

中华人民共和国国家标准

GB/T XXXX-201X

代替GB/T XXXX-XXXX

饲料中细菌总数的测定

Examination of bacterial count in feeds

(征求意见稿)

20××-××-××发布

20××-××-××实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会

发布

前言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替GB/T 13093-2006《饲料中细菌总数的测定》，与GB/T 13093-2006相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了适用范围（见第1章，2006版的第1章）；
- 更改了试样的制备（见第7章，2006版的第7章）；
- 更改了试样稀释及培养条件（见第8章，2006版的第9章，附录A）；
- 增加了空白实验（见第8.1.4条）
- 更改了细菌总数计算方法（见第9.1条，2006版的第9.2条）
- 更改了细菌总数的报告（见第9.2条，2006版的第9.3.3条）

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量检验检测中心（北京）]，中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。

本文件主要起草人：李丽蓓、谢秀兰、刘晓露、娄迎霞、李征、姚婷、董雪、樊霞。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 1986年首次发布为GB/T 13093-1986，1991年第一次修订，2006年第二次修订；
- 本次为第三次修订。

饲料中细菌总数的测定

1 范围

本文件规定了饲料中细菌总数的测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、饲料原料（动物源性、植物源性饲料原料）及精料补充料中细菌总数的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 细菌总数 bacterial count

饲料试样经过处理，在一定条件下（如培养基、培养温度和时间等）培养后，所得每g（mL）试样中形成的细菌总数。

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，在一定条件下培养后（如用特定的培养基，在温度 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 等），所得每 g（mL）试样中所含细菌总数。

5 培养基或材料

除非另有规定，仅使用分析纯的试剂。

- 5.1 水：GB/T 6682三级。
- 5.2 平板计数琼脂培养基：见附录 A 中 A.1。
- 5.3 磷酸盐缓冲液（稀释液）：见附录 A 中 A.2。
- 5.4 0.85%生理盐水：见附录 A 中 A.3。
- 5.5 实验室常见消毒药品。
- 5.6 1 mol/L氢氧化钠溶液。
- 5.7 1 mol/L盐酸溶液。

6 仪器设备

- 6.1 恒温培养箱： $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.2 均质器。
- 6.3 微型混合器。

- 6.4 恒温水浴锅：46 °C±2 °C。
- 6.5 高压灭菌器。
- 6.6 分析天平：精准到 0.01 g。
- 6.7 pH计或精密pH试纸。
- 6.8 菌落计数器或放大镜。
- 6.9 振荡器。
- 6.10 灭菌三角瓶（或无菌均质袋）。
- 6.11 灭菌移液管或微量移液器及吸头。
- 6.12 灭菌试管。
- 6.13 灭菌培养皿：直径 90 mm。

7 样品

7.1 采样原则

样品的采集应遵循随机性、代表性的原则。采样过程应遵循无菌操作程序，防止一切可能的外来污染。

7.2 采样方法

- 7.2.1 应在同一批次产品中采集样品，每件样品的采样量应满足微生物指标检验的要求，一般不少于500 g (mL)。
- 7.2.2 独立包装小于等于500 g (mL) 的样品，取完整包装。
- 7.2.3 独立包装大于500 mL的液态产品，应在采样前摇动或用无菌棒搅拌液体，使其达到均质后采集适量样品，放入同一个无菌采样容器内作为一件样品。
- 7.2.4 独立包装大于500 g的固态产品，应用无菌采样器从同一包装的不同部位分别采取适量样品，放入同一个无菌采样容器内作为一件样品。

7.3 采集样品的贮存和运输

- 7.3.1 应尽快将样品送往实验室检验。
- 7.3.2 应在运输过程中保持样品完整。
- 7.3.3 应在接近原有贮存温度条件下贮存样品，或采取必要措施防止样品中微生物数量的变化。

8 试验方法

8.1 试样的稀释

- 8.1.1 以无菌操作称取25 g样品，放于含有225 mL稀释液或生理盐水的灭菌三角瓶（瓶内预置适当数量的玻璃珠）或无菌均质袋中。置振荡器上充分振荡30 min，或用拍击式均质器拍打1 min~2 min，制成1：10的样品均液。
- 8.1.2 用1 mL无菌吸管或微量移液器吸取1：10样品均液1 mL，沿管壁慢慢注入含有9 mL无菌稀释液或0.85%生理盐水的无菌试管中（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的样品均液。

8.1.3 另取一只1 mL无菌吸管，按上述操作方法，作10倍递增稀释，如此每递增稀释一次，即更换一支无菌吸管或吸头。

8.1.4 根据饲料卫生标准要求或对试样污染状况的估计，选择2个~3个适宜稀释度的样品均液，在进行10倍递增稀释时，吸取1 mL样品均液于无菌平皿内，每个稀释度作两个平皿。同时，分别吸取1 mL空白稀释液或0.85%生理盐水加入两个无菌平皿内作空白对照。

8.1.5 稀释液移入平皿后，及时将约15 mL~20 mL凉至45 °C~50 °C的培养基（可放置于46 °C±2 °C恒温水浴锅内保温）倾注平皿，小心转动培养皿使试样与培养基充分混均。

8.2 培养

8.2.1 待琼脂凝固后，倒置平皿于36 °C±1 °C恒温培养箱内培养48 h±2 h。

8.2.2 如估计试样可能在培养基平皿表面弥漫生长时，待培养基完全凝固后，可在凝固后的琼脂表面覆盖一薄层琼脂培养，凝固后倒置平皿，按8.2.1条件进行培养。

8.2.3 试验程序图

试验程序图见附录B。

8.3 细菌计数

8.3.1 细菌计数时，可用肉眼观察，如菌落形态小时可借助于放大镜或菌落计数器检查，以防遗漏。细菌计数以菌落形成单位（colony-forming unit, CFU）表示。

8.3.2 选择菌落数在30 CFU~300 CFU之间，无蔓延菌落生长的平板计数细菌总数。低于30 CFU的平板记录具体菌落数，大于300 CFU的可记录成多不可计。每个稀释度的菌落数应采用两个平板的平均值。

8.3.3 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作为该稀释度的菌落数，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代表一个平皿细菌数。

8.3.4 当平板上出现菌落间无明显界线的链状生长时，则将每条单链作为一个菌落计数。

9 结果报告

9.1 细菌总数的计算

9.1.1 若只有一个稀释度平板上的细菌数在适宜计数范围内，计算两个平板细菌数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数，作为每g（mL）样品中细菌总数结果。

示例1：

单位为CFU/g（mL）

稀释度	1:10	1:100	1:1000	结果计算
细菌数	多不可计，多不可计	160, 168	20, 26	16400

上述数据按9.2.2数字修约后，表示为16000或 1.6×10^4 。

9.1.2 若有两个连续稀释度的平板细菌数在适宜计数范围内时，按下列公式计算：

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

式中：

N ——样品中细菌数；

ΣC ——平板(含适宜范围细菌数的平板)细菌数之和;

n_1 ——第一稀释度(低稀释倍数)平板个数;

n_2 ——第二稀释度(高稀释倍数)平板个数;

d ——稀释因子(第一稀释度)。

示例2:

单位为CFU/g (mL)

稀释度	1:10	1:100	1:1000	结果计算
细菌数	多不可计, 多不可计	252, 264	44, 46	27545

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0.1n_2)d} = \frac{252 + 264 + 44 + 46}{[2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} = 27545$$

上述数据按9.2.2数字修约后,表示为28000或 2.8×10^4 。

9.1.3 若所有稀释度的平板上细菌数均大于300 CFU,则对稀释度最高的平板进行计数,其他平板可记录为多不可计,结果按平均细菌数乘以最高稀释倍数计算。

示例3:

单位为CFU/g (mL)

稀释度	1:10	1:100	1:1000	结果计算
细菌数	多不可计, 多不可计	多不可计, 多不可计	308, 318	313000

上述数据按9.2.2数字修约后,表示为310000或 3.1×10^5 。

9.1.4 若所有稀释度的平板细菌数均小于30 CFU,则应按稀释度最低的平均细菌数乘以稀释倍数计算。

示例4:

单位为CFU/g (mL)

稀释度	1:10	1:100	1:1000	结果计算
细菌数	25, 29	2, 6	0, 0	270

上述数据按9.2.2数字修约后,表示为270或 2.7×10^2 。

9.1.5 若所有稀释度(包括液体样品原液)平板均无细菌生长,则以小于1乘以最低稀释倍数计算。

示例5:

单位为CFU/g (mL)

稀释度	1:10	1:100	1:1000	结果计算
细菌数	0, 0	0, 0	0, 0	<10

9.1.6 若所有稀释度的平板细菌数均不在30 CFU~300 CFU之间,其中一部分小于30 CFU或大于300 CFU时,则以最接近30 CFU或300 CFU的平均细菌数乘以稀释倍数计算。

示例6:

单位为CFU/g (mL)

稀释度	1:10	1:100	1:1000	结果计算
细菌数	305, 311	19, 24	2, 4	3080

上述数据按9.2.2数字修约后,表示为3100或 3.1×10^3 。

9.2 细菌总数的报告

9.2.1 细菌总数小于100 CFU时,按“四舍五入”原则修约,以整数报告。

9.2.2 细菌数大于或等于100 CFU时,第3位数字采用“四舍五入”原则修约,取前两位数字,后面用0代替位数;也可用10的指数形式来表示,按照“四舍五入”原则修约后,采用两位有效数字。

9.2.3 若空白对照上有菌落生长,则此次检测结果无效。

9.2.4 称重取样以CFU/g为单位报告，体积取样以CFU/mL为单位报告。

附录 A
(规范性)
培养基或材料

A.1 平板计数琼脂(plate count agar, PCA)培养基

A.1.1 成分

胰蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	2.5 g
葡萄糖	1.0 g
琼脂	15.0 g
三级水	1000 mL

A.1.2 制法

将上述成分加入三级水中，煮沸溶解，用1 mol/L氢氧化钠溶液或盐酸溶液调节pH至 7.0 ± 0.2 。分装三角瓶或试管，121 °C高压灭菌15 min。

A.2 磷酸盐缓冲液（稀释液）

A.2.1 成分

磷酸二氢钾	34.0 g
三级水	1000 mL

A.2.2 制法

储存液：称取34.0 g磷酸二氢钾溶解于500 mL 三级水中，用大约175 mL的1 mol/L 氢氧化钠溶液调节pH 7.2后，在用三级水稀释至1000 mL后储存于冰箱。

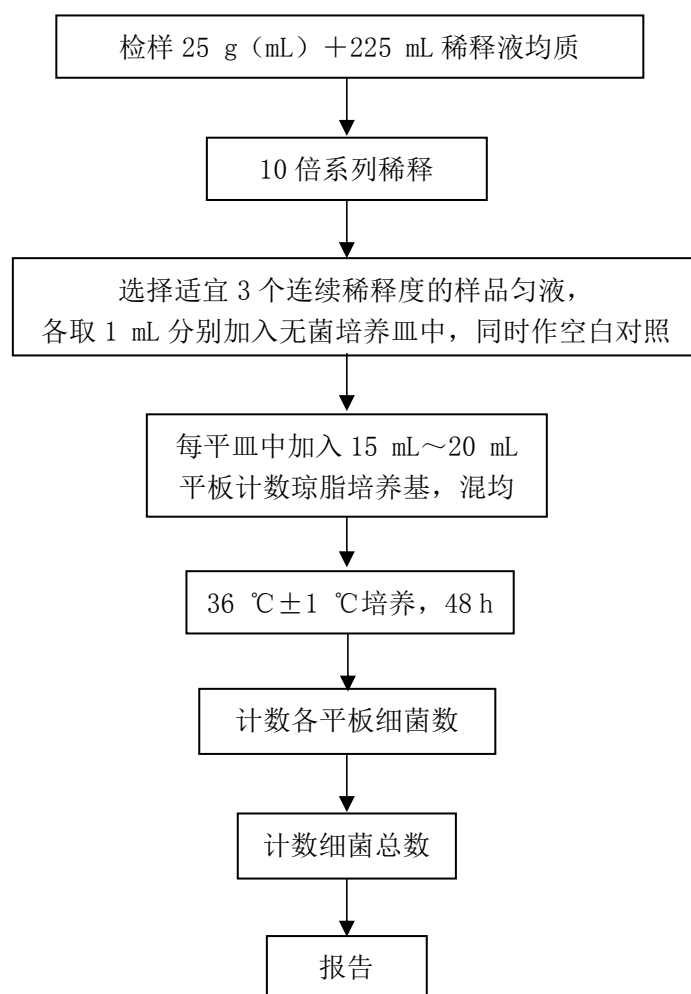
稀释液：取储存液1.25 mL，用三级水稀释至1000 mL，分装适宜容器或每管9 mL，121 °C高压灭菌15 min。

A.3 0.85%生理盐水

称取氯化钠（分析纯）8.5 g，溶于1000 mL 三级水中。分装三角瓶中，121 °C高压灭菌15 min。

附录 B
(规范性)
细菌总数试验程序图

细菌总数试验程序见图 B.1。



细菌总数试验程序

参 考 文 献

- [1] GB 4789.2-2022 食品微生物学检验 菌落总数的测定
 - [2] ISO 4833-2013 Microbiology of the food chain—Horizontal method for the enumeration of microorganisms
 - [3] GB/T 18869-2019 饲料中大肠菌群的测定
-