

T/GXAIA

广西分析测试协会团体标准

T/GXAIA XXXX—2023

干米粉中霉菌酵母的快速计数法

Rapid method for enumerate of molds and yeasts in dry rice noodles

（征求意见稿）

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

广西分析测试协会 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。

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。

本文件由广西食品安全协会提出并宣贯。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

干米粉中霉菌酵母的快速计数法

1 范围

本文件描述了干米粉中霉菌酵母快速计数法的原理、培养基和试剂配制、仪器和设备、分析步骤、结果计算和报告。

本文件适用于干米粉中霉菌酵母的快速计数。

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 4789.15-2016 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

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

Handy Plate®快速霉菌酵母测试片是含与马铃薯葡萄糖琼脂主要成份一致的营养成份、冷水可溶性凝胶、复合的酶底物指示剂，使霉菌酵母快速显色，判读计数更方便。

5 培养基和试剂配制

5.1 培养基

5.1.1 Handy Plate®快速霉菌酵母测试片。

5.2 试剂配制

5.2.1 磷酸盐缓冲液。

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 1000 mL 后贮存于冰箱。

稀释液：取贮存液 1.25 mL，用蒸馏水稀释至 1000 mL，分装于适宜容器中，121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。

5.2.2 生理盐水：称取 8.5 g 氯化钠加入 1000 mL 蒸馏水中，搅拌至完全溶解，分装后，121 °C 灭菌 15 min，备用。

5.2.3 氢氧化钠溶液（1 mol/L）：称取 40 g 氢氧化钠溶于 1000 mL 无菌蒸馏水中。

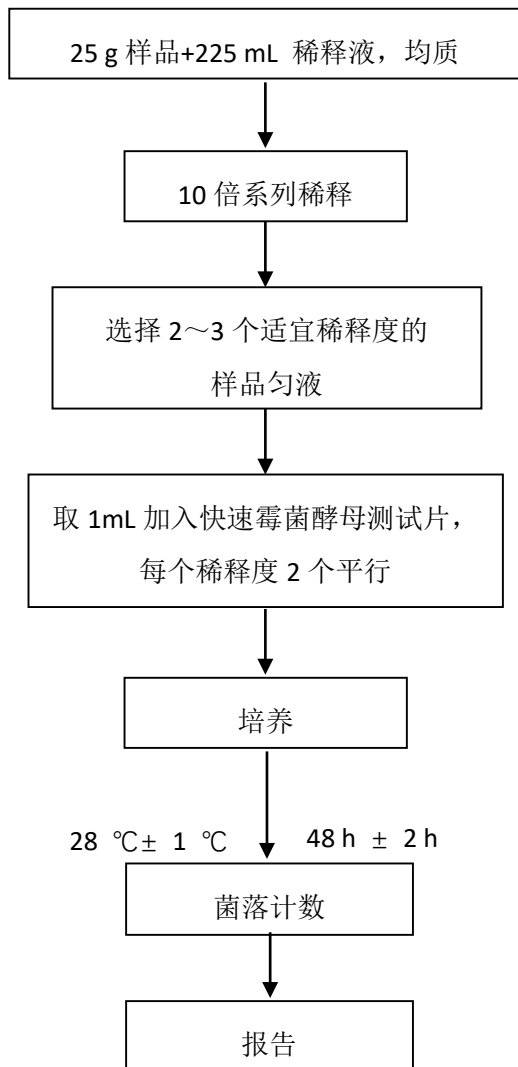
5.2.4 盐酸溶液（1 mol/L）：取盐酸 90 mL 用水稀释到 1 000 mL。

6 仪器和设备

- 6.1 电子天平：感量 0.1 g。
- 6.2 拍击式均质器及均质袋。
- 6.3 旋涡混合器。
- 6.4 恒温培养箱：28 °C ± 1 °C。
- 6.5 灭菌锅。
- 6.6 无菌锥形瓶（容量 500 mL）。
- 6.7 pH 计或精密 pH 试纸：精密度 0.1。
- 6.8 无菌吸管：1 mL (0.01 mL 刻度)、10 mL (0.1 mL 刻度)。
- 6.9 无菌微量移液器及枪头：1 mL。
- 6.10 无菌试管：18 mm×180 mm。

7 检验程序

干米粉中霉菌酵母的快速计数检验程序见图1。



8 操作步骤

8.1 样品稀释

8.1.1 取 25 g 样品，加入含有 225 mL 无菌稀释液（蒸馏水或生理盐水或磷酸盐缓冲液），充分振摇，或用拍击式均质器拍打 1min~2min，制成 1:10 的样品匀液。

8.1.2 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，或在旋涡振荡器上混匀，此液为 1:100 样品匀液。

8.1.3 按 8.1.2 操作制备 10 倍系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。

8.2 接种

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。将测试片置于平坦表面处，揭开上层膜。每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液于快速霉菌酵母测试片内，2 个平行。静置至少 1 min 以使样液充分吸收。同时取 1 mL（蒸馏水或生理盐水或磷酸盐缓冲液）加入测试片作空白对照。

8.3 培养

将测试片正面朝上，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 $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 。

8.4 菌落计数

用肉眼观察，必要时可用放大镜或低倍镜，记录稀释倍数和计数相应霉菌和酵母菌落数。以菌落形成单位（CFU）表示。

选取菌落数在 10 CFU~150 CFU 的测试片，根据菌落形态分别计数霉菌和酵母。霉菌为蓝绿色扁平较大菌落，边缘不整齐。酵母为较小的蓝绿色凸起菌落，规则整齐。

9 结果与报告

9.1 结果

9.1.1 计算同一稀释度的两个测试片菌落数的平均值，再将平均值乘以相应的稀释倍数。

9.1.2 若两个连续稀释度的所有测试片菌落数均在 10 CFU~150 CFU 之间，按如下公式计算：

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

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 ——低稀释倍数平板个数；

n_2 ——高稀释倍数平板个数；

d ——低稀释度稀释因子

示例：

稀释度	1:100 （低稀释度）	1:1000 （高稀释度）
菌落数（CFU）	132/126	16/18

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2) d} = \frac{132+126+16+18}{(2+0.1 \times 2) \times 10^{-2}} = \frac{29200}{2.2} = 13272$$

按 9.2.2 数字修约后，表示为13000或 1.3×10^4 。

9.1.3 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。

9.1.4 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。

9.1.5 若所有稀释度的平板菌落数均不在 10 CFU~150 CFU 之间，其中一部分小于 10 CFU 或大于 150 CFU 时，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。

9.1.6 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。

9.2 报告

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

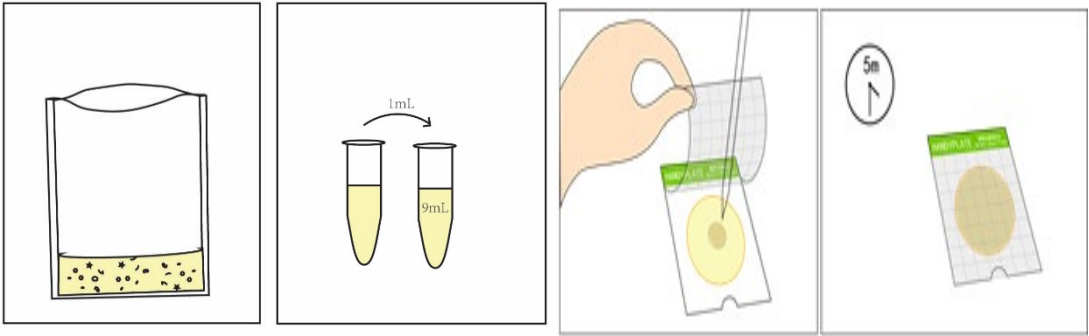
9.2.2 菌落数大于或等于 100 时，第三位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数来表示结果；也可用 10 的指数形式来表示，此时也按“四舍五入”原则修约后，采用前两位有效数字。

9.2.3 若所有测试片上为蔓延菌落而无法计数，则报告菌落蔓延。

9.2.4 若空白对照上有菌落生长，则此检测结果无效。

9.2.5 以 CFU/g 为单位报告，报告或分别报告霉菌和/或酵母数。

干米粉中霉菌酵母的快速计数操作流程

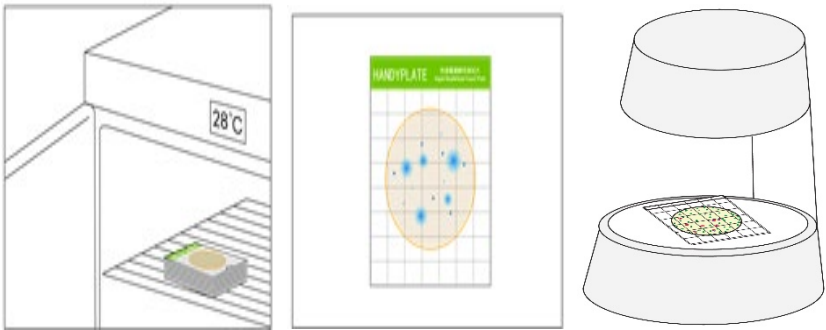


1.样品制备

2.梯度稀释

3.接种

4.静置



5.培养

6.判读计数