

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXX—XXXX

生乳及巴氏杀菌乳中嗜冷菌的测定  
快速培养法

Enumeration method of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk  
—rapid cultural method

(ISO 17410:2019 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic  
microorganisms—Annex B, IDT)

(公开征求意见稿)

(本稿完成日期: 2024.11)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施



## 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。

本文件等同采用ISO 17410:2019《Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms》Annex B，文件类型由ISO的技术规范调整为我国的行业标准。

本文件做了下列最小限度的编辑性改动：

- 为与现有标准协调，将标准名称改为《生乳及巴氏杀菌乳中嗜冷菌的测定 快速培养法》；
- 增加了样品采集、检测程序、样品准备、结果计算的详细说明。

本文件与ISO17410:2019的主要技术性差异及其原因如下：

- 删除了无菌涂布棒，因为本文件中不需要进行涂布；
- 将ISO17410:2019中样品采集、样品准备、结果计算部分进行了明确，增加了可操作性，便于本文件的应用。

——增加了检测程序的技术路线示意图，增加了可操作性，便于本文件的应用。

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国畜牧业标准化技术委员会（SAC/TC 274）归口。

本文件起草单位：XXXX、XXXX、XXXX、XXXX、XXXX。

本文件主要起草人：XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX。



# 生乳及巴氏杀菌乳中嗜冷菌的测定 快速培养法

## 1 范围

本文件描述了生乳及巴氏杀菌乳中嗜冷菌测定的快速培养法。

本文件适用于生乳及巴氏杀菌乳中嗜冷菌的快速测定。

## 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 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 原理

试样悬浮液与 44°C-47°C 的乳平板计数（MPC）琼脂于平板中混合，于 21°C 条件下培养 25 h，菌落计数，算出每 mL（g）检样中的嗜冷菌数量。

## 5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 无菌磷酸盐缓冲液储备液：称取 34.0 g 的磷酸二氢钾溶于 500 mL 蒸馏水中，用约 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 1000 mL 后，4°C 贮存。

5.3 无菌磷酸盐缓冲液工作液：取磷酸盐缓冲液储备液（5.2）1.25 mL，用蒸馏水稀释至 1000 mL，分装于适宜容器中，121°C高压灭菌 15 min。

5.4 无菌生理盐水：称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中，121°C高压灭菌 15 min。

5.5 MPC 琼脂：称取 5.0 g 酪蛋白胨、2.5 g 酵母提取物、1.0 g 无水葡萄糖和 1.0 g 不含抑制性物质的脱脂奶粉溶于 1 000 mL 蒸馏水中，调节 pH 至 7.0±0.1。加入 9.0~18.0g 琼脂<sup>1</sup>，煮沸溶解，分装于适宜容器，密封后，121°C高压灭菌 15 min。

## 6 仪器设备

6.1 恒温培养箱：温度为 21°C±1°C。

6.2 高压灭菌锅。

6.3 培养皿：直径 90 mm。

6.4 pH 计：25°C时精度为±0.1。

6.5 移液器：0.1 mL 和 1 mL，配无菌枪头。

6.6 天平：精度为±0.1 g。

6.7 水浴锅。

6.8 振荡器。

6.9 均质器。

6.10 菌落计数装置（可选）：例如，由带黑暗背景的发光基座、装有辅助菌落数检测的放大镜和（可选）机械或电子式数字计数器组成。

## 7 样品

样品的采集按GB 4789.1执行。

## 8 检验程序

嗜冷菌的快速检验程序见图1。

---

1) 基于琼脂的凝胶程度。

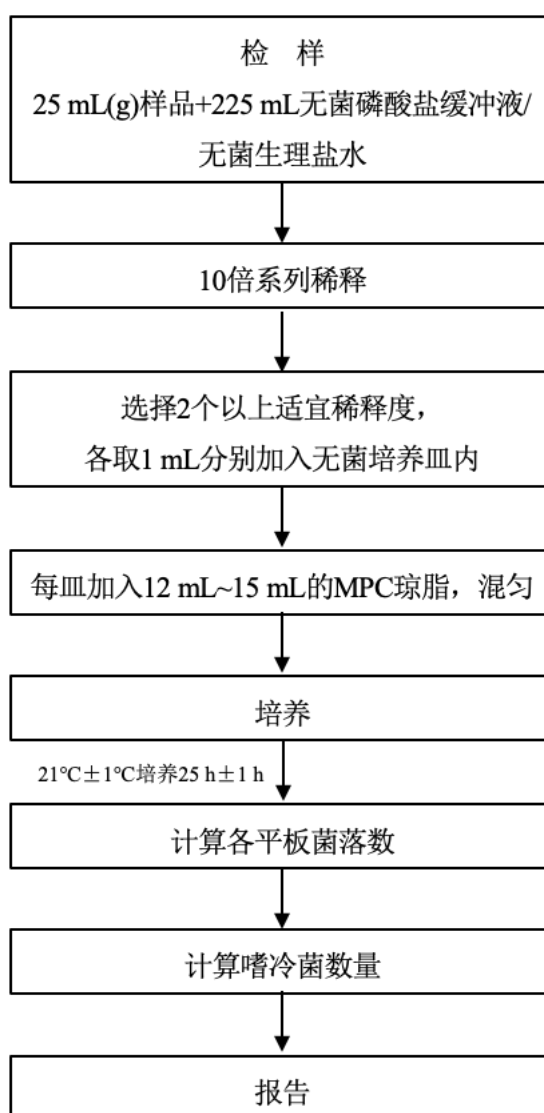


图1 嗜冷菌快速检验程序

## 9 试验步骤

9.1 取 25 mL (g) 样品置于盛有 225 mL 无菌磷酸盐缓冲液 (5.3) 或无菌生理盐水 (5.4) 的无菌锥形瓶或无菌均质袋中, 混匀, 制成 1:10 的样品匀液。

9.2 用 1 mL 移液器 (6.5) 吸取样品匀液 (9.1) 1 mL, 沿管壁缓慢注于盛有 9 mL 稀释液的无菌试管中 (注意枪头尖端不应触及稀释液面), 振荡混匀, 制成 1:100 的样品匀液。

9.3 按 9.2 操作, 制备 10 倍系列稀释样品匀液。每次稀释均使用新的无菌枪头。

9.4 选择适宜稀释度的样品匀液 (至少 2 个连续稀释度), 取 1 mL 样品匀液于培养皿 (6.3) 内, 每个稀释度做两个培养皿。同时, 分别吸取 1 mL 空白稀释液加入两个培养皿 (6.3) 内作空白对照。

9.5 将 12 mL~15 mL 冷却至 44°C~47°C 的 MPC 琼脂 (5.5) 倾注培养皿, 从初始悬浮液制备结束到将培养基倒入培养皿 (6.3) 之间的时间不应超过 45 min。转动培养皿使样品匀液与培养基均匀混合, 冷却。

9.6 待琼脂凝固后, 将培养皿 (9.5) 倒置, 21°C±1°C 培养 25 h±1 h。

## 10 菌落计数

10.1 可用肉眼观察, 必要时用放大镜或菌落计数装置 (6.10), 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 Form Unit, CFU) 表示。

10.2 选取菌落数在 10 CFU~300 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于 10 CFU 的平板记录具体菌落数, 大于 300 CFU 的可记录为“多不可计”。

10.3 当平板上出现菌落间无明显界线的链状生长时, 则将每条单链作为一个菌落计数。其中平板有较大片状菌落生长时, 则不宜采用, 而应以无较大片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数; 若片状菌落不到平板的四分之一, 而其余四分之三中菌落分布又很均匀, 可通过推算, 以代表一个平板的菌落数。

## 11 试验数据处理结果计算

11.1 若只有 1 个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内, 计算两个平板菌落数的平均值, 再将平均值乘以相应稀释倍数, 作为每 mL (g) 试样中嗜冷菌计数结果。

11.2 若有两个及以上连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时, 按下列公式计算:

试样中嗜冷菌数量以  $N$  计, 单位为菌落形成单位每毫升 (克) [CFU/mL (g)], 按式 (1) 计算。

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

式中:

$\sum c$  ——平板 (含适宜范围菌落数的平板) 菌落数之和, 单位为菌落形成单位 (CFU);

$n_1$  ——第一稀释度 (低稀释倍数) 平板个数;

$n_2$  ——第二稀释度 (高稀释倍数) 平板个数;

$d$  ——第一稀释度稀释因子。

## 12 结果报告



12.1 若所有稀释度培养皿中菌落数均少于 10 CFU，结果报告为“样品中嗜冷菌计数小于  $10 \times 1/d$  CFU/mL (g)，式中  $d$  为最低稀释液的稀释度。

12.2 若所有稀释度的平板上菌落数均大于 300 CFU，则对稀释度最高的平板进行计数，其他平板可记录为多不可计，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。

12.3 嗜冷菌计数小于 100 CFU 时，按“四舍五入”原则修约，以整数报告。

12.4 嗜冷菌计数大于或等于 100 CFU 时，第三位数字采用“四舍五入”原则修约后，保留两位有效数字，后面用 0 代替位数；也可用 10 的指数形式来表示，按“四舍五入”原则修约后，保留两位有效数字。

12.5 若空白对照上有菌落生长，则此次检验结果无效。

## 附录 A

(资料性)

## 结构编号对照一览表和技术差异及其原因一览表

结构编号对照一览表见表A.1, 技术差异及其原因一览表见表A.2。

表 A.1 给出了本文件与 ISO 17410:2019 结构编号对照一览表。

表 A.1 本文件与 ISO 17410:2019 结构编号对照一览表

本文件结构编号	ISO 17410:2019 结构编号
1	Annex B B.1
2	2
3	3
4	4
5	5
5.1	-
5.2	-
5.3	-
5.4	Annex A A.3.1
6	6
6.1	6.3
6.2	6.4
6.3	6.5
6.4	6.6
6.5	6.8
6.6	-
6.7	6.10
6.8	-
6.9	-
6.10	6.1
7	7

8	-
9	Annex B B.3
9.1	9.1
9.2	Annex B B.3.2.1、B.3.2.2
9.3	Annex B B.3.2.3
9.4	Annex B B.3.2.4
9.5	Annex B B.3.2.5、B.3.2.6
9.6	Annex B B.3.2.7
10	9.3
10.1	9.3.1、Annex B B.3.1
10.2	-
10.3	9.3.2
11	10
11.1	-
11.2	-
12	11
12.1	10
12.2	-
12.3	-
12.4	-
12.5	-
附录 A	-

表 A.2 给出了本文件与 ISO 17410:2019 技术差异及其原因的一览表。

表 A.2 本文件与 ISO 17410:2019 技术差异及其原因的一览表

本文件结构编号	技术差异	原因
2	规范性引用文件更改为中国国家标准	ISO 17410:2019 引用 ISO 标准为规范性引用文件，本文件更改为中国国家标准

3.1	删除嗜冷微生物定义	本文件仅进行嗜冷菌检测
5.1	增加无菌磷酸盐缓冲液储备液的配制方法	增加可操作性，便于本文件的应用
5.2	增加无菌磷酸盐缓冲液工作液的配制方法	增加可操作性，便于本文件的应用
5.3	增加无菌生理盐水的配制方法	增加可操作性，便于本文件的应用
5.4	增加天平	增加可操作性，便于本文件的应用
6.6	增加振荡器	增加可操作性，便于本文件的应用
6.8	增加均质器	增加可操作性，便于本文件的应用
7	明确样品采集的要求	增加可操作性，便于本文件的应用
8	增加检验程序的说明	增加可操作性，便于本文件的应用
9.4	增加空白对照	增加可操作性，便于本文件的应用
10	增加菌落计数的单位和计数范围	增加可操作性，便于本文件的应用
11		
11.1	增加结果计算的详细说明	提高数据的准确性
11.2		
12		
12.1		
12.2	增加结果报告的详细说明	提高结果报告的准确性
12.3		
12.4		
12.5		
附录 A	更改为结构编号对照一览表和技术差异及其原因一览表	明确本文件与 ISO 17410:2019 的一致性和技术差异的原因

