



动物检疫检验技术

专业教学资源库

水中总大肠菌群的测定



水中总大肠菌群的测定

- **检验依据：** GB/T5750. 12-2006
- **方法：** 多管发酵法



总大肠菌群

- 总大肠菌群

– 37℃、发酵乳糖、需氧和兼性厌氧、革兰氏阴性、无芽孢杆菌

- 总大肠菌群

粪大肠菌群（耐热--）

非粪大肠菌群

EC肉汤
44.5±0.5℃



总大肠菌群

- **MPN** (most probable number)
 - 最可能数或最近似数
- **总大肠菌群MPN**
 - 100mL水样中所含的总大肠菌群的最近似数或最可能数



指示菌（总大肠菌群）

- **指示菌**应具有的条件

和肠道致病菌的来源相同

在外界环境中的生存时间长

检验方法比较简便



实验目标

- 掌握生活饮用水总大肠菌群的测定方法
- 掌握水源水总大肠菌群的测定方法
- 判定水被肠道致病菌污染的程度和水的卫生质量



实验内容

- 1 培养基制备
- 2 乳糖发酵试验
- 3 分离培养
- 4 证实试验
- 5 结果分析与报告



实验器材

- 水样
 - 生活饮用水、水源水
- 培养基
 - 乳糖蛋白胨培养液、伊红美兰培养基
- 试剂
 - 革兰氏染色液、稀释剂等



实验器材

- 其他

- 无菌工作台、酒精灯、稀释液、灭菌吸管、灭菌试管、小倒管、试管架、接种环、恒温培养箱、高压蒸汽灭菌器、载玻片、香柏油、平皿、天平、电炉等。



培养基制备

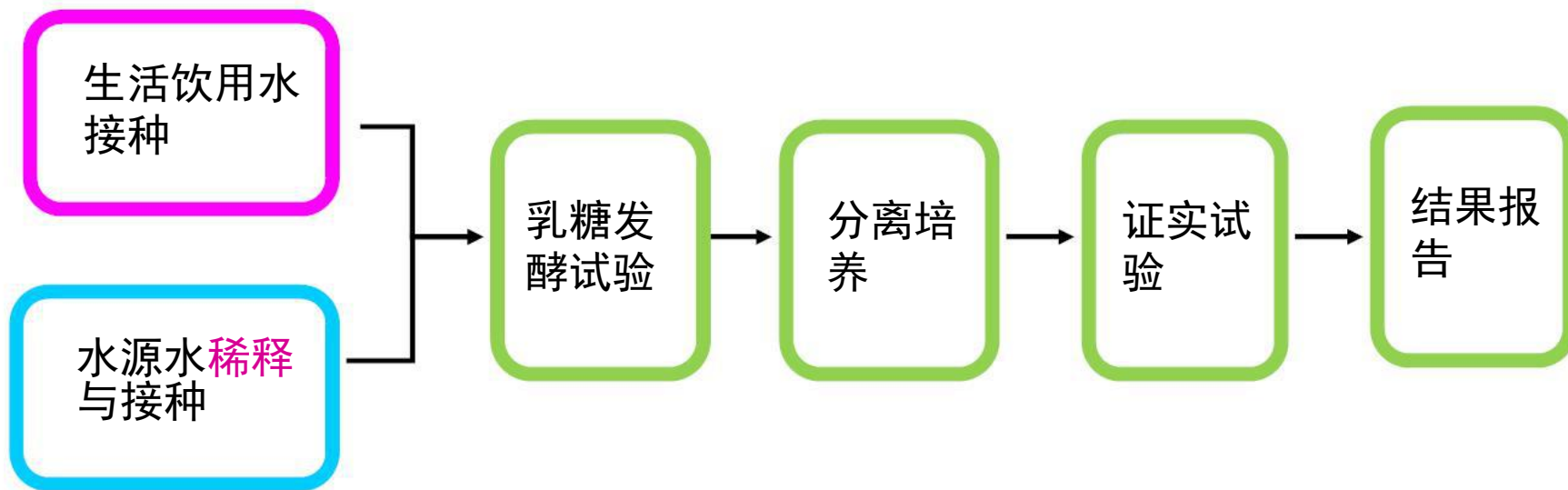
- 乳糖发酵管
 - 双料管
 - 单料管
- 伊红美兰平板

放置
小倒
管并
排气





检验程序





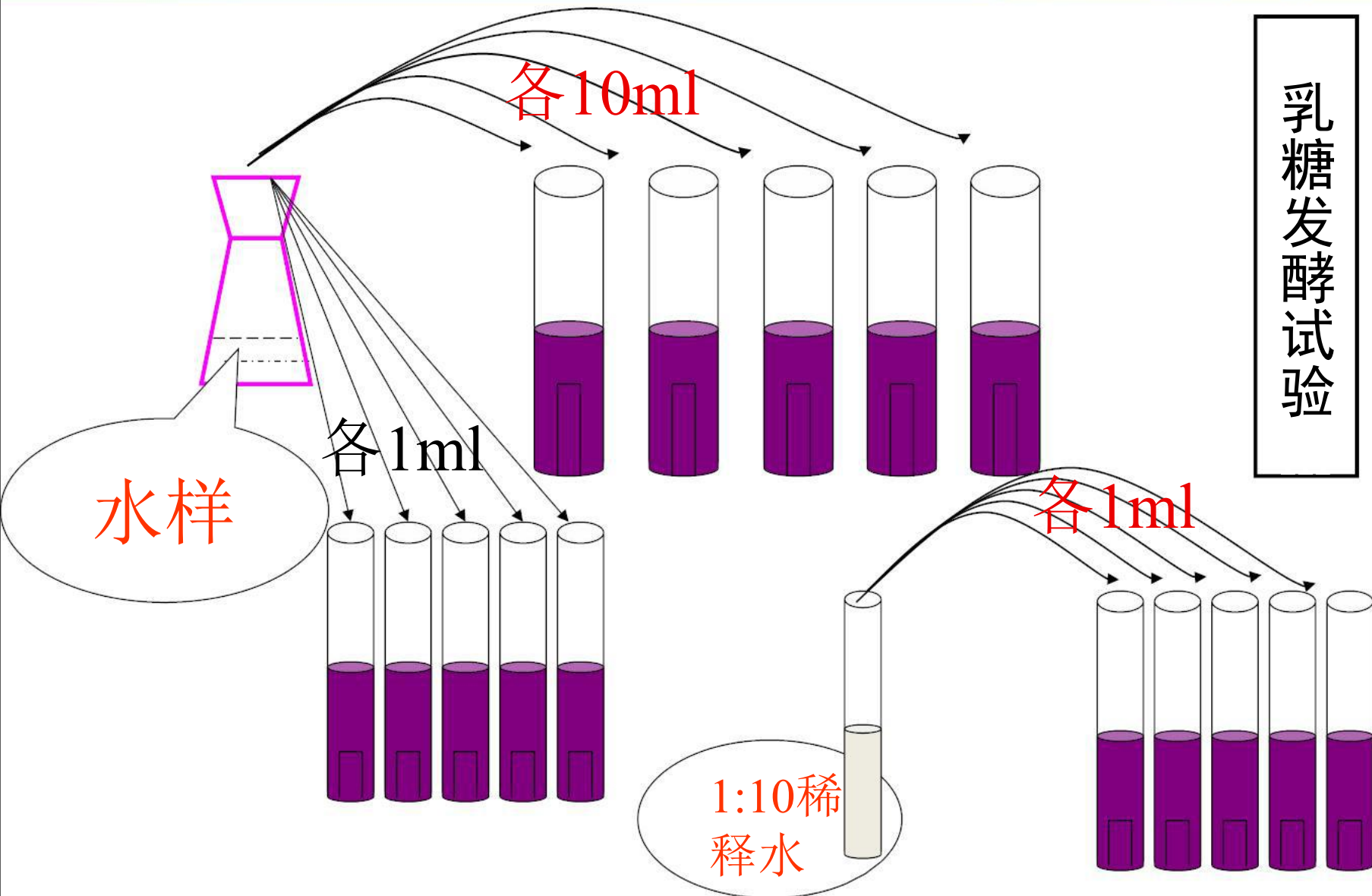
一、乳糖发酵（初发酵）试验

- 自来水

- 直接接种10mL水样于双料培养基，每个水样共接种5管

- 水源水

- 加大稀释度，每个稀释度接种5管，每个水样共接种15管





一、乳糖发酵（初发酵）试验

- 培养

- 36℃ ± 1℃

- 24h ± 2h

- 观察产酸产气情况

- 不产酸产气

- 产酸产气





第二天



二、分离培养

- 产酸产气的发酵管
分别转种EMB平板
(分区划线)
 - $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
 - $24\text{h} \pm 2\text{h}$





第三天



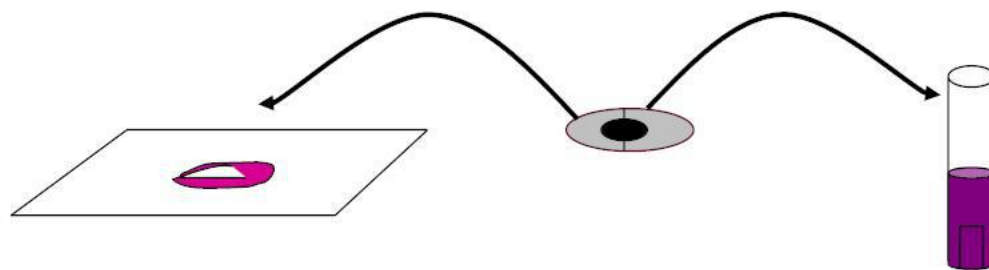
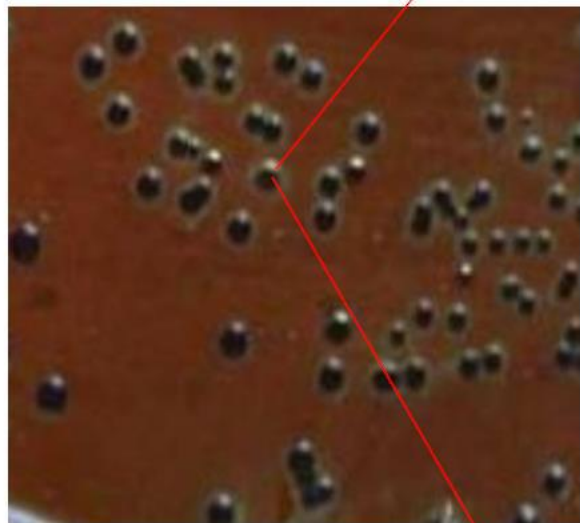
三、证实试验（复发酵试验）

- 观察EMB平板菌落形态
 - 深紫黑色、具有金属光泽的菌落
 - 紫黑色、不带或略带金属光泽的菌落
 - 淡紫红色、中心较深的菌落





一半进行涂片、染色、镜检



另一半进行接种
(证实试验用)



三、证实试验（复发酵试验）

- 只有染色镜检为革兰氏阴性无芽孢杆菌才接种乳糖蛋白胨管
 - 36℃ ± 1℃
 - 24h ± 2h



第四天



四、结果报告

- 观察乳糖发酵管产气情况
 - 产酸产气者，即证实有总大肠菌群存在
- 查MPN 检索表
 - 根据证实为总大肠菌群阳性的管数
- 报告每100ml水样中的总大肠菌群最可能数（MPN）



四、结果报告

- 5管法结果见表1， 15管法结果见表2



四、结果报告

表1 用5份10mL水样时各种阳性和阴性结果组合时的最可能数 (MPN)

5个10mL管中阳性管数	最可能数 (MPN)
0	<2.2
1	2.2
2	5.1
3	9.2
4	16.0
5	>16.0



四、结果报告

表2 总大肠菌群MPN检索表(部分)

(总接种量55.5mL, 其中5份10mL水样, 5份1mL水样, 5份0.1mL水样)

接种量/ mL			总大肠菌群 /(MPN/ 100mL)	接种量/ mL			总大肠菌群 /(MPN/ 100mL)
10ml管	1ml管	0.1ml管		10ml管	1ml管	0.1ml管	
0	0	0	<2	1	0	0	2
0	0	1	2	1	0	1	4
0	0	2	4	1	0	2	6
0	0	3	5	1	0	3	8
0	0	4	7	1	0	4	10
0	0	5	9	1	0	5	12



四、结果报告

- **稀释样品查表后所得结果应乘稀释倍数**
 - 表2采用3个稀释度（10mL、1mL 和0.1mL），每个稀释度5管
 - 表2内所列接种量如改用100mL、10mL和1mL时，表内数字应相应降低10倍；如改为1mL、0.1mL和 0.01mL时，则表内数字应相应增加10倍。其余可类推。



四、结果报告

- 所有乳糖发酵管均阴性，可报告总大肠菌群未检出。



注意事项

1. 无菌操作。
2. 每递增稀释一次，即换一支1mL灭菌吸管。
3. 培养基使用前应先检查培养基内小倒管中是否有气泡。
4. 接种量在1ml及以下时用单料培养基，接种量超过1ml时用双料培养基。
5. 检样从开始稀释到接种所用时间不宜超过15min。



习题作业

1. 判断食品是否被肠道致病菌所污染及其污染程度时，常用总大肠菌群作为指示菌来表示，该指示菌应具备的条件有哪些。
2. 总大肠菌群和粪大肠菌群有什么区别？如何区分粪大肠菌群和非粪大肠菌群。



习题作业

3. 检样从开始稀释到接种所用时间不宜超过15min，为什么？
4. 单料和双料培养基有什么区别？什么时候使用双料培养基？
5. 生活饮用水的菌落总数、总大肠菌群标准是多少？畜禽饮用水总大肠菌群标准是多少？



动物检验检疫技术

专业教学资源库

Thank You!