ICS 07.100.20
C 51

中华人民共和国国家标准

GB/T 28230—2011

膜过滤法测定入出境船舶压舱水中大肠菌群

Enumeration of coliforms in ballast water of entry-exit ships by membrane filtration

2011-12-30 发布　　2012-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会　发布

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准修改采用美国环境保护局(EPA)《方法 1604:膜过滤法联合测定水中总大肠菌群和大肠杆菌》(2002 年 9 月)[Method 1604:Total coliforms and *Escherichia coli* in water by membrane filtration using a simultaneous detection technique (MI medium),september 2002]。

本标准与 EPA 方法的主要区别是:

——删除了大肠杆菌计数的内容;

——培养箱温度由 35 ℃±0.5 ℃修改为 36 ℃±1 ℃;

——增加将水样梯度稀释的步骤。

本标准由国家质量监督检验检疫总局提出。

本标准由中国检验检疫科学研究院归口。

本标准起草单位:中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国广州出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:王林、张顺合、张乐、李俊成、李金有、聂维忠、廖如燕、陈春田、常林、慈颖、庞秋艳、杨晨光、韩辉。

标准分享网 www.bzfxw.com 免费下载

膜过滤法测定入出境船舶压舱水中大肠菌群

1 范围

本标准规定了采用膜过滤法测定入出境船舶压舱水中大肠菌群(coliforms)的程序和方法。

本标准适用于对入出境船舶压舱水中的大肠菌群进行计数。

2 设备和材料

2.1 恒温培养箱:36 ℃±1 ℃。

2.2 冰箱:2 ℃～8 ℃。

2.3 100 mL 量筒:灭菌。

2.4 膜过滤装置[1]:见 4.1.2。

2.5 无菌纤维素酯滤膜,白色,带格栅,直径 47 mm,孔径 0.45 μm。

2.6 无菌移液管:10 mL,精确到 0.1 mL。

2.7 无菌生理盐水。

2.8 锥形瓶:150 mL。

2.9 紫外线灯:波长 366 nm。

2.10 无菌培养皿:直径 50 mm。

2.11 无菌滤器:孔径 0.22 μm。

2.12 MI 培养基:见附录 A。

3 检测程序

大肠菌群检测程序见图 1。

4 操作步骤

4.1 准备

4.1.1 制备 MI 琼脂培养基,4 ℃保存的培养基应待温度恢复至室温备用。

4.1.2 装配过滤装置:用消毒镊子夹取无菌滤膜置于滤器多孔盘上,格栅面向上,装配滤杯与滤器基座,连接缓冲瓶、真空泵(无真空泵可用注射器代替)。过滤装置示意见图 2。

---

1) 可使用等效的膜过滤装置。

标准分享网 www.bzfxw.com 免费下载

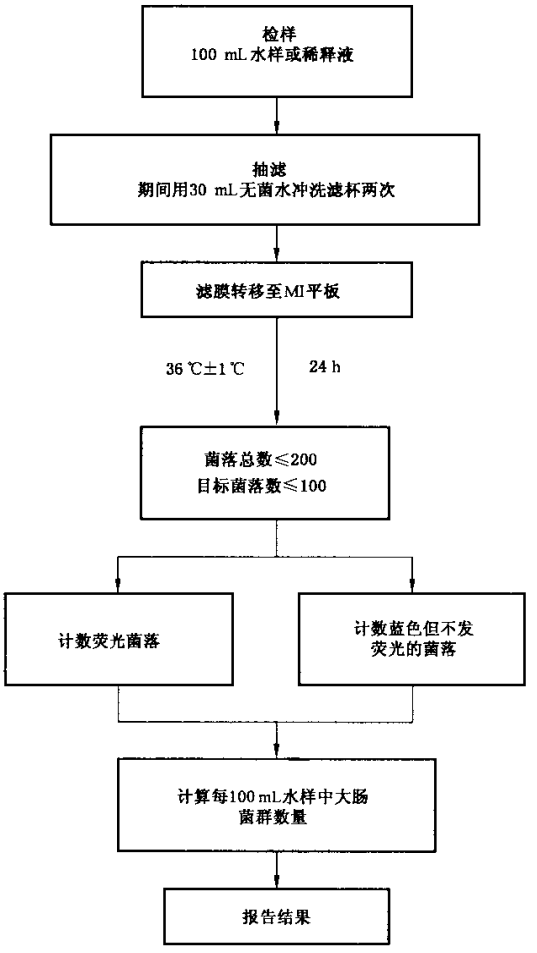


图 1　大肠菌群检测程序

4.1.3　样品稀释：用无菌移液管移取 10 mL 水样至盛有 90 mL 无菌生理盐水的锥形瓶内，充分混匀，根据对样品污染状况的估计，按上述操作依次制成 10 倍系列等比稀释的样品匀液备检。每份样品选取 3 个适宜的连续稀释度分别进行检测。

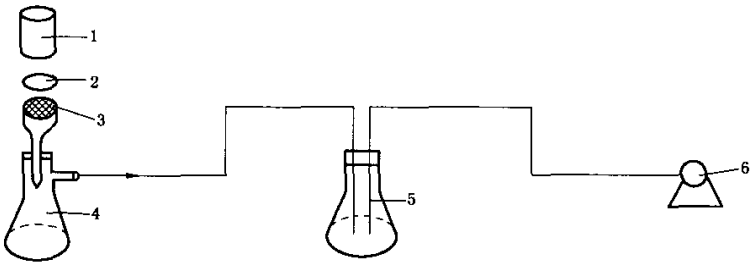
4.2　抽滤

4.2.1　加 30 mL 无菌水于滤杯中，充分浸湿滤膜。

4.2.2　用无菌量筒量取 100 mL 水样或稀释液，倒入滤杯，开启真空泵，抽滤完 100 mL 水样后分别用 30 mL 无菌水冲洗滤杯两次。

4.2.3　关闭真空泵，移去滤杯，用消毒镊子轻轻夹取滤膜边缘，将滤膜格栅面向上覆于 MI 琼脂培养基上，用镊子轻压或滑动滤膜，使其贴紧培养基，防止滤膜边缘翘起或与琼脂之间形成气泡。

标准分享网 www.bzfxw.com 免费下载



说明：

1——滤杯；

2——滤膜；

3——多孔盘；

4——抽滤瓶；

5——缓冲瓶；

6——真空泵(或注射器)。

图2　膜过滤装置示意图

4.3　培养

将培养皿滤膜面向上，置于36 ℃±1 ℃培养箱培养24 h。

4.4　计数

4.4.1　在暗室或紫外操作室中于366 nm紫外线下计数所有发荧光的菌落数 a(包括蓝绿色荧光菌落和蓝白色荧光菌落)。

4.4.2　计数在自然光下呈蓝色但在366 nm紫外线下不发荧光的菌落数 b。

4.4.3　选择总菌落数≤200，且 $a+b\leqslant100$ 的稀释度平板进行计数，如有多个稀释度平板符合计数要求，则选择目标菌落数较多的平板进行计数。

4.5　计算与报告结果

检样中的大肠菌群数为 $a+b$，根据检样的稀释度计算并报告每100 mL压舱水样中的大肠菌群数。

标准分享网 www.bzfxw.com 免费下载

附 录 A
（规范性附录）
MI 琼脂培养基

A.1 成分

蛋白胨	5 g
酵母浸膏	3 g
β-D-乳糖	1 g
4-甲基伞形酮-β-半乳糖苷(MUGal) (终浓度 100 μg/mL)	0.1 g
羟基吲哚-β-D 葡萄糖苷酸(IBDG) (终浓度 320 μg/mL)	0.32 g
氯化钠(NaCl)	7.5 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	3.3 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	1.0 g
十二烷基硫酸钠(SLS)	0.2 g
脱氧胆酸钠	0.1 g
琼脂	15 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2 头孢磺啶溶液

将 0.02 g 头孢磺啶溶于 20 mL 蒸馏水中，用 0.22 μm 滤器过滤除菌，现配现用。

A.3 配制

将 A.1 中成分加热搅拌溶解，121 ℃高压灭菌 15 min，冷却至 45 ℃～50 ℃后，每升加入 5 mL 新制备的头孢磺啶溶液(终浓度为 5 μg/mL)，倾倒 50 mm 培养皿，每皿约 5 mL，2 ℃～8 ℃冰箱保存。

标准分享网 www.bzfxw.com 免费下载