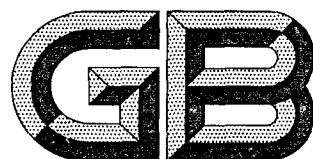


ICS 13.060
C 51



中华人民共和国国家标准

GB/T 5750.12—2006
部分代替 GB/T 5750—1985

生活饮用水标准检验方法 微生物指标

Standard examination methods for drinking water—
Microbiological parameters

2006-12-29 发布

2007-07-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	I
1 菌落总数	1
2 总大肠菌群	3
3 耐热大肠菌群	14
4 大肠埃希氏菌	16
5 贾第鞭毛虫	19
6 隐孢子虫	30

前 言

GB/T 5750《生活饮用水标准检验方法》分为以下部分：

- 总则；
- 水样的采集和保存；
- 水质分析质量控制；
- 感官性状和物理指标；
- 无机非金属指标；
- 金属指标；
- 有机物综合指标；
- 有机物指标；
- 农药指标；
- 消毒副产物指标；
- 消毒剂指标；
- 微生物指标；
- 放射性指标。

本标准代替 GB/T 5750—1985《生活饮用水标准检验法》第二篇中的细菌总数、总大肠菌群。

本标准与 GB/T 5750—1985 相比主要变化如下：

- 依据 GB/T 1.1—2000《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》调整了结构；
- 增加了生活饮用水中耐热大肠菌群、大肠埃希氏菌、贾第鞭毛虫、隐孢子虫 4 项指标的 7 个检验方法。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准负责起草单位：中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所。

本标准参加起草单位：中山大学、黑龙江省疾病预防控制中心、河北省疾病预防控制中心、北京市疾病预防控制中心、深圳市疾病预防控制中心、澳门自来水公司、广州市自来水公司。

本标准主要起草人：金银龙、陈西平、周淑玉、孙宗科、宋宏。

本标准参加起草人：遇晓杰、张淑红、张雅婕、丁培、薛金荣、余淑苑、范晓军、章诗芳。

本标准于 1985 年 8 月首次发布，本次为第一次修订。

生活饮用水标准检验方法

微生物指标

1 菌落总数

1.1 平皿计数法

1.1.1 范围

本标准规定了用平皿计数法测定生活饮用水及其水源水中的菌落总数。

本法适用于生活饮用水及其水源水中菌落总数的测定。

1.1.2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

1.1.2.1

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

水样在营养琼脂上有氧条件下 37℃ 培养 48 h 后, 所得 1 mL 水样所含菌落的总数。

1.1.3 培养基与试剂

1.1.3.1 营养琼脂

1.1.3.1.1 成分:

A	蛋白胨	10 g
B	牛肉膏	3 g
C	氯化钠	5 g
D	琼脂	10 g~20 g
E	蒸馏水	1 000 mL

1.1.3.1.2 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(如用含杂质较多的琼脂时, 应先过滤), 经 103.43 kPa (121℃, 15 lb) 灭菌 20 min, 储存于冷暗处备用。

1.1.4 仪器

1.1.4.1 高压蒸汽灭菌器。

1.1.4.2 干热灭菌箱。

1.1.4.3 培养箱 36℃ ± 1℃。

1.1.4.4 电炉。

1.1.4.5 天平。

1.1.4.6 冰箱。

1.1.4.7 放大镜或菌落计数器。

1.1.4.8 pH 计或精密 pH 试纸。

1.1.4.9 灭菌试管、平皿(直径 9 cm)、刻度吸管、采样瓶等。

1.1.5 检验步骤

1.1.5.1 生活饮用水

1.1.5.1.1 以无菌操作方法用灭菌吸管吸取 1 mL 充分混匀的水样, 注入灭菌平皿中, 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。

1.1.5.1.2 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, 进行菌落计数,

即为水样 1 mL 中的菌落总数。

1.1.5.2 水源水

1.1.5.2.1 以无菌操作方法吸取 1 mL 充分混匀的水样,注入盛有 9 mL 灭菌生理盐水的试管中,混匀成 1:10 稀释液。

1.1.5.2.2 吸取 1:10 的稀释液 1 mL 注入盛有 9 mL 灭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 稀释液等备用。如此递增稀释一次,必须更换一支 1 mL 灭菌吸管。

1.1.5.2.3 用灭菌吸管取未稀释的水样和 2 个~3 个适宜稀释度的水样 1 mL,分别注入灭菌平皿内。以下操作同生活饮用水的检验步骤。

1.1.6 菌落计数及报告方法

作平皿菌落计数时,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,供下一步计算时应用。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,而其余一半中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。然后再求该稀释度的平均菌落数。

1.1.7 不同稀释度的选择及报告方法

1.1.7.1 首先选择平均菌落数在 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时,则将该菌落数乘以稀释倍数报告之(见表 1 中实例 1)。

1.1.7.2 若有两个稀释度,其生长的菌落数均在 30~300 之间,则视二者之比值来决定,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 2 则报告其中稀释度较小的菌落总数(如表 1 中实例 3)。若等于 2 亦报告其中稀释度较小的菌落数(见表 1 中实例 4)。

1.1.7.3 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之(见表 1 中实例 5)。

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

1.1.7.5 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之(见表 1 中实例 7)。

1.1.7.6 若所有稀释度的平板上均无菌落生长,则以未检出报告之。

1.1.7.7 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,任意数其中 2 个平板 1 cm² 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 cm²,再乘其稀释倍数作报告。

1.1.7.8 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,为了缩短数字后面的零数也可用 10 的指数来表示(见表 1“报告方式”栏)。

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 1.6×10 ⁴
2	2 760	295	46	1.6	37 750	38 000 或 3.8×10 ⁴
3	2 890	271	60	2.2	27 100	27 000 或 2.7×10 ⁴
4	150	30	8	2	1 500	1 500 或 1.5×10 ³

表 1 (续)

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			
5	多不可计	1 650	513	—	513 000	510 000 或 5.1×10 ⁵
6	27	11	5	—	270	270 或 2.7×10 ²
7	多不可计	305	12	—	30 500	31 000 或 3.1×10 ⁴

2 总大肠菌群

2.1 多管发酵法

2.1.1 范围

本标准规定了用多管发酵法测定生活饮用水及其水源水中的总大肠菌群。

本法适用于生活饮用水及其水源水中总大肠菌群的测定。

2.1.2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1.2.1

总大肠菌群 total coliforms

总大肠菌群指一群在 37℃ 培养 24 h 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。

2.1.3 培养基与试剂

2.1.3.1 乳糖蛋白胨培养液

2.1.3.1.1 成分

A 蛋白胨	10 g
B 牛肉膏	3 g
C 乳糖	5 g
D 氯化钠	5 g
E 溴甲酚紫乙醇溶液(16 g/L)	1 mL
F 蒸馏水	1 000 mL

2.1.3.1.2 制法

将蛋白胨、牛肉膏、乳糖及氯化钠溶于蒸馏水中,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,分装于装有倒管的试管中,68.95 kPa (115℃, 10 lb) 高压灭菌 20 min,贮存于冷暗处备用。

2.1.3.2 二倍浓缩乳糖蛋白胨培养液

按上述乳糖蛋白胨培养液(2.1.3.1),除蒸馏水外,其他成分量加倍。

2.1.3.3 伊红美蓝培养基

2.1.3.3.1 成分

A 蛋白胨	10 g
B 乳糖	10 g
C 磷酸氢二钾	2 g
D 琼脂	20 g~30 g
E 蒸馏水	1 000 mL
F 伊红水溶液(20 g/L)	20 mL

G 美蓝水溶液(5 g/L) 13 mL

2.1.3.3.2 制法

将蛋白胨、磷酸盐和琼脂溶解于蒸馏水中,校正 pH 为 7.2,加入乳糖,混匀后分装,以 68.95 kPa (115℃,10 lb)高压灭菌 20 min。临用时加热融化琼脂,冷至 50℃~55℃,加入伊红和美蓝溶液,混匀,倾注平皿。

2.1.3.4 革兰氏染色液

2.1.3.4.1 结晶紫染色液

A 成分:

- | | |
|------------------|-------|
| a 结晶紫 | 1 g |
| b 乙醇(95%,体积分数) | 20 mL |
| c 草酸铵水溶液(10 g/L) | 80 mL |

B 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。

2.1.3.4.2 革兰氏碘液

A 成分:

- | | |
|-------|--------|
| a 碘 | 1 g |
| b 碘化钾 | 2 g |
| c 蒸馏水 | 300 mL |

B 制法:将碘和碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许,充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水。

2.1.3.4.3 脱色剂

乙醇(95%,体积分数)。

2.1.3.4.4 沙黄复染液

A 成分:

- | | |
|----------------|--------|
| a 沙黄 | 0.25 g |
| b 乙醇(95%,体积分数) | 10 mL |
| c 蒸馏水 | 90 mL |

B 制法:将沙黄溶解于乙醇中,待完全溶解后加入蒸馏水。

2.1.3.4.5 染色法

- 将培养 18 h~24 h 的培养物涂片。
- 将涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染色液,染 1 min,水洗。
- 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。
- 滴加脱色剂,摇动玻片,直至无紫色脱落为止,约 30 s,水洗。
- 滴加复染剂,复染 1 min,水洗,待干,镜检。

2.1.4 仪器

- 2.1.4.1 培养箱:36℃±1℃。
- 2.1.4.2 冰箱:0℃~4℃。
- 2.1.4.3 天平。
- 2.1.4.4 显微镜。
- 2.1.4.5 平皿:直径为 9 cm。
- 2.1.4.6 试管。
- 2.1.4.7 分度吸管:1 mL,10 mL。

2.1.4.8 锥形瓶。

2.1.4.9 小倒管。

2.1.4.10 载玻片。

2.1.5 检验步骤

2.1.5.1 乳糖发酵试验

2.1.5.1.1 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 灭菌生理盐水中,混匀后吸取 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。

2.1.5.1.2 检验水源水时,如污染较严重,应加大稀释度,可接种 1, 0.1, 0.01 mL 甚至 0.1, 0.01, 0.001 mL,每个稀释度接种 5 管,每个水样共接种 15 管。接种 1 mL 以下水样时,必须作 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 灭菌刻度吸管。

2.1.5.1.3 将接种管置 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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阴性,如有产酸产气者,则按下列步骤进行。

2.1.5.2 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 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养箱内培养 18h~24h,观察菌落形态,挑取符合下列特征的菌落作革兰氏染色、镜检和证实试验。

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。

2.1.5.3 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 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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。

2.1.6 结果报告

根据证实为总大肠菌群阳性的管数,查 MPN(most probable number,最可能数)检索表,报告每 100 mL 水样中的总大肠菌群最可能数(MPN)值。5 管法结果见表 2,15 管法结果见表 3。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阴性时,可报告总大肠菌群未检出。

表 2 用 5 份 10 mL 水样时各种阳性和阴性结果组合时的最可能数(MPN)

5 个 10 mL 管中阳性管数	最可能数(MPN)
0	<2.2
1	2.2
2	5.1
3	9.2
4	16.0
5	>16

表 3 总大肠菌群 MPN 检索表

(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)

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	1	0	0	2
0	0	1	2	1	0	1	4
0	0	2	4	1	0	2	6
0	0	3	5	1	0	3	8
0	0	4	7	1	0	4	10
0	0	5	9	1	0	5	12
0	1	0	2	1	1	0	4
0	1	1	4	1	1	1	6
0	1	2	6	1	1	2	8
0	1	3	7	1	1	3	10
0	1	4	9	1	1	4	12
0	1	5	11	1	1	5	14
0	2	0	4	1	2	0	6
0	2	1	6	1	2	1	8
0	2	2	7	1	2	2	10
0	2	3	9	1	2	3	12
0	2	4	11	1	2	4	15
0	2	5	13	1	2	5	17
0	3	0	6	1	3	0	8
0	3	1	7	1	3	1	10
0	3	2	9	1	3	2	12
0	3	3	11	1	3	3	15
0	3	4	13	1	3	4	17
0	3	5	15	1	3	5	19
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

表 3 (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	0	0	5	3	0	0	8
2	0	1	7	3	0	1	11
2	0	2	9	3	0	2	13
2	0	3	12	3	0	3	16
2	0	4	14	3	0	4	20
2	0	5	16	3	0	5	23
2	1	0	7	3	1	0	11
2	1	1	9	3	1	1	14
2	1	2	12	3	1	2	17
2	1	3	14	3	1	3	20
2	1	4	17	3	1	4	23
2	1	5	19	3	1	5	27
2	2	0	9	3	2	0	14
2	2	1	12	3	2	1	17
2	2	2	14	3	2	2	20
2	2	3	17	3	2	3	24
2	2	4	19	3	2	4	27
2	2	5	22	3	2	5	31
2	3	0	12	3	3	0	17
2	3	1	14	3	3	1	21
2	3	2	17	3	3	2	24
2	3	3	20	3	3	3	28
2	3	4	22	3	3	4	32
2	3	5	25	3	3	5	36
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

表 3 (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	0	0	13	5	0	0	23
4	0	1	17	5	0	1	31
4	0	2	21	5	0	2	43
4	0	3	25	5	0	3	58
4	0	4	30	5	0	4	76
4	0	5	36	5	0	5	95
4	1	0	17	5	1	0	33
4	1	1	21	5	1	1	46
4	1	2	26	5	1	2	63
4	1	3	31	5	1	3	84
4	1	4	36	5	1	4	110
4	1	5	42	5	1	5	130
4	2	0	22	5	2	0	49
4	2	1	26	5	2	1	70
4	2	2	32	5	2	2	94
4	2	3	38	5	2	3	120
4	2	4	44	5	2	4	150
4	2	5	50	5	2	5	180
4	3	0	27	5	3	0	79
4	3	1	33	5	3	1	110
4	3	2	39	5	3	2	140
4	3	3	45	5	3	3	180
4	3	4	52	5	3	4	210
4	3	5	59	5	3	5	250
4	4	0	34	5	4	0	130
4	4	1	40	5	4	1	170
4	4	2	47	5	4	2	220
4	4	3	54	5	4	3	280
4	4	4	62	5	4	4	350
4	4	5	69	5	4	5	430
4	5	0	41	5	5	0	240
4	5	1	48	5	5	1	350
4	5	2	56	5	5	2	540
4	5	3	64	5	5	3	920
4	5	4	72	5	5	4	1 600
4	5	5	81	5	5	5	>1 600

2.2 滤膜法

2.2.1 范围

本标准规定了用滤膜法测定生活饮用水及其水源水中的总大肠菌群。

本法适用于生活饮用水及其水源水中总大肠菌群的测定。

2.2.2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.2.2.1

总大肠菌群滤膜法 **membrane filter technique for total coliforms**

总大肠菌群滤膜法是指用孔径为 0.45 μm 的微孔滤膜过滤水样,将滤膜贴在添加乳糖的选择性培养基上 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,能形成特征性菌落的需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽胞杆菌以检测水中总大肠菌群的方法。

2.2.3 培养基与试剂

2.2.3.1 品红亚硫酸钠培养基

2.2.3.1.1 成分

A 蛋白胨	10 g
B 酵母浸膏	5 g
C 牛肉膏	5 g
D 乳糖	10 g
E 琼脂	15 g~20 g
F 磷酸氢二钾	3.5 g
G 无水亚硫酸钠	5 g
H 碱性品红乙醇溶液(50 g/L)	20 mL
I 蒸馏水	1 000 mL

2.2.3.1.2 储备培养基的制备

先将琼脂加到 500 mL 蒸馏水中,煮沸溶解,于另 500 mL 蒸馏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,补足蒸馏水至 1 000 mL,混匀后调 pH 为 7.2~7.4,再加入乳糖,分装,68.95 kPa (115 $^{\circ}\text{C}$, 10 lb) 高压灭菌 20 min,储存于冷暗处备用。

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,再将滤膜置于培养垫上培养。

2.2.3.1.3 平皿培养基的配制

将上法制备的储备培养基加热融化,用灭菌吸管按比例吸取一定量的 50 g/L 的碱性品红乙醇溶液置于灭菌空试管中,再按比例称取所需的无水亚硫酸钠置于另一灭菌试管中,加灭菌水少许,使其溶解后,置沸水浴中煮沸 10 min 以灭菌。

用灭菌吸管吸取已灭菌的亚硫酸钠溶液,滴加于碱性品红乙醇溶液至深红色退成淡粉色为止,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),立即将此培养基 15 mL 倾入已灭菌的空平皿内。待冷却凝固后置冰箱内备用。此种已制成的培养基于冰箱内保存不宜超过两周。如培养基已由淡粉色变成深红色,则不能再用。

2.2.3.2 乳糖蛋白胨培养液

同 2.1.3.1。

2.2.4 仪器

2.2.4.1 滤器。

2.2.4.2 滤膜,孔径 0.45 μm 。

2.2.4.3 抽滤设备。

2.2.4.4 无齿镊子。

2.2.4.5 其他仪器同多管发酵法 2.1.4。

2.2.5 检验步骤

2.2.5.1 准备工作

2.2.5.1.1 滤膜灭菌:将滤膜放入烧杯中,加入蒸馏水,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水洗涤 2 次~3 次,以除去残留溶剂。

2.2.5.1.2 滤器灭菌:用点燃的酒精棉球火焰灭菌。也可用蒸汽灭菌器 103.43 kPa (121°C, 15 lb) 高压灭菌 20 min。

2.2.5.2 过滤水样

用无菌镊子夹取灭菌滤膜边缘部分,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 -5.07×10^4 Pa(负 0.5 大气压)下抽滤。

2.2.5.3 培养

水样滤完后,再抽气约 5 s,关上滤器阀门,取下滤器,用灭菌镊子夹取滤膜边缘部分,移放在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 37°C 恒温箱内培养 24 h \pm 2 h。

2.2.6 结果观察与报告

2.2.6.1 挑取符合下列特征菌落进行革兰氏染色、镜检:

紫红色、具有金属光泽的菌落;

深红色、不带或略带金属光泽的菌落;

淡红色、中心色较深的菌落。

2.2.6.1.1 凡革兰氏染色为阴性的无芽胞杆菌,再接种乳糖蛋白胨培养液,于 37°C 培养 24h,有产酸产气者,则判定为总大肠菌群阳性。

2.2.6.1.2 按式(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数(CFU/100 mL)报告之。

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

2.3 酶底物法

2.3.1 范围

本标准规定了用酶底物法测定生活饮用水及其水源水中的总大肠菌群。

本法适用于生活饮用水及其水源水中总大肠菌群的检测。

本法可在 24 h 判断水样中是否含有总大肠菌群及含有的总大肠菌群的最可能数(MPN)。

本法可同时检测大肠埃希氏菌,见大肠埃希氏菌检测(4.3)。

2.3.2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.3.2.1

总大肠菌群酶底物法 enzyme substrate technique for total coliforms

总大肠菌群酶底物法是指在选择性培养基上能产生 β -半乳糖苷酶(β -D-galactosidase)的细菌群组,该细菌群组能分解色原底物释放出原色使培养基呈现颜色变化,以此技术来检测水中总大肠菌群的方法。

2.3.3 培养基与试剂

2.3.3.1 培养基

在本标准中酶底物法采用固定底物技术(Defined Substrate Technology, DST),本方法采用 Minimal Medium ONPG-MUG (MMO-MUG)培养基,可选用市售商品化制品。每 1 000 mL MMO-MUG

培养基所含基本成分为:

A 硫酸铵 [(NH ₄) ₂ SO ₄]	5.0 g
B 硫酸锰 (MnSO ₄)	0.5 mg
C 硫酸锌 (ZnSO ₄)	0.5 mg
D 硫酸镁 (MgSO ₄)	100 mg
E 氯化钠 (NaCl)	10 g
F 氯化钙 (CaCl ₂)	50 mg
G 亚硫酸钠 (Na ₂ SO ₃)	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

2.3.3.2 生理盐水

8.5 g/L 的生理盐水,用于稀释样品。

成分:氯化钠 8.5 g
蒸馏水加至 1 000 mL

溶解后,分装到稀释瓶内,每瓶 90 mL,103.43 kPa (121℃,15 lb)20 min 高压灭菌。

2.3.4 仪器设备

2.3.4.1 量筒:100 mL、500 mL、1 000 mL。

2.3.4.2 吸管:1 mL、5 mL 及 10 mL 的无菌玻璃吸管或塑料一次性吸管。

2.3.4.3 稀释瓶:100 mL、250 mL、500 mL 及 1 000 mL 能耐高压的灭菌玻璃瓶。

2.3.4.4 试管:可高压灭菌的玻璃或塑料试管,大小约 15 mm×10 cm。

2.3.4.5 培养箱:36℃±1℃。

2.3.4.6 高压蒸汽灭菌器。

2.3.4.7 干热灭菌器(烤箱)。

2.3.4.8 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。

2.3.4.9 程控定量封口机:用于 51 孔或 97 孔法(MPN 法,最可能数法)定量盘的封口。

2.3.5 检验步骤

2.3.5.1 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 灭菌生理盐水中,必要时可加大稀释度。

2.3.5.2 定性反应

用 100 mL 的无菌稀释瓶量取 100 mL 水样,加入 2.7 g±0.5 g MMO-MUG 培养基粉末,混摇均匀使之完全溶解后,放入 36℃±1℃ 的培养箱内培养 24 h。

2.3.5.3 10 管法

2.3.5.3.1 用 100 mL 的无菌稀释瓶量取 100 mL 水样,加入 2.7 g±0.5 g MMO-MUG 培养基粉末,混摇均匀使之完全溶解。

2.3.5.3.2 准备 10 支 15 mm×10 cm 或适当大小的灭菌试管,用无菌吸管分别从前述稀释瓶中吸取 10 mL 水样至各试管中,放入 36℃±1℃ 的培养箱中培养 24 h。

2.3.5.4 51 孔定量盘法

2.3.5.4.1 用 100 mL 的无菌稀释瓶量取 100 mL 水样,加入 2.7 g±0.5 g MMO-MUG 培养基粉末,

混摇均匀使之完全溶解。

2.3.5.4.2 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以赶除孔穴内气泡,然后用程控定量封口机封口。放入 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养 24 h。

2.3.6 结果报告

2.3.6.1 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。

2.3.6.2 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,表示水中含有总大肠菌群。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。

2.3.6.3 10 管法

2.3.6.3.1 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。

2.3.6.3.2 计算有黄色反应的试管数,对照表 4 查出其代表的总大肠菌群最可能数(MPN)。结果以 MPN/100 mL 表示。如所有管未产生黄色,则可报告为总大肠菌群未检出。

表 4 10 管法不同阳性结果的最可能数(MPN)及 95%可信范围

阳性试管数	总大肠菌群 (MPN/100 mL)	95%可信范围	
		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
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	—

2.3.6.4 51 孔定量盘法

2.3.6.4.1 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。

2.3.6.4.2 计算有黄色反应的孔穴数,对照表 5 查出其代表的总大肠菌群最可能数(MPN)。结果以 MPN/100 mL 表示。如所有孔未产生黄色,则可报告为总大肠菌群未检出。

表 5 51 孔定量盘法不同阳性结果的最可能数(MPN)及 95%可信范围

阳 性 数	总大肠菌群/ (MPN/100 mL)	95%可信范围	
		下 限	上 限
0	<1	0.0	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
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

表 5 (续)

阳 性 数	总大肠菌群/ (MPN/100 mL)	95%可信范围	
		下 限	上 限
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	—

3 耐热大肠菌群

3.1 多管发酵法

3.1.1 范围

本标准规定了用多管发酵法测定生活饮用水及其水源水中的耐热大肠菌群。

本法适用于生活饮用水及其水源水中耐热大肠菌群的测定。

3.1.2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1.2.1

耐热大肠菌群 *thermotolerant coliform bacteria*

用提高培养温度的方法将自然环境中的大肠菌群与粪便中的大肠菌群区分开,在 44.5℃ 仍能生长的大肠菌群,称为耐热大肠菌群。

3.1.3 培养基与试剂

3.1.3.1 EC 培养基

3.1.3.1.1 成分:

A 胰蛋白胨	20 g
B 乳糖	5 g
C 3 号胆盐或混合胆盐	1.5 g
D 磷酸氢二钾	4 g

E 磷酸二氢钾	1.5 g
F 氯化钠	5 g
G 蒸馏水	1 000 mL

3.1.3.1.2 制法:将上述成分溶解于蒸馏水中,分装到带有倒管的试管中,68.95 kPa (115℃,10 lb)高压灭菌 20 min,最终 pH 为 6.9 ± 0.2 。

3.1.3.2 伊红美蓝琼脂

同 2.1.3.3。

3.1.4 仪器

3.1.4.1 恒温水浴: $44.5^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 或隔水式恒温培养箱。

3.1.4.2 其他同总大肠菌群多管发酵法(2.1.4.1~2.1.4.9)。

3.1.5 检验步骤

3.1.5.1 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°C 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 $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$,如所有管均不产气,则可报告为阴性,如有产气者,则转种于伊红美蓝琼脂平板上,置 44.5°C 培养 $18 \text{ h} \sim 24 \text{ h}$,凡平板上有典型菌落者,则证实为耐热大肠菌群阳性。

3.1.5.2 如检测未经氯化消毒的水,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,可用直接多管耐热大肠菌群方法,即在第一步乳糖发酵试验时按总大肠菌群 2.1.5.1 接种乳糖蛋白胨培养液在 $44.5^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 水浴中培养,以下步骤同 3.1.5.1。

3.1.6 结果报告

根据证实为耐热大肠菌群的阳性管数,查最可能数(MPN)检索表,报告每 100 mL 水样中耐热大肠菌群的最可能数(MPN)值。

3.2 滤膜法

3.2.1 范围

本标准规定了用滤膜法测定生活饮用水及低浊度水源水中的耐热大肠菌群。

本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。

3.2.2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.2.2.1

耐热大肠菌群滤膜法 membrane filter technique for thermotolerant coliform bacteria

耐热大肠菌群滤膜法是指用孔径为 $0.45 \mu\text{m}$ 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°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。

3.2.3 培养基与试剂

3.2.3.1 MFC 培养基

3.2.3.1.1 成分

A 胰胨	10 g
B 多胨	5 g
C 酵母浸膏	3 g
D 氯化钠	5 g
E 乳糖	12.5 g
F 3 号胆盐或混合胆盐	1.5 g
G 琼脂	15 g
H 苯胺蓝	0.2 g
I 蒸馏水	1 000 mL

3.2.3.1.2 制法

在1 000 mL蒸馏水中先加入玫红酸(10 g/L)的0.2 mol/L氢氧化钠溶液10 mL,混匀后,取500 mL加入琼脂煮沸溶解,于另外500 mL蒸馏水中,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℃左右,制成平板,不可高压灭菌。

制好的培养基应存放于2℃~10℃,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,再将滤膜置于培养垫上培养。

3.2.3.2 EC培养基

同3.1.3.1。

3.2.4 仪器

3.2.4.1 隔水式恒温培养箱或恒温水浴。

3.2.4.2 玻璃或塑料培养皿:60 mm×15 mm或50 mm×12 mm。

3.2.4.3 其他仪器同2.2.4。

3.2.5 检验步骤

3.2.5.1 准备工作 同2.2.5.1。

3.2.5.2 过滤水样 同2.2.5.2。

3.2.5.3 培养:水样滤完后,再抽气约5 s,关上滤器阀门,取下滤器,用灭菌镊子夹取滤膜边缘部分,移放在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,放入44.5℃隔水式培养箱内培养24 h±2 h。如使用恒温水浴,则需用塑料平皿,将皿盖紧,或用防水胶带贴封每个平皿,将培养皿成叠封入塑料袋内,浸到44.5℃恒温水浴里,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。

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

3.2.6 结果报告

计数被证实的耐热大肠菌落数,水中耐热大肠菌群数系以100 mL水样中耐热大肠菌群菌落形成单位(CFU)表示,见式(2)。

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

4 大肠埃希氏菌

4.1 多管发酵法

4.1.1 范围

本标准规定了用多管发酵法测定生活饮用水及其水源水中的大肠埃希氏菌。

本法适用于生活饮用水及其水源水中大肠埃希氏菌的测定。

4.1.2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

4.1.2.1

大肠埃希氏菌多管发酵法 multiple tube fermentation technique for *Escherichia coli*

大肠埃希氏菌多管发酵法是指多管发酵法总大肠菌群阳性,在含有荧光底物的培养基上44.5℃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,使培养基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。

4.1.3 培养基与试剂

4.1.3.1 EC-MUG培养基

4.1.3.1.1 成分

A 胰蛋白胨	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

4.1.3.1.2 制法

将干燥成分加入水中,充分混匀,加热溶解,在 366 nm 紫外光下检查无自发荧光后分装于试管中,68.95 kPa (115 $^{\circ}$ C, 10 lb)高压灭菌 20 min,最终 pH 为 6.9 \pm 0.2。

4.1.4 仪器

4.1.4.1 紫外光灯:6 W、波长 366 nm 的紫外灯,用于观测荧光反应。

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

4.1.4.3 天平。

4.1.4.4 平皿:直径为 9 cm。

4.1.4.5 试管。

4.1.4.6 分度吸管:1 mL,10 mL。

4.1.4.7 锥形瓶。

4.1.4.8 小倒管。

4.1.4.9 金属接种环。

4.1.4.10 冰箱:0 $^{\circ}$ C \sim 4 $^{\circ}$ C。

4.1.5 检验步骤

4.1.5.1 接种

将总大肠菌群多管发酵法初发酵产酸或产气的管进行大肠埃希氏菌检测。用烧灼灭菌的金属接种环或无菌棉签将上述试管中液体接种到 EC-MUG 管中。

4.1.5.2 培养

将已接种的 EC-MUG 管在培养箱或恒温水浴中 44.5 $^{\circ}$ C \pm 0.5 $^{\circ}$ C 培养 24 h \pm 2 h。如使用恒温水浴,在接种后 30 min 内进行培养,使水浴的液面超过 EC-MUG 管的液面。

4.1.6 结果观察与报告

将培养后的 EC-MUG 管在暗处用波长为 366 nm 功率为 6 W 的紫外光灯照射,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 阳性管数,查对应的最可能数(MPN)表得出大肠埃希氏菌的最可能数,结果以 MPN/100 mL 报告。

4.2 滤膜法

4.2.1 范围

本标准规定了用滤膜法测定生活饮用水及其水源水中的大肠埃希氏菌。

本法适用于生活饮用水及其水源水中大肠埃希氏菌的测定。

4.2.2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

4.2.2.1

大肠埃希氏菌滤膜法 **membrane filter technique for *Escherichia coli***

用滤膜法检测水样后,将总大肠菌群阳性的滤膜在含有荧光底物的培养基上培养,能产生 β -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。

4.2.3 培养基与试剂

4.2.3.1 MUG 营养琼脂培养基(NA-MUG)

4.2.3.1.1 成分

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- β -D-葡萄糖醛酸苷(MUG)	0.1 g
E 蒸馏水	1 000 mL

4.2.3.1.2 制法

将干燥成分加入水中,充分混匀,加热溶解,103.43 kPa (121 $^{\circ}$ C, 15 lb)高压灭菌 15 min,最终 pH 为 6.8 \pm 0.2。在无菌操作条件下倾倒入直径 50 mm 平板备用。倾倒入好的平板在 4 $^{\circ}$ C 条件下可保存两个星期。

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,再将滤膜置于培养垫上培养。

4.2.4 仪器

4.2.4.1 紫外光灯:6 W、波长 366 nm 的紫外灯,用于观测荧光反应。

4.2.4.2 其他仪器同 2.2.4。

4.2.5 检验步骤

4.2.5.1 接种

将总大肠菌群滤膜法有典型菌落生长的滤膜进行大肠埃希氏菌检测。在无菌操作条件下将滤膜转移到 NA-MUG 平板上,细菌截留面朝上,进行培养。

4.2.5.2 培养

将已接种的 NA-MUG 平板 36 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C 培养 4h。

4.2.6 结果观察与报告

将培养后的 NA-MUG 平板在暗处用波长为 366 nm 功率为 6W 的紫外光灯照射,如果菌落边缘或菌落背面有蓝色荧光产生则表示水样中含有大肠埃希氏菌。

记录有蓝色荧光产生的菌落数并报告,报告格式同总大肠菌群滤膜法格式。

4.3 酶底物法

4.3.1 范围

本标准规定了用酶底物法测定生活饮用水及其水源水中的大肠埃希氏菌。

本法适用于生活饮用水及其水源水中大肠埃希氏菌的检测。

本法可在 24 h 判断水样中是否含有大肠埃希氏菌及含有的大肠埃希氏菌的最可能数(MPN)值。

本法可同时检测总大肠菌群,方法见 2.3。

4.3.2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

4.3.2.1

大肠埃希氏菌酶底物法 enzyme substrate technique for *Escherichia coli*

在选择性培养基上能产生 β -半乳糖苷酶(β -D-galactosidase)分解色原底物释放出有色原体使培养基呈现颜色变化,并能产生 β -葡萄糖醛酸酶(β -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为大肠埃希氏菌酶底物法。

4.3.3 培养基与试剂

培养基与试剂同 2.3.3。

4.3.4 仪器设备

4.3.4.1 紫外光灯:6 W、波长 366 nm 的紫外灯,用于观测荧光反应。

4.3.4.2 其他仪器同 2.3.4。

4.3.5 检验步骤

检验步骤同 2.3.5。

4.3.6 结果观察与报告

4.3.6.1 结果判读

结果判读同 2.3.6.1,对照表同表 4 与表 5。水样变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。

4.3.6.2 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 的紫外光灯照射,如果有蓝色荧光产生判断为阳性反应,表示水中含有大肠埃希氏菌。水样未产生蓝色荧光判断为阴性反应。结果以大肠埃希氏菌检出或未检出报告。

4.3.6.3 10 管法

4.3.6.3.1 将培养 24 h 颜色变成黄色的水样的试管在暗处用波长为 366 nm 的紫外光灯照射,如果有蓝色荧光产生则表示有大肠埃希氏菌存在。

4.3.6.3.2 计算有荧光反应的试管数,对照表 4 查出其代表的大肠埃希氏菌最可能数。结果以 MPN/100 mL 表示。如所有管未产生荧光,则可报告为大肠埃希氏菌未检出。

4.3.6.4 51 孔定量盘法

4.3.6.4.1 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 的紫外光灯照射,如果有蓝色的荧光产生则表示该定量盘孔穴中含有大肠埃希氏菌。

4.3.6.4.2 计算有荧光反应的孔穴数,对照表 5 查出其代表的大肠埃希氏菌最可能数。结果以 MPN/100 mL 表示。如所有孔未产生荧光,则可报告为大肠埃希氏菌未检出。

5 贾第鞭毛虫

5.1 免疫磁分离荧光抗体法

5.1.1 范围

本标准规定了用免疫磁分离荧光抗体法测定生活饮用水及其水源水中的贾第鞭毛虫孢囊和隐孢子虫卵囊。

本法适用于生活饮用水及水源水中贾第鞭毛虫孢囊和隐孢子虫卵囊的测定。

5.1.2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

5.1.2.1

贾第鞭毛虫 giardia

一种可能在水中或其他介质中发现的原虫类寄生虫。有两个种,它们的宿主是:*G. intestinalis* (人类)和 *G. muris* (鼠类)。

5.1.2.2

隐孢子虫 cryptosporidium

一种可能在水中或其他介质中发现的原虫类寄生虫,有 6 个种,且它们可能的宿主是:*C. parvum*

(哺乳类动物,包括人类);*C. boileyi*和*C. meleagridis*(鸟类);*C. muris*(鼠类);*C. serpeatis*(爬行类)和*C. nasorum*(鱼类)。

5.1.3 器材与试剂

5.1.3.1 采样器材

5.1.3.1.1 Envirochek 方法

- A 蠕动泵;
- B 泵管;
- C Envirocheck 滤囊(醚砜滤膜,有效过滤面积 1 300 cm²,孔径 1.0 μm);
- D 夹子;
- E 水表;
- F 流量控制阀;
- G 过滤管;
- H 塑料连接。

5.1.3.1.2 Filta-Max 方法

- A Filta-Max 滤芯:压缩后的多孔海绵滤膜模块(共 60 层多孔海绵滤膜从 600 mm 压缩到 30 mm,其中单层多孔海绵滤膜厚 10 mm,外径 55 mm,内径 18 mm);
- B Filta-Max 滤器:带进出水样口及配套软管和辅助工具的 Filta-Max 滤器;
- C 合适的压力泵(导流泵,蠕动泵等);
- D 泵管;
- E 夹子;
- F 水表;
- G 流量控制阀(1 L/min~4 L/min)。

5.1.3.1.3 Filta-Max Xpress 快速方法

- A Filta-Max Xpress 快速滤芯;
- B Filta-MaXpress 滤器:带进出水样口及配套软管和辅助工具的 Filta-Max Xpress 滤器;
- C 合适的压力泵(导流泵,蠕动泵);
- D 泵管;
- E 夹子;
- F 水表;
- G 流量控制阀(1 L/min~4 L/min)。

5.1.3.2 淘洗/浓缩/纯化器材

5.1.3.2.1 Envirochek 方法

- A 过滤夹:带臂水平振荡装置,臂有垂直安装的过滤夹,最大频率 600 r/min;
- B 175 mL 锥形离心管;
- C 离心机:容量 175 mL 刻度锥形离心管和能达到 1 500 g 的加速度的离心机;
- D 旋涡搅拌器;
- E 塑料吸耳球;
- F 10 mL 移液管;
- G 50 mL 移液管;
- H 100 mL 有刻度的量筒;
- I 一侧平面试管,125 mm×16 mm,带管塞,一侧为 60 mm×10 mm 平面;

- J 用于一侧平面试管的磁颗粒浓缩器(MPC-M);
- K 锥形具塞 5 mL 微量离心管;
- L 巴斯德移液管。

5.1.3.2.2 Filta-Max 方法

- A 手动或自动 Filta-Max 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 手动真空泵;
- C 磁力搅拌器和搅拌棒;
- D 滤膜(3.0 μm),直径 73 mm。

5.1.3.2.3 Filta-Max Xpress 快速法

- A Filta-Max Xpress 快速淘洗装置;
- B 空气压缩机,至少 0.4 MPa 以上压力,15 L 压缩空气;
- C 容量 500 mL 刻度锥形离心管和能达到 2 000 g 加速度的离心机;
- D 500 mL 锥形离心管;
- E 蠕动泵。

5.1.3.3 染色器材

- 5.1.3.3.1 三通真空泵。
- 5.1.3.3.2 湿度孵化盒。
- 5.1.3.3.3 显微镜玻璃井形载玻片(井的直径为 9 mm),容积 100 μL 。
- 5.1.3.3.4 玻璃盖玻片。
- 5.1.3.3.5 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱。
- 5.1.3.3.6 荧光显微镜。
- 5.1.3.3.7 450 nm~480 nm 的蓝色滤光片。
- 5.1.3.3.8 330 nm~385 nm 的紫外光滤光片。
- 5.1.3.3.9 20 倍、40 倍、100 倍的目镜。
- 5.1.3.3.10 测微计。
- 5.1.3.3.11 5 μL ~20 μL 的可调微量移液管。
- 5.1.3.3.12 20 μL ~200 μL 的可调微量移液管。
- 5.1.3.3.13 200 μL ~1000 μL 的可调微量移液管。
- 5.1.3.4 接种器材
- 5.1.3.4.1 小口塑料瓶(20 L)。
- 5.1.3.4.2 Mallasez 或修改的 Neubauer 血球计数器。

所有玻璃器皿和塑料管都必须在使用后及洗涤前经高压消毒。用热的浓洗涤剂溶液清洁器材,然后将它们放到浓度最小为 50 g/L 的次氯酸钠溶液中,至少在室温浸泡 30 min。用蒸馏水冲洗器材,然后将其放到没有卵囊的环境中干燥。尽可能使用一次性物品。

5.1.3.5 试剂

- 5.1.3.5.1 超纯水。
- 5.1.3.5.2 150 mmol/L PBS 溶液(磷酸缓冲盐)。

A 成分:

NaCl	8.5 g
Na ₂ HPO ₄	1.07 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0.39 g
加超纯水到	1 000 mL

- B 制法:用盐酸或氢氧化钠将 pH 调到 7.2 \pm 0.1,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 可储存 1 个星期。

5.1.3.5.3 贾第鞭毛虫/隐孢子虫免疫磁分离 (IMS) 试剂盒。

- 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 10 SL 缓冲液 A (15 mL), 透明无色；
- D 10 SLTM 缓冲液 B (10 mL), 品红色。

将免疫磁分离(IMS)试剂盒, 4℃ 储存。

5.1.3.5.4 免疫荧光试剂盒。

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 (5mL), 于 4℃ 储存。

5.1.3.5.5 封固剂: 2% DABCO/甘油。

A 成分:

甘油 / PBS 缓冲盐溶液 (60%/40%)	100 mL
DABCO	2 g

B 保存: 室温条件下储存 12 个月。

5.1.3.5.6 1 mol/L Tris, pH 7.4。

在 1 000 mL 超纯水中溶解 132.2 g 的 Tris 盐酸; 然后再加 19.4 g 的 Tris 碱。用盐酸或氢氧化钠溶液将 pH 调到 7.4±0.1。用孔径 0.2 μm 的滤膜将它过滤灭菌后, 移到一个无菌的塑料容器中。室温条件下储存 6 个月。

5.1.3.5.7 0.5 mol/L Na₂-EDTA, pH 8.0。

将 37.22 g 乙二胺四乙酸二钠盐二水化合物 (Na₂-EDTA) 溶解到 200 mL 的超纯水中, 然后用盐酸或氢氧化钠溶液将 pH 调到 8.0±0.1, 室温条件下储存 6 个月。

5.1.3.5.8 淘洗缓冲液。

A Envirochek 淘洗缓冲液:

月桂醇聚醚-12(Laureth-12)	4 g
1 mol/L Tris, pH 7.4	40 mL
0.5 mol/L Na ₂ -EDTA, pH 8.0	8 mL
A 型止泡剂	600 μL
加超纯水到	4 000 mL

称取 1 g 月桂醇聚醚-12 到玻璃烧杯中, 然后加 100 mL 超纯水。用电炉或微波炉将烧杯加热, 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。用超纯水将烧杯冲洗几次, 确保所有的洗涤剂都转移到量筒中。加 10 mL pH 为 7.4 的 Tris 溶液; 2 mL pH 为 8.0 的 Na₂-EDTA 溶液和 150 μL A 型止泡剂。最后用超纯水稀释到 1 000 mL。室温条件下储存 1 个月。

B Filta-Max 淘洗缓冲液 (PBST 缓冲液):

Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
KCl	0.2 g
NaCl	8 g
非离子表面活性剂 Tween-20	0.1 mL
超纯水	900 mL

将 1.44 g 磷酸氢二钠、0.24 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾及 8 g 氯化钠加入 900 mL 超纯水, 搅拌 20 min 至完全溶解, 加入 0.1 mL 非离子表面活性剂 Tween-20 并继续搅拌 10 min, 然后用超纯水稀释至 1 000 mL。

C Filta-Max Xpress 快速法淘洗缓冲液 (PETT 缓冲液):

焦磷酸四钠 (Sodium pyrophosphate tetra-basic decahydrate)	0.2 g
--	-------

EDTA 柠檬酸三钠(EDTA tri-sodium salt)	0.3 g
Tris-HCl(1 mol/L)	10 mL
Tween-80	0.1 mL

将 0.2 g 焦磷酸四钠和 0.3 g EDTA 柠檬酸三钠加入 900 mL 超纯水,搅拌 10 min 使之完全混合。然后加入 10 mL 1.0 mol/L Tris-HCl 并搅拌 5 min 使之混合。再加入 0.1 mL Tween-80 并搅拌 10 min 混合 (Tween-80 粘度高,吸取时务必注意)。最后用超纯水稀释至 1 000 mL,并调节 pH 至 7.4 ± 0.2 。

5.1.3.5.9 0.1 mol/L 盐酸溶液。

5.1.3.5.10 1 mol/L 氢氧化钠溶液。

5.1.3.5.11 纯甲醇。

5.1.3.5.12 DAPI 储存溶液:在一个含有 1 mg 4',6-二氨基-2-苯基吲哚(DAPI)的烧瓶中,注入 500 μ L 的纯甲醇 (2mg/L)。4 $^{\circ}$ C 暗处储存 15 天。

5.1.3.5.13 DAPI 染色溶液:用 50 mL PBS 稀释 10 μ L DAPI 母液。每日配制并将它储存在暗的 4 $^{\circ}$ C 环境中。

5.1.3.5.14 50 g/L 的次氯酸钠溶液。

5.1.3.5.15 碱性洗涤剂。

5.1.3.5.16 纯的 *Giardia lamblia* 孢囊:浓度为 100 个孢囊/mL,能在 4 $^{\circ}$ C 储存 2 个月。

5.1.3.5.17 纯的 *Cryptosporidium parvum* 卵囊:浓度为 100 个卵囊/mL,能在 4 $^{\circ}$ C 储存 2 个月。

注:对于储存了 2 个月以上的卵囊存储液,可以在对其浓度和荧光的强度检查之后继续使用。

5.1.4 分析步骤

5.1.4.1 采样/淘洗/浓缩

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:
体积(L)

原水	20 L
处理水	100 L

5.1.4.1.1 Envirochek 方法

A 采样系统的组成

- 一次性使用的,孔径 1 μ m,褶聚醚砜滤纸的滤囊;
- 压力标定在 0.21 MPa 的控制阀(对于处理水来说是可任意选择的);
- 连接在滤囊出口的水表,能控制过滤水样的体积;
- 流量能达到 2 L/min 的蠕动泵。

B 采样

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

过滤后,要将滤囊放到 4 $^{\circ}$ C 的暗处存放,一般不要超过 72 h。

C 淘洗

- a 取下滤囊进水口的乙烯栓,用量筒加 110 mL 左右的淘洗缓冲液到每个滤囊的外腔中。
- b 将滤囊插到带臂水平振荡器的夹钳上,滤囊的出水阀在 12 点钟的位置。
- c 打开振荡器的开关,将速度设在最大速度的 80%,然后将样本振荡 10 min。
- d 将滤囊中的淘洗液倾注入到 175 mL 的锥形离心管中,再用 110 mL 的淘洗缓冲液将滤囊的外腔再充满。
- e 将过滤器插到振荡器的夹钳上,这次出水阀的位置是它原来位置沿着它的轴方向转 90°角。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入到 175 mL 的锥形离心管中。

D 浓缩

- a 将装有淘洗液样本的 175 mL 离心管置 1 500 g 离心 15 min。自然地减速,以免扰乱沉淀物。
- b 用移液管小心地将上清液吸掉,使上清液刚好到沉淀物的上面为止(不要扰乱沉淀物)。
- c 如果压实的沉淀物体积小于或等于 0.5 mL,就要加试剂水到离心管中,使其总体积为 10 mL。将试管置于旋转式搅拌器 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,就要用式(3)确定在离心管中需要的总体积:

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

以便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,加试剂水到离心管中,使其总体积达到上面计算的水平。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。

5.1.4.1.2 Filita-Max 方法

A 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 将过滤装置连接到需采样的水源。

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。工作压力最大不应超过 0.8 MPa。

注 2: 采样时如使用导流泵、蠕动泵等泵类装置,应安装在过滤装置上游。

注 3: 样品采集可在水源现场或实验室完成。

B 淘洗与浓缩

在淘洗与浓缩过程中,参考生产商的手动或自动淘洗装置使用手册操作。

a 手工淘洗步骤

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。将过滤模块(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,从过滤模块上去除螺栓。再连接上不锈钢虹吸管。向浓缩管注入 600 mL PBST 缓冲液,随后连接到快接头上。将活塞上下活动 20 次,以冲洗解压的过滤模块。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 PBST 缓冲液,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到第二次的淘洗液中。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 PBST 缓冲液,隔着袋子用手轻轻磨擦滤膜。如此,清洗 2 次。将清洗液与浓缩液混合。

b 自动淘洗步骤

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。将过滤模块从支架上取下, 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。按控制面板上的 F1 键, 卸下过滤模块上的螺栓。再连接上不锈钢虹吸管。向浓缩管注入 600 mL PBST 缓冲液, 随后连接到快接头上。按 F1 键开始初次浸润, 然后按 F3 键进行第一次淘洗。拆下浓缩管, 按 F4 键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 PBST 缓冲液, 再连接到洗涤管上。按 F3 键开始淘洗。拆下浓缩管, 按 F4 键以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 μm 滤膜转移到提供的袋子中, 加入 5 mL PBST 缓冲液, 隔着袋子用手轻轻磨擦滤膜。如此, 清洗 2 次。将清洗液与浓缩液混合。

5.1.4.1.3 Filta-Max Xpress 快速方法

A 采样

a 将过滤模块(螺栓头朝下)安装在支架上, 拧紧盖子(盖子即为进样口)。

b 将过滤装置连接到需采样的水源。

注 1: 为使液体流经滤膜需在顶部施加 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。工作压力最大不应超过 0.8 MPa。

注 2: 采样时如使用导流泵、蠕动泵等泵类装置, 应安装在过滤装置上游。

注 3: 样品采集可在水源现场或实验室完成。

注 4: 本方法亦适用于浊度高的水源水的采样。

B 淘洗

采用 Filta-Max Xpress 压力淘洗装置可使淘洗过程全自动完成。详细操作程序参见生产商使用指南。将压力淘洗装置准备就绪, 向缓冲液槽中加入足量的淘洗缓冲液, 利用厂商提供的连接锁合将缓冲液槽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。打开压力淘洗装置后面的封闭阀。

淘洗步骤为:

a 打开压力淘洗器。

b 过滤装置进样口朝上, 移开样品阻留器, 连接出样口分流装置(过滤模块仍在过滤装置内)。

c 将过滤装置倒转, 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 按控制面板的 F1 键, 开始自动淘洗。

f 淘洗结束时, 打开压力淘洗装置。卸下过滤装置, 再拿开出样分流装置, 打开过滤装置, 弃掉过滤模块。

g 将离心瓶盖好, 从样品收集器支架中取出。

C 浓缩

a 将装有淘洗液样本的 500 mL 离心管置 2 000 g 离心 15 min。慢慢地减速, 以免搅起沉淀物。记录沉淀物体积。

注意: 勿用制动器!

b 离心后, 用吸气装置将沉淀物上层 8 mL~10 mL 处的悬浮物小心吸出(吸气装置的真空应小于 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 试剂水冲洗离心瓶两次,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,就要用式(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。

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

加试剂水到离心管中,使其总体积达到上面计算的水平。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。

5.1.4.2 IMS 分离

5.1.4.2.1 试剂制备

A 由 10×SL-A 型缓冲液配制稀释的 1×SL-A 型缓冲液。用试剂水作为稀释剂。每个样品制备 1mL 的 1×SL-A 型缓冲液。

注意:长时间在 0℃~4℃ 储存后,可能会在 10×SL-A 型缓冲液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℃)恒温。

B 加 1 mL 10×SL-A 型缓冲液和 1 mL 10×SL-B 型缓冲液到一侧平面试管中。

5.1.4.2.2 卵囊捕获

A 定量转移 10 mL 水样浓缩物到含有 SL-缓冲液的一侧平面试管中。

B 将抗隐孢子虫抗体和抗贾第鞭毛虫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。

C 在含有水样浓缩物和 SL-缓冲液样品的一侧试管中各加 100 μL 上述悬浮的微粒。

D 将样品试管固定到旋转式的搅拌器上,在大约 25 r/min 的条件下至少旋转 1 h。

E 至少旋转 1 h 后,将试管从搅拌器上取下,然后再将其放在磁粒浓缩器 (MPC-1)上,并将试管有平面的一边朝向磁铁。

F 用手柔和地大约 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。

G 如果让 MPC-1 中的样品静置 10 s 以上,就要在进行下一个步骤之前,重复前一个(即步骤 F)步骤。

H 立即打开顶端的盖,同时将保持在 MPC-1 上的试管中的所有上清液倒到一个适当的容器中。做这一步骤时,不要摇动试管,也不要将试管从 MPC-1 上取下。

I 将试管从 MPC-1 上取下,加 1 mL 1×SL-A 型缓冲液。非常柔和地将试管中的所有物质再悬浮。不要形成漩涡。

J 将样品试管中的所有液体定量转移到有标签的 1.5mL 微量离心管中。

K 将微量离心管放到另一磁粒子浓缩器 (MPC-M)中,MPC-M 在放微量离心管的位置有一根磁条。

L 用手 180°角轻轻地摇动试管。每秒大约摇动一个 180°角的频率,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。

M 立即从留在 MPC-M 上的试管和顶盖中的上清液吸出。如果同时处理一个以上的样品,就要在吸去每个试管的上清液之前,进行 3 个 180°角的摇动或滚动的动作。小心不要扰乱与磁铁邻近管壁上的附着物。不要摇动试管。当进行这些步骤时,不要将试管从 MPC-M 上取下。

5.1.4.2.3 磁珠与孢(卵)囊复合物的分离

A 将磁条从 MPC-M 上取下。

B 加 50μL 0.1 mol/L 的盐酸(HCl)至上述微量离心管中,用涡旋混合 10 s。

C 将试管放在 MPC-M 上,然后让它在室温垂直静止 10 min。

D 用力涡旋 5 s~10 s。

E 保证所有样品都在试管的底部,然后将微量离心管放在 Dynal MPC-M 上。

F 再将磁条放到 MPC-M 上,然后大约 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。

G 准备一个井型载玻片,然后加 5 μL 1 mol/L 的氢氧化钠 (NaOH) 溶液至样本井中。

H 不要将微量离心管从 MPC-M 上取下。将所有样品从 MPC-M 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。

I 重复步骤 A~F,然后将样品转移到相同的井形载玻片上。

5.1.4.3 染色

5.1.4.3.1 将有样品的井形载玻片放到 42°C 的培养箱中,蒸发干。

5.1.4.3.2 在每一含有干样品的井中加一滴(50 μL)纯甲醇,然后让它空干 3 min~5 min。

5.1.4.3.3 用试管准备所需体积(每井 50 μL)的抗隐孢子虫抗体和抗贾第鞭毛虫单克隆抗体异硫氰酸荧光素(FITC)工作稀释液(1/1;Cellabs/PBS)。

5.1.4.3.4 加 50 μL 用上述异硫氰酸荧光素(FITC)单克隆抗体工作稀释液至含样本井中。将载玻片放到湿室中于 37°C 培养 30 min 左右。

5.1.4.3.5 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移液管轻轻地从每个井边吸掉过量的荧光素标记单克隆抗体。

5.1.4.3.6 在每个井中加 70 μL 的 PBS,静置 1 min~2 min 后,吸掉多余的 PBS。

5.1.4.3.7 加 50 μL DAPI 溶液(使用时配制,即加 10 μL 2 mg/mL 溶于纯甲醇中的 DAPI 于 50 mL 的 PBS 中)到每个井中,然后让它在室温静置 2 min 左右。

5.1.4.3.8 吸掉过量的 DAPI 溶液。

5.1.4.3.9 加 70 μL 的 PBS 到每个井中,静置 1 min~2 min 后,吸掉多余的 PBS。

5.1.4.3.10 加 70 μL 的试剂水到每个井中,静置 1 min 后,吸掉多余的试剂水。

5.1.4.3.11 让载玻片在暗处干燥后,加一滴含防荧光减弱的封固剂到每个井的中心。

5.1.4.3.12 在井形载玻片上盖上盖玻片,然后将它存放在干燥的暗盒中,备查。

5.1.4.4 镜检

打开显微镜和汞灯。预热 10 min 后,在 200 倍的荧光显微镜下检查,在 400 倍的荧光显微镜下进一步证实。并将全井进行计数。

贾第鞭毛虫的孢囊是椭圆形的。它们的长度为 8 μm ~14 μm ,宽度为 7 μm ~10 μm 。孢囊壁会发出苹果绿的荧光。在紫外光下,DAPI 阳性孢囊会出现 4 个亮蓝色的核。

隐孢子虫的卵囊为稍微椭圆的圆形。它们的直径为 2 μm ~6 μm 。卵囊壁会发出苹果绿的荧光。在紫外光下,DAPI 阳性卵囊会出现 4 个亮蓝色的核。

计数整个井面,呈现表 6 特征的就是孢(卵)囊。

表 6 贾第鞭毛虫孢囊与隐孢子虫卵囊的特征

标 准	重 要 性	备 注
染了绿色的膜	+++	染色的强度是容易变的
大小	+++	
膜与细胞质的对照	++	膜的荧光强些
形状	++	贾第鞭毛虫:卵圆形 隐孢子虫:球形
孢囊壁的完整性	+	孢囊会失去形状!
注 1: DAPI 染色是为了帮助计数,因为假的孢囊(亮苹果绿物体)呈 DAPI 阴性(无 4 个天蓝色核,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,为真孢囊。 注 2: DIC 装置用于了解孢囊的内在结构,当荧光和 DAPI 两种都不清楚的时候可以使用 DIC 装置。 注 3: 如结构清楚,有助于真孢囊计数,如结构不清楚而只有苹果绿色荧光时,可能是空的孢囊,或带有无定形结构的孢囊,亦可能是有内部结构的孢囊。		

5.1.5 结果的计算、报告和检测限

5.1.5.1 用式(5)报告每升样本中的孢(卵)囊数:

$$Y = (X \times V) / (V_1 \times V_2) \dots\dots\dots(5)$$

式中:

- Y——每升水中孢囊或卵囊的数目;
- X——计数样本的体积中孢囊或卵囊的数目;
- V——离心后再悬浮的体积,单位为毫升(mL);
- V₁——计数样本的体积,单位为毫升(mL);
- V₂——过滤后水的体积,单位为升(L);

5.1.5.2 用式(6)计算分析的检测限:

$$D = V / (V_1 \times V_2) \dots\dots\dots(6)$$

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);
- V₁——计数样本的体积,单位为毫升(mL);
- V₂——过滤后水的体积,单位为升(L)。

5.1.6 质量控制

5.1.6.1 免疫荧光质量控制

免疫荧光试剂盒的控制必须每个星期做一次。它由两个试验组成:一个阳性对照和一个阴性对照。

5.1.6.2 阴性对照

- 5.1.6.2.1 制准备一个井形载玻片。
- 5.1.6.2.2 加 50 μL 蒸馏水,然后将它放在培养箱中干燥。
- 5.1.6.2.3 参照 5.1.4.3 染色。
- 5.1.6.2.4 对整个井面进行计数。

不得找出任何贾第鞭毛虫囊和隐孢子虫的卵囊。

5.1.6.3 阳性对照

- 5.1.6.3.1 制备一个井形载玻片。
- 5.1.6.3.2 涡旋储存的原虫 2 min。
- 5.1.6.3.3 在同一井中掺加 5 μL 贾第鞭毛虫囊和 5 μL 隐孢子虫卵囊阳性样本,然后将它放在培养箱中干燥。
- 5.1.6.3.4 参照 5.1.4.3 染色。
- 5.1.6.3.5 对整个井面进行计数。

必须找到根据表 6 中描述的规则而均匀染色的孢囊和卵囊。

5.1.6.4 整个程序的质量控制

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

5.1.6.4.1 阴性对照

- A 加 20 L 蒸馏水到小口塑料瓶中。
 - B 与样品分析一样分析蒸馏水。
- 不得找到任何贾第鞭毛虫或隐孢子虫。
将所有结果记录在表 7 原虫测定方法质量控制表格中。

5.1.6.4.2 阳性对照

为了做阳性对照,应在 20 L 蒸馏水中掺加已知数量的囊和卵囊。用血球计数器和用染色的井形载

玻片,测定在 20L 蒸馏水中加入的孢囊和卵囊的数量。

A 原虫接种液的计数

- a 涡旋 2 min 储存的原虫。
- b 在一个有 10 mL 蒸馏水的烧杯中加一些孢囊和卵囊,以便得到一个最终浓度大约每 mL 5×10^4 个孢(卵)囊的溶液。
- c 用磁棒搅拌 30 min。
- d 用血球计数器测定这种溶液的浓度 10 次。
- e 用染色的井形载玻片[加大约 250 个孢(卵)囊到井上]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。

B 阳性对照的分析

- a 在装有 10 L 蒸馏水的小口塑料瓶中加 500 个贾第鞭毛虫的孢囊和 500 个隐孢子虫的卵囊。
- b 用滤囊过滤该水。
- c 用 10 L 蒸馏水冲洗小口塑料瓶,然后用同一个滤囊过滤该水。
- d 分析这个样品要象分析一个典型的样品一样。

将所有结果记录在表 7 中。这种方法的回收率为 10%~100%之间。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。

5.1.6.5 免疫荧光质量控制记录

原虫测定方法质量控制记录到表 7 中。

表 7 原虫测定方法质量控制表格

日期	操作人员	阴性对照	阳性对照	批号

操作质量控制记录

日期：

阴性对照：

过滤体积：

免疫磁分离试剂盒批号：

荧光抗体试剂盒批号：

结果：

操作人员：

阳性对照：

过滤体积：

免疫磁分离试剂盒批号：

荧光抗体试剂盒批号：

贾第鞭毛虫孢囊的数量：

隐孢子虫卵囊的数量：

血球计数器			井形载玻片		
序号	隐孢子虫	贾第鞭毛虫	序号	隐孢子虫	贾第鞭毛虫
1			1		
2			2		
3			3		
4			4		
5			5		
6					
7					
8					
9					
10					

平均	
标准差	
结果	

隐孢子虫回收率

贾第鞭毛虫回收率

结论

6 隐孢子虫

见第5章。