



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 13093—2023

代替 GB/T 13093—2006

## 饲料中细菌总数的测定

Determination of bacterial count in feeds

2023-08-06 发布

2024-03-01 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：

- a) 更改了适用范围(见第 1 章,2006 年版的第 1 章)；
- b) 更改了原理(见第 4 章,2006 年版的第 4 章)；
- c) 更改了培养基(见 5.7,2006 年版的第 6 章)；
- d) 删除了试样的制备(见 2006 年版的第 7 章)
- e) 增加了样品(见第 7 章)；
- f) 删除了测定程序(见 2006 年版的第 8 章)；
- g) 增加了空白试验(见 8.1.2.3)；
- h) 更改了培养条件(见 8.2,2006 年版的 9.1.5)；
- i) 更改了菌落计数(见 8.3,2006 年版的 9.2)；
- j) 更改了试验数据处理(见第 9 章,2006 年版的 9.3)。

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专利的责任。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

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、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、姜迎霞、李征、姚婷、董雪、崔婕、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

本文件描述了检测饲料中细菌总数的平板计数法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和动植物源性饲料原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

GB/T 20195 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(如用特定的培养基、培养温度和时间等)培养后,所得每克或每毫升试样中菌落的数量。

注:菌落的数量以菌落形成单位(colony forming unit, CFU)表示。

## 4 原理

将饲料待测样品经适当处理和稀释之后,其中的微生物充分分散成单个细胞,取一定量的稀释样液接种平板上,经过培养,由每个单细胞生长繁殖而形成肉眼可见的菌落,即一个单菌落应代表原样品中的一个单细胞;统计菌落数量,根据其稀释倍数和取样接种量即可换算出饲料中的菌数。

## 5 试剂或材料

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 氢氧化钠溶液(1 mol/L):称取 20 g 氢氧化钠,溶于水,冷却至室温后,用水定容至 500 mL。

5.3 盐酸溶液(1 mol/L):量取 42 mL 的浓盐酸,用水稀释至 500 mL,摇匀。

5.4 磷酸盐缓冲储备液:称取 34.0 g 磷酸二氢钾溶解于 500 mL 水中,用大约 175 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2 后,用水稀释至 1 000 mL,混匀,2 ℃~8℃存放。

5.5 无菌磷酸盐缓冲液:取磷酸盐缓冲储备液(5.4)1.25 mL,用水稀释至 1 000 mL,分装适宜容器或每管 9 mL,121 ℃高压灭菌 15 min。

- 5.6 无菌生理盐水:称取氯化钠 8.5 g,用水溶解并定容至 1 000 mL,分装适宜容器或每管 9 mL,121 ℃ 高压灭菌 15 min。
- 5.7 平板计数琼脂培养基:按照附录 A 制备。
- 5.8 无菌液体石蜡:取液体石蜡,121 ℃ 高压灭菌 20 min。
- 5.9 无菌吐温 80:取吐温 80,121 ℃ 高压灭菌 20 min。

## 6 仪器设备

- 6.1 恒温培养箱:控温精度 $\pm 1$  ℃。
- 6.2 拍打式均质器。
- 6.3 恒温装置:控温精度 $\pm 2$  ℃。
- 6.4 高压灭菌器。
- 6.5 天平:感量 0.1 g 和 0.01 g。
- 6.6 pH 计或精密 pH 试纸。
- 6.7 无菌均质杯或无菌均质袋。
- 6.8 无菌移液管或微量移液器及吸头:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)。
- 6.9 无菌试管。
- 6.10 无菌培养皿:直径 90 mm。

## 7 样品

按照 GB/T 20195 进行样品制备,磨碎,过 0.45 mm 孔径筛。样品应尽快检验。

## 8 试验步骤

### 8.1 试样溶液的制备和稀释

#### 8.1.1 试样溶液的制备

8.1.1.1 普通试样:以无菌操作称取 25 g(mL)试样,放于含有 225 mL 无菌磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水的无菌均质杯内,8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min,或放入盛有 225 mL 稀释液的无菌均质袋中,用拍打式均质器拍打 1 min~2 min,制成 1:10 的试样匀液。

8.1.1.2 油脂类试样:以无菌操作称取 25 g(mL)试样,先加 12.5 mL 无菌液体石蜡混匀,再加 25 mL 无菌的吐温 80,在 40 ℃~44 ℃ 水浴中振荡混合 10 min,加入无菌的生理盐水 187.5 mL(在 40 ℃~44 ℃ 水浴中预温),在 40 ℃~44 ℃ 水浴中乳化,制成 1:10 的试样匀液。

#### 8.1.2 试样溶液的稀释

8.1.2.1 用 1 mL 无菌移液管或微量移液器吸取 1:10 试样匀液 1 mL,沿管壁慢慢注入含有 9 mL 无菌磷酸盐缓冲液或无菌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,制成 1:100 的试样匀液。

8.1.2.2 按 8.1.2.1 操作方法,作 10 倍递增稀释,如此每递增稀释一次应更换一次无菌移液管或微量移液器吸头。

8.1.2.3 根据对试样污染状况的估计,选择 2 个~3 个适宜连续稀释度的试样匀液,每个稀释度吸取 1 mL 试样匀液于无菌平皿内,每个稀释度做两个平皿。同时,吸取 1 mL 无菌磷酸盐缓冲液或无菌生

理盐水置于无菌平皿内做空白对照。

## 8.2 培养

稀释液移入平皿后,及时将 15 mL~20 mL 凉至 46 °C~50 °C 的培养基(可放置于 48 °C±2 °C 恒温装置)倾注平皿,小心转动平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,时间不超过 30 min。如果估计试样可能在培养基表面弥漫生长时,待培养基完全凝固后,可在凝固后的琼脂表面覆盖一薄层凉至 48 °C±2 °C 平板计数琼脂培养基(约 4 mL)。待琼脂凝固后,水平倒置平板于 36 °C±1 °C 恒温培养箱内培养 48 h±2 h。

## 8.3 细菌菌落计数

8.3.1 细菌菌落计数时,可用肉眼观察,必要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(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。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。

8.3.3 两个平板其中一个平板有较大片状菌落生长时,应选择无较大片状菌落生长的平板进行菌落计数;若片状菌落不到平板的一半,而另一半菌落分布又很均匀,则应选择菌落分布均匀的半个平板进行菌落计数,计数结果乘以 2 代表这个平板的菌落数。

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

8.3.5 若空白对照上有菌落生长,则此次检测结果无效。

## 9 试验数据处理

### 9.1 细菌总数的计算

9.1.1 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内,计算两个平板菌落数的平均值,再将平均值乘以相应稀释倍数,作为每克或每毫升试样中细菌总数结果,见附录 B 中示例 1。

9.1.2 若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时,按公式(1)计算:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

$N$  ——样品中细菌总数;

$C$  ——平板(含适宜范围的平板)菌落数;

$n_1$  ——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)。

计算结果作为每克或每毫升试样中细菌总数结果,见附录 B 中示例 2。

9.1.3 若所有稀释度的平板上菌落数均大于 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,结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算,见附录 B 中示例 3。

9.1.4 若所有稀释度的平板菌落数均小于 30 CFU,则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算,见附录 B 中示例 4。

9.1.5 若所有稀释度平板均无细菌生长,则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算,见附录 B 中示例 5。

9.1.6 若所有稀释度的平板菌落数均不在 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 的平均菌落数乘以稀释倍数计算,见附录 B 中示例 6。

## 9.2 结果表述

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 细菌总数大于或等于 100 CFU 时,第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约,取前 2 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 2 位有效数字。

附 录 A  
(规范性)  
平板计数琼脂培养基制备

A.1 培养基成分

培养基成分见表 A.1。

表 A.1 培养基成分

成分	质量或体积
胰蛋白胨/g	5.0
酵母浸膏(没粉)/g	2.5
葡萄糖/g	1.0
琼脂/g	15.0
三级水/mL	1 000

A.2 制法

将上述成分煮沸溶解,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液或盐酸溶液调节 pH 至  $7.0 \pm 0.2$ 。分装至三角瓶或试管中,121 °C 高压灭菌约 15 min。

**附录 B**  
**(资料性)**  
**细菌总数计算示例**

细菌总数计算见示例 1~示例 6。

示例 1:

项目	稀释度			计算方式	计算结果	结果表示
	1:10	1:100	1:1 000			
菌落数/CFU	多不可计,多不可计	160,168	20,26	$\frac{160+168}{2} \times 100$	16 400	$1.6 \times 10^4$

示例 2:

项目	稀释度			计算方式	计算结果	结果表示
	1:10	1:100	1:1 000			
菌落数/CFU	多不可计,多不可计	252,264	44,46	$\frac{252+264+44+46}{[2+(0.1 \times 2)]} \times \frac{1}{100}$	27 545	$2.8 \times 10^4$

示例 3:

项目	稀释度			计算方式	计算结果	结果表示
	1:10	1:100	1:1 000			
菌落数/CFU	多不可计,多不可计	多不可计,多不可计	308,318	$\frac{308+318}{2} \times 1 000$	313 000	$3.1 \times 10^5$

示例 4:

项目	稀释度			计算方式	计算结果	结果表示
	1:10	1:100	1:1 000			
菌落数/CFU	25,29	2,6	0,0	$\frac{25+29}{2} \times 10$	270	$2.7 \times 10^2$

示例 5:

项目	稀释度			计算方式	计算结果	结果表示
	1:10	1:100	1:1 000			
菌落数/CFU	0,0	0,0	0,0	$<1 \times 10$	$<10$	$<10$

示例 6:

项目	稀释度			计算方式	计算结果	结果表示
	1:10	1:100	1:1 000			
菌落数/CFU	305,311	19,24	2,4	$\frac{305+311}{2} \times 10$	3 080	$3.1 \times 10^3$