SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1059.3—2002

进出口食品平板菌落计数　滤膜法

Plate count for bacterial colonies in food for import and export—Membrane filter 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。其中平板菌落计数　滤膜法中的培养基、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17.2.05),结合SN 0168—1992《出口食品平板菌落计数》样品制备中内容,并在实验的基础上编写而成。

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。

本标准主要起草人: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

进出口食品平板菌落计数　滤膜法

SN/T 1059.3--2002

Plate count for bacterial colonies in food for import and export—Membrane filter method

1　范围

本标准规定了进出口食品中平板菌落计数　滤膜法。

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、辣椒粒、牛奶(需用胰蛋白酶处理)中菌落计数的检验。

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,使细菌留在膜表面。将滤膜放在胰化大豆-坚牢绿琼脂(TSFA)培养基上培养,产生深、浅绿色菌落,进行计数。

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　滤膜:有机或水相,孔径为 0.45 μm。

4.2.4　培养箱:36℃±1℃。

4.2.5　水浴箱:35℃±1℃。

4.2.6　吸管:1 mL、10 mL,具刻度。

4.2.7　玻璃三角瓶和广口瓶:200 mL,500 mL。

4.2.8　试管:17 mm×170 mm,玻璃制。

4.2.9　玻璃珠:直径 5 mm。

4.2.10　平皿:直径 90 mm。

4.2.11　天平:感量 0.1 g。

4.2.12　均质器。

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)。

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

4.3.2 胰化大豆-坚牢绿琼脂(TSFA)(见附录 A A2)。

4.3.3 三(羟甲基)胺甲烷 Tris 缓冲剂(见附录 A A3)。

4.3.4 胰蛋白酶贮存液(见附录 A A4)。

4.4 样品制备

4.4.1 以无菌操作取有代表性的样品盛于灭菌容器内。如有包装,则用 75%乙醇在包装开口处擦拭后取样。

4.4.2 样品匀液制备

4.4.2.1 固体或半固体食品: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 的样品匀液。如样品均质时间超过 2 min,应在均质杯外加冰水冷却。

4.4.2.2 干燥或干粉食品:以无菌操作取 25 g 样品,放入装有 225 mL PT 稀释液的 500 mL 灭菌广口瓶中(瓶内预置适当数量的玻璃珠)。迅速振摇,将样品混匀,制成 1∶10 的样品匀液。振摇时,幅度 30 cm,7 s 内振摇 25 次,也可用机械振荡器振荡 15 s 代替手摇。

4.4.2.3 液体食品:用灭菌吸管吸取 25 mL 样品,放入装有 225 mL PT 稀释液的 500 mL 的灭菌广口瓶中,按 4.4.2.2 条中所述的方法,迅速振摇,制成 1∶10 的样品匀液。吸取样品时,吸管插入液面下不要超过 2.5 cm。吸管内液体要在 2 s～4 s 内完全排入稀释液中。不要在稀释液中吹洗吸管。

4.4.3 稀释样品匀液

4.4.3.1 用 10 mL 灭菌吸管准确吸取 1∶10 的样品匀液 10 mL 放入装有 90 mL PT 稀释液的 200 mL 灭菌广口瓶中。按 4.4.2.2 中所述的方法,迅速振摇,制成 1∶100 的样品液。

4.4.3.2 分别用 10 mL 灭菌吸管按 4.4.3.1 条所述方法将样品匀液制成 10 倍递增 PT 稀释液的样品液如 10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}……

4.4.4 酶处理的食品

需要酶处理的食品取 1∶10 PT 样品匀液 10 mL 加酶原液 1 mL,在灭菌试管中混合放入 35℃±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 培养

以无菌操作将滤膜取出放于预先干燥的 TSFA 琼脂平板表面上,滤膜和琼脂表面之间应无气泡。将 TSFA 琼脂平板,平放入 36℃±1℃培养箱内培养 48 h。

4.7 计数

4.7.1 培养后,对每个 TSFA 琼脂平板上产生的深、浅绿色菌落进行计数。25～250 个菌落为合适范围。如果不能立即计数,应将平板存放于 0℃～4℃,但不得超过 24 h。

4.7.2 如只有一个稀释度的两个平板上的菌落在合适范围内,先计算两个平板的平均值,再将平均值乘以相应稀释倍数,作为每克(毫升)[g(mL)]样品中平板菌数。

4.7.3 如有两个稀释度在合适范围内,先计算每个稀释度两个平板的平均值。再计算两个稀释度的平均值,然后计算每克(毫升)[g(mL)]样品中平板菌落数。

4.7.4 当最低稀释度的两个平板上都少于 25 个菌落时,计数这一稀释度两个平板上的实际菌落数。计算两个平板上的平均菌落数,将平均菌落数乘以稀释倍数,得到估计的平板菌落数。给这个数注上星号(*),表明该数系从菌落数在 25～250 这一范围之外的平板估计所得。

4.7.5 当所有平板上的菌落都超过 250 时,则应将最高稀释度的两个平板的平均菌落数乘以稀释倍

数。得到估计的平板菌落数。给这个数注上星号(*)(同4.7.4)。

4.7.6 如果所有稀释度的平板都没有菌落,则以小于1乘以最低稀释倍数报告平板菌落数。给这个数注上星号(*)(同4.7.4)。

4.7.7 同一稀释度的两个平板中,一个有25～250个菌落,另一个的菌落多于250个,两个平板都要计数。计算方法同4.7.2。

4.7.8 两个连续稀释度中的每个稀释度都有一个平板的菌落数在25～250个范围内,而另一个的菌落数高于250或低于25四个平板都要计数。计算方法参照4.7.2和4.7.3。

4.7.9 某稀释度的两个平板都有25～250个菌落,而另一稀释度的两个平板中只有一个平板的菌落数在25～250范围内。四个平板都要计数,计算方法参照4.7.2和4.7.3。

5 结果报告

报告每克(毫升)〔g(mL)〕样品中平板菌落数或估计数的平板菌落数。

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℃高压灭菌 15 min。

A2 胰化大豆-坚牢绿琼脂(TSFA)

a) 蛋白胨 15.0 g

b) 植物蛋白胨(或大豆胨) 5.0 g

c) 氯化钠(NaCl) 5.0 g

d) 坚牢绿 0.25 g

e) 琼脂 15 g

f) 蒸馏水 1 000 mL

将上述成分加热溶解分装，121℃高压灭菌 15 min，调整最终 pH 为 7.3。

A3 (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。室温或 4℃～6℃保存。

A4 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℃保存一周或－18℃保存 3 个月。