

ICS 07.100.30
C53



中华人民共和国食品安全国家标准

GB 4789.2—××××
代替 GB/T 4789.2-2008

食品微生物学检验 菌落总数测定

Microbiological examination in foods —
Aerobic plate count

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准的第一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3章菌落总数(2001年)(Bacteriological Analytical Manual, Chapter 3: Aerobic plate count, 2001),第二法修改采用国际分析家学会(AOAC INTERNATIONAL)AOAC 990.12《食品中菌落总数 Petrifilm 测试片法》(1994年)(AOAC Official Method 990.12, Aerobic plate count in foods dry rehydratable film Petrifilm aerobic count plate method, 1994)。

本标准的第一法与FDA/BAM方法的区别如下:

- 平板菌落计数的适宜范围由25 CFU~250 CFU改为30 CFU~300 CFU;
- 培养温度由 $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 改为 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 10倍稀释,由10 mL样品匀液加入到90 mL稀释液,改为1 mL样品匀液加入到9 mL稀释液;
- 未采用螺旋平板计数法。

本标准的第二法与AOAC 990.12的区别为:培养温度由 $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 改为 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

本标准代替GB/T 4789.2—2003《食品卫生微生物学检验 菌落总数测定》。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB 4789.2—1984、GB/T 4789.2—1994、GB/T 4789.2—2003 GB/T 4789.2—2008

食品微生物学检验

菌落总数测定

1 范围

本标准规定了食品中菌落总数的测定方法。

本标准适用于各类食品中菌落总数的测定。

2 术语与定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

菌落总数 aerobic plate count

食品检样经过处理,在一定条件下培养后(如培养基成分、培养温度和时间、pH、需氧性质等),所得1 mL(或1 g)检样中形成菌落的总数。本标准规定的培养条件下所得结果,只包括一群在平板计数琼脂上生长发育的嗜中温需氧菌或兼性厌氧菌的菌落总数。

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,30 °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250 mL、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 放大镜或(和)菌落计数器或Petrifilm™¹⁾自动判读仪。

4 培养基和试剂

- 4.1 平板计数琼脂培养基:见第A.1章。
- 4.2 磷酸盐缓冲液:见第A.2章。
- 4.3 无菌生理盐水:称取8.5 g氯化钠溶于1 000 mL蒸馏水中,121 °C高压灭菌15 min。
- 4.4 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。
- 4.5 1 mol/L盐酸(HCl):移取浓盐酸90 mL,用蒸馏水稀释至1 000 mL。
- 4.6 Petrifilm™菌落总数测试片和压板。

1) Petrifilm™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。

第一法 平板菌落计数法

5 检验程序

菌落总数的检验程序见图 1。

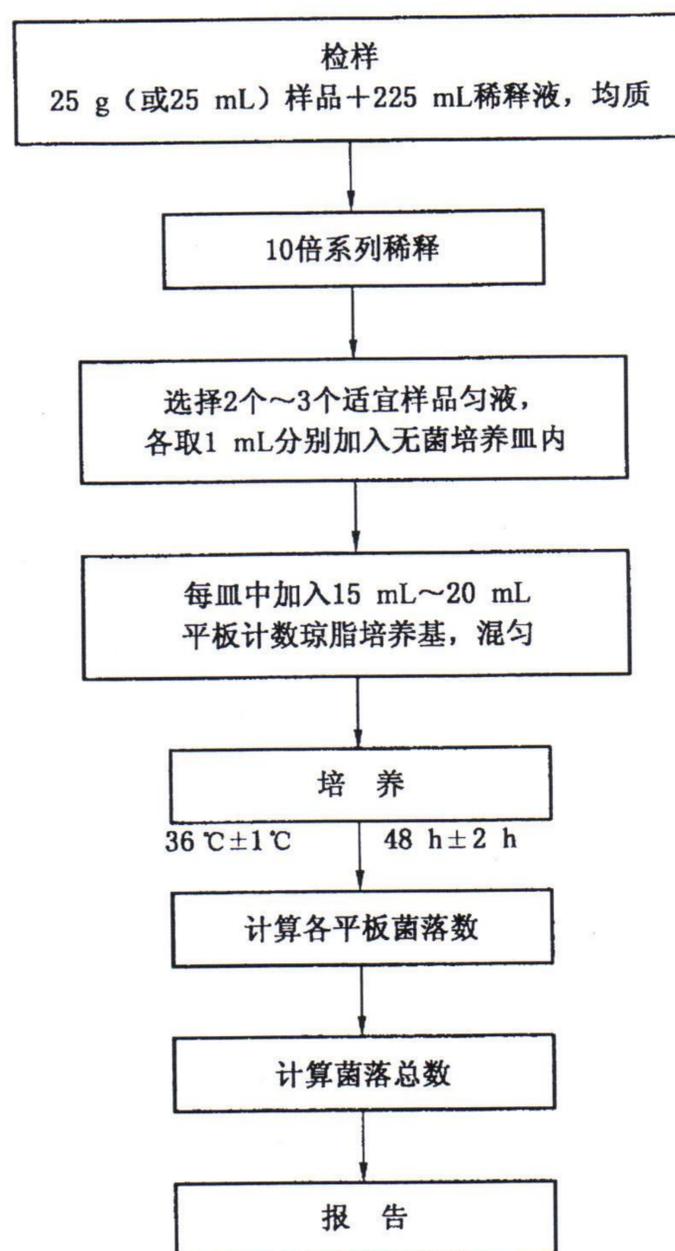


图 1 菌落总数的检验程序

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 样品置盛有 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 稀释液的无菌均质袋中,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 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL,沿管壁缓慢注于盛有 9 mL 稀释液的无菌试管中(注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面),振摇试管或换用一支无菌吸管反复吹打使其混合均匀,制成 1:100 的样品匀液。

6.1.4 按 6.1.3 操作程序,制备 10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释一次,换用一次 1 mL 无菌吸管

或吸头。

6.1.5 根据对样品污染状况的估计,选择2个~3个适宜稀释度的样品匀液(液体样品可包括原液),在进行10倍递增稀释时,每个稀释度分别吸取1 mL样品匀液加入两个无菌平皿内。同时分别取1 mL稀释液加入两个无菌平皿作空白对照。

6.1.6 及时将15 mL~20 mL冷却至46 °C的平板计数琼脂培养基(可放置于46 °C±1 °C恒温水浴箱中保温)倾注平皿,并转动平皿使其混合均匀。

6.2 培养

6.2.1 琼脂凝固后,将平板翻转,36 °C±1 °C培养48 h±2 h。水产品30 °C±1 °C培养72 h±3 h。

6.2.2 如果样品中可能含有在琼脂培养基表面弥漫生长的菌落时,可在凝固后的琼脂表面覆盖一薄层琼脂培养基(约4 mL),凝固后翻转平板,按6.2.1条件进行培养。

6.3 菌落计数

可用肉眼观察,必要时用放大镜或菌落计数器,记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落计数以菌落形成单位(colony-forming units, CFU)表示。

6.3.1 选取菌落数在30 CFU~300 CFU之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于30 CFU的平板记录具体菌落数,大于300的可记录为多不可计。每个稀释度的菌落数应采用两个平板的平均数。

6.3.2 其中一个平板有较大片状菌落生长时,则不宜采用,而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数;若片状菌落不到平板的一半,而其余一半中菌落分布又很均匀,即可计算半个平板后乘以2,代表一个平板菌落数。

6.3.3 当平板上出现菌落间无明显界线的链状生长时,则将每条单链作为一个菌落计数。

7 结果的表述

7.1 菌落总数的计算方法

7.1.1 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内,计算两个平板菌落数的平均值,再将平均值乘以相应稀释倍数,作为每克(或毫升)中菌落总数结果。

7.1.2 若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时,按式(1)计算:

$$N = \sum C / (n_1 + 0.1n_2) d \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

N ——样品中菌落数;

$\sum C$ ——平板(含适宜范围菌落数的平板)菌落数之和;

n_1 ——第一个适宜稀释度平板上的菌落数;

n_2 ——第二个适宜稀释度平板上的菌落数;

d ——稀释因子(第一稀释度)。

示例:

稀释度	1:100(第一稀释度)	1:1000(第二稀释度)
菌落数	232,244	33,35

$$N = \sum C / (n_1 + 0.1n_2) d$$

$$= \frac{232 + 244 + 33 + 35}{[2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{544}{0.022} = 24\,727$$

上述数据经“四舍五入”后,表示为25 000或 2.5×10^4 。

- 7.1.3 若所有稀释度的平板上菌落数均大于 300,则对稀释度最高的平板进行计数,其他平板可记录为多不可计,结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。
- 7.1.4 若所有稀释度的平板菌落数均小于 30,则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。
- 7.1.5 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。
- 7.1.6 若所有稀释度的平板菌落数均不在 30~300 之间,其中一部分小于 30 或大于 300 时,则以最接近 30 或 300 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。
- 7.2 菌落总数的报告
- 7.2.1 菌落数在 100 以内时,按“四舍五入”原则修约,采用两位有效数字报告。
- 7.2.2 大于或等于 100 时,第三位数字采用“四舍五入”原则修约后,取前两位数字,后面用 0 代替位数;也可用 10 的指数形式来表示,按“四舍五入”原则修约后,采用两位有效数字。
- 7.2.3 若所有平板上为蔓延菌落而无法计数,则报告菌落蔓延。
- 7.2.4 若空白对照上有菌落生长,则此次检测结果无效。
- 7.2.5 称重取样以 CFU/g 为单位报告,体积取样以 CFU/mL 为单位报告。

第二法 菌落总数 Petrifilm™ 测试片法

8 检验程序

除将平板计数琼脂培养基改成 Petrifilm™ 菌落总数测试片外,其他与第 5 章相同。

9 操作步骤

9.1 样品的稀释

按照 6.1.1~6.1.2 制备 1:10 的样品匀液后,用 1 mol/L 氢氧化钠(NaOH)或 1 mol/L 盐酸(HCl)调节 pH 至 6.6~7.2。

9.2 接种

根据对样本污染状况的估计,选择 2 个~3 个适宜稀释度的样品匀液进行检验。将测试片置于平坦实验台表面,揭开上层膜,用吸管或微量移液器吸取 1 mL 样品匀液,垂直滴加在测试片的中央,将上层膜盖下,允许上层膜直接落下,但不要滚动上层膜,将压板(凹面底朝下)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膜上,切勿扭转压板。拿起压板,静置至少 1 min 以使培养基凝固。每个稀释度接种两张测试片。

9.3 培养

将测试片的透明面朝上,水平置于培养箱内。可堆叠至 20 片,培养温度和时间同 6.2。

9.4 计数

9.4.1 培养结束后立即计数,可肉眼观察计数,或用菌落计数器、放大镜、Petrifilm™ 自动判读仪计数。选取菌落数在 30~300 之间的测试片计数。

9.4.2 计数所有红色菌落。细菌浓度很高时,整个测试片会变成红色或粉红色,将结果记录为“多不可计”。

9.4.3 有时,当细菌浓度很高时,测试片中央没有可见菌落,但圆形培养膜的边缘有许多小的菌落,其结果也记录为“多不可计”;进一步稀释样品可获得准确的读数。

9.4.4 某些微生物会液化凝胶,造成局部扩散或菌落模糊的现象。如果液化现象干扰计数,可以计数未液化的面积来估算菌落数。

10 结果的表述

同第 7 章。

附录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 平板计数琼脂(plate count agar, PCA)培养基

A.1.1 成分

胰蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	2.5 g
葡萄糖	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.0±0.2

A.1.2 制法

将上述成分加于蒸馏水中,煮沸溶解,调节 pH。分装试管或锥形瓶,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 磷酸盐缓冲液

A.2.1 成分

磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	34.0 g
蒸馏水	500 mL

pH 7.2

A.2.2 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 °C 高压灭菌 15 min。