

食品中霉菌和酵母菌计数的检测能力验证结果分析

韩蕊

1. 北京农学院 北京 100096

2. 天津雀巢普瑞纳宠物食品有限公司 天津 300451

摘要: 目的: 探究食品中霉菌与酵母菌的计数检测精度与检测效果。方法: 以国际法和快速检测法作为计数检测方法, 以 GB 4789.15—2016 为检测评判标准, 对食品中霉菌和酵母菌进行提取、稀释、培养、分离、染色和计数。结果: 国际法与快速检测法的检测范围均能够达到 $2\text{cfu/mL}-5.0 \times 10^5\text{cfu/mL}$ 。结论: 国际法与快速检测法均能够以高精度计数检测能力进行食品霉菌和酵母菌的科学检测。

关键词: 牛奶; 霉菌; 酵母菌; 计数; 检测能力

Analysis of the verification results of the detection ability of mould and yeast counts in food

Han Rui

1. Beijing University of Agriculture, Beijing 100096

2. Tianjin Nestle Purina Pet Food Co., LTD., Tianjin 300451, China

Abstract: Objective: To explore the accuracy and detection effect of the counting of mold and yeast in food. Methods: International law and rapid detection method were used as counting methods, and GB 4789.15 -- 2016 was used as detection and evaluation standard to extract, dilute, culture, isolate, stain and count mold and yeast in food. Results: The detection range of international law and rapid detection method was $2\text{cFU/ml}-5.0 \times 10^5\text{cFU/ml}$. Conclusion: Both international law and rapid detection method can be used for the scientific detection of food mold and yeast with high precision.

Keywords: milk; The mold; Yeast; Count; Detection capability

一、霉菌和酵母菌概述

现今已经发现能够对粮食造成污染的霉菌已有 150 多种, 高效精准的计数检测计数实现对食品霉菌的控制对于指导粮食储备和保护人类安全而言具有重要意义^[2]。酵母菌被广泛应用在酿造业、食品业和医药工业等领域。现阶段已经探明的酵母菌共有 1000 多种, 其中与食品有直接关系的酵母菌主要有面包酵母、假丝酵母和啤酒酵母等, 虽然多数酵母菌均可作为食物添加材料混入食品当中, 但是若食品中酵母菌的含量过高且长期或短时间内大量食用则同样会引起人体深部的真菌感染。为此, 通过对食品中霉菌和酵母菌含量进行精准计数检测是十分必要的^[3]。

二、材料与方法

(一) 试验材料

试验使用的原材料为市面上销售的鲜牛奶和酸奶。

(二) 试验设备

本试验使用的主要仪器电子天平、高压蒸汽灭菌锅、超净工作台、酸度计、冰箱、水浴锅、恒温振荡培养箱、混合纤维素微孔滤膜、微生物快速检测仪。另外, 本试验还需要用到移液枪、玻璃棒、试管、注射器、离心管、过滤器、锥形瓶、量筒、药匙、烧杯、涂布棒、培养皿、酒精灯、载玻片以及擦镜纸等。

(三) 试验试剂及配制

生理盐水: 称取 0.80g 氯化钠将其溶于蒸馏水中, 并定容至 100mL, 制成 0.80% 的氯化钠溶液, 作为后期灭菌使用。次甲基蓝染液: 称取 0.02g 次甲基蓝粉末并将其倒入小烧杯中, 然后向烧杯中再加入 2g 二水合柠檬酸三钠, 用蒸馏水将其溶解后定容至 100mL, 经过除菌过滤后将剩余溶液装入棕色试剂瓶中, 并置于低温环境进行保存。孟加拉红培养基: 直接购买。使用时取 35g 培养

基将其加入 1000mL 的蒸馏水中加热煮沸，调节其溶液的 pH 至 7.1 ± 0.1 区间，然后将其置入 120°C 环境下进行高压灭菌，时间为 20min，当培养基冷却至 46°C 之后将其倾倒在平板中使用^[4]。马铃薯葡萄糖培养基（自制）：将马铃薯去皮并切成 200g 小块装入烧杯中，然后向烧杯中加入 500mL 蒸馏水，维持煮沸时间 30min，然后使用四层纱布对土豆淀粉溶液进行过滤，待淀粉溶液稍冷却后加入 10g 葡萄糖，并定容至 1000mL，均分装在 5 个锥形瓶中，同样置于 120°C 环境下灭菌 20min，然后等待冷却备用。

（四）试验方法

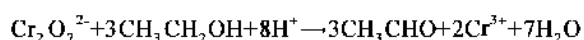
因现阶段市面上合格的酸奶中霉菌数量极少，为获得可以用于不同浓度霉菌计数检测的数据，本试验将通过人工污染的样品酸奶的方式增加酸奶中霉菌含量^[5]。

（五）待检样品的制备

取样品鲜牛奶（1mL）置于小试管中，使用无菌生理盐水对其进行 10 倍梯度的稀释，然后选择稀释度为 103、104 和 105 的牛奶用孟加拉红培养基倾倒在平板上进行培养，并设计空白培养基作为对照，将装有 103、104、105 梯度的培养皿和空白培养皿一同放入 25°C 环境中进行培养，培养时间为 48h，然后使用接种环挑取霉菌菌丝，接种在马铃薯葡萄糖培养基（50ml）的锥形瓶中，放置在转速为 60r/min，温度为 25°C 的恒温震荡环境下进行培养，在此环境下培养 24h 后可获得霉菌菌液。使用移液管吸取 5mL 霉菌菌液将其加入到 45mL 的酸奶中进行混匀，至此待检酸奶样品便完全制备完成。

（六）霉菌与酵母菌的检测原理

以上述酸奶作为试验原材料，因植入霉菌孢子的直径在 $3\mu\text{m}$ 以上远低于牛奶中各组分的尺寸，所以可用孔径为 $3\mu\text{m}$ 的滤膜对检测材料进行过滤，以实现从酸奶中霉菌的收集。因霉菌属于真菌类的一种，所以其细胞壁共可分为三层，最外层由无定型的 β 葡聚糖组成，中层由糖蛋白组成，内层由几丁质纤维组成，其成分结构与酵母菌的细胞壁结构大致相似。在试验中发现 $2\mu\text{L}$ 的酵母菌浓缩液若使用 $3\mu\text{L}$ 浓度为 0.02% 的次甲基蓝染液对其染色，则可达到非常好的计数效果。在比色法测定中，酵母菌在厌氧环境下发酵可产生乙醇，而在酸性环境下乙醇可被橙红色重铬酸根离子所氧化，重铬酸根离子会被还原成灰绿色的三价铬离子。其反应方程式如下：



产生 Cr^{3+} 可在波长为 593nm 光下达到最大吸收峰，其吸光度与 Cr^{3+} 浓度之间呈正比例线性关系。

三、计数检测试验

（一）霉菌的检测方法

在无菌工作台取 1mL 样品酸奶置于小试管中，加入 9mL 的生理盐水对其稀释 10 倍，制成本次试验的待检样品。然后使用无菌针管吸取稀释后的待检样品（吸取 5ml），将其滴在孔径为 $3\mu\text{m}$ 的滤膜上进行过滤，然后向过滤液中打入 $50\mu\text{L}$ 的无菌空气，用吸取针管反复吸吹使过滤液充分混匀。用移液器取滤膜上方残留的 $2\mu\text{L}$ 液体，并将其滴在载玻片相应位置，等待自然晾干后向菌膜处滴加 $3\mu\text{L}$ 浓度为 0.02% 的次甲基蓝染液进行染色，时间为 1min，然后使用滴管吸取蒸馏水对染色区域进行冲洗，待再此晾干后将其插入微生物快速检测系统进行检测。

1. 快速检测法检测霉菌

国际法与快速检测法对酸奶中霉菌含量的计数检测数据如表 2 所示，其中 a-q 为实验组，r、s、t 为对照组。

表 2 两种计数检测法检测数据

试验编号	国际法检测结果 (M (cfy/ml))	快速检测法检测结果 (N (cfy/ml))	lgM	lgN
a	1650000	288013	6.224854	5.450926
b	975000	311273	5.976762	5.481768
v	511000	325275	5.717470	5.522373
d	233000	152672	5.355478	5.221335
e	91800	70620	4.957558	4.845195
f	63800	50638	4.815511	4.714552
g	33600	26520	4.517530	4.445244
h	10500	8246	4.035316	3.926253
i	7500	6039	3.865161	3.787198
j	4170	3475	3.631166	3.639754
k	2010	1653	3.315341	3.241163
l	815	733	2.918465	2.845676
m	566	513	2.754553	2.728532
n	341	304	2.544036	2.584600
o	111	107	2.059228	2.023464
p	72	81	1.873333	1.914824
q	48	58	1.691195	1.760842
r	27	33	1.457168	1.521469
s	15	9	1.136148	1.000000
t	4	5	0.688960	0.61246

2. 霉菌快速检测法检出限和检测范围的确定

霉菌正常生长成熟后其体态会表现为细长形状，对这些特征明显的霉菌进行计数检测相对容易，但是在高

浓度霉菌菌株群下，菌丝相互交叉重叠现象十分严重，无法通过显微镜观察的方式进行计数。由下表3中对不同浓度霉菌的检测结果显示数据中看出，即当霉菌在酸奶中的含量大于 5.0×10^5 cfu/mL时，那么霉菌菌丝重叠将会影响快速检测法的检测精度，造成实际检测结果与其他检测方法偏差过大问题。在上述试验方法中，酸奶在经过10倍系数的稀释过滤后，可由5mL酸奶浓缩出20 μ L菌液，取其中2 μ L进行霉菌含量的计数检测，所以快速检测法的检出限为20cfu/mL，范围为20cfu/mL- 5.0×10^5 cfu/mL。

(二) 酵母菌的活化方法

在无菌工作台中使用量筒量取50mL的无菌生理盐水，并倒入锥形瓶中作为基液，向基液中加入0.5g的安琪酵母，待充分震荡后用棉塞进行封口，并将其置于温度在35 $^{\circ}$ C的恒温培养箱中活化30min。然后取1mL酸奶置于试管中，加入9mL的生理盐水进行稀释，之后取稀释后的酸奶9mL放入1mL的活化酵母菌液中，在此使用生理盐水按10倍梯度对其进行稀释，稀释倍数为106倍，用吸管在101-105稀释度的试管中各滴加1滴石蜡油，然后将试管放置在温度为35 $^{\circ}$ C的恒温培养箱中进行发酵，发酵时间为1h。在每个试管中分别加入3mL的重铬酸钾溶液，以酸性重铬酸钾溶液作为酵母菌活化计数的空白对照，然后将其全部置于沸水浴中加热反应8min，使用流水进行冷却，对593nm处的测量吸光度进行检测，对每个浓度分别做3个平行。将发酵后的酵母菌涂布在孟加拉红培养基上，每个浓度梯度同样做3个平行，将所有培养基放置在25 $^{\circ}$ C的恒温环境中培养，在48h后取出培养基对培养基上的酵母菌进行计数。

1. 染色条件的确定

对材料中酵母菌的染色情况进行观察，实际观察效果如表5所示。

表5 不同浓度染色液和染色时间对酵母菌的染色效果

时间	浓度				
	0.03%	0.02%	0.01%	0.001%	0.0001%
35s	++			-	-
60s	++	+		-	-
180s	++	+		-	-
300s	++	++	+		-
430s	++	++	+		-

注：“-”无色；“±”微蓝色；“+”蓝色；“++”深蓝色。

由上可知，未进行染色的酵母菌在显微镜呈现通体透亮状态，经过染色的酵母菌边缘与中心处界限相对模糊，不利于快速检测法利用特征值进行检测。用浓度在

0.02%的染料染色1min后，酵母菌在显微镜下可观察到中心区域呈蓝绿色边缘黑色且色差明显的表现特征，可利于快速检测法进行计数。

2. 酸奶中酵母菌的检测效果

用上述检测方法制成培养基的平板对照结果如图2、图3、图4所示。

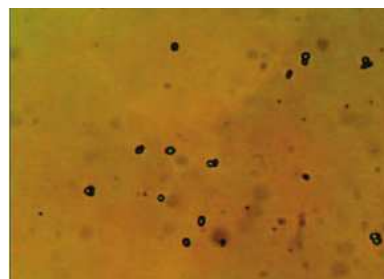


图1 截流液中的酵母菌

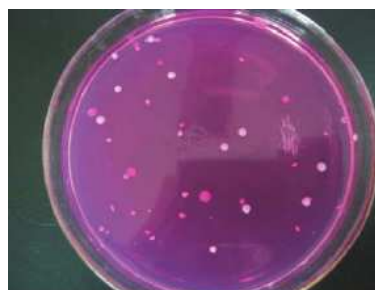


图2 截流液的培养结果



图3 滤液的培养结果

由图1可以看出，截留液在经过次甲基蓝染液染色后，在显微镜下能够清晰看出酵母菌的轮廓。而牛奶材料经孔径为1.2 μ m滤膜过滤后其截留液中的杂质明显变少，能够看清除单个酵母菌的形态。上图3培养基是培养经滤膜过滤的滤出液，用肉眼看不出有酵母菌的生长，由此可证明孔径为1.2 μ m的滤膜能够有效截留酵母菌。

四、检测图像处理及识别

因霉菌染色图像的特殊性需要对其成像后图像进行处理，进而得到更加精准的计数检测数据。

(一) 霉菌的形态特征

霉菌的营养体由菌丝构成，这表明菌丝属于霉菌的

显著特征之一，霉菌在直接镜检计数中主要以视野范围内菌丝的数目来判断霉菌的个数，因此在进行霉菌计数之前需要对菌丝的形态特征进行辨识。在载玻片上霉菌的图像如下图4所示：

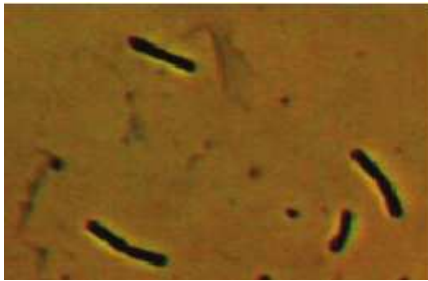


图4 霉菌典型图像

从上图能够看出，霉菌染色后在显微镜下特征是细长的棒状物，因霉菌在染色后会出现空心形态，所以图像上细长的菌丝为两条平行的边缘，且菌丝顶端为钝角形态。在识别计数过程中可对图像黑色连通区域进行分析，并对其形态学特征进行计算，然后运用霉菌形态学特征作为判断依据，对检测样本进行分类识别。

（二）最大类间方差法

用Ostu方法实现对霉菌图像的分割。因霉菌染色后在显微镜下会呈现出两条黑色平行的边缘，所以在使用Ostu法对图像进行分割时，应当加强对黑色区域的分量控制，以此获得特征更加明显的霉菌图像，为后续对霉菌特征值的提取提供便利。

1. 分部分割

本文使用的是点状光源图像法，因此在摄取霉菌图像时各部分亮度会稍有差别，即可能会出现四周部分亮度低而中间高的情况。在对整幅图像进行处理时通常采用统一阈值法进行分割，这种方法会导致亮度较低图像部位霉菌图像过多，而亮度较高部分图像的白色成分过多。此时可利用Ostu法对分割图片进行分别计算，进而避免因光亮导致各部分霉菌分别不均匀的情况^[6]。

2. 图像的平滑处理

从图5中能够看出，图像中长条状霉菌细胞周围的毛刺较多，并且图像会受到一些噪声干扰在图像中形成黑色小点，此类现象会影响检测方法对细胞边缘数值的跟踪，进而降低计数检测的特征参数提取，使实际检测能够结构验证出现比对误差。因此，在对图像进行阈值分割后，还需要对图像进行一次形态学的平滑处理。本研究中对霉菌图像的形态学平滑处理主要以二值图像给予解决，此方法主要运用腐蚀运算和膨胀运算两种算法实现对光亮程度不同区域的二次成像。从腐蚀运算的角

度出发，但借助腐蚀运算只能够使目标缩小且孔洞增大，消除图像与周围孤立个体的边界点处理，即使两个分开的图像轻微粘连。而膨胀运算则可以使目标区域增大孔洞缩小，填补个体轮廓边缘微小凹陷，使整个个体可以更加连通化。

（三）中轴提取

将酸奶中成分形状与霉菌形态特征进行对比可以发现，二者之间的特征非常显著。霉菌的个体图像主要呈细长的棒状，在个体两端有两条平行的边缘黑线。在国际法与快速检测法中，计算机对霉菌的识别技术在于对图像中个体中轴的提取，中轴的提取方法可分为细化法和燃烧法，这两种方法对于一些非典型霉菌图像进行计数时会出现遗漏现象，即无法对中轴不对称的霉菌个体进行检测。为此本文采用一种基于内切圆图形的一阶微分脊峰搜索中轴法进行霉菌个体的计数，该方法可被应用到快速检测法中进行辅助检测。该方法主要以图像内部霉菌个体图像边缘的内切圆为基点，以内切圆半径作为该点到图像边缘的最小距离。计算机通过分别计算霉菌个体图像连通域中每个点的内切圆半径，得到半径不均的分布图，每个半径分布图的脊峰便是霉菌个体图像的中轴的所在^[7]。

五、结论

通过本文的分析可以看出，因各培养基的组分不同，导致计数检测结果也不同，但是国际法与快速检测法的检测数据大致相同。其中，霉菌在孟加拉红琼脂上的生长率会相对高于马铃薯葡萄糖琼脂上的霉菌生长率，主要原因在于培养基碳氮比不同对霉菌生长率会产生一定影响，并且葡萄糖含量过低会在一定程度降低霉菌的检出率。为此，将通过人、机、料、法、环等5个角度此次对食品中霉菌和酵母菌计数检测能力结果验证进行分析。

人即为实验操作人员，要求实验操作人员应具有较高的实践水平和丰富的检测经验，能够熟练掌握目标霉菌与酵母菌的检验方法，并对菌落形态与染色特征进行科学判定，可以在实验之初制定周全的试验方案，在实验过程中对整个试验走向进行控制，保障结果不漏计、不设计。

机即为实验需要用到的所有机械设备，所有仪器应当能够满足检测工作的基本要求，检测设备的性能与检测精度会直接影响本次计数检测试验的结果。同时，因部分搅拌设备的旋转刀片会破坏霉菌的菌丝，进而会导致实际计数检测结果数据偏高，所以应当挑选适合的搅

拌设备例如拍击式均质器对试验样本数据进行混匀。试验使用的培养箱配置应具备多种用途,并且能够实现高精度控温和时间控制,确保培养基中的霉菌与酵母菌能够在设定环境下生存。料即为试验试验的原材料和培养用料。考虑到霉菌可在不同食物培养基上生长,并且不同厂家生产的培养基用料也大不相同,因计数能力结果验证试验只能制备一种样品,所以为避免试验的中断,需要严格控制采购培养基的质量。以本文使用的孟加拉红琼脂为例,孟加拉红琼脂见光易出现分解,因此在整个试验中需要严格控制光照因素对试验的影响,若缺少棕色瓶可以通过不透光袋子密封透光玻璃瓶的方式保存。无论哪种保持方式都需要在使用之前对其质量进行检测,从而避免培养基变质影响试验结果。

法即为计数检测方法。在进行霉菌与酵母计数检验中需要按照指定方法处理特定样品,例如使用稀释液反复冲洗装有样品的西林瓶工序时,需要保障冲洗能够将目标菌全部转移;在48h培养霉菌过程中第一次观察需要轻拿轻放,严禁上下翻转平板和左右晃动平板的现象出现,避免霉菌孢子二次扩散生成次生菌落,影响试验计数检测的结果;当使用肉眼对霉菌和酵母进行观察时,可借助低倍显微镜或放大镜的方式对其进行区分和计数,提高记录稀释倍数与对应霉菌酵母的检测效率。

环即代表环境。在整个试验过程中环境条件如温度、湿度、光照、空气流动、震动和无菌环境等因素都会在

一定程度上影响菌株的生长,进而影响试验最后的计数检测结果分析情况。在试验进行到每一个新阶段前需要对试验环境进行检测与人为调整,通过电子设备的方式监控并记录每个时段下的环境条件,在检测酸奶样品中霉菌含量时,还要有适当的防控措施,以预防成熟霉菌的孢子在空气中扩散。

参考文献:

- [1]耿战辉、徐腾月、董雪、马秀玲.提高霉菌和酵母计数结果准确性的方法探讨[J].食品安全质量检测学报,2020,11(17):4.
- [2]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):5.
- [3]赵红阳,王鸣雨,宋娇娇,等.快速霉菌酵母测试片法与GB 4789.15-2016在3种类型食品中霉菌计数比较[J].中国食品卫生杂志,2020,32(4):4.
- [4]傅德江.饮料中霉菌和酵母计数检验结果不确定度的评定[J].食品安全导刊,2020(18):2.
- [5]辛双阳,何天文.食品中霉菌和酵母计数能力验证的结果与分析[J].现代食品,2021(11):3.
- [6]吕志敏,于佳,管宁.食品包装用纸中酵母菌计数测量不确定度的评定[J].检验检疫学刊,2020,30(1):3.
- [7]任秀,白继超,骆海朋,等.食品检验用解脂耶氏酵母菌标准物质制备研究[J].食品安全质量检测学报,2021,12(17):6.

