

DB 15

内蒙古自治区地方标准

DB15/T 1850—2020

动物垫料中菌落总数检测

Detection for aerobic plate count in animal bedding

地方标准信息服务平台

2020-02-25 发布

2020-03-25 实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国呼和浩特海关提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国呼和浩特海关、鄂尔多斯市动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：赵治国、陈林军、敖威华、延涵、崔强、王海艳、于志超、刘佳、任彩霞、刘来俊、张晓东、杨帆、陈少博。

地方标准信息服务平台

动物垫料中菌落总数检测

1 范围

本标准规定了动物垫料中菌落总数的平板计数法。
本标准适用于动物垫料中菌落总数的定量检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 8170 数值修约规则与极限数值得表示和判定

SN/T 1538.1 培养基制备指南 第1部分：实验室培养基制备质量保证通则

SN/T 1538.2 培养基制备指南 第2部分：培养基性能测试实用指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

动物垫料 animal bedding

用于吸收动物排泄物，使动物保持舒适生活环境的铺垫物。包括动物笼内非直接与动物机体接触的铺垫物。

3.2

菌落总数 aerobic plate count

检样经过处理，在一定条件下（如培养基、培养温度和培养时间等）培养后，所得每 g (cm²) 检样中形成的需氧和兼性厌氧微生物菌落总数。

3.3

菌落形成单位 colony forming unit (CFU)

在琼脂平板上经过一定温度和时间培养后形成的每一个菌落，是计算细菌或霉菌数目的单位。

4 设备和材料

4.1 恒温培养箱：36 °C ± 1 °C。

4.2 冰箱：2 °C ~ 5 °C。

- 4.3 恒温水浴箱：46 °C ± 1 °C。
- 4.4 天平：感量为 0.1 g。
- 4.5 均质器。
- 4.6 振荡器。
- 4.7 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。
- 4.8 无菌锥形瓶：250 mL、500 mL。
- 4.9 无菌培养皿：直径 90 mm。
- 4.10 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。
- 4.11 放大镜或/和菌落计数器。
- 4.12 无菌规格板：5 cm × 5 cm。
- 4.13 漩涡混合器。
- 4.14 无菌量筒。
- 4.15 无菌棉签。
- 4.16 无菌镊子。
- 4.17 无菌剪刀。
- 4.18 无菌滤膜均质袋。

5 培养基和试剂

- 5.1 实验用水：符合 GB/T 6682 的要求。
- 5.2 无菌生理盐水：见附录 A. 2。
- 5.3 磷酸盐缓冲液：见附录 A. 3。
- 5.4 平板计数琼脂培养基：见附录 A. 4。

6 操作步骤

6.1 采样

6.1.1 采样原则

样品采集应遵循随机性、代表性的原则。采样过程遵循无菌操作程序，防止一切可能的污染。

6.1.2 颗粒状或粉末状样品

对送检样品包装内不同部位样品进行随机多点取样至少 250 g，充分混匀后称取 25 g 颗粒状或粉末状垫料样品，加入 225 mL 无菌稀释液（磷酸盐缓冲液或生理盐水），充分振摇或均质 1 min ~ 2 min，制成 1:10 的样品匀液。

6.1.3 平面样品

表1 不同面积平面类垫料样品采样量

| 样品面积 m ² | 采样量 cm ² | 规格板数 |
|------------------------|------------------------|------|
| 小于0.25 (含) | 25 | 1 |
| 0.25~0.5 (含) | 50 | 2 |
| 0.5~0.75 (含) | 75 | 3 |
| 大于0.75 | 100 | 4 |

稀释无菌操作将灭菌规格板（5 cm×5 cm）放在平面垫料表面，用浸有无菌稀释液（磷酸缓冲液或生理盐水）的棉拭子，在规格板内来回均匀涂抹整个方格3次，并随之转动棉拭子，然后用灭菌剪刀剪去棉拭子与手接触的部分，将棉拭子头置入装有25 mL 无菌稀释液的无菌锥形瓶中，根据样品面积大小重复采样1~4个规格板面积，采样量见表1，相应地将棉拭子头置入25 mL~100 mL的无菌稀释液中，充分振摇制成样品原液（1 mL原液对应的样品面积为1 cm²）。取1 mL样品原液注入含有9 mL无菌稀释液的试管中，制成1:10的样品匀液。

6.2 稀释

6.2.1 取1 mL 1:10样品匀液注入含有9 mL无菌稀释液的试管中，另换一支1 mL无菌吸管反复吹吸，或在旋涡混合器上混匀，此液为1:100的样品匀液。

6.2.2 按6.2.1操作，制备10倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释一次，换用1支1 mL无菌吸管。

6.2.3 根据对垫料样品污染状况的估计，选择2~3个适宜稀释度的样品匀液，在进行10倍递增稀释的同时，每个稀释度分别吸取1 mL样品匀液于2个无菌平皿内；同时分别取1 mL无菌稀释液加入2个无菌平皿作空白对照。

6.2.4 及时将20 mL~25 mL冷却至46℃的平板计数琼脂培养基（可置于46℃±1℃恒温水浴箱中保温）倾注平皿，并转动平皿使其混合均匀。置水平台面待培养基完全凝固。

6.2.5 如果样品中可能含有在琼脂培养基表面弥漫生长的菌落时，可在凝固后的琼脂表面覆盖一薄层平板计数琼脂培养基（约4 mL），凝固后翻转平板，再进行培养。

6.3 培养

琼脂凝固后倒置平板，置36℃±1℃培养箱中培养48 h±2 h，观察并计数结果。

6.4 菌落计数

6.4.1 用肉眼观察，必要时可用放大镜或低倍镜，记录稀释倍数和相应的菌落总数。以菌落形成单位（colony-forming units, CFU）表示。

6.4.2 选取菌落数在30 CFU~300 CFU之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于30 CFU的平板记录具体菌落数，大于300 CFU的可记录为多不可计。

6.4.3 其中一个平板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板作为该稀释度的菌落数；若片状菌落不到平板的一半，而其余一半中菌落分布又很均匀，即可计数半个平板菌落数后乘以2，代表该平板菌落数。

6.4.4 当平板上出现菌落间无明显界线的链状生长时，则将每条单链作为一个菌落计数。

7 结果与报告

7.1 结果

7.1.1 若只有一个稀释度的两个平板菌落数在 30 CFU~300 CFU 时，计算同一稀释度的两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数。

7.1.2 若有两个稀释度平板上菌落数均在 30 CFU~300 CFU 时，按以下公式 (1) 计算：

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

N ——样品中菌落总数；

∑C ——平板（含适宜范围菌落数的平板）菌落数之和；

n₁ ——第一稀释度（低稀释倍数）平板个数；

n₂ ——第二稀释度（高稀释倍数）平板个数；

d ——稀释因子（第一稀释度）。

7.1.3 若所有平板上菌落数均大于 300 CFU，则对稀释度最高的平板进行计数，其它平板可记录为多不可计，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。

7.1.4 若所有平板上菌落数均小于 30 CFU，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

7.1.5 若所有稀释度（包括液体样品原液）平板均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

7.1.6 若所有稀释度的平板菌落数均不在 30 CFU~300 CFU 之间，其中一部分小于 30 CFU 或大于 300 CFU 时，则以最接近 30 CFU 或 300 CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算，同时应选取稀释倍数较低的平均菌落数进行计算。

7.2 报告

7.2.1 菌落数按“四舍五入”原则修约。菌落数在 10 CFU 以内时，采用一位有效数字报告；菌落数在 10 CFU~100 CFU 之间时，采用两位有效数字报告。

7.2.2 菌落数大于或等于 100 CFU 时，第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数来表示结果；也可用 10 的指数形式来表示，此时也按“四舍五入”原则修约，采用两位有效数字。具体修约规则按照 GB/T 8170 执行。

7.2.3 若空白对照平板上有菌落出现，则此次检测结果无效。

7.2.4 以 CFU/g 或 CFU/cm² 为单位报告菌落总数。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 培养基制备及质量保证

按照SN/T 1538.1和SN/T 1538.2执行，并对制备好的培养基进行性能测试，如使用等效的脱水合成培养基，使用前对其进行验收并按其说明书使用。

A.2 生理盐水

A.2.1 成分

| | |
|-----|---------|
| 氯化钠 | 8.5 g |
| 蒸馏水 | 1000 mL |

A.2.2 制法

氯化钠加入1000 mL蒸馏水中，搅拌至完全溶解，分装后，121 °C灭菌15 min，备用。

A.3 磷酸盐缓冲液

A.3.1 成分

| | |
|-------|---------|
| 磷酸二氢钾 | 34.0 g |
| 蒸馏水 | 1000 mL |

A.3.2 制法

贮存液：称取34.0 g的磷酸二氢钾溶于500 mL蒸馏水中，用大约175 mL的1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH至7.2±0.1，用蒸馏水稀释至1000 mL后贮存于冰箱。

稀释液：取贮存液1.25 mL，用蒸馏水稀释至1000 mL，分装于适宜容器中，121 °C高压灭菌15 min。

A.4 平板计数琼脂培养基

A.4.1 成分

| | |
|------|---------|
| 胰蛋白胨 | 5.0 g |
| 酵母浸膏 | 2.5 g |
| 葡萄糖 | 1.0 g |
| 琼脂 | 15.0 g |
| 蒸馏水 | 1000 mL |

A. 4. 2 制法

上述各成分加入蒸馏水中，加热溶解，调至pH至 7.0 ± 0.2 。分装后， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌15 min，备用。

地方标准信息服务平台