

1 主题内容与适用范围

本标准规定了出口食品平板菌落计数的方法。

本标准适用于各种出口食品及其原料，有专门规定检验方法的除外。

2 设备和材料

- 2.1 工作台：超净工作台或放于清洁、光线充足的实验室里的水平工作台。琼脂平板在工作台上暴露15min，每平板不得超过15个菌落。
- 2.2 恒温培养箱：36±1℃。
- 2.3 恒温水浴箱：45±1℃。
- 2.4 均质器。
- 2.5 振荡器。
- 2.6 吸管：1、10和25mL，具0.1 mL刻度。
- 2.7平皿：直径为90mm。
- 2.8 稀释瓶：广口瓶或三角烧瓶，容量为200mL和500mL。
- 2.9 玻璃珠：直径为5mm左右。
- 2.10 天平：感量0.1g。

3 培养基和试剂

- 3.1 平板计数琼脂。
- 3.2 75% 乙醇。
- 3.3 稀释剂：磷酸盐缓冲稀释液。

4 操作程序

4.1 样品制备

4.1.1 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。

4.1.2 制备样品匀液

4.1.2.1 固体或半固体食品：以无菌操作取25g样品，放入装有225mL稀释剂的灭菌均质杯内，于8 000r／min均质1～2min，制成1：10的样品匀液。如样品均质时间超过2min，应在均质杯外加冰水冷却。

4.1.2.2 干燥或干粉食品：以无菌操作取25g样品，放入装有225mL稀释剂和适量玻璃珠的500mL稀释瓶中。迅速振摇，将样品混匀，制成1：10的样品匀液。振摇时，幅度为30cm，7s内振摇25次，也可用机械振荡器振荡15s代替手摇。

4.1.2.3 液体食品：用灭菌吸管吸取25 mL样品，放入装有225 mL稀释剂的500mL稀释瓶中，按4.1.2.2条中所述方法迅速振摇，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2～4s内完全排入稀释剂中。不要在稀释剂中吹洗吸管。

4.2 稀释样品匀液

4.2.1 用10mL灭菌吸管准确吸取1：10的样品匀液10mL，放入装有90mL稀释剂的200mL稀释瓶中。按4.1.2.2条中所述的方法，迅速振摇。制成1：100的样品液。从容器中吸取样品匀液和以后的稀释操作中，吸管尖不要碰着瓶口。吸入的液体应先高于所要求的刻度，然后提起吸管使其尖端离开液面并贴在容器内壁将液体调至所要求的刻度。

4.2.2 分别用10 mL灭菌吸管按4.2.1条所述方法将样品匀液制成10倍递增稀释的样品液，如10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵……。

4.3 平板接种

4.3.1 对于每一个样品，选用合适的三个连续稀释度的样品液进行平板计数。

4.3.2 分别用灭菌吸管吸取1mL样品液放入作了适宜标志的平皿内。每个稀释度的样品液用两个平皿。如果某一样品液在取出供试部分前的放置时间超过3min，应按4.1.2.2条所述方法再振摇该样品液。

4.3.3 分别加12～15mL平板计数琼脂(已放45+1℃的水浴中恒温)到各平皿内。立即将平皿内的样品液和琼脂培养基充分混合。混合方法是将平皿倾斜和旋转。要防止把混合物溅到平皿壁和盖上。同时将平板计数琼脂倾入加有1mL稀释剂的另一灭菌平皿作空白对照。将样品液加入平皿后应立即倾注琼脂培养基，每个样品从开始稀释到倾注最后一个平皿所用的时间不得超过20min。

4.4 培养

待琼脂凝固后将平皿翻转，立即放进36±1℃的恒温培养箱内培养46±2h。培养箱应保持一定的湿度，经48h培养的琼脂培养基的失重不得超过15%。

4.5 菌落计数和记录

4.5.1 培养后，立即计数每个平板上的菌落数。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24h。

4.5.2 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)样品中平板菌落数(下表，样品1)。

4.5.3 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)样品中平板菌落数(下表，样品2)。

4.5.4 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(下表，样品3)。

4.5.5 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(*) (意义同4.5.4)(下表，样品4)。

4.5.6 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(*) (意义同4.5.4条)(下表，样品5)。

4.5.7 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4.5.2条(下表，样品6)。

4.5.8 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4.5.2条和4.5.3条(下表，样品7)。

4.5.9 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4.5.2条和4.5.3条(下表，样品8、9)。

4.5.10 蔓延生长菌落

通常有三种不同类型的蔓延生长菌落。第一种类型呈链状菌落，菌落之间没有明显界线。这些菌落是当琼脂和试验物混合时，一个细菌块被分散所致；第二种类型是在琼脂和平皿底之间形成的水膜样菌落；第三种是在平皿边缘或琼脂表面形成的水膜样菌落，如果所选择的平板出现过量的蔓延菌落生长，以致a被蔓延菌落盖住的地方，包括由于蔓延菌落造成的抑制生长区面积超过平板面积的50%，或b.由于蔓延菌落造成的抑制生长区面积超过平板面积的25%，这样的平板报告为“蔓延菌落”，不予计数。计数其他平板上的菌落数，将这些数值的算术平均值报告为平板菌落数(下表，样品10)。

当有必要计数除以上a.和b.外的蔓延生长菌落时，将三种不同类型的蔓延菌落分别计数。对于第一种类型，如果仅有一条链，将它作为一个菌落计。如果有来源不同的几条链，将每条链作为一个菌落计，不要把链上生长的各个菌落分开来数。第二种和第三种类型的蔓延生长形成易于鉴别的菌落，即按一般菌落计数，把计数的蔓延生长菌落数同一般菌落数加在一起，计算平板菌落数。

4.5.11 操作者对同一平板复核自己的计数结果，其差异应在5%之内，而其他人对这一平板重复计数，其差异应在10%之内。否则，应找出原因，加以校正。

4.6 计算和记录数字

适宜稀释度的两个平板的菌落数平均值或两个稀释度的平板菌落数平均值乘以相应稀释倍数计算出每克(毫升)样品中平板菌落数。

记录时，只有在换算到每克(毫升)样品中平板菌落数时，才能定下两位有效数字，第三位数字采用四舍五入的方法记录。也可将样品的平板菌落数记录为10的指数形式(见下表中的例子)。

5 结果报告

报告每克(毫升)样品中平板菌落数或估计的平板菌落数。

平板菌落数计算

样品号	菌落数			平板菌落数/g(mL)
	1：100	1：1000	1：10000	
1	多不可计	175	16	190000 (1.9×10 ⁵)
	多不可计	208	17	
2	多不可计	224	25	250000 (2.5×10 ⁵)
	多不可计	245	30	
3	18	2	0	1600 (1.6×10 ³) *
	14	0	0	
4	多不可计	多不可计	523	5100000 (5.1×10 ⁶)*
	多不可计	多不可计	487	
5	0	0	0	<100 (<1.0×10 ²) *
	0	0	0	
6	多不可计	245	23	260000 (2.6×10 ⁵)
	多不可计	278	20	
7	多不可计	225	21	270000 (2.7×10 ⁵)
	多不可计	255	40	
8	多不可计	210	18	230000 (2.3×10 ⁵)
	多不可计	240	28	
9	多不可计	260	30	270000 (2.7×10 ⁵)
	多不可计	230	28	
10	多不可计	245	35	290000 (2.9×10 ⁵)
	多不可计	230	蔓延菌落	

注：带星号(*)者为估计数。

附 录 A

培养基制备

(补充件)

A1 平板计数琼脂

胰蛋白胨	5.0g
酵母浸膏	2.5g
葡萄糖	1.0g
琼脂	15.0g
蒸馏水	1000mL

将各成分加于蒸馏水中，煮沸溶解。分装试管或烧瓶，121℃高压灭菌15min。最终pH7.0±0.1。

A2 磷酸盐缓冲稀释液

贮存液：	
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	34.0g
蒸馏水	500mL

用大约175mL的1 mol／L氢氧化钠溶液调节pH至7.2，用蒸馏水稀释至1 000mL后贮存于冰箱。

稀释液：用蒸馏水稀释1.25mL贮存液至1 000mL，分装于合适容器，121℃高压灭菌15min。

附加说明：

本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出。

本标准由中华人民共和国河南进出口商品检验局、湖南进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人李志培、邓明义。

本标准主要参考美国食品和药物管理局(FDA)《细菌学分析手册》第6版第4章(1984年)。