



中华人民共和国粮食行业标准

LS/T 6146—2023

粮油检验 粮食中霉菌计数 荧光快速检测法

Inspection of grain and oils—Enumeration of molds in grain—
Fluorescence rapid detection method

2023-11-14 发布

2024-05-14 实施

国家粮食和物资储备局 发布
中国标准出版社 出版

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。

本文件由国家粮食和物资储备局提出。

本文件由全国粮油标准化技术委员会(SAC/TC 270)归口。

本文件起草单位：国家粮食和物资储备局科学研究院、国家粮食和物资储备局标准质量中心、山东省粮油检测中心、中国储备粮管理集团有限公司仓储管理部、河北省粮油质量检测和信息服务中心、天津海关动植物与食品检测中心、吉林省粮油卫生检验监测站、广东省粮食和物资储备保障中心、安徽省粮油产品质量监督检测站、云南省粮油科学研究院(云南省粮油产品质量监督检验测试中心)、山西省检验检测中心(山西省标准计量技术研究院)、陕西省粮食质量安全中心、青岛元信检测技术有限公司、天祥(天津)质量技术服务有限公司青岛分公司、农业农村部食物与营养发展研究所。

本文件主要起草人：崔华、王松雪、谢刚、王培、李克强、郭玉婷、王静、檀军锋、李森、张宏伟、赵良娟、张月、张建桥、石家源、王亚军、朱启思、胡斌、刘付英、王学政、王友凯、王丽华、宋泽伟、赵荔、高璐斐、韩娟。

粮油检验 粮食中霉菌计数 荧光快速检测法

1 范围

本文件规定了粮食中霉菌计数荧光快速检测法的试剂与材料、仪器与设备、操作步骤、结果计算与报告、废弃物处理。

本文件适用于粮食及其制品中霉菌的计数。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

霉菌计数 enumeration of molds

样品经过处理,在一定条件下经培养后所得 1 g 样品中霉菌的数量。

3.2

菌落形成单位 colony-forming unit; CFU

由单个菌体或聚集成团的多个菌体在固体培养基上生长繁殖所形成的集落。

4 原理

样品稀释液通过滤膜后,霉菌被截留在滤膜表面,经培养基放大培养后,荧光试剂中不发光的酶底物进入霉菌体内并发生酶解反应,底物将发光基团释放到霉菌的细胞质中,发光基团在细胞内累积后,霉菌菌落在激发光线作用下被激发而显示荧光。

5 试剂与材料

除另有说明外,试验用水应符合 GB/T 6682 中三级水的规格。

5.1 改良霉菌培养基:见附录 A 中 A.1。

5.2 生理盐水:见 A.2。

5.3 荧光显色液:见 A.3。

5.4 无菌均质袋或锥形瓶:容量 250 mL。

- 5.5 广口锥形瓶:容量 1 L 或 500 mL。
- 5.6 试管:18 mm×180 mm。
- 5.7 无菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)或移液器及枪头。
- 5.8 无菌镊子。
- 5.9 无菌培养皿:直径 90 mm。
- 5.10 无菌疏水栅格滤膜:孔径 0.45 μm,直径 47 mm。
- 5.11 带垫片培养皿:直径 50 mm。

6 仪器与设备

- 6.1 谷物粉碎机:电机转速 $\geq 1\ 000$ r/min,粉碎粒径 < 1 mm。
- 6.2 天平:感量 0.1 g。
- 6.3 荧光检测仪:光源激发波长范围包含 490 nm,并含有截止波长为 420 nm 的光学滤镜。
- 6.4 拍击式均质器或振荡器。
- 6.5 涡旋混合器。
- 6.6 过滤器:50 mL \leq 滤杯体积 ≤ 250 mL。
- 6.7 真空泵。
- 6.8 培养箱:28 °C ± 1 °C。
- 6.9 灭菌锅。

7 操作步骤

7.1 样品制备

- 7.1.1 将样品用谷物粉碎机磨细至粒径小于 1 mm(全部通过 1 mm 孔径的试验筛),充分混匀。
- 7.1.2 准确称取 25 g 粉碎试样(精确至 0.1 g),置于含有 225 mL 无菌生理盐水(5.2)的锥形瓶(5.4)中,盖好瓶塞,放置到振荡器(6.4)中振荡 30 min(振荡幅度以样品全部摇起为有效);或置于无菌均质袋(5.4)中,加入 225 mL 无菌生理盐水,用拍击式均质器(6.4)高速拍打 2 min,制成 1:10 样品稀释液。
- 7.1.3 用无菌吸管(5.7)吸取 1 mL 1:10 样品稀释液注入含有 9 mL 无菌生理盐水的试管(5.6)中,用涡旋混合器(6.5)混匀,即为 1:100 样品稀释液。
- 7.1.4 按照 7.1.3 规定的操作程序制备 10 倍系列稀释样品稀释液。每递增稀释一次,更换一次无菌吸管或移液器枪头(5.7)。

7.2 样品过滤

- 7.2.1 根据对样品污染状况的估计,选择 2~3 个适宜稀释液的样品稀释液进行过滤,每个稀释液吸取 1 mL,注入含有 9 mL 无菌生理盐水的试管中,用涡旋混合器混匀,每个稀释液重复 2 次上述操作。同时,准备 2 管 10 mL 无菌生理盐水作为空白对照。
- 7.2.2 用无菌镊子(5.8)夹取无菌疏水栅格滤膜(5.10)边缘部分,将网格面向上贴放在过滤器(6.6)的滤床上,固定好滤杯,将试管中的样品稀释液转移至滤杯中,打开真空泵(6.7)进行抽滤,抽滤完后再用 10 mL 左右无菌生理盐水冲洗试管后倒入滤杯中,打开真空泵抽滤,待试液抽滤完后抽气约 5 s 后关闭真空泵。

7.3 滤膜培养

用无菌镊子夹住滤膜边缘从过滤器中取出,转移到改良霉菌培养基(5.1)中,将网格面朝上,先将滤

膜一边接触培养基后再缓慢下放,使二者紧密贴合,中间不能有气泡。盖好皿盖后将培养皿倒扣放入培养箱(6.8)中,于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 3\text{ h}$ 。

7.4 菌落计数

用无菌镊子从改良霉菌培养基中取出滤膜,将网格面朝上转移到含有 1.5 mL 荧光显色液(5.3)的带垫片培养皿(5.11)中,盖好皿盖后将培养皿倒扣放入培养箱中,于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 30 min 后,将培养皿口朝上置于荧光检测仪(6.3)的采集平台上,通过观察窗对荧光菌落进行观察并计数。

注:使用不同厂家的荧光显色液和荧光检测仪时在操作方面会有区别,按照其使用说明要求进行操作。

8 结果计算与报告

8.1 总则

选取霉菌总数在 $10\text{ CFU}\sim 150\text{ CFU}$ 的滤膜进行计算,将同一稀释度的两个滤膜霉菌总数取平均值,再乘以相应的稀释倍数,以 CFU 表示霉菌的总数。

8.2 结果计算

8.2.1 当霉菌总数均在 $10\text{ CFU}\sim 150\text{ CFU}$ 之间时,按式(1)计算:

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

式中:

- N —— 样品霉菌数;
- $\sum C$ —— 两个连续稀释度的所有平板霉菌数之和;
- n_1 —— 低稀释倍数滤膜个数;
- n_2 —— 高稀释倍数滤膜个数;
- d —— 低稀释度稀释因子。

公式应用范例见附录 B。

8.2.2 在无法通过重新选择样品稀释度来优化霉菌总数均为 $10\text{ CFU}\sim 150\text{ CFU}$ 的情况下,按照以下方式进行计算:

- a) 当霉菌总数均小于 10 CFU 时,按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算;
- b) 当霉菌总数均大于 150 CFU 时,按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数计算;
- c) 其中一部分小于 10 CFU 或大于 150 CFU 时,按接近 10 CFU 或 150 CFU 的平均菌落数乘以相应稀释倍数计算;
- d) 当霉菌总数均为 0 时,以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

8.3 报告

8.3.1 霉菌数小于 100 CFU 时,以整数报告。

8.3.2 霉菌数大于或等于 100 CFU 时,取前 2 位数字,后面用 0 代替位数或者用 10 的指数形式来表示。

8.3.3 若所有滤膜上为蔓延菌落而无法计数,则报告菌落蔓延。

8.3.4 若空白对照上有菌落生长,则此次检测结果无效。

8.3.5 以 CFU/g 为单位报告。

9 废弃物处理

检测过程中的废弃物按照 GB 19489 的相关要求进行处理。

附 录 A
(资料性)
培养基与试剂

A.1 改良霉菌培养基

A.1.1 成分

麦芽浸粉	30.0 g
葡萄糖	20.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
酵母粉	2.0 g
磷酸二氢钾	1.0 g
硫酸镁	0.5 g
琼脂	20.0 g
维生素 B ₂	0.005 g
氯霉素	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 配制方法

除琼脂和维生素 B₂ 以外,准确称量其他各成分置于烧杯中,加入适量蒸馏水,搅拌至完全溶解,补足蒸馏水至 1 000 mL,加入琼脂,于 121 °C ± 1 °C 灭菌 15 min,待冷却至 46 °C(可放置于 46 °C ± 1 °C 水浴锅中保温),加入 1 mL 维生素 B₂ 溶液(5 mg/mL,用无菌生理盐水配制,现配现用),混匀后倾注 15 mL~20 mL 至每个无菌培养皿(5.9)中,待凝固后置 4 °C 冰箱内保存备用(储存时间不宜超过 2 周)。

A.2 生理盐水

A.2.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 配制方法

称取 8.5 g 氯化钠溶于适量蒸馏水中,搅拌至完全溶解,定容至 1 000 mL,分装后,121 °C ± 1 °C 灭菌 15 min 后备用。

A.3 荧光显色液

A.3.1 成分

5(6)-羧基荧光素二乙酸酯	0.15 mg
十二烷基-β-D-麦芽糖苷	0.2 g
甘氨酸	0.01 g
ε-聚赖氨酸	0.01 g

A.3.2 配制方法

称取 0.2 g 十二烷基- β -D-麦芽糖苷、0.01 g 甘氨酸和 0.01 g ϵ -聚赖氨酸,用 100 mL 无菌水充分溶解后,无菌条件下用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,即为荧光显色缓冲液;准确称取 0.15 mg 5(6)-羧基荧光素二乙酸酯,用 30 μL 二甲基亚砜溶解后加入荧光显色缓冲液中,即为荧光显色液,4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用(储存时间不宜超过 2 周)。

附 录 B
(资料性)
公式应用范例

两个连续稀释度的所有滤膜霉菌数均在 10 CFU~150 CFU 之间,结果见表 B.1。

表 B.1 计算范例

稀释度	低稀释度 1 : 100(10 ⁻²)	高稀释度 1 : 1 000(10 ⁻³)
霉菌数(CFU)	132/126	16/18

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} = \frac{132 + 126 + 16 + 18}{(2 + 0.1 \times 2) \times 10^{-2}} = 13\ 272\ \text{CFU}$$

数字修约后,表示为 1.3×10^4 ,报告为 1.3×10^4 CFU/g。
