

T/

中国食品工业协会团体标准

T/ xxx-2022

食品中霉菌和酵母的快速测定
测试片法

Rapid determination of Mold and Yeast in food

Dry rehydratable film method

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国食品工业协会发布

前 言

本标准按照 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。

本标准编制过程中参考和引用 GB 4789.15-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》以及 AOAC OMA 2014.05《食品中霉菌酵母菌计数测定方法 3M™ Petrifilm™快速霉菌酵母计数测试片方法 最终版》(2017年) (AOAC Official Method 2014.05 Enumeration of Yeast and Mold in Food 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate Final Action 2017) 的相关表述。

本标准的附录 A 为技术性附录，附录 B 为规范性附录。

本标准由中国食品工业协会归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

本标准为首次制定。

食品中霉菌和酵母菌的快速测定 测试片法

1 范围

本标准规定了霉菌和酵母（molds and yeasts）的快速测定测试片方法。

本标准适用于食品中霉菌和酵母的快速测定。

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

AOAC OMA 2014.05《食品中霉菌酵母菌计数测定方法 3M™ Petrifilm™快速霉菌酵母计数测试片方法》

3 术语和定义

GB 4789.15 界定的术语和定义适用于本文件。

4 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其它设备和材料如下：

4.1 培养箱：28℃±1℃

4.2 恒温水浴锅：46℃±1℃

4.3 天平：感量为0.1g

4.4 均质器及均质袋

4.5 振荡器

4.6 无菌吸管：1mL（具0.01mL刻度）、10mL（具0.1mL刻度）或微量移液器及吸头

4.7 无菌锥形瓶：容量500mL

4.8 放大镜或3M测试片判读仪（PPRA）用于辅助判读

5. 培养基和试剂

5.1 3M快速霉菌酵母测试片和压板：见附录 A

5.2 磷酸盐缓冲液：见附录 B 中 B.1；无菌生理盐水：见附录 B 中 B.2

6 检验程序

检验程序见图1。

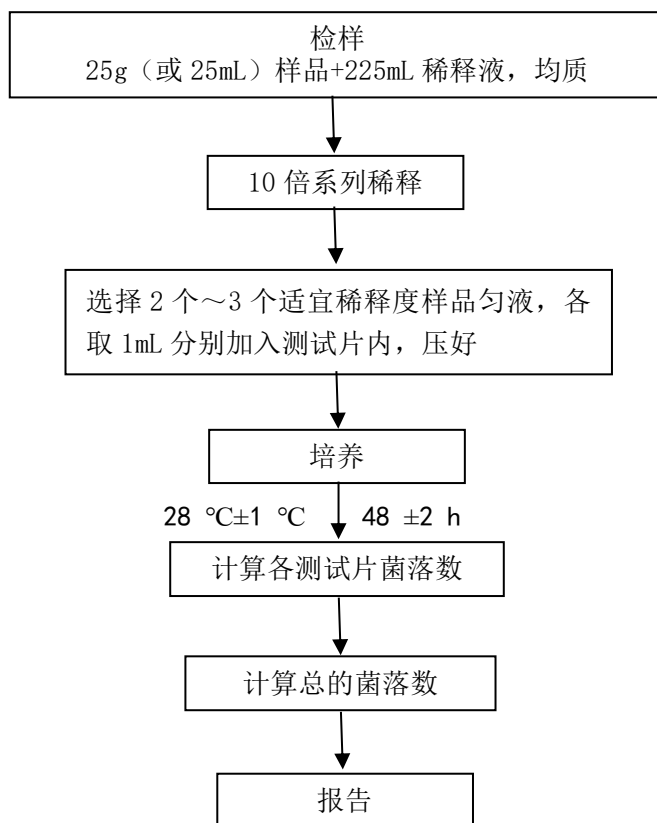


图1 霉菌和酵母平板计数法的检验程序

7 操作步骤

7.1 样品的稀释

7.1.1 固体和半固体样品：称取 25 g 样品置于盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内，8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min，或放入盛有 225 mL 稀释液的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min，制成 1:10 的样品匀液。

7.1.2 液体样品：以无菌吸管吸取 25 mL 样品置于盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶（可在瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分混匀，或放入盛有 225 mL 稀释液的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min，制成 1:10 的样品匀液。

7.1.3 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL，沿管壁缓慢注于盛有 9 mL 稀释液的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振摇试管或换用 1 支无菌吸管或无菌吸头反复吹打使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

7.1.4 按 7.1.3 操作程序，制备 10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释一次，换用 1 次 1 mL 无菌吸管或吸头。

7.2 接种

根据对样品污染状况的估计，选择 2~3 个适宜稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液）进行测定。具体操作步骤按照测试片使用说明进行，每个稀释度接种两个测试片，同时分别吸取 1 mL 空白稀释液加入测试片做空白对照。

7.3 培养

将测试片的正面朝上，水平置于培养箱内，培养时间和温度参考操作说明书或附录 A。

7.4 计数

7.4.1 培养结束后立即计数，可肉眼观察计数，必要时用菌落计数器或放大镜计数。记录稀释倍数和相应霉菌和酵母菌落数，以菌落形成单位（colony forming units, CFU）表示。

7.4.2 选取菌落数在 10 CFU~150 CFU 之间的测试片，根据菌落形态分别计数霉菌和酵母菌落。

8 结果与报告

8.1 结果

8.1.1 计算同一稀释度的两个测试片上的菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数。

8.1.2 若有两个连续稀释度的测试片菌落数均在 10 CFU~150 CFU 之间，按公式（1）计算：

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

公式中：

N——样品中菌落数；

$\sum C$ ——测试片（含适宜范围菌落数的测试片）菌落数之和；

n_1 ——第一稀释度（低稀释倍数）测试片个数；

n_2 ——第二稀释度（高稀释倍数）测试片个数；

d——稀释因子（第一稀释度）。

8.1.3 若所有稀释度的测试片上菌落数均大于 150 CFU，则对稀释度最高的测试片进行计数并标注为估计值，其他测试片可记录为多不可计，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。

8.1.4 若所有稀释度的测试片菌落数均小于 10 CFU，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

8.1.5 若所有稀释度（包括液体样品原液）测试片均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

8.1.6 若所有稀释度的测试片菌落数均不在10CFU~150CFU之间，其中一部分小于10CFU或大于150CFU时，则以最接近10CFU或150CFU的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

8.2 报告

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

8.2.2 菌落数大于或等于100CFU 时，前第3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；也可用10的指数形式来表示，按“四舍五入”原则修约后，采用两位有效数字。

8.2.3 若空白对照上有菌落生长，则此次检测结果无效。

8.2.4 称重取样以CFU/g为单位报告，体积取样以CFU/mL为单位报告，报告可分别报告霉菌和酵母数，或报告霉菌和酵母菌的总和数。

附录 A

(技术性附录)

3M 快速霉菌酵母测试片操作流程

A.1 测试片的原理

3M 快速霉菌酵母测试片是即用型培养基系统，包含营养成分、抗生素、冷水可溶性凝胶以及有助于霉菌和酵母菌计数的指示剂。并且特殊的指示剂技术能防止霉菌的堆叠，使判读更加容易。如图2和3。

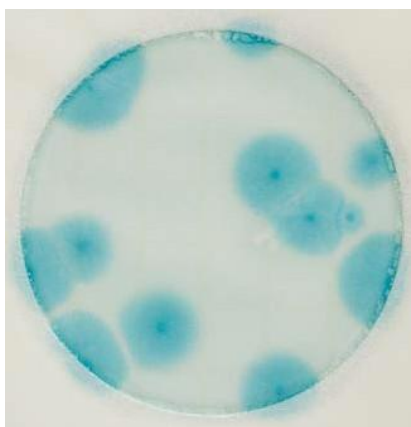


图2 测试片中的霉菌



图3 测试片中的酵母

A.2 测试片的操作流程

A.2.1 加样

将测试片水平放置，掀起上层膜将 1mL 样液垂直滴加到底层中央处。将上层膜缓慢落下，防止样液溢出，和避免产生气泡，切勿使上层膜直接落下，如图4。

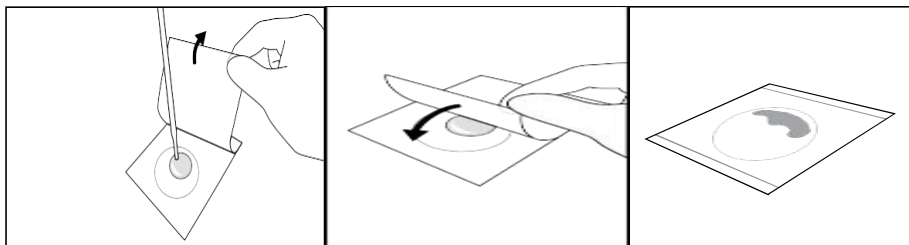


图4 测试片加样演示图

A.2.2 压板

将压板放置于上层膜的中央处。轻按压板，使样液均匀覆盖于培养基上，切勿扭转压板。拿起压板后，静止至少1分钟，以使培养基凝固，如图5。

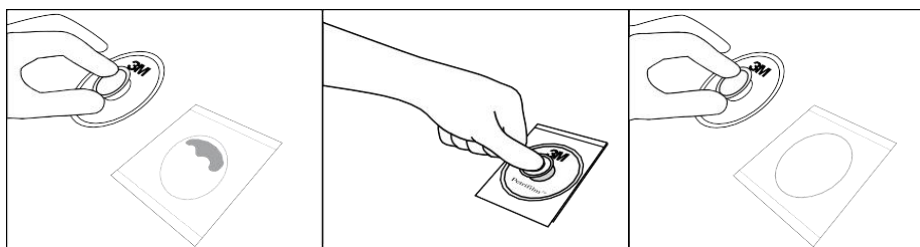


图5 测试片压板演示图

A.2.3 培养温度和时间

测试片放于培养箱进行培养，透明面朝上，最多可堆叠20片，如图6。

28 °C±1 °C，培养 48 ±2 h；

如某些生长缓慢的霉菌或酵母在48小时有菌落生长，但无法区分菌落形态或菌落特征不明显，可将培养时间延长 12-24 小时后再进行判读，。

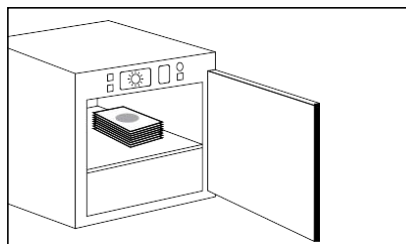


图6 测试片培养演示图

A.2.4 测试片的计数

培养结束后立即计数，可肉眼直接观察计数。霉菌的形态是有边缘的大型菌落，菌落为蓝绿色（随着培养时间延长，可能也有黄色或其它颜色），菌落扁平，中心颜色深暗，边缘扩散；酵母的形态是有清晰边缘的小型菌落，蓝绿色且颜色均匀，没有暗色中心，菌落有凸起；如图7所示。

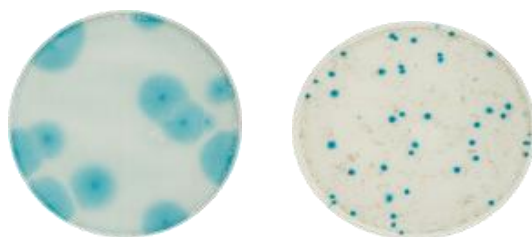


图7 霉菌和酵母的形态

必要时用放大镜计数或用3M 测试片自动判读仪（PPRA）计数，如图8。



图8 3M 测试片自动判读仪（PPRA）

附录 B

(规范性附录)

试剂

B.1 磷酸盐缓冲液

B.1.1 成分

磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 34.0 g

蒸馏水 500 mL

pH 7.2

B.1.2 制法

贮存液：称取34.0 g的磷酸二氢钾溶于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，用蒸馏水稀释至1 000 mL后贮存于冰箱。

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高压灭菌15 min。

B.2 无菌生理盐水

B.2.1 成分

氯化钠 8.5 g

蒸馏水 1000 mL

B.2.2 制法

称取8.5g氯化钠溶于1 000 mL蒸馏水中，121 °C高压灭菌15 min。