

中华人民共和国国家标准

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

National food safety standard

Food microbiological examination: Enumeration of coliforms

2010-03-26 发布

2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

食品伙伴网<http://www.foodmate.net>

前 言

本标准代替GB/T 4789.3-2008《食品卫生微生物学检验 大肠菌群计数》。

本标准与GB/T 4789.3-2008相比，主要修改如下：

——修改了标准的中英文名称；

——“第二法 大肠菌群平板计数法”的平板菌落数的选择范围修改为“15 CFU~150 CFU”；

——删除了“第三法 大肠菌群Petrifilm™ 测试片法”。

本标准的附录A、附录B为规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 4789.3-1984、GB 4789.3-1994、GB /T 4789.3-2003、GB /T 4789.3-2008。

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。

本标准适用于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 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：

3.1 恒温培养箱：36℃±1℃。

3.2 冰箱：2℃～5℃。

3.3 恒温水浴箱：46℃±1℃。

3.4 天平：感量0.1g。

3.5 均质器。

3.6 振荡器。

3.7 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。

3.8 无菌锥形瓶：容量500 mL。

3.9 无菌培养皿：直径90 mm。

3.10 pH计或pH比色管或精密pH试纸。

3.11 菌落计数器。

4 培养基和试剂

4.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨（Lauryl Sulfate Tryptose, LST）肉汤：见附录A中A.1。

- 4.2 煌绿乳糖胆盐（Brilliant Green Lactose Bile, BGLB）肉汤：见附录 A 中 A.2。
- 4.3 结晶紫中性红胆盐琼脂（Violet Red Bile Agar, VRBA）：见附录 A 中 A.3。
- 4.4 磷酸盐缓冲液：见附录 A 中 A.4。
- 4.5 无菌生理盐水：见附录 A 中 A.5。
- 4.6 无菌 1 mol/L NaOH：见附录 A 中 A.6。
- 4.7 无菌 1 mol/L HCl：见附录 A 中 A.7。

第一法 大肠菌群 MPN 计数法

5 检验程序

大肠菌群MPN计数的检验程序见图1。

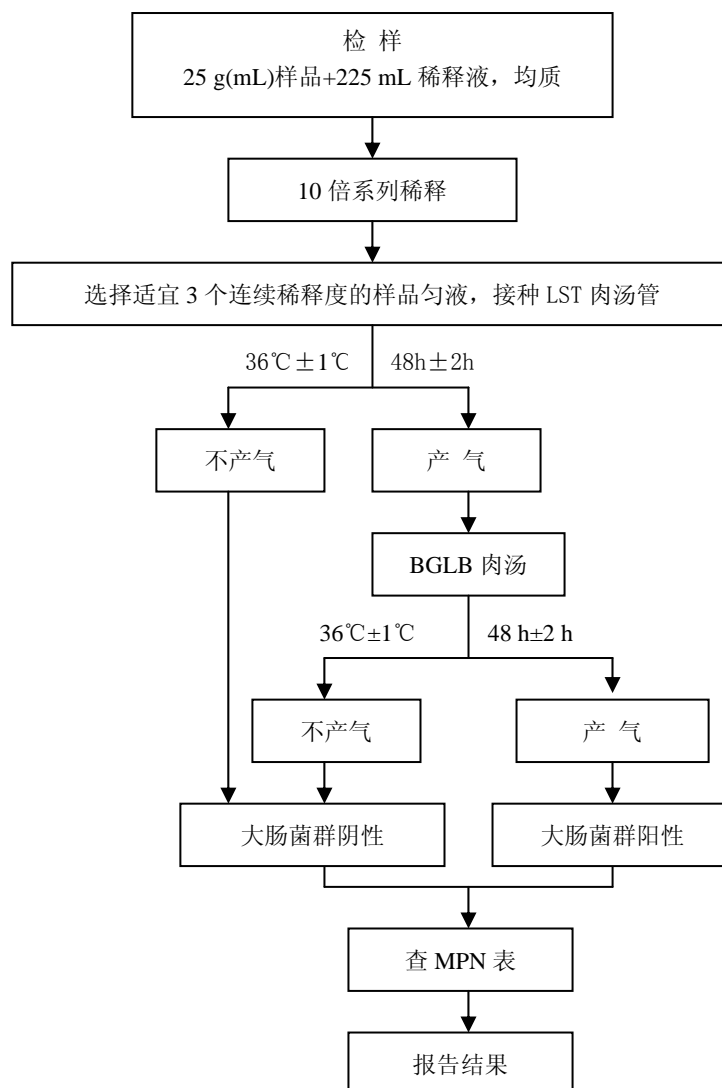


图1 大肠菌群 MPN 计数法检验程序

6 操作步骤

6.1 样品的稀释

6.1.1 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，8000 r/min~10000 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。

6.1.2 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）中，充分混匀，制成 1:10 的样品匀液。

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

6.1.4 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。

6.1.5 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。

6.2 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1mL(如接种量超过1 mL, 则用双料LST肉汤), 36℃±1℃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, 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。

6.3 复发酵试验

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℃±1℃培养48 h±2 h, 观察产气情况。产气者, 计为大肠菌群阳性管。

6.4 大肠菌群最可能数(MPN)的报告

按6.3确证的大肠菌群LST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

7 检验程序

大肠菌群平板计数法的检验程序见图2。

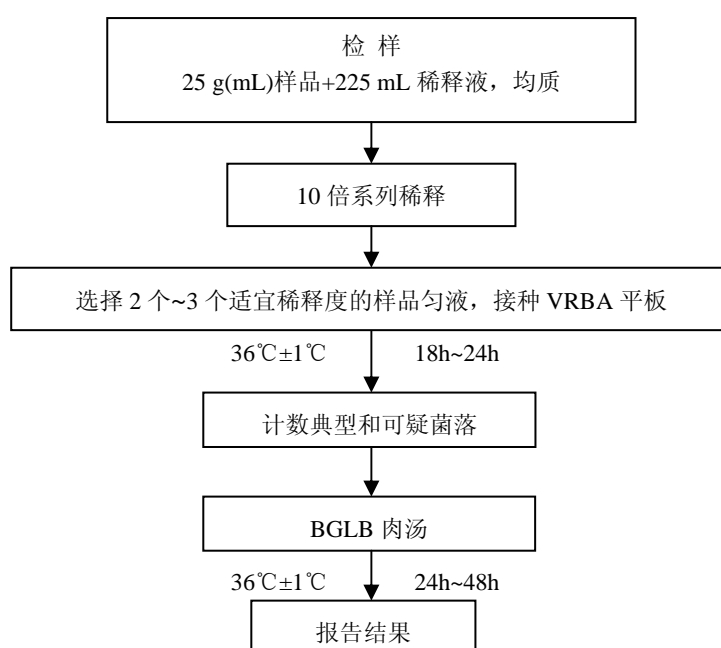


图2 大肠菌群平板计数法检验程序

8 操作步骤

8.1 样品的稀释

按6.1进行。

8.2 平板计数

8.2.1 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。

8.2.2 及时将15 mL~20 mL冷至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。

8.3 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。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。

8.4 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,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。

8.5 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8.3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:100×6/10×10⁴/g(mL)=6.0×10⁵ CFU/g(mL)。

附录A
(规范性附录)
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 |
| pH 6.8±0.2 | |

A.1.2 制法

将上述成分溶解于蒸馏水中，调节 pH。分装到有玻璃小倒管的试管中，每管 10 mL。121 °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 |
| pH 7.2±0.1 | |

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 7.0~7.5），用蒸馏水稀释到 975 mL，调节 pH，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 °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 |
| pH 7.4±0.1 | |

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。煮沸2 min，将培养基冷却至45℃～50℃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 ₂ PO ₄) | 34.0 g |
| 蒸馏水 | 500 mL |
| pH 7.2 | |

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，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℃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℃高压灭菌15 min。

A.6 1 mol/L NaOH

A.6.1 成分

| | |
|------|---------|
| NaOH | 40.0 g |
| 蒸馏水 | 1000 mL |

A.6.2 制法

称取40 g氢氧化钠溶于1 000 mL蒸馏水中，121℃高压灭菌15 min。

A.7 1 mol/L HCl

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，用蒸馏水稀释至1 000 mL，121℃高压灭菌15 min。

附录B
(规范性附录)
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 | 1100 | 180 | 4,100 |
| 2 | 1 | 2 | 27 | 8.7 | 94 | 3 | 3 | 3 | >1100 | 420 | -- |

注 1: 本表采用 3 个稀释度[0.1 g(mL)、0.01 g(mL)和 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 1g (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)、0.0001 g(mL)时, 则表内数字应相应增高 10 倍, 其余类推。