



中华人民共和国国家标准

GB 4789.2—xxxx

食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定

(征求意见稿)

xxxx-xx-xx 发布

xxxx-xx-xx 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

前言

本标准与GB 4789.2-2016相比，主要变化如下：

本标准与GB 4789.2-2016相比，主要变化如下：

- 修改了设备和材料；
- 修改了培养基和试剂；
- 修改了检验程序；
- 修改了操作步骤；
- 修改了附录A。

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： $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 3.2 冰箱： $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 3.3 恒温装置： $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 3.4 天平：感量为 0.1 g 。
- 3.5 均质器。
- 3.6 振荡器。
- 3.7 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。
- 3.8 无菌锥形瓶。
- 3.9 无菌培养皿：直径 90 mm 。
- 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 菌落总数测试片：应符合 GB 4789.28 中平板计数琼脂培养基质量控制要求。
- 4.3 无菌磷酸盐缓冲液：见 A.2。
- 4.4 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。

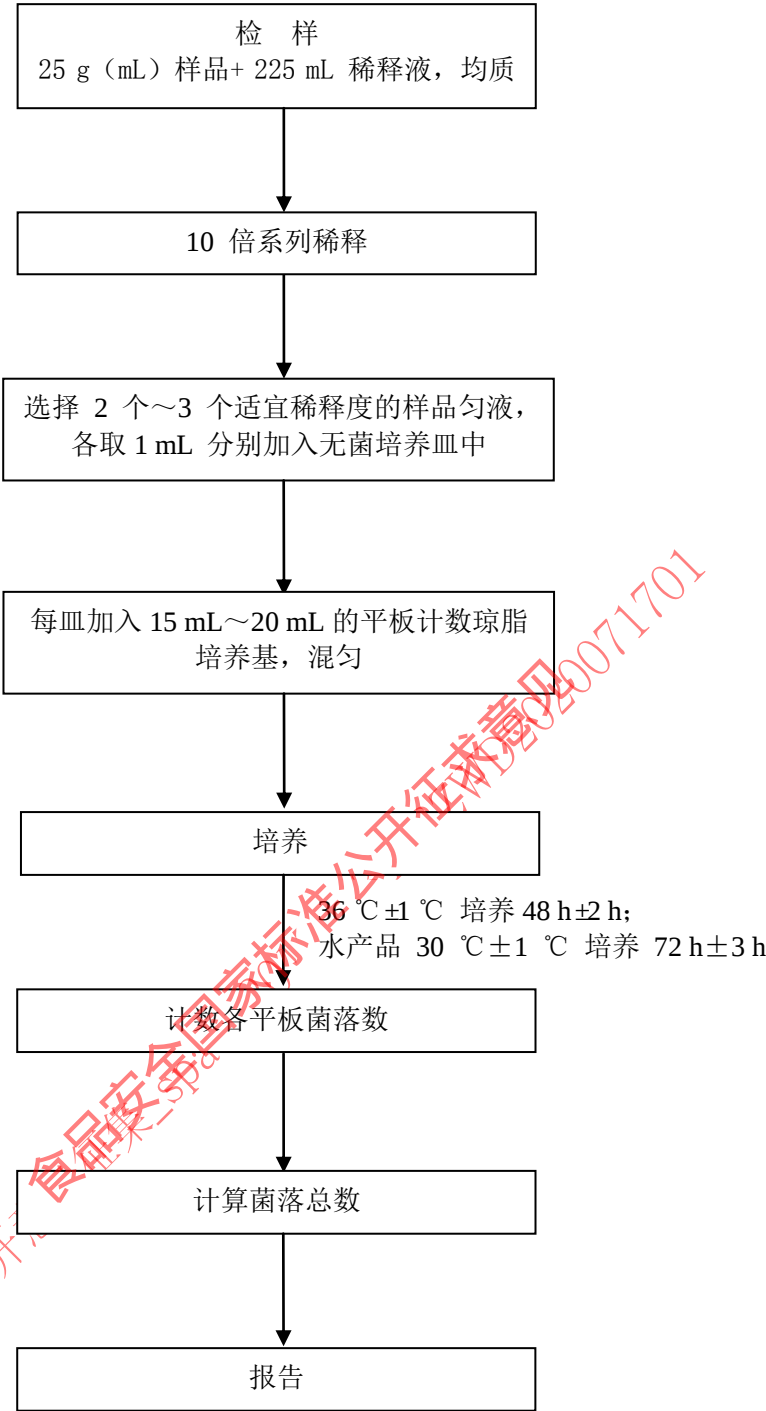


图 1 菌落总数的检验程序

- 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 样品置于盛有 225 mL 无菌磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水的无菌均质杯内，8000 r/min～ 10000 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 样品置于盛有 225 mL 无菌磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水的无菌锥形瓶（瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分混匀，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。
- 6.1.3 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 样品匀液于无菌培养皿内，每个稀释度做两个培养皿。同时，分别吸取 1 mL 空白稀释液加入两个无菌培养皿内作空白对照。
- 6.1.6 及时将 15 mL～20 mL 冷却至 45℃～50℃ 的平板计数琼脂培养基（可放置于 48℃±2℃ 恒温装置中保温）倾注培养皿，并转动培养皿使其混合均匀。

6.2 培养

- 6.2.1 待琼脂凝固后，将平板翻转，36℃±1℃ 培养 48 h±2 h，水产品 30℃±1℃ 培养 72 h±3 h。如果样品中可能含有在琼脂培养基表面蔓延生长的菌落时，可在凝固后的琼脂表面覆盖一薄层琼脂培养基，凝固后翻转平板，进行培养。
- 6.2.2 如使用菌落总数测试片，测试片应按照相关技术规程操作。

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 unit, 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。
- 6.3.3 其中一个平板有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无较大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。

示例1:

稀释度	1:10	1:100	1:1000	计算结果
菌落数（CFU）	多不可计，多不可计	124，138	11，14	13100

- 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：

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} = 24727 \dots\dots\dots (1)$$

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2：

稀释度	1:100（第一稀释度）	1:1000（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 25000 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。

示例3：

稀释度	1:10	1:100	1:1000	计算结果
菌落数（CFU）	多不可计，多不可计	多不可计，多不可计	442， 420	431000

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。

示例4：

稀释度	1:10	1:100	1:1000	计算结果
菌落数（CFU）	14， 15	1， 0	0， 0	145

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。

示例5：

稀释度	1:10	1:100	1:1000	计算结果
菌落数（CFU）	0， 1	0， 0	0， 0	<1×10

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。

示例6：

稀释度	1:10	1:100	1:1000	计算结果
菌落数（CFU）	312， 306	14， 19	2， 4	3090

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，采用两位有效数字，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 若空白对照上有菌落生长，则此次检测结果无效。
- 7.2.4 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	1000 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 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.2 无菌磷酸盐缓冲液

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 1000 mL 后贮存于冰箱。

稀释液：取贮存液 1.25 mL，用蒸馏水稀释至 1000 mL，分装于适宜容器中，121 ℃ 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	1000 mL

A.3.2 制法

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