

实验技术与方法

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王伟¹,李琴²,赵红阳³,张东方⁴,孙英健³,王鸣雨³,宋娇娇³,卢行安³(1. 大连工业大学生物工程学院,辽宁大连 116034; 2. 黑龙江省农垦乳业检测中心,
黑龙江哈尔滨 150090; 3. 中国检验检疫科学研究院,北京 100176;
4. 3M 中国有限公司,北京 100176)

摘要:目的 比较 Petrifilm™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》测定质控样品、标准菌株及野生菌株、酸奶样品和人工污染酸奶样品中霉菌和酵母计数的一致性,研究 Petrifilm™RYM 法的特异性。方法 选取 2 份霉菌和酵母计数质控样品、78 株霉菌和酵母标准菌株及野生菌株、50 份酸奶样品和 50 份人工污染酸奶样品,利用两种方法进行霉菌和酵母计数的测定,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;同时利用 Petrifilm™RYM 法检测 15 株非霉菌和酵母菌株,考察 Petrifilm™RYM 的特异性。结果 两种方法对质控样品、标准菌株及野生菌株、酸奶样品和人工污染酸奶样品检测结果的配对 *t* 检验均 $P > 0.05$,差异无统计学意义;|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。Petrifilm™RYM 法检测非霉菌和酵母菌株,结果显示没有菌落出现,表明 Petrifilm™RYM 具有良好的特异性。结论 Petrifilm™RYM 法和 GB 4789.15—2016 对质控样品、标准菌株及野生菌株、酸奶样品和人工污染酸奶样品中霉菌和酵母计数的检测结果一致性较好,且 Petrifilm™RYM 具有良好的特异性。

关键词:Petrifilm™快速霉菌酵母测试片法; GB 4789.15—2016; 霉菌; 酵母; 一致性; 特异性

中图分类号:R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2018)03-0253-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2018.03.007

Comparison of the Petrifilm™ rapid yeast and mold count plate method with the national standard (GB 4789.15-2016) in yoghurtWANG Wei¹, LI Qin², ZHAO Hong-yang³, ZHANG Dong-fang⁴, SUN Ying-jian³,
WANG Ming-yu³, SONG Jiao-jiao³, LU Xing-an³(1. School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Liaoning Dalian
116034, China; 2. Heilongjiang Agriculture and Reclamation Dairy Inspection
Center, Heilongjiang Harbin 150090, China; 3. Chinese Academy of Inspection and
Quarantine, Beijing 100176, China; 4. 3M China Limited, Beijing 100176, China)

Abstract: Objective The 3M™ Petrifilm™ rapid yeast and mold count plate (RYM) method and the national standard method (GB 4789.15-2016) were compared for the consistency in yoghurt detection, and the specificity of the Petrifilm™RYM was assessed. **Methods** Two quality control samples, 78 reference strains and isolated strains of yeast and mold, 50 yoghurt samples and 50 artificially contaminated yoghurt samples were detected by both method. Then the data of the two method were analyzed by the paired *t* test and the log difference (|dlog|); and Petrifilm™RYM method was used to detect non-mold-yeast strains for specificity. **Results** There was no significant difference ($P > 0.05$) among different samples in paired *t* test, and the ratio of |dlog| ≤ 0.50 were 100.0%. There was no significant difference between the two method. The result of the yeast and mold count in non-mold-yeast strains were blank, indicating that the Petrifilm™RYM had good specificity. **Conclusion** There was no significant difference between the result of the Petrifilm™RYM method and the GB 4789.15-2016 method in detecting quality control samples, strains of yeast and mold, yoghurt samples and artificially contaminated yogurt samples, and the Petrifilm™RYM had good specificity.

Key words: Petrifilm™ rapid yeast and mold count plate; GB 4789.15-2016; mold count; yeast; consistency; specificity

收稿日期:2018-04-08

作者简介:王伟 女 硕士生 研究方向为微生物溯源方法 E-mail:3169324291@qq.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

在自然界中,霉菌和酵母普遍具有较强的腐生竞争能力,导致它们无所不在^[1-3]。食品中霉菌和酵母的存在会引起食品的腐败变质,使食品表面失去色、香、味,有些霉菌能够合成霉菌毒素,引起急、慢性中毒及致癌作用^[4-6],因此以霉菌和酵母计数来估计食品被污染的程度,并作为评价食品卫生质量的指示菌。目前已有若干个国家制定了某些食品中霉菌和酵母的限量标准,我国也制定了食品中霉菌和酵母的限量标准,且 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》^[7]已于2017年4月19日正式实施。

本试验主要对 Petrifilm™ 快速霉菌酵母测试片(RYM)法和 GB 4789.15—2016 测定酸奶中霉菌和酵母计数进行一致性分析,并研究 Petrifilm™ RYM

的特异性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源与质控样品

酸奶样品选取了50份不同品牌或口味的酸奶样品,均购自超市;并选取了2份霉菌和酵母计数质控样品,样品标识分别为 M056 和 M052,其满意值范围对数值(log₁₀ CFU/ml)均为 2.669~3.669。

1.1.2 标准菌株及野生菌株

选取93株标准菌株及野生菌株,其中29株霉菌包括27株标准菌株、2株野生菌株;49株酵母包括33株野生菌株、16株标准菌株;15株非霉菌和酵母菌株包括14株标准菌株、1株野生菌株。具体信息见表1~3。

表1 霉菌菌株信息

Table 1 Basic information of mold strains

菌株编号	菌株名称	来源	菌株编号	菌株名称	来源
ACCC 30167	康宁木霉	ACCC ^a	CICC 4029	鲜绿青霉	CICC ^b
ACCC 30579	棒曲霉	ACCC	CICC 40536	黄曲霉	CICC
ACCC 36937	黄色镰刀菌	ACCC	CICC 40356	扩展青霉	CICC
ACCC 30469	构巢曲霉	ACCC	CICC 4034	岛青霉	CICC
ACCC 32409	荨麻青霉	ACCC	CICC 40293	灰黄青霉	CICC
ACCC 30585	溜曲霉	ACCC	CICC 2474	杂色曲霉	CICC
ACCC 30415	米曲霉	ACCC	CGMCC 3.4600	雪腐镰刀菌	CGMCC ^c
ACCC 32409	圆弧青霉	ACCC	CGMCC 3.4759	串珠镰刀菌	CGMCC
ACCC 30588	哈茨木霉	ACCC	CGMCC 3.4598	禾谷镰刀菌	CGMCC
ACCC 30471	赭曲霉	ACCC	CGMCC 3.5835	烟曲霉	CGMCC
ACCC 36102	尖孢镰刀菌	ACCC	ATCC 9643	黄曲霉	ATCC ^d
ACCC 38007	木贼镰刀菌	ACCC	ATCC 16888	黑曲霉	ATCC
ACCC 37119	茄病镰刀菌	ACCC	T ₁	未鉴定	酸奶样品
ACCC 30536	棘孢木霉	ACCC	T ₂	未鉴定	酸奶样品
ACCC 37402	拟枝孢镰刀菌	ACCC			

注:^a表示中国农业微生物菌种保藏管理中心;^b表示中国工业微生物菌种保藏管理中心;^c表示中国普通微生物菌种保藏管理中心;^d表示美国菌种保藏中心

1.1.3 主要仪器与试剂

混匀仪、电子分析天平、恒温生化培养箱。Petrifilm™ RYM(3 M 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

质控样品:按照质控样品使用说明进行,准备40 ml 无菌稀释液,无菌操作开启西林瓶,样品开启后,立即加入4 ml 稀释液进行再水化,待溶解后,吸出放入无菌瓶中,再用余下的无菌稀释液清洗西林瓶内壁,此40 ml 溶液即是特性量值范围的质控样品。质控样品的检测在四个时间点分别由两名检测人员单独完成,时间点间隔1周,每次检测做5次重复。

标准菌株及野生菌株:用接种针挑取一定量的标准菌株及野生菌株于稀释液中,充分混匀,配制

成一定浓度的菌悬液,此菌悬液即是待测标准菌株及野生菌株原液。

酸奶样品:称取25 g 酸奶样品放入盛有25 ml 稀释液的无菌三角烧瓶内,涡旋混匀2 min,制成1:2的样品匀液;称取20 g 酸奶样品放入盛有80 ml 稀释液的无菌三角烧瓶内,涡旋混匀2 min,制成1:5的样品匀液;称取25 g 酸奶样品放入盛有225 ml 稀释液的无菌三角烧瓶内,涡旋混匀2 min,制成1:10的样品匀液。以此来考察酸奶样品经不同浓度稀释后的检测结果。

人工污染酸奶样品:在1:10 稀释梯度的样品匀液中添加40 ml 质控样品菌悬液,涡旋混匀2 min,制成人工污染样品。

1.2.2 霉菌和酵母计数

按照 Petrifilm™ RYM 法的操作步骤,28 ℃ 培

表 2 酵母菌株信息

Table 2 Basic information of yeast strains

菌株编号	菌株名称	来源	菌株编号	菌株名称	来源
P. K18	库德毕赤酵母	葡萄酒酿造环境	SF24	扣囊复膜酵母	白酒酒曲
P. K9	库德毕赤酵母	葡萄酒酿造环境	SF41	扣囊复膜酵母	白酒酒曲
P. K16	库德毕赤酵母	葡萄酒酿造环境	SF38	扣囊复膜酵母	白酒酒曲
P. K8	库德毕赤酵母	葡萄酒酿造环境	SF29	扣囊复膜酵母	白酒酒曲
P. K14	库德毕赤酵母	葡萄酒酿造环境	FC 13284	啤酒酵母	样品
P. A 6	异常毕赤酵母	白酒酒曲	FC 13385	布拉氏酵母	样品
P. A 8	异常毕赤酵母	白酒酒曲	M ₁	浅白隐球酵母	样品
YF7	浅白隐球酵母	环境	M ₂	粘质红酵母	样品
YF12	库德毕赤酵母	葡萄酒	ATCC 1001	酿酒酵母	ATCC
YF18	浅黄隐球酵母	环境	ATCC 10231	白色念珠菌	ATCC
YF19	克鲁维毕赤酵母	葡萄酒酿造环境	ATCC 1257	近平滑假丝酵母	ATCC
YF28	季也蒙毕赤酵母	葡萄酒酿造环境	ATCC 1316	热带假丝酵母	ATCC
YF44	拜耳接合酵母	葡萄酒酿造环境	ATCC 1457	解脂假丝酵母	ATCC
YB1	隐球酵母	环境	ATCC 1736	杰丁毕赤酵母	ATCC
YB6	马克斯克鲁维酵母	白酒酒曲	ATCC 1767	产阮假丝酵母	ATCC
YB7	美极梅奇酵母	葡萄酒酿造环境	ATCC 1784	中间假丝酵母	ATCC
YB9	海洋嗜杀酵母	白酒酒曲	ATCC 1904	涎沫假丝酵母	ATCC
YB16	粟酒裂殖酵母	葡萄酒酿造环境	ATCC 1950	博伊丁假丝酵母	ATCC
YS9	酿酒酵母	葡萄酒酿造环境	ATCC 1962	麦芽糖假丝酵母	ATCC
YS39	酿酒酵母	葡萄酒酿造环境	ATCC 9080	酿酒酵母	ATCC
YS32	酿酒酵母	葡萄酒酿造环境	ATCC 9763	酿酒酵母	ATCC
YS17	酿酒酵母	葡萄酒酿造环境	CICC 1946	酿酒酵母	CICC
YS31	酿酒酵母	葡萄酒酿造环境	CMCC 98001	白色念珠菌	CMCC ^o
SC	酿酒酵母	葡萄酒酿造环境	CMCC 98007	啤酒酵母	CMCC
SF21	扣囊复膜酵母	白酒酒曲			

注:°表示中国医学细菌保藏管理中心

表 3 非霉菌和酵母菌菌株信息

Table 3 Basic information of non-mold-yeast strains

标准菌株号	标准菌株名称	来源	标准菌株号	标准菌株名称	来源
ATCC 13047	阴沟肠杆菌	ATCC	ATCC 6939	马红球菌	ATCC
ATCC 13076	肠炎沙门菌	ATCC	ATCC 8090	弗氏柠檬酸杆菌	ATCC
ATCC 13883	肺炎克雷伯菌	ATCC	ATCC 8739	大肠埃希菌	ATCC
ATCC 17802	副溶血性弧菌	ATCC	ATCC 9027	铜绿假单胞菌	ATCC
ATCC 19114	单核细胞增生李斯特菌	ATCC	ATCC 9290	宋内志贺菌	ATCC
ATCC 29212	粪肠球菌	ATCC	CMCC 23008	产气肠杆菌	CMCC
ATCC 51329	阪崎克罗诺杆菌	ATCC	DM423	蜡样芽胞杆菌	大连医科大学
ATCC 6538	金黄色葡萄球菌	ATCC			

养 48 h^[8]。按照 GB 4789.15—2016 中的平板计数法操作步骤,28 ℃培养 5 d。

1.2.3 特异性试验

将稀释后的非霉菌和酵母菌株样品滴种到 Petrifilm™ RYM 上,观察菌株的生长情况,进行 Petrifilm™ RYM 的特异性试验。

1.3 统计学分析

采用 2 种统计方式:配对资料 *t* 检验以及 $|d\log|$ 汇总分析。统计分析之前,检测结果进行对数值转换。通过配对资料 *t* 检验来评价两种方法检测结果之间差异是否有统计学意义;通过对 $|d\log|$ 的分析,采用国际通用的经验值 0.25,分别计数 $|d\log| \leq 0.25$ 、 $0.25 < |d\log| < 0.50$ 、 $|d\log| \geq 0.50$ 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 质控样品检测结果

两种方法对质控样品的检测在四个时间点分别由甲、乙两名检测人员单独完成,时间点间隔 1 周,每次检测做 5 次重复。质控样品的霉菌和酵母计数检测结果均在质控样品满意值范围之内;配对 *t* 检验 $t = 1.750\ 3$, $P = 0.087\ 9$; $|d\log|$ 值均 < 0.25 , $|d\log| \leq 0.50$ 占比为 100.0% (40/40)。

2.2 标准菌株及野生菌株检测结果

两种方法检测 78 株霉菌和酵母标准菌株及野生菌株,霉菌和酵母计数检测结果的配对 *t* 检验 $t = 1.541\ 9$, $P = 0.127\ 2$; $|d\log| \leq 0.25$ 占比为 93.6% (73/78), $0.25 < |d\log| < 0.50$ 占比为 6.4% (5/78), $|d\log| \leq 0.50$ 占比为 100.0% (78/78)。

2.3 非霉菌和酵母菌株检测结果

Petrifilm™ RYM 法检测 15 株非霉菌和酵母菌株,结果显示没有菌落出现。

2.4 酸奶样品检测结果

两种方法检测 50 份酸奶样品,1:2、1:5、1:10 稀释梯度酸奶样品的霉菌和酵母计数检测结果分别小于 2、5、10 CFU/g,|dlog| 值均 < 0.25,|dlog| ≤ 0.50 占比均为 100.0% (50/50)。

2.5 人工污染酸奶样品检测结果

两种方法检测 50 份人工污染酸奶样品,检测结果的配对 t 检验 $t = 0.8154$, $P = 0.4188$; |dlog| 值均 < 0.25, |dlog| ≤ 0.50 占比为 100.0% (50/50)。

3 讨论

配对资料 t 检验适用于同一样本接受不同处理后的比较,可以尽可能消除其他干扰因素的影响,仅体现处理因素的作用,用来观测样本在处理前后的平均值差异是否有统计学意义^[9],但进行配对 t 检验时,需要考虑接受不同处理后的两个总体是否正态分布,这两个总体方差是否已知及相关系数是否已知。|dlog| 汇总分析可以发现每个样本用两种方法检测的差异大小,同时要求对同一个样本多次检测取平均值进行判断^[10]。本次结果统计采用了两种统计方式,可以判断两种方法检测结果的差异是否有统计学意义以及两种方法的一致性。

Petrifilm™ RYM 法与 GB 4789.15—2016 对 2 份质控样品进行检测,检测结果均在质控样品满意值范围内;检测结果的配对 t 检验 $P > 0.05$,差异无统计学意义;|dlog| 的汇总分析,说明两种方法对质控样品的检测结果一致性较好。质控样品的检测在不同时间点由不同检测人员单独完成,表明 Petrifilm™ RYM 法对质控样品的检测具有良好的重复性和再现性。

两种方法对 78 株霉菌和酵母标准菌株及野生菌株、50 份酸奶样品、50 份人工污染酸奶样品检测结果的配对 t 检验均 $P > 0.05$,差异无统计学意义;|dlog| 的汇总分析均表明两种方法对霉菌和酵母标准菌株及野生菌株、酸奶样品、人工污染酸奶样品的检测结果一致性较好。

Petrifilm™ RYM 法检测 15 株非霉菌和酵母菌株,结果显示没有菌落出现,说明 Petrifilm™ RYM 法

具有良好的特异性。

综上,在检测质控样品、标准菌株及野生菌株、酸奶样品和人工污染酸奶样品时,Petrifilm™ RYM 法与 GB 4789.15—2016 检测结果的一致性较好,并且 Petrifilm™ RYM 具有良好的特异性。与 GB 4789.15—2016 比较,Petrifilm™ RYM 法培养时间为 48 h,检测周期缩短,提高了检测效率,霉菌和酵母菌落在 Petrifilm™ RYM 上呈不同形态,容易判断观察和直接计数,也易与检验液中不溶杂质颗粒区分,计数清晰。Petrifilm™ RYM 法可满足质控样品、标准菌株及野生菌株、酸奶样品和人工污染酸奶样品中霉菌和酵母计数的快速检测需求。

参考文献

- [1] GRIFFIN D M. Fungal colonization of sterile hair in contact with soil[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1960, 43(4):583-596.
- [2] ADAMS R I, MILETTO M, TAYLOR J W, et al. Dispersal in microbes; fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances[J]. Isme Journal, 2013, 7(7):1262-1273.
- [3] FISCHER G, DOTT W. Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene[J]. Archives of Microbiology, 2003, 179(2):75-82.
- [4] JACOBSON K M. Moisture and substrate stability determine VAMycorrhizal fungal community distribution and structure in an arid grassland[J]. Journal of Arid Environments, 1997, 35(1):59-75.
- [5] BEUCHAT L R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruit and vegetables[J]. Microbes & Infection, 2002, 4(4):413-423.
- [6] ROZALI S, MILANI E A, DEED R C, et al. Bacteria, mould and yeast spore inactivation studies by scanning electron microscope observations[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 263(10):17-25.
- [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 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.
- [8] 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.
- [9] 杨树勤. 卫生统计学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,1990:29-34.
- [10] International Standard Organization. Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for the enumeration of microorganisms—colony—count technique at 30 °C: ISO 4833:2003[S]. Switzerland: Organization for Standardization,2003.