

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2552.4—2010

乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第4部分：嗜冷微生物菌落计数

Microbiological examination of milk and milk products hygiene—
Part 4: Colony-count method of psychrotrophic microorganisms

(ISO 6730:2005/IDF101, Milk—Enumeration of colony forming units of psychrotrophic microorganisms—Colony-count technique at 6.5 °C;
ISO 8552:2004/IDF132, Milk—Estimation of psychrotrophic microorganisms—Colony-count technique at 21 °C, MOD)

2010-05-27 发布

2010-12-01 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

SN/T 2552《乳及乳制品卫生微生物学检验方法》分为十三个部分：

- 第1部分：取样指南；
- 第2部分：检验样品的制备与稀释；
- 第3部分：酵母、霉菌菌落计数；
- 第4部分：嗜冷微生物菌落计数；
- 第5部分：沙门氏菌检验；
- 第6部分：柠檬酸杆菌检验；
- 第7部分：阴沟肠杆菌检验；
- 第8部分：普通变形杆菌和奇异变形杆菌检验方法；
- 第9部分：克雷伯氏菌检验；
- 第10部分：阪崎肠杆菌检验—免疫荧光方法；
- 第11部分：蜡样芽孢杆菌的分离与计数；
- 第12部分：单核细胞增生李斯特氏菌检测与计数；
- 第13部分：假单胞菌属的分离与计数。

本部分是 SN/T 2552 的第 4 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分第一法修改采用 ISO 6730:2005/IDF101《乳—嗜冷微生物菌落计数 6.5℃菌落计数技术》(Milk—Enumeration of colony forming units of psychrotrophic microorganisms—Colony-count technique at 6.5 °C)，第二法修改采用 ISO 8552:2004/IDF132《乳—嗜冷微生物的评估 21℃菌落计数技术(快速法)》(Milk—Estimation of psychrotrophic microorganisms—Colony-count technique at 21 °C)，主要差异如下。

- 按照 GB/T 1.1 标准要求 and 汉语习惯对一些编排格式进行了修改；
- 将一些国际标准的表达方式改为适用于我国标准的表达方式；
- 对前言进行了修改；
- 规范性引用文件引用了采用国际标准的本系列标准，而非国际标准；
- 为使实际操作更符合我国的习惯和要求，将 5.2.4 刻度吸管不采用容积要求 11 mL±0.2 mL，将 5.2.6 菌落计数设备修改为可选用设备；
- 为简化培养基的配制，将第一法和第二法所用的培养基统一为第二法所用培养基，即平板计数牛奶琼脂(见附录 A)；
- 8.5.7 为避免菌落蔓延，应采取的预防措施仅推荐采取“在凝固后，覆盖一层培养基”的方法，而不同时推荐采用“在培养皿盖内的滤纸上滴加一滴甘油”的方法；
- 统一“重复性”的要求，将第二法中的“重复性”修改为参见第一法的“重复性”。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：姜英辉、雷质文、赵贵明、房保海、赵丽青、贾俊涛、祝素珍、李正义、唐静、马维兴、张健、刘云国、祝长青。

乳及乳制品卫生微生物学检验方法

第4部分：嗜冷微生物菌落计数

1 范围

SN/T 2552 的本部分规定了 6.5 °C 条件下嗜冷微生物的菌落计数方法、21 °C 条件下对嗜冷微生物数量进行评估的菌落计数快速方法。

本部分适用于原料乳、巴氏消毒乳及其他经热处理乳中的嗜冷微生物菌落计数，其他乳及乳制品可参照使用。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件，凡是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。

SN/T 2552.1 乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第1部分：取样指南

SN/T 2552.2 乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第2部分：检验样品的制备与稀释

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

嗜冷微生物 psychrotrophic microorganisms

在本部分规定的 6.5 °C 的条件下培养 10 d，形成可计数菌落的细菌、酵母菌和霉菌。

4 原理

采用平板牛奶计数琼脂和规定数量的样品，制备倾注平板。对测试样品进行十倍梯度稀释，在相同的条件下，制备其他稀释度的平板。平板在有氧条件下，6.5 °C 培养 10 d，21 °C 培养 25 h。为获得满意的结果，选择合适的稀释水平，以从琼脂平板上获得的菌落数和稀释水平来计算每毫升样品中菌落形成单位(CFU)。

本部分包括第一法 6.5 °C 菌落计数法和第二法 21 °C 菌落计数法(快速法)。第二法所描述的快速法是一种近似的方法，这是因为在 21 °C 的培养条件下，除了嗜冷菌以外还其他菌能够生长。然而，大量的研究表明，第二法和第一法所得结果具有良好的相关性。第一法满足对嗜冷菌计数的更准确要求。

5 设备和材料

5.1 总则

5.1.1 按照 SN/T 2552.2 的要求，对所有接触检测样品、稀释剂、稀释样品匀液或培养基的器具进行灭菌。

5.1.2 如果有合适的规范,可用一次性器具替代可重复利用的玻璃器具。可重复利用的玻璃器具需能够经受得住重复灭菌,并且为化学惰性。

5.1.3 常规微生物实验室用于制备检测样品和稀释样品匀液的设备 and 器具见 SN/T 2552.2 的规定。

5.2 特殊要求

5.2.1 干热灭菌设备(烘箱)和湿热灭菌设备(高压灭菌锅)。

5.2.2 培养箱:可操作温度为 $6.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $21\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.2.3 平皿:玻璃或塑料制品,直径 90 mm~100 mm。

5.2.4 刻度吸管:1 mL \pm 0.02 mL、10 mL \pm 0.2 mL。

5.2.5 水浴锅:可操作温度为 $45\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、另一个水浴锅可将水煮沸。

5.2.6 菌落计数设备(可选用):由一个带黑暗背景的发光基座、装有放大倍数至少 $\times 2$ 的放大镜和一个机械或电子数字计数器组成。

5.2.7 pH 计:精确到 ± 0.1 pH 单位。

5.2.8 试管:20 mL。

5.2.9 三角瓶或培养瓶:500 mL,具有合适的塞子。

6 培养基和试剂

6.1 稀释剂

见 SN/T 2552.2。

6.2 平板计数牛奶琼脂

见附录 A。

7 取样

实验室所接收到的样品应具有代表性,并且在运输和储藏过程中不得破坏或改变。
有关取样方法见 SN/T 2552.1

第一法 6.5 $^{\circ}\text{C}$ 菌落计数法

8 程序

8.1 概述

为了提高方法的精密度,稀释样品匀液的制备应严格按照标准进行。

影响精密度的因素有:

- 混合设备的类型;
- 混合时间;
- 稀释剂;
- 大微粒沉淀所需的时间;
- 制备十倍样品匀液的混合时间。

注:操作时防止污染,8.2 和 8.3 中所描述的操作应避免在阳光直射下进行。

8.2 检测样品和初始悬液的制备

见 SN/T 2552.2

8.3 十倍梯度样品匀液的制备

见 SN/T 2552.2

可以应用其他稀释系列,例如,10 mL 检测样品初始稀释物稀释于 90 mL 稀释液中;或 11 mL 检测样品稀释于 99 mL 稀释液中。应用的样品和稀释液量越大,方法的准确性和精密度就越高。

8.4 操作的持续时间

从开始制备初始匀液到样品匀液与培养基混匀所用时间不应超过 15 min。

8.5 接种和培养

8.5.1 取两个无菌平皿,用无菌刻度吸管吸取 1 mL 检测样品至每个平皿中。

8.5.2 再取两个无菌平皿,用另一个无菌刻度吸管吸取 1 mL 10^{-1} 样品匀液至每个平皿中。

8.5.3 必要时,用更高稀释度的样品匀液重复以上操作。

8.5.4 检测培养基温度以确保不超过 46 °C。培养基温度大于 46 °C,可能会破坏或杀死样品中的嗜冷微生物菌群。为防止可能会产生的危害,也可使用涂布平板方法和采用更低的培养温度。向每个平皿倾注 12 mL~15 mL 平板计数牛奶琼脂。如果 15 mL 不能够使微生物均匀分布,可使用 20 mL 平板计数牛奶琼脂。

8.5.5 旋转平板,小心混匀样品匀液和培养基。可将平板放在凉的水平面上使混合物凝固。

8.5.6 制备足够数量的对照平板,以检测灭菌状况。

8.5.7 将平板倒置后放入 6.5 °C 的培养箱中,培养 10 d。

为避免菌落蔓延,应在凝固后的培养基上再覆盖一层培养基。

8.5.8 平皿叠放不能超过 6 个,平皿之间、平皿与培养箱的壁及顶部不能相互接触。

8.6 菌落计数

8.6.1 可选用菌落计数设备计数每个平板上的菌落。在柔和光线下检查平板。重要的是针尖样菌落应计数在内,但应注意避免将培养基中的未溶解颗粒或沉淀物质误判为菌落。仔细检查可疑目标物,必要时使用更高倍数放大镜区别菌落和其他物质。

8.6.2 蔓延菌落应视为单个菌落。如果蔓延生长菌落的面积小于整个平板的四分之一,计数其余未受影响部分的菌落,以此代表整个平板的菌落数。如果平板上超过四分之一的面积被蔓延菌落覆盖,则放弃对该平板的计数。

9 结果计算

9.1 选取菌落数在 10 CFU~300 CFU 之间的琼脂平板。

按式(1)计算每毫升牛奶中嗜冷微生物菌落总数(CFU):

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

式中:

N ——每毫升牛奶中嗜冷微生物菌落总数(CFU);

$\sum C$ ——所有用于计数琼脂平板上的菌落数总和;

- n_1 ——第一稀释度含有 10 CFU~300 CFU 菌落的琼脂平板个数;
- n_2 ——第二稀释度含有 10 CFU~300 CFU 菌落的琼脂平板个数;
- d ——第一稀释悬液的稀释倍数。

9.2 如果有超过 2 个可计数的稀释度菌落数在 10 CFU~300 CFU 之间,对 3 个稀释度来说,修改为式(2):

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2 + 0.01n_3)d} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- N ——每毫升牛奶中嗜冷微生物菌落总数(CFU);
- $\sum C$ ——所有用于计数琼脂平板上的菌落数总和;
- n_1 ——第一稀释度含有 10 CFU~300 CFU 菌落的琼脂平板个数;
- n_2 ——第二稀释度含有 10 CFU~300 CFU 菌落的琼脂平板个数;
- n_3 ——第三稀释度含有 10 CFU~300 CFU 菌落的琼脂平板个数;
- d ——第一稀释悬液的稀释倍数。

9.3 结果按数值修约规则修约至两位有效数值。如果要取舍的数字是 5,其右边的数字全为零,则 5 左边的数字若为奇数则进一,若为偶数则不进。如:28 500 的结果是 28 000,11 500 结果为 12 000。

每毫升牛奶中嗜冷微生物的菌落总数(CFU)以数字 $(1.0-9.9) \times 10^x$ 来表示。其中 x 是合适幂次。

例如:一次微生物菌落计数的结果如下(每个稀释度培养 2 个培养皿):

接种 10^{-2} 稀释度悬液,两个琼脂平板上的菌落数分别为 168 和 215。

接种 10^{-3} 稀释度悬液,两个琼脂平板上的菌落数为 14 和 25。

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{[2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{422}{0.022} = 19\ 182$$

将结果进行四舍五入后,每毫升牛奶中嗜冷微生物为 19 000 或 1.9×10^4 CFU。

9.4 如果与实验室样品一致的两个平板上的菌落数都小于 10,则报告结果如下:

每毫升牛奶中嗜冷微生物小于 $10 \times 1/d$ CFU(d 为最低稀释度的稀释倍数)。

9.5 如果所有平板上的菌落数都大于 300 CFU,计算最接近 300 CFU 菌落数的平板上的菌落,然后乘以最高稀释度对应数值的倒数,结果报告如下:

每毫升牛奶中嗜冷微生物 CFU 的估计值。

10 重复性

在同一实验室、由同一操作者使用相同设备、按照相同的测试方法,并在短时间内对同一被测对象进行测试,所获得的两个独立单一检测结果的绝对差异,较高结果比较低结果高 30%的情况不到 5%。

如果重复性要求不符合 5%或大于 5%,则应调查误差的可能来源。

11 结果报告

检测报告应注明:

- a) 样品标识的全部信息;
- b) 取样方法(如果有);
- c) 检测方法;

- d) 本部分中未规定的所有操作细节,以及可能已经影响试验结果的一些因素。
- e) 检测结果。如果对检测结果作了重复性核查,应引用最终的核查结果。

第二法 21℃菌落计数法(快速法)

12 程序

12.1 初始悬液和十倍梯度样品匀液的制备

根据 SN/T 2552.2 制备检测样品初始悬液(10^{-1})和系列十倍梯度样品匀液。

由于培养基不透明,加之培养后的菌落微小,尤其是零稀释度平板上的菌落不易被检测出来。因此,应至少稀释样品十倍或更大的倍数。

12.2 接种和培养

12.2.1 取两个无菌平皿,用无菌吸管吸取 1 mL 初始悬液至每个平皿中。

12.2.2 必要时,用更高稀释倍数的样品匀液重复以上操作。换一支新的无菌吸管吸取 1 mL 至每个平皿中。

12.2.3 如果可能,仅选择关键稀释梯度(至少两个连续梯度)接种平皿,使每个平板菌落数在 10 个~300 个之间。

12.2.4 其他步骤同 8.5.4~8.5.5。

12.2.5 将平板倒置后放入 21℃ 的培养箱中,培养 25 h±1 h。平皿叠放不能超过 6 个,平皿之间、平皿与培养箱的壁及顶部不能相互接触。

12.3 菌落计数

同 8.6.1~8.6.2。

13 结果计算

同 9.1~9.5。

14 重复性

同第 10 章。

15 结果报告

同第 11 章。

附 录 A
(规范性附录)
平板计数牛奶琼脂培养基

A.1 成分

酵母浸膏	2.5 g
酶解干酪素	5.0 g
无水葡萄糖(C ₆ H ₁₂ O ₆)	1.0 g
脱脂乳粉 ¹⁾	1.0 g
琼脂	9 g~18 g ²⁾
水	1 000 mL

A.2 制法

A.2.1 商业脱水完全培养基

根据产品说明书进行培养基的制备。但应添加脱脂奶粉。必要时,调整 pH 值,使灭菌后的培养基在 25 ℃时 pH 值为 7.0。

A.2.2 脱水基础培养基

将酵母浸膏、酶解干酪素、葡萄糖、脱脂奶粉按顺序溶解于水中并加热溶解。再加入琼脂后加热煮沸,搅拌至琼脂完全溶解,或蒸汽加热大约 30 min。如果溶液不澄清,应采用滤纸过滤。

必要时,调整 pH 值,使灭菌后的培养基在 25 ℃时 pH 值为 7.0±0.2。

A.2.3 分装、灭菌和储存

分装培养基到试管中,每管 12 mL~15 mL,或将 100 mL~150 mL 培养基分装到三角瓶或适宜的容器中。

121 ℃±1 ℃高压灭菌 15 min。如果培养基需要立即使用,可放于水浴锅中冷却至 44 ℃~47 ℃。如果不立即使用,将培养基于 3 ℃±2 ℃,避光存放不超过 3 个月。在进行微生物检测之前,完全融化储藏的培养基,放入水浴锅中冷却至 44 ℃~47 ℃备用。

为了检测琼脂的温度,建议将温度计放入装有与所使用培养基相似的,浓度为 15 g/L 琼脂溶液的单 独容器中。此温度对照溶液应与所用培养基的加热和冷却操作步骤相一致。

-
- 1) 脱脂奶粉应不含抑制性物质。应使用已知不含抑制性物质的脱脂奶粉作比较试验确证。
 - 2) 依琼脂凝胶的强度而定。
-

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
乳及乳制品卫生微生物学检验方法
第 4 部分：嗜冷微生物菌落计数

SN/T 2552.4—2010

*

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

*

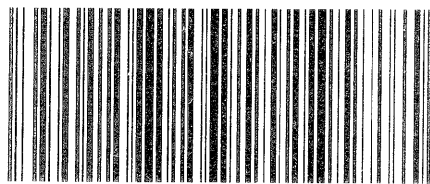
开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字

2010年10月第一版 2010年10月第一次印刷

印数 1—1 600

*

书号：155066·2-21206 定价 16.00 元



SN/T 2552.4—2010