



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 12661—90

---

## 纸和纸板菌落总数的测定法

Paper and board—Determination of microbiological  
properties—Total bacterial count

1990-12-28 发布

1991-10-01 实施

---

国家技术监督局 发布

# 中华人民共和国国家标准

## 纸和纸板菌落总数的测定法

GB/T 12661—90

Paper and board—Determination of microbiological  
properties—Total bacterial count

本标准参照采用国际标准 ISO 8784/1—1987《纸和纸板——微生物性质的测定方法——第一部分：细菌总数》。

### 1 主题内容与适用范围

本标准规定了纸和纸板内部和表面菌落总数的测定方法。  
本标准适用于除植物羊皮纸或具有湿强度之外的大多数纸和纸板。

### 2 引用标准

GB 450 纸和纸板试样的采取

### 3 术语

菌落总数：纸和纸板按规定的条件保温培养后，在标准的培养基中形成的细菌菌落总数。

### 4 原理

将纸或纸板碎解后的悬浮液按规定的稀释浓度在指定的培养基上制备成平板。在 30℃ 有氧环境下培养 72 h，按选择的平板和稀释因子计算每克样品的菌落总数。

### 5 器材

- 5.1 天平：感量 0.1 g。
- 5.2 放大镜：放大倍数 10× 或 15×，作平板菌落计数用。
- 5.3 锥形瓶：容量 500 mL。
- 5.4 玻璃珠：直径 5 mm。
- 5.5 保温箱：温度可以控制在  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 。
- 5.6 pH 计或 6.4~8.0 精密 pH 试纸。
- 5.7 高压灭菌锅：可以在  $120^\circ\text{C}$  和 100 kPa 的条件下操作。
- 5.8 烘箱：可以在  $165 \pm 2^\circ\text{C}$  时持续工作 3 h。
- 5.9 酒精灯。
- 5.10 刀或剪刀（灭菌）：用来切纸或纸板。
- 5.11 镊子（灭菌）：用来夹住纸或纸板的样品。
- 5.12 牛皮纸信封：230 mm×300 mm 和 160 mm×240 mm 的信封各一个，小的放在大的里面。信封用高定量的牛皮纸做成，使其能够经受在烘箱中灭菌，不会过分变脆或产生有害的副产物。灭菌后，在信封一端用压敏胶带纸封口。



- 5.13 牛皮纸:高定量牛皮纸。
- 5.14 锥形瓶:容积 300 mL。用非脱脂棉的塞子。
- 5.15 培养皿:规格为 100 mm×15 mm。
- 5.16 注射器:校准过的 10 mL 医用注射器。或用 10 mL 移液管,其放液端开口 3 mm,以便吸取纤维悬浮液。灭菌之前,全部移液管的末端大口用棉花塞住,将注射器或移液管放入金属盒或牛皮纸袋内进行灭菌。

## 6 试剂

- 6.1 乙醇:浓度为 75%(m/m)。
- 6.2 塞子:非脱脂棉或一次性使用的塞子。
- 6.3 培养基:胰蛋白胨葡萄糖抽提物琼脂,其组成见附录 A A1。  
如果没有胰蛋白胨葡萄糖抽提物琼脂,可以用平板计数琼脂或其他适宜的培养基来代替。使用代替的营养琼脂应在试验报告中说明。
- 6.4 稀释液:林格氏溶液(Ringers solution)。其组成见附录 A A2。也可以用其他的等渗溶液,但应在试验报告中加以说明,同一试验中不能使用不同的稀释液。

## 7 仪器和培养基的灭菌

根据器材选用灭菌方法。

### 7.1 湿热灭菌(高压灭菌锅)

以下各项在 120℃、100 kPa 下灭菌 20 min:

- a. 锥形瓶(5.3)内装玻璃珠(5.4)和稀释液(6.4);
- b. 培养基(6.3)。

### 7.2 干热灭菌

以下各项在 165±2℃下,灭菌 3 h。

- a. 牛皮纸信封(5.12)、牛皮纸(5.13);
- b. 培养皿(5.15);
- c. 注射器或移液管。

加热前,注射器和移液管应完全干燥。信封或牛皮纸加热灭菌时,必须避免烧焦。

### 7.3 燃烧

剪刀、镊子、刀具及类似的器具使用前用 75%(m/m)乙醇(6.1)浸泡,需要剪切纸样时,从酒精中取出,淌流片刻,然后燃掉器具上剩余的酒精。

## 8 试样的采取和制备

8.1 按照 GB 450 规定取样,并作如下补充。

8.2 卫生巾、高级卫生纸、普通卫生纸等均以包装好的一包或一卷为单位取样。

平板和卷筒包装的纸或纸板取样时,从各单位样品中弃去纸或纸板顶部几层,以除去污染的表面。然后用无菌刀沿平行于纸轴或平板纸的一边平行切两刀,再垂直切一刀,可为几层纸的厚度,切下矩形样品去掉上层纸页。小心地将无菌信封打开,将纸和纸板样品从垂直切口末端滑进信封,即水平切口穿过信封内,剪去距底部切口约 200 mm 处以上的样品,使样品滑到里面的信封内,用压敏胶带封住外面的信封。样品大小为 100 mm×200 mm。

8.3 试验碎片的准备:无菌室内操作。在天平盘上放一张灭菌纸,称其皮重。

### 8.3.1 卫生巾

拆开卫生巾的外包装,一只手用无菌镊子(5.11)夹出一条,另一只手用无菌剪刀将一端剪去约



50 mm长,然后剪出宽为5 mm左右横条,将横条剪成5 mm×5 mm左右的方块,然后再夹出另一条,按上述方法剪成方块。将两条卫生巾中的数量相等的方块,放在天平的无菌纸上,称取1.0 g包括各层的试样。

### 8.3.2 小卷卫生纸

拆开卫生纸的外包装,用无菌刀沿轴向切开数层,用无菌剪刀去掉外层的5层,并各剪去30 mm宽的两边,取中间的样品,用同样的方法剪成5 mm×5 mm左右的方块,放在天平的无菌纸上,称取试样1.0 g。

### 8.3.3 平板、卷筒纸或纸板

用无菌刀或剪刀剪开信封,用无菌镊子(5.11)夹出样品,用同样的方法剪成5 mm×5 mm左右的方块,放在天平的无菌纸上,称取试样1.0 g。

## 9 操作步骤

### 9.1 试样悬浮液的制备

将1.0 g纸或纸板的试样碎片,倒入盛有100 mL无菌林格氏溶液的内装玻璃珠的锥形瓶中(5.3),充分摇动约10 min至悬浮液不再含有纤维团块,制成1:100的悬浮液。

### 9.2 平板分离和保温培养

称取试样和进行平板分离的房间,应是无气流对流和无灰尘的无菌室。

#### 9.2.1 涂板前30 min,用30 W紫外线灯管灭菌30 min。

解离后的悬浮液(9.1),立即进行平板分离。用无菌的10 mL注射器(5.16),将含有相当于0.1 g的纸或纸板的10 mL悬浮液分配于5个无菌培养皿中(5.15),其量近似相等。

9.2.2 如果预计测试碎片中含有较多的菌落总数,可进一步配制比1%更高稀释度的悬浮液。如0.1%的悬浮液。可把10 mL的1%悬浮液加到90 mL无菌的稀释液中,并把这种悬浮液10 mL等量地分配到5个培养皿中,于是5个培养皿总共含有0.01 g纸或纸板。更高的稀释度也可以通过这种悬浮液配制出来,但每作一个新的稀释度须换用移液管。

9.2.3 把配制好的悬浮液用注射器吸取10 mL,分别加5个培养皿中各2 mL,然后在每个培养皿中倒入冷却至约45℃的培养基15~20 mL,立即摇动各培养皿使纤维分散,以达到培养基与纤维均匀分布,以便准确计算菌落数。每一批试验的培养基作一个对照培养皿,以检查其无菌性和是否有空气污染。

接种后的培养皿,水平地放在桌面上,使其凝固,然后颠倒过来放入保温箱中,在30±1℃条件下保温培养72 h。

9.2.4 尽量将纸和纸板的试验碎片稀释度调节到每个培养皿产生30~300菌落的细菌数。对于那些细菌含量较低的纸或纸板样品,可降低稀释度为1:30稀释液(即1.0 g试验碎片,倒入盛有30 mL无菌林格氏溶液中)。

### 9.3 菌落计数

检查有菌落生长的培养皿。可将培养皿背面划成几等份用肉眼观察,并用10~15倍的放大镜(5.2),复查看有无遗漏。记下菌落数量和稀释度,并舍去菌落数大于300的培养皿。

## 10 结果计算

10.1 菌落总数用每克纸和纸板生成菌落单位的数量表示。例如试验用1.0%的悬浮液,5个培养皿中原试验碎片总重是0.1 g。如全部菌落计数是22,那么菌落总数就是 $22 \times \frac{1}{0.1} = 220$ 个/g。如果用0.1%的悬浮液,5个培养皿中原试验碎片总重是0.01 g,得到相同的菌落数,结果将是2200个/g。

10.2 精密度:同一样品应作两组平板分离,其标准平板计数误差应在15%以内。

## 11 试验报告

试验报告应包括以下内容：

- a. 本国家标准编号；
- b. 样品名称及送样单位；
- c. 试验日期和地点；
- d. 以每克试样所含菌落总数表示的结果；
- e. 对照培养皿上的菌落总数；
- f. 任何偏离本标准的操作或能够影响试验结果的工作条件。

**附录 A**  
**培养基和稀释液**  
(补充件)

**A1 培养基****A1.1 胰蛋白胨葡萄糖抽提物琼脂**

成分	含量
牛肉汁	3.0 g
胰蛋白胨	5.0 g
右旋糖( <i>d</i> -葡萄糖)	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.0

**A1.2 平板计数琼脂**

成分	含量
蛋白胨	5.0 g
酵母汁	2.5 g
右旋糖( <i>d</i> -葡萄糖)	1.0 g
琼脂	14.0 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.0

**A1.3 制备**

试验室制备上述培养基时,务必保证上述组分完全溶解后再置入合适的容器灭菌。  
如果市售的胰蛋白胨葡萄糖抽提物为脱水状态。使用时参照其包装上印制的说明。

**A2 稀释液****A2.1 林格氏溶液**

成分	含量
NaCl	2.500 g
KCl	0.105 g
CaCl <sub>2</sub>	0.120 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.050 g
蒸馏水或去离子水	1 000 mL

**A2.2 制备**

将上述盐类溶解并置入合适的容器。置于高压灭菌锅内,在 120℃ 100 kPa 下灭菌 15 min。

**附加说明：**

本标准由中华人民共和国轻工业部提出。

本标准由轻工业部造纸工业科学研究所归口。

本标准由陕西轻工业科学研究所负责起草。

本标准主要起草人刘秀荣、任玉珍。