

霉菌和酵母菌显色纸片效果初步评价

张建明¹, 滕昆仑², 卢勉飞², 蔡芷荷¹, 吴清平³, 李斌¹

1. 广东环凯微生物科技有限公司, 广东 广州 510663; 2. 广东环凯生物科技有限公司, 广东 肇庆 526238;

3. 广东省微生物研究所, 广东 广州 510070

摘要: 目的 初步评价新研发显色纸片对霉菌和酵母菌检验效果。方法 用本实验室研制的霉菌和酵母菌显色纸片(简称 HK) 与国外 3M 同类产品及传统国家标准计数培养基沙氏葡萄糖琼脂(SDA) 对霉菌和酵母菌的检验效果从特异性、选择性和生长率 3 个方面进行对比测试。结果 对 7 株酵母菌, HK 的纸片有更好的显色效果, HK 纸片对全部 7 株酵母菌均有显色反应, 而 3M 对 6 株显色明显, 1 株显色不明显; 对 17 株霉菌, HK 对其中 16 株显色效果明显, 3M 对其中 15 株霉菌显色效果明显。对 23 株非目标菌 2 种纸片均能良好抑制。2 种纸片的生长率差异无统计学意义($P = 0.399$), 对各种菌的生长率均达到 0.9 以上。结论 用新研发的显色纸片检测霉菌和酵母菌, 特别是对酵母菌, 具有比较好的效果。

关键词: 显色纸片; 霉菌; 酵母菌

中图分类号: TS201

文献标识码: A

文章编号: 1004-8685(2017)17-2489-03

Primary evaluation of count plate in the detection of yeast and mold

ZHANG Jian-ming*, TENG Kun-lun, LU Mian-fei, CAI Zhi-he, WU Qing-ping, LI Bin

* Guangdong Huankai Microbial Sci & Tech. Co. Ltd., Guangzhou, Guangdong 510663, China

Abstract: Objective To evaluate the detection efficacy of count plate for yeast and mold. **Methods** To compare the count plate made in our laboratory (HK) with the similar product made by 3M and SDA on specificity, selectivity and growth rate in the detection of mold and yeast. **Results** HK was better than 3M in the test of 7 yeast strains with better chromogenic effect, which had reaction to all the 7 strains. 3M had chromogenic effect to 6 strains of yeast, with no significant effect to 1 strain. In the test of 17 mold strains, HK had good chromogenic effect to 16 strains, 3M had good chromogenic effect to 15 strains. In the test of 23 non-target bacteria strains, the two count plate both had good inhibition. There was no statistical significant on the difference of growth rate between the 2 count plates ($P = 0.399$). All growth rates were higher than 0.9. **Conclusion** The yeast and mold count plate made in our laboratory has a good effect in detecting mould and yeast, especially for the yeast.

Key Words: Count plate; Mould; Saccharomycetes

霉菌和酵母菌同属于真菌,霉菌分布极广,种类繁多。食品中霉菌和酵母菌的增殖一般会导致营养价值下降、酸败变味或外观恶化等,能产生有毒代谢物,通过食品引起食用者急性或慢性中毒,严重的情况下,还可能产生强烈的致癌性^[1-2]。因此在微生物检验中,霉菌和酵母菌的检验是重要的检测项目。传统的检验方法主要包括形态检查和生化方法,准确性和灵敏性均较高,传统培养基成本较低,但采用传统方法进行菌落总数测定存在明显不足^[3],传统方法涉及的实验较多,操作繁琐,需要时间较长。因此,研究和建立食源性微生物快速准确特异检测的新技术和

新方法受到各国科学家的重视^[4]。

显色纸片是在显色培养基基础上进一步改进的简化运用,显色纸片相对于传统的平板培养法具有显著优点:(1)可测定少量检品,不需要配制试剂和大量的玻璃器皿,操作简便,经济实用;易于消毒保存,携带方便,价格低廉,能大大减少或消除对环境的污染,能减少试验后的清洗工作,能克服热琼脂法不适宜受损细菌恢复的缺陷,故适用于实验室、生产现场和野外工作环境;(2)可以在取样的同时接种,结果更能真实地反映当时样本中的细菌数,防止由于细菌繁殖造成的数量增多;(3)不用进行使用前的准备工作,能大大节省时间、人力和物力^[5-6]。因此显色纸片被越来越多的检验机构认可^[7-9]。但是目前进口的检测纸片价格昂贵,增加了食品和药品企业的检验成本^[10],因此本实验室自主研发了霉菌和酵母菌显色纸片,并将其与 3M 霉菌和酵母菌测试纸片以及国家标准检验方法进行对比,以测试该显色纸片的性能。

基金项目:广州市科技计划项目(201610010067)

作者简介:张建明(1979-),男,本科,工程师,主要从事培养基研发工作。

通讯作者:吴清平, E-mail: wuqp203@163.com;

zjm987654@sina.com

1 材料与方法

1.1 菌株 酵母菌 7 株,霉菌 17 株,革兰阳性菌 6 株,革兰阴性菌 17 株,以上菌株均来自本实验室和广东省微生物所。

1.2 仪器与试剂 AP4000 全自动螺旋接种仪(美国 SBI 公司); Smartcounter 自动菌落计数仪(中国广东环凯微生物科技有限公司)。本实验室研制的霉菌和酵母菌纸片(简称 HK);美国 3M 公司的霉菌和酵母菌纸片(简称 3M,批号:2017-01KC);沙氏葡萄糖琼脂(简称 SDA,批号:F1499Y)、胰酪胨大豆琼脂培养基(简称 TSA,批号:F1504Y)平板由中国广东环凯微生物科技有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 特异性试验 将 17 株霉菌和 7 株酵母菌采用 SDA 复苏后,取 10 cfu/ml ~ 100 cfu/ml 浓度的菌液加 1 ml 至 HK 和 3M 纸片上,28 °C 培养 40 h ~ 48 h,同时涂布 SDA 平板上,比较菌落特征。

1.3.2 选择性试验 将 6 株革兰阳性菌和 17 株革兰阴性菌制备成 1 000 cfu/ml ~ 5 000 cfu/ml 浓度的菌液,加 1 ml 至 HK 和 3M 纸片上,28 °C 培养 40 h ~ 48 h,观察是否有菌落生长及生长情况。同时稀释 10 倍涂布于 TSA 平板计数。

1.3.3 生长率试验 将 4 株代表性酵母菌和 4 株代表性霉菌共 8 株菌采用 SDA 复苏,28 °C 培养 48 h 后,挑取菌落制备成菌液,按梯度稀释,选取合适的连续 3 个稀释梯度加 1 ml 至 HK 和 3M 纸片上,28 °C 培养 40 h ~ 48 h,同时涂布 SDA 平板进行计数,选取 10 cfu/ml ~ 100 cfu/ml 的稀释浓度进行最后的结果记录。按下列公式计算生长率(PR): $PR = NS / NO$,其中 NS 表示待测纸片上得到的平均菌落数,NO 表示参比培养基 SDA 平板上获得的平均菌落数。

1.3.4 纸片的使用方法 将测试菌株复苏(霉菌用 PDA 平板,细菌用 TSA 平板),挑取菌落制备成菌液,进行梯度稀释,打开纸片,取 1 ml 菌液或样品至纸片上,然后合上纸片,使菌液充满整个纸片表面。然后放置 28 °C 培养 40 h ~ 48 h。

1.4 统计学处理 数据分析采用 SPSS 19.0 软件,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 特异性试验 培养基的特异性结果见表 1,在目前实验室的 24 株霉菌和酵母菌对纸片进行扫菌后,由结果可以看出,7 株酵母菌在 HK 纸片上有着清晰的紫色菌落,而 3M 纸片对一些酵母菌显色较慢,SDA 平板上均呈现奶油色菌落;HK 纸片上霉菌则普遍呈紫色扩散菌落,3M 纸片呈蓝绿色扩散菌落。而在 SDA 上霉菌呈现各种色泽。实验结果表明,对 7 株酵母菌,HK 纸片有更好的显色效果,HK 纸片对全部 7

株酵母菌均有显色反应,而 3M 对 6 株显色明显,1 株显色不明显;对 17 株霉菌,HK 对其中 16 株显色效果明显,3M 对其中 15 株霉菌显色效果明显,2 种纸片显色单一,优于 SDA 各种杂乱的色泽。

表 1 试验菌株在 2 种纸片以及 SDA 上的特异性试验

编号	菌株	HK	3M	SDA
1	白色念珠菌 ATCC10231	+	+	+
2	白色念珠菌 CMCC(B) 98001	+	+	+
3	酿酒酵母 ATCC9763	+	+	+
4	李也蒙毕赤酵母 GIMR12	+	+	+
5	光滑假丝酵母 ATCC15126	+	+	+
6	葡萄糖酵母 ATCC9080	+	-	+
7	热带假丝酵母 ATCC1369	+	+	+
8	黑曲霉 ATCC16404	+	+	+
9	桔青霉 AS2.788	+	+	+
10	黑曲霉 CMCC(B) 98003	+	+	+
11	大毛霉 GIM3.84	+	+	+
12	米根霉 GIMQ303	+	+	+
13	桔青霉 GIM3.91	+	-	+
14	绿色木霉 GIM3.139	+	+	+
15	赤土毛霉 GIM3.92	-	+	+
16	橙黄筒壳菌 GIM3.93	+	-	+
17	鲜红青霉 GIM3.94	+	+	+
18	黄曲霉 GIM3.17	+	+	+
19	黑曲霉 GIM3.95	+	+	+
20	木霉 GIM3.608	+	+	+
21	白地霉 GIM2.12	+	+	+
22	总状毛霉 GIM3.86	+	+	+
23	黑曲霉 GIM3.546	+	+	+
24	蜡叶芽枝霉 GIM3.415	+	+	+

注: + 表示阳性菌落; - 表示阴性菌落。

2.2 选择性试验 HK 纸片和 3M 纸片均有较好的选择效果,23 株非目标菌在 2 种纸片中均不生长(表 2)。

表 2 试验菌株在 2 种纸片的选择性试验(株)

菌株	菌株数	阳性结果	
		HK	3M
葡萄球菌	3	0	0
粪肠球菌	1	0	0
芽胞杆菌	2	0	0
肠杆菌	5	0	0
志贺菌	2	0	0

菌株	菌株数	续表	
		阳性结果	
		HK	3M
沙门菌	3	0	0
变形杆菌	1	0	0
假单胞菌	1	0	0
弧菌	3	0	0
链球菌	1	0	0
李斯特菌	1	0	0
合计	23	0	0

2.3 生长率试验 8 株酵母菌和霉菌在不同纸片和 SDA 上生长率比较结果显示 2 种纸片的生长率差异无统计学意义 ($P = 0.399$), 各纸片以及各种菌的生长率均达到 0.9 以上(表 3)。

表 3 霉菌和酵母菌在 2 种纸片上的生长率

菌株	HK	3M	SDA
黑曲霉 ATCC16404	1.13	1.09	1.00
桔青霉 AS2.788	1.05	1.04	1.00
酿酒酵母 ATCC9763	1.02	1.01	1.00
白色念珠菌 ATCC10231	0.99	0.97	1.00
白色念珠菌 CMCC(B)98001	1.02	1.01	1.00
大毛霉 GIM3.84	0.93	0.93	1.00
米根霉 GIMQ303	1.12	1.08	1.00
光滑假丝酵母 ATCC15126	1.02	0.98	1.00

3 讨论

HK 纸片和 3M 纸片选用了不同的底物对霉菌和酵母菌进行显色, 因此菌落呈现不同的颜色^[11-13], HK 纸片呈现紫色, 而 3M 纸片呈蓝绿色, 加上纸片中营养物质的差异, 使 HK 纸片和 3M 纸片对不同菌株的显色效果不同。实验表明 7 株酵母菌在 48 h 测试时间内 HK 纸片上显色速度优于 3M 纸片, 7 株酵母菌全部显色, 而 3M 有 1 株酵母菌未显色。

纸片相对于传统的计数法, 显色效果和营养提供更好, 1.5 d 左右大部分霉菌和酵母菌的色泽能明显显示出来, 而平板一般都要 2 d 以上才能更好的计数。但是如果区分不同的霉菌, 由于平板计数法会对不同的菌株显示出不同的菌落和孢子颜色, 可能 SDA 的平板计数法效果更好。纸片和传统计数法各有其优劣性, 综合使用能更高效准确经济地对霉菌和酵母菌进行检测。同时也对纸片的研发改进提供了

思路 and 方向, 下一步如果能够增加纸片对不同霉菌和酵母显色特异性可以更好地对霉菌和酵母菌进行分类筛选。

本研究所选取的纸片制备所用载体为无纺布和滤纸外的复合冷水凝胶, 相对于无纺布和滤纸^[14-15], 检测更快速、方便、灵敏度高和特异性强, 容易判别计数, 而且可以从纸片上挑取目标菌做进一步的验证, 具有广泛的应用前景。

参考文献

- [1] 雷玲钮. 食品中霉菌、酵母菌检测分析[J]. 食品科学, 2013, 7(1): 50-51.
- [2] 梁美丹, 肖剑, 易云婷, 等. 食品微生物能力验证霉菌酵母菌计数[J]. 轻工科技, 2015, 7(7): 5-6.
- [3] 吴毓薇, 吴许文, 吴清平, 等. 食品卫生微生物测试片检测技术进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(12): 2832-2834.
- [4] 王峰, 潘赢, 王学涛, 等. 食品微生物快速检测技术研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(8): 990-993.
- [5] 戴昌芳, 邓峰, 李玉伟, 等. 霉菌快速检测纸片法的研究[J]. 中国公共卫生, 1998, 14(11): 674-675.
- [6] 白阳. 菌落总数测试片研究进展[J]. 江苏调味副食品, 2015, 2(2): 1-4.
- [7] Chow WHA, McCloskey C, Tong Y, et al. Application of isothermal helicase-dependent amplification with a disposable detection device in a simple sensitive stool test for toxigenic clostridium difficile[J]. J Mol Diagn, 2008, 10(5): 452-458.
- [8] Rosa M, Norma L, De-Ann L. Efficacy of 3M™ Petrifilm™ aerobic count plates for enumerating Bacillus sporothermodurans and Geobacillus stearothermophilus in UHT milk[J]. Int Dairy J, 2012(8): 147-149.
- [9] 陈倩, 陈昭斌. 微生物快速检验方法新进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(4): 1061-1064.
- [10] 程楠, 何景, 董凯, 等. 试纸法在食品安全快速检测中的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(1): 256-261.
- [11] 吴清平, 周艳红, 蔡芷荷. 卫生微生物特异性显色培养基的研究与应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(1): 124-126.
- [12] Miranda RO, Carvalho AFD, Nero LA. Development of a selective culture medium for bifidobacteria, Raffinose-Propionate Lithium Mupirocin(RP-MUP) and assessment of its usage with Petrifilm? aerobic count plates[J]. Food Microbiol, 2014, 39(4): 96-102.
- [13] Vicky J, Liesbeth J. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria[J]. Food Microbiol, 2010, 27(6): 710-730.
- [14] 王佳男, 肖茜文, 王艳蕊, 等. 食品微生物测试片的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(2): 701-705.
- [15] Jain R, Babbar SB. Guar gum and isubgol as cost-effective alternative gelling agents for in vitro multiplication of an orchid, den-drobium chrysothoxum[J]. Curr Sci, 2005, 88(2): 292-295.

收稿日期: 2017-01-18