

## 前 言

本标准对 GB/T 4789.3—1994《食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定》进行修订。

本标准与 GB/T 4789.3—1994 相比主要修改如下：

——按照 GB/T 1.1—2000 对标准文本格式和文字进行修改。

——修改并规范原标准中的“设备和材料”。

本标准自实施之日起，GB/T 4789.3—1994 同时废止。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心营养与食品安全所。

本标准主要起草人：刘宏道、冉陆、付萍、杨宝兰、姚景会。

本标准于 1984 年首次发布，1994 年第一次修订，本次为第二次修订。

## 食品卫生微生物学检验

### 大肠菌群测定

#### 1 范围

本标准规定了食品中大肠菌群的测定方法。

本标准适用于各类食品中大肠菌群的测定。

#### 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/T 4789.28—2003 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

#### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

##### 3.1

大肠菌群 *Coliform bacteria*

一群能发酵乳糖、产酸产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽胞杆菌。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,推断食品中有否污染肠道致病菌的可能。

食品中大肠菌群数系以 100 mL(g) 检样内大肠菌群最可能数(MPN)表示。

#### 4 设备和材料

- 4.1 冰箱:0℃~4℃。
- 4.2 恒温培养箱:36℃±1℃。
- 4.3 恒温水浴锅:46℃±1℃。
- 4.4 显微镜:10×~100×。
- 4.5 均质器或灭菌乳钵。
- 4.6 架盘药物天平:0 g~500 g,精确至 0.5 g。
- 4.7 灭菌吸管 1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)。
- 4.8 灭菌锥形瓶:500 mL。
- 4.9 灭菌玻璃珠:直径约 5 mm。
- 4.10 灭菌培养皿:直径 90 mm。
- 4.11 灭菌试管:16 mm×160 mm。
- 4.12 灭菌刀、剪子、镊子等。

#### 5 培养基和试剂

- 5.1 乳糖胆盐发酵管:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.9 规定。
- 5.2 伊红美蓝琼脂平板:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.25 规定。
- 5.3 乳糖发酵管:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.10 规定。

5.4 EC 肉汤:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.11 规定。

5.5 磷酸盐缓冲液:按 GB/T 4789.28—2003 中 3.22 规定。

5.6 0.85%灭菌生理盐水。

5.7 革兰氏染色液:按 GB/T 4789.28—2003 中 2.2 规定。

## 6 检验程序

大肠菌群检验程序见图 1。

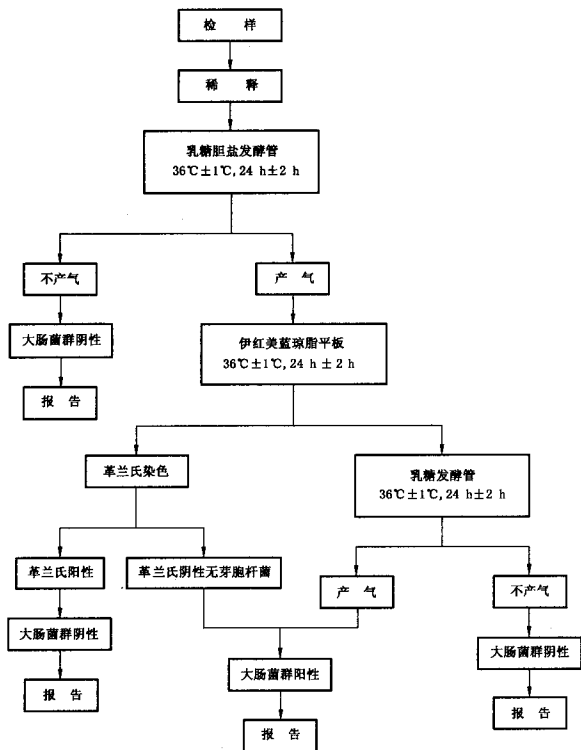


图 1

## 7 操作步骤

### 7.1 检样稀释

7.1.1 以无菌操作将检样 25 g(mL) 放于含有 225 mL 灭菌生理盐水或其他稀释液的灭菌玻璃瓶内 (瓶内预置适当数量的玻璃珠) 或灭菌乳钵内, 经充分振摇或研磨做成 1:10 的均匀稀释液。固体检样最好用均质器, 以 8 000 r/min~10 000 r/min 的速度处理 1 min, 做成 1:10 的均匀稀释液。

7.1.2 用1 mL灭菌吸管吸取1:10稀释液1 mL,注入含有9 mL灭菌生理盐水或其他稀释液的试管内,振荡试管混匀,做成1:100的稀释液。

7.1.3 另取1 mL灭菌吸管,按上条操作依次做10倍递增稀释液,每递增稀释一次,换用1支1 mL灭菌吸管。

7.1.4 根据食品卫生标准要求或对检样污染情况的估计,选择三个稀释度,每个稀释度,接种三管。

## 7.2 乳糖发酵试验

将待检样品接种于乳糖胆盐发酵管内,接种量在1 mL以上者,用双料乳糖胆盐发酵管,1 mL及1 mL以下者,用单料乳糖胆盐发酵管。每一稀释度接种三管,置 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 温箱内,培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ ,如所有乳糖胆盐发酵管都不产气,则可报告为大肠菌群阴性,如有产气者,则按下列程序进行。

## 7.3 分离培养

将产气的发酵管分别转种在伊红美蓝琼脂平板上,置 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 温箱内,培养 $18\text{ h}\sim 24\text{ h}$ ,然后取出,观察菌落形态,并做革兰氏染色和证实试验。

## 7.4 证实试验

在上述平板上,挑取可疑大肠菌群菌落1个~2个进行革兰氏染色,同时接种乳糖发酵管,置 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养箱内培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ ,观察产气情况。凡乳糖管产气、革兰氏染色为阴性的无芽胞杆菌,即可报告为大肠菌群阳性。

## 7.5 报告

根据证实为大肠菌群阳性的管数,查MPN检索表,报告每100 mL(g)大肠菌群的MPN值。

## 8 粪大肠菌群(*Faecal coliform*)

8.1 用接种环将所有产气的乳糖胆盐发酵管培养物(见7.2)转种于EC肉汤管内,置 $44.5^{\circ}\text{C}\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 水浴箱内(水浴箱内的水面应高于EC肉汤液面),培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ ,经培养后,如所有EC肉汤管均不产气,则可报告为阴性;如有产气者,则将所有产气的EC肉汤管分别转种于伊红美蓝琼脂平板上,置培养 $18\text{ h}\sim 24\text{ h}$ ,凡平板上有典型菌落者,则证实为粪大肠菌群阳性。

## 8.2 结果报告

根据证实为粪大肠菌群的阳性管数,查MPN检索表,报告每100 mL(g)粪大肠菌群的MPN值(见表1)。

表1 大肠菌群最可能数(MPN)检索表

| 阳性管数               |                      |                       | MPN<br>100 mL(g) | 95%可信限 |     |
|--------------------|----------------------|-----------------------|------------------|--------|-----|
| 1 mL(g) $\times 3$ | 0.1 mL(g) $\times 3$ | 0.01 mL(g) $\times 3$ |                  | 下 限    | 上 限 |
| 0                  | 0                    | 0                     | <30              |        |     |
| 0                  | 0                    | 1                     | 30               | <5     | 90  |
| 0                  | 0                    | 2                     | 60               |        |     |
| 0                  | 0                    | 3                     | 90               |        |     |
| 0                  | 1                    | 0                     | 30               |        |     |
| 0                  | 1                    | 1                     | 60               | <5     | 130 |
| 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              |        |     |

表 1 (续)

| 阳 性 管 数   |             |              | MPN<br>100 mL(g) | 95%可信限 |        |
|-----------|-------------|--------------|------------------|--------|--------|
| 1 mL(g)×3 | 0.1 mL(g)×3 | 0.01 mL(g)×3 |                  | 下 限    | 上 限    |
| 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     | 230    |
| 1         | 1           | 1            | 110              | 30     | 360    |
| 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              |        |        |
| 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[1 mL(g)、0.1 mL(g)和 0.01 mL(g)],每稀释度三管。

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