



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4544.2—2022

商品化试剂盒检测方法 菌落总数 方法二

Commercial kit method—Aerobic count—Test method II

2022-03-14 发布

2022-10-01 实施

中华人民共和国海关总署 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。

本文件是 SN/T 4544《商品化试剂盒检测方法 菌落总数》的第2部分。SN/T 4544 已经发布了以下部分：

——商品化试剂盒检测方法 菌落总数 方法一；

——商品化试剂盒检测方法 菌落总数 方法二。

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。

本文件由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本文件起草单位：中华人民共和国福州海关。

本文件主要起草人：郑晶、林杰、郭菁、肖颖、陈彬、董健、柯璐、徐珊、张温玲、戴晓丽。

以正式出版文本为准

商品化试剂盒检测方法

菌落总数 方法二

1 范围

本文件规定了食品中两种 3M 菌落总数测试片(3M Petrifilm™ Aerobic Count Plate 和 3M Petrifilm™ Rapid Aerobic Count Plate)的检测方法。

本文件适用于食品中菌落总数的测定。该方法不适用于米粉等 10 倍稀释后流动性不强的食品;不适用于 10 倍稀释后色度较深的食品。

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 4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27405 实验室质量控制规范 食品微生物检测

SN/T 2775 商品化食品检测试剂盒评价方法

SN/T 3266 食品微生物检验方法确认技术规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全和防止污染,应由具备资格的工作人员检测菌落总数。所有培养物和废弃物应按照 GB 19489 和 GB/T 27405 中的有关规定执行。

5 技术概要

菌落总数测试片(3M Petrifilm™ Aerobic Count plate)是一种预先制备好的培养基系统,其培养基为标准的平板计数琼脂(PCA)培养基,并且含菌落指示剂,菌落在测试片上呈红色,这样可增强菌落计数效果。

菌落总数测试片(3M Petrifilm™ Rapid Aerobic Count Plate)是一种预先制备好的培养基系统,包含营养成分、冷水可溶性凝胶及双联指示剂技术,菌落在测试片上呈红色和蓝色,24 h 即可对食品基质进行菌落计数。

6 仪器和设备

除微生物实验室常规灭菌和培养设备外,其他设备和材料如下:

- 6.1 恒温培养箱: $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.2 冰箱: $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.3 恒温水浴箱: $46\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.4 天平:感量为 0.1 g 。
- 6.5 均质器。
- 6.6 振荡器。
- 6.7 无菌吸管: 1 mL (具 0.01 mL 刻度), 10 mL (具 0.1 mL 刻度)或微量移液器及吸头。
- 6.8 无菌锥形瓶:容量为 250 mL 、 500 mL 。
- 6.9 无菌培养皿:直径为 90 mm 。
- 6.10 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。
- 6.11 放大镜或/和菌落计数器。
- 6.12 3M 压板。

7 试剂和材料

- 7.1 菌落总数测试片:本文件使用的测试片 3M Petrifilm™ Aerobic Count Plate 和 3M Petrifilm™ Rapid Aerobic Count Plate 由 3M 有限公司生产,参考 SN/T 2775 和 SN/T 3266,按商品化食品检测试剂盒评价程序进行评价,评价结果参见附录 A 和附录 B。
- 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS):按附录 C 中 C.1。
- 7.3 无菌生理盐水:按附录 C 中 C.2。
- 7.4 1 mol/L 氢氧化钠(NaOH):称取 40 g NaOH 溶于 $1\text{ }000\text{ mL}$ 蒸馏水中。
- 7.5 1 mol/L 盐酸(HCl):移取 90 mL 浓盐酸,用蒸馏水稀释至 $1\text{ }000\text{ mL}$ 。

8 检测程序

菌落总数测试片检测程序见图 1。



图1 菌落总数测试片检测方法程序

9 操作步骤

9.1 样品制备和稀释

9.1.1 按照 GB 4789.2 的方法制备 1 : 10 样品匀液。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 (NaOH) 调节, 碱性样液用 1 mol/L 盐酸 (HCl) 调节, 或根据产品标准规定的酸碱溶液来调节 pH 值。

9.1.2 按照 GB 4789.2 方法吸取 1 : 10 样品匀液, 制备 10 倍系列稀释样品匀液。

9.2 接种

9.2.1 根据对样品污染情况的估计, 选择 2 个 ~ 3 个适宜稀释度样品匀液进行检验, 根据需要选择 3M Petrifilm™ Aerobic Count Plate 测试片或 3M Petrifilm™ Rapid Aerobic Count Plate 测试片。

9.2.2 将菌落总数测试片置于平坦表面处, 揭开上层膜, 吸取某一稀释度的 1 mL 样品匀液, 垂直滴加在测试片的中央处, 然后将上层膜轻轻放下, 将压板放置在上层膜中央处, 轻轻的压下, 使样液均匀覆盖于圆形的培养面积上, 切勿扭转压板。拿起压板, 静置至少 1 min 以使培养基凝固。

9.2.3 每个稀释度接种两张测试片。同时, 分别吸取 1 mL 空白稀释液加入两张测试片内作空白对照。

9.3 培养

9.3.1 3M Petrifilm™ Aerobic Count Plate 培养

将测试片的透明面朝上,水平置于培养箱内,可堆叠至 20 片。在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$,水产品 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $72\text{ h}\pm 3\text{ h}$ 。

9.3.2 3M Petrifilm™ Rapid Aerobic Count Plate 培养

在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$;如有产品标准等特殊要求,则按相应的标准或要求进行。

9.4 菌落计数

9.4.1 3M Petrifilm™ Aerobic Count Plate 计数

9.4.1.1 到培养时间应立即计数,选取菌落数在 30 CFU~300 CFU 之间的测试片计数菌落总数,记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落计数以菌落形成单位(colony-forming units, CFU)表示。

9.4.1.2 计数所有红色菌落。如果无法确定红点是菌落还是红色食品基质,可以延长培养 24 h 后观察。如果红点变大则确定是菌落,如果红点未变大则确定是基质。

9.4.1.3 当细菌浓度很高时,整个测试片会变成红色,将结果记录为“多不可计”(too numerous to count, TNTC)。

9.4.1.4 3M Petrifilm™ Aerobic Count Plate 有 20 个等分格,当菌落数量过多,计数困难时,可选择几个有代表性菌落的小方格,计算平均菌落数,再乘以相应倍数,即可得到整个测试片上的估算菌落数。

9.4.1.5 一些微生物会液化凝胶,造成局部扩散或菌落模糊的现象。如果液化现象干扰计数,可以计数未液化的面积来估算菌落浓度。

9.4.2 3M Petrifilm™ Rapid Aerobic Count Plate 计数

9.4.2.1 到培养时间应立即计数,选取菌落数在 30 CFU~300 CFU 之间的测试片计数菌落总数,记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落计数以菌落形成单位(colony-forming units, CFU)表示。

9.4.2.2 计数所有蓝色和红色菌落。如果无法确定红点是菌落还是红色食品基质,可以延长培养 24 h 后观察。如果红点变大则确定是菌落,如果红点未变大则确定是基质。

9.4.2.3 当细菌浓度很高时,整个测试片会变成红色或蓝色,将结果记录为“多不可计”(too numerous to count, TNTC)。

9.4.2.4 3M Petrifilm™ Rapid Aerobic Count Plate 有 30 个等分格,当菌落数量过多,计数困难时,可选择几个有代表性菌落的小方格,计算平均菌落数,再乘以相应倍数,即可得到整个测试片上的估算菌落数。

9.4.2.5 一些微生物会液化凝胶,造成局部扩散或菌落模糊的现象。如果液化现象干扰计数,可以计数未液化的面积来估算菌落浓度。

10 结果和报告

菌落总数的计算方法和菌落总数报告的规则按照 GB 4789.2。

附 录 A

(资料性)

菌落总数测试片(3M Petrifilm™ Aerobic Count Plate)评价结果

A.1 线性和准确度

见表 A.1 和表 A.2。

表 A.1 测试片方法和参考方法(GB 4789.2—2016)的线性关系

食品种类	食品基质	线性方程	相关系数(R^2)	T 检验值
肉类	冻鸡肉	$y=0.804x+0.673\ 8$	0.942 4	0.927
	熟鸡肉	$y=0.917\ 4x+0.285\ 8$	0.930 5	0.412
鱼类和海产品	丁香鱼	$y=1.017\ 5x+0.055\ 5$	0.991 9	0.582
	旗鱼松	$y=1.012x+0.071\ 9$	0.952 6	0.340
	冻带鱼	$y=0.926\ 4x-0.146\ 3$	0.989 5	2.494
水果和蔬菜制品	萝卜丝	$y=0.878\ 4x+0.342\ 9$	0.967 0	0.221
	沙拉	$y=0.621\ 1x+0.825\ 7$	0.971 3	0.189
	青豆	$y=1.047\ 2x-0.048\ 8$	0.981 9	0.192
乳制品	纯牛奶	$y=1.012\ 2x+0.063\ 7$	0.955 0	0.382
	婴儿奶粉	$y=0.997\ 5x+0.034$	0.964 7	0.108
	全脂奶粉	$y=0.984\ 9x+0.089\ 1$	0.986 8	0.086
杂品	馅饼	$y=1.040\ 6x-0.382\ 1$	0.968 9	1.072
	面条	$y=0.826\ 7x+0.153\ 5$	0.897 2	0.733
	咖喱粉	$y=0.984\ 2x+0.043\ 4$	0.992 0	0.015
	绿茶	$y=0.974\ 2x+0.234\ 4$	0.995 2	0.510
$T_{0.05}(15)=2.131$				

表 A.2 5 类食品的线性关系

食品种类	Log 值范围	线性方程	相关系数(R^2)
肉类	1.00~3.26	$y=0.826\ 9x+0.565\ 9$	0.923 6
鱼类和海产品	0~3.75	$y=0.945\ 8x+0.065\ 8$	0.949 2
水果和蔬菜制品	0.30~3.86	$y=1.250\ 9x-0.547\ 4$	0.935 4
乳制品	1.00~5.20	$y=0.991\ 9x+0.074\ 7$	0.983 1
杂品	1.00~3.96	$y=0.925\ 1x+0.232\ 2$	0.919 5
所有食品		$y=0.997\ 3x+0.048\ 5$	0.936 4
注: y 为测试片法菌落数的对数值; x 为参考法菌落数的对数值。			

A.2 耐变性

选用两个污染水平的奶粉样品对培养温度和培养时间两个变量进行耐变性试验,经验证,培养温度选择 35 ℃和 37 ℃,培养时间选择 46 h 和 50 h,对检测结果的标准偏差与在重复性条件下得到的标准偏差没有明显差别,表明说明书中对培养温度为 36 ℃ $\pm$ 1 ℃和培养时间为 48 h $\pm$ 2 h 的耐变性范围不影响检测结果。见表 A.3。

表 A.3 耐变性试验结果

实验条件	菌株添加水平	测试结果					平均值	S _r
		1	2	3	4	5		
37 ℃, 50 h	高浓度	3.36	3.30	3.36	3.33	3.30	3.33	0.029
	低浓度	2.30	2.30	2.30	2.40	2.40	2.34	0.053
37 ℃, 46 h	高浓度	3.39	3.32	3.34	3.39	3.39	3.37	0.034
	低浓度	2.30	2.30	2.36	2.32	2.32	2.32	0.025
35 ℃, 50 h	高浓度	3.36	3.35	3.36	3.34	3.36	3.35	0.008
	低浓度	2.30	2.34	2.38	2.32	2.26	2.32	0.047
35 ℃, 46 h	高浓度	3.30	3.34	3.39	3.34	3.36	3.35	0.034
	低浓度	2.34	2.34	2.34	2.36	2.36	2.35	0.011

A.3 批间变异

取 3 个不同批号的测试片对两个污染浓度奶粉样品进行批间变异实验,3 个不同批号测试片测试结果的标准偏差与在重复性条件下得到的标准偏差没有明显差别,说明不同批号产品无明显差异。见表 A.4。

表 A.4 批间变异试验结果

菌株浓度	批号	测定结果					Mean	S _r	RSD
		1	2	3	4	5			
高浓度	2013-02-TU	3.40	3.38	3.38	3.38	3.38	3.38	0.01	0.30%
	2013-02-TB	3.34	3.38	3.32	3.36	3.40	3.36	0.03	0.89%
	2013-02-TG	3.36	3.34	3.32	3.36	3.36	3.35	0.02	0.53%
	总平均值	3.37			总 S _r		0.02		
低浓度	2013-02-TU	2.51	2.58	2.56	2.56	2.46	2.53	0.05	1.88%
	2013-02-TB	2.52	2.48	2.49	2.52	2.45	2.49	0.03	1.21%
	2013-02-TG	2.53	2.45	2.45	2.49	2.54	2.49	0.05	1.83%
	总平均值	2.51			总 S _r		0.04		

A.4 实验室间验证试验

8 家实验室对高、中、低 3 个接种水平样品的 5 个平行测试结果室间重复性和再现性分析表明方法稳定可靠。见表 A.5。

表 A.5 实验室间验证试验结果

添加水平	实验室数	参考法		测试片法	
		<i>r</i>	<i>R</i>	<i>r</i>	<i>R</i>
高	8	0.285	0.438	0.293	0.381
中	8	0.332	0.598	0.313	0.492
低	8	0.383	0.510	0.369	0.419

以正式出版文本为准

附录 B

(资料性)

菌落总数测试片(3M Petrifilm™ Rapid Aerobic Count Plate)评价结果

B.1 线性和准确度

见表 B.1 和表 B.2。

表 B.1 测试片方法和参考方法(GB 4789.2—2016)的线性关系

食品种类	食品基质	线性方程	相关系数(R^2)	T 检验值
肉类	糟鸭	$y=0.988x-0.018$	0.985	0.055
	冻猪肉	$y=1.055x-0.300$	0.988	0.070
	卤牛肉	$y=1.013x-0.136$	0.992	0.208
鱼类和海产品	鱿鱼丝	$y=0.9914x+0.0519$	0.989	0.034
	明虾	$y=0.884x+0.300$	0.988	0.234
	鲳鱼	$y=1.011x-0.046$	0.991	0.051
水果和蔬菜制品	开心果	$y=1.0019x-0.0206$	0.997	0.051
	葡萄汁	$y=1.0927x-0.5277$	0.999	0.036
	沙拉	$y=0.936x+0.300$	0.998	0.423
乳制品	纯牛奶	$y=0.9826x+0.0607$	0.996	0.081
	奶粉	$y=0.9963x-0.0442$	0.997	0.176
	圣代	$y=0.9965x+0.002$	0.996	0.041
杂品	茶叶	$y=1.103x-0.170$	0.971	0.548
	五谷粉	$y=1.022x-0.046$	0.993	0.070
	鸡精	$y=0.9492x+0.2819$	0.995	0.138
$T_{0.05}(15)=2.131$				

表 B.2 5类食品的线性关系

食品种类	Log 值范围	线性方程	相关系数(R^2)
肉制品	1.60~7.20	$y=1.024x-0.133$	0.996
鱼类和海产品	2.2~6.18	$y=1.007x-0.047$	0.994
杂品	2.67~5.95	$y=0.955x+0.248$	0.996
乳制品	3.53~6.08	$y=1.000x+0.029$	0.995
家禽类	2.11~5.79	$y=0.979x+0.088$	0.994
所有样品		$y=1.001x+0.007$	0.994
注: y 为测试片方法菌落数的对数值; x 为参考方法菌落数的对数值。			

B.2 耐变性

选用两个污染水平的纯牛奶样品对培养温度和培养时间两个变量进行耐变性试验。经验证,培养温度选择 35 ℃ 和 37 ℃,培养时间选择 22 h 和 26 h 对检测结果的标准偏差 S_r 与在重复性条件下得到的标准偏差 S_r 无显著差异,表明说明书中对培养温度 36 ℃ $\pm$ 1 ℃ 和培养时间 24 h $\pm$ 2 h 的耐变性范围不影响检测结果。见表 B.3。

表 B.3 耐变性试验结果

实验条件	菌株添加水平	测试结果(lg)值					平均值	S_r	RSD
		1	2	3	4	5			
37 ℃, 26 h	高水平	5.62	5.67	5.60	5.81	5.66	5.67	0.080	1.41%
	低水平	3.89	3.90	3.88	3.94	3.89	3.90	0.025	0.64%
37 ℃, 22 h	高水平	5.61	5.72	5.75	5.63	5.60	5.66	0.067	1.18%
	低水平	3.93	3.91	3.89	3.89	3.95	3.91	0.028	0.72%
35 ℃, 26 h	高水平	5.59	5.66	5.60	5.61	5.63	5.62	0.028	0.50%
	低水平	3.94	3.93	3.95	3.92	3.95	3.94	0.013	0.33%
35 ℃, 22 h	高水平	5.72	5.69	5.73	5.69	5.65	5.70	0.030	0.53%
	低水平	3.93	3.89	3.94	3.90	3.89	3.91	0.022	0.56%

B.3 批间变异

取 3 个不同批号测试片对两个污染浓度奶粉样品进行批间变异实验,3 个不同批号测试片测试结果的标准偏差与在重复性条件下得到的标准偏差没有明显差别,说明不同批号产品无明显差异。见表 B.4。

表 B.4 批间变异试验结果

菌株浓度	批号	测定结果(lg)值					平均值	S_r	RSD
		1	2	3	4	5			
高水平	2018-01 KA	6.92	6.95	6.91	6.90	6.93	6.92	0.020	0.288%
	2018-06 KA	6.86	6.88	6.98	6.96	6.99	6.93	0.061	0.874%
	2018-08 KA	6.94	6.93	6.93	6.96	6.98	6.95	0.021	0.299%
	总平均值	6.94			总 S_r		0.038		
低水平	2018-01 KA	4.15	4.20	4.11	4.15	4.15	4.15	0.033	0.787%
	2018-06 KA	4.11	4.18	4.15	4.11	4.18	4.15	0.031	0.750%
	2018-08 KA	4.18	4.18	4.11	4.15	4.18	4.16	0.028	0.666%
	总平均值	4.15			总 S_r		0.029		

B.4 实验室间验证试验

8家实验室对高、中、低3个接种水平样品的5个平行测试结果室间重复性和再现性分析表明方法稳定可靠。见表B.5。

表 B.5 实验室间验证试验结果

添加水平	实验室数	<i>r</i>		<i>R</i>	
		参考法	测试片法	参考法	测试片法
高	8	0.316	0.511	0.316	0.511
中	8	0.392	0.544	0.392	0.544
低	8	0.281	0.437	0.281	0.437

附 录 C
(规范性)
培养基和试剂

C.1 磷酸盐缓冲液

C.1.1 成分

磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	34.0 g
蒸馏水	500 mL
pH 值	7.2

C.1.2 制法

贮存液:称取 34.0 g 的磷酸二氢钾溶于 500 mL 蒸馏水中,用大约 175 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH,用蒸馏水稀释至 1 000 mL 后贮存于冰箱。

稀释液:取贮存液 1.25 mL,用蒸馏水稀释至 1 000 mL,分装于适宜容器中,于 121 ℃ 高压下灭菌 15 min。

C.2 无菌生理盐水

C.2.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

C.2.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中,于 121 ℃ 高压下灭菌 15 min。

以正式出版文本为准

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
商品化试剂盒检测方法
菌落总数 方法二

SN/T 4544.2—2022

*

中国海关出版社有限公司出版发行
北京市朝阳区东四环南路甲1号(100023)
编辑部:(010)65194242-7530
网址 www.customskb.com/book
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 28 千字
2022 年 月第一版 2022 年 月第一次印刷
印数 1—

*

书号: 155175·701 定价 16.00 元



SN/T 4544.2—2022