

微生物数码显微培养计数系统在 固体粉末样品检测中的应用

廖燮恒^{1,2}, 赵海锋¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)(2. 高露洁棕榄(中国)有限公司, 广东广州 510620)

摘要: 本文研究了微生物数码显微培养计数系统在微生物培养过程中的菌落判定和计数能力。以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白假丝酵母菌和巴西曲霉四种微生物为测试菌株探讨了传统目测计数方法和仪器计数方法的一致性, 并分析了当样品有杂质时对仪器读数的影响。结果显示仪器读数和目视读数具有显著的正相关性 ($R^2=0.85\sim0.99$, $p<0.05$), 该仪器在微生物生长过程中能够实现实时监测, 当菌落总数超标时能及时起到预警作用, 且仪器能显示出培养皿上各点的三维图像, 仪器读数结合人工判断, 能较好地区分菌落和杂质, 接种回收率在 105%~155% 之间。在实际固体粉末测试样品中应用, 结果显示仪器读数和目视读数接近, 一致性比例为 94%, 且仪器读数更为敏感。因此, 微生物数码显微培养计数系统可以很好的应用于食品、药品和化妆品中菌落总数的快速准确定量检测。

关键词: 微生物数码显微培养系统; 相关性; 实时监测; 杂质

文章编号: 1673-9078(2021)05-279-286

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.5.0516

Application of Microbial Colony Counting System in the Detection of Powder Samples

LIAO Xie-heng^{1,2}, ZHAO Hai-feng¹

(1.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.Colgate-Palmolive (China) Co. Ltd., Guangzhou 510620, China)

Abstract: The capabilities of the microbial colony counting system (MCCS) including colony determination and counting abilities were examined in this study. Four different microorganisms including *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis* were used as testing strains to examine the consistency of the traditional visual counting method and the instrumental counting method, and the influence of impurities in a sample on instrumental reading. The results showed that there was a significant ($R^2=0.85\sim0.99$, $p<0.05$) positive correlation between the instrument readings and visual counting results. The instrument can realize real-time monitoring during the growth of microorganisms, and when the total number of colonies exceeds the limit, provides early warning displays 3D images of each point on the petri dish. The instrumental reading combined with manual judgment can distinguish better colonies and impurities and allow an inoculation recovery rate of 105%~155%. When the MCCS system was applied to actual powdered test samples, the result showed that the instrumental readings were close to the visual readings with the consistency rate of 94%, and the instrument was even more sensitive. Therefore, the MCCS can be well applied to the rapid and accurate quantitative detection of the total number of colonies in food, pharmaceutical and cosmetic areas.

Key words: microbial colony counting system; correlation; real-time monitoring; impurities

引文格式:

廖燮恒,赵海锋.微生物数码显微培养计数系统在固体粉末样品检测中的应用[J].现代食品科技,2021,37(5):279-286

LIAO Xie-heng, ZHAO Hai-feng. Application of microbial colony counting system in the detection of powder samples [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(5): 279-286

收稿日期: 2020-06-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31972062); 广东省科技计划项目 (2018A050506008; 2016A010105003); 广州市科技计划项目 (201903010056)

作者简介: 廖燮恒 (1983-), 女, 研究方向: 食品微生物检测

通讯作者: 赵海锋 (1977-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品生物技术

微生物检测, 是食品, 药品, 化妆品等领域产品的重要释放指标^[1]。随着社会产品的多元化, 人们对健康越来越重视, 对产品的质量要求也越来越高^[2]。一方面, 社会发展, 政府为保障消费者对质量监控加大力度, 检测方法逐渐与国际接轨, 质量对应的法律

法规更加严谨,而食源性污染又是食品行业最突出的问题^[3,4]。另一方面,产品竞争也愈演愈烈,商家都希望能通过自动化手段降低产品成本,增加竞争力。微生物的传统检测具有时间长,人工操作多的特点,需要数天才能完成,往往成为产品释放时间的瓶颈,商家需要为此建立起对应的原料以及成品库存,当有超标事故发生,往往是数天之后,连续生产的产品可能已经受到多天的污染。因此,可靠的微生物自动快速检测技术,能为检测结果提供预警信号的仪器,受到市场上的广泛关注^[5-8]。

市面上有不少成熟的微生物自动化检测技术,大部分是采取非琼脂培养的方式。例如,利用 ATP 技术,有 Celsis 和 Charm。利用电化学法,有梅里埃的 Tempo 和 Sy-Lab 的 Bactrac。利用颜色变化法,有梅里埃的 Bact/Alert。利用流式细胞技术,有 BD 的 Microcount, Foss 公司的 BactoScan 和梅里埃的 Chemunex。除此之外,还有酶联免疫法 ELISA^[9],荧光定量 PCR 法^[10,11],高通量测序技术结合传统培养技术^[12],阻抗法^[13],快速测试纸片^[14],分子生物学法等。另外一些方式是利用一些预警的软件而达到控制风险的目的^[15]。企业在正式实施这些方法前,需要有完整的方法验证作为支持,以证明代替方法与传统方法一致或者更加严格。

传统的微生物检测技术,是通过倒琼脂平皿,然后放置到合适的温度中培养,培养数天后人工目视读数结果。微生物检测的过程中,关键步骤结果读数,大多数是依赖人工目视读数,并且依赖于实验员的主观经验^[16]。目前有不少学者研究通过自动化的技术例如影像菌落读数仪器对培养皿菌落进行自动计数^[17-19]。我们尝试使用下文中的 Microu3D 检测仪器,在不改变微生物实验中的培养基、温度、时间等培养条件的情况下,通过仪器对培养过程中平皿变化的连续监控,探讨其与传统的人工目视读数结果间的一致性,以拓展其在食品和日化品中微生物快速检测的应用。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

试验菌株: *Escherichia coli* ATCC 8739 大肠埃希氏杆菌、*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 金黄色葡萄球菌、*Candida albicans* ATCC 10231 白假丝酵母菌和 *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 巴西曲霉购买于 KWIK-STIK Plus Culture, Microbiologics。

培养基: Modified Letheen Agar (MLA)、Sabouraud Dextrose Agar (SDA) 和 TAT 购于美国 BD 公司。

1.2 仪器与设备

微生物数码显微培养计数系统 MicroBio u3D 252398, BD 公司; 高压灭菌锅, 美国 Steris 公司; 培养箱 BD240, Binder 公司; 纯水仪 Elix-10, 密理博公司; 生物安全柜 A2, Thermo 公司; 超净工作台 ACB-4A1, Thermo 公司; 比浊仪, BBL 公司。

1.3 方法

1.3.1 培养基制备及灭菌

按照供应商指引准备好 MLA, SDA, TAT 和生理盐水。培养基在 121 °C 下灭菌 15 min。琼脂培养基使用前放置于 46 °C 水浴锅中保温, 稀释剂和生理盐水灭菌后冷却至常温使用。

1.3.2 菌悬液的制备

准备多支 0.85% 的生理盐水, 用于稀释菌悬液。无菌条件下将目标菌株转接到 MLA/SDA 平板上进行划线和菌种复苏, 得到新鲜菌株。金黄色葡萄球菌和大肠杆菌: 将细菌划线到 MLA 平板上, 放置于 30 °C 的培养箱内培养 18~24 h, 获得新鲜菌种。白色念珠球菌: 将霉菌划线到 SDA 平板里面, 放置于 22.5 °C 的培养箱内培养 24~48 小时。巴西曲霉: 将霉菌划线到 SDA 斜面试管, 放置于 22.5 °C 的培养箱内培养 7~8 d, 准备好比浊仪, 将菌悬液调整到麦氏浓度 0.5 (0.5 McFarland standard)。此时金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的浓度为 1.5×10^8 CFU/mL, 用 1:10 的浓度进行稀释得到 10^7 CFU/mL、 10^6 CFU/mL、 10^5 CFU/mL、 10^4 CFU/mL、 10^3 CFU/mL, 共 6 个菌液浓度。而白色念珠球菌的浓度为 1.0×10^6 CFU/mL, 按同样的方法稀释得到 10^5 CFU/mL、 10^4 CFU/mL、 10^3 CFU/mL。用 50 mL 的生理盐水, 对霉菌斜面试管进行润洗, 利用玻璃珠将霉菌芽孢洗脱。对其进行 1:10 稀释四次, 此时每 10 μ L 的菌悬液大约为 20 CFU。

1.3.3 倾注法平板计数

1.3.3.1 只接种标准菌株

将目标菌种的菌悬液移到平皿中, 每种菌的接种梯度为两个, 分别是 20 CFU 左右的低浓度接种和 150 CFU 左右的高浓度接种, 每个平板倒入 15~20 mL 琼脂培养基, 摇匀, 待凝固, 分别放入自动读数仪和培养箱内进行培养。细菌平板培养温度为 30 °C, 真菌平板培养温度为 22.5 °C, 培养时间为 96 h。

1.3.3.2 标准菌株中加入杂质的影响

在平皿中先加入 1 g 珍珠粉末作为杂质, 然后接种约 50 CFU 左右的标准菌株。每个平板倒入 15~20 mL 琼脂培养基, 摇匀, 待凝固, 分别放入自动读数

仪和培养箱内进行培养。细菌平板培养温度为 30 ℃，真菌平板培养温度为 22.5 ℃，培养总时间为 96 h。

1.3.3.3 实际应用

使用某种白色粉末原料，进行常规的微生物污染检测，使用 TAT 作为肉汤，然后分别倾注 MLA 培养基作为细菌计数平板，SDA 培养基作为真菌及霉菌计数平板。

1.3.4 计数对比

每天分别记录自动读数仪和培养箱内平板的读数，记录，并对两种方法的结果进行比较，利用数据分析软件 Minitab 对相关性 R² 和比值%进行评价。

1.4 数据统计与分析

采用 SPSS 23 对数据进行处理，所有数据结果均以平均值±标准差表示，并用 Origin 8.0 作图。

2 结果与讨论

2.1 结果与分析

2.1.1 仪器与读数

仪器外观如图 1a 所示，它具有微生物培养箱的功能，可以设定不同的温度，通过每 30 min 一次的图片采集（图 1b），形成 3D 图像（图 1c），判断菌落生长的形成，确认它是否菌落。由于照片是连续的，所以可以实现生长情况的连续监控，如果有超标的情况可以实时得知。

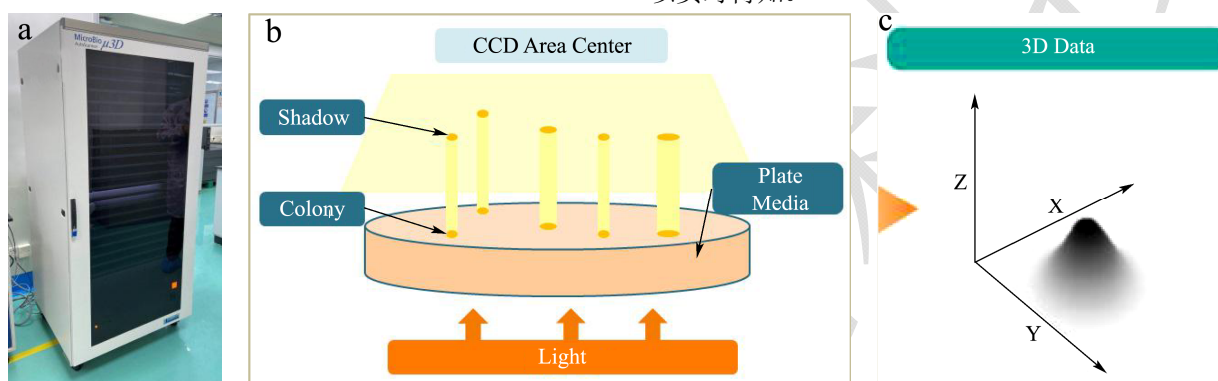


图 1 MicroBio 3D 仪器外观以及检测原理

Fig.1 Appearance and detection principle of MicroBio 3D

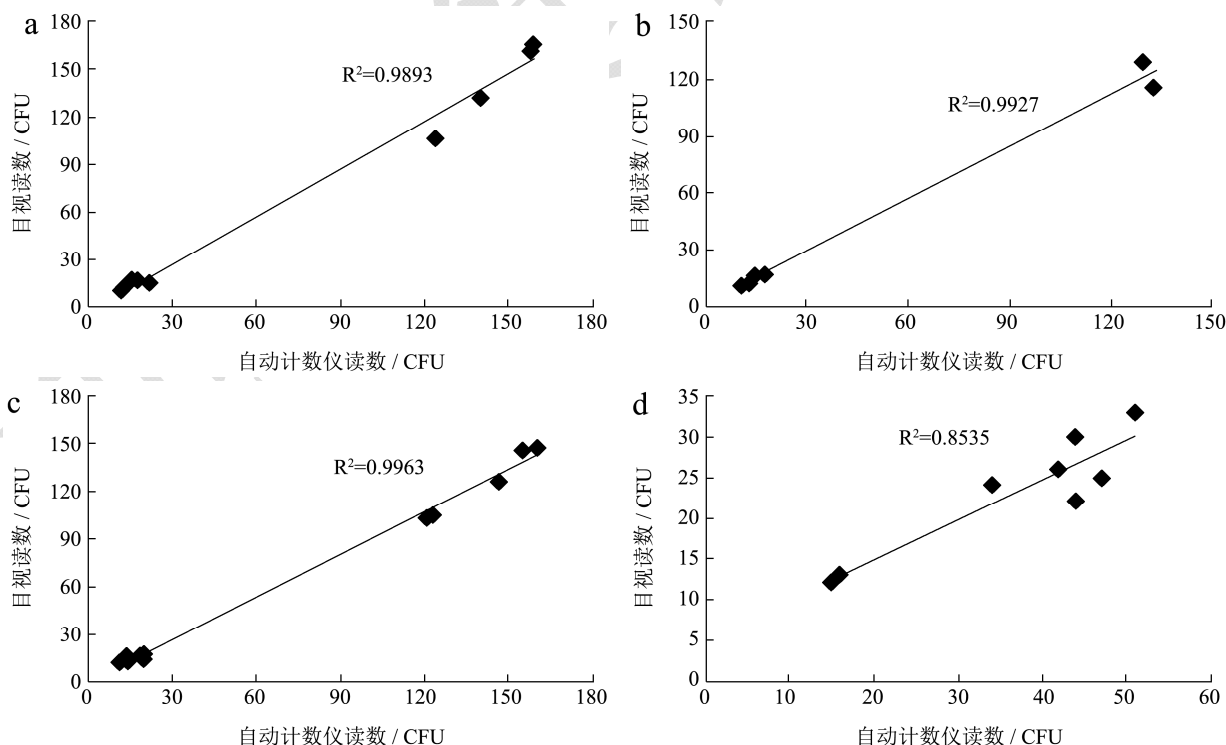


图 2 培养标准菌落时仪器读数和目视读数的相关性

Fig.2 Correlation of both methods for microbial colony detection

注：a：大肠杆菌 ATCC8739；b：金黄色葡萄球菌 ATCC6538；c：白色念珠球菌 ATCC10231；d：巴西曲霉 ATCC16404。

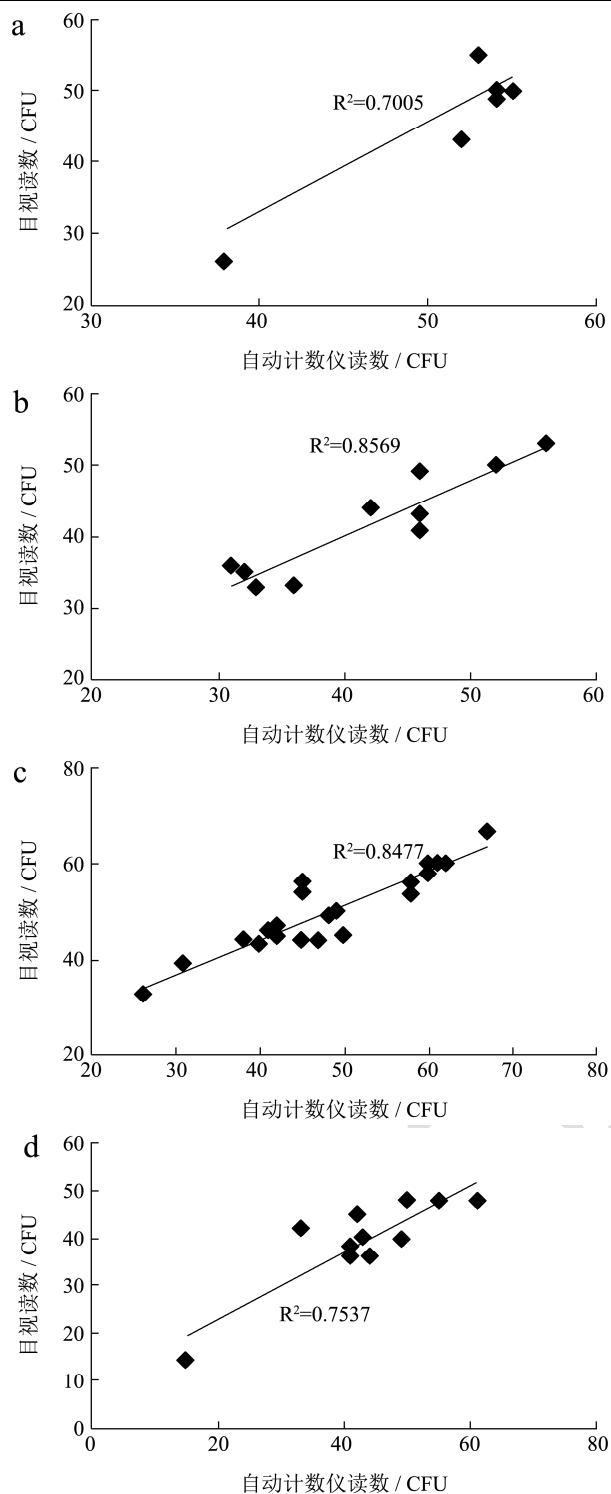


图3 加入杂质时仪器读数和目视读数的相关性

Fig.3 Correlation of both methods for microbial colony

detection supplementation with residue

注: a: 大肠杆菌+杂质; b: 金黄色葡萄球菌+杂质; c: 白色念珠球菌+杂质; d: 巴西曲霉+杂质。

2.1.2 仪器读数和目视读数的一致性

金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白假丝酵母菌和黑曲霉在 MLA 和 SDA 培养基中培养 96 h 后, 分别采用目视法和仪器法进行计数, 两种方法的相关性如图

2 所示。由图 2 可知, 对于金黄色葡萄球菌, 大肠杆菌和白假丝酵母菌, 机器读数与目视读数的相关性都在 95% 以上, 而对于巴西曲霉, 机器读数与目视读数的相关性为 85%, 表明两种方法在测试菌株上具有很高的等效性。

2.1.3 杂质对机器读数的影响

将添加有珍珠粉杂质的样品, 接种 4 种实验菌株, 然后测试杂质对供试菌株读数的影响, 结果如图 3 所示。由图 3 可知, 对于金黄色葡萄球菌, 大肠杆菌和白假丝酵母菌, 机器读数与目视读数的相关性都在 95% 以上, 表明杂质对机器读数的影响较小; 而对于巴西曲霉, 机器读数与目视读数的相关性是 75%, 说明杂质对霉菌的检测结果影响较大。这可能与霉菌的生长形态有关, 当霉菌生长成熟时在琼脂表面菌落会蔓延, 可能会遮挡其他菌落的形成, 加上杂质的影响, 图片采集时可能出现阻挡的情况而使机器的检出率降低。

2.1.4 Boxplot 分析

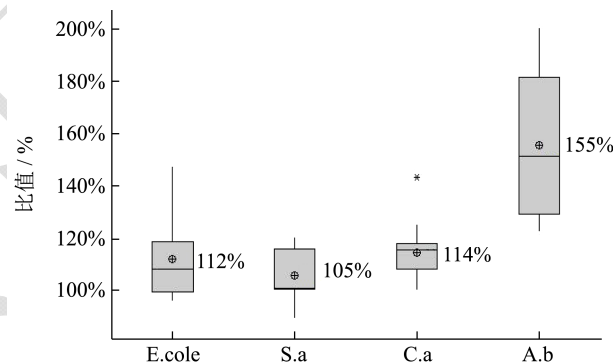


图4 标准菌仪器读数与目视读数的比值

Fig.4 Ratio of results obtained by both methods

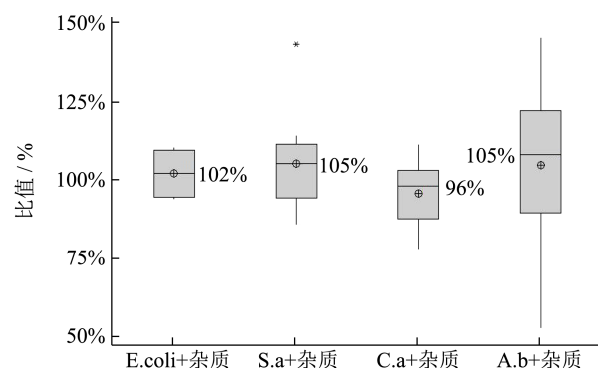


图5 加入杂质时仪器读数与目视读数的比值

Fig.5 Effects of residue on the ratio of results obtained by both methods

参考 AOAC 指引, 接种回收率比值的可接受范围是 50%~200%。比值%=机器读数值除以目视读数的数值。图 4 展示了 4 种实验菌株的回收率和离散性, 大肠杆菌, 金黄色葡萄球菌和白假丝酵母菌的回收率平

均值分别为 112%, 105% 和 114%, 具有良好的回收率, 而巴西曲霉的回收率平均值是 155%。巴西曲霉之所以被检测出超过 100% 的回收率, 一个原因可能是对于在霉菌孢子周围形成的新菌落, 机器比肉眼更敏感故能检测出来。另一个原因可能是对于邻近几个菌落形成的片状, 人眼的读数会报读成一个菌落, 而机器能检测出原始扩散点而读数更高。图 5 是当加入杂质时对机器读数的影响, 从图 5 中看到几个回收值均比单纯培养标准菌落时要下降, 这可能是当菌落较小时, 杂质会对微小的菌落形成阻挡而令镜头无法拍摄到。

2.1.5 图像

机器能实时显示出时间与菌落读数的趋势图, 从图中发现, 检测出的速度与回收率, 与菌种的类型与

菌落形态有很大关系。金黄色葡萄球菌和大肠杆菌, 能在 24 h 内完成检测。对于白假丝酵母菌, 使用 MLA 培养基培养的平板能在 24 h 到达范围, 而使用 SDA 平板的需要到 48 h 才能到达, 这与培养的温度有关, SDA 培养的温度较低, 故菌落生长相对慢。而巴西曲霉, 需要到 72 h 才能完成检测, 这也是由其生长特性决定的。

2.1.6 杂质的区分

通过比较图像的差异, 可以区分机器读数是真正的菌落还是由于杂质而误判。因为菌落在不同的时间点会变大而杂质则维持不变, 这在放大的 3D 图会更加明显。最终结果判读的时候, 可以结合目视的读数和机器的读数做判断。

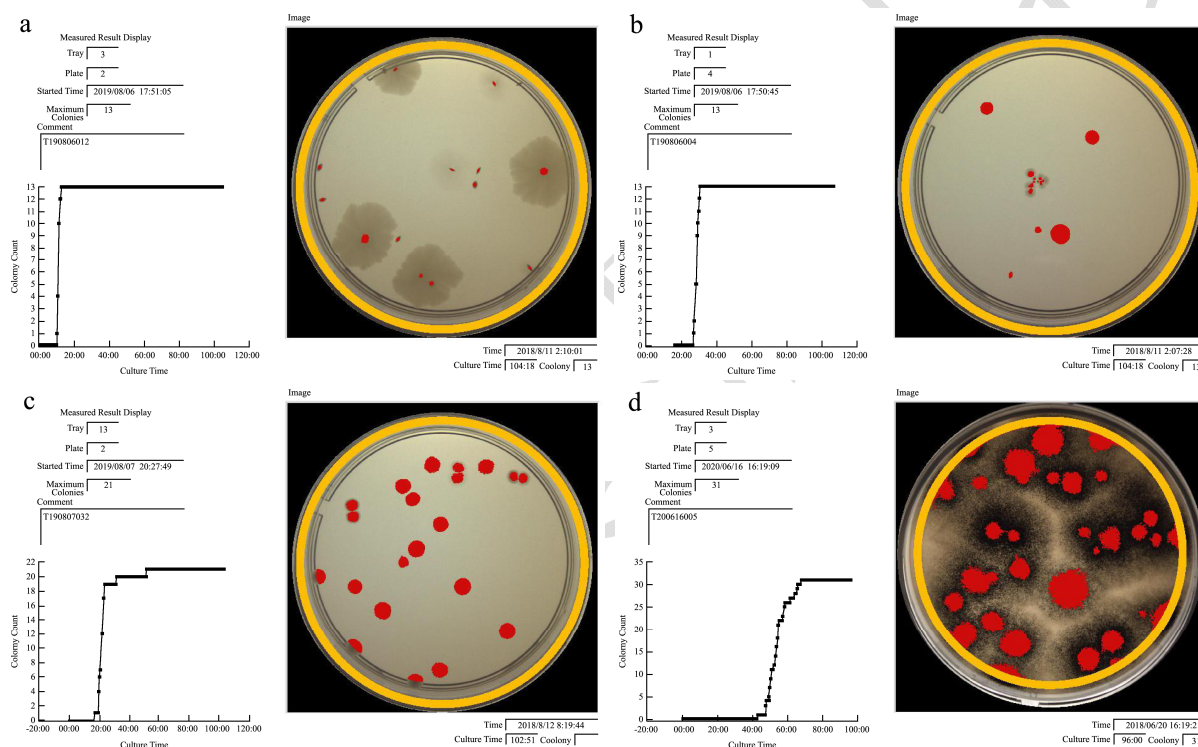


图 6 仪器的检测时间与读数

Fig.6 Detection time and results of MicroBio 3D

注: a: 大肠杆菌; b: 金黄色葡萄球菌; c: 白假丝酵母菌; d: 巴西曲霉。

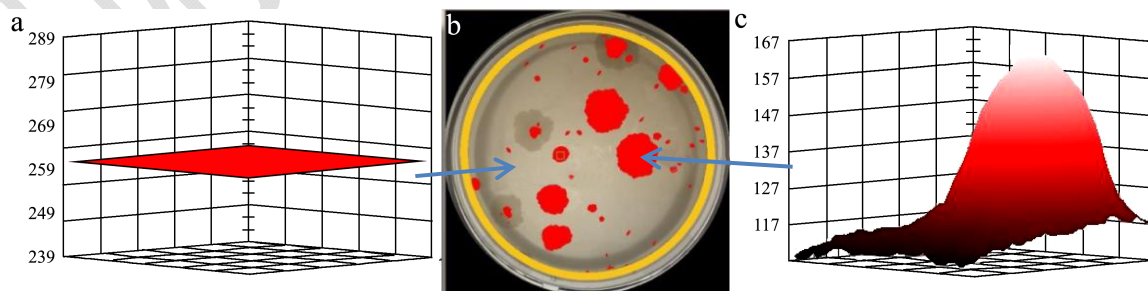


图 7 大肠杆菌菌落放大图

Fig.7 Enlarge image of *E. coli* colony detected by MicroBio 3D

如图 7b 所示, 结果页面会出现培养皿的照片, 菌落的位置会显示红色标记。当将鼠标指向培养皿内

区域, 能出现那个位置的放大三维显示图。如果是没有菌落生长的位置, 三维图像平面不会有变化, 显示

图会出现像图 7a 图像,当鼠标移到有菌落生长的地方,会显示出菌落生长的三维图,如图 7c 所示。利用这个功能也可以区分开特定区域的杂质和菌落。

2.1.7 MicroBio 3D 在固体粉末样品中的实际应用

表 1 是采用两种方法对某白色粉末样品进行微生物污染测试的结果。由表 1 可知,22 个样品,MLA 培养皿和 SDA 培养皿各 44 个,对比目视读数和仪器读数,共 88 个培养皿中 83 个培养皿的读数是一致的,比例为 94%。其余 5 个培养皿仪器读数多于目视读数。

表 1 仪器法与目视法在固体粉末样品中的实际应用

Table 1 The practical application of both methods for microbial colony detection in solid powder samples

样品	仪器读数结果						目视读数结果					
	MLA		SDA		MLA		MLA		SDA		MLA	
1	0	1	3	1	10 CFU/g	20 CFU/g	0	1	3	1	10 CFU/g	20 CFU/g
2	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g
3	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g
4	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g
5	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g
6	0	0	1	0	<10 CFU/g	10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g
7	0	0	0	1	<10 CFU/g	10 CFU/g	0	0	0	1	<10 CFU/g	10 CFU/g
8	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g
9	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g
10	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g
11	5	3	6	8	40 CFU/g	70 CFU/g	2	3	5	8	30 CFU/g	70 CFU/g
12	0	3	0	0	20 CFU/g	<10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g
13	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g
14	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g
15	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g
16	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g
17	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g
18	0	1	0	0	10 CFU/g	<10 CFU/g	0	1	0	0	10 CFU/g	<10 CFU/g
19	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g
20	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g
21	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g
22	1	0	0	0	10 CFU/g	<10 CFU/g	0	0	0	0	<10 CFU/g	<10 CFU/g

在 22 个样品目视观察中,样品 1、7、11、18 结果报告是有菌落生长的,这四个样品对应的仪器读数均对应有生长,其中,样品 11 的 MLA 平板目视读数为 30 CFU/g 而仪器读数为 40 CFU/g,仪器读数稍高于目视读数。

对于 18 个目视读数均无任何生长的样品中,样品 6,12 和 22 则仪器分别报告有 10~20 CFU/g 的生长。因此,仪器检测更为敏感,读数稍微多于目视读数。

2.2 讨论

除了读数高度一致性以外,当遇到有严重污染或者超标的情况,仪器能实时发出邮件警报,不需要等到培养结束的时候才发现,从而对超标结果起到预警

作用。为微生物实验室的自动化,实验室的数据完整性,提供了一个较好的选择^[20]。

在实验过程中发现,仪器具备参数设定功能,对于特定的微生物,则需要有对应的最敏感参数。对于菌落很小的目标菌种,可以调节较为敏感的参数,这样即使在肉眼未能很好判断的阶段,仪器已经能判别出菌落的生长从而起到很好的预警作用。而对于菌落形态较大,例如是生长在营养琼脂表面的芽孢菌落往往会长成片状,或者是像巴西曲霉那样的会在琼脂表面长出孢子的,如果参数调节得敏感,则会有较多的误判,仪器会将凹凸不平的单菌落误判为多菌落,一个成熟霉菌菌落生长出来的许多孢子,肉眼观察是一个菌落而机器会将所有孢子都判断成为菌落而造成误判。故此在日常使用过程中,可以优先考虑常见菌或

者是特定的致病菌,寻找对应合适的参数而使得仪器能在尽可能短的时间内检测出菌落。另外,当杂质和菌落在同一个垂直面上并且菌落非常小的时候,杂质有可能挡住菌落而无法读出^[21]。

从 2010 年起有不少学者对通过影像系统对培养皿读数进行研究^[16,20,22,23],市面上的仪器成品也各有千秋,其核心是影像系统的数据处理算法,不同的算法影响了仪器的判读能力、精度和产生误判机会的大小^[24]。有些仪器能通过菌落的外观例如大小,颜色,质感,边缘表现等,通过大数据分析形成菌落形态的数据库,当检测样品菌落数量的同时对菌落形态进行分析判定,从而对培养皿上的菌落作菌种鉴定。而到菌种鉴定的步骤,需要有足够大的数据库,并且同一种菌,生长在琼脂的不同位置,其形态和颜色也有所不同,其精确度比起单纯的菌落数量计算更为复杂,期望在不久的将来这项技术能有所突破。

3 结论

本文讨论的仪器能实现实时监测的情况下,对活菌的生长进行计算,在不改变检测方法的前提下,包括培养基的种类,培养的温度和方式都保持不变,用机器的判读代替传统的人工目视读数。在人工接种包括在高浓度和低浓度的标准菌时,仪器的检测读数和人工目视读数有较高的一致性;在有杂质的情况下,仪器判定的菌落更为准确;而当使用实际样品进行微生物污染检测时,仪器读数能等同或者稍高于人工读数,显示了其优越性。

参考文献

- [1] 王兴洁,刘爱平,敖晓琳,等.中国传统食醋微生物污染及控制措施研究进展[J].食品与发酵工业,2019,45(10):260-265
WANG Xing-jie, LIU Ai-ping, AO Xiao-lin, et al. Microbial contamination and control measures during traditional Chinese vinegar fermentation [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(10): 260-265
- [2] 陈艳菲.食品微生物检测内容与技术概述[J].食品安全导刊, 2018,27:105
CHEN Yan-fei. Overview of food microbiological testing content and technology [J]. Food Safety Guide, 2018, 27: 105
- [3] 刘回春.监管部门加大食品抽检力度食品添加剂微生物污染农药残留三大问题突出[J].中国质量万里行,2020,1: 38-40
LIU Hui-chun. Supervision departments step up food sampling inspections [J]. China Quality Miles, 2020, 1: 38-40
- [4] Stobnicka-Kupiec A, Gołofit-Szymczak M, Górny R. Microbial contamination level and microbial diversity of occupational environment in commercial and traditional dairy plants [J]. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 2019, 26: 555-565
- [5] Giacobbe D R, Giani T, Bassetti M, et al. Rapid microbiological tests for bloodstream infections due to multidrug resistant Gram-negative bacteria: therapeutic implications [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2020, 26: 713-722
- [6] Bonadonna L, Briancesco R, Rosa G L. Innovative analytical methods for monitoring microbiological and virological water quality [J]. Microchemical Journal, 2019, 150: 104160
- [7] Shi J, Zhang F, Wu S, et al. Noise-free microbial colony counting method based on hyperspectral features of agar plates [J]. Food Chemistry, 2019, 274: 925-932
- [8] Eady M, Setia G, Park B. Detection of Salmonella from chicken rinsate with visible/near-infrared hyperspectral microscope imaging compared against RT-PCR [J]. Talanta, 2019, 195: 313-319
- [9] 庞磊,胡颖.免疫检测技术在食品检测中的应用[J].粮食科技与经济,2019,44(7):67-69,72
PANG Lei, HU Ying. Application of immune detection technology in food detection [J]. Grain Science and Technology and Economy, 2019, 44(7): 67-69, 72
- [10] 王香君,李梦茹,段杉.实时荧光定量 PCR 法定量微生物的条件及在鱼露和虾油微生物检测中的应用研究[J].食品与发酵工业,2018,44(2):194-201
WANG Xiang-jun, LI Meng-ru, DUAN Shan. Determination of the conditions for the counting of microbes by real-time fluorescent quantitative PCR and research on the detection of microbial populations in fish sauce and shrimp sauce [J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(2): 194-201
- [11] 白菊红,康建平,张星灿,等.多重 PCR 技术在病原微生物检测中的应用[J].食品工业科技,2019,40(7):322-325,331
BAI Ju-hong, KANG Jian-ping, ZHANG Xing-can, et al. Application of multiplex PCR technology on detection of pathogenic microorganism [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(7): 322-325, 331
- [12] 阮征,魏力,张延杰,等.高通量测序结合传统培养分析常温油沙冰皮月饼的菌群多样性[J].食品与发酵工业,2019, 45(6): 203-208
RUAN Zheng, WEI Li, ZHANG Yan-jie, et al. Analysis of microbial flora diversity of oil bean paste stuffing snow moon cake at room temperature by high-throughput sequencing combined with traditional culture isolation [J]. Food and

- Fermentation Industries, 2019, 45(6): 203-208
- [13] 张爱萍,唐佳妮,刘东红.阻抗法检测食品中微生物的研究进展[J].食品工业科技,2011,32(2):436-439
- ZHANG Ai-ping, TANG Jia-ni, LIU Dong-hong. Research progress in the impedance method in the detection of microorganisms in food [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(2): 436-439
- [14] 池福敏,罗章,辜雪冬,等.3M 测试片法在西藏牦牛乳制品微生物检测中的应用[J].食品工业,2015,36(12):201-203
- CHI Fu-min, LUO Zhang, GU Xue-dong, et al. The applications of 3M pereifilm count plate method in microbial detection of Tibet yak dairy products [J]. The Food Industry, 2015, 36(12): 201-203
- [15] González S C, Possas A, Carrasco E, et al. 'MicroHibro': a software tool for predictive microbiology and microbial risk assessment in foods [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 290: 226-236
- [16] Zhu G, Yan B, Xing M, et al. Automated counting of bacterial colonies on agar plates based on images captured at near-infrared light [J]. Journal of Microbiological Methods, 2018, 153: 66-73
- [17] Ogawa H, Nasu S, Takeshige M, et al. Noise-free accurate count of microbial colonies by time-lapse shadow image analysis [J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 91(3): 420-428
- [18] Ferrari A, Lombardi S, Signoroni A. Bacterial colony counting with convolutional neural networks in digital microbiology imaging [J]. Pattern Recognition, 2017, 61: 629-640
- [19] Saviano A M, Lourenço F R. Using image analysis to determine gentamicin potency by agar diffusion microbiological assay and its measurement uncertainty [J]. Measurement, 2019, 146: 315-321
- [20] Ernstsen C L, Login F H, Jensen H H, et al. Data for automated, high-throughput microscopy analysis of intracellular bacterial colonies using spot detection [J]. Data in Brief, 2017, 14: 643-647
- [21] Stolze N, Bader C, Henning C, et al. Automated image analysis with ImageJ of yeast colony forming units from cannabis flowers [J]. Journal of Microbiological Methods, 2019, 164: 105681
- [22] Chiang P J, Tseng M J, He Z S, et al. Automated counting of bacterial colonies by image analysis [J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 108: 74-82
- [23] Guillier L, Pardon P, Augustin J C. Automated image analysis of bacterial colony growth as a tool to study individual lag time distributions of immobilized cells [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 65(2): 324-334
- [24] Foddai A C G, Grant I R. Methods for detection of viable food borne pathogens: current state-of-art and future prospects [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104: 4281-4288

(上接第 318 页)

- [28] US EPA. Tolerance reassessment advisory committee. Regulating risk from undetected residues in food [R]. Washington DC, USA: Office of Pesticide Programs, Environmental Protection Agency, 1998
- [29] GEMS/Food-WHO. Reliable evaluation of low-level contaminant of food, workshop in the frame of GEMS/Food-EURO [R]. Kulmbach: WHO, 1995
- [30] GB/T 27404-2008, 实验室质量控制规范食品理化检测[S]
- GB/T 27404-2008, Laboratory Quality Control Standard for Physical and Chemical Inspection of Food [S]
- [31] 陈俊玉,何建顺,余晓薇,等.出口水产品中氯霉素残留状况及其风险评价[J].食品研究与开发,2016,37(13):181-183
- CHEN Jun-yu, HE Jian-shun, YU Xiao-wei, et al. Situation and risk of chloramphenicol residues in export aquatic products [J]. Food Research and Development, 2016, 37(13): 181-183
- [32] Nugraha A, Khotimah K, Rietjens I M C M. Risk assessment of aflatoxin B1 exposure from maize and peanut consumption in Indonesia using the margin of exposure and liver cancer risk estimation approaches [J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 113: 134-144
- [33] Van den Berg S J P L, Alhusainy W, Restani P, et al. Chemical analysis of estragole in fennel based teas and associated safety assessment using the Margin of Exposure (MOE) approach [J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 65: 147-154