

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2552.3—2010

乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第3部分：酵母、霉菌菌落计数

Microbiological examination for milk and milk products hygiene—
Part 3: Colony-count method of yeast and moulds

(ISO 6611:2004, Milk and milk products—
Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds—
Colony-count technique at 25 °C, MOD)

2010-05-27 发布

2010-12-01 实施



中华人民共和国 发布
国家质量监督检验检疫总局

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：嗜冷菌微生物菌落计数；
- 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；
- 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 3 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分与 ISO 6611:2004《乳及乳制品中酵母、霉菌 25℃ 菌落形成单位计数方法》(ISO 6611:2004 Milk and milk products—Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds—Colony-count technique at 25℃)的一致程度为修改采用，主要差异如下：

- 按照 GB/T 1.1 标准要求和汉语习惯对一些编排格式进行了修改；
- 将一些适用于国际标准的表述改为适用于我国标准的表述；
- 对“规范性引用文件”的内容按照国家标准的要求进行了修订；
- 删除 ISO 6611:2004“定义”。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分由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负责起草。

本部分主要起草人：房保海、雷质文、赵贵明、姜英辉、贾俊涛、赵丽青、刘云国、颜显辉、李明哲、王静、韩青、祝长青、赵可军、林修光、张秀梅。

乳及乳制品卫生微生物学检验方法

第3部分：酵母、霉菌菌落计数

1 范围

SN/T 2552 的本部分规定了在 25 °C 条件下检测和计数乳及乳制品中酵母、霉菌菌落形成单位的方法。

本部分适用于牛奶、液体奶制品、奶粉、干甜乳清粉、干燥干酪乳、乳糖、奶酪、酸性酪蛋白、乳酸干酪素、酶凝干酪素、酸乳清粉、黄油、冷冻乳制品(包括冷冻食品)、奶油布丁、甜点、发酵牛奶和奶油种的酵母、霉菌计数。

本部分不适用于新鲜乳酪中酵母的检测。

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 原理

3.1 如果初始产品是液体或为在其他制品中的悬浮物,需要用规定的选择性培养基和规定的检测样品量来制备倾注平板。

对其他测试样品或悬浮样品进行十倍梯度稀释,在相同的条件下,制备倾注平板。

3.2 平板在有氧条件下,25 °C ± 1 °C 培养 5 d。

3.3 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克或每毫升产品中酵母、霉菌菌落形成单位(CFU)。

4 稀释液和培养基

4.1 稀释液

按照 SN/T 2552.2 的规定执行。

4.2 稀释液的分装、灭菌和储存

按照 SN/T 2552.2 的规定执行。

4.3 酵母浸膏、葡萄糖、土霉素、琼脂培养基

见附录 A 第 A.1 章。

4.4 酵母浸膏、葡萄糖、氯霉素、琼脂培养基

见附录 A 第 A.2 章。

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:25℃±1℃。

5.2.3 无菌培养皿:直径 90 mm。

5.2.4 刻度吸管:1 mL±0.01 mL、10 mL±0.01 mL。

5.2.5 水浴锅:45℃±1℃。

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×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 培养瓶/烧瓶:500 mL,使用合适的塞子或盖子。

5.2.9 均质器(旋刀式或拍击式)或等效的设备。

5.2.10 天平:感量 0.1 g。

5.2.11 冰箱:2℃~5℃。

6 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。

有关采样方法见 SN/T 2552.1。

7 检验程序

7.1 概述

7.1.1 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。操作时防止污染,7.2 和 7.3 中所描述的操作应避免在阳光下进行。

7.1.2 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;

——制备十倍样品稀释液的混合时间。

7.2 样品和初始稀释液制备

按照 SN/T 2552.2 的规定执行。

7.3 进一步十倍梯度稀释

按照 SN/T 2552.2 的规定执行。

7.4 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。

7.5 接种和培养

7.5.1 取两个无菌培养皿,用无菌的刻度吸量管转移 1 mL 测试样品(液体产品)或 1 mL 10^{-1} 初始悬浮液至每个培养皿中。

7.5.2 再取两个无菌培养皿,用另一个无菌刻度吸量管转移 1 mL 10^{-1} 稀释物(液体产品)或 1 mL 10^{-2} 稀释液(其他产品)至每个培养皿中。

7.5.3 必要时,用更大的十倍梯度稀释液重复操作。

7.5.4 向每个培养皿倾注 15 mL 含有盐酸土霉素或含有氯霉素的培养基,倾注之前培养基应事先熔化并在水浴锅中保持 45 °C。

7.5.5 小心旋转平板,使接种物和培养基充分混匀。将平板放在凉的水平面上使混合物凝固。

7.5.6 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。

7.5.7 每个稀释梯度至少制备 2 个空白对照平板,以检测灭菌状况。

7.5.8 倒置制备的平板后,将平板放在培养箱中,25 °C \pm 1 °C 培养 5 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。

7.5.9 平皿叠放不能超过 6 个,平皿与培养箱的壁及顶部不能接触。

7.6 解释

7.6.1 计数每个培养皿的菌落数,排除可能生长的异常细菌菌落。必要时,根据形态学特征区分酵母和霉菌菌落。

7.6.2 仅保留菌落数在 10 CFU~150 CFU 之间的培养皿。为避免培养皿平板上的霉菌蔓延长满难以计数的情况,应在 2 d 后开始观察结果;如果部分培养皿的霉菌长满,或难以计数分离完好的菌落,则计数下一个更高稀释度培养皿中的菌落数,即使这些培养皿中的菌落数可能小于 10。遇到后者这种情况时,按照 8.2 继续操作。

7.7 确认

对于任何极微小的或可疑菌落,都应该进行显微检查。

必要时,至少要显微检查 \sqrt{n} 个菌落(n 为计数菌落数)。

8 结果表述

8.1 选取菌落数在 10 CFU~150 CFU 之间的琼脂平板。

用式(1)计算每克或每毫升产品中酵母或霉菌的 CFU 数量(N):

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

式中:

- ∑C ——保留的计数培养皿中菌落总数;
- n_1 ——在第1个稀释度中含有 10 CFU~150 CFU 菌落的培养皿数;
- n_2 ——在第2个稀释度中含有 10 CFU~150 CFU 菌落的培养皿数;
- d ——与第1个稀释度相应的稀释系数。

如果有超过 2 个可计数的稀释度(菌落数在 10 CFU~150 CFU 之间),应考虑进行下一个稀释度进行修改公式,如果是 3 个稀释度,变为式(2):

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

式中:

- n_3 ——保留的菌落数在 10 CFU~150 CFU 之间第 3 个稀释度培养皿数目。

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。

每毫升牛奶中酵母或霉菌的菌落形成单位(CFU)以数字(1.0~9.9)×10^x 来表示。其中 x 是合适的幂次。

例如:一次酵母或霉菌的 CFU 计数结果如下(每个稀释度 2 个培养皿)。

第 1 个稀释度保留(10⁻²)的培养皿有 83 CFU 和 97 CFU。

第 2 个稀释度保留(10⁻³)的培养皿,有 33 CFU 和 28 CFU。

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} = \frac{83 + 97 + 33 + 28}{[2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} = 10\ 954$$

将结果按数值修约规则修约后每克或每毫升产品中酵母或霉菌为 11 000 或 1.1×10⁴ CFU。

8.2 如果对应检测样品(液体产品)或初始悬浮液(其他产品)的 2 个培养皿菌落数都小于 10 CFU,按照以下方法报告结果:

- 每毫升(液体产品)产品中酵母或霉菌 CFU<10;
- 每克(其他产品)产品中酵母或霉菌 CFU<10×1/d(d 为初始悬浮液的稀释系数)。

8.3 如果所有平板上的菌落数都大于 150 CFU,计算最接近 150 CFU 的平板上的菌落,然后乘以最高稀释度对应数值的倒数,将结果报告为每克或每毫升产品中酵母或霉菌 CFU 的估计值。

9 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。

10 结果报告

检测报告应注明:

- a) 样品完整标识的必要的全部信息;
- b) 采用的采样方法(如果有);
- c) 采用的检测方法,参照本部分;
- 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) 获得的检测结果,如果作了重复性核查,最终引用的所得结果。

附 录 A
(规范性附录)
培 养 基

A.1 酵母浸膏、葡萄糖、土霉素、琼脂培养基

A.1.1 基础培养基

A.1.1.1 成分

酵母浸膏	5.0 g
葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)	20.0 g
琼脂	10 g~15 g ¹⁾
水	900 mL

A.1.1.2 制备

将各成分或脱水完全培养基溶解于水中,必要时需加热。
必要时,调整 pH 值,使灭菌后培养基的 pH 在 25 ℃ 时为 6.6。
121 ℃ ± 1 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.1.2 盐酸土霉素溶液

A.1.2.1 成分

盐酸土霉素($C_{22}H_{30}O_{11} \cdot HCl$)	50 mg
蒸馏水	50 mL

A.1.2.2 制备

将盐酸土霉素溶于蒸馏水中,所用溶液现配现用,过滤灭菌。

A.1.3 完全培养基

A.1.3.1 成分

盐酸土霉素溶液	10 mL
基础培养基	90 mL

A.1.3.2 制备

将灭菌基础培养基(A.1.1)冷却至 45 ℃;使用之前,将盐酸土霉素溶液(A.1.2)45 ℃ 保温,无菌条件下向 90 mL 基础培养基中加入 10 mL 盐酸土霉素溶液。

1) 根据琼脂凝胶的强度而定。

A.2 酵母浸膏、葡萄糖、氯霉素、琼脂培养基

A.2.1 成分

酵母浸膏	5.0 g
葡萄糖(C ₆ H ₁₂ O ₆)	20.0 g
氯霉素(C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅)	0.1 g ²⁾
琼脂	12 g~15 g ³⁾
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制备

将各成分溶于蒸馏水中,必要时加热。

必要时,调整 pH 值,使灭菌后培养基在 25 ℃ 时的 pH 值为 6.6。

将琼脂培养基分装到合适的容器中。

121 ℃ ± 1 ℃ 高压灭菌 15 min。

2) 为得到最终浓度为 100 μg/mL 的培养基。

3) 根据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3部分：酵母、霉菌菌落计数
SN/T 2552.3—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

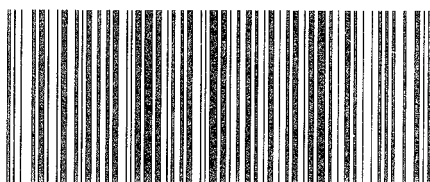
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 13 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：155066·2-21205 定价 16.00 元



SN/T 2552.3-2010