中 华 人 民 共 和 国 国 家 标 准

GB47893.—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

GB47893.—2016

前 言

本标准代替 GB4789.3—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》、GB/T47893.2—2002《食品卫生微生物学检验 大肠菌群的快速检测》和SN/T0169—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GB47893.—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。

Ⅰ

GB47893.—2016

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

2.

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。

最可能数 Mostprobablenumber;MPN基于泊松分布的一种间接计数方法。

3 检验原理

31 .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。

32 .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:

41 .恒温培养箱:36℃ ±1℃。

42 .冰箱:2℃~5℃。

43 .恒温水浴箱:46℃±1℃。

4. 天平:感量01.g。

45 .均质器。

46 .振荡器。

47 .无菌吸管:1mL(具00.1mL刻度)、10mL(具01.mL刻度)或微量移液器及吸头。

48 .无菌锥形瓶:容量500mL。

49 .无菌培养皿:直径90mm。

1

GB47893.—2016

41.0 pH 计或pH 比色管或精密pH 试纸。

41.1 菌落计数器。

5 培养基和试剂

51 .月桂基硫酸盐胰蛋白胨(laurylsulfatetryptose,LST)肉汤:见A.1。

52 .煌绿乳糖胆盐(brilliantgreenlactosebile,BGLB)肉汤:见A.2。

53 .结晶紫中性红胆盐琼脂(violetredbileagar,VRBA):见A.3。

54 .无菌磷酸盐缓冲液:见 A.4。

5. 无菌生理盐水:见 A.5。

56 .1mol/LNaOH溶液:见A.6。

57 .1mol/LHCl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

2

GB47893.—2016

7 操作步骤

71 .样品的稀释

71.. 固体和半固体样品:称取25g样品,放入盛有225mL磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内 ,8000r/min~10000r/min均质1min~2min,或放入盛有225mL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1min~2min,制成1∶10的样品匀液。

71.2 .液体样品:以无菌吸管吸取25mL样品置盛有225mL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。

71.3 .样品匀液的pH应在65.~7.之间,必要时分别用1mol/LNaOH或1mol/LHCl调节。

71.4 .用1mL 无菌吸管或微量移液器吸取1∶10样品匀液1mL,沿管壁缓缓注入9mL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1mL无菌吸管反复吹打,使其混合均匀,制成1∶100的样品匀液。

71.5 .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1mL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15min。

72 .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1mL,则用双料LST肉汤),36℃± 1℃ 培养24h±2h,观察倒管内是否有气泡产生,24h±2h产气者进行复发酵试验(证实试验),如未产气则继续培养至48h±2h,产气者进行复发酵试验。未产气者为大肠菌群阴性。

73 .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℃±1℃培养48h±2h,观察产气情况。产气者,计为大肠菌群阳性管。

74 .大肠菌群最可能数(MPN)的报告

按73.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。

3

GB47893.—2016

图2 大肠菌群平板计数法检验程序

9 操作步骤

91 .样品的稀释按71.进行。

92 .平板计数

92.1 .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1mL。同时取1mL生理盐水加入无菌平皿作空白对照。

92.. 及时将15mL~20mL融化并恒温至46℃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3mL~4mLVRBA 覆盖平板表层。翻转平板,置于36℃±1℃培养18h~24h。

93 .平板菌落数的选择

选取菌落数在15CFU~150CFU 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05.mm或更大,最低稀释度平板低于15CFU 的记录具体菌落数。

94 .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℃±1℃培养24h~48h,观察产气情况。凡BGLB肉汤管产气,即可报告为大肠菌群阳性。

4

GB47893.—2016

95 .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1mL,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)= 60.×105CFU/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。

5

GB47893.—2016

附 录 A培养基和试剂

A1 .月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤

A1.. 成分

胰蛋白胨或胰酪胨

氯化钠乳糖

磷酸氢二钾(K2HPO4)磷酸二氢钾(KH2PO4)月桂基硫酸钠

蒸馏水

20.0g

5.0g

5.0g

2.75g

2.75g

0.1g 1000mL

A1.2 .制法

将上述成分溶解于蒸馏水中,调节pH 至68.±02.。分装到有玻璃小倒管的试管中,每管10mL。121℃高压灭菌15min。

A2 .煌绿乳糖胆盐(BGLB)肉汤

A2.1 .成分

蛋白胨乳糖

牛胆粉(oxgall或oxbile)溶液01.%煌绿水溶液

蒸馏水

10.0g

10.0g 200mL

13.3mL 800mL

A2.. 制法

将蛋白胨、乳糖溶于约500mL蒸馏水中,加入牛胆粉溶液200mL( 20.0g脱水牛胆粉溶于200mL蒸馏水中,调节pH至70.~75.),用蒸馏水稀释到975mL,调节pH 至72.±01.,再加入01.%

煌绿水溶液133.mL,用蒸馏水补足到1000mL,用棉花过滤后,分装到有玻璃小倒管的试管中,每管10mL。121℃高压灭菌15min。

A3 .结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)

A3.1 .成分

蛋白胨酵母膏乳糖

7.0g

3.0g

10.0g

6

GB47893.—2016

氯化钠

胆盐或3号胆盐中性红

结晶紫琼脂

蒸馏水

5.0g

1.5g

0.03g 0.002g 15g~18g 1000mL

A3.2 .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74.±01.。煮沸2min,将培养基融

化并恒温至45℃~50℃倾注平板。使用前临时制备,不得超过3h。

A4 .磷酸盐缓冲液

A4.1 .成分

磷酸二氢钾(KH2PO4)蒸馏水

34.0g 500mL

A4.2 .制法

贮存液:称取340.g的磷酸二氢钾溶于500mL蒸馏水中,用大约175mL的1mol/L氢氧化钠溶液调节pH 至72.±02.,用蒸馏水稀释至1000mL后贮存于冰箱。稀释液:取贮存液12.5mL,用蒸馏水稀释至1000mL,分装于适宜容器中,121℃高压灭菌15min。

A5 .无菌生理盐水

A5.1 .成分

氯化钠蒸馏水

8.5g 1000mL

A5.2 .制法

称取85.g氯化钠溶于1000mL蒸馏水中,121℃高压灭菌15min。

A6 .1mol/LNaOH 溶液

A6.1 .成分

NaOH蒸馏水

40.0g 1000mL

A6.2 .制法

称取40g氢氧化钠溶于1000mL无菌蒸馏水中。

7

GB47893.—2016

A7 .1mol/LHCl溶液A7.1 .成分

HCl蒸馏水

90mL 1000mL

A7.2 .制法

移取浓盐酸90mL,用无菌蒸馏水稀释至1000mL。

8

GB47893.—2016

附 录 B

大肠菌群最可能数(MPN)检索表

B1 .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B1.。

表 B1 .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 | 1000 |
| 2 | 0 | 2 | 20 | 4.5 | 42 | 3 | 3 | 0 | 240 | 42 | 1000 |
| 2 | 1 | 0 | 15 | 3.7 | 42 | 3 | 3 | 1 | 460 | 90 | 2000 |
| 2 | 1 | 1 | 20 | 4.5 | 42 | 3 | 3 | 2 | 1100 | 180 | 4100 |
| 2 | 1 | 2 | 27 | 8.7 | 94 | 3 | 3 | 3 | >1100 | 420 | — |
| 注1:本表采用3个稀释度[01.g(mL)、00.1g(mL)、00.01g(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. 和00.1g(mL)时,表内数字应相应降低10倍;如改用0.01g(mL)、00.01g(mL)和00.001g(mL)时,则表内数字应相应增高10倍,其余类推。 |

9