

DB 23

黑龙江省地方标准

DB23/T XXXX-XXXX

黑土中粪大肠菌群、总大肠菌群 监测技术规范

(征求意见稿)

起草单位：黑龙江省哈尔滨生态环境监测中心

联系人：王晓燕

联系电话：15846081365

邮箱：2718299166@qq.com

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

黑龙江省市场监督管理局 发布

目 录

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 采样技术要求	1
5 分析技术要求	2
6 质量控制要求	2
7 监测记录	3
8 注意事项	3
附录 A 总大肠菌群 滤膜法	4
附录 B 总大肠菌群 多管发酵法	7
附录 C 总大肠菌群 酶底物法	10
附录 D 粪大肠菌群 滤膜法	13
附录 E 粪大肠菌群 多管发酵法	16
附录 F 粪大肠菌群 酶底物法	20

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。

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。

本文件由黑龙江省生态环境厅提出并归口。

本文件起草单位：黑龙江省哈尔滨生态环境监测中心。

本文件主要起草人：王晓燕、石野、赵然、王玥彤.....

黑土中粪大肠菌群、总大肠菌群监测技术规范

1 范围

本文件规定了黑土中粪大肠菌群、总大肠菌群监测的术语和定义、采样技术要求、分析技术要求、质量控制要求、监测记录、注意事项等技术内容。

本文件适用于耕地黑土、园地和牧草地中粪大肠菌群、总大肠菌群的监测。

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。

NY/T 395 农田土壤环境质量监测技术规范

NY/T 4691 农产品产地土壤环境监测质量控制技术规范

HJ/T 166 土壤环境监测技术规范

HJ 1001 水质总大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

水和废水监测分析方法

3 术语和定义

3.1 黑土

指黑龙江省、吉林省、辽宁省、内蒙古自治区的相关区域范围内具有黑色或者暗黑色腐殖质的表层土壤。

3.2 总大肠菌群

(37 ± 1) °C 培养 24 h，能发酵乳糖产酸产气的、需氧及兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌。

3.3 粪大肠菌群

粪大肠菌群又称耐热大肠菌群，(44.5 ± 0.5) °C 培养 24 h，能生长并发酵乳糖产酸产气的大肠菌群。

4 采样技术要求

4.1 样品采集

4.1.1 非冰冻期黑土样品的采集

4.1.1.1 监测点的布设

按照NY/T 395的有关规定执行。

4.1.1.2 采样器具

采样器具按照 NY/T 395 的有关规定准备。采样瓶，采用耐灭菌处理的 150mL 玻璃瓶或塑料瓶，在采集不存在或不考虑余氯、金属离子干扰的样品时，可采用市售无菌采样瓶或无菌采样袋。凡接触样品的器具使用前需 121℃经高压灭菌 20min 后，用铝箔或厚的牛皮纸 ($\geq 150\text{g}/\text{m}^2$)，包裹好，备用。

4.1.1.3 采样方式

按照NY/T 395的有关规定执行。样品装瓶或袋时装到三分之二处，顶部需留有一定空间。

4.1.2 冰冻期黑土样品的采集

4.1.2.1 监测点的布设

按照NY/T 395的有关规定执行。

4.1.1.2 采样器具

采样器具准备重型冰镐或钢钎、机械钻孔机等，其余按照 NY/T 395 的有关规定准备。采样瓶，采用耐灭菌处理的 150mL 塑料瓶，在采集不存在或不考虑余氯、金属离子干扰的样品时，可采用市售无菌采样瓶或无菌采样袋。凡接触样品的器具使用前需 121℃经高压灭菌 20min 后，用铝箔或厚的牛皮纸 ($\geq 150\text{g}/\text{m}^2$)，包裹好，备用。

4.1.2.2 采样方式

冻土样品采集时，要先清除采样点附近积雪至裸土暴露。由于冻土坚硬，采取冻土样品时一般需采用重型冰镐或钢钎配合采样铲使用，或采用机械钻孔机，以钻孔取样为主。其余按照NY/T 395的有关规定执行。样品装瓶或袋时装到三分之二处，顶部需留有一定空间。

4.2 样品流转与保存

4.2.1 样品流转

按照HJ 166的有关规定执行。

4.2.2 样品保存

采集好的土样需放置在4℃冷藏设备内保存运输，24h内进行分析；若采集冻土需在4℃下冷藏解冻，解冻后24h内进行分析。

5 分析技术要求

参照附录A-F进行分析。

6 质量控制要求

6.1 样品采集

按照NY/T 4691的有关规定执行。

6.2 样品分析

按照附录A-F的质量保证和质量控制执行。

7 原始记录

7.1 采样记录按照 NY/T 395 的有关规定执行。

7.2 监测记录信息应至少包括项目名称、检验方法、灭菌锅及培养箱信息、培养基灭菌温度、培养温度、培养时间（精确到分），样品名称、计算所用数据信息、三级审核等，可根据实际工作需要自行设计表格。

7.3 监测记录宜以书面、电子或其他媒体形式储存，应定期归档。

8 注意事项

8.1 采集冻土样品选择钻孔取样时，需快速刮取未融化样品。

8.2 实验室中使用的器皿及产生的废物须经 121℃ 高压蒸汽灭菌 30 min。灭菌后，器皿方可清洗，样品和废弃物应安全处置。

附录 A 总大肠菌群 滤膜法

A.1 原理

将土壤用灭菌的稀释水稀释后，注入已灭菌的放有微孔滤膜的滤器中，经过抽滤，细菌即被截留在滤膜上，然后将滤膜贴于合适的培养基上在 (37 ± 1) ℃条件下进行培养，计数与鉴定滤膜上生长的大肠菌群落。换算出每克土样中含有的大肠菌群数。

A.2 试剂和材料

A.2.1 碳酸钠溶液 $[c(\text{Na}_2\text{CO}_3)=1.0\text{mol/L}]$ ：称取 10.6g 碳酸钠 (Na_2CO_3) 溶于水，并定容到 100 mL。

A.2.2 氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH})=1\text{mol/L}$ 。

A.2.3 盐酸溶液： $c(\text{HCl})=1\text{mol/L}$ 。

A.2.4 生理盐水： $\omega(\text{NaCl})=0.8\%$ 。

A.2.5 无菌稀释水：根据土壤样品的数量配制稀释用的生理盐水(A.2.4)，准备 8 个或 9 个内装有 90mL 生理盐水(A.2.4)的三角瓶，其中放入数颗玻璃珠，经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min，备用。三角瓶数量应根据土壤样品的稀释倍数确定。

A.2.6 除非另有规定，本方法所用的试剂均为国家标准的分析纯，水为 GB/T6682 中规定的二级水。

A.3 仪器和设备

A.3.1 天平。

A.3.2 显微镜。

A.3.3 革兰氏染色用有关器材。

A.3.4 恒温培养箱：可提供 (37 ± 1) ℃的培养温度。

A.3.5 干热灭菌箱。

A.3.6 高压蒸汽灭菌器。

A.3.7 振荡器。

A.3.8 滤膜过滤装置：滤膜孔径为 0.45 μm 。

A.3.9 采样瓶：采用耐灭菌处理的 150mL 玻璃瓶或塑料瓶。采样瓶，在采集不存在或不考虑余氯、金属离子干扰的样品时，可采用市售无菌采样瓶或无菌采样袋。

A.4 培养基

培养基可购买市售成品培养基。

A.4.1 品红亚硫酸钠培养基（滤膜法用）

a) 成分：

- 1) 蛋白胨：10g；
- 2) 酵母浸膏：5g；
- 3) 牛肉浸膏：5g；
- 4) 乳糖：10g；
- 5) 琼脂：20 g；
- 6) 磷酸氢二钾：3.5g；
- 7) 水：1000mL；
- 8) 无水亚硫酸钠：5g；
- 9) 碱性品红乙醇溶液 $(\rho=50\text{g/L})$ ：20mL。

b) 储备培养基的制备：

先将琼脂加入 900mL 水，加热溶解，然后加入磷酸氢二钾及蛋白胨，混匀使之溶解，再加水至 1000mL，用氢氧化钠溶液(A.2.2)或盐酸溶液(A.2.3)调 pH 值为 7.2~7.4。趁热用脱脂棉过滤，再加入乳糖，混匀后定量分装于三角瓶内，置高压蒸汽灭菌器中，于 115℃ 灭菌 20min。储于冷暗处备用，

保质期 7d。

c) 平皿培养基的配制:

将上述储备培养基加热全部融化, 根据三角瓶内的容量, 用灭菌移液管按比例 1:50 吸取已灭菌的碱性品红乙醇溶液 ($\rho=50\text{g/L}$) 置于灭菌试管中; 再置于沸水浴中煮沸 10min 以灭菌。再按比例 1:200 称取无水亚硫酸钠置于另一灭菌空试管内, 加少许无菌水使其溶解后, 置于沸水浴中煮沸 10min 以灭菌。用灭菌移液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, 至深红色褪成淡红色为止。将此混合液全部加入已融化的培养基内并混匀, 防止产生气泡。立即将此培养基倾入约 15mL 已灭菌的空平皿内, 待其冷凝后, 倒置于冰箱备用。在冰箱内保存不宜超过 14d。如培养基已由淡红色变成深红色, 则不能再用。

A.4.2 乳糖蛋白胨培养液

a) 成分:

- 1) 蛋白胨: 10g;
- 2) 牛肉膏: 3g;
- 3) 乳糖: 5g;
- 4) 氯化钠: 5g;
- 5) 溴甲酚紫乙醇溶液 ($\rho=16\text{g/L}$): 1mL;
- 6) 水: 1000mL。

b) 制法:

将蛋白胨、牛肉膏、乳糖及氯化钠置于 1000mL 水中加热溶解, 用氢氧化钠溶液 (A.2.2) 或盐酸溶液 (A.2.3) 调 pH 值为 7.2~7.4, 再加入 1mL 溴甲酚紫乙醇溶液 ($\rho=16\text{g/L}$), 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 20 min, 储于冷暗处, 保质期 7d。

A.4.3 乳糖蛋白胨半固体培养基

a) 成分:

- 1) 蛋白胨: 10g;
- 2) 酵母浸膏: 5g;
- 3) 牛肉浸膏: 5g;
- 4) 乳糖: 10g;
- 5) 琼脂: 5g;
- 6) 水: 1000mL。

b) 制法:

先将上述成分加热溶解于 1000mL 水中, 用氢氧化钠溶液 (A.2.2) 或盐酸溶液 (A.2.3) 调 pH 值为 7.2~7.4。趁热用脱脂棉过滤, 混匀后定量分装于小试管内, 置高压蒸汽灭菌器中, 于 115℃ 灭菌 20min。冷却后置于冰箱内储存。此培养基存放时间不宜超过 14d。

A.5 分析步骤

A.5.1 准备工作

滤膜灭菌: 将滤膜放入烧杯中, 加入水, 置于沸水浴中煮沸灭菌 3 次, 每次 15min。前 2 次煮沸后需要换水并洗涤 2 次~3 次, 除去膜内残余溶剂。

滤器灭菌: 用点燃的酒精棉球火焰灭菌, 或用 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min。

A.5.2 抽滤

称取土壤样品 10.0g (m), 放于灭菌三角瓶内, 加无菌稀释水 (A.2.5) 至 100mL (V)。充分摇匀, 若土壤样品颗粒较大, 可将三角瓶置于振荡器上振荡 3min, 制成均匀菌液 A。用 10mL 灭菌移液管吸取 10mL 均匀菌液 A 加入装有 90mL 无菌稀释水 (A.2.5) 的三角瓶中摇匀, 制成 1:10 均匀菌液。按上述操作步骤, 依次配制稀释 10 倍菌液, 如此每递增 1 次, 即换用 1 支 10mL 灭菌移液管, 根据预

期菌群数目，将均匀菌液依次进行 10 倍稀释，制得稀释菌液作为待检水样，记录均匀菌液 A 的稀释度 D。

稀释完成后，进行抽滤。抽滤前，应将待检水样充分摇匀，使附着于颗粒、杂质上的菌落分散，以利于正确的检测。用无菌镊子夹取灭菌滤膜边缘，粗糙面向上，贴放在已灭菌的滤床上，固定好滤器，连接好抽气系统。滤器内先加入约 10mL 无菌稀释水（A.2.5），再用已灭菌移液管吸取 1.0mL 充分混匀稀释好的待检水样，加入滤器中。于负压 50kPa 下抽滤，快滤完前应再加入少许无菌稀释水（A.2.5），以冲洗滤器内壁，使水样内菌全部集聚于滤膜上。水样滤完后，再抽滤约 5s 即停止抽气，取下滤器，用灭菌镊子夹取滤膜边缘部分，移放在品红亚硫酸钠培养基（A.4.1）上，滤膜载留菌面向上，滤膜应与培养基面完全紧贴，两者间不得留有气泡，然后将平板倒置，放入（37±1）℃恒温箱内培养 24h。

A.6 计算

样品滤膜上所生的菌落数一般不超过 50 个为宜，如菌落数过多则不易分散生长，影响菌落准确计数。检测时，样品应用几个不同稀释度进行检测，以选择其中合适的 1 个滤膜进行计数，同时须做平行样测定。

选择符合下列特征的菌落，取菌落的一小部分进行涂片、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。

凡革兰氏阴性无芽孢杆菌，需再接种于乳糖蛋白胨培养液（A.4.2）或乳糖蛋白胨半固体培养基（A.4.3），培养前应将此培养基放入水浴中煮沸排气，冷却凝固后方能使用，经（37±1）℃培养，前者于 24h 产酸产气；或后者经 6h~8 h 培养后产气，则为总大肠菌群阳性。

每克土壤中的总大肠菌群数 C（CFU/g），可按式（1）计算：

$$C = \frac{M \times V}{D \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

M——滤膜上生长的经鉴定为总大肠菌群菌落的菌落数，单位为个每毫升（个/mL）；

V——均匀菌液 A 的定容体积，单位为毫升（mL）；

D——均匀菌液 A 的稀释度；

m——土壤样品取样量，单位为克（g）。

测定结果保留两位有效数字，大于 100 时以科学计数法表示。

A.7 质量保证和质量控制

A.7.1 无菌检验

每次实验应同时抽滤 10mL 无菌稀释水（A.2.5），将抽滤完的滤膜移放在品红亚硫酸钠培养基（A.4.1）上，然后将平板倒置，放入（37±1）℃恒温箱内培养 24h。如出现菌落，则该次测定结果无效，应查明原因重新测定。

A.7.2 滤膜鉴定

采用新滤膜前，应对滤膜进行鉴定，即将已知的大肠埃希氏菌置于水中用此种滤膜过滤，此时在滤液中不应检出大肠埃希氏菌。

A.7.3 培养基检验

对每批次培养基须使用有证标准菌株进行培养基质量检验。

附录 B 总大肠菌群 多管发酵法

B.1 原理

根据总大肠菌群应具有的生物特性，如革兰氏阴性无芽孢杆菌，在（37±1）℃培养 24h 后能发酵乳糖并产酸产气，能在选择培养基上产生典型菌落，利用这一特性，根据发酵过程中阳性管的数量，通过查 MPN 生物统计表，可检测大肠菌群的数量。

B.2 试剂和材料

B.2.1 氢氧化钠溶液：c（NaOH）=1 mol/L。

B.2.2 盐酸溶液：c（HCl）=1mol/L。

B.2.3 生理盐水： ω （NaCl）=0.8%。

B.2.4 无菌稀释水：根据土壤样品的数量配制稀释用的生理盐水（B.2.3）。每个土壤样品准备 8 个或 9 个内装有 90mL 生理盐水（B.2.3）的三角瓶，其中放入数颗玻璃珠，经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min，备用，三角瓶具体数量根据土壤样品的稀释倍数确定。

B.2.5 除非另有规定，本方法所用的试剂均为国家标准的分析纯，水为 GB/T 6682 中规定的二级水。

B.3 仪器和设备

B.3.1 天平。

B.3.2 显微镜。

B.3.3 革兰氏染色用有关器材。

B.3.4 高压蒸汽灭菌器。

B.3.5 恒温培养箱：可提供（37 ± 1）℃ 的培养温度。

B.3.6 放大镜。

B.3.7 振荡器。

B.3.8 采样瓶：采用耐灭菌处理的 150mL 玻璃瓶或塑料瓶。采样瓶，在采集不存在或不考虑余氯、金属离子干扰的样品时，可采用市售无菌采样瓶或无菌采样袋。

B.4 培养基

培养基可购买市售成品培养基。

B.4.1 乳糖蛋白胨培养液

a) 成分：

1) 蛋白胨：10g；

2) 牛肉膏：3g；

3) 乳糖：5g；

4) 氯化钠：5g；

5) 溴甲酚紫乙醇溶液（ $\rho=16\text{g/L}$ ）：1mL；

6) 水：1000 mL。

b) 制法：

将蛋白胨、牛肉膏、乳糖及氯化钠置于 1000mL 水中加热溶解，用氢氧化钠溶液（B.2.1）或盐酸溶液（B.2.2）调整 pH 值为 7.2~7.4，再加入 1mL 溴甲酚紫乙醇溶液（ $\rho=16\text{g/L}$ ），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 20 min，储于冷暗处备用，保质期 7d。

B.4.2 三倍浓缩乳糖蛋白胨培养液

按上述乳糖蛋白胨培养液（B.4.1）浓缩 3 倍配制，保质期 7d。

B.4.3 品红亚硫酸钠培养基

a) 成分：

1) 蛋白胨：10g；

- 2) 乳糖: 10g;
- 3) 磷酸氢二钾: 3.5g;
- 4) 琼脂: 20 g~30 g;
- 5) 水: 1000mL;
- 6) 无水亚硫酸钠: 5g 左右;
- 7) 碱性品红乙醇溶液 ($\rho=50 \text{ g/L}$): 20 mL。

b) 储备培养基的制备:

先将琼脂加至 900mL 水中, 加热溶解, 然后加入磷酸氢二钾及蛋白胨, 混匀使之溶解, 再以水补足至 1000mL, 用氢氧化钠 (B.2.1) 或盐酸 (B.2.2) 溶液调整 pH 值为 7.2~7.4, 趁热用脱脂棉或纱布过滤, 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, 储存于冷暗处备用, 保质期 7d。

c) 平皿培养基的配制:

将 B.4.3 制备的储备培养基加热融化, 根据烧瓶内培养基的容量, 用灭菌移液管按比例 1:50 吸取碱性品红乙醇溶液 ($\rho=50 \text{ g/L}$), 置于灭菌空试管中。再按比例 1:200 称取所需的无水亚硫酸钠置于另一个灭菌空试管内, 加无菌水少许使其溶解后, 置于沸水浴中煮沸 10min 以灭菌。用灭菌移液管吸取已灭菌的亚硫酸钠溶液, 滴加到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约 15mL 倾入已灭菌的空平皿内, 待其冷却凝固后倒置于冰箱内备用。此种已制成的培养基于冰箱内保存不宜超过 14d, 如培养基已由淡红色变成深红色, 则不能再用。

B.4.4 伊红美蓝培养基

a) 成分:

- 1) 蛋白胨: 10 g;
- 2) 乳糖: 10g;
- 3) 磷酸氢二钾: 2g;
- 4) 琼脂: 20 g;
- 5) 水: 1000 mL;
- 6) 伊红水溶液 ($\rho=20\text{g/L}$): 20mL;
- 7) 美蓝水溶液 ($\rho=5 \text{ g/L}$): 13 mL。

b) 储备培养基的制备:

先将琼脂加至 900mL 水中, 加热溶解, 然后加入磷酸氢二钾及蛋白胨, 混匀, 使之溶解, 再以水补足至 1000mL, 用氢氧化钠 (B.2.1) 或盐酸 (B.2.2) 溶液调整 pH 值为 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 115℃ 灭菌 20min, 储存于冷暗处备用, 保质期 7d。

c) 平皿培养基的配制:

将上法制备的储备培养基加热融化。根据烧瓶内培养基的容量, 用灭菌移液管按比例吸取已灭菌的伊红水溶液 ($\rho=20\text{g/L}$) 和已灭菌的美蓝水溶液 ($\rho=5 \text{ g/L}$), 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已灭菌的空平皿内, 待其冷却凝固后倒置于冰箱内备用, 保质期 7d。

B.5 分析步骤

B.5.1 土壤样品的稀释

称取土壤样品 $m=10.0\text{g}$ 放于灭菌三角瓶内, 加无菌稀释水 (B.2.4) 至 100mL (V)。充分摇匀, 若土壤样品颗粒较大, 可将三角瓶置于振荡器上振荡 3min, 制成均匀菌液 A。用 10mL 灭菌移液管吸取 10mL 均匀菌液 A 加入装有 90mL 无菌稀释水 (B.2.4) 的三角瓶中摇匀, 制成 1:10 均匀菌液。另取

一支 10mL 移液管，按上述操作步骤，依次配制稀释 10 倍菌液，如此每递增 1 次，即换用 1 支 10mL 灭菌移液管。根据预期菌群数目，将均匀菌液 A 稀释成 3 个稀释度依次为 10 倍的稀释菌液。

B.5.2 接种水样

将这 3 个稀释度的菌液分别接种 1mL，于装有 10mL 乳糖蛋白胨培养液 (B.4.1) 的试管中 (内有倒管)，每个稀释度菌液接种 5 管。如需接种 10mL 稀释菌液，则接种于备有 5mL 三倍浓缩乳糖蛋白胨培养液 (B.4.2) 的试管中 (内有倒管)，3 个稀释度共计 15 支管。

B.5.3 平板分离

经 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 24h 后，将产酸产气及只产酸的发酵管 (发酵试管颜色变黄为产酸，小玻璃倒管内有气泡为产气)，分别接种于品红亚硫酸钠培养基 (B.4.3) 或伊红美蓝培养基 (B.4.4) 上，再置于 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温箱内培养 18h~24h，挑选符合下列特征的菌落，取菌落的一小部分进行涂片，革兰氏染色，镜检。

- a) 品红亚硫酸钠培养基上的菌落：
- 1) 紫红色，具有金属光泽的菌落；
 - 2) 深红色，不带或略带金属光泽的菌落；
 - 3) 淡红色，中心色较深的菌落。
- b) 伊红美蓝培养基上的菌落：
- 1) 深紫黑色，具有金属光泽的菌落；
 - 2) 紫黑色，不带或略带金属光泽的菌落；
 - 3) 淡紫红色，中心色较深的菌落。

B.5.4 复发酵实验

上述涂片镜检的菌落如为革兰氏阴性无芽孢杆菌，则挑选该菌落的另一部分，再接种于普通浓度乳糖蛋白胨培养液 (B.4.1) 中 (内有倒管)，每管可接种分离自同一初发酵管的最典型的菌落 1 个~3 个，然后置于 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温箱中培养 24h，有产酸产气者，即证实有总大肠菌群存在。

B.6 计算

根据证实有大肠菌群存在的阳性管数参考水和废水监测分析方法表 5-2-10，得到每 100mL 均匀菌液 A 中的总大肠菌群数 (MPN 值)。每克土壤中的总大肠菌群数 C (MPN/g)，可按式 (2) 计算：

$$C = \frac{MPN \times V}{m \times 100} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

MPN——每 100mL 均匀菌液 A 中的总大肠菌群数；

V——均匀菌液 A 的定容体积，单位为毫升 (mL)；

m——土壤样品取样量，单位为克 (g)。

测定结果保留两位有效数字，大于 100 时以科学计数法表示。

B.7 质量保证和质量控制

每次实验应接种 1mL 无菌稀释水 (B.2.4) 于 10mL 乳糖蛋白胨培养液 (B.4.1) 的 5 个试管中，经 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 24h 后，如出现产酸产气现象，则该次测定结果无效，应查明原因重新测定。

对每批次培养基须使用有证标准菌株进行培养基质量检验。

附录 C 总大肠菌群 酶底物法

C.1 原理

在选择性培养基上总大肠菌群产生的特异性生物酶 β -半乳糖苷酶(β -D-galactosidase)能分解培养基中的邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG), 在 (37 ± 1) °C 条件下培养 24h 后使培养基呈现颜色变化, 依此来检测土壤中的总大肠菌群。

C.2 试剂和材料

C.2.1 无菌水: 经 121°C 高压灭菌 20min 后的水, 备用, 应现用现配。

C.2.2 培养基: 采用市售培养基。

C.2.3 除非另有规定, 本方法所用的试剂均为国家标准的分析纯, 水为 GB/T 6682 中规定的二级水。

C.3 仪器设备

C.3.1 采样瓶: 采用耐灭菌处理的 150mL 玻璃瓶或塑料瓶。采样瓶, 在采集不存在或不考虑余氯、金属离子干扰的样品时, 可采用市售无菌采样瓶或无菌采样袋。

C.3.2 高压蒸汽灭菌器: 可提供 121°C 的高压灭菌温度。

C.3.3 电热干燥箱: 可提供 (170 ± 10) °C 的灭菌温度。

C.3.4 天平: 精度 0.01g。

C.3.5 振荡器。

C.3.6 封口机: 用于 51 孔和 97 孔定量盘封口。

C.3.7 恒温培养箱: 可提供 (37 ± 1) °C 的恒定培养温度。

C.3.8 三角烧瓶: 150mL。

C.3.9 51 孔塑料定量盘: 含 51 个孔穴, 50 个小孔体积为 1.96mL, 顶部大孔体积为 8.5mL。

C.3.10 97 孔塑料定量盘: 含 97 个孔穴, 48 个小孔体积为 0.186mL, 48 个大孔体积为 1.86 mL。顶部大孔体积 11mL。

C.3.11 移液枪和已灭菌移液枪头: 1000 μ L、10 mL。

C.4 分析步骤

C.4.1 土壤样品的稀释

称取土壤样品 $m=1.00g$, 放于装有 $V=100mL$ 无菌水 (C.2.1) 的无菌三角烧瓶 (C.3.8) 中, 充分摇匀, 可将三角烧瓶置于振荡器上振荡 5min, 制成均匀菌液 A。

C.4.2 样品稀释

均匀菌液 A 应进行至少 1:10 稀释, 先量取 50mL 无菌水于无菌三角烧瓶 (C.3.8) 中, 加入一支培养基 (C.2.2), 混匀。若样品比较洁净, 则直接移取 10mL 均匀菌液 A 加入上述混合液中, 再加入 40mL 无菌水 (C.2.1) 至 100mL, 制备成 1:10 稀释度的均匀菌液。若样品污染比较重, 先量取 50mL 无菌水 (C.2.1) 于无菌三角烧瓶 (C.3.8) 中, 加入一支培养基 (C.2.2), 混匀。再直接移取 10mL 上述 1:10 稀释度的均匀菌液加入至混合液中, 加入 40mL 无菌水 (C.2.1) 至 100 mL, 制备成 1:100 稀释度的均匀菌液, 必要时可按同法加大稀释度。记录均匀菌液 A 的稀释度 D。

C.4.3 样品检测

将稀释后样品全部倒入 51 孔 (C.3.9) 或 97 孔定量盘 (C.3.10) 中, 用手抚平定量盘赶除孔内气泡, 用封口机封口。将定量盘置于 (37 ± 1) °C (检测总大肠菌群) 培养箱 (C.3.7) 中, 培养 24h。若结果为可疑阳性, 可延长培养时间到 28h, 超过 28h 之后出现的颜色反应不作为阳性结果。

C.5 结果计算与表示

C.5.1 结果判读

培养 24h 后, 如无黄色孔穴则为阴性; 出现黄色孔穴, 若比阳性比色盘的黄色浅, 结果为阴性; 若

与阳性比色盘的黄色相近或更深，结果为阳性。

C.5.2 结果计数

根据 51 孔或 97 孔定量盘中阳性黄色孔穴数，对照表 1 或 HJ1001-2018 附录 B 查出其代表的总大肠菌群最大可能数，结果以 MPN/100 mL 表示。

表 1 酶底物法（51 孔定量盘）不同阳性结果的 MPN 检索表

阳性数	大肠菌群 MPN/100mL	95%可信范围		阳性数	大肠菌群 MPN/100mL	95%可信范围	
		下限	上限			下限	上限
0	<1	0.0	3.7	26	36.4	24.7	53.9
1	1.0	0.3	5.6	27	38.4	26.4	56.6
2	2.0	0.6	7.3	28	40.6	28.0	59.5
3	3.1	1.1	9.0	29	42.9	29.7	62.5
4	4.2	1.7	10.7	30	45.3	31.5	65.6
5	5.3	2.3	12.3	31	47.8	33.4	69.0
6	6.4	3.0	13.9	32	50.4	35.4	72.5
7	7.5	3.7	15.5	33	53.1	37.5	76.2
8	8.7	4.5	17.1	34	56.0	39.7	80.1
9	9.9	5.3	18.8	35	59.1	42.0	84.4
10	11.1	6.1	20.5	36	62.4	44.6	88.8
11	12.4	7.0	22.1	37	65.9	47.2	93.7
12	13.7	7.9	23.9	38	69.7	50.0	99.0
13	15.0	8.8	25.7	39	73.8	53.1	104.8
14	16.4	9.8	27.5	40	78.2	56.4	111.2
15	17.8	10.8	29.4	41	83.1	59.9	118.3
16	19.2	11.9	31.3	42	88.5	63.9	126.2
17	20.7	13.0	33.3	43	94.5	68.2	135.4
18	22.2	14.1	35.2	44	101.3	73.1	146.0
19	23.8	15.3	37.3	45	109.1	78.6	158.7
20	25.4	16.5	39.4	46	118.4	85.0	174.5
21	27.1	17.7	41.6	47	129.8	92.7	195.0
22	28.8	19.0	43.9	48	144.5	102.3	224.1
23	30.6	20.4	46.3	49	165.2	115.2	272.2
24	32.4	21.8	48.7	50	200.5	135.8	387.6
25	34.4	23.3	51.2	51	>200.5	146.1	-

C.5.3 计算

从表 1 或 HJ1001-2018 附录 B 中查得每 100mL 水样中的总大肠菌群的最大可能数(MPN 值)后，每克土壤样品中的总大肠菌群数 C (MPN/g)，可按式 (3) 计算:

$$C = \frac{MPN \times V}{D \times m \times 100} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

MPN——每 100 mL 水样中的总大肠菌群的最大可能数;

V——均匀菌液 A 的定容体积，单位为毫升 (mL)；

D——均匀菌液 A 的稀释度；

m——土壤称重，单位为克（g）。

测定结果保留两位有效数字，大于 100 时以科学计数法表示。

C.6 质量保证和质量控制

C.6.1 无菌检验

每次实验时，用无菌水做全程序空白测定，培养后的比色盘显示结果应为阴性，否则，该次测定结果无效，应查明原因后重新测定。

C.6.2 阳性、阴性对照实验

每新购不同批次培养基应使用质控标样进行阳性、阴性对照试验。将相应质控标样按使用说明操作，溶解后在 (37 ± 1) °C 温度条件下培养 24h 后观察结果，合格后方能使用该批次培养基，否则该批次培养基不能用于样品测定。

C.6.3 稀释度控制

对某些特殊样品，可按样品稀释步骤（C.4.2）增加若干不同稀释度，使结果控制在定量盘检测范围内。

C.6.4 培养基检验

对每批次培养基须使用有证标准菌株进行培养基质量检验。

附录 D 粪大肠菌群 滤膜法

D.1 原理

将土样用灭菌的稀释水稀释后，注入已灭菌的放有微孔滤膜的滤器中，经过抽滤，细菌被截留在滤膜上，然后将滤膜贴于合适的培养基上在 (44.5 ± 0.5) ℃条件下进行培养，计数与鉴定滤膜上生长的大肠菌群落。计算出每克土壤中含有的大肠菌群数。

D.2 试剂和材料

D.2.1 碳酸钠溶液 $[c(\text{Na}_2\text{CO}_3)=1.0\text{mol/L}]$ ：称取 10.6g 碳酸钠 (Na_2CO_3) 溶于水，并定容到 100 mL。

D.2.2 氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH})=1\text{mol/L}$ 。

D.2.3 盐酸溶液： $c(\text{HCl})=1\text{mol/L}$ 。

D.2.4 生理盐水： $\omega(\text{NaCl})=0.8\%$ 。

D.2.5 无菌稀释水：根据土壤样品的数量配制稀释用的生理盐水(D.2.4)，准备 8 个或 9 个内装有 90mL 生理盐水(D.2.4)的三角瓶，其中放入数颗玻璃珠，经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min，备用。三角瓶数量应根据土壤样品的稀释倍数确定。

D.2.6 除非另有规定，本方法所用的试剂均为国家标准的分析纯，水为 GB/T6682 中规定的二级水。

D.3 仪器和设备

D.3.1 天平。

D.3.2 显微镜。

D.3.3 革兰氏染色用有关器材。

D.3.4 恒温培养箱：可提供 (44.5 ± 0.5) ℃的培养温度。

D.3.5 干热灭菌箱。

D.3.6 高压蒸汽灭菌器。

D.3.7 振荡器。

D.3.8 滤膜过滤装置：滤膜孔径为 0.45 μm 。

D.3.9 采样瓶：采用耐灭菌处理的 150mL 玻璃瓶或塑料瓶。采样瓶，在采集不存在或不考虑余氯、金属离子干扰的样品时，可采用市售无菌采样瓶或无菌采样袋。

D.4 培养基

培养基可购买市售成品培养基。

D.4.1 M-TEC 培养基

a) 成分：

- 1) 蛋白胨：5g；
- 2) 乳糖：10g；
- 3) 酵母浸膏：3g；
- 4) 氯化钠：7.5 g；
- 5) 磷酸氢二钾：3.3g；
- 6) 磷酸二氢钾：1g；
- 7) 十二烷基磺酸钠：0.2g；
- 8) 去氧胆酸钠：0.1g；
- 9) 溴甲酚紫：0.08 g；
- 10) 溴酚红：0.08g；
- 11) 琼脂：15g；
- 12) 水：1000 mL。

b) 制法：

按上述成分的规定量置于 1000mL 水中，加热溶解，用碳酸钠溶液（D.2.1）调 pH 值为 7.4，分装于小烧瓶内，每瓶 100mL，于 115℃ 灭菌 20min，储于冰箱中备用，保质期 7 d。

D.4.2 EC 培养基

a) 成分：

- 1) 胰蛋白胨：20g；
- 2) 乳糖：5g；
- 3) 胆盐混合物或 3 号胆盐：1.5g；
- 4) 磷酸氢二钾：4g；
- 5) 磷酸二氢钾：1.5g；
- 6) 氯化钠：5g；
- 7) 水：1000 mL。

b) 制法：

将上述成分加热溶解于 1000mL 水中，用氢氧化钠（D.2.2）或盐酸溶液（D.2.3）调 pH 值为 6.9，混匀后定量分装于内装倒管的试管中，置高压蒸汽灭菌器中，于 115℃ 灭菌 20min。此培养基用前现配制，不宜置冰箱，以防检测时出现假阳性。

D.5 分析步骤

D.5.1 准备工作

滤膜灭菌：将滤膜放入烧杯中，加入水，置于沸水浴中煮沸灭菌 3 次，每次 15min。前 2 次煮沸后需要换水并洗涤 2 次~3 次以除去膜内残余溶剂。

滤器灭菌：用点燃的酒精棉球火焰灭菌，或用 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。

D.5.2 抽滤

称取土壤样品 $m=10.0g$ ，放于灭菌三角瓶内，加无菌稀释水（D.2.5）至 $V=100\text{ mL}$ 。充分摇匀，若土壤样品颗粒较大，可将三角瓶置于振荡器上振荡 3min，制成均匀菌液 A。用 10mL 灭菌移液管吸取均匀菌液 A 10mL，加入装有 90mL 无菌稀释水（D.2.5）的三角瓶中摇匀，制成 1:10 均匀菌液。按上述操作步骤，依次配制稀释 10 倍菌液，如此每递增 1 次，即换用 1 支 10 mL 灭菌移液管，根据预期菌群数目，将均匀菌液依次进行 10 倍稀释，制得稀释菌液作为待检水样。记录均匀菌液 A 的稀释度 D。

稀释完成后，进行抽滤。样品抽滤前，应将待检水样充分摇匀，使附着于颗粒、杂质上的菌落分散，以利于正确的检测。用无菌镊子夹取灭菌滤膜边缘，粗糙面向上，贴放在已灭菌的滤床上，稳妥地固定好滤器，连接好抽气系统。于滤器内先加入约 10mL 无菌稀释水（D.2.5），然后用已灭菌移液管吸取 1.0mL 充分混匀稀释好的待检水样，加入滤器中。于负压 50kPa 下进行抽滤，快滤完前应再加入少许灭菌水，以冲洗滤器内壁，使水样内菌全部集聚于滤膜上。水样滤完后，再抽滤约 5s 即停止抽气，取下滤器，用灭菌镊子夹取滤膜边缘部分，移放在 M-TEC 培养基（D.4.1）上，滤膜载留菌面向上，滤膜应与培养基面完全紧贴，两者间不得留有气泡，然后将平板倒置，放入 $(44.5\pm 0.5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。恒温箱内培养 24h。

D.6 计算

D.6.1 滤膜上所生的菌落数一般不超过 50 个为宜，如菌落数过多则不易分散生长，影响菌落准确计数。检测时，样品应用几个不同稀释度进行检测，以选择其中合适的一个滤膜进行计数，同时须做平行样测定。在 M-TEC 培养基上，粪大肠菌群菌落呈黄色，计数滤膜上此类菌落的数目。每克土壤中的粪大肠菌群数 C_n (CFU/g)，可按式（4）计算：

$$C_n = \frac{M \times V}{D \times m} \dots\dots\dots (4)$$

式中：

M——滤膜上生长的粪大肠菌群菌落总数，单位为个每毫升（个/mL）；

V——均匀菌液 A 的定容体积，单位为毫升（mL）；

D——均匀菌液 A 的稀释度；

m——土壤样品取样量，单位为克（g）。

测定结果保留两位有效数字，大于 100 时以科学计数法表示。

D.6.2 对某些不典型或疑难的菌落，可取其一部分进行涂片、革兰氏染色、镜检。另一部分接种于 EC 培养基（D.4.2）内（管内有倒管），每管可接种分离自同一初发酵管的最典型的菌落 1 个~3 个，然后置于（44.5 ± 0.5）℃恒温箱中培养 24h，有产酸产气者，即证实有粪大肠菌群存在。

D.7 质量保证和质量控制

D.7.1 无菌检验

每次实验应同时抽滤 10mL 无菌稀释水（D.2.5），将抽滤完的滤膜移放在 M-TEC 培养基（D.4.1）上，然后将平板倒置，放入（44.5 ± 0.5）℃恒温箱内培养 24h。如出现菌落，则该次测定结果无效，应查明原因重新测定。

D.7.2 滤膜鉴定

采用新滤膜前，应对滤膜进行鉴定，即将已知的大肠埃希氏菌置于水中用此种滤膜过滤，此时在滤液中不应检出大肠埃希氏菌。

D.7.3 培养基检验

对每批次培养基须使用有证标准菌株进行培养基质量检验。

附录 E 粪大肠菌群 多管发酵法

E.1 原理

根据粪大肠菌群应具有的生物特性，如革兰氏阴性无芽孢杆菌，在 (37 ± 1) ℃和 (44.5 ± 0.5) ℃培养 24h 后能发酵乳糖并产酸产气，能在选择培养基上产生典型菌落，利用这一特性，根据发酵过程中阳性管的数量，通过查 MPN 生物统计表，可检测粪大肠菌群的数量。

E.2 试剂和材料

E.2.1 氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH})=1\text{ mol/L}$ 。

E.2.2 盐酸溶液： $c(\text{HCl})=1\text{ mol/L}$ 。

E.2.3 生理盐水： $\omega(\text{NaCl})=0.8\%$ 。

E.2.4 无菌稀释水：根据土壤样品的数量配制稀释用的生理盐水（E.2.3）。每个土壤样品准备 8 个或 9 个内装有 90mL 生理盐水（E.2.3）的三角瓶，其中放入数颗玻璃珠，经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min，备用，三角瓶具体数量根据土壤样品的稀释倍数确定。

E.2.5 除非另有规定，本方法所用的试剂均为国家标准的分析纯，水为 GB/T 6682 中规定的二级水。

E.3 仪器和设备

E.3.1 天平。

E.3.2 显微镜。

E.3.3 革兰氏染色用有关器材。

E.3.4 高压蒸汽灭菌器。

E.3.5 恒温培养箱：可提供 (37 ± 1) ℃、 (44.5 ± 0.5) ℃的培养温度。

E.3.6 放大镜。

E.3.7 振荡器。

E.3.8 采样瓶：采用耐灭菌处理的 150mL 玻璃瓶或塑料瓶。采样瓶，在采集不存在或不考虑余氯、金属离子干扰的样品时，可采用市售无菌采样瓶或无菌采样袋。

E.4 培养基

培养基可购买市售成品培养基。

E.4.1 乳糖蛋白胨培养液

a) 成分：

1) 蛋白胨：10g；

2) 牛肉膏：3g；

3) 乳糖：5g；

4) 氯化钠：5g；

5) 溴甲酚紫乙醇溶液（ $\rho=16\text{g/L}$ ）：1mL；

6) 水：1000 mL。

b) 制法：

将蛋白胨、牛肉膏、乳糖及氯化钠置于 1000mL 水中加热溶解，用氢氧化钠溶液（E.2.1）或盐酸溶液（E.2.2）调整 pH 值为 7.2~7.4，再加入 1mL 溴甲酚紫乙醇溶液（ $\rho=16\text{g/L}$ ），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 20 min，储于冷暗处备用，保质期 7d。

E.4.2 三倍浓缩乳糖蛋白胨培养液

按上述乳糖蛋白胨培养液（E.4.1）浓缩 3 倍配制，保质期 7d。

E.4.3 品红亚硫酸钠培养基

a) 成分：

1) 蛋白胨：10g；

- 2) 乳糖: 10g;
- 3) 磷酸氢二钾: 3.5g;
- 4) 琼脂: 20 g~30 g;
- 5) 水: 1000mL;
- 6) 无水亚硫酸钠: 5g 左右;
- 7) 碱性品红乙醇溶液 ($\rho=50$ g/L): 20 mL。

b) 储备培养基的制备:

先将琼脂加至 900mL 水中, 加热溶解, 然后加入磷酸氢二钾及蛋白胨, 混匀使之溶解, 再以水补足至 1000mL, 用氢氧化钠 (E.2.1) 或盐酸 (E.2.2) 溶液调整 pH 值为 7.2~7.4, 趁热用脱脂棉或纱布过滤, 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, 储存于冷暗处备用, 保质期 7d。

c) 平皿培养基的配制:

将 E.4.3 制备的储备培养基加热融化, 根据烧瓶内培养基的容量, 用灭菌移液管按比例 1:50 吸取碱性品红乙醇溶液 ($\rho=50$ g/L), 置于灭菌空试管中。再按比例 1:200 称取所需的无水亚硫酸钠置于另一个灭菌空试管内, 加无菌水少许使其溶解后, 置于沸水浴中煮沸 10min 以灭菌。用灭菌移液管吸取已灭菌的亚硫酸钠溶液, 滴加到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约 15mL 倾入已灭菌的空平皿内, 待其冷却凝固后倒置于冰箱内备用。此种已制成的培养基于冰箱内保存不宜超过 14d, 如培养基已由淡红色变成深红色, 则不能再用。

E.4.4 伊红美蓝培养基

a) 成分:

- 1) 蛋白胨: 10 g;
- 2) 乳糖: 10g;
- 3) 磷酸氢二钾: 2g;
- 4) 琼脂: 20 g;
- 5) 水: 1000 mL;
- 6) 伊红水溶液 ($\rho=20$ g/L): 20mL;
- 7) 美蓝水溶液 ($\rho=5$ g/L): 13 mL。

b) 储备培养基的制备:

先将琼脂加至 900mL 水中, 加热溶解, 然后加入磷酸氢二钾及蛋白胨, 混匀, 使之溶解, 再以水补足至 1000mL, 用氢氧化钠 (E.2.1) 或盐酸 (E.2.2) 溶液调整 pH 值为 7.2~7.4, 趁热用脱脂棉或纱布过滤, 再加入乳糖, 混匀后定量分装于烧瓶内, 置高压蒸汽灭菌器 115℃ 灭菌 20min, 储存于冷暗处备用, 保质期 7d。

c) 平皿培养基的配制:

将上法制备的储备培养基加热融化。根据烧瓶内培养基的容量, 用灭菌移液管按比例吸取已灭菌的伊红水溶液 ($\rho=20$ g/L) 和已灭菌的美蓝水溶液 ($\rho=5$ g/L), 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已灭菌的空平皿内, 待其冷却凝固后倒置于冰箱内备用, 保质期 7d。

E.4.5 EC 培养基

a) 成分:

- 1) 胰蛋白胨: 20g;
- 2) 乳糖: 5g;
- 3) 胆盐混合物或 3 号胆盐: 1.5 g;

- 4) 磷酸氢二钾: 4g;
- 5) 磷酸二氢钾: 1.5g;
- 6) 氯化钠: 5g;
- 7) 水: 1000mL。

b) 制法:

将上述成分加热溶解于 1000mL 水中, 用氢氧化钠 (E.2.1) 或盐酸 (E.2.2) 调 pH 值为 6.9, 混匀后定量分装于内装倒管的试管中, 置高压蒸汽灭菌器中, 于 115℃ 灭菌 20min。此培养基用前现配制, 不宜置冰箱, 以防检测时出现假阳性。

E.5 分析步骤

E.5.1 土壤样品的稀释

称取土壤样品 $m=10.0g$ 放于灭菌三角瓶内, 加无菌稀释水 (E.2.4) 至 100mL (V)。充分摇匀, 若土壤样品颗粒较大, 可将三角瓶置于振荡器上振荡 3min, 制成均匀菌液 A。用 10mL 灭菌移液管吸取 10mL 均匀菌液 A 加入装有 90mL 无菌稀释水 (E.2.4) 的三角瓶中摇匀, 制成 1:10 均匀菌液。另取一支 10mL 移液管, 按上述操作步骤, 依次配制稀释 10 倍菌液, 如此每递增 1 次, 即换用 1 支 10mL 灭菌移液管。根据预期菌群数目, 将均匀菌液 A 稀释成 3 个稀释度依次为 10 倍的稀释菌液。

E.5.2 接种水样

将这 3 个稀释度的菌液分别接种 1mL, 于装有 10mL 乳糖蛋白胨培养液 (E.4.1) 的试管中 (内有倒管), 每个稀释度菌液接种 5 管。如需接种 10mL 稀释菌液, 则接种于备有 5mL 三倍浓缩乳糖蛋白胨培养液 (E.4.2) 的试管中 (内有倒管), 3 个稀释度共计 15 支管。

E.5.3 平板分离

经 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 24h 后, 将产酸产气及只产酸的发酵管 (发酵试管颜色变黄为产酸, 小玻璃倒管内有气泡为产气), 分别接种于品红亚硫酸钠培养基 (E.4.3) 或伊红美蓝培养基 (E.4.4) 上, 再置于 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温箱内培养 18h~24h, 挑选符合下列特征的菌落, 取菌落的一小部分进行涂片, 革兰氏染色, 镜检。

- a) 品红亚硫酸钠培养基上的菌落:
 - 1) 紫红色, 具有金属光泽的菌落;
 - 2) 深红色, 不带或略带金属光泽的菌落;
 - 3) 淡红色, 中心色较深的菌落。
- b) 伊红美蓝培养基上的菌落:
 - 1) 深紫黑色, 具有金属光泽的菌落;
 - 2) 紫黑色, 不带或略带金属光泽的菌落;
 - 3) 淡紫红色, 中心色较深的菌落。

E.5.4 复发酵实验

上述涂片镜检的菌落如为革兰氏阴性无芽孢杆菌, 则挑选该菌落的另一部分, 再接种于 EC 培养基 (E.4.5) 中 (内有倒管), 每管可接种分离自同一初发酵管的最典型的菌落 1 个~3 个, 然后置于 $(44.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 恒温箱中培养 24h, 有产酸产气者, 即证实有粪大肠菌群存在。

E.6 计算

根据证实有粪大肠菌群存在的阳性管数参考水和废水监测分析方法表 5-2-10, 得到每 100mL 均匀菌液 A 中的粪大肠菌群数 (MPN 值)。每克土壤中的粪大肠菌群数 C_n (MPN/g), 可按式 (5) 计算:

$$C_n = \frac{MPN \times V}{m \times 100} \dots\dots\dots (5)$$

式中:

MPN——每 100mL 均匀菌液 A 中的粪大肠菌群数;

V——均匀菌液 A 的定容体积，单位为毫升（mL）；

m——土壤样品取样量，单位为克（g）。

测定结果保留两位有效数字，大于 100 时以科学计数法表示。

E.7 质量保证和质量控制

每次实验应采用无菌稀释水（E.2.4）作为空白对照，接种 1mL 无菌稀释水（E.2.4）于 10mL 乳糖蛋白胨培养液（E.4.1）的 5 个试管中，经（37 ± 1）℃培养 24h 后，如出现产酸产气现象，则该次测定结果无效，应查明原因重新测定。

对每批次培养基须使用有证标准菌株进行培养基质量检验。

附录 F 粪大肠菌群 酶底物法

F.1 原理

在选择性培养基上粪大肠菌群产生的特异性生物酶 β -半乳糖苷酶(β -D-galactosidase)能分解培养基中的邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG),在(44.5 \pm 0.5) $^{\circ}$ C条件下培养24h后使培养基呈现颜色变化,依此来检测土壤中的粪大肠菌群。

F.2 试剂和材料

F.2.1 无菌水:经121 $^{\circ}$ C高压灭菌20min后的水,备用,应现用现配。

F.2.2 培养基:采用市售培养基。

F.2.3 除非另有规定,本方法所用的试剂均为国家标准的分析纯,水为GB/T6682中规定的二级水。

F.3 仪器和设备

F.3.1 采样瓶:采用耐灭菌处理的150mL玻璃瓶或塑料瓶。采样瓶,在采集不存在或不考虑余氯、金属离子干扰的样品时,可采用市售无菌采样瓶或无菌采样袋。

F.3.2 高压蒸汽灭菌器:可提供121 $^{\circ}$ C的高压灭菌温度。

F.3.3 电热干燥箱:可提供(170 \pm 10) $^{\circ}$ C的灭菌温度。

F.3.4 天平:精度0.01g。

F.3.5 振荡器。

F.3.6 封口机:用于51孔和97孔定量盘封口。

F.3.7 恒温培养箱:可提供(44.5 \pm 0.5) $^{\circ}$ C的恒定培养温度。

F.3.8 三角烧瓶:150mL。

F.3.9 51孔塑料定量盘:含51个孔穴,50个小孔体积为1.96mL,顶部大孔体积为8.5mL。

F.3.10 97孔塑料定量盘:含97个孔穴,48个小孔体积为0.186mL,48个大孔体积为1.86mL。顶部大孔体积11mL。

F.3.11 移液枪和已灭菌移液枪头:1000 μ L、10mL。

F.4 分析步骤

F.4.1 土壤样品的稀释

称取土壤样品 $m=1.00g$,放于装有 $V=100mL$ 无菌水(F.2.1)的无菌三角烧瓶(F.3.8)中,充分摇匀,可将三角烧瓶置于振荡器上振荡5min,制成均匀菌液A。

F.4.2 样品稀释

均匀菌液A应进行至少1:10稀释,先量取50mL无菌水于无菌三角烧瓶(F.3.8)中,加入一支培养基(F.2.2),混匀。若样品比较洁净,则直接移取10mL均匀菌液A加入上述混合液中,再加入40mL无菌水(F.2.1)至100mL,制备成1:10稀释度的均匀菌液。若样品污染比较重,先量取50mL无菌水(F.2.1)于无菌三角烧瓶(F.3.8)中,加入一支培养基(F.2.2),混匀。再直接移取10mL上述1:10稀释度的均匀菌液加入至混合液中,加入40mL无菌水(F.2.1)至100mL,制备成1:100稀释度的均匀菌液,必要时可按同法加大稀释度。记录均匀菌液A的稀释度D。

F.4.3 样品检测

将稀释后样品全部倒入51孔(F.3.9)或97孔定量盘(F.3.10)中,用手抚平定量盘赶除孔内气泡,用封口机封口。将定量盘置于(44.5 \pm 0.5) $^{\circ}$ C(检测粪大肠菌群)培养箱(F.3.7)中,培养24h。若结果为可疑阳性,可延长培养时间到28h,超过28h之后出现的颜色反应不作为阳性结果。

F.5 结果计算与表示

F.5.1 结果判读

培养24h后,如无黄色孔穴则为阴性;出现黄色孔穴,若比阳性比色盘的黄色浅,结果为阴性;若

与阳性比色盘的黄色相近或更深，结果为阳性。

F.5.2 结果计数

根据 51 孔或 97 孔定量盘中阳性黄色孔穴数，对照表 1 或 HJ1001-2018 附录 B 查出其代表的粪大肠菌群最大可能数，结果以 MPN/100 mL 表示。

F.5.3 计算

从表 1 或 HJ1001-2018 附录 B 中查得每 100mL 水样中的粪大肠菌群的最大可能数(MPN 值)后，每克土壤样品中的粪大肠菌群数 C_n (MPN/g)，可按式 (6) 计算：

$$C_n = \frac{MPN \times V}{D \times m \times 100} \dots\dots\dots (6)$$

式中：

MPN——每 100 mL 水样中的粪大肠菌群的最大可能数；

V——均匀菌液 A 的定容体积，单位为毫升 (mL)；

D——均匀菌液 A 的稀释度；

m——土壤称重，单位为克 (g)。

测定结果保留两位有效数字，大于 100 时以科学计数法表示。

F.6 质量保证和质量控制

F.6.1 无菌检验

每次实验时，用无菌水做全程序空白测定，培养后的比色盘显示结果应为阴性，否则，该次测定结果无效，应查明原因后重新测定。

F.6.2 阳性、阴性对照实验

每新购不同批次培养基应使用质控标样进行阳性、阴性对照试验。将相应质控标样按使用说明操作，溶解后在 $(44.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 温度条件下培养 24h 后观察结果，合格后方能使用该批次培养基，否则该批次培养基不能用于样品测定。

F.6.3 稀释度控制

对某些特殊样品，可按样品稀释步骤 (F.4.2) 增加若干不同稀释度，使结果控制在定量盘检测范围内。

F.6.4 培养基检验

对每批次培养基须使用有证标准菌株进行培养基质量检验。