

自动菌落计数仪在乳制品检测中的应用



刘胜桃¹, 宋鸽¹, 王秀艳¹, 李慧娟^{1,*}, 逯刚², 张淑丽¹, 王海斌¹, 赵三军¹,
张德喜¹

¹蒙牛乳业(沈阳)有限责任公司, 辽宁沈阳 110122

²内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 内蒙古呼和浩特 011517

摘要: 目的: 为提高计数效率, 实现原始数据的可追溯性, 通过对自动菌落计数仪的适用性、准确性、精密度和重复性进行试验验证, 确定其在乳制品和原辅料样品检测中菌落计数的适用情况。方法: 选取平板倾注法和测试片法进行验证测试, 包括嗜冷菌、需氧芽孢、嗜热需氧芽孢, 乳酸菌计数、菌落总数、大肠菌群、霉菌、酵母菌、金黄色葡萄球菌等项目, 采用人工计数与自动菌落计数仪计数进行对比, 确定其可行性、适用性和准确性。结果: 正常的无背景干扰的培养皿菌落计数和 3M 测试片菌落计数对比验证, 目测法与仪器法进行配对 t 检验, $P=0.17$, 大于 0.05, 在统计学上结果无显著性差异, 有颜色的培养基对自动计数无显著影响。对于针尖状菌落、菌落与培养基颜色接近、菌落轮廓不明显、菌落较大蔓延且菌落边缘不规则、培养基中同时存在食品颗粒与菌落时, 或菌落颜色与食品颗粒颜色接近时, 仪器计数效果较差不能满足准确性要求。结论: 对于质地均匀的样品, 自动菌落计数准确度和精密度均比较好, 工作效率高节省了实验人员的操作时间, 且实验原始数据及图像可在仪器中长期保存, 是实验室值得推广的计数方法。但对于试验验证中有干扰的样品和培养基, 可采取适当措施改变计数条件, 人工修正仪器计数结果, 但计数效率会有所降低, 实验室可视情况选择使用。

关键词: 乳制品; 自动菌落计数; 适用性; 效率

DOI: 10.57237/j.wjfs.2022.01.002

Application of Automatic Colony Counter in the Detection of Dairy Products

Liu Shengtao¹, Song Ge¹, Wang Xiuyan¹, Li Huijuan^{1,*}, Lu Gang², Zhang Shuli¹, Wang Haibin¹,
Zhao Sanjun¹, Zhang Dexi¹

¹Mengniu Dairy (Shenyang) Co., LTD., Shenyang 110122, China

²Inner Mongolia Mengniu Dairy (Group) Co., LTD., Hohhot 011517, China

Abstract: Objective: To improve the counting efficiency and realize the traceability of raw data. The applicability, accuracy, precision and repeatability of the automatic colony counter were verified by experiments, Determine the applicability of colony count in the detection of dairy products and raw and auxiliary materials. Methods: The plate pouring method and test piece method are selected for verification test, including psychrophilic bacteria, aerobic spores, thermophilic aerobic spores, lactic acid bacteria count, total number of colonies, coliform, mold, yeast, Staphylococcus

基金项目: 国家重点研发计划食品安全关键技术研发-食品安全监测与控制技术的全链条区域综合示范-食品安全全程监测控制技术保障体系构建方法研究 (2019YFC1606503).

*通信作者: 李慧娟, lihuijuan@mengniu.cn

收稿日期: 2022-09-20; 接受日期: 2022-10-20; 在线出版日期: 2022-11-01

<http://www.wjfs.com>

aureus and other items. The manual count is compared with the automatic colony counter to determine its feasibility, applicability and accuracy. Results: The colony count of normal Petri dish without background interference was compared with that of 3M test piece. The paired t-test was carried out by visual method and instrument method, $P = 0.17$, greater than 0.05. There was no significant difference in statistical results, and the colored medium had no significant effect on automatic counting. The counting effect of the instrument is poor when there are needle shaped colonies, the color of colonies is close to that of the culture medium, the contour of colonies is not obvious, the colonies spread greatly and the edges of colonies are irregular, there are food particles and colonies in the culture medium at the same time, or the color of colonies is close to that of food particles, which can not meet the accuracy requirements. Conclusion: For samples with uniform texture, the accuracy and precision of automatic colony counting are relatively good, the work efficiency is high, the operation time of experimental personnel is saved, and the original experimental data and images can be stored in the instrument for a long time. It is a counting method worthy of popularization in the laboratory. However, for the samples and culture medium with interference in the test verification, appropriate measures can be taken to change the counting conditions and manually correct the counting results of the instrument, but the counting efficiency will be reduced, and the laboratory can choose to use it according to the situation.

Keywords: Dairy; Automatic Colony Count; Applicability; Efficiency

1 引言

随着民众对食品安全的要求越来越严格,各微生物检测机构,面临越来越频繁的微生物菌落总数统计和结果报告工作[1]检测过程中常常会有菌落计数问题,如果检测过程中菌落数少时可肉眼直接观察计数,但在高污染样品的检测或者添加微生物进行研究性试验过程中,每个皿上会有几十个或者几百个的菌落的情况。这种情况下肉眼观察菌落数耗时长、易造成视觉疲劳、且人工计数易受外界干扰导致影响菌落计数的准确性[2-8]。另外,人工菌落计数原始数据结果无法保存,缺乏后期的数据分析,不利于实现检测的准确性及数据化管理[9]。为了提升检测效率,市场推行了各种微生物自动菌落计数设备来满足微生物计数需求[10-14],包括实现原始试验数据的保存与复现[15]。

本实验室选择自动菌落计数仪[16],对皿上的菌落进行计数,与人工肉眼计数结果进行比较,以验证全自动菌落计数仪的准确性、精密度和重现性,从而确定该菌落计数仪是否符合菌落计数要求,能否应用于乳制品中微生物的检测计数。

2 材料与amp;方法

2.1 试剂与amp;材料

孟加拉红琼脂(CM164)、嗜冷菌计数琼脂(CM199)、平板计数琼脂(CM101)、结晶紫中性

红胆盐琼脂(CM115)、Baird-Parker 琼脂平板(PB022A)、MC 培养基(CM156)、MRS 琼脂(CM188),以上培养基均采购于北京。

PetriefilmTM6417 霉菌酵母菌测试片(70200590159)、PetriefilmTM6477 快速霉菌酵母测试片(70200775800)、PetriefilmTM6406 菌落总数测试片(70200572157)、PetriefilmTM6416 大肠菌群测试片(UU008196485),以上测试片均采购于上海。

生牛乳、冠益乳酸牛奶、饼干碎粒、玉米脆筒由蒙牛沈阳工厂提供、菌落总数质控样(QC-FD-002)、大肠菌群质控样(QC-FD-004)、霉菌酵母质控样(QC-FD-020)、金黄色葡萄球菌质控样(QC-FD-009)来自于中国检验检疫科学研究院测试评价中心。

2.2 仪器与amp;设备

Czone-G6T 型自动菌落计数仪(杭州);BSC-1300IIB₂ 生物安全柜(上海);SSW-600-2S 恒温水箱(上海);MJX-250BIII 霉菌培养箱(天津);MSIII basic 漩涡混合器(德国);LT-BIX300L 生化培养箱(上海)。

2.3 测定方法与amp;步骤

2.3.1 适用性验证

选取平板倾注法和测试片计数法对不同类型样品

进行验证测试,检测项目包括生牛乳中嗜冷菌、需氧芽孢、嗜热需氧芽孢,发酵乳中乳酸菌计数,以及质控样品中菌落总数、大肠菌群、霉菌、酵母菌、金黄色葡萄球菌,颗粒原料中菌落总数,参照产品说明书及国标方法检测进行检测,选择在计数范围内的培养皿及测试片,分别采用目测法与仪器法进行计数,并进行统计学分析 2 种方法的差异,重点对培养皿和测试片的培养基背景、菌落大小、菌落颜色、菌落形态等是对否计数造成影响进行研究。

2.3.2 准确性验证

选取适用性验证后的培养皿,选择在计数范围内

2.3.5 操作方法流程图

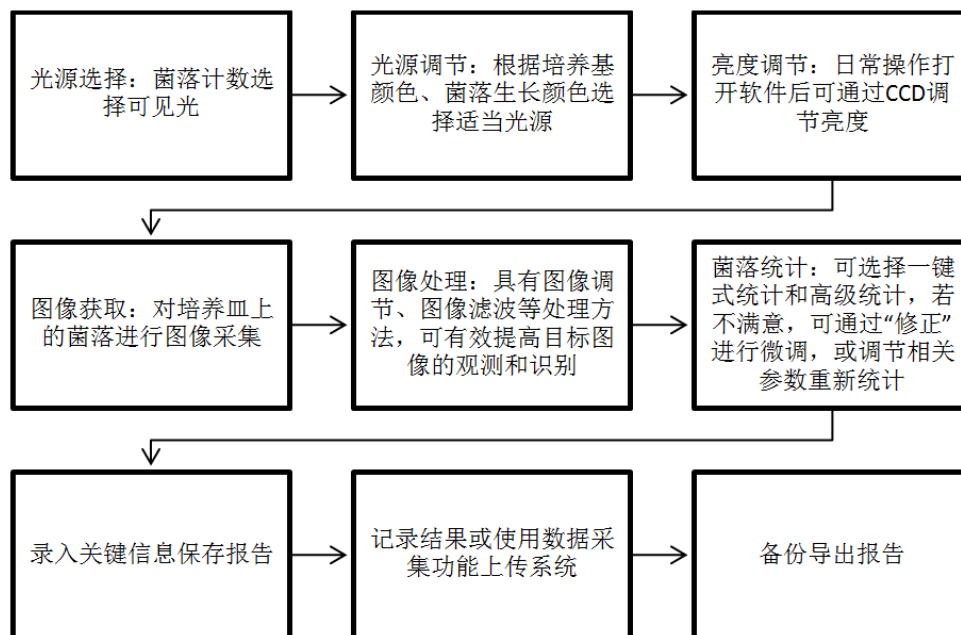


图 1 操作方法流程图

Figure 1 Operation method flowchart

3 结果与讨论

3.1 适用性验证

实验室随机选取 38 组样本进行验证测试,其中平板倾注法 30 组、测试片计数法 8 组,检测项目包括生牛乳中嗜冷菌、需氧芽孢、嗜热需氧芽孢,发酵乳中乳酸菌计数,以及质控样品中菌落总数、大肠菌群、霉菌、酵母菌、金黄色葡萄球菌,颗粒原料中菌落总

的培养皿及测试片,分别采用目测法与仪器法进行计数,并进行统计学分析 2 种方法的差异。

2.3.3 精密度验证

选取 14 个不同样品,包括使用平皿及测试片检测,采用仪器法及目测法对测试结果分别进行 5 次计数,计算相对标准偏差。

2.3.4 重现性验证

由不同实验人员分别采用 2 种计数方法对同一个平皿进行计数,以相对标准偏差来评价 2 种计数方法的重现性。

数,参照产品说明书及国标方法检测进行检测,平皿和测试片的选择要考虑到培养基背景、菌落大小、菌落颜色、菌落形态等是对否计数造成影响。对比结果见表 1,目测法与仪器法进行配对 t 检验, $P=0.006$,小于 0.05,在统计学上结果有显著性差异。

通过实验数据对差异情况进行分析,采用自动菌落计数仪进行菌落计数时,针尖状菌落如 21℃ 培养的嗜冷菌,由于菌落细小与培养基融合不易识别,故准确性不高。另外菌落与培养基颜色接近会干扰菌落的准确计数,或菌落轮廓不明显时计数准确性也会受到影响,如需氧

芽孢、嗜热需氧芽胞计数,当菌落较大、蔓延且菌落边缘不规则,在仪器计数时,会将菌落边缘分割成多个菌落,造成误判。大肠菌群测试片只能用于菌落计数无法

识别菌落周围有无气泡。当培养基中同时存在食品颗粒与菌落时,或菌落颜色与食品颗粒颜色接近时仪器也无法对食品颗粒和菌落进行准确识别。

表 1 适用性验证数据

Table 1 Applicability verification data

序号	样品名称	检测项目	培养基名称	人工目测计数结果 CFU	自动菌落计数仪结果 CFU
1	生牛乳	嗜冷菌 6.5℃	嗜冷菌计数琼脂	147	135
2	生牛乳	嗜冷菌 6.5℃	嗜冷菌计数琼脂	205	210
3	生牛乳	嗜冷菌 6.5℃	嗜冷菌计数琼脂	133	138
4	生牛乳	嗜冷菌 21℃	平板计数牛奶琼脂	36	55
5	生牛乳	嗜冷菌 21℃	平板计数牛奶琼脂	110	145
6	生牛乳	嗜冷菌 21℃	平板计数牛奶琼脂	89	122
7	生牛乳	需氧芽孢	MPC	13	21
8	生牛乳	需氧芽孢	MPC	8	17
9	生牛乳	需氧芽孢	MPC	15	22
10	生牛乳	嗜热需氧芽孢	DTA	11	16
11	生牛乳	嗜热需氧芽孢	DTA	16	25
12	生牛乳	嗜热需氧芽孢	DTA	14	20
13	发酵乳	乳杆菌	MRS 琼脂	96	93
14	发酵乳	乳杆菌	MRS 琼脂	73	78
15	发酵乳	嗜热链球菌	MC 培养基	88	89
16	发酵乳	嗜热链球菌	MC 培养基	65	62
17	质控样	菌落总数	平板计数琼脂	126	124
18	质控样	菌落总数	平板计数琼脂	105	100
19	质控样	菌落总数	菌落总数测试片	89	87
20	质控样	菌落总数	菌落总数测试片	55	55
21	饼干碎粒	菌落总数	平板计数琼脂	66	123
22	饼干碎粒	菌落总数	平板计数琼脂	45	88
23	玉米脆筒	菌落总数	平板计数琼脂	114	159
24	玉米脆筒	菌落总数	平板计数琼脂	150	208
25	质控样	大肠菌群	VRBA	46	43
26	质控样	大肠菌群	VRBA	70	72
27	质控样	大肠菌群	大肠菌群测试片	43	42
28	质控样	大肠菌群	大肠菌群测试片	25	25
29	质控样	霉菌	孟加拉红琼脂	44	40
30	质控样	霉菌	孟加拉红琼脂	32	35
31	质控样	霉菌	霉菌酵母菌测试片	33	28
32	质控样	霉菌	霉菌酵母菌测试片	25	26
33	质控样	酵母菌	孟加拉红琼脂	78	77
34	质控样	酵母菌	孟加拉红琼脂	65	69
35	质控样	酵母菌	霉菌酵母菌测试片	56	55
36	质控样	酵母菌	霉菌酵母菌测试片	45	43
37	质控样	金黄色葡萄球菌	Baird-Parker 琼脂	43	42
38	质控样	金黄色葡萄球菌	Baird-Parker 琼脂	50	50

3.2 准确性验证

实验室选用适用性验证后的 25 组样本进行验证测试,其中平板倾注法 17 组、测试片计数法 8 组,检测项目包括生牛乳中嗜冷菌、发酵乳中乳酸菌计数,以

及质控样品中菌落总数、大肠菌群、霉菌、酵母菌、金黄色葡萄球菌,参照产品说明书及国标方法检测进行检测,平皿和测试片的选择要考虑到培养基背景的干扰是对否计数造成影响。对比结果见表 1,目测法与仪器法进行配对 t 检验, $P=0.17$,大于 0.05,在统计学上

结果无显著性差异，说明在使用有颜色的培养基如 法自动计数方法准确可靠。VRBA、孟加拉红培养基对自动计数无显著影响，仪器

表 2 准确性验证数据

Table 2 Accuracy verification data

序号	样品名称	检测项目	培养基名称	人工目测计数结果 CFU	自动菌落计数仪结果 CFU
1	生牛乳	嗜冷菌 6.5℃	嗜冷菌计数琼脂	147	135
2	生牛乳	嗜冷菌 6.5℃	嗜冷菌计数琼脂	205	210
3	生牛乳	嗜冷菌 6.5℃	嗜冷菌计数琼脂	133	138
4	发酵乳	乳杆菌	MRS 琼脂	96	93
5	发酵乳	乳杆菌	MRS 琼脂	73	78
6	发酵乳	嗜热链球菌	MC 培养基	88	89
7	发酵乳	嗜热链球菌	MC 培养基	65	62
8	质控样	菌落总数	平板计数琼脂	126	124
9	质控样	菌落总数	平板计数琼脂	105	100
10	质控样	大肠菌群	VRBA	46	43
11	质控样	大肠菌群	VRBA	70	72
12	质控样	霉菌	孟加拉红琼脂	44	40
13	质控样	霉菌	孟加拉红琼脂	32	35
14	质控样	酵母菌	孟加拉红琼脂	78	77
15	质控样	酵母菌	孟加拉红琼脂	65	69
16	质控样	金黄色葡萄球菌	Baird-Parker 琼脂	43	42
17	质控样	金黄色葡萄球菌	Baird-Parker 琼脂	50	50
18	质控样	菌落总数	菌落总数测试片	89	87
19	质控样	菌落总数	菌落总数测试片	55	55
20	质控样	大肠菌群	大肠菌群测试片	43	42
21	质控样	大肠菌群	大肠菌群测试片	25	25
22	质控样	霉菌	霉菌酵母菌测试片	33	28
23	质控样	霉菌	霉菌酵母菌测试片	25	16
24	质控样	酵母菌	霉菌酵母菌测试片	56	55
25	质控样	酵母菌	霉菌酵母菌测试片	45	43

3.3 精密度验证

选取 14 个不同样品,包括使用平皿及测试片检测,采用仪器法及目测法对同一测试结果分别进行 5 次计数,计算相对标准偏差。对比结果见表 2,目测法相对标准偏差在 0.52%-2.85%,平均相对标准偏差为 1.34%,仪器法相对标准偏差在 0.59%-4.87%,平均相对标准偏差为 1.58%,2 种计数方法的相对标准偏差均小于 10%,精密度符合要求,但仪器法的精密度整体上高于目测法。

另外,仪器法最好使用一次性平皿,因玻璃平皿为重复性使用,时间久了会出现划痕或由于制作工艺问题存在气泡等问题,在仪器计数过程中,会被误记为菌落,导致菌落数值偏高的情况,可采用手动标记功能,将被误认为菌落的计数结果去除,修正计数结果,使用一次性培养皿则不存在此类问题。另外,若平皿中存在细小菌落,肉眼不易识别的情况下,菌落计数仪仍能识别计数,但出现在仪器计数区域外生长在平皿边缘的菌落则需要人工修正计数结果。

表 3 精密度验证数据

Table 3 Precision validation data

序号	第 1 次计数 CFU	第 2 次计数 CFU	第 3 次计数 CFU	第 4 次计数 CFU	第 5 次计数 CFU	相对标准偏 差%
平皿 1 目测法	236	234	232	234	232	0.72
平皿 1 仪器法	235	233	230	231	234	0.89
平皿 2 目测法	78	77	78	77	76	1.08
平皿 2 仪器法	77	78	78	76	78	1.16
平皿 3 目测法	140	142	141	140	141	0.59
平皿 3 仪器法	142	142	145	144	143	0.91
平皿 4 目测法	275	273	275	275	272	0.52
平皿 4 仪器法	270	272	275	274	273	0.71
平皿 5 目测法	120	124	124	122	121	1.46
平皿 5 仪器法	125	122	122	123	122	1.06
平皿 6 目测法	73	75	74	72	74	1.55
平皿 6 仪器法	78	77	75	75	74	2.17
平皿 7 目测法	32	32	30	32	31	2.85
平皿 7 仪器法	45	45	48	47	47	2.89
平皿 8 目测法	105	105	104	102	104	1.18
平皿 8 仪器法	133	132	133	130	132	0.93
菌片 9 目测法	148	149	148	154	149	1.68
菌片 9 仪器法	150	153	152	155	151	1.26
菌片 10 目测法	142	144	146	143	144	1.03
菌片 10 仪器法	143	146	145	145	144	0.79
菌片 11 目测法	23	24	24	23	24	2.32
菌片 11 仪器法	25	23	24	23	22	4.87
菌片 12 目测法	215	207	214	214	205	2.20
菌片 12 仪器法	210	207	211	210	211	0.78
菌片 13 目测法	184	182	183	180	182	0.81
菌片 13 仪器法	186	188	188	186	188	0.59
菌片 14 目测法	130	128	131	130	130	0.80
菌片 14 仪器法	125	128	135	128	126	3.05

3.4 重现性验证

由不同实验人员分别采用 2 种计数方法对同一个平皿进行计数,以相对标准偏差来评价 2 种计数方法的重现性。对比结果见表 3,不同人员采用目测法相对标准偏差为 0.70%,采用仪器法相对标准偏差为 1.23%,其标准偏差均<10%,符合重现性要求。

表 4 重现性验证数据

Table 4 Repeatable validation data

人员	1	2	3	4	5	相对标准偏差%
目测计数法 CFU	186	184	187	185	187	0.70
仪器计数法 CFU	188	183	183	187	185	1.23

4 结论

通过上述结果分析可知,对于正常的无背景干扰的样品的菌落计数和 3M 测试片上的菌落计数,仪器计

数法的计数准确度和精密度均比较好,且计数速度较快,基本可实现一键计数,且仪器操作功能比较完善,实现了样品的可追溯性,可记录样品编号、稀释度、平皿编号、原始数值和人工修正后数值以及平皿的图片,最终形成完整的原始记录,可长期保存,如实验室使

用信息化系统录入实验数据,也可采用数据采集功能代替人工录入结果,降低数据录入的出错率。实验室可以根据实际情况选择使用,减少实验员人工计数的工作量,提升计数效率,试验数据的有追溯性。

但由于培养基颜色、实验样品本底颜色、菌落形态、颜色、大小、着生位置等因素的影响,可视情况对仪器参数进行调整后计数更准确,仪器软件针对不同培养基平板,可设置专用参数,并可长期存储,在对相应培养基平板计数时可选择专用参数模板,避免后续重复调整设置参数,针对于试验测试中菌落识别不准确的样品和培养皿,也可采取适当措施改变计数条件[17],例如在培养基中添加适当浓度的 TTC 指示剂[18]改变菌落颜色,可以增大菌落与背景区域的颜色差异[19, 20],或在标准允许的情况下加大稀释度减少食品颗粒的干扰,可以满足仪器计数的条件,出现以上情况时则需要人工修正仪器计数结果,但是计数效率会有所降低,针对不规则菌落形态的识别准确性问题也需要进一步研究。

参考文献

- [1] 张帆. 全自动菌落分析仪的微生物快检应用 [J]. 食品安全导刊, 2011, (12): 28-29.
- [2] 马健锦. 基于机器视觉的菌落自动计数软件开发 [J]. 海峡科学, 2019 (01): 37-40.
- [3] 杨小青, 杨秋翔, 杨剑. 基于形态学的显微细胞图像处理与应用 [J]. 计算机系统应用, 2016, 25 (3): 220-224.
- [4] 张依朗. 基于机器视觉的高通量自动菌落挑取系统研究 [D]. 北京化工大学, 2021.
- [5] 周振, 易小波, 赵辉煌. 一种基于小波变换的血液细胞计数方法 [J]. 衡阳师范学院学报, 2015, 30 (3): 162-165.
- [6] 苏永健. 菌落计数器校准方法研究以及其测量不确定度分析 [J]. 计量与测试技术, 2019, 46 (02): 112-114.
- [7] Suryani E, Wiharto W, Polvonov N. Identification and counting white blood cells and red blood cells using image processing case study of leukemia [J]. Blood, 2015, 2 (6): 2850-2858.
- [8] 梁春梅, 常建军, 喻东威, 等. 自动菌落计数仪在乳品检测中的应用研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11 (01): 146-152.
- [9] 伏广伟, 张珍竹, 崔绮嫦, 等. 全自动菌落计数仪在纺织检测中的应用研究 [J]. 中国纤检, 2021 (02): 66-69.
- [10] 武宗茜, 王鹏, 丁天怀. 活动轮廓模型在重叠藻细胞计数中的应用 [J]. 计算机工程, 2012, 38 (3): 209-211.
- [11] 王国新, 张长利, 房俊龙. 基于图像处理技术的菌落自动计数系统的研究 [J]. 中国乳品工业, 2006, 34 (2): 40-42.
- [12] Biswas S, Ghoshal D, Hazra R. A new algorithm of image segmentation using curve fitting based higher order polynomial smoothing [J]. Intern J Light Electron Opt, 2016, 127 (20): 8916-8925.
- [13] Medeiros RS, Scharcanski J, Wong A. Image segmentation via multi-scale stochastic regional texture appearance models [J]. Comput Vis Imag Understand, 2016, 142 (C): 23-36.
- [14] 崔绮嫦, 刘泽姿, 罗桂莲, 等. 基于人工智能的全自动菌落计数仪研发 [J]. 中国纤检, 2020 (12): 66-69.
- [15] 郭晓敏. 基于显微图像的颗粒计数方法研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [16] G6 全自动菌落计数分析仪 [J]. 食品安全导刊, 2010 (07): 33.
- [17] 李艳肖, 胡雪桃, 张芳, 等. 基于高光谱技术的菌落图像分割与计数 [J]. 农业工程学报, 2020, 36 (20): 326-332.
- [18] 刘胜桃, 秦思文, 鲍晓凤, 等. TTC 在乳及乳制品菌落总数检测中的应用 [J]. 食品研究与开发, 2016, 37 (24): 135-139.
- [19] 李光泽. 食品微生物检验菌落总数测定方法的效果分析 [J]. 中国卫生产业, 2016, 13 (1): 134-135.
- [20] Ren D, Chen P, Wang Y, et al. Research and application on the characteristics of compound cold water soluble gel in petrifilm aerobic count plates [J]. LWT-Food Science and Technology. 2017, 82: 335-341.

作者简介

刘胜桃

1986 年生, 助理工程师, 本科, 研究方向为食品微生物检测研究。

E-mail: 573209185@qq.com

宋鸽

1983 年生, 工程师, 硕士研究生, 研究方向为食品安全检测研究。

E-mail: songge@mengniu.cn

李慧娟

1978 年生, 高级工程师, 硕士研究生, 研究方向为食品质量安全及检测研究。

E-mail: lihuijuan@mengniu.cn