

中华人民共和国国家标准

GB 4789.41—2016

食品安全国家标准

食品微生物学检验 肠杆菌科检验

2016-08-31 发布

2017-03-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会 发布

食品安全国家标准

食品微生物学检验 肠杆菌科检验

1 范围

本标准规定了食品中肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)的检验方法。

本标准第一法适用于肠杆菌科含量较高的食品中肠杆菌科的计数;第二法适用于肠杆菌科含量较低食品中肠杆菌科的计数。

2 术语和定义

2.1

肠杆菌科 Enterobacteriaceae

在给定条件下发酵葡萄糖产酸、氧化酶阴性的需氧或兼性厌氧革兰氏阴性无芽胞杆菌。

2.2

肠杆菌科计数 Enumeration of Enterobacteriaceae

按本标准规定方法,对每克或每毫升检样中的肠杆菌科进行计数。

2.3

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 ℃±1 ℃。

3.2 冰箱:2 ℃~5 ℃。

3.3 水浴箱:46 ℃±1 ℃。

3.4 天平:感量0.1 g。

3.5 显微镜:10倍~100倍。

3.6 均质器。

3.7 振荡器。

3.8 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。

3.9 无菌锥形瓶或等效容器:容量150 mL、500 mL。

3.10 无菌培养皿:直径90 mm。

3.11 无菌试管:18 mm×180 mm、15 mm×150 mm。

3.12 pH计或pH比色管或精密pH试纸。

4 培养基和试剂

4.1 缓冲蛋白胨水(BPW):见B.1。

- 4.2 缓冲葡萄糖煌绿胆盐肉汤(EE 肉汤):见 B.2。
 4.3 结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂(VRBGA):见 B.3。
 4.4 营养琼脂(NA):见 B.4。
 4.5 葡萄糖琼脂:见 B.5。
 4.6 革兰氏染色液:见 B.6。
 4.7 氧化酶试剂:见 B.7。
 4.8 无菌 1 mol/L NaOH:见 B.8。
 4.9 无菌 1 mol/L HCl:见 B.9。

第一法 肠杆菌科平板计数法

5 检验程序

肠杆菌科平板计数法检验程序见图 1。

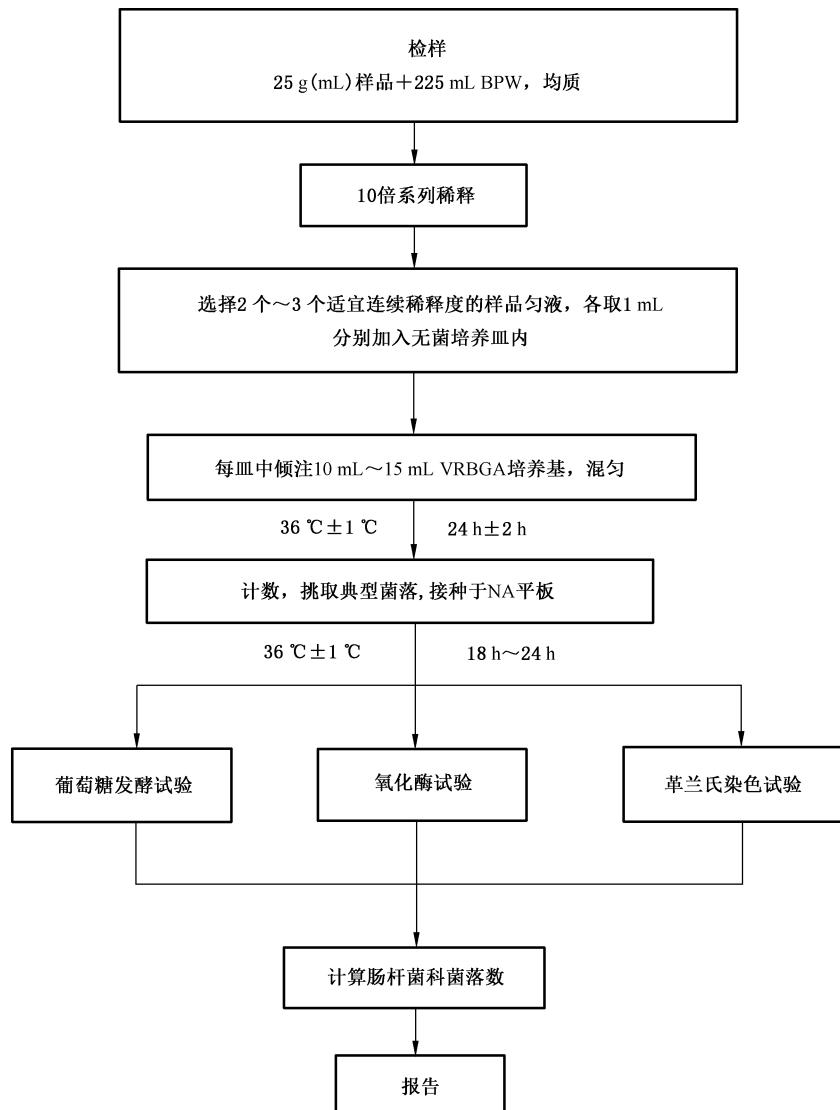


图 1 肠杆菌科平板计数法检验程序

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 BPW 的无菌均质杯中,8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min,或放入盛有 225 mL BPW 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 样品放入盛有 225 mL BPW 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,沿管壁缓缓注入盛有 9 mL BPW 的无菌试管中(注意吸管或吸头尖端不应触及稀释液面),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。

6.1.4 按 6.1.3 操作程序,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 倾注平板和培养

6.2.1 根据对样品污染状况的估计及相关限量要求,选择 2 个~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 2 个无菌平皿。同时,分别吸取 1 mL BPW 加入两个无菌平皿内作为空白对照。

6.2.2 将 10 mL~15 mL 冷却至 46 °C 的 VRBGA(可放置于 46 °C±1 °C 恒温水浴箱中保温)倾注于每个平皿中。小心旋转平皿,使样品匀液与培养基充分混匀。

6.2.3 待琼脂凝固后,倾注一薄层同样的培养基覆盖平板表层。防止蔓延生长并使菌落特征更为明显。

6.2.4 待 VRBGA 平板上层琼脂凝固后翻转平板,36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。

6.3 典型菌落计数和确认

6.3.1 肠杆菌科典型菌落为有或无沉淀环的粉红色至红色或紫色菌落。选取典型菌落数在 15 CFU~150 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板,只计数典型菌落数。菌落计数以菌落形成单位(colony-forming units,CFU)表示。

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。

6.3.4 从每个平板上至少挑取 5 个(小于 5 个全选)典型菌落进行确认;如果有不同形态的典型菌落,则每种形态分别至少挑取 1 个菌落进行确认。

6.3.5 典型菌落的确认:

- a) 分别将所挑选的每一个菌落,划线于营养琼脂平板,36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h,挑取平板上的菌落进行革兰氏染色镜检、氧化酶试验及葡萄糖发酵试验。
- b) 革兰氏染色镜检:肠杆菌科为革兰氏阴性杆菌,无芽孢,大小为 $(0.3\sim1.0)\mu\text{m}\times(1.0\sim6.0)\mu\text{m}$ 。
- c) 氧化酶试验:用铂/铱接种环或玻璃棒(不要用镍铬接种环)挑取单个菌落涂于浸湿氧化酶试剂

的滤纸上，滤纸的颜色在 10 s 内变成蓝紫色，判为阳性反应。

- d) 葡萄糖发酵试验:用接种针挑取少许氧化酶阴性的同一个菌落,穿刺于葡萄糖琼脂内,于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$,若试管内的内容物变为黄色,判为阳性反应。

6.4 结果的计算

6.4.1 一般原则

若有两个连续稀释度的平板典型菌落数在适宜计数范围内,按式(1)计算,示例见A.1、A.2、A.3、A.4。

式中 i

N ——样品中肠杆菌科菌落数;

Σa ——确诊的肠杆菌科菌落数之和；

n_1 ——第一稀释度(低稀释倍数)平板个数(含确证的肠杆菌科菌落);

n_2 ——第二稀释度(高稀释倍数)平板个数(含确证的肠杆菌科菌落);

d ——稀释因子(第一稀释度)。

其中, a 按式(2)计算:

式中：

a —— 确证的肠杆菌科菌落数；

b ——某一平板中 *A* 个菌落中被确证为肠杆菌科的菌落数, $b \leq A$;

A——某一平板中用于确认试验的菌落数；

C——某一平板中典型菌落总数。

6.4.2 低菌落数

若最低稀释度(包括液体样品原液)平板的典型菌落数均小于 15 CFU,具有确证的肠杆菌科菌落,则以确证的菌落数乘以最低稀释倍数计算。

若最低稀释度(包括液体样品原液)平板均无菌落生长,或典型菌落数均小于 15 CFU,且无确证的肠杆菌科菌落,则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

6.4.3 特殊情况

第一稀释度平板上的典型菌落数均大于 150 CFU,且有确证的肠杆菌科菌落,以及第二稀释度平板上无确证的肠杆菌科菌落或典型菌落数不在 15 CFU~150 CFU 之间,则以确证的菌落数乘以第一稀释倍数计算,示例见 A.5。

若所有稀释度的平板上典型菌落数均不在适宜计数范围内,且无确证的肠杆菌科菌落,则以小于1乘以最低稀释倍数计算。

7 报告

7.1 菌落数小于 100 时,以整数报告。

7.2 菌落数大于或等于 100 时,对第 3 位数字进行修约后,取前 2 位数字,后面用 0 代替位数;也可用 10 的指数形式来表示,采用两位有效数字。

7.3 数字修约按“四舍五入”原则进行。

- 7.4 若所有平板上为蔓延菌落而无法计数，则报告菌落蔓延。
- 7.5 若空白对照上有菌落生长，则此次检测结果无效。
- 7.6 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 肠杆菌科 MPN 计数法

8 检验程序

肠杆菌科 MPN 计数法检验程序见图 2。

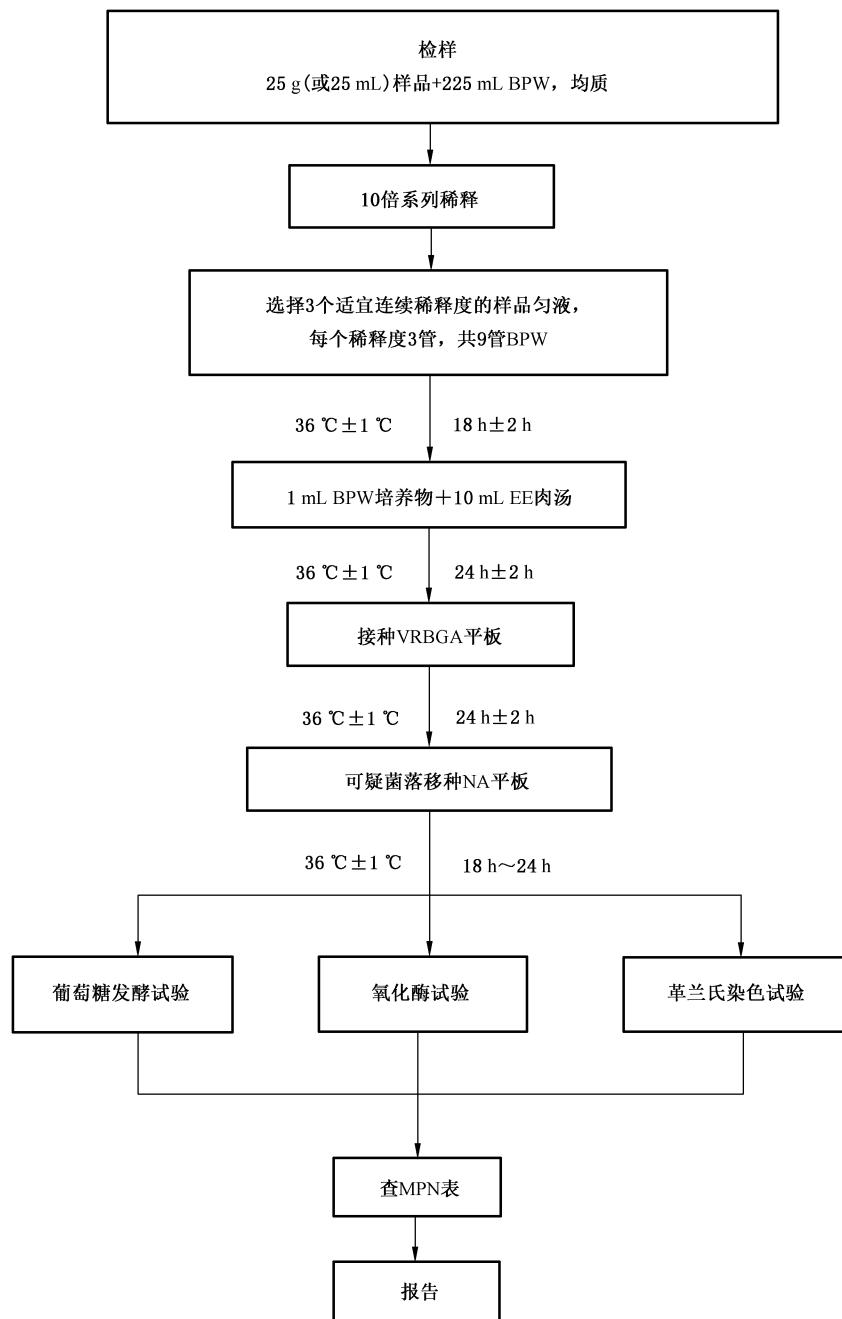


图 2 肠杆菌科 MPN 计数法检验程序

9 操作步骤

9.1 样品的稀释

按 6.1 进行。

9.2 接种和培养

9.2.1 非选择性前增菌

根据对样品污染状况的估计及相关限量要求,选择 3 个适宜连续稀释度的样品匀液,每个稀释度 3 管,共 9 管 BPW 于 36 ℃ ±1 ℃ 培养 18 h±2 h。

9.2.2 选择性增菌

从 BPW 各培养管中,分别移取 1 mL 培养物,接种于 10 mL 的 EE 肉汤中,36 ℃±1 ℃ 培养 24 h±2 h。

9.2.3 分离

用接种环从 EE 各肉汤管中分别取培养物 1 环,划线接种于 VRBGA 平板,36 ℃±1 ℃ 培养 24 h±2 h,观察平板上有无典型菌落。

9.3 典型菌落的确认

典型菌落确认见 6.3。

10 报告

肠杆菌科为革兰氏阴性无芽胞杆菌,发酵葡萄糖产酸、氧化酶阴性。只要有 1 个菌落确认为肠杆菌科,其所代表的 EE 管即为肠杆菌科阳性,依据 EE 阳性管数查 MPN 表(见附录 C),报告每克(毫升)样品中肠杆菌科的 MPN 值。称重取样以 MPN/g 为单位报告,体积取样以 MPN/mL 为单位报告。

附录 A
结果计算示例

A.1 两个连续稀释度均含适宜的典型菌落数平板，并含有已确证的肠杆菌科菌落，数据见表 A.1。

表 A.1 肠杆菌科平板计数结果示例 1

稀释度	1 : 100(第一稀释度)		1 : 1 000(第二稀释度)	
典型菌落数/CFU	126	145	20	24
用于确认试验的菌落数/CFU	5	5	5	5
确证的菌落数/CFU	4	5	4	3
<i>a</i>	4/5×126=101	5/5×145=145	4/5×20=16	3/5×24=14

$$N = \frac{101 + 145 + 16 + 14}{[2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{276}{0.022} = 12\ 545$$

上述数据按 7.2 数字修约后，表示为 13 000 或 1.3×10^4 。

A.2 两个连续稀释度均含适宜典型菌落数平板，其中某一稀释度的一个平板菌落数不在适宜范围内，或者两个稀释度各有一个平板菌落数不在适宜范围内，则相应的平板不作为计数平板，数据见表 A.2。

表 A.2 肠杆菌科平板计数结果示例 2

稀释度	1 : 100(第一稀释度)		1 : 1 000(第二稀释度)	
典型菌落数/CFU	126	118	20	10
用于确认试验的菌落数/CFU	5	8	5	—
确证的菌落数/CFU	4	5	4	—
<i>a</i>	4/5×126=101	5/8×118=74	4/5×20=16	—

$$N = \frac{101 + 74 + 16}{[2 + (0.1 \times 1)] \times 10^{-2}} = \frac{191}{0.021} = 9\ 095$$

上述数据按 7.2 数字修约后，表示为 9 100 或 9.1×10^3 。

A.3 两个连续稀释度均含适宜典型菌落数平板，其中一个平板无已确证的肠杆菌科菌落，则相应的平板不作为计数平板，数据见表 A.3。

表 A.3 肠杆菌科平板计数结果示例 3

稀释度	1 : 100(第一稀释度)		1 : 1 000(第二稀释度)	
典型菌落数/CFU	126	118	20	20
用于确认试验的菌落数/CFU	5	6	5	5
确证的菌落数/CFU	4	6	4	0
<i>a</i>	4/5×126=101	6/6×118=118	4/5×20=16	0

$$N = \frac{101 + 118 + 16 + 0}{[2 + (0.1 \times 1)] \times 10^{-2}} = \frac{235}{0.021} = 11\ 190$$

上述数据按 7.2 数字修约后，表示为 11 000 或 1.1×10^4 。

A.4 两个连续稀释度均含适宜典型菌落数平板,但无已确证的肠杆菌科菌落,则以小于1乘以最低稀释倍数计算。

A.5 第一稀释度平板上的菌落数超过150 CFU,且有证实的肠杆菌科菌落,以及第二稀释度平板上无确证的肠杆菌科菌落或典型菌落数不在15 CFU~150 CFU之间,则以确证的菌落数乘以第一稀释倍数计算,数据见表A.5。

表 A.5 肠杆菌科平板计数结果示例 5

稀释度	1 : 100(第一稀释度)		1 : 1000(第二稀释度)	
典型菌落数/CFU	220	198	23	17
用于确认试验的菌落数/CFU	5	5	5	5
确证的菌落数/CFU	4	3	0	0
<i>a</i>	4/5×220=176	3/5×198=119	0	0

$$N = \left(\frac{176 + 119}{2} \right) \times 10^2 = 14\ 750$$

附录 B
培养基和试剂

B.1 缓冲蛋白胨水(BPW)**B.1.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠	3.5 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

B.1.2 制法

将 B.1.1 成分加热溶解,于 25 ℃时调节 pH 至 7.2±0.2,分装于 500 mL 广口瓶中,每瓶 225 mL, 121 ℃高压灭菌 15 min。

B.2 缓冲葡萄糖煌绿胆盐肉汤(EE 肉汤)**B.2.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钠(无水)	6.45 g
磷酸二氢钾	2.0 g
牛胆盐	20.0 g
煌绿	0.013 5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

B.2.2 制法

将 B.2.1 成分溶于水中,加热煮沸至完全溶解,加热不宜超过 30 min,迅速冷却培养基,于 25 ℃调节 pH 至 7.2±0.2,分装于灭菌的 18 mm×180 mm 试管中,每管 10 mL,不需高压灭菌,5 ℃±3 ℃可存放一个月。

B.3 结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂(VRBGA)**B.3.1 成分**

蛋白胨	7.0 g
酵母浸膏	3.0 g
3 号胆盐	1.5 g
葡萄糖	10.0 g
氯化钠	5.0 g

中性红	0.03 g(或 0.6% 酒精溶液 5 mL)
结晶紫	0.002 g(或 0.1% 水溶液 2 mL)
琼脂粉	10.0 g~12.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

B.3.2 制法

将 B.3.1 成分溶于水中, 加热煮沸至完全溶解, 25 ℃时调节 pH 至 7.4 ± 0.2, 分装于灭菌的锥形烧瓶中, 不需高压灭菌, 用前制备。倾注平板, 使用前干燥平板。未干燥的平板 5 ℃±3 ℃可存放两周。

B.4 营养琼脂(NA)

B.4.1 成分

牛肉浸膏	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
琼脂粉	10.0 g~12.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

B.4.2 制法

将 B.4.1 成分溶于水中, 加热煮沸, 25 ℃时调节 pH 至 7.3±0.2, 121 ℃高压灭菌 15 min。倾注平板, 使用前干燥平板。未干燥的平板于 5 ℃±3 ℃可存放两周。

B.5 葡萄糖琼脂

B.5.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
酵母浸膏	1.5 g
葡萄糖	10.0 g
氯化钠	5.0 g
溴甲酚紫	0.015 g(或 0.4% 溴甲酚紫酒精溶液 3.75 mL)
琼脂粉	10.0 g~12.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

B.5.2 制法

将 B.5.1 成分溶于水中, 加热煮沸, 25 ℃时调节 pH 至 7.0±0.2, 分装于 15 mm×150 mm 试管, 每管约 5 mL, 121 ℃高压灭菌 15 min 后, 试管垂直放置。于 5 ℃±3 ℃可存放 1 周。为去除培养基中的氧气, 使用前可将葡萄糖琼脂试管置于沸水浴中 15 min, 然后迅速冷却, 备用。

B.6 革兰氏染色液

B.6.1 结晶紫染色液

B.6.1.1 成分

结晶紫	1.0 g
-----	-------

95%乙醇	20.0 mL
1%草酸铵水溶液	80.0 mL

B.6.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

B.6.2 革兰氏碘液**B.6.2.1 成分**

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL

B.6.2.2 制法

将碘和碘化钾先行混合,加入少许蒸馏水充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

B.6.3 沙黄复染液**B.6.3.1 成分**

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

B.6.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

B.6.4 染色方法

B.6.4.1 将涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染色液,染 1 min,水洗。

B.6.4.2 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。

B.6.4.3 滴加 95%乙醇脱色 15 s~30 s,直至染色液被洗掉,但不要过分脱色、水洗。

B.6.4.4 加沙黄复染液,复染 1 min,水洗、干燥、镜检。

B.6.4.5 革兰氏阳性菌呈紫色,革兰氏阴性菌呈红色。

B.7 氧化酶试剂**B.7.1 成分**

<i>N,N,N',N'</i> -四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
蒸馏水	100.0 mL

B.7.2 制法

将 B.7.1 成分溶解于冷水中,少量新鲜配制。

B.7.3 试验方法

用细玻璃棒或一次性接种针挑去单个菌落,涂布在氧化酶试剂湿润的滤纸上。在 10 s 内呈现粉红

或紫红色，即为氧化酶试验阳性。不变色者为氧化酶试验阴性。

B.8 无菌 1 mol/L NaOH

B.8.1 成分

NaOH	40.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

B.8.2 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。

B.9 无菌 1 mol/L HCl

B.9.1 成分

HCl	90.0 mL
蒸馏水	1 000.0 mL

B.9.2 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 C
肠杆菌科最可能数(MPN)检索表

每克(毫升)检样中肠杆菌科最可能数(MPN)的检索见表 C.1。

表 C.1 肠杆菌科最可能数(MPN)的检索表

阳性管数			MPN	95%置信区间		阳性管数			MPN	95%置信区间	
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(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 1 g(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。