

1 主题内容与适用范围

本标准规定了出口食品嗜热菌芽孢(需氧芽孢总数、平酸芽孢和厌氧芽孢)的计数方法。

本标准适用于谷物产品和食品配料嗜热菌芽孢计数。其他食品可参照使用。

2设备和材料

- 2.1 取样工具：刮勺、取样铲等。
- 2.2 带盖样品瓶或容器。
- 2.3 高压蒸汽灭菌锅。
- 2.4 天平：感量0.01g。
- 2.5 均质器和1 000mL带盖均质杯。
- 2.6 移液管：容量1mL、10mL(大口径)。
- 2.7 培养皿：内径90mm。
- 2.8 250mL三角烧瓶：具100mL刻度线。
- 2.9 水浴箱：温度45~48℃。
- 2.10 酒精灯。
- 2.11 菌落计数器。
- 2.12 培养箱：温度55±2℃。
- 2.13 蒸汽柜。

3 培养基

- 3.1 葡萄糖胰蛋白胨琼脂。
- 3.2 覆盖琼脂。
- 3.3 改良亚硫酸盐琼脂。
- 3.4 肝汤。

4. 样品制备

- 4.1 谷物：将50g样品放入灭菌均质杯内，加入200mL灭菌蒸馏水，以8 000~10 000r/ min均质3min，使成均匀的混悬液。
- 4.2 淀粉或面粉：将20 g样品放入盛有适量玻璃珠的250mL灭菌三角烧瓶内，加灭菌蒸馏水至100mL刻度线，振荡，使成均匀的混悬液。
- 4.3 糖：将20g干态糖或相同糖含量的液态糖(根据白利度确定。如29.41g、68白利度的液态糖相当于20g干态糖)放入250mL灭菌三角烧瓶内，加灭菌蒸馏水至100mL刻度线，搅拌使溶解，迅速加热至沸并维持5min，立即用水冷却。

5 接种培养和计数

5.1 需氧嗜热芽孢总数

- 5.1.1 谷物、淀粉或面粉：用大口径移液管移取20mL谷物混悬液或10mL淀粉或面粉混悬液，在搅拌状态下加入盛有100mL融化的葡萄糖胰蛋白胨琼脂(55~60℃)的250mL三角烧瓶内。将此混合物在沸水或蒸汽柜中放置15min。轻微搅拌使尽快冷却，再将全部混合物等量倾注至5个灭菌培养皿内。凝固后于其表面覆盖一薄层2% 灭菌琼脂(防止蔓延型菌落出现)，待覆盖琼脂凝固后，倒置培养皿于55℃保持一定湿度培养48h。
- 5.1.2 糖：于5个灭菌培养皿内各放入2 mL经热处理的糖溶液，倾入葡萄糖胰蛋白胨琼脂(55~60℃)，轻轻摇动，使样液，与培养基混合均匀。待凝固后，倒置培养皿于55℃保持一定湿度培养48h。
- 5.1.3 计数5个平板上的菌落。5个平板上的菌落数相加，再乘以2即为10g谷物中的需氧嗜热芽孢 总数。如样品为淀粉或面粉或糖，则5个平板上的菌落数相加，再乘以5即为10g样品中的需氧嗜热芽孢总数。

5.2 平酸芽孢

- 5.2.1 对上述5.1.1和5.1.2条中的平板再进行检查。计数平板上直径1~5mm，中心有不透明暗色斑点的圆形菌落。在紫色平板上，平酸菌菌落通常被黄色晕圈围绕着。当接种菌过多(整个平板呈淡黄色)或产低酸的菌株存在时，黄色晕圈不明显或消失。表面以下的菌落致密，两面凸出，近乎针尖状。如对表面以下菌落有怀疑，可挑取此菌落划线培养于葡萄糖胰蛋白胨琼脂平板上，以证实表面菌落的特征。
- 5.2.2 样品中平酸芽孢的计算同上述5.1.3条。

5.3 产硫化氢厌氧芽孢

- 5.3.1 将20mL样品混悬液分装于6支刚刚排气的改良亚硫酸盐琼脂试管内。如样品为谷物、淀粉或面粉，应旋紧试管帽，在加热(在沸水或蒸汽柜中放置15min)之前和加热过程中轻轻颠倒试管数次，加热后迅速用水冷却试管。预热试管至55℃，并在此温度下培养48h。
- 5.3.2 产硫化氢厌氧菌在改良亚硫酸盐培养基中形成乌黑发亮的特殊球形区域，无明显气体产生。某些不产硫化氢厌氧菌产生大量氢气和还原亚硫酸盐，引起琼脂断裂和使整个培养基变黑。但是；这种情况易与上述的黑色球形区域分开。计数6支试管中的黑色球形区域。6支试管中的黑色球形区域数相加，再乘以2即为10g谷物中的产硫化氢厌氧芽孢数。如样品为淀粉或面粉或糖，则6支试管中的黑色球形区域数相加，再乘以2.5即为10g样品中的产硫化氢厌氧芽孢数。

5.4 不产硫化氢厌氧芽孢

- 5.4.1 将20mL样品混悬液分装于6支刚刚排气的肝汤试管内。如样品为谷物、淀粉或面粉，应立即旋紧试管帽，在加热(在沸水或蒸汽柜中放置15min)之前和加热过程中搓转试管数次。加热后迅速用水冷却，并于各试管内注入50℃灭菌覆盖琼脂，厚度5~6cm。待琼脂凝固后，预热试管至55℃，并在此温度下培养48~72h。
- 5.4.2 琼脂断裂，产酸，偶尔伴有干酪气味，被判定为不产硫化氢厌氧菌。此方法适用于定性试验或作粗略定量估计，不能以单位样品中芽孢数表示结果。

6 报告结果

- 6.1 需氧嗜热芽孢总数、平酸芽孢、产硫化氢厌氧芽孢：按芽孢数/10g样品报告结果。
- 6.2 不产硫化氢厌氧芽孢：按阳性或阴性(+或-)管数报告结果。

附 录 A

培养基制备

(补充件)

A1 葡萄糖胰蛋白胨琼脂

胰蛋白胨	10g
葡萄糖	5g
2% 溴甲酚紫乙醇溶液	2mL
琼脂	15g
蒸馏水	1000mL
最终pH	6.7±0.1

将各成分混悬于蒸馏水中，静置5min，混合均匀，加热，不时搅拌煮沸1 min，分装于玻璃瓶内，121℃高压灭菌20min。

A2 覆盖琼脂

琼脂	20g
蒸馏水	1000mL

将琼脂混悬于蒸馏水中，静置5min，加热煮沸使溶解，分装于试管或三角烧瓶内，121℃高压灭菌20 min。

A3 改良亚硫酸盐琼脂

蛋白胨	10g
无水亚硫酸钠	1g
琼脂	10g
蒸馏水	1000mL

将蛋白胨、亚硫酸钠和琼脂混悬于蒸馏水中，充分混合，加热使溶解。分装试管，每管10~15mL，再于各试管内加入适量清洁的混铁粉或铁屑。不调pH。121℃高压灭菌20min。如不使用固体亚硫酸钠，每周需配制新鲜亚硫酸钠溶液。

A4 肝汤

将500g碎牛肝加入1 000mL蒸馏水中，振荡，微火煮沸1h。调 pH7.0，再煮沸10min。用纱布过滤，挤出液体部分，并稀释至1 000mL。加入蛋白胨10g，磷酸氢二钾1g，再调至pH7.0。将煮沸过的碎牛肝(1~2cm厚)和肝汤(10~12mL)加入18×150mm试管内，121℃高压灭菌20min。除新鲜配制以外，使用前以流动蒸汽加热培养基20min以上，以排除培养基内的空气。接种后用灭菌琼脂(50℃)覆盖，厚度5~6cm。

附加说明：

本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出。

本标准由中华人民共和国湖北进出口商品检验局、福建进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人张宗显、章众长。

本标准主要参考美国公积分析化学家协会(AOAC)法定分析方法第14版，第46章，第46.078~46.082节(1984年)。