



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
国家卫生和计划生育委员会

发布

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，主要修改如下：

- 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℃~5℃；
- c) 恒温水浴箱：44.5℃±0.2℃；
- d) 天平：感量0.1g；
- 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）：见附录A中A.2。
- 4.3 无菌生理盐水：见附录A中A.3。
- 4.4 1 mol/L NaOH：见附录A中A.4。
- 4.5 1 mol/L HCl：见附录A中A.5。

5 检验程序

粪大肠菌群检验程序见图1。

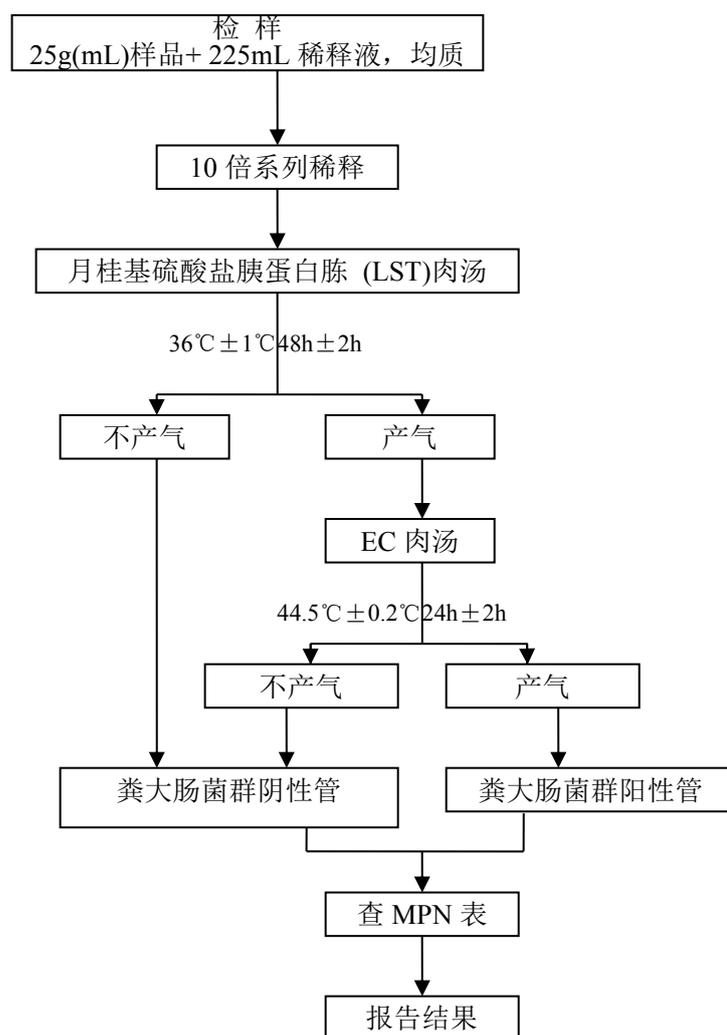


图1 粪大肠菌群 MPN 计数法检验程序

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,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,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~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 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1 mL（如接种量需要超过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℃的EC肉汤管中。将所有接种的EC肉汤管放入带盖的44.5℃±0.2℃恒温水浴箱内，培养24 h±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g（mL）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_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	1 000.0 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 °C 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_2HPO_4)	4.0 g
磷酸二氢钾 (KH_2PO_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 °C 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

A.3.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1000 mL 蒸馏水中，121 °C 高压灭菌 15 min。

A. 4 1 mol/L NaOH

A. 4.1 成分

NaOH	40.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 4.2 制法

称取40g 氢氧化钠溶于1000 mL蒸馏水中。

A. 5 1 mol/L HCl

A. 5.1 成分

盐酸	90.0 mL
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 5.2 制法

移取盐酸 90 mL，用蒸馏水稀释至 1000 mL。

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)
	0.1g	0.01 g	0.001 g	0.0001 g	0.00001 g		
a	3	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	3-1-0	430
b	2	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	3-1-0	430
c	3	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0	2-2-1	280
d	3	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	1	2-2-1	280
e	3	3	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	3-3-2	110000
f	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	0	0	0-0-1	3
g	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	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g(mL)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			MPN	95%置信区间		阳性管数			MPN	95%置信区间	
0.1	0.01	0.001		下限	上限	0.1	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[0.1g(mL)、0.01g(mL)和 0.001g(mL)]、每个稀释度接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1g (mL)、0.1g(mL)和 0.01g(mL)时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 0.01g(mL)、0.001g(mL)、0.0001g(mL)时, 则表内数字应相应增高 10 倍, 其余类推。