



中华人民共和国国家标准

GB 4789.2—2016

食品安全国家标准

食品微生物学检验 菌落总数测定

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

前 言

本标准代替 GB 4789.2—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》。

食品安全国家标准

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(Aerobic plate count)的测定方法。
本标准适用于食品中菌落总数的测定。

2 术语和定义

菌落总数 aerobic plate count

食品检样经过处理,在一定条件下(如培养基、培养温度和培养时间等)培养后,所得每 g(mL)检样中形成的微生物菌落总数。

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℃±1℃,30℃±1℃。
- 3.2 冰箱:2℃~5℃。
- 3.3 恒温水浴箱:46℃±1℃。
- 3.4 天平:感量为0.1g。
- 3.5 均质器。
- 3.6 振荡器。
- 3.7 无菌吸管:1mL(具0.01mL刻度)、10mL(具0.1mL刻度)或微量移液器及吸头。
- 3.8 无菌锥形瓶:容量250mL、500mL。
- 3.9 无菌培养皿:直径90mm。
- 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。

4 培养基和试剂

- 4.1 平板计数琼脂培养基:见A.1。
- 4.2 磷酸盐缓冲液:见A.2。
- 4.3 无菌生理盐水:见A.3。

5 检验程序

菌落总数的检验程序见图1。

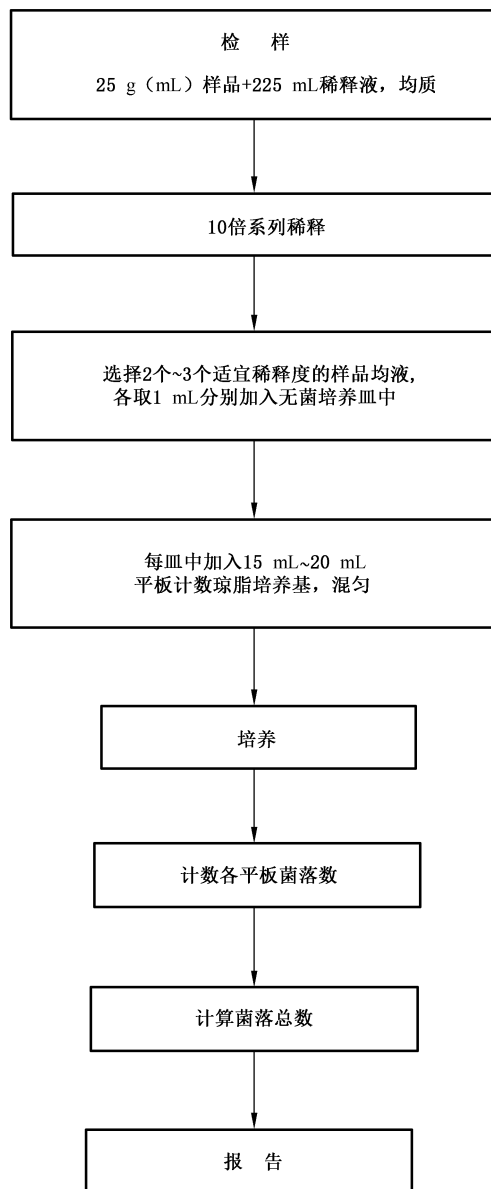


图 1 菌落总数的检验程序

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 1 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,制备 10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释一次,换用 1 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,吸取 1 mL 样品匀液于无菌平皿内,每个稀释度做两个平皿。同时,分别吸取 1 mL 空白稀释液加入两个无菌平皿内作空白对照。

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 待琼脂凝固后,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

6.3.1 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。

6.3.2 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 CFU 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。

6.3.3 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。

6.3.4 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 结果与报告

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 g(mL)样品中菌落总数结果。

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:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots(1)$$

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 ——第一稀释度(低稀释倍数)平板个数;

n_2 ——第二稀释度(高稀释倍数)平板个数;

d ——稀释因子(第一稀释度)。

示例:

稀释度	1:100(第一稀释度)	1:1 000(第二稀释度)
菌落数(CFU)	232,244	33,35

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} = \frac{232 + 244 + 33 + 35}{[2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{544}{0.022} = 24\ 727$$

上述数据按 7.2.2 数字修约后,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 CFU,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 CFU,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 CFU~300 CFU 之间,其中一部分小于 30 CFU 或大于 300 CFU 时,则以最接近 30 CFU 或 300 CFU 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 菌落数小于 100 CFU 时,按“四舍五入”原则修约,以整数报告。

7.2.2 菌落数大于或等于 100 CFU 时,第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后,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,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。

附 录 A

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

A.1.2 制法

将上述成分加于蒸馏水中,煮沸溶解,调节 pH 至 7.0 ± 0.2 。分装试管或锥形瓶, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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_2PO_4)	34.0 g
蒸馏水	500 mL

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, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 mL

A.3.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。