

- extraction methods for quantification of microcystin-LR and microcystin-RR in fish, vegetable, and soil matrices using UPLC-MS/MS[J]. *Harmful Algae*, 2018, 76(4): 47-57.
- [15] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 水产品中微囊藻毒素的测定:GB 5009.273—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [16] GREER B, MCNAMEE S E, BOOTS B, et al. A validated UPLC-MS/MS method for the surveillance of ten aquatic biotoxins in European brackish and freshwater systems [J]. *Harmful Algae*, 2016, 55(1): 31-40.
- [17] 刘腾飞,杨代凤,毛健,等.碳纳米管材料在食品安全分析中的应用[J].*化工进展*,2018,37(10):3699-3725.
- [18] 赵伟高.磁性多壁碳纳米管的制备及其吸附性能研究[D].天津:天津大学,2016.
- [19] 殷敏.磁性多壁碳纳米管的功能化修饰及在磁共振成像中的应用[D].上海:上海师范大学,2010.
- [20] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会.生活饮用水标准检验方法 有机物指标:GB/T 5750.8—2006[S].北京:中国标准出版社,2006.
- [21] 陈冰,肖维毅,尧珍玉,等.磁性多壁碳纳米管固相萃取-气相色谱质谱联用快速测定食用油中的苯并[a]芘[J].*中国测试*,2015,41(11):44-49.
- [22] 付善良,丁利,朱绍华,等.磁性多壁碳纳米管固相萃取-气相色谱-质谱法检测水样中的 13 种邻苯二甲酸酯类化合物[J].*色谱*,2011,29(8):737-742.
- [23] 胡争艳,王天娇,王立媛,等.磁性多壁碳纳米管分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测婴幼儿配方奶粉中 14 种性激素残留[J].*中国卫生检验杂志*,2018,28(6):641-649.

实验技术与方法

快速霉菌酵母测试片法与 GB 4789.15—2016 在 3 种类型食品中霉菌计数比较

赵红阳¹,王鸣雨¹,宋娇娇¹,高思琪²,杨含草²,关远航²,孟云³,卢行安¹

(1. 中国检验检疫科学研究院,北京 100176; 2. 大连医科大学,辽宁大连 116044; 3. 3M 中国有限公司,北京 100176)

摘要:目的 比较快速霉菌酵母测试片(RYM)法和 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》方法(以下简称国标法)测定 3 种类型食品样品中霉菌计数的一致性。方法 选取 90 份糕点、面包、饼干样品,30 份含乳饮料、植物蛋白饮料、固体饮料样品,30 份保健食品样品并对 3 种类型食品样品进行人工污染得到的人工污染样品,利用 RYM 法和国标法进行霉菌计数的测定,检测结果通过配对资料 *t* 检验以及对数值差值绝对值(|dlog|)汇总分析进行统计。结果 两种方法对 3 种类型食品样品以及人工污染样品检测结果在统计学意义上无显著性差异($P>0.05$);|dlog|≤0.50 占比均为 100.0%,表明两种方法的检测结果一致性较好。结论 RYM 法和国标法对 3 种类型的食品样品及其人工污染样品中霉菌计数的检测结果一致性较好。

关键词:快速霉菌酵母测试片;GB 4789.15—2016;霉菌计数;一致性

中图分类号:R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2020)04-0397-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.04.009

Comparison of the rapid yeast and mold count plate method with GB 4789.15-2016 method for enumeration of molds in three types of food

ZHAO Hongyang¹, WANG Mingyu¹, SONG Jiaojiao¹, GAO Siqi²,
YANG Hancao², GUAN Yuanhang², MENG Yun³, LU Xing'an¹

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 2. Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China; 3. 3M China Limited, Beijing 100176, China)

Abstract: Objective The rapid yeast and mold count plate (RYM) method and the national standard (GB 4789.15-

收稿日期:2020-03-17

基金项目:科技部“食品安全关键技术研发”重点专项(2017YFC1601400)

作者简介:赵红阳 女 中级工程师 研究方向为微生物检测及溯源方法 E-mail: zhy8707@163.com

通信作者:卢行安 男 研究员 研究方向为微生物检测质量控制和溯源方法 E-mail: luxa@sina.com

2016) method were compared for the consistency in three types of food detection. **Methods** 90 pastry, bread and biscuits samples, 30 milk beverage, vegetable protein beverage and solid drink samples, 30 health foods samples, three types of artificially contaminated food samples were detected by the RYM method and the GB method, then the data of the two method were analyzed by the paired *t* test and the log difference ($|d \log|$). **Results** The statistics were made for the data of three types of food samples and three types of artificially contaminated food samples. The paired *t* test gave $P > 0.05$, and the ratio of $|d \log| \leq 0.50$ were 100.0%. There was no significant difference between the result of the two method.

Conclusion There is no significant difference between the results of the RYM method and the GB method in detecting three types of food samples and three types of artificially contaminated food samples.

Key words: Rapid yeast and mold count plate; GB 4789.15-2016; enumeration of molds; consistency

霉菌广泛分布于自然界,是一种常见的真核微生物,可以形成各种微小的孢子,极易污染食物^[1-2]。霉菌的污染会导致食品营养价值下降、腐败变质,有些霉菌能够合成霉菌毒素,是一种有毒的代谢产物,会引起人体各种急性和慢性中毒,有些甚至具有强烈的致癌性^[3-5],因此,对食品中霉菌的检测与控制是十分必要的。

糕点、面包、饼干、含乳饮料、植物蛋白饮料和固体饮料及功能食品3种类型食品是现代人们日常生活需求日益增长的消费品,均含有碳水化合物和蛋白质等丰富的营养物质,非常利于霉菌的生长繁殖,因此在流通和储存过程中也极易变质。GB 7099—2015《食品安全国家标准 糕点、面包》^[6]、GB 7101—2015《食品安全国家标准 饮料》^[7]中明确规定了霉菌的限量指标,GB 16740—2014《食品安全国家标准 保健食品》^[8]中明确规定了霉菌和酵母菌的限量指标。目前国内外对霉菌的检查方法主要有平板计数法、显色培养基计数法、WKJ-II型微生物快速检测系统、流式细胞仪计数法和测试片法^[9]。其中,测试片法是一项微生物快速的检测方法,该方法操作简便,检测周期短,极大地提高了检测效率。

对于酵母菌的检测使用国标方法和测试片法培养时间区别较小,测试片法对霉菌的检测效率有明显提升,国内外因食品中霉菌污染而产生的安全

问题较为多发^[10],本试验主要对快速霉菌酵母测试片法(以下简称 RYM 法)和 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》^[11](以下简称国标法)中平板计数法测定糕点、面包、饼干、含乳饮料、植物蛋白饮料和固体饮料及功能食品中霉菌计数进行一致性分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

选取不同品牌和口味的糕点、面包、饼干样品各30份,共计90份,均购自超市;含乳饮料、植物蛋白饮料、固体饮料样品各10份,共计30份,均购自超市;保健食品样品30份,其中26份样品由保健食品厂家提供,2份样品购自超市,2份样品购自网上商城。

1.1.2 标准菌株

多种测试食品样品在制作过程中会使用酵母,GB 7099—2015^[6]中只规定了霉菌限量,因此本试验仅选取霉菌标准菌株进行人工污染,根据王伟等^[12]对于 RYM 法和国标法测定 93 株霉菌和酵母菌标准菌株及野生菌株计数结果的一致性分析,选取其中 8 株对 RYM 法和国标法霉菌和酵母菌计数结果无显著性差异的霉菌标准菌株用于制备人工污染样品,具体信息见表 1。

表 1 霉菌标准菌株信息

Table 1 Basic information of mold strains

| 菌株编号 | 菌株名称 | 拉丁文名称 | 菌株来源 |
|--------------|-------|-------------------------------|-----------------|
| CICC 4034 | 岛青霉 | <i>Penicillium islandicum</i> | 中国工业微生物菌种保藏管理中心 |
| CGMCC 3.4598 | 禾谷镰孢菌 | <i>Fusarium graminearum</i> | 中国普通微生物菌种保藏管理中心 |
| ATCC 37119 | 茄镰孢菌 | <i>Fusarium solani</i> | 中国农业微生物菌种保藏管理中心 |
| ATCC 16888 | 黑曲霉 | <i>Aspergillus niger</i> | 美国菌种保藏中心 |
| CGMCC 3.4600 | 雪腐镰刀菌 | <i>Fusarium nivale</i> | 中国普通微生物菌种保藏管理中心 |
| ATCC 30469 | 构巢曲霉 | <i>Aspergillus nidulans</i> | 中国农业微生物菌种保藏管理中心 |
| CGMCC 3.4759 | 串珠镰刀菌 | <i>Fusarium moniliforme</i> | 中国普通微生物菌种保藏管理中心 |
| ATCC 32409 | 荨麻青霉 | <i>Penicillium urticae</i> | 中国农业微生物菌种保藏管理中心 |

1.1.3 主要仪器与试剂

生物安全柜、恒温生化培养箱、混匀仪、电子分

析天平。Petrifilm™ RYM(3M 中国有限公司)、孟加拉红培养基(北京陆桥技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品的制备

自然样品:称取 25 g (mL) 样品放入盛有 225 mL 稀释液的无菌三角烧瓶内,混匀 2 min,制成 1:10 的样品匀液(自然样品编号:1-1~150-1)。

人工污染样品:用接种针挑取一定量的霉菌标准菌株于稀释液中,充分混匀,配置成一定浓度的菌悬液,向样品匀液中添加菌悬液,混匀 2 min,制成最终浓度为 $10^2 \sim 10^5$ CFU/mL 的人工污染样品(人工污染样品编号:1-2~150-2)。

1.2.2 霉菌计数

1.2.2.1 国标法的操作步骤^[12]

稀释与接种:取 1.2.1 中制备的样品匀液,严格按照 1:10 倍比稀释,根据对样品污染状况的估计,选择适宜的 2~3 个连续稀释度的样品匀液,在进行倍比稀释的同时,每个稀释度分别取 1 mL 样品匀液于 2 个无菌平皿内。将 20~25 mL 冷却至 46 ℃ 的孟加拉红琼脂倾注平皿,并转动平皿使其混合均匀,置水平台面待培养基完全凝固。

培养:琼脂凝固后,正置平板,置 (28 ± 1) ℃ 培养箱中培养,观察并记录培养至第 5 天的结果。

判读与计数:计算同一稀释度的两个平板菌落数的平均值,再将平均值乘以相应稀释倍数。平板菌落数的选取依据国标法第一法执行。

1.2.2.2 RYM 法的操作步骤^[13]

稀释与接种:取 1.2.1 中制备的样品匀液,严格按照 1:10 倍比稀释,根据对样品污染状况的估计,选择适宜的 2~3 个连续稀释度,每个稀释度接种 2 张 RYM 测试片,将测试片置于平坦试验台面,揭开层膜,使用移液器将 1 mL 样品匀液垂直滴在测试片的中央,允许上层膜直接落下,但切勿上下滚动上层膜。手拿压板横杆,将压板放置在上层膜中央处,平稳地压下,使样品匀液覆盖于圆形的培养面积上,切勿扭转压板。拿起压板,静置至少 1 min 以使培养基凝固。

培养:将测试片的透明面朝上置于培养箱内,堆叠片数不超过 20 片。培养温度为 28 ℃,培养时间 (48 ± 2) h。

判读与计数:选取菌落数在 15~150 CFU 之间的测试片计数,将颜色随着时间的延长为蓝绿色不等、中心深暗、边缘扩散的大型扁平菌落计为霉菌。每个稀释度的菌落数应采用 2 张测试片的平均数。

1.2.3 数据分析

在统计分析之前,将检测结果进行对数值转换,对检测结果的 $d\log$ 值进行正态检验。采用 2 种统计方式:配对资料 t 检验以及 $|d\log|$ 汇总分

析^[14-15],通过配对资料 t 检验来评价两种方法检测结果之间是否有显著性差异;通过对 $|d\log|$ 的分析,采用国际通用的经验值 0.25,分别计数 $|d\log| \leq 0.25$ 、 $0.25 < |d\log| \leq 0.50$ 、 $|d\log| > 0.50$ 的结果个数占所有结果个数的百分比,评价两种方法检测结果的一致性。

2 结果

2.1 面包、糕点、饼干样品霉菌计数检测结果

采用国标法和 RYM 法检测 90 份面包、糕点、饼干样品,90 份样品中有 87 份样品的霉菌计数结果均为 <10 CFU/g(见表 2),对检测结果的 $d\log$ 值进行正态检验,结果表明 $d\log$ 值服从正态分布,检测结果在统计学意义上无显著性差异($t=1.2197$, $P>0.05$);90 组检测结果中 $|d\log| \leq 0.25$ 的结果占比为 98.9%(89/90), $0.25 < |d\log| \leq 0.50$ 占比为 1.1%(1/90), $|d\log| > 0.50$ 占比为 0.0%(0/90)。

表 2 糕点、面包、饼干样品的霉菌计数检测结果($n=90$)

| 样品编号 | 计数结果/(CFU/g) | | 结果数 | 占比/% |
|------------------------------|--------------|-------|-----|------|
| | RYM 法 | 国标法 | | |
| 1-1~20-1,23-1~42-1,44-1~90-1 | $<10^*$ | <10 | 87 | 96.7 |
| 21-1 | 1 500 | 1 400 | 1 | 1.1 |
| 22-1 | 25 | 35 | 1 | 1.1 |
| 43-1 | <10 | 25 | 1 | 1.1 |

注:*代表计数结果 <10 的数据,在进行统计检验时,统一按数值 10 取对数进行统计

2.2 含乳饮料、植物蛋白饮料、固体饮料样品霉菌计数检测结果

采用国标法和 RYM 法检测 30 份含乳饮料、植物蛋白饮料、固体饮料样品,检测结果均小于 10 CFU/g 或 10 CFU/mL, $|d\log| \leq 0.25$ 占比为 100.0%(30/30)。

2.3 保健食品样品霉菌计数检测结果

采用国标法和 RYM 法检测 30 份保健食品样品的霉菌计数检测结果均小于 10 CFU/g, $|d\log| \leq 0.25$ 占比为 100.0%(30/30)。

2.4 人工污染面包、糕点、饼干样品霉菌计数检测结果

采用国标法和 RYM 法检测 90 份人工污染面包、糕点、饼干样品,对检测结果的 $d\log$ 值进行正态检验,结果表明 $d\log$ 值服从正态分布; $d\log$ 值的平均值为 0.020 0,配对 t 检验 P 值为 0.186 4,说明两种方法检测结果在统计学意义上无显著性差异($t=1.3425$, $P>0.05$);90 组检测结果中 $|d\log| \leq 0.25$ 占比为 91.1%(82/90), $0.25 < |d\log| \leq 0.50$ 占比为

8.9% (8/90), $|\text{dlog}| > 0.50$ 占比为 0.0% (0/90)。

2.5 人工污染含乳饮料、植物蛋白饮料、固体饮料样品霉菌计数检测结果

采用国标法和 RYM 法检测 30 份人工污染含乳饮料、植物蛋白饮料、固体饮料样品,对检测结果的 dlog 值进行正态检验,结果表明 dlog 值服从正态分布; dlog 值的平均值为 0.009 9,配对 t 检验 P 值为 0.310 0,说明两种方法检测结果在统计学意义上无显著性差异 ($t = 1.050 9, P > 0.05$); $|\text{dlog}| \leq 0.25$ 占比为 100.0% (30/30)。

2.6 人工污染保健食品样品霉菌计数检测结果

采用国标法和 RYM 法检测 30 份人工污染保健食品样品,对检测结果的 dlog 值进行正态检验,结果表明 dlog 值服从正态分布, dlog 值的平均值为 -0.029 5,配对 t 检验 P 值为 0.216 3,说明两种方法检测结果在统计学意义上无显著性差异 ($t = 1.285 6, P > 0.05$); 30 组检测结果中 $|\text{dlog}| \leq 0.25$ 占比为 96.7% (29/30), $0.25 < |\text{dlog}| \leq 0.50$ 占比为 3.3% (1/30), $|\text{dlog}| > 0.50$ 占比为 0.0% (0/30)。

3 讨论

两种方法对于面包、糕点、饼干样品的霉菌检测结果在统计学意义上无显著性差异 ($P > 0.05$); 两种方法对于这 3 种类型食品人工污染样品的检测结果在统计学意义上无显著性差异 ($P > 0.05$), $|\text{dlog}| \leq 0.50$ 占比均为 100.0%,说明两种方法对这 3 种类型食品的霉菌计数检测结果的一致性较好。

本试验采用配对资料 t 检验和 $|\text{dlog}|$ 汇总分析对样品进行分析。配对资料 t 检验适用于对同一样品接受不同处理后的比较,能够尽可能消除其他干扰因素,体现出两种方法对于样品总体霉菌计数检测结果的影响。 $|\text{dlog}|$ 汇总分析体现两种方法对每个样品检测的差异大小^[14-15]。通过两种统计方式,可以判断两种方法检测结果的差异是否具有统计学意义以及两种方法的一致性。

本试验选取的面包、糕点、饼干样品、含乳饮料、植物蛋白饮料、固体饮料样品以及保健食品样品成分更为复杂,同时面包、糕点、饼干和保健食品等样品检验液中具有较多不溶样品基质颗粒,有较强的代表性。RYM 测试片应用 5-溴-4-氯-3 吡啶基-磷酸盐作为指示剂与霉菌发生特异性显色反应,通常呈蓝绿色放射性菌落^[16],在计数过程中发现霉菌菌落易于区分不溶颗粒,计数清晰,同时与国标法比较,RYM 法培养时间为 48 h,检测周期缩短,极大

地提高了检测效率。

综上,在检测面包、糕点、饼干样品、含乳饮料、植物蛋白饮料、固体饮料样品以及保健食品样品 3 种类型食品人工污染样品时,RYM 法与国标法检测结果的一致性较好。RYM 法可满足 3 种类型食品样品和人工污染样品中霉菌计数的快速检测需求。

参考文献

- [1] PITT J I, HOCKING A D. Fungi and food spoilage[J]. Food Control, 2009, 10(1):59-60.
- [2] SAMSON R A, HOEKSTRA E S, FRISVAD J C. Introduction to food-borne fungi[J]. Mycologia, 1988, 81(6):942.
- [3] BOUAKLINE A, LACROIX C, ROUX N, et al. Fungal contamination of food in hematology units[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(11):4272-4273.
- [4] 黄惠兴,王平原,李桂霞,等. 糕点、面包、饼干类食品霉菌检验方法探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(5): 852-853.
- [5] 柴竹林,王岩,王庆峰,等. 食品中常见霉菌毒素的污染及其检测技术[J]. 食品安全导刊, 2015(27):109.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 糕点、面包:GB 7099—2015 [S]. 北京:中国标准出版社,2015.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 饮料:GB 7101—2015 [S]. 北京:中国标准出版社,2015.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 保健食品:GB 16740—2014[S]. 北京:中国标准出版社,2014.
- [9] 刘桐,刘爽,司南,等. 霉菌和酵母菌检测技术的研究进展[J]. 农产品加工,2018(6):73-75.
- [10] 张丽,程杨. 关于霉菌毒素对食品的污染及防止方法[J]. 食品研究与开发, 2002, 23(6):98-100.
- [11] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数:GB 4789.15—2016 [S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [12] 王伟,李琴,赵红阳,等. Petrifilm™ 快速霉菌酵母测试片法与 GB 4789.15—2016 在酸奶检测中的比较[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(3):253-256.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 食品中霉菌和酵母菌的计数 Petrifilm™ 测试片法:SN/T 2566—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [14] 杨树勤. 卫生统计学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,1990: 29-34.
- [15] International Organization for Standardization. Microbiology of food chain—Horizontal method for the enumeration of microorganisms-Part1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique:ISO 4833-1:2013 [S]. 2013.
- [16] 王佳男,肖茜文,王艳蕊,等. 食品微生物测试片的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(2):701-705.