

ICS 65.120
B 46



中华人民共和国国家标准

GB/T 18869—2002

饲料中大肠菌群的测定

Determination of coliform bacteria in feeds



2002-09-24 发布

2003-03-01 实施



中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准在查阅大量资料文献和样品检测的基础上制定。

本标准的制定其技术内容主要依据 GB 4789.3—1994《食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定》。

本标准的附录 A、附录 B 均为规范性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准由国家饲料质量监督检验中心(北京)负责起草。

本标准主要起草人:李丽蓓、饶正华、杨曙明、高生。

饲料中大肠菌群的测定

警告——使用本标准的人员应有正规实验室工作的实践经验。具备适当设备的实验室才能承担检验。应小心处理所有废弃物。

1 范围

本标准规定了饲料中大肠菌群的测定方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、饲料原料(骨粉、肉骨粉、鱼粉、乳清粉等)中大肠菌群的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 4789.28—1994 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

GB/T 14699.1 饲料采样方法

3 原理

将试样稀释至适当浓度,用乳糖胆盐发酵培养基,在 $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 下培养 (24 ± 2) h,根据确证试验为大肠菌群阳性的管数,查出每100 g(mL)试样中大肠菌群的最大可能数(MPN)。

4 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或相当纯度水。

以下试剂制备具体要求见附录A。

- a) 乳糖胆盐发酵培养基:见第A.1章。
- b) 伊红美蓝琼脂平板:见第A.2章。
- c) 乳糖发酵培养基:见第A.3章。
- d) 磷酸盐缓冲稀释液:见第A.4章。
- e) 生理盐水。
- f) 革兰氏染色液:见第A.5章。

5 仪器、设备

- 5.1 培养箱: $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.2 显微镜:普通生物显微镜。
- 5.3 均质器或乳钵。
- 5.4 平皿:直径为90 mm。
- 5.5 试管。
- 5.6 吸管:1 mL。
- 5.7 广口三角瓶:容量为500 mL。
- 5.8 玻璃珠:直径约5 mm。
- 5.9 载玻片。

5.10 酒精灯。

5.11 试管架。

6 采样

按照 GB/T 14699.1 的要求执行。采样器具要灭菌消毒。

7 分析步骤(见附录 B)

7.1 检样稀释

7.1.1 以无菌操作将试样 25 g(或 mL)放于含有 225 mL 灭菌生理盐水或其他稀释液的灭菌玻璃瓶内(瓶内预置适当数量的玻璃珠)或灭菌乳钵内,经充分振摇或研磨做成 1:10 的均匀稀释液。固体试样最好用均质器,以 8 000 r/min~10 000 r/min 的速度处理 1 min,做成 1:10 的均匀稀释液。

7.1.2 用 1 mL 灭菌吸管吸取 1:10 稀释液 1 mL,注入含有 9 mL 灭菌生理盐水或其他稀释液的试管内,振摇试管混匀,做成 1:100 的稀释液。

7.1.3 另取 1 mL 灭菌吸管,按上条操作依次做 10 倍递增稀释,每递增稀释一次,换用一支 1 mL 灭菌吸管。

7.1.4 根据对试样污染情况的估计,选择三个稀释度,每个稀释度接种 3 管。

7.2 乳糖发酵试验

将待检试样接种于乳糖胆盐发酵管内,接种量在 1 mL 以上者,用双料乳糖胆盐发酵管,1 mL 及 1 mL 以下者,用单料乳糖胆盐发酵管。每一稀释度接种 3 管,置 36℃±1℃培养箱内,培养 24 h±2 h,如所有乳糖胆盐发酵管都不产气,则可报告为大肠菌群阴性,如有产气者,则按下列程序进行。

7.3 分离培养

将产气的发酵管分别转接种在伊红美蓝琼脂平板上,置 36℃±1℃培养箱内,培养 18 h~24 h,然后取出,观察菌落形态,并做确证试验。

7.4 确证试验

在上述平板上,挑取可疑大肠菌群菌落 1 个~2 个进行革兰氏染色,同时接种乳糖发酵管,置 36℃±1℃培养箱内培养 24 h±2 h,观察产气情况。凡乳糖管产气、革兰氏染色为阴性的无芽孢杆菌,即可报告为大肠菌群阳性。

7.5 报告

根据确证为大肠菌群阳性的管数,查 MPN 检索表(表 1),报告每 100 g(mL)试样中大肠菌群的最大可能数,以“个/100 g(mL)”表示。

表 1 大肠菌群最大可能数(MPN)检索表

阳性管数 ^a			MPN ^b (100 mL(g)试样)	95%可信限	
1 mL(g)×3	0.1 mL(g)×3	0.01 mL(g)×3		上限	下限
0	0	0	<30		
0	0	1	30	<5	90
0	0	2	60		
0	0	3	90		
0	1	0	30	<5	130
0	1	1	60		
0	1	2	90		
0	1	3	120		

表 1 (续)

阳性管数 ^a			MPN ^b [100 mL(g)试样]	95%可信限	
1 mL(g)×3	0.1 mL(g)×3	0.01 mL(g)×3		上限	下限
0	2	0	60		
0	2	1	90		
0	2	2	120		
0	2	3	160		
0	3	0	90		
0	3	1	130		
0	3	2	160		
0	3	3	190		
1	0	0	40	<5	200
1	0	1	70	10	210
1	0	2	110		
1	0	3	150		
1	1	0	70	10	230
1	1	1	110	30	360
1	1	2	150		
1	1	3	190		
1	2	0	110	30	360
1	2	1	150		
1	2	2	200		
1	2	3	240		
1	3	0	160		
1	3	1	200		
1	3	2	240		
1	3	3	290		
2	0	0	90	10	360
2	0	1	140	30	370
2	0	2	200		
2	0	3	260		
2	1	0	150	30	440
2	1	1	200	70	890
2	1	2	270		
2	1	3	340		
2	2	0	210	40	470
2	2	1	280	100	1 500
2	2	2	350		
2	2	3	420		
2	3	0	290		
2	3	1	360		
2	3	2	440		
2	3	3	530		
3	0	0	230	40	1 200
3	0	1	390	70	1 300
3	0	2	640	150	3 800
3	0	3	950		

表 1 (续)

阳性管数 ^a			MPN ^b [100 mL(g)试样]	95%可信限	
1 mL(g)×3	0.1 mL(g)×3	0.01 mL(g)×3		上限	下限
3	1	0	430	70	2 100
3	1	1	750	140	2 300
3	1	2	1 200	300	3 800
3	1	3	1 600		
3	2	0	930	150	3 800
3	2	1	1 500	300	4 400
3	2	2	2 100	350	4 700
3	2	3	2 900		
3	3	0	2 400	360	13 000
3	3	1	4 600	710	24 000
3	3	2	11 000	1 500	48 000
3	3	3	≥24 000		

^a 本表采用三个稀释度[1 mL(g)、0.1 mL(g)和 0.01 mL(g)],每稀释度 3 管。

^b 表内所列试样量如改用 10 mL(g)、1 mL(g)和 0.1 mL(g)时,表内 MPN 数字应相应降低 10 倍;如改用 0.1 mL(g)、0.01 mL(g)和 0.001 mL(g)时,则表内 MPN 数字应相应增加 10 倍。其余可类推。

附录 A
(规范性附录)
试剂和培养基制备

以下培养基的制备按 GB 4789.28—1994 的规定。

A.1 乳糖胆盐发酵培养基

A.1.1 成分

蛋白胨	20 g
猪胆盐(或牛、羊胆盐)	5 g
乳糖	10 g
0.04%溴甲酚紫水溶液	25 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH7.4	

A.1.2 制法

将蛋白胨、胆盐及乳糖溶于水中,校正 pH,加入指示剂,分装每管 10 mL,并放入一个小导管,115℃ 高压灭菌 15 min。

注:双料乳糖胆盐发酵管除蒸馏水外,其他成分加倍。

A.2 伊红美蓝琼脂(EMB)

A.2.1 成分

蛋白胨	10 g
乳糖	10 g
磷酸氢二钾	2 g
琼脂	17 g
2%伊红 Y 溶液	20 mL
0.65%美蓝溶液	10 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH7.1	

A.2.2 制法

将蛋白胨、磷酸盐和琼脂溶解于蒸馏水中,校正 pH,分装于烧瓶内,121℃ 高压灭菌 15 min 备用。临用时加入乳糖并加热溶化琼脂,冷至 50℃~55℃,加入伊红和美蓝溶液,摇匀,倾注平板。

A.3 乳糖发酵培养基

A.3.1 成分

蛋白胨	20 g
乳糖	10 g
0.04%溴甲酚紫水溶液	25 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH7.4	

A.3.2 制法

将蛋白胨及乳糖溶于水中,校正 pH,加入指示剂,按检验要求分装 30 mL、10 mL 或 3 mL,并放入

一个小导管,115℃高压灭菌 15 min。

注:双料乳糖发酵管除蒸馏水外,其他成分加倍。3 mL 乳糖发酵管供大肠菌群证实试验用。

A.4 磷酸盐缓冲液

A.4.1 储存液

磷酸二氢钾	34 g
$c(\text{NaOH})=1 \text{ mol/L}$ 氢氧化钠溶液	175 mL
蒸馏水	825 mL
pH7.2	

A.4.2 制法

先将磷酸盐溶解于 500 mL 蒸馏水中,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液校正 pH 后,再用蒸馏水稀释至 1 000 mL。

A.4.3 稀释液:取储存液 1.25 mL,用蒸馏水稀释至 1 000 mL。分装每瓶 100 mL 或每管 10 mL,121℃ 高压灭菌 15 min。

A.5 革兰氏染色法

A.5.1 结晶紫染色液

结晶紫	1 g
95%乙醇	20 mL
10 g/L 草酸铵水溶液	80 mL

将结晶紫溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

A.5.2 革兰氏碘液

碘	1 g
碘化钾	2 g
蒸馏水	300 mL

将碘与碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许,充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

A.5.3 沙黄复染液

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.5.4 染色法

A.5.4.1 将涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染色液,染 1 min,水洗。

A.5.4.2 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。

A.5.4.3 滴加 95%乙醇脱色,约 30 s,或将乙醇滴滴整个涂片,立即倾去,再用乙醇滴滴整个涂片,脱色 10 s。

A.5.4.4 水洗,滴加复染液,复染 1 min。水洗,待干,镜检。

A.5.4.5 结果

革兰氏阳性菌呈紫色。革兰氏阴性菌呈红色。

注:亦可用 1:10 稀释石炭酸复红染色液作复染液,复染时间仅需 10 s。

附录 B
(规范性附录)
大肠菌群检验程序

大肠菌群检验步骤见图 B.1。

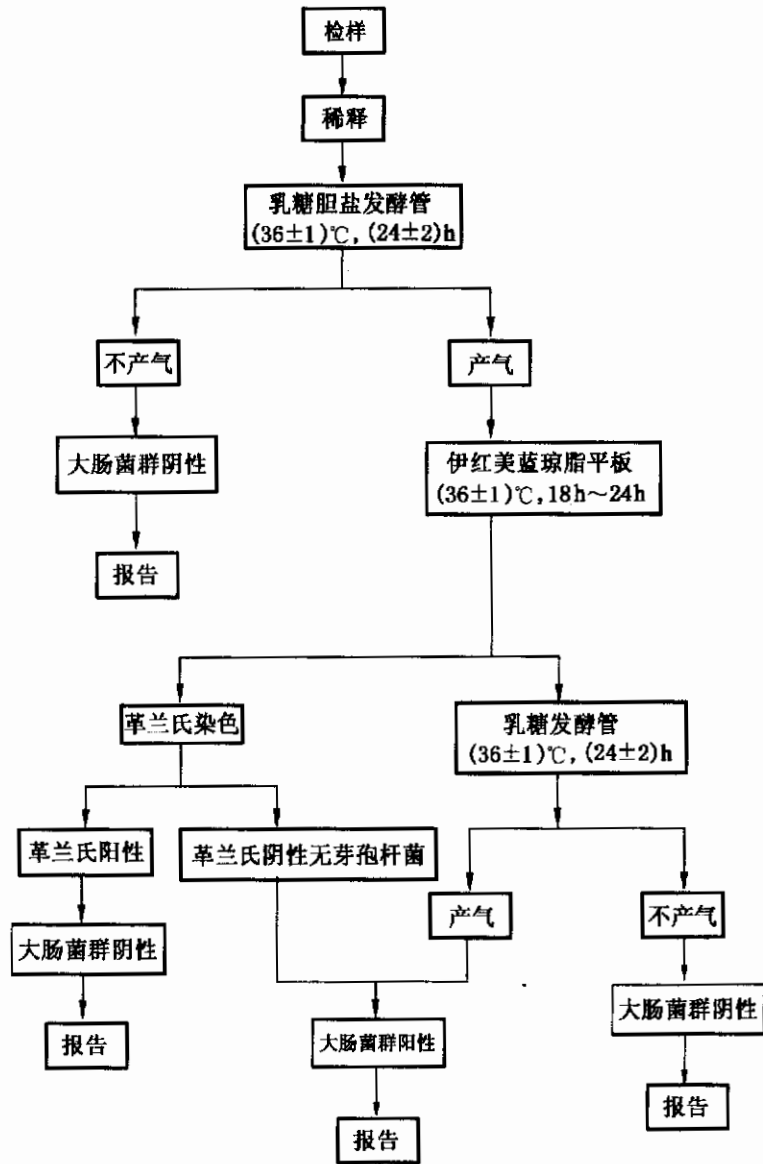


图 B.1 大肠菌群测定步骤图