

保健用品微生物检验方法 第 1 部分：菌落总数测定

Microbiological examine method for health care material

Part 1:Aerobic bacterial count

2017 - 11 - 10 发布

2017 - 12 - 30 实施

吉林省质量技术监督局 发布

前 言

DB22/T 394《保健用品微生物检测方法》拟分为如下部分：

- 第1部分：菌落总数测定；
- 第2部分：耐热大肠菌群测定；
- 第3部分：铜绿假单胞菌测定；
- 第4部分：金黄色葡萄球菌测定；
- 第5部分：霉菌和酵母菌数测定。

本部分为DB22/T 394-2017的第1部分。

本部分按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本部分代替DB22/T 394-2004《保健用品微生物检验方法》，与DB22/T 394-2004相比，结构做了较大调整。除编辑性修改外，主要技术内容变化如下：

- 删除了乙型溶血性链球菌；
- 删除了定量杀菌试验。

本部分由吉林省卫生和计划生育委员会提出并归口。

本部分起草单位：吉林省疾病预防控制中心。

本部分主要起草人：杨修军、刘桂华、黄鑫、赵薇、张立夫。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

- DB22/T 394-2004。

保健用品微生物检验方法 第1部分：菌落总数测定

警示——使用本标准的人员应有正规实验室工作的实践经验。本标准并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。

1 范围

本标准规定了保健用品中微生物中菌落总数的测定方法。
本标准适用于生产和经营的保健用品中菌落总数的测定。

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，仅所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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB 19489 实验室生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

菌落总数 aerobic bacterial count

食品检样经过处理，在一定条件下（如培养基、培养温度和培养时间等）培养后，所得每 g (mL) 检样中形成的微生物菌落总数。

4 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯。实验用水符合 GB/T 6682 中二级水的要求。

- 4.1 灭菌生理盐水：见附录 A.1。
- 4.2 灭菌液体石蜡：见附录 A.2。
- 4.3 灭菌吐温-80：见附录 A.3。
- 4.4 营养琼脂培养基：见附录 A.4。
- 4.5 0.5%氯化三苯四氮唑（TTC）：见附录 A.5。

5 仪器和设备

- 5.1 天平。
- 5.2 灭菌刻度吸管：10 mL、5 mL、1 mL。
- 5.3 高压锅。

- 5.4 量筒。
- 5.5 恒温水浴箱或隔水式恒温箱:44.5 °C ± 0.5 °C。
- 5.6 三角烧瓶。
- 5.7 研钵。
- 5.8 振荡器。
- 5.9 灭菌平皿:直径 90 mm。
- 5.10 恒温培养箱:36 °C ± 1 °C。
- 5.11 放大镜。

6 样品

6.1 样品的采集

所采集的样品,应具有代表性,一般视每批保健用品数量大小,随机抽取相应数量的包装单位。检验时,应从不少于2个包装单位的取样中共取10 g (5.1) 或10 mL (5.2)。包装量小于20 g的样品,采样时可适量增加样品包装数量。

6.2 注意事项

- 6.2.1 供检验样品,应严格保持原有的包装状态。容器不应有破裂,在检验前不得打开,防止样品被污染。
- 6.2.2 接到样品后,应立即登记,编写检验序号,并按检验要求尽快检验。如不能及时检验,样品应放在室温阴凉干燥处,不要冷藏或冷冻。
- 6.2.3 若只有一个样品而同时需做多种分析,如微生物、毒理、化学等,则宜先取出部分样品做微生物检验,再将剩余样品做其它分析。
- 6.2.4 在检验过程中,从打开包装到全部检验操作结束,均须防止微生物的再污染和扩散,所用器皿及材料均应事先灭菌(5.3),全部操作应在符合生物安全要求的实验室中进行。

6.3 样品的制备

6.3.1 液体样品

水溶性液体样品,用灭菌吸管吸取10 mL加到90 mL (5.4) 灭菌生理盐水(4.1)中,混匀后,制成1:10匀液。

油性液体样品,取样品10 g,先加5 mL灭菌液体石蜡(4.2)混匀,再加10 mL灭菌的吐温-80,在40 °C~44 °C水浴中(5.5)振荡混合10 min,加入灭菌的生理盐水75 mL(在40 °C~44 °C水浴中预温),在40 °C~44 °C水浴中乳化,制成1:10的悬液。

6.3.2 膏、霜、乳剂半固体状样品

亲水性的样品,称取10 g,加到装有玻璃珠及90 mL灭菌生理盐水的三角烧瓶(5.6)中,充分振荡混匀,静置15 min,用其上清液作为1:10的匀液。

疏水性样品,称取10 g,放到灭菌的研钵(5.7)中,加10 mL灭菌液体石蜡,研磨成粘稠状再加入10 mL灭菌吐温-80,研磨待溶解后,加70 mL灭菌生理盐水,在40 °C~44 °C水浴中充分混合,制成1:10匀液。

6.3.3 固体样品

称取10 g, 加到90 mL灭菌生理盐水中, 充分振荡(5.8)混匀, 使其分散混悬, 静置后, 取上清液作为1:10的匀液。

6.3.4 膜状样品

取10 cm², 将膜剪成碎片, 置灭菌锥形瓶中, 加100 mL生理盐水, 使成10 mL/cm²浓度, 浸泡10 min到15 min, 摇匀即得。

6.3.5 含抑菌成分检验样品的制备

6.3.5.1 稀释法:用稀释液和培养基将样品稀释到一定浓度, 使其抑菌成分的浓度减少到无菌作用的浓度, 再进行检验。

6.3.5.2 中和法:在检验样品或培养基中加入吐温-80 和卵磷脂作为中和剂, 以中和其抑菌效果。

6.3.5.3 对吸水膨胀或粘度大的样品, 可制成1:20 样液。

7 试验步骤

7.1 培养

用灭菌吸管吸取1:10 稀释的匀液 2 mL, 分别注入到两个灭菌平皿(5.9)内, 每皿1 mL。另取1 mL 注入到9 mL灭菌生理盐水试管中(注意勿使吸管接触液面), 更换一支吸管, 并充分混匀, 制成1:100 匀液。吸取2 mL, 分别注入到两个灭菌平皿内, 每皿1 mL。如样品含菌量高, 还可再稀释成1:1000, 1:10000, ……等, 每种稀释度应换1 支吸管。

将融化并冷至45 °C~50 °C的营养琼脂培养基倾注到平皿内, 每皿约15 mL, 随即转动平皿, 使样品与培养基充分混合均匀, 待琼脂凝固后, 翻转平皿, 置36 °C±1 °C培养箱(5.10)内培养48 h±2 h。另取一个不加样品的灭菌空平皿, 加入约15 mL营养琼脂培养基, 待琼脂凝固后, 翻转平皿, 置36 °C±1 °C培养箱内培养48 h±2 h, 为空白对照。

如保健品中的颗粒与菌落不易区分, 可在每100 mL营养琼脂中加入1 mL 0.5%的TTC溶液, 如有细菌存在, 培养后菌落呈红色, 而保健用品的颗粒颜色无变化。

7.2 菌落计数

先用肉眼观察, 点数菌落数, 然后再用放大5 倍~10 倍的放大镜(5.11)检查, 以防遗漏。记下各平皿的菌落数后, 求出同一稀释度各平皿生长的平均菌落数。若平皿中有连成片状的菌落或花点样菌落蔓延生长时, 该平皿不宜计数。若片状菌落不到平皿中的一半, 而其余一半中菌落数分布又很均匀, 则可将此半个平皿菌落计数后乘以2, 以代表全皿菌落数。

8 试验数据处理

8.1 选取平均菌落数在30 个~300 个之间的平皿, 作为菌落总数测定的范围。当只有一个稀释度的平均菌落数符合此范围时, 即以该平皿菌落数乘其稀释倍数报告之(见表1中例1)。

8.2 若有两个稀释度, 其平均菌落数均在30 个~300 个之间, 则应求出两菌落总数之比值来决定, 若其比值小于或等于2, 应报告其平均数, 若大于2 则以其中稀释度较低的平均菌落数报告之(见表1中例2及例3)。

8.3 若所有稀释度的平均菌落数均大于300 个, 则应按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数报告之(见表1中例4)。

- 8.4 若所有稀释度的平均菌落数均小于 30 个，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数报告之（见表 1 例 5）。
- 8.5 若所有稀释度的平均菌落数均不在 30 个~300 个之间，其中一个稀释度大于 300 个，而相邻的另一稀释度小于 30 个时，则以接近 30 或 300 的平均菌落数乘以稀释倍数报告之（见表 1 中例 6）。
- 8.6 若所有的稀释度均无菌生长，报告数为每 g 或每 mL 小于 10 CFU。
- 8.7 菌落计数的报告，菌落数在 10 以内时，按实有数值报告之，大于 100 时，采用二位有效数字，在二位有效数字后面的数值，应以四舍五入法计算。为了缩短数字后面零的个数，可用 10 的指数来表示（见表 1 报告方式栏）。在报告菌落数为“不可计”时，应注明样品的稀释度。

表1 细菌计数结果及报告方式

例次	不同稀释度平均菌落数			两稀释度 菌数之比	菌落总数 CFU/mL或CFU/g	报告方式 CFU/mL或CFU/g
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}			
1	1356	164	20	—	16400	16000或 1.6×10^4
2	2760	259	46	1.6	38000	38000或 3.8×10^4
3	2890	271	60	2.2	27100	27000或 2.7×10^4
4	不可计	4650	513	—	513000	51000或 5.1×10^5
5	27	11	5	—	270	270或 2.7×10^2
6	不可计	305	12	—	30500	31000或 3.1×10^4
7	0	0	0	—	$<1 \times 10$	<10

注：CFU:菌落形成单位。

- 8.8 按重量取样的样品以 CFU/g 为单位报告；按体积取样的样品以 CFU/mL 为单位报告。

9 防止污染措施

应按照GB 19489的规定执行。

附 录 A
(规范性附录)
试剂或材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

A.1 生理盐水

8.5 g氯化钠溶解到1000 mL蒸馏水后，分装10 mL管后，121 °C高压灭菌20 min。

A.2 灭菌液体石蜡

取液体石蜡50 mL，121 °C高压灭菌20 min。

A.3 灭菌吐温-80

取吐温-80 50 mL，121 °C高压灭菌20 min。

A.4 营养琼脂

将蛋白胨20 g、氯化钠5 g加到蒸馏水1000 mL中，溶解。混匀，调PH为7.1~7.4，加入琼脂，121 °C高压灭菌15 min。

A.5 0.5 %氯化三苯四氮唑 (TTC)

TTC 0.5 g溶解后过滤。121 °C高压灭菌20 min，装于棕色试剂瓶，置4 °C冰箱备用。
