

微生物学实验教程系列

资源与环境 微生物学实验教程

杨金水 主 编 袁红莉 主 审

RESOURCES AND
ENVIRONMENTAL
MICROBIOLOGY EXPERIMENTATION



科学出版社

微生物学实验教程系列

资源与环境微生物学实验教程

主 编 杨金水
副主编 屈建航
主 审 袁红莉



X172-33

11

科学出版社

北 京



北航

C1720612

内 容 简 介

环境安全关乎人类生存与健康,资源与环境微生物学实验是高校一门重要专业课程。本书在科学出版社的组织和中国农业大学的支持下,由多所院校一线教师集体编写而成。全书以微生物在水体、土壤、大气、难降解化合物、环境质量监测及环境领域中的基础理论及实际应用方面的重要作用为主,设置了29个实验,注重实用性和先进性,以拓展学生对微生物学在工、农、环保等领域应用的认识,提高综合能力。

本书可作为农林院校、综合性大学、师范院校的生命科学相关专业、环境科学与工程及其他相关专业的本科生和研究生的教材或教学参考书使用,也可供相关专业的教师和研究人員参考。

图书在版编目(CIP)数据

资源与环境微生物学实验教程 / 杨金水主编. —北京:科学出版社, 2014.4

微生物学实验教程系列

ISBN 978-7-03-039901-4

I. ①资… II. ①杨… III. ①环境微生物学-实验-高等学校-教材
IV. ①X172-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第038620号

责任编辑:刘 畅 / 责任校对:钟 洋
责任印制:阎 磊 / 封面设计:迷底书装

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京市文林印务有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014年4月第一版 开本:720×1000 B5

2014年4月第一次印刷 印张:16 插页:1

字数:338 000

定价:29.80元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

微生物学实验教程系列编委会

主 委	任	李季伦	中国农业大学
	员	李季伦	中国农业大学
		陈文新	中国农业大学
		邢来君	南开大学
		陈冠军	山东大学
		赵良启	山西大学
		顾桂芬	中国农业大学
		楼惠强	中国农业大学
		何 群	中国农业大学
		李 颖	中国农业大学
		李大伟	中国农业大学
		王贺祥	中国农业大学
		封文海	中国农业大学
		宋 渊	中国农业大学
		袁红莉	中国农业大学
		文 莹	中国农业大学

本书编委会名单

主 编 杨金水

副 主 编 屈建航

编写人员 (按姓氏汉语拼音排序)

高同国 河北农业大学

李炳学 沈阳农业大学

李海峰 河南工业大学

吕志伟 聊城大学

屈建航 河南工业大学

王风芹 河南农业大学

杨金水 中国农业大学

主 审 袁红莉 中国农业大学

总 序

中国农业大学生物学院微生物学科创建于1958年,由原北京农业大学植保系和土化系的微生物学教研组合并组建而成,是我国高等院校第一个农业微生物学专业。1981年被国务院学位委员会列为第一批博士点,1993年被评为农业部重点学科,2001年被评为国家级重点学科。

本学科特色是研究、挖掘和利用丰富的微生物资源,为农业生产服务。研究方向包括根瘤菌资源调查和系统发育学、固氮酶的生化机制及遗传调控、真菌生理及遗传学、药用及食用真菌学、微生物发酵工程、土壤和环境微生物学,并在此基础上,加强了微生物分子遗传,增加了病毒学、免疫学和生物质能源等研究方向。1985年,原在植保系的微生物专业参与了中国农业大学生物学院的组建,建立了微生物系,于2003年更名为“微生物及免疫学系”。目前本系开设的本科生课程包括:微生物生物学,原核生物进化与系统分类学,真菌生物学,微生物生理学,微生物遗传学,微生物发酵工程,食用菌学,资源与环境微生物学,病毒学及免疫学,每门课程均有理论课和实验课。

本系俞大绂教授等老一代学者及多位已经退休的老师们在微生物学教学思想、课程设置及团队建设等方面,为学科发展做出了巨大的贡献,也为后人的工作奠定了良好的基础。在教学中突出的特色是理论课程与实验课程的紧密结合,特别是对于本专业入门的实验课程,积极推进将“死标本”的观察转变为学生自行分离和观察活体标本,使学生们从被动地接受知识转变为主动地参与学习,有利于促进学生们掌握实验技能,并锻炼思考和分析能力。这种教学理念和模式一直沿用至今。目前本系担任教学工作的是一支中、青年教师结合的队伍,他们责任心强、思想活跃、虚心进取,不断进行教学改革,积极探讨在新的形势下,如何正确解决“基础与创新”、“理论与实践”、“教学与科研”的关系,认真履行着教师的职责。

本套实验教程的基本资料均来自教师们多年的积累。本系历来坚持教学与科研并重的原则,在多年的发展过程中,逐步规划将教师的科研方向与所承担的课程内容紧密相关,保证教学内容中基础知识与前沿知识相结合,很多实验设计出自任课教师的科研积累。大家齐心协力,勇于创新,不断更新实验教学内容,使各门实验课程的教学工作一直受到学生的好评。

本系承担的9门本科生微生物学实验课程一直没有编写正式出版的教材。最近,在大家的努力和领导的支持下,各位主编在近年完成实验课教学大纲修订的前提下,汇集了来自其他兄弟院校教师们的智慧,终于完成9本实验教程的编写,这是大家

共同努力的结果。

衷心感谢南开大学邢来君教授、山东大学陈冠军教授、山西大学赵良启教授欣然接受我们的邀请，不仅为本套教材的审稿付出辛勤劳动，同时作为本套实验教程编委会成员，为保证教材的质量献计献策。感谢中国农业大学生物学院领导的支持和“教育部高等学校专业综合改革试点”项目的资助，感谢来自兄弟院校全体参编教师们的认真合作。感谢科学出版社为编辑和出版本套教材所付出的努力。希望这套实验教程的出版，为本学科和相关学科读者的学习和工作带来有益的参考，也希望广大读者提出批评和建议，以便我们今后做出修改。

李季伦

2014年1月

前 言

环境安全是人们赖以生存的基本保障，也是保障我国经济健康、持续发展的一個关键因素。因此，如何评价与人们生活息息相关的水体、土壤、空气、生活废弃物对人们健康及生活安全的影响成为人们日益关注的问题。环境微生物学是重点研究污染环境中的微生物学，是环境科学中的一个重要分支，是 20 世纪 60 年代末兴起的一门边缘学科。它主要以微生物学的理论与技术为基础，研究有关环境现象、环境质量及环境问题，与其他学科如土壤微生物学、水及污水处理微生物学、环境化学、环境地学、环境工程学等互相影响，互相渗透，互为补充。

本书作者在多年的教学科研工作中，有感于目前环境微生物学实验教材大多偏向于基础微生物学实验，这对于已经具备微生物学基础的读者而言参考价值不大，另外环境领域的研究技术日新月异，涵盖面日益宽广，有些教材内容过于繁多，因此结合自己承担的环境微生物学课程的实际教学效果和学生的反馈，在对自编的环境微生物学实验指导不断完善的基础上，联合多所院校的相关专业老师，阅读了大量国内外实验技术与方法，汲取众家之长，同时增补了多年科研工作中的实践经验，注重实用性及先进性，编著了《资源与环境微生物学实验教程》这本教材，希望对从事相关领域工作的科学技术人员及普及环境安全知识都具有一定的帮助。

本教材针对微生物在水体、土壤、大气、难降解化合物、环境监测及环境领域中的基础理论及实际应用方面的重要作用，分别设置了水中细菌学检测，环境水体中伤寒沙门菌的定量 PCR 检测，噬菌体的分离、纯化及效价测定，水中生化需氧量的测定，强化生物除磷技术，微生物脱氮技术，富营养化湖水中藻类的测定（叶绿素 a 法），水体沉积物中 DNA 的提取，活性污泥的培养及曝气生物滤池对污水的生物处理，厌氧颗粒污泥的培养及升流式厌氧污泥床对污水的生物处理，土壤微生物生物量的测定，土壤呼吸强度的测定，土壤脲酶活性测定，变性梯度凝胶电泳技术分析土壤中微生物的多样性，限制性片段长度多态性技术分析土壤中微生物的多样性，空气中微生物数量的检测，废气的生物滴滤塔处理，酚降解菌的分离筛选、降解能力的定量测定及菌种鉴定，木质素降解菌的分离纯化及木质素酶活性测定，半纤维素降解菌的分离筛选及木聚糖酶活性检测，卤代芳香烃降解基因的 PCR 检测，水质微型生物群落监测泡沫塑料块法，发光细菌法检测水体及土壤的急性毒性，应用 Ames 实验检测水体中的致突变污染物，木质纤维素废弃物制备燃料乙醇，石油污染土壤的微生物修复，微生物絮凝剂产生菌的筛选及絮凝剂成分分析，细菌冶金活性测定，微藻生物柴油的制备共 29 个实验，以扩展学生对微生物在工、农、环

保等领域应用的认识,提高学生发现问题、提出问题、分析问题和解决实际环境及生物技术相关问题的能力,促进学生知识、能力和素质协调发展。

本书在科学出版社的组织下及中国农业大学生物学院“教育部高等学校专业综合改革试点”项目支持下,由中国农业大学生物学院微生物及免疫学系杨金水担任主编,中国农业大学袁红莉担任主审,由多所高校的相关专业老师组成了环境微生物学实验教程编写组集体编写而成。具体分工如下:吕志伟(聊城大学)负责实验一、十九、二十三、二十四的编写,高同国(河北农业大学)负责实验二、三、七、二十七的编写,李海峰(河南工业大学)负责实验四、五、六、十八的编写,屈建航(河南工业大学)负责实验八、十四、十五、十六、十七的编写,李炳学(沈阳农业大学)负责实验九、二十、二十一、二十六的编写,杨金水(中国农业大学)负责实验十、二十二、二十八、二十九的编写,王风芹(河南农业大学)负责实验十一、十二、十三、二十五的编写。全书由杨金水统稿。

本书可作为农林院校、综合性大学、师范院校的生物学专业、环境科学与工程及其他相关专业的本科生和研究生的教材或参考书使用,也可供相关专业的教师和研究参考。

由于编者水平有限,本书内容涉及广泛,书中难免还有遗漏和不当之处,敬请读者指正,以便在今后能进一步修正和完善。

编 者

2014 年 1 月

目 录

总序

前言

第一章 水环境微生物学实验技术	1
实验一 水中细菌学检测	1
实验二 环境水体中伤寒沙门菌的定量 PCR 检测	10
实验三 噬菌体的分离、纯化及效价测定	17
实验四 水中生化需氧量的测定	24
实验五 强化生物除磷技术	30
实验六 微生物脱氮技术	40
实验七 富营养化湖水中藻类的测定 (叶绿素 a 法)	51
实验八 水体沉积物中总 DNA 的提取	57
实验九 活性污泥的培养及曝气生物滤池对污水的生物处理	63
实验十 厌氧颗粒污泥的培养及升流式厌氧污泥床对污水的生物处理	70
第二章 土壤环境微生物学实验技术	81
实验十一 土壤微生物生物量的测定	81
实验十二 土壤呼吸强度的测定	96
实验十三 土壤脲酶活性测定	105
实验十四 变性梯度凝胶电泳技术分析土壤中微生物的多样性	110
实验十五 限制性片段长度多态性技术分析土壤中微生物的多样性	120
第三章 气体环境微生物学实验技术	131
实验十六 空气中微生物数量的检测	131
实验十七 废气的生物滴滤塔处理	138
第四章 难降解化合物微生物降解实验技术	146
实验十八 酚降解菌的分离筛选、降解能力的定量测定及菌种鉴定	146
实验十九 木质素降解菌的分离纯化及木质素酶活性测定	152
实验二十 半纤维素降解菌的分离筛选及木聚糖酶活性检测	159
实验二十一 卤代芳香烃降解基因的 PCR 检测	167
第五章 环境质量监测微生物学技术	174
实验二十二 水质微型生物群落监测泡沫塑料块法	174
实验二十三 发光细菌法检测水体及土壤的急性毒性	181

实验二十四	应用 Ames 实验检测水体中的致突变污染物	187
第六章	微生物在环境领域上的应用技术	195
实验二十五	木质纤维素废弃物制备燃料乙醇	195
实验二十六	石油污染土壤的微生物修复	206
实验二十七	微生物絮凝剂产生菌的筛选及絮凝剂成分分析	214
实验二十八	细菌冶金活性测定	222
实验二十九	微藻生物柴油的制备	229

图版

第一章 水环境微生物学实验技术

实验一 水中细菌学检测

一、实验目的

1. 学习水样的取样方法，了解大肠菌群检测的常用方法。
2. 掌握利用多管发酵法测定水中大肠菌群数量的方法。

二、实验原理

生活用水的水源常被生活污水、工业废水或人与动物的粪便污染。粪便污物含有不同类型的微生物，有腐生性的和病原性的。腐生性微生物对人无害，而病原性微生物则能引起传染病的发生。水源水如湖水、河水、池水和溪水，常含有很多腐生菌，但仍可安全地饮用。然而水源水一旦被粪便污染，就可能被肠道病原体污染而引起肠道传染病甚至流行病，如霍乱、伤寒、细菌性痢疾和阿米巴性痢疾及脊髓灰质炎和传染性肝炎等病毒性疾病。因此，必须对生活用水及其水源水进行严格的细菌学检查。

然而肠道病原菌在水中容易死亡与变异，因此数量较少，要从中特别是自来水中分离出病原菌常较困难与费时，这样就要找到一个合适的指示菌。此指示菌要求是大量出现在粪便中的非病原菌，并且和水源病原菌相比较易检出。若指示菌在水中不存在或数量很少，则说明大多数情况下没有病原菌。最广泛应用的指示菌是大肠菌群（coliform group）。它的定义是：一群好氧和兼性厌氧、革兰氏阴性、无芽孢的杆状细菌，在乳糖培养基中，经 37℃ 条件下 24 ~ 48h 培养能产酸产气。根据水中大肠菌群的数目来判断水源是否被粪便所污染，并间接推测水源受肠道病原菌污染的可能性。我国规定每 100mL 自来水中大肠菌群不得检出（GB 5749—2006）。

大肠菌群检测的技术有多种，目前国内外主要有以下几种。

1. 传统方法

传统方法主要包括多管发酵法和滤膜法，这两种技术在世界各国得到普遍应用。

(1) 多管发酵法

多管发酵法使用历史较久，又称水的标准分析方法，为我国大多数卫生单位与水厂所采用。多管发酵法测定水中大肠菌群包括初发酵试验、平板划线分离、革兰

氏染色、复发酵试验4步。初发酵试验和复发酵试验是根据糖发酵的原理,即大肠杆菌能发酵乳糖产酸产气。平板划线分离是采用复红亚硫酸钠琼脂培养基或伊红亚甲蓝培养基(EMB培养基),二者均有选择作用。前者中的复红作指示剂,可被亚硫酸钠脱色,使培养基呈粉红色,大肠杆菌发酵乳糖产酸与复红反应形成深红色复合物,使大肠菌群的菌落变为带金属光泽的深紫色菌落;后者中的伊红、亚甲蓝两种染料作指示剂,大肠杆菌发酵乳糖产酸时,两种染料结合成复合物,使大肠菌群产生与前者相似的、带核心的、有金属光泽的深紫色菌落。

该方法优点是不需昂贵的仪器设备,经过基本微生物学培训的技术员即可操作;缺点是乳糖发酵管的制作耗时费力,检测样品需要做系列稀释,加上后续确认试验需要96h以上,而且属于半定量试验,其技术特点决定了该法有时还会低估样品中大肠菌群的数量甚至造成漏检。

(2) 滤膜法

滤膜法也是水质微生物检测的一种标准方法。其主要原理是使用孔径为 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜过滤水样,将大肠菌群在内的细菌截流在膜上,然后把膜放在选择性培养基中培养,计数膜上生长出的典型细菌菌落数。大肠菌群在含有乳糖的复红亚硫酸钠培养基上长出带有金属光泽的深紫色菌落,在伊红亚甲蓝培养基上也长出与前者相似的、带核心的、有金属光泽的深紫色菌落。

滤膜法属于定量试验,具有许多和试管发酵技术相同的优点。滤膜法非常便于检测较大体积的水样,这样就能增加检出的敏感性和可靠性;缺点是特异性不高,结果容易受水样中其他细菌的影响而出现误判,也需结合进一步的确认试验才能最终确定结果。滤膜法存在的最主要问题是饮用水常常因为消毒处理使其中的大肠菌群受到损伤,这种应激和损伤的大肠菌群无法在选择性固体培养基上生长出菌落。另外,滤膜法也非常不适合检测杂质较多、浊度较大的水样。

2. 酶活性检测法

与传统方法相比,本法具有更好的特异性,反应也更加快速、敏感。 β -葡萄糖醛酸酶和 β -半乳糖苷酶是两种最常使用在大肠菌群检测中的酶类。很多研究发现,94%~96%的大肠杆菌均表达 β -葡萄糖醛酸酶,而其他肠道细菌表达 β -葡萄糖醛酸酶的比例明显低于大肠杆菌,因此相对来说该酶可以作为大肠杆菌的标志性酶。多种底物可用于建立酶催化的显色反应或荧光反应,如羟基吲哚- β -D-葡萄糖苷酸(IBDG)和4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖醛酸苷(MUG)等。5-溴-4-氯-3-吲哚半乳糖苷(X-gal)和邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)等则可用于检测 β -半乳糖苷酶的显色反应,此类方法已被《生活饮用水标准检验方法》GB/T 5750.12—2006采用。

酶活性检测法(酶底物法)比传统方法省时省力(18~24h),而且特异性高;缺点是试剂花费较高,而且与传统方法一样不能解决无法培养的大肠杆菌的检出难题。水中的消毒剂、食品的处理过程及培养体系中可能存在的一些抑制因子都可能使大肠杆菌受损,使大肠杆菌失去增殖和酶合成的能力。

3. 纸片法

纸片法是以大肠菌群细菌生长发育时分解乳糖产酸,同时产生脱氢酶脱氢,氢可与无色的氯化三苯四氮唑(TTC)作用形成红色化合物使菌落(菌苔)变红的原理,将一定量的乳糖、指示剂(如TTC)、溴甲酚紫、蛋白胨等吸附在特定面积的无菌滤纸上,大肠菌群细菌通过上述两种指示剂显示出发酵乳糖产酸、纸片变黄和形成红色斑点(红晕)的固有特性。以此特性作为阳性结果的唯一判定标准。

4. 免疫学方法

免疫学方法和分子生物学方法都能省略繁琐的培养和确认步骤,可以在几个小时内高特异地辨别出可培养的和不可培养的大肠杆菌,基本可分为酶联免疫吸附试验(ELISA)和免疫荧光(IFA)两大类方法。ELISA法检测大肠菌群会受到其他微生物共同抗原的干扰,可能会造成假阳性。同时,该方法对操作人员的技术水平要求较高,相关试剂成本也很高。

5. 分子生物学方法

该方法大多数不需要培养步骤,理论上几个小时内即可完成检测。常用的检测大肠菌群的分子生物学方法有聚合酶链式反应(PCR)法和原位杂交(ISH)法。

(1) PCR法

此方法原理是将滤膜上截留的细菌用化学方法裂解,释放出DNA,再在相应的引物引导下用Taq酶扩增出产物,通过电泳条带染色或再与相应探针杂交判定结果。该方法的难点和缺点在于食品或水中微生物种类众多,必须要设计高特异性引物方能从中检出大肠菌群,而不出现假阳性。

(2) ISH法

合成与特定病原体DNA或RNA序列相互补的探针,然后与病原体进行原位杂交,可以非常特异地检出特定的大肠菌群。最常用的探针是与rRNA互补的,其中16S rRNA和23S rRNA探针应用最为广泛,并被作为菌种鉴别的标准试剂。该类方法的缺点在于,水样一般来说营养缺乏,水体中污染的大肠杆菌核糖体丰度较低,因而16S rRNA含量也较低,会降低荧光信号强度。

6. Hygicult 载片培养法

该产品是一种结晶紫中性红胆盐琼脂载片,它把适合于大肠菌群快速生长的琼脂培养基浇注在一块带折叶设计的塑料桨片上,使培养基能方便、充分地与样品表面接触,并带有帽盖,可以使载片在无污染情况下放回到无菌培养管中进行转运和培养。大肠菌群细菌能够分解琼脂载片上的乳糖产酸和产气,并产生其他特征性的形态、颜色变化,从而通过目测对大肠菌群菌落数进行定性或定量的快速检测。其缺点是实验结果和采样对象的表面光滑程度有关。

7. 试剂盒法

大肠菌群快速检测试剂盒是近年来开发出的一类产品,其以GB/T 4789.3—2003、GB/T 5750.12—2006中2.1和2.3标准为依据,将传统的操作方法进行了优

化和标准化,极大地减少了操作的难度,具有简单、快速、准确和价格低廉的特点,适用于食品中大肠菌群检测。不同厂家的产品使用方法略有不同,且均配有详细的操作说明,此处不再赘述。

本实验采用多管发酵法,以 GB/T 5750.12—2006 的方法为准。

三、实验材料

1. 培养基

(1) 单倍乳糖蛋白胨培养液

蛋白胨	10g
牛肉浸膏	3g
乳糖	5g
氯化钠	5g
溴甲酚紫乙醇溶液 (16g/L)	1mL
蒸馏水	1000mL

制法:将蛋白胨、牛肉浸膏、乳糖及氯化钠溶于蒸馏水中,调整 pH 为 7.2 ~ 7.4,再加入 1mL 16g/L 的溴甲酚紫乙醇溶液,充分混匀,分装于装有导管的试管中,68.95kPa (115℃) 高压灭菌 20min,贮存于冷暗处备用。

(2) 双倍乳糖蛋白胨培养液

按上述单倍乳糖蛋白胨培养液配置,除蒸馏水外,其他成分量加倍。

(3) 伊红亚甲蓝培养基

蛋白胨	10g
乳糖	10g
磷酸氢二钾	2g
琼脂	20 ~ 30g
蒸馏水	1000mL
伊红水溶液 (20g/L)	20mL
亚甲蓝水溶液 (5g/L)	13mL

制法:将蛋白胨、磷酸氢二钾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 68.95kPa (115℃) 高压灭菌 20min。临用时加热融化琼脂,温度为 50 ~ 55℃ 时,加入伊红和亚甲蓝溶液,混匀,倾注平皿。

2. 试剂

(1) 结晶紫染色液

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

制法:将结晶紫溶于乙醇中,然后与草酸铵水溶液混合 (注意: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) 革兰氏碘液

碘	1g
碘化钾	2g
蒸馏水	300mL

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。

(3) 脱色剂

乙醇(95%,体积分数)。

(4) 沙黄复染液

沙黄	0.25g
乙醇(95%,体积分数)	10mL
蒸馏水	90mL

制法:将沙黄溶解于乙醇中,待完全溶解后加入蒸馏水。

3. 革兰氏染色法

- 1) 将培养 18~24h 的培养物涂片。
- 2) 将涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染色液,染 1min,水洗。
- 3) 滴加革兰氏碘液,作用 1min,水洗。
- 4) 滴加脱色剂,摇动玻片,直至无紫色脱落为止,过 20~30s,水洗。
- 5) 滴加复染液,复染 1min,水洗,待干,镜检。

4. 器材

无菌培养皿,玻璃涂棒,无菌吸管,无菌量筒,带塞子的灭菌细口瓶,酒精灯,培养箱等。

四、实验步骤

(一) 水样的采取

1) 自来水:先将自来水龙头用酒精灯火焰烧灼 3min 灭菌,再开放水龙头使水流 5min 后,以带塞子的灭菌细口瓶接取水样,以待分析。

2) 池水、河水或湖水:应取距水面 1~15cm 的水样,先将灭菌的带玻璃塞瓶瓶口向下浸入水中,然后翻转过来,除去玻璃塞,水即流入瓶中。盛满后,将瓶塞盖好,再从水中取出,最好立即检查,否则需立即放入冰箱中 4℃ 条件下保存(注意:水样保存时间不超过 3d)。

(二) 大肠菌群的检查

1. 乳糖发酵试验

取 10mL 水样接种到 10mL 双倍乳糖蛋白胨培养液中, 取 1mL 水样接种到 10mL 单倍乳糖蛋白胨培养液中, 另取 1mL 水样注入 9mL 灭菌生理盐水中, 混匀后吸取 1mL (即 0.1mL 水样) 注入 10mL 单倍乳糖蛋白胨培养液中, 每一稀释度接种 5 管。

注意: 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 10mL 水样双倍培养基, 每份接种 10mL 水样。

检验水源水时, 如污染较严重, 应加大稀释度, 可接种 1mL、0.1mL、0.01mL 甚至 0.1mL、0.01mL、0.001mL, 每个稀释度接种 5 管, 每个水样共接种 15 管。接种 1mL 以下水样时, 必须做 10 倍递增稀释后, 取 1mL 接种。每递增稀释一次, 换用 1 支 1mL 灭菌刻度吸管。

将接种管置 $(36\pm1)^{\circ}\text{C}$ 培养箱内, 培养 $(24\pm2)\text{h}$, 如所有乳糖蛋白胨培养管都不产酸产气, 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. 分离培养

将产酸产气的发酵管分别转接在伊红亚甲蓝琼脂平板上, 于 $(36\pm1)^{\circ}\text{C}$ 培养箱内培养 18~24h, 观察菌落形态, 挑取符合下列特征的菌落做革兰氏染色、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。

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 $(36\pm1)^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 $(24\pm2)\text{h}$, 有产酸产气者, 即证实有总大肠菌群存在。

五、实验结果

根据证实为总大肠菌群阳性的管数, 查最可能数 (most probable number, MPN) 检索表, 报告每 100mL 水样中的总大肠菌群最可能数值。5 管法结果见表 1-1。15 管法结果见表 1-2。稀释样品查表后所得结果应乘以稀释倍数。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 1-1 用 5 份 10mL 水样时各种阳性和阴性结果组合时的最可能数

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