DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260416003
引用格式: 刘娜, 王亚萍, 孟云, 等. Bact/Alert 3D 微生物检测系统与国家标准方法在乳制品商业无菌检测中的应用对比研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(18): 211–219.
Liu Na, Wang Yaping, Meng Yun, et al. Comparative study on the application of Bact/Alert 3D microbial detection system and national standard methods for commercial sterility testing in dairy products [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(18): 211–219. (in Chinese with English abstract).

Bact/Alert 3D 微生物检测系统与国家标准方法在乳制品商业无菌检测中的应用对比研究

刘 娜[1], 王亚萍[1], 孟 云[2], 李景云[1*]
[1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 梅里埃诊断产品(上海)有限公司, 上海 201315]

摘 要: 目的 对比研究 Bact/Alert 3D 微生物检测系统法(简称仪器法)在检测超高温瞬时杀菌(ultra-high temperature instantaneous sterilization, UHT)乳纯牛奶和常温酸奶商业无菌项目, 以国家标准方法为参考。**方法** 通过对 36 种微生物进行适用性测试, 评价仪器法的包容性; 通过 GB 4789.26—2023《食品安全国家标准 食品微生物学检验 商业无菌检验》(简称国标法)与仪器法对比检测地衣芽孢杆菌人工污染的 UHT 纯牛奶和白色念珠菌人工污染的常温酸奶, 通过 50%检出限(50% limit of detection, LOD_{50})比较两种方法的灵敏度与检出时效, 评价仪器法的灵敏性; 并对灵敏性在 5 个实验室间进行验证。**结果** 仪器法对 36 种微生物的包容性为 100%; 仪器法在 UHT 纯牛奶(地衣芽孢杆菌)中的 LOD_{50} 略低于国标法, 在常温酸奶(白色念珠菌)中 LOD_{50} 略高于国标法; 仪器法阳性检出时间短于国标法。**结论** 仪器法对测试的 36 种微生物具有良好的适用性; 在检测乳制品灵敏度时, 会依据样品基质的不同与国标法略存在差异, 但时效性优于国标法。

关键词: Bact/Alert 3D; 商业无菌; 超高温瞬时杀菌纯牛奶; 常温酸奶; 方法对比
中图分类号: TS252.7 **文献识别码:** A **文章编号:** 2095–0381(2026)18–0211–09

Comparative study on the application of Bact/Alert 3D microbial detection system and national standard methods for commercial sterility testing in dairy products

LIU Na[1], WANG Ya-Ping[1], MENG Yun[2], LI Jing-Yun[1*]
[1. *National Institute for Food and Drug Control*, *Beijing* 100050, *China*; 2. *BioMérieux* (*Shanghai*) *Company Limited*, *Shanghai* 201315, *China*]

ABSTRACT: Objective To comparatively study the Bact/Alert 3D microbiological detection system method (referred to as the instrument method) in the detection of commercial sterility items of ultra-high temperature instantaneous (UHT) sterilized milk, pure milk and room-temperature yogurt, with reference to the national standard

收稿日期: 2026-04-16
基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1103100)
第一作者: 刘娜(1988—), 女, 副研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: xinyiliuna@163.com
***通信作者:** 李景云(1972—), 男, 主任技师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: lijingyun@nifdc.org.cn

methods. **Methods** The inclusivity of the instrument method was assessed by performing suitability tests on 36 kinds of microbial species. The sensitivity and detection time of the 2 methods were compared by detecting UHT pure milk artificially contaminated with *Bacillus licheniformis* and room-temperature yogurt artificially contaminated with *Candida albicans* using the GB 4789.26—2023 *National food safety standard-Food microbiological examination-Commercial sterility testing* (national standard method) and the instrument method; sensitivity was compared using 50% limit of detection (LOD_{50}), and the detection timeliness was evaluated. Additionally, the sensitivity was validated across 5 laboratories. **Results** The instrument method demonstrated 100% inclusivity for the 36 kinds of microbial species tested. The LOD_{50} of the instrument method was slightly lower than that of the national standard method for UHT pure milk with *Bacillus licheniformis*, but slightly higher for room-temperature yogurt with *Candida albicans*. The time to positivity for the instrument method was significantly shorter than that of the national standard method. **Conclusion** The instrument method shows good applicability for the 36 kinds of microbial species tested. While there are slight differences in sensitivity compared to the national standard method depending on the sample matrix, the instrument method offers superior timeliness.

KEY WORDS: Bact/Alert 3D; commercial sterility; ultra-high temperature instantaneous sterilized pure milk; room-temperature yogurt; method comparison

0 引 言

商业无菌[1]是评价乳制品安全性[2]与货架期稳定性[3]的关键指标，尤其对于超高温瞬时杀菌(ultra-high temperature instantaneous sterilization, UHT)乳纯牛奶(UHT纯牛奶)[4]和常温酸奶等长保质期产品[5]，确保其商业无菌状态是保障消费者健康和企业产品质量的核心要求[6]。我国现行 GB 4789.26—2023《食品安全国家标准 商业无菌检验》(简称国标法)主要通过保温后观察样品是否出现膨胀、pH 变化、重量变化及镜检微生物增殖等现象[7]来判断产品是否达到商业无菌要求[8]。该方法虽具有操作规范、结果明确的优点，但仍存在检测周期较长(通常需 10 d)[9]、结果判定依赖人工经验(如镜检主观性较强)、难以实现高通量检测等问题，难以满足现代乳制品行业对快速、自动化、标准化检测的需求[10]。

近年来，基于腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)[11]等微生物代谢产物的快检技术在食品和乳制品微生物检测领域逐步得到应用[12]，不断优化的聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术[13]、流式细胞术[14−16]、免疫学[16]、纳米技术[17]等技术促进了微生物检验的发展。然而，在乳制品商业无菌检测中，ATP 生物发光法虽快速简便，但只能反映总微生物代谢活性，且乳制品中残留的 ATP 或乳清成分易产生背景干扰；PCR 技术灵敏度高，但无法区分死活菌，且乳制品中的高蛋白、高脂肪及金属离子可能抑制扩增反应；流式细胞术可实现单细胞水平分析，但样品前处理(如脂肪去除、菌体染色)耗时较长，难以满足高通量检测需求；免疫学方法特异性强，但需针对特定菌种制备抗体，覆盖谱窄；纳米技术等新型传感方法多处于实验室研究阶段。而 Bact/Alert 3D 微生物检测系统[18]采用比色传感器连续监测培养瓶中 CO_2 产生引起的颜色变化，从而自动判断微生物生长状态，具有操作自动化、结果客观、检测时间短等优势[19]。目前，该系统已广泛应用于临床血培养及部分食品病原菌检测[20]，但在乳制品商业无菌检测领域的系统性能评价研究仍较为有限，尤其缺乏针对不同乳制品基质及典型污染菌的对比研究数据。

本研究通过 Bact/Alert 3D 微生物检测系统测试多个种属评价仪器的包容性，进一步选取地衣芽孢杆菌和白色念珠菌作为代表性污染菌，分别模拟 UHT 纯牛奶中常见的芽孢污染和常温酸奶中可能出现的真菌污染，系统比较 Bact/Alert 3D 系统与国标法在检测灵敏度、检出时效及多实验室可重复性方面的差异，旨在为乳制品行业引入更高效、可靠的商业无菌检测方法提供科学依据，也为相关检测标准的更新与补充提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 菌 株

本研究用到的菌株详见表 1，依据常见食源性致病菌污染情况及食品安全意义，选取了 10 株革兰氏阴性杆菌，6 株革兰氏阳性菌、6 株芽孢菌、5 株益生菌、5 株霉菌以及 4 株细菌样真菌。菌株序号为 28~29 菌株为实验室分离的丝状真菌，其他菌株均来自于中国医学细菌菌种保藏管理中心(National Center for Medical Culture Collections, CMCC)。

1.2 材料与试剂

UHT 杀菌乳纯牛奶(UHT 纯牛奶)、纯甄 0 添加经典原味酸奶(常温酸奶)(中国蒙牛乳业)。

iAST 工业标准需氧培养瓶(iAST 培养瓶)、iLYM 工业真菌培养瓶(iLYM 培养瓶)(法国梅里埃公司)；平板计数琼

脂(plate count agar, PCA)培养基、马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基(247940, 美国 BD 公司); Bruker 标准溶剂(美国 Sigma-Aldrich 公司); α-氰基-4-羟基肉桂酸(α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, HCCA)(德国 Bruker 公司); 甲酸(纯度 98%, 北京百灵威科技有限公司); 一次性塑料涂布棒(常德比克曼生物科技有限公司)。

1.3　仪器与设备

Bact/Alert 3D 微生物检测系统(法国梅里埃公司); NU-543-600S 生物安全柜(美国 Nuaire 公司); LT-IBX450F 微生物培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); autoflex 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry,

表 1　菌株信息表

Table 1　Information table of species

序号	菌株信息	选择依据/食品安全意义
1	大肠埃希氏菌 CMCC(B)44102	革兰氏阴性杆菌, 1~4 菌株为乳制品中需严格监控的致病菌或粪便污染指示菌, 5 菌株为乳制品中常见的产气腐败菌, 6~8 菌株为非无菌乳饮料中耐低营养、耐防腐剂的机会致病菌, 9 菌株为常见于乳品加工设备及水源中, 10 菌株为嗜盐致病菌, 可评估系统在高渗透压或非常规生长条件下的检测性能, 确保方法的广谱包容性
2	沙门氏菌 CMCC(B)50094	
3	福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572	
4	阪崎肠杆菌 CMCC(B)45416	
5	产气肠杆菌 CMCC(B)45107	
6	洋葱伯克霍尔德菌 CMCC(B)23005	
7	新洋葱伯克霍尔德菌 CMCC(B)23006	
8	神秘伯克霍尔德菌 CMCC(B)23010	
9	铜绿假单胞菌 CMCC(B)10104	
10	副溶血弧菌 CMCC(B)20033	
11	金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003	革兰氏阳性菌, 11 菌株为乳制品中常见的致病菌, 12 菌株具有耐热性可评价巴氏杀菌效果, 13~14 菌株广泛存在于乳品加工环境, 15 菌株是冷藏乳制品中极具威胁的食源性致病菌, 16 菌株可作为后者的生物安全替代菌
12	粪肠球菌 CMCC(B)32480	
13	表皮葡萄球菌 CMCC(B)26029	
14	藤黄微球菌 CMCC(B)28001	
15	单核细胞增生李斯特氏菌 CMCC(B)54012	
16	英诺克李斯特氏菌 CMCC(B)54103	
17	蜡样芽孢杆菌 CMCC(B)63303	芽孢菌, 17~18 菌株是乳制品中常见的芽孢菌, 19 菌株广泛存在于乳品环境, 20 菌株为近年从土壤中分离的潜在的芽孢污染源, 21 菌株乳制品“平盖酸败”的主要成因菌, 22 菌株为可污染 pH 较低乳制品的嗜酸耐热菌
18	地衣芽孢杆菌 CMCC(B)63552	
19	枯草芽孢杆菌 CMCC(B)63501	
20	人参土芽孢杆菌 CMCC(B)63612	
21	嗜热嗜脂肪地芽孢杆菌 CMCC(B)63509	
22	酸土脂环酸芽孢杆菌 ATCC10223	
23	植物乳杆菌 CMCC(B)34134	益生菌, 23~25 菌株为在乳制品中生长能力较强的兼性厌氧菌, 26 菌株代表低 pH 环境下仍具代谢活性的乳酸菌, 27 菌株为严格厌氧菌
24	副干酪乳杆菌 CMCC(B)34114	
25	干酪乳杆菌 CMCC(B)34135	
26	德氏乳杆菌保加利亚亚种 CMCC(B)34131	
27	长双歧杆菌婴儿亚种 CMCC(B)93905	
28	草酸青霉 FC14476	霉菌, 28~29 菌株为常见产毒丝状真菌, 30~32 环境中常见污染菌
29	桔青霉 CMCC(F)98028	
30	拟青霉 FC13400	
31	产黄青霉 CMCC(F)98801	
32	黑曲霉 CMCC(F)98003	
33	酿酒酵母 CMCC(F)98018	细菌样真菌, 33 菌株常温酸奶或含糖乳制品中若污染可引起产气、涨包、产醇, 34 菌株可在乳制品表面形成菌膜污染设备管道, 35 菌株导致乳制品脂解酸败, 36 菌株为可污染常温酸奶等乳制品的条件致病真菌
34	近平滑假丝酵母 CMCC(F)98010	
35	解脂耶氏酵母菌 CMCC(F)98025	
36	白色念珠菌 CMCC(F)98001	

MALDI-TOF MS)(德国 Bruker 公司); BX61 显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 菌种冻干

本研究采用冻干菌作为人工污染菌株进行测试, 冻干处理的主要目的是实现菌株的标准化保存和稳定化定量, 便于多实验室间统一发放和使用。分别取 36 种微生物新鲜培养物加入冻干保护剂中, 20 μL/瓶加入经烘烤灭菌的西林瓶中, –40 ℃预冻 2 h 后, 用冷冻干燥机干燥 16 h。通过平板计数法计数冻干品中的活菌浓度, 冻干后的样品于 –40 ℃保存备用。

1.4.2 仪器法包容性测试

取 36 种微生物冻干品各 1 瓶, 用 1 mL 生理盐水溶解, 依据各微生物的计数浓度分别稀释至 10^1~10^2 CFU/mL, 用无菌注射器吸取 10 mL 菌悬液分别注入 iAST 培养瓶和 iLYM 培养瓶中, 用仪器法进行检测。两种培养瓶培养基成分有差异, 前者主要用于细菌检测, 后者则用于真菌。

1.4.3 仪器法与国标法灵敏性测试

GB 4789.45—2023《食品安全国家标准 微生物检验方法验证通则》要求“实验室内验证时, 至少测试 20 个平行样品”。为此, 本研究选择设置 3 个浓度, 为更好测试 2 种方法灵敏度, 最低浓度分别设置 30 个平行。

用地衣芽孢杆菌 CMCC(B)63552 冻干品人工污染 UHT 纯牛奶, 其中 10^{-2} CFU/mL(低浓度)污染浓度 30 份, 10^{-1} CFU/mL(中浓度)污染浓度 20 份, 10^{0} CFU/mL(高浓度)污染浓度 20 份, 用仪器法检测。具体操作如下: 在生物安全柜内用无菌注射器吸取 10 mL 待测样品注入适宜培养瓶中, 即 3 个浓度的每个培养瓶中含有活菌数目的理论值分别为 0~1、1~10、10~100 CFU, 然后将培养瓶置于仪器中 36 ℃培养 5 d 进行检测。本研究中 UHT 纯牛奶选用 iAST 培养瓶, 常温酸奶选用 iLYM 培养瓶。另外制备 10^{-1} CFU/包装(低浓度)污染浓度 30 份, 10^{0} CFU/包装(中浓度)污染浓度 20 份, 10^{1} CFU/包装(高浓度)污染浓度 20 份, 即 3 个浓度的每个包装中含有活菌数目的理论值分别为 0~1、1~10、10~100 CFU, 然后用国标法检测, 将样品置于 36 ℃保温 10 d, 观察膨胀、pH、重量变化, 并进行镜检确认。

根据泊松分布原理, 当每份样品平均污染量低于 1 CFU(低浓度为 0.6 CFU)时, 部分样品可能实际未分配到活菌, 因此理论最大检出率低于 100%。

按上述方法与浓度, 用白色念珠菌人工污染常温酸奶后分别用仪器法和国标法进行检测。

1.4.4 实验室间验证

组织 5 家实验室(A~E)按 1.4.3 部分进行方法验证, 各家实验室在低浓度和中浓度水平分别检测 5 份样品。

1.5 数据处理

依据 GB 4789.45—2023, 选取检出率在 25%~75%的污染水平, 计算 50%检出限(50% limit of detection, LOD_{50}), 计算见公式(1):

$$LOD_{50}=\frac{0.7\times d\times m}{\ln[n/(n-y)]} \tag{1}$$

式中: d 为样品的染菌浓度, CFU/mL; m 为试样量, g/mL; n 为测试总量; y 为阳性结果数。

为评价估计值的可靠性, 使用 SPSS 18.0 软件计算 LOD_{50} 95%置信区间, 对阳性率($p=y/n$)建立 Clopper-Pearson 精确二项置信区间[p_L, p_U], 计算见公式(2)和(3):

$$LOD_{50,L}=\frac{0.7\times d}{\ln(1-p_U)} \tag{2}$$

$$LOD_{50,U}=\frac{0.7\times d}{\ln(1-p_L)} \tag{3}$$

式中: p_U 和 p_L 分别为置信上限和置信下限。

2 结果与分析

2.1 仪器法对 36 个种属菌株包容性测试结果

仪器法对 36 种测试微生物的包容性为 100% (36/36), 对不同菌种的报阳时间存在一定差异, 其中对 15 种细菌的报阳时间小于 1 d, 对 4 种真菌和 6 种细菌的报阳时间介于 1~2 d 之间, 对 4 种真菌和 6 种细菌的报阳时间介于 3~4 d 之间, 对草酸青霉菌的报阳时间超过 4 d(表 2)。

报阳时间小于 1 d 的菌株包括蜡样芽孢杆菌、大肠埃希氏菌、阪崎肠杆菌、枯草芽孢杆菌、产气肠杆菌、副溶血弧菌、沙门氏菌、粪肠球菌、地衣芽孢杆菌、福氏志贺氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌等, 该些菌在 35 ℃培养条件下生长旺盛, 可快速产生 CO_2。白色念珠菌、新洋葱伯克霍尔德菌、洋葱伯克霍尔德菌、藤黄微球菌、酸土脂环酸芽孢杆菌、近平滑假丝酵母、黑曲霉、植物乳杆菌、酿酒酵母、副干酪乳杆菌报阳时间为 1~2 d, 该组以酵母和霉菌为主, 其生长速率低于多数细菌; 伯克霍尔德菌属中两株(新洋葱、洋葱)报阳较快, 但神秘伯克霍尔德菌明显滞后, 提示种间差异。报阳时间为 2~5 d 的菌株包括拟青霉、神秘伯克霍尔德菌、人参土芽孢杆菌、嗜热嗜脂肪地芽孢杆菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种、长双歧杆菌婴儿亚种、干酪乳杆菌、桔青霉、产黄青霉、解脂耶氏酵母菌以及最慢的草酸青霉, 其中的嗜热嗜脂肪地芽孢杆菌为极耐热芽孢菌, 在 35 ℃(低于其最适温度 55 ℃)条件下萌发缓慢; 德氏乳杆菌保加利亚亚种、干酪乳杆菌以及长双歧杆菌具有耐酸性, 且本身生长较慢, 故在中性的培养瓶中报阳时间较长; 霉菌为丝状生长。

表 2　仪器法对 36 种微生物包容性测试结果

Table 2　Inclusivity results of the instrument method for 36 kinds of microbial species

序号	菌株信息	结果	报阳时间/d	序号	菌株信息	结果	报阳时间/d
1	蜡样芽孢杆菌 CMCC(B)63303	+	0.40	20	酸土脂环酸芽孢杆菌 ATCC10223	+	1.28
2	大肠埃希氏菌 CMCC(B)44102	+	0.44	21	近平滑假丝酵母 CMCC(F)98010	+	1.44
3	阪崎肠杆菌 CMCC(B)45416	+	0.45	22	黑曲霉 CMCC(F)98003	+	1.53
4	枯草芽孢杆菌 CMCC(B)63501	+	0.46	23	植物乳杆菌 CMCC(B)34134	+	1.61
5	产气肠杆菌 CMCC(B)45107	+	0.49	24	酿酒酵母 CMCC(F)98018	+	1.75
6	副溶血弧菌 CMCC(B)20033	+	0.49	25	副干酪乳杆菌 CMCC(B)34114	+	1.79
7	沙门氏菌 CMCC(B)50094	+	0.51	26	拟青霉 FC13400	+	3.56
8	粪肠球菌 CMCC(B)32480	+	0.53	27	神秘伯克霍尔德菌 CMCC(B)23010	+	3.91
9	地衣芽孢杆菌 CMCC(B)63552	+	0.55	28	人参土芽孢杆菌 CMCC(B)63612	+	3.91
10	福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572	+	0.57	29	嗜热嗜脂肪地芽孢杆菌 CMCC(B)63509	+	3.91
11	单核细胞增生李斯特氏菌 CMCC(B)54012	+	0.73	30	德氏乳杆菌保加利亚亚种 CMCC(B)34131	+	3.91
12	英诺克李斯特氏菌 CMCC(B)54103	+	0.73	31	长双歧杆菌婴儿亚种 CMCC(B)93905	+	3.91
13	金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003	+	0.77	32	干酪乳杆菌 CMCC(B)34135	+	3.91
14	表皮葡萄球菌 CMCC(B)26029	+	0.79	33	桔青霉 CMCC(F)98028	+	3.91
15	铜绿假单胞菌 CMCC(B)10104	+	0.82	34	产黄青霉 CMCC(F)98801	+	3.91
16	白色念珠菌 CMCC(F) 98001	+	1.04	35	解脂耶氏酵母菌 CMCC(F)98025	+	3.91
17	新洋葱伯克霍尔德菌 CMCC(B)23006	+	1.07	36	草酸青霉 FC14476	+	4.05
18	洋葱伯克霍尔德菌 CMCC(B)23005	+	1.13	37	阴性对照	-	观察 5
19	藤黄微球菌 CMCC(B)28001	+	1.16				

注: +表示结果阳性, -表示结果阴性。

长, 产 CO_2 速率低于单细胞微生物, 故报阳普遍较慢; 而神秘伯克霍尔德菌, 相比同属的洋葱和新洋葱伯克霍尔德菌, 其生长速率明显偏低, 可能与菌株特异性代谢缺陷或营养需求有关; 人参土芽孢杆菌为新分离的土壤来源芽孢杆菌, 在乳制品模拟体系中的适应性未知, 报阳较慢可能反映其嗜温或特殊营养需求; 解脂耶氏酵母菌慢于酿酒酵母和近平滑假丝酵母, 可能与其产脂肪酶、代谢偏好有关。

2.2　仪器法与国标法测试人工污染基质灵敏度结果

2.2.1　地衣芽孢杆菌人工污染的 UHT 纯牛奶测试结果

仪器法对低浓度(0.6 CFU/瓶)染菌的 30 份样品检出率为 63.3% (19/30), 符合预期范围。对中浓度(6.0 CFU/瓶)和高浓度(60.0 CFU/瓶)染菌样品的检出率均为 100% (20/20), 结果见表 3。据此结果计算, 仪器法的 LOD_{50} 为 0.42 CFU (95%置信区间 0.26~0.72 CFU)。

依据国标法(表 4), 阴性对照未出现膨胀现象, pH 为 6.70。3 个浓度人工污染样品均出现未见膨胀的现象。低浓度(0.6 CFU/包装)样品镜检检出率为 50% (15/30), 符合预期范围; pH 介于 6.61~6.67 之间。中浓度(6.0 CFU/包装)和高浓度(60.0 CFU/包装)污染样品镜检检出率为 100% (20/20), pH 分别介于 6.42~6.60、6.25~6.66 之间。据此结果计算, 国标法的 LOD_{50} 为 0.61 CFU (95%置信区间 0.35~1.13 CFU)。

2.2.2　白色念珠菌人工污染的常温酸奶测试结果

仪器法对低浓度(0.6 CFU/瓶)染菌的 30 份样品检出率为 50% (15/30), 符合预期范围。对中浓度(6.0 CFU/瓶)和高浓度(60.0 CFU/瓶)染菌样品的检出率均为 100% (20/20), 结果见表 5。据此结果计算, 仪器法的 LOD_{50} 为 0.61 CFU (95%置信区间 0.36~1.15 CFU)。

依据国标法(表 6), 阴性对照未出现膨胀现象, pH 为 4.36, 重量为 213.86 g。低浓度(0.6 CFU/包装)染菌样品第 4 d 开始有膨胀现象出现, 至第 10 d 共计 60% (18/30)样品出现膨胀现象, 膨胀样品镜检均为阳性, 符合预期范围; pH 介于 4.31~4.36 之间。中浓度(6.0 CFU/包装)和高浓度(60.0 CFU/包装)染菌样品至第 4 d 为 100% (20/20)出现膨胀现象且镜

检均为阳性, pH 介于 4.31~4.34 之间。据此结果计算, 国标法的 LOD_{50} 为 0.46 CFU (95%置信区间 0.28~0.81 CFU)。

2.3 仪器法与国标法测试人工污染基质灵敏度实验室间验证结果

2.3.1 5 家实验室对地衣芽孢杆菌人工污染的 UHT 纯牛奶测试结果

5 家实验室用地衣芽孢杆菌人工污染 UHT 纯牛奶的检测结果见表 7。染菌水平为 0.6 CFU/瓶时, 仪器法对 40 份样品的检出率为 57.5% (23/40), 符合预期范围。据此计算 LOD_{50} 为 0.49 CFU (95%置信区间 0.32~0.80 CFU), 检出阳性时间为 0~2 d; 染菌水平为 6.0 CFU/瓶时, 仪器法对 40 份样品的检出率为 100% (40/40), 检出阳性时间为 0~1 d。

染菌水平为 0.6 CFU/包装时, 国标法对 40 份样品的检出率为 50.0% (20/40), 符合预期范围。据此计算 LOD_{50} 为 0.60 CFU (95%置信区间 0.39~1.00 CFU); 染菌水平为 6.0 CFU/包装时, 仪器法对 40 份样品的检出率为 100% (40/40), 结果见表 8。2 个染菌水平样品在(36±1) ℃保温 10 d 均未见膨胀现象。

表 3 仪器法对地衣芽孢杆菌人工污染 UHT 纯牛奶灵敏度检测结果

Table 3 Sensitivity results of UHT pure milk artificially contaminated with *Bacillus licheniformis* by the instrument method

污染水平/(CFU/瓶)	报阳数量/d					阳性率/%
	0~1	1~2	2~3	3~4	4~5	
0.6 (*n*=30)	10	8	0	1	0	63.3
6.0 (*n*=20)	20	0	0	0	0	100.0
60.0 (*n*=20)	20	0	0	0	0	100.0

表 4 国标法对地衣芽孢杆菌人工污染 UHT 纯牛奶灵敏度检测结果

Table 4 Sensitivity results of UHT pure milk artificially contaminated with *Bacillus licheniformis* by the national standard method

污染水平/(CFU/包装)	开始膨胀时间/d	阳性数量	样品总数	阳性率/%	pH	重量/g
0.6 (*n*=30)	未见膨胀	15	30	50	6.61~6.67	217.28~217.54
6.0 (*n*=20)	未见膨胀	20	20	100	6.42~6.60	217.44~217.54
60.0 (*n*=20)	未见膨胀	20	20	100	6.25~6.66	217.63~218.01
0(阴性对照)	未见膨胀	/	/	/	6.70	216.75

注: /为未出现, 下同。

表 5 仪器法对白色念珠菌人工污染常温酸奶灵敏度检测结果

Table 5 Sensitivity results of room-temperature yogurt artificially contaminated with *Candida albicans* by the instrument method

污染水平/(CFU/瓶)	报阳数量/d					阳性率/%
	0~1	1~2	2~3	3~4	4~5	
0.6 (*n*=30)	0	15	0	0	0	50
6.0 (*n*=20)	0	20	0	0	0	100
60.0 (*n*=20)	18	2	0	0	0	100

表 6 国标法检测白色念珠菌人工污染常温酸奶灵敏度结果

Table 6 Sensitivity results of room-temperature yogurt artificially contaminated with *Candida albicans* by the national standard method

污染水平/(CFU/包装)	开始膨胀时间/d	阳性数量	样品总数	阳性率/%	pH	重量/g
0.6 (*n*=30)	4	18	30	60	4.31~4.36	211.07~214.29
6.0 (*n*=20)	3	20	20	100	4.31~4.34	212.28~213.73
60.0 (*n*=20)	3	20	20	100	4.31~4.33	213.16~213.85
阴性对照	未见膨胀	/	/	/	4.36	213.86

表 7 5 家实验室用仪器法检测地衣芽孢杆菌人工污染 UHT 纯牛奶的灵敏度结果

Table 7 Sensitivity results of UHT pure milk artificially contaminated with *Bacillus licheniformis* by the instrument method across 5 laboratories

人工污染水平/(CFU/瓶)	测定结果/(阳性数量/总数)					LOD_{50}
	A	B	C	D	E	
0.6	5/8	5/8	4/8	4/8	5/8	0.49
6.0	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	/

2.3.2 5 家实验室对白色念珠菌人工污染的常温酸奶测试结果

5 家实验室用白色念珠菌人工污染常温酸奶的检测结果见表 9。染菌水平为 0.6 CFU/瓶时, 仪器法对 40 份样品的检出率为 45.0% (18/40), 符合预期范围。据此计算 LOD_{50} 为 0.70 CFU (95%置信区间 0.44~1.22 CFU), 检出阳性时间为 0~3 d; 染菌水平为 6.0 CFU/培养瓶时, 仪器法对 40 份样品的检出率为 100% (40/40), 检出阳性时间均为 0~2 d。

表 8　5 家实验室用国标法检测地衣芽孢杆菌人工污染 UHT 纯牛奶的灵敏度结果

Table 8　Sensitivity results of UHT pure milk artificially contaminated with *Bacillus licheniformis* by the national standard method across 5 laboratories

人工污染水平/(CFU/包装)	测定结果/(阳性数量/总数)					LOD_{50}
	A	B	C	D	E	
0.6	4/8	4/8	4/8	4/8	4/8	0.60
6.0	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	/

染菌水平为 0.6 CFU/包装时, 国标法对 40 份样品的检出率为 52.5% (24/40), 符合预期范围。据此计算 LOD_{50} 为 0.46 CFU (95%置信区间 0.30~0.74 CFU), 在(36±1) ℃保温第 3 d 开始出现膨胀现象; 染菌水平为 6.0 CFU/包装时, 国标法对 40 份样品的检出率为 100% (40/40), 在(36±1) ℃保温第 2 d 开始出现膨胀现象, 结果见表 10。

表 9　5 家实验室用仪器法检测白色念珠菌人工污染常温酸奶的灵敏度结果

Table 9　Sensitivity results of room-temperature yogurt artificially contaminated with *Candida albicans* by the instrument method across 5 laboratories

人工污染水平/(CFU/瓶)	测定结果/(阳性数量/总数)					LOD_{50}
	A	B	C	D	E	
0.6	4/8	4/8	3/8	4/8	3/8	0.70
6.0	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	/

表 10　5 家实验室用国标法检测白色念珠菌人工污染常温酸奶的灵敏度结果

Table 10　Sensitivity results of room-temperature yogurt artificially contaminated with *Candida albicans* by the national standard method across 5 laboratories

人工污染水平/(CFU/包装)	测定结果/(阳性数量/总数)					LOD_{50}
	A	B	C	D	E	
0.6	5/8	5/8	4/8	5/8	5/8	0.46
6.0	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	/

3　讨论与结论

本研究系统评价了仪器法在 UHT 纯牛奶和常温酸奶商业无菌检测中的适用性, 并与国标法进行了对比。结果表明, 仪器法对 36 种代表性微生物的包容性为 100%, 表现出广泛的适用性。在灵敏度方面, 仪器法对地衣芽孢杆菌污染 UHT 纯牛奶的 LOD_{50} 略低于国标法，即稍优于国标法; 而对白色念珠菌污染常温酸奶的 LOD_{50} 略高，即稍逊于国标法。时效性方面, 仪器法所有阳性样品的报阳时间均短于国标法。多实验室验证结果显示, 仪器法具有良好的重复性与稳定性, 进一步证实了其在实际应用中的可行性。

仪器法在 UHT 纯牛奶中灵敏度优于国标法, 可能与检测原理差异有关。仪器法通过监测微生物代谢产生的 CO_2 捕捉生长信号, 尤其在低浓度污染时表现出较高的检出能力。而国标法主要依赖保温后样品是否出现产气、产酸等肉眼可见变化, 对于不产气或产气量较少的菌株(如地衣芽孢杆菌)可能存在漏检风险。本研究也观察到, 国标法检测地衣芽孢杆菌污染样品时未见膨胀现象, 仅能通过镜检和 pH 变化间接判定, 且镜检对操作人员经验要求较高。

仪器法在常温酸奶基质中对白色念珠菌的灵敏度略低于国标法, 这可能与取样量和样品基质有关。仪器法每瓶取样 10 mL, 而国标法采用全包装保温而检出概率可能更高。常温酸奶黏度较高, 可能影响菌体的均匀分布, 进而对仪器法小体积取样的一致性造成一定干扰。上述结果表明, 仪器法的检测性能受样品基质和取样量的影响, 在实际应用中应根据产品特点优化检测方案。

仪器法在检出时效性方面的优势对乳制品生产企业具有重要实际意义。传统国标法需 10 d 保温观察, 而仪器法在 5 d 内即可完成检测, 缩短了产品放行周期, 有助于降低库存压力, 提升生产效率。此外, 仪器法结果自动判读, 避免了人工镜检的主观误差, 符合现代实验室自动化、标准化的发展方向。

本研究也存在一定局限性。首先, 研究所用人工污染样品均为冻干菌株, 与自然污染样品的复杂性仍有差异[21]; 其次, 仅选取了两种代表性基质和两种典型污染菌[22], 即地衣芽孢杆菌和白色念珠菌作为代表性污染菌, 虽覆盖了乳制品商业无菌检验中两类最重要的污染类型(芽孢菌与真菌)及两类主流长保质期产品(UHT 纯牛奶和常温酸奶), 但未能包含所有乳制品类型及潜在污染微生物[23]; 再次, 多实验室验证中各家实验室使用的仪器、培养瓶及操作人员可能存在一定差异, 虽未影响整体结论, 但仍需在实际应用中持续关注方法的稳健性。在后续研究中需进一步拓展至更多乳制品类型及多种潜在污染菌的适用性验证, 以及规范操作流程, 降低人员误差。

综上所述, Bact/Alert 3D 微生物检测系统在 UHT 纯牛奶和常温酸奶的商业无菌检测中表现出良好的包容性、灵敏度和时效性。然而, 仪器法的检测成本和设备要求高于国标法, 对于寻求时效性的大型企业, 可作为国标法的潜在补充方案。在后续研究中应进一步拓展, 在自然污染样品验证方面, 收集实际生产中出现商业无菌不合格的留样产品, 对比两种方法的检测一致性, 以补充人工污染实验的不足; 在复杂污染场景模拟方面, 开展多种乳制品基质中混合菌污染和低水平持续污染的适用性[24]; 同时探索优化取样量、培养瓶类型及检测流程[25], 以及横向比较不同技术在复杂基质[26]中的检测性能[27], 如免疫学[28]、流式细胞术[29]、纳米技术[30]等, 为乳制品行业提供更加高效、可靠的商业无菌检测解决方案。

参考文献

[1] Wang Xiya, Su Bin, Geng Fengzhen, et al. Detection and identification approaches of psychrotrophic bacteria in raw milk and dairy products: a review [J]. Food Chemistry, 2026, 498: 147263.

[2] 朱盼盼. 常温奶酪加工技术研究及产品货架期稳定性评价[D]. 银川: 宁夏大学, 2022: 1-2.
Zhu Panpan. Processing technology and shelf life stability prediction of room temperature cheese [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2022: 1-2.

[3] Li Hongjuan, You Hexin, Li Mengfan, et al. Impact of cold-chain interruption on the stability and quality of pasteurized milk: physical, enzymatic, and microbial insights [J]. Journal of Food Science, 2025, 90(12): e70731.

[4] 梁俊健, 林淑仪, 朱震, 等. 超高温灭菌乳的无菌包装概念与工艺质控[J]. 中国乳业, 2021(6): 79–82.
Liang Junjian, Lin Shuyi, Zhu Zhen, et al. Aseptic packaging concept and process quality control of ultra-high temperature sterilized milk [J]. China Dairy, 2021(6): 79–82.

[5] Xu Jinyu, Hei Xue, Zheng Mumin, et al. Effect of heat-resistant protease from psychrotrophic bacteria in raw milk on shelf-life quality of UHT milk [J]. Food Control, 2026, 183: 111927.

[6] 蔡亚洁, 乌日娜, 周津羽, 等. 乳制品中有害微生物检测新技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(1): 41–47.
Cai Yajie, Wu Rina, Zhou Jinyu, et al. Research progress in new technologies for detecting harmful microorganisms in dairy products [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(1): 41–47.

[7] 东思源, 仇凯, 孟镇, 等. 食品商业无菌国内外标准法规对比研究及标准化工作思考[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(22): 305–310.
Dong Siyuan, Qiu Kai, Meng Zhen, et al. Comparative study on Chinese and foreign standards and regulations for commercial sterility in foods and consideration of relevant standardization work [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(22): 305–310.

[8] 苏涛, 毛永杨, 田金兰, 等. 食品安全标准中微生物检验指标的问题分析及建议[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(9): 2801–2807.
Su Tao, Mao Yongyang, Tian Jinlan, et al. Analysis and suggestion on microbiological examination index in food safety standard [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(9): 2801–2807.

[9] 胡凤月, 周燕霞, 巩有博, 等. 灭菌乳中嗜热脂肪芽孢杆菌商业无菌的最低可视浓度的测定[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9409–9414.
Hu Fengyue, Zhou Yanxia, Gong Youbo, et al. Determination of the lowest visible concentration of commercial sterility of *Geobacillus stearothermophilus* in sterilized milk [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(24): 9409–9414.

[10] 房玉国, 王克新, 张丽宏, 等. 灭菌乳商业无菌检验方法的探讨[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(1): 29–30.
Fang Yuguo, Wang Kexin, Zhang Lihong, et al. The probe about examination method of commercial sterilization of sterilized [J]. China Dairy Industry, 2002, 30(1): 29–30.

[11] 林木娣, 黄诗韵, 杨爱君, 等. Promicol ATP 微生物快速检测系统在UHT 灭菌奶商业无菌检测上的应用研究[J]. 中国乳业, 2017(6): 69–74.
Lin Mudi, Huang Shiyun, Yang Aijun, et al. The application of promicol ATP microbial rapid detection system in UHT milk commercial sterility test [J]. China Dairy, 2017(6): 69–74.

[12] Liang Lijiao, Wang Ping, Zhao Xiaomei, et al. Metabolomics aided by machine learning *Decodes* adaptive remodeling of *Bacillus* biofilms in response to pasteurization stress [J]. npj Science of Food, 2026, 10: 62.

[13] 肖沙, 赵格, 赵建梅, 等. 生鲜乳中 16 种致病微生物多重荧光定量 PCR 集成检测技术的建立与初步应用[J]. 中国动物检疫, 2024, 41(7): 86–95, 116.
Xiao Sha, Zhao Ge, Zhao Jianmei, et al. Establishment and application of multiplex integrated qPCR system for 16 kinds of pathogenic microorganisms in raw milk [J]. China Animal Health Inspection, 2024, 41(7): 86–95, 116.

[14] 刘婷婷. 流式细胞术在微生物检测中应用研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2021: 2-6.
Liu Tingting. Application of flow cytometry in microorganism detection [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2021: 2-6.

[15] 刘娜, 王亚萍, 李景云, 等. 基于流式细胞仪提高乳制品商业无菌检验时效性的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(20): 131–139.
Liu Na, Wang Yaping, Li Jingyun, et al. Research on improving the timeliness of commercial sterile testing of dairy products based on flow cytometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(20): 131–139.

[16] 苏娜, 明亮, 何静, 等. 免疫检测技术在食源性致病菌中的应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(12): 343–352.
Su Na, Ming Liang, He Jing, et al. Research progress on application of immunoassays in foodborne pathogens [J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(12): 343–352.

[17] 王亦纯, 张迎弟, 陈鹭庆, 等. 纳米酶在食源性病原微生物检测中的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(12): 89–101.
Wang Yichun, Zhang Yingdi, Chen Luqing, et al. Recent application progress on nanozymes for foodborne pathogenic microorganisms detection [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(12): 89–101.

[18] BioMérieux. Validation of the BacT/ALERT® 3D system for sterility testing of pharmaceutical products [J]. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 2021, 75(4): 342–356.

[19] Jimenez L, Rana N, Amalraj J, et al. Validation of the BacT/ALERT(R) 3D system for rapid sterility testing of biopharmaceutical samples [J]. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 2012, 66(1): 38–54.

[20] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia,10th Edition, Supplement 10.5, Chapter 2. 6. 27: Microbiological examination of cell-based preparations automated growth-based methods for sterility testing[M]. Strasbourg: Council of Europe, 2021, 5665-5667 .

[21] Li Bolin, Flint S, Palmer J, et al. On farm cleaning-in-place (CIP) vs multi-species biofilm: rethinking hygiene strategies in raw milk bulk tanks [J]. International Dairy Journal, 2026, 176: 106560.

[22] Cheng Jingqi, Gao Yue, Liu Jingxun, et al. Effect of heat-resistant protease of *Pseudomonas fluorescens* on the quality of liquid milk: a

physicochemical and proteomic perspective [J]. Journal of Dairy Science, 2026, 109(2): 1052–1064.

[23] 王一恬. 荧光假单胞菌耐热性蛋白酶特性及其对液态乳品质影响的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2023: 1-2.
Wang Yitian. Study on the characteristics of thermostable protease from *Pseudomonas fluorescens* and its effect on the quality of liquid milk [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2023: 1-2.

[24] Qi Yan, You Chunping. Emerging strategies for monitoring and mitigating *Pseudomonas* species contamination in milk and dairy food [J]. International Dairy Journal, 2026, 177: 106596.

[25] Lu Yuying, Wu Qian, Zhu Lei, et al. Dairy spoilage enzymes: a review of impacts and diagnostic tools [J]. Food Research International, 2026, 227: 118272.

[26] 张桐, 谢茂梅, 刘艺丹, 等. 三磷酸腺苷生物发光法在提高复杂样品细菌检测能力方面的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(14): 1–8.
Zhang Tong, Xie Maomei, Liu Yidan, et al. Research progress on the application of adenosine triphosphate bioluminescence method in improving the detection ability of bacteria in complex samples [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(14): 1–8.

[27] Marino F, Bonincontro C, Caligaris L, et al. Optimization of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid detection of nosocomial pathogens on environmental surfaces [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26(13): 5933.

[28] 王帅, 杨艳歌, 吴占文, 等. 重组酶聚合酶扩增、重组酶介导等温扩增及酶促重组等温扩增技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(9): 297–305.
Wang Shuai, Yang Yange, Wu Zhanwen, et al. A review of the application of recombinase polymerase amplification, recombinase-aided amplification and enzymatic recombinase amplification in rapid detection of foodborne pathogens [J]. Food Science, 2023, 44(9): 297–305.

[29] Servain-Viel S, Aknin M L, Domenichini S, et al. A flow cytometry method for safe detection of bacterial viability [J]. Cytometry Part A, 2024, 105(2): 146–156.

[30] 高家昊, 郦娟, 褚冲, 等. 纳米抗体在食源性微生物污染检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(9): 11–18.
Gao Jiahao, Li Juan, Chu Chong, et al. Application of nanobodies in the detection of foodborne microbial contamination [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(9): 11–18.

(责任编辑: 范彩旭　曹岱琳)