

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。

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 μ m。

4.2.5 培养箱：36 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C。

4.2.6 水箱箱：45 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C。

4.2.7 吸管：1mL、10mL，具刻度。

4.2.8 玻璃三角瓶和广口瓶：500mL。

4.2.9 试管：17 mm×170 mm，玻璃制。

4.2.10 玻璃珠：直径5 mm。

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25mL样品，放入装有225mL PT稀释液的500mL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225mL 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10mL加酶原液1mL，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10mL~20mL无菌蒸馏水于滤器中，加入PT样品匀液10mL，打开真空泵，抽吸过滤，再加入10mL~15mL 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。

(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 000mL

将上述成分加热溶解分装90mL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10mL 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	0.25mL
i) 琼脂	15 g
j) 蒸馏水	1 000mL

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℃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 000mL

溶解加热煮沸，调整pH7.2~7.6，121℃，15 min高压灭菌。温度冷至45℃~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500mL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100mL，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0.45μm滤膜过滤除菌。于4℃~6℃保存一周或-18℃保存3个月。