



中华人民共和国国家标准

GB 4789.3—2016

食品安全国家标准

食品微生物学检验 大肠菌群计数

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会
国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB 4789.3—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》、GB/T 4789.32—2002《食品卫生微生物学检验 大肠菌群的快速检测》和 SN/T 0169—2010《进出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检测方法》大肠菌群计数部分。

本标准与 GB 4789.3—2010 相比,主要变化如下:

- 增加了检验原理;
- 修改了适用范围;
- 修改了典型菌落的形态描述;
- 修改了第二法平板菌落数的选择;
- 修改了第二法证实试验;
- 修改了第二法平板计数的报告。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 大肠菌群计数

1 范围

本标准规定了食品中大肠菌群(Coliforms)计数的方法。

本标准第一法适用于大肠菌群含量较低的食品中大肠菌群的计数;第二法适用于大肠菌群含量较高的食品中大肠菌群的计数。

2 术语和定义

2.1

大肠菌群 Coliforms

在一定培养条件下能发酵乳糖、产酸产气的需氧和兼性厌氧革兰氏阴性无芽胞杆菌。

2.2

最可能数 Most probable number;MPN

基于泊松分布的一种间接计数方法。

3 检验原理

3.1 MPN 法

MPN 法是统计学和微生物学结合的一种定量检测法。待测样品经系列稀释并培养后,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出待测样品中大肠菌群的最大可能数。

3.2 平板计数法

大肠菌群在固体培养基中发酵乳糖产酸,在指示剂的作用下形成可计数的红色或紫色,带有或不带有沉淀环的菌落。

4 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

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

4.2 冰箱: $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

4.3 恒温水浴箱: $46\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

4.4 天平:感量 0.1 g。

4.5 均质器。

4.6 振荡器。

4.7 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。

4.8 无菌锥形瓶:容量 500 mL。

4.9 无菌培养皿:直径 90 mm。

4.10 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

4.11 菌落计数器。

5 培养基和试剂

5.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨(lauryl sulfate tryptose, LST)肉汤:见 A.1。

5.2 煌绿乳糖胆盐(brilliant green lactose bile, BGLB)肉汤:见 A.2。

5.3 结晶紫中性红胆盐琼脂(violet red bile agar, VRBA):见 A.3。

5.4 无菌磷酸盐缓冲液:见 A.4。

5.5 无菌生理盐水:见 A.5。

5.6 1 mol/L NaOH 溶液:见 A.6。

5.7 1 mol/L HCl 溶液:见 A.7。

第一法 大肠菌群 MPN 计数法

6 检验程序

大肠菌群 MPN 计数的检验程序见图 1。

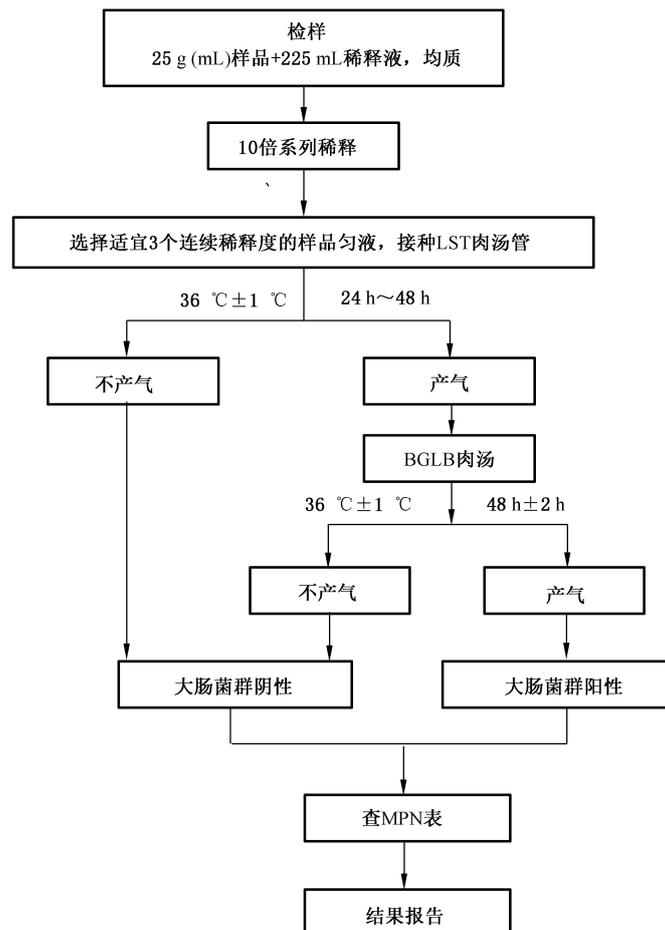


图 1 大肠菌群 MPN 计数法检验程序

7 操作步骤

7.1 样品的稀释

7.1.1 固体和半固体样品:称取 25 g 样品,放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内,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 1:10 的样品匀液。

7.1.2 液体样品:以无菌吸管吸取 25 mL 样品置盛有 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)或其他无菌容器中充分振摇或置于机械振荡器中振摇,充分混匀,制成 1:10 的样品匀液。

7.1.3 样品匀液的 pH 应在 6.5~7.5 之间,必要时分别用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调节。

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

7.1.5 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 1 次,换用 1 支 1 mL 无菌吸管或吸头。从制备样品匀液至样品接种完毕,全过程不得超过 15 min。

7.2 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 管月桂基硫酸盐胰蛋白胨(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 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h,观察倒管内是否有气泡产生,24 h ± 2 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 h ± 2 h,产气者进行复发酵试验。未产气者为大肠菌群阴性。

7.3 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,移种于煌绿乳糖胆盐肉汤(BGLB)管中,36 °C ± 1 °C 培养 48 h ± 2 h,观察产气情况。产气者,计为大肠菌群阳性管。

7.4 大肠菌群最可能数(MPN)的报告

按 7.3 确证的大肠菌群 BGLB 阳性管数,检索 MPN 表(见附录 B),报告每 g(mL)样品中大肠菌群的 MPN 值。

第二法 大肠菌群平板计数法

8 检验程序

大肠菌群平板计数法的检验程序见图 2。

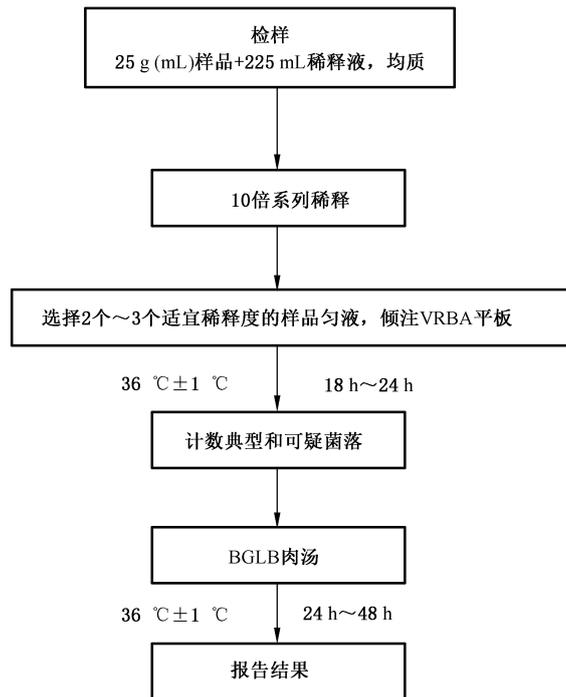


图2 大肠菌群平板计数法检验程序

9 操作步骤

9.1 样品的稀释

按 7.1 进行。

9.2 平板计数

9.2.1 选取 2 个~3 个适宜的连续稀释度, 每个稀释度接种 2 个无菌平皿, 每皿 1 mL。同时取 1 mL 生理盐水加入无菌平皿作空白对照。

9.2.2 及时将 15 mL~20 mL 融化并恒温至 46 °C 的结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)约倾注于每个平皿中。小心旋转平皿, 将培养基与样液充分混匀, 待琼脂凝固后, 再加 3 mL~4 mL VRBA 覆盖平板表层。翻转平板, 置于 36 °C ± 1 °C 培养 18 h~24 h。

9.3 平板菌落数的选择

选取菌落数在 15 CFU~150 CFU 之间的平板, 分别计数平板上出现的典型和可疑大肠菌群菌落(如菌落直径较典型菌落小)。典型菌落为紫红色, 菌落周围有红色的胆盐沉淀环, 菌落直径为 0.5 mm 或更大, 最低稀释度平板低于 15 CFU 的记录具体菌落数。

9.4 证实试验

从 VRBA 平板上挑取 10 个不同类型的典型和可疑菌落, 少于 10 个菌落的挑取全部典型和可疑菌落。分别移种于 BGLB 肉汤管内, 36 °C ± 1 °C 培养 24 h~48 h, 观察产气情况。凡 BGLB 肉汤管产气, 即可报告为大肠菌群阳性。

9.5 大肠菌群平板计数的报告

经最后证实为大肠菌群阳性的试管比例乘以 9.3 中计数的平板菌落数,再乘以稀释倍数,即为每 g(mL) 样品中大肠菌群数。例: 10^{-4} 样品稀释液 1 mL,在 VRBA 平板上有 100 个典型和可疑菌落,挑取其中 10 个接种 BGLB 肉汤管,证实有 6 个阳性管,则该样品的大肠菌群数为: $100 \times 6 / 10 \times 10^4 / \text{g(mL)} = 6.0 \times 10^5 \text{CFU/g(mL)}$ 。若所有稀释度(包括液体样品原液)平板均无菌落生长,则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

附 录 A

培养基和试剂

A.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤

A.1.1 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_2HPO_4)	2.75 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	2.75 g
月桂基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将上述成分溶解于蒸馏水中,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。 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.2 煌绿乳糖胆盐(BGLB)肉汤

A.2.1 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	800 mL

A.2.2 制法

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 $7.0 \sim 7.5$),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。 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.3 结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)

A.3.1 成分

蛋白胨	7.0 g
酵母膏	3.0 g
乳糖	10.0 g

氯化钠	5.0 g
胆盐或 3 号胆盐	1.5 g
中性红	0.03 g
结晶紫	0.002 g
琼脂	15 g~18 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

将上述成分溶于蒸馏水中,静置几分钟,充分搅拌,调节 pH 至 7.4 ± 0.1 。煮沸 2 min,将培养基融化并恒温至 $45\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倾注平板。使用前临时制备,不得超过 3 h。

A.4 磷酸盐缓冲液

A.4.1 成分

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	34.0 g
蒸馏水	500 mL

A.4.2 制法

贮存液: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 后贮存于冰箱。稀释液:取贮存液 1.25 mL,用蒸馏水稀释至 1 000 mL,分装于适宜容器中, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.5 无菌生理盐水

A.5.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.6 1 mol/L NaOH 溶液

A.6.1 成分

NaOH	40.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制法

称取 40 g 氢氧化钠溶于 1 000 mL 无菌蒸馏水中。

A.7 1 mol/L HCl 溶液**A.7.1 成分**

HCl	90 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

移取浓盐酸 90 mL,用无菌蒸馏水稀释至 1 000 mL。

附录 B
大肠菌群最可能数(MPN)检索表

B.1 大肠菌群最可能数(MPN)检索表

每 g(mL) 检样中大肠菌群最可能数(MPN)的检索见表 B.1。

表 B.1 大肠菌群最可能数(MPN)检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	—	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1 000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1 000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2 000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1 100	180	4 100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1 100	420	—

注 1: 本表采用 3 个稀释度[0.1 g(mL)、0.01 g(mL)、0.001 g(mL)], 每个稀释度接种 3 管。
注 2: 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高 10 倍, 其余类推。