

# 《鲜米粉中菌落总数的快速计数法》 标准编制说明

## 一、 工作简况

### 1、任务背景

菌落总数测定是用来判定食品被细菌污染的程度及卫生质量，它反映食品在生产过程中是否符合卫生要求，以便对被检样品做出适当的卫生学评价。菌落总数的多少在一定程度上标志着食品卫生质量的优劣。食品的菌落总数严重超标，说明其产品的卫生状况达不到基本的卫生要求，将会破坏食品的营养成分，加速食品的腐败变质，导致食品的品质、色泽、风味等发生变化，甚至使食品失去食用价值。消费者食用微生物超标严重的食品，很容易患痢疾等肠道疾病，可能引起呕吐、腹泻等症状，危害人体健康安全。菌落总数超标也意味着致病菌超标的机会增大，增加危害人体健康的几率。

目前，《GB 4789.2-2022 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数的测定》方法的准确性相对较高，数据的重现性较好。其检测周期为 2-3 d，花费的时间较长，检测结果具有滞后性，待样品中污染的数量搞清楚后，一些损失已经无法挽回。且培养基准备繁琐，需要较高的专业技能和配套仪器设备。其中纳入的测试片法检测周期最快可达 1 d，检测周期大大缩短，提高了检测效率，缩减了检测成本，同时也保证了检测结果的一致性。测试片为即用型，免于培养基配制，相对于国标中的倾注法，无热损伤，计数更准确。只需加样、培养、判读三步，操作简便。但该标准中对菌落总数测试片的描述仅限于应符合 GB 4789.28 中平板计数琼脂培养基质量控制要求，且主要营养成份与平板计数琼脂培养基配方一致。对于其使用也是按照测试片提供的相关技术规程操作。对于测试片法虽然进行了多种代表性食品基质的验证，和 PCA 平板法相比具有可靠的一致性。但对于具体鲜米粉食品基质的适用性和准确度等并没有验证或具体指导方法。

本次拟制定的标准采用测试片法对鲜米粉中菌落总数进行快速计数，由于测试片为即用型且操作简便，对检验技术水平和设施设备要求相对较低，能够快速有效地检测鲜米粉中菌落总数的污染状况，确保食品安全和人民身体健康。

### 2、主要工作过程

为了适应行业发展及相关检测机构的实际应用,进一步加强我国自主知识产权的微生物相关快速检测方法与国际先进方法的融合与对接,推进我国食品行业不断健康发展,广西壮族自治区产品质量检验研究院组织广东环凯生物科技有限公司等制定《食品安全团体标准 鲜米粉中菌落总数的快速计数法》。广西分析测试协会于 2023 年 2 月组织专家对《鲜米粉中菌落总数的快速计数法》、《鲜米粉中大肠菌群的快速计数法》、《干米粉中霉菌酵母的快速计数法》团体标准进行了立项评审,经审查,上述申报的团体标准符合立项条件,现予立项。

本标准的研究工作历时约半年,历经了三个阶段的研究历程。第一阶段,2023 年,通过检测大量纯菌株和自然污染、人工污染的样品,对方法进行了优化,包括测试片对鲜米粉的适用性和准确度等;第二阶段,完成实验室内和第三方检测机构方法性能指标确认及等共计 3 家实验室间的验证工作。在上述几个阶段工作的基础上,编制完成了《鲜米粉中菌落总数的快速计数法》标准文本(内部讨论稿)和编制说明。第三阶段在广泛征求社会意见的基础上对意见进行最好归纳整理,形成送审稿。经专家审查通过后根据专家组意见对标准送审稿做必要修改,形成标准报批稿和编制说明送广西分析测试协会秘书处。

## 二、 标准编制原则

《鲜米粉中菌落总数的快速计数法》是在科学研究的基础上,结合多家实验室和基层检验人员的检测数据,经过科学研究及实际样品验证而制定的。本标准不仅能填补螺蛳粉行业的空白,提高地方食品安全水平,而且对打破国外技术垄断确保我国食品安全具有很高的应用价值。此标准的文本编写按照 GB/T 1.1—2009《标准化工作导则 第一部分:标准的结构和编写》中的相关规定进行;方法验证和确认技术综合参考 GB 4789.28-2013《食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求》、GB 4789.2-2016《食品微生物学检验 菌落总数测定》SN/T 3266-2012《食品微生物检验方法确认技术规范》、AOAC 食品微生物定性和定量检验方法的确认指南(2002)、ISO 16140:2003 食品和动物饲料微生物学—可替代方法的确认规范、药品微生物检验替代方法验证指导原则。

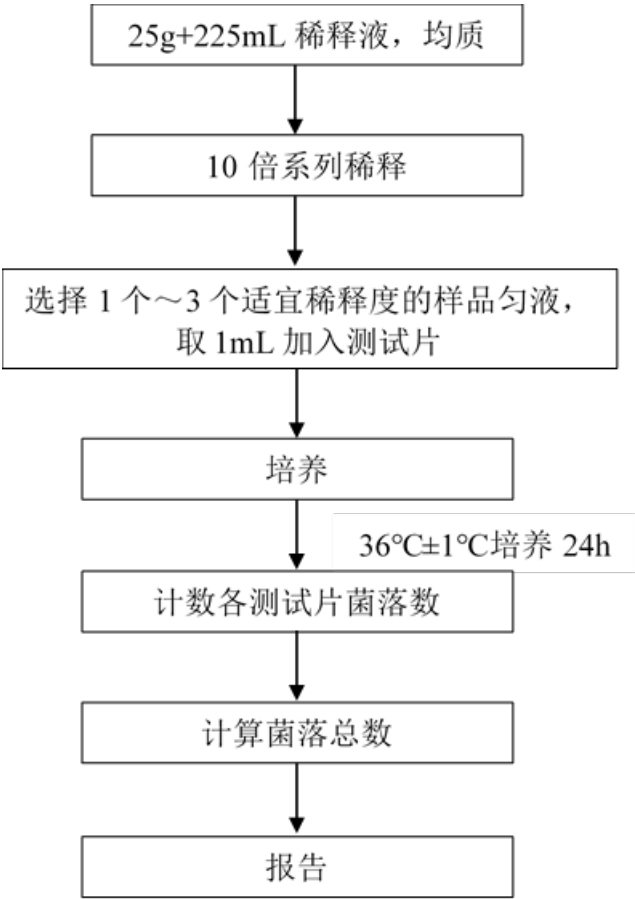
## 三、 主要研究内容

### 1、方法原理

Handy Plate™ 快速菌落总数测试片是含与平板计数琼脂主要成份一致的营养成份、冷水可溶性耐受液化的凝胶、快速显色复合酶底物指示剂,使判读计数更容易快速。

待测样品中的微生物在培养基中生长代谢时生产多种酶，显色底物指示剂被酶解后显色基团释放，当显色基团累积后，信号自然被放大，菌落肉眼可见或菌落计数仪可见并被计数。

3、检验程序：



4、实验室内方法性能指标确认实验

根据 ISO 16140-2:2016 的要求，5 株质控菌在测试片法和平板法计数结果的 log 10 差值在 ±0.5 之内，满足一致性要求。

	接种浓度	PCA (log10)	测试片 (log10)	PCA (log10)-测试片 (log10)
铜绿假单胞菌 CMCC(B)10104	低	1.740363	1.623249	0.117113399
	中	3.198657	3.287802	-0.089144643
	高	5.158362	5.190332	-0.031969206

金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003	低	1.755875	1.672098	0.083777
	中	3.190332	3.20412	-0.01379
	高	5.361728	5.445604	-0.08388
枯草芽孢杆菌 CMCC(B)63501	低	1.690196	1.716003	-0.02581
	中	3.404834	3.324282	0.080551
	高	5.78533	5.633468	0.151861
白色念珠菌 CMCC(B)98003	低	1.477121	1.518514	-0.04139
	中	2.78533	2.819544	-0.03421
	高	5.832509	5.875061	-0.04255
黑曲霉 CMCC(B)98003	低	1.591065	1.643453	-0.05239
	中	3.184691	3.143015	0.041677
	高	5.220108	5.068186	0.151922

选择食品中常见 155 株分离株制作菌悬液并梯度稀释，取适宜浓度进行检测，同时采用国标法做对比。以测试片法检验结果为因变量，以国标法检测结果为自变量进行线性回归分析，计算相关系数  $r^2$ 。快速菌落总数测试片和 PCA 的线性方程： $y=0.9598x - 0.0848$ ，相关系数  $r=0.9922$ ，快速菌落总数测试片方法与国标 PCA 方法两者拟合度良好，说明测试片法的检测结果可以做为国标方法的替代方法。

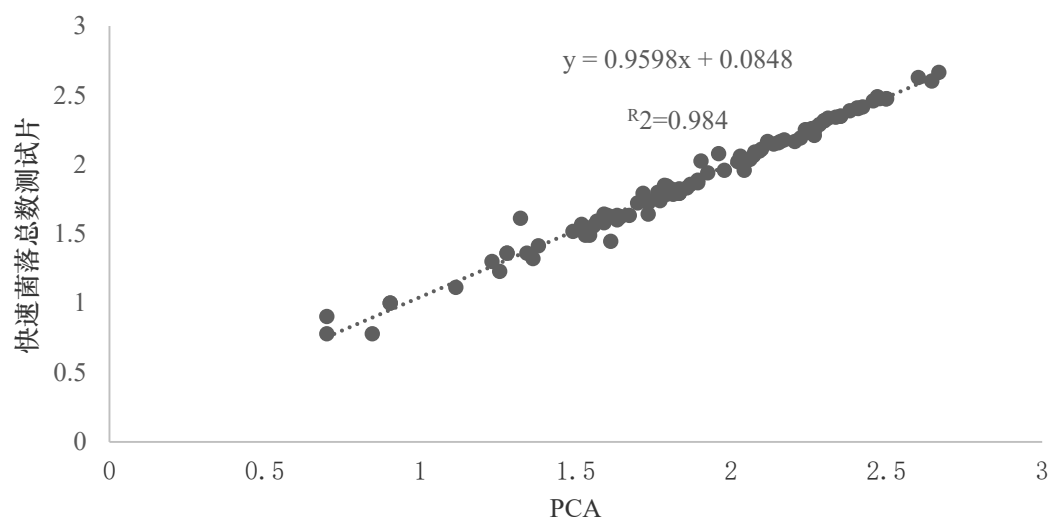
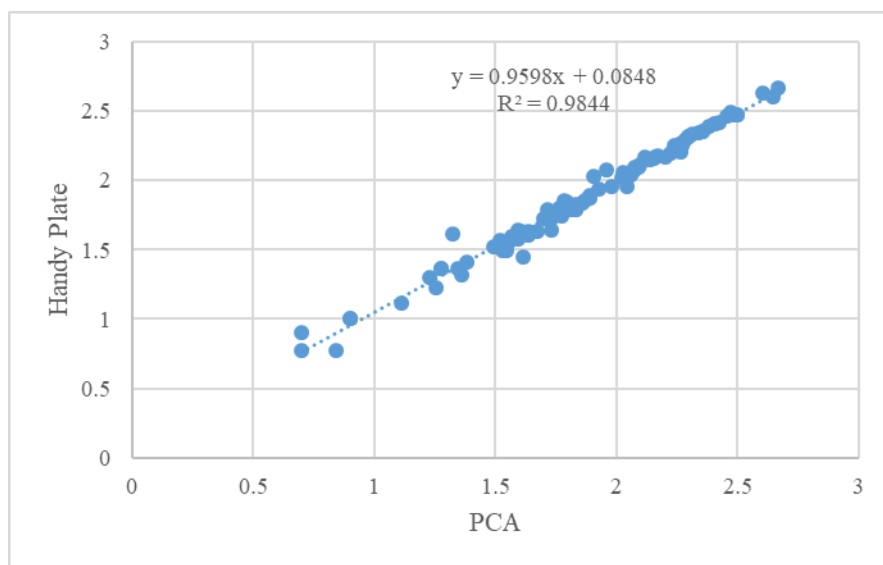


图 1 快速菌落总数测试片纯菌株 (n=155)

鲜米粉测试片法和平板计数琼脂计数结果的  $\log 10$  差值在  $\pm 0.5$  之内，满足一致性要求。测试片法检测更快速，比传统方法缩短 24h 以上。

表 2 测试片法和平板计数琼脂菌落总数检测结果

产品名称	快速菌落总数测试片 24h		平板计数琼脂(PCA)48h		$\lg_{\text{PCA}} - \lg_{\text{测试片}}$
	cfu/25g	log10	cfu	log10	
河粉	1446	3.160168293	2030	3.307496038	0.147327745
米粉	$1.18 \times 10^6$	6.071882007	$1.07 \times 10^6$	6.029383778	-0.04249823

香精香料样品测试片法和国标平板法计数结果的  $\log 10$  差值在  $\pm 0.5$  之内，满足一致性要求。测试片法检测更快速，比传统方法缩短 24h 以上。

表 3 测试片法和国标法香精香料菌落总数检测结果

产品名称	快速菌落总数测试片 24h		平板计数琼脂(PCA)48h		$\lg_{\text{PCA}} - \lg_{\text{测试片}}$
	cfu	log10	cfu	log10	
功夫汁（清香型）	160	2.204119983	210	2.322219295	0.118099312
功夫汁（蜀香型）	210	2.322219295	250	2.397940009	0.075720714
培根香料	4000	3.602059991	4400	3.643452676	0.041392685
梅菜扣肉膏	82000	4.913813852	90000	4.954242509	0.040428657
炒香辣椒粉	65000	4.812913357	66000	4.819543936	0.006630579
红烧牛肉酱	15	1.176091259	28	1.447158031	0.271066772

## 5、实验室间验证结果

### （1）准确度实验

三家验证单位分以相同批次实际样品和有证标准物质（混合菌种，溯源性：CICC24176、CICC23008、CICC10384）配制的样品（菌落总数参考值 670CFU/g，范围值 430-1000CFU/g）作为方法准确度试验样品，采用快速计数法（参照《鲜米粉中菌落总数的快速计数法》）检测其菌落总数浓度的原始测试数据。结果见表 4

表 4 准确度测试数据

实验组号	浓度 (MPN/g)	测定值 (CFU/g)						平均值	标准偏差	相对标准偏差 (%)
		第一次	第二次	第三次	第四次	第五次	第六次			
1 益谱	低浓度 $10 \sim 10^2$	70	60	80	90	60	80	1.86	0.07	3.9
	中浓度 $10^3 \sim 10^4$	6300	7000	7300	6100	7800	7600	3.84	0.04	1.1
	高浓度 $10^5 \sim 10^6$	186000	189000	176000	165000	155000	161000	5.23	0.03	0.7
	参考值: 670	600	790	780	690	620	630	2.83	0.05	1.8
2 益谱	低浓度 $10 \sim 10^2$	60	60	70	80	60	70	1.82	0.05	2.8

	中浓度 $10^3 \sim 10^4$	6500	6800	7500	6400	7400	7000	3.84	0.03	0.7
	高浓度 $10^5 \sim 10^6$	149000	153000	166000	169000	175000	182000	5.22	0.03	0.6
	参考值: 670	650	660	690	690	590	600	2.81	0.03	1.0
3 合创	低浓度 $10 \sim 10^2$	70	70	90	80	70	70	1.87	0.05	2.5
	中浓度 $10^3 \sim 10^4$	8000	6400	7200	6600	7200	7500	3.85	0.04	0.9
	高浓度 $10^5 \sim 10^6$	129000	177000	168000	186000	171000	152000	5.21	0.06	1.1
	参考值: 670	610	820	810	790	630	600	2.85	0.07	2.3
4 合创	低浓度 $10 \sim 10^2$	90	90	50	70	60	70	1.85	0.10	5.4
	中浓度 $10^3 \sim 10^4$	8400	7400	8200	7900	7800	7500	3.90	0.02	0.5
	高浓度 $10^5 \sim 10^6$	129000	167000	188000	176000	151000	132000	5.19	0.07	1.3
	参考值: 670	710	780	770	790	720	740	2.88	0.02	0.7
5 速竞	低浓度 $10 \sim 10^2$	50	60	80	70	40	90	1.8	0.13	7.3
	中浓度 $10^3 \sim 10^4$	6250	6500	6300	7000	5600	6900	3.8	0.04	0.9
	高浓度 $10^5 \sim 10^6$	125000	132000	124000	179000	138000	135000	5.1	0.06	1.1
	参考值: 670	520	660	670	820	760	720	2.8	0.07	2.4
6 速竞	低浓度 $10 \sim 10^2$	50	90	100	40	50	70	1.8	0.16	8.8
	中浓度 $10^3 \sim 10^4$	6600	7200	7500	5900	8000	7400	3.8	0.05	1.2
	高浓度 $10^5 \sim 10^6$	166000	159000	146000	145000	151000	171000	5.2	0.03	0.6
	参考值: 670	500	530	580	620	680	670	2.8	0.05	2.0

注：平均值、标准偏差、相对标准偏差为原始数据以 10 为底，对数转化后计算所得。

## （2）正确度实验

表 5 为广西区内三家验证单位以有证标准物质（混合菌种，溯源性：CICC24176、CICC23008、CICC10384）配制的样品（菌落总数参考值 670CFU/g，范围值 430-1000CFU/g）作为方法正确度试验样品，采用快速计数法（参照《鲜

米粉中菌落总数的快速计数法》) 检测其菌落总数的原始测试数据。

表 5 正确度测试数据

实验组号	测定值 (CFU/g)						平均 值	配制样品		相对 误差 (%)
	第 一	第二次	第三次	第四次	第五次	第六次		参考值 (CFU/g)	对数 值	
1 益谱	600	790	780	690	620	630	2.83	670	2.83	0.0
2 益谱	650	660	690	690	590	600	2.81			0.7
3 合创	610	820	810	790	630	600	2.85	670	2.83	0.7
4 合创	710	780	770	790	720	740	2.88			1.8
5 速竞	520	660	670	820	760	720	2.84	670	2.83	0.35
6 速竞	500	530	580	620	680	670	2.77			2.1

注：平均值、配制样品对数值、相对误差为原始数据以 10 为底，对数转化后计算所得。

表 6 有证标准物质配制的样品测试数据汇总表

实验组号	有证标准物质配制的样品			相对误差（%）
	测定值平均值	参考值（CFU/g）	参考值对数	
1 益谱	2.83	670	2.83	0.0
2 益谱	2.81			0.7
3 合创	2.85	670	2.83	0.7
4 合创	2.88			1.8
5 速竞	2.84	670	2.83	0.35
6 速竞	2.77			2.1
实验室内相对误差范围（%）	0.0-2.1			
相对误差的标准偏差	1.32			

注：表中各项数据均为原始数据以 10 为底，对数转化后计算所得。

(3) 精密度实验

三家验证单位方法验证结果精密度的统计分析。其结果如表 7。

表 7 精密度测试数据汇总表

实验组号	低浓度	中浓度	高浓度	有证标准物质 配制的样品
------	-----	-----	-----	-----------------



	平均 值	标准 偏差	相对 标准 偏差 (%)	平均 值	标准 偏差	相对 标准 偏差 (%)	平均 值	标准 偏差	相对 标准 偏差 (%)	平均 值	标准 偏差	相对 标准 偏差 (%)
1 益谱	1.86	0.07	3.9	3.84	0.04	1.1	5.23	0.03	0.7	2.83	0.05	1.8
2 益谱	1.82	0.05	2.8	3.84	0.03	0.7	5.22	0.03	0.6	2.81	0.03	1.0
3 合创	1.87	0.05	2.5	3.85	0.04	0.9	5.21	0.06	1.1	2.85	0.07	2.3
4 合创	1.85	0.10	5.4	3.90	0.02	0.5	5.19	0.07	1.3	2.88	0.02	0.7
5 速竞	1.8	0.13	7.3	3.8	0.04	0.9	5.1	0.06	1.1	2.8	0.07	2.4
6 速竞	1.8	0.16	8.8	3.8	0.05	1.2	5.2	0.03	0.6	2.8	0.05	2.0
总平均值	1.83			3.84			5.19			2.83		
实验室内相对 标准偏差范围	2.5-8.8			0.5-1.2			0.6-1.3			0.7-2.4		

注：表中各项数据均为原始数据以 10 为底，对数转化后计算所得。

按 HJ 168-2020《环境监测分析方法标准制订技术导则》、《RB/T 033-2020》微生物检测方法确认与验证指南的方法和要求，制定本方法验标技术方案，采用《鲜米粉中大肠菌群的快速计数法》草案开展验证工作。方法的精密度、准确度是评价方法水平的主要技术指标，经方法验证，结果如下：

（1）3 家实验室 6 个实验组参与了方法验证工作，在进行方法验证报告数据统计时，所有数据全部采用，未进行取舍。

（2）方法精密度：3 家实验室 6 个实验组分别对低、中、高三个浓度的实际样品及有证标准物质配制的样品进行了 6 次重复测定：实验室内相对标准偏差范围分别为 2.5-8.8%，0.5-1.2%，0.6-1.3%，0.7-2.4%。

（3）方法正确度：3 家实验室 6 个实验组分别对有证标准物质配制的样品进行了 6 次重复测定：实验室内的相对误差范围为 0.0-2.1%。

#### 四、相关现行法律、法规和强制性行业标准的关系

目前关于菌落总数检测的标准主要是：《GB 4789.2-2022 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数的测定》、ISO 4833-1:2013 MICROBIOLOGY OF THE FOOD CHAIN — HORIZONTAL METHOD FOR THE ENUMERATION OF MICROORGANISMS — PART 1: COLONY COUNT AT 30 ° C BY THE POUR PLATE TECHNIQUE、ISO 4833-2:2013 MICROBIOLOGY OF THE FOOD CHAIN — HORIZONTAL METHOD FOR THE ENUMERATION OF MICROORGANISMS — PART 2: COLONY COUNT AT 30 ° C BY THE

SURFACE PLATING TECHNIQUE、美国 FDA 的《Bacteriological Analytical Manual Chapter 3: Aerobic Plate Count》、SN/T 0168-2015 《进出口食品中菌落总数计数方法》，这些标准采用传统平板法，方法的准确性相对较高，数据的重现性较好。其检测周期为 2-3 d，花费的时间较长，检测结果具有滞后性，待样品中污染的数量搞清楚后，一些损失已经无法挽回。且培养基准备繁琐，需要较高的专业技能和配套仪器设备。新国标纳入测试片法，但只对主要成份，质量要求和操作进行简单描述，没有具体的适用性指导。SN/T 4544.1-2016 《商品化试剂盒检测方法 菌落总数 方法一》适于肉类、鱼类和海产品、水果和蔬菜制品、乳制品和杂菌等的菌落总数测定，需要 48-72h；SN/T 4544.2-2022 《商品化试剂盒检测方法 菌落总数 方法二》、T/CGCC 58-2021 《食品中菌落总数的快速测定测试片法》均为国外品牌测试片只针对部分代表性样品进行了验证。

本标准为首次制定，发布实施后将填补我国鲜米粉行业菌落总数快速检测技术的空白。

## 五、 行业标准做为强制性或推荐性团体标准的建议

建议做为推荐性团体标准。

## 六、 贯彻团体标准的要求和措施建议

目前鲜米粉行业对菌落总数检测的重视度不够，没有针对性的标准指导，采用通用性的食品安全国家标准得到的结果具有滞后性，一旦出现问题将无法弥补损失。而且对基层单位人员、技术、设施设备要求较高。因此，建议相关部门加强鲜米粉菌落总数检测相关政策的要求，推广简便适用的快速检测相关技术，实现快速、准确的监测鲜米粉生产、运输、储藏时期的菌落总数污染状况，预测预报危害（毒素产生、超标）的发生，从而减少经济损失，保障人民食品安全。

## 七、 废止现行有关标准的建议

无。

## 八、 其他应予说明的情况

无。

