



中华人民共和国国家标准

GB/T 4789.3—2008
代替 GB/T 4789.3—2003



2008-11-21 发布

2009-03-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的第一法和第二法修改采用美国食品药品监督管理局(FDA)《细菌学分析手册》第4章大肠杆菌和大肠菌群计数(2002年)(Bacteriological Analytical Manual, Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria, 2002), 第三法修改采用国际分析家学会(AOAC INTERNATIONAL)AOAC 991.14《食品中大肠菌群和大肠杆菌计数 Petrifilm 测试片法》(1994年)(AOAC Official Method 991.14, Coliform and *Escherichia coli* counts in foods—Dry rehydratable film Petrifilm *E. coli* count plate and Petrifilm coliform count plate methods)。

本标准与FDA和AOAC方法的主要区别是:

——将样品制备时取样量50 g(或50 mL)修改为25 g(或25 mL);

——将培养温度由 $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 修改为 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

本标准代替GB/T 4789.3—2003《食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定》。

本标准与GB/T 4789.3—2003相比主要修改如下:

——将标准名称改为“食品卫生微生物学检验 大肠菌群计数”;

——增加了大肠菌群的平板计数法和纸片检测方法;

——大肠菌群的MPN(most probable number)法从以乳糖胆盐为主要培养基的MPN法,修改为以月桂基硫酸盐胰蛋白胨(lauryl sulfate tryptose, LST)肉汤为主要培养基的MPN法;

——大肠菌群MPN法中原“报告每100 mL(g)大肠菌群的MPN值”,修改为“报告每1 mL(或1 g)大肠菌群的MPN值”。

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卫生部提出并归口。

本标准由中华人民共和国卫生部负责解释。

本标准负责起草单位:中国疾病预防控制中心营养与食品安全所。

本标准参与起草单位:江苏省疾病预防控制中心、中华人民共和国内蒙古出入境检验检疫局、上海市疾病预防控制中心、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:刘秀梅、袁宝君、刘中学、刘弘、陈敏、卢行安、田静。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

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

食品卫生微生物学检验

大肠菌群计数

1 范围

本标准规定了食品中大肠菌群计数的方法。

本标准适用于各类食品中大肠菌群的计数。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

大肠菌群 coliforms

一群在 36 °C 条件下培养 48 h 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。该菌群主要来源于人畜粪便，作为粪便污染指标评价食品的卫生状况，推断食品中肠道致病菌污染的可能。

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 °C ± 1 °C。
- 3.2 冰箱：2 °C ~ 5 °C。
- 3.3 恒温水浴箱：46 °C ± 1 °C。
- 3.4 天平：感量 0.1 g。
- 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 菌落计数器或 PetrifilmTM 1) 自动判读仪。

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：见第 A.1 章。
- 4.2 煌绿乳糖胆盐(brilliant green lactose bile, BGLB)肉汤：见第 A.2 章。
- 4.3 结晶紫中性红胆盐琼脂(violet red bile agar, VRBA)：见第 A.3 章。
- 4.4 磷酸盐缓冲液：见第 A.4 章。

1) PetrifilmTM 是由 3M 公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者，并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效的产品。

- 4.5 无菌生理盐水:称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中,121 ℃ 高压灭菌 15 min。
- 4.6 1 mol/L 氢氧化钠(NaOH):称取 40 g 氢氧化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中。
- 4.7 1 mol/L 盐酸(HCl):移取浓盐酸 90 mL,用蒸馏水稀释至 1 000 mL。
- 4.8 Petrifilm™ 大肠菌群检验测试片和压板。

第一法 大肠菌群 MPN 计数

5 检验程序

大肠菌群 MPN 计数的检验程序见图 1。

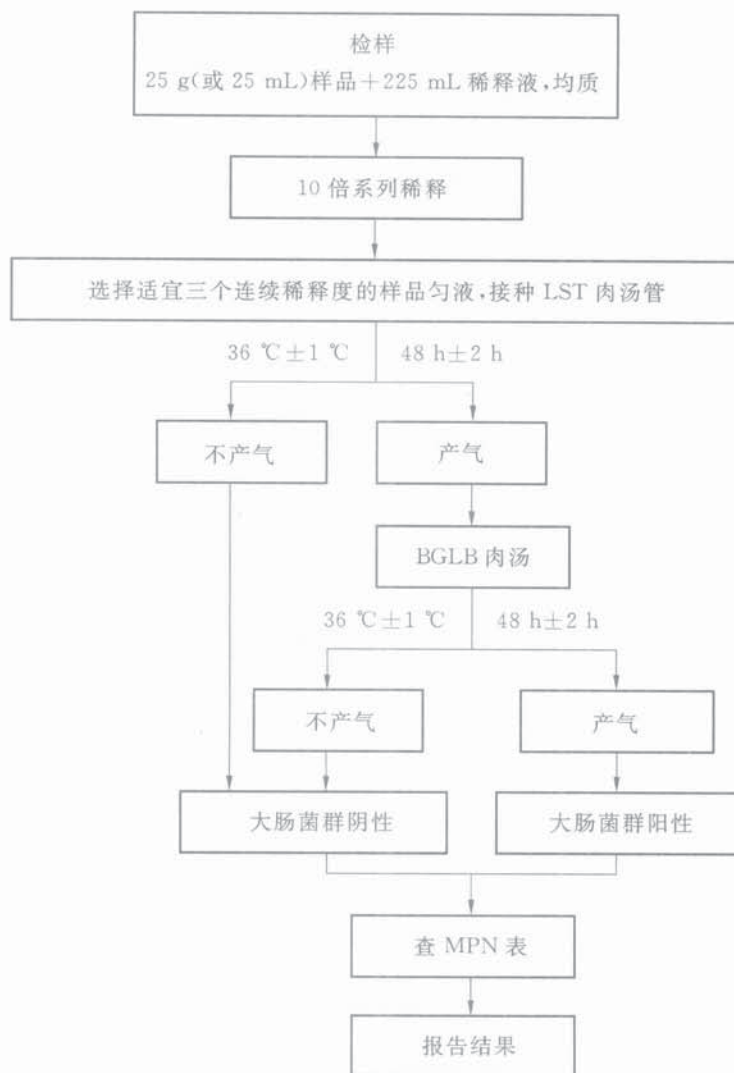


图 1 大肠菌群 MPN 计数检验程序

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,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。

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 氢氧化钠(NaOH)或 1 mol/L 盐酸(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 10 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 1 mL(如接种量超过 1 mL,则用双料 LST 肉汤), $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$,观察倒管内是否有气泡产生,如未产气则继续培养至 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。记录在 24 h 和 48 h 内产气的 LST 肉汤管数。未产气者为大肠菌群阴性,产气者则进行复发酵试验。

6.3 复发酵试验

用接种环从所有 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 内发酵产气的 LST 肉汤管中分别取培养物 1 环,移种于煌绿乳糖胆盐(BGLB)肉汤管中, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$,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

根据大肠菌群阳性管数,检索 MPN 表(见附录 B),报告每克(或毫升)样品中大肠菌群的 MPN 值。

第二法 大肠菌群平板计数

7 检验程序

大肠菌群平板计数的检验程序见图 2。

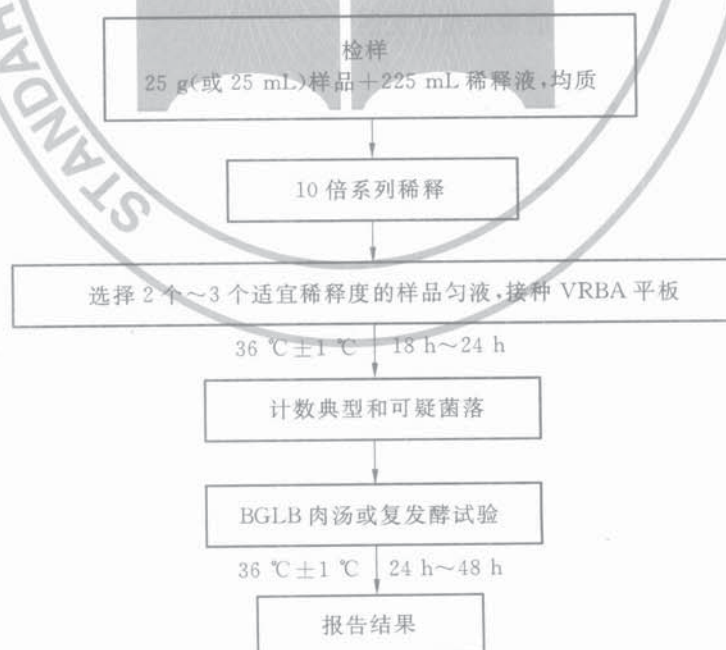


图 2 大肠菌群平板计数检验程序

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,每个稀释度接种两个无菌平皿,每皿 1 mL。同时分别取 1 mL 生理盐水加入两个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 30~150 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,即为每克(或毫升)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(CFU/mL)。

第三法 大肠菌群 Petrifilm™测试片法

9 检验程序

大肠菌群 Petrifilm™测试片法的检验程序见图 3。

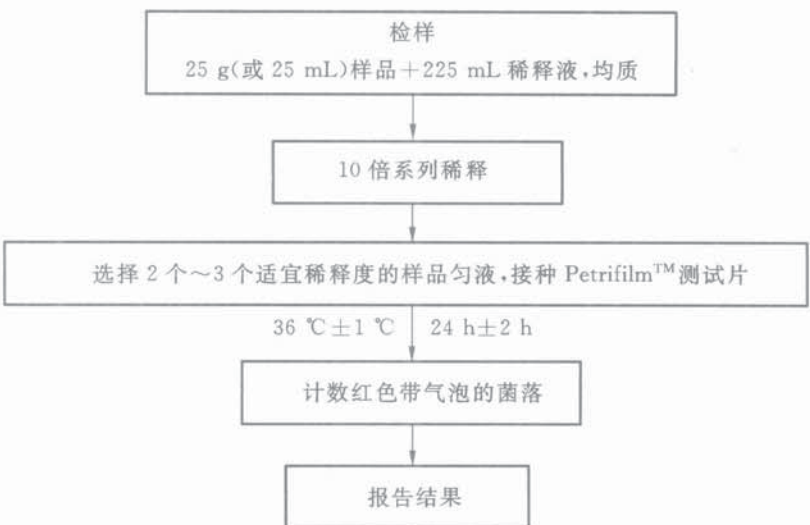


图 3 大肠菌群 Petrifilm™测试片计数法程序图

10 操作步骤

10.1 样品的稀释

按 6.1 进行。

10.2 测定

10.2.1 样品接种及培养

将待检样品选取 2 个~3 个适宜的连续稀释度,每个稀释度接种两张测试片。将 Petrifilm™ 大肠菌群测试片置于平坦实验台面,揭开上层膜,用吸管吸取 1 mL 样液垂直滴加在测试片的中央,将上层膜缓慢盖下,避免气泡产生和上层膜直接落下。把压板(平面底朝下)放置在上层膜中央,轻轻地压下,使样液均匀覆盖于圆形的培养面积上,切勿扭转压板。拿起压板,静置至少 1 min 以使培养基凝固。

将测试片的透明面朝上置于培养箱内,堆叠片数不超过 20 片,36℃±1℃培养 24 h±2 h。

10.2.2 判读

培养 24 h±2 h 后应立即计数,可目测或用标准菌落计数器、放大镜或 Petrifilm™ 自动判读仪来计数。红色有气泡的菌落确认为大肠菌群。圆形培养区边缘上及边缘以外的菌落不作计数。当培养区域出现大量气泡,大量不明显小菌落或培养区呈暗红色三种情况,表明大肠菌群的浓度较高,需要进一步稀释样品以获得更准确的读数。

10.3 大肠菌群测试片计数的报告

选取菌落数在 15~150 之间的测试片,计数其红色有气泡的菌落数,两个测试片的平均菌落数乘以稀释倍数即为每克(或毫升)样品中的大肠菌群菌落形成单位(CFU)数。如果所有稀释度测试片上的菌落数都小于 15,则计数稀释度最低的测试片上的平均菌落数乘以稀释倍数报告;如果所有稀释度的测试片上均无菌落生长,则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告;如果最高稀释度的菌落数大于 150,计数最高稀释度的测试片上的平均菌落数乘以稀释倍数报告。计数菌落数大于 150 的测试片时,可计数一个或两个具有代表性的方格内的菌落数,换算成单个方格内的菌落数后乘以 20 即为测试片上估算的菌落数(圆形生长面积为 20 cm²)。报告单位以 CFU/g(或 CFU/mL)表示。

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
月桂基磺酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL
pH6.8±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 ℃ 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	200.0 mL
0.1%煌绿水溶液	13.3 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH7.2±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,pH7.0~7.5)用蒸馏水稀释到 975 mL,调节 pH 至 7.4,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 ℃ 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
pH7.4±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_2PO_4)	34.0 g
蒸馏水	500 mL
pH7.2	

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 至 7.2,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℃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

每克(或毫升)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(或0.1 mL)、0.01 g(或0.01 mL)和0.001 g(或0.001 mL)],每个稀释度接种3管。

注2: 表内所列检样量如改用1 g(或1 mL)、0.1 g(或0.1 mL)和0.01 g(或0.01 mL)时,表内数字应相应降低10倍;如改用0.01 g(或0.01 mL)、0.001 g(或0.001 mL)、0.000 1 g(或0.000 1 mL)时,则表内数字应相应增高10倍,其余类推。