

中华人民共和国国家标准

GB 4789.39—2013

食品安全国家标准 食品微生物学检验 粪大肠菌群计数

2013-11-29 发布 2014-06-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 _{发 布} 国家卫生和计划生育委员会

前 言

本标准代替 GB/T 4789.39—2008《食品卫生微生物学检验 粪大肠菌群计数》。 本标准与 GB/T 4789.39—2008 相比,主要变化如下:

- ——修改了标准的中文名称;
- ——修改了操作步骤;
- ——增加了附录 B。





食品安全国家标准 食品微生物学检验 粪大肠菌群计数

1 范围

本标准规定了食品中粪大肠菌群计数的方法。本标准适用于各类食品中粪大肠菌群的计数。

2 术语和定义

2.1 粪大肠菌群

一群在 44.5 ℃培养 24 h~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。该菌群来自人和温血动物粪便,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性。

3 技术要求设备和材料

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:

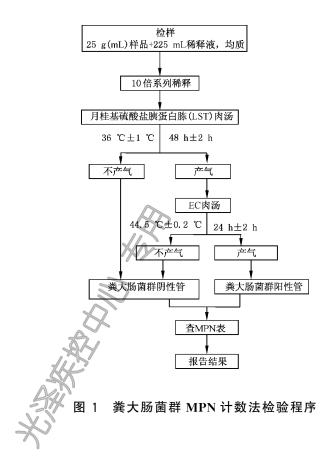
- a) 恒温培养箱:36 ℃±1 ℃;
- b) 冰箱:2°C~5°C;
- c) 恒温水浴箱:44.5 ℃±0.2 ℃;
- d) 天平:感量 0.1 g;
- e) 均质器;
- f) 振荡器;
- g) 无菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)或微量移液器及吸头;
- h) 无菌锥形瓶:容量 500 mL;
- i) 无菌培养皿:直径 90 mm;
- j) pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

4 培养基及试剂

- 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** EC 肉汤(*E.coli* Broth):见 A.2。
- 4.3 无菌生理盐水:见 A.3。
- **4.4** 1 mol/L NaOH:见 A.4。
- 4.5 1 mol/L HCl:见 A.5。

5 检验程序

粪大肠菌群检验程序见图 1。



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, $8~000~r/min\sim10~000~r/min$ 均质 $1~min\sim2~min$,制成 1:10 样品匀液,或置 225 mL 稀释液的无菌均质袋中,用拍打式均质器拍打 $1~min\sim2~min$,制成 1:10 的样品匀液。
- 6.1.2 液体样品:以无菌吸管吸取样品 25 mL 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 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,沿管壁缓缓注入盛有 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,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(如接种量需要超过 1 mL,则用双料 LST 肉汤), 36 $\mathbb{C}\pm 1$ \mathbb{C} 培养 24 h±2 h,观察倒管内是否有气泡产生,24 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。记录在 24 h 和 48 h 内产气的 LST 肉汤管数。未产气者为粪大肠菌群阴性,产气者则进行复发酵试验。

如采用多个稀释度,最终确定最适的三个连续稀释度方法参见附录 B。

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,移种于预先升温至 44.5 \mathbb{C} 的 EC 肉汤管中。将所有接种的 EC 肉汤管放入带盖的 44.5 \mathbb{C} ± 0.2 \mathbb{C} 恒温水浴箱内,培养 24 $h\pm 2$ h,水浴箱的水面应高于肉汤培养基液面,记录 EC 肉汤管的产气情况。产气管为粪大肠菌群阳性,不产气为粪大肠菌群阴性。

定期以已知为 44.5 ℃产气阳性的大肠杆菌和 44.5 ℃不产气的产气肠杆菌或其他大肠菌群细菌作阳性和阴性对照。

6.4 粪大肠菌群 MPN 计数的报告

根据证实为粪大肠菌群的阳性管数,查粪大肠菌群最可能数(MPN)检索表(见附录 C),报告每克(毫升)粪大肠菌群的 MPN 值。



附录A

培养基和试剂

A.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨(Lauryl Sulfate Tryptose, 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 ₂ HPO ₄)	2.75 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	2.75 g
月桂基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.1.2 制法

将 A.1.1 成分溶解于蒸馏水中,校正 pH 至 6.8 ± 0.2 。分装到有玻璃小倒管的试管中,每管10~mL, $121~^{\circ}$ 高压灭菌 15~min。

A.2 EC 肉汤(E.coli Broth)

A.2.1 成分

胰蛋白胨或胰酪胨	20.0 g
3号胆盐或混合胆盐	1.5 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	4.0 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	1.5 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.2.2 制法

将 A.2.1 成分溶解于蒸馏水中,校正 pH 至 6.9 ± 0.1 。分装到有玻璃小倒管的试管中,每管8 mL, 121 $^{\circ}$ 高压灭菌 15 min。

A.3 无菌生理盐水

A.3.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

4

A.3.2 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.4 1 mol/L NaOH

A.4.1 成分

NaOH40.0 g 蒸馏水 1 000.0 mL

A.4.2 制法

称取 40 g 氢氧化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中。

A.5 1 mol/L HCl

A.5.1 成分

._ 利法 移取盐酸 90 mL,用蒸馏水稀释至 1 000 mL。 90.0 mL 1 000.0 mL

A.5.2 制法

附 录 B

确定最适的三个连续稀释度方法

在 10⁻¹~10⁻⁵ 五个连续稀释度中确定最适的三个连续稀释度方法如下:

- a) 有一个以上的稀释度 3 管均为阳性。选择三管都是阳性结果的最高稀释度及其相连的两个更高稀释度(见表 B.1 示例 a、b,表中带下划线的数字对应的接种样品量为最终选取的最适稀释度,下同);在未选择的较高稀释度中还有阳性结果时,则顺次下移到下一个更高三个连续稀释度(见表 B.1 示例 c);如果中间有某个稀释度没有阳性结果,但更高稀释度有阳性结果,则将此阳性结果加到前一稀释度,进而确定三个连续稀释度(见表 B.1 示例 d);如果不能按照这个原则找到三个合适的稀释度,则选择前一个较低的稀释度(见表 B.1 示例 e)。
- b) 没有任何一个稀释度 3 管均为阳性。如果没有一个稀释度的 3 管均为阳性,则选择三个最低稀释度(见表 B.1 示例 f);如果在更高的没有被选择的稀释度还有阳性结果,将此阳性结果加到选择的最高稀释度,进而确定三个连续稀释度(见表 B.1 示例 g)。MPN 计算阳性结果的选择示例见表 B.1。

表 B.1 关于 MPN 计算阳性结果的选择示例

示例编号			接种样品量 mL	***	选择的三个连续 稀释度阳性管数	MPN g(mL)		
	0.1 g 0.01 g		0.001 g	0.000 1 g	0.000 01 g			
a	3	3_	1	0	0	3-1-0	430	
b	2	3	1	0	0	3-1-0	430	
С	3	2	2	1	0	2-2-1	280	
d	3	2	2	0	1	2-2-1	280	
e	3	3	3	3	2	3-3-2	110 000	
f	0	0	1	0	0	0-0-1	3	
g	2	2	1	1	0	2-2-2	35	
注:下划线表示应选择的连续稀释度。								

附 录 C

粪大肠菌群最可能数(MPN)表

每克(毫升)检样中粪大肠菌群最可能数(MPN)的检索见表 C.1。

表 C.1 粪大肠菌群最可能数(MPN)检索表

阳性管数		MDM	95%置信区间		阳性管数			Mon	95%置信区间		
0.1	0.01	0.001	MPN	下限	上限	0.1	0.01	0.001	MPN	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 4	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(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 lg(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)、0.000~1~g(mL)时,则表内数字应相应增高 10~倍,其余类推。

⚠ 版权声明

中国标准在线服务网(www.spc.org.cn)是中国质检出版社委托北京标科网络技术有限公司负责运营销售正版标准资源的网络服务平台,本网站所有标准资源均已获得国内外相关版权方的合法授权。未经授权,严禁任何单位、组织及个人对标准文本进行复制、发行、销售、传播和翻译出版等违法行为。版权所有,违者必究!

中国标准在线服务网 http://www.spc.org.cn

标准号: GB 4789.39-2013 购买者: 光泽疾控中心 订单号: 0100190109034394

防伪号: 2019-0109-0832-0312-3281

时 间: 2019-01-09

定 价: 21元



GB 4789.39-2013

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
食品安全国家标准
食品微生物学检验 粪大肠菌群计数

GB 4789.39—2013

中国标准出版社出版发行 北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013) 北京市西城区三里河北街16号(100045)

> 网址:www.gb168.cn 服务热线:400-168-0010 010-68522006

010-0032200

2014年3月第一版

书号: 155066 · 1-48548

版权专有 侵权必究