.1 采样

按以下步骤采样。

- a) 将滤芯(螺栓头朝下)安装在支架上,拧紧盖子(盖子即为进样口)。
- b) 将滤器连接到需采样的水源进行采样。

注 1:为使液体流经滤芯需在顶部施加 0.05 MPa 的压力。推荐的 0.05 MPa 工作压力形成的液体流速为 3 L/min~4 L/min。工作压力最大不超过 0.8 MPa。

注 2:采样时如使用导流泵、蠕动泵等泵类装置,安装在滤器上游。

注 3:样品采集可在水源现场或实验室完成。过滤后,于 0℃~4℃ 冷藏避光保存滤芯,一般不要超过 72 h。

##### 8.1.4.1.3.2 淘洗与浓缩

选用符合技术参数要求的设备,并参考该设备的说明书进行操作。举例说明如下。

###### a) 手工淘洗

- 1) 第一次淘洗。将 3 μm 滤膜放置到浓缩器中,组装好浓缩管和洗涤管。将滤芯从支架上取下,安装到淘洗器的活塞顶部。将淘洗器的狭口与洗涤管用快接头连接。拉下淘洗器的延伸臂至锁住,从滤芯上去除螺栓。再连接上不锈钢虹吸管。向浓缩管注入 600 mL 淘洗液 B,随后连接到快接头上。将活塞上下活动 20 次,以冲洗解压的滤芯。拆下浓缩管,挤压活塞 5 次以清除过滤器中的残留液体。
- 2) 第一次淘洗液浓缩。将浓缩管与磁性搅拌棒连接,放置在磁性搅拌盘上,以 60 r/min~120 r/min 搅拌。将真空泵连接到浓缩器上,形成压力为 13.3 kPa~40.0 kPa 的真空。打开活栓,使流出液浓缩到 30 mL~40 mL。将浓缩液轻轻倒入 50 mL 离心管中。
- 3) 第二次淘洗。浓缩管中重新加入 600 mL 淘洗液 B,再连接到洗涤管上。重复第一次淘洗过程,只需 10 次。
- 4) 第二次淘洗液浓缩。将第一次的浓缩液加入第二次的淘洗液中。按上述方法重复浓缩过程。
- 5) 将 3 μm 滤膜转移到提供的袋子中,加入 5 mL 淘洗液 B,隔着袋子用手轻轻摩擦滤膜。清洗 2 次。将清洗液与浓缩液混合。

###### b) 自动淘洗

- 1) 第一次淘洗。将 3 μm 滤膜放置到浓缩器中,组装好浓缩管和洗涤管。打开自动淘洗器电源。将滤芯从支架上取下,安装到淘洗器的活塞顶部。将淘洗器的狭口与淘洗管用快接头连接。卸下滤芯上的螺栓。再连接上不锈钢虹吸管。向浓缩管注入 600 mL 淘洗液 B,随后连接到快接头上。开始初次浸润,然后进行第一次淘洗。拆下浓缩管,清除过滤器中的残留液体。
- 2) 第一次淘洗液浓缩。将浓缩管与磁性搅拌棒连接,放置在磁性搅拌盘上,以 60 r/min~120 r/min 搅拌。将真空泵连接到浓缩器上,形成压力为 13.3 kPa~40.0 kPa 的真空。打

开活栓,使流出液浓缩到 30 mL~40 mL。将浓缩液轻轻倒入 50 mL 离心管中。

- 3) 第二次淘洗。浓缩管中重新加入 600 mL 淘洗液 B,再连接到洗涤管上。开始淘洗。拆下浓缩管,清除过滤器中的残留液体。
- 4) 第二次淘洗液浓缩。将第一次的浓缩液加入第二次的淘洗液中。按上述方法重复浓缩过程。
- 5) 将 3  $\mu\text{m}$  滤膜转移到提供的袋子中,加入 5 mL 淘洗液 B,隔着袋子用手轻轻摩擦滤膜。清洗 2 次。将清洗液与浓缩液混合。

#### 8.1.4.1.4 多孔海绵滤膜模块采样及快速淘洗步骤

##### 8.1.4.1.4.1 采样

采样方法如下:

- a) 将滤芯(螺栓头朝下)安装在支架上,拧紧盖子(盖子即为进样口);
- b) 将滤器连接到需采样的水源进行采样。

注 1:为使液体流经滤芯需在顶部施加 0.05 MPa 的压力。推荐的 0.05 MPa 工作压力形成的液体流速为 3 L/min~4 L/min。工作压力最大不超过 0.8 MPa。

注 2:采样时如使用导流泵、蠕动泵等泵类装置,安装在滤器上游。

注 3:样品采集可在水源现场或实验室完成。过滤后,于 0  $^{\circ}\text{C}$ ~4  $^{\circ}\text{C}$  冷藏避光保存滤囊,一般不要超过 72 h。

注 4:本方法亦适用于浊度高的水源水的采样。

##### 8.1.4.1.4.2 淘洗

采用符合技术参数要求的多孔海绵滤膜模块快速压力淘洗装置可使淘洗过程全自动完成,将压力淘洗装置准备就绪,向淘洗液瓶中加入足量的淘洗液 C,利用连接锁将淘洗液瓶与压力淘洗装置连接,确保二者之间形成良好密封。连接压缩空气源和压力淘洗装置,保证足够的空气压力和体积。

举例说明如下。

- a) 打开压力淘洗设备的舱门。
- b) 滤器进样口朝上,移开样品阻留器,连接分流调节器(滤芯仍在滤器内)。
- c) 将滤器倒转,用快接头连接到压力淘洗器上。
- d) 将 500 mL 锥形离心瓶放置在样品收集器支架上,关闭压力淘洗装置。
- e) 开始自动淘洗。
- f) 淘洗结束时,打开压力淘洗装置。卸下滤器,再取下分流调节器,打开滤器,弃掉滤芯。
- g) 将离心瓶盖好,从样品收集器支架中取出。

##### 8.1.4.1.4.3 浓缩

按以下步骤浓缩。

- a) 将装有淘洗液样本的离心瓶置于 2 000 g 离心 15 min。慢慢减速,以免搅起沉淀物。记录沉淀物体积。

注:勿用制动器!

- b) 离心后,用吸气装置将沉淀物上层悬浮液体吸出,保留 8 mL~10 mL 液体(吸气装置的压力应小于 3.3 kPa)。
- c) 如果压实的沉淀物体积小于或等于 0.5 mL,将试管置于旋转式搅拌器 20 s,然后将样品转入 Leighton 管中;用 1 mL 纯水冲洗离心瓶二次,清洗液转入同一 Leighton 管中。

- d) 如果压实的沉淀物体积大于 0.5 mL,用公式(4)确定在离心管中需要的总体积,以便将再悬浮的沉淀物调整到相当于 0.5 mL 压实沉淀物的体积。

$$\text{需要的总体积(mL)} = \text{沉淀物体积} \times 10 \text{ mL}/0.5 \text{ mL} \dots\dots\dots(4)$$

加纯水到离心管中,使其总体积到上面计算的水平。将试管旋转搅拌 10 s~15 s,以便使沉淀物再悬浮。记录这个再悬浮物的体积。

#### 8.1.4.2 免疫磁分离

8.1.4.2.1 长时间在 0 ℃~4 ℃冷藏保存后,可能会在缓冲液 A 中形成一些结晶沉淀。为了确保这些沉淀的结晶能够再溶解,使用前应将其置室温(15 ℃~22 ℃)中直至结晶溶解。

8.1.4.2.2 加 1 mL 缓冲液 A 和 1 mL 缓冲液 B 到 Leighton 管中。

8.1.4.2.3 定量转移 10 mL 水样浓缩物到 Leighton 管中。

8.1.4.2.4 将抗隐孢子虫抗体和抗贾第鞭毛虫抗体的磁微粒原液置于漩涡混合器上搅拌,以便使珠粒悬浮。通过倒置试管的方法保证珠粒再悬浮,并确定底部没有残留的小团。

8.1.4.2.5 向含有水样浓缩物和缓冲液样品的 Leighton 管中各加 100 μL 上述悬浮的微粒。

8.1.4.2.6 将含有样品的 Leighton 管固定到旋转式的搅拌器上,25 r/min 旋转 1 h。

8.1.4.2.7 将试管从搅拌器上取下,然后再将其放在磁粒浓缩器 1 上,并将试管有平面的一边朝向磁铁。

8.1.4.2.8 用手柔和地以大约 90°角头尾相连地摇动试管,使试管的盖顶和基底轮流上下倾斜。以每秒大约倾斜一次的频率持续 2 min。

8.1.4.2.9 如果磁粒浓缩器 1 中的样品静置 10 s 以上,就要在进行下一个步骤之前,重复步骤 8.1.4.2.8。

8.1.4.2.10 立即打开顶端的盖,同时将固定在磁粒浓缩器 1 上的试管中的所有上清液倒到废液器中。做这一步骤时,不要摇动试管,也不要将试管从磁粒浓缩器 1 上取下。

8.1.4.2.11 将试管从磁粒浓缩器 1 上取下,加 1 mL 缓冲液 A。非常柔和地将试管中的所有物质再悬浮。不要形成漩涡。

8.1.4.2.12 将试管中的所有液体定量转移到有标签的 1.5 mL 微量离心管中。

8.1.4.2.13 将微量离心管放到未加磁条的磁粒子浓缩器 2 中,然后加入磁条。

8.1.4.2.14 用手 180°角轻轻地摇动试管。每秒大约摇动一个 180°角,持续大约 1 min。在这一步结束时,珠粒和卵囊会在试管的背面形成一个褐色圆点。

8.1.4.2.15 立即将固定在磁粒浓缩器 2 上的离心管和顶盖中的上清液吸出。如果同时处理一个以上的样品,就要在吸去每个离心管的上清液之前,进行 3 个 180°角的摇动动作,不要扰乱磁铁邻近管壁上的附着物。不要摇动离心管。不要将离心管从磁粒浓缩器 2 上取下。

8.1.4.2.16 将磁条从磁粒浓缩器 2 上取下。

8.1.4.2.17 加 50 μL 0.1 mol/L 的盐酸至上述微量离心管中,涡旋混合 10 s。

8.1.4.2.18 将试管放在磁粒浓缩器 2 上,室温垂直静置 10 min。

8.1.4.2.19 用力涡旋 5 s~10 s。

8.1.4.2.20 保证所有样品都在试管的底部,然后将微量离心管放在磁粒浓缩器 2 上。

8.1.4.2.21 再将磁条放到磁粒浓缩器 2 上,以大约 90°角头尾相连地轻轻摇动试管。使试管的盖顶和基底轮流上下倾斜,以每秒大约倾斜一次的频率持续 30 s。

8.1.4.2.22 准备一个载玻片,加 5 μL 1 mol/L 的氢氧化钠溶液至样品井中。

8.1.4.2.23 不要将微量离心管从磁粒浓缩器 2 上取下。将所有样品从磁粒浓缩器 2 上的微量离心管中转移到有氢氧化钠的样品井中。不要扰乱试管背壁上的珠粒。

## 8.1.4.3 染色

8.1.4.3.1 将有样品的载玻片置 37 ℃ 培养箱中干燥不超过 2 h, 或置室温避光自然风干。

8.1.4.3.2 在该玻片上加一滴(50  $\mu\text{L}$ )的纯甲醇, 然后让它自然干燥 3 min~5 min。

8.1.4.3.3 用试管准备所需体积(50  $\mu\text{L}$ )的抗隐孢子虫单克隆抗体和抗贾第鞭毛虫单克隆抗体 FITC 工作稀释液(1/1; Cellabs/PBS)。

8.1.4.3.4 加 50  $\mu\text{L}$  上述 FITC 单克隆抗体工作稀释液至玻片上。将载玻片放到湿盒中于 36 ℃ $\pm$ 1 ℃ 培养 30 min 左右。

8.1.4.3.5 30 min 后, 取出载玻片, 然后用一个干净的顶端带有真空源的巴斯德玻璃吸管轻轻地吸掉过量的荧光素标记单克隆抗体。

8.1.4.3.6 在每个玻片上加 70  $\mu\text{L}$  的 PBS, 静置 1 min~2 min 后, 吸掉多余的 PBS。

8.1.4.3.7 加 50  $\mu\text{L}$  DAPI 溶液(使用时配制, 即加 10  $\mu\text{L}$  2 mg/mL 溶于纯甲醇中的 DAPI 于 50 mL 的 PBS 中)到玻片上, 然后让它在室温静置 2 min 左右。

8.1.4.3.8 吸掉过量的 DAPI 溶液。

8.1.4.3.9 加 70  $\mu\text{L}$  的 PBS 到玻片上, 静置 1 min~2 min 后, 吸掉多余的 PBS。

8.1.4.3.10 加 70  $\mu\text{L}$  的纯水到玻片上, 静置 1 min 后, 吸掉多余的纯水。

8.1.4.3.11 让载玻片在暗处干燥后, 加一滴封固剂, 盖上盖玻片, 然后将它存放在干燥的暗盒中, 备查。

注: 如使用商用染色试剂盒, 可按照试剂盒内说明书要求进行染色。

## 8.1.4.4 镜检

打开显微镜。预热 15 min 后, 在 200 倍的荧光显微镜下检查, 再依次在 400 倍的蓝光激发(FITC 模式)、400 倍的紫外激发(DAPI 模式)下进一步证实。若 DAPI 染色结果不能确认时, 可以使用 DIC 模式观察孢囊内部结构进行确认。

贾第鞭毛虫的孢囊呈椭圆形, 长为 8  $\mu\text{m}$ ~14  $\mu\text{m}$ , 宽为 7  $\mu\text{m}$ ~10  $\mu\text{m}$ 。在 FITC 模式下, 孢囊壁会发出苹果绿色的荧光。在 DAPI 模式下, 当内部呈现亮蓝色或者观察到 1 个~4 个细胞核时, 呈 DAPI 阳性, 可确认为贾第鞭毛虫孢囊; 若呈现边缘绿色, 内部浅蓝色时, 呈 DAPI 阴性, 建议采用 DIC 模式进一步观察, 若能看到孢囊的细胞核、中轴等内部结构, 可确认为贾第鞭毛虫孢囊。

隐孢子虫的卵囊呈稍微椭圆的圆形, 直径为 4  $\mu\text{m}$ ~8  $\mu\text{m}$ 。在 FITC 模式下, 卵囊壁有苹果绿色荧光。在 DAPI 模式下, 当内部呈现亮蓝色或者观察到 1 个~4 个细胞核时, 呈 DAPI 阳性, 可确认为隐孢子虫卵囊; 若呈现边缘绿色, 内部浅蓝色时, 呈 DAPI 阴性, 建议采用 DIC 模式进一步观察, 若能看到卵囊内有 1 个~4 个月牙形孢子, 可确认为隐孢子虫卵囊。

计数整个玻片染色区域, 呈现表 7 特征的可判断为孢(卵)囊。

表 7 贾第鞭毛虫孢囊与隐孢子虫卵囊的特征

标准	重要性	备注
苹果绿色荧光的膜	+++	荧光强度可变
大小	+++	贾第鞭毛虫: (8 $\mu\text{m}$ ~14 $\mu\text{m}$ ) $\times$ (7 $\mu\text{m}$ ~10 $\mu\text{m}$ ); 隐孢子虫: 4 $\mu\text{m}$ ~8 $\mu\text{m}$
膜与细胞质的对照	++	膜的荧光强度大于细胞质



表 7 贾第鞭毛虫孢囊与隐孢子虫卵囊的特征 (续)

标准	重要性	备注
形状	++	贾第鞭毛虫,椭圆形;隐孢子虫,圆形
孢囊壁的完整性	+	孢囊壁会因破损而失去形状
<p>注 1: 紫外激发光下观察 DAPI 染色结果用于确认是否为孢(卵)囊,因为假的孢(卵)囊(苹果绿色物体)呈 DAPI 阴性(无 4 个亮蓝色核,只有亮蓝色胞浆),出现 4 个亮蓝色核和亮蓝色胞浆为 DAPI 阳性,为真孢(卵)囊。</p> <p>注 2: 当 DAPI 染色不能确认时,可以使用 DIC 模式观察孢(卵)囊内部结构。</p> <p>注 3: 如 DIC 模式下结构清楚,有助于真孢(卵)囊计数,如结构不清楚且只有囊壁呈苹果绿色荧光时,可能是空的孢(卵)囊,或带有无定形结构的孢(卵)囊,亦可能是有内部结构的孢(卵)囊。</p>		

### 8.1.5 试验数据处理

#### 8.1.5.1 按公式(5)计算每 10 升样本中的孢(卵)囊数:

$$Y = \frac{X \times V}{V_1 \times V_2} \times 10 \quad \dots\dots\dots(5)$$

式中:

$Y$  ——每 10 升水中孢囊或卵囊的数目,单位为个每 10 升(个/10 L);

$X$  ——计数样本的体积中孢囊或卵囊的数目,单位为个(个);

$V$  ——离心后再悬浮的体积,单位为毫升(mL);

$V_1$  ——计数样品的体积,单位为毫升(mL);

$V_2$  ——过滤后水的体积,单位为升(L)。

#### 8.1.5.2 按公式(6)计算分析的检测限:

$$D = \frac{V}{V_1 \times V_2} \quad \dots\dots\dots(6)$$

式中:

$D$  ——每升孢囊或卵囊的检测限;

$V$  ——离心后再悬浮的体积,单位为毫升(mL);

$V_1$  ——计数样品的体积,单位为毫升(mL);

$V_2$  ——过滤后水的体积,单位为升(L)。

### 8.1.6 质量控制

#### 8.1.6.1 免疫荧光质量控制

免疫荧光试剂盒的质量控制应每批次试验做一次,由阳性对照和阴性对照组成。

##### 8.1.6.1.1 阴性对照

按以下步骤进行。

- a) 准备一个载玻片。
- b) 加 50  $\mu$ L 纯水,然后将它放在培养箱中干燥。
- c) 染色步骤应符合 8.1.4.3 的要求。
- d) 对整个染色区域进行计数,不得找出任何贾第鞭毛虫孢囊和隐孢子虫的卵囊。

#### 8.1.6.1.2 阳性对照

按以下步骤进行。

- a) 准备一个载玻片。
- b) 将阳性对照样品涡旋 2 min,以混匀储存的原虫孢(卵)囊。
- c) 在玻片上滴加 5  $\mu$ L 贾第鞭毛虫孢囊和 5  $\mu$ L 隐孢子虫卵囊阳性样本,然后放在培养箱中干燥。
- d) 染色步骤应符合 8.1.4.3 的要求。
- e) 对整个染色区域进行计数,应找到表 7 中描述的规则而均匀的染色孢囊和卵囊。

#### 8.1.6.2 试验全程的质量控制

整个步骤(从采样到显微镜检查)的质量控制应每三个月做一次。它由两个试验组成:20 L 加有原虫的水作为阳性对照,20 L 的纯水作为阴性对照。

##### 8.1.6.2.1 阴性对照

按以下步骤进行。

- a) 加 20 L 纯水到小口塑料瓶中。
- b) 按样品分析步骤分析阴性对照水样。不得找到任何贾第鞭毛虫孢囊和隐孢子虫卵囊。

##### 8.1.6.2.2 阳性对照

###### 8.1.6.2.2.1 原虫接种液的计数

按以下步骤进行。

- a) 涡旋 2 min 储存的原虫孢(卵)囊。
- b) 在一个有 10 mL 纯水的烧杯中加入一些孢囊和卵囊,以便得到一个最终浓度大约每毫升  $5 \times 10^4$  个孢(卵)囊的溶液。
- c) 用磁棒搅拌 30 min。
- d) 用载玻片测定这种溶液的浓度 10 次。
- e) 用载玻片[加大约 250 个孢(卵)囊到玻片上]测定这种溶液的浓度 5 次。

计数这两种方法的浓度和标准差。如果标准差小于 25%,那么就可以把这个读数看作是正确。如果标准差大于 25%,就要制备新的原虫接种液,然后再测定它的浓度。

###### 8.1.6.2.2.2 阳性对照的分析

按以下步骤进行。

- a) 在装有 10 L 纯水的小口塑料或玻璃瓶中加入 500 个贾第鞭毛虫的孢囊和 500 个隐孢子虫的卵囊。
- b) 过滤该水样。
- c) 用 10 L 纯水冲洗小口塑料瓶,然后继续过滤。
- d) 按样品分析步骤分析阳性对照水样。

如回收率在 10%~100%之间,则符合质量控制要求;如不在此范围,需检查所有的设备和试剂,同时再做一个阳性对照。

## 8.2 滤膜浓缩/密度梯度分离荧光抗体法

### 8.2.1 原理

首先通过微孔滤膜法过滤水样浓缩样品或加入氯化钙溶液和碳酸氢钠溶液形成碳酸钙沉淀浓缩样品,将浓缩后的样品通过密度梯度离心进行分离纯化,然后将纯化后的样品经免疫荧光染色,通过荧光显微镜对贾第鞭毛虫孢囊进行定性分析和定量检测。具有高藻、高有机质和高絮凝剂含量的水源水样本应先进行前期处理。

### 8.2.2 培养基与试剂

8.2.2.1 纯水,GB/T 6682,一级。

8.2.2.2 丙酮[ $\varphi(\text{CH}_3\text{COCH}_3) \geq 99.5\%$ ]。

8.2.2.3 乙醇[ $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 75\%$ ];乙醇[ $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 75\%$ ]或通过将 75 mL 无水乙醇用纯水稀释至 100 mL 配制获得。

8.2.2.4 Percoll-蔗糖溶液:称取 17.1 g 蔗糖溶解于 45 mL 纯水中,加入 45 mL 的 Percoll,然后加入纯水至 100 mL,混匀。此溶液的密度在  $1.10 \text{ g/cm}^3 \sim 1.15 \text{ g/cm}^3$  之间。于  $0 \text{ }^\circ\text{C} \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$  冷藏保存条件下可使用 7 d。

8.2.2.5 磷酸盐缓冲液(PBS):分别称取 8.0 g 氯化钠、2.9 g 十二水合磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、0.2 g 氯化钾、0.2 g 磷酸二氢钾,用纯水溶解至 1 000 mL。用 1 mol/L 盐酸溶液或氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.2~7.4 之间。于  $0 \text{ }^\circ\text{C} \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$  冷藏保存条件下可使用 7 d。

8.2.2.6 磷酸盐吐温缓冲液(PBST):向 100 mL PBS 中加入 0.01 mL 吐温-80,混匀。室温条件下可储存使用 30 d。

8.2.2.7 DABCO-甘油:称取 12.6 g 甘油,边搅拌加热至  $60 \text{ }^\circ\text{C} \sim 70 \text{ }^\circ\text{C}$ ,然后加入 0.2 g 的 1,4-二偶氮双环(2,2,2)辛烷(DABCO),搅拌溶解。室温条件下可储存使用 12 个月。

8.2.2.8 牛血清蛋白(BSA)溶液[ $\rho(\text{BSA}) = 1.0 \text{ g/L}$ ]:称取 0.1 g 牛血清蛋白(BSA)溶解于 100 mL 纯水中,用  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜过滤备用。于  $0 \text{ }^\circ\text{C} \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$  冷藏保存,可使用 1 个月。

8.2.2.9 DAPI 染色液:称取 2 mg 的 DAPI 溶解于 1 mL 甲醇中,作为 DAPI 储备液,于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  避光保存可使用 1 年。使用时,取  $1 \mu\text{L}$  的 DAPI 储备液加入到 5 mL 的 PBS 中,混匀后得到 DAPI 染色液,于  $0 \text{ }^\circ\text{C} \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$  冷藏避光保存并在当日使用。

8.2.2.10 免疫荧光试剂:抗贾第鞭毛虫单克隆抗体-异硫氰荧光素试剂盒。于  $0 \text{ }^\circ\text{C} \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$  冷藏保存。

8.2.2.11 脱水剂 30:向 30 mL 无水乙醇中加入 5 mL 的甘油,然后用纯水定容到 100 mL。于  $0 \text{ }^\circ\text{C} \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$  冷藏保存可使用 1 年。

8.2.2.12 脱水剂 70:向 70 mL 无水乙醇中加入 5 mL 的甘油,然后用纯水定容到 100 mL。于  $0 \text{ }^\circ\text{C} \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$  冷藏保存可使用 1 年。

8.2.2.13 脱水剂 90:向 90 mL 无水乙醇中加入 5 mL 的甘油,然后用纯水定容到 100 mL。于  $0 \text{ }^\circ\text{C} \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$  冷藏保存可使用 1 年。

8.2.2.14 贾第鞭毛虫孢囊:每份溶液中含 100 个贾第鞭毛虫孢囊。于  $0 \text{ }^\circ\text{C} \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$  冷藏保存,使用前通过免疫荧光染色确认其浓度。

8.2.2.15 氯化钙溶液[ $c(\text{CaCl}_2) = 1.0 \text{ mol/L}$ ]:称取 111.0g 氯化钙,用纯水溶解,稀释至 1 000 mL。

8.2.2.16 碳酸氢钠溶液[ $c(\text{NaHCO}_3) = 1.0 \text{ mol/L}$ ]:称取 84.0 g 碳酸氢钠,用纯水溶解,稀释至 1 000 mL。

8.2.2.17 氢氧化钠溶液[ $c(\text{NaOH}) = 10 \text{ mol/L}$ ]:称取 40.0 g 氢氧化钠,用纯水溶解,稀释至 100 mL。

8.2.2.18 氨基磺酸溶液 [ $\rho(\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}) = 97.0 \text{ g/L}$ ]; 称取 97.0 g 氨基磺酸, 用纯水溶解, 稀释至 1 000 mL。

### 8.2.3 仪器设备

8.2.3.1 富集过滤装置: 配置蠕动泵(最大频率 600 r/min)和硅胶管的不锈钢过滤器(直径 142 mm)或同等功能的一体化过滤装置。

8.2.3.2 离心机: 可离心 15 mL 锥形离心管和 500 mL 离心杯, 离心力可达到 2 000  $g$ , 可进行刹车挡位选择。

8.2.3.3 pH 计。

8.2.3.4 磁力搅拌器: 搅拌容量涵盖 10 L。

8.2.3.5 真空抽滤器。

8.2.3.6 涡旋振荡器。

8.2.3.7 真空泵: 压力可调范围为 0 mmHg~5 mmHg。

8.2.3.8 显微镜: 荧光装置和微分干涉装置。450 nm~480 nm 蓝色滤光片; 330 nm~385 nm 紫外滤光片; 20 倍、40 倍、100 倍物镜。

8.2.3.9 采样桶: 10 L、50 L。材质为聚乙烯。

8.2.3.10 平底桶: 10 L, 材质为聚丙烯。

8.2.3.11 无齿镊子。

8.2.3.12 密度计: 量程涵盖 1.10  $\text{g/cm}^3$ ~1.15  $\text{g/cm}^3$ 。

8.2.3.13 免疫组化笔。

8.2.3.14 电子天平。

8.2.3.15 烧杯: 100 mL 和 1 000 mL。

8.2.3.16 容量瓶: 1 mL、10 mL、100 mL 和 1 000 mL。

8.2.3.17 混合纤维素酯微孔滤膜: 孔径 1  $\mu\text{m}$ , 直径 142 mm。

8.2.3.18 醋酸纤维微孔滤膜: 孔径 3  $\mu\text{m}$ , 直径 25 mm。

8.2.3.19 载玻片。

8.2.3.20 盖玻片。

8.2.3.21 锥形底离心管: 15 mL、50 mL。材质为聚丙烯。

8.2.3.22 离心杯: 500 mL。

8.2.3.23 巴斯德玻璃吸管。

### 8.2.4 试验步骤

#### 8.2.4.1 采样

8.2.4.1.1 根据水样类型不同, 采集不同体积水样: 水源水宜采集 10 L, 生活饮用水宜采集 50 L。

8.2.4.1.2 样品采集后若不能立即处理, 可于 1  $^{\circ}\text{C}$ ~10  $^{\circ}\text{C}$  冷藏保存, 在 72 h 内进行浓缩处理。

#### 8.2.4.2 样品浓缩

##### 8.2.4.2.1 微孔滤膜过滤法(适用于浑浊度小于 20 NTU 的水样)

8.2.4.2.1.1 将不锈钢过滤器通过软管经蠕动泵和水样相连。将混合纤维素酯微孔滤膜正面向上置于过滤装置上, 用纯水淋洗滤膜使滤膜与滤器间无气泡, 安装好过滤器。打开蠕动泵过滤水样。若过滤压

力过大(流速低于 0.3 L/min 时),可更换新的滤膜重复上述步骤。水样过滤完之后,依次用约 200 mL 的 PBST、75%乙醇和纯水清洗采样桶,并将清洗液过滤。过滤结束后,打开过滤装置,使用平头镊子将滤膜正面向内多次对折,将折叠好的滤膜置于 50 mL 的锥形底离心管中。若使用多张滤膜,可放置于同一 50 mL 锥形底离心管中。

注:蠕动泵转速设置推荐 300 r/min~600 r/min,在此条件下水样流速为 0.3 L/min~2 L/min。

8.2.4.2.1.2 向上述 50 mL 锥形底离心管中加入丙酮至 40 mL,摇晃混匀使滤膜完全溶解。将溶解液分装进 4 个 15 mL 离心管中,在 1 050 g 条件下离心 10 min(勿用制动器,减速度为 0)。离心结束后,用吸管吸去上清液,留下沉淀物。再次向 50 mL 锥形底离心管中加入 40 mL 丙酮进行混匀,混合液分装至上述 4 个 15 mL 离心管中,混匀后在 1 050 g、20 ℃条件下离心 10 min(勿用制动器,减速度为 0)。离心结束后,用吸管吸去上清液至盛水的烧杯中,检查上清液是否因含混合纤维素酯滤膜而遇水后生成白色絮体。如有,再次向有白色絮体的 15 mL 离心管中添加丙酮并离心去上清液,直至上清液遇水无白色絮体生成。

8.2.4.2.1.3 向上述 4 个 15 mL 离心管离心后的沉淀物中分别加入 1.25 mL 75%乙醇,轻轻混匀,再缓慢加入 PBS 至 10 mL。2 000 g、20 ℃条件下离心 10 min(勿用制动器,减速度为 0)。离心后吸去上清液,保留沉淀物。记录 4 个 15 mL 离心管中沉淀物的总体积为  $V$ 。

8.2.4.2.1.4 若沉淀物总体积  $V$  小于或等于 2 mL,向上述 4 个 15 mL 离心管浓缩后的沉淀物中各加入 2.5 mL 的 PBST,置于涡旋振荡器上振荡 1 min 混匀。并且记录该样品的  $V_1 = V$ 。

8.2.4.2.1.5 若沉淀物总体积  $V$  大于 2 mL,向上述 4 个 15 mL 离心管浓缩后的沉淀物中需各加入的 PBST 体积为 1.25 倍的  $V$ 。置于涡旋振荡器上振荡 1 min 混匀。将 4 个 15 mL 离心管中的混合液分装至多个 15 mL 离心管,保证每个离心管内样品体积不超过 3 mL。该样品用于后续分离纯化和染色镜检的离心管数量最好大于或等于 4 个, $V_1$  为用于后续分离纯化和染色镜检的液体体积的 1/6。

#### 8.2.4.2.2 碳酸钙沉淀法(适用于浑浊度大于或等于 20 NTU 的水样)

8.2.4.2.2.1 将水样转入 10 L 平底桶,置于磁力搅拌器上,边搅拌边加入 100 mL 氯化钙溶液,待混匀后边搅拌边加入 100 mL 碳酸氢钠溶液。

8.2.4.2.2.2 用氢氧化钠溶液调节 pH 至 10,静置 12 h~16 h 后使用软管通过虹吸效应吸去上清液,余下约 200 mL 沉淀物。

8.2.4.2.2.3 加入 200 mL 的氨基磷酸溶液溶解余下的沉淀物,转移至 500 mL 离心杯中,用少量 PBST 分次洗涤平底桶,将洗涤液均加入上述 500 mL 离心杯中。在 2 000 g、20 ℃条件下离心 10 min(勿用制动器,减速度为 0),弃去上清液,留下沉淀物。

8.2.4.2.2.4 向离心杯中加入约 15 mL PBST,摇匀后平均分配至 4 个 15 mL 离心管中,再用 15 mL PBST 分 3 次洗涤离心杯,均分别转移至上述 15 mL 离心管中。在 2 000 g、20 ℃条件下离心 10 min(勿用制动器,减速度为 0),吸去上清液,保留沉淀物。向上述各 15 mL 离心管的沉淀物中添加 PBS 至 10 mL,混匀,在 2 000 g、20 ℃条件下离心 10 min(勿用制动器,减速度为 0),吸去上清液,保留沉淀物。记录 4 个 15 mL 离心管中沉淀物的总体积为  $V$ 。

8.2.4.2.2.5 若沉淀物总体积  $V$  小于或等于 2 mL,向上述浓缩后的沉淀物中各加入 2.5 mL 的 PBST,置于涡旋振荡器上振荡 1 min 混匀。并且记录  $V_1 = V$ 。

8.2.4.2.2.6 若沉淀物总体积  $V$  大于 2 mL,向上述 4 个 15 mL 离心管浓缩后的沉淀物中需各加入的 PBST 体积为 1.25 倍的  $V$ 。置于涡旋振荡器上振荡 1 min 混匀。将 4 个 15 mL 离心管中的混合液分装至多个 15 mL 离心管,保证每个离心管内样品体积不超过 3 mL。该样品用于后续分离纯化和染色镜检的离心管数量最好大于或等于 4 个, $V_1$  为实际用于后续分离纯化和染色镜检的液体体积的 1/6。

8.2.4.2.2.7 水样量大于 10 L 时,根据水样体积重复步骤 8.2.4.2.2.1~8.2.4.2.2.4,并根据 15 mL 离心管中沉淀物的体积选择步骤 8.2.4.2.2.5 或者 8.2.4.2.2.6 进行沉淀物重悬。

### 8.2.4.3 分离纯化

将每个 15 mL 离心管内溶液混匀,然后用巴斯德玻璃吸管从溶液底部缓慢加入 5 mL Percoll-蔗糖溶液,加入过程中避免搅混两种溶液。在 1 050 g、20 ℃ 条件下离心 10 min(勿用制动器,减速度为 0)。离心结束后,用塑料吸管取中间层(从中间层上部吸取)富含孢囊的混合液于新的 15 mL 离心管中。同一个样品的孢囊混合液可放置于同一离心管中。向离心后的沉淀物中添加 2.5 mL 的 PBST,混匀。再次从溶液底部缓慢加入 5 mL Percoll-蔗糖溶液按照上述步骤进行二次分离纯化,纯化后取中间层混合液。与上述混合液合并。

### 8.2.4.4 染色

8.2.4.4.1 用免疫组化笔在醋酸纤维滤膜的外周画圆圈,再用镊子将滤膜平移至纯水液面上使其反面湿润。操作时滤膜不要浸入液面。

8.2.4.4.2 将上述醋酸纤维滤膜用平头镊子平移至真空抽滤器上,用吸管吸取上述混合液逐滴加到圆圈内进行抽滤。滴加时避免将混合液溅到圆圈外。抽滤过程中,滤膜上要保持有一薄层液面,以防止滤膜干燥后破损。抽滤液体后,用 3 mL PBS 淋洗 15 mL 离心管,淋洗液用上述方法抽滤。抽滤液体后,在滤膜圆圈内滴加 0.50 mL BSA 溶液,保持 2 min,若圆圈内仍有明显液体残留则继续抽滤。

8.2.4.4.3 用镊子将滤膜平移至载玻片上,在滤膜圆圈内滴加一滴免疫荧光试剂。将载玻片置于潮湿暗环境中,在室温条件下避光静置 30 min。再向滤膜圆圈内滴加 0.10 mL DAPI 染色溶液,室温条件下避光静置 10 min。

8.2.4.4.4 用镊子将滤膜平移至真空抽滤器上进行抽滤,在滤膜圆圈内滴加 4 mL PBS 进行淋洗。抽滤液体后,依次向圆圈内滴加各 3 mL 的脱水剂 30、脱水剂 70 和脱水剂 90 进行抽滤。

8.2.4.4.5 于新的载玻片上滴加 1 滴 DABCO-甘油,用镊子将上述滤膜平行移到有 DABCO-甘油的载玻片上。再在滤膜圆圈内滴加一滴 DABCO-甘油,盖上盖玻片(不要有气泡)并进行固定。于 0 ℃~4 ℃ 冷藏避光保存,保存期为 7 d。

### 8.2.4.5 镜检

应符合 8.1.4.4 的要求。对滤膜圆圈内全部样品进行计数。

## 8.2.5 试验数据处理

8.2.5.1 按公式(7)报告每 10 升样本中的孢囊数(个):

$$Y = \frac{X \times V}{V_1 \times V_2} \times 10 \quad \dots\dots\dots(7)$$

式中:

Y —— 每 10 升样本中孢囊的数目,单位为个每 10 升(个/10 L);

X —— 计数样本的体积中孢囊的数目,单位为个(个);

V —— 水样浓缩后所得沉淀物总体积,单位为毫升(mL);

V<sub>1</sub> —— 用于镜检计数的沉淀物体积,单位为毫升(mL);

V<sub>2</sub> —— 采集的水样体积,单位为升(L)。

8.2.5.2 按公式(8)计算分析相对标准偏差：

$$\text{RSD} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}}{\bar{x}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(8)$$

式中：

RSD —— 相对标准偏差；

$\bar{x}$  —— 孢囊数目的平均值，单位为个(个)；

$x_i$  —— 孢囊的数目，单位为个(个)；

$n$  —— 测定次数。

## 8.2.6 质量控制

### 8.2.6.1 免疫荧光试剂盒的质量控制

#### 8.2.6.1.1 免疫荧光试剂盒的质量控制组成

免疫荧光试剂盒的质量控制由阴性对照和阳性对照两个试验组成。样品分析时，每周进行一次。

#### 8.2.6.1.2 阴性对照

取 50  $\mu\text{L}$  PBS 作为样品按照 8.2.4.4 进行染色，然后镜检，检测结果不应有任何贾第鞭毛虫孢囊的检出。

#### 8.2.6.1.3 阳性对照

取 10  $\mu\text{L}$  免疫荧光试剂盒中阳性控制样品滴于滤膜上直接染色，在显微镜下观察，荧光镜检时，保证至少 50% 孢囊外形完好、未受损伤，孢囊的形态符合表 7 中描述的特征。

### 8.2.6.2 试验全程的质量控制

#### 8.2.6.2.1 试验全程的质量控制组成

试验全程的质量控制是对从采样到镜检的全过程进行质量控制，由阴性对照和阳性对照两个试验组成。样品分析时，每批水样检测前进行一次。

#### 8.2.6.2.2 阴性对照

用 10 L 纯水作为空白，进行浓缩、分离纯化和染色后做镜检分析，若未检出任何孢囊，表明试验中未带进污染，可以进行后续操作。

#### 8.2.6.2.3 阳性对照

为确保准确计算阳性对照的回收率，在每次阳性对照试验前对使用的已知浓度的原虫接种液进行质量控制，因此阳性对照分为原虫接种液的质量控制和阳性对照分析两部分内容。

##### 8.2.6.2.3.1 原虫接种液样品的质量控制

按以下步骤进行。

- a) 直接购买的已知数量的接种液。遵循说明书进行保存并在保质期内使用。对同批次样品，使用前通过染色镜检确认孢囊数目。

- b) 通过流式分选获得的已知孢囊数目的样品。进行染色镜检,统计孢囊数目。该试验进行 5 次,计算平均浓度和标准差。如果标准差小于 25%,那么以此平均浓度值为该批原虫接种液的浓度。如果标准差大于 25%,重新准备样品并进行质量控制。
- c) 通过稀释获得的原虫接种液:涡旋 2 min 存储的原虫,在一个有 10 mL 纯水的烧杯中加一些孢囊,以便得到一个最终浓度大约每毫升  $5 \times 10^4$  个孢囊的溶液,用磁棒搅拌 30 min。用血球计数器测定这种溶液的浓度 10 次,通过染色镜检测定这种溶液的浓度 5 次。计数这两种方法的浓度和标准差。如果标准差小于 25%,那么就可以把这个读数看作是正确。如果标准差大于 25%,就要制备新的原虫接种液,然后再测定它的浓度。

注 1:根据实际情况选择其中一种方式进行质量控制。

注 2:按公式(9)计算平均值:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad \dots\dots\dots(9)$$

按公式(10)计算标准差:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad \dots\dots\dots(10)$$

式中:

- $\sigma$  ——标准差;
- $N$  ——总样本数;
- $i$  ——为第  $i$  个样本;
- $\bar{x}$  ——平均值。

8.2.6.2.3.2 阳性对照分析

在 10 L 纯水样品中加 100 个~500 个贾第鞭毛虫孢囊,依次进行浓缩、分离纯化、染色和镜检,计算其回收率。在每批水样检测之前进行一次阳性对照试验。此方法的回收率在 20%~100%之间。如不在此范围,需检查所有设备和试剂后重做阳性对照试验。

9 隐孢子虫

9.1 免疫磁分离荧光抗体法

9.1.1 原理

采用过滤和反向冲洗技术从水样中富集隐孢子虫卵囊,借助免疫磁分离技术将隐孢子虫卵囊从其他杂质中分离出来,再经过酸化脱磁、FITC/DAPI 染色,最后经过显微镜检确认和计数的方法。

9.1.2 培养基与试剂

应符合 8.1.2 的要求。

9.1.3 仪器设备

应符合 8.1.3 的要求。

9.1.4 试验步骤

应符合 8.1.4 的要求。



### 9.1.5 试验数据处理

应符合 8.1.5 的要求。

### 9.1.6 质量控制

应符合 8.1.6 的要求。

## 9.2 滤膜浓缩/密度梯度分离荧光抗体法

### 9.2.1 原理

滤膜浓缩/密度梯度分离荧光抗体法检测隐孢子虫卵囊的原理同贾第鞭毛虫孢囊,按 8.2.1 描述的方法测定。

### 9.2.2 培养基与试剂

9.2.2.1 免疫荧光试剂:抗隐孢子虫单克隆抗体-异硫氰荧光素试剂盒。于 0℃~4℃ 冷藏保存。

9.2.2.2 隐孢子虫卵囊:每份溶液中含 100 个隐孢子虫卵囊,于 0℃~4℃ 冷藏保存。使用前通过免疫荧光染色确认其浓度。

9.2.2.3 其他培养基与试剂应符合 8.2.2 的要求。

### 9.2.3 仪器设备

应符合 8.2.3 的要求。

### 9.2.4 试验步骤

应符合 8.2.4 的要求。

### 9.2.5 试验数据处理

应符合 8.2.5 的要求。

### 9.2.6 质量控制

应符合 8.2.6 的要求。

## 10 肠球菌

### 10.1 多管发酵法

#### 10.1.1 原理

多管发酵法计数基于泊松分布的 MPN 理论,用于估算出样品单位体积中细菌数的 MPN 值。本试验中选择使用肠球菌肉汤,因其中含有叠氮化钠,有利于肠球菌生长的同时抑制革兰阴性菌的繁殖。

#### 10.1.2 培养基与试剂

警示:10.1.2.1 和 10.1.2.2 中叠氮化钠属于剧毒化学品,储存及配制过程中需小心谨慎操作,避免高热及剧烈震动引起意外。

### 10.1.2.1 肠球菌肉汤培养基

#### 10.1.2.1.1 成分

按如下成分配制：

a) 胰蛋白胨	17.0 g
b) 牛肉浸膏	3.0 g
c) 酵母浸膏	5.0 g
d) 牛胆粉	10.0 g
e) 氯化钠	5.0 g
f) 柠檬酸钠( $\text{NaC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ )	1.0 g
g) 七叶苷	1.0 g
h) 柠檬酸铁铵	0.5 g
i) 叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ )	0.25 g
j) 纯水	1 000 mL

#### 10.1.2.1.2 制法

将上述各成分加热煮沸至溶解，待冷却后，调节 pH 至 7.0~7.4。每管分装 10 mL，121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min。若制备双料浓度的肠球菌肉汤，可将上述配方中纯水改为 500 mL。

### 10.1.2.2 肠球菌琼脂(胆汁七叶苷叠氮钠琼脂)培养基

#### 10.1.2.2.1 成分

按如下成分配制：

a) 胰酶消化酪蛋白胨	17.0 g
b) 牛肉浸膏	3.0 g
c) 酵母浸膏	5.0 g
d) 牛胆粉	10.0 g
e) 氯化钠	5.0 g
f) 柠檬酸钠	1.0 g
g) 七叶苷	1.0 g
h) 柠檬酸铁铵	0.5 g
i) 叠氮化钠	0.25 g
j) 琼脂	13.5 g
k) 纯水	1 000 mL

#### 10.1.2.2.2 制法

将上述各成分加热煮沸至溶解，待冷却后，调节 pH 至 7.0~7.4，121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min，于 45 ℃~50 ℃ 倾注平板备用。

### 10.1.2.3 胆汁七叶苷琼脂培养基(BEA)

#### 10.1.2.3.1 成分

按如下成分配制：

a) 蛋白胨	8.0 g
b) 胆盐	20.0 g
c) 柠檬酸铁( $\text{FeC}_3\text{H}_5\text{O}_7$ )	0.5 g
d) 七叶苷	1.0 g
e) 琼脂	15.0 g
f) 纯水	1 000 mL

#### 10.1.2.3.2 制法

将上述各成分加入纯水中,缓慢加热溶解,121 ℃高压蒸汽灭菌 15 min,于 45 ℃~50 ℃倾注平板备用。

#### 10.1.2.4 脑心浸液肉汤(BHIB)培养基

##### 10.1.2.4.1 成分

按如下成分配制:

a) 牛心粉	5.0 g
b) 胰蛋白质胨	10.0 g
c) 葡萄糖	2.0 g
d) 氯化钠	5.0 g
e) 无水磷酸氢二钠	2.5 g
f) 纯水	1 000 mL

##### 10.1.2.4.2 制法

将各成分加入纯水中,加热溶解,冷却后调节 pH 至 7.0~7.4,分装到试管中,121 ℃高压蒸汽灭菌 15 min。

#### 10.1.2.5 含 6.5%氯化钠脑心浸液肉汤培养基

##### 10.1.2.5.1 成分

按如下成分配制:

a) 脑心浸液肉汤(BHIB)培养基	除纯水外,其他成分应符合 10.1.2.4 的要求
b) 氯化钠	65.0 g
c) 纯水	1 000 mL

##### 10.1.2.5.2 制法

将各成分加入纯水中,加热溶解,冷却后调节 pH 至 7.0~7.4,分装到试管中,121 ℃高压蒸汽灭菌 15 min。

#### 10.1.2.6 脑心浸萃琼脂(BHIA)培养基

##### 10.1.2.6.1 成分

按如下成分配制:

a) 幼牛脑浸萃	200.0 g
----------	---------

b) 牛心浸萃	250.0 g
c) 豚胶	10.0 g
d) 葡萄糖	2.0 g
e) 氯化钠	5.0 g
f) 无水磷酸氢二钠	2.5 g
g) 琼脂	15.0 g
h) 纯水	1 000 mL

#### 10.1.2.6.2 制法

将各成分加入纯水中,加热溶解,冷却后调节 pH 至 7.0~7.4,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min,于 45 ℃~50 ℃ 倾注平板备用。

#### 10.1.2.7 革兰氏染色液

应符合 5.1.2.4 的要求。

#### 10.1.3 仪器设备

10.1.3.1 高压蒸汽灭菌器。

10.1.3.2 电炉。

10.1.3.3 恒温培养箱:35 ℃±2 ℃、35 ℃±0.5 ℃、45 ℃±0.5 ℃。

10.1.3.4 冰箱。

10.1.3.5 电子天平。

10.1.3.6 显微镜。

10.1.3.7 pH 计。

10.1.3.8 平皿:直径 9 cm。

10.1.3.9 试管:18 mm×180 mm、15 mm×160 mm。

10.1.3.10 无菌吸管:1 mL、10 mL。

10.1.3.11 锥形瓶:500 mL。

10.1.3.12 酒精灯。

10.1.3.13 接种环。

10.1.3.14 载玻片。

#### 10.1.4 试验步骤

##### 10.1.4.1 增菌液发酵试验

10.1.4.1.1 以无菌操作方法用无菌吸管吸取 10 mL 充分混匀的水样接种到 10 mL 双料肠球菌肉汤培养液中,取 1 mL 水样接种到 10 mL 单料肠球菌肉汤培养液中。另取 1 mL 水样注入到 9 mL 无菌生理盐水中,充分混匀后取 1 mL(即 0.1 mL 水样)注入到 10 mL 单料肠球菌肉汤培养液中。每一稀释度平行接种 3 管。

10.1.4.1.2 当生活饮用水可能处于较为严重的污染时,应加大稀释度,可接种 1 mL、0.1 mL、0.01 mL 或 0.1 mL、0.01 mL、0.001 mL,每个稀释度接种 3 管,每个水样共接种 9 管。宜选择包含阴性反应终点,即含有非 3 管全部发酵最低稀释度的 3 个连续稀释度。接种 1 mL 以下水样时,应作 10 倍递增稀释后,取 1 mL 水样接种到 9 mL 无菌生理盐水中,充分混匀后取 1 mL 再进行稀释。每次更换 1 支

1 mL无菌吸管。

10.1.4.1.3 将肠球菌肉汤管置于  $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱内,培养  $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。若肠球菌肉汤无明显黑色沉淀,则可报告肠球菌未检出。如肠球菌肉汤呈现明显黑色沉淀,则按下列步骤进行。

#### 10.1.4.2 分离培养

将带黑色沉淀的肠球菌肉汤增菌液分别接种于肠球菌琼脂平板,于  $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。观察菌落形态,挑取有棕色菌环的棕黑色大菌落 10 个,进行革兰氏染色、镜检和证实试验。

#### 10.1.4.3 证实试验

挑取 10 个典型菌落,同时接种 BHIB 肉汤和 BHIA 平板,BHIB 肉汤置  $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ ,BHIA 平板置  $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。纯培养后 BHIB 肉汤分别接种 BEA 平板,6.5%氯化钠 BHIB 肉汤和 BHIB 肉汤。将 BEA 平板和 6.5%氯化钠 BHIB 肉汤置于  $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ ;BHIB 肉汤置于  $45\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ ,观察细菌生长情况。挑取 BHIA 平板上生长菌落进行革兰氏染色。染色镜检为革兰氏染色阳性球菌;BEA 平板上生长并水解七叶苷(形成黑色或棕色沉淀);6.5%氯化钠的 BHIB 肉汤  $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  生长良好;BHIB 肉汤  $45\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  生长;具备以上特征的典型菌落可证实为肠球菌。

#### 10.1.5 试验数据处理

根据证实为肠球菌阳性的管数,对照表 8,报告每 100 mL 水样中的肠球菌 MPN 值,以 MPN/100 mL 表示。如所有培养管均为阴性时,可报告肠球菌未检出。

表 8 肠球菌 9 管法 MPN 表

接种量/mL			肠球菌/ (MPN/100 mL)	95%置信区间		接种量/mL			肠球菌/ (MPN/100 mL)	95%置信区间	
10	1	0.1		下限	上限	10	1	0.1		下限	上限
0	0	0	<3.0	—	9.5	2	0	1	14	3.6	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	0	2	20	4.5	42
0	1	0	3.0	0.15	11	2	1	0	15	3.7	42
0	1	1	6.1	1.2	18	2	1	1	20	4.5	42
0	2	0	6.2	1.2	18	2	1	2	27	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	2	2	0	21	4.5	42
1	0	0	3.6	0.17	18	2	2	1	28	8.7	94
1	0	1	7.2	1.3	18	2	2	2	35	8.7	94
1	0	2	11	3.6	38	2	3	0	29	8.7	94
1	1	0	7.4	1.3	20	2	3	1	36	8.7	94
1	1	1	11	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	2	0	11	3.6	42	3	0	1	38	8.7	110
1	2	1	15	4.5	42	3	0	2	64	17	180
1	3	0	16	4.5	42	3	1	0	43	9	180
2	0	0	9.2	1.4	38	3	1	1	75	17	200

表 8 肠球菌 9 管法 MPN 表 (续)

接种量/mL			肠球菌/ (MPN/100 mL)	95%置信区间		接种量/mL			肠球菌/ (MPN/100 mL)	95%置信区间	
10	1	0.1		下限	上限	10	1	0.1		下限	上限
3	1	2	120	37	420	3	2	3	290	90	1 000
3	1	3	160	40	420	3	3	0	240	42	1 000
3	2	0	93	18	420	3	3	1	460	90	2 000
3	2	1	150	37	420	3	3	2	1 100	180	4 100
3	2	2	210	40	430	3	3	3	>1 100	420	—

注 1: 本表采用 3 个稀释度(10 mL、1 mL 和 0.1 mL),每个稀释度接种 3 管。10 mL 水样需要接种双料增菌液。  
注 2: 表内所列接种量如改用 1 mL、0.1 mL 和 0.01 mL 时,则表内数字应相应增高 10 倍,其余以此类推。

### 10.1.6 质量控制

#### 10.1.6.1 培养基检验

更换不同批次培养基时要进行阳性和阴性菌株检验,培养基质量控制参照 GB 4789.28 进行。阳性菌株为粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)标准菌株 ATCC 29212(CICC 23658 或其他等效标准菌株),阴性菌株为大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)标准菌株 ATCC 25922(CICC 10305 或其他等效标准菌株)。其中,肠球菌肉汤阳性菌株接种浓度为 10 CFU/mL~100 CFU/mL,阴性菌株接种浓度为 1 000 CFU/mL~5 000 CFU/mL,接种量均为 1 mL,若使用的是定量标准菌株,则可按照给定值直接稀释后,按照试验步骤 10.1.4.1 进行操作。阳性菌株经肠球菌肉汤培养液培养后应产生黑色沉淀;阴性菌株不应产生黑色沉淀。肠球菌琼脂平板分别采用阳性和阴性菌株进行验收,其他培养基按照 10.1.4.3 用阳性菌株进行验收。

#### 10.1.6.2 对照试验

定期进行阳性及阴性对照试验。将阳性菌株粪肠球菌和阴性菌株大肠埃希氏菌制成浓度为 100 CFU/100 mL~1 000 CFU/100 mL 的菌悬液,若使用的是定量标准菌株,则可按照给定值直接稀释后使用,按 10.1.4 的要求进行操作。阴性对照试验的肠球菌肉汤培养基中不应产生黑色沉淀;阳性对照试验的肠球菌肉汤培养基中应产生黑色沉淀,再经过 10.1.4.2 和 10.1.4.3 确认检出肠球菌。如阴性对照或阳性对照试验结果不符合,本批次试验结果无效,应查明原因后重新测定。

## 10.2 滤膜法

### 10.2.1 原理

用孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤水样后,将滤膜置于 CATC 培养基上培养,计数滤膜表面上培养出的红色小菌落数。根据证实试验计算每 100 mL 样品中含有的肠球菌数。

### 10.2.2 培养基与试剂

警示:10.2.2.1 中叠氮化钠属于剧毒化学品,储存及配制过程中需小心谨慎操作,避免高热及剧烈震动引起意外。

### 10.2.2.1 CATC 琼脂基础

#### 10.2.2.1.1 成分

琼脂基础按如下成分配制：

a) 酪朊	15.0 g
b) 酵母浸粉	5.0 g
c) 柠檬酸钠	15.0 g
d) 磷酸二氢钾	5.0 g
e) 碳酸钠	2.0 g
f) 吐温-80	1.0 g
g) 琼脂	15.0 g
h) 叠氮化钠	0.4 g
i) 纯水	1 000 mL

#### 10.2.2.1.2 制法

将上述各成分加热煮沸至溶解，冷却到 50 ℃ 后，每 100 mL 中无菌加入 1% TTC(2,3,5-三苯基四唑氯化物)水溶液 1 mL，混匀后倾注平板备用。

### 10.2.2.2 1% TTC 水溶液

#### 10.2.2.2.1 成分

按如下成分配制：

a) TTC	1.0 g
b) 纯水	100 mL

#### 10.2.2.2.2 制法

将上述成分充分混匀溶解，用孔径为 0.22 μm 滤膜过滤除菌后，置于无菌棕色容器内，于 0 ℃ ~ 4 ℃ 冷藏避光保存。

### 10.2.2.3 胆汁七叶苷琼脂培养基(BEA)

应符合 10.1.2.3 的要求。

### 10.2.2.4 脑心浸液肉汤(BHIB)培养基

应符合 10.1.2.4 的要求。

### 10.2.2.5 含 6.5% 氯化钠脑心浸液肉汤培养基

应符合 10.1.2.5 的要求。

### 10.2.2.6 脑心浸萃琼脂(BHIA)培养基

应符合 10.1.2.6 的要求。

#### 10.2.2.7 革兰氏染色液

应符合 5.1.2.4 的要求。

#### 10.2.3 仪器设备

10.2.3.1 高压蒸汽灭菌器。

10.2.3.2 电炉。

10.2.3.3 恒温培养箱： $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $45\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

10.2.3.4 冰箱。

10.2.3.5 电子天平。

10.2.3.6 显微镜。

10.2.3.7 pH 计。

10.2.3.8 过滤设备：配备滤器和抽滤装置。

10.2.3.9 滤膜：孔径  $0.45\text{ }\mu\text{m}$ （用于过滤水样）和  $0.22\text{ }\mu\text{m}$ （用于 1% TTC 水溶液配制）。

10.2.3.10 平皿：直径 9 cm。

10.2.3.11 无菌吸管：1 mL、10 mL。

10.2.3.12 锥形瓶：容量 500 mL。

10.2.3.13 酒精灯。

10.2.3.14 接种环。

10.2.3.15 无齿镊子。

10.2.3.16 载玻片。

#### 10.2.4 试验步骤

##### 10.2.4.1 准备工作

10.2.4.1.1 滤器灭菌：用点燃的酒精棉球火焰灭菌，或  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  高压蒸汽灭菌 20 min。

10.2.4.1.2 滤膜灭菌：将滤膜放入烧杯中，加入纯水，煮沸灭菌 3 次，15 min/次，前两次煮沸后需更换纯水洗涤 2 次~3 次。或使用符合要求的一次性无菌滤膜。

##### 10.2.4.2 过滤水样

用无菌镊子夹取无菌滤膜边缘部分，将粗糙面向上，贴放在已灭菌的滤床上，固定好滤器，将 100 mL 水样注入滤器中，打开滤器阀门，在  $-5.07\times 10^4\text{ Pa}$ （-0.5 大气压）下抽滤。如水样处于较为严重的污染状况时，需对水样进行适当稀释。即用无菌吸管吸取水样 25 mL 到 225 mL 无菌生理盐水中，充分混匀，制成 1：10 的稀释样品。再取 25 mL 的 1：10 稀释样品加入 225 mL 无菌生理盐水中，充分混匀，制成 1：100 的稀释样品。稀释至适当的稀释度再进行过滤。每稀释一次，更换无菌吸管。每个稀释度平行过滤 2 个水样，每个水样过滤 100 mL。

##### 10.2.4.3 培养

过滤完水样后，再抽气 5 s，关上滤器阀门，取下滤器，用无菌镊子夹取滤膜边缘部分，分别移放在 2 块 CATC 琼脂平板上，即为平板 1 和平板 2，滤膜截留细菌面向上，滤膜应与培养基完全贴紧，两者间不得留有气泡，然后将培养基平板倒置，于  $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。



#### 10.2.4.4 结果观察

10.2.4.4.1 挑取在 CATC 琼脂上生长的红色小菌落进行革兰氏染色和镜检。

10.2.4.4.2 挑取 10 个典型菌落,同时接种 BHIB 肉汤和 BHIA 平板,之后证实试验应符合 10.1.4.3 的要求。

#### 10.2.5 试验数据处理

对证实为肠球菌菌落的滤膜进行计数,应选取 2 个生长有 20 个~60 个肠球菌的滤膜进行计数。

按公式(11)计算滤膜上生长的肠球菌数,以每 100 mL 水样中的肠球菌数(CFU/100 mL)报告结果。

$$\text{肠球菌数(CFU/100 mL)} = \frac{(A + B) \times C}{2 \times D \times d} \dots\dots\dots(11)$$

式中:

A —— 滤过 100 mL 水样中平板 1 表面疑似肠球菌典型菌落数,单位为菌落形成单位每 100 毫升(CFU/100 mL);

B —— 滤过 100 mL 水样中平板 2 表面疑似肠球菌典型菌落数,单位为菌落形成单位每 100 毫升(CFU/100 mL);

C —— 证实为阳性的肠球菌菌落数,单位为菌落形成单位(CFU);

D —— 用于证实试验的肠球菌菌落数,单位为菌落形成单位(CFU);

d —— 每 100 mL 过滤水中实际水样的比例。

#### 10.2.6 质量控制

##### 10.2.6.1 培养基检验

更换不同批次培养基时要进行阳性和阴性菌株检验,将阳性菌株粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)标准菌株 ATCC 29212(CICC 23658 或其他等效标准菌株)和阴性菌株大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)标准菌株 ATCC 25922(CICC 10305 或其他等效标准菌株)制成 10 CFU/100 mL~100 CFU/100 mL 的菌悬液。若使用的是定量标准菌株,则可按照给定值直接稀释。分别按照试验步骤 10.2.4 进行试验。阳性菌株经过滤在 CATA 琼脂平板培养后应产生红色小菌落;阴性菌株不应产生红色小菌落。针对具有选择性作用的肠球菌肉汤和肠球菌琼脂培养基,应采用阳性及阴性菌株进行验收;其他培养基按照 10.1.4.3 用阳性菌株进行验收。

##### 10.2.6.2 对照试验

定期进行阳性及阴性对照试验。将阳性菌株粪肠球菌和阴性菌株大肠埃希氏菌制成浓度为 10 CFU/100 mL~100 CFU/100 mL 的菌悬液,若使用的是定量标准菌株,则可按照给定值直接稀释后,按照试验步骤 10.2.4 进行操作。阴性对照试验不应产生红色小菌落;阳性对照试验应产生红色小菌落,再经过 10.1.4.3 确认检出肠球菌。如阴性对照或阳性对照试验结果不符合,本批次试验结果无效,应查明原因后重新测定。

## 11 产气荚膜梭状芽孢杆菌

### 11.1 滤膜法

#### 11.1.1 原理

采用滤膜过滤器,用孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤水样,细菌被阻留在膜上,将滤膜的截留面朝下贴

在SPS培养基上,36℃厌氧培养18 h~24 h后,计数黑色菌落数,挑选5个可疑菌落进行证实试验。产气荚膜梭状芽孢杆菌是能够分解乳糖产酸产气,产卵磷脂酶,分解卵黄中的卵磷脂,无动力,能将硝酸盐还原为亚硝酸盐的革兰阳性杆菌,结合证实试验结果与计数结果,计算得到100 mL样品中产气荚膜梭状芽孢杆菌数的方法。

### 11.1.2 培养基与试剂

#### 11.1.2.1 0.1%缓冲蛋白胨水

##### 11.1.2.1.1 成分

按如下成分配制:

- |        |          |
|--------|----------|
| a) 蛋白胨 | 1.0 g    |
| b) 纯水  | 1 000 mL |

##### 11.1.2.1.2 制法

加热溶解蛋白胨于纯水中,调节pH至6.8~7.2,121℃高压蒸汽灭菌15 min。

#### 11.1.2.2 亚硫酸盐-多黏菌素-磺胺嘧啶(SPS)琼脂

##### 11.1.2.2.1 成分

按如下成分配制:

- |                        |          |
|------------------------|----------|
| a) 胰酶消化酪蛋白胨            | 15.0 g   |
| b) 酵母浸粉                | 10.0 g   |
| c) 柠檬酸铁铵               | 1.0 g    |
| d) 琼脂                  | 15.0 g   |
| e) 纯水                  | 1 000 mL |
| f) 亚硫酸钠溶液(100 g/L)     | 10 mL    |
| g) 多黏菌素B硫酸盐溶液(1.2 g/L) | 10 mL    |
| h) 磺胺嘧啶钠溶液(12.0 g/L)   | 10 mL    |

##### 11.1.2.2.2 制法

将基础成分加热煮沸至完全溶解,调节pH至6.8~7.2,分装到500 mL烧瓶中,每瓶250 mL,121℃高压蒸汽灭菌15 min,于50℃±1℃保温备用。临用前每250 mL基础溶液按比例加入亚硫酸钠溶液(新配)、多黏菌素B硫酸盐溶液和磺胺嘧啶钠溶液,摇匀,倾注平板。

#### 11.1.2.3 液体硫乙醇酸盐(FT)培养基

##### 11.1.2.3.1 成分

按如下成分配制:

- |             |        |
|-------------|--------|
| a) 胰酶消化酪蛋白胨 | 15.0 g |
| b) L-胱氨酸    | 0.5 g  |
| c) 酵母浸粉     | 5.0 g  |
| d) 葡萄糖      | 5.0 g  |

e) 氯化钠	2.5 g
f) 硫乙醇酸钠[CH <sub>2</sub> (SH)COONa]	0.5 g
g) 刃天青	0.001 g
h) 琼脂	0.75 g
i) 纯水	1 000 mL

#### 11.1.2.3.2 制法

将以上成分加热煮沸至完全溶解,冷却后调节 pH 至 6.9~7.3,分装试管,每管 10 mL,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min。临用前煮沸或流动蒸汽加热 15 min,迅速冷却至接种温度。

#### 11.1.2.4 含铁牛乳培养基

##### 11.1.2.4.1 成分

按如下成分配制:

a) 新鲜全脂牛奶	1 000 mL
b) 七水合硫酸亚铁(FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	1.0 g
c) 纯水	50.0 mL

##### 11.1.2.4.2 制法

将硫酸亚铁溶于纯水中,不断搅拌,缓慢加入 1 000 mL 牛奶中,混匀。分装试管,每管 10 mL,118 ℃ 高压蒸汽灭菌 12 min。本培养基应新鲜配制。

#### 11.1.2.5 缓冲动力-硝酸盐培养基

##### 11.1.2.5.1 成分

按如下成分配制:

a) 蛋白胨	5.0 g
b) 牛肉浸粉	3.0 g
c) 硝酸钾	5.0 g
d) 无水磷酸氢二钠	2.5 g
e) 半乳糖	5.0 g
f) 甘油	5.0 mL
g) 琼脂	3.0 g
h) 纯水	1 000 mL

##### 11.1.2.5.2 制法

将以上成分加热煮沸至完全溶解,调节 pH 至 7.1~7.5,分装试管,每管 10 mL,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min。如果当天不用,于 0 ℃~4 ℃ 冷藏保存。临用前煮沸或流动蒸汽加热 15 min,迅速冷却至接种温度。

#### 11.1.2.6 卵黄琼脂培养基

##### 11.1.2.6.1 成分

按如下成分配制:

a) 肉浸液	1 000 mL
b) 蛋白胨	15.0 g
c) 氯化钠	5.0 g
d) 琼脂	15.0 g~20.0 g
e) 葡萄糖溶液(500 g/L)	20 mL
f) 卵黄盐悬液(500 g/L)	100 mL~150 mL

#### 11.1.2.6.2 制法

制备基础培养基,调节 pH 至 7.4~7.6,分装每瓶 100 mL。121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min,于 50 ℃ ± 1 ℃ 保温备用,临用前每 100 mL 基础溶液按比例加入葡萄糖溶液和卵黄盐悬液,混匀,倾注平皿。

#### 11.1.2.7 硝酸盐还原试剂

##### 11.1.2.7.1 甲液(对氨基苯磺酸溶液)

溶解 8.0 g 对氨基苯磺酸于 1 000 mL 乙酸溶液 [ $c(\text{CH}_3\text{COOH})=5 \text{ mol/L}$ ] 中。

##### 11.1.2.7.2 乙液( $\alpha$ -萘酚乙酸溶液)

溶解 5.0 g  $\alpha$ -萘酚于 1 000 mL 乙酸溶液 [ $c(\text{CH}_3\text{COOH})=5 \text{ mol/L}$ ] 中。

#### 11.1.2.8 革兰氏染色液

应符合 5.1.2.4 的要求。

#### 11.1.3 仪器设备

11.1.3.1 电子天平。

11.1.3.2 pH 计或精密 pH 试纸。

11.1.3.3 恒温培养箱:36 ℃ ± 1 ℃。

11.1.3.4 冰箱。

11.1.3.5 恒温水浴箱:46 ℃ ± 1 ℃。

11.1.3.6 显微镜。

11.1.3.7 无菌吸管:1 mL、10 mL 或移液器。

11.1.3.8 无菌试管:18 mm × 180 mm。

11.1.3.9 无菌平皿:直径 9 cm。

11.1.3.10 厌氧培养装置。

11.1.3.11 过滤设备:配备滤器和抽滤装置。

11.1.3.12 滤膜:孔径为 0.45  $\mu\text{m}$ 。

11.1.3.13 无齿镊子。

#### 11.1.4 样品

11.1.4.1 污染较轻的水样,可直接取 100 mL 水样进行检验。

11.1.4.2 污染严重的水样,可使用 0.1% 缓冲蛋白胨水将水样按 10 倍系列稀释,取 100 mL 进行检验。

## 11.1.5 试验步骤

### 11.1.5.1 产气荚膜梭状芽孢杆菌检验程序

检验程序见图 1。

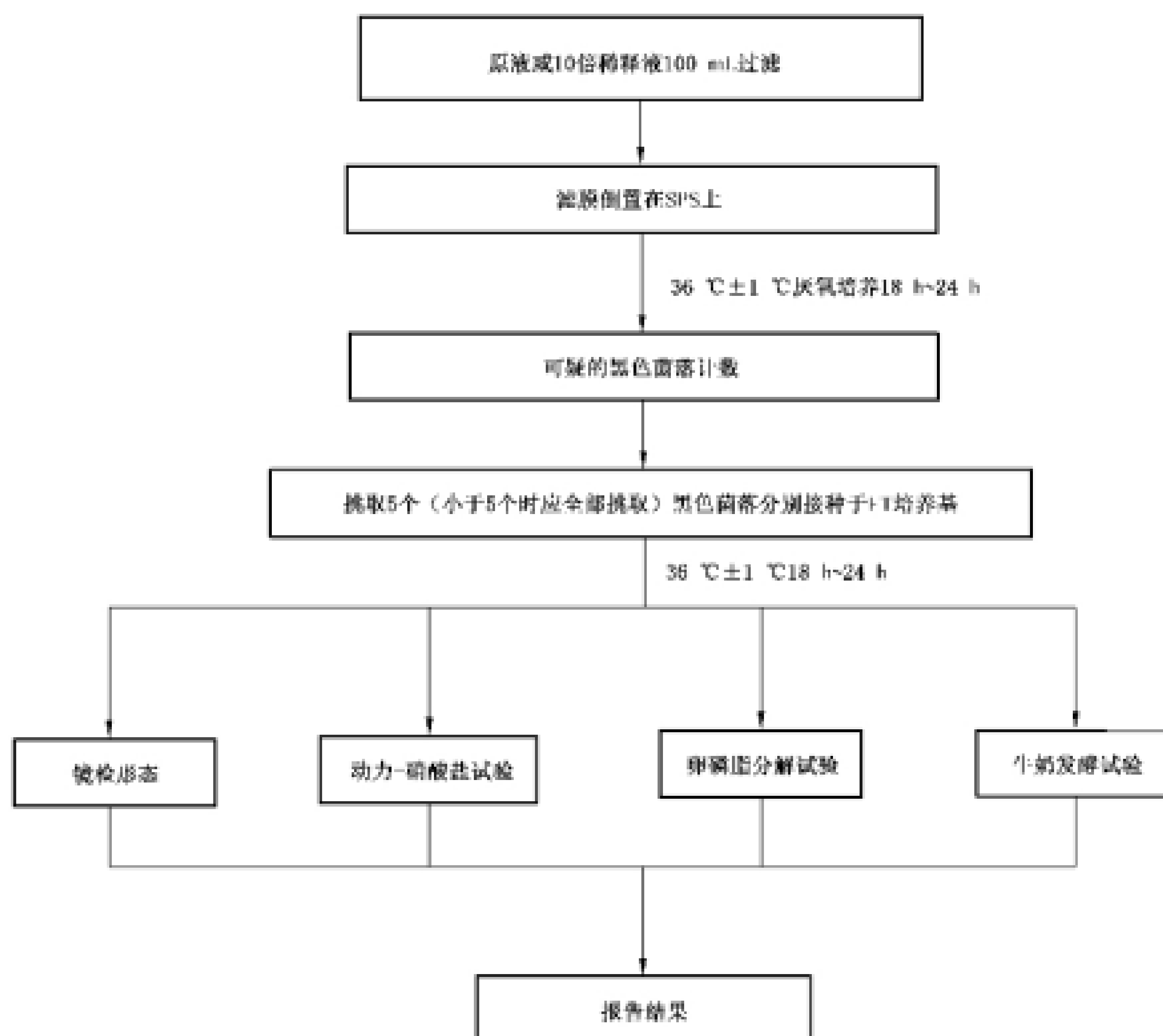


图 1 产气荚膜梭状芽孢杆菌检验程序

### 11.1.5.2 滤膜灭菌

将滤膜放入烧杯中,加入纯水,煮沸灭菌 3 次,15 min/次,前两次煮沸后需换水洗涤 2 次~3 次。或使用符合要求的商用一次性无菌滤膜。

### 11.1.5.3 滤器灭菌

滤器经 121℃ 高压蒸汽灭菌 15 min。或使用符合要求的商用一次性无菌滤器。

### 11.1.5.4 过滤水样

先用无菌镊子夹取无菌滤膜边缘部分,将滤膜正面朝上贴放在已灭菌的滤床上,固定好滤器,将 100 mL 水样注入滤器中,打开滤器阀门,在  $-5.07 \times 10^4$  Pa(-0.5 个大气压)下抽滤。每次试验均需要用 100 mL 0.1% 缓冲蛋白胨水进行空白对照。

### 11.1.5.5 培养

过滤完水样后,关上滤器阀门,取下滤器,用无菌镊子夹取滤膜边缘部分,移滤膜倒置在 SPS 琼脂培养基上,滤膜截留细菌面与培养基完全贴紧,避免气泡产生,然后将平皿倒置于厌氧培养装置内,于  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  厌氧培养 18 h~24 h,计数黑色菌落数。

### 11.1.5.6 证实试验

11.1.5.6.1 使用无菌镊子夹住滤膜边缘,缓缓掀起,以免菌落脱落或被蹭花,翻转滤膜,使菌落生长面朝上,从滤膜或培养基上挑取上述平板上生长的 5 个可疑黑色菌落(小于 5 个时应全部挑取),分别接种于 FT 培养基,于  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 18 h~24 h,该培养物用于证实试验。

11.1.5.6.2 用上述培养液涂片,革兰氏染色、镜检。产气荚膜梭状芽孢杆菌为革兰阳性粗大杆菌,其耐热菌株可能形成卵形芽孢,位于菌体中央或近端,其宽度一般不超过菌体宽度。

11.1.5.6.3 取生长旺盛的 FT 培养液 1 mL,接种于 10 mL 含铁牛乳培养基底部,加入 1 cm~2 cm 高液体石蜡,以隔绝氧气,于  $46\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴中培养 2 h,然后每小时观察一次有无“暴烈发酵”现象,该现象的特点是乳凝结物破碎后快速形成海绵样物质,通常会上升到培养基表面。5 h 内不发酵者为阴性。产气荚膜梭状芽孢杆菌发酵乳糖,凝固酪蛋白并大量产气,呈“暴烈发酵”现象,但培养基不变黑。

11.1.5.6.4 用接种针取 FT 培养液穿刺接种于缓冲动力-硝酸盐培养基,于  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  厌氧培养 24 h  $\pm 2\text{ h}$ 。在透射光下检查细菌沿穿刺线的生长情况,判定有无动力。有动力的菌株沿穿刺线呈扩散生长,无动力的菌株沿穿刺线生长而无扩散生长。滴加 0.5 mL 甲液(对氨基苯磺酸液)和 0.2 mL 乙液( $\alpha$ -萘酚乙酸溶液)以检查亚硝酸盐的存在。15 min 内出现红色者,表明硝酸盐被还原为亚硝酸盐;如果不出现颜色变化,则加少许锌粉,放置 10 min,出现红色者,表明该菌株不能还原硝酸盐。产气荚膜梭状芽孢杆菌无动力,能将硝酸盐还原为亚硝酸盐。

11.1.5.6.5 用接种针取 FT 培养液点种于卵黄琼脂平板(每个平板至少可接种 10 点),于  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  厌氧培养 24 h  $\pm 2\text{ h}$ ,观察接种点的变化。产气荚膜梭状芽孢杆菌会产生卵磷脂酶,分解卵黄中的卵磷脂,接种点的底部及周围形成乳白色的浑浊带。

### 11.1.6 试验数据处理

#### 11.1.6.1 产气荚膜梭状芽孢杆菌的计数

对滤膜上证实为产气荚膜梭状芽孢杆菌的菌落进行计数。

#### 11.1.6.2 产气荚膜梭状芽孢杆菌的计算

根据检验用样品量,按公式(12)计算出每 100 mL 样品中产气荚膜梭状芽孢杆菌菌落数,结果以 CFU/100 mL 报告。

$$\text{产气荚膜梭状芽孢杆菌菌落数(CFU/100 mL)} = \frac{A \times B}{C \times d} \dots\dots\dots(12)$$

式中:

A——过滤 100 mL 水样中滤膜上可疑的黑色菌落数,单位为菌落形成单位每 100 毫升(CFU/100 mL);

B——证实为产气荚膜梭状芽孢杆菌的菌落数,单位为菌落形成单位(CFU);

C——用于证实试验的产气荚膜梭状芽孢杆菌的菌落数,单位为菌落形成单位(CFU);

d——每 100 mL 过滤水中实际水样的比例。

## 11.1.7 质量控制

### 11.1.7.1 培养基检验

更换不同批次培养基时要进行阳性和阴性菌株检验,将阳性菌株产气荚膜梭状芽孢杆菌(*Clostridium perfringens*)标准菌株 CICC 22949(或其他等效标准菌株)和阴性菌株生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)标准菌株 CICC 10385(或其他等效标准菌株)制成 5 CFU/100 mL~100 CFU/100 mL 的菌悬液,若使用的是定量标准菌株,则可按照给定值直接稀释后使用,分别按照试验步骤 11.1.5.2~11.1.5.5 进行操作。阳性菌株应产生黑色菌落;阴性菌株不应产生黑色菌落。其他培养基和试剂按照 11.1.5.6 采用阳性菌株进行验收。

### 11.1.7.2 对照试验

定期进行阳性及阴性对照试验。将阳性菌株产气荚膜梭状芽孢杆菌和阴性菌株生孢梭菌制成 5 CFU/100 mL~100 CFU/100 mL 的菌悬液,若使用的是定量标准菌株,则可按照给定值直接稀释后使用,按 11.1.5 的要求进行操作。阴性对照试验不应出现黑色菌落;阳性对照试验应产生黑色菌落,再经过 11.1.5.6 确认检出产气荚膜梭状芽孢杆菌。如阴性对照或阳性对照试验结果不符合,本批次试验结果无效,应查明原因后重新测定。

---