

团 体 标 准

T / CIFST 022—2024

食品中霉菌和酵母的快速检测 测试片法

Rapid enumeration of molds and yeasts in food
—Handy Plate method

2024-08-20 发布

2024-08-20 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》的规定起草。

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责任。

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：广东环凯生物科技有限公司、广东省科学院微生物研究所、华润怡宝饮料(中国)有限公司、上海康识食品科技有限公司、广东鼎湖山泉有限公司、安利(中国)日用品有限公司、黑龙江飞鹤乳业有限公司、无限极(中国)有限公司。

本文件主要起草人：万强、吴清平、张志刚、吴木生、周炯、蔡小钢、于畅游、李文治、吴深坚、曲晓莹、李兴、金颖、陈汉峰、杨宁、周勇、罗慧琳、孙旖旎。

食品中霉菌和酵母的快速检测 测试片法

1 范围

本文件规定了霉菌和酵母(molds and yeasts)的快速检测-测试片法。
本文件适用于食品及加工环境涂抹样品中霉菌和酵母的快速计数。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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 4789.15 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数
GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 设备和材料

- 3.1 电子天平:感量 0.1 g。
- 3.2 拍击式均质器及无菌均质袋。
- 3.3 涡旋混合器。
- 3.4 培养箱:28 °C±1 °C。
- 3.5 高压蒸汽灭菌器。
- 3.6 无菌锥形瓶:容量 500 mL。
- 3.7 pH 计或精密 pH 试纸:精密度 0.1。
- 3.8 无菌吸管:1 mL(0.01 mL 刻度)、10 mL(0.1 mL 刻度)。
- 3.9 无菌微量移液器及枪头:1 mL。
- 3.10 无菌试管:18 mm×180 mm。
- 3.11 Smartcounter[®]全自动菌落计数器。
- 3.12 不锈钢多联过滤系统。
- 3.13 单片无菌微生物分析滤膜(无菌滤膜):47 mm×0.45 μm。
- 3.14 不锈钢采样板:10 cm×10 cm。

4 培养基和试剂

- 4.1 Handy Plate[®]快速霉菌酵母测试片。
- 4.2 无菌磷酸盐缓冲液:见附录 A.1。
- 4.3 无菌生理盐水:见附录 A.2。
- 4.4 1 mol/L NaOH 溶液:见附录 A.3。
- 4.5 1 mol/L HCl 溶液:见附录 A.4。

4.6 EHK[®] HK-PBS 一次性采样管。

5 检验程序

霉菌酵母测试片法计数检验程序见图 1。

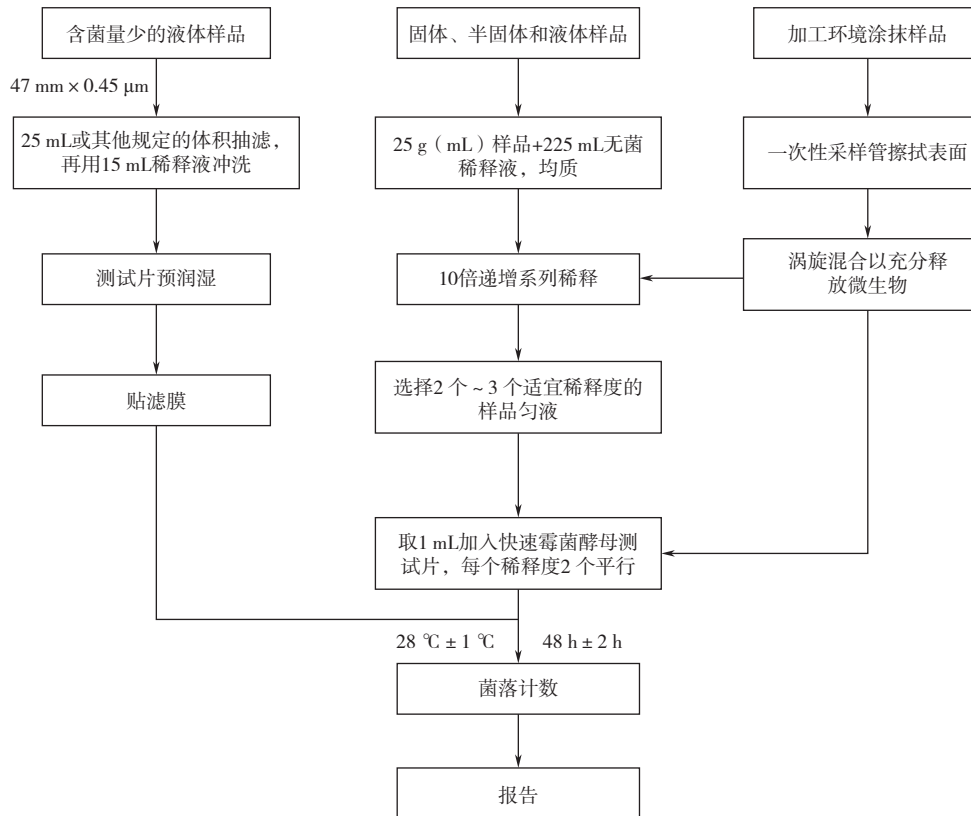


图 1 霉菌酵母测试片法计数检验程序

6 操作步骤

6.1 样品的稀释

6.1.1 固体、半固体和液体样品：取 25 g(mL)样品，置于盛有 225 mL 无菌稀释液(蒸馏水或生理盐水或磷酸盐缓冲液)的无菌锥形瓶中，充分振摇，或用拍击式均质器拍打 1 min~2 min，制成 1:10 的样品匀液。含有较高活性酶(如面粉、香精香料)或较深颜色色素(如酱油、可乐等)的样品，可加大稀释液倍数(如 1:20)。

6.1.2 取 1 mL 1:10 样品匀液注入含有 9 mL 无菌稀释液的试管中，另换一支 1 mL 无菌吸管反复吹吸，或在涡旋混合器上混匀，此液为 1:100 样品匀液。

6.1.3 按 6.1.2 操作制备 10 倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释一次，换用 1 支 1 mL 无菌吸管。

6.1.4 含菌量少的液体样品(如饮料)：取适量(25 mL 或其他规定的体积)经直径 47 mm、孔径 0.45 μm 无菌滤膜抽滤，再用 15 mL 无菌稀释液冲洗抽滤。

6.1.5 加工环境涂抹样品：取 1 支 HK-PBS 一次性采样管，取出拭子在食品加工接触部位沿不锈钢采样板擦拭采样表面(100 cm²)从两个方向(从左到右，然后从上到下)覆盖整个区域。将拭子放回含缓

冲液的采样管中,涡旋混合以充分释放微生物。或按 6.1.2、6.1.3 制备 10 倍递增系列稀释样品匀液。

6.2 接种培养

6.2.1 将测试片置于平坦表面处,揭开上膜。根据对样品污染状况的估计,选择 2 个~3 个适宜稀释度的样品匀液(液体样品可包括原液),每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液加到快速霉菌酵母测试片中央,每个稀释度 2 个平行。静置至少 1 min 以使培养基凝固。同时分别取 1 mL 无菌稀释液加入快速霉菌酵母测试片作空白对照,每个稀释度 2 个平行。

6.2.2 含菌量少的液体样品:使用吸管或移液器将 1 mL 无菌稀释液加到快速霉菌酵母测试片中央,盖上下膜,充分扩散均匀后再掀开上膜,将滤膜格栅面朝下置于测试片凝胶上。盖上下膜,用手轻抚使滤膜和凝胶及上膜紧密贴合,尽量避免产生气泡。

6.2.3 加工环境涂抹样品:打开一次性采样管的保护盖,倒置,将样液按刻度挤出 1 mL 至快速霉菌酵母测试片上,每组 2 个平行。或取稀释液 1 mL 至快速霉菌酵母测试片上,每组 2 个平行。

6.2.4 将快速霉菌酵母测试片正面朝上,堆叠不超过 20 张,放入培养箱中,于 $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 。如有需要可适当延长培养时间。

6.2.5 实验室应根据需要设置阳性对照、阴性对照,定期对检验过程进行质量控制。宜选用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)FSCC(T)214001 和黑曲霉(*Aspergillus niger*)FSCC(T)114025 或等效标准菌株作为阳性对照菌株,大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)FSCC(T)149009 或等效标准菌株作为阴性对照菌株。

6.3 菌落计数

用肉眼或借助 Smartcounter[®]全自动菌落计数器计数霉菌和酵母。霉菌为较大的蓝绿色扁平菌落,边缘不整齐。酵母为较小的蓝绿色凸起菌落,边缘规则整齐。

7 结果与报告

7.1 结果

7.1.1 选取菌落数为 10 CFU~150 CFU 的测试片进行计算,将同一稀释度的 2 个测试片菌落数取平均值,再乘以相应的稀释倍数。

7.1.2 若 2 个连续稀释度的所有测试片菌落数均在 10 CFU~150 CFU,按公式(1)计算:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

N ——样品菌落数;

$\sum C$ ——两个连续稀释度的所有测试片菌落数之和;

n_1 ——低稀释倍数测试片个数;

n_2 ——高稀释倍数测试片个数;

d ——低稀释度稀释因子。

示例:

稀释度	1 : 100(低稀释度)	1 : 1 000(高稀释度)
菌落数/CFU	132/126	16/18

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} = \frac{132 + 126 + 16 + 18}{[2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{292}{0.022} = 13\ 272$$

按 7.2.2 数字修约后，表示为 1.3×10^4 。

7.1.2 若所有稀释度测试片上的菌落数均小于 10 CFU，则按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

7.1.3 若所有稀释度测试片上的菌落数均大于 150 CFU，则按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

7.1.4 若所有稀释度的测试片菌落数均不在 10 CFU~150 CFU，其中一部分小于 10 CFU 或大于 150 CFU，则以接近 10 CFU 或 150 CFU 的平均菌落数乘以相应稀释倍数计算。

7.1.5 若所有稀释度的测试片均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

7.1.6 若所有稀释度的测试片菌落数多不可计，则需重复实验，选取更高稀释度的样品稀释液计数。

7.2 报告

7.2.1 菌落数按“四舍五入”原则修约。菌落数在 10 CFU 以内时，采用一位有效数字报告；菌落数在 10 CFU~100 CFU 之间时，采用两位有效数字报告。

7.2.2 菌落数大于或等于 100 CFU 时，第三位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数来表示结果；也可用 10 的指数形式来表示，此时也按“四舍五入”原则修约后，采用前 2 位有效数字。

7.2.3 若空白对照上有菌落生长，则此次检测结果无效。

7.2.4 称重取样以 CFU/g 为单位报告，体积取样以 CFU/mL 为单位报告，环境样品以 CFU/100 cm² 为单位报告，报告或分别报告霉菌和/或酵母数。

8 废弃物处置

检测过程中产生的废弃物按照 GB 19489 的相关要求进行处置，含微生物的废弃物应 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min 后再按相关规定处置。

附 录 A
(规范性)
培养基和试剂

A.1 无菌磷酸盐缓冲液

A.1.1 成分

A.1.1.1 磷酸二氢钾	34.0 g
A.1.1.2 蒸馏水	500 mL

A.1.2 制法

A.1.2.1 贮存液：称取 34.0 g 磷酸二氢钾溶于 500 mL 蒸馏水中，用大约 175 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2 ± 0.1 ，用蒸馏水稀释至 1 000 mL 后贮存于冰箱。

A.1.2.2 稀释液：取贮存液 1.25 mL，用蒸馏水稀释至 1 000 mL，分装于适宜容器中，121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。

A.2 无菌生理盐水

A.2.1 成分

A.2.1.1 氯化钠	8.5 g
A.2.1.2 蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠加入 1 000 mL 蒸馏水中，搅拌至完全溶解，分装后，121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min，备用。

A.3 1 mol/L NaOH 溶液

A.3.1 成分

A.3.1.1 NaOH	40.0 g
A.3.1.2 无菌蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

称取 40 g NaOH 溶于 1 000 mL 无菌蒸馏水中。

A.4 1 mol/L HCl 溶液

A.4.1 成分

A.4.1.1 HCl	90 mL
A.4.1.2 无菌蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

移取浓盐酸 90 mL，用无菌蒸馏水稀释至 1 000 mL。