



测试片法快速检测乳品中的菌落总数

梁春梅¹, 喻东威¹, 吴玉秋¹, 刘晓川², 薛志清¹, 解鑫¹, 赵媛¹, 许璐¹, 扎木则仁¹

(1.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; 2.北京安普生化科技有限公司 北京 100027)

摘要:通过用快速菌落总数测试片法与国标方法进行对比, 从而对快速菌落总数测试片的准确性、特异性、灵敏度、稳定性等各项性能进行评估, 并验证了快速菌落总数测试片与国标方法(GB 4789.2-2010)检测结果的一致性。结果表明, 快速菌落总数测试片计数更简单、操作简便, 缩短了检测时间, 24 h即可对样品进行菌落计数。

关键词:快速菌落总数测试片; 国标法; 乳制品

中图分类号: TS252.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-2230(2017)01-0047-03

Petrifilm test piece method of rapid total colony number count to detect the aerobic plate count in dairy products

LIANG Chunmei¹, YU Dongwei¹, WU Yuqiu¹, LIU Xiaochuan², XUE Zhiqing¹, XIE Xin¹, ZHAO Yuan¹, XU Lu¹, Zhamuzeren¹

(1.Inner Mongolia Meng Niu Dairy Products Co., Ltd, Hohhot 010018, China; 2.Beijing Anapure BioScientific Co., Ltd, Beijing 100027, China)

Abstract: The test compared the Petrifilm test piece method of rapid aerobic plate count and national standard method, evaluated accuracy, specificity, sensitivity, stability, and other performance attributes of the Petrifilm test piece method of rapid aerobic plate count, and validated the consistency of test results of Petrifilm test piece method of rapid aerobic plate count and the national standard method(GB 4789.2-2010). In the test results, the Petrifilm test piece method of rapid aerobic plate count has simpler colony-counting, more convenient operation, and shorter detection time; it only takes 24 hours to start colony-counting.

Key words: Petrifilm test piece; national standard method; dairy products

0 引言

菌落总数测试片是美国3M公司生产的一预先制备好的培养基系统, 在食品企业中该系列产品作为微生物日常检测的方法, 已经广泛用于食品、饮料及相关行业的微生物检测;

快速菌落总数测试片是培养基中含有作为载体的冷水可溶性凝胶及双联指示剂, 使测试片中的菌落显不同颜色。比传统的方法能缩短时间(24 h即可对样品进行菌落计数), 且观察结果更简便, 有助于提高微生物实验质量和提高工作效率。

本文将快速菌落总数测试片法和国标方法进行对比, 考察在检测乳制品样品时两种方法是否存在显著性差异, 为乳品企业更好的应用该产品提供有效数据。

1 实验

1.1 材料与设备

生乳 80 份、奶粉 90 份、冰激凌 10 份、纯牛奶(加标)份、奶酪 20 份、酸性产品(加标)20 份, 其中加标是指添加一定浓度的标准菌株的产品。

标准菌株大肠埃希氏菌(cicc0389), 金黄色葡萄球菌(cicc21600)。

3M Petrifilm™快速菌落总数测试片, 平板计数琼脂培养基。

生物安全柜, 恒温培养箱。

1.2 方法

所有样品均以快速菌落总数测试片法和国标法同时进行试验, 其中快速菌落总数测试片法培养时间为 24 h(奶粉除外, 要求培养 48 h), 国标法为 48 h。

接种标准菌株新鲜培养物至营养肉汤中 36 ℃ 培养 18 ~ 24 h, 上述培养物用质量分数为 0.85% 的生理盐水制成每 1 mL 含菌数为 1 ~ 1 000 mL⁻¹ 的菌悬液,

收稿日期: 2016-09-28

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项(2013YQ14037108)。

作者简介: 梁春梅(1983-), 女, 工程师, 从事食品检测及分析工作。

备用。

1.3 测定方法

(1)样品试验,本试验对 235 个样品进行对比。按照国标 GB4789.2-2010 方法对样品进行稀释,选择 2~3 个适宜稀释度采用测试片法和国标法分别进行试验。测试片法需 36℃ 培养 24 h(奶粉样品需培养 48 h),国标方法需 36℃ 培养 48 h,记录菌落数量。

(2)重复性实验,随机抽取 1 个批次的生乳样品采用国标法和测试片法同时检测,分别由不同人员,在不同时间进行检验,分别做 20 组平行实验。

(3)定量限试验,在检验范围的低限制备 5 份不同含菌浓度的样品,每份不同含菌浓度的样品分别用测试片法和国标法进行不少于 5 次检验,采用统计方法比较替代方法的检验结果与国标法结果的差异。

(4)线性试验,选择 5 个浓度的样品,每个浓度至少测定 5 次。根据以上实验数据,以检验结果为因变量,以样品中微生物的预期数量为自变量进行线性回归分析,计算相关系数 r 。替代方法的相关系数不得低于 0.95。

1.4 统计分析

将菌落计数结果转化成常用对数值后,对每类样品进行统计学分析。对对数平均偏差进行配对 t 检验以确定不同方法之间微生物菌落总数是否有显著性差异。重复性试验用相对标准偏差进行分析,也可用 F 检验计算得出不同方法的重复性差异。对线性试验结果进行线性回归分析。

2 结果与讨论

2.1 样品实验

本研究采用试片法和国标方法对 6 种乳制品产品,共 235 个样品进行菌落总数测定比对,结果分别采用 spss 软件对样品菌落总数结果进行配对 T 检验分析如下:

分析结果可知两种方法检测生乳、奶粉、冰激凌、纯牛奶、奶酪等样品相关性分别为: 0.963、0.955、0.98、0.984、0.994、0.989;两种方法检测结果具有良好的相关性,且方法之间无显著性差异($P>0.05$)。

2.2 精密度实验

取 1 个纯牛奶样品分装试管,用其稀释活化好的标准菌株(大肠埃希氏菌)稀释至适宜范围,分别用国标方法和测试片法进行计数,此适宜稀释度做 20 个重复实验。

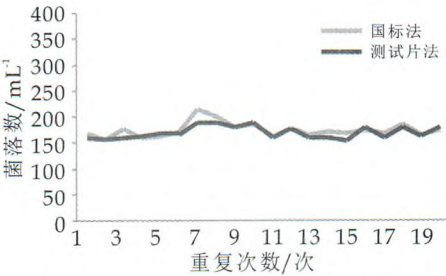


图1 两种方法精密度实验对比结果

AD 判定标准: 99%置信水平下 $AD<1.035$, 或 95%

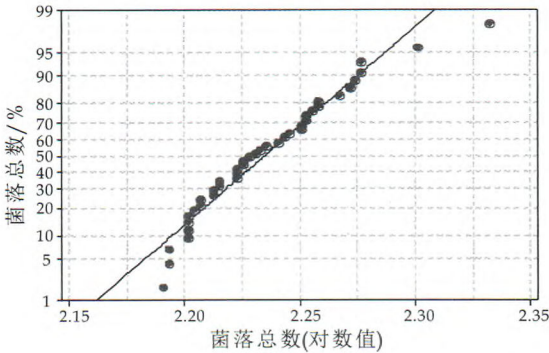


图2 精密度实验正态性检验

置信水平下 $AD<0.752$, 则说明系统服从正态性分布。

测试片法精密度试验结果显示,相对标准偏差(RSD%)为 7.06%,国标方法检测结果计算相对标准偏差(RSD)为 7.82%,两种方法相对标准偏差均符合要求($RSD%<15%$)。从图 1 可知测试片法重复检测结果与国标方法保持很好的一致性。

对检测数据进行正态性检验分析(如图 2)得到 $AD=0.604$, 小于临界值 0.725(95%置信区间),系统服从正态分布,数据处于受控状态。再对其两组数据进行 F 检验和 T 检验分析如下:

F 检验分析得出 $F_{\text{计}}=0.751$, $F_{\text{表}}(0.05, 19, 19)=2.168$, $F_{\text{计}}<F_{\text{表}}$ 说明两种方法之间 $F_{\text{表}}$ 精密度在统计学上无显著差异。

t 检验分析得出 $t_{\text{计}}=1.500$, 查表得出 $t_{\text{表}}(0.05, 38)=2.024$ 因 $t_{\text{计}}<t_{\text{表}}$, 故检测添加标准菌株的纯牛奶测试片法和国家标准检测结果不存在显著性差异。

2.3 定量限实验

原奶样品和奶粉样品按照 10 倍梯度进行稀释,选取 0 mL^{-1} 的样品, 1 mL^{-1} 的样品, 10 mL^{-1} 的样品, 20 mL^{-1} 的样品, 50 mL^{-1} 的样品,采用测试片法和国标方法分别进行计数。且对检测结果进行统计学分析,结果如表 1 所示。

表1 成对样本统计量

方法	均值	标准差	均值的标准误
测试片法	0.8424	0.73612	0.14722
国标方法	0.8700	0.70881	0.14176

注: $n=25$ 。

采用 spss 软件对数据进行配对 T 检验分析如下:

由表 1 可知,采用不同方法对不同菌浓度的纯牛奶样品进行检测,共得到 90 组数据,其中测试片法测得平均菌落总数对数值为 0.8424,标准差为 0.73612,标准误差为 0.14722;国标方法测得平均菌落总数对数值为 0.8700,标准差为 0.70881,标准误差为 0.14176。

表2 成对样本相关系数

方法	n	相关系数	P 值
测试片法和国标方法	25	0.990	0.000

由表 2 和表 3 可知,采用不同方法对样品进行检

表3 成对样本检验

方 法	成对差分					t	d _f	P值(双侧)
	均值	标准差	均值的标准误差	差分的 95% 置信区间				
				下限	上限			
测试片法和 国标方法	-0.02760	0.10733	0.02147	-0.07190	0.01670	-1.286	24	0.211

测,其相关性为0.990, $P>0.05$,即不同菌浓度的纯牛奶样品用测试片法和国家标准法测得菌落总数结果无显著性差异,说明测试片法的定量限检测结果符合要求。

试验同时对 1 mL^{-1} 左右的20组样品进行检测,测试片法和国标方法检出率均达到80%,测试片法检测限为 1 mL^{-1} ,灵敏度相当于国标方法。

2.4 线性实验

原奶样品和奶粉样品按照10倍梯度进行稀释,分别选取1~10,10~30,30~100,100~200,200~300 mL^{-1} 的样品采用测试片法和国标方法进行计数。

用国标法和测试片法进行预测,结果 $R=0.988$, $R^2=0.976$,调整 $R^2=0.975$,标准估计误差为0.12169。

表4 方差分析结果

名称	平方和	d _f	均方	F	P值
回归	25.505	1	25.505	1722.208	0.000 ^a
残差	0.637	43	0.015		
总计	26.142	44			

注:b为因变量为国标法;预测变量为国标法和3M测试片法。

表5 回归系数

方法	非标准化系数(B)	标准误差	标准系数	t	P值
国标法	-0.137	0.045		-3.051	0.004
测试片法	1.068	0.026	0.988	41.499	0.000

注:因变量为国标法。

对数据进行回归线性分析,结果如下。

表4“方差”分析中,“回归”P值为0.000,如果“回归”P值小于0.05是显著的,因此建立的模型是可行的。表5“系数”中计算出的系数的概率值都是小于显著性水平(P)0.05,说明两种方法回归系数达到了显著水平,因此得出测试片法和国标方法具备相关性。由

图3可知相关系数 $R^2=0.975$,测试片法相关系数不低于0.95,因此测试片法测定菌落总数符合线性关系。

3 结论

实验结果表明快速菌落总数测试片法和国标方法检测纯牛

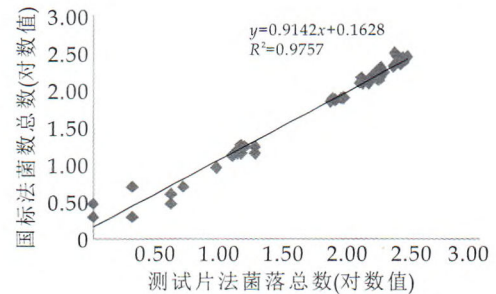


图3 3M测试片法和国标法检验结果

奶、奶粉、酸性产品(包括酸酸乳、真果粒)、冰激凌等产品中的菌落总数,结果无统计学差异($P>0.05$),准确度、精密性、定量限、线性试验均符合要求;快速测试片法检测奶粉样品,48 h会有水化现象,与48 h菌落测试片相比水化程度有所改善,建议奶粉样品24 h预读数,再培养到48 h读数。快速菌落总数测试片可用于酸性产品菌落总数测定,pH值大于4的酸性样品不需要调节。

快速菌落总数测试片采用双联指示剂,使测试片中的菌落显不同颜色计数更简单,操作简便,并且相对传统的测试片方法检测时间为48h缩短至24 h,在更短的时间内获得样品的测试结果,能更加迅速地采取有效的措施解决发现的问题,因此用于乳与乳制品中菌落总数的检测可提高检测效率。

参考文献:

- [1] GB 4789. 2-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》[S].
- [2] 国家药典委员会, 中国药典(2010版): 药品微生物检验替代方法验证指导原则. 中国医药技术出版社, 2010(3): 340-345.

- [30] CEBALLOS L S, MORALES E R, ADARVE G D L T, et al. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology[J]. Journal of Food Composition & Analysis, 2009, 22(4):322-329.
- [31] WU F J, XUE Y, LIU X F, et al. The protective effect of eicosapentaenoic acid-enriched phospholipids from sea cucumber Cucumaria frondosa on oxidative stress in PC12 cells and SAMP8 mice[J]. Neurochemistry international, 2014, 64: 9-17.

(上接第33页)

son of the biological activities of *Saccharomyces cerevisiae*-expressed intracellular EGF, extracellular EGF, and tagged EGF in early-weaned pigs[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2015, 99(17): 7125-7135.

[28] 汤小鹏, 方热军. 表皮生长因子对早期断奶仔猪生长性能及肠道健康的影响[J]. 动物营养学报, 2015, 27(11): 3345-3351.

[29] MIETTINEN P J. Transforming growth factor- α and epidermal growth factor expression in human fetal gastrointestinal tract[J]. Pediatric research, 1993, 33(5): 481-486.