

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 555—2002

动物产品中大肠菌群、粪大肠菌群 和大肠杆菌的检测方法

Detection methods for coliform group, faecal coliform group,
coliform bacteria in animal products

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌是食品卫生的三项重要的卫生指标。当前国际上采用的方法有美国公职分析化学家协会(AOAC)方法及日本人介绍的煌绿乳糖胆盐肉汤(BGLB)和 EC 试管发酵法。为满足要求,依照日本采用的 BGLB 和 EC 试管发酵法并进行适当改进,建立了本检测方法。本方法用 BGLB 发酵管检测大肠菌群并计算最大可能数(MPN)值,用 EC 肉汤发酵管检测粪大肠菌群并计算 MPN 值,在检测粪大肠菌群的基础上通过生化鉴定检测大肠杆菌并计算 MPN 值,鉴定中省去了革兰氏染色。这些重要改进缩短了检验时间,简化了操作程序,而且经对比试验证明结果可靠,适合于动物产品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌的检测。

本标准的附录 A 是规范性附录,附录 B 是资料性附录。

本标准由农业部畜牧兽医局提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:天津动植物检疫局。

本标准主要起草人:秦贞奎、张碧波、侯艳梅、杨金良、薛振源。

动物产品中大肠菌群、粪大肠菌群 和大肠杆菌的检测方法

1 范围

本标准规定了动物产品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌的检测方法。
本标准适用于动物产品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌的检测。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准

2.1

大肠菌群 coliforms; coliform group

一群能分解乳糖产酸产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽胞杆菌。

2.2

粪大肠菌群 faecal coliforms; faecal coliforms group

44.5℃发酵乳糖产气的一群细菌,是用来表示来源于粪便的大肠菌群。

2.3

大肠杆菌 escherichia coli; coliform bacteria

符合大肠菌群和粪大肠菌群定义,用IMViC(靛基质、甲基红、维培和西蒙氏柠檬酸盐)生化试验进一步鉴定,四种生化反应结果依次为++--和-+-+的细菌。

2.4

最大可能数 most probable number, MPN

采用多次稀释方法所求得的最近似数,是通过概率计算出来的。

2.5 IMViC

靛基质试验、甲基红试验、维培(VP)试验和枸橼酸盐利用试验的缩写。

3 检测方法

3.1 材料准备

3.1.1 仪器

吸管,恒温水浴箱,培养箱,匀浆器,100 mL、200 mL 和 500 mL 三角瓶及广口瓶,直径 5 mm 的玻璃珠。

3.1.2 培养基及试剂

配制方法见附录 A(规范性附录)。

3.1.2.1 煌绿乳糖胆盐肉汤(BGLB),配制方法见第 A.1 章。

3.1.2.2 EC 肉汤,配制方法见第 A.2 章。

3.1.2.3 伊红美蓝琼脂(EMB),配制方法见第 A.3 章。

3.1.2.4 甲基红-维培(MR-VP)培养基,配制方法见第 A.4 章。

3.1.2.5 西蒙氏柠檬酸盐培养基,配制方法见第 A.5 章。

- 3.1.2.6 靛基质(吲哚)试验培养基,配制方法见第 A.6 章。
- 3.1.2.7 科瓦克(Kovacs)氏靛基质试剂,配制方法见第 A.7 章。
- 3.1.2.8 甲基红指示剂,配制方法见第 A.8 章。
- 3.1.2.9 维培(VP)试剂,配制方法见第 A.9 章。

3.2 检测程序

本标准的检测程序见图 1。

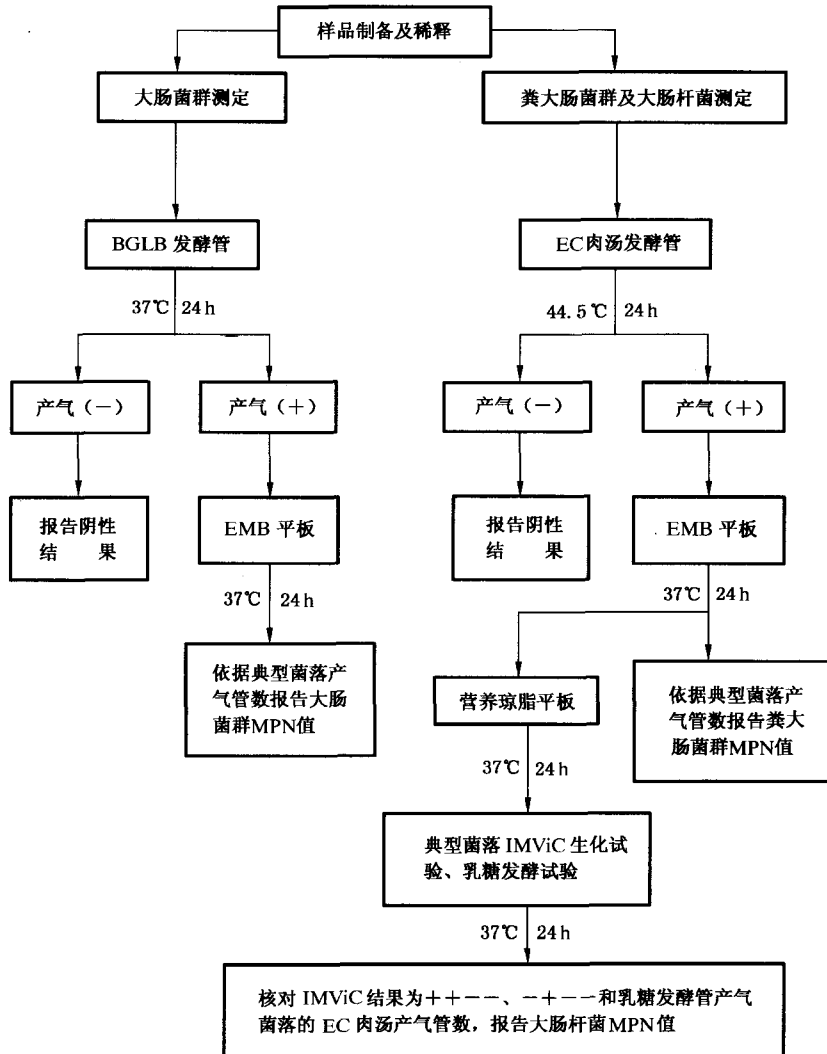


图 1 检测程序流程图

3.3 样品制备

3.3.1 无菌操作从动物产品中采取有代表性的样品

如有包装则用 75%乙醇在开口处擦拭后取样。若不能及时检测,应将冷冻样品置于-15℃冰箱保存。非冷冻而易腐的样品,应置于 4℃冰箱保存。检测前冷冻样品可于 2℃~-5℃下在 18 h 内,或于 45℃下在 15 min 内解冻。

3.3.2 不同样品匀浆液的制备

3.3.2.1 液体样品:以无菌吸管取样 25 mL 加入到装有 225 mL 灭菌生理盐水的灭菌玻璃瓶(瓶内预置适当数量的玻璃珠)内,制成 1:10 的样品匀浆。

3.3.2.2 固体和半固体样品:以无菌操作取样 25 g,加入到装有 225 mL 灭菌生理盐水的灭菌匀浆器内,于 8 000 r/min 均浆 2 min,制成 1:10 样品匀浆(也可用灭菌乳钵研磨的方式代替)。

3.3.2.3 样品稀释液的制备:根据样品污染情况,用灭菌生理盐水将样品匀浆制成一系列十倍递增的样品稀释液(通常采用 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 稀释)。从制备样品匀浆至稀释完毕,全过程不得超过15 min。

3.4 大肠菌群的测定

3.4.1 大肠菌群 MPN 值的测定

3.4.1.1 每个样品通常选用 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 三个连续稀释度的样品稀释液,每个稀释度接种三管BGLB(见第A.1章),每管接种1 mL,每接种一个稀释度换一支无菌吸管。

3.4.1.2 将接种管置于 $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 培养24 h。

3.4.1.3 观察试管的产气情况:检查管内是否有气泡产生,并记录24 h内产气的BGLB管数。如所有培养管均未产气,则报告大肠菌群阴性;如有产气管,进一步试验证实。

3.4.2 大肠菌群的证实试验

3.4.2.1 将所有产气管中的培养物用接种环接种到伊红美蓝琼脂平板, $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 培养24 h。

3.4.2.2 大肠菌群在伊红美蓝琼脂平板上生长,其菌落为有金属光泽、黑紫色或紫色带黑心。

3.4.2.3 查有金属光泽、黑紫色或紫色带黑心菌落的BGLB产气管数及其稀释倍数。

3.4.2.4 结果报告:按3.4.2.3检查结果,查MPN检索表(见附录B),报告大肠菌群的MPN/g(mL)值。

3.5 粪大肠菌群测定

3.5.1 粪大肠菌群 MPN 值的测定

3.5.1.1 每个样品通常选用 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 三个连续稀释度的样品稀释液,每个稀释度接种三管EC肉汤,每管接种1 mL。

3.5.1.2 将所有接种的EC肉汤管于30 min内置于温度为 $(44.5\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 的带盖水浴箱内,培养 (24 ± 2) h。水浴箱的水面应高于肉汤培养基液面。用 44.5°C 产气阳性的大肠杆菌和 44.5°C 不产气的大肠杆菌或其他大肠菌群细菌作阳性和阴性对照。

3.5.1.3 记录EC管的产气情况。EC肉汤管都不产气为粪大肠菌群阴性,产气为粪大肠菌群阳性。将产气管作证实试验。

3.5.2 证实试验

3.5.2.1 将产气管接种伊红美蓝平板在 $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 培养24 h。

3.5.2.2 查有金属光泽、紫色带黑心菌落的EC产气管数及其稀释倍数。

3.5.2.3 结果报告:按3.5.2.2结果,查MPN检索表(见附录B)。报告粪大肠菌群的MPN/g(mL)值。

3.6 大肠杆菌测定

3.6.1 培养

将3.5.2.1中伊红美蓝平板上典型大肠杆菌菌落接种到营养琼脂平板,在 $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 培养18 h~24 h。每个平板至少挑选2个菌落。

3.6.2 生化试验

挑取上述菌落纯培养物接种3.6.3生化培养基和乳糖发酵管, $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 培养24 h后观察结果。

3.6.3 大肠杆菌与非大肠杆菌鉴别试验方法

3.6.3.1 靛基质试验:

- 滴加Kovacs氏靛基质试剂0.1 mL于靛基质试验培养基中混合,静置,观察结果。
- 出现红色环的为反应阳性;出现黄色环的为反应阴性。

3.6.3.2 甲基红(MR)试验:

- 滴加甲基红指示剂0.2 mL于MR-VP培养基中混合,观察结果。
- 出现红色为阳性反应;出现黄色为阴性反应。

3.6.3.3 维培(VP)试验:

- 滴加VP试剂甲液0.2 mL于MR-VP培养基中混匀,再滴加VP试剂乙液0.1 mL混匀,静

置,观察结果。

b) 在 15 min 内出现红色的为阳性反应;无颜色变化的为阴性反应。阴性结果 1 h 后再观察一次,出现红色也为阳性反应。

3.6.3.4 西蒙氏柠檬酸盐试验:观察培养基颜色变化,出现蓝色为阳性反应;不变色为阴性反应。

3.6.4 大肠杆菌鉴定结果

应符合表 1 要求。

表 1 大肠杆菌鉴定结果

脲基质	MR	VP	西蒙氏柠檬酸盐	鉴定(型别)
+	+	-	-	典型大肠埃希氏杆菌
-	+	-	-	非典型大肠埃希氏杆菌
+	+	-	+	典型柠檬酸盐杆菌
-	+	-	+	非典型柠檬酸盐杆菌
-	-	-	+	典型产气肠杆菌
+	-	-	+	非典型产气肠杆菌

如出现表 1 以外的生化反应类型,表明培养物可能不纯,应重新划线分离,必要时做重复试验。

3.6.5 结果报告

IMViC 试验结果为++--、-+-+和乳糖发酵管产气者,查其 EC 肉汤产气管数及其稀释倍数,对照附录 B(资料性附录)中 MPN 检索表报告样品中大肠埃希氏杆菌 MPN/g(mL)值。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂配制方法

A.1 煌绿乳糖胆盐肉汤(BGLB)**A.1.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
乳糖	20.0 g
牛胆盐	10.0 g
煌绿水溶液	13.3 g
蒸馏水	10.0 mL

A.1.2 配制方法

将蛋白胨、乳糖溶于约 500 mL 蒸馏水中,加入牛胆盐后用蒸馏水稀释到 970 mL,调 pH7.4。再加入 0.1%煌绿水溶液 13.3 mL,用蒸馏水补足到 1 000 mL。分装到 20×150 mm 试管中(管内有倒立的小发酵管)。每管 10 mL。于 112 kPa 灭菌 15 min,最终 pH(7.2±0.1)。

A.2 EC 肉汤**A.2.1 成分**

胰蛋白胨或酪蛋白胰消化物	20.0 g
3号胆盐或混合胆盐	1.5 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	4.0 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	1.5 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 配制方法

将以上成分溶解于蒸馏水中,分装 16×150 mm 试管(试管内有倒立的小发酵管),每管 8 mL,于 112 kPa 灭菌 15 min,最终 pH(6.9±0.1)。

A.3 伊红美蓝琼脂(EMB)**A.3.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
伊红 Y	0.4 g(或 2%水溶液 20 mL)
乳糖	10.0 g
美蓝	0.065 g(或 0.5%水溶液 13 mL)
磷酸氢二钾	2.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 配制方法

将蛋白胨、磷酸盐和琼脂加到 1 000 mL 蒸馏水中,并加热使其溶解。并分装于三角瓶中。每瓶 100 mL 或 200 mL,75 kPa 灭菌 15 min,最终 pH(7.1±0.2)。使用前将琼脂溶化,于每 100 mL 琼脂中

加5 mL灭菌的20%乳糖水溶液,2 mL的2%伊水溶液和1.3 mL 0.5%的美蓝水溶液,摇匀,冷至45~50℃后倾注平皿。

A.4 MR-VP 培养基

A.4.1 成分

胰胨	7.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钾	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 配制方法

将各成分溶解于蒸馏水中,分装试管中,于是112 kPa 灭菌15 min,最终pH(6.9±0.2)。

A.5 西蒙氏柠檬酸盐培养基

A.5.1 成分

氯化钠	5.0 g
硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.2 g
琼脂	20 g
磷酸氢二铵	1.0 g
2%溴麝香草酚蓝溶液	40 mL
磷酸氢二钾	1.0 g
柠檬酸钠	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 配制方法

先将盐类溶解于水,调整pH6.8,再加琼脂,加温溶化后,加入指示剂,混合均匀后装入试管,112 kPa 灭菌15 min,摆成斜面。

A.6 靛基质试验培养基

A.6.1 成分

胰胨或胰酪胨	10.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 配制方法

加热搅拌溶解胰胨或胰酪胨于蒸馏水中。分装试管,每管5 mL。112 kPa 灭菌15 min。最终pH(6.9±0.2)。

A.7 Kovacs 氏靛基质试剂

A.7.1 成分

对-二甲胺基苯甲醛	5.0 g
戊醇	75.0 mL
盐酸(浓)	25.0 mL

A.7.2 配制方法

将对-二甲胺基溶于戊醇中,然后慢慢加入浓盐酸即可。

A. 8 甲基红指示剂**A. 8.1 成分**

甲基红	0.1 g
95%乙醇	300 mL

A. 8.2 配制方法

将甲基红溶解于 300 mL 乙醇中,加水稀释 500 mL。

A. 9 Voges-Proskauer(V-P)试剂**A. 9.1 成分****A. 9.1.1 甲液**

α -萘酚	5.0 g
无水乙醇	1 000 mL

A. 9.1.2 乙液

氢氧化钾	40.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 9.2 配制方法

A. 9.2.1 甲液:将 α -萘酚溶解于无水乙醇中。

A. 9.2.2 乙液:将氢氧化钾溶解于蒸馏水中。

附录 B
(资料性附录)
MPN 检索表^a

表 B.1 MPN 检索表^a

阳性管数			MPN [mL(g)]	95%可信限	
0.1 mL ^b (g)×3	0.01 mL(g)×3	0.001 mL(g)×3		下限	上限
0	0	0	<3		
0	0	1	3	<0.5	9
0	0	2	6		
0	0	3	9		
0	0	3	9		
0	1	0	3	<0.5	13
0	1	1	6		
0	1	2	9		
0	1	3	12		
0	2	0	6		
0	2	1	9		
0	2	2	12		
0	2	3	16		
0	3	0	9		
0	3	1	13		
0	3	2	16		
0	3	3	19		
1	0	0	4	<0.5 1	20 21
1	0	1	7		
1	0	2	11		
1	0	3	15		
1	1	0	7	1 3	23 36
1	1	1	11		
1	1	2	15		
1	1	3	19		
1	2	0	11	3	36
1	2	1	15		
1	2	2	20		
1	2	3	24		
1	3	0	16		
1	3	1	20		
1	3	2	24		
1	3	3	29		

表 B.1(续)

阳性管数			MPN [mL(g)]	95%可信限	
0.1 mL ^b (g)×3	0.01 mL(g)×3	0.001 mL(g)×3		下限	上限
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	0	2	20		
2	0	3	26		
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	1	2	27		
2	1	3	34		
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
2	2	2	35		
2	2	3	42		
2	3	0	29		
2	3	1	36		
2	3	2	44		
2	3	3	53		
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	0	3	95		
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	1	3	160		
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	2	3	290		
3	3	0	240	36	1 300
3	3	1	460	71	2 400
3	3	2	1 100	150	4 800
3	3	3	≥2 400		

^a 本表采用三管法三个稀释度[0.1 g(mL)、0.01 g(mL)和 0.001(mL)],每个稀释度接种三管。

^b 表内所列检样量如改用 1 g(mL)、0.1 g(mL)和 0.01 g(mL)时,表内数字应相应降低 10 倍;如改用 0.01 g(mL)、0.001 g(mL)和 0.000 1 g(mL)时,则表内数字应相应增加 10 倍,其余类推。