

团 体 标 准

T/CNFIA 156—2022

食品中霉菌和酵母的快速计数 测试片法

Rapid enumeration of molds and yeasts in food—
Dry rehydratable film method

2022-06-15 发布

2022-06-15 实施

中国食品工业协会 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。

本文件由中国食品工业协会归口。

本文件起草单位：3M 中国有限公司、北京市疾病预防控制中心、中国检验检疫科学研究院、石家庄学院化工学院、郑州市食品药品检验所、内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司、内蒙古伊利实业集团股份有限公司、国家乳制品产业计量测试中心、好丽友食品有限公司、中国食品工业协会食品安全标准法规委员会。

本文件主要起草人：孟云、霍建伟、陈倩、陆峥、赵红阳、陈佳、王琪、马利军、康晓斌、刘亦畅、王云霞、康文成、王亚飞、闫子祥、吴士焕、李宇。

食品中霉菌和酵母的快速计数 测试片法

1 范围

本文件规定了霉菌和酵母(molds and yeasts)的快速计数测试片法。

本文件适用于食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

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,其他设备和材料如下:

- a) 培养箱:28 °C ±1 °C;
- b) 恒温水浴装置:46 °C ±1 °C;
- c) 天平:感量为 0.1 g;
- d) 均质器及均质袋;
- e) 振荡器;
- f) 无菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)或微量移液器及吸头;
- g) 无菌锥形瓶:容量 500 mL;
- h) 放大镜或测试片判读仪。

5 培养基和试剂

5.1 Petrifilm™快速霉菌酵母测试片:见附录 A。

5.2 磷酸盐缓冲液:见附录 B 中的 B.1。

5.3 无菌生理盐水:见 B.2。

6 检验程序

检验程序见图 1。

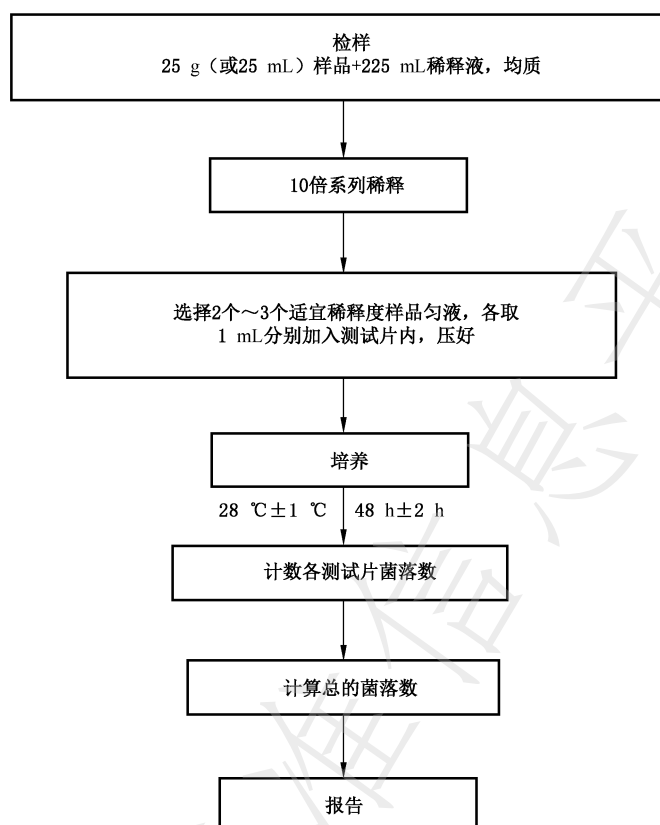


图 1 霉菌和酵母的检验程序

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 无菌稀释液(磷酸盐缓冲液或生理盐水)的无菌均质杯内,8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min,或放入盛有 225 mL 无菌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 无菌稀释液的无菌锥形瓶(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 无菌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 无菌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 加样

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,每个稀释度加样到两个测试片,同时吸取 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,最多可堆叠 20 片,28℃±1℃,培养 48±2 h。

7.4 计数

7.4.1 培养结束后立即计数,可肉眼直接观察计数,必要时用放大镜或测试片判读仪辅助计数。记录稀释倍数和相应霉菌和酵母数,以菌落形成单位(colony forming units,CFU)表示。

7.4.2 选取菌落数为 10 CFU~150 CFU 的测试片,根据菌落形态分别计数霉菌和酵母的菌落数。

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为 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为 10 CFU~150 CFU,其中一部分小于 10 CFU 或大于 150 CFU 时,则以最接近 10 CFU 或 150 CFU 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;菌落数为 10 CFU~100 CFU 时,采用两位有效数字报告。

8.2.2 菌落数大于或等于 100 CFU 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,或报告霉菌和酵母的总数。

附录 A

(资料性)

Petrifilm™快速霉菌酵母测试片操作流程

A.1 测试片的原理

Petrifilm™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。

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 1 mL 样品匀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 A.1。

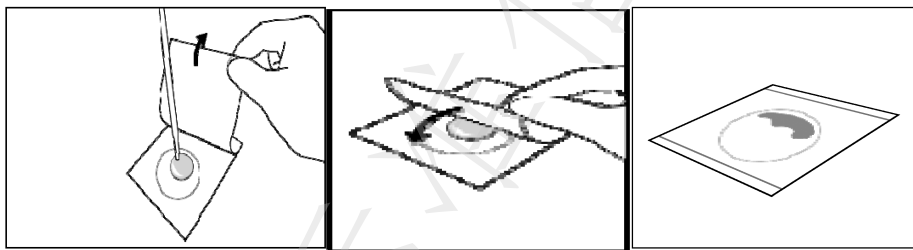


图 A.1 测试片加样演示图

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 A.2。

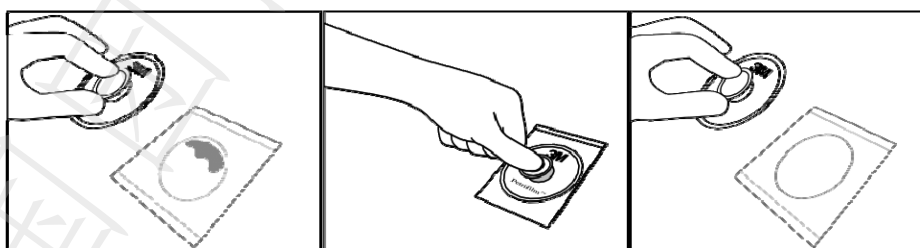


图 A.2 测试片压板演示图

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 A.3, $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 培养 $48 \pm 2\text{ h}$ 。如某些生长缓慢的霉菌或酵母在 48 h 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 h~24 h 后再进行判读。

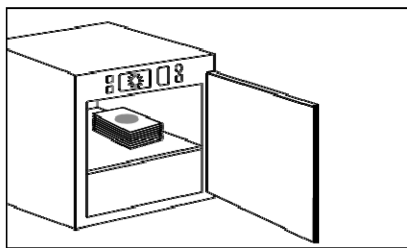


图 A.3 测试片培养演示图

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,可能也有黄色或其他颜色),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 A.4 所示。

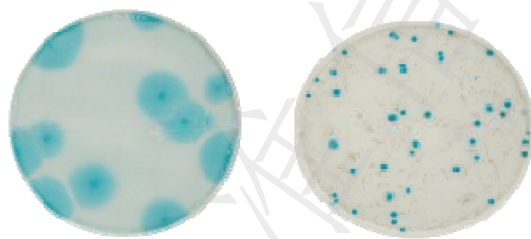


图 A.4 霉菌和酵母的形态

必要时用放大镜或用测试片自动判读仪辅助计数,如图 A.5。



图 A.5 测试片自动判读

附录 A
(规范性)
试剂

B.1 磷酸盐缓冲液

B.1.1 成分

一水磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	8.7 g
七水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	36.7 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2	

B.1.2 制法

称取 8.7 g 一水磷酸二氢钠和 36.7 g 七水合磷酸氢二钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中,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	1 000 mL

B.2.2 制法

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