



中华人民共和国国家标准

GB/T 4789.32—2002

食品卫生微生物学检验 大肠菌群的快速检测

Microbiological examination of food hygiene—
Rapid detection of Coliform bacteria

2002-06-13 发布

2002-10-01 实施

国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准规定了食品中大肠菌群的快速检验方法。本标准规定使用的培养基 MUGaI 肉汤中的 4-甲基伞型酮- β -D-半乳糖苷与美国联邦法规 40, 第 141 节, 21 款(Code of Federal Regulations 40, Part 141.21)规定的检验大肠菌群所用的 MI 琼脂的主要成分(4-甲基伞型酮- β -D-半乳糖苷)是同一物质。

本标准关于大肠菌群的菌落计数,参考了 ISO 4832:1999(E)《微生物学-大肠菌群菌落计数法通则》(Microbiology-General Guidance for the enumeration of coliforms-colony count technique)。

本标准中的附录 A 是规范性附录。

本标准由国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

本标准主要起草单位:镇江出入境检验检疫局,中国标准化协会,镇江质量技术监督局。

本标准主要起草人:甄宏太、李平、张秀春、闵继福。

引 言

大肠菌群系指一群能发酵乳糖、产酸或醛，并产生 β -半乳糖苷酶需氧或兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌。该菌主要来源于人畜粪便，故以此作为粪便污染指标来评价食品的卫生质量，推断食品中是否有污染肠道致病菌的可能。如果大肠菌群存在于食品中，表明未做有效的消毒处理、加工后保存条件不良或消毒后又受到污染。快速检验这些细菌，有助于食品的卫生管理，维护消费者的食用安全。

食品卫生微生物学检验

大肠菌群的快速检测

1 范围

本标准规定了食品中大肠菌群的快速检验和计数方法。

本标准适用于食品中大肠菌群的快速检验和计数。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB 4789.3 食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定

GB 4789.28 食品卫生微生物学检验 染色法培养基和试剂

ISO 4832:1991(E) 微生物学-大肠菌群菌落计数法通则

3 术语和定义

下列属于和定义适用于本标准

3.1

3.2 大肠菌群 Coliform bacteria

大肠菌群是革兰氏阴性、无芽孢、氧化酶阴性的杆状细菌，为需氧和兼性厌氧，可在有胆盐（或具有其他抑制生长的表面活性剂）存在的情况下生长，通常可在 36 ± 2 °C 发酵乳糖并产酸和醛。具有 β -半乳糖苷酶。在本标准设定的条件下，大肠菌群为能分解 β -半乳糖苷，使培养基发出荧光或生成紫色（或红色）菌落的一群革兰氏阴性无芽孢杆菌。

4 原理

4.1 最可能数(MPN)法

大肠菌群可产生 β -半乳糖苷酶，分解液体培养集中的酶底物——4-甲基伞型酮- β -D-半乳糖苷（以下简称MUGal），使4-甲基伞型酮游离，因而在366nm的紫外光灯下呈现蓝色荧光。

4.2 平板法

大肠菌群可产生 β -半乳糖苷酶，分解培养集中的酶底物——茜素- β -D半乳糖苷（以下简称Aliz-gal），使茜素游离并与固体培养基中的铝、钾、铁、铵离子结合形成紫色（或红色）的螯合物，使菌落呈现相应的颜色。

5 试剂和培养基

5.1 磷酸盐缓冲液

按 GB 4789.28-1994 中 3.22 规定进行制备。

5.2 生理盐水

5.2.1 成分

氯化钠 8.5g

蒸馏水 1 000mL

5.2.2 制法

将氯化钠溶于蒸馏水，121 蒸汽灭菌15min。

5.3 MUGal 肉汤

5.3.1 成分

胰蛋白胨或胰酪胨	20.0g
氯化钠	5.0g
无水磷酸氢二钾	2.75g
无水磷酸二氢钾	2.75g
月桂基硫酸钠	0.1g
MUGal (纯度不低于99%)	0.08g
蒸馏水	1 000mL

5.3.2 制法

将各成分加热溶于蒸馏水中，以 15% ~ 20% 氢氧化钠溶液调整 pH 值，分装于 20 mm × 150 mm 试管，每管 9 mL，116 蒸汽灭菌10 min，最终pH值7.0 ~ 7.2。待培养基冷却后，以无菌手续于每管培养液内加入 0.1 mL 经无菌水稀释的 500 μg/mL 头孢磺定液或于 1000mL 灭菌培养液内加 1 mL 经无菌水稀释的5 mg/mL头孢磺定液并以无菌操作分装试管。

注：双料的MUGal肉汤除蒸馏水外其他成分加倍

5.4 Aliz-gal 琼脂

5.4.1 成分

胰蛋白胨或胰酪胨	20.0g
氯化钠	5.0g
无水磷酸氢二钾	2.75g
无水磷酸二氢钾	2.75g
月桂基硫酸钠	0.1g
Aliz-gal (纯度不低于97%)	0.05g
异丙基硫代半乳糖苷	0.03g
硫酸铝钾	0.5g
柠檬酸铁铵	0.5g
琼脂	15.0g
蒸馏水	1 000mL

5.4.2 制法

将各成分放入蒸馏水中，加热使溶化，以15% ~ 20% NaOH 调整pH值，分装烧瓶，116 蒸汽灭菌10min，最终pH值 7.0 ~ 7.2。

6 设备和器材

6.1 培养箱：37 ± 1 。

6.2 冷藏箱：0 ± 4 。

6.3 天平：感量 0.01g。

6.4 均质器或乳钵。

6.5 平皿：直径 90mm。

6.6 试管：20mm × 150 mm。

6.7 吸管：1.0mL 和 10.0mL。

- 6.8 广口瓶或三角瓶：容量 500mL。
 6.9 玻璃珠：直径约 5mm。
 6.10 试管架。
 6.11 紫外灯（波长 366nm）。
 6.12 其他。

7 检验程序

见图1。

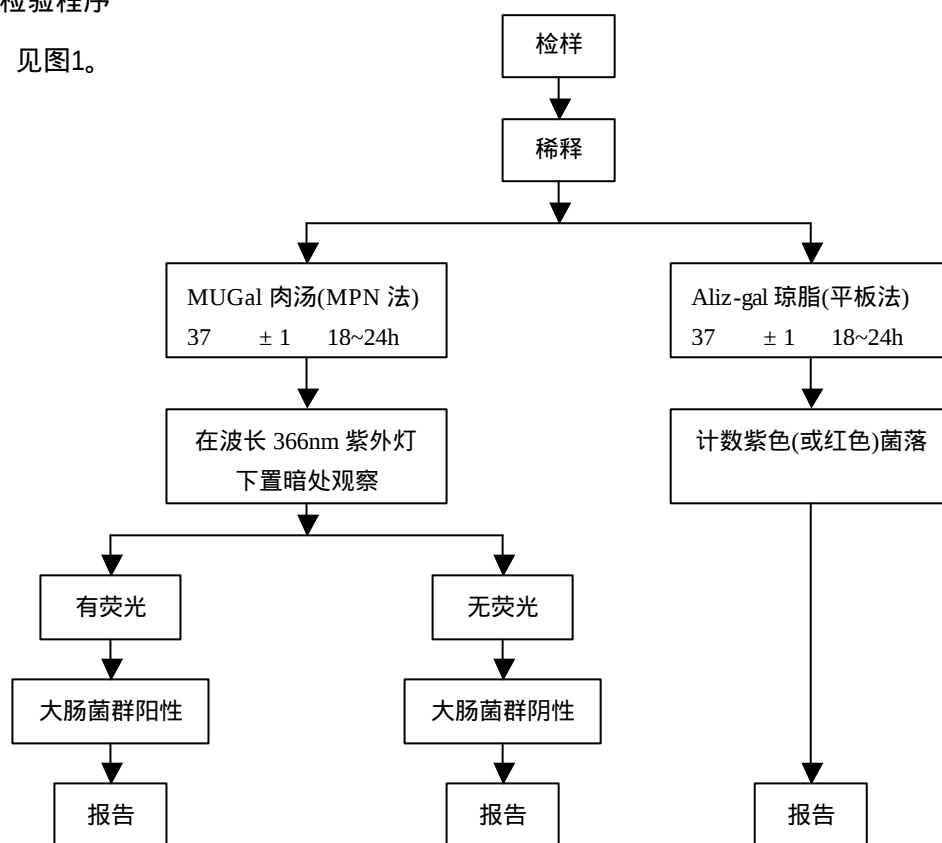


图1 检验程序

8 样品的制备

- 8.1 以无菌手续取 25mL（或 25g）样品，加于含 225 mL 无菌磷酸盐缓冲液（或生理盐水）的广口瓶（或三角瓶）内（瓶内预置适当数量的玻璃珠），充分振摇或用均质器以 8 000 r/m~10 000 r/m 均质 1 min 成 1 : 10 稀释液。
 8.2 用 1mL 无菌吸管吸取 1 : 10 样品稀释液 1.0mL，注入含 9.0 mL 无菌磷酸盐缓冲液（或生理盐水）的试管内。振摇均匀，即成 1 : 100 样品稀释液。
 8.3 另取 1.0 mL 无菌吸管，按上法制备 10 倍递增样品稀释液。每递增一次，换一支 1.0 mL 无菌吸管。
 8.4 根据食品卫生标准要求或对样品污染程度的估计，选择三个适宜的连续稀释度，每个稀释度接种三管培养基（MPN 法）或两个平皿（平板法）。

9 大肠菌群的 MPN 计数

- 9.1 将待检样品和样品稀释液接种 MUGal 肉汤管，每管 1.0 mL（接种量在 1.0 mL 以上者，接种双料 MUGal 肉汤管），每个样品接种三个连续稀释度，每个稀释度接种 3 管培养基。同时另取 2 支 MUGal 肉汤管（或双料 MUGal 肉汤管）加入与样品稀释液等量的上述无菌磷酸盐缓冲液（或生理盐水）作空白对照。
 9.2 将接种后的培养管置于 37 ± 1 °C 培养箱培养 18~24h。

9.3 将培养管置于暗处，用波长 366nm 的紫外光灯照射，如显蓝色荧光，为大肠菌群阳性管；如未显蓝色荧光，则为大肠菌群阴性管。

9.4 结果报告：根据大肠菌群阳性管数，查 MPN 表（见附录 A），报告每 100mL（g）食品中大肠菌群 MPN 值。

10 大肠菌群的菌落计数

10.1 用灭菌吸管吸取待检样液 1.0mL，加入无菌平皿内。每个样品接种三个连续稀释度，每个稀释度接种两个平皿。

10.2 于每个加样平皿内倾注 15mL 45 ~ 50 的 Aliz-gal 琼脂，迅速轻轻转动平皿，使混合均匀。待琼脂凝固后，再倾注 3mL ~ 5mL Aliz-gal 琼脂覆盖表面。同时将 Aliz-gal 琼脂倾入加有 1mL 上述无菌磷酸盐缓冲液（或生理盐水）的无菌平皿内作空白对照。

10.3 待琼脂凝固后，翻转平板，于 37 ± 1 培养箱培养 18 ~ 24h。取出平板，计数紫色（或红色）菌落。

10.4 结果报告

10.4.1 当平板上的紫色（或红色）菌落数不高于 150 个，且其中至少有一个平板紫色（或红色）菌落不少于 15 个时，按式（1）计算大肠菌群数：

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

式中：

N——样品的大肠菌群数，个/mL或g；

$\sum C$ ——所有计数平板上，紫色（或红色）菌落数之总和；

n_1 ——供计数的最低稀释倍数的平板数；

n_2 ——供计数的高一倍数的平板数；

d——供计数的样品最低稀释度（如 10^{-1} ， 10^{-2} ， 10^{-3} 等）。

10.4.2 如接种所有（3 个）稀释样品的平板上紫色（或红色）菌落数均少于 15 个时，仍按式（1）计算，但应在所得结果旁加“*”号，表示为估计值。

10.4.3 如接种未稀释样品和所有稀释样品的平板上，紫色（或红色）菌落数均少于 15 个时，报告结果为：每毫升（克）样品少于 15 个大肠菌群。

10.4.4 如接种未稀释样品和所有稀释样品的平板上，均未发现紫色（或红色）菌落数时，报告结果为：每毫升（克）样品少于 1 个大肠菌群。

10.4.5 如平板上的紫色（或红色）菌落数高于 150 个时，按式(1)计算，在结果旁加“*”号表示估计值或视情况重新选择较高的稀释倍数进行测定。

附 录 A
(规范性附录)
大肠菌群最可能数(MPN)检索表

表 A.1

阳性管数			MPN 100 mL(g)	95%可信限	
1 mL(g)×3	0.1mL(g) × 3	0.01mL(g)×3		下限	上限
0	0	0	<30	< 5	90
0	0	1	30		
0	0	2	60		
0	0	3	90		
0	1	0	30	< 5	130
0	1	1	60		
0	1	2	90		
0	1	3	120		
0	2	0	60	-	-
0	2	1	90		
0	2	2	120		
0	2	3	160		
0	3	0	90	-	-
0	3	1	130		
0	3	2	160		
0	3	3	190		
1	0	0	40	< 5	200
1	0	1	70	10	210
1	0	2	110		
1	0	3	150		
1	1	0	70	10	200
1	1	1	110	30	210
1	1	2	150		
1	1	3	190		
1	2	0	110	30	360
1	2	1	150		
1	2	2	200		
1	2	3	240		
1	3	0	160	-	-
1	3	1	200		
1	3	2	240		
1	3	3	290		
2	0	0	90	10	360
2	0	1	140	30	370
2	0	2	200		
2	0	3	260		

表 A.1 (续)

阳性管数			MPN 100 mL(g)	95%可信限	
1 mL(g)x3	0.1mL(g) x 3	0.01mL(g)x3		下限	上限
2	1	0	150	30	440
2	1	1	200	70	890
2	1	2	270		
2	1	3	340		
2	2	0	210	40	470
2	2	1	280	100	1 500
2	2	2	350		
2	2	3	420		
2	3	0	290		
2	3	1	360	-	-
2	3	2	440		
2	3	3	530		
3	0	0	230	40	1 200
3	0	1	390	70	1 300
3	0	2	640	150	3 800
3	0	3	950		
3	1	0	430	70	2 100
3	1	1	750	140	2 300
3	1	2	1 200	300	3 800
3	1	3	1 600		
3	2	0	930	150	3 800
3	2	1	1 500	300	4 400
3	2	2	2 100	350	4 700
3	2	3	2 900		
3	3	0	2 400	360	13 000
3	3	1	4 600	710	24 000
3	3	2	11 000	1 500	48 000
3	3	3	≥ 24 000		

注 1：本表采用 3 个稀释度[1mL(g)、0.1mL(g)和 0.01mL(g)]，每稀释度 3 管。

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