



中华人民共和国国家标准

GB/T 13093—2006
代替 GB/T 13093—1991

饲料中细菌总数的测定

Examination of bacterial count in feeds

2006-12-12 发布

2007-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准是对 GB/T 13093—1991《饲料中细菌总数的测定方法》的修订。

本标准与 GB/T 13093—1991 相比主要差异如下：

- 根据 GB/T 4789.2—2003《食品卫生微生物学检验 细菌总数测定》补充了“表 1 稀释度选择及细菌总数报告方式”；
- 根据 ISO 4833:2003《食品和动物饲料中微生物学 30℃时菌落计数》将原标准从稀释液到倾注培养基之间,时间不能超过 15 min,修改为不能超过 30 min；
- 将细菌总数的单位修改为:菌落形成单位每克(或每毫升),即 CFU/g(mL)。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准自实施之日起,GB/T 13093—1991 同时废止。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位:国家饲料质量监督检验中心(北京)。

本标准主要起草人:李丽蓓、饶正华、杨曙明、苏晓鸥。

本标准于 1986 年首次发布,1991 年第一次修订,本次为第二次修订。

饲料中细菌总数的测定

1 范围

本标准规定了饲料中细菌总数的测定方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、饲料原料(鱼粉等)、牛精料补充料中细菌总数的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195—2006 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

细菌总数 bacterial count

饲料试样经过处理,在一定条件下(如培养成分、培养温度和时间等)培养后,所得 1 g(mL)试样中含细菌总数。

注:主要作为判定饲料被污染程度的标志,也可以应用这一方法观察细菌在饲料中繁殖的动态,以便对被检样品进行卫生学评价时提供依据。

4 原理

试样经过处理,稀释至适当浓度,在一定条件(如用特定的培养基,在温度 $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $72\text{ h} \pm 3\text{ h}$ 等)下培养后,所得 1 g(mL)试样中所含细菌总数。

5 设备及材料

- 5.1 分析天平:感量 0.1 g。
- 5.2 震荡器:往复式。
- 5.3 粉碎机:非旋风磨,密闭要好。
- 5.4 高压灭菌器:灭菌压力 $0 \sim 3\text{ kg/cm}^2$ 。
- 5.5 冰箱:普通冰箱。
- 5.6 恒温水浴锅: $46^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.7 恒温培养箱: $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.8 微型混合器。
- 5.9 灭菌三角瓶:100 mL、250 mL、500 mL。
- 5.10 灭菌移液管:1 mL、10 mL。
- 5.11 灭菌试管:16 mm×160 mm。
- 5.12 灭菌玻璃珠:直径 5 mm。

5.13 灭菌培养皿：直径 90 mm。

5.14 灭菌金属勺、刀等。

6 培养基和试剂

6.1 营养琼脂培养基：见附录 A。

6.2 磷酸盐缓冲液(稀释液)：见附录 A。

6.3 0.85%生理盐水：见附录 A。

6.4 水琼脂培养基：见附录 A。

6.5 实验室常见消毒药品。

7 试样的制备

按照 GB/T 14699.1 进行采样,采样时应特别注意样品的代表性和避免采样时的污染。
按照 GB/T 20195—2006 进行样品的制备,磨碎过 0.45 mm 孔径筛。样品应尽快检验。

8 测定程序

细菌总数测定程序见图 1。

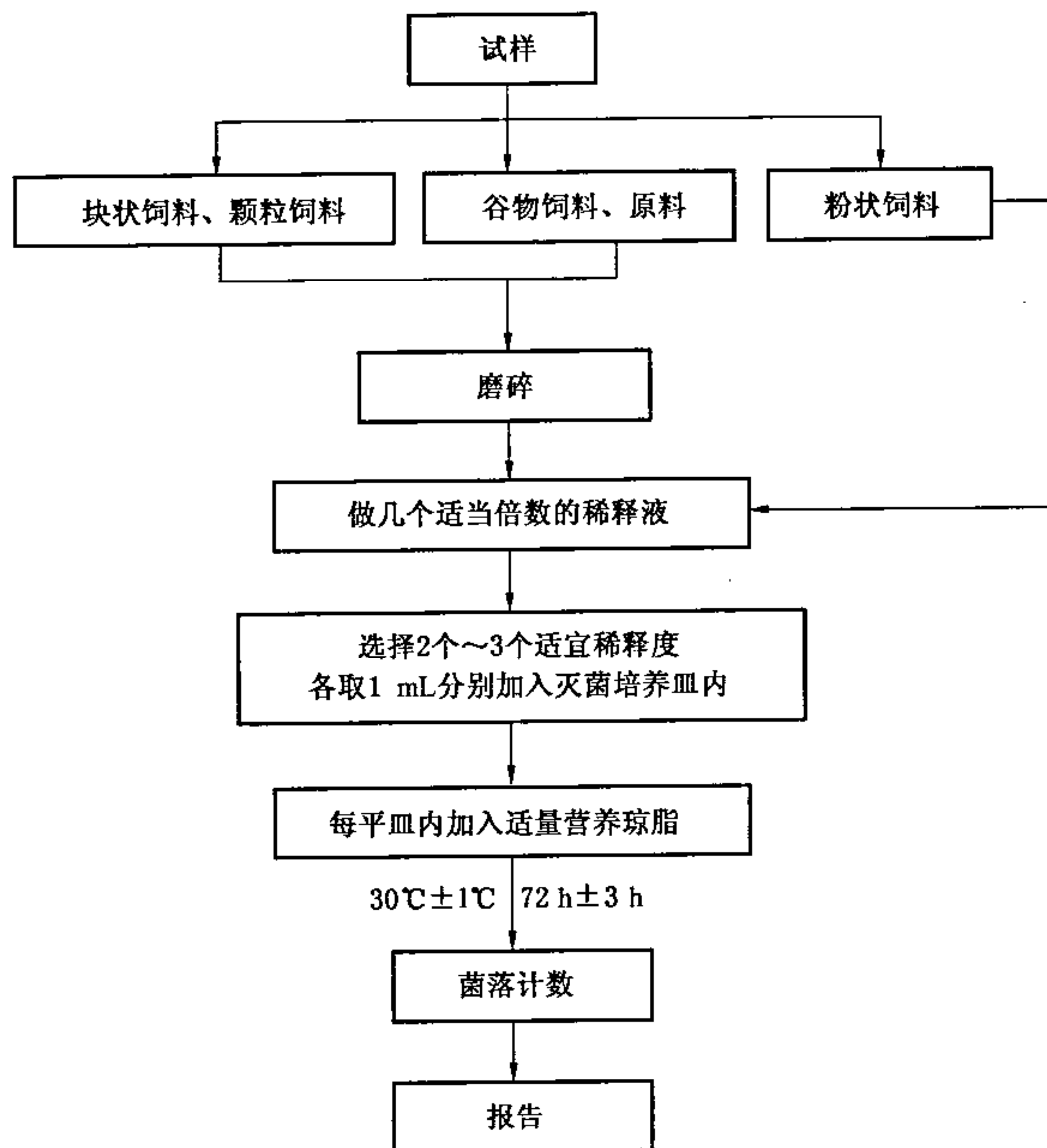


图 1 细菌总数测定程序

9 测定步骤

9.1 试样稀释及培养

9.1.1 以无菌操作称取试样(第7章)25 g(或10 g),放于含有225 mL(或90 mL)稀释液或生理盐水的灭菌三角瓶中(瓶内预置适当数量的玻璃珠)。置振荡器上,振荡30 min。经充分振摇后,制成1:10的均匀稀释液。最好置均质器中8 000 r/min~10 000 r/min的速度处理1 min。

9.1.2 用1 mL灭菌吸管吸取1:10稀释液1 mL,沿管壁慢慢注入含有9 mL灭菌稀释液或生理盐水的试管中(注意吸管尖端不要触及管内稀释液),振摇试管,或放微型混合器上,混合30 s,混合均匀,制成1:100的稀释液。

9.1.3 另取一只1 mL灭菌吸管,按上述操作方法,作10倍递增稀释,如此每递增稀释一次,即更换一支灭菌吸管。

9.1.4 根据饲料卫生标准要求或对试样污染程度的估计,选择2个~3个适宜稀释度,分别在作10倍递增稀释的同时,即以吸取该稀释的吸管移1 mL稀释液于灭菌平皿内,每个稀释度作两个培养皿。

9.1.5 稀释液移入培养皿后,应及时将凉至 $46^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的培养基(可放置 $46^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴锅内保温)注入培养皿约15 mL,小心转动培养皿使试样与培养基充分混匀。从稀释试样到倾注培养基之间,时间不能超过30 min。

如估计试样中所含微生物可能在培养基平皿表面生长时,待培养基完全凝固后,可在培养基表面倾注凉至 $46^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的水琼脂培养基4 mL。

9.1.6 待琼脂凝固后,倒置平皿于 $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内培养 $72\text{ h}\pm 3\text{ h}$ 取出,计算平板内细菌总数目,细菌总数乘以稀释倍数,即得每克试样所含细菌总数。

9.2 细菌总数计算方法

做平板菌落计数时,可用肉眼观察,如菌落形态小时可借助于放大镜检查,以防遗漏。在计算出各平板细菌总数后,求出同稀释度的两个平板菌落的平均值。

9.3 细菌总数计数的报告

9.3.1 平板细菌总数的选择

选择细菌总数在30~300之间的平板作为细菌总数测定标准。每一稀释度使用两个平板菌落的平均数,两个平板其中一个平板有较大片状菌落生长时,则不宜采用,而应以无片状菌落生长的平板菌落的平均数作为该稀释度的细菌总数,若片状菌落不到平板的一半,而另一半菌落分布又很均匀,即可计算半个平板后乘2以代表全平皿细菌总数。

9.3.2 稀释度的选择

9.3.2.1 应选择平均细菌总数在30~300之间的稀释度,乘以稀释倍数报告之(见表1中例次1)。

9.3.2.2 若有两个稀释度,其生长的细菌总数均在30~300之间,则视两者之比如何来决定。若其比值小于或等于2,应报告其平均值;若大于2则报告其中较小的数字(见表1中例次2及例次3)。

9.3.2.3 若所有稀释度的平均细菌总数均大于300,则应按稀释度最高的平均细菌总数乘以稀释倍数报告之(见表1中例次4)。

9.3.2.4 若所有稀释度的平均细菌总数均小于30,则应按稀释度最低的平均细菌总数乘以稀释倍数报告之(见表1中例次5)。

9.3.2.5 若所有稀释度均无菌落生长,则以小于1乘以最低稀释倍数报告之(见表1中例次6)。

9.3.2.6 若所有稀释度的平均细菌总数均不在30~300之间,其中一部分大于300或小于30时,则以最接近30或300的平均细菌总数乘以稀释倍数报告之(见表1中例次7)。

9.3.3 细菌总数的报告

细菌总数在100以内时,按其实有数报告,大于100时,采用两位有效数字,在两位有效数字后面的数值,以四舍五入方法修约。为了缩短数字后面的零数,也可用10的指数表示(见表1)。

表 1 稀释度选择及细菌总数报告方式

例次	稀释液及细菌总数			稀释液之比	细菌总数/ [CFU/g(mL)]	报告方式/ [CFU/g(mL)]
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³			
1	多不可计	164	20	—	16 400	16 000 或 1.6×10 ⁴
2	多不可计	295	46	1.6	37 750	38 000 或 3.8×10 ⁴
3	多不可计	271	60	2.2	27 100	27 000 或 2.7×10 ⁴
4	多不可计	多不可计	313	—	313 000	310 000 或 3.1×10 ⁵
5	27	11	5	—	270	270 或 2.7×10 ²
6	0	0	0	—	<1×10	<10
7	多不可计	305	12	—	30 500	31 000 或 3.1×10 ⁴

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

除非特殊注明,所用试剂均为分析纯;水符合 GB/T 6682 三级水规格。

A.1 营养琼脂培养基

A.1.1 成分

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g~20 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶于蒸馏水中,加入 15% 氢氧化钠溶液约 2 mL 校正 pH 至 7.2~7.4。加入琼脂,加热煮沸,使琼脂溶化。分装三角瓶,121℃ 高压灭菌 20 min。

注:此培养基供一般细菌培养之用,可倾注平板或制成斜面。如菌落计数,琼脂量为 1.5%;如作成平板或斜面,则应为 2%。

A.2 磷酸盐缓冲液(稀释液)

A.2.1 储存液

磷酸二氢钾	34 g
1mol/L 氢氧化钠溶液	175 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

先将磷酸盐溶解于 500 mL 蒸馏水中,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液校正 pH7.0~7.2 后,再用蒸馏水稀释至 1 000 mL。

A.2.3 稀释液

取储存液 1.25 mL,用蒸馏水稀释至 1 000 mL。分装每瓶或每管 9 mL,121℃ 高压灭菌 20 min。

A.3 0.85%生理盐水

称取氯化钠(分析纯)8.5 g,溶于 1 000 mL 蒸馏水中。分装三角瓶中,121℃ 高压灭菌 20 min。

A.4 水琼脂培养基

A.4.1 成分

琼脂	9 g~18 g
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

加热使琼脂溶化,校正 pH6.8~7.2。分装三角瓶中,121℃ 高压灭菌 20 min。

参 考 文 献

- [1] GB/T 4789.2—2003 食品卫生微生物学检验 细菌总数测定[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
-