

倾注平板计数法和纸片法测试菌落总数的比较研究

卢行安 秦成 李军 乔军 (辽宁出入境检验检疫局食品生物室)

摘要

本文对用两种方法测定能力验证人工制备样品的菌落总数结果进行比较研究。随机抽取能力验证的样品 2×24 份,该样品为人工制备的冻干细菌的样品,分别用再水化干燥纸片法(3M Petrifilm™)和倾注平板法测定24份样品中的菌落总数,两种测试方法的菌落总数结果经统计学处理,显示两种测试方法在该能力验证样品无显著差异,再水化干燥纸片中的染料指示剂对样品中的细菌无明显影响。

关键词:倾注平板计数法,再水化干燥纸片法,菌落总数,能力验证样品

前言

菌落总数主要是作为判定食品被污染程度的标记,也可以应用这一方法观察食品中细菌的性质以及细菌在食品中繁殖的动态,以便对被检样品进行卫生学评价时提供科学依据。该测试项目是2002年亚太实验室认可合作组织的食品微生物学能力验证计划(编号T030)的一个考核项目。参试实验室按使用的培养基不同菌落总数的测试方法分两种,分别为倾注平板计数法和再水化干燥纸片(3M Petrifilm™ AC)计数法。国内已有关于菌落总数检测纸片的比较试验的文献报道,但本试验主要基于如下的原因:(1)测试的能力验证样品为人工制备的样品,菌群组成和样品基体均与正常检验的样品有区别,不同的测定方法的菌落总数的结果可能有差异。(2)该能力验证样品中的优势菌为革兰氏阳性菌,对氯化三苯四氮唑(TTC)敏感(查阅的资料显示在培养剂中添加TTC的含量为50mg/kg,而我们的试验结果显示40 mg/kg的TTC即可完全抑制该样品中蜡样芽胞杆菌的生长,该论文待发表),而3M Petrifilm™ AC纸片含有该红色指示染料;(3)采用倾注平板法时,优势菌易形成蔓延菌落,当48h计数时,许多菌发生融合,影响准确计数(结果可能偏低);(4)有参试实验室反映使用3M Petrifilm™ AC的菌落总数结果高于倾注平板法的结果。

实验材料

Petrifilm Aerobic Count (AC)测试片由3M中国有限公司提供,该纸片为预先制备好的培养基系统,它含有标准方法的培养基,和一种冷水可溶性的凝胶剂和一种指示剂,是菌落总数计数用的纸片。

能力验证样品:为亚太实验室认可合作组织食品微生物学能力验证计划(APLAC)的样品。该样品主要含蜡样芽胞杆菌(在该样品中为绝对优势菌,菌落总数计数的目标菌)、粘质沙雷氏菌、弗氏枸橼酸杆菌、产气肠杆菌和大肠埃希氏菌。样品中的冻干保护剂有蔗糖、海藻糖和谷氨酸钠。

实验方法

随机选取能力验证样品,分别用纸片法(AOAC 990.12 3M Petrifilm™ AC)和倾注平板计数法*(SN0168-92方法)测试24个样品,对两种测试方法的菌落总数结果用完全随机设计的两样本比较。

*待稀释的样品与计数琼脂混匀和凝固后,在其上多加一薄层计数琼脂,防止菌落的蔓延和融合。

结果和讨论

两种方法测试的菌落总数的结果及其对数值见下表。

表1 两法测得菌落总数的结果 (48 份样品)

3M 纸片法 (cfu/ml)	倾注平板法(cfu/ml)	3M 纸片法 (log ₁₀ cfu/ml)	倾注平板法(log ₁₀ cfu/ml)
8000	7200	3.90	3.86
8500	8100	3.93	3.91
8100	8600	3.91	3.93
8100	6000	3.91	3.78
8500	8000	3.93	3.90
8900	9100	3.95	3.96
9100	6200	3.96	3.79
7100	6100	3.85	3.79
7800	6200	3.89	3.79
8800	9500	3.94	3.98
8600	7800	3.93	3.89
9600	9900	3.98	4.00
7100	6600	3.85	3.82
7400	6500	3.87	3.81
8600	9200	3.93	3.96
7100	8500	3.85	3.93
7600	6300	3.88	3.80
9100	6200	3.96	3.79
8400	10200	3.92	4.01
8200	7400	3.91	3.87
6800	6400	3.83	3.81
7500	8100	3.88	3.91
8800	8800	3.94	3.94
8500	7200	3.93	3.86

从表中的结果可以计算出：方法 AOAC 990.12 3M Petrifilm AC 所得的结果的均数为 8200cfu/ml (对数值为 3.91)，高于倾注平板计数法 (SN0168-92 方法) 的结果，后法为 7700cfu/ml (对数值为 3.88)；但经统计学处理的结果如下：

$$t = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{n}}} = 1.35$$

查 t 界值表 ($t_{46, 0.10} = 1.680$)，得 $P > 0.1$ ，故不能认为使用以上两种测试方法所得的菌落总数的结果有显著性差异；再水化干燥纸片中的染料指示剂对该能力验证样品中的细菌无明显抑制作用。同时对参试实验室的结果进行统计时，将两法测得的结果放在一起进行统计学分析和处理。再水化干燥纸片 (3M Petrifilm AC) 计数法得到 AOAC、FDA 和 AFNOR 等国际组织的认可，该纸片已被国外食品生产剂政府监督机构所属的实验室广泛应用，但该方法在我国尚未被国标 (GB) 和行标 (SN) 采用，因而对于使用者而言，该结果可以起到参考作用。

参考文献

1. 姚景慧等，菌落总数检测纸片的比较试验，中国食品卫生杂志[J], 2000,12(3), P76-77.
2. 张洪祥 主编译 中华预防医学会组译，日本药学会编著 卫生试验法[M]。注解，华文出版社 1995。
3. 孟昭赫主编 食品卫生检验方法注解 微生物学部分[M]，人民卫生出版社，1991。
4. Official Methods of Analysis of AOAC International[M], Chapter 17: Microbiological Methods 17th Edition/2000.
5. CURIALE et al. Dry Rehydratable Film for Enumeration of Total Aerobic Bacteria in Foods: Collaborative Study. J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM VOL73 NO.2 1990 P242-247.