

凝胶型菌落总数测试片的研制

王杰伟, 吴艳辉, 孙万东, 何艳玲

(北京陆桥技术股份有限公司, 中国检验检疫科学研究院, 北京 100123)

摘要: 本文以脑心浸液(BHI)肉汤为营养成分,以黄原胶与卡拉胶两种冷水可溶凝胶作为复合凝胶,研制出可应用于食品微生物菌落总数检测的凝胶型测试片。通过正交试验确定测试片培养基附加组分最优添加组合,并试验了两种凝胶不同复配比例对理化及微生物结果的影响,最终确定测试片培养基组分为BHI 38.5 g/L, TTC 0.008 g/L, SAP 0.05 g/L, 丙酮酸钠 2.0 g/L,且黄原胶与卡拉胶比例为8:2时,测试片达到最优性能。本文研制的菌落总数测试片,与国标平板计数方法相比,两种方法线性相关性达到0.99以上,测试片检出限可达2 CFU/mL,灵敏度达到100%;与行业主流产品3M Petrifilm菌落总数测试片相比,定量结果无明显差异, R^2 达到0.99。本文所研制的凝胶型菌落总数测试片可应用于食品中菌落总数的检测。

关键词: 菌落总数; 测试片; 冷水可溶凝胶; 平板计数

文章编号: 1673-9078(2021)05-325-331

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.5.0949

Preparation of Gel Bacterial Testing Plate

WANG Jie-wei, WU Yan-hui, SUN Wan-dong, HE Yan-ling

(Beijing Landbridge Technology Co. Ltd., Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

Abstract: Brain heart infusion (BHI) broth as nutrient components and two cold water soluble gel, xanthan gum and carrageenan as complex gel were used to develop a gel bacterial testing plate for the detection of aerobic bacterial count in food. The optimal combination of the key additional components was determined by orthogonal test, and the effects of the ratio of the two gels on physical and chemical and microbiological results were examined. The optimal results were obtained when the components of medium were BHI 38.5 g/L, TTC 0.008 g/L, SAP 0.05 g/L, sodium pyruvate 1.5 g/L, and the proportion of complex gel was xanthan gum: carrageenan=8:2. Compared with national standard method, the gel testing plate method of this study had a good correlation ($R^2>0.99$), achieving the same limit (2 CFU/mL) detection and sensitivity (100%); Compared with 3M Petrifilm, the quantitative results showed no significant difference, the two methods linear relationship was good ($R^2=0.99$). The detection limit, sensitivity, and accuracy of the colony count testing plate in this study were no significant differences in comparison with the national method, it can be applied to the detection of colony count in food.

Key words: aerobic bacterial count; test plate; cold water soluble gel; plate count method

引文格式:

王杰伟,吴艳辉,孙万东,等.凝胶型菌落总数测试片的研制[J].现代食品科技,2021,37(5):325-331

WANG Jie-wei, WU Yan-hui, SUN Wan-dong, et al. Preparation of gel bacterial testing plate [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(5): 325-331

近些年,随着国家对食品质量管控的日趋严格,在食品检测行业,作为必检项目食品中菌落总数指标^[1]检测量激增,菌落总数是衡量食品卫生质量的重要指标之一,为食品样品的卫生学评价提供科学依据。依据GB 4789.2-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定》标准,食品微生物菌群数量的

收稿日期: 2020-10-16

基金项目: 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费专项资金资助项目
(2018JK044)

作者简介: 王杰伟(1986-),男,工程师,研究方向: 食品微生物检测

通讯作者: 何艳玲(1976-),女,高级工程师,研究方向: 微生物检测技术

检测方法为平板培养法^[2],整体检测流程费时费力,微生物菌落计数测试片检测法是一种新型检测方法,它是以凝胶、无纺布和滤纸3种主流载体替代琼脂作为培养基载体培养微生物的一种检测新技术。测试片作为在传统琼脂平板计数法基础上经过简化和改进,形成的一种新型检测方法,是微生物快速检测方法发展的趋势,测试方法的接受度逐年上升^[3]。

国内对于菌落总数测试片的研究以无纺布体系为主,随着研究的不断深入,无纺布体系菌落色素扩散、菌落显色不清晰或连成片^[4],有的需要借助压板固定菌落生长区等缺点,以及与传统方法相比计数结果偏低^[5]的问题逐渐显露,因此,无纺布应用于菌落

总数测试片还需进一步改善,目前并尚无理想改进方案。

本研究针对无纺布载体测试片的弊端,进行冷水可溶凝胶测试片的研制。冷水可溶凝胶作为一种亲水胶体,在适当的配比下可提供较好的固化粘合作用^[6],可起到替代琼脂粉的效果,因此相比无纺布体系菌落测试片,凝胶体系菌落测试片可为微生物提供与 GB 4789.2-2016 倾注培养法更为接近的生长环境,从而得到更为准确的检测结果。本文以 GB 4789.2-2016 平板计数培养基为基础,使冷水可溶凝胶替代琼脂粉,进行凝胶体系菌落总数测试片的研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

1.1.1 主要试剂

脑心浸液肉汤(BHI)、平板计数琼脂由北京陆桥技术股份有限公司提供;3M Petrifilm 菌落总数测试片购自 3M 中国有限公司;2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)购自 SIGMA 公司;瓜尔胶、聚丙烯酸钠、黄原胶、卡拉胶、高吸水树脂(SAP)、丙酮酸钠购自阿拉丁试剂有限公司;聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)膜、聚乙烯膜、聚丙烯膜购自上海晶华胶粘新材料股份有限公司;纸基胶板购自上海金标生物科技有限公司。

1.1.2 菌株

大肠埃希氏菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、铜绿假单胞菌 ATCC10104、阪崎克罗诺杆菌 ATCC29544、单增李斯特氏菌 ATCC19111 购自美国菌种保藏中心;枯草芽孢杆菌 CMCC63501 购自中国工业微生物菌种保藏中心。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液的制备

分别挑取上述试验菌株的单菌落接种于脑心浸液肉汤中,于 36℃ 培养 24 h。取 1 mL 菌液加入 9 mL 无菌生理盐水中混合均匀,即为 10^{-1} 稀释液,重复上述操作将菌液稀释至适宜稀释度,得到菌落总数处于 10^2 CFU/mL 的各标准菌株菌悬液;将大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌与枯草芽孢杆菌四种标准菌株菌悬液各取 2 mL 混合,得到混合菌液。

1.2.2 测试片的制备

测试片上层覆膜为 PET 塑料膜,底板为 200 g 防水型背胶相纸,将培养基各组分混合均匀后添加于测试片底板培养区域。

1.2.3 菌落总数测试片覆膜的确定

分别选用厚度为 0.2 mm 的聚乙烯膜、聚丙烯膜、PET 膜作为覆膜,使用 200 g/m² 纸基胶板作为下基材。按照 38.5 g/L BHI (本研究后续试验中 BHI 添加量均为 38.5 g/L),卡拉胶 15 g/L 的添加量混合均匀,涂布于基材上制成菌落总数测试片,接种铜绿假单胞菌菌液,于 36℃ 培养 24 h 观察菌落状态。

1.2.4 菌落总数测试片培养基组分的确定

1.2.4.1 冷水可溶凝胶的筛选

冷水可溶凝胶的筛选参照 Ren^[7]等的信息,选择瓜尔胶、聚丙烯酸钠、黄原胶、卡拉胶进行试验。将各冷水可溶凝胶均按照 15 g/L 的添加量,分别与 BHI 培养基进行混合,均匀添加至测试片培养区域,接种枯草芽孢杆菌菌液,于 36℃ 培养 24 h。综合测试片理化与微生物生长状态筛选冷水可溶凝胶。

1.2.4.2 单因素-正交实验确定培养基组分

(1) TTC 添加量水平的确定^[8,9]

分别将 0.006、0.007、0.008、0.009 与 0.01 g/L TTC 与 BHI 培养基,15 g/L 复合凝胶(黄原胶:卡拉胶=1:1,下同),0.05 g/L SAP 以及 1.5 g/L 丙酮酸钠混合后均匀添加至测试片培养区域,接种 1 mL 混合菌液于 37℃ 培养 24 h 统计菌落数量。

(2) SAP 添加量水平的确定

分别将 0.03、0.04、0.05、0.06 和 0.07 g/L SAP 与 BHI 培养基、复合凝胶、0.008 g/L TTC 以及 1.5 g/L 丙酮酸钠混合后均匀添加至测试片培养区域,接种 1 mL 混合菌液,于 37℃ 培养 24 h 后统计菌落数量。

(3) 丙酮酸钠添加量水平的确定

分别将 0.5、1.0、1.5、2.0 与 2.5 g/L 丙酮酸钠与 BHI 培养基,复合凝胶,0.008 g/L TTC 以及 0.05 g/L SAP 混合后均匀添加至测试片培养区域,接种 1 mL 混合菌液,于 37℃ 培养 24 h 后统计菌落数量。

(4) 培养基组分最优组合的确定

在上述试验结果的基础上,根据所确定的 TTC 添加量范围(0.007 L、0.008、0.009 g/L)、SAP 添加量范围(0.04、0.05、0.06 g/L)以及丙酮酸钠添加量范围(1.0、1.5、2.0 g/L),进行三因素三水平正交试验,以确定三种关键组分在培养基中的最优组合。

1.2.5 冷水可溶性凝胶比例的确定

按照 15 g/L 的总凝胶添加量,黄原胶与卡拉胶复配比例分别为 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5,与优化后的培养基混合后均匀添加至测试片培养区域,接种 1 mL 混合菌液,于 37℃ 培养 24 h 后观察测试片理化状态并统计菌落数量。

1.2.6 菌落总数测试片的性能评价

本文所研制的菌落总数测试片的性能,通过灵敏度、准确度两项指标,与 GB 4789.2-2016 平板计数法以及当前市场占有率最高的 3M Petrifilm 测试片进行对比验证并评估。

1.2.6.1 灵敏度

将制备好的混合菌液,以生理盐水进行梯度稀释至 10^{-2} ~ 10^{-7} ,分别使用测试片方法、GB 4789.2-2016 平板计数法以及 3M Petrifilm 测试片进行菌落计数,试验设置三个平行,以最低稀释度的检测结果作为最低检测限,以最低检测限作为测试片灵敏度的检测标准。检测结果大于最低检测限的为阳性,检测结果小于最低检测限的为阴性,灵敏度=阳性/(阳性+阴性)^[10]。

1.2.6.2 准确度检测

将 6 种标准菌悬液,以无菌生理盐水稀释至 10^2 CFU/mL,同时选取散装熟食、散装糕点、生鸡肉、奶粉等菌落总数相对较高的市售食品样品,分别进行 10^{-2} ~ 10^{-5} 稀释,各标准菌株以及实际样品稀释液均分别使用测试片方法、GB 4789.2-2016 平板计数法以及 3M Petrifilm 测试片进行菌落计数,其中实际样品检测统计菌落数处于 10^2 CFU/mL 稀释度的结果。建立标准菌株测试片法-国标法以及测试片法 3M Petrifilm 法检测结果的标准曲线。

1.2.7 数据处理

本试验数据使用 SPSS 17.0 软件进行处理,灵敏度检测数据采用 *t* 检验,以 $p<0.05$ 为差异有统计学意义;准确度检测采用线性回归分析以检验不同方法检测结果的一致性。各组试验均重复三次,检测结果使用平均值±标准偏差表示。

2 结果与讨论

2.1 覆膜的确定

测试片的覆膜除作为结果观察与计数的窗口外,对于保证测试片培养区域的氧气供应起着决定作用。本研究选用好氧程度较高的铜绿假单胞菌进行试验,结果表明,以聚乙烯和聚丙烯材质作为覆膜的测

试片中铜绿假单胞菌生长状态差显色均过浅,无法准确计数,而以 PET 材质作为覆膜的测试片中菌落生长良好显色清晰,说明 PET 材质微观结构有一定程度上利于氧气自由扩散^[11],对好氧菌的促生长效果更理想,更为适宜作为测试片的覆膜材质,各种材质覆膜制备的测试片效果见图 1。

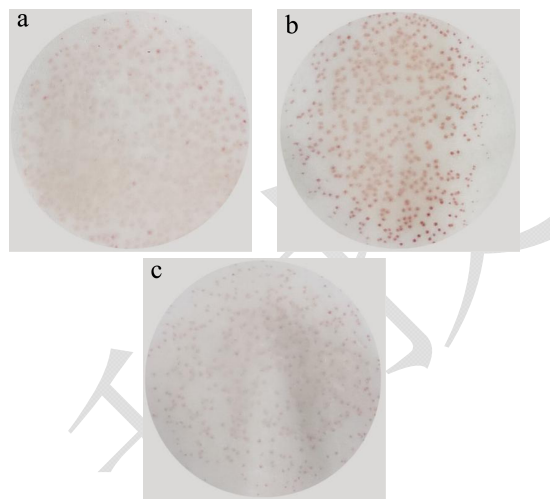


图 1 不同上基材制备测试片的菌落形态

Fig.1 Colony morphology of testing plates prepared by 3 different upper substrates

注: a: 聚乙烯膜; b: PET 膜; c: 聚丙烯膜。

2.2 冷水可溶凝胶的筛选

菌落测试片中冷水可溶凝胶的性能要求包括:结构稳定,不可被液化能力较强的芽孢杆菌所分解液化;复水后阻隔性强,可阻断色素在培养体系中的过度扩散,从而使色素聚集于菌落周边,避免产生色素晕圈,便于计数;水扩散性能理想,样品稀释液加入培养区域后可自由扩散至整个培养区域且时间尽量短,方便实验操作并节省试验时间。本试验中选用凝胶液化能力强,菌落色素扩散较严重的枯草芽孢杆菌检测各种冷水可溶凝胶的稳定性,同时观察菌落晕圈情况及稀释液自由扩散至整个培养区域的时间。各冷水可溶凝胶培养后的菌落形态与性能比对情况见表 1 与图 2。

表 1 各冷水可溶性凝胶性能比对

Table 1 Comparison of cold water soluble gel

	卡拉胶	聚丙烯酸钠	黄原胶	瓜尔胶
扩散速度/s	2.26±0.18	8.58±0.60	12.80±0.96	9.15±0.87
菌落数量/CFU	109±6.12	无法计数	98±5.56	77±7.73
液化比例/%	9.50±0.62	92.43±5.83	0	44.45±3.20
色素晕圈直径/mm	2.89±0.16	严重蔓延	0	4.15±0.26

本试验表明,四种冷水可溶凝胶制作的测试片中,菌落数量及大小差异不大;聚丙烯酸钠与瓜尔胶

稳定性较差^[12],对应的测试片均被严重液化,不适用于作为测试片中的凝胶组分;卡拉胶有轻微程度的液

化以及因菌落色素扩散产生的晕圈, 稀释液在测试片表面扩散速度最快; 黄原胶扩散速度慢^[13], 但具有优越的稳定性以及色素阻隔性能。

本试验所选用的四种冷水可溶凝胶中的任何一种均无法满足菌落总数测试片对于凝胶的要求, 综合考虑上述试验中各凝胶的技术指标, 水扩散性能优势且结构稳定性尚可的卡拉胶, 恰好与结构稳定但水扩散性能略有欠缺的黄原胶形成互补, 因此本试验选用以黄原胶为主体, 同时添加少量比例的卡拉胶作为复合凝胶进行后续试验研究。

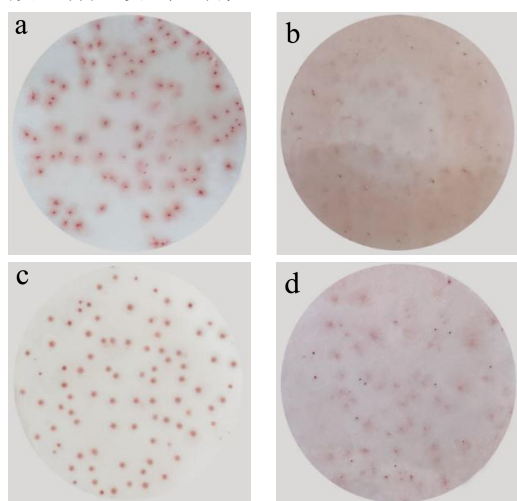


图2 不同冷水可溶凝胶制备测试片的菌落形态

Fig.2 Colony morphology of testing plates prepared by different gel

注: a: 卡拉胶; b: 聚丙烯酸钠; c: 黄原胶; d: 瓜尔胶。

2.3 培养基组分单因素实验

TTC 作为测试片中菌落生长指示剂, 相对于其他指标剂灵敏准确, 且常温下它与菌落形成的颜色在空气中稳定, 可长时间保存, 但浓度过高时对于微生物, 尤其是革兰氏阳性细菌造成较强的抑制, 需根据测试片菌落颜色清晰且计数准确的实际需求对 TTC 的使用浓度进行优化^[14]。TTC 添加量为 0.006 g/L 时, 菌落显色略浅尚无法清晰计数, TTC 添加量为 0.008 g/L 时菌落显色明显 (见图 3) 且未表现出明显的抑制性, 当 TTC 添加量达到 0.01 g/L 时菌落数量明显减少, 因此确定 TTC 最佳添加量为 0.008 g/L。

SAP 亲水性强, 将其添加于培养基组分中作为分散剂, 可显著提升测试片的水扩散速度, 但其含量过高时也会对微生物生长形成负作用。不同 SAP 添加量的测试片菌落数量见图 4, SAP 添加量越高测试片水扩散速度越快, 添加量达到 0.07 g/L 时对微生物表现出一定的抑制性, SAP 的最佳添加量为 0.05 g/L,

此时测试片水扩散速度为 3~5 s。

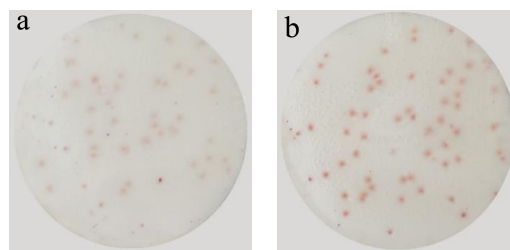


图3 不同 TTC 添加量对菌落显色状态的影响

Fig.3 Effect of different TTC concentration on colony chromogenic reaction

注: a: 0.006 g/L TTC 添加量菌落显色状态; b: 0.008 g/L TTC 添加量菌落显色状态。

微生物在正常生长过程中因需氧代谢会生成过氧化氢等有毒代谢产物^[15], 丙酮酸钠在酸性条件下分解产生丙酮酸, 丙酮酸一方面可进行三羧酸循环产生能量, 供微生物合成代谢酶分解过氧化氢, 同时还可直接还原过氧化氢解除其毒害作用。因此丙酮酸钠对于促进微生物生长, 修复损伤菌有着重要作用。由图 4 可知当丙酮酸钠添加量达到 1.5 g/L 后, 菌落数量趋于平稳, 因此确定丙酮酸钠的添加量为 1.5 g/L。

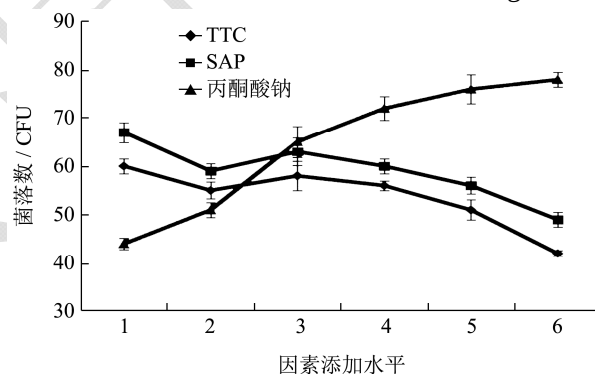


图4 培养基组分单因素试验结果

Fig.4 Single factor test results of medium components

注: TTC 1~6 添加水平分别为 0、0.006、0.007、0.008、0.009 与 0.01 g/L; SAP 1~6 添加水平分别为 0、0.03、0.04、0.05、0.06 与 0.07 g/L; 丙酮酸钠 1~6 添加水平分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 与 2.5 g/L。

2.4 培养基组分最优组合的确定

根据 1.2.4.2 中确定的三种关键组分添加量范围, 进行三因素三水平正交试验, 结果见表 2, 影响培养基效果关键组分主次顺序为 A(丙酮酸钠)>B(TTC)>(SAP), 最佳水平组合为 C₃A₂B₂, 即三种组分的最优组合方式为 TTC 0.008 g/L, SAP 0.05 g/L, 丙酮酸钠 2.0 g/L。按照最优组合再次进行验证, 菌落总数为 213 CFU/mL, 与表 2 中试验 5 结果相符。

表 2 培养基关键组分正交试验结果

Table 2 Orthogonal test results of the key components

试验编号	因素			菌落总数/(CFU/mL)
	A: TTC/(g/L)	B: SAP/(g/L)	C: 丙酮酸钠/(g/L)	
1	0.007	0.04	1.0	136
2	0.007	0.05	1.5	177
3	0.007	0.06	2.0	193
4	0.008	0.04	1.5	180
5	0.008	0.05	2.0	210
6	0.008	0.06	1.0	121
7	0.009	0.04	2.0	169
8	0.009	0.05	1.0	128
9	0.009	0.06	1.5	156
K1	506	485	385	
K2	511	515	513	
K3	453	470	572	
$\overline{K1}$	168.7	161.7	128.3	
$\overline{K2}$	170.3	171.7	171	
$\overline{K3}$	151	156.7	194	
R	19.3	15	65.7	
最优组合	C ₃ A ₂ B ₂			

表 3 不同冷水可溶凝胶复配比例测试片效果

Table 3 Effect of different cold water soluble gel ratio testing plate

项目	黄原胶: 卡拉胶				
	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5
水扩散速度/s	6.42±0.44	3.39±0.24	3.22±0.20	3.08±0.30	2.29±0.21
液化比例/%	0	0	4.63±0.29	13.38±1.33	26.91±2.16
晕圈直径/mm	0	0	0.56±0.04	1.39±0.10	1.86±0.14
菌落数量/CFU	110±8.43	108±5.66	103±4.89	113±3.96	100±5.07

表 4 菌落总数测试片灵敏度检测

Table 4 Sensitivity detection of testing plate

稀释度	菌落数/(CFU/mL)						灵敏度 /%
	空白	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
测试片法	0	多不可计	多不可计	242±3.79	41±2.31	2±0.58	100
国标法	0	多不可计	多不可计	262±3.61	43±2.52	2±1.73	100
3M 测试片	0	多不可计	多不可计	238±4.23	44±2.11	2±1.08	100

2.5 冷水可溶凝胶比例的确定

不同黄原胶与卡拉胶比例下测试片水扩散速度、培养基液化情况、菌落色素扩散情况与菌落数量见表 3，黄原胶与卡拉胶比例为 9:1 与 8:2 时，测试片培养基无液化以及菌落色素扩散，但相比于 9:1 时水扩散速度 6~7 s，8:2 水扩散速度可达到 3~4 s，此优势相当于在实际检测过程中缩短了整体检测周期，尤其在样品量大时此优势更为明显；黄原胶与卡拉胶比例为

7:3 时，随着卡拉胶比例的增加，测试片出现了 5%左右的液化，虽然此时水扩散速度也有了小幅度增加，但仅为改善 0.2~0.3 s 水扩散性能而牺牲掉 5%液化并非理想的选择；黄原胶与卡拉胶比例为 6:4 以及 5:5 时测试片液化比例已经较高，因此将黄原胶:卡拉胶为 8:2 作为冷水可溶凝胶复配比例。

2.6 性能评价

2.6.1 灵敏度检测

灵敏度试验结果见表4, 本文所研制的菌落总数测试片、国标方法以及3M Petrifilm测试片的检测限均为2 CFU/mL。本文所研制的菌落总数测试片与国标方法对菌落数量为30~300之间的可计数样本进行计数与分析, $t=2$, $p=0.18>0.05$, 说明菌落总数测试片与国标方法检测结果无差异显著性。

2.6.2 准确度检测

使用菌落总数测试片与GB 4789.2-2016 倾注法对各标准菌株进行菌落总数检测, 两种检测方法的线性相关曲线见图5, 由本试验结果可知, 菌落总数测试片与国标方法检测结果具有良好的线性关系, R^2 达到0.994, 表明两种检测方法对于包括标准菌株与实际样品在内所有样本的计数结果无差异显著性。

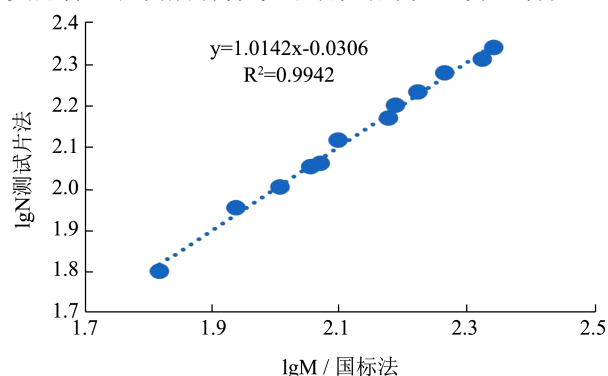


图5 测试片法与国标法检测结果相关曲线

Fig.5 Linear correlation curve of test results between

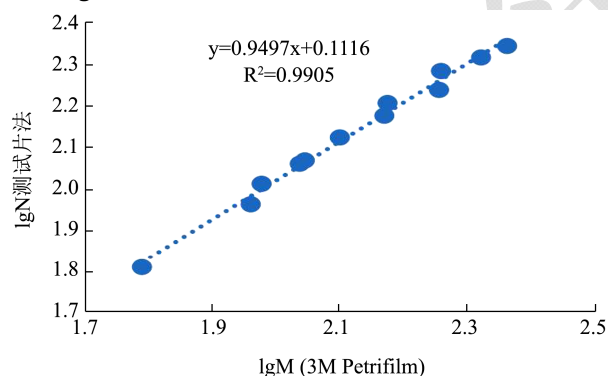


图6 测试片法与3M检测结果相关曲线

Fig.6 Linear correlation curve of test results between testing plate and national standard method testing plate method and 3M Petrifilm method

测试片法-3M Petrifilm法的线性相关曲线见图6, 对于标准菌株以及实际样品, 菌落总数测试片与当前市场占有率最高的测试片产品-3M Petrifilm 检测结果的线性关系达到0.99, 说明本文所研制的菌落总数测试片可应用于食品微生物检测。

3 结论

本文以四种食品检测中常见的条件致病菌为试

验菌株, 通过筛选基材, 优化培养基干粉组分, 研制菌落总数测试片; 在优化培养基干粉组分这一核心环节上, 首先通过理化性状及菌落生长状态筛选出黄原胶与卡拉胶作为测试片冷水可溶性凝胶; 再通过单因素-正交实验确定培养基中关键组分TTC、SAP与丙酮酸钠的添加量分别为0.008 g/L、0.05 g/L与2.0 g/L; 最后确定复合凝胶内黄原胶与卡拉胶的比例为8:2 (m/m)。菌落总数测试片与国标中平板计数法以及3M Petrifilm测试片进行比对, 标准菌株与实际样品检测线性相关性均良好, R^2 均达到0.99以上, 测试片检出限可达2 CFU/mL, 灵敏度达到100%, 说明本文研制的菌落总数测试片可应用于食品微生物检测领域, 同时对于不同基质的样品均有较理想的适用性。在食品检测行业精准高效的发展趋势下, 相比于国标方法, 测试片方法具有明显的优势, 在检测流程上省去了培养基制备、高压、冷却、倒平板等工序, 极大简化了检验流程; 在微生物定量结果准确性保证上, 测试片法避免了国标倾注法在倾倒培养基时对细菌的热损伤, 同时适量TTC的加入使得培养后菌落更易识别, 不存在国标平板计数法在读取结果时生长于培养基内部的细菌形态过小不易识别的问题; 另外测试片体积小, 便于培养、保存与运输。在检测成本方面, 虽然测试片在直接材料成本上高于国标方法, 但如考虑到测试片法无繁琐的平板制备工序, 节省人工缩短、总体检测周期短从而隐形成本更低, 测试片法在总成本上与国标法差距并不明显, 而且在检测量越大时优势越明显。因此本文所研制的测试片方法在检测行业具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Silva N D. Microbiological Examination Methods of Food and Water: a Laboratory Manual [M]. CRC Press, 2013: 57-65
- [2] GB 4789.2-2016, 食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数[S]
- [3] GB 4789.2-2016, National Food Safety Standard-Food Microbiological Examination-Aerobic Plate Count [S]
- [4] 黄玲玲, 刘辉, 黄宝莹, 等. 3种不同培养基和1种测试片检测水溶性化妆品中菌落总数的结果分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(10): 2446-2450
- [5] HUANG Ling-ling, LIU Hui, HUANG Bao-ying, et al. Comparison of 3 different media and petrifilm™ for detection of total bacterial count in water-soluble cosmetics [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(10): 2446-2450

- [4] Medina L M, Jordano R. Petrifilm -a simplified cultural technique [J]. Encyclopedia of Food Microbiology, 2014: 19-24
- [5] R Jain, Babbar S B. Guar gum and isubgol as cost-effective alternative gelling agents for in vitro multiplication of an orchid, *Dendrobium chrysotoxum* [J]. Current Science, 2005, 88(2): 292-295
- [6] Soumya Banerjee, Suvendu Bhattacharya. Compressive textural attributes, opacity and syneresis of gels prepared from gellan, agar and their mixtures [J]. Journal of Food Engineering, 2011, 102: 287-292.
- [7] D Ren, P Chen, Y Wang, 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
- [8] 郑连宝,陈文祥,嵇林峰,等.一种在菌落总数测定中防止芽孢杆菌菌落弥漫生长的方法[J].中国卫生检验杂志,2019, 29(22):2715-2717
ZHENG Lian-bao, CHEN Wen-xiang, JI Lin-feng, et al. A method for preventing colony diffuse growth of *Bacillus* spp. in bacterial plate counting [J]. Chin J Health Lab Tec, 2019, 29(22): 2715-2717
- [9] 孔秀珍,程洁萍.在化妆品细菌总数测定中应用 TTC 的探讨[J].中国卫生检验杂志,2006,16(7):831-832
KONG Xiu-zhen, CHENG Jie-ping. Application of TTC in determination of total bacterial count in cosmetics [J]. Chin J Health Lab Tec, 2006, 16(7): 831-832
- [10] Silva B O, Caraviello D Z, Rodrigues A C, et al. Evaluation of petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* from milk samples [J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88(8): 3000-3008
- [11] J Li, S Tang, Z Wu, et al. Branching and cross-linking of poly (ethylene terephthalate) and its foaming properties [J]. Polymer Science, 2017, 59: 164-172
- [12] 王丽仙,李良川,刘彝,等.嗜碱杆菌甘露聚糖酶环境适应性及其对瓜尔胶的降解作用[J].华东理工大学学报(自然科学版),2018,44(5):661-669
WANG Li-xian, LI Liang-chuan, LIU Yi, et al. Environmental adaptability of alkalophilic mannanase and its degradation of guar gum [J]. Journal of East China University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2018, 44(5): 661-669
- [13] 范婷婷,王天宇,徐淑科,等.一种分散速溶型黄原胶的制备方法[J].中国食品添加剂,2019,9:94-99
FAN Ting-ting, WANG Tian-yu, XU Shu-ke, et al. A preparation method of instant xanthan gum [J]. China Food Additives, 2019, 9: 94-99
- [14] 郭登峰,王羚佳,舒晓梦,等.菌落总数测试卡用凝胶培养基和显色剂的优化[J].食品与机械,2018,34(3):82-85,145
GUO Deng-feng, WANG Ling-jia, SHU Xiao-meng, et al. Optimization gelling medium and color developer for bacterial testing slip [J]. Food and Machinery, 2018, 34(3): 82-85, 145
- [15] 胡薇薇,宋辽原,付月华.丙酮酸钠提高食品细菌检出率的探讨[J].浙江预防医学,2003,15(6):80-81
HU Wei-wei, SONG Liao-yuan, FU Yue-hua, et al. Discussion on improving the detection rate of food bacteria by sodium pyruvate [J]. Zhejiang Prev Med, 2003, 15(6): 80-81

(上接第 255 页)

- [11] 李锦周,杨红兵,刘毅,等.HS-SPME-GC-MS 鉴别高良姜及大良姜[J].湖北农业科学,2020,59(1):135-138
LI Jin-zhou, YANG Hong-bing, LIU Yi, et al. Identification of galangal and galangal by HS-SPME-GC-MS [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2020, 59(1): 135-138
- [12] 王元成,曾艺芸,李振坚,等.细叶石斛和翅梗石斛花朵赋香成分的 GC-MS 分析[J].林业科学研究,2020,33(3):116-123
WANG Yuan-cheng, ZENG Yi-yun, LI Zhen-jian et al. GC-MS analysis of the aroma components of *Dendrobium tenuifolia* and *Dendrobium pterocarpus* [J]. Forestry Science Research, 2020, 33(3): 116-123
- [13] 郭罕星,王占新,鲁俊鹏,等.植物精油对鸽源白色念珠菌的体外抑菌作用及肉鸽攻毒保护试验[J].中国家禽,2020, 42(9):47-53
GUO Han-xing, WANG Zhan-xin, LU Jun-peng, et al. *In vitro* antibacterial effect of plant essential oils on *Candida albicans* from pigeons and protection of meat pigeons from challenge [J]. China National Poultry, 2020, 42(9): 47-53