

团体标准

T/CIFST XXX-20XX

食品中商业无菌快速检测方法 呼吸信号法（BACT/ALERT 3D）

Rapid test method of commercial sterilization in food-Respiration based signal method
(BACT/ALERT 3D)

（征求意见稿）

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

中国食品科学技术学会 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》给出的规则起草。

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义务。

本文件由中国食品科学技术学会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

食品中商业无菌快速检测方法

呼吸信号法（BACT/ALERT 3D）

1 范围

本文件规定了基于呼吸信号法（BACT/ALERT 3D）的原理对食品及其原料、半成品和生产环境中的商业无菌检测方法。

本文件适用于食品及其原料、半成品和生产环境中的商业无菌检测快速筛查。

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 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物检验 总则

GB 4789.26-2023 食品安全国家标准 食品微生物检验 商业无菌检验

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 方法原理

BACT/ALERT 3D 微生物培养监测系统利用比色传感器和反射光，监测培养瓶在培养过程中产生的二氧化碳（CO₂）情况，判定样品是否符合商业无菌要求。如果样品中存在微生物，生产代谢过程中产生 CO₂，使培养瓶底部的传感器发生颜色改变。仪器对接种了样品的培养瓶进行孵育，每隔 10 min 对瓶底颜色进行检测，与培养瓶底部初始颜色进行比对，在指定的天数内，若培养瓶底部颜色发生明显变化，代表 CO₂ 水平显著改变，说明样品中有微生物生长，判定为阳性。反之，若瓶底颜色未有明显变化，代表 CO₂ 水平无显著改变，说明样品中无微生物生长，则判定为阴性。

4 设备和材料

- 4.1 bioMerieux BACT/ALERT 3D 微生物培养监测系统。
- 4.2 pH 计或精密 pH 试纸：精密度 0.1。
- 4.3 冰箱：2℃~5℃。
- 4.4 一次性无菌注射器：20 mL。
- 4.5 均质器及无菌均质袋、均质杯或研钵。
- 4.6 75%酒精棉球或棉片。
- 4.7 显微镜物镜：10×~100×。
- 4.8 罐头打孔器或容器开启器。
- 4.9 一次性无菌手套。

5 培养基和试剂

除特别说明外，仅使用分析纯或生化试剂，实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水。

- 5.1 iAST 工业用低酸需氧培养瓶。
- 5.2 iNST 工业用低酸厌氧培养瓶。
- 5.3 iLYM 工业用酸性需氧培养瓶。
- 5.4 iFA plus 工业用聚合吸附物中和需氧瓶。
- 5.5 75%乙醇溶液：分别量取 75 mL 无水乙醇和 25 mL 水，混合均匀后备用。

5.6 革兰氏染色液：见 GB 4789.26-2023 附录 A 中 A.10。

6 培养瓶的选择与确认

- 6.1 pH 的测定，测定方法参照 GB 4789.26-2023 中的 5.2.6，根据测得的结果选择适宜的培养瓶。
- 6.2 选择培养瓶，pH 大于或等于 4.6 的样品选择 iAST 工业用低酸需氧培养瓶，pH 小于 4.6 的样品选择 iLYM 工业用酸性需氧培养瓶，含茶或者咖啡等抑菌物质的样品选择 iFA plus 工业用聚合吸附物中和需氧瓶。
- 6.3 培养瓶的准备，肉眼确认培养瓶应为包装完整，内容物清澈的状态。用 75%酒精棉球或棉片消毒培养瓶胶塞。
- 6.4 感官检查，检查方法按照 GB 4789.26-2023 中的 5.2.5 进行。

7. 检验程序

食品中商业无菌快速检测方法 BACT/ALERT 3D 呼吸信号法检测流程参见图 1。

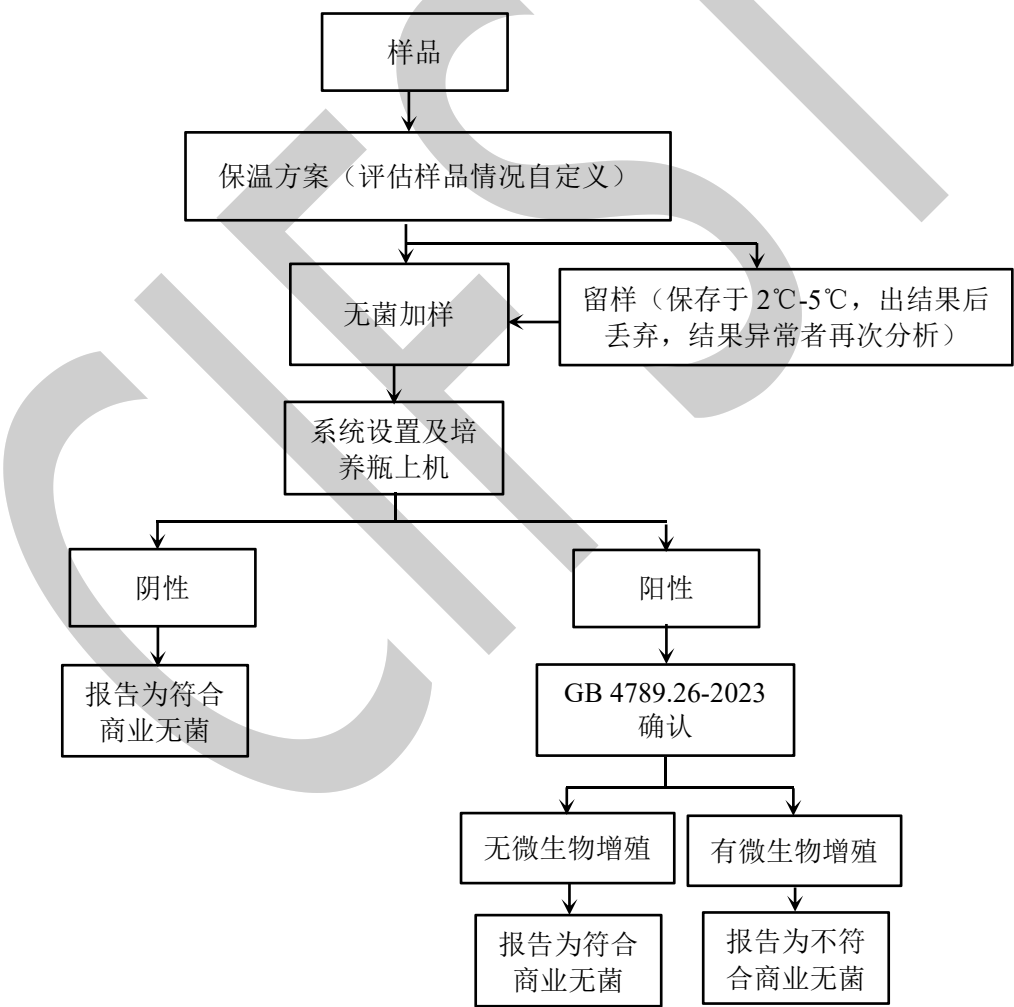


图 1 食品中商业无菌快速检测方法 BACT/ALERT 3D 呼吸信号法检测流程

8 操作步骤

8.1 样本的处理

8.1.1 保温，需要预估待测样品中的初始菌量以及样品基质对微生物生长是支持还是抑制，对于适宜微生物生长的基质可以选择适当保温孵育方案，当样品中微生物浓度可以达到 1 CFU/测试量（如 10mL~20 mL）的时候即可上机测试，经过对产品中微生物的生长特性做出合理判定预估后，自行制定适合的增菌方案，如 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，36 h~48 h。

8.1.2 样品的处理用 75%酒精棉球擦拭试样外包装。

8.1.3 包装饮用水或者生产过程用水等需要大取样量的样本可用滤膜法来操作。

8.2 无菌加样

8.2.1 用无菌注射器从食品包装容器抽取 10 mL~20 mL 样本，在无菌条件下接种至对应培养瓶。若内容物无法吸取，则无菌称取 20 g 样品于灭菌研钵内捣碎，小心打开培养瓶封口，取 10 g 加入培养瓶。经滤膜法处理后的滤膜也可放入相应培养瓶，培养瓶在无菌条件下开盖操作后，换用新置换盖，待上机测试。

8.2.2 加完试样后，应在培养瓶上注明样品编号。

8.3 留样

加样后，将取完试样的样本密封好，做好标记，保存于冰箱中。待该批样本检验得出结果后方可丢弃。

8.4 BACT/ALERT 3D 微生物检测系统操作与设置

8.4.1 孵育温度及检测时间设置

8.4.1.1 调节仪器处于正常工作状态，并按检测类型设定好孵育温度和最大检测时间。酸性或酸化食品设定孵育温度为 $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，低酸性食品设定孵育温度为 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，最大检测时间为 5 d。

8.4.1.2 校正模块温度。

8.4.1.3 选择装有抽屉的孵育或组合模块，设置检测所需的温度，并保存温度设定。

8.4.1.4 按下设定最大检测时间按钮，进入设定最大时间屏幕。

8.4.1.5 选择相应种类的培养瓶，使用孵育时间滚动按钮以 1 d 为单位，设定孵育期，可设定的最小检测时间为 0.1 d，按检测需求选择好相应的最大时间，保存最大检测时间设定，或者将系统返回到先前设定的最大检测时间。

8.4.1.6 按以上步骤设定每种待测样品的最大检测时间，系统最大检测时间为 5 d，企业可以根据实际需求来设定最长检测时间。

8.4.2 加载培养瓶

进入微生物检测系统加载培养瓶界面，打开孵育抽屉，用条码扫描仪读取每个培养瓶的信息。然后把培养瓶分别插入有照明灯的单元，先插入传感器，单元指示器缓慢闪烁，确认培养瓶已经加载。加载完毕所有培养瓶，轻轻关闭抽屉，然后按下确认按钮。

8.4.3 培养瓶结果数据读取和卸载

微生物检测系统对培养瓶进行孵育并自动检测，当仪器检测到阳性瓶后，电脑会报警提醒操作者，可进入仪器的浏览和打印界面，记录阳性瓶的读数和标记，然后按仪器操作说明卸载阳性培养瓶。当孵育时间达到设定的最大检测时间，若培养瓶中无微生物生长，则仪器会给出阴性的结果，记录阴性瓶的读数和标记，然后按仪器操作说明卸载阴性培养瓶。

8.4.4 浏览和打印试验数据

试验过程中可进入培养瓶读数绘图屏幕，观察试验情况。试验完毕后，选择进入报告屏幕，打印报告。

8.5 阳性瓶结果的验证

8.5.1 对仪器分析结果为阳性的试样，将留样按 GB 4789.26-2023（显微镜，染色试剂加在前面）中 6.2.7~6.2.8 进行涂片和接种试验并记录。

8.5.2 将阳性培养瓶打开，按 GB 4789.26-2023 中附录 B 要求接种培养进行试验并记录。

9 结果判定与报告

9.1 仪器分析结果为阴性，感官检查、pH 测定正常，则报告为商业无菌。

9.2 仪器分析结果为阳性，经过验证试验无微生物增殖现象，则报告为商业无菌。

9.3 仪器分析结果为阳性，经过验证试验有微生物增殖现象，则报告为非商业无菌。

10 质量控制

10.1 应按照 GB 4789.1 的规定由具备资格的微生物检验人员执行检测工作。

10.2 检验人员应观察 BACT/ALERT 3D 微生物检测系统自动质量控制的单元状态，对未通过质量控制的单元，依次使用校正试剂盒中的标准序号 1、2、3、4 对单元进行校正，可由专业人员来进行校正。