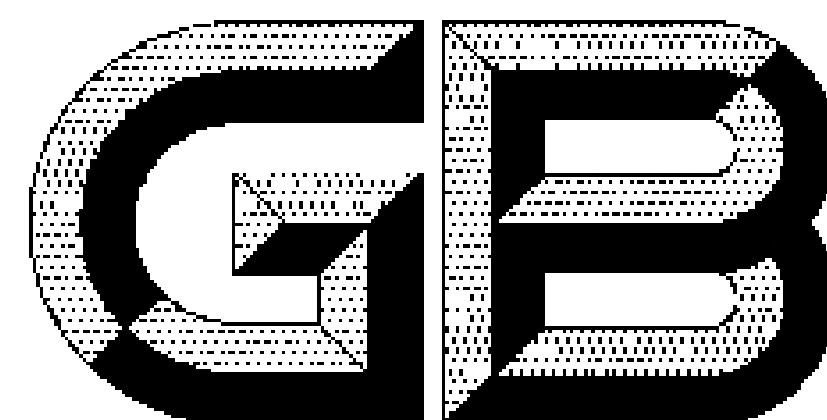




中华人民共和国国家标准

GB/T 18869—2019
代替 GB/T 18869—2002

饲料中大肠菌群的测定

Determination of coliforms in feeds

2019-06-04 发布

2020-01-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。
本标准代替 GB/T 18869—2002《饲料中大肠菌群的测定》。
本标准与 GB/T 18869—2002 相比,主要技术内容修改如下:
——修改了适用范围(见第 1 章,2002 年版的第 1 章);
——增加了术语和定义(见第 3 章);
——修改了原理的描述(见第 4 章,2002 年版的第 3 章);
——增加了 LST 发酵法(见 8.3)。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本标准起草单位:中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量监督检验中心(北京)]。

本标准主要起草人:李丽蓓、刘晓露、李胜、王彤。

本标准的历次版本发布情况为:

——GB/T 18869—2002。



饲料中大肠菌群的测定

1 范围

本标准规定了饲料中大肠菌群的测定方法。
本标准适用于饲料和饲料添加剂中大肠菌群的测定。



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

3 术语和定义

下列定义适用于本文件。

3.1

大肠菌群 coliforms
在一定培养条件下能发酵乳糖产酸产气的需氧或兼性厌氧革兰氏阴性无芽孢杆菌。

3.2

最可能数 most probable number; MPN
基于泊松分布的一种间接计数方法。

4 原理

将待测样品稀释至适当浓度并培养后,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表,查出待测样品中大肠菌群的最大可能数。

5 培养基或材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂。

- 5.1 水:符合 GB/T 6682 中三级水的要求。
- 5.2 乳糖胆盐发酵培养基:见附录 A 中 A.1。
- 5.3 伊红美蓝琼脂:见附录 A 中 A.2。
- 5.4 乳糖发酵培养基:见附录 A 中 A.3。
- 5.5 革兰氏染色液:见附录 A 中 A.4。
- 5.6 月桂基硫酸盐胰蛋白胨(lauryl sulfate tryptose, LST)肉汤:见附录 A 中 A.5。
- 5.7 煌绿乳糖胆盐(brilliant green lactose bile, BGLB)肉汤:见附录 A 中 A.6。
- 5.8 磷酸盐缓冲液:见附录 A 中 A.7。
- 5.9 无菌生理盐水:见附录 A 中 A.8。

5.10 氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH})=1\text{ mol/L}$ 。见附录 A 中 A.9。

5.11 盐酸溶液： $c(\text{HCl})=1\text{ mol/L}$ 。见附录 A 中 A.10。

6 仪器设备

6.1 天平：感量 0.1 g。

6.2 恒温培养箱： $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

6.3 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。

6.4 无菌锥形瓶：容量 500 mL。

6.5 均质器。

6.6 振荡器。

6.7 显微镜：普通生物显微镜。

6.8 pH 计或精密 pH 试纸。

7 样品

7.1 采样原则

样品的采集应遵循随机性、代表性的原则。采样过程应遵循无菌操作程序，防止一切可能的外来污染。

7.2 采样方法

7.2.1 应在同一批次产品中采集样品，每件样品的采样量应满足微生物指标检验的要求，一般不少于 500 g(mL)。

7.2.2 独立包装小于、等于 500 g 的固态产品或小于、等于 500 mL 的液态产品，取完整包装。

7.2.3 独立包装大于 500 mL 的液态产品，应在采样前摇动或用无菌棒搅拌液体，使其达到均质后采集适量样品，放入同一个无菌采样容器内作为一件样品。

7.2.4 独立包装大于 500 g 的固态产品，应用无菌采样器从同一包装的不同部位分别采取适量样品，放入同一个无菌采样容器内作为一件样品。

7.3 采集样品的贮存和运输

7.3.1 应尽快将样品送往实验室检验。

7.3.2 应在运输过程中保持样品完整。

7.3.3 应在接近原有贮存温度条件下贮存样品，或采取必要措施防止样品中微生物数量的变化。

8 试验方法

8.1 试验方法类别

本标准试验方法分为乳糖胆盐发酵法和 LST 发酵法，乳糖胆盐发酵法适用于限量要求以 MPN/100 g(mL)为单位的产品，LST 发酵法适用于限量要求以 MPN/g(mL)为单位的产品。

8.2 乳糖胆盐发酵法

8.2.1 试样的稀释

8.2.1.1 固态和半固态样品：称取 25 g 试样，放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质

杯,8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min,或放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打 1 min~2 min,制成 10 倍稀释的样品匀液。

注:含有硬物的原料,如肉骨粉等里面含骨渣易扎破均质袋,不宜用拍击式均质器。

8.2.1.2 液态样品:以无菌吸管吸取 25 mL 样品置于盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶(瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠)或其他无菌容器中,置于振荡器中振荡,充分混匀,制成 10 倍稀释的样品匀液。

注:黏稠样品宜采用固态称量法。

8.2.1.3 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 10 倍稀释的样品匀液 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(注意吸管和吸头尖端不要触及稀释液面),振摇试管或换一只 1 mL 无菌吸管反复吹打,使其混合均匀,制成 100 倍稀释的样品匀液。

8.2.1.4 根据对样品污染状况的估计,按上述操作,依次制成十倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释一次,换一只 1 mL 无菌吸管或吸头。从制备样品匀液至样液接种完毕,全过程不超过 15 min。

8.2.2 乳糖发酵试验

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 管乳糖胆盐发酵管,每管接种 1 mL(如接种量超过 1 mL,则用双料乳糖胆盐发酵管),置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱内,培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$,观察倒管内是否有气泡产生,如未产气则可报告为大肠菌群阴性,如有产气者,则按 8.2.3 和 8.2.4 程序进行操作。

8.2.3 分离培养

将产气的发酵管分别接种在伊红美蓝琼脂平板上,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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。

8.2.4 确证试验

在上述平板上,挑取可疑菌落 1 个~2 个进行革兰氏染色,同时接种乳糖发酵管,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱内,培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$,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,即可报告大肠菌群为阳性。

8.2.5 试验程序图

乳糖胆盐发酵法试验程序图见附录 B。

8.3 LST 发酵法

8.3.1 试样的稀释

操作同 8.2.1。

8.3.2 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 LST 肉汤,每管接种 1 mL(如接种量超过 1 mL,则用双料 LST 肉汤), $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$,观察倒管内是否有气泡产生, $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 产气者进行复发酵试验(证实试验),如未产气则继续培养至 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$,产气者进行复发酵试验。未产气者为大肠菌群阴性。

8.3.3 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 BGLB 管中, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$,

观察产气情况。产气者,计为大肠菌群阳性管。

8.3.4 试验程序图

LST 发酵法试验程序图见附录 C。

9 结果报告

9.1 根据确证为大肠菌群阳性的管数,检索乳糖胆盐发酵法大肠菌群最可能数(MPN)检索表(见附录 D),报告每 100 g(mL)样品中大肠菌群的 MPN 值。

9.2 根据确证为大肠菌群阳性的管数,检索 LST 发酵法大肠菌群最可能数(MPN)检索表(见附录 E),报告每克(毫升)[g(mL)]样品中大肠菌群的 MPN 值。



附 录 A
(规范性附录)
培养基或材料

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

A.1.2 制法

将蛋白胨、胆盐及乳糖溶于水中,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 ,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。双料乳糖胆盐发酵管除蒸馏水外,其余成分加倍。



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

A.2.2 制备

将蛋白胨、磷酸氢二钾和琼脂溶解于蒸馏水中,调节 pH 至 7.1 ± 0.2 ,分装于烧瓶中,121 ℃ 高压灭菌 15 min。临用时加入乳糖并加热溶解,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

A.3.2 制备

将蛋白胨及乳糖溶于水中,调节 pH 至 7.4 ± 0.1 ,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。3 mL 供证实试验用。

A.4 革兰氏染色法

A.4.1 结晶紫染色液

A.4.1.1 成分

结晶紫	1 g
95%乙醇	2 g
10 g/L 草酸铵溶液	80 mL

A.4.1.2 制备

将结晶紫溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

A.4.2 革兰氏碘液



A.4.2.1 成分

碘	1 g
碘化钾	2 g
蒸馏水	300 mL

A.4.2.2 制备

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,加入蒸馏水 300 mL。

A.4.3 沙黄复染液

A.4.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	2 g
蒸馏水	90 mL

A.4.3.2 制备

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.4.4 染色

A.4.4.1 将涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染色液,染色 1 min,水洗。

A.4.4.2 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。

A.4.4.3 滴加 95%乙醇脱色,约 30 s,或将乙醇滴满整个涂片,立即倾去,再用乙醇滴满整个涂片,脱色 10 s。

A.4.4.4 水洗,滴加复染液,复染 1 min。水洗,待干,镜检。亦可用 1 : 10 稀释石灰酸复红染色液作复染液,复染时间仅需 10 s。

A.4.4.5 结果

革兰氏阳性菌呈紫色。革兰氏阴性菌呈红色。

A.5 月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤

A.5.1 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 ₂ HPO ₄)	2.75 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	2.75 g
月桂基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制备

将上述成分溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,调节 pH 至 6.8±0.2。分装到有玻璃小倒管的试管中,每管 10 mL。121 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.6 煌绿乳糖胆盐(BGLB)肉汤

A.6.1 成分

蛋白胨	10.0 g
乳糖	10.0 g
牛胆粉(oxgall 或 oxbile)溶液	200 mL
0.1%煌绿水溶液	13.3 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制备

将蛋白胨、乳糖溶于约 500 mL 蒸馏水中,加入牛胆粉溶液 200 mL(将 20.0 g 脱水牛胆粉溶于 200 mL 蒸馏水中,调节 pH 至 7.0~7.5),用蒸馏水稀释到 975 mL,调节 pH 至 7.2±0.1,再加入 0.1% 煌绿水溶液 13.3 mL,用蒸馏水补足到 1 000 mL,用棉花过滤后,分装到有玻璃小倒管的试管中,每管 10 mL。121 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.7 磷酸盐缓冲液

A.7.1 成分

磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	34.0 g
蒸馏水	500 mL

A.7.2 制备

储备液: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±0.2,用蒸馏水稀释至 1 000 mL 后储存于冰箱。



稀释液:取储备液 1.25 mL,用蒸馏水稀释至 1 000 mL,分装于锥形瓶(6.4)中,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.8 无菌生理盐水

A.8.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.8.2 制备

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.9 1 mol/L 氢氧化钠溶液

A.9.1 成分

氢氧化钠(NaOH)	40.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.9.2 制备

称取 40 g 氢氧化钠溶于 1 000 mL 无菌蒸馏水中。

A.10 1 mol/L 盐酸溶液

A.10.1 成分

盐酸(HCl)	90 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.10.2 制法

移取浓盐酸 90 mL,用无菌蒸馏水稀释至 1 000 mL。

附 录 B
(规范性附录)
大肠菌群乳糖胆盐发酵法试验程序图

大肠菌群乳糖胆盐发酵法试验程序见图 B.1。

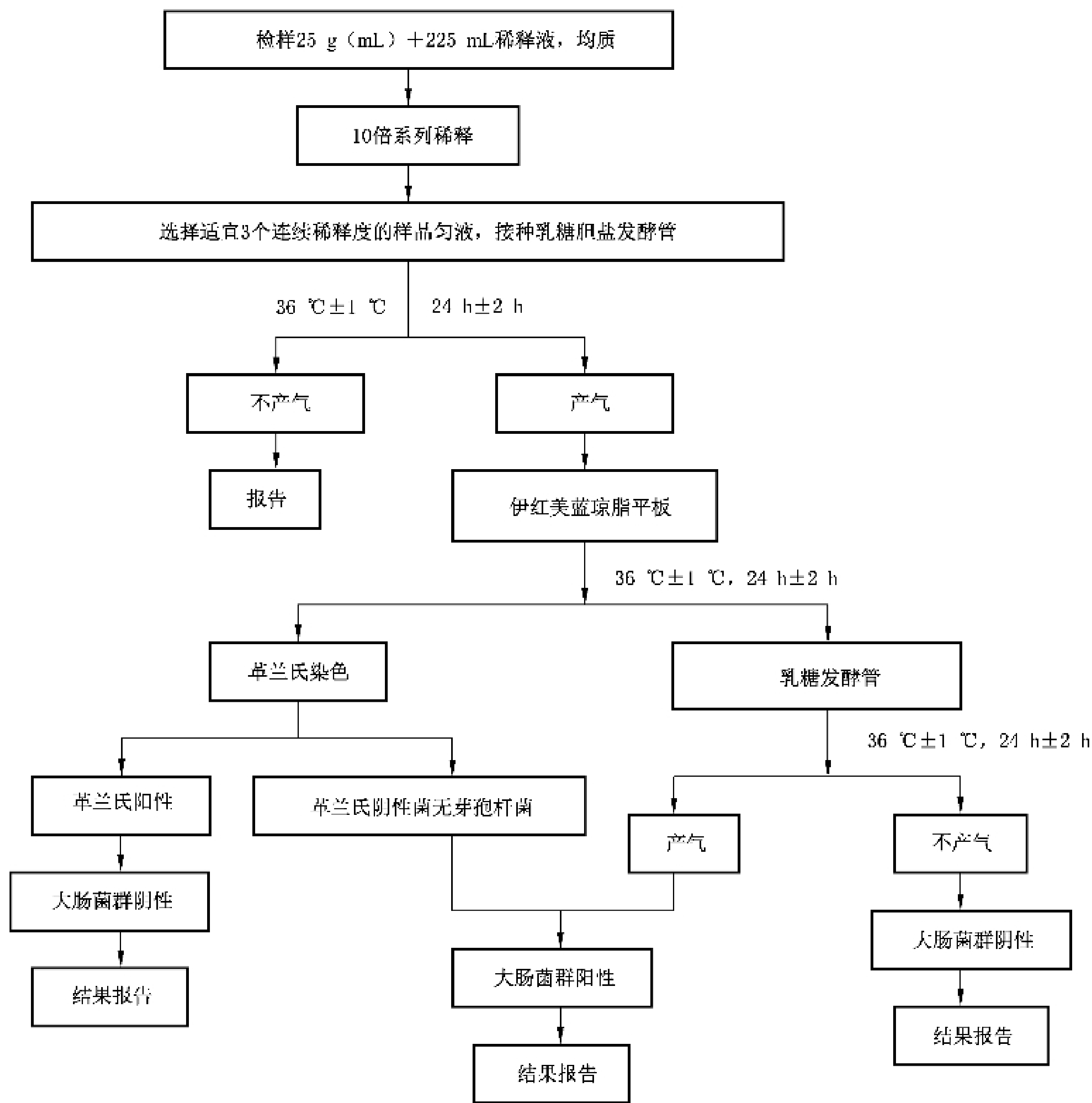


图 B.1 大肠菌群乳糖胆盐发酵法试验程序

附 录 C
(规范性附录)
大肠菌群 LST 发酵法试验程序图

大肠菌群 LST 发酵法试验程序见图 C.1。

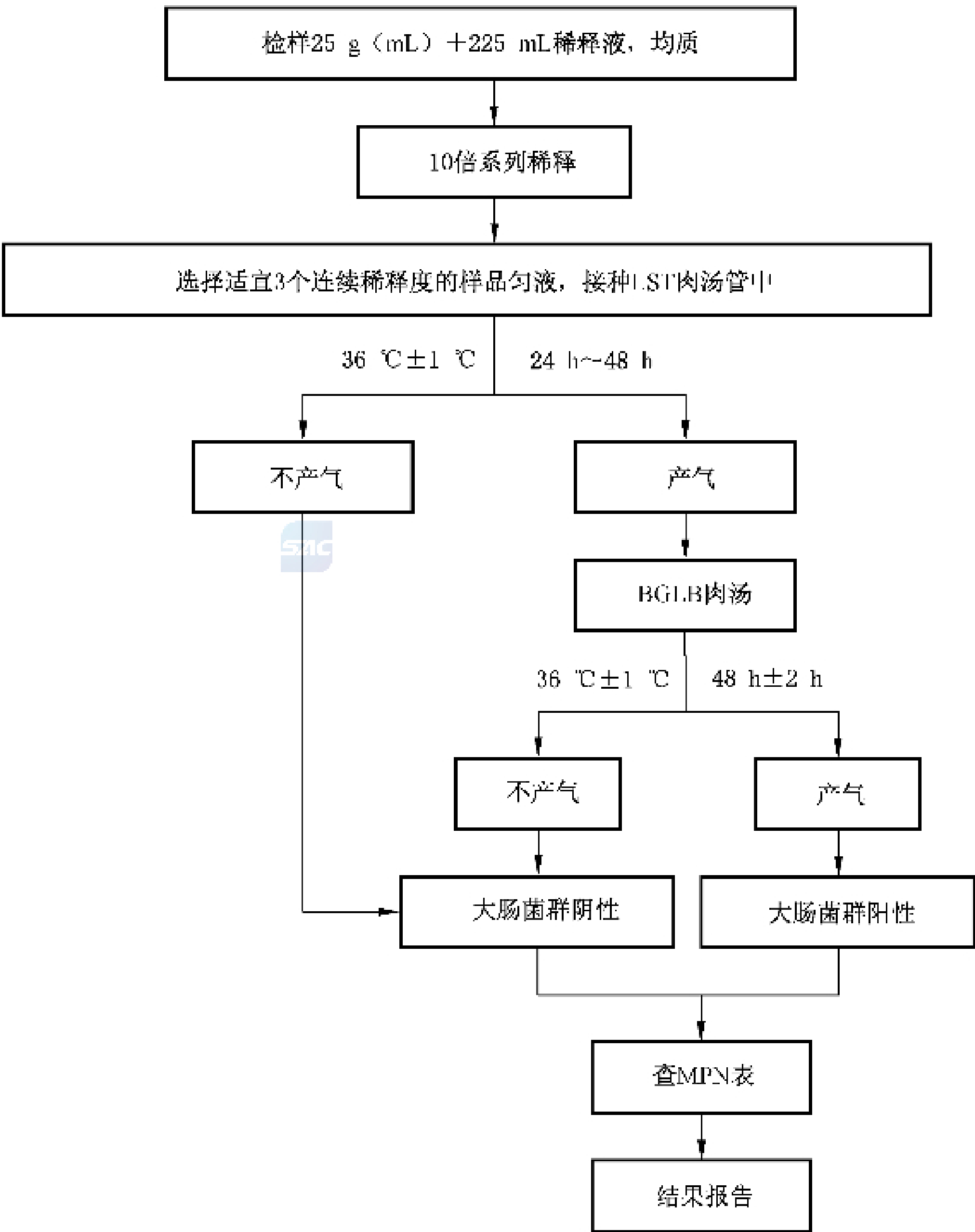


图 C.1 大肠菌群 LST 发酵法试验程序

附 录 D
(规范性附录)

乳糖胆盐发酵法大肠菌群最可能数(MPN)检索表

每 100 g(mL) 检样中大肠菌群最可能数(MPN)的检索,见表 D.1。表内所列检样量如改用 10 g(mL)、1 g(mL)和 0.1 g(mL)时,表内数字相应降低 10 倍;如改用 0.1 g(mL)、0.01 g(mL)和 0.001 g(mL)时,表内数字相应增加 10 倍,其余可类推。

表 D.1 乳糖胆盐发酵法大肠菌群最可能数(MPN)检索表

阳性管数 ^a			MPN	95%可信限	
1 g(mL)×3	0.1 g(mL)×3	0.01 g(mL)×3		上限	下限
0	0	0	<30	<5	90
0	0	1	30	<5	90
0	0	2	60	<5	90
0	0	3	90	<5	90
0	1	0	30	<5	130
0	1	1	60	<5	130
0	1	2	90	<5	130
0	1	3	120	<5	130
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	—	—
1	2	1	150	—	—

表 D.1（续）

阳性管数 ^a			MPN	95%可信限	
1 g(mL)×3	0.1 g(mL)×3	0.01 g(mL)×3		上限	下限
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	—	—
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

表 D.1（续）

阳性管数 ^a			MPN	95%可信限	
1 g(mL)×3	0.1 g(mL)×3	0.01 g(mL)×3		上限	下限
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	1500	48 000
3	3	3	≥24 000	—	—
^a 本表采用 3 个稀释度[1 g(mL)、0.1 g(mL)和 0.01 g(mL)],每个稀释度接种 3 管。					

附 录 E
(规范性附录)

LST 发酵法大肠菌群最可能数(MPN)检索表

每克(毫升)[g(mL)]检样中大肠菌群最可能数(MPN)的检索,见表 E.1。表内所列检样量如改用 1 g(mL)、0.1 g(mL)和 0.01 g(mL)时,表内数字相应降低 10 倍;如改用 0.01 g(mL)、0.001 g(mL)和 0.000 1 g(mL)时,表内数字相应增加 10 倍,其余可类推。

表 E.1 LST 法大肠菌群最可能数(MPN)检索表

阳性管数 ^a			MPN	95%可信限	
0.1 g(mL)×3	0.01 g(mL)×3	0.001 g(mL)×3		上限	下限
0	0	0	<3.0	9.5	—
0	0	1	3.0	9.6	0.15
0	1	0	3.0	11	0.15
0	1	1	6.1	18	1.2
0	2	0	6.2	18	1.2
0	3	0	9.4	38	3.6
1	0	0	3.6	18	0.17
1	0	1	7.2	18	1.3
1	0	2	11	38	3.6
1	1	0	7.4	20	1.3
1	1	1	11	38	3.6
1	2	0	11	42	3.6
1	2	1	15	42	4.5
1	3	0	16	42	4.5
2	0	0	9.2	38	1.4
2	0	1	14	42	3.6
2	0	2	20	42	4.5
2	1	0	15	42	3.7
2	1	1	20	42	4.5
2	1	2	27	94	8.7
2	2	0	21	42	4.5
2	2	1	28	94	8.7
2	2	2	35	94	8.7
2	3	0	29	94	8.7
2	3	1	36	94	8.7
3	0	0	23	94	4.6

表 E.1（续）

阳性管数 ^a			MPN	95%可信限	
0.1 g(mL)×3	0.01 g(mL)×3	0.001 g(mL)×3		上限	下限
3	0	1	38	110	8.7
3	0	2	64	180	17
3	1	0	43	180	9
3	1	1	75	200	17
3	1	2	120	420	37
3	1	3	160	420	40
3	2	0	93	420	18
3	2	1	150	420	37
3	2	2	210	430	40
3	2	3	290	1 000	90
3	3	0	240	1 000	42
3	3	1	460	2 000	90
3	3	2	1 100	4 100	180
3	3	3	>1 100	—	420
^a 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。					
