

自动菌落计数仪在乳品检测中的应用研究

梁春梅, 常建军, 喻东威*, 宋晓东, 李 照, 张利俊, 刘萍萍, 吴玉秋, 解 鑫
(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司中心实验室, 呼和浩特 011500)

摘 要: 目的 对自动菌落计数仪的技术参数、准确度、精密度、重现性等进行试验, 研究其是否满足乳品中菌落总数的计数要求。**方法** 选用一次性平皿的倾注法和 3M 测试片法的菌落结果进行计数, 检测项目包括菌落总数、大肠菌群、霉菌酵母、嗜冷菌、乳酸菌等。检测结果分别用仪器法和目测法进行计数, 并对结果进行比较。**结果** 目测法和仪器法计数结果进行配对 T 检验分析可知在 95% 置信区间 P 值大于 0.05, 在统计学上无显著性差异, 但检测结果偏差 10% 的符合率达不到 100%。重复性偏差为 0.43%~5.52%, 重现性试验相对标准偏差为 3.60%, 国标方法的标准偏差为 3.05%。**结论** 样品的背景颜色和颗粒度对仪器的计数结果有影响, 可根据实际情况选择使用。

关键词: 自动菌落计数仪; 快速简便; 乳品

Research on the application of automatic colony counting instrument in dairy products detection

LIANG Chun-Mei, CHANG Jian-Jun, YU Dong-Wei*, SONG Xiao-Dong, LI Zhao, ZHANG Li-Jun,
LIU Ping-Ping, WU Yu-Qiu, XIE Xin

(Inner Mongolia MengNiu Dairy Products Co., Ltd, Hohhot 011500, China)

ABSTRACT: Objective To test the technical parameters, accuracy, precision, reproducibility, and so on of the automatic colony counter, and study whether it meets the counting requirements of the total number of colonies in the dairy. **Methods** The colony results of the disposable plate and the 3M test piece method were used for counting, and the detection items included the total number of colonies, Coliform bacteria, mold yeast, psychrophilic bacteria, *Lactobacillus*, etc. The test results were counted by instrumental method and visual method, and the results were compared. **Results** The paired T test analysis of the visual and instrumental results showed that the P value was greater than 0.05 in the 95% confidence interval, and there was no statistically significant difference in statistics, but the coincidence rate of the test result deviation of 10% was less than 100%. The repeatability deviation was 0.43%–5.52%, the relative standard deviation of the reproducibility test was 3.60%, and the standard deviation of the national standard method was 3.05%. **Conclusion** The background color and particle size of the sample have an effect on the counting result of the instrument. The automatic colony counter can be selected according to the actual situation.

KEY WORDS: automatic colony counter; fast and simple; dairy products

基金项目: 十三五国家课题(2018YFC1604202)

Fund: Supported by National Project of the 13th Five-Year Plan (2018YFC1604202)

*通讯作者: 喻东威, 主要研究方向为食品安全风险评估工作。E-mail: yudongwei@mengniu.cn

*Corresponding author: YU Dong-Wei, Inner Mongolia MengNiu Dairy Co., Ltd, Hohhot 011500, China. E-mail: yudongwei@mengniu.cn

1 引言

在食品微生物的检测过程中常常会有菌落计数问题, 如果检测过程中菌落数少时可肉眼直接观察计数, 但在高污染样品的检测或者添加微生物进行研究性试验过程中, 每个皿上会有几十个或者几百个的菌落的情况^[1-6]。这种情况下肉眼观察菌落数数目耗时长、眼睛易疲劳, 若期间受到干扰或打断时, 常面临返工风险, 效率低。随着人们对检测结果的要求越来越严, 对检测效率的要求的提高, 市场上推行各种各样的菌落计数仪, 来满足微生物的检测需求^[7-10]。

本试验选择某自动菌落计数仪, 对平板上的菌落进行计数, 与肉眼计数结果进行比较, 以期验证自动菌落计数仪的计数准确性、精密度和稳定性, 从而确定该自动菌落计数仪是否符合菌落计数要求, 能否应用于乳制品产品微生物的检测计数。

2 材料与方法

2.1 试剂与材料

3M 菌落总数、大肠菌群、霉菌酵母测试片(德国 3M 公司); PCA 营养琼脂、孟加拉红培养基、VRBA 培养基(北京陆桥技术股份有限公司)。

实验样品来源于市售。

2.2 仪器与设备

自动菌落计数仪; tape A2 生物安全柜(美国赛默飞公司); Friocell222 微生物培养箱(德国 3M 公司); Tuttnauer 2540EL 高压灭菌锅(以色列 Tuttnauer 公司); XS204 电子天平(瑞士梅特勒托利多公司)。

2.3 标准菌株

黑曲霉(CICC 2487)、假丝酵母(CICC 1965)、枯草芽孢杆菌(CICC 10275)、肠炎沙门氏菌(CICC 21482)、粪肠球菌(CICC 23658)(中国工业微生物菌种保藏管理中心)。实验前需要按照说明书对所涉及标准菌株进行活化。

2.4 实验方法

2.4.1 样品

生乳由蒙牛六期原奶化验室提供, 其他产品均由蒙牛四期化验室提供。涉及 8 个品种样品共制备并筛选出 147 个具有代表性的长菌的平皿, 涉及类型为生乳样品、奶粉样品、奶酪样品、真果粒样品、核桃奶样品、谷物牛奶、原料(椰果、蜂蜜、蓝莓、单甘酯)等。

2.4.2 准确性试验

试验选用一次性平皿倾注法和 3M 测试片进行验证, 检测项目包括菌落总数、大肠菌群、霉菌酵母、嗜冷菌(用生乳样品)、乳酸菌(用酸奶样品)等。用不同的样品或灭菌生理盐水作为稀释液对标准菌株或含有目标菌的样品进行 10 倍梯度稀释, 选择适宜的稀释度进行试验, 检测结果分别用仪器法和目测法进行计

数, 分析 2 种方法计数结果是否存在显著性差异。

2.4.3 精密度试验

随机选取 5 个不同品种的样品(生牛乳、奶粉样品), 添加适宜浓度的标准菌株, 采用仪器法进行检测, 每个样品做 7 组平行试验, 计算相对标准偏差。

3M 测试片法测定结果, 选择 1 个一定菌浓度的 3M 测试片采用 2 种方法进行计数, 计算相对标准偏差。

2.4.4 重现性验证

同一个平皿采用 2 种方法, 不同人员进行计数, 以相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)来评价 2 种方法的重现性差异, 计算相对标准偏差。

2.4.5 数据分析

结果准确性采用 minitab 软件进行配对 *T* 检测分析, 和不同方法计数结果偏差小于 10% 进行分析; 重复性相对标准偏差应小于 10%。

3 结果与分析

3.1 准确性试验

3.1.1 菌落总数测定结果

试验采用一次性皿倾注方法对生乳样品(采用 10 倍稀释的样品)、奶粉样品(采用 10 倍稀释的样品)、核桃奶(采用原液)、真果粒样品(采用原液)、奶酪(采用 10 倍稀释的样品)、雪糕(原倍)、原料样品(采用 10 倍稀释的样品)进行菌落总数测定, 选取代表性的菌落总数平皿 58 个, 试验平皿的选择均涉及到培养基背景干扰, 观察样品及培养基的颜色是否对计数造成影响; 研究分别用仪器法和目测法对结果进行计数, 分析计数结果是否存在显著性差异。

研究结果(表 1)可知生乳样品检测得到平板菌落总数结果用 2 种方法进行数数偏差小于 10% 的符合率 80%, 偏差小于 20% 的符合率 100%。奶粉样品检测得到平板菌落总数结果用 2 种方法进行数数偏差小于 10% 的符合率 67%, 偏差小于 20% 的符合率 87%。真果粒样品、核桃奶样品、谷物牛奶样品、奶酪样品的平板菌落数用目测法和仪器方法检测偏差不是很大, 但是用 2 种方法计算雪糕、原料(白色颗粒)的平板菌落数的结果的偏差比较大, 主要原因雪糕样品比较稠倒入培养基后会变得浑浊, 导致有些菌落不是很清楚, 影响计数; 部分原料产品如单甘脂, 在水中不容, 且是白色细小颗粒, 加入到平皿中不容易分清是白色颗粒还是白色菌落, 数数过程中会有干扰。再对两种数数结果进行配对 *T* 检测分析可知, 在 95% 置信区间, *P* 值为 0.387, 在统计学上无显著性差异。

3.1.2 大肠菌群测定结果

选择奶酪、真果粒、核桃奶、谷物牛奶样品添加适宜浓度的大肠菌群标准菌株进行大肠菌群测定(VRBG 培养基), 检测结果采用仪器法和国标(目测法)进行计数, 结果如表 2。

试验结果可知自动菌落计数仪器大肠菌群菌落计数结果与国标方法(目测法)相比样品计数结果偏差均小于 10%, 符合率达到 100%。再对两种数数结果进行配对 *T* 检

测分析可知,在 95% 置信区间 P 值为 0.914,在统计学上无显著性差异。因大肠菌群检测培养基上菌落是带有颜色的,因此该项目的计数不受背景干扰的影响,计数相对菌落计数简单,速度快。

3.1.3 霉菌酵母测定结果

选择生乳(包括霉菌、酵母和其他杂菌)、真果粒样品添加(或不添加)适宜浓度的霉菌、酵母标准菌株进行霉菌酵母(孟加拉红培养基)检测,检测结果采用仪器法和国标(目测法)进行计数,结果如表 3。

因孟加拉红培养基是带有颜色的,所以样品不会对平皿背景造成影响,从试验结果可知自动菌落计数器霉菌酵母菌落计数结果与国标方法(目测法)相比样品计数结果偏差小于 10%的符合率达到 80%,偏差小于 20%的符合率达到 93%。再对 2 种方法的结果进行配对 T 检测分析可知,在 95% 置信区间 P 值为 0.057,在统计学上无显著性差异。

3.1.4 嗜冷菌测定结果

选择生乳进行嗜冷菌检测,检测结果采用仪器法和国标(目测法)进行计数,结果如表 4。

试验结果可知自动菌落计数器嗜冷菌计数结果与国标方法(目测法)相比计数结果偏差小于 10%的符合率达到 78%,偏差小于 20%的符合率达到 100%。再对 2 种结果进行配对 T 检测分析可知,在 95% 置信区间 P 值为 0.102,在统计学上无显著性差异。自动菌落计数器的计数结果符合要求。因选择生乳作为样品进行嗜冷检测,杂菌较多,有背景干扰,再加培养温度低,菌落长的慢且小,计数较困难,有些细小的菌落肉眼无法识别,自动菌落计数器可以识别,因此大多数计数结果偏高于目测法计数结果,

3.1.5 乳酸菌测定结果

选择奶粉样品进行乳酸菌检测,检测结果采用仪器法和国标(目测法)进行计数,结果如表 5。

结果可知自动菌落计数器乳酸菌计数结果与国标方法(目测法)相比计数结果偏差小于 10%的符合率达到 100%。再对两种计数结果进行配对 T 检测分析可知,在 95% 置信区间 P 值为 0.437,在统计学上无显著性差异。

3.1.6 3M 测试片测定结果

选择生乳样品、核桃奶样品进行菌落总数、霉菌酵母、大肠菌群检测,检测结果采用仪器法和国标(目测法)进行计数,结果如表 6。

结果可知 3M 测试片法检测菌落计数时仪器法计数结果与国标方法相比较偏差小于 10%的符合率达到有 79%,偏差小于 20%的符合率达到 97%。再对两种结果进行配对 T 检测分析可知,在 95% 置信区间 P 值为 0.059,在统计学上无显著性差异。

3.2 精密度验证

随机选取 6 个不同品种的样品(生乳样品、奶粉样品、奶酪样品、真果粒样品、核桃奶样品、谷物牛奶),添加适宜浓度的标准菌株,采用仪器法进行检测,每个样品做 7 组平行试验,计

算相对标准偏差。3M 测试片法测定结果,选择 1 个一定菌浓度的 3M 测试片采用仪器法进行计数,计算相对标准偏差。

从结果(表 7)可知仪器方法计数精密度分别为 1.26%、0.43%、0.83%、5.52%、1.71%,目测法计数精密度分别为 1.10%、1.38%、0.79%、2.06%、0.63%。相对标准偏差均小于 10%,且从试验数据可知部分样品仪器方法计数结果比国标方法高,是因为生乳和奶粉检测过程中平皿上会长出特别小的菌落,肉眼看不清而未计数,自动菌落计数器可放大计数而导致。

仪器方法计数 3M 测试片的菌落计数,精密度达到 0.53%,也小于相对标准偏差 10%的要求。因此自动菌落计数器的精密度符合要求。

3.3 重现性验证

同一个平皿采用 2 种方法,不同人员进行计数,以相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)来评价 2 种方法的重现性差异。

试验结果(表 8)可知不同人员采用国标方法(目测法)和仪器方法计数菌落总数,相对标准偏差分别 3.05%和 3.60%,2 种方法相对标准偏差均小于 10%,符合重现性要求。

3.4 操作适用性

通过不同人员对菌落计数器进行操作可知,仪器操作相对简便,在拍照过程中需要调节光度使其照出最佳的效果,根据计数培养基和菌落特征直接选择适宜的程序即可进行读数。通过人为添加或删除菌落参数可自动换算,有培养皿直径的计算、样本稀释度输入,实现自动换算文字、图形标注等功能。计数过程中自动记录人为删减或增加的菌落数,搬动不会对仪器使用造成影响^[11,12]。

4 结论与讨论

本研究主要考虑不同计数范围的菌落计数,菌落颜色和培养基背景颜色相似(主要包括乳白色和粉红色)时的计数,不透明培养基中的菌落计数,带颗粒的样品(与菌落颜色相似)的计数,霉菌和芽孢等蔓延菌的计数,平皿边缘菌落的计数,测试片法检测不同项目的菌落计数等方面进行验证。从试验结果可知选择不同样品检测不同项目,包括菌落总数、大肠菌群、霉菌酵母、嗜冷菌、乳酸菌,3M 测试片的菌落、大肠菌群和霉菌酵母,通过对两种方法计数结果进行分析可知在 95% 置信区间 P 值为均大于 0.05,在统计学上无显著性差异。但通过偏差分析可知有些产品的偏差达不到 10%,精密度试验和重现性试验结果均在 5%左右。

自动菌落计数器在操作过程中,对大多数菌落自动计数外,部分菌落需要人为的进行识别并增加、删除或切割,从而完善计数效果,因此延长了计数时间。3M 测试片的验证因为菌落颜色较明显从而更快的计出菌落数(菌落总数测试片和霉菌酵母测试片)。但是仪器无法自动识别大肠菌群测试片上产气的紫色菌落和不产气的紫色菌落,只能人为

表 1 准确性验证数据
Table 1 Accuracy verification data

样品	目测法 /(CFU/皿)	仪器法 /(CFU/皿)	样品	目测法 /(CFU/皿)	仪器法 /(CFU/皿)	样品	目测法 /(CFU/皿)	仪器法 /(CFU/皿)	样品	目测法 /(CFU/皿)	仪器法 /(CFU/皿)
	6	6		300	305		32	32		23	23
	147	145		278	249	核桃奶	238	224	谷物	51	50
	281	267		44	43		240	217	牛奶	144	135
	101	115		50	40		84	93		148	130
	18	19		259	264		55	79	雪糕	16	20
	126	131		275	270		90	127		13	26
生乳 样品	22	22	奶粉 样品	71	70	原料	10	10		17	30
	137	136		38	38		0	0	雪糕	60	83
	314	315		41	40		0	0		43	64
	110	113		41	42		0	0		40	66
	142	124		191	195		78	88		11	11
	279	274		258	211		3	3	真果粒	168	156
	177	179		53	41		22	21		240	232
	128	140		72	67		214	185	/	/	/
	228	184		49	41		127	114	/	/	/

表 2 大肠菌群准确性验证数据
Table 2 Coliform accuracy verification data

样品	目测法 /(CFU/皿)	仪器法 /(CFU/皿)	样品	目测法 /(CFU/皿)	仪器法 /(CFU/皿)	样品	目测法 /(CFU/皿)	仪器法 /(CFU/皿)
奶酪-1	3	3	真果粒-7	374	374	谷物奶-10	15	15
奶酪-2	35	35	真果粒-5	3	3	谷物奶-11	22	21
奶酪-3	262	263	真果粒-6	40	40	谷物奶-12	167	161
奶酪-4	154	154	核桃奶-9	300	306	核桃奶-8	41	40

注: 超出 300 CFU/皿的计数结果可不进行统计计算。

表 3 霉菌酵母准确性验证数据
Table 3 Mold yeast accuracy verification data

样品	目测法 /(CFU/皿)	仪器法 /(CFU/皿)	样品	目测法 /(CFU/皿)	仪器法 /(CFU/皿)	样品	目测法 /(CFU/皿)	仪器法 /(CFU/皿)
生乳-1	7	7	生乳-9	147	124	真果粒-11	27	25
生乳-2	55	50	生乳-10	8	8	真果粒-12	90	91
生乳-3	98	87	生乳-7	141	112	真果粒-13	14	13
生乳-4	41	37	生乳-8	104	106	真果粒-14	44	42
生乳-5	5	5	生乳-6	46	48	真果粒-15	48	46

表 4 嗜冷菌准确性验证数据
Table 4 Psychrophilic accuracy verification data

样品	目测法 /(CFU/皿)	仪器法 /(CFU/皿)	样品	目测法 /(CFU/皿)	仪器法 /(CFU/皿)	样品	目测法 /(CFU/皿)	仪器法 /(CFU/皿)
生乳-1	364	380	生乳-6	389	405	生乳-4	65	76
生乳-2	129	147	生乳-7	35	36	生乳-5	100	102
生乳-3	194	183	生乳-8	203	204	生乳-9	354	377

表 7 菌落计数精密密度验证
Table 7 Colony count precision verification

序号	检测次数	菌落数(CFU/皿)																	
		样品 1(平皿)		样品 2(平皿)		样品 3(平皿)		样品 4(平皿)		样品 5(平皿)		样品 6(3M 测试片)							
		目测法	仪器法	目测法	仪器法	目测法	仪器法	目测法	仪器法	目测法	仪器法	目测法	仪器法						
1	第 1 次	267	249	181	175	283	274	239	200	210	182	253	254	253	253				
2	第 2 次	263	244	182	180	282	279	232	210	201	179	253	257	251	251				
3	第 3 次	261	245	182	173	285	280	211	198	205	181	253	255	252	252				
4	第 4 次	261	248	180	175	285	278	213	205	210	180	253	256	253	253				
5	第 5 次	259	245	181	178	285	275	243	203	208	180	253	253	253	253				
6	第 6 次	257	249	182	175	281	276	235	200	206	182	254	253	252	252				
7	第 7 次	264	242	182	178	279	278	236	206	211	180	253	253	/	/				
	相对标准偏差	1.26%	1.10%	0.43%	1.38%	0.83%	0.79%	5.52%	2.06%	1.71%	0.63%	0.53%							

表 8 重现性验证数据
Table 8 Reproducibility verification data

人员	菌落数/(CFU/皿)	
	国标法	迅数仪器法
1	245	236
2	230	235
3	248	225
4	235	248
5	240	231
相对标准偏差	3.05%	3.60%

识别并进行计数。通过对原料样品或奶粉样品计数试验可知, 仪器对与培养基颜色特别接近的菌落(特别是乳白色), 或与菌落颜色相近的颗粒不能很好的进行区分, 也只能通过人为进行辨别并计数。因培养基加入样品(如核桃奶)后因培养基背景颜色较深, 且培养基倾注稍厚时, 仪器无法对平皿上层的菌落进行清楚识别, 会影响计数结果。

通过上述结果分析可知, 采用自动菌落计数仪进行菌落计数时, 如果样品对培养基背景有干扰时, 需要人为识别和仪器计数相结合效果会更好, 但是计数速度上不会有优势; 对于正常的无背景干扰的样品的菌落计数和 3M 测试片上的菌落计数, 仪器计数法的计数准确度和精密度均比较好, 且计数速度较快; 因该仪器操作相对简便, 功能比较齐全实用, 也可直接保存计数结果和皿的图片方便后期查看。所以实验室可以根据具体情况而选择使用, 可减少研究人员的工作负担, 且确保试验数据的可追溯性。今后还需要不断完善仪器的功能, 为实验研究提供更加高端和高质量的服务。

参考文献

- [1] 武雪峰. 菌落自动计数系统的开发与研究[D]. 天津: 河北工业大学, 2015.
Wu XF. Development and research of colony automatic counting system [D]. Tianjin: Hebei University of Technology, 2015.
- [2] 杨小青, 杨秋翔, 杨剑. 基于形态学的显微细胞图像处理与应用[J]. 计算机系统应用, 2016, 25(3): 220-224.
Yang XQ, Yang QX, Yang J. Microscopic cell image processing and application based on morphology [J]. Computer Syst Appl, 2016, 25(3): 220-224.
- [3] 王卫星, 王子周. 一种基于小波变换与分水岭变换的菌落图像分割算法研究[J]. 重庆邮电大学学报(自然科学版), 2008, 20(1): 104-107.
Wang WX, Wang ZZ. Study of colony image segmentation algorithm based on wavelet transform and watershed transform [J]. J Chongqing Univ Post Telecomm (Nat Sci Ed), 2008, 20(1): 104-107.
- [4] 周振, 易小波, 赵辉煌. 一种基于小波变换的血液细胞计数方法[J].

衡阳师范学院学报, 2015, 30(3): 162-165.

Zhou Z, Yi XB, Zhao HH. A method of blood cell counting based on wavelet transform [J]. J Hengyang Norm Univ, 2015, 30(3): 162-165.

- [5] 门洪, 武玉杰, 王彩红. 基于图像处理的异养菌菌落计数方法研究[J]. 化工自动化及仪表, 2008, 35(3): 41-44.
Men H, Wu YJ, Wang CH. Study on the method of counting the heterotrophic colony in image processing [J]. Contr Instrum Chem Ind, 2008, 35(3): 41-44.
- [6] Suryani E, Wiharto W, Polvonov N. Identification and counting white blood cells and red blood cells using image processing case study of leukemia [J]. Blood, 2015, 2(6): 2850-2858.
- [7] 武宗茜, 王鹏, 丁天怀. 活动轮廓模型在重叠藻细胞计数中的应用[J]. 计算机工程, 2012, 38(3): 209-211.
Wu ZQ, Wang P, Ding TH. Application of active contour model in overlapped algae cells counting [J]. Comput Eng, 2012, 38(3): 209-211.
- [8] 王国新, 张长利, 房俊龙. 基于图像处理技术的菌落自动计数系统的研究[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(2): 40-42.
Wang GX, Zhang CL, Fang JL. Experimental study for automatic colony counting system based on image processing [J]. Chin Dair Ind, 2006, 34(2): 40-42.
- [9] Biswas S, Ghoshal D, Hazra R. A new algorithm of image segmentation using curve fitting based higher order polynomial smoothing [J]. Intern J Light Electron Opt, 2016, 127(20): 8916-8925.
- [10] Medeiros RS, Scharcanski J, Wong A. Image segmentation via multi-scale stochastic regional texture appearance models [J]. Comput Vis Imag Understand, 2016, 142(C): 23-36.
- [11] Biswas S, Ghoshal D. Blood cell detection using thresholding estimation based watershed transformation with sobel filter in frequency domain [J]. Proced Comput Sci, 2016, 89(17): 651-657.
- [12] Hettiarachchi R, Peters JF. Vorono region-based adaptive unsupervised color image segmentation [J]. Patt Recogn, 2016, 65(2): 119-135.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介

梁春梅, 工程师, 硕士, 主要研究方向为食品检测及分析。
E-mail: liangchunmei@mengniu.cn

喻东威, 博士, 主要研究方向为食品安全风险评估。
E-mail: yudongwei@mengniu.cn