



中华人民共和国城镇建设行业标准

CJ/T 141~150—2001

城市供水水质检验方法标准 及编制说明和研究报告

2001-07-17发布

2001-12-01实施

中华人民共和国建设部 发布

一、城市供水水质检验方法标准

**Standard methods for the examination of
water of urban water supply**

前 言

本标准由建设部标准定额研究所提出。

本标准由建设部给水排水产品标准化技术委员会归口。

本标准由国家城市供水水质监测网天津监测站负责起草。

本标准起草人：张旭东、李婧。

本标准参加验证单位：北京监测站、上海监测站、深圳监测站、武汉监测站、昆明监测站。

中华人民共和国城镇建设行业标准

城市供水 致突变物的测定 鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验

CJ/T 150—2001

Urban water supply—
Determination of mutagenesis—
Salmonella typhimurium/Mammals microsomal enzyme test

1 范围

本标准规定了用鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物微粒体酶试验测定城市供水的致突变性。

本标准适用于城市供水及其源水水质致突变性的测定。

本标准规定以 2 L 为接种的最高检测水样体积。

2 方法

人工诱变鼠伤寒沙门氏菌突变株(即组氨酸营养缺陷型),在无组氨酸的培养基上不能生长,如受到致突变物的作用,使其基因发生变化而回复突变为原来的野生型,即使在缺乏组氨酸的条件下也能生长(如下图所示)。其中一些致突变物为直接致突变物。另外一些为间接致突变物,即需代谢活化后具有致突变性。

野生型 $\xrightarrow{\text{正向突变}}$ 组氨酸营养缺陷型 $\xrightarrow{\text{回复突变}}$ 野生型

3 试剂和材料

3.1 营养肉汤

牛肉浸膏	5 g
蛋白胨	10 g
氯化钠	5 g
蒸馏水	1 000 mL

将上述成分混合后,加热溶解,用饱和 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.2,分装于试管中,每管 10 mL。经 121℃ 高压湿热灭菌 20 min。4℃ 冰箱保存,供增菌使用。(保存期 7 天)

3.2 V-B 液

柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	10 g
磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	65.5 g
磷酸氢二钠($NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$)	17.5 g
硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1.0 g
蒸馏水	500 mL

将上述试剂在少量蒸馏水中溶解后,稀释至 500 mL。硫酸镁水溶液在最后缓慢加入以防止产生沉淀,经滤纸过滤后,于 4℃ 冰箱保存。

3.3 底层培养基

葡萄糖	20 g
V-B 液	100 mL
琼脂	17 g
蒸馏水	900 mL

将 V-B 液用饱和 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0。另将葡萄糖溶于 100 mL 蒸馏水中(溶液变黄者弃去重配),两者于 115℃ 灭菌 10 min。琼脂于 800 mL 蒸馏水中煮沸溶化,121℃ 灭菌 20 min,待其凉至 80℃ 左右,将前两者倒入混匀。浇制平板,每皿 25 mL。于 4℃ 冰箱中可保存 14 天。

3.4 0.5 mol/L-组氨酸-0.5 mol/L-生物素溶液

成分

L-组氨酸(FW155.7)	7.8 mg
[或 L-组氨酸盐酸盐(FW209.63)]	10.5 mg]
D-生物素	12.4 mg
蒸馏水	100 mL

混匀溶解,于 4℃ 冰箱中保存。

3.5 0.1 mol/L-组氨酸溶液

L-组氨酸(FW155.7)	1.56 g
[或 L-组氨酸盐(FW209.63)]	2.10 g]
蒸馏水	100 mL

混匀溶解,于 4℃ 冰箱中保存。

3.6 营养琼脂

琼脂	16 g
营养肉汤	1 000 mL

将琼脂倒入营养肉汤内加热煮沸,用饱和 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.2~7.4,121℃ 高压灭菌 20 min。于 4℃ 冰箱中可保存 14 天。

3.7 H⁻顶层培养基

琼脂	0.6 g
氯化钠	0.5 g
蒸馏水	100 mL

将琼脂和氯化钠溶于蒸馏水中加热煮沸,以每支试管 2.5 mL 分装,加塞,121℃ 高压灭菌 20 min。于 4℃ 冰箱中可保存 14 天。

3.8 H⁻顶层培养基

H ⁻ 顶层培养基	100 mL
0.1 mol/L L-组氨酸溶液	10 mL

将加热溶化了的 H⁻顶层培养基加入 0.1 mol/L L-组氨酸溶液 10 mL 混匀,趁热以每支试管 2.5 mL 分装,加塞,121℃ 高压灭菌 20 min。于 4℃ 冰箱中可保存 14 天。

3.9 顶层培养基

H ⁻ 顶层培养基	100 mL
0.5 mmol/L L-组氨酸-0.5 mmol/L D-生物素溶液	10 mL

将加热溶化了的 H⁻顶层培养基加入 0.5 mol/L L-组氨酸-0.5 mmol/L D-生物素溶液后混匀,趁热以每支试管 2.5 mL 分装,加塞,121℃ 高压灭菌 20 min。于 4℃ 冰箱中可保存 14 天。

3.10 0.2 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.4)

每 100 mL 含	
0.2 mol/L 磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	81 mL

0.2 mol/L 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 19 mL

若 pH 值小于 7.4, 用 0.2 mol/L 磷酸氢二钠调节至 7.4, 115℃ 高压灭菌 10 min, 于 4℃ 冰箱中保存。

3.11 氨苄青霉素碱性溶液

氨苄青霉素 80 mg

氢氧化钠溶液(0.02 mol/L) 10 mL

临用时无菌操作配制。

3.12 氨苄青霉素平板

在 1 000 mL 底层培养基中加入 0.5% L-组氨酸盐酸盐溶液 10 mL, 或 0.5% L-组氨酸溶液 8.17 mL, 0.5 mmol/L D-生物素溶液 6 mL, 121℃ 高压灭菌 20 min 后, 加入 1.9 mL 氨苄青霉素碱性溶液, 混匀浇制平板, 供挑选菌种用。

3.13 结晶紫水溶液 0.1 g/100 mL 避光保存。

3.14 苦酮酸水溶液 4.0 mg/mL TA98(-S9 或 +S9)作阳性对照用

(或敌克松水溶液 0.5 mg/mL)

3.15 环磷酸水溶液 20 mg/mL TA100(-S9 或 +S9)作阳性对照用

3.16 S-9 混合液

每毫升含量

S-9 0.32 mL

MgCl_2 (0.4 mol/L) 20 μL

KCl(1.65 mol/L) 20 μL

辅酶 I (NADPH) 2.7 mg

6-磷酸葡萄糖(1 mol/L) 5 μL

磷酸钠缓冲液(0.2 mol/L) 0.6 mL

灭菌蒸馏水 35 μL

除 S-9 外, 各组分灭菌后保存于冰箱, 无菌操作, 临用时配制, 置于冰箱中, 其活性可保持 4 h~5 h。

3.17 S-9 的制备

使用体重 200 g 左右的健康雄性大鼠, 用玉米油稀释的国产多氯联苯(或 aroclor-1254, 浓度为 200 mg/mL, 剂量为 100 mg/kg)腹腔注射一次。诱导五天后, 断头处死大鼠, 无菌取出肝脏, 放入烧杯中称重。按每克肝脏加入 0.15 mol/L KCl 溶液 3 mL, 连同烧杯移入冰水中, 用消毒剪刀剪碎肝脏, 在玻璃匀浆器内制成肝匀浆, 在高速冷冻离心机上以 9 000 g(速度 12 000 rpm)10 min。吸出上清液即为 S-9, 分装小试管, 每管 2 mL, 放 -80℃ 或 -20℃ 冰箱保存。应无菌操作, 制备后, 应用接种环挑出少许在营养琼脂板上涂布, 37℃、24 h 培养检验应为无菌。用间接致癌物(黄曲霉素 B 或 2 氨基苄)鉴定其生物活性, 方可使用。

3.18 2-氨基苄溶液 2 mg/L DMSO 溶液

4 仪器设备

4.1 高压蒸气灭菌器

4.2 干热灭菌箱

4.3 恒温箱

4.4 普通冰箱

4.5 高速冷冻离心机(12 000 r/min)

4.6 低温冰箱(-80℃)或液氮罐

4.7 超净工作台

- 4.8 恒温水浴锅
- 4.9 真空泵
- 4.10 比色器
- 4.11 自动菌落计数器
- 4.12 微量加液器或微量注射器(100 μL ~500 μL)
- 4.13 试管、平皿($\phi 90$)、分度吸管
置于干热灭菌箱 160 $^{\circ}\text{C}$ ，灭菌 8 h。
- 4.14 振荡培养箱

5 试验菌种的选用、鉴定与保存

5.1 菌种的选用

鉴于 TA98、TA100 菌种特性变异小，不易丢失，且能分别测试移码型突变和碱基置换型突变，因此本试验采用 TA98、TA100 作为测试菌种。

5.2 菌种鉴定

5.2.1 增菌液的制备

将菌种接种于 10 mL 已灭菌的营养肉汤中，37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 14 h~16 h 至每毫升活菌数不少于 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ 个。

5.2.2 组氨酸缺陷型鉴定

将各装有 2.5 mL H⁻ 顶层培养基的 3 支试管中分别加入 0.1 mL 增菌液，分别倒入底层培养基平板。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。将各装有 2.5 mL H⁺ 顶层培养基的 3 支试管中分别加入 0.1 mL 增菌液，分别倒入底层培养基平板。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。

结果判定：在有组氨酸的培养基上应成菌膜状而在无组氨酸的培养基上应只有个别菌落生长。

5.2.3 深度粗糙突变(rfa)——结晶紫抑菌试验

用接种环或无菌滤纸将 0.1 mL 增菌液涂布于营养琼脂平板上，将 6 mm 直径无菌滤纸浸湿结晶紫水溶液后放置其上，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。一式两份。

结果判定：具有深度粗糙变异的菌株在滤纸片处出现抑菌环(直径>1 mm)。

5.2.4 R 因子鉴定——抗氨苄青霉素试验

用接种环将增菌液在营养琼脂平板上划线，再用接种环蘸上氨苄青霉素碱性溶液与其交叉划线，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

结果判定：无 R 因子的菌株在交叉处有抑菌带，有 R 因子者则无。

5.2.5 ΔuvrB 突变——紫外线损伤修复试验

用接种环将增菌液在营养琼脂平板上划线，平板的一半用黑纸遮盖，置紫外灯下(15 W，距离 33 cm)照射 8 s。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。

结果判定：切除修复系统缺损(ΔuvrB)的菌株受辐射后不生长，野生型则生长。

5.2.6 自发回复突变

在无菌的 2.5 mL 顶层培养基加入 0.1 mL 增菌液倒入底层培养基平板上，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。一式三份。

结果判定：观察每皿自发回变数。TA98 应在 15~50 个/皿，TA100 应在 75~200 个/皿范围内。

5.2.7 回变特性-阳性对照

在无菌的 2.5 mL 顶层培养基中加入 0.1 mL 增菌液并加入 0.1 mL 阳性物后倒入底层培养基平板上，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。一式三份。

结果判定：出现密集菌落(大于 2 倍以上自发回变数)者为突变试验阳性。

5.3 菌种的保存

10 mL 增菌液中加入 1 mL 二甲基亚风(DMSO)在 $-60^{\circ}\text{C}\sim-80^{\circ}\text{C}$ 可保存六个月至一年。

营养琼脂斜面增菌保存,在 4°C 可保存三个月。

6 测定步骤

6.1 水样浓缩液的制备

6.1.1 XAD-2 树脂的处理

6.1.1.1 市售 XAD-2 树脂需用重蒸馏水洗去所含氯化物,弃去浮于上层的树脂。用色谱纯级甲醇将水洗去。

6.1.1.2 依次用丙酮、乙醚、甲醇各蒸馏回流 8 h。保存在甲醇中。(溶剂均需三次重蒸馏或用色谱纯级)

6.1.2 安装 XAD-2 树脂柱

将处理好的树脂倒入一支高 45 cm、直径 2.5 cm 的玻璃柱内,树脂体积 20 mL,在玻璃柱底部及树脂柱上部放入经丙酮、乙醚、甲醇蒸馏回流过的玻璃棉以支撑树脂并截留杂质。用 1 000 mL 蒸馏水冲洗树脂柱。

6.1.3 水样的采集、吸附及滤水量

清洁的容器采集水样后,静置高处数小时使水中悬浮物沉淀并使溶解氧稳定,经加氯消毒的水要先用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 脱氯。用虹吸法将 60 L 水样以流速为 40 mL/min 通过树脂柱。

6.1.4 有机物的洗脱、浓缩、保存

水样过柱吸附后用氮气吹干树脂柱,分三次,每次以 10 mL 加入色谱纯丙酮(视情况亦可用丙酮:甲醇=3:7 混合溶剂)溶液浸泡后,以 3 mL/min 流速收集洗脱液于三角烧瓶。用 5 g 无水硫酸钠过滤脱水后,倒入 K-D 浓缩器浓缩至 2 mL 左右。放入真空干燥器抽负压将溶剂蒸干并保存在真空干燥器内。浓缩物应尽快使用。用时加 DMSO 定容至 3.0 mL,为原液,并稀释至原液的 1/2、1/4 浓度,则原液、1/2 原液浓度溶液、1/4 原液浓度溶液各 0.10 mL 分别相当于水样 2.0 L、1.0 L、0.5 L。

6.2 试验方法和步骤

6.2.1 试验方法:平板掺入法。

6.2.2 试验步骤

6.2.2.1 增菌培养方法同菌种鉴定

6.2.2.2 培养基制备:提前一天制备底层培养基平板若干个,放入 37°C 温箱内验证无菌。试验当天融化顶层培养基, 45°C 水浴保存。

6.2.2.3 接种培养:在每管顶层培养基中加入 0.1 mL 增菌液、0.1 mL 相当于一定水样体积的浓缩液(6.1.4),需活化时再加入 0.4 mL S-9 混合液,混匀后倒入底层培养基上铺匀。 $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,接种 3 个水样体积(6.1.4),每个接种水样体积进行三个平行测定。

6.2.2.4 对照:自发回变和阳性对照做三个平行测定。自发回变每皿加 0.1 mL DMSO,阳性对照每皿加 0.1 mL 阳性对照物。

7 结果分析及评价

7.1 对待测物的每个剂量及阳性对照应列出每皿的实际回变菌落数及平均数,其中三个平行样回变菌落数相对标准偏差应小于 30%。

7.2 在 1~2 个接种水样体积下,其回变菌落数是自发回变数的两倍及两倍以上,且有剂量反映关系者,定为阳性;否则即为致突变阴性。

8 质量控制

8.1 每次试验前后都应用 20% 的新洁尔灭清洁无菌室,避免细菌及霉菌滋生。

8.2 每批培养基都要做灭菌完全试验。

8.3 应避免琼脂与葡萄糖一同高压,防止产生弱致突变性,影响试验结果。

8.4 若考虑水样中悬浮物吸附的致突变物,应连同悬浮物一同通过 XAD 树脂过滤。

8.5 试验有效性

每次试验应当测定待测物和 S-9 混合液的无菌性并确定对阳性对照物的反应性,保证测试菌株自发回变数在确定的范围内且变化较小。

9 安全

9.1 做完试验后一切带菌的器皿、培养基应及时经 121℃ 高压灭菌 20 min。

9.2 应严格保管、使用及销毁阳性物。
