

# DB 15

## 内蒙古自治区地方标准

DB15/T 1849—2020

### 动物垫料中大肠菌群检测

Detection for coliforms 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、内蒙古自治区农牧业科学院。

本标准主要起草人：赵治国、延涵、崔强、王海艳、于志超、陈林军、敖威华、张晓东、盛万里、罗晓平、李军燕。

地方标准信息服务平台



# 动物垫料中大肠菌群检测

## 1 范围

本标准规定了动物垫料中大肠菌群MPN计数法和平板计数法。  
本标准适用于动物垫料中大肠菌群的定量检测。

## 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的表示和判定

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。也包括动物笼内非直接与动物机体接触的铺垫物。

### 3.2

**大肠菌群** coliforms

培养条件下能发酵乳糖、产酸产气的需氧和兼性厌氧的一群革兰氏阴性无芽胞杆菌。

### 3.3

**最可能数** most probable number (MPN)

泊松分布的一种间接计数方法。

### 3.4

**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 检验原理

### 4.1 MPN 计数法

MPN计数法是统计学和微生物学相结合的一种定量检测法。待测样品经系列稀释并培养后,根据其未生长的最低稀释度与生长的最高稀释度,应用统计学概率论推算出待测样品中大肠菌群的最大可能数。

### 4.2 平板计数法

大肠菌群在固体培养基中发酵乳糖产酸,在指示剂的作用下形成可计数的红色或紫色,带有或不带有沉淀环的菌落。

## 5 仪器和设备

- 5.1 恒温培养箱:  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.2 冰箱:  $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.3 恒温水浴箱:  $46\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.4 天平: 感量  $0.1\text{ g}$ ,  $0.0001\text{ g}$ 。
- 5.5 均质器。
- 5.6 漩涡混合器。
- 5.7 高压灭菌器。
- 5.8 菌落计数器。
- 5.9 无菌试管:  $18\text{ mm}\times 180\text{ mm}$ 。
- 5.10 无菌吸管:  $1\text{ mL}$ (具  $0.01\text{ mL}$  刻度)、 $10\text{ mL}$ (具  $0.1\text{ mL}$  刻度)或微量移液器及吸头。
- 5.11 无菌滤膜均质袋。
- 5.12 无菌锥形瓶:  $500\text{ mL}$ 。
- 5.13 无菌量筒。
- 5.14 无菌规格板:  $5\text{ cm}\times 5\text{ cm}$ 。
- 5.15 无菌培养皿:  $15\text{ mm}\times 90\text{ mm}$ 。
- 5.16 无菌棉签。
- 5.17 无菌镊子。
- 5.18 无菌剪刀。
- 5.19 无菌勺。
- 5.20 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

## 6 培养基和试剂

- 6.1 实验用水: 符合 GB/T 6682 的要求。
- 6.2 月桂基硫酸盐胰蛋白胨(lauryl sulfate tryptose, LST)肉汤: 见附录 A.2。
- 6.3 煌绿乳糖胆盐(brilliant green lactose bile, BGLB)肉汤: 见附录 A.3。
- 6.4 结晶紫中性红胆盐琼脂(violet red bile agar, VRBA): 见附录 A.4。
- 6.5 无菌磷酸盐缓冲液: 见附录 A.5。
- 6.6 无菌生理盐水: 见附录 A.6。
- 6.7 NaOH 溶液 ( $1\text{ mol/L}$ ): 见附录 A.7。

6.8 HCL 溶液（1 mol/L）：见附录 A.8。

## 7 MPN 计数法

### 7.1 采样

#### 7.1.1 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，防止一切可能的外来污染。

#### 7.1.2 颗粒状或粉末样品

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。

#### 7.1.3 平面样品

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 cm<sup>2</sup>）。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。

表1 不同面积平面类垫料样品采样量

样品面积 m <sup>2</sup>	采样量 cm <sup>2</sup>	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

## 7.2 稀释

7.2.1 样品匀液的 pH 应在 6.5~7.5 之间，必要时用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCL 调节。

7.2.2 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL，沿管壁缓缓注入 9 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振摇试管或换用 1 支 1 mL 无菌吸管或吸头反复吹打，使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

7.2.3 根据对样品污染状况的估计，按上述操作，依次制成 10 倍递增系列稀释的样品匀液。每递增稀释 1 次，换用 1 支 1 mL 无菌吸管或吸头。从制备样品匀液至样品接种完毕，全过程不得超过 15 min。

### 7.3 初发酵试验

每个样品选择3个适宜的连续稀释度的样品匀液(液体样品可以选择原液),每个稀释度接种3管月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤,每管接种1 mL(如接种量超过1 mL,则用双料LST肉汤),36 °C ±1 °C培养24 h ±2 h,观察导管内是否有气泡产生,24 h ±2 h产气者进行复发酵试验(证实试验),如未产气则继续培养至48 h ±2 h,产气者进行复发酵试验。未产气者为大肠菌群阴性。

### 7.4 复发酵试验(证实试验)

用接种环从产气的LST肉汤管中分别取培养物1环,移种于煌绿乳糖胆盐肉汤(BGLB)管中,36 °C ±1 °C培养48 h ±2 h,观察产气情况。产气者计为大肠菌群阳性管。

### 7.5 大肠菌群最可能数(MPN)的报告

按7.4确证的大肠菌群BGLB阳性管数,检索MPN表(见附录B),报告每g(cm<sup>2</sup>)样品中大肠菌群的MPN值。

## 8 平板计数法

### 8.1 采样

按7.1进行。

### 8.2 稀释

按7.2进行。

### 8.3 平板计数

8.3.1 选取2~3个适宜的连续稀释度,每个稀释度接种2个无菌平皿,每皿1 mL。同时取1 mL磷酸盐缓冲液或生理盐水加入无菌平皿作空白对照。

8.3.2 及时将约15 mL~20 mL融化并恒温至45 °C~50 °C的结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)倾注于每个平皿中。小心旋转平皿,使培养基与样液充分混匀,待琼脂凝固后,加3 mL~4 mL VRBA琼脂覆盖平板表层。凝固后翻转平板,于36 °C ±1 °C培养18 h~24 h。

### 8.4 平板菌落数的选择

选取菌落数在15 CFU~150 CFU之间的平板,分别计数平板上出现的典型和可疑大肠菌群菌落。典型菌落为紫红色,菌落周围有红色的胆盐沉淀环,菌落直径为0.5 mm或更大。

### 8.5 证实试验

从每个VRBA平板上分别挑取10个不同类型的典型和可疑菌落,少于10个菌落的挑取全部典型和可疑菌落。分别移种于BGLB肉汤管内,36 °C ±1 °C培养24 h~48 h,观察产气情况。BGLB肉汤管产气,可报告为大肠菌群阳性。

### 8.6 大肠菌群平板计数结果计算与报告



### 8.6.1 大肠菌群平板计数结果的计算

8.6.1.1 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内，分别计算经最后证实为大肠菌群阳性的试管比例乘以 8.4 中计数的平板菌落数，计算平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数，即为每 g (cm<sup>2</sup>) 样品中大肠菌群数。例：加入 10<sup>-2</sup> 样品稀释液的 2 个 VRBA 平板上分别有 82 个和 64 个典型或可疑菌落，从每个平板分别挑取其中 10 个菌落接种 BGLB 肉汤管，分别证实有 7 个和 8 个阳性管，则该样品的大肠菌群数为：(82×7/10+64×8/10)×10<sup>2</sup>/2=5.4×10<sup>3</sup> CFU/g (cm<sup>2</sup>)。

8.6.1.2 若有 2 个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时，先计算适宜计数范围内每个平板经最后证实为大肠菌群阳性的菌落数，再按公式 (1) 计算样品中大肠菌群平板计数结果：

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

式中：

N——样品中大肠菌群板计数结果；

∑C——平板（含适宜范围菌落数的平板）证实为大肠菌群阳性的菌落数之和；

n<sub>1</sub>——第一稀释度（低稀释倍数）平板个数；

n<sub>2</sub>——第二稀释度（高稀释倍数）平板个数；

d——稀释因子（第一稀释度）。

8.6.1.3 若所有平板上菌落数均大于 150 CFU，则对稀释度最高的平板菌落进行确认，根据菌落确认结果，利用 8.6.1.1 中方法，计算样品中大肠菌群平板计数结果。

8.6.1.4 若所有平板上菌落数均小于 15 CFU，则应按稀释度最低的平板菌落进行确认，根据菌落确认结果，利用 8.6.1.1 中方法，计算样品中大肠菌群平板计数结果。

8.6.1.5 若所有稀释度的平板菌落数均不在 15 CFU~150 CFU 之间，其中一部分小于 15 CFU 或大于 150 CFU 时，则以最接近 15 CFU 或 150 CFU，且稀释倍数较少的平板菌落数进行确认，利用 8.6.1.1 中方法，计算样品中大肠菌群平板计数结果。

8.6.1.6 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。

### 8.6.2 报告

8.6.2.1 大肠菌群平板计数结果按“四舍五入”原则修约。结果在 10 CFU 以内时，采用一位有效数字报告；结果在 10 CFU~100 CFU 之间时，采用两位有效数字报告。

8.6.2.2 大肠菌群平板计数结果大于或等于 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，此时按照“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。

8.6.2.3 若空白对照平板上有大肠菌群菌落出现，则此次检验结果无效。

8.6.2.4 以 CFU/g 或 CFU/cm<sup>2</sup> 为单位报告大肠菌群平板计数结果。

**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 月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤****A.2.1 成分**

胰蛋白胨或胰酪胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾( $K_2HPO_4$ )	2.75 g
磷酸二氢钾( $KH_2PO_4$ )	2.75 g
月桂基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1000 mL

**A.2.2 制法**

将上述成分溶解于蒸馏水中，调节pH至 $6.8 \pm 0.2$ ，分装到有倒立发酵管的试管中，每管10 mL， $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌15 min备用。

**A.3 煌绿乳糖胆盐(BGLB)肉汤****A.3.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
乳糖	10.0 g
牛胆盐	20.0 g
0.1%煌绿水溶液	0.0133 g
蒸馏水	1000 mL

**A.3.2 制法**

准确称取以上成分，加1000 mL蒸馏水，加热煮沸至完全溶解，调节pH至 $7.2 \pm 0.2$ ，分装于有倒立发酵管的试管中，每管10 mL， $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压菌15 min备用。

**A.4 结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)**

## A. 4.1 成分

蛋白胨	7.0 g
胆盐	1.5 g
酵母粉	3.0 g
乳糖	10.0 g
氯化钠	5.0 g
中性红	0.03 g
结晶紫	0.002 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1000 mL

## A. 4.2 制法

准确称取以上成分,加1000 mL蒸馏水,静置几分钟,充分搅拌溶解,调节pH至 $7.4 \pm 0.1$ 。煮沸2 min,将培养基融化并恒温至 $45\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倾注平板。使用前3 h内制备。

## A. 5 磷酸盐缓冲液

## A. 5.1 成分

磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	34.0 g
蒸馏水	500 mL

## A. 5.2 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 $7.2 \pm 0.2$ ,用蒸馏水稀释至1000 mL后贮存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌15 min备用。

## A. 6 无菌生理盐水

## A. 6.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1000 mL

## A. 6.2 制法

称取8.5 g氯化钠溶于1000 mL蒸馏水中, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌15 min备用。

## A. 7 1 mol/L NaOH溶液

## A. 7.1 成分

氢氧化钠	40.0 g
蒸馏水	1000 mL

A. 7. 2 制法

称取40 g氢氧化钠溶于1000 mL无菌蒸馏水中。

A. 8 1 mol/L HCL 溶液

A. 8. 1 成分

HCL	90 mL
蒸馏水	1000 mL

A. 8. 2 制法

量取浓盐酸90 mL，用无菌蒸馏水稀释至1000 mL。

地方标准信息服务平台

附 录 B  
(规范性附录)  
大肠菌群最可能数 (MPN) 检索表

每g (cm<sup>2</sup>) 检样中大肠菌群最可能数 (MPN) 的检索见表B. 1。

表B. 1 大肠菌群最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95 %可信限	
0.1	0.01	0.001		上限	下限	0.1	0.01	0.001		上限	下限
0	0	0	<3.0	—	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	—

注1: 本表采用3个稀释度0.1 g (mL)、0.01 g (mL)和0.001 g (mL), 每个稀释度接种3管。

注2: 表内所列检样量如改用1 g (mL)、0.1 g (mL)和0.01 g (mL)时, 表内数字要相应降低10倍; 如改用0.01 g (mL)、0.001 g (mL)、0.0001 g (mL)时, 则表内数字要相应提高10倍, 其余类推。