

平板计数法与纸片法检测食品微生物菌落总数的比较研究

王曦¹, 苏章庭¹, 李宏², 周露^{1*}

(1. 广东省食品检验所, 广州 510435; 2. 中国合格评定国家认可中心, 北京 100062)

摘要: 目的 找出平板倾注法与纸片法 2 种检测食品菌落总数方法之间的相关性, 判断 2 种方法有无显著性差异。**方法** 样品处理按 GB 4789.2-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》进行处理, 平板倾注法取样品稀释液接种平皿倾注琼脂、纸片法取样品稀释液接种细菌计数纸片。用上述 2 种方法对市场上随机抽取 30 份饼干及糕点和 2 份质控样品进行菌落总数检测, 最后做统计学分析(*t*-test)。**结果** 倾注法与纸片法检测结果无显著差异($P>0.05$)且对不同菌落数区间(0~100 CFU/g、100~1000 CFU/g、1000~10000 CFU/g)都适用。2 份质控样品评价结果为满意。**结论** 纸片法可用于食品菌落总数的快速检测, 缩短检测流程, 提高工作效率。

关键词: 菌落总数; 平板计数法; 纸片法

Comparison of plate counting method with paper slice method for detecting total bacterial count in food

WANG Xi¹, SU Zhang-Ting¹, LI Hong², ZHOU Lu^{1*}

(1. Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China; 2. China National Accreditation Service for Conformity Assessment, Beijing 100062, China)

ABSTRACT: Objective To find out the correlation between the plate pouring method and the paper disk method to detect the total bacterial count in food, and judge whether there is significant difference between the two methods. **Methods** The samples were treated according to GB 4789.2-2016 *National Food Safety Standard-Microbiological Examination of Food-Determination of Total Bacterial Count*. Sample diluent was inoculated with plate pouring method, agar was poured into plate, and sample diluent was inoculated with bacteria counting paper by paper disk method. The above two methods were used to detect the total number of colonies of 30 biscuits and cakes and 2 quality control samples randomly selected from the market, and statistical analysis (*t*-test) was performed. **Results** There was no significant difference between the results of plate pouring method and paper disk method ($P>0.05$), and it was applicable to different colony number ranges (0–100 CFU/g, 100–1000 CFU/g, 1000–10000 CFU/g). The evaluation results of 2 kinds of quality control samples were satisfactory. **Conclusion** The paper disk method can be used to detect the total number of food colonies quickly, which can shorten the detection process and improve the work efficiency.

KEY WORDS: total number of colonies; plate count method; paper disk method

*通讯作者: 周露, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物安全。E-mail: zhoulu1982@sohu.com

*Corresponding author: ZHOU Lu, Ph.D, Senior Engineer, Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China. E-mail: zhoulu1982@sohu.com

1 引言

食品被微生物污染往往是不可避免的。污染食品的微生物主要为细菌。评价食品卫生质量状况,一般采用微生物检验中 3 项细菌指标,即菌落总数、大肠菌群和致病菌。有时某些食品中还可能有特定指标^[1-3]。

菌落总数是指食品经过处理,在一定条件下培养后,所得 1 g 或 1 mL 检样中所含的细菌菌落总数。菌落总数主要作为判别食品被污染程度的标志,目的在于了解食品在生产中,从原料加工到成品包装受外界污染的情况;也可以应用这一方法观察细菌在食品中繁殖的动态,确定食品的保存期,以便对被检样品进行卫生学评价时提供依据^[4-6]。菌落总数是以检样中的细菌和培养基混合后,每个细菌都能形成一个可见的单独菌落的假定为基础的。由于检验过程是在有氧条件下培养的(空气中含氧约 20%),因而并不能测出每 g 或每 mL 检样中实际的总活菌数。所以,传统方法对于菌落总数的测定也有其局限性。一方面厌氧菌、微嗜氧菌和冷营菌在此条件下不生长,另一方面有特殊营养要求的一些细菌也受到了限制,所得结果只包括能在培养基中发育、嗜中温、需氧和兼性厌氧的细菌菌落总数,并不表示样品中实际存在的所有细菌总数^[7-9]。

目前国内食品微生物菌落计数检测按 GB 4789.2-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》^[10]平板计数法进行,但在实际检测过程中,由于平板计数法实验步骤繁琐,实验操作时间长,效率较低,有部分检测检测机构采用纸片法代替平板计数法,目前美国官方分析化学师协会(Association of Official Agricultural Chemists, AOAC)官方方法 990.12《食品中细菌总数的检测再水化干膜法》^[11]和加拿大的 MFHPB-33^[12]都采用纸片检测食品和奶粉中菌落总数,但目前国内还没有使用纸片法检测菌落总数的国标方法。本研究通过平板计数法与纸片法比较了 3 种不同菌落数区间(0~100 CFU/g、100~1000 CFU/g、1000~10000 CFU/g)的菌落数,并进行了统计学分析,进一步分析了上述 2 种方法的差异性,找出能够提高检测效率,缩短检测流程,提高工作效率又不影响检测结果准确性的菌落计数的速测检测方法,为下一步菌落计数标准方法的修订提供参考依据。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

平板计数琼脂培养基(plate count agar, PCA)(批号 190703,有效期 3 年,北京陆桥技术有限公司);3M Petrifilm 菌落总数测试片(货号 70200572157,有效期至 2020-07-17,明尼苏达矿业制造国际贸易有限公司提供)。

30 份饼干及糕点(对市场上随机抽取)。

2 份质控样品批号(编号:19-W799、19-J761,由中国检验检疫科学研究院测试评价中心提供)。

2.2 实验方法

2.2.1 培养基配制

PCA 培养基配制按产品使用说明配制,高压灭菌后置于 46 °C 恒温水浴锅内;测试纸片于冰箱取出放置待恢复常温使用。

2.2.2 样液制备

质控样品:于无菌环境下开启冻干样品西林瓶盖,立即(1 min 内)从 60 mL 灭菌生理盐水中吸取 4 mL 加入西林瓶中,将样品水化,待样品粉末溶解后,将溶液吸出转移至无菌锥形瓶中,再用余下的稀释液反复清洗西林瓶内壁,回收清洗液放入上述无菌瓶中,此 60 mL 溶液即是待测样品原液。

食品样品样液制备:按 GB 4789.2-2016 进行处理。

对上述制备后的质控样品和食品样品样液进行 10 倍稀释,充分混匀,制成 1:10(V:V)的样品匀液,用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10(V:V)样品匀液 1 mL,沿管壁缓慢注于盛有 9 mL 稀释液的无菌试管中(注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面),振摇试管或换用 1 支无菌吸管反复吹打使其混合均匀,制成 1:100(V:V)的样品匀液。

2.2.3 检测方法

平板法:在无菌条件下用 1 mL 灭菌吸管分别取上述测试菌液稀释液 1 mL 置 2 个无菌平皿内,同时吸取 1 mL 无菌生理盐水倾注入 15~20 mL 46 °C 的平板计数琼脂,转到摇匀,待冷却凝固后翻转平板放置 36 °C±1 °C 培养 48 h±2 h。

纸片法^[13]:在无菌条件下用 1 mL 灭菌吸管分别取上述测试菌液稀释液 1 mL 置 2 个测试纸片中,覆盖好纸片放置 36 °C±1 °C 培养 48 h±2 h。

2.3 统计方法

将测试数据用 SPSS17.0 进行分析, $P<0.05$ 表示具有统计学意义。

2.4 计算方法

质控样品的测试结果采用“Z-比分数”评价,Z-比分数计算如下:

$$Z = \frac{x - X}{\hat{\sigma}}$$

式中: x 表示测试人员所提交的测试结果;

X 表示指定值;

$\hat{\sigma}$ 表示标准差。

当 $|Z| \leq 2$,测试结果满意;当 $2 < |Z| < 3$,测试结果有问题(可疑);当 $|Z| \geq 3$,测试结果不满意(离群)。

3 结果与分析

3.1 30 份饼干及糕点倾注法和纸片法检测结果及分析

30 份饼干及糕点分别通过倾注法和纸片法进行菌落总数检测, 所得检测结果通过 T 检验进行分析, 实验数据经统计处理^[14], 饼干样品组 $t=-0.334$, $P>0.05$, 表明倾注法与纸片法检测菌落总数结果无显著差异。糕点样品组 $t=-0.387$, $P>0.05$, 表明倾注法与纸片法检测菌落总数结果无显著差异, 结果详见表 1 和表 2。

3.2 不同菌落数区间的倾注法和纸片法检测结果及分析

饼干样品组: 实验数据经统计处理, 3 种不同菌落数区间(0~100 CFU/g、100~1000 CFU/g、1000~10000 CFU/g), $P>0.05$, 表明倾注法与纸片法检测菌落总数结果无显著差异。糕点样品组: 实验数据经统计处理, 3 种不同菌落数区间(0~100 CFU/g、100~1000 CFU/g、1000~10000 CFU/g), $P>0.05$, 表明倾注法与纸片法检测菌落总数结果无显著差异。结果见表 3。

表 1 样品 2 种方法菌落总数结果
Table 1 The total number of colonies in the 2 methods

样品类型	样品编号	倾注法	纸片法	倾注法	纸片法
		平板平均菌落数/(10 ⁻¹)	平板平均菌落数/(10 ⁻¹)	平均菌落数/(CFU/g)	平均菌落数/(CFU/g)
饼干	1	2.5	6	25	60
饼干	2	11	14	110	140
饼干	3	3	5	30	50
饼干	4	3.5	1	35	10
饼干	5	21.5	17	215	170
饼干	6	0	0	0	0
饼干	7	122.5	139	1225	1390
饼干	8	0	0.5	0	5
饼干	9	0	0	0	0
饼干	10	9.5	14	95	140
饼干	11	54.5	78	545	780
饼干	12	0	0	0	0
饼干	13	8.5	12	85	120
饼干	14	95	111.5	950	1115
饼干	15	35	44	350	440
糕点	16	0	0	0	0
糕点	17	31	44.5	310	445
糕点	18	9.5	18.5	95	185
糕点	19	29.5	41	295	410
糕点	20	1	1.5	10	15
糕点	21	210.5	235.5	2105	2355
糕点	22	2.5	3.5	25	35
糕点	23	27	40.5	270	405
糕点	24	1	3.5	10	35
糕点	25	1.5	5	15	50
糕点	26	43.5	57	435	570
糕点	27	2	6.5	20	65
糕点	28	0	0	0	0
糕点	29	137	161	1370	1610
糕点	30	21.5	34.5	215	345

3.3 质控样品的倾注法和纸片法检测结果及分析

质控样品使用倾注法检测结果: 编号 19-W799 样品菌落数为 3600 CFU/g, 编号 19-J761 样品菌落数为 17000 CFU/g。质控样品使用纸片法检测结果: 编号 19-W799 样品菌落数为 4500 CFU/g, 编号 19-J761 样品菌落数为 21000 CFU/g。结果见表 4。

质控样品使用纸片法测试结果: 编号 19-W799 样品 Z 值为 1.1, 结果评价为满意; 编号 19-J761 样品 Z 值为 1.6, 结果评价为满意。2 份质控样品均以纸片法所得结果进行能力验证评价, 评价结果均为满意, 纸片法适用于菌落总数测定。结果见表 5。

4 结论与讨论

本研究结果表明采用平板计数法与纸片法的检测食

品中的菌落总数没有显著性差异, 这与国内学者李宇等^[15]的研究结果一致。目前国外权威的食品卫生监管机构如 FDA、AOAC 官方方法和加拿大都采用纸片法检测食品中的菌落总数。

纸片法的优点是在进行食品微生物菌落总数检测过程中减少了培养基的配制、琼脂的高压灭菌、倾注冷却至 45 °C PCA 琼脂和等候琼脂凝固等繁琐步骤, 节省了大量的人力物力, 检测同样数量的样品由于纸片法所用的主要材料是薄纸片, 而平板计数法一个稀释梯度需用 2 个平行, 检测一个样品菌落总数可能需要选择多个梯度, 需要用到多个平板, 样品较多时所需要培养平板所占体积较大, 许多检测机构因为场地所有限, 不便购买更多的培养箱来满足检测需求。而采用纸片法特别适合培养场地小和检测样品数量多的检测机构。

表 2 2 种方法对食品菌落总数测定的比较分析

Table 2 Comparison and analysis of 2 methods for determination of total number of food colonies

样品类型	测试方法	平均菌落数/(CFU/g)	t 值	P 值
饼干	倾注法	244.3	-0.334	P>0.05
饼干	纸片法	294.7		
糕点	倾注法	345.0	-0.387	P>0.05
糕点	纸片法	435.0		

表 3 2 种方法检测结果中不同菌落数区间的比较分析

Table 3 Comparative analysis of different colony number intervals in the results of 2 detection methods

样品类型	菌落数区间/(CFU/g)	t 值	P 值
饼干	0-100	-0.434	P>0.05
饼干	100-1000	-0.495	P>0.05
饼干	1000-10000	-0.849	P>0.05
糕点	0-100	-1.710	P>0.05
糕点	100-1000	-1.786	P>0.05
糕点	1000-10000	-0.468	P>0.05

表 4 质控样品 2 种方法菌落总数结果

Table 4 Total colony count results of both methods for quality control samples

样品编号	倾注法	纸片法	倾注法	纸片法
	平板平均菌落数/(10 ⁻²)	平板平均菌落数/(10 ⁻²)	平均菌落数/(CFU/g)	平均菌落数/(CFU/g)
19-W799	169.5	212.5	17000	21000
19-J761	35.5	44.5	3600	4500

表 5 菌落总数能力验证评价结果

Table 5 Results of validation and evaluation of total colonies

样品编号	结果	Z 值	结果评价
19-W799	21000	1.1	满意
19-J761	4500	1.6	满意

鉴于目前国内食品微生物检验采用的 GB 4789.2-2016 标准为强制性标准, 纸片法检测食品菌落总数适用食品微生物污染监控、产品质量监督。当食品菌落总数的检测结果在该产品判定标准规定限度附近和涉及仲裁检测, 应该以平板计数法报告检测结果。

参考文献

- [1] 河南农业大学. 食品微生物检验学[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1991.
Henan Agricultural University. Food microbiological examination [M]. Beijing: China Science and Technology Press, 1991.
- [2] 刘德, 吴鑫, 杨洁, 等. 婴幼儿米粉中菌落总数检测方法的比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(23): 6090-6094.
Liu D, Wu X, Yang J, *et al.* Comparison of detection methods of total bacterial colonies in infant rice flour [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(23): 6090-6094.
- [3] 张雅婕, 张永, 田佩瑶, 等. 纸片法检测水中菌落总数的应用与评价[J]. 环境卫生学杂志, 2019, 9(4): 379-381, 385.
Zhang YJ, Zhang Y, Tian PY, *et al.* Application and evaluation of paper strip method for the detection of total bacterial count in water [J]. *J Environ Hyg*, 2019, 9(4): 379-381, 385.
- [4] 苏晓燕, 杨菲, 刘万敏, 等. 测试片法在细菌菌落总数检测中的应用价值研究[J]. 人民军医, 2019, 62(7): 628-631.
Su XY, Yang F, Liu WM, *et al.* Study on the application value of test piece method in the detection of total bacterial colony [J]. *People Mil Surg*, 2019, 62(7): 628-631.
- [5] 段鸿斌. 食品微生物检验技术[M]. 重庆: 重庆大学出版社, 2015.
Duan HB. Food microbiology inspection technology [M]. Chongqing: Chongqing University Press, 2015.
- [6] 周浩, 凌秀梅, 李俊霞, 等. 菌落总数与金葡萄菌检测能力验证结果与分析[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(16): 149-152.
Zhou H, Ling XM, Li JX, *et al.* Verification results and analysis of total colonies and *Staphylococcus aureus* detection ability [J]. *Food Res Dev*, 2017, 38(16): 149-152.
- [7] 傅志丰, 周鹤, 许文蓓. 浅谈食品微生物检验中菌落总数和大肠菌群测定注意事项[J]. 食品安全导刊, 2019, (26): 34-36.
Fu ZF, Zhou H, Xu WP. Talking about the matters needing attention in the determination of total bacterial colonies and coliform bacteria in food microbiological examination [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2019, (26): 34-36.
- [8] 马国善. 食品微生物检验菌落总数测定方法的效果观察[J]. 中国医药

指南, 2018, 16(20): 47-48.

- Ma GS. Observation of the effect of the method for determining the total number of colonies in food microbiological examination [J]. *Guide Chin Med*, 2018, 16(20): 47-48.
- [9] 余慧. 食品微生物菌落总数能力验证与质量控制[J]. 食品安全导刊, 2018, (27): 140.
Yu H. Capability verification and quality control of the total number of food microbial colonies [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2018, (27): 140.
- [10] GB 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
GB 4789.2-2016 National food safety standard-Microbiological examination of food-Determination of total bacterial count [S].
- [11] AOAC Official Method 990. 12 Aerobic plate count in foods dry rehydratable film (petrifilm aerobic count plate) method [S].
- [12] MFHPB-33 HPB method [S].
- [13] SN/T 4544.1-2016 商品化试剂盒检测方法 菌落总数方法一[S].
SN/T 4544.1-2016 Commercial kit detection method-Total number of colonies method 1 [S].
- [14] 高祖新. 医药数理统计[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2008.
Gao ZX. Medical mathematical statistics [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2008.
- [15] 李宇, 姚卢悦. 菌落总数检测纸片法与国标方法的比较研究[J]. 食品工业, 2012, 33(10): 157-159.
Li Y, Yao LY. Comparative study on the method of detecting the total number of colonies by the method of paper and the national standard [J]. *Food Ind*, 2012, 33(10): 157-159.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



王 曦, 主要研究方向为食品微生物检验。
E-mail: 602167678@qq.com



周 露, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物安全。
E-mail: zhoulu1982@sohu.com