

ICS
CCS

T/GXAIA

广西分析测试协会团体标准

T/GXAIA XXXX—XXXX

鲜米粉中大肠菌群的快速计数法

Rapid method for enumerate of coliforms in fresh rice noodles

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

广西分析测试协会 发布

前　　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广西分析测试协会提出并宣贯。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

鲜米粉中大肠菌群的快速计数法

1 范围

本文件描述了鲜米粉中大肠菌群快速计数法的原理、培养基和试剂配制、仪器和设备、分析步骤、结果计算和报告。

本文件适用鲜米粉中大肠菌群的快速计数。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 4789. 3-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数

3 术语和定义

GB 4789. 3-2016界定的术语和定义适用于本文件。

4 原理

Handy Plate ®快大肠菌群测试片是含与结晶紫中性红胆盐琼脂主要成份一致的营养成份、冷水可溶性凝胶、酶底物指示剂，使大肠菌群菌落显红色，同时发酵乳糖产酸产气，判读计数更方便。

5 培养基和试剂配制

5. 1 培养基

5. 1. 1 Handy Plate ®大肠菌群测试片。

5. 2 试剂配制

5. 2. 1 无菌磷酸盐缓冲液。

贮存液：称取 34.0 g 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 ± 0.1 ，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 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。

5. 2. 2 无菌生理盐水：称取 8.5 g 氯化钠加入 1000 mL 蒸馏水中，搅拌至完全溶解，分装后，121 °C 灭菌 15 min，备用。

5. 2. 3 氢氧化钠溶液 (1 mol/L)：称取 40 g 氢氧化钠溶于 1000 mL 无菌蒸馏水中。0.22 μm 无菌滤

器过滤。

5.2.4 盐酸溶液 (1 mol/L) : 取盐酸 90 mL 用水稀释到 1 000 mL。

6 仪器和设备

6.1 恒温培养箱: 36 °C± 1 °C。

6.2 天平: 感量 0.1 g。

6.3 均质器。

6.4 振荡器。

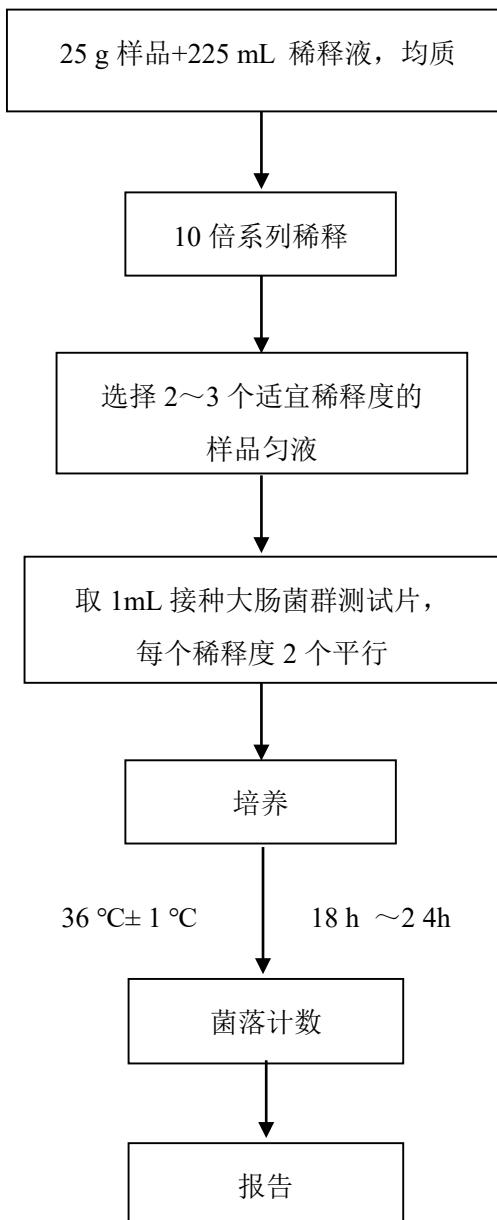
6.5 无菌吸管: 1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度) 或微量移液器及吸头。

6.6 无菌锥形瓶(容量 500 mL)。

6.7 pH 计或精密 pH 试纸: 精密度 0.1。

7 检验程序

鲜米粉中大肠菌群快速计数法的检验程序见图1。



8 操作步骤

8.1 样品稀释

8.1.1 取25 g样品，放入盛有225 mL磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内，8000 r/min~10 000 r/min均质1min~2min，或放入盛有225 mL磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打1 min~2 min，制成1: 10的样品匀液。

8.1.2 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。

8.1.3 用1 mL无菌吸管或微量移液器吸取1:10样品匀液1 mL，沿管壁缓缓注入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。

8.1.4 根据对样品污染状况的估计，按上述操作，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。

8.2 接种

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。将测试片置于平坦表面处，揭开上层膜。每个稀释度分别吸取1 mL样品匀液于大肠菌群测试片内，2个平行。静置至少1 min 以使样液充分吸收。同时取1 mL生理盐水加入测试片作空白对照。

8.3 培养

将测试片正面朝上，堆叠不超过20张，放入培养箱中，于36 °C ± 1 °C 培养18 h ~ 24 h。

8.4 菌落计数

用肉眼观察，必要时可用放大镜或低倍镜，记录稀释倍数和计数相应大肠菌群菌落数。大肠菌群为有黄色酸环、菌落周围有气泡的红色菌落。

9 结果与报告

9.1 结果

选取菌落数在15 CFU~150 CFU的测试片进行计算，将同一稀释度的两个测试片菌落数取平均值，再乘以相应的稀释倍数。

9.1.1 若两个连续稀释度的所有测试片菌落数均在15 CFU~150 CFU之间，按如下公式计算：

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

式中：

N——样品菌落数；

ΣC ——两个连续稀释度的所有测试片菌落数之和；

n_1 ——低稀释倍数平板个数；

n_2 ——高稀释倍数平板个数；

d ——低稀释度稀释因子

示例：

| 稀释度 | 1:100 (低稀释度) | 1:1000 (高稀释度) |
|-----------|--------------|---------------|
| 菌落数 (CFU) | 132/126 | 16/18 |

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0.1n_2) d} = \frac{132 + 126 + 16 + 18}{(2 + 0.1 \times 2) \times 10^{-2}} = \frac{29200}{2.2} = 13272$$

按 9.2.2 数字修约后，表示为13000或 1.3×10^4 。

9.1.2 若所有稀释度测试片上的菌落数均小于 15 CFU，则按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

9.1.3 若所有稀释度测试片上的菌落数均大于 150 CFU，则按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

9.1.4 若所有稀释度的平板菌落数均不在 15 CFU~150 CFU 之间，其中一部分小于 15 CFU 或大于 150 CFU 时，则以接近 15 CFU 或 150 CFU 的平均菌落数乘以相应稀释倍数计算。

9.1.5 若所有稀释度的测试片均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

9.2 报告

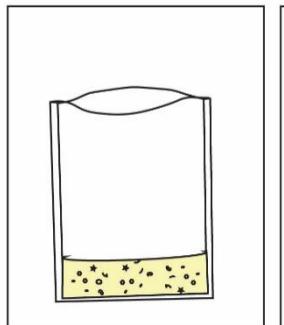
9.2.1 菌落总数小于 100 CFU 时，按“四舍五入”原则修约，以整数报告。

9.2.2 菌落总数大于或等于 100 CFU 时，第三位数字采用“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。

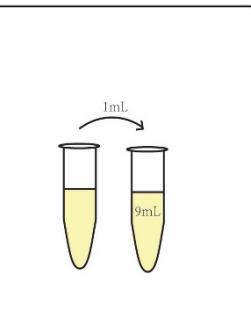
9.2.3 若空白对照上有菌落生长，则此检测结果无效。

9.2.4 以 CFU/g 为单位报告大肠菌群数。

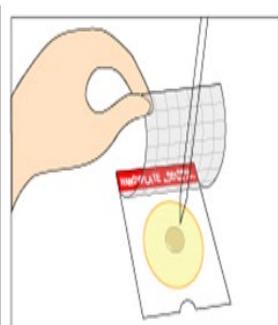
鲜米粉中大肠菌群的快速计数法操作流程



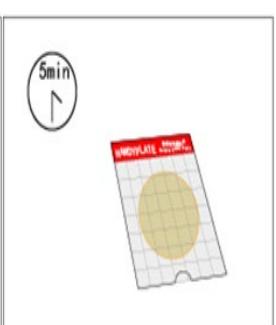
1. 样品制备



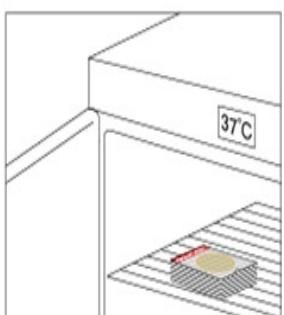
2. 梯度稀释



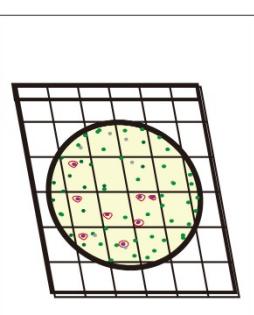
3. 接种



4. 静置



5. 培养



6. 判读计数