

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1331—2007

乳与乳制品中嗜冷菌、需氧芽孢及 嗜热需氧芽孢数的测定

**Enumeration of Colony of Psychrotrophic Microorganisms,
Total Aerobic Bacterial Spores and Thermophilic Aerobic
Bacterial Spores in Milk and Dairy Products**

(ISO6730:1992 Milk—Enumeration of colony-forming units of psychrotrophic micro-organisms—colony-count technique at 6.5°C; NEN6813:1999 Milk and milk products—Determination of the content of spores of mesophilic aerobic sporeforming bacteria; NEN6809:1999 Milk and milk products—Determination of the content of thermophilic aerobic sporeforming bacteria, NEQ)

2007-04-17 发布

2007-07-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的起草参考了 ISO6730:1992《乳—嗜冷微生物菌落计数—6.5℃ 菌落计数技术》(英文版); 荷兰国家标准 NEN6813:1999《乳与乳制品—嗜中温需氧芽孢数的测定》(荷兰文版); 荷兰国家标准 NEN6809:1999《乳与乳制品—嗜热需氧芽孢数的测定》(荷兰文版)。本标准与 ISO6730:1992、NEN6813:1999、NEN6809:1999 的一致性程度为非等效。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:农业部乳品质量监督检验测试中心。

本标准主要起草人:李奇英、马文宏、张华、王金华。

乳与乳制品中嗜冷菌、需氧芽孢及嗜热需氧芽孢数的测定

第一部分:乳中嗜冷菌数测定

1 范围

本部分规定了乳中嗜冷菌数的测定方法。

本部分适用于生鲜乳及巴氏杀菌乳中嗜冷菌数的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB/T 4789.1 食品卫生微生物学检验 总则

GB/T 4789.28—2003 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本部分。

3.1

嗜冷菌 psychrotrophic microorganisms

指在 6.5℃ 条件下,需氧培养 10 d,在 MPC 琼脂平板上形成可计数菌落的细菌、酵母和霉菌。

3.2

MPC 琼脂 milk plate count agar

乳平板计数琼脂。

4 原理

检样在 MPC 琼脂内,于 6.5℃ 条件下培养 10 d,菌落计数,算出每毫升检样中的嗜冷菌数。

5 稀释液和培养基

5.1 蛋白胨-盐溶液

5.1.1 成分

酶水解酪蛋白胨	1.0 g
氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

5.1.2 制法

将酶水解酪蛋白胨和氯化钠溶解于蒸馏水中,用质量分数 15% 氢氧化钠溶液校正 pH 至 7.0 ± 0.1 。分装试管和烧瓶,每管 9 mL、每瓶 90 mL 或 225 mL,相对误差不超过 $\pm 2\%$ 。密封后, $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

5.2 磷酸盐缓冲液:按 GB/T 4789.28—2003 中 3.22 规定进行制备。

5.3 MPC 琼脂培养基

5.3.1 成分

胰蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	2.5 g
葡萄糖	1.0 g
脱脂奶粉	1.0 g
琼脂	10 g~15 g
蒸馏水	1 000 mL

注 1:脱脂奶粉不应含有抗生素类物质。

注 2:琼脂用量根据其凝固程度决定。

5.3.2 制法

将 5.3.1 中除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水中,用质量分数 15% 氢氧化钠溶液校正 pH 至 7.0 ± 0.1 。加入琼脂,加热煮沸,使琼脂溶化。必要时使用两层纱布之间夹脱脂棉过滤,分装烧瓶。密封后, $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。若立即使用此培养基,在水浴(6.3)中将其冷却到 45°C ;否则,将灭菌后的培养基放于暗处温度为 $0^\circ\text{C} \sim 5^\circ\text{C}$ 之间贮存,时间不超过 30 d。为了避免延误倾注培养基的时间,微生物检测之前,加热融化培养基。然后,于水浴(6.3)中冷却到 45°C 。

6 设备和材料

6.1 微生物实验室常用设备和材料。

6.2 生化培养箱: $6.5^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

6.3 水浴锅: $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。

6.4 无菌培养皿:直径 90 mm。

6.5 无菌吸管。

7 取样

样品的采取按 GB/T 4789.1 执行。

8 检测程序

嗜冷菌数检测程序见图 1。

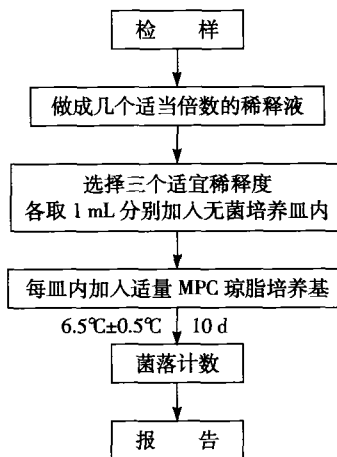


图 1

9 操作步骤

9.1 检样处理

9.1.1 快速翻转待检样品容器 25 次,使样品混合均匀,避免形成泡沫。然后,以无菌操作打开样品包装容器。

9.1.2 用无菌吸管(6.5)吸取 1 mL 检样于含有 9 mL 无菌稀释液(5.1 或 5.2)的试管中(或 10 mL 检样于含有 90 mL 无菌稀释液的烧瓶中,或 25 mL 检样于含有 225 mL 无菌稀释液的烧瓶中),经充分振荡获得 10^{-1} 均匀稀释液。

9.1.3 另用一支 1 mL 无菌吸管吸取 10^{-1} 稀释液 1 mL,加入到含有 9 mL 无菌稀释液的试管中,振荡试管,混合均匀,获得 10^{-2} 稀释液。按上述操作方法,做 10 倍递增稀释。如此每递增稀释一次,即换用一支 1 mL 无菌吸管。

9.2 接种及培养

9.2.1 根据对样品中嗜冷菌污染情况的估计,选择三个适宜稀释度,分别在做 10 倍递增稀释的同时,即以吸取该稀释度的吸管移 1 mL 该稀释液于无菌培养皿(6.4)内,每个稀释度接种两个培养皿。

9.2.2 检查培养基(5.3)的温度不要超过 46°C 。然后,立即倾注 12 mL~15 mL 培养基到每个培养皿中。

9.2.3 小心地转动培养皿使接种样液和培养基混合均匀,水平放置使混合物凝固。从第一步稀释液的制备到接种样液和培养基混合所用的时间不得超过 15 min。

9.2.4 接种的同时,用 1 mL 稀释液作空白试验。

9.2.5 待琼脂凝固后,堆叠培养皿,倒置在培养箱(6.2)中,于 $6.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养 10 d。培养皿堆叠不超过 6 个。

9.3 菌落计数

9.3.1 做平板菌落计数时,可用肉眼观察,极微小的菌落也应计数在内,需要时用放大镜检查。

9.3.2 蔓延的菌落被认为是单一菌落。如果被蔓延菌落所覆盖的部分不到平板面积的 $1/4$,计数未受影响的平板部分的菌落并计算出整个平板的相对量;如果被蔓延菌落所覆盖的部分超过了平板面积的 $1/4$,不应计数。

10 结果计算

10.1 保留含有 10 个~300 个菌落的培养皿。

用公式(1)计算每毫升样品中的嗜冷菌数:

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0.1n_2 + 0.01n_3)d} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

N ——样品中嗜冷菌数,cfu/mL;

$\sum c$ ——所有保留培养皿中计数菌落的总和;

n_1 ——保留的含有 10 个~300 个菌落的培养皿中第一个稀释度的培养皿数;

n_2 ——保留的含有 10 个~300 个菌落的培养皿中第二个稀释度的培养皿数;

n_3 ——保留的含有 10 个~300 个菌落的培养皿中第三个稀释度的培养皿数;

d ——第一个稀释度的稀释因数。

结果保留两位有效数字。

示例:

嗜冷菌的菌落数给出如下结果(每个稀释度培养 2 个培养皿):

——在第一个稀释度下(10^{-2})含有 168 个和 215 个菌落;

——在第二个稀释度下(10^{-3})含有 14 个和 25 个菌落;

——在第三个稀释度下(10^{-4})少于 10 个菌落。

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0.1n_2 + 0.01n_3)d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{(2 + 0.1 \times 2) \times 10^{-2}} = \frac{422}{0.022} = 19\ 182$$

修约上述结果,样品中嗜冷菌数报告为 19 000 或 1.9×10^4 cfu/mL。

10.2 如果所有稀释度培养皿中菌落数均少于 10 个,结果报告为“样品中嗜冷菌数小于 $10 \times 1/d$ cfu/mL”,式中 d 为最低稀释液的稀释度。

10.3 如果所有稀释度培养皿中的菌落数均多于 300 个,从最接近 300 个菌落的培养皿中计算出一个估计值乘以相应最高稀释度的倒数。结果报告为“每毫升样品中嗜冷菌数的估计值”。

11 重复性

在重复性条件下两次独立测试结果的绝对差值,不大于较低结果的 30%,以大于较低结果 30% 的情况不超过 5% 为前提。

第二部分:需氧芽孢总数测定

1 范围

本部分规定了乳与乳制品中需氧芽孢总数的测定方法。

本部分适用于生鲜乳及其制品中需氧芽孢总数的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB/T 4789.1 食品卫生微生物学检验 总则

GB/T 4789.28—2003 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本部分。

3.1

需氧芽孢总数 total aerobic bacterial spores

指在有氧条件下,经 80°C 加热处理 10 min,能存活并且于 36°C 下培养 48 h 在 MPC 琼脂平板上形成可计数的菌落总数。

3.2

MPC 琼脂 milk plate count agar

乳平板计数琼脂。

4 原理

取一定量的液体检样或检样的初级稀释液,将其在 80°C 下加热 10 min,在 MPC 琼脂内,于 36°C 条件下培养 48 h,菌落计数,算出每毫升(克)检样中的需氧芽孢总数。

5 稀释液和培养基

5.1 蛋白胨-盐溶液

5.1.1 成分

酶水解酪蛋白胨	1.0 g
氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

5.1.2 制法

将酶水解酪蛋白胨和氯化钠溶解于蒸馏水中,用质量分数 15% 氢氧化钠溶液校正 pH 至 7.0 ± 0.1 。分装试管和烧瓶,每管 9 mL、每瓶 90 mL 或 225 mL,相对误差不超过 $\pm 2\%$ 。密封后, $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

5.2 磷酸盐缓冲液:按 GB/T 4789.28—2003 中 3.22 规定进行制备。

5.3 MPC 琼脂培养基

5.3.1 成分

胰蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	2.5 g
葡萄糖	1.0 g
脱脂奶粉	1.0 g
琼脂	10 g~15 g
蒸馏水	1 000 mL

注 1:脱脂奶粉不应含有抗生素类物质。

注 2:琼脂用量根据其凝固程度决定。

5.3.2 制法

将 5.3.1 中除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水中,用质量分数 15% 氢氧化钠溶液校正 pH 至 7.0 ± 0.1 。加入琼脂,加热煮沸,使琼脂融化。必要时使用两层纱布之间夹脱脂棉过滤,分装烧瓶。密封后, $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。若立即使用此培养基,在水浴(6.3)中将其冷却到 45°C 。否则,将灭菌后的培养基放于暗处温度为 $0^\circ\text{C} \sim 5^\circ\text{C}$ 之间贮存,时间不超过 30 d。为了避免延误倾注培养基的时间,微生物检测之前,加热融化培养基。然后,于水浴(6.3)中冷却到 45°C 。

6 设备和材料

6.1 微生物实验室常用设备和材料。

6.2 培养箱: $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。

6.3 水浴锅: $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。

6.4 水浴锅: $80^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。

6.5 无菌培养皿:直径 90 mm。

6.6 无菌吸管。

6.7 无菌试管。

7 取样

样品的采取按 GB/T 4789.1 执行。

8 检测程序

需氧芽孢总数检测程序见图 2。

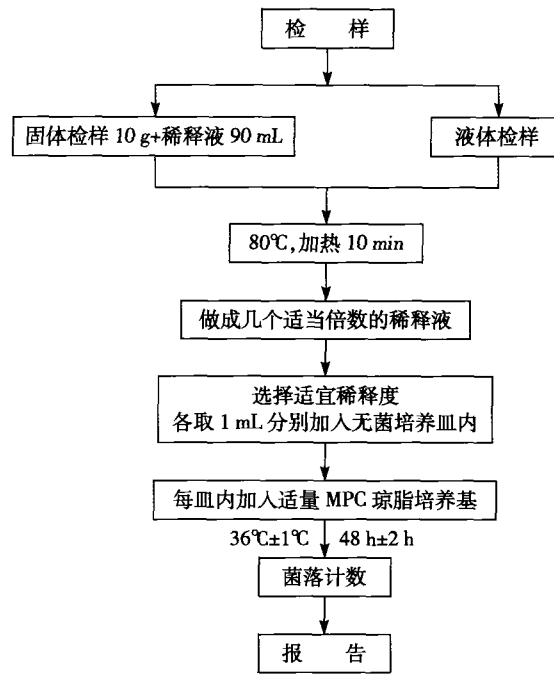


图 2

9 操作步骤

9.1 检样处理

9.1.1 以无菌操作打开待检样品包装容器,液体样品应避免形成泡沫。

9.1.2 以无菌操作称取固体或半固体检样 10 g(或 25 g)于含有 90 mL(或 225 mL)预热至 45℃ 的灭菌稀释液(5.1 或 5.2)的三角烧瓶中(瓶内预置适当数量的玻璃珠),经充分振摇(必要时用均质器均质或无菌乳钵研磨)制成 10^{-1} 初级稀释液。

9.2 加热处理

9.2.1 用无菌吸管(6.6)吸取液体检样、固体或半固体检样的初级稀释液 5 mL~10 mL 于无菌试管(6.7)中,注意不应使样液接触到超出水面和位于水面下 2 cm 以内的试管内壁。

9.2.2 立即将上述试管放入 $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的水浴(6.4)中,使试管内液面至少低于水面 4 cm。

9.2.3 加热处理 $10 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$ 。在对照管中放一支温度计测定温度。试管内样液的升温时间不应超过 5 min。

9.2.4 将加热处理后的试管取出立即放到 20°C 以下的流水中冷却。

9.3 进一步稀释液的制备

用一支 1 mL 无菌吸管(6.6),吸取 1 mL 经加热处理的样液,于含有 9 mL 无菌稀释液的试管中,振荡试管,混合均匀,获得其 10 倍稀释液(液体检样 10^{-1} 稀释液或固体检样 10^{-2} 稀释液)。按上述操作方法,做 10 倍递增稀释,如此每递增稀释一次,换用一支 1 mL 无菌吸管。

9.4 接种和培养

9.4.1 根据对样品中芽孢含量的估计,选择适宜的稀释度,即通过正确地选择,使得在培养结束后至少有一个培养皿里长出 10 个~150 个菌落。分别在做 10 倍递增稀释的同时,即以吸取该稀释度的吸管移 1 mL 该稀释液于无菌培养皿内,每个稀释度接种两个培养皿。

9.4.2 立即倾注 12 mL~15 mL 已融化并冷却至 $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的 MPC 琼脂培养基到每个培养皿中。

9.4.3 小心地转动培养皿使接种样液和培养基混合均匀,水平放置使混合物凝固。从热处理结束到接种样液和培养基混合所用的时间不得超过 15 min。

9.4.4 接种样液的同时,用 1 mL 稀释液,作空白试验。

9.4.5 待琼脂凝固后,堆叠培养皿,倒置在培养箱(6.2)中,于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ 。

注:为了避免菌落蔓延使得无法计数,可采取以下措施:

——待培养皿里的混合物凝固后,于其上再铺一层(约 5 mL)还保持液体状态的该培养基;

——待培养皿里的混合物凝固后,翻转培养皿,于培养皿的盖子里放一片滤纸并在滤纸上滴几滴甘油。

9.5 菌落计数

9.5.1 做平板菌落计数时,可用肉眼观察,需要时用放大镜检查。

9.5.2 蔓延的菌落被认为是单一菌落。如果被蔓延菌落所覆盖的部分不到平板面积的 $1/4$,计数未受影响的平板部分的菌落并计算出整个平板的相对量。如果被蔓延菌落所覆盖的部分超过了平板面积的 $1/4$,不应计数。

10 结果计算

10.1 保留含有 10 个~150 个菌落的培养皿。

用公式(2)计算每毫升或每克样品中需氧芽孢总数:

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

N ——样品中需氧芽孢总数,cfu/mL(g);

$\sum c$ ——所有保留培养皿中计数菌落的总和;

n_1 ——保留的含有 10 个~150 个菌落的培养皿中第一个稀释度的培养皿数;

n_2 ——保留的含有 10 个~150 个菌落的培养皿中第二个稀释度的培养皿数;

d ——第一个稀释度的稀释因数。

结果保留两位有效数字。

示例:

需氧芽孢总数测定给出如下结果(每个稀释度培养 2 个培养皿):

——在第一个稀释度下(10^0)含有 86 个和 101 个菌落;

——在第二个稀释度下(10^{-1})含有 8 个和 12 个菌落。

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0.1n_2)d} = \frac{86 + 101 + 12}{(2 + 0.1 \times 1) \times 10^0} = \frac{199}{2.1} = 94.8$$

修约上述结果,样品中芽孢总数报告为 95 或 9.5×10^1 cfu/mL。

10.2 如果所有稀释度培养皿中菌落数均少于 10 个,结果报告为“样品中需氧芽孢总数小于 $10 \times 1/d$ cfu/mL(g)”,式中 d 为最低稀释液的稀释度。

10.3 如果所有稀释度培养皿中的菌落数均多于 150 个,结果报告为“样品中需氧芽孢总数大于 $150 \times 1/d$ cfu/mL(g)”,式中 d 为最高稀释液的稀释度。

第三部分:嗜热需氧芽孢数测定

1 范围

本部分规定了乳与乳制品中嗜热需氧芽孢数的测定方法。

本部分适用于生鲜乳及其制品中嗜热需氧芽孢数的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB/T 4789.1 食品卫生微生物学检验 总则

GB/T 4789.28—2003 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本部分。

3.1

嗜热需氧芽孢 thermophilic aerobic bacterial spores

指在有氧条件下,经 100℃ 加热处理 30 min,能存活并且于 55℃ 下培养 48 h 在 DTA 平板上形成可计数菌落的微生物。

3.2

DTA—dextrose tryptone agar

葡萄糖胰蛋白胍琼脂。

4 原理

取一定量的液体检样或检样的初级稀释液,将其在 100℃ 下加热 30 min,在 DTA 培养基内,于 55℃ 条件下培养 48 h,菌落计数,算出每毫升(克)检样中的嗜热需氧芽孢数。

5 稀释液和培养基

5.1 蛋白胍-盐溶液

5.1.1 成分

酶水解酪蛋白胍	1.0 g
氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

5.1.2 制法

将酶水解酪蛋白胍和氯化钠溶解于蒸馏水中,用质量分数 15% 氢氧化钠溶液校正 pH 至 7.0 ± 0.1 。分装试管和烧瓶,每管 9 mL、每瓶 90 mL 或 225 mL,相对误差不超过 $\pm 2\%$ 。密封后, $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

5.2 磷酸盐缓冲液:按 GB/T 4789.28—2003 中 3.22 规定进行制备。

5.3 DTA 培养基

5.3.1 成分

胰蛋白胍	10.0 g
葡萄糖	5.0 g
2% 溴甲酚紫乙醇溶液	2 mL
琼脂	10 g~15 g
蒸馏水	1 000 mL

注:琼脂用量根据其凝固程度决定。

5.3.2 制法

将 5.3.1 中除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水中,用质量分数 15% 氢氧化钠溶液校正 pH 至 6.9 ± 0.1 。加入琼脂,加热煮沸,使琼脂溶化,分装烧瓶。密封后 $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。若立即使用此培养基,在水浴(6.3)中将其冷却到 45°C ;否则,将灭菌后的培养基放于暗处温度为 $0^\circ\text{C} \sim 5^\circ\text{C}$ 之间贮存,时间不超过 30 d。为了避免延误倾注培养基的时间,微生物检测之前,加热融化培养基。然后,于水浴(6.3)中冷却到 45°C 。

6 设备和材料

6.1 微生物实验室常用设备和材料。

6.2 培养箱: $55^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。

6.3 水浴锅: $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。

6.4 无菌培养皿;直径 90 mm。

6.5 无菌吸管。

6.6 无菌试管。

7 取样

样品的采取按 GB/T 4789.1 执行。

8 检测程序

嗜热需氧芽孢数检测程序见图 3。

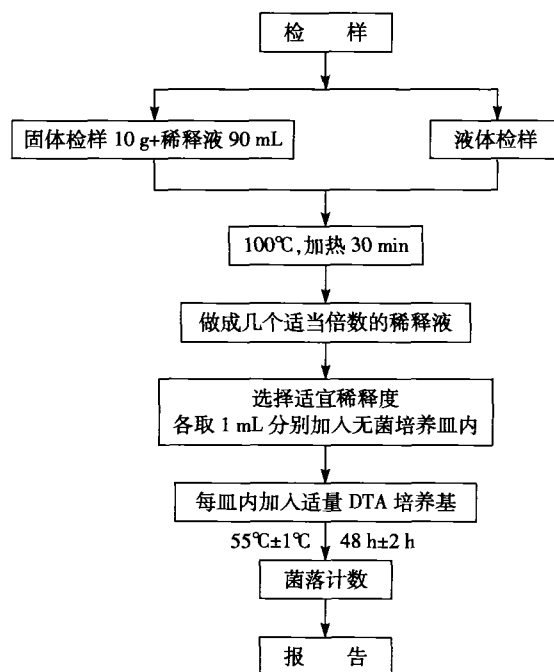


图 3

9 操作步骤

9.1 检样处理

9.1.1 以无菌操作打开待检样品包装容器,液体样品应避免形成泡沫。

9.1.2 以无菌操作称取固体或半固体检样 10 g(或 25 g)于含有 90 mL(或 225 mL)预热至 45°C 的灭菌

稀释液(5.1或5.2)的三角烧瓶中(瓶内预置适当数量的玻璃珠),经充分振摇(必要时用均质器均质或无菌乳钵研磨)制成 10^{-1} 初级稀释液。

9.2 加热处理

9.2.1 用无菌吸管(6.5)吸取液体检样、固体或半固体检样的初级稀释液 5 mL~10 mL 于无菌试管(6.6)中,注意不应使样液接触到超出水面和位于水面下 2 cm 以内的试管内壁。

9.2.2 立即将上述试管放入 100℃ 的水浴中,使试管内液面至少低于水面 4 cm。

9.2.3 加热处理 30 min ± 1 min,从试管放入 100℃ 水浴中开始计时。

9.2.4 将加热处理后的试管取出立即放到 20℃ 以下的流水中冷却。

9.3 进一步稀释液的制备

如果有必要,取一支 1 mL 无菌吸管,吸取 1 mL 经加热处理的样液于含有 9 mL 无菌稀释液的试管中,振摇试管,混合均匀,获得其 10 倍稀释液(液体检样 10^{-1} 稀释液或固体检样 10^{-2} 稀释液)。

9.4 接种和培养

9.4.1 根据对样品中嗜热需氧芽孢含量的估计,选择适宜的稀释度,即通过正确地选择,使得在培养结束后至少有一个培养皿里长出 10 个~150 个菌落。分别在做 10 倍递增稀释的同时,即以吸取该稀释度的吸管移 1mL 该稀释液于无菌培养皿内,每个稀释度接种两个培养皿。

注:在每毫升(克)乳或乳制品中,常常只有少量的嗜热需氧芽孢。如果想测出它们的数量,可以采取以下措施:

——在多个培养皿里接种足够量的经加热处理的液体样品或经加热处理的初级稀释液;

——使用更大的培养皿,以能够在其中接种多于 1 mL 经加热处理的液体样品或经加热处理的初级稀释液。

在报告结果时,必须要注明对检测方法进行的调整。

9.4.2 立即倾注 12 mL~15 mL 已融化并冷却至 45℃ ± 1℃ 的 DTA 培养基到每个培养皿中。

9.4.3 小心地转动培养皿使接种样液和培养基混合均匀,水平放置使混合物凝固。从热处理结束到接种样液和培养基混合所用的时间不得超过 15 min。

9.4.4 接种样液的同时,用 1 mL 稀释液作空白试验。

9.4.5 待琼脂凝固后,堆叠培养皿,将其倒置在塑料袋里,然后将其放入培养箱(6.2)中,于 55℃ ± 1℃ 培养 48 h ± 2 h。

注:为了避免菌落蔓延使得无法计数,可采取以下措施:

——待培养皿里的混合物凝固后,于其上再铺一层(约 5 mL)还保持液体状态的该培养基;

——待培养皿里的混合物凝固后,翻转培养皿,于培养皿的盖子里放一片滤纸并在滤纸上滴几滴甘油。

9.5 菌落计数

9.5.1 做平板菌落计数时,可用肉眼观察,必要时用放大镜检查。

9.5.2 蔓延的菌落被认为是单一菌落。如果被蔓延菌落所覆盖的部分不到平板面积的 1/4,计数未受影响的平板部分的菌落并计算出整个平板的相对量。如果被蔓延菌落所覆盖的部分超过了平板面积的 1/4,不应计数。

10 结果计算

10.1 保留含有 10 个~150 个菌落的培养皿。

用公式(3)计算每毫升或每克样品中的嗜热需氧芽孢数:

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

N ——样品中的嗜热需氧芽孢数,cfu/mL(g);

$\sum c$ ——所有保留培养皿中计数菌落的总和;

n_1 ——保留的含有 10 个~150 个菌落的培养皿中第一个稀释度的培养皿数；

n_2 ——保留的含有 10 个~150 个菌落的培养皿中第二个稀释度的培养皿数；

d ——第一个稀释度的稀释因数。

结果保留两位有效数字。

示例：

嗜热需氧芽孢数测定给出如下结果(每个稀释度培养 2 个培养皿)：

——在第一个稀释度下(10^0)含有 86 个和 101 个菌落；

——在第二个稀释度下(10^{-1})含有 8 个和 12 个菌落。

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0.1n_2)d} = \frac{86 + 101 + 12}{(2 + 0.1 \times 1) \times 10^0} = \frac{199}{2.1} = 94.8$$

修约上述结果,样品中嗜热需氧芽孢数报告为 95 或 9.5×10^1 cfu/mL。

10.2 如果所有稀释度培养皿中菌落数均少于 10 个,结果报告为“样品中嗜热需氧芽孢数小于 $10 \times 1/d$ cfu/mL(g)”,式中 d 为最低稀释液的稀释度。

10.3 如果所有稀释度培养皿中的菌落数均多于 150 个,结果报告为“样品中嗜热需氧芽孢数大于 $150 \times 1/d$ cfu/mL(g)”,式中 d 为最高稀释液的稀释度。