

食品中霉菌和酵母菌计数的检测能力 验证结果分析

汪腊云, 裴华*, 朱晓薇, 戚亭
(绿城农科检测技术有限公司, 杭州 310052)

摘要: **目的** 分析食品中霉菌和酵母菌计数的检测能力验证的结果。**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》和食品中霉菌和酵母菌计数的检测能力验证(第一轮) [ACAS-PT899 (2020)]的指导书, 对2份测试样品进行稀释、培养、计数。**结果** 样品 20-C229 的检测结果: 霉菌 780 CFU/mL, 酵母菌 70 CFU/mL, 霉菌和酵母菌 850 CFU/mL; 样品 20-K432 的检测结果: 霉菌 1200 CFU/mL, 酵母菌 580 CFU/mL, 霉菌和酵母菌 1800 CFU/mL。经评价, 2个考核样品|Z|均小于2.0, 结果评价均为满意。**结论** 本实验室具备食品中霉菌和酵母菌计数的检测能力。

关键词: 霉菌; 酵母菌; 计数; 能力验证

Analysis of verification results of detection ability of molds and yeasts in food

WANG La-Yun, PEI Hua*, ZHU Xiao-Wei, QI Ting

(Lvcheng Agricultural Technology Co., Ltd., Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the results of the proficiency test for the count of mold and yeast in food.

Methods According to GB 4789.2—2016 *National food safety standard-Microbiological inspection determination of food-Determination of total bacterial count* and the guidance on the testing ability verification of mold and yeast count in food (the first round) [ACAS-PT899 (2020)], 2 test samples were diluted, cultured and counted. **Results** The detection results of sample 20-C229: 780 CFU/mL for mold, 70 CFU/mL for yeast, 850 CFU/mL for mold and yeast, and the results of sample 20-K432: 1200 CFU/mL for mold, 580 CFU/mL for yeast, 1800 CFU/mL for mold and yeast. According to the evaluation, the |Z| values of the 2 assessment samples were all less than 2.0, and the evaluation results were satisfactory. **Conclusion** This laboratory has the ability to detect the count of mold and yeast in food.

KEY WORDS: mould; yeast; count; proficiency testing

0 引言

能力验证是指利用实验室间比对, 按照预先制定的准则评价参加者的能力, 是用来判断和监控实验室技术能

力、持续改进质量管理体系的有效手段之一, 是一种实验室外部质量控制的方法^[1-4]。在人员能力评价、方法验证、数据或结果准确性评价等方面都具有非常重要的意义^[5]。CNAS-RL02:2018《能力验证规则》^[4]明确规定, 食品微生物

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1603400)

Fund: Supported by the National Key R & D Program (2018YFC1603400)

*通信作者: 裴华, 高级工程师, 主要研究方向为食品、农产品质量安全检测。E-mail: 346088073@qq.com

*Corresponding author: PEI Hua, Senior Engineer, Lvcheng Agricultural Technology Co., Ltd., Hangzhou 310052, China. E-mail: 346088073@qq.com

物领域的的能力验证最低参加频次为1次/年。

随着食品行业的迅猛发展及消费者消费习惯的转变,对食品卫生及安全的要求越来越严^[6-7],食品中微生物限量的检验,霉菌、酵母菌的检验计数是最常规的指标^[8]。本实验室参加了2020年由中国检验检疫科学技术研究院测试评价中心组织的ACAS-PT899(2020)^[9]食品中霉菌和酵母菌计数的检测能力验证(第一轮),以提高实验室对食品中霉菌和酵母菌计数的检测能力和水平。

1 材料与方 法

1.1 样品来源

样品20-C229和20-K432(人工污染的食品样品,白色冻干块状,西林瓶真空包装,中国检验检疫科学技术研究院测试评价中心)。

收到样品后需立即进行检测,如不能立即检测,需放在2~6℃冰箱中保存。

1.2 试剂耗材

孟加拉红琼脂、马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)(青岛海博生物技术有限公司);生理盐水(实验室自制)。实验用水均为无菌水。

1.3 仪器设备

MJ-250F-I 霉菌培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);HFSafe-1500LC 生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司)。

1.4 实验方法

参照ACAS-PT899(2020)食品中霉菌和酵母菌计数的检测能力验证(第一轮)作业指导书^[9]、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》^[10]第一法进行实验。

1.4.1 样品前处理

参照ACAS-PT899(2020)食品中霉菌和酵母菌计数的检测能力验证(第一轮)作业指导书对样品进行前处理:准备60 mL 无菌水,在100级环境中打开西林瓶,立刻加入5 mL 无菌水使其再水化,待充分溶解后,吸出放进已灭菌的100 mL 锥形瓶中,再反复用余下55 mL 无菌水清洗西林瓶内壁,回收清洗液放入上述100 mL 锥形瓶中,直至预先准备的60 mL 无菌水全部使用完全为止。此溶液即是待测样品原液^[9]。

1.4.2 样品稀释

按照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》^[10]第一法对样品进行相应的稀释:以无菌移液器吸取25 mL 样品至盛有225 mL 无菌水的锥形瓶中,充分振摇1 min,制成1:10(V:V,下同)的样品匀液,吸取1 mL 该匀液注入含有

9 mL 无菌水的试管中,另换一支1 mL 无菌移液器反复吹吸,此液为1:100的样品匀液。以上2种稀释液分别平行制备2份。分别吸取1 mL 样品原液以及1:10、1:100的样品匀液于无菌平皿中,每个梯度做2个平行样。同时分别吸取1 mL 无菌水加入2个无菌平皿中,用以作为空白对照。同时,需及时将20~25 mL 冷却至46℃的琼脂倾注平皿,并转动平皿使其混合均匀。放置水平台面待培养基完全凝固。

分别选择马铃薯葡萄糖琼脂和孟加拉红琼脂平板以及2名不同检测员进行比对实验。

1.4.3 培养

按照国标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》^[10]第一法的要求,待琼脂凝固后,正置平板,放在(28±1)℃培养箱中进行培养,培养至第5 d的时候,观察并记录结果。

2 结果与分析

2.1 结果观察与计数

2.1.1 不同培养基及平行比对

样品20-C229和20-K432在孟加拉红琼脂及马铃薯葡萄糖琼脂平板上的生长情况及菌落计数见表1。样品20-C229的酵母菌在原液、1:10及部分1:100的稀释度平皿上形成了可计数的分散单一菌落形态,部分1:100的稀释度平皿上未形成任何菌落形态。样品20-K432在1:10及1:100的稀释度平皿上形成了可计数的分散单一菌落形态,而其他稀释比例的平皿中则菌落数目较多无法计数。

2.1.2 不同人员比对

由2名检测员分别取2份样品,按照1.4.2用移液枪按无菌操作各自稀释成不同浓度的供试液,吸取1 mL 注皿,平行2份,分别倾注约46℃孟加拉红培养基,摇匀,静置冷却。正置平板,放在(28±1)℃培养箱中进行培养。结果见表2。

2.2 实验结果

从表1、表2可以看出,不同培养基及不同检测员间的检测结果相差不大,最终选择人员A的孟加拉红琼脂培养基的检测结果作为能力验证报出结果,即样品20-C229的检测结果:霉菌780 CFU/mL,酵母菌70 CFU/mL,霉菌和酵母菌850 CFU/mL,样品20-K432的检测结果:霉菌1200 CFU/mL,酵母菌580 CFU/mL,霉菌和酵母菌1800 CFU/mL。

Z比分数是由能力验证的指定值和能力评定标准差计算的实验室偏倚的标准化度量,Z比分数有时也称为Z值或Z分数^[11],当 $|Z| \leq 2.0$ 时为满意结果,当 $2.0 < |Z| < 3.0$ 时为可疑结果,当 $|Z| \geq 3.0$ 时为不满意结果。

表 1 不同琼脂平板上的菌落计数结果
Table 1 Colony count results on different agar plates

样品编号	浓度	PDA													
		孟加拉红				霉菌				酵母菌					
		平板 1	平板 2												
20-C229	原液	多不可计	多不可计	70	70	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	68	72	多不可计	多不可计
	1:10	72	70	7	7	79	77	74	70	70	70	5	6	75	73
	1:100	15	15	1	0	16	15	14	11	11	0	0	0	16	15
	结果/(CFU/mL)	780		70		850		720		70		540		810	
20-K432	原液	多不可计													
	1:10	117	120	57	59	174	179	110	112	112	55	53	166	179	
	1:100	12	12	6	6	18	18	9	10	10	1	4	17	19	
	结果/(CFU/mL)	1200		580		1800		1100		540		1700			

表 2 不同人员间检测的菌落计数结果
Table 2 Results of colony count among different personnel

样品编号	浓度	人员 A												人员 B											
		霉菌				酵母菌				霉菌和酵母菌				霉菌				酵母菌				霉菌和酵母菌			
		平板 1	平板 2	平板 1	平板 2	平板 1	平板 2	平板 1	平板 2	平板 1	平板 2	平板 1	平板 2	平板 1	平板 2	平板 1	平板 2								
20-C229	原液	多不可计	多不可计	70	70	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计		
	1:10	72	70	7	7	79	77	80	72	72	3	6	75	73											
	1:100	15	15	1	0	16	15	9	6	6	0	0	5	8											
	结果/(CFU/mL)	780		70		850		760		70		740													
20-K432	原液	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计										
	1:10	117	120	57	59	174	179	121	117	117	54	56	169	179											
	1:100	12	12	6	6	18	18	10	9	9	3	4	12	13											
	结果/(CFU/mL)	1200		580		1800		1200		580		1700													

本次能力验证共有 69 个实验室参加, 其中参加 I 组样品(样品 20-C229)的实验室共 49 个, 参加 III 组样品(样品 20-K432)的实验室共 36 个, 本实验室样品 20-C229 和样品 20-K432 经中国检验检疫科学技术研究院测试评价中心评价后 Z 值分别为为 0.1 和 0.7, 均为满意结果。本实验室的实验结果为满意(具体见图 1 和图 2, 本实验室代码为 055),

说明本实验室具备检测霉菌和酵母菌计数的能力。

3 结论与讨论

本次中国检验检疫科学技术研究院测试评价中心组织的 ACAS-PT899(2020)食品中霉菌和酵母菌计数的检测能力验证(第一轮)实验中, 结果满意。

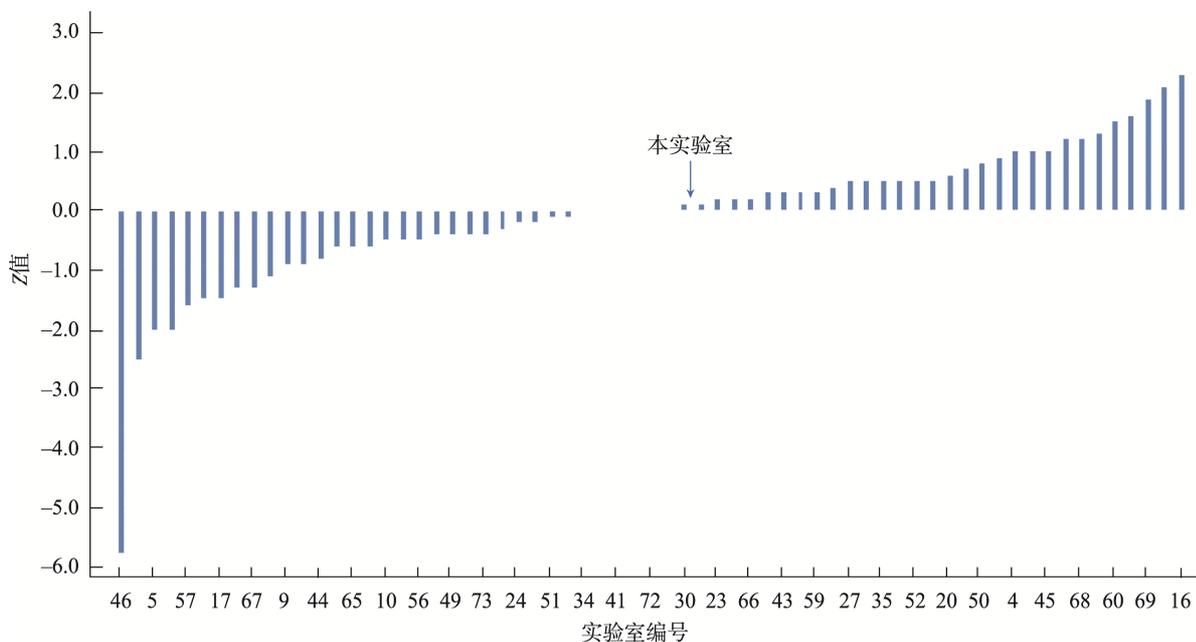


图 1 样品 20-C229 霉菌和酵母菌计数 Z 值柱状分布图

Fig.1 Columnar distribution of Z value of mould and yeast count in sample 20-C229

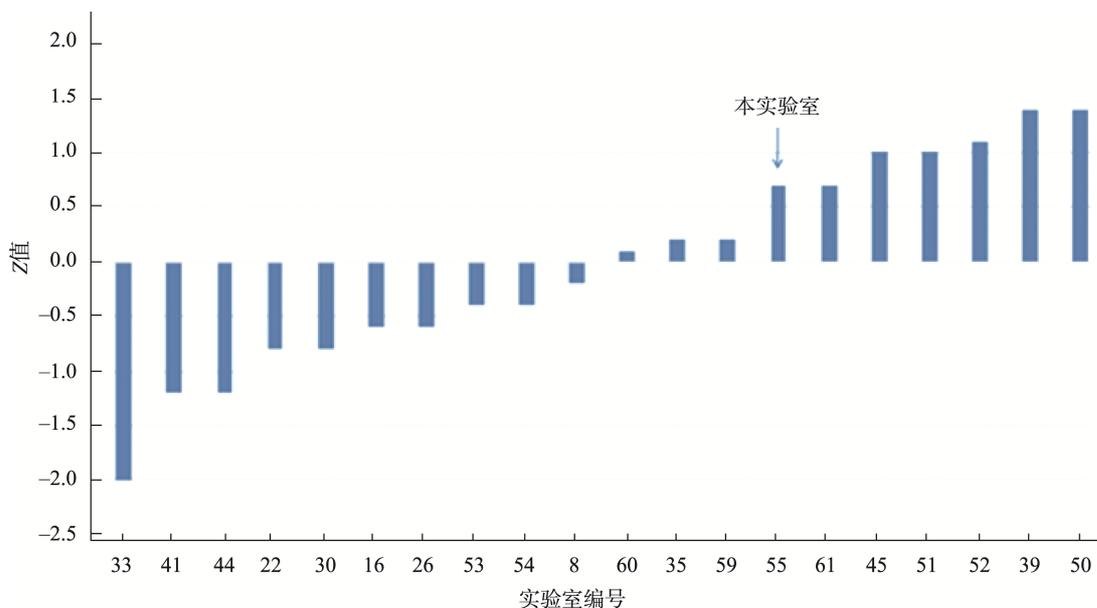


图 2 样品 20-K432 霉菌和酵母菌计数 Z 值柱状分布图

Fig.2 Columnar distribution of Z value of mould and yeast count of sample 20-K432

本次能力验证取得满意结果与仔细阅读作业指导书并按技术规范操作、对培养基和试剂做好质控密切相关。通过能力验证,提高了实验室对霉菌和酵母菌计数的检测能力,提升了检测人员的专业技术能力和职业素养,促进了实验室检测水平的提高^[12-15]。

同时,在进行检测时,应注意:(1)样品收到后应检查密封状况,并立即进行检测,若不能立即检测,按说明书放置在2~6℃冷藏。(2)冻干的块状样品是1个样品单元,属于1个不可分割的整体,切勿只取其中一部分进行测试。(3)使用5 mL 无菌水溶解样品时,一定要在盛装样品的西林瓶中操作,严禁将西林瓶中的白色冻干物样品倒出西林瓶进行再水化。(4)霉菌在培养过程中可能存在因观察而上下翻转平皿导致霉菌和酵母孢子扩散,形成次生小菌落的现象,从而影响计数结果的准确性。在CNAS-CL01-A001《检测和校准实验室能力认可准则在微生物领域的应用说明》^[15]中有对实验室提出应防止孢子扩散的措施,这是影响检测结果的一个重要因素,因此,在新版标准GB 4789.15—2016中,明确规定将培养方式调整正置培养^[16]。

参考文献

- [1] 邓可,刘黎,郭兵,等.能力验证提升实验室检测水平的实证研究[J].冶金分析,2017,(9):39-45.
DENG K, LIU L, GUO B, *et al.* Empirical study on the improvement of laboratory testing level by proficiency testing [J]. Metall Anal, 2017, (9): 39-45.
- [2] 唐凌天,符斌.实验室能力验证的发展[J].中国无机分析化学,2013,3(4):11-15.
TANG LT, FU B. Development of laboratory proficiency testing [J]. Chin J Inorg Anal Chem, 2013, 3(4): 11-15.
- [3] CNAS-CL01—2018 检测和校准实验室能力认可准则[S].
CNAS-CL01—2018 Accreditation criteria for testing and calibration laboratory capacity [S].
- [4] CNAS-RL 02:2018 能力验证规则[S].
CNAS-RL 02:2018 Capability verification rules [S].
- [5] 雷质文.食品微生物实验室质量管理手册[M].北京:中国标准出版社,2006.
LEI ZW. Handbook of quality management of food microbiology laboratory [M]. Beijing: Standards Press of China, 2006.
- [6] 周威,胡梁斌,李红波,等.食物中食源性病原菌检测技术研究进展[J].食品研究与开发,2017,(9):213-216.
ZHOU W, HU LB, LI HB, *et al.* Research progress on detection technology of food borne pathogens in food [J]. Food Res Dev, 2017, (9): 213-216.
- [7] 林坚,杨涛,卢相琦,等.儿童外伤性单纯性硬膜外血肿 83 例[J].中华创伤杂志,2015,(5):400-402.
LIN J, YANG T, LU XQ, *et al.* 83 cases of traumatic simple epidural hematoma in children [J]. Chin J Trauma, 2015, (5): 400-402.
- [8] 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 QM, WANG L. Discussion on Influencing Factors of verification of inspection ability of mold and yeast in food [J]. Mod Food, 2018, (11): 114-117.
- [9] ACAS-PT899 (2020) 食品中霉菌和酵母菌计数的检测能力验证(第一轮)作业指导书[S].
ACAS-PT899 (2020) Operation instruction for verification of detection ability of mould and yeast count in food (the first round) [S].
- [10] 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-Microbiological inspection determination of food-Determination of total bacterial count [S].
- [11] CNAS-GL002:2018 能力验证结果的统计处理和评价指南[S].
CNAS-GL002:2018 Guidelines for statistical processing and capability evaluation of proficiency testing results [S].
- [12] 王志伟,徐琼,陈欣钦,等.能力验证样品中沙门氏菌的分离与鉴定[J].食品研究与开发,2016,(7):161-163.
WANG ZW, XU Q, CHEN XQ, *et al.* Isolation and identification of *Salmonella* in proficiency testing samples [J]. Food Res Dev, 2016, (7): 161-163.
- [13] 曾博雅.食品微生物金黄色葡萄球菌定量检测能力验证[J].现代食品,2020,(11):176-177,181.
ZENG BY. Validation of quantitative detection ability of food microorganism *Staphylococcus aureus* [J]. Mod Food, 2020, (11): 176-177, 181.
- [14] 周威,胡梁斌,李红波,等.食物中食源性病原菌检测技术研究进展[J].食品研究与开发,2017,(9):213-216.
ZHOU W, HU LB, LI HB, *et al.* Research progress on detection technology of foodborne pathogens in food [J]. Food Res Dev, 2017, (9): 213-216.
- [15] CNAS-CL01-A001:2018 检测和校准实验室能力认可准则在微生物领域的应用说明[S].
CNAS-CL01-A001:2018 Accreditation criteria for testing and calibration laboratory capacity in the field of microbiology [S].
- [16] 郭丽艳.能力验证样品中霉菌和酵母检测结果的不确定度评定[J].食品安全质量检测学报,2019,10(18):6088-6092.
GUO LY. Evaluation of uncertainty of mould and yeast test results in capability verification samples [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(18): 6088-6092.

(责任编辑:韩晓红)

作者简介



汪腊云,助理工程师,主要研究方向为食品、农产品质量安全检测。
E-mail: 1290423808@qq.com



裴华,高级工程师,主要研究方向为食品、农产品质量安全检测。
E-mail: 346088073@qq.com