

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

T/SSFS

团体标准

T/SSFS XXXX—2023

肉及肉制品中菌落总数的快速测定 测试片法

Rapid aerobic plate count in Meat and meat products
Dry rehydratable film method

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

上海市食品学会 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。

本文件的某些内容可能涉及专利。

本文件由上海市食品学会提出、归口并组织实施。

本文件起草单位：山东美正生物科技有限公司、通标标准技术服务（青岛）有限公司、中农孚德检测技术（北京）有限公司、新希望六和股份有限公司、临沂金锣文瑞食品有限公司、北京美正生物科技有限公司。

本文件主要起草人：王琦，付敏，陶文靖，贾晨，彭庆娟，刘宁，郭玉蔓，周琦，聂飞霞，王玉花，曲连海，李瑜。

声明：本文件的知识产权归属于上海市食品学会，未经上海市食品学会同意，不得印刷、销售。任何组织、个人使用本标准开展认证、检验等活动应经上海市食品学会批准授权。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件首次承诺执行单位：山东美正生物科技有限公司、通标标准技术服务（青岛）有限公司、通标标准技术服务有限公司、通标标准技术服务（大连）有限公司、中农孚德检测技术（北京）有限公司、中农孚德检测技术（武汉）有限公司、临沂金锣文瑞食品有限公司、新希望六和股份有限公司、北京美正生物科技有限公司。

肉及肉制品中菌落总数的快速测定 测试片法

1 范围

本文件规定了肉及肉制品中菌落总数测试片和快速菌落总数测试片检测方法。
本文件适用于肉及肉制品中菌落总数的快速测定，其他类别食品也可参照执行。

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 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求

3 术语和定义

GB 4789.2、GB 7718 界定的术语和定义适用于本文件。

4 原理

菌落总数测试片/快速菌落总数测试片为预制型的培养基系统，含有平板计数琼脂培养基的主要营养成分和功能性成分（显色剂、冷水可凝胶等），微生物在测试片上生长时，代谢产物与测试片培养基中的指示剂发生化学反应，从而使微生物菌落着色。

5 仪器和设备

- 5.1 恒温培养箱：36 °C ±1 °C。
- 5.2 电子天平：感量 0.1 g。
- 5.3 均质器。
- 5.4 冰箱：2 °C ~8 °C。
- 5.5 振荡器。
- 5.6 pH 计或精密 pH 试纸：精密度 0.1。
- 5.7 测试片压板。

6 试剂和耗材

- 6.1 MicroFast®菌落总数测试片/快速菌落总数测试片（见附录 A.1、A.2、A.3）。
- 6.2 磷酸盐缓冲液（见附录 A.4）。
- 6.3 生理盐水（见附录 A.5）。
- 6.4 1 mol/L NaOH 溶液（见附录 A.6）。
- 6.5 1 mol/L HCl 溶液（见附录 A.7）。
- 6.6 无菌吸管：1 mL（具 0.01mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。
- 6.7 无菌锥形瓶：容量 250 mL。
- 6.8 无菌均质杯或均质袋。

7 操作步骤

7.1 样品的制备

7.1.1 称取 25 g 样品置于盛有 225 mL 无菌磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水的无菌均质杯内，8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min，或放入盛有 225 mL 稀释液的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min，制成 1:10 的样品匀液。

7.1.2 样品匀液的 pH 应在 5.0~8.5 之间，必要时用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调节样品匀液的 pH。

7.2 样品的稀释

吸取 1:10 样品匀液 1 mL，沿管壁缓慢注于盛有 9 mL 稀释液的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），在振荡器上振荡混匀，制成 1:100 的样品匀液，以此类推，制备 10 倍系列稀释样品匀液，每稀释一次，换用 1 次 1 mL 无菌吸管或吸头。

7.3 接种

7.3.1 根据样本的卫生状况选择 1~3 个适宜的稀释度进行接种检测。

7.3.2 测试片平放在水平实验台上，缓慢揭开上膜。将 1 mL 样品匀液垂直滴加在测试片中心区域。缓慢盖上上膜，尽量避免气泡的产生。上膜直接落下覆盖即可。将压板放在测试片中央，轻轻压下，使样液均匀分布于圆形培养基上，拿起压板，静置 2 min，再移动测试片。

7.3.3 每个稀释度接种两张测试片。同时吸取 1 mL 无菌磷酸盐缓冲液或无菌生理盐水作空白对照。

7.4 培养

7.4.1 菌落总数测试片法

将测试片正置于培养箱内，最多可堆叠至 20 片，置于 36 °C ± 1 °C 温度下，培养 48 h ± 2 h。

7.4.2 快速菌落总数测试片法

将测试片正置于培养箱内，最多可堆叠至 20 片，置于 36 °C ± 1 °C 温度下，培养 24 h ± 2 h。

7.5 计数

7.5.1 培养后，菌落总数测试片上计数红色菌落；快速菌落总数测试片上计数红色及蓝色菌落。可目视或标准菌落计数器或其它的照明放大镜进行计数，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（CFU）表示。

7.5.2 选取菌落数在 30 CFU~300 CFU 之间的测试片进行计数；低于 30 CFU 的测试片记录具体菌落数；当测试片上菌落数很高时，整个测试片会变成红色或蓝色，结果可记录为“多不可计”。

8 结果与报告

结果的计算方法和报告规则按照 GB 4789.2。

附录 A
(规范性)
培养基和试剂

A.1 MicroFast[®]菌落总数测试片 (AC)

主要营养成分：蛋白胨，酵母粉，葡萄糖，氯化钠等。

功能性成分：氯化三苯基四氮唑 (Triphenyltetrazolium chloride, TTC)，缓冲盐等。

辅助材料：冷水可凝胶，热熔胶，合成纸，泡棉，PC膜等。

A.2 MicroFast[®]快速菌落总数测试片 (RAC)

营养成分：蛋白胨，酵母粉，葡萄糖，氯化钠等。

功能性成分：TTC，糖苷酶底物，氨基酸，维生素，缓冲盐等。

辅助材料：冷水可凝胶，热熔胶，合成纸，泡棉，PC膜等。

A.3 测试片存储条件

未开封时，最佳保藏温度为2℃~8℃，并在保质期内用完。在湿度较高的环境中，请先将测试片恢复至室温后开封。开封后，如未用完，需要将测试片放回袋中，铝箔袋二次折叠后用胶布黏上或封口夹封口，避光保存（不可冷藏），并于一个月之内用完。运输或短期保存时，将测试片置于常温即可。

A.4 磷酸盐缓冲液

成分：磷酸二氢钾 (KH₂PO₄) 34.0 g，蒸馏水 500 mL。

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至7.2，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，121℃ 高压灭菌15 min。

A.5 生理盐水

成分：氯化钠8.5 g，蒸馏水1 000 mL。

制法：称取8.5 g 氯化钠溶于1 000 mL 蒸馏水中，121℃ 高压灭菌15 min。

A.6 1 mol/L NaOH 溶液

成分：NaOH 40.0 g，蒸馏水1 000 mL。

制法：称取 40.0 g 氢氧化钠溶于1 000 mL 无菌蒸馏水中。

A.7 1 mol/L HCl 溶液

成分：HCl 90 mL，蒸馏水1 000 mL。

制法：移取浓盐酸 90 mL，用无菌蒸馏水稀释至1 000 mL。

附录 B

(规范性)

MicroFast[®]菌落总数测试片的验收操作

B.1 参照标准

应符合GB 4789.28 的规定要求。

B.2 文件信息验收

厂家提供的配方中主要营养成分与平板计数琼脂培养基配方一致，质控报告应符合 GB 4789.28 中平板计数琼脂培养基质量控制要求。

B.3 产品外观验收

测试片包装完整，无破损，在有效期内。

B.4 技术指标验收

B.4.1 菌落特征：菌落在菌落总数测试片显示红色，菌落在快速菌落总数测试片显示红色及蓝色。

B.4.2 非选择分离和计数固体培养基上目标菌的生长率不小于0.7。

B.5 技术指标验收操作

B.5.1 标准菌株

大肠埃希氏菌 ATCC 25922（或其他等效标准菌株）、金黄色葡萄球菌 ATCC 6538（或其他等效标准菌株）、枯草芽胞杆菌 ATCC 6633（或其他等效标准菌株）。

B.5.2 培养基和试剂

胰酪大豆胨液体培养基（TSB）、菌落总数测试片（AC）、快速菌落总数测试片（RAC）、胰酪大豆胨培养基（TSA）、无菌生理盐水。

B.5.3 检验程序

B.5.3.1 菌悬液制备

接种大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽胞杆菌的新鲜培养物至TSB液体培养基中或采用其他方法，培养条件为36℃培养18 h~24 h，取1mL用无菌生理盐水10倍递增稀释制成含菌数50 CFU/mL~200 CFU/mL的菌悬液，备用。

也可直接使用符合要求的即用型定量标准菌株，具体操作参照生产厂商说明书。

B.5.3.2 接种及培养

B.5.3.2.1 通则：选择适宜稀释度的菌悬液，分别接种于测试片和无菌培养皿，接种量均为1 mL，每一稀释度做2个平行。同时，吸取1 mL 无菌稀释液分别加入无菌培养皿和测试片内作空白对照。

B.5.3.2.2 平板法：将15 mL~20 mL 冷却至46℃~50℃的TSA倾注无菌培养皿，转动培养皿使其混合均匀，水平放置待琼脂凝固后，倒置放入36℃培养箱培养48 h±2 h。

B.5.3.2.3 测试片：应按照7.3~7.4操作。

B.5.3.3 计数

选择菌落数适中的平皿、测试片进行计数，按式(B.1)计算生长率。

$$P_R = \frac{N_S}{N_0} \dots\dots\dots (B.1)$$

式中：

P_R ——生长率；

N_S ——测试片上得到的菌落总数；

N_0 ——TSA培养基平板上获得的菌落总数（该菌落总数应 ≥ 100 CFU）。

B.5.3.4 测试片标准显色示例

菌落总数测试片验收示意图如图B.1所示。快速菌落总数测试片验收示意图如图B.2所示。

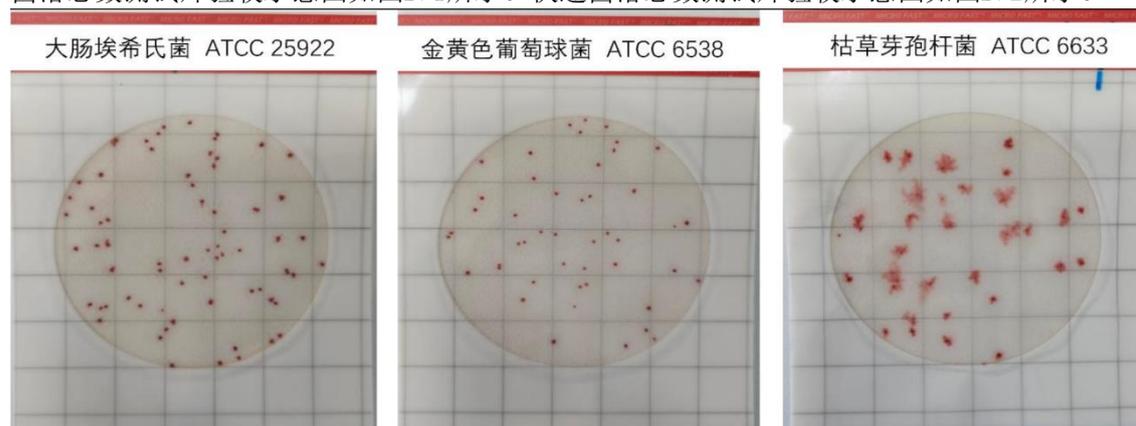


图 B.1 菌落总数测试片验收示意图

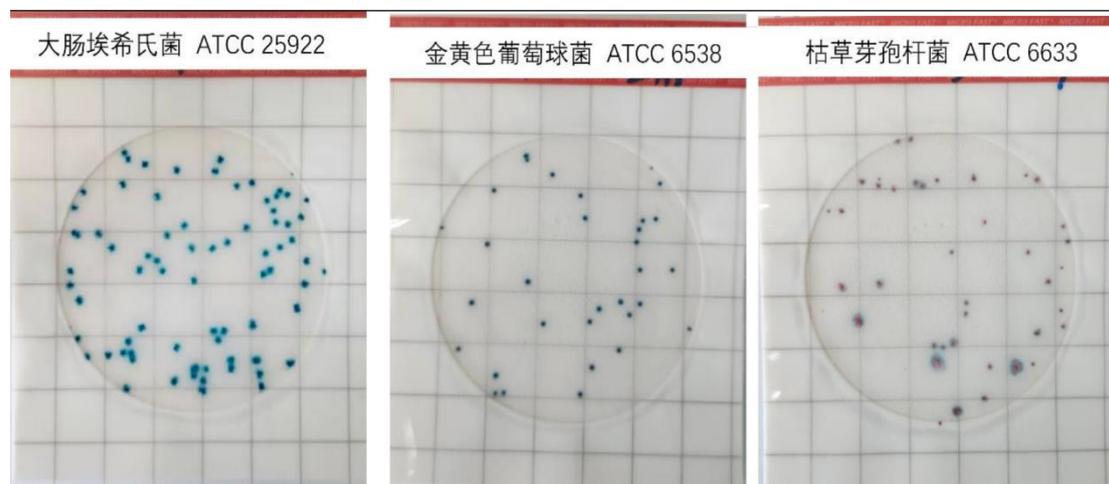


图 B.2 快速菌落总数测试片验收示意图

附录 C

(资料性)

菌落总数快速测定 测试片法评价结果

以GB 4789.2-2022 倾注平板计数琼脂的方法为参考方法，对菌落总数测试片法和快速菌落总数测试片法在相对正确度和准确度方面与参考方法的一致性进行验证评价，结果如下：

C.1 菌落总数测试片法的评价结果

C.1.1 相对正确度

对测试片方法和参考方法检测结果取对数值并计算二者的差值，超出差值的总平均值的95%置信区间的样品比例在0~1/30范围内，均低于1/20的比例要求。

C.1.2 准确度

准确度以重复测试结果的预期最大偏倚（ β -期望容忍区间， β -ETI）来表示，计算 β -ETI的上下限（以对数值表示），肉制品的 β -ETI最低下限为-0.206，最高上限为0.278，均在可接受性限值 ± 0.5 的范围内。

C.2 快速菌落总数测试片法评价结果

C.2.1 相对正确度

对测试片方法和参考方法检测结果取对数值并计算二者的差值，超出差值的总平均值的95%置信区间的样品比例在0~1/30范围内，均低于1/20的比例要求。

C.2.2 准确度

准确度以重复测试结果的预期最大偏倚（ β -期望容忍区间， β -ETI）来表示，计算其 β -ETI的上下限（以对数值表示），肉制品的 β -ETI最低下限为-0.379，最高上限为0.371；均在可接受性限值 ± 0.5 的范围内。

注：本评价参照ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain -Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
