

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 0330—2012
代替 SN 0330—1994

出口食品微生物学检验通则

General rules for microbiological examinations of export food

2012-05-07 发布

2012-11-16 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 实验室场所	1
3.1 概述	1
3.2 安全要求	1
3.3 实验室设计	2
3.4 实验室区域	2
3.5 实验室场所布局和设施	2
3.6 清洁和消毒	3
4 操作人员	4
4.1 概述	4
4.2 能力	4
4.3 实验室人员的能力验证	4
4.4 卫生	4
5 仪器设备	4
6 实验室器材的准备	5
6.1 准备	5
6.2 灭菌/去污	5
6.3 一次性用品和材料	5
6.4 干净玻璃器皿和材料的保存	5
6.5 灭菌玻璃器皿和材料的管理	5
6.6 去污和消毒	6
6.7 废物处理	6
6.8 清洗	6
7 培养基的制备和灭菌	6
8 实验室样品	6
8.1 取样	6
8.2 样品运送	7
8.3 样品接收	7
8.4 样品保存	8
8.5 检测部分	8
9 检验	9
9.1 检验中的卫生防范	9
9.2 初始悬浊液和稀释液的制备	9
10 计数	10

10.1	概述	10
10.2	固体培养基计数法	10
10.3	固体培养基计数法的计算和结果表达	12
10.4	霉菌和酵母菌计数	15
10.5	液体培养基 MPN 检测法	15
11	定性检测方法	19
11.1	概述	19
11.2	原理	19
11.3	测量不确定度	20
12	确认的方法	20
12.1	概述	20
12.2	纯培养物的准备	20
12.3	革兰氏染色	20
12.4	生化方法鉴定	20
12.5	核酸探针鉴定	20
12.6	血清学方法	20
13	检测报告	21
14	微生物检测方法的确认	21
15	结果质量保证/操作质量控制	21
15.1	内部质量控制	21
15.2	参考菌株	22
15.3	外部质量控制(能力验证)	22
附录 A	(资料性附录) 一些消毒剂特性	23
附录 B	(规范性附录) 最可能数(MPN)的测定	24

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN 0330—1994《出口食品中微生物学检验通则》。

本标准与 SN 0330—1994 相比,除编辑性修改外主要技术变化如下:

- 将原标准名称改为《出口食品微生物学检验通则》;
- 对原标准的范围进行了修订;
- 增加了“实验室场所”;
- 增加了“操作人员”;
- 增加了“仪器设备”;
- 增加了“实验室器材的准备”;
- 增加了“培养基的制备和灭菌”;
- 将原标准中的“取样”、“样品的验收、存放和检验样品的制备”合并为“实验室样品”,并按 ISO 7218 对该章节内容进行了修订;
- 将原标准中的“检验”分为“检验”、“计数”、“定性检测方法”、“确认的方法”等章节进行详细描述,并按 ISO 7218 对章节内容进行了修订;
- 将原标准中的“检验记录和结果的报告”改为“检测报告”,并按 ISO 7218 对章节内容进行了修订;
- 增加了“微生物检测方法的确认”;
- 增加了“结果质量保证/操作质量控制”;
- 删去原标准的附录 A,增加“最可能数(MPN)的测定”。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准由中华人民共和国福建出入境检验检疫局、中华人民共和国内蒙古出入境检验检疫局、中华人民共和国山西出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局负责起草。

本标准主要起草人:黄晓蓉、郑晶、郑麟毅、刘中学、李卫华、蒋原、李志勇。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN 0330—1994。

出口食品微生物学检验通则

1 范围

本标准规定了按照特定标准执行的食品微生物检验的一般要求。

本标准适用于食品微生物实验室对食品样品、食品及食品原料生产环境的微生物学检验。

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。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27025 检测和校准实验室能力的通用要求

GB/T 27405 实验室质量控制规范 食品微生物检测

SN/T 1538.1 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

SN/T 1538.2 培养基制备指南 第2部分:培养基 性能测试实用指南

SN/T 2102.1 食源性病原体 PCR 检测技术规范 第1部分:通用要求和定义

ISO/IEC 指南 43-1 利用实验室间比对的能力验证试验 第1部分:能力验证试验方案的建立和实施

ISO 6887 食品和动物饲料微生物学 微生物检验试验样品及初始悬浊液和十倍制稀释液的制备

ISO 8199 水质 微生物培养计数指南

ISO 8261 乳和乳制品 微生物检验试验样品及初始悬浊液和十倍制稀释液制备通用指南

ISO 14461-1 乳和乳制品 微生物实验室内质量控制 第1部分:菌落计数用分析性能评定

ISO 14461-2 乳和乳制品 微生物实验室内质量控制 第2部分:平行板和后续稀释步骤的菌落计数可靠性测定

ISO 16140 食品和动物饲料微生物学 可替代方法的确认程序

ISO/TS 19036 食品和动物饲料微生物学 定量检测的测量不确定度评估指南

3 实验室场所

3.1 概述

本条款是实验室设计通用要求,注意样品的接收和制备应与其他检测样品有效隔离,以防止交叉污染。

3.2 安全要求

实验室设计应遵守不同微生物类型的安全要求。微生物分成4个危害等级:

——危害等级 I (低个体危害,低群体危害):不会导致人类和动物疾病的微生物。

——危害等级 II (中等个体危害,低群体危害):能引起人或动物发病,但一般情况下对实验室工作者、群体或环境不会引起严重危害的病原体。实验室暴露会导致严重感染,但有有效的治疗和预防措施,并且传播风险有限。

- 危害等级Ⅲ（高个体危害，低群体危害）：能引起人类或动物严重疾病的病原体，但通常不在个体间传播，有有效的治疗和预防措施。
- 危害等级Ⅳ（高个体危害，高群体危害）：能引起人类或动物非常严重的疾病，可直接或在个体间传播的病原体，没有有效的治疗和预防措施。

3.3 实验室设计

食品微生物学危害等级Ⅰ级、Ⅱ级和Ⅲ级的实验室设计应满足 GB 19489 的要求，还应考虑 3.4～3.6 的要求。

3.4 实验室区域

3.4.1 概述

实验室区域包含样品和检测区域（见 3.4.2）和其他区域（见 3.4.3），这些区域应相对独立。

3.4.2 样品和检测区域

实验室应对以下区域进行独立分隔或划分：

- 样品接收和保存区；
- 样品制备区，尤其是原材料（如含大量微生物的粉状物）的制备；
- 样品检测区，从初始悬浊液开始到微生物培养过程的样品检测；
- 可疑病原体操作区；
- 参考菌株和其他菌株保存区；
- 培养基和器具的准备及灭菌区；
- 培养基和试剂的保存区；
- 食品无菌检测区；
- 去除污染物区；
- 玻璃器皿和其他器具的清洗区；
- 危险化学品保存区，最好是特别设计的橱柜、房间或建筑物。

3.4.3 其他区域

其他区域也应设计为独立区域，并考虑以下方面：

- 入口、走廊、楼梯、电梯；
- 行政管理区域（如：文秘室、办公室、文件室等）；
- 衣帽间和厕所；
- 档案室；
- 储藏室；
- 休息室。

3.5 实验室场所布局和设施

3.5.1 目的

为保证微生物检测结果的可靠性不受环境影响，实验室设计应避免交叉污染。可采取以下方法：

- 实验室建设应遵循“无回路”原则；
- 应有序执行适当防范程序，保证检测和样品的真实完整（如：使用密封容器）；
- 时间或空间上有效隔离各检测活动。

应避免极端条件,如超出范围的温度、粉尘、湿度、水汽、噪声、振动等。应有足够空间并保证工作区域的整洁。

3.5.2 设施

为了减少粉尘和微生物(危害等级Ⅲ)污染的风险,检测区域装修还应满足以下条件:

- 墙壁、天花板和地板应光滑,易于清洁且对在实验室中使用的清洁剂和消毒剂有耐受性;
- 地板应防滑;
- 除非是密封管道,否则液体输送管不允许在检测区域上方通过,其他架高建筑应有遮掩,且易于日常清洁;
- 进行检测时门窗应能关闭以使气流达到最小,门窗设计应防止灰尘聚集,易于清洁,环境温度(18℃~27℃)和空气质量(微生物含量、灰尘散播率等)应适合检测要求,进气、出气宜使用过滤通风系统,以保证空气质量;
- 安装足够的抽气系统以防止在使用脱水培养基、带粉尘的样品或粉末状样品时粉尘飞扬;
- 当检测操作在低污染环境中进行时,室内应装备超净工作台或生物安全柜;
- 如有必要,实验室环境应采用百叶窗或经过处理的合适玻璃面板来防止阳光照射带来的有害影响。避免在内部安装窗帘,因为窗帘不易清洁且会成为粉尘来源。

3.5.3 其他问题

应考虑下列几点:

- 用水应有效可靠,质量符合所需用途;
- 有充足电力供应;
- 有管道或瓶装气体供应;
- 实验室各部分有充足光线;
- 实验室椅子和家具应采用光滑且不具渗透性材料,易于清洗消毒;
- 实验室家具的样式应易于清洁地面(如:活动家具);
- 除非检测必需的器具,其他家具、文件或其他物品不得放置于检测区域;
- 应有存放使用样品、培养基、试剂等操作文件的设施;
- 每个检测室配备洗手池,最好设置在靠近门的位置;
- 应有高压灭菌器对污染的废料和培养基进行处理,有条件时,可对污染废物进行焚烧处理;
- 备有安全系统,包括消防器材、紧急备用电源、喷淋装置和冲眼装置;
- 提供有效的急救措施。

3.6 清洁和消毒

清洁和消毒应考虑以下情况:

- 地板、墙壁、天花板、实验室椅子、家具及其接合处应定期保养和维修,以防止产生裂缝而可能成为污染源;
- 定期清洁和消毒以保证环境条件适合检测操作,污染或可能受污染的表面应用已知有效的杀菌剂和真菌消毒剂消毒,必要时可用甲醛对房间和器具熏蒸消毒;
- 通风系统及其过滤器应定期维护,必要时更换过滤器;
- 实验室工作区域表面、人员接触的表面和空气应定期监控微生物质量(监控频率基于之前的检测结果);
- 表面污染评估可直接使用含有抗消毒剂的适合中和剂(如:卵磷脂、硫代硫酸钠)的接触板;空气质量检查可以用非选择性培养基(如:平板计数琼脂-PCA)或用于检测目标微生物(如:霉

菌)的选择性培养基,制成平板,打开盖在空气中暴露 15 min 后,培养、计数。也可使用其他有效的检测表面污染的方法。

4 操作人员

4.1 概述

人员能力的一般要求按 GB/T 27025 的有关条款。

4.2 能力

对每项方法或技术都需建立适当的能力评估标准,包括基础和操作原理。实验室应通过内部质量控制进行能力建设(见 15.1.2)。

注:在 ISO 14461-1 中有提供调查菌落计数结果不理想原因(移液管、初始悬浊液的不均一性、计数等)的方法。

4.3 实验室人员的能力验证

实验室人员的能力应定期评估。包括参与内部质量保证程序、能力验证(见 ISO/IEC 指南 43-1)、使用参考材料或按 ISO 14461-2 对微生物计数方法进行自我评估测试。

4.4 卫生

为了防止污染样品和培养基以及个体感染,应执行下列个人卫生预防措施:

- 穿着齐整、干净的合身实验服,实验服由防火布料制成,不得在工作区域或衣帽间以外穿着实验服;
- 为保持样品不受污染,必要时要带发套;
- 保持指甲干净并适当剪短;
- 微生物实验操作前、后以及上洗手间之后,应立刻用温水将手彻底洗净,最好使用无需用手操作的水龙头,尽可能使用专用的清洁液体、粉状肥皂或合适的消毒剂,使用专用纸张或专用毛巾擦手,这些防范措施适用于实验室人员和来访者;
- 操作打开后的样品、培养基以及接种时,禁止说话、咳嗽等;
- 有皮肤感染或疾病的人员,应防止携带的微生物污染样品而使结果无效;
- 不得在实验室内进食和饮水,不得将个人消费品放在实验室冰箱或冰柜中;
- 禁止用嘴吸移液管。

5 仪器设备

5.1 为了与良好实验室规范一致,实验设备应放置于适宜的环境条件下,便于操作、维护、清洁、消毒与校准,并保持整洁与良好的工作状态。使用前应核查设备是否符合指定要求,使用过程中应对其性能的有效性进行监控。

5.2 根据需要,应对设备和监控装置进行可溯源至国家标准的校准,并实施再校准和所有必要的期间检查,将校准程序和结果予以文件化。每个实验室应根据仪器型号、实验室能力水平和制造商的说明书来决定仪器各项校准核查的频率。

5.3 定期检查和维护设备,保证安全适用。依据工作条件及结果准确度的要求对设备进行监控。

5.4 检测设备应有检测精确度的要求。精确度基于日常使用中设备合理操作的实际偏差,并涉及仪器的不确定度。

5.5 涉温设备在启用前以及维修或任何有可能使温度控制受到影响的变动后,都应核查温度的稳定性

和分布均匀性。

5.6 所有仪器设备在启用前都应仔细阅读产品说明书,按照说明书操作、使用和维护仪器设备。

5.7 设备和其所配备的软件应能够达到相应的精确度并符合检测所涉及的相关规范。当指标对结果有重大影响时,要建立关键数量或关键值的校准程序。日常使用前,校准或检查设备,确认其达到实验室要求且符合相关标准规范。实验室针对软件的所有重新配置或更改都应进行核查,以保证修改后的软件能够给出正确的结果。

6 实验室器材的准备

6.1 准备

6.1.1 用于微生物学检测的玻璃器皿和其他实验室材料应合理配置,正确使用,并保证其处于洁净和(或)无菌状态直至使用。

6.1.2 实验器材要按防止或限制操作者与感染材料接触的方式设计。试管和瓶子要采用适当方式塞住。如有必要,玻璃器皿(如:移液管)要放置在特制容器中或包裹适当材料(如:特制的纸张、铝箔等)灭菌。玻璃器皿进行高压灭菌时要留有空间以便蒸汽自由进出,否则不能达到灭菌效果。

6.2 灭菌/去污

6.2.1 概述

应记录灭菌/去污的温度和持续时间。可使用灭菌指示条区分灭菌和未灭菌材料。

6.2.2 干热灭菌

加热玻璃器皿等物,灭菌炉温要在 170 °C 下维持至少 1 h 或等效条件。

6.2.3 湿热灭菌

加压条件下湿蒸汽灭菌是实验室玻璃器皿和材料最有效的灭菌方式。高压灭菌器腔体内温度要在 121 °C 维持至少 15 min。

6.2.4 化学法去污

使用适当浓度的化合物(如:含氯产品、乙醇、季铵化合物等)浸泡足够时间去除污物时,应保证化学残留不影响微生物的恢复生长。

6.3 一次性用品和材料

一次性用品和材料可替代重复使用的器具和材料(如:玻璃器皿、培养皿、移液管、瓶子、试管、接种环、涂布棒等)。一次性用品和材料应不含抑制微生物生长的物质,并保持无菌状态,必要时应进行核查。

6.4 干净玻璃器皿和材料的保存

保存期间,在保持洁净的环境下对干净玻璃器皿和材料进行防尘保护。

6.5 灭菌玻璃器皿和材料的管理

在保持其灭菌状态条件下保存玻璃器皿和材料时,一次性用品按厂商说明书保存,防止其包装损坏。实验室自备的器具在洁净环境下保存。

6.6 去污和消毒

6.6.1 一次性用品的处理

污染的一次性用品弃置前要经灭菌处理。除本条款描述的方法外,也可采用焚烧法。

6.6.2 玻璃器皿和材料用前除菌

器具的灭菌可采用湿热灭菌(见 6.2.3)或干热灭菌(见 6.2.2)。在某些情况下(如:抽样场所),可使用适当的化学杀菌,但处理后的器具不能含有抑制物。

6.6.3 玻璃器皿和材料用后除菌

6.6.3.1 要除菌的材料应放在容器中,如高压灭菌塑料袋。高压灭菌是所有除菌程序中的首选方法(121 °C 至少维持 30 min)。材料在高压灭菌器中应以有利于热渗透的方式装载(如:防止超紧密堆积),还要注意松开盖子和打开袋子。

6.6.3.2 除高压灭菌,还可选择其他法规允许的方法。所有与微生物培养物(固体或液体培养物)接触的器具都应进行高压灭菌,包括可重复使用的未清洗器具。检测期间,可用新配制的消毒剂对小型耐腐蚀性器具(如:移液管)进行浸泡除菌。巴氏吸管仅可使用一次。大部分消毒剂(参见附录 A)有毒性,使用浓缩消毒剂时要戴手套和防护眼镜。

6.7 废物处理

污染材料的处理并不直接影响样品检测质量,但却是良好实验室管理的内容。废物处理要遵守国家有关环境、健康和安全的法律。按以下内容,分别建立识别和分离污染材料及其容器的体系:

- 能随一般废物处理的无污染废物(如:未经培养的食物样品);
- 解剖刀、针、刀、破损的玻璃;
- 要高压灭菌和再利用的污染材料;
- 要高压灭菌和处理的污染材料。

6.8 清洗

重复使用的器具要在灭菌后才可清洗。清洗后,用去离子水冲刷所有器具。当使用专用仪器(如:移液管清洗器、培养皿清洗器、超声波水槽)清洗时,可简化过程。重复使用的器具在清洗后不得有影响微生物生长的残留物。

7 培养基的制备和灭菌

培养基的制备和灭菌按照 SN/T 1538.1、SN/T 1538.2 执行。

8 实验室样品

8.1 取样

8.1.1 一般要求

8.1.1.1 取样应是随机抽样,抽取的样品应对一批产品具有代表性,且在运输和保存期间不被损坏或更换。

8.1.1.2 合同对食品取样数量有明确规定的,按合同规定取样或者按有关法规、标准要求确定取样

数量。

8.1.1.3 从取样至开始检测的全过程中,应采取必要的措施防止食品中固有微生物的数量和生长能力发生变化。

8.1.1.4 取样应遵循无菌操作程序,防止一切可能的外来污染。每取完一份样品,应更换新的取样用具或将用过的取样用具迅速消毒后,再取另一份样品,以免交叉污染。

8.1.2 取样方法

8.1.2.1 直接食用的小包装食品,尽可能取原包装,直到检测前不要开封,以防污染。

8.1.2.2 统装或大容器包装的液体食品,在取样前摇动或用灭菌棒搅拌液体,尽量使其达到均质。取样时应先将取样用具浸入液体内略加漂洗,然后再取所需量的样品。容器装样量不得超过其总容量的四分之三,以防止样品泄漏,便于检测前将样品摇匀。

8.1.2.3 统装或大容器包装的固体和半固体食品,每份样品应用灭菌取样器由几个不同部位采取,一起放入一个灭菌容器内,使之有充分的代表性。

8.1.2.4 生产过程中的取样应划分检验批次,注意同批产品质量的均一性。如用固定的贮液桶或流水作业线上的取样笼头取样时,应先消毒笼头。当用自动取样器取不需要冷却的粉状或固体食品时,应履行相应的管理办法,保证样品的代表性不被人破坏。

8.1.3 样品的标记

所有盛样容器应有和样品一致的标记,样品标记应牢固、具防水性,字迹清晰不脱色,且应标明产品标志与号码、样品顺序号以及其他需要说明的情况。当样品需要托运或由非专职取样人员运送时,应封识样品容器。

8.1.4 取样记录

当取样结束后,应由取样人填写完整的取样记录,内容应至少包括:

- 样品名称;
- 样品来源;
- 样品的大小或数量;
- 取样时产品温度;
- 取样环境条件;
- 取样的日期、地点和时间;
- 要求检测的项目;
- 取样人的签字。

8.2 样品运送

8.2.1 取样结束后应尽快将样品送往实验室,要保证运送过程中样品的微生物数量不发生变化。样品应以防止破损和溢漏的方式包装。运送冷冻和易腐食品应在包装容器内加适量密封的冷却剂或冷冻剂。样品如不能及时运送,冷冻样品应存放在 -15°C 以下冰箱或冷藏库内;冷却和易腐样品存放在 $0^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ 冰箱或冷藏库内;其他样品可放在常温冷暗处。

8.2.2 如不能由专人携带送样时,也可托运。托运前应将样品包装好,应能防破损、防冻结或防易腐和冷冻样品升温或融化。在包装上应注明“防碎”、“易腐”、“冷藏”等字样。

8.2.3 做好样品运送记录,写明运送条件、日期、到达地点及其他需要说明的情况,并由运送人签字。

8.3 样品接收

8.3.1 当样品送达实验室后,应立即对照协议书核查样品并记录,内容包括:

- 样品件数；
- 包装是否完整；
- 样品容器上的标记是否清晰可认；
- 测量样品温度并核对是否和取样时的食品温度一致；
- 干燥样品有无受潮和细菌增殖征象；
- 冷冻样品是否融化；
- 易腐样品有无腐败征象；
- 接收日期和时间；
- 取样的细节(取样日期和时间,样品状态等)；
- 客户名称和地址。

8.3.2 如果样品状态不佳或样品量不足,实验室应拒绝接收样品。在特殊情况下,与客户协商并达成共识后,样品可用于检测,但检测报告要标明样品的有效性信息。样品的标签或标号以及记录在实验室的所有场合应可追溯,保证样品从进入实验室的流程直到检测报告拟定都可被监控。

8.3.3 接收易腐样品时,要记录运输的温度或记录能反应样品状态的温度。样品接收后要尽可能在24 h内检测。对于高度易腐样品(如:贝类),检测要在取样后24 h之内开始,易腐样品(如:鱼、鲜奶)则不超过36 h。如果能够证明目标微生物的恢复不受样品基质影响,样品可在-15℃以下冷冻。

8.4 样品保存

应在样品中微生物数量变化最小的条件下,保存待检样品。推荐下列保存条件:

- 冷冻样品:低于-15℃保存;
- 易腐和冷藏样品:0℃~4℃保存;
- 干燥样品:常温冷暗处保存。

8.5 检测部分

8.5.1 检测样品的制备

8.5.1.1 样品的全部制备过程均应遵循无菌操作程序,样品容器开启前,先将容器表面擦干净,再用70%乙醇消毒开启部位及其周围。

8.5.1.2 冷冻样品:检测前应先融化,可在0℃~4℃融化,时间不超过18 h,或在低于45℃的条件下不超过15 min。融化后尽快检测。

8.5.1.3 硬的或干制样品:使用旋转均质器的时间一次不超过2.5 min。需要碾碎或磨碎的样品,碾碎或磨碎的时间大约为1 min,以避免样品温度升高。

8.5.1.4 液体样品:可用吸管吸取一定量,加于适量的稀释液或培养基内,以30 cm的弧度摇动25次,以保证样品中微生物分布均匀。

8.5.1.5 复合样品(由不同种类的食品组成):应该按组成比例采集组成该食品的各个成分的原料。也可以将全部食品部分均质作为一个混合样品,对需要碾碎或磨碎的测试样品,注意避免样品温度升高,粉碎时间不超过1 min。

8.5.1.6 其他样品:如粘性、酸性、粉状、坚硬、脱水和冷冻干燥、发酵(含有活菌)等特殊样品的制备参见ISO 6887或ISO 8261中检测样品的取样、均质和稀释的特别规则。

8.5.2 实验室样品的保存和销毁

实验室样品要保存至出具所有结果,如有必要,可保存更长时间。由于微生物状态可能改变,通常不接受对样品的再检测。检出致病菌的样品要经过无害化处理。

9 检验

9.1 检验中的卫生防范

9.1.1 为防止环境和测试样品的污染,应在独立房间、独立区域或在安全柜内操作(脱水)粉末状产品。

9.1.2 打开一般样品之前,在开启部位周围区域用 70%乙醇(或其他等效产品)擦拭并待其蒸发。打开无菌包装之前,使打开区域处于含 100 mg/kg~200 mg/kg 游离氯的溶液(或其他适合的消毒剂)中至少 10 min 以杀死可能污染样品的微生物。其他用于打开样品包装的工具和除去部分或全部样品包装的器具(如:开罐头刀、剪刀、勺子、钳子、移液管等)均要灭菌。

9.1.3 检测开始前,工作区域应清洁并用适当的消毒剂擦拭。检测开始前立即洗手,检测期间如果手被污染,应再次洗手。

9.1.4 所有使用的器具在用前和使用期间都应灭菌并防止污染。所有使用过的器具和工具应放置于合适的容器内以便进行处理和灭菌。

9.1.5 采取防范措施使检测尽可能在无菌条件下进行。如:

- 确保工作区域清洁,除去所有可能的污染源或将其减少至最低,工作区域没有气流(如:关闭门窗),检测期间防止不必要的人员走动;
- 工作前后,用适当的消毒剂消毒工作台面;
- 开始检测之前,确保开展检测所需的各项物品都已备齐;
- 迅速开展检测;
- 在时间和空间上区分“洁净”和“脏”的相关活动(尤其对于高风险样品很重要,如生肉和鲜蛋);
- 使用一次性用品;
- 检测过程中,如果一个包装内的一次性移液管、培养皿未用完,在取出所需数量后以正确的方式密封包装;
- 用浸泡过 70%乙醇或其他适当消毒剂的纱布或其他适当材料迅速擦去任何溢出物,在继续检测前重点清洁和消毒此工作台面,为达到消毒效果需要适当的接触时间,使用其他消毒剂时,应根据厂商说明书操作;
- 如有国家法律要求,应在生物安全柜内检测可能含有致病菌的产品;
- 当从容器中取出一支灭菌移液管时,移液管尖端不要接触到容器外表面以防污染;
- 移液管不要接触稀释瓶的瓶口和瓶颈。

9.1.6 气溶胶是环境污染和感染的重要因素,因此,应将气溶胶的形成减到最少。气溶胶可能在下列情况中产生:

- 打开培养皿、试管和瓶子时;
- 使用混合器、注射器、离心机时;
- 排空移液管中液体时;
- 灭菌湿的接种针或接种环时;
- 打开含冻干菌的安瓿瓶时。

9.1.7 对于分子生物学检测,按 SN/T 2102.1 采取防范措施。

9.2 初始悬浊液和稀释液的制备

9.2.1 概述

按 8.5.1 制备初始悬浊液和稀释液,除非有特殊要求,从样品制备至接种培养基结束的时间不得超过 45 min。初始悬浊液或稀释液按有关标准方法进行增菌。

9.2.2 浓缩

9.2.2.1 离心或膜过滤

如果需要检测低数量的微生物,可根据灵敏度和精确度,逐级浓缩测试部分以利于检测。可通过离心或膜过滤的方式进行浓缩。如果使用离心方式,在已知量的稀释液中重悬离心沉淀物后继续分析。对涉及的每个混合物(食品加微生物),开展研究以证明逐级浓缩是否必要和有效,评估食品悬浊液的过滤性。根据灵敏度、选择性、线性和重现性验证所有方法的性能。如果污染程度未知,标准方法(不含过滤法)要做平行测试。

9.2.2.2 免疫分离

如果样品中存在的目标微生物含量较低,可使用包被特异抗体的免疫磁珠分离和浓缩微生物。直接将带有捕获目标微生物的磁珠,涂布于有关标准中指定的特定固体培养基上。

10 计数

10.1 概述

10.1.1 在评定食品的卫生质量或安全状况时,仅仅知道微生物是否存在是不够的,更多情况下,微生物的定量一样重要,并且需要进行定量检测。微生物的数量可以用多种检测方法得到:培养基培养后计数,流式细胞法计数,PCR法计数等。本标准只包含培养基计数法。

10.1.2 固体培养基计数法是以微生物在培养基上能繁殖成肉眼可见菌落为基础。如果含有很多干扰菌落计数的颗粒,或微生物含量很低,在没有纯化目标微生物前不能使用这个方法。在这种情况下可选择液体培养基计数法。

10.2 固体培养基计数法

10.2.1 概述

在培养皿上标上样品编号、稀释系数、日期和其他需要的信息。选择合适稀释倍数以保证得到合适的菌落数和克服可能的抑制因子。从每个稀释度移取稀释液时要使用独立的灭菌移液管,除非从高稀释倍数稀释到低稀释倍数。食品微生物的计数技术中,至少取两个连续的稀释度,每个稀释度两个平皿。

10.2.2 平板倾注法

10.2.2.1 吸取规定量的检测稀释液,将移液管尖部靠试管壁使移液管剩余液体粘到试管壁上。打开灭菌平皿盖,使移液管能够插入即可,排出溶液。

10.2.2.2 从水浴锅中取出琼脂培养基时,用干布擦去瓶子表面污渍,防止污染平皿。将熔化好保持在44℃~47℃的琼脂培养基倒入平皿,90 mm平皿一般倾注18 mL~20 mL,避免直接倒在含接种物的溶液上。

10.2.2.3 立即将溶液和培养基小心混匀,将平皿置于水平表面冷却凝固(凝固时间不能超过10 min)。倾注过程避免培养基漏到容器外或平皿盖子上。

10.2.2.4 如果检测中已经预计会有蔓延菌落存在,用灭菌的无营养琼脂或其他指定培养基覆盖凝固的平皿,以防止或减小菌落蔓延。

10.2.3 涂布法

10.2.3.1 概述

涂布法用于只能在琼脂表面生长的菌落计数,比平板倾注法具有优势,更易观察菌落表面形态,提高分析人员对不同类型菌落的鉴别能力。由于涂布法使微生物不受熔化培养基的热力,所以可获得更高的计数量。预先倒好至少有 3 mm 厚的培养基,这个厚度可以使微生物不受气泡和水蒸气的影响。为使生长速度统一,保证接种溶液在 15 min 内被吸收,可按 SN/T 1538.1 或相关标准方法使凝固的培养基表面干燥。

10.2.3.2 手工涂布法

10.2.3.2.1 用灭菌移液管,把液体样品或初始悬浊液(一般是 0.1 mL 或 0.5 mL)转移到培养基平皿中(直径均为 90 mm 或 140 mm)。每个稀释度的稀释液重复此操作。

10.2.3.2.2 需要检测低含量微生物的样品时,可以增加十倍样品量,取液态样品或初始悬浊液 1.0 mL。此时,应使用大平皿(直径 140 mm)或三个小平皿(直径 90 mm)。

10.2.3.2.3 尽快用玻璃、塑料或钢制涂布棒,将样液在培养基表面涂抹均匀,但不要触及平皿边缘。接种后可将平皿于室温放置 15 min,使接种液被吸收。

10.2.3.3 螺旋平板法

10.2.3.3.1 概述

螺旋平板法已用于牛奶和牛奶制品以及其他食品的实验室比对测试中。

10.2.3.3.2 琼脂平板制备

琼脂平板制备推荐使用自动分装灭菌系统,以保证平板的水平度。倒入相同量的琼脂到所有平皿,使平板有相同高度,利于螺旋接种仪针头保持正确的接触角度。也可以选择使用商业制备好的琼脂平板。

10.2.3.3.3 平板计数

首先用次氯酸钠溶液清洗针头和管道,再用无菌水冲洗仪器系统,最后将液态样品注入针头内。将制备好的平板放在转盘的接种针头下。样品通过接种针头螺旋状地将样液分布到平板表面上。移开接种好的平板,将接种针头放置到开始的位置。清洗接种针头后,再接种其他平板。培养后,将螺旋平板计数栅放在中间适当位置。根据 20 个菌落计数规则进行计数,选择任一扇形区,从边缘向中心计数菌落直至计数到 20 个菌落。继续计数已观察到第 20 个菌落的扇形区中所含有的剩余菌落。计数相对同样的扇形区段的菌落,并且根据这两个区段的接种量区分两个区域的菌落数,每部分计数栅适宜的接种量参见各螺旋接种仪操作手册。

10.2.4 培养

10.2.4.1 除非有特别说明,接种后立即翻转平板,然后迅速将他们放置于适当温度的培养箱中。如果容易产生脱水现象(如:培养箱为 55 °C 或空气流动过强时),培养前用塑料袋松散地包好,或采取其他等效的措施。

10.2.4.2 在培养过程中,温度微小变化是不可避免和允许的,例如培养箱开和关的过程。但是,这些

过程的变化应该控制到最小,并保证不会影响到实验结果。

注意:在某些情况下,计数时为避免混淆样品中的杂质和菌落,将接种的平板放置于 3℃±2℃ 保存,与接种培养的平板比较以区分杂质和菌落,也可以使用放大镜区分杂质和菌落。

10.2.4.3 在某些情况下,由于实验室工作的需求,在培养前,接种好的平板最长冷藏 24 h。如果这样做,实验室应保证这个操作不会影响计数结果。

10.2.4.4 在有氧培养中,一般平板堆叠不能超过 6 个,平板之间、平板与培养箱壁间要距离至少 25 mm。如果空间不够,在空气流通的系统里,可以叠得更高些。这种情况,需要证实温度均匀性。

10.2.4.5 培养后,平板需要立即进行计数。如果无法及时计数,应将平板放置于冰箱中,保存不超过 48 h,除非有其他特殊说明。只有在已经证明对计数结果不会产生影响的情况下才能对平板进行冷藏。使用含指示剂的培养基,冷藏的平板要在室温下进行平衡,以确保能获得正确颜色。

10.3 固体培养基计数法的计算和结果表达

10.3.1 菌落计数

按具体标准培养后,对少于 300 个菌落(总菌落、典型菌落或可疑菌落)的每个平板进行菌落计数。按照具体标准的菌落描述,计数典型或可疑菌落。如存在蔓延菌落,将蔓延菌落作为一个菌落计数。如果蔓延少于四分之一平板,计数不受影响的部分,用这个数目来计算整个平板的菌落数。扣除这个蔓延菌落的理论菌落数就是整个平板的菌落数。如果超过四分之一平板长有蔓延菌落,不用计数。将成链状的菌落作为一个菌落计。各种计算方法见 10.3.2,包括无菌落生长的平板。当使用螺旋接种仪时,根据 10.2.3.3.3 进行菌落计数。

10.3.2 结果表达

10.3.2.1 概述

10.3.2.1.1 一般情况如下:

- 每个稀释度接种到一个直径 90 mm 平板;
- 总菌落数最多数目为:每个平板 300;
- 在计数典型菌落或可疑菌落时的总菌落数(典型和非典型):最好是每个平板 300;
- 典型或可疑菌落的最大数目:每个平板 150;
- 接种鉴定或验证的可疑菌落数:一般每个平板 5。

这些数字由具体标准规定。如果不是使用直径 90 mm 的平板,菌落的最大数目根据平板(或滤膜)表面积或增或减。

10.3.2.1.2 下列计算方法是假设实验操作正确的情况。偶尔发生特殊情况时(如:两个连续稀释度的稀释因子的比率可能差别很多),计数结果需要经过有资质的微生物专家验证,必要时可以否定结果。

10.3.2.2 计算方法:一般情况(总菌落或典型菌落的计数)

为保证结果的有效性,一般需要计数一个以上平板,平板包含至少 10 个菌落(包括总菌落、典型菌落或符合鉴定标准的菌落),按式(1)进行计算。

$$N = \frac{\sum c}{V \times 1.1 \times d} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

N ——每克(毫升)样品中的菌落数,CFU/g(mL);

Σc ——两个连续稀释度平板上的菌落数平均之和,CFU;

V ——每个平板接种的溶液体积,单位为毫升(mL);

d ——第一个稀释度的稀释系数(当样品没有被稀释时 $d=1$)。

计算结果四舍五入,如果第三位等于5,前一位数进一,保留两位有效数字。

示例:

第一稀释度(10^{-2}):168个菌落;

第二稀释度(10^{-3}):14个菌落;

$$N = \frac{\Sigma c}{V \times 1.1 \times d} = \frac{168 + 14}{1 \times 1.1 \times 10^{-2}} = \frac{182}{0.011} = 16\ 545$$

计数结果: 1.7×10^4 CFU/g(mL)。

10.3.2.3 计算方法:验证试验后

在需要进行验证试验时,经验证后,按式(2)进行计算。

$$a = \frac{b}{A} \times C \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

a ——每克(毫升)样品中的目标菌落数;

A ——选取用于验证试验的可疑菌落数;

b ——进行验证试验后证实的菌落数;

C ——平板上总的可疑菌落数。

示例:

第一稀释度(10^{-3}):66个菌落,选择8个菌落进行检测,其结果6个为目标菌;那么, $a=50$;

第二稀释度(10^{-4}):4个菌落,检测4个菌落,其结果均为目标菌,那么, $a=4$;

$$N = \frac{\Sigma a}{V \times 1.1 \times d} = \frac{50 + 4}{1 \times 1.1 \times 10^{-3}} = 49\ 090$$

计数结果: 4.9×10^4 CFU/g(mL)。

10.3.2.4 计算方法:低菌落数

10.3.2.4.1 当一平板(样品或初悬液或第一稀释度)含少于10个菌落的情况

10个以上菌落是计数方法精确度适宜的限值。如果平板上菌落数小于10,但大于等于4时,按照10.3.2.2计算结果,结果报告为估计数: \times CFU/g(mL)。如果菌落数为1个~3个,精确度太低,结果报告为:存在微生物,但少于 $(4 \times d)$ CFU/g(mL)。

10.3.2.4.2 平板(检测样品或初悬液或第一稀释度)无菌落生长的情况

如果液态样品原液或初悬液或第一稀释度接种的平板没有菌落生长,结果报告为: $<1/d$ CFU/mL(液态样品)或者 $<1/d$ CFU/g(其他样品)。 d 是初悬液的稀释因子(直接用样品原液接种时 $d=10^0=1$)。

10.3.2.4.3 特殊情况

特殊情况涉及计数典型或可疑菌落,计算方法见表1。

表 1 特殊情况的计数方法

情况类型	1	2
计算方法	第一稀释度 d_1 平板上典型和非典型菌落数超过 300,有可见的典型菌落或证实的菌落,以及如果第二稀释度 d_2 平板菌落数少于 300 个,其中无典型菌落或证实的菌落,结果按“ $<1/d_2$ CFU/g(mL)且 $>1/d_1$ CFU/g(mL)”计数	第一稀释度 d_1 平板上典型和非典型菌落数超过 300,无可见的典型菌落或证实的菌落,以及如果第二稀释度 d_2 平板菌落数少于 300 个,其中无典型菌落或证实的菌落,结果按“ $<1/d_2$ CFU/g(mL)”计数
示例	第一稀释度(10^{-2}):平板上超过 300 个菌落,有典型菌落或证实的菌落; 第二稀释度(10^{-3}):平板上 33 个菌落,无典型菌落或证实的菌落	第一稀释度(10^{-2}):平板上有超过 300 个菌落,无典型菌落或证实的菌落; 第二稀释度(10^{-3}):平板上 33 个菌落,无典型菌落或证实的菌落
计数结果/ [CFU/g(mL)]	>100 且 $<1\ 000$	$<1\ 000$

10.3.2.5 计算方法:特殊示例

10.3.2.5.1 当第一稀释度 d_1 平板菌落数(总菌落、典型菌落或可疑菌落)超过 300(或具体标准规定的其他数字),第二稀释度 d_2 平板低于 10 个菌落(总菌落、典型菌落或确证后的菌落)。如果 d_1 稀释度的平板菌落数在 334~300 之间(置信区间的上限加权平均为 300),用 10.3.2.2 的计算方法,见表 2 中的示例 1。如果 d_1 稀释度的平板菌落数大于 334(置信区间的上限加权平均为 300),只要计算稀释度 d_2 的结果并计算出一个估算数,见表 2 中的示例 2。当设定了最大菌落数 300,如果估算数小于 8(置信区间的下限加权平均为 10),这时两稀释度的差异是不能接受的,见表 2 中的示例 3。对应置信区间的数值应与计数的菌落数最大值相适宜,见表 2 中的示例 4。

10.3.2.5.2 当所有平板的菌落数都超过 300(或具体标准规定的其他数字),结果报告为:每毫升或每克样品含“超过 $300/d$ ”(总菌落数或典型菌落数)或“超过 $300 \times (b/A) \times (1/d)$ ”(确证菌落)。其中:

d ——最终稀释度的稀释系数;

A ——可疑菌落数;

b ——从可疑菌落数 A 中确证的菌落数。

10.3.2.5.3 最终稀释度的平板含有大于 10 个、小于 300 个菌落(总菌落数、典型菌落数或可疑菌落数),按式(3)计算微生物数 N' :

$$N' = \frac{c}{V \times d} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

c ——平板上菌落数;

V ——每个平板接种液体积;

d ——对应稀释系数。

根据 10.3.2.2 规定保留结果有效数字,结果报告为:微生物含量为 \times CFU/g(mL),见表 2 中的示例 5。

表 2 特殊示例计数情况举例

示例	平板计数情况	计算方法	计数结果/ [CFU/g(mL)]
1	第一稀释度(10^{-2}):310 个菌落; 第二稀释度(10^{-3}):8 个菌落	用表 1 中情况 1 的计算方法计算两 稀释度上菌落数	2.9×10^3
2	第一稀释度(10^{-2}):平板上超过 334 个菌落; 第二稀释度(10^{-3}):9 个菌落	按照 10^{-3} 稀释度平板上菌落数计算	9.0×10^3
3	第一稀释度(10^{-2}):平板上有超过 334 个 菌落; 第二稀释度(10^{-3}):7 个菌落	—	结果不可接受
4	计数最大数设为 150 时: 第一稀释度(10^{-2}):超过 167 个菌落(置信区 间上限加权平均等于 150); 第二稀释度(10^{-3}):7 个菌落	结果按照 10^{-3} 稀释度平板上的菌落 数给出估算值	7.0×10^3
5	最终稀释度(10^{-4}):120 个菌落	$N' = \frac{120}{1 \times 10^{-4}} = 1\ 200\ 000$	1.2×10^6

10.3.2.6 测量不确定度

定量检测的测量不确定度评估见 ISO/TS 19036。

10.4 霉菌和酵母菌计数

10.4.1 概述

霉菌和酵母菌一般用平板倾注法检测,这个方法可以简单地计数,或者用涂布技术,该方法能最大限度使细胞与大气中的氧气接触并避免来自融化琼脂的热力。如果使用制备好的琼脂平板,接种前平板要保持干燥(按 SN/T 1538.1)。一些霉菌和酵母菌具有传染性或能引起突变反应,操作时要特别小心。平板应放置于培养箱中,不能放于敞开的房间。平板应水平放置培养且在准备计数前不移动,因为移动会导致孢子散播,长出其他菌落,尽量少移动平板盖子。火焰灭菌的接种针应在接种前冷却,避免孢子或其他细胞的扩散。工作台和培养箱应定期消毒。

10.4.2 计数

一般计数 10 个~150 个菌落的平板。如果真菌主要由霉菌组成,选择低种群数量的平板计数,对含计数上限菌落数的平板,要选择性地计数。如果菌落可疑,每个样品至少检查五个菌落,判定是否有细菌的存在。

10.5 液体培养基 MPN 检测法

10.5.1 原理

将检测样品接种到特定的液体培养基,这种培养基一般会对非目标菌产生抑制作用。可利用各种方法确定目标菌是否生长,例如:目测是否浑浊,是否产气,颜色是否变化,在选择性培养基上的分离情况等。相关标准中规定了培养基成分和阴性、阳性的辨别特征。用此方法,检测只能获得定性结果,也就是阳性或阴性结果。为得到微生物估计量,需做几个测试,并用统计学方法确定最可能数(MPN)。

10.5.2 接种

10.5.2.1 概述

使用选择性培养基时,加入样品后不应降低它的选择性。大多数标准会在范围中详细列出特殊细胞和培养液相容性的信息,但要特别注意调味品、可可粉和肉汤等基质,可能含有抑制生长的物质,需要添加中和物。可用高倍稀释、过滤、滤膜或免疫磁珠分离方法把目标微生物从样品中分离。样品中的生物成分可能引起不相容性,例如:受环境严重污染的样品、发酵产品或含益生菌的样品,比微生物含量很少的样品更难分析。对于这些难分析的样品,应用标准菌株验证方法的相容性。

10.5.2.2 步骤

接种检测样液一般少于或等于 1 mL,样液一般加入到十倍或五倍体积的培养基中。100 mL 以上的体积,可能要使用更浓缩的培养基,或将灭菌脱水培养基溶到冷却的样品中。此外,从制备样品第一稀释度,接种到最后一管、多孔盘或瓶子的时间应该少于 15 min,每次稀释使用新的灭菌吸管。

10.5.3 接种系统选择

10.5.3.1 一般要求

MPN 方法本质在于每个稀释度增菌液不一定都含有微生物,根据每一稀释度产生微生物生长的增菌液可以估算出样品初始浓度的细菌量。为获得超过可能浓度范围的估计数,需要数个稀释度,每个稀释度培养几管(或几个平板等)。原始样品中微生物最可能数(MPN)和估算的精确度,可以根据培养后阳性和阴性管数,用统计学方法计算。根据以下条件选择 MPN 类型:

- 调查中样品的微生物期望值;
- 管理需要;
- 精确度需要;
- 其他实际考虑。

根据检测样的阳性管数粗略计算不确定度,与根据平板上菌落数计算不确定度一样,都是粗略简单的方式。当使用试验管数的平方根时,不确定度提高。试验管数为四倍时,不确定度减半。当测试只使用平行试管时,不确定度很低。根据测试样大小,将样液接种到装有所需液体培养基的试管或瓶子中。如果是小样,可以用多孔平板。

10.5.3.2 单稀释度系统

当预计微生物浓度很小或只会适当变化时,最适宜接种系统为单一稀释度连续等量测试。当预计的微生物最大量和最小量之比小于 25,至少要接种十个平行管;比率为 200 时,接种 50 个平行管。附录 B 中的表 B.1~表 B.4 为单稀释度系统 MPN 表。

10.5.3.3 多稀释度系统

当微生物浓度未知,或预期变化范围很大,则需要接种数个连续稀释度,以保证同时有阴性和阳性结果。稀释度数量由 MPN 值计算方法决定。如果使用查表方法,三个稀释度结果应有效,稀释系统类型受 MPN 表可用性限制。如果使用电脑程序,稀释度数量和并行试管数量不受限制。

10.5.3.4 对称稀释系统

对称 MPN 系统最常使用每个稀释度接种三或五个平行试管。这种系统的精确度会随着试管数的下降而迅速降低,三管法不适合高浓度。如果要求高精度,推荐使用五管法或更多的并行试管法。附

录 B 中的表 B.5~表 B.7 为三管法和五管法的 MPN 表。

10.5.3.5 不对称稀释系统

在不对称稀释系统中,不同稀释度不会有相同的管数。这种系统仅用于估算范围明确的微生物含量,参照 ISO 8199。

10.5.4 培养

在培养箱或水浴中培养接种过的试管或瓶子,多孔平板放置于培养箱中。根据具体标准方法设置培养温度和时间。一些微生物可能需要两个阶段的培养以及菌种确证步骤,培养条件详见具体标准。

10.5.5 结果的解释

区别微生物阳性、阴性结果的标准随微生物种类而变,这在相关标准中有规定。依据标准,计数和记录样品中所有测试阳性结果的数量。

10.5.6 MPN 值的测定

10.5.6.1 概述

MPN 值的测定有三种不同方法:用数学公式、查 MPN 表或专用电脑程序计算。只要这些方法都是基于相同的统计学原理,则是等效的。

10.5.6.2 数学公式

10.5.6.2.1 所有情况使用的近似公式

任何稀释度和平行试管的 MPN 值由式(4)获得:

$$\text{MPN} = \frac{Z_p \times m_r}{\sqrt{m_s \times m_t}} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

Z_p —— 阳性试管数;

m_r —— 样品参考质量,单位为克(g);

m_s —— 阴性管的样品总质量,单位为克(g);

m_t —— 所有管的样品总质量,单位为克(g);

MPN —— 每个样品参考质量的微生物含量,单位为克(g)(一般 1 g,有时 100 g)。

10.5.6.2.2 一个系列试管的精确方法

单个系列试管的 MPN 值由式(5)获得:

$$\text{MPN} = \frac{m_r}{m_m} \ln \left[\frac{n}{n - z_p} \right] \dots\dots\dots (5)$$

式中:

m_r —— 样品参考质量,单位为克(g);

m_m —— 每系列试管的样品质量,单位为克(g);

\ln —— 自然对数;

n —— 一个系列中的试管数;

z_p —— 阳性试管数。

10.5.6.2.3 单稀释度试验精确度估算

使用式(6)近似计算 MPN95%的置信区间:

$$x = \frac{m_r}{m_m} \ln \left[\frac{n}{z_n \pm 2 \sqrt{\frac{z(n - z_n)}{n}}} \right] \dots\dots\dots (6)$$

式中:

- x ——95%置信区间的上限或下限;
- m_r ——样品参考质量,单位为克(g);
- m_m ——每系列试管的样品质量,单位为克(g);
- \ln ——自然对数;
- n ——一个系列中的试管数;
- z_n ——阴性试管数。

计算下限时使用加号,计算上限时使用减号。大多数试管都是阴性时,近似值不够准确,但当阳性管数增加时,近似值会提高。

10.5.6.2.4 对称多稀释度试验的精确度估算

对称多稀释度 MPN 系统 \log_{10} 标准不确定度可以由式(7)获得:

$$SE = 0.58 \sqrt{\frac{\log_{10} f}{n}} \dots\dots\dots (7)$$

式中:

- SE —— \log_{10} MPN 标准偏差;
- f ——连续稀释度间的稀释因子;
- n ——每稀释度管数。

MPN 估算值乘以或除以 $2 \times SE$ 的逆对数可以近似地得到 95%置信区间的上限和下限。这个步骤可能会使置信区间上限偏大。

10.5.6.3 MPN 表

10.5.6.3.1 单稀释度系统表

附录 B 中的表 B.1~表 B.4 列出了 MPN 值和每个测试样 10 个、15 个、20 个和 25 个平行管数的 95%置信区间(每管接种同一稀释度)。要表示每样品参考质量(或体积)的结果,乘以 MPN 值和 95%限值的比率(参考质量除以测试样质量),不要乘以不确定标准对数。食品微生物中参考质量一般为 1 g。测试样质量要与作为接种液的样品的量(g)相符合,例如:1 mL 的 10^{-1} 均匀样等于 0.1 g。

示例:

5 mL 10 倍稀释的样品(0.1 g/mL)接种到 20 管双料肉汤。培养后,16 管有生长。样品中最可能细菌密度是多少?表 A.3 给出每管 1.61MPN 值,95%置信上限 2.77,下限 0.93。测试样为 5 mL,相当于 0.5 g 样品,所以每克样品的 MPN 值为 $MPN = \frac{1.61}{0.5} = 3.2/g$,置信区间范围:95%下限 = $\frac{0.93}{0.5} = 1.9/g$,95%上限 = $\frac{2.77}{0.5} = 5.5/g$ 。

10.5.6.3.2 多稀释系统表:三个连续稀释度

对称稀释系统常用每稀释度三管或五管平行。记录每列试管的阳性管数,从 MPN 表中读取相应样品量的最可能数。一些阳性管数的组合会比其他组合更可能发生。例如:0、0、3 比 3、2、1 发生的概率低。为量化这种概率,所有阳性结果的组合按 0~3 分类。类别 1 结果发生概率更高,类别 3 结果少

见,不易发生。最差是类别 0 结果,被认为高度可疑。假定测试结果是正确的,则预计 95% 的组合落在类别 1,4% 落在类别 2,0.9% 落在类别 3,0.1% 落在类别 0。类别的详细说明见表 B. 6。在多于三个稀释度的情况中,正确的三个连续稀释度选择未必总是明确的。但是,记录所有阳性管数的可能组合和从表 B. 5 中获得相应类别是容易做到的。然后,应用以下规则(示例见表 3):

- 选择类别 1 中的三个连续稀释度组合,查出 MPN 值,如果类别 1 有超过一个以上组合,采用最高阳性管数的数值;
- 如果没有一个类别 1 的组合可用,应用类别 2 组合,如果类别 2 中有超过一个以上组合,采用最高阳性管数的数值;
- 如果没有一个类别 2 的组合可用,应用类别 3 组合,如果类别 3 中有超过一个以上组合,采用最高阳性管数的数值。

表 3 计算 MPN 值阳性结果选择的示例

样品	每管样品接种下列样品量培养后三管中的阳性管数 ^a					MPN ^b	
	液体产品:10 mL 其他产品:1 g	液体产品: 1 mL 其他产品: 10 ⁻¹ g	液体产品: 10 ⁻¹ mL 其他产品: 10 ⁻² g	液体产品: 10 ⁻² mL 其他产品: 10 ⁻³ g	液体产品: 10 ⁻³ mL 其他产品: 10 ⁻⁴ g	液体产品/ (mL ⁻¹)	其他产品/ (g ⁻¹)
1	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	1	0	11	1.1×10 ²
2	3	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>0</u>		24	2.4×10 ²
3	2	2	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	7.4	7.4
4	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	0	0	2.4	2.4
5	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	1	0	2.1×10 ⁻¹	2.1

^a 下划线指出组合的选择。
^b 用 MPN 检索表计算(见表 B. 5)。

10.5.6.4 计算机程序

通用计算机程序对 MPN 系统中的稀释度数量和并行管数或 MPN 对称性没有限制。MPN 分析仪就是以早期程序为基础的分析程序。

10.5.7 结果表达

从表 B. 5 MPN 表(根据三个或五个连续的稀释度组合)得出参考体积的最可能数,报告每克或每毫升的最可能微生物数。质量或参考体积可以不是克或毫升(如可以是 100 g 或 100 mL)。

11 定性检测方法

11.1 概述

定性检测方法指在给定的产品量中检测特定微生物的存在与否。

11.2 原理

除非标准有特殊规定,混合或均质 25 g 样品,加入到 225 mL 或 225 g 选择性或非选择性肉汤中。为促进食品中受损微生物修复,样品一般先是非选择性肉汤中增菌再进行选择性增菌,然后通过选择性

琼脂培养基分离。使用两种不同的增菌肉汤,以及使用两种或两种以上的选择性琼脂培养基,将提高方法的灵敏度。培养后,用接种环将培养液涂布到选择性培养基表面,以得到单菌落。除非有特殊规定,经过培养的增菌肉汤只在评估完冷藏对结果的影响且在检测报告中明确说明后才能被冷藏。将培养后获得的部分菌落(一般每平板5个)采用合适的确认技术进行鉴定。用于确认的菌落选择应含有典型的可疑菌落。

11.3 测量不确定度

定性检测的结果为非数字结果(如阳性或阴性),则不需要对测量不确定度进行评估,但鼓励实验室去了解测试结果可能产生的所有变量。

12 确认的方法

12.1 概述

生化鉴定和血清鉴定只能使用纯培养物。相关的确认试验在具体标准中有详细规定。本条款作为生化实验的可选标准。本条款指出的确认方法可以在本条款指定条件下使用,除非具体标准中有其他说明。

12.2 纯培养物的准备

挑取培养基上单个菌落,接种非选择性培养基作为纯培养物。培养后,选择分离较好的菌落进行确认实验。如有需要可重复以上步骤。如有可能,确认实验应使用从单一菌落分离出来的细胞。若一个菌落中的细胞数不足,则先在液体培养基或斜面中次培养,此后培养物才能使用。

12.3 革兰氏染色

该细菌细胞染色方法可以用来描述细菌形态,并通过在实验条件下是否保留结晶紫来区分两种不同细菌种类。染色结果不同主要是由细胞壁结构不同引起的。也可使用3%氢氧化钾溶液来替代革兰氏染色法。取一环微生物菌体加入2滴氢氧化钾溶液。革兰氏阴性菌可使该溶液在30s内变得粘稠,举起接种环可见粘丝状。在高倍油镜下观察玻片,细菌细胞壁呈蓝或紫色为革兰氏阳性菌,细胞壁呈红色为革兰氏阴性菌。有些特殊的细菌纯培养物,镜检区域内可能同时出现革兰氏阳性和阴性细胞。细胞太密集会有错误的反应。

12.4 生化方法鉴定

生化方法鉴定包括手工、半自动和全自动培养装置或仪器方法。实验室应使用标准菌株对方法进行验证,并进行质量控制。具体标准中的生化方法至少应包括生化检测或其他补充实验的描述。

12.5 核酸探针鉴定

当用核酸探针对单菌落进行确证时,实验室应使用标准菌株验证探针,并进行质量控制。

12.6 血清学方法

12.6.1 概述

采用生化方法对单菌落进行鉴定后,再采用血清学方法。

12.6.2 玻片凝集试验

抗原-抗体反应使细菌细胞凝集在一起,形成絮状或颗粒状物质。肠杆菌科细菌,H抗原和相应的

抗血清反应产生絮状物，O 抗原凝集度更高，成颗粒状物。进行抗血清反应前，需先进行自凝实验，将细菌细胞与 3% 氯化钠溶液混合，如细胞粘合，则细胞自凝，不能进行血清实验。商业用抗血清分两种：一种是多价抗血清，可以与一种特殊基因的微生物反应，或同一类血清型的微生物反应，可用来做初步筛选；另一种是单价抗血清，用于对特定血清型进行鉴定。实验室应使用标准菌株对每批抗血清进行质量控制。当使用抗血清试剂时，应做阳性和阴性对照。

12.6.3 乳胶凝集试验

乳胶凝集试验是一种更快速的方法，将乳胶颗粒包被在特定抗体上，抗原与乳胶试剂中抗体发生反应。实验室应使用标准菌株对乳胶凝集试剂进行质量控制。当使用乳胶凝集试剂时，应做阳性和阴性对照。

13 检测报告

实验室应按照检验方法中规定的要求，准确、客观地报告每一项检测结果。经检测的每样样品都应有完整的检验记录和报告，内容应至少包括：

- 样品名称；
- 样品描述、状态和标识；
- 收样和开始检测的日期；
- 检验方法；
- 检测项目和生长及各项反应情况；
- 检测结果；
- 检测结束日期；
- 检测者和审核人的姓名、签字或等效标识；
- 其他需要在记录和报告中的说明情况。

14 微生物检测方法的确认

标准方法、其他方法和实验室内部方法在应用于微生物检测前，实验室均应进行必要的实验室确认试验。微生物检测方法的确认要求见 GB/T 27405，具体的确认程序可参考 ISO 16140 或其他相关标准进行。

15 结果质量保证/操作质量控制

15.1 内部质量控制

15.1.1 内部质量控制包括对实验室所有工作的连续评估。主要目的是为了保证日常结果的一致性以及与标准的一致性。

15.1.2 实验室应制定周期性检查程序以证实检测可变性(检测人员差异、设备差异、材料差异)处在控制下，该程序应覆盖实验室所有检测活动，该程序应包括但不限于以下方法：

- 使用添加已知水平的加标样品，包括目标和背景微生物；
- 使用不同基质的添加或自然污染的样品；
- 使用标准物质(包括能力验证样品)；
- 重复检测；
- 重复评估检测结果。

检查的时间间隔受实验室开展的实验性质及实验频率影响。建议将实际检测与内部质量控制结合

起来。

15.1.3 有些项目实验室很少进行检测。在这种情况下,内部质量控制程序也许并不合适,而一个与检测同时进行的验证程序或许更为适合。

15.2 参考菌株

按照 SN/T 1538.1 保藏参考菌株。

15.3 外部质量控制(能力验证)

实验室应定期参加与其检测范围相关的能力验证计划,适当基质的能力验证优先选择。实验室利用外部质量评估不仅可评定实验室检测结果偏差,还可以检查整个实验室质量体系的有效性。

附 录 A
(资料性附录)
一些消毒剂特性

表 A.1 一些消毒剂特性

消毒 剂	活体抗性							非活体					毒性		
	真 菌	细 菌		分 歧 杆 菌	芽 胞	脂 类 病 毒	非 脂 类 病 毒	蛋 白 质	天 然 材 料	合 成 材 料	硬 水	清 洁 剂	皮 肤	眼 睛	肺 部
		革 兰 氏 阳 性	革 兰 氏 阴 性												
次氯酸盐	+	+++	+++	++	++	+	+	+++	+	+	+	C	+	+	+
乙醇	-	+++	+++	+++	-	+	V	+	+	+	+	-		+	
甲醛	+++	+++	+++	+++	+++ ^a	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
戊二醛	+++	+++	+++	+++	+++ ^b	+	+	NA	+	+	+	NA	+++	+++	+++
碘液	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+++	+	+	+	A	+		-
<p>注：+++：良好； ++：较好； +：轻微的； -：零； V：视病毒而定； C：阳离子的； A：阴离子的； NA：不适用。</p>															
<p>^a 高于 40 ℃。 ^b 高于 20 ℃。</p>															

附 录 B
(规范性附录)
最可能数(MPN)的测定

表 B.1 10 管法每份测试的 MPN 值和 95% 可信限

阳性管数	每 10 管一组			
	MPN	log ₁₀ MPN 的标准不确定度	95% 可信限	
			下限	上限
1	0.11	0.435	0.02	0.75
2	0.22	0.308	0.06	0.89
3	0.36	0.252	0.11	1.11
4	0.51	0.220	0.19	1.38
5	0.69	0.198	0.28	1.69
6	0.92	0.184	0.40	2.10
7	1.20	0.174	0.55	2.64
8	1.61	0.171	0.75	3.48
9	2.30	0.179	1.03	5.16

表 B.2 15 管法每份测试的 MPN 值和 95% 可信限

阳性管数	每 15 管一组			
	MPN	log ₁₀ MPN 的标准不确定度	95% 可信限	
			下限	上限
1	0.07	0.434	0.01	0.49
2	0.14	0.307	0.04	0.57
3	0.22	0.251	0.07	0.69
4	0.31	0.218	0.12	0.83
5	0.41	0.196	0.17	0.98
6	0.51	0.179	0.23	1.15
7	0.63	0.167	0.30	1.33
8	0.76	0.157	0.37	1.55
9	0.92	0.150	0.47	1.80
10	1.10	0.144	0.57	2.11
11	1.32	0.141	0.70	2.49
12	1.61	0.139	0.86	3.02
13	2.01	0.142	1.06	3.82
14	2.71	0.155	1.35	5.45

表 B.3 20 管法每份测试的 MPN 值和 95%可信限

阳性管数	每 20 管一组			
	MPN	\log_{10} MPN 的标准不确定度	95%可信限	
			下限	上限
1	0.05	0.434	0.01	0.36
2	0.11	0.307	0.03	0.42
3	0.16	0.251	0.05	0.50
4	0.22	0.218	0.08	0.60
5	0.29	0.195	0.12	0.69
6	0.36	0.178	0.16	0.80
7	0.43	0.165	0.20	0.91
8	0.51	0.155	0.25	1.03
9	0.59	0.147	0.31	1.16
10	0.69	0.140	0.37	1.30
11	0.80	0.134	0.44	1.46
12	0.92	0.130	0.51	1.65
13	1.05	0.126	0.59	1.85
14	1.20	0.123	0.69	2.10
15	1.39	0.121	0.80	2.40
16	1.61	0.121	0.93	2.77
17	1.90	0.122	1.09	3.29
18	2.30	0.127	1.30	4.08
19	3.00	0.141	1.58	5.67

表 B.4 25 管法每份测试的 MPN 值和 95%可信限

阳性管数	每 25 管一组			
	MPN	\log_{10} MPN 的标准不确定度	95%可信限	
			下限	上限
1	0.04	0.434	0.01	0.29
2	0.08	0.307	0.02	0.03
3	0.13	0.251	0.04	0.40
4	0.17	0.217	0.07	0.47
5	0.22	0.195	0.09	0.54
6	0.27	0.178	0.12	0.61
7	0.33	0.165	0.16	0.69

表 B.4 (续)

阳性管数	每 25 管一组			
	MPN	\log_{10} MPN 的标准不确定度	95%可信限	
			下限	上限
8	0.39	0.154	0.19	0.77
9	0.45	0.146	0.23	0.86
10	0.51	0.139	0.27	0.96
11	0.58	0.133	0.32	1.06
12	0.65	0.128	0.37	1.16
13	0.73	0.123	0.42	1.28
14	0.82	0.119	0.48	1.41
15	0.92	0.116	0.54	1.55
16	1.02	0.113	0.61	1.70
17	1.14	0.111	0.69	1.88
18	1.27	0.109	0.78	2.09
19	1.43	0.108	0.88	2.33
20	1.61	0.108	0.99	2.62
21	1.83	0.109	1.12	2.99
22	2.12	0.111	1.29	3.50
23	2.53	0.117	1.49	4.28
24	3.22	0.123	1.77	5.85

表 B.5 使用 1 g(mL)、0.1 g(mL)、0.01 g(mL)各三管检测的 MPN 检索表和 95%可信限

阳性结果数			MPN	类别 ^a	95%可信限 ^b	
1 g(mL)	0.1 g(mL)	0.01 g(mL)			下限	上限
0	0	0	<0.30		0.00	0.94
0	0	1	0.30	3	0.01	0.95
0	1	0	0.30	2	0.01	1
0	1	1	0.61	0	0.12	1.7
0	2	0	0.62	3	0.12	1.7
0	3	0	0.94	0	0.35	3.5
1	0	0	0.36	1	0.02	1.7
1	0	1	0.72	2	0.12	1.7

表 B.5 (续)

阳性结果数			MPN	类别 ^a	95%可信限 ^b	
1 g(mL)	0.1 g(mL)	0.01 g(mL)			下限	上限
1	0	2	1.1	0	0.4	3.5
1	1	0	0.74	1	0.13	2
1	1	1	1.1	3	0.4	3.5
1	2	0	1.1	2	0.4	3.5
1	2	1	1.5	3	0.5	3.8
1	3	0	1.6	3	0.5	3.8
2	0	0	0.92	1	0.15	3.5
2	0	1	1.4	2	0.4	3.5
2	0	2	2.0	0	0.5	3.8
2	1	0	1.5	1	0.4	3.8
2	1	1	2.0	2	0.5	3.8
2	1	2	2.7	0	0.9	9.4
2	2	0	2.1	1	0.5	4
2	2	1	2.8	3	0.9	9.4
2	2	2	3.5	0	0.9	9.4
2	3	0	2.9	3	0.9	9.4
2	3	1	3.6	0	0.9	9.4
3	0	0	2.3	1	0.5	9.4
3	0	1	3.8	1	0.9	10.4
3	0	2	6.4	3	1.6	18.1
3	1	0	4.3	1	0.9	18.1
3	1	1	7.5	1	1.7	19.9
3	1	2	12	3	3	36
3	1	3	16	0	3	38
3	2	0	9.3	1	1.8	36
3	2	1	15	1	3	38
3	2	2	21	2	3	40

表 B.5 (续)

阳性结果数			MPN	类别 ^a	95%可信限 ^b	
1 g(mL)	0.1 g(mL)	0.01 g(mL)			下限	上限
3	2	3	29	3	9	99
3	3	0	24	1	4	99
3	3	1	46	1	9	198
3	3	2	110	1	20	400
3	3	3	>110			

^a 见表 B.6。
^b 本表给出的可信限仅是统计学对结果的影响,还存在其他有时可能更重要的变化来源。

表 B.6 结果类别的解释

类别 ^a	定 义
1	当从 MPN 表中查到样品中细菌数时,该结果是获得的最大可能性。至多 5%可能性获得比本类别中的最小可能性还要小的结果
2	当从 MPN 表中查到样品中细菌数时,该结果的可能性比类别 1 中的最小可能性还要小,但至多 1%的可能性获得比本类别中最小可能性还要小的结果
3	当从 MPN 表中查到样品中细菌数时,该结果的可能性比类别 2 中的最小可能性还要小,但至多 0.1%的可能性获得比本类别中最小可能性还要小的结果
0	当从 MPN 表中查到样品中细菌数时,该结果的可能性比类别 3 中的最小可能性还要小,但至多 0.1%的可能性获得比本类别中最小可能性还要小的结果

^a 开始检测之前,要决定可接受哪种类别,仅 1、1 和 2 或甚至 1、2 和 3。当决定用于结果的依据具有重要性时,仅类别 1,或至多类别 1 和 2,结果是可以接受的。类别 0 的结果要作可疑考虑。

表 B.7 使用 1 g(mL)、0.1 g(mL)、0.01 g(mL)各五管检测的 MPN 检索表和 95%可信限

阳性管数			MPN	95%可信限	
1 g(mL)	0.1 g(mL)	0.01 g(mL)		下限	上限
0	0	0	<0.2	<0.1	0.7
0	1	0	0.2	<0.1	0.7
0	2	0	0.4	<0.1	1.1
1	0	0	0.2	<0.1	0.7
1	0	1	0.4	<0.1	1.1
1	1	0	0.4	<0.1	1.1

表 B.7 (续)

阳性管数			MPN	95%可信限	
1 g(mL)	0.1 g(mL)	0.01 g(mL)		下限	上限
1	1	1	0.6	<0.1	1.5
2	0	0	0.5	<0.1	1.3
2	0	1	0.7	0.1	1.7
2	1	0	0.7	0.1	1.7
2	1	1	0.9	0.2	2.1
2	2	0	0.9	0.2	2.1
2	3	0	1.2	0.3	2.8
3	0	0	0.8	0.1	1.9
3	0	1	1.1	0.2	2.5
3	1	0	1.1	0.2	2.5
3	1	1	1.4	0.4	3.4
3	2	0	1.4	0.4	3.4
3	2	1	1.7	0.5	4.6
3	3	0	1.7	0.5	4.6
4	0	0	1.3	0.3	3.1
4	0	1	1.7	0.5	4.6
4	1	0	1.7	0.5	4.6
4	1	1	2.1	0.7	6.3
4	1	2	2.6	0.9	7.8
4	2	0	2.2	0.7	6.7
4	2	1	2.6	0.9	7.8
4	3	0	2.7	0.9	8
4	3	1	3.3	1.1	9.3
4	4	0	3.4	1.2	9.3
5	0	0	2.3	0.7	7
5	0	1	3.1	1.1	8.9
5	0	2	4.3	1.5	11
5	1	0	3.3	1.1	9.3
5	1	1	4.6	1.6	12
5	1	2	6.3	2.1	15
5	2	0	4.9	1.7	13
5	2	1	7	2.3	17
5	2	2	9.4	2.8	22

表 B.7 (续)

阳性管数			MPN	95%可信限	
1 g(mL)	0.1 g(mL)	0.01 g(mL)		下限	上限
5	3	0	7.9	2.5	19
5	3	1	11	3.1	25
5	3	2	14	3.7	34
5	3	3	18	4.4	50
5	4	0	13	3.5	30
5	4	1	17	4.3	49
5	4	2	22	5.7	70
5	4	3	28	9	85
5	4	4	35	12	100
5	5	0	24	6.8	75
5	5	1	35	12	100
5	5	2	54	18	140
5	5	3	92	30	320
5	5	4	160	64	580
5	5	5	>180	—	—