SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1059.2—2002

进出口食品中大肠菌群、大肠杆菌计数 滤膜/MUG 法

Total coliform and escherichia coli counts in food for import and export—Membrane filter/MUG method

2002-01-16 发布　　2002-06-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局　发布

前　言

本标准是按照GB/T 1.1—1993《标准化工作导则　第1单元：标准的起草与表述规则　第1部分：标准编写的基本规定》进行编写的。其中大肠菌群、大肠杆菌计数　滤膜/MUG法的培养基、培养温度和滤膜法等内容，是参考美国公职分析化学家协会（AOAC）《公定分析方法》（1995年第16版17.3.09），结合SN 0169—1992《出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检验方法》中样品制备并在实验的基础上编写的。

本标准的附录A是标准的附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准由中华人民共和国天津出入境检验检疫局负责起草。

本标准起草人：陈子红、侯丽萍、唐丹舟、张思传、孙俐。

本标准首次发布。

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

进出口食品中大肠菌群、大肠杆菌计数 滤膜/MUG 法

SN/T 1059.2—2002

Total coliform and escherichia coli counts in food for import and export—Membrane filter/MUG method

1 范围

本标准规定了进出口食品中大肠菌群、大肠杆菌计数滤膜/MUG 法。

本标准仅适用于进出口方便面、膨化食品、矿泉水、单晶糖、饮料、椒粒、牛奶(需用蛋白酶处理)中大肠菌群、大肠杆菌的计数滤膜/MUG 法检验。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

SN 0330—1994 出口食品中微生物学检验通则

3 抽样

按 SN 0330 规定执行。

4 检验方法

4.1 方法原理

将滤膜放入滤器,过滤样品,由于滤膜的作用,大肠菌群、大肠杆菌保留在膜表面。大肠菌群在乳糖莫能霉素葡萄糖醛酸(LMG)琼脂平板上经培养后产生蓝色菌落。大肠杆菌经培养后产生的葡萄糖苷能降解荧光底物 4-甲基伞形酮-β-D 葡萄糖苷酸(MUG)并释放 4-甲基伞形酮荧光物质,在波长 366 nm 长波紫外光(UV)灯下 MUG 阳性菌落呈蓝白色荧光。

4.2 设备和材料

4.2.1 滤器:一套,备有预滤器。

4.2.2 真空泵。

4.2.3 长波紫外光(UV)灯:波长 366 nm。

4.2.4 滤膜:有机或水相,孔径 0.45 μm。

4.2.5 培养箱:36℃±1℃。

4.2.6 水浴箱:45℃±1℃。

4.2.7 吸管:1 mL、10 mL,具刻度。

4.2.8 玻璃三角瓶和广口瓶:500 mL。

4.2.9 试管:17 mm×170 mm,玻璃制。

4.2.10 玻璃珠:直径 5 mm。

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 2002-01-16 批准 2002-06-01 实施

4.2.11 平皿：直径 90 mm。

4.2.12 天平：感量 0.1 g。

4.2.13 均质器。

4.2.14 乳钵和研棒。

4.3 培养基和试剂

4.3.1 蛋白胨-吐温 80(PT)稀释液(见附录 A A1)。

4.3.2 乳糖莫能霉素葡萄糖酸琼脂(LMG)(见附录 A A2)。

4.3.3 缓冲 MUG 琼脂(BMA)(见附录 A A3)。

4.3.4 三(羟甲基)胺甲烷(Tris)缓冲剂(见附录 A A4)。

4.3.5 胰蛋白酶贮存液(见附录 A A5)。

4.4 样品制备

4.4.1 以无菌操作取有代表性的样品。如有包装则用 75%乙醇在开口处擦拭后取样。若不能及时检验，应将冷冻样品置于－15℃保存；非冷冻而易腐的食品，应置于 4℃冰箱保存。检验前冷冻样品可于 2℃～5℃18 h 内解冻，或在 45℃以下 15 min 内解冻。

4.4.2 样品匀液的制备

4.4.2.1 液体食品

以灭菌吸管吸取 25 mL 样品，放入装有 225 mL PT 稀释液的 500 mL 灭菌广口瓶(瓶内预置适当数量的玻璃珠)，以 80 cm 幅度、于 7 s 内振摇 25 次(或以机械振荡器振摇)，制成 1∶10 的样品匀液。

4.4.2.2 固体和半固体食品

以无菌操作取 25 g 样品，放入装有 225 mL PT 稀释液的灭菌均质杯内，于 8 000 r/min 均质 1 min～2 min，制成 1∶10 样品匀液(也可用灭菌乳钵研磨的方法代替)。

4.4.3 稀释样品匀液

根据对样品污染情况的估计，用 PT 稀释液将样品匀液制成一系列十倍递增的样品稀释液，如 10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}……。从制备样品匀液至稀释完毕，全过程不得超过 15 min。

4.4.4 需要酶处理的食品

取 1∶10 PT 稀释液 10 mL 加酶原液 1 mL，在灭菌试管中混合放入 36℃±1℃水浴中处理 20 min～30 min，取出过滤。

4.5 过滤

对每一份试样，选用适宜的三个连续稀释度的样液，每个稀释度的样液分别过滤两次，将灭菌的过滤装置连接于真空抽滤瓶上，以无菌操作将无菌滤膜放在抽滤底座上，用不锈钢夹子固定。以无菌操作加 10 mL～20 mL 无菌蒸馏水于滤器中，加入 PT 样品匀液 10 mL，打开真空泵，抽吸过滤，再加入 10 mL～15 mL无菌蒸馏水，抽吸过滤，关闭真空泵。用无菌镊子将滤膜取出。

4.6 计数

4.6.1 大肠菌群计数

以无菌操作将滤膜取出放于预先干燥的 LMG 琼脂平板表面上，滤膜与琼脂表面之间应无气泡。放入 36℃±1℃培养箱培养 24 h±2 h。选用 25～250 个菌落的平板，计数所有蓝色(包括深或浅蓝色)的菌落。滤膜上的菌落数乘以稀释倍数即为每克(毫升)[g(mL)]食品中大肠菌群数。

4.6.2 大肠杆菌计数

将有大肠菌群的滤膜放入预先干燥好的 BMA 琼脂平板表面上，滤膜与琼脂表面之间应无气泡。放入 36℃±1℃培养箱培养 2 h，在暗室或紫外操作室内用波长 366 nm UV 灯观察滤膜上的菌落是否有蓝白色荧光。选用 25～250 个菌落数的平板，计算所有带蓝白色荧光的菌落数，乘以稀释倍数即为每克(毫升)[g(mL)]食品中大肠杆菌数。

附 录 A
（标准的附录）
培养基和试剂

A1 蛋白胨-吐温 80(PT)稀释液

a) 蛋白胨 1.0 g
b) 吐温 80 10.0 g
c) 蒸馏水 1 000 mL

将上述成分加热溶解分装 90 mL 于三角瓶中，121 ℃，15 min 高压灭菌。

A2 乳糖莫能霉素葡萄糖醛酸琼脂(LMG)

a) 胰蛋白胨 10.0 g
b) 蛋白胨 5.0 g
c) 酵母膏 3.0 g
d) 乳糖 12.5 g
e) 莫能霉素 0.038 g(溶解在 10 mL 95%酒精里)
f) 苯胺蓝 0.1 g
g) 葡萄糖醛酸钠盐 0.5 g
h) 硫酸十七烷基钠盐 0.25 mL
i) 琼脂 15 g
j) 蒸馏水 1 000 mL

加热煮沸，不能高压消毒，温度冷至 45℃～50℃无菌操作，调整 pH 最终为 7.2±0.1。倾注平板，打开皿盖在 35 C温箱，15 min～20 min 烘干备用。

A3 缓冲 MUG 琼脂(BMA)

a) 磷酸氢二钠 8.23 g
b) 磷酸二氢钠 1.20 g
c) 氯化钠 5.0 g
d) 4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖苷酸(MUG) 0.1 g
e) 琼脂 15.0 g
f) 蒸馏水 1 000 mL

溶解加热煮沸，调整 pH7.2～7.6，121 C，15 min 高压灭菌。温度冷至 45 C～50℃，倾注平板。

A4 Tris 缓冲剂(1.0 mol/L)。溶解 121.1 g 三(羟甲基)胺甲烷于 500 mL 水中，用浓盐酸调节溶液至所需 pH 值。用水稀释至 1 L。室温 4℃～6℃保存。

A5 胰蛋白酶贮存液：用 Tris 缓冲剂稀释 10 g 胰蛋白酶(Doifco No. 0153 或等效品)至 100 mL，pH7.6。如需要加热至 35℃以助溶，通过 Whatman No. 1 滤纸(或等效品)过滤以除去不溶物质，再用 0.45 μm滤膜过滤除菌。于 4℃～6 C保存一周或－18℃保存 3 个月。