

ICS 67.100.01

C 53

备案号:

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1665—2008

畜禽饮用水中总大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法

Determination of total coliforms and escherichia coli in drinking water for
livestock and poultry - Enzyme substrate method

2008-07-14 发布

2008-08-10 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准中附录A为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部畜牧业司提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：农业部食品质量监督检验测试中心（上海）。

本标准主要起草人：孟瑾、郑冠树、张敏、吴榕、韩奕奕、樊蕴秀、蒋曙光。

畜禽饮用水中总大肠菌群和大肠埃希氏菌的测定 酶底物法

1 范围

本标准规定了畜禽饮用水中总大肠菌群和大肠埃希氏菌的酶底物法测定方法。

本标准适用于畜禽饮用水中总大肠菌群和大肠埃希氏菌的最可能数（MPN）值的快速测定。

本方法可同时检测畜禽饮用水中的总大肠菌群和大肠埃希氏菌。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

在选择性培养基上总大肠菌群产生的特异性生物酶 β -半乳糖苷酶（ β -D-galactosidase），将无色的邻硝基酚- β -D-半乳糖苷（ONPG）水解为黄色的邻硝基酚（ONP），依此测定畜禽饮用水中总大肠菌群最可能数（MPN）值。

在选择性培养基上大肠埃希氏菌产生的特异性生物酶 β -半乳糖苷酶（ β -D-galactosidase），使无色的培养基呈现黄色，同时产生的 β -葡萄糖醛酸酶（ β -glucuronidase）分解4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖醛酸苷（MUG），使4-甲基伞形酮游离并产生荧光物质，在波长366 nm紫外光下产生特征性蓝色荧光，依此测定畜禽饮用水中大肠埃希氏菌最可能数（MPN）值。

4 培养基及试剂

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂；实验用水应符合GB/T 6682中三级水的规定。

4.1 培养基

Minimal Medium ONPG-MUG（MMO-MUG）培养基¹⁾，称取以下试剂：

硫酸铵 [(NH ₄) ₂ SO ₄]	5.0 g
硫酸锰 (MnSO ₄)	0.5 mg
硫酸锌 (ZnSO ₄)	0.5 mg
硫酸镁 (MgSO ₄)	100.0 mg
氯化钠 (NaCl)	10.0 g
氯化钙 (CaCl ₂)	50.0 mg
亚硫酸钠 (Na ₂ SO ₃)	40.0 mg
两性霉素B (amphotericin B)	1.0 mg
邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷 (ONPG)	500.0 mg
4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖醛酸苷 (MUG)	75.0 mg
茄属植物萃取物 (solanum 萃取物)	500.0 mg
N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸钠盐 (HEPES 钠盐)	5.3 g
N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸 (HEPES)	6.9 g

培养基经过 121 °C、5 min 灭菌后，适用于 1 000 mL 水样的测定。

1) 可选用 Colilert 或同类市售商品。

4.2 灭菌生理盐水

称取8.5 g氯化钠 (NaCl)，用适量蒸馏水溶解稀释至1 000 mL，混匀后取90 mL分装到稀释瓶内，121 °C、20 min高压灭菌。

5 仪器和设备

- 5.1 培养箱：36 °C ± 1 °C。
- 5.2 高压蒸汽灭菌锅。
- 5.3 烘箱。
- 5.4 定量盘：定量培养用无菌塑料盘，含 51 个孔穴，每一孔穴可容纳 2 mL 水样。
- 5.5 程控定量封口机。
- 5.6 紫外灯：波长 366 nm。
- 5.7 天平：感量 0.01 g。

6 检验步骤

6.1 试样制备

检测所需水样为 100 mL。必要时，可对水样进行 10 倍稀释，取 10 mL 水样，加入到 90 mL 灭菌生理盐水 (4.2) 中，混匀。

6.2 定性反应

量取 100 mL ± 0.5 mL 水样 (6.1) 于 100 mL 无菌稀释瓶中，加入 2.7 g ± 0.5 g MMO-MUG 培养基粉末 (4.1)，混和均匀，放入 36 °C ± 1 °C 的培养箱 (5.1) 内培养 24 h。

6.3 51 孔定量盘法

6.3.1 量取 100 mL ± 0.5 mL 水样 (6.1) 于 100 mL 无菌稀释瓶中，加入 2.7 g ± 0.5 g MMO-MUG 培养基粉末 (4.1)，混摇均匀使之完全溶解。

6.3.2 将水样 (6.3.1) 全部分装在定量盘 (5.4) 51 个孔穴内，抚平定量盘背面以除去孔穴内气泡，用程控定量封口机 (5.5) 封口，放入 36 °C ± 1 °C 的培养箱 (5.1) 内培养 24 h。

7 结果报告

7.1 结果判读

培养 24 h 后的水样颜色变为黄色则为阳性反应。如果结果为可疑阳性，可延长培养时间到 28 h，再进行结果判读。

7.2 定性反应

7.2.1 总大肠菌群：培养 24 h 后的水样颜色变为黄色则为阳性反应；否则为阴性反应。定性反应结果以 100 mL 水样中总大肠菌群检出或未检出报告。

7.2.2 大肠埃希氏菌：培养 24 h 后的水样颜色变为黄色的，在暗处用波长为 366 nm 的紫外灯照射，有蓝色荧光产生判定为阳性反应；否则为阴性反应。定性反应结果以 100 mL 水样中大肠埃希氏菌检出或未检出报告。

7.3 51 孔定量盘法

7.3.1 总大肠菌群

51 孔定量盘中黄色反应的孔穴计数，对照附录 A 中表 A.1 查出其代表的总大肠菌群最可能数 (MPN) 值，结果以 MPN/100 mL 表示。

注：稀释后检测的水样，定量结果需乘以稀释倍数。

7.3.2 大肠埃希氏菌

51 孔定量盘中荧光反应的孔穴计数，对照附录 A 中表 A.1 查出其代表的大肠埃希氏菌最可能数 (MPN) 值，结果以 MPN/100 mL 表示。

注：稀释后检测的水样，定量结果需乘以稀释倍数。

附录 A
(规范性附录)

51 孔定量盘法不同阳性结果的最可能数 (MPN) 及 95 %可信限

A.1 51 孔定量盘法不同阳性结果的最可能数 (MPN) 及 95 %可信限

表 A.1 51 孔定量盘法大肠菌群最可能数 (MPN) 检索表

阳性数	大肠菌群 (MPN/100 mL)	95 %可信限	
		下限	上限
0	<1	0.0	3.7
1	1.0	0.3	5.6
2	2.0	0.6	7.3
3	3.1	1.1	9.0
4	4.2	1.7	10.7
5	5.3	2.3	12.3
6	6.4	3.0	13.9
7	7.5	3.7	15.5
8	8.7	4.5	17.1
9	9.9	5.3	18.8
10	11.1	6.1	20.5
11	12.4	7.0	22.1
12	13.7	7.9	23.9
13	15.0	8.8	25.7
14	16.4	9.8	27.5
15	17.8	10.8	29.4
16	19.2	11.9	31.3
17	20.7	13.0	33.3
18	22.2	14.1	35.2
19	23.8	15.3	37.3
20	25.4	16.5	39.4
21	27.1	17.7	41.6
22	28.8	19.0	43.9
23	30.6	20.4	46.3
24	32.4	21.8	48.7
25	34.4	23.3	51.2
26	36.4	24.7	53.9
27	38.4	26.4	56.6
28	40.6	28.0	59.5
29	42.9	29.7	62.5
30	45.3	31.5	65.6
31	47.8	33.4	69.0
32	50.4	35.4	72.5
33	53.1	37.5	76.2
34	56.0	39.7	80.1
35	59.1	42.0	84.4
36	62.4	44.6	88.8
37	65.9	47.2	93.7

表 A.1 (续)

阳性数	大肠菌群 (MPN/100 mL)	95 %可信限	
		下限	上限
38	69.7	50.0	99.0
39	73.8	53.1	104.8
40	78.2	56.4	111.2
41	83.1	59.9	118.3
42	88.5	63.9	126.2
43	94.5	68.2	135.4
44	101.3	73.1	146.0
45	109.1	78.6	158.7
46	118.4	85.0	174.5
47	129.8	92.7	195.0
48	144.5	102.3	224.1
49	165.2	115.2	272.2
50	200.5	135.8	387.6
51	>200.5	146.1	—