

生化培养箱内部的循环风向对霉菌 检测结果的影响

刘永永, 纪丹*, 刘晓海, 李梅, 刘长玉

(蒙牛乳制品武汉有限责任公司, 武汉 430040)

摘要: 目的 解决样品在培养过程中出现的污染以及培养基干裂的问题, 提高食品检验技术。**方法** 依据 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》, 将生化培养箱进行了改装, 通过更换培养箱轴流风机风扇叶, 改变培养箱内部循环风向。**结果** 当培养箱内部的循环风方向改变后, 改善了样品在培养过程中染菌和培养基干裂的现象, 样品在培养过程中染菌几率比改善前降 50%, 培养基干裂现象完全解决。**结论** 更换培养箱轴流风机风扇叶, 改变培养箱内部循环风向, 可以有效降低样品的染菌几率, 防止培养基干裂对检测结果造成的影响, 提高检验结果准确性。

关键词: 生化培养箱; 循环风向; 霉菌; 空白实验

Effect of circulating wind direction inside the biochemical incubator on the results of mold detection

LIU Yong-Yong, JI Dan*, LIU Xiao-Hai, LI Mei, LIU Chang-Yu

(Mengniu Dairy Products Wuhan, Wuhan 430040, China)

ABSTRACT: Objective To solve the problems of sample contamination and dry cracking of the culture medium during the cultivation process, and improve food inspection technology. **Methods** According to GB 4789.15-2016 *National food safety standard-Food microbiology inspection-Mold and yeast count*, the biochemical incubator was modified by changing the axial flow fan blade of the incubator and the way of the internal circulation wind direction of the incubator. **Results** When the direction of the circulating air inside the incubator is changed, the phenomenon of bacteria contamination and dry cracking of the medium during the culture process was improved. In the process of culture, the probability of bacterial contamination was 50% lower than that before the improvement, and the phenomenon of culture medium dryness was completely solved. **Conclusion** Changing the fan blade of the axial flow fan in the incubator and the wind direction of the internal circulation in the incubator can effectively reduce the probability of the sample contaminated with bacteria, prevent the influence of the dry crack of the culture medium on the test results, and improve the accuracy of the test results.

KEY WORDS: biochemical incubator; circulating wind direction; mold; blank test

*通讯作者: 纪丹, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: jidan@mengniu.cn

*Corresponding author: JI Dan, Mengniu Dairy Products Wuhan, Wuhan 430040, China. E-mail: jidan@mengniu.cn

1 引言

霉菌是一些丝状真菌的统称,可生长在固体营养基上,形成绒毛状、蜘蛛网状、棉絮状或地毯状菌丝体的真菌^[1]。霉菌可引起食品、农产品的发霉变质。霉菌的监测也成为食品检验技术^[2-5]与食品卫生质量评价中的重要组成部分。

由于霉菌孢子大量存在于空气中,控制外部环境、培养箱内部环境中的霉菌孢子是霉菌检测的难点。自 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菌计数》^[6]实施以来,将原 GB 4789.15-2010《食品安全国家标准食品微生物学检验 霉菌和酵母菌计数》^[7]中倒置平板培养改成正置平板培养,霉菌培养中的污染和培养基干裂现象频发。因此本研究结合 2010 版国标培养过程中污染和培养基干裂现象少的特点,将生化培养箱的轴流风机风扇叶进行改装^[8-14],使得改装后培养箱循环风的流向与改装前相反,使培养箱内部风向类似 2010 版国标吹向培养皿皿盖,从而探究培养箱改装对培养基干裂和样品污染现象的影响,提升检测结果的准确性^[15-20],为相关检测提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

LRH-250 生化培养箱(上海一恒科技有限公司);改装

LRH-250 生化培养箱(上海一恒科技有限公司); HHW-21CU-600B 恒温水浴锅(上海福玛实验设备有限公司); SW-CJ-2F 净化工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

孟加拉红(微生物试剂,北京陆桥技术服务有限公司); 无菌二级水(自制); 乳品中霉菌和酵母菌计数质控(中国工业微生物菌种保藏管理中心)。

2.2 方法

2.2.1 培养箱改装原理

生化培养箱 2 台,1 台不做任何改变(未改装),未改装的培养箱循环风向为自下而上循环;1 台更换培养箱轴流风机风扇叶(改装),使得培养箱内部循环风向与原来相反,改装后培养箱循环风方向为自上而下循环。未改装、改装后的生化培养箱中的循环风方向见图 1。生化培养箱利用轴流风机使箱体内部形成循环风,达到平衡箱体内温湿度的目的。循环风会带来一个缺点;带入环境中的霉菌孢子。2010 版国标,培养皿倒置,循环风直吹培养皿皿盖,霉菌污染情况轻微甚至没有,但 2016 版国标要求培养皿正置培养,改造生化培养箱后循环风风向与改造前相反,这样就类似 2010 版国标,循环风直吹培养皿皿盖,可以降低污染和干裂的目的。

2.2.2 微生物培养试验验证

微生物试验过程中的样品均进行 2 组平行样检测,分别在 2 台经检定合格的生化培养箱(改装/未改装)中同时进行培养,积累实验数据。

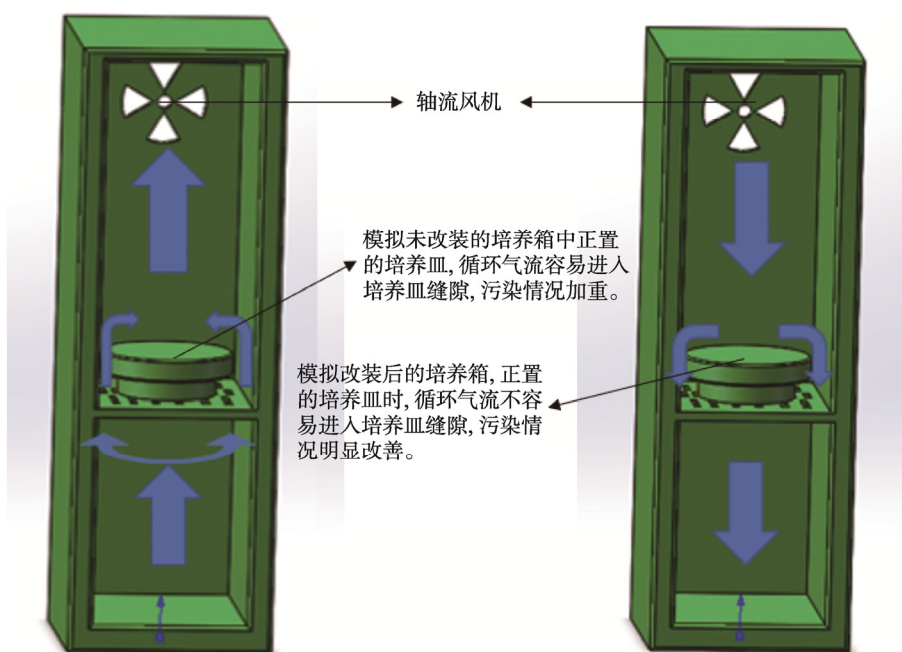


图 1 未改装、改装后的生化培养箱中的循环风方向

Fig.1 Circulating wind direction in unmodified and modified biochemical incubator

(1) 霉菌阳性加标样品

挑取适量霉菌于 225 mL 无菌水、无菌乳、无菌果酱、无菌淀粉、无菌奶粉中作为阳性加标样品原液(对应样品号 1、2、3、4、5)。每个样品同时检测 4 次,其中 2 次使用 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》(下文简称;国标法)检测,2 次使用《Petrifilm™ 霉菌酵母测试片法》(下文简称;测试片法)^[21]检测,将 2 种方法的培养物分别置于改装和未改装的培养箱中进行培养。

(2) 质控样品

购买质控样品检测(按照质控样品说明书进行操作),两名操作人员检测,分别放置于改装和未改装的 2 个培养箱中进行培养。

(3) 霉菌阴性样品

每个样品分别检测 2 次,分别放置于改装和未改装的 2 个培养箱中进行培养。

(4) 空白试验

利用备用的孟加拉红培养基直接倾注平板,待琼脂凝固后分别放置于改装和未改装的 2 个培养箱中进行培养。

(5) 改装后培养箱重复性、重现性、准确性试验

检测质控样品、水样、乳品、食品原料、果酱果粒,进行加标检测改装后培养箱样品的重复性、重现性、准确性实验。

3 结果与分析

3.1 霉菌阳性样品的检测结果

3.1.1 霉菌阳性加标样品的检测结果

1、2、3、4、5 号分别为乳品、乳品、果粒、果酱、奶粉中添加霉菌菌株制备成的阳性样品,检测过程中稀释度选择均为 1000、10000 倍,检测结果见表 1。通过对霉菌阳性加标样品检测数据进行分析;以上检测过程,检测环境稳定无变化,检测药品已验收符合,人员检测能力符合,样品稳定性符合。国标法未改装与改装培养箱的检测结果绝对差值 r 在 0.04 至 0.15 之间,测试片法未改装与改装培养箱的检测结果绝对差值 r 在 0 至 0.08 之间,检测结果均不大于重复性限, $r=0.25$ ^[22],国标法、测试片法未改装与改装培养箱结果的对比符合重复限要求,说明改装后设备检测结果符合对比要求,改造后培养箱的稳定性符合。未改装培养箱国标法与测试片法实验结果的绝对差值 r 在 0.03 至 0.15 之间,改装培养箱国标法与测试片法实验结果的绝对差值 r 在 0 至 0.15 之间,不大于重复性限, $r=0.25$;说明方法间对比符合。在样品、检测环境一致、检测药品已验收符合、方法对比符合的前提下,培养箱的稳定性符合,说明培养箱改装后对霉菌阳性样品的检测结果稳定性没有影响。

表 1 阳性加标样品的检测结果
Table 1 Results of positive labeled samples

样品号	培养箱	国标法霉菌菌落数 /(CFU/mL)	干裂皿数	国标法改装前后 绝对差值 r	测试片法霉菌菌落数 /(CFU/mL)	测试片法改装前后 绝对差值 r	国标法与测试片法 绝对差值 r
1	未改装	2.6×10^5	0	0.04	2.4×10^5	0.07	0.03
	改装	2.8×10^5	0		2.8×10^5		0
2	未改装	2.3×10^5	0	0.04	3.0×10^5	0	0.12
	改装	2.1×10^5	0		3.0×10^5		0.15
3	未改装	4.4×10^5	1	0.15	3.1×10^5	0.06	0.15
	改装	3.1×10^5	0		3.6×10^5		0.06
4	未改装	2.2×10^7	0	0.11	1.7×10^7	0.08	0.11
	改装	1.7×10^7	0		1.5×10^7		0.05
5	未改装	2.4×10^7	1	0.08	2.6×10^7	0.05	0.03
	改装	2.0×10^7	0		1.9×10^7		0.02

3.1.2 质控样品的检测结果

质控样品 QC-FD-027(2018 年,质控样品的特性值为 3600 CFU/mL,特性值区间 2200~5900 CFU/mL)2 人分别检测 2 次,置于检测数据见表 2。质控样品在未改装、改装培养箱培养,结果均符合特性值区间 2200~5900 CFU/mL 的要求,检测值接近特性值 3600 CFU/mL。

检测人员 A、B 检测结果符合绝对差值 $r < 0.25$,符合不大于重复性限 $r = 0.25$ 的要求。通过未改装、改装培养箱培养质控样品的结果,说明改装前后培养箱的准确性符合要求。

3.2 阴性样品的检测结果

阴性样品为已经检验不含霉菌酵母菌的乳品、果酱、

无菌水(1-5 号为乳品、6-10 号果酱、10-14 号为无菌水), 连续 14 d 每天检测一个样品, 使用 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》检测。每个样品做平行样, 分别在未改装与改装的 2 个培养箱进行培养。样品的稀释度选择 10、100 倍稀释, 检测结果见表 3。通过阴性样品对比数据分析, 未改装培养箱阴性样品有 28 皿长菌、2 皿干裂, 改装培养箱阴性样品有 5 皿长菌、无干裂, 菌落经检测为霉菌。改装后被污染皿数由 28 减少至 5, 干裂皿数由 2 减少至 0, 说明经过改装的培养箱可以有效的减少样品污染, 也可以有效的减少培养基干裂。

改造培养箱污染数量减少、干裂减少, 因为未改造时

循环风直吹培养皿皿底, 循环风直接吹皿底, 皿底与皿盖的契合有空隙处, 培养箱环境中霉菌孢子, 随着循环风就进入皿内导致污染, 风直接进入皿内导致培养基干裂。改造后培养箱内部轴流风机使得循环风直吹培养皿皿盖, 因皿盖套住皿底, 循环风无法从皿的空隙处吹入皿内, 所以改造后污染数量减少、干裂减少。

表 2 质控样品的检测结果
Table 2 Results of quality control samples

培养方法	A 检测结果/(CFU/mL)	B 检测结果/(CFU/mL)
未改装	4100	4000
改装	4200	3700

表 3 阴性样品的检测结果
Table 3 Results of negative samples

样品号	培养方式	霉菌菌落数				改造前染菌皿数	改转后染菌皿数
		10 倍稀释		100 倍稀释			
1	未改装	0	0	0	3		
	改装	0	0	0	0		
2	未改装	0	0	0	0		
	改装	0	0	0	0		
3	未改装	2	7	2	3		
	改装	0	0	0	0		
4	未改装	0	0	0	4		
	改装	0	0	0	0		
5	未改装	0	0	11(干裂)	7		
	改装	0	0	0	0		
6	未改装	0	0	0	3		
	改装	0	0	0	0		
7	未改装	2	2	0	0		
	改装	0	0	0	0		
8	未改装	0	0	0	4(干裂)	28	5
	改装	0	0	0	0		
9	未改装	5	0	1	0		
	改装	0	0	0	1		
10	未改装	1	2	4	4		
	改装	0	0	0	0		
11	未改装	1	5	0	10		
	改装	4	4	1	2		
12	未改装	1	1	0	6		
	改装	1	0	0	0		
13	未改装	0	0	0	2		
	改装	0	0	0	0		
14	未改装	7	8	0	1		
	改装	0	0	0	0		

3.3 空白试验结果

灭菌后的孟加拉红培养基倾注平皿, 每天将两块同批次的孟加拉红培养皿, 分别在未改装与改装的培养箱中(28±1) °C培养 5 d, 连续 18 d 完成空白试验, 具体结果见图 1。以上 18 组空白孟加拉红平皿数据, 未改装培养箱 18 组有 7 组被污染, 改装培养箱 18 组均未被污染, 改装培养箱可以有效避免被外界污染。阳性样品菌含量较高, 被污染几个菌对检测结果的影响较小, 不会导致结果出现大的偏离, 所以阳性样品实验数据对比均符合。培养箱内循环

风的改变对阳性样品结果的影响不易分辨, 而阴性样品被污染少数菌则容易分辨, 且影响检测结果的判定。

3.4 改装后生化培养箱重复性测试

霉菌菌液加标乳品、水样、淀粉制备成 3 个样品, 每个加标样品重复检测 5 次, 检测结果见表 4。通过对重复性检测数据进行分析; 以上检测过程, 环境、药品、人员、样品均无异常情况, 均满足检测要求。乳品加标、水样加标、淀粉加标, 每个样品的重复检测结果两两取绝对差值 r , 均不大于重复性限 $r=0.25$, 说明改装培养箱的重复性符合。

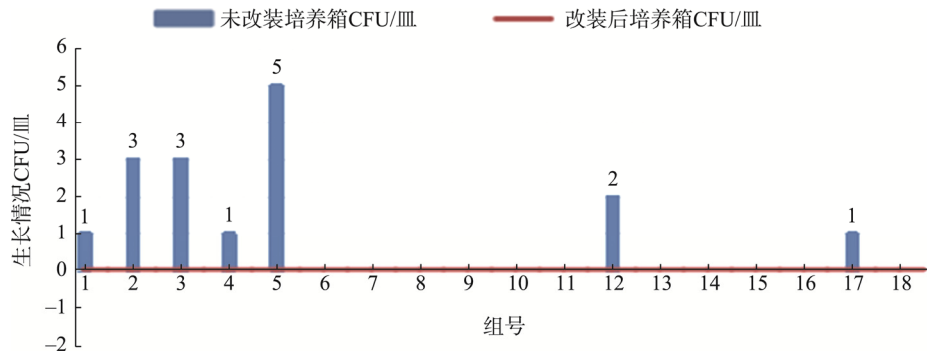


图 2 空白试验结果

Fig.2 Empty data

表 4 阳性样品的检测结果
Table 4 Results of positive samples

样品号	培养方式	霉菌和酵母菌落数				结果/(CFU/g)		
		10^0	10^{-1}	10^{-2}				
乳品加标 1	改装	3	4	1	0	/	/	4
乳品加标 2	改装	9	7	1	0	/	/	8
乳品加标 3	改装	9	5	2	0	/	/	7
乳品加标 4	改装	6	8	2	0	/	/	7
乳品加标 5	改装	6	5	2	0	/	/	6
水样加标 1	改装	5	6	1	2	/	/	6
水样加标 2	改装	9	9	1	0	/	/	9
水样加标 3	改装	11	9	0	0	/	/	10
水样加标 4	改装	11	7	1	0	/	/	9
水样加标 5	改装	8	8	1	1	/	/	8
淀粉加标 1	改装	/	/	8	8	0	0	80
淀粉加标 2	改装	/	/	6	4	0	1	50
淀粉加标 3	改装	/	/	5	6	0	1	60
淀粉加标 4	改装	/	/	4	3	0	2	40
淀粉加标 5	改装	/	/	4	5	0	1	50

3.5 改装后生化培养箱重现性、准确性测试

乳品 1、乳品 2、乳品 3 为同一个无菌样品, 水样 1、水样 2、水样 3 为同一个无菌样品, 将乳品、水样无菌样品分为 3 天检测, 每天检测一次。质控样为同一编号的 4 支样品(编号: QC-FD-027、2019 年), 每天检测一支, 质控样品的特性值为 890 CFU/mL, 特性值区间 540~1500 CFU/mL, 检测结果见表 5。通过以上检测数据进行分析; 环境、药品、人员、样品均无异常情况, 均满足检测要求。乳品、水样的结果一致, 将质控样品的检测结果两两取绝对差值, 结果均不大于重复性限, $r=0.25$, 说明改造培养箱的重现性符合。

质控样在改装培养箱培养检测结果为 1100、1200

CFU/mL, 均符合特性值区间 540~1500 CFU/mL 的要求。3.1.2 中质控样品在改装培养箱培养检测结果 4200、3700 CFU/mL, 均符合特性值区间 2200~5900 CFU/mL 的要求。通过 6 次质控样品的检测结果, 说明改造后培养箱的准确性符合。

4 结 论

通过对实验数据进行整理分析, 得出以下结论;

a、改装培养箱后内部的循环气流(未改装的培养箱内部循环气流为底部吹出、上部进入)由上部吹出、底部进入时, 能有效控制阴性样品 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菌计数》检测中的污染和培养基干裂情况。

表 5 重现性样品的检测结果
Table 5 Results of reproducibility samples

样品号	培养方式	霉菌菌落数						
		原液	10 倍稀释	100 倍稀释	结果/(CFU/g)			
乳品 1	改装	/	/	0	0	0	0	< 10
乳品 2	改装	/	/	0	0	0	0	< 10
乳品 3	改装	/	/	0	0	0	0	< 10
水样 1	改装	0	0	0	0	/	/	< 1
水样 2	改装	0	0	0	0	/	/	< 1
水样 3	改装	0	0	1	0	/	/	< 1
质控样 1	改装	103	106	16	12	/	/	1100
质控样 2	改装	110	105	18	8	/	/	1100
质控样 3	改装	112	112	16	25	/	/	1200
质控样 4	改装	103	106	16	12	/	/	1200

b、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菌计数》中, 明确指出培养皿正置, 但是并未培养箱的循环风向加以明确, 培养物在旧、新国标要求的条件下, 进行倒置、正置培养, 结果出现 2016 版国标正置培养阴性样品污染现象, 因此建议检测过程中, 对培养箱循环风风向进行控制。

参考文献

- [1] 刘慧. 现代食品微生物学(第二版)[M]. 中国轻工业出版社, 2014.
Liu H. Modern food microbiology (2nd edition) [M]. China Light Ind Press, 2014.
- [2] 韦尚伟. 食品检验技术中存在的问题[J]. 现代食品, 2017, (5): 61-63.
Wei SW. Problems in food inspection technology [J]. Mod Food, 2017, (5): 61-63.
- [3] 邹军. 我国食品检验技术中存在问题及解决方法探析[J]. 科技创新与应用, 2016, (8): 297-297.
Zou J. Analysis of the existing problems and solutions in food inspection technology in China [J]. Technol Innov Appl, 2016, (8): 297-297.
- [4] 陈平燕. 我国食品检验技术中存在的问题探析[J]. 广东蚕业, 2017, (10): 94-95.
Chen PY. Analysis of the existing problems in food inspection technology in China [J]. Guangdong Sericult, 2017, (10): 94-95.
- [5] 高景会. 食品安全检测中存在的问题及解决对策[J]. 现代食品, 2017, 7(8): 12-13.
Gao JH. Problems in food safety testing and solutions[J]. Mod Food, 2017, 7(8): 12-13.
- [6] GB 4789.15-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母菌计数[S].
GB 4789.15-2016 National food safety standard-Food microbiological analysis-Moulds and yeasts count [S].
- [7] GB 4789.15-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母菌计数[S].
GB 4789.15-2010 National food safety standard, Food microbiological analysis, Moulds and yeasts count [S].
- [8] GB/T 28851-2012 生化培养箱技术条件[S].
GB/T 28851-2012 Specifications for refrigerated incubators [S].
- [9] 杨旭, 王以忠, 朱慧. 恒温恒湿培养箱中温湿度自动控制器的总体方

- 案设计[J]. 电子测试, 2013, (8): 112-113.
- Yang X, Wang YZ, Zhu H. Design of automatic temperature and humidity controller in constant temperature and humidity incubator [J]. Electron Test, 2013, (8): 112-113.
- [10] 王炯. 恒温恒湿培养箱智能控制系统研究[J]. 科技创新与应用, 2012, (31): 42.
- Wang J. Research on intelligent control system of constant temperature and humidity incubator [J]. Innov Appl Sci Technol, 2012, (31): 42.
- [11] 罗伟. 基于智能解耦补偿的生化培养箱智能控制[J]. 电子制作, 2016, (6): 36.
- Luo W. Intelligent control of biochemical incubator based on intelligent decoupling compensation [J]. Electron Prod, 2016, (6): 36.
- [12] 盛京林, 郑自祥. 生化培养箱的改进[J]. 仪器与未来, 1991, (10): 10-11.
- Sheng JL, Zheng ZX. Improvement of biochemical incubator [J]. Instr Future, 1991, (10): 10-11.
- [13] 罗伟. 生化培养箱智能控制系统的设计[J]. 电子制作, 2016, (4): 24-25.
- Luo W. Design of intelligent control system for biochemical incubator [J]. Electron Prod, 2016, (4): 24-25.
- [14] 董小飞, 吴佩云, 莫靖昱. 浅谈纺织品恒温恒湿实验室的设计[J]. 南通纺织职业技术学院学报, 2006, (1): 7-9.
- Dong XF, Wu PY, Mo JY. Brief discussion on the design of textile constant temperature and humidity laboratory [J]. J Nantong Text Vocat Tech Coll, 2006, (1): 7-9.
- [15] 李若旦才让. 提高食品检验准确性的措施[J]. 食品安全导刊, 2016, (18): 33.
- Li RDCR. Measures to improve the accuracy of food inspection[J]. Chin Food Saf Magz, 2016, (18): 33.
- [16] 陈创辉. 食品检验结果的影响因素及提高检验结果准确性的措施[J]. 食品安全导刊, 2018, (18): 57.
- Chen CH. Influencing factors of food inspection results and measures to improve the accuracy of food inspection results [J]. Chin Food Saf Mag, 2018, (18): 57.
- [17] 陈杰. 科学做好食品安全检验工作[J]. 中国食品, 2018, (6): 68-70.
- Chen J. Scientific food safety inspection [J]. Chin Foods, 2018, (6): 68-70.
- [18] 徐慧萍, 李翠霞. 我国乳品质量安全的影响因素分析[J]. 中国食物与营养, 2012, (8): 5-8.
- Xu HP, Li CX. Analysis of influencing factors of milk quality safety in China [J]. China Food Nutr, 2012, (8): 5-8.
- [19] 高景会. 食品安全检测中存在的问题及解决对策[J]. 现代食品, 2017, (8): 12-13.
- Gao JH. Problems in food safety testing and solutions [J]. Mod Food, 2017, (8): 12-13.
- [20] 郭利亚, 王加启, 李发弟. 浅析我国生鲜乳质量安全监管及对策[J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(12): 42-45.
- Guo LY, Wang JQ, Li FD. Analysis on the quality and safety supervision and Countermeasures of fresh milk in China [J]. Chin J Anim Sci, 2012, 48(12): 42-45.
- [21] SN/T 2566-2010 中外标准 食品中霉菌和酵母菌的计数 Petrifilm 测试片法[S].
- SN/T 2566-2010 Chinese and foreign standards-Enumeration of mould and yeast in foods-Petrifilm yeast and mold count plate method [S].
- [22] SN/T 1800-2006 食品和动物饲料微生物学 30 °C菌落计数方法[S].
- SN/T 1800-2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs-colony-count method at 30 °C [S].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



刘永永, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: liuyongyong@mengniu.cn



纪丹, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: jidan@mengniu.cn