ICS 65.080
B 10

中华人民共和国国家标准

GB/T 19524.1—2004

肥料中粪大肠菌群的测定

Determination of fecal coliforms in fertilizers

2004-05-31 发布　　2004-10-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会　发布

中国标准出版社
数码防伪

前　言

本标准的附录A、附录B为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部种植业管理司提出。

本标准起草单位：农业部微生物肥料质量监督检验测试中心。

本标准主要起草人：曹凤明、沈德龙、李俊、姜昕、李生。

肥料中粪大肠菌群的测定

1 范围

本标准规定了肥料中粪大肠菌群的测定方法。

2 定义

下列定义适用于本标准。

粪大肠菌群 fecal coliforms

一群在44.5℃±0.5℃条件能发酵乳糖、产酸产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽胞杆菌。

粪大肠菌群数为每克(毫升)肥料样品中粪大肠菌群的最可能数(MPN)。

3 仪器设备

高压蒸汽灭菌器;显微镜;恒温水浴或隔水式培养箱;恒温旋转式摇床;干燥箱;天平;酸度计或精密pH试纸;接种环;试管(15 mm×150 mm);小套管(杜兰管);移液管;三角瓶;培养皿;载玻片;玻璃珠;酒精灯;试管架。

4 培养基和试剂

4.1 培养基:遵照附录A的规定。

4.2 革兰氏染色液:遵照附录B的规定。

5 检验步骤

5.1 样品稀释

在无菌操作下称取样品10.0 g或吸取样品10 mL,加入到带玻璃珠的90 mL无菌水中,置于摇床上200 r/min充分振荡30 min,即成10^{-1}稀释液。

用无菌移液管吸取5.0 mL上述稀释液加入到45 mL无菌水中,混匀成10^{-2}稀释液。这样依次稀释,分别得到10^{-3},10^{-4}等浓度稀释液(每个稀释度须更换无菌移液管)。

5.2 乳糖发酵试验

选取三个连续适宜稀释液,分别吸取不同稀释液1.0 mL加入到乳糖胆盐发酵管内,每一稀释度接种3支发酵管,置44.5℃±0.5℃恒温水浴或隔水式培养箱内,培养24 h±2 h。如果所有乳糖胆盐发酵管都不产酸不产气,则为粪大肠菌群阴性;如果有产酸产气或只产酸的发酵管,则按5.3进行。

5.3 分离培养

从产酸产气或只产酸的发酵管中分别挑取发酵液在伊红美蓝琼脂平板上划线,置36℃±1℃条件下培养18 h~24 h。

5.4 证实试验

从5.3分离平板上挑取可疑菌落,进行革兰氏染色。染色反应阳性者为粪大肠菌群阴性;如果为革兰氏阴性无芽胞杆菌则挑取同样菌落接种在乳糖发酵管中,置44.5℃±0.5℃条件下培养24 h±2 h。观察产气情况,不产气为粪大肠菌群阴性;产气为粪大肠菌群阳性。

5.5 结果

证实试验为粪大肠菌群阳性的,根据粪大肠菌群阳性发酵管数,查MPN检索表,得出每克(毫升)肥料样品中的粪大肠菌群数。

附 录 A
（规范性附录）
培养基

A.1 乳糖胆盐发酵培养基

蛋白胨	20.0 g
猪胆盐	5.0 g
乳糖	10.0 g
0.004% 溴甲酚紫水溶液	25.0 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH 值	7.2～7.4

制法：将蛋白胨、猪胆盐及乳糖溶解于蒸馏水中，校正 pH，加入溴甲酚紫水溶液，然后分装试管，每管 9 mL，并放入一支倒置的小套管，高压灭菌 115℃、15 min。

注 1：初发酵培养基。

注 2：粪大肠菌群细菌发酵乳糖产酸产气使培养液由紫色变成黄色，套管内充有气体。

A.2 伊红美蓝琼脂培养基

蛋白胨	10.0 g
乳糖	10.0 g
磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	2.0 g
琼脂	20.0 g
2%伊红 Y 水溶液	20.0 mL
0.65%美蓝水溶液	10.0 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH 值	7.2～7.4

制法：将蛋白胨、乳糖、磷酸氢二钾溶解于蒸馏水中，校正 pH，投入琼脂并加热溶解，分装于三角瓶中，高压灭菌 115℃、15 min 备用。伊红和美蓝溶液分别高压灭菌 121℃、20 min。临用时加热熔化培养基，冷却至 50℃～55℃，加入无菌的伊红和美蓝溶液，摇匀，倾注平板。

A.3 乳糖发酵培养基

蛋白胨	20.0 g
乳糖	10.0 g
0.004%溴甲酚紫水溶液	25.0 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH 值	7.2～7.4

制法：将蛋白胨及乳糖溶于水中，校正 pH，加入指示剂，按检验要求分装 3 mL～5 mL，并放入 1 支倒置的小套管，高压灭菌 115℃、15 min。

STANDARDS PRESS OF CHINA

附 录 B
（规范性附录）
革兰氏染色液

B.1 结晶紫染色液

甲液：	结晶紫	2.0 g
	乙醇(95%)	20 mL
乙液：	草酸铵	0.8 g
	蒸馏水	80 mL

将结晶紫研细后，加入95%乙醇使之溶解，配成甲液。将草酸铵溶于蒸馏水中配成乙液，甲液与乙液混合，静置48 h后使用。

B.2 卢哥氏(Lugol)碘液

碘(I_2)	1.0 g
碘化钾(KI)	2.0 g
蒸馏水	300 mL

先将碘化钾溶解在少量蒸馏水(3 mL～5 mL)中，再将碘完全溶解在碘化钾溶液中，然后加入余下的蒸馏水。置于棕色瓶中可保存数月。

B.3 脱色液

95%的乙醇。

B.4 复染液

0.5%的番红水溶液：取2.5 g番红花，溶于100 mL无水乙醇中。取番红乙醇溶液20 mL，加入80 mL蒸馏水，即成0.5%番红水溶液。

中华人民共和国
国家标准
肥料中粪大肠菌群的测定
GB/T 19524.1—2004
*
中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045
网址 www.bzcbs.com
电话:68523946 68517548
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销
*
开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 8千字
2004年7月第一版 2004年7月第一次印刷
*
书号:155066·1-21209 定价 8.00元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533

GB/T 19524.1-2004