农业行业标准

《生乳及巴氏杀菌乳中嗜冷菌的测定 快速培养法》

（公开征求意见稿）

编制说明

XXXX
XXXX
XXXX
XXXX

一、工作简况

（一）任务来源

2022 年 10 月，XXXX 完成了《生乳及巴氏杀菌乳中嗜冷菌的测定 快速培养法》标准草案和项目建议书等书面材料，向全国畜牧业标准化技术委员会提出申报。2023 年 3 月，农业农村部以《农业农村部农产品质量安全监管司关于下达 2023 年农业国家标准和行业标准制修订项目计划的通知》（农质标函〔2023〕51 号）批准项目立项，项目计划编号：农质标函〔2023〕51 号 NYB-23049，标准起草单位为 XXXX、XXXX、XXXX、XXXX、XXXX、XXXX，首席专家是 XXX。

（二）制定背景

牛奶被称为“白色血液”，含有乳铁蛋白、维生素、氨基酸、脂肪酸、钙等多种易被人体吸收的物质，具有良好的营养价值，同时也成为适宜微生物生长的优良培养基。为了控制微生物污染，热加工处理和低温储存技术被广泛应用。但随着低温储存和冷链技术在生乳保存和运输中的应用，以乳酸菌为代表的嗜温菌数量大大减少，嗜冷微生物逐渐成为主要微生物，导致生乳中微生物菌群结构变化。

嗜冷微生物通常被定义为最适生长温度在 15℃左右，最高生长温度低于 20℃，最低生长温度为 0℃左右的微生物，广泛分布于土壤、水、空气中等。大量研究表明，生乳中最常见的嗜冷微生物是假单胞菌属（*Pseudomonas*），其次是寡养单胞菌属（*Stenotrophomonas*）、不动杆菌属（*Acinetobacter*）和乳球菌属

（*Lactococcus*）等。在低温环境下，嗜冷菌通过调节细胞膜的流动性、产生抗冻蛋白、冷休克蛋白、冷活性酶等4种途径，保持自身在低温下的活性，引起乳及乳制品在低温下的腐败现象。嗜冷芽孢杆菌（*Bacillus*）还有可能在生乳中形成孢子，在巴氏杀菌或超高温瞬时杀菌（Ultra - High Temperature Instantaneous Sterilization，UHT）等热处理后存活，在萌发后形成营养细胞，且可能产生对人体有害的毒素。研究发现，乳中存在由嗜冷菌产生的低温下具有活性的蛋白酶和脂肪酶，并且这种酶即使经过热处理后仍保持部分活性，在乳及乳制品贮藏过程中分解蛋白质和脂肪，导致产生沉淀、异味、老化凝胶、油脂分离等腐败现象，影响产品的货架期。

平板培养法是确定微生物计数的“金标准”方法。国际标准化组织（International Organization for Standardization，ISO）颁布修订标准ISO 17410《食品链微生物学 嗜冷微生物计数的平行方法》，其2019版将之前使用的6.5 ℃需氧培养10 d（平板倾注）修改为6.5 ℃需氧培养10 d（平板涂布），并在附件中列入源于ISO 8552:2004|IDF 132:2004《乳 21℃嗜冷微生物计数法（快速法）》的快速方法，用于预估生乳和巴氏杀菌乳中嗜冷微生物数量。与我国农业行业标准NY/T 1331—2007《乳与乳制品中嗜冷菌、需氧芽孢和嗜热需氧芽孢数的测定》中规定的6.5℃需氧培养10 d（平板倾注）相比，快速方法仅需要25 h，极大的缩短了培养时间。为对ISO 17410:2019进行引用，本标准对ISO 17410:2019中提出的嗜冷微生物培养方法进行了验证，为降低由嗜冷微生物造成的乳及乳制品腐

败提供技术支撑。

（三）起草过程

第一阶段：起草阶段

1）成立起草组

在接到标准制定任务后，2023 年 3 月成立了标准起草组，包括 XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX 等共 9 人，见表 1。2023 年 4 月，围绕嗜冷菌快速检测方法，制定了详细的实施方案和技术路线。

表 1 标准起草组成员及分工

序号	姓名	单位	分工
1	XXX	XXXX	整体方案设计，组织协调
2	XXX	XXXX	标准征求意见、方法验证
3	XXX	XXXX	方法优化、材料完善
4	XXX	XXXX	方法优化、标准文本撰写
5	XXX	XXXX	方法验证、材料完善
6	XXX	XXXX	方法验证、材料完善
7	XXX	XXXX	材料检查修改
8	XXX	XXXX	材料检查修改
9	XXX	XXXX	材料检查修改

2）收集和分析相关参考文献

2023 年 4 月到 6 月，收集到如下国内国外相关法律法规、标准、书、文章、为标准起草提供了参考。

ISO 17410:2019 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms

NY/T 1331—2007 乳与乳制品中嗜冷菌、需氧芽孢及嗜热需氧芽孢数的测定

SN/T 2552.4—2010 乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第 4 部

分：嗜冷微生物菌落计数

OLIVERIAl J.S., PARMELEE C.E. Rapid Enumeration of Psychrotrophic Bacteria in Raw and Pasteurized Milk. J Milk Food Techno, 1976,39: 269-272.

王克新, 房玉国, 张丽宏. 液体乳中嗜冷菌数的测定. 中国乳品工业, 2001,29:31-32.

吉玲. 生鲜乳中嗜冷菌检验的两种培养条件比较. 中国乳品工业, 2020,48:55-57.

由于本文件涉及的内容在国际组织已经具有成熟的研究基础，考虑到我国奶业发展现状以及与国际组织有效接轨，标准起草组首先查阅了以上相关参考文献，认为 ISO 17410:2019 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms 中附录 B 内容对起草本标准具有引用价值。

3）翻译工作，确证方法

2023 年 6 月到 7 月，起草组对 ISO 17410:2019《Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms》进行翻译。

2023 年 7 月—2024 年 5 月，标准起草组依据《食品安全国家标准 微生物检验方法验证通则》（GB/T 4789.45—2023）和《微生物检测方法确认与验证指南》（RB/T 033—2020）确立方法相对正确度、准确度，并对实际样品进行检测与分析等。

4）试验验证情况

2024 年 6 月，委托新疆农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、唐山市农产品质量安全检验检测中心、农业农村部乳品质量

检验测试中心（北京）等三家检测机构对方法的检测准确度进行复核验证实验。验证结果表明，该方法实用有效。

5）形成标准征求意见稿

在以上收集和分析相关参考文献，调研、试验验证工作的基础上，起草组按照 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》和 GB/T 1.2—2020《标准化工作导则 第 2 部分：以 ISO/IEC 标准化文件为基础的标准化文件起草规则》的规定起草编写标准文本内容和编制说明内容，并组织开展 5 次专家讨论会。

2023 年 12 月 16 日，XXXX 组织内部讨论会，XXX、XXX、XXX、XXX、XXX 等 6 人讨论了标准的框架和验证方法。

2024 年 3 月 30 日，中国农业科学院北京畜牧兽医研究所组织内部讨论会，XXX、XXX、XXX、XXX、XXX 等 8 人讨论了方法相对正确度、准确度。

2024 年 5 月 25 日，XXXX 召开讨论会，会议邀请了中国绿色食品发展中心、河南省农业农村厅、中国农业大学、北京市农林科学院畜牧兽医研究所、山西农业大学、河北省现代农业产业技术体系奶牛创新团队、青岛农业大学等单位相关专家对标准的文本框架、编制说明进行了讨论。

2024 年 8 月 17 日，XXXX 组织内部讨论会，XXX、XXX、XXX、XXX、XXX 等 7 人讨论了答复意见及文本修改。

2024 年 8 月 24 日，XXXX 组织召开线下会议，中国绿色食品发展中心、兰州大学、中国农业大学、北京农学院动物科学技术学院、农业农村部农产品质量安全中心、中国农业科学院、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所等单位相关专家对文本和编制说明进行

重新修改和完善。

第二阶段：定向征求意见阶段

2024年7月，在全国范围内遴选了20个科研院校、技术推广检测技术等领域单位及专家、有针对性地进行标准定向征求意见。征求意见的单位见表2，不同领域单位类型情况见表3。

表2征求意见单位名单

序号	单位名称	备注
1	农业农村部乳品质量检验测试中心（北京）	/
2	农业农村部乳品质检中心	/
3	唐山市农产品质量安全检验检测中心	/
4	中国农业大学	/
5	广东省农业科学院动物科学研究所	/
6	中优乳奶业研究院（天津）有限公司	/
7	河南科技大学	/
8	农业农村部乳品质量检验测试中心（哈尔滨）	/
9	新疆农业大学	/
10	内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司	/
11	内蒙古自治区农牧业科学院	/
12	福建长富乳品有限公司	/
13	青岛农业大学	/
14	河南农业大学	/
15	西北农林科技大学	/
16	新疆农科院农业质量标准与检测技术研究所	/
17	山东省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所	/
18	新疆大学生命科学与技术学院	/
19	全国畜牧局总站	/
20	安徽农业大学	/

表3不同领域单位类型情况

序号	单位类型	单位数量
1	教学机构	3
2	科研机构	4

3	技术推广机构	10
4	生产企业	3

收到20家单位及专家回函，回函20家，共有64条意见。经过研究和甄别，采纳37条意见，不采纳20条意见，部分采纳7条意见，并经过对征求意见稿进行修改完善，形成标准预审稿。

第三阶段：预审阶段

2024年11月21日，标准起草组组织召开了标准预审会，邀请郑小平、郑百芹、李俊玲、许文涛、单吉浩、牟玉莲、许晓敏7位专家，对标准预审稿进行了认真审查。在听取标准起草组汇报的基础上，专家组审查了标准文本及编制说明，提出如下主要修改意见：一是建议将标准名称修改为“生乳及巴氏杀菌乳中嗜冷菌的测定 快速培养法”；二是删除术语和定义；三是编制说明中补充6.5℃和21℃培养方法的特性；四是按GB/T 1.1和GB/T 1.2的要求进一步规范标准文本。专家组一致同意审查通过，建议标准起草组按照上述意见进一步修改后形成《生乳及巴氏杀菌乳中嗜冷菌的测定 快速培养法》（公开征求意见稿），报全国畜牧业标准化技术委员会秘书处。预审意见汇总处理表附件1。

第四阶段 公开征求意见阶段

二、标准编制原则、主要内容及其确定依据

（一）标准编制原则

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，同时遵循以下原则：

（1）政策性：制定本文件直接关系到国家和广大人民群众的利益。因此，在制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法规和规

章。

（2）先进性：对本文件中有关内容的确定，力求反映本研究领域的国内外先进技术和经验，使标准中所规定的技术内容有利于乳及乳制品中嗜冷菌的控制。

（3）规范性：在本文件征求意见稿的编制过程中力求做到技术内容的叙述正确无误，文字表达准确和简明易懂，标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑。

（4）可操作性：可操作性是制定标准的必备因素，因此，在制定标准的过程中，始终把经济实用和可操作性作为重要的依据，以便在执行中容易操作。

（二）主要内容及其确定依据

1. 主要验证情况说明

1.1 样品来源

2023年6月至2024年8月，标准起草组采集了我国北京、浙江、宁夏、福建、新疆等地乳品加工厂的奶罐车采集生牛乳共85份，陕西乳品加工厂的奶罐车采集生山羊乳样品14个，甘肃采集生绵羊乳样品30个，新疆采集生驴乳和生骆驼乳各11个，西藏采集生牦牛乳8个，冷藏条件下带回实验室，于12 h内完成试验。巴氏杀菌乳共16份，10份购自北京的超市，6份为本实验室储藏样品，于12 h内完成试验。用于制备人工污染样品的UHT乳购自北京的超市，在保质期内完成试验。

1.2 培养基和稀释液

乳平板计数琼脂（milk plate count agar，MPC），北京陆桥；

0.85%无菌生理盐水，北京陆桥。

1.3 相对正确度

相对正确度是参考方法的结果与待确认方法的结果之间的比较研究，使用Bland-Altman方法进行分析。

对所采集的生牛乳样品用两种条件进行培养后分别计数，计算嗜冷微生物浓度，以对数值表示，其中两种方法的差值用d表示。结果显示，21℃培养与6.5℃培养结果不完全一致，但Bland-Altman方法分析表明21℃培养结果可用于预估生乳和巴氏杀菌乳中嗜冷菌数量（表4）。

表 4 生乳样品嗜冷微生物计数

样品	6.5℃	21℃	d	样品	6.5℃	21℃	d	样品	6.5℃	21℃	d
1	3.46	3.18	0.28	30	3.64	3.15	0.50	59	4.84	3.77	1.07
2	3.15	3.04	0.11	31	3.11	3.11	0.00	60	5.08	3.91	1.17
3	4.04	3.26	0.78	32	4.08	2.85	1.23	61	4.81	3.83	0.99
4	3.91	3.32	0.59	33	6.93	6.11	0.82	62	5.00	3.65	1.34
5	4.08	3.30	0.78	34	5.04	3.81	1.23	63	5.11	3.93	1.18
6	3.93	3.18	0.75	35	6.11	3.90	2.21	64	5.04	3.83	1.21
7	4.00	3.43	0.57	36	5.15	3.68	1.46	65	4.86	3.73	1.13
8	4.04	3.94	0.10	37	4.77	3.76	1.01	66	5.08	3.73	1.35
9	3.96	3.46	0.50	38	5.18	3.97	1.20	67	5.00	3.77	1.23
10	4.08	3.04	1.04	39	5.04	3.76	1.29	68	4.08	4.04	0.04
11	3.92	3.36	0.56	40	5.04	3.85	1.20	69	3.26	3.34	-0.09
12	3.32	2.97	0.35	41	5.40	3.62	1.77	70	3.85	3.34	0.50
13	4.28	3.45	0.83	42	5.20	3.67	1.53	71	3.80	3.45	0.35
14	4.15	3.59	0.56	43	5.23	3.66	1.57	72	4.78	4.30	0.48
15	4.36	4.23	0.13	44	5.04	3.81	1.24	73	3.48	2.66	0.81
16	4.52	3.32	1.20	45	5.18	3.91	1.27	74	5.58	4.48	1.10
17	3.82	3.91	-0.09	46	5.84	3.71	2.13	75	3.34	2.36	0.98
18	3.70	3.45	0.25	47	5.26	3.60	1.65	76	4.11	3.28	0.84
19	3.63	3.15	0.48	48	5.08	3.74	1.34	77	4.00	3.78	0.22
20	3.28	3.18	0.10	49	5.20	3.82	1.38	78	5.08	4.30	0.78

21	3.65	3.43	0.22	50	5.15	3.74	1.41	79	4.30	3.30	1.00
22	3.87	3.08	0.79	51	5.11	3.76	1.36	80	4.00	3.60	0.40
23	3.34	3.15	0.19	52	5.28	3.52	1.76	81	5.00	4.18	0.82
24	4.00	3.15	0.85	53	4.89	3.82	1.07	82	4.81	4.20	0.60
25	3.67	3.23	0.44	54	5.00	3.67	1.33	83	2.89	2.85	0.05
26	3.18	2.60	0.58	55	5.08	3.84	1.24	84	3.28	3.34	-0.06
27	4.30	4.23	0.07	56	5.04	3.93	1.11	85	4.59	3.49	1.10
28	3.70	3.08	0.62	57	5.15	3.70	1.45	平均值	4.44	3.58	0.85
29	3.41	3.11	0.30	58	5.04	3.85	1.20	/	/	/	/

结果显示，6.5℃计数法结果的平均值为4.44 $\log_{10}$，最大值为6.93 $\log_{10}$，为样品33；最小值为2.89 $\log_{10}$，为样品83；结果中位数为4.36 $\log_{10}$，为样品15。21℃计数法结果的平均值为3.58 $\log_{10}$，最大值为6.11 $\log_{10}$，为样品33；最小值为2.36 $\log_{10}$，为样品75；结果中位数为3.65 $\log_{10}$，为样品62。两种方法差值d的平均值为0.85 $\log_{10}$，最大值为2.21 $\log_{10}$，为样品35；最小值为-0.09 $\log_{10}$，为样品17和样品69；中位数为0.84 $\log_{10}$，为样品76。

通过SAS 9.4对数据进行分析，差值d的分布服从正态分布，$P = 0.0675 > 0.05$（零假设为“服从正态分布”，$P > 0.05$，应接受零假设，即差值d分布服从正态分布），可以使用Bland-Altman方法分析两种方法的一致性。Bland-Altman分析结果显示（图1），两种方法的偏倚为0.85 $\log_{10}$，其95%置信区间上限为1.89 $\log_{10}$，下限为-0.18 $\log_{10}$，仅2个（2/85，2.35%）数据位于95%置信区间范围外，绝大多数差值都位于偏倚的95%置信区间内，因此可以认为两种培养方法的结果具有较好的一致性，两种方法在实际生产中检测生乳中嗜冷微生物数量时可以互相替代使用。

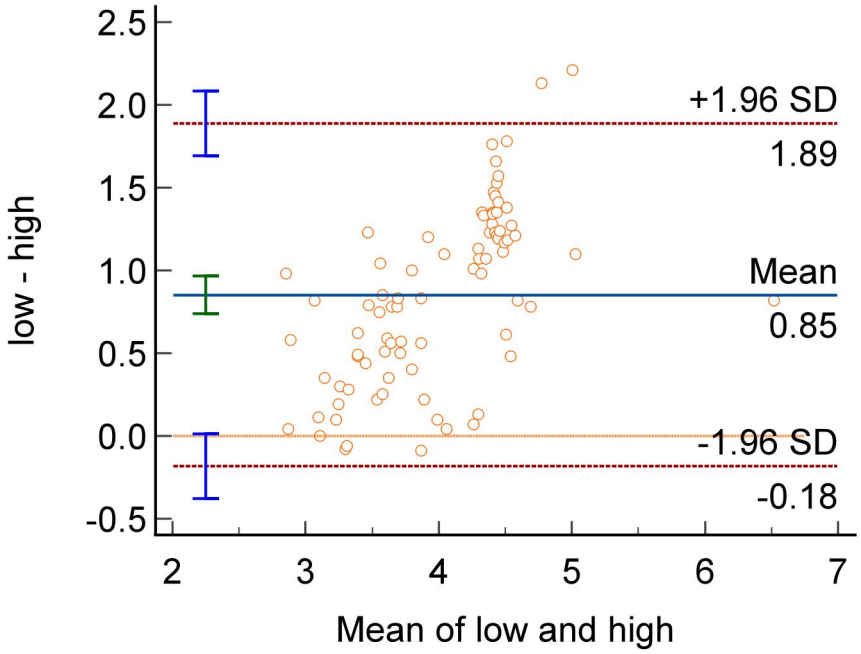

图 1 生乳样品 6.5℃计数法和 21℃计数法的 Bland-Altman 分析

注：low 表示 6.5℃计数法，high 表示 21℃计数法，Mean 为差值 d 的平均值，1.96 SD 为 1.96 倍差值标准差。横轴 x 表示两种方法测量每个样品的平均值，纵轴 y 表示两种方法测量每个样品的差值。

对所采集的生山羊乳样品用两种条件进行培养后分别计数，计算嗜冷微生物浓度，以对数值表示，其中两种方法的差值用d表示。结果见表5。

表 5 生山羊乳样品嗜冷微生物计数

样品	6.5℃	21℃	d
1	7.78	6.81	0.97
2	7.30	7.15	0.15
3	7.70	5.57	2.13
4	7.00	6.48	0.52
5	7.00	6.43	0.57
6	7.70	6.87	0.83
7	6.26	6.00	0.26
8	7.70	7.04	0.66
9	6.90	6.89	0.01
10	7.00	6.59	0.41
11	7.30	6.92	0.38
12	7.00	6.72	0.28
13	7.48	7.04	0.44

14	7.18	6.28	0.90
平均值	7.23	6.63	0.61

结果显示，6.5℃计数法结果的平均值为7.23 log_{10}，最大值为7.78 log_{10}，为样品1；最小值为6.26 log_{10}，为样品7；结果中位数为7.24 log_{10}，为样品2、11、14。21℃计数法结果的平均值为6.63 log_{10}，最大值为7.15 log_{10}，为样品2；最小值为5.57 log_{10}，为样品3；结果中位数为6.77 log_{10}，为样品1和样品12。两种方法差值d的平均值为0.61 log_{10}，最大值为2.13 log_{10}，为样品3；最小值为0.01 log_{10}，为样品9；中位数为0.48 log_{10}，为样品4和样品13。

通过SAS 9.4对数据进行分析，差值d的分布不服从正态分布，$P = 0.0074 < 0.05$（零假设为“服从正态分布”，$P > 0.05$，应接受零假设，即差值d分布服从正态分布），可以使用Bland-Altman比值法分析两种方法的一致性。Bland-Altman分析结果显示（图2），两种方法的偏倚为1.09 log_{10}，其95%置信区间上限为1.27，下限为0.94，仅1个（1/14，7.14%）数据位于95%置信区间范围外，绝大多数比值都位于偏倚的95%置信区间内，因此可以认为两种培养方法的结果具有较好的一致性，两种方法在实际生产中检测生山羊乳中嗜冷微生物数量时可以互相替代使用。

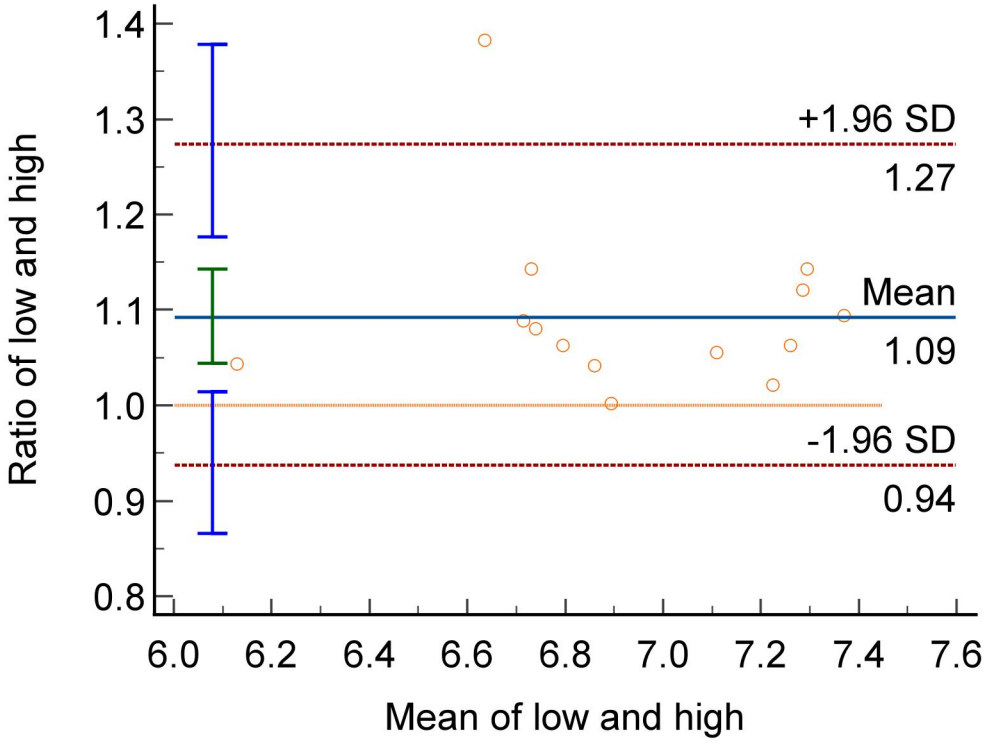

图 2 生山羊乳样品 6.5℃计数法和 21℃计数法的 Bland-Altman 分析

对所采集的生绵羊乳样品用两种条件进行培养后分别计数，计算嗜冷微生物浓度，以对数值表示，其中两种方法的差值用d表示。结果见表6。

表 6 生绵羊乳样品嗜冷微生物计数

样品	6.5℃	21℃	d
1	6.34	6.23	0.11
2	7.11	7.30	-0.19
3	6.91	6.67	0.24
4	7.63	7.59	0.04
5	5.99	6.04	-0.05
6	6.62	6.60	0.02
7	5.89	5.54	0.34
8	6.08	5.87	0.21
9	6.15	5.95	0.20
10	7.32	7.08	0.24
11	6.94	6.32	0.62

12	4.70	4.56	0.14
13	6.98	6.43	0.55
14	5.78	5.32	0.46
15	7.04	7.04	0.00
16	7.28	7.20	0.07
17	5.36	5.79	-0.42
18	7.15	7.23	-0.08
19	6.96	6.83	0.13
20	6.82	6.88	-0.06
21	6.90	6.86	0.05
22	5.98	6.08	-0.10
23	6.45	6.79	-0.35
24	6.65	6.57	0.09
25	5.86	5.95	-0.09
26	5.60	5.96	-0.36
27	6.67	6.20	0.47
28	6.79	6.64	0.15
29	6.93	6.59	0.34
30	5.46	5.78	-0.32
平均值	6.48	6.40	0.08

结果显示，6.5℃计数法结果的平均值为6.48 $\log_{10}$，最大值为7.63 $\log_{10}$，为样品4；最小值为4.70 $\log_{10}$，为样品12；结果中位数为6.66 $\log_{10}$，为样品24和样品27。21℃计数法结果的平均值为6.40 $\log_{10}$，最大值为7.59 $\log_{10}$，为样品4；最小值为4.56 $\log_{10}$，为样品12；结果中位数为6.50 $\log_{10}$，为样品13和样品24。两种方法差值d的平均值为0.08 $\log_{10}$，最大值为0.62 $\log_{10}$，为样品11；最小值为-0.42 $\log_{10}$，为样品17；中位数为0.08 $\log_{10}$，为样品16和样品24。

通过SAS 9.4对数据进行分析，差值d的分布服从正态分布，$P = 0.7943 > 0.05$（零假设为“服从正态分布”，$P > 0.05$，应接受零假设，

即差值d分布服从正态分布），可以使用Bland-Altman方法分析两种方法的一致性。Bland-Altman分析结果显示（图3），两种方法的偏倚为0.08 $\log_{10}$，其95%置信区间上限为0.60 $\log_{10}$，下限为-0.44 $\log_{10}$，仅1个（1/30，3.33%）数据位于95%置信区间范围外，绝大多数差值都位于偏倚的95%置信区间内，因此可以认为两种培养方法的结果具有较好的一致性，两种方法在实际生产中检测生绵羊乳中嗜冷微生物数量时可以互相替代使用。

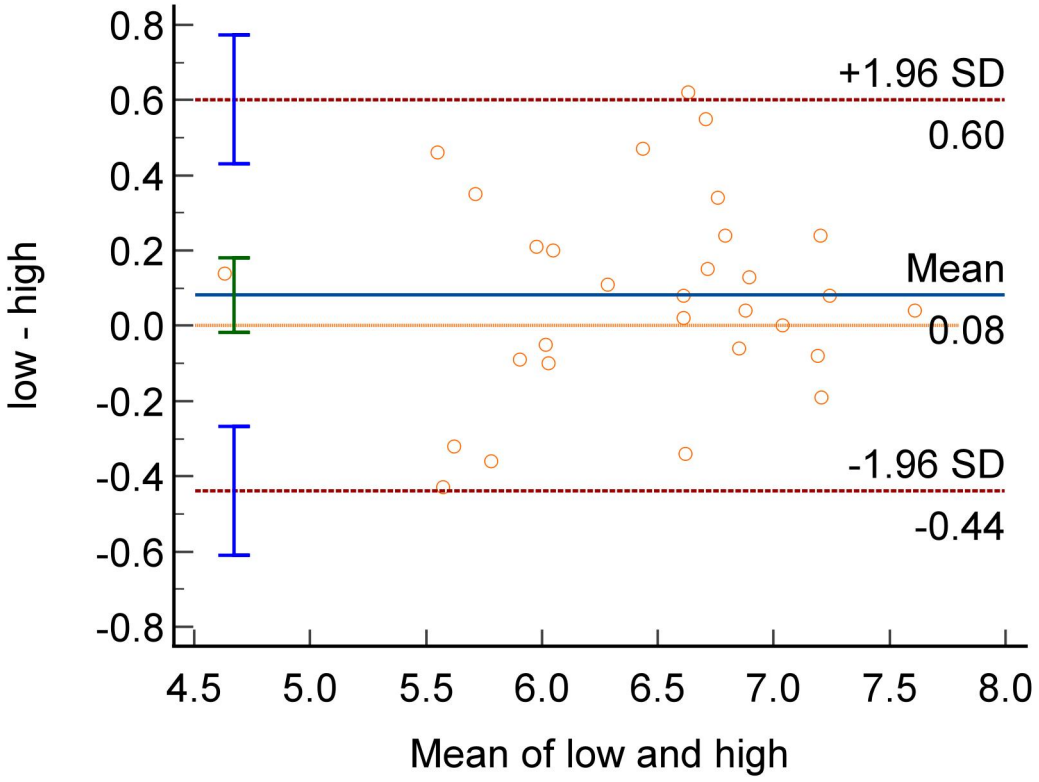

图 3 生绵羊乳样品 6.5℃计数法和 21℃计数法的 Bland-Altman 分析

对所采集的生驴乳样品用两种条件进行培养后分别计数，计算嗜冷微生物浓度，以对数值表示，其中两种方法的差值用d表示。结果见表7。

表 7 生驴乳样品嗜冷微生物计数

样品	6.5℃	21℃	d
1	7.28	7.28	0.00
2	7.15	7.18	-0.03
3	6.38	6.28	0.10
4	6.90	6.57	0.33
5	6.65	6.62	0.03
6	6.97	6.86	0.12
7	6.93	6.83	0.11
8	7.26	7.08	0.18
9	4.56	4.04	0.51
10	4.30	4.34	-0.04
11	7.67	7.57	0.10
平均值	6.55	6.42	0.13

结果显示，6.5℃计数法结果的平均值为6.55 $\log_{10}$，最大值为7.67 $\log_{10}$，为样品11；最小值为4.30 $\log_{10}$，为样品10；结果中位数为6.93 $\log_{10}$，为样品7。21℃计数法结果的平均值为6.42 $\log_{10}$，最大值为7.57 $\log_{10}$，为样品11；最小值为4.04 $\log_{10}$，为样品9；结果中位数为6.83 $\log_{10}$，为样品7。两种方法差值d的平均值为0.13 $\log_{10}$，最大值为0.51 $\log_{10}$，为样品9；最小值为-0.04 $\log_{10}$，为样品10；中位数为0.10 $\log_{10}$，为样品11。

通过SAS 9.4对数据进行分析，差值d的分布服从正态分布，$P = 0.0532 > 0.05$（零假设为“服从正态分布”，$P > 0.05$，应接受零假设，即差值d分布服从正态分布），可以使用Bland-Altman方法分析两种方法的一致性。Bland-Altman分析结果显示（图4），两种方法的偏倚为0.13 $\log_{10}$，其95%置信区间上限为0.45 $\log_{10}$，下限为-0.20 $\log_{10}$，仅1个（1/11，9.10%）数据位于95%置信区间范围外，绝大多数差值

都位于偏倚的95%置信区间内，因此可以认为两种培养方法的结果具有较好的一致性，两种方法在实际生产中检测生驴乳中嗜冷微生物数量时可以互相替代使用。

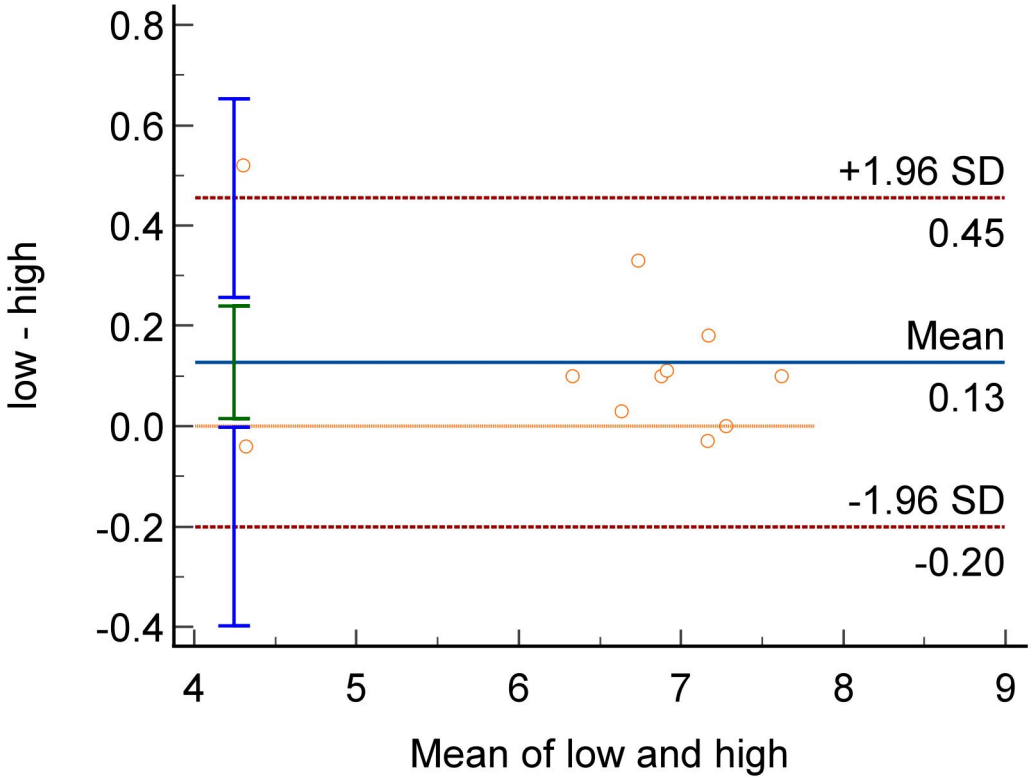

图 4 生驴乳样品 6.5℃计数法和 21℃计数法的 Bland-Altman 分析

对所采集的生骆驼乳样品用两种条件进行培养后分别计数，计算嗜冷微生物浓度，以对数值表示，其中两种方法的差值用d表示。结果见表8。

表 8 生骆驼乳样品嗜冷微生物计数

样品	6.5℃	21℃	d
1	6.71	5.99	0.72
2	4.41	4.76	-0.34
3	6.15	5.86	0.28
4	6.11	5.76	0.36
5	5.62	5.56	0.07

6	6.04	5.83	0.21
7	7.08	7.15	-0.07
8	4.58	4.49	0.09
9	7.11	6.30	0.81
10	6.81	6.11	0.69
11	5.46	5.26	0.21
平均值	6.01	5.73	0.28

结果显示，6.5℃计数法结果的平均值为6.01 $\log_{10}$，最大值为7.11 $\log_{10}$，为样品4；最小值为4.41 $\log_{10}$，为样品2；结果中位数为6.11 $\log_{10}$，为样品4。21℃计数法结果的平均值为5.73 $\log_{10}$，最大值为7.15 $\log_{10}$，为样品7；最小值为4.49 $\log_{10}$，为样品8；结果中位数为5.83 $\log_{10}$，为样品6。两种方法差值d的平均值为0.28 $\log_{10}$，最大值为0.81 $\log_{10}$，为样品9；最小值为-0.34 $\log_{10}$，为样品2；中位数为0.21 $\log_{10}$，为样品11。

通过SAS 9.4对数据进行分析，差值d的分布服从正态分布，$P = 0.6838 > 0.05$（零假设为“服从正态分布”，$P > 0.05$，应接受零假设，即差值d分布服从正态分布），可以使用Bland-Altman方法分析两种方法的一致性。Bland-Altman分析结果显示（图5），两种方法的偏倚为0.27 $\log_{10}$，其95%置信区间上限为0.97 $\log_{10}$，下限为-0.43 $\log_{10}$，所有数据差值都位于偏倚的95%置信区间内，因此可以认为两种培养方法的结果具有较好的一致性，两种方法在实际生产中检测生骆驼乳中嗜冷微生物数量时可以互相替代使用。

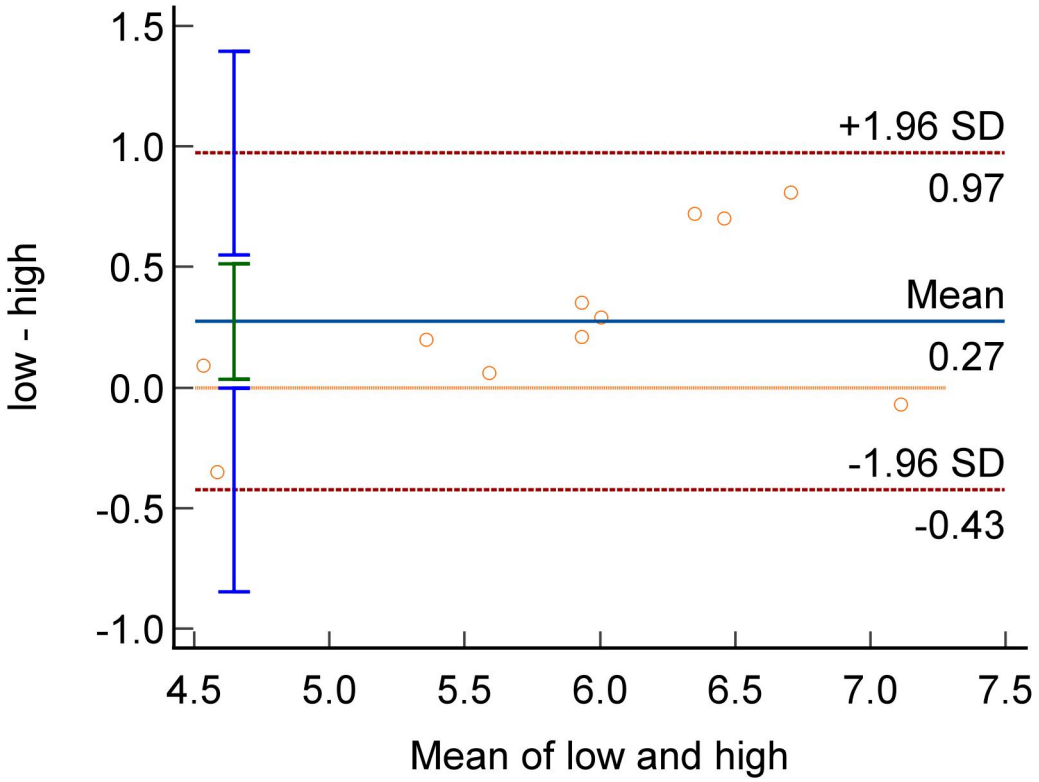

图 5 生骆驼乳样品 6.5℃计数法和 21℃计数法的 Bland-Altman 分析

对所采集的生牦牛乳样品用两种条件进行培养后分别计数，计算嗜冷微生物浓度，以对数值表示，其中两种方法的差值用d表示。结果见表9。

表 9 生牦牛乳样品嗜冷微生物计数

样品	6.5℃	21℃	d
1	7.74	7.73	0.01
2	7.43	7.48	-0.05
3	7.66	7.41	0.25
4	7.94	7.76	0.18
5	7.15	7.15	0.00
6	5.90	5.66	0.23
7	8.04	8.18	-0.13
8	6.28	5.98	0.30
平均值	7.27	7.17	0.10

结果显示，6.5℃计数法结果的平均值为7.27 $\log_{10}$，最大值为8.04 $\log_{10}$，为样品7；最小值为5.90 $\log_{10}$，为样品6；结果中位数为7.55 $\log_{10}$，为样品2和样品3。21℃计数法结果的平均值为7.17 $\log_{10}$，最大值为8.18 $\log_{10}$，为样品7；最小值为5.66 $\log_{10}$，为样品6；结果中位数为7.45 $\log_{10}$，为样品2和样品3。两种方法差值d的平均值为0.10 $\log_{10}$，最大值为0.30 $\log_{10}$，为样品8；最小值为-0.13 $\log_{10}$，为样品7；中位数为0.09 $\log_{10}$，为样品1和样品4。

通过SAS 9.4对数据进行分析，差值d的分布服从正态分布，$P = 0.3878 > 0.05$（零假设为“服从正态分布”，$P > 0.05$，应接受零假设，即差值d分布服从正态分布），可以使用Bland-Altman方法分析两种方法的一致性。Bland-Altman分析结果显示（图6），两种方法的偏倚为0.10 $\log_{10}$，其95%置信区间上限为0.42 $\log_{10}$，下限为-0.22 $\log_{10}$，所有数据差值都位于偏倚的95%置信区间内，因此可以认为两种培养方法的结果具有较好的一致性，两种方法在实际生产中检测生牦牛乳中嗜冷微生物数量时可以互相替代使用。

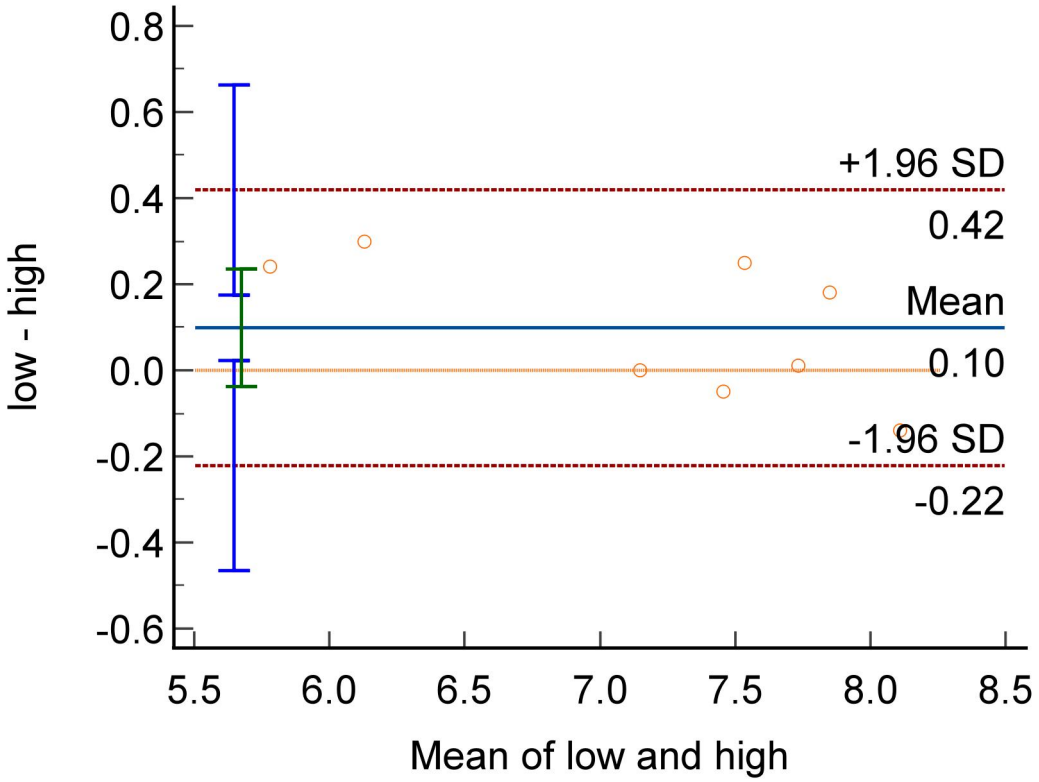

图 6 生牦牛乳样品 6.5℃计数法和 21℃计数法的 Bland-Altman 分析

ISO17410:2019中指出，21℃计数法除适用于生乳外，对于巴氏杀菌乳产品也同样适用，因此开展了巴氏杀菌乳的验证，结果见表10。

表 10 巴氏杀菌乳样品嗜冷微生物计数

样品	6.5℃	21℃	d
1	2.67	1.45	1.22
2	2.61	1.65	0.96
3	2.61	1.49	1.12
4	2.60	1.20	1.40
5	2.45	1.30	1.15
6	2.48	1.04	1.44
7	2.28	1.34	0.94
8	2.53	1.52	1.01
9	2.40	1.11	1.28
10	2.54	2.04	0.50

11	2.60	1.58	1.02
12	2.20	1.41	0.79
13	2.68	1.38	1.30
14	2.34	1.43	0.91
15	2.23	1.58	0.65
16	2.49	1.34	1.15
平均值	2.48	1.43	1.05

结果显示，对于巴氏杀菌乳样品，6.5℃计数法结果的平均值为2.48 $\log_{10}$，最大值为2.68 $\log_{10}$，为样品13；最小值为2.20 $\log_{10}$，为样品12；结果中位数为2.51 $\log_{10}$，为样品8和样品16。21℃计数法结果的平均值为1.43 $\log_{10}$，最大值为2.04 $\log_{10}$，为样品$_{10}$；最小值为1.04 $\log_{10}$，为样品6；结果中位数为1.42 $\log_{10}$，为样品12和样品14。两种方法差值d的平均值为1.05 $\log_{10}$，最大值为1.44 $\log_{10}$，为样品6；最小值为0.50 $\log_{10}$，为样品$_{10}$；中位数为1.07 $\log_{10}$，为样品3和样品11。

通过SAS 9.4对数据进行分析，差值d的分布服从正态分布，$P = 0.8225 > 0.05$，可以使用Bland-Altman方法分析两种方法的一致性。Bland-Altman分析结果显示（图7），两种方法的偏倚为1.05 $\log_{10}$，其95%置信区间上限为1.56 $\log_{10}$，下限为0.54 $\log_{10}$，仅1个（1/16，6.25%）数据位于95%置信区间范围外，绝大多数差值都位于偏倚的95%置信区间内，因此可以认为两种培养方法的结果具有较好的一致性，两种方法在实际生产中检测巴氏杀菌乳中嗜冷微生物数量时可以互相替代使用。

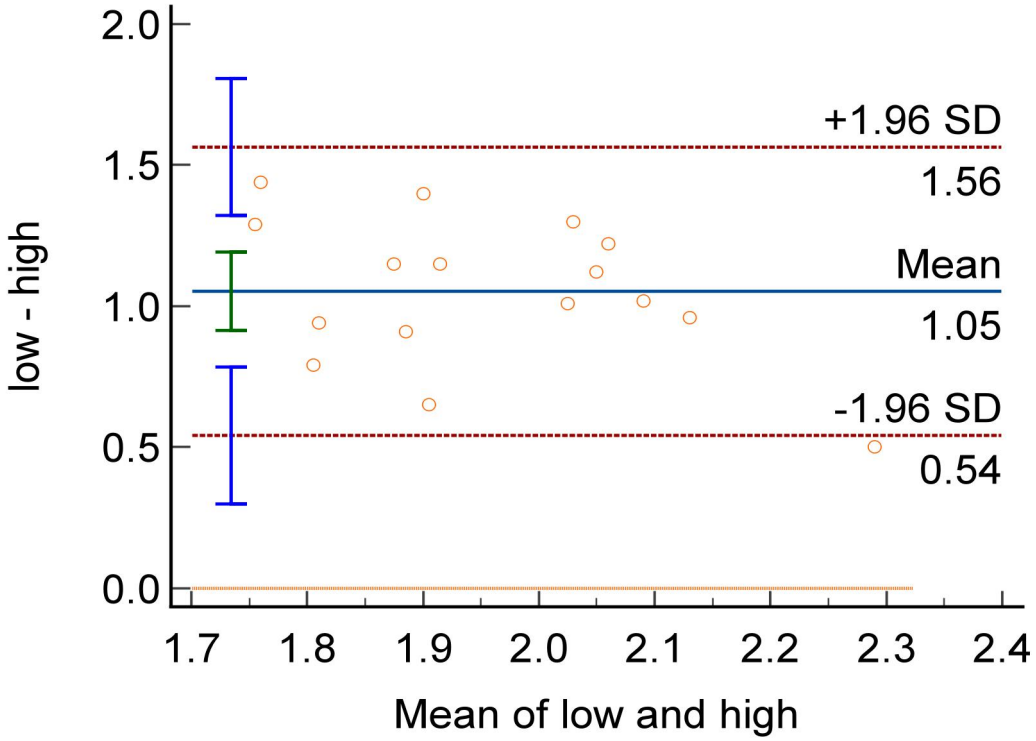

图 7 巴氏杀菌乳样品 6.5℃计数法和 21℃计数法的 Bland-Altman 分析

1.4 准确度

准确度通过参考方法的结果与待确认方法的结果之间的比较研究，使用人工污染样品进行。选择6个测试样品，其中2个样品为低浓度污染水平，2个为中间浓度污染水平，2个为高浓度污染水平，每个样品重复测试5次，结果见表11，计算β-期望容差区间（β-expectation tolerance interval，β-ETI）（表12），并绘制准确度分布图（图8）。其中，准确度的可接受性限为AL=±0.5 $\log_{10}$。

表 11 人工污染样品嗜冷微生物计数

样品编号	6.5℃计数法					21℃计数法				
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	y_1	y_2	y_3	y_4	y_5
1（低水平）	4.18	4.08	4.18	4.11	4.08	3.85	3.85	3.91	3.95	3.81
2（低水平）	4.20	4.15	4.26	4.15	4.18	3.68	3.95	3.93	3.89	3.75
3（中水平）	5.78	5.85	5.89	5.83	5.93	5.46	5.51	5.41	5.45	5.49

4（中水平）	5.61	5.43	5.53	5.54	5.48	5.84	5.90	5.81	5.88	5.79
5（高水平）	8.73	8.64	8.74	8.56	8.63	8.36	8.26	8.28	8.30	8.41
6（高水平）	8.79	8.74	8.63	8.64	8.54	8.40	8.36	8.34	8.23	8.28

表 12 β-期望容差区间

样品编号	X	S_{ref}	AL_s	Y	S_{val}	B	U	L	AL	
1（低水平）	4.11	0.05	0.20	3.85	0.06	-0.26	-0.16	-0.36	0.50	-0.50
2（低水平）	4.18	0.05	0.18	3.89	0.12	-0.29	-0.19	-0.39	0.50	-0.50
3（中水平）	5.85	0.06	0.23	5.46	0.04	-0.39	-0.29	-0.49	0.50	-0.50
4（中水平）	5.53	0.07	0.28	5.84	0.05	0.31	0.41	0.21	0.50	-0.50
5（高水平）	8.64	0.08	0.31	8.30	0.07	-0.34	-0.24	-0.44	0.50	-0.50
6（高水平）	8.64	0.10	0.38	8.34	0.07	-0.30	-0.20	-0.40	0.50	-0.50

注：X 表示 6.5℃计数法结果的中位值，S_{ref} 表示 6.5℃计数法结果的合成标准差，AL_s 表示 6.5℃计数法新的接受限（$AL_s=\pm4\times S_{ref}$），Y 表示 21℃计数法结果的中位值，S_{val} 表示 21℃计数法结果的合成标准差，B 表示偏倚，U 表示β-ETI 上限，L 表示β-ETI 上限。

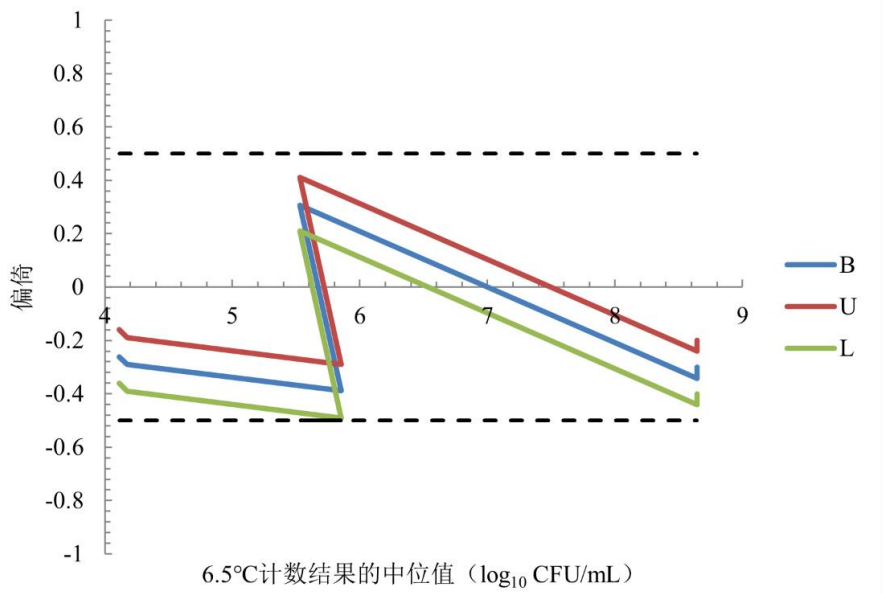

图 8 准确度分布图

由图3可知，对于所有样本，其β-ETI的上限值≤AL，上限值≥-AL，可认为21℃计数法与6.5℃计数法等效。

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益。

（一）试验验证的分析、综述报告

本方法分别在三家实验室进行比对验证实验，以验证其重现性。三家实验室分别为新疆农业科学院农业质量标准与检测技术研究所（Lab1）、唐山市农产品质量安全检验检测中心（Lab2）、农业农村部乳品质量检验测试中心（北京）（Lab3）等。以灭菌乳为本底，添加4株假单胞杆菌，制备出4log$_{10}$、5log$_{10}$、8log$_{10}$高中低三个浓度水平，每个浓度水平检测2个平行考察方法的准确度，结果见表13~表15。

根据《食品安全国家标准 微生物检验方法验证通则》（GB/T 4789.45—2023）要求，计算三家实验室结果的准确度（表 16~表 17），并绘制准确度分布图（图9）。

表 13 方法再现性考察验证试验结果（Lab1）

样品	6.5℃计数法				21℃计数法			
	计算值	Log$_{10}$值	计算值	Log$_{10}$值	计算值	Log$_{10}$值	计算值	Log$_{10}$值
低水平	1.2×10^{4}	4.08	1.1×10^{4}	4.06	4.6×10^{3}	3.66	4.9×10^{3}	3.69
中水平	4.2×10^{5}	5.62	3.3×10^{5}	5.52	2.6×10^{5}	5.41	2.9×10^{5}	5.46
高水平	4.5×10^{8}	8.65	4.4×10^{8}	8.64	2.4×10^{8}	8.38	2.1×10^{8}	8.32

表 14 方法再现性考察验证试验结果（Lab2）

样品	6.5℃计数法				21℃计数法			
	计算值	Log$_{10}$值	计算值	Log$_{10}$值	计算值	Log$_{10}$值	计算值	Log$_{10}$值
低水平	1.5×10^{4}	4.18	1.3×10^{4}	4.11	5.1×10^{3}	3.71	5.0×10^{3}	3.70
中水平	6.2×10^{5}	5.79	7.2×10^{5}	5.86	2.7×10^{5}	5.43	2.6×10^{5}	5.41
高水平	3.8×10^{8}	8.58	3.6×10^{8}	8.56	2.3×10^{8}	8.36	2.1×10^{8}	8.32

表 15 方法再现性考察验证试验结果（Lab3）

样品	6.5℃计数法				21℃计数法			
	计算值	Log_{10}值	计算值	Log_{10}值	计算值	Log_{10}值	计算值	Log_{10}值
低水平	1.5×10^4	4.18	1.3×10^4	4.11	5.4×10^3	3.73	6.5×10^3	3.81
中水平	3.8×10^5	5.58	3.7×10^5	5.57	2.6×10^5	5.41	2.5×10^5	5.40
高水平	3.5×10^8	8.54	3.7×10^8	8.57	3.0×10^8	8.48	2.7×10^8	8.43

表 16 实验室间验证样品 6.5℃计数法准确度

污染水平	低	中	高
X	4.12	5.66	8.59
S_r	0.032	0.039	0.012
S_L	0.021	0.1	0.033
S_R	0.038	0.107	0.035
r	0.09	0.11	0.03
R	0.11	0.3	0.1
AL_s	0.13	0.35	0.12

注：X 表示 6.5℃计数法结果的平均值，Sr 表示 6.5℃计数法的重复性标准差，SL 表示 6.5℃计数法的实验室间标准差，S_R 表示 6.5℃计数法的再现性标准差，r 表示 6.5℃计数法的重复性限，R 表示 6.5℃计数法的再现性限，ALs 表示 6.5℃计数法的新接受限（ALs=±3.3×SR，ref）。

表 17 实验室间验证样品 21℃计数法准确度

污染水平	低	中	高
Y	3.71	5.42	8.38
S_r	0.027	0.017	0.028
S_L	0.029	0	0.041
S_R	0.04	0.017	0.049
r	0.08	0.05	0.08
R	0.11	0.05	0.14
S_{TI}	0.042	0.018	0.053
df	6.38	8.89	5.5
B	-0.41	-0.24	-0.21
U	-0.35	-0.22	-0.13
L	-0.47	-0.27	-0.29
AL	0.5	0.5	0.5
	-0.5	-0.5	-0.5

注：Y 表示 21℃计数法结果的平均值，STI 表示 21℃计数法的容忍区间标准差，df 表示自由度。

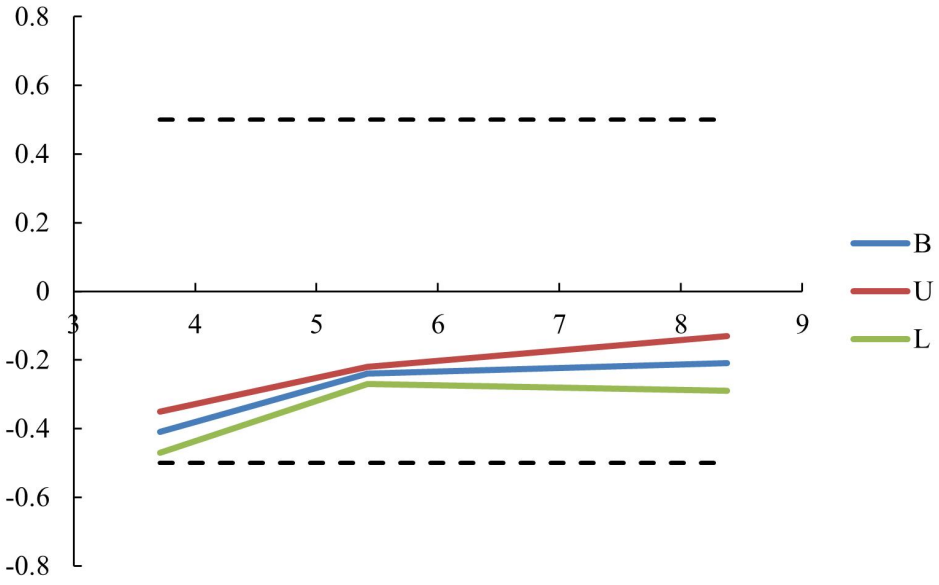

图 9 准确度分布图

由图9可知，对于所有实验室，其β-ETI的上限值≤AL，上限值≥-AL，可认为21℃计数法与6.5℃计数法等效。

（二）、技术经济论证、预期的经济效益、社会效益和生态效益

目前，乳中嗜冷微生物检测主要根据 NY/T 1331—2007 进行，需要在 6.5 ℃需氧培养 10 天。该方法耗时较长，对牧场来说，得到的是 10 d 之前的嗜冷微生物污染数据，无法实现根据污染情况实时调整牧场管理；而乳企在得到培养计数结果时，该批次生乳已加工为产品，甚至有可能已经被售卖给消费者，嗜冷微生物产生的耐热酶所带来的腐败威胁仍然存在。

在本标准中，采用 ISO 17410-2019 附录 B 提出的快速检测方法对生乳和巴氏杀菌乳进行检测，发现两种方法检测结果的一致性高，可替代 6.5 ℃计数法并在牧场和乳企应用，极大地缩短了检测时间。

建立乳中嗜冷微生物快速检测方法，对指导牧场开展嗜冷微生

物污染防控和乳企明确嗜冷微生物污染，降低由此导致的乳及乳制品腐败浪费具有重要意义。从本次调查的结果来看，嗜冷微生物污染在生乳中普遍存在，可能会对后续加工而成的乳品造成影响。通过本标准的应用，在乳品加工前探明嗜冷微生物污染程度，对保障食品安全具有重大意义。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

经查，国际上有关于嗜冷菌快速检测的标准《Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms》（ISO17410:2019），本文件为采标。

五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因。

本文件引用国际标准《Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms》（标准号：ISO17410:2019），为合规引用。主要引用如下 部分：1范围，4、原理，5、试剂或材料，6、仪器设备，7、样品，9、试验步骤，10、菌落计数，11、试验数据处理结果计数。12、结果报告。

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

本文件的制定符合《食品安全国家标准 微生物检验方法验证通则》（GB/T 4789.45—2023）和《微生物检测方法确认与验证指南》（RB/T 033—2020）等相关法律、行政法规规定。与现行基础标准

《乳与乳制品中嗜冷菌 、需氧芽抱及嗜热需氧芽抱数的测定》（NY/T 1331-2007）相衔接，遵循政策性和协调同一性的原则。本文件与现行法律法规和相关标准无重复交叉。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本文件在制定过程中不存在重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

经查，未识别到与本文件技术内容有关的专利。

九、贯彻标准的要求和措施建议

本文件为农业行业标准，并不涉及有关国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等有关强制性标准要求，因此建议将其作为推荐性行业标准颁布实施。组织标准学习，加大对标准的宣传及贯彻力度，建议农业行政主管部门采用本文件对生乳及巴氏杀菌乳中嗜冷微生物的检测进行指导。

十、其他应予说明的事项

本文件没有说明的其他事项。

附件 1

预审会议审查意见汇总处理表

标准名称:《乳及乳制品中嗜冷微生物的测定 快速培养法》

共 10 页

标准项目承担单位: XXXX 等

2024 年 11 月 21 日填写

序号	标准章条编号	意见内容	提出单位	处理意见	备注
1	标题	修改为“生乳及巴氏杀菌乳中嗜冷菌的测定 快速培养法”	专家组	采纳	
2	全文	将“嗜冷微生物”修改为“嗜冷菌”	专家组	采纳	
3	全文	将“乳及乳制品”修改为“生乳及巴氏杀菌乳”	专家组	采纳	
4	1	删除“本文件适用于生乳及巴氏杀菌乳中嗜冷微生物的测定”	专家组	采纳	
5	3	删除“3 术语和定义”	专家组	采纳	
6	4	修改为“试样悬浮液与 44℃-47℃的乳平板计数（MPC）琼脂培养基于平板中混合”	专家组	采纳	
7	5.4	明确“MPC 琼脂培养基”的名称及配制方法	专家组	采纳	
8	6.5	删除“无菌”	专家组	采纳	

9	9.1	修改为“取 25 mL（g）样品置于盛有 225 mL 无菌磷酸盐缓冲液（4.2）或无菌生理盐水（4.3）的无菌锥形瓶或无菌均质袋中，混匀”	专家组	采纳	
10	9.2	修改为“用 1 mL 移液器（5.5）吸取样品匀液（8.1）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”	专家组	采纳	
11	9.4	删除“菌落计数在 10 CFU 到 300 CFU 之间的”	专家组	采纳	
12	9.5	将“将培养皿置于凉爽的水平表面，使混合物凝固。”修改为“冷却”	专家组	采纳	
13	9.6	将“培养皿（6.3）”修改为“培养皿（8.5）”	专家组	采纳	
14	12.2	修改为“若所有稀释度的平板上菌落数均大于 300CFU，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”	专家组	采纳	
15	编制说明	补充 6.5℃和 21℃培养方法的特性	专家组	采纳	

注:提出单位为专家组。