

# 团体标准

T/NAIAxxxx-xxxx

## 食品加工环境（洁净区）

## 浮游菌的测定方法

Test method for airborne microbe in clean room(zone) of the food  
processing environment

(征求意见稿)

xxxxx-xx-xx发布

xxxxx-xx-xx实施

宁夏化学分析测试协会 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》的规定起草。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏回族自治区食品检测研究院、宁夏计量质量检验检测研究院、宁夏回族自治区标准化研究院、宁夏百瑞源枸杞股份有限公司、宁夏夏进集团股份有限公司。

本标准主要起草人：冯秀娟、李谦、苏洋、何淑桢、岳苑、高俊峰、简敏捷、吕晓东、滕园园、张小飞。

本文件为首次发布。

# 食品加工环境（洁净区）浮游菌的测定方法

## 1 范围

本标准规定了食品检测和食品加工环境（洁净区）中浮游菌测试条件、测试方法。

本标准适用于食品检测机构和食品生产企业洁净室、洁净区以及局部空气清洁作业区(包括洁净工作台)的浮游菌的测试和环境的验证。

## 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，仅所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/T 16293 医药工业洁净室（区）浮游菌的测试方法

## 3 术语和定义

### 3.1 菌落

微生物培养后，由一个或几个微生物繁殖而形成的微生物集落，简称CFU，通常用个数表示。

### 3.2 浮游菌

悬浮在空气中的活微生物粒子通过浮游菌采样器收集到专门的培养基，在适宜的生长条件下繁殖到可见的菌落数。

### 3.3 浮游菌浓度

单位体积空气含浮游菌菌落数的多少，以计数浓度表示，单位是个/m<sup>3</sup>或个/L。

## 4 测试方法

### 4.1 测试原理

本方法采用计数浓度法，选择合适的培养基（能证实其能够支持微生物生长的培养基）、恒温培养箱，采用浮游菌采样器将收集到的细小空气流直接撞击到平板培养基表面上，附着的活微生物粒子经若

干时间和适宜的生长条件让其繁殖形成菌落,根据浮游菌浓度以判定测试环境是否达到相应洁净度级别浮游菌的技术要求。

## 4.2 人员职责及培训

洁净室(区)的测试人员应进行本专业的培训并获得相应资格后才能履行对洁净室(区)测试的职责,其中包含涉及的卫生知识和基本微生物知识。

洁净室(区)的测试人员应选择与测试环境的空气洁净度级别要求相适应的穿戴方式,外面的衣服不能带进100000级以上的区域。

## 4.3 仪器设备与培养基

### 4.3.1 浮游菌采样器

4.3.1.1 原理:浮游菌采样器一般采用撞击法机理可分为狭缝式采样器、离心式或针孔式采样器。视情况自行选择合适的设备。狭缝式采样器由内部风机将气流吸入,通过采样器的狭缝式平板,将采集的空气喷射并撞击到缓慢旋转的平板培养基表面上,附着的活微生物粒子经培养后形成菌落。离心式采样器由于内部风机的高速旋转,气流从采样器前部吸入从后部流出,在离心力的作用下,空气中的活微生物粒子有足够的时间撞击到专用的固形培养条上,附着的活微生物粒子经培养后形成菌落。针孔式采样器是气流通过一个金属盖吸入,盖子上是密集的经过机械加工的特制小孔,通过风机将收集到的细小的空气流直接撞击到平板培养基表面上,附着的活微生物粒子经培养后形成菌落。

4.3.1.2 应根据实际需要选择合适的浮游菌采样器。

4.3.1.3 浮游菌采样器必须要有流量计和定时器。

4.3.1.4 应严格按仪器说明书的要求进行操作。

4.3.1.5 采样器必须按仪器的检定周期,定期对仪器作检定,以保证测试数据的可靠性。

4.3.1.6 仪器开机,预热至稳定后,方可按仪器说明书的规定对仪器进行校正,同时检查采样流量,并根据采样量设定采样时间。

4.3.1.7 采样口必须用便于消毒及化学性能稳定的材料制造,采样管严禁渗漏,内壁应光滑,采样管的长度应根据测定点的高度定,尽量减少弯曲。

### 4.3.2 培养皿

一般采用 $\phi 90\text{mm} \times 15\text{mm}$ 规格的培养皿。

### 4.3.3 恒温培养箱

必须定期对培养箱进行校准。

#### 4.3.4 培养基

大豆酪蛋白琼脂培养基（TSA）或平板计数琼脂培养基（PCA），配制方法见附录A或选择商品化培养基。

#### 4.3.5 高压蒸汽灭菌器

### 4.4 测试步骤

4.4.1 采样者应穿戴与被测洁净区域相应的工作服进入测试区域，双手用75%酒精消毒或戴无菌手套操作。

4.4.2 采样前，采样器、培养皿表面先用75%酒精严格消毒。

4.4.3 用75%酒精清洗采样器的顶盖、转盘以及罩子的内外面，用75%酒精棉球擦拭采样头及采样头的内外壁，同时采用火焰喷枪灼烧采样头及其内壁进行高温灭菌。

4.4.4 开启浮游菌采样器，使仪器中残余的酒精蒸发，将消毒好的培养皿置于设备固定位置，旋上采样头。

4.4.5 根据不同的洁净度级别选择合适的采样量，设定好采样时间，置采样口于采样点后，启动测试按钮进行采样。

### 4.5 培养

全部采样结束后，将培养皿倒置于恒温培养箱中于 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养48h。每批培养基应有对照试验，检验培养基本身是否污染。可每批选定1只培养皿作对照培养。

### 4.6 菌落计数

4.6.1 用肉眼对培养皿上所有的菌落直接计数、标记或在菌落计数器上点计，必要时用5~10倍放大镜检查，有无遗漏。

4.6.2 若平板上有2个或2个以上的菌落重叠，可分辨时仍以2个或2个以上菌落计数。

### 4.7 注意事项

4.7.1 使用前应仔细检查每个培养皿的质量，培养基有变质、破损或污染的不能使用。

4.7.2 对培养基、培养条件及其他参数作详细的记录。

4.7.3 由于细菌种类繁多，差别甚大，计数时一般用透射光于培养皿背面或正面仔细观察，不要漏计培养皿边缘生长的菌落，并须注意细菌菌落或培养基沉淀物的区别，必要时用显微镜鉴别。

## 5 测试规则

## 5.1 测试状态

静态和动态两种状态均可进行测试。浮游菌测试前，被测洁净室(区)由用户决定是否需要预先消毒。测试报告中应标明测试时所采用的状态和室内测试人员数。

## 5.2 测试人员

测试人员必须穿戴符合被测环境级别的工作服。静态测试时，室内测试人员不得多于2人，测试开始后人员立即离开测试区域。

## 5.3 测试时间

测试前，先启动净化空气调节系统，若为单向流洁净室(区)，系统运行时间不少于10min；若为非单向流洁净室(区)，系统运行时间不少于30min。对于预先消毒的测试室进行测试，先打开紫外灯，30min后关闭紫外灯，等待30min后可进行测试。在动态测试时，则须记录生产开始的时间以及测试时间。

## 5.4 浮游菌浓度计算

### 5.4.1 最少采样点数目及其布置

浮游菌测试的最少采样点数目及位置可参照附录B。

- a) 工作区测点位置离地0.8m~1.5m左右(略高于工作面)，送风口测点位置离开送风面30cm左右，可在关键设备或关键工作活动范围处增加测点。
- b) 每个采样点一般采样一次。

### 5.4.2 最小采样量

浮游菌每次最小采样量见表1。

表1 最小采样量

洁净度级别	采样量 L/次
100级	1000
10000级	500
100000级	100
300000级	100

### 5.4.3 采样注意事项

- a) 对于单向流或送风口，采样器采样管口朝向应正对气流方向；对于非单向流，采样管口向上。

- b) 布置采样点时，至少应离开尘粒较集中的回风口 1m 以上。
- c) 采样时，测试人员应站在采样口的下风侧，并尽量少走动。
- d) 应采取一切措施防止采样过程的污染和其他可能对样本的污染。
- e) 培养皿在用于检测时，为避免培养皿运输或搬动过程造成的影响，宜同时进行阴性对照试验，每次或每个区域取 1 个对照皿，与采样皿同法操作但不需暴露采样，然后与采样后的培养皿 (TSA 或 PCA) 一起放入培养箱内培养，结果应无菌落生长。

#### 5.4.4 记录

测试报告应包含以下内容：

- a) 测试者的名称和地址，测试日期；
- b) 测试依据；
- c) 被测洁净室(区)的平面位置(必要时标注相邻区域的平面位置)；
- d) 有关测试仪器及其测试方法的描述：包括测试环境条件，采样点数目以及布置图，测试次数，采样流量，或可能存在的测试方法的变更，测试仪器的检定证书等；若为动态测试，则还应记录现场操作人员数量及位置，现场运转设备、数量和位置；
- e) 测试结果；包括所有统计计算资料。

## 6 结果计算

6.1 用计数方法得出各个培养皿的菌落数。

6.2 每个测点的浮游菌平均浓度的计算，见式(1)。

$$\text{浮游菌平均浓度 (个/m}^3\text{)} = \text{菌落数} / \text{采样量} \dots\dots\dots (1)$$

示例1：某测点采样量为 400 L，菌落数为 1，则：

$$\text{浮游菌平均浓度} = \frac{1}{0.4} = 2.5 \text{ 个/m}^3$$

示例2：某测点采样量为 2m<sup>3</sup>，菌落数为 3，则：

$$\text{浮游菌平均浓度} = \frac{3}{2} = 1.5 \text{ 个/m}^3$$

## 7 结果评定

每个测点的浮游菌平均浓度必须低于所选定评定标准中的界限。

在静态测试时，若某测点的浮游菌平均浓度超过评定标准，则应重新采样两次，两次测试结果均合格才能判为符合。

## 8 日常监控

对于浮游菌的取样频次，如果出现下列情况应考虑修改，在评估以下情况后，也应确定其他项目的检测频次：

- 停工时间比预计延长；
- 关键区域内发现有污染存在；
- 在生产期间，空气净化系统进行任何重大的维修；
- 日常操作记录反映出倾向性的数据；
- 消毒规程的改变；
- 引起生物污染的事故等；
- 当生产设备有重大维修或增加设备时；
- 当洁净室(区)结构或区域分布有重大变动时。

附 录 A  
(规范性附录)  
培养基的灭菌和准备

A.1 胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)培养基的灭菌及准备

A.1.1 胰蛋白胨大豆琼脂培养基可以按以下处方制备,也可使用按该处方生产的符合要求的商品化培养基。配制后按培养基规定的程序灭菌。

A.1.2 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)配方

胰蛋白胨	15g
植物蛋白胨	5g
氯化钠	5g
琼脂	15g
蒸馏水	1000mL

取上述成分加入蒸馏水中,加热溶解,调节pH至 $7.3 \pm 0.2$ ,分装后,121℃高压灭菌15 min。冷却至约 $46 \pm 1^\circ\text{C}$ ,在无菌操作要求下倾注约20 mL至无菌皿中,加盖后在室温放至凝固。

A.2 平板计数琼脂(PCA)培养基的灭菌及准备

A.2.1 平板计数琼脂培养基可以按以下处方制备,也可使用按该处方生产的符合要求的商品化培养基。配制后按培养基规定的程序灭菌。

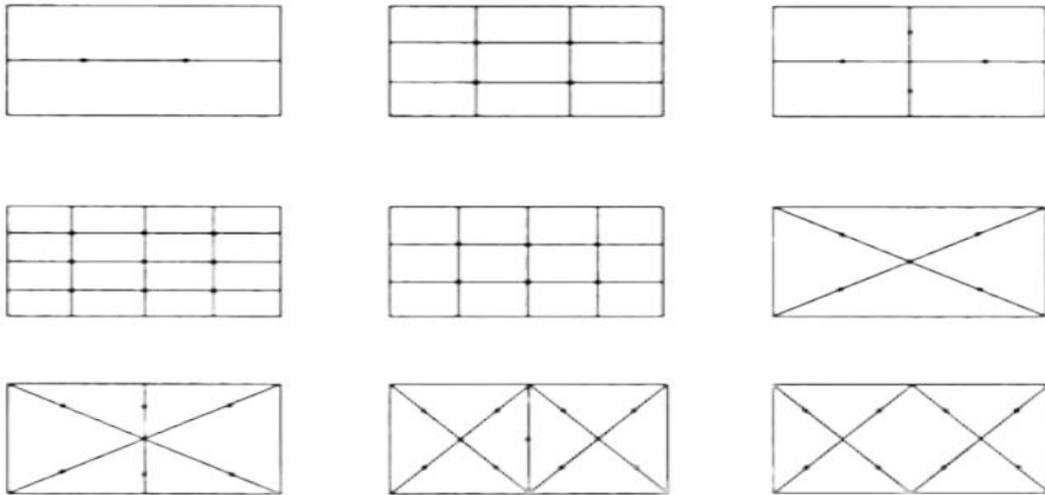
A.2.2 平板计数琼脂培养基(PCA)配方

胰蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	2.5 g
葡萄糖	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1000 mL

将上述成分加于蒸馏水中,煮沸溶解,调节pH至 $7.0 \pm 0.2$ ,分装后,121℃高压灭菌15min。冷却至约 $46 \pm 1^\circ\text{C}$ ,在无菌操作要求下倾注约20 mL至无菌皿中,加盖后在室温放至凝固。

附 录 B  
(规范性附录)  
洁净室(区)采样点布置

B.1 洁净室(区)采样点布置宜力求均匀,避免采样点在局部区域过于稀疏。下列多点采样的采样点布置图示可作参考(见图B.1)。



图B.1 平面采样点布置图

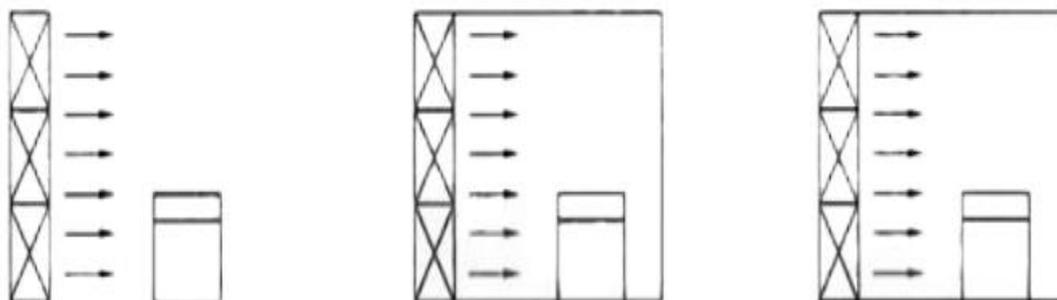
B.2 洁净室(区)采样点数目因洁净度级别及面积大小不同可设置不同的采样数。具体可参考表B.1。

表B.1 采样点数目

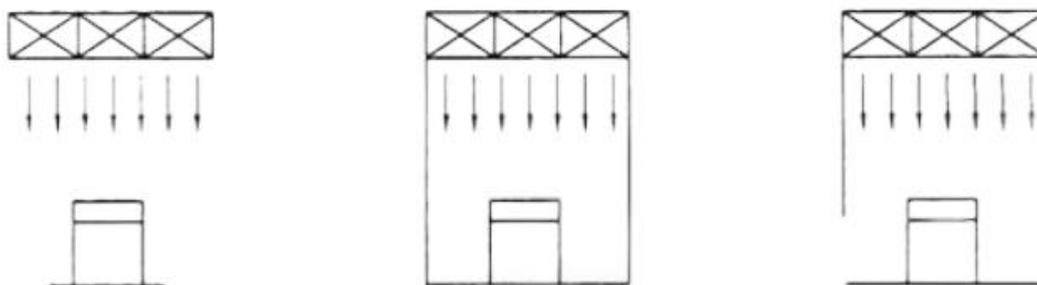
面积 (m <sup>2</sup> )	洁净度级别			
	100	10000	100000	300000
<10	2	2	2	2
≥10~<20	4	4	2	2
≥20~<40	8	8	2	2
≥40~<100	16	16	2	2
≥100~<200	40	10	3	3
≥200~<400	80	20	6	6
≥400~<1000	160	40	13	13
≥1000~<2000	400	100	32	32
≥2000	800	200	63	63

注: 对于 100 级的单向流洁净室(区), 包括 100 级洁净工作台(bench), 面积指的是送风口表面积; 对于 10000 级以上的非单向流洁净室(区), 面积指的是房间面积。

B.3 100级单向流区域，洁净工作台或局部空气净化设施的采样点宜布置在正对气流方向的工作面上，气流形式可参考图B.2、图B.3。



图B.2 水平单向流的气流形式



图B.3 垂直单向流的气流形式

附 录 C  
(资料性附录)  
洁净室(区)浮游菌技术要求

C.1 不同洁净度级别对浮游菌的技术要求如表C.1。

表C.1 洁净室(区)浮游菌技术要求

洁净度级别	微生物最大允许数
	浮游菌 (个/m <sup>3</sup> )
100	≤5
10000	≤100
100000	≤500

---