

综述

食品中霉菌和酵母计数检验方法国内外标准的比较研究及启示

韩小敏,徐文静,张靖,徐进,李凤琴,白莉

(国家食品安全风险评估中心,国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室,北京 100021)

摘要:霉菌和酵母是食品中常见的污染真菌,通常也被用作评价食品卫生质量的指示菌。我国自1984年起开始对食品中霉菌和酵母的污染情况进行监测,这也使我国食品卫生质量得到了极大提高。然而,与其他国家或国际检验方法标准相比,我国现行有效的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》的主要技术内容还有很大不同。因此,为顺应国际贸易的需要,更好地推动我国标准与国外或国际标准接轨,本综述分别对来自国外或国际的检验方法标准,如美国(BAM Chapter 18—2001)、澳大利亚(AS 5013.29—2009)和国际标准化组织(ISO 21527—2008),与我国的检验方法标准(GB 4789.15—2016)进行比较分析,以期为我国霉菌和酵母计数检验方法标准的后续修订提供理论依据和方法参考。

关键词:污染监测;检验方法标准;霉菌和酵母;计数

中图分类号:R155

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2023)09-1375-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.09.020

Implication and comparative study of Chinese and foreign examination method standards on mold and yeast enumeration in food

HAN Xiaomin, XU Wenjing, ZHANG Jing, XU Jin, LI Fengqin, BAI Li

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Molds and yeasts are common fungi that cause food contamination, and are also used as indicators to evaluate the quality of food hygiene. China has been conducting contamination surveillance of molds and yeasts in food since 1984, and has greatly promoted the quality of food hygiene nationwide. However, the key technical aspects of Chinese standard GB 4789.15—2016 “National food safety standards of food microbiological examination - molds and yeasts enumeration” and foreign standards from other countries or international organizations are rather different. Therefore, to adapt to the needs of international trade and better promote Chinese standards in line with foreign or international standards, this article reviews the comparative analysis of foreign or international standards such as BAM Chapter 18—2001 from the US, AS 5013.29—2009 from Australia, and ISO 21527—2008 from the International Organization for Standardization, with the Chinese standard (GB 4789.15—2016) on mold and yeast enumeration to provide a theoretical basis and reference method for the subsequent revision of the Chinese standard on mold and yeast enumeration in food.

Key words: Contamination monitoring; examination method standard; molds and yeasts; enumeration

霉菌和酵母广泛分布于自然界,并可作为食品中正常菌相的一部分普遍存在^[1]。此外,霉菌和酵母还被广泛用于传统和现代发酵工业如面包、酱油、食醋和酒类等的发酵生产^[2]。但某些霉菌和酵母在特定条件下还可引起食品的腐败变质,使其失

去色、香、味等特征。如某些酵母在新鲜和加工过的食品中异常繁殖后可使食品产生异味,并可使液体食品变浑浊、产生气泡、形成薄膜、颜色改变并散发出难闻的气味等^[3]。此外,黄曲霉和米曲霉等真菌还可产生对人和动物具有肝肾等毒性的真菌毒素,引起人和动物的急、慢性毒性中毒^[4]。因此,霉菌和酵母常被用作评价食品卫生质量的指示菌,并以食品中污染的霉菌和酵母的数量来判定食品被污染的程度^[5]。

我国自1984年起,由卫生部食品卫生监督检验所的专家团队首次牵头制定了《食品安全国家标准 食品卫生微生物学检验 霉菌和酵母数测定》

收稿日期:2023-04-20

基金项目:《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)修改单

作者简介:韩小敏 女 研究员 研究方向为食品卫生

E-mail:hanxiaomin@cfsa.net.cn

通信作者:白莉 女 研究员 研究方向为食品卫生

E-mail:baili@cfsa.net.cn

(GB 4789.15—1984),该标准中规定了食品中霉菌和酵母的计数方法^[5]。此后三十多年内,该团队对该标准进行了4次修订,分别为GB 4789.15—1994(卫生部食品卫生监督检验所)^[6]、GB/T 4789.15—2003(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所)^[7]、GB 4789.15—2010(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所)^[8]和GB 4789.15—2016(国家食品安全风险评估中心微生物实验部)^[9]。此外,美国食品药品监督管理局(U. S. food and drug administration, FDA)^[10]、澳大利亚标准化管理委员会(Standards Australia Committee)^[11]和国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)^[12-13]也制定了相应的标准,以控制食品中霉菌和酵母的污染。因此,为打破贸易壁垒,确保我国食品的进出口安全,有必要对中国、美国、澳大利亚和ISO现行的食品中霉菌和酵母计数检验方法标准中涉及的关键内容进行对比分析,并为我国相关标准的后续修订提供思路和指导。

1 标准的适用范围

1.1 GB 4789.15—2016的适用范围

该标准适用于食品中霉菌和酵母的计数,未对食品的类别做特殊规定。但该标准包括两种方法,第一种方法适用于各类食品中霉菌和酵母的计数;第二种方法适用于番茄酱罐头、番茄汁中霉菌的计数^[9]。

1.2 BAM Chapter 18—2001的适用范围

同GB 4789.15—2016的适用范围类似,BAM Chapter 18—2001也是适用于食品中霉菌和酵母的计数,未对食品的类别做特殊规定。但该标准包括两种方法,第一种方法适用于各类食品中霉菌和酵母的计数;第二种方法适用于可以用钳子处理的食品如干豆、坚果、咖啡、可可豆等的霉菌的计数^[10]。

1.3 AS 5013.29—2009的适用范围

该标准适用于食品中霉菌和酵母的计数,但该标准以水分活度(Water activity, a_w)0.95为划分依据,设计了两种不同的培养基,分别适用于 $a_w > 0.95$ 和 $a_w < 0.95$ 的样品^[11]。

1.4 ISO 21527—2008的适用范围

该标准以 $a_w = 0.95$ 为划分标准,设计了两种不同的方法分别对应 $a_w > 0.95$ 的产品(ISO 21527-1—2008)和 $a_w \leq 0.95$ 的产品(ISO 21527-2—2008)^[12-13]。其中,ISO 21527-1—2008适合于可用于人类消费和动物饲用的产品中能在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下培养的霉菌和酵母的计数,该类产品的 a_w 通常 > 0.95 ,主要指鸡蛋、肉、牛奶除外的奶制品、水果、蔬菜等;同时本部

分方法不能用于霉菌孢子的计数、真菌区系的鉴定、真菌毒素的测定以及罐装或瓶装水果和蔬菜中热敏感型真菌如纯黄丝衣霉(*Byssoschlamys fulva*)或雪白丝衣霉(*Byssoschlamys nivea*)的计数^[12]。ISO 21527-2—2008适合于可用于人类消费和动物饲用的产品中能在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下培养的耐高渗酵母和嗜旱性霉菌的计数,该类产品的 a_w 通常 ≤ 0.95 ,主要指水果干、蛋糕、果酱、肉干、腌鱼(或咸鱼)、谷物及谷物制品、面粉、坚果、香料和调味品等;同时本部分方法不能用于霉菌孢子的计数,也不适合 $a_w \leq 0.6$ 的脱水产品包括脱水谷物、含油的产品、各类香料、豆科植物、种子、粉末状或速溶饮品等;同时本部分方法不能用于霉菌孢子的计数、真菌区系的鉴定、真菌毒素的测定以及嗜盐嗜旱性真菌如*Polypaecilum pisce*和*Basipetospora halophila*的计数^[13]。

由上可知,ISO 21527—2008和AS 5013.29—2009两项标准的适用范围划分类似,均以 $a_w = 0.95$ 为界限,规定了两个不同的操作方法。而GB 4789.15—2016和BAM Chapter 18—2001两项标准的适用范围类似,两项标准的第一法均适用于各类食品,而前者的第二法适用于番茄酱罐头、番茄汁,后者的第二法适用于以用钳子处理的食品。所以,在采用不同的标准进行样品中霉菌和酵母的测定时,首先需要核对其适用范围。

2 设备和材料

2.1 GB 4789.15—2016的设备和材料

该标准除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,对方法涉及的其他设备和材料及其参数都做了详细规定,如培养箱及其培养温度 $[(28 \pm 1)^\circ\text{C}]$ 、样品混匀时所用仪器(拍击式均质器及均质袋)、电子天平及其感量(需精确到小数点后1位)、无菌锥形瓶及其容量(500 mL)、无菌吸管(1 mL具0.01 mL刻度,10 mL具0.1 mL刻度)、无菌试管(18×180 mm)、无菌平皿(直径90 mm)、微量移液器和枪头及其规格(1.0 mL)、恒温水浴锅及其温度 $[(46 \pm 1)^\circ\text{C}]$ 、显微镜及其放大倍数等(100~1 000倍)^[9]。

2.2 BAM Chapter 18—2001的设备和材料

该标准的基本设备和材料分别同BAM Chapter 1和Chapter 3。其他的规定为:培养箱(25°C)、阿诺德蒸气室、pH计、水浴 $[(45 \pm 1)^\circ\text{C}]$ ^[10]。

2.3 AS 5013.29—2009的设备和材料

该标准并未对方法涉及的设备和材料及其具体参数做详细规定和说明,均按照AS 5013系列的规定执行^[11]。

2.4 ISO 21527—2008的设备和材料

该标准对微生物实验室常规灭菌及培养设备都做了详细的要求,如培养箱[(25±1)℃]、移液管(无菌、容量为1 mL、准确度为0.1 mL)、水浴(44℃~47℃)、pH计(25℃下的精确度为pH 0.1)、培养皿(无菌、玻璃或塑料制品、直径为90~100 mm)、显微镜(可区分酵母和细菌,放大倍数范围为250~1 000倍)、双筒放大镜(放大倍数范围为6.5~50倍)和涂布棒(玻璃或塑料制品,直径小于2 mm、柄长80 mm)等^[12-13]。

综上所述,GB 4789.15—2016和ISO 21527—2008两项标准在文本中均对霉菌和酵母培养的设备 and 材料做出了详细的说明,而AS 5013.29—2009和BAM Chapter 18—2001两项标准,除对特殊设备进行说明外,均需参考各自对应的通用标准中的设备和材料。

3 培养基

3.1 GB4789.15—2016的培养基

该标准推荐的培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(Potato dextrose agar, PDA)和孟加拉红琼脂,两者均添加了氯霉素(100 mg/L),也都适用于常见霉菌和酵母的生长^[9]。

3.2 BAM Chapter 18—2001的培养基

该标准中涉及的培养基包括氯硝铵玫瑰红氯霉素琼脂(Dichloran rose bengal chloramphenicol agar, DRBC)、氯硝胺甘油琼脂(Dichloran 18% glycerol agar, DG18)、平板计数琼脂(Plate count agar, PCA)、麦芽汁琼脂(Malt agar, MA)、适合于霉菌和酵母的麦芽浸膏琼脂(Malt extract agar for yeasts and molds, MEAYM)、PDA。值得注意的是,为了抑制细菌的生长可在培养基高压前添加氯霉素(100 mg/L);或者高压前添加氯霉素(50 mg/L)和高压后添加金霉素(50 mg/L)^[10]。

3.3 AS 5013.29—2009的培养基

该标准推荐的培养基是DRBC和DG18,前者适用于高水分活度食品($a_w > 0.95$),后者适用于低水分活度食品($a_w < 0.95$)^[11]。

3.4 ISO 21527—2008的培养基

该标准依据样品 a_w 的不同制定了两个不同的方法。其中ISO 21527-1—2008中推荐的培养基为DRBC,并推荐了3种可选择性添加试剂的详细用法及使用理由,分别是盐酸金霉素、微量元素和Tergitol(一种表面活性剂)^[12]。其中添加盐酸金霉素(质量浓度为0.1%)主要是为了抑制细菌的生长,此外为防止细菌的过度生长,必要时还可添加氯霉素(100 mg/L)和金霉素(50 mg/L),但不建议使用可能会抑制酵母生长的庆大霉素^[12]。微量元素包括ZnSO₄·7H₂O(1 g/100 mL)和CuSO₄·5H₂O(0.5 g/100 mL),添加的目的主要是为了促进霉菌的生长并使其充分显示完整的形态,特别是促进色素的产生^[12]。表面活性剂Tergitol(1 mL/L)添加的目的主要是为了防止毛霉科真菌的过度生长^[12]。ISO 21527-2—2008中推荐的培养基为DG18,并推荐了2种可选择性添加的试剂的详细用法及使用理由。这两种试剂分别为盐酸金霉素和微量元素,添加的理由同ISO 21527-1—2008中的描述^[12-13]。

从不同培养基的比较可知,虽然上述培养基均可用于霉菌和酵母的检测,但由于不同标准中各培养基组分及含量均不相同,具体见表1。因此在选用不同的方法进行霉菌和酵母计数时,必须严格按照各标准中规定的培养基的制备方法进行配制,以尽量减少培养基成分及制备方法对实验结果的影响^[14]。

4 稀释液

4.1 GB4789.15—2016的稀释液

该标准推荐使用的稀释液为蒸馏水或生理盐

表1 四项标准中所用培养基成分的对比如分析

Table 1 Comparative analysis of the composition of the culture medium used in the four standards

序号	标准号	培养基	添加剂、抗生素
1	GB 4789.15—2016	PDA和孟加拉红琼脂	均添加了氯霉素,浓度为100 mg/L
2	AS 5013.29—2009	DRBC($a_w > 0.95$)、DG18($a_w < 0.95$)	DRBC中一般添加100 mg/L的氯霉素。如果预计样品中含有大量革兰氏阴性菌,建议添加庆大霉素(50 mg/L)。DG18中一般添加100 mg/L的氯霉素。
3	ISO 21527—2008		
	ISO 21527-1—2008	DRBC	DBRC中一般添加100 mg/L的氯霉素。为了抑制细菌的过度生长,也可以选择性添加氯霉素(100 mg/L)和金霉素(50 mg/L)。必要还可添加微量元素和表面活性剂。
	ISO 21527-2—2008	DG18	DG18中一般添加100 mg/L的氯霉素。必要时推荐选择性添加盐酸金霉素和微量元素。
4	BAM Chapter 18—2001	当食品的 $a_w < 0.95$ 时,建议优先选择DG18培养基。同时计数霉菌和酵母时建议选择DRBC培养基。其他可用培养基还包括PCA、MA和PDA	DBRC和DG18中一般添加100 mg/L的氯霉素。

水或磷酸盐缓冲溶液^[9]。

4.2 BAM Chapter 18—2001的稀释液

该标准推荐使用的稀释液为0.1%蛋白胨水溶液^[10]。

4.3 AS 5013.29—2009的稀释液

该标准推荐使用的稀释液为0.1%蛋白胨水溶液或耐渗稀释液[0.1%的蛋白胨水溶液中加入20%~30%(w/V)的葡萄糖]或指定的稀释液,但该标准不建议稀释液中含有氯化钠,以尽量减少对酵母的伤害^[11]。其中耐渗稀释液用于低水分活度

样品。

4.4 ISO 21527—2008的稀释液

该标准推荐的稀释液为0.1%蛋白胨水溶液,并规定高压后该培养基在25℃下的pH值为7.0±0.2^[12]。此外,ISO 21527-2—2008中还建议向稀释液中添加非离子型表面活性剂吐温80(质量浓度为0.05%)^[13],它可以有效促进液体的流动性,从而使溶液中物质的分布更加均匀,并降低两项界面的张力,使溶液中的孢子在培养基中充分分散,减少聚集,从而大大提高霉菌的检出率^[15-16]。

表2 四项标准中所用稀释液成分的对比如分析

Table 2 Comparative analysis of the composition of the dilution solution used in the four standards

序号	标准号	稀释液	其他
1	GB 4789.15—2016	蒸馏水或生理盐水或磷酸盐缓冲液	
2	AS 5013.29—2009	0.1%的蛋白胨溶液或耐渗稀释液或指定的稀释液	如果在浓缩物、糖浆和其他低水分活度样品中计数酵母菌,则使用亲渗透稀释剂。
	ISO 21527—2008		
3	ISO 21527-1—2008	0.1%蛋白胨肉汤	
	ISO 21527-2—2008	0.1%蛋白胨肉汤	
4	BAM Chapter 18—2001	0.1%的蛋白胨水	

综上可知,除GB 4789.15—2016的稀释液为蒸馏水或生理盐水或磷酸盐缓冲液外,其他3项标准的稀释液建议为0.1%的蛋白胨溶液。但是考虑到蛋白胨按原料及制备方法的不同,类型和功效也各异,因此ISO 21527—2008中规定蛋白胨应为动物或植物组织的酶解消化产物,同时鉴于蛋白胨成分可能会影响实验结果,建议实验前先对蛋白胨的品牌及成分进行考察后再进行实验^[12-13]。而AS 5013.29—2009和BAM Chapter 18—2001中并没有规定蛋白胨的具体要求^[10-11]。此外,考虑到稀释液除具有稀释作用外,还具有保持细胞内渗透压稳定,避免因细胞壁的破坏而影响微生物的生长和繁殖的功能。因此,生理盐水也不是在任何情况下都适用的,对于含盐量较高的样品,不建议采用生理盐水进行稀释^[9-13]。

5 检验程序

4项标准中仅GB 4789.15—2016提供了直观的检验程序图,其余3项标准均未提供直观的检验程序图^[9-13]。

5.1 样品的稀释

5.1.1 GB 4789.15—2016中样品的稀释

该标准将样品分为:固体和半固体样品;液体样品。分别称取25g或25mL加入225mL无菌稀释液,充分震荡,或用拍击式均质器拍打1~2min后,制成1:10的样品匀液。然后按1:10的比例制成不同浓度的样品匀液,并根据样品的污染情况选

择2~3个适宜稀释度的样品匀液(液体样品可包括原液),每个稀释度分别取1mL样品匀液于2个无菌平皿内。同时分别取1mL无菌稀释液加入2个无菌平皿作为空白对照^[9]。

5.1.2 BAM Chapter 18—2001中样品的稀释

该标准规定将制备好的样品取25~50g后加入适量的0.1%蛋白胨水到10⁻¹稀释度,然后均质2min或混匀30~60s,制成10⁻¹稀释液。然后用0.1%蛋白胨水按1:10逐级梯度稀释,最多可制成10⁻⁶稀释液^[10]。

5.1.3 AS 5013.29—2009中样品的稀释

该标准规定除浓缩物、糖浆和其他低水分活度的样品中酵母的计数时需使用耐渗稀释液、并需多次稀释外,其余样品一般使用0.1%的蛋白胨水对样品进行稀释。涉及样品稀释的其他参数如稀释度的个数、培养基的倾注量、每个稀释度接种的平板数等均参考AS 5013系列^[11]。

5.1.4 ISO 21527—2008中样品的稀释

该标准建议除特殊说明外使用0.1%蛋白胨水作为稀释液,并推荐优先使用蠕动均质器而非搅拌器或摇床。此外,为了避免孢子的快速沉降,建议移液管保持在水平状态而非垂直状态^[12-13]。

5.2 接种方式

5.2.1 GB 4789.15—2016的接种方式

该标准采用倾注法进行接种。接种时,将制备好的样品匀液吸取1.0mL于无菌平皿中,待培养基冷却至46℃时,及时将20~25mL培养基倾注至

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^[9]。

5.2.2 BAM Chapter 18—2001的接种方式

该标准的接种方法也有倾注法和涂布法,且该标准中认为涂布法的计数结果准确性优于倾注法^[10]。其中倾注法的要求如下:无菌吸取 1.0 mL 样品稀释液到预先准备好的 15×100 mm 的平皿中,并倒入 20~25 mL 温度合适的 DG18 琼脂。顺时针轻轻转动平板混匀稀释液和琼脂,然后逆时针转动,注意不要溢出。建议加入样品稀释液后,1~2 min 内加入琼脂;否则稀释液有可能粘在培养皿底部导致不能充分混匀,尤其是对于样品中淀粉含量高且培养皿是塑料的情况来说。

涂布平板法的要求:无菌移液管移取 0.1 mL 稀释液到预先准备好的 DRBC 琼脂平板上,每个稀释度做 3 个平行,并用无菌涂布棒涂布均匀。当样品的 $a_w < 0.95$ 时,建议采用 DG18 培养基。且建议从第一个稀释度的制备到最后一个平板的倾注或涂布,不要超过 20 min,最好不要超过 10 min。

5.2.3 AS 5013.29—2009的接种方式

该标准规定按 AS 5013 系列规定的表面涂布法进行接种。按水分活度不同选择适宜的培养基,高水分活度样品 ($a_w > 0.95$) 和低水分活度样品 ($a_w < 0.95$) 分别选择 DRBC 和 DG18^[11]。

5.2.4 ISO 21527—2008的接种方式

该标准的接种方法有倾注法和涂布法,实验时可根据样品中可能存在的真菌种类选择相应的接

种方法。考虑到涂布法更有利于将细胞最大程度的暴露于氧气中,并避免因高温造成真菌繁殖体的失活而导致计数过低,因此在采用倾注法时,应验证倾注法与表面涂布法结果的等效性^[12-13]。同时与 AS 5013.29—2009 相同,ISO 21527—2008 也规定高水分活度样品 ($a_w > 0.95$) 和低水分活度样品 ($a_w \leq 0.95$) 分别选择 DRBC 和 DG18 进行接种^[12-13]。接种量一般为 0.1 mL,但对于污染霉菌和酵母的量低的样品而言,可最多将 0.3 mL 的稀释液分散接种在 3 个平板上。如果怀疑样品中存在快速生长的霉菌,建议采用 ISO 21527-2—2008^[12]。将制备好的稀释液用无菌接种棒均匀地涂布在培养基表面直至液体完全被培养基吸收。此外,为保证计数结果的准确性,采用倾注法进行接种时要求倾注培养基到平皿后立即顺时针方向旋转平皿,然后再逆时针旋转,使其充分混匀^[17]。同时从样品稀释至倾注平板的时间应该控制在 20 min 之内^[18],以尽量提高计数结果的准确性。

综上所述,可以看出不同标准在接种方法、接种量、培养基量等接种方式上的要求不同,具体可见表 3。但 4 项标准中除 ISO 21527 中每个平板的培养基用量约为 15 mL 外,其余 3 项标准中每个平板的培养基量均约为 20~25 mL,且采用倾注法和涂布法时每个平板的接种量分别均为 1.0、0.1 mL。GB 4789.15—2016 只有倾注法和 AS 5013.29—2019 只有涂布法,其余 2 项标准均同时含有倾注法和涂布法两种方法。

表 3 四项标准中所用接种方式的对比分析

Table 3 Comparative analysis of the inoculation methods used in the four standards

序号	标准号	接种方法	接种量/板	培养基量/板(直接 9 cm)	其他
1	GB 4789.15—2016	倾注法	1.0 mL	20~25 mL	
2	AS 5013.29—2009	涂布法	0.1 mL	凝固后的平板厚度约 5 mm,约为 20~25 mL	
3	ISO 21527—2008	倾注法和涂布法	倾注法 1.0 mL、涂布法 0.1 mL,对于污染低的样品可最多将 0.3 mL 10^{-1} 的稀释液或液体原液,分散涂布在 3 个平板上。	15 mL	样品稀释至倾注平板的时间不超过 20 min。
4	BAM Chapter 18—2001	倾注法和涂布法	倾注法 1.0 mL、涂布法 0.1 mL	20~25 mL	建议不要超过 20 min,最好不要超过 10 min

5.3 培养

培养主要指的是培养温度和培养方式。GB 4789.15—2016 要求琼脂凝固后,平板正置,置 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养箱中培养,观察并记录培养至第 5 天的结果^[9]。

BAM Chapter 18—2001 规定将平板置 25°C 下黑暗条件下培养,每叠平板的数量不超过 3 个且不要将平板倒置^[10]。AS 5013.29—2009 要求一般将平板在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下垂直培养 5 d。DG18 平板需要

培养 7 d, (68 ± 4) h 后计数结果,随后每隔 24 h 计数 1 次,避免因霉菌的过度生长而导致无法计数的情况^[11]。考虑到某些细菌也可以在 DRBC 培养基上生长,因此为避免错误鉴定的酵母菌出现,需要对每个菌落采用显微镜进行镜检^[11]。ISO 21527—2008 规定将平板在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下正置培养 5 d,如有必要,将琼脂平板置散射的日光下继续培养 1~2 d^[12-13]。

对 4 项标准的对比可知,GB4789.15—2016 的培养温度均高于 AS 5013.29—2009、ISO 21527—

2008和BAM Chapter 18—2001规定的培养温度,同时4项标准中均未对培养箱的湿度进行明确规定^[9-13]。GB4789.15—2016、BAM Chapter 18—2001和AS 5013.29—2009均提出了需对DRBC进行避光保存的要求,且AS 5013.29—2009对DRBC的储存方式、温度及时间等均进行了详细说明^[9-13]。此外,AS 5013.29—2009还规定如果预计样品中含有大量的革兰氏阴性细菌时,应在倾注前将庆大霉素溶液添加到制备好的培养基中^[11]。ISO 21527—2008中还建议将平板放在打开的塑料袋中,以免霉菌扩散污染培养箱,而GB 4789.15—2016和AS 5013.29—2009中均无此项建议^[9-13]。

此外,关于接种后平板的培养是应采取正置还是倒置,一直是该标准讨论的热点问题。为使该标准的检测结果更准确,在后续的GB 4789.15的修订中有必要扩大采样种类和采样量,进一步评估正置培养和倒置培养的检测结果。

5.4 结果观察

5.4.1 GB 4789.15—2016的结果观察

该标准规定选取培养5 d且菌落数在10~150 CFU的平板进行计数,根据菌落形态,必要时可用放大镜或低倍镜,分别计数霉菌和酵母的菌落数^[9]。特别需要指出的是GB 4789.15—2016中明确规定,当霉菌蔓延生长覆盖整个平板时可记录为菌落蔓延。但该标准没有给出如何区分霉菌和酵母的菌落形态的具体方法^[9]。

5.4.2 BAM Chapter 18—2001的结果观察

该标准规定培养5 d后计数,如果第5天没有观察到菌落生长,然后继续培养48 h^[10]。建议培养结束前不要计数平板,以防平板挪动导致孢子脱落而产生二次生长导致计数结果不准确。计数含0~150 CFU的平板,如果该平板上的菌落主要是酵母,则含150 CFU的平板是可以计数的;但如果平板上存在大量霉菌,则依据霉菌的类型,计数的上限可能会降低^[10]。

5.4.3 AS 5013.29—2009的结果观察

该标准规定在培养(68±4) h后开始记录菌落

数,随后每隔24 h计数1次,但对平板上的菌落总数的范围以及如何区分霉菌和酵母等未做详细规定^[11]。

5.4.4 ISO 21527—2008的结果观察

该标准对菌落的计数时间、平板的菌落数以及如何区分霉菌和酵母等均进行了详细的说明。例如该标准规定平板培养2~5 d后,选择平板上的菌落数<150 CFU的平板进行计数^[12-13]。此外,对于遇到霉菌生长过快时如何选择合适的时间点计数也做了详细说明,即如果遇到霉菌生长过快时,可在培养2、5 d时分别计数菌落数^[12-13]。同时,该标准还明确提出考虑到霉菌孢子很容易在空气中散播,为了避免卫星菌落的形成,计数时应尽量小心处理平板^[12-13]。

综上所述,可以看出不同标准在培养时间及结果观察时有不同,具体可见表4。目前只有GB 4789.15—2016的观察时间是固定的,且除AS 5013.29—2009外,其余3项中每个平板的最大菌落数均为150 CFU。

6 结果与报告

6.1 GB4789.15—2016的结果与报告

该标准对不同情况下,霉菌和酵母的计数方法给出了明确的规定,并明确规定若空白对照平板上有菌落出现时,此次检验结果无效。并要求称重取样以CFU/g为单位,体积取样以CFU/mL为单位报告,报告或分别报告霉菌和/或酵母数^[9]。

6.2 BAM Chapter 18—2001的结果与报告

该标准规定按三次计数结果的平均值以CFU/g或CFU/mL报告^[10]。并取两位有效数字,如果第三位数字是≥6,则四舍五入到上面的数字(如456≈460);如果第三位数字<6,则四舍五入到下面的数字(如445≈440);如果前面两个数字是奇数,则四舍五入到上面的数字(455≈460)。如果所有平板上均未见霉菌和酵母的菌落,则用小于所用最低稀释度的1倍进行报告。如有必要,可选择PDA或MA平板进一步分离单菌落。

表4 四项标准中培养及结果观察的对比分析

Table 4 Comparative analysis of the cultivation and observation of results used in the four standards

序号	标准号	培养时间	菌落数范围/板	是否继续观察	其他
1	GB 4789.15—2016	5 d	≤150 CFU	否	—
2	AS 5013.29—2009	68 h±4 h	—	每隔24 h观察一次	—
3	ISO 21527—2008	2 d-5 d	≤150 CFU	否	可根据实际情况选择观察时间
4	BAM Chapter 18—2001	5 d	≤150 CFU,如果霉菌过多,则计数上限可能会降低	是,如果5 d没有观察到菌落生长,则继续培养48 h	—

6.3 AS 5013. 29—2009的结果与报告

该标准规定要报告每毫升或每克待测样品中的霉菌数或酵母数,且报告中要涵盖实验日期、样品测定时出现的所有细节以及观察到的任何异常现象^[11]。

6.4 ISO 21527—2008的结果与报告

该标准规定要描述样品的完整信息包括采样方法(如果已知的话),如果有必要,需要对霉菌和酵母的菌落数分别进行报告^[12-13]。此外,值得注意的是,ISO 21527-1—2008在术语和定义部分对霉菌和酵母的形态特征、繁殖结构芽孢(Propagule germ)以及菌落的定义进行了描述,ISO 21527-2—2008在术语和定义部分对嗜高渗酵母(*Osmophilic yeast*)和旱生霉菌(*Xerophilic mould*)的特点进行了明确规定^[12-13]。

综上所述可知,GB 4789. 15—2016、AS 5013. 29—2009和BAM Chapter 18—2001均缺乏霉菌和酵母形态特征的详细描述,不利于初学者对两类菌的区分^[10-11]。此外,AS 5013. 29—2009和ISO 21527—2008中均缺乏菌落数的详细计算方法,尤其是对于某些平板上菌落数过少或过多以及出现菌落蔓延的情况^[10-13]。

7 其他

7.1 计数方法的种类

4项标准中仅GB 4789. 15—2016和BAM Chapter 18—2001涵盖了平板计数法和直接镜检计数法两种完全不同的方法。其中前者的第二法霉菌直接镜检计数法适用于番茄酱罐头、番茄汁中霉菌的计数,后者的第二法霉菌直接计数法适用于可以用钳子处理的食物如干豆、坚果、咖啡、可可豆等中霉菌的计数^[9-10]。此外,BAM Chapter 18—2001还涉及了真菌毒素的测定方法^[10]。

7.2 培养基质量测试

ISO 21527—2008中规定需按照ISO/TS 11133的所有规定对DRBC和DG18进行通用性测试,并以标准菌株酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) ATCC9763、白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC10231、黑曲霉(*Aspergillus niger*) ATCC16404和总状毛霉(*Mucor racemosus*) ATCC42647或在其他菌种保藏中心记录为等效的菌株对培养基的生长效率(productivity)进行测定,以大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922和枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)或在其他菌种保藏中心记录为等效的菌株对培养基的选择性进行测定^[12-13]。而其余3项标准中均无此项描述^[9-11]。

8 对我国食品安全国家标准 霉菌和酵母计数检验方法修订的启示

4项标准在适用范围、设备和材料、培养基和试剂、检验程序等方面均具有不同程度的差异。但总的来说,争议或差别较大的内容主要为稀释液的种类和组成成分,尤其是蛋白胨的组成成分、培养基的种类及组成成分、是否有必要按照水分活度选择不同的培养基进行接种,培养温度、培养方式、观察时间和观察次数的不同,是否有必要增加霉菌和酵母的形态特征描述,以及结果与报告描述详细程度与特殊情况如菌落蔓延情况如何进行统计或描述的差异。因此,为控制和保证食品的卫生质量,确保进出口食品安全,在后续的标准修订工作中有必要对上述差异分别开展详细的实验研究,以保证实验结果的可靠性和稳定性。

参考文献

- [1] 罗雪云,刘宏道. 食品卫生微生物检验标准手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 1995.
LUO X Y, LIU H D. Manual of microbiological examination of food hygiene[M]. Beijing: Standards Press of China, 1995.
- [2] 张兰威. 发酵食品工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011.
ZHANG L W. Fermented food technology[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2011.
- [3] 饶瑜,常伟,唐洁,等. 食品中腐败酵母的研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2013, 49(4): 61-64.
RAO Y, CHANG W, TANG J, et al. Study progress on spoilage yeast in food products[J]. Sichuan Food and Fermentation, 2013, 49(4): 61-64.
- [4] 韩小敏,张宏元,张靖,等. 中国94份玉米饲料原料中真菌及其毒素污染状况调查[J]. 中华预防医学杂志, 2016, 50(10): 907-911.
HAN X M, ZHANG H Y, ZHANG J, et al. Survey on fungi contamination and natural occurrence of mycotoxins in 94 corn feed ingredients collected from China[J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2016, 50(10): 907-911.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 食品卫生微生物学检验 霉菌和酵母数测定: GB 4789.15—1984[S]. 北京: 中国标准出版社, 1984.
Ministry of Health of the People's Republic of China. Microbiological examination of food hygiene-Determination of molds and yeasts: GB 4789.15—1984[S]. Beijing: Standards Press of China, 1984.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 食品卫生微生物学检验 霉菌和酵母计数: GB 4789.15—1994[S]. 北京: 中国标准出版社, 1994.
Ministry of Health of the People's Republic of China. Microbiological examination of food hygiene-Molds and yeasts enumeration: GB 4789.15—1994[S]. Beijing: Standards Press of China, 1994.
- [7] 中华人民共和国卫生部, 国家标准化管理委员会. 食品卫生

- 微生物学检验 霉菌和酵母计数: GB/T 4789.15—2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- Ministry of Health of the People's Republic of China, Standardization Administration. Microbiological examination of food hygiene-Molds and yeasts enumeration: GB 4789.15—2003 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2003.
- [8] 中华人民共和国卫生部. 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—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- Ministry of Health of the People's Republic of China. National food safety standards - Food microbiological examination-Molds and yeasts enumeration: GB 4789.15—2010 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2010.
- [9] 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, 2017.
- National Health and Family Planning Commission. National food safety standards - Food microbiological examination-Molds and yeasts enumeration: GB 4789.15—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [10] VALERIE TOURNAS, MICHAEL E STACK, PHILIP B MISLIVEC, et al. BAM Chapter 18: Yeasts, Molds and Mycotoxins[S]. US: FDA, 2001.
- [11] Food standards Australia New Zealand. Food microbiology-Method 29: Examination for specific organisms-Colony count of yeasts and moulds; AS 5013.29—2009[S]. Australian: Council of Standards Australia, 2009.
- [12] International Organization for Standardization. ISO 21527-1—2008 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 1: Colony count technique in products within water activity greater than 0.95[S]. Oxford: ISO, 2008.
- [13] International Organization for Standardization. ISO 21527-2—2008 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 1: Colony count technique in products within water activity less than or equal to 0.95[S]. Oxford: ISO, 2008.
- [14] 覃晓, 罗秋敏, 王玲. 食品中霉菌、酵母菌检验能力验证的影响因素探讨[J]. 现代食品, 2018(11): 114-117.
- QIN X, LUO Q M, WANG L. Study on the influencing factors of proficiency test for fungi and yeasts in food [J]. Modern Food, 2018(11): 114-117.
- [15] 杨耀琴, 杨虎川, 陶惠红, 等. 吐温 80 对温热抑瘤作用的增强效应——小鼠黑色素瘤实验研究[J]. 肿瘤防治研究, 1999, 26(4): 260-262.
- YANG Y Q, YANG H C, TAO H H, et al. The synergic effect of tween-80 on the antitumor of hyperthermia——Experimental studeis of mouse melanoma [J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 1999, 26(4): 260-262.
- [16] 刘坚真, 钟青萍, 方祥, 等. 霉菌总数测定培养基的改进研究[J]. 生物学杂志, 2004, 21(4): 17-20.
- LIU J Z, ZHONG Q P, FANG X, et al. A modified medium for fungi counting [J]. Journal of Biology, 2004, 21(4): 17-20.
- [17] 陈红平. 浅谈对食品微生物中霉菌和酵母菌计数方法的认识 [J]. 计量与测试技术, 2006, 33(11): 44-45.
- CHEN H P. Simple discussion of some views for the mould and yeast calculate of food microbiolog [J]. Metrology & Measurement Technique, 2006, 33(11): 44-45.
- [18] 祝伟. 食品中微生物的国家标准检测方法 [J]. 食品安全导刊, 2020, 264(3): 118.
- ZHU W. National standard testing methods for microorganisms in food [J]. China Food Safety Magazine, 2020, 264(3): 118.