

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

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： $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

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

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

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。

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。

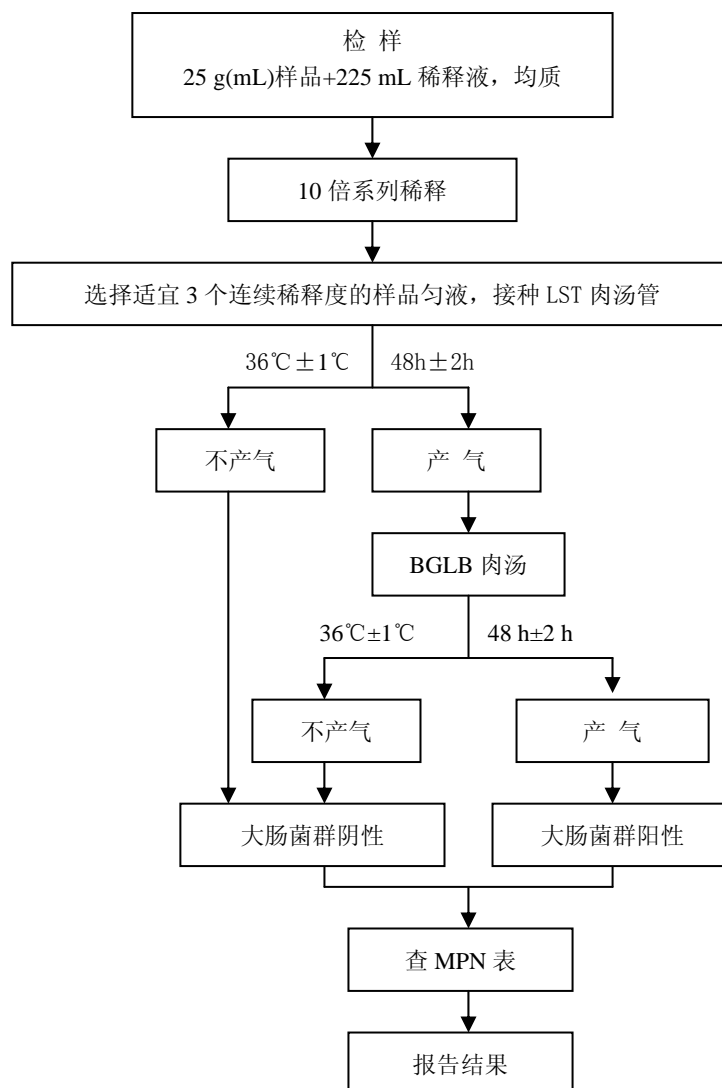


图1 大肠菌群 MPN 计数法检验程序

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。

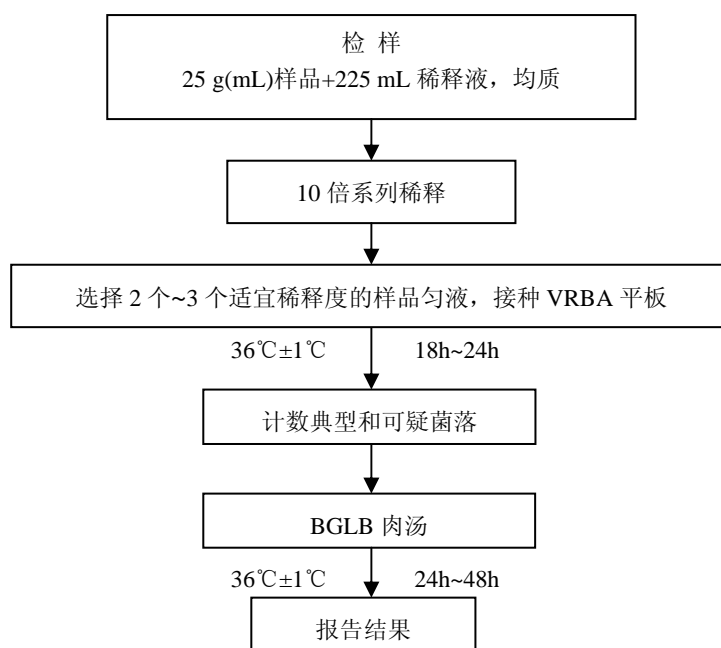


图2 大肠菌群平板计数法检验程序

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。