SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2552.2—2010

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

Microbiological examination method for milk and milk products hygiene—Part 2: Preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions

(ISO 8261:2001, Milk and milk products—General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination, MOD)

2010-05-27 发布　　2010-12-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局　发布

中国标准出版社
数码防伪

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：假单孢菌属的分离与计数。

本部分是SN/T 2552的第2部分。

本部分按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本部分与ISO 8261:2001《Milk and milk products—General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination》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；

——删减了原文条款4原理。

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、中华人民共和国山西出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国内蒙古出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国广西出入境检验检疫局、中华人民共和国吉林出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国福建出入境检验检疫局负责起草。

本部分主要起草人：赵贵明、李卫华、刘振、祝长青、雷质文、王海艳、高旗利、李晓虹、吕敬章、罗兆飞、许龙岩、黄晓蓉。

标准分享网 www.bzfxw.com 免费下载

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

1 范围

SN/T 2552的本部分规定了乳及乳制品用于微生物检验的样品制备与稀释方法。

本部分适用于乳及乳制品用于微生物检验的样品制备与稀释。

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。

GB 4789.2 食品安全国家标准 食品卫生微生物学检验 菌落总数测定

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实验室样品 laboratory samples

送至实验室进行检测或检验的样品。

3.2

乳 milk

从哺乳动物中挤出的正常乳房分泌物，无添加物且未从其中提取任何成分。

3.3

乳制品 milk product

以乳为原料，利用全部或部分成分加工而成的液体，半固体或固体产品。

3.4

初始悬浮液(首次稀释液)

待检样品在称量或定量后与9倍体积稀释液混合而成的悬浮液、溶液或洗脱液。如果有大颗粒，可进行搅拌。在某些情况下，如果1∶9悬浮液太粘稠，可加大稀释液体积；如果需要比1∶9更浓的首次稀释液才能获得试验结果，则适当减少稀释液体积，但对测试结果的描述时则应考虑到这些因素。如果每克样品中细菌数少于10个则使用第一个稀释液；在细菌含量更低的情况下，可考虑适当减少稀释液的体积。

4 设备和材料

4.1 干热灭菌与湿热灭菌装置。

4.2 均质器。

4.3 机械搅拌装置。

4.4 三角瓶或玻璃瓶。

4.5 试管(三角瓶或玻璃瓶)。

4.6 吸管:容量 1 mL,吸头 1.75 mm~3.0 mm。

4.7 刻度吸管:10 mL 或 20 mL 带有棉塞或配备机械吹吸装置的大容量刻度吸管。

4.8 玻璃珠:直径约 6 mm。

4.9 pH 计:温度补偿型,精确度至±0.2 pH 单位。

4.10 天平:感量 0.1 g。

4.11 水浴锅:可设定 30 ℃±1 ℃,37 ℃±1 ℃以及 45 ℃±1 ℃等温度。

4.12 玻璃棒。

4.13 加热板。

5 稀释剂

5.1 基础材料

配制稀释液时,一般采用分析级试剂,使用蒸馏水、去离子水或同等质量的水,以适当摩尔浓度的氢氧化钠或盐酸溶液调节培养基的 pH,尽可能使培养基体积和其中组分浓度保持不变。通常培养基的体积越小,调节 pH 试剂的浓度越高。

5.2 通用稀释液

5.2.1 蛋白胨盐溶液:见附录 A 第 A.1 章。

5.2.2 1/4 Ringer 氏溶液:见附录 A 第 A.2 章。

5.2.3 蛋白胨溶液:见附录 A 第 A.3 章。

5.2.4 磷酸缓冲液:见附录 A 第 A.4 章。

5.3 专用稀释液(用于样品初始原液的制备)

5.3.1 缓冲蛋白胨水:见附录 A 第 A.5 章。

5.3.2 柠檬酸钠溶液:见附录 A 第 A.6 章。

5.3.3 磷酸氢二钾溶液:见附录 A 第 A.7 章。

5.3.4 含消泡剂的磷酸氢二钾溶液:见附录 A 第 A.8 章。

5.3.5 三聚磷酸钠溶液:见附录 A 第 A.9 章。

5.3.6 含 α-淀粉酶溶液的通用稀释液:见附录 A 第 A.10 章。

5.4 稀释液分装、灭菌和储存

5.4.1 分装

将初始悬浮液制备用稀释液(5.2 和 5.3)分装到三角瓶或试剂瓶中;将十倍梯度稀释的稀释液分装到试管、三角瓶或试剂瓶中。必要时将稀释液预热至 45 ℃时再分装。

灭菌后的三角瓶或试剂瓶中的稀释液应为 90 mL、225 mL,试管中应为 9.0 mL 或其他规定体积的稀释液。分装后试管、三角瓶或试剂瓶应加盖封口。体积误差应控制在±2%以内。

5.4.2 灭菌

于 121 ℃温度下高压湿热灭菌 15 min,大体积的样品可延长灭菌时间。

标准分享网 www.bzfxw.com 免费下载

5.4.3 储存

若稀释液不立即使用，宜将其存放在温度为 0 ℃～5 ℃的暗处，但时间不宜超过 1 个月。

6 取样

取样按照 SN/T 2552.1。实验室收到的样品应保证具有代表性，并在运输及储藏过程中无损坏。

7 操作步骤

7.1 总则

整个操作过程中，测试样品、初始悬浮液和十倍梯度稀释液温度不应超过 20 ℃温度。对某种特定的细菌检验(如：沙门氏菌等)，需要专用技术或预防措施。7.2 与 7.3 的操作不得在阳光直射的地方进行。操作过程中应当采取常规无菌预防措施。

7.2 测试样与初始悬浮液制备

7.2.1 概要

对经过了热或酸处理的产品，样品初始悬液要在室温 20 ℃～25 ℃下放置 45 min，再进行稀释和接种，以使受损微生物在初始悬液中得到恢复后，在选择性培养基上获得最大回收，为避免温度突然改变对微生物造成损伤，除特殊说明外，下列操作过程温度应与测试样的温度接近。

7.2.2 乳与液态乳制品

上下快速翻转容器 25 次，使微生物在样品中均匀分散，同时应避免产生气泡。混合与取样时间间隔不超过 3 min。用无菌吸管吸取 1 mL 测试样，加入 9 mL 稀释液(或 10 mL 测试样，加入到 90 mL 稀释液中，25 mL 加入到 225 mL 稀释液中)。振摇样品稀释液(如手摇，幅度为 300 mm，7 s 之内振摇 25 次，或者采用机械搅拌装置，搅拌 5 s～10 s，制备成 10^{-1} 样品稀释液)。

制备高稀释度的样液按照 7.3 所述步骤操作。

7.2.3 干乳、干甜乳清、干酸乳清、干酪乳和乳糖

反复振摇和翻转容器，充分混匀密闭容器内容物。若测试样品是未开封的状态，容器太满而不能充分混匀时，将样品转到更大的容器进行混匀。用抹刀取一定量测试样品，进行以下操作。并立即将样品容器封严。

将含有 90 mL 或 225 mL 稀释液的试剂瓶放置 45 ℃水浴中预热。

称取 10 g 或 25 g 测试样品装入一适当玻璃容器内(也可称取测试样品直接加入到含有稀释液的试剂瓶中)，然后将样品粉末加入到含有合适稀释液的稀释瓶中。对于干酸乳清，采用 pH8.4±0.2 的磷酸氢二钾溶液。必要时，滚筒干燥的奶粉采用 pH7.5±0.2 的稀释液(柠檬酸钠或磷酸氢二钾溶液)。为了更好地复原，可使用玻璃珠，但应在灭菌前就加入到试剂瓶中。

溶解测试样品时，慢慢涡旋将粉末浸湿，振摇试剂瓶 25 次，幅度约 300 mm，时间 7 s。可以选蠕动式均质器处理。

试剂瓶放回水浴 5 min，间歇振摇一次。

按照 7.3 制备高稀释度样液。

7.2.4 奶酪和加工奶酪

称取10 g或25 g测试样品置于一无菌容器内(或者直接称样放入均质器内),然后将其转至旋转式均质器或蠕动式均质器内,加入90 mL(若样品为25 g则加入225 mL)稀释液(柠檬酸钠溶液或磷酸氢二钾溶液,pH7.5±0.1),均质1 min～3 min直到奶酪充分分散。若使用旋转式均质器,给以足够时间总转数达到15 000 r/min～20 000 r/min进行混合。但即使采用转速最慢的旋转均质器,时间不应超过2.5 min,均质样液温度不允许超过45 ℃,使气泡散开。

制备高稀释度的样液按照7.3所述步骤操作。

7.2.5 酸酪素、乳酪、凝乳酶干酪素和酪蛋白酸盐

反复翻转和振摇,充分混匀密闭容器内的内容物。称取10 g或25 g测试样品置于一无菌的塑料均质袋中,室温条件下加入90 mL(若样品为25 g则加入225 mL)合适的稀释液:酸酪素或乳酪,选用含消泡剂的磷酸氢二钾溶液,pH8.4±0.2;酪蛋白酸盐,选用磷酸氢二钾溶液,pH7.5±0.2;凝乳酶干酪素,选用含消泡剂的磷酸氢二钾溶液,pH7.5±0.2。

使用磷酸氢二钾溶液作为凝乳酶干酪素的稀释液可能产生不溶性颗粒,妨碍平板计数,建议采用下面可供选择的操作步骤:充分混匀后于室温下静置15 min。必要时,对颗粒状产品使用两个无菌袋,均质2 min,静置5 min。

其他可选方法:取样前将干酪素进行研磨。取20 g测试样品(如果检样为25 g,则取50 g)放置于一合适的容器内,使用转速约20 000 r/min转带刀、具有热保护装置(防止研磨过程中发热)的均质器进行研磨(Virtis器或同类产品)。称取研磨样品于适当容积的无菌试剂瓶中,加入玻璃珠和预先加热至37 ℃的三聚磷酸钠溶液进行混合。将试剂瓶放在混合装置上混合15 min,然后将其放在37 ℃水浴15 min,并不时混匀。

按照7.3制备高稀释度样液。

7.2.6 黄油

称取10 g或25 g测试样于一样品容器内。将容器放入45 ℃水浴,直到测试样完全融化。加入保温至45 ℃的90 mL(25 g则加225 mL)稀释液进行混合。推荐使用蠕动式均质器。

或者按以下操作,仅采用稀释液的水相:取50 g测试样[加体积/质量百分数约为16%(约为8 mL)的水],然后加入一定量[50－50×16%,或实际数值](=42 mL)预先水浴加热至45 ℃的磷酸缓冲液。将容器放入45 ℃水浴中水浴直至黄油融化。振摇混合充分,分层时间不超过15 min。必要时,用刮刀和(或)玻璃棒除去脂肪相。

如有必要分离油、水相,则将融化的测试样转到无菌离心管中(或直接在离心管中融化)进行离心,离心转速为1 000 r/min或2 000 r/min。可能有必要通过一连接真空泵的无菌导管,无菌操作除去脂肪(上层)相。然后用吸管吸取底层。

按照7.3制备高稀释度的稀释样液。

7.2.7 冷冻乳制品(包括食用冰品)

称取10 g或25 g测试样品于一样品容器中。将容器放置30 ℃水浴,直到整个测试样品完全溶解,然后混合。

按照7.3制备高稀释度的样液。

7.2.8 奶油冻、甜点和甜乳酪

称取10 g或25 g测试样于一含有玻璃珠的一角瓶中,室温条件加入90 mL(25 g则加225 mL)稀

标准分享网 www.bzfxw.com 免费下载

释液，振摇使样品分散。

按照 7.3 制备高稀释度的样液。

7.2.9 发酵乳和酸奶油

称取 10 g 或 25 g 测试样于一含有玻璃珠的三角瓶中，加入 90 mL(25 g 则加 225 mL)pH7.5±0.2 稀释液，手摇混合，或者采用蠕动式均质器。

按照 7.3 制备高稀释度的样液。

7.2.10 婴幼儿乳制食品

反复振摇和翻转，使密闭容器内的内容物充分混匀。若未开封容器内测试样太满不能充分混匀时，可以将其转到大一些的容器进行混合。打开容器，用刮刀取规定量的测试样品，并按照以下操作步骤进行处理。取样完毕容器立即封严。

将含有 90 mL 稀释液的试剂瓶放置 45 ℃水浴保温。称取 10 g 测试样品于一合适的玻璃容器内(如：烧杯)，然后将样品粉末加入到含有合适稀释液(通用稀释液或三聚磷酸钠溶液)的试剂瓶内。

称取 10 g 测试样品直接加入到预先保温至 45 ℃含稀释液的试剂瓶中。

注：为了更好地复原，加入玻璃珠会有帮助。若使用玻璃珠，则应在灭菌前就加入到试剂瓶中。

为溶解样品，缓慢涡旋浸湿样品粉末，然后手摇试剂瓶 25 次，幅度约 300 mm，时间约 7 s。或者，使用蠕动式均质器。将试剂瓶再放回水浴 5 min，时而振摇一次。高稀释度的稀释液制备按照 7.3 进行。淀粉含量高的样品因为初始悬浮液高粘稠度可能出现溶解问题。采用含 α-淀粉酶的通用稀释液，以减少原液的粘稠度，或者使用两倍量的稀释液进行稀释。在后续的检验中要考虑此稀释液的浓度。

7.3 十倍梯度稀释

7.3.1 十倍梯度稀释方法，见 GB 4789.2。

7.3.2 若对 0.1 mL 或 0.1 g 测试样品测试有无微生物时，则不必制备十倍梯度稀释液。

7.3.3 若测试要求更大的体积样液，则用无菌吸管转移 10 mL 原液到含 90 mL 无菌稀释液的试剂瓶中，或者 11 mL 原液至 99 mL 无菌稀释液的试剂瓶中。日常操作中，若取 10^{-3} 稀释液试验，则转移 1 mL 原液至 99 mL 无菌稀释液的试剂瓶中。

7.3.4 当转移粘稠的稀释液比如酸酪素或凝乳酶干酪素时，用稀释液反复吹吸几次冲洗吸管，采用制备十倍稀释液试管中的稀释液。

初始悬浮液粘稠时，应进行此步操作；未将吸管进行冲洗，原液的量转移会不正确。

附 录 A
（规范性附录）
培养基和试剂

A.1 蛋白胨盐溶液

胰酪胨	1.0 g
氯化钠(NaCl)	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

将各组分溶解在水中，必要时稍微加热。采用5.1中的酸碱溶液调整其pH在25 ℃时达到7.0±0.2。

A.2 1/4 Ringer氏溶液

氯化钠(NaCl)	2.25 g
氯化钾(KCl)	0.105 g
无水氯化钙($CaCl_2$)	0.06 g
碳酸氢钠($NaHCO_3$)	0.05 g
蒸馏水	1 000 mL

将各组分溶解在水中，采用5.1中的酸碱溶液调节pH值，使灭菌后的溶液在25 ℃时pH为6.9±0.2。

A.3 蛋白胨溶液

蛋白胨	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL

将蛋白胨溶解在水中，采用5.1中的酸碱溶液调节pH，使灭菌后的pH在25 ℃时为7.0±0.2。

A.4 磷酸缓冲液

磷酸氢二钾(KH_2PO_4)	42.5 g
蒸馏水	1 000 mL

将磷酸氢二钾溶解在500 mL水中，采用5.1中的酸碱溶液调整pH，使其灭菌后25 ℃时pH为7.2±0.2。然后稀释至1 000 mL。然后将此储备液保存在冰箱中。

用作稀释液时，取1 mL储备液(20 ℃)加入到1 000 mL水中混匀。

A.5 缓冲蛋白胨水(前增菌培养基)

动物组织胰酶消化胨	10.0 g
氯化钠(NaCl)	5.0 g
十二水磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	9.0 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

将各组分溶解在水中，必要时可轻微加热。采用5.1中合适的酸碱溶液调节pH，使其灭菌后25 ℃

标准分享网 www.bzfxw.com 免费下载

时达到7.0±0.2。

A.6 柠檬酸钠溶液[用于奶酪和(滚筒)干乳]

二水柠檬酸二钠($Na_2C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)	20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

将柠檬酸钠溶解在水中,必要时可采用45 ℃~50 ℃的电热板加热。采用5.1中合适的酸碱液调整pH,使其灭菌后25 ℃时pH为7.5±0.2。

A.7 磷酸氢二钾溶液[用于奶酪、(滚筒)干乳、发酵乳、酪蛋白酸盐、干酸乳清或酸奶油]

磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

采用45 ℃~50 ℃的加热板将磷酸氢二钾溶解在水中。用于酸性乳清粉,采用5.1中合适的酸碱液调节pH,使灭菌后的原稀释液pH在25 ℃时为8.4±0.2。用于奶酪、滚筒干燥乳、发酵乳、酪蛋白酸盐和酸奶油,调节pH使其灭菌后25 ℃时达到7.5±0.2。

A.8 含消泡剂的磷酸氢二钾溶液(用于酸性干酪素、乳酪和凝乳酶干酪素)

磷酸盐溶液	
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	20.0 g
蒸馏水	1 000 mL
消泡剂储备液	
多聚乙二醇2000(BDH)	1 g
蒸馏水	1 000 mL

采用45 ℃~50 ℃温度加热溶解磷酸盐,加入1 mL消泡剂储备液至1 L磷酸氢二钾溶液中。采用5.1中合适的酸碱液调节溶液pH值,使用于酸性干酪素和乳酪的初始稀释液的pH值在灭菌后25 ℃时达到7.5±0.2。

A.9 三聚磷酸钠溶液(作为凝乳酶干酪素溶解产生问题时的备选稀释液)

三聚磷酸钠($Na_3O_{10}P_3$)	20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

必要时,采用加热板轻微加热将三聚磷酸钠溶解在水中。将三聚磷酸钠盐分装在含有90 mL的试剂瓶中,121 ℃高压湿热灭菌20 min。该培养基在0 ℃~5 ℃环境最多可存放1个月时间。

A.10 含α-淀粉酶溶液的通用稀释液(用于淀粉含量高的婴幼儿食品)

取12.5 mg活性大约为每毫克400单位的α-淀粉酶加入到225 mL通用稀释液中(见5.2)。该稀释液用于25 g测试样品。以此类推配制其他量测试样品所用的稀释液(如:10 g测试样品,加5 mg α-淀粉酶至90 mL通用稀释液中)。

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2部分：检验样品的制备与稀释
SN/T 2552.2—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 16千字
2010年10月第一版 2010年10月第一次印刷
印数 1—1 600
*
书号：155066·2-21204 定价 16.00 元

标准分享网 www.bzfxw.com 免费下载