

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2098—2008

食品和化妆品中的菌落计数检测方法 螺旋平板法

Determination of aerobic bacterial count in foods and cosmetics—
Spiral plate method

2008-07-17 发布

2009-02-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准的附录 A 为规范性附录,附录 B 为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国福建出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:陈彬、黄晓蓉、郑晶、吴谦、汤敏英、张体银、林杰。

本标准系首次发布的出入境检验检疫标准。

食品和化妆品中的菌落计数检测方法

螺旋平板法

1 范围

本标准规定了食品和化妆品中菌落计数的检测方法。
本标准适用于各类食品和化妆品的菌落计数。

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 7918.1 化妆品微生物标准检验方法 总则

SN 0168 出口食品平板菌落计数

SN/T 1538.1—2005 培养基制备指南 第1部分:实验室培养基制备质量保证通则

3 原理

螺旋接种菌落计数是依据阿基米德螺旋原理,使样品以对数规律螺旋线形式接种在平板上。样品接种后,菌落即分布在螺旋轨迹上,随半径的增加分布得越来越稀。采用特殊的计数栅格,自平板外周向中央对平皿上的菌落进行计数,即可得到样品中微生物的数量。

4 设备和材料

- 4.1 螺旋接种仪。
- 4.2 菌落计数仪。
- 4.3 均质器。
- 4.4 恒温培养箱:36℃±1℃,30℃±1℃。
- 4.5 样品杯:容量5 mL。
- 4.6 电子天平:精确至0.1 g。
- 4.7 灭菌吸管:1 mL、10 mL。
- 4.8 灭菌平皿:100 mm、150 mm。
- 4.9 稀释瓶:广口瓶或锥形瓶,容量为250 mL和500 mL。

5 培养基和试剂

- 5.1 稀释液:磷酸盐缓冲稀释液见第A.1章。
- 5.2 1 mol/L 氢氧化钠(NaOH):称取40 g NaOH溶于1 000 mL蒸馏水中。
- 5.3 1 mol/L 盐酸(HCl):移取浓盐酸90 mL,用蒸馏水稀释至1 000 mL。
- 5.4 平板计数琼脂:见第A.2章。
- 5.5 卵磷脂吐温-80 营养琼脂:见第A.3章。
- 5.6 5.25%次氯酸钠。
- 5.7 灭菌液体石蜡。

5.8 灭菌吐温-80。

6 操作步骤

6.1 平板制备

按 SN/T 1538.1—2005 中 4.3 的规定,制备和储存用于食品检测的平板计数琼脂和用于化妆品检测的卵磷脂吐温-80 营养琼脂。

6.2 样品制备

6.2.1 按 SN 0168 的方法进行食品样品制备。制备 1:10 的样品匀液后,无菌操作调节该样品匀液的 pH 为 6.6~7.2,酸性样液用 1 mol/L 氢氧化钠,碱性样液用 1 mol/L 盐酸调节,或根据产品标准规定的酸碱溶液来调节 pH 值。

6.2.2 化妆品样品按 GB/T 7918.1 方法进行样品制备。

6.2.3 根据食品卫生标准要求或对样品污染情况的估计,参照螺旋接种仪接种模式的计数范围选择 1 个~2 个适宜稀释度检验。

6.2.4 如果样品稀释液中的微粒会阻塞接种针,应先过滤除去微粒或静置 5 min。

6.3 接种平板

6.3.1 平板使用前按 SN/T 1538.1—2005 中 4.4.4 的规定或用适宜的方法对琼脂表面进行干燥,使培养基表面的水滴消失,注意不要过度干燥,并做好标记。

6.3.2 在螺旋接种仪上选择平板规格,“100 mm”或“150 mm”平板,并选择接种模式。

6.3.3 取制备好的适宜稀释度的样品稀释液,以选定的模式接种于平板计数琼脂平板或卵磷脂吐温-80 营养琼脂平板,每个稀释度接种两块平板。

6.3.4 接种每一个样品前后均按仪器设定程序对螺旋接种仪进行清洗消毒。

6.3.5 按相同接种模式接种稀释液作为空白对照。

6.4 培养

将接种后平板翻转,置于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱内培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ (水产品 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $72\text{ h}\pm 3\text{ h}$),如有产品标准等特殊要求,则按相应的标准或要求进行。

6.5 菌落计数和记录

6.5.1 到培养时间后应立即计数,如果不能立即计数,应将平板存放于 $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,但不超过 24 h。

6.5.2 将平板放在菌落计数仪载物台上,选择适当的背景和光源,选定接种模式和稀释度,按照菌落计数仪的操作规程计数每个平板菌落数,并记录。

6.6 菌落总数的计算和记录

6.6.1 平板上菌落数符合菌落计数仪规定计数范围的为合适范围。(如:第 B.3 章所列的计数范围。)

6.6.2 如果两个稀释度的四个平板菌落数均在合适范围内,则将四个平板菌落数的平均值作为每克(毫升)样品中的菌落数。

6.6.3 如果只有一个稀释度的两个平板菌落数在合适范围内,则将这两个平板菌落数的平均值作为每克(毫升)样品中的菌落数。

6.6.4 当低稀释度的两个平板菌落数都少于合适范围的下限时,计算这一稀释度两个平板菌落数的平均值作为每克(毫升)样品中的菌落数。给这个数注上星号(*),表明该数是从菌落数在计数范围之外的平板估计所得。

6.6.5 当所有平板上的菌落数都超过合适范围的上限时,计算高稀释度两个平板菌落数的平均值作为每克(毫升)样品中的菌落数,给这个数注上星号(*) (意义同 6.6.4)。

6.6.6 如果所有稀释度的平板都没有菌落,则以小于1乘以稀释倍数和接种体积作为每克(毫升)样品中的菌落数,给这个数注上星号(*) (意义同6.6.4)。

示例1: 每个平板接种体积为50 μL , 稀释倍数为10倍, 则应报告小于200 CFU/mL。

示例2: 每个平板接种体积为100 μL , 稀释倍数为1倍, 则应报告小于10 CFU/mL。

6.6.7 记录时,只有在换算到每克(毫升)样品中菌落数时,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。也可将样品的菌落数记录为10的指数形式。

7 结果的表述

根据6.6规定计算出每克(毫升)样品的菌落数,固体样品以CFU/g为单位报告,液体样品以CFU/mL为单位报告。

附 录 A
(规范性附录)
培 养 基

A.1 磷酸盐缓冲稀释液

A.1.1 贮存液

磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	34.0 g
蒸馏水	500 mL

用大约 175.0 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2,用蒸馏水稀释至 1 000 mL 后贮存于 4 ℃~12 ℃ 冰箱。

A.1.2 稀释液

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

A.2 平板计数琼脂

A.2.1 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
蒸馏水	1 000 mL
pH7.0±0.1	

A.2.2 制法

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 15 min。

A.3 卵磷脂吐温-80 营养琼脂

A.3.1 成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
卵磷脂	1.0 g
吐温-80	7.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

先将卵磷脂加到少量蒸馏水中,加热溶解,加入吐温-80。将除琼脂外的其他成分加到其余的蒸馏水中溶解,加入已溶解的卵磷脂、吐温-80,混匀,调 pH 值为 7.1~7.4,加入琼脂,121 ℃,高压灭菌 20 min。

附 录 B

(资料性附录)

全自动螺旋接种计数系统操作程序¹⁾

B.1 仪器接种操作步骤

- B.1.1 在仪器规定位置分别放置装有 5.25%次氯酸钠消毒液、无菌水和无菌水的三个溶液池以及样品杯架,在真空泵上的废液瓶里加适量 5.25%次氯酸钠消毒液。
- B.1.2 打开接种仪和真空泵的电源,此时真空泵开始工作,直至达到要求时停止。
- B.1.3 根据需要,在操作面板上选择平板规格及接种模式。如果接种样品中含有较多的微粒,选择 EXPEL。如果接种样品中含有难以杀灭的细菌如革兰氏阳性芽孢菌,选择 POWER CLEAN。
- B.1.4 将装有样液的样品杯,放到样品杯架的左上角位置,样液液面和样品架平齐。
- B.1.5 按下 ALL 键,仪器将按顺序开始清洗,吸入样液和接种平板。
- B.1.6 在接种针消毒和进样的时候,在琼脂平板侧面标记一条线,将平板放在旋转台上,侧面标记线对准接种起始线。
- B.1.7 此时旋转台旋转,接种针降到琼脂上方,呈放射状向外移动。同时,注射器活塞向下移动,将样液接种到平板上。
- B.1.8 接种结束后,小心取下平板,盖上盖子,放置在水平台子上,注意不要倾斜,等琼脂表面干燥后再倒置培养。
- B.1.9 如果还要接种平板,重复 B.1.3~B.1.8。
- B.1.10 实验结束后,将装有 70%乙醇的样品杯放置于样品杯架的左上角位置,运行一次强力清洗程序,吸入乙醇(乙醇不够再加),直至整个管道系统充满为止。
- B.1.11 关闭仪器电源,取下三个溶液池和废液瓶,清洗,消毒。
- B.1.12 用软布或纸巾蘸玻璃清洁液、不锈钢清洁液或 70%乙醇擦拭仪器表面,盖上防尘罩。

B.2 仪器自动计数操作步骤

- B.2.1 打开计数仪,显示器和电脑主机的电源。
- B.2.2 在桌面上双击 Qcount 的图标。
- B.2.3 输入用户名和密码。
- B.2.4 建立或打开数据库。
- B.2.5 进入软件界面。
- B.2.6 移走平板的盖子,将平板放在平板正中导向装置内。
- B.2.7 在平板工具栏内,在 Source 下拉框内选择平板的接种类型。大小设置为 min:0.1 和 max:20。
- B.2.8 在相机工具栏,选择 Top 或 Bottom 光源,如果菌落颜色比培养基浅,选择 Light Colonies,反之则不选。选择适当的 Shutter Speed,使菌落和培养基对比最清楚。
- B.2.9 如果是倾注或涂布平板,置 Sample Volume 和 Area Multiplier。
- B.2.10 根据需要更改 Low Count 值,如果使用 AutoPlate 接种仪,在 Grid 中选择 Spiral。如果需要阅读平板时缩小分析区域则选择 Reduce Region,同时在 Area Multiplier 输入 5.00%。

1) 本标准的验证是采用美国 SBI 公司生产的 Autoplate 4000+Qcount 全自动螺旋接种计数系统进行的,其他同类仪器经评估后采用。

- B. 2. 11 如果是螺旋平板,在螺旋工具栏内设置 Plater 为 Autoplate,在 Mode 中选择接种模式。
- B. 2. 12 主屏幕图像区域,在 Plate ID 输入用户定义的编号。
- B. 2. 13 在 Dilution 内输入样品稀释倍数的对数值。
- B. 2. 14 如果是 Qcount 计数系统,单击 Count。Color Qcount 计数系统单击 Total Count。
- B. 2. 15 Count Used 和 CFU/mL 会出现在图像左边。
- B. 2. 16 如果平板上有部分菌落计数有错误,在平板图像上单击鼠标右键,进入 Edit Colonies,修正结果。
- B. 2. 17 如果该计数平板还有平行样平板要计数,点击 Save:Next is 下的 Rep,保存结果,反之点击 Save:Next is 下的 New。
- B. 2. 18 如果还有平板需要计数,重复 B. 2. 6~B. 2. 17。
- B. 2. 19 计数结束后,关闭计数仪、显示器、电脑的电源,用软布或纸巾蘸玻璃清洁液、不锈钢清洁液或 70%乙醇擦拭仪器表面,盖上防尘罩。

B. 3 不同接种模式的计数范围

Autoplate 4000+Qcount 全自动螺旋接种计数系统不同接种模式的计数范围见表 B. 1(以接种 100 mm 平板为例)。

表 B. 1 不同接种模式的计数范围

接种模式	起始半径/ mm	旋转间距/ mm	接种时间/ s	体积/ μL	计数范围/ (CFU/mL)
指数 50 μL	13.0	13	5.2	50.00	$4.0 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^5$
缓慢指数 50 μL ^a	13.0	13	8.5	50.00	$4.0 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^5$
指数 100 μL	13.0	13	8.5	100.00	$2.0 \times 10^2 \sim 2.0 \times 10^5$
均一 20 μL	13.0	13	5.2	20.00	$1.0 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^4$
均一 100 μL	13.0	13	5.2	100.00	$2.0 \times 10^2 \sim 3.0 \times 10^3$
均一 250 μL	13.0	13	5.2	250.00	$8.0 \times 10^1 \sim 1.2 \times 10^3$
草坪模式 ^b	7.3	34	14.0	20.00	
比例模式 ^c	13.0	13	5.2	20.00	

^a 接种有机化合物,或使用湿的平板时使用,防止旋转外圈的样品在向心力的作用下流向旋转内圈。

^b 在需要底物或细菌在平板上确切分布的测试时使用,如融合扩散测试、滤过性毒菌研究及酶的产生。

^c 此接种模式有助于放大细菌数量在很小的梯度范围内对抗生素或诱变剂的反应。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
食品和化妆品中的菌落计数检测方法
螺旋平板法

SN/T 2098—2008

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 12 千字

2008年9月第一版 2008年9月第一次印刷

印数 1—2 000

*

书号: 155066·2-19089 定价 8.00 元



SN/T 2098—2008