

4种方法测定矿泉水中产气荚膜梭菌测量审核结果的比较分析

谢耐珍, 李鑫*

(广西-东盟食品检验检测中心, 南宁 530022)

摘要: **目的** 比较分析4种方法对矿泉水中产气荚膜梭菌测量审核结果的影响。**方法** 以测量审核作业指导书、GB 8538—2016《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》为依据, GB 4789.13-2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验》为参考, 分别采用两标准中的亚硫酸盐-多粘菌素-磺胺嘧啶(sulfite polymyxin sulphadiazine, SPS)琼脂培养基和胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸(tryptose sulfite cycloserine, TSC)琼脂培养基, 再以以滤膜法倾注上层培养基与不倾注上层培养基的方法同时检测测量审核样品和模拟水样。比较2种培养基的产气荚膜梭菌回收率, 运用方差分析测量审核样品、运用配对 t 检验模拟水样, 进而评价4种方法对矿泉水中产气荚膜梭菌计数结果一致性的影响。**结果** 4种方法检测结果无明显差异, 但是经不倾注上层培养基培养后目标菌难显黑色, 经倾注上层培养基培养后目标菌显黑色。3个厂家的SPS培养基、TSC培养基产气荚膜梭菌的平均回收率分别为: 89%、98%。采用TSC培养基和滤膜法倾注上层培养基这一方法的标准差最小, 最为稳定。测量审核样品 $|Z| < 2$ 、空白样品为0 CFU/50 mL, 结果满意。**结论** 采用滤膜法倾注上层培养基的方法更适用于矿泉水中产气荚膜梭菌的检验, 并建议优先采用TSC培养基, 以确保检测结果的准确性和质量。

关键词: 产气荚膜梭菌; 矿泉水; 测量审核; SPS培养基; TSC培养基; 倾注上层培养基

Comparison and analysis of 4 methods for measuring and reviewing *Clostridium perfringens* in mineral water

XIE Nai-Zhen, LI Xin*

(Guangxi-ASEAN Food Inspection and Testing Center, Microbiology Inspection Department, Nanning 530022, China)

ABSTRACT: Objective To compare and analyze the effects of 4 methods on the measurement results of *Clostridium perfringens* in mineral water. **Methods** Based on the measurement audit work instruction, GB 8538-2016 *National food safety standard-Test method for testing natural mineral water drinking* and GB 4789.13-2012 *National food safety standard-Microbiologyinspection-Clostridium perfringens test*, the sulfite polymyxin sulfamethazine (SPS) agar and tryptose sulfite cycloserine (TSC) agar in 2 standards were used for culturing. And then the simultaneous detection of measurement audit samples and simulated water samples were carried out by the filter method of pouring the upper medium and the filter method of not pouring the upper medium. The recovery rates of *Clostridium perfringens* were compared between the 2 media, the analysis of variance was used to measure the measurement audit samples, and the paired t test was used to simulate the water samples, and then the

*通讯作者: 李鑫, 主管药师, 主要研究方向为食品、药品、化妆品质量安全检测。E-mail: lixin3170243@163.com

*Corresponding author: LI Xin, Pharmacist-in-Charge, Guangxi-ASEAN Food Inspection and Testing Center, Nanning 530022, China. E-mail: lixin3170243@163.com

impact of the 4 methods on the consistency of the counts of *Clostridium perfringens* in mineral water was evaluated.

Results There was no significant difference in the test results of the 4 methods, but the target bacteria was difficult to appear black after being cultured without pouring the upper medium, and the target bacteria was black after being cultured by pouring the upper medium. The average recoveries of *Clostridium perfringens* from 3 manufacturers' SPS media and TSC media were 89% and 98%. The standard deviation of the TSC medium and filter membrane method of pouring the upper medium was the smallest and the most stable. The measurement review results were $|Z| < 2$ and 0 CFU/50 mL, and the results were satisfactory. **Conclusion** The method of pouring the upper medium by the filter method is more suitable for the detection of *Clostridium perfringens* in mineral water to ensure the accuracy and quality of the test results, and it is recommended to use TSC medium as the first choice.

KEY WORDS: *Clostridium perfringens*; mineral water; measurement audits; sulfite polymyxin sulfamethazine; tryptose sulfite cycloserine; pouring the upper medium

1 引言

测量审核是国际通行的科学有效的实验室质量控制方法之一,是指实验室对被测物品(材料或制品)进行实际测试并将测试结果与参考值进行比较的活动,相当于一对一的能力验证^[1]。测量审核报告与能力验证结果通知单对实验室申请认可具有同等效力^[2]。实验室可利用此手段控制实验室的持续检测水平,评估检测人员的技能,从而提高实验室的竞争力。通过参加测量审核及对结果的分析,实验室可以及时发现问题,认真分析原因,找出问题的根源,采取相关的纠正措施,对质量控制起到补充、纠正和完善的作用,不断提高管理水平。

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)是一种革兰氏阳性杆菌,产芽孢,本菌虽属厌氧性细菌,但对厌氧程度的要求并不太严^[3],广泛地存在于自然界的土壤、污水、粪便及人畜肠道中,是正常肠道菌群的成员之一,也是一种条件致病菌,通常被用作粪便污染的指标,可引起人创伤性气性坏疽和食物中毒、痢疾等各种疾病^[4-7]。产气荚膜梭菌产芽孢,对污水净化处理的各种措施具有较强抵抗力,其数量与水污染程度有关,因此也被认为是水质的指标。GB 8538-2016《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》^[8]规定,饮用天然矿泉水需检测产气荚膜梭菌。在该国标中,指定的分离培养基为亚硫酸盐-多粘菌素-磺胺嘧啶(sulfite polymyxin sulfamethazine, SPS)琼脂,但早有文献^[9]报道,用该培养基按照国标操作,经24 h厌氧培养后产气荚膜梭菌的黑色菌落产生不明显,容易产生漏检。本实验对国标方法进行改进和对比,采用滤膜法(倾注上层培养基与不倾注上层培养基)及SPS培养基、胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸(tryptose sulfite cycloserine, TSC)琼脂培养基,2个变量,共计4种方法分别检测测量审核样品和模拟水样。对4种方法检测结果进行对比,同时测定和比较SPS培养基和TSC培养基的产气荚膜梭菌回收率。测量审核样品检测结果运用方差分析、模拟水样检测结果运用配

对 t 检验评价4种方法对矿泉水中产气荚膜梭菌计数结果一致性的影响,为矿泉水中产气荚膜梭菌的检验以及日后实验室检测产气荚膜梭菌工作的优化提供参考和依据。

2 材料与方法

2.1 样品

测量审核样品(2个)序号分别为MA19-A264、MA19-A710,由中国检验检疫科学研究院测试评价中心提供,样品为白色冻干块状,包装于真空西林瓶内。复原后即为待测矿泉水样品。

模拟水样:实验室用产气荚膜梭菌标准菌株(ATCC13124)加标自备水样。

2.2 仪器与设备

AC2-6S1型A2级双人操作生物安全柜(新加坡ESCO公司);HVA-85型高压灭菌器(日本HIRAYAMA公司);VITEK 2 Compact全自动微生物鉴定/药敏分析系统(法国生物梅里埃公司);DM500型照相显微镜(德国LEICA公司);EZ-FIT/EZ-Curve微生物过滤检测系统(美国Merck Millipore公司);IMH400-S型生化培养箱(美国Thermo公司);BagMixer 400-W拍击式均质器(法国Interscience公司)。

2.3 培养基

亚硫酸盐-多粘菌素-磺胺嘧啶琼脂(批号:180814,北京陆桥技术有限责任公司;批号:1076071,广东环凯微生物科技有限公司;批号:20170711,青岛海博生物技术有限公司);胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂(批号:180427,北京陆桥技术有限责任公司;批号:1080511,广东环凯微生物科技有限公司;批号:20181011,青岛海博生物技术有限公司);液体硫乙醇酸盐培养基(fluid thioglycollate medium, FTG)(批号:170105)、卵黄琼脂培养基(批号:180409)、血平板(批号:20190604)(北京陆桥技术有限责任公司);细菌蛋白胨(批号:3206057)、动力-硝酸盐培养基

(批号: 1073901)、含铁牛奶培养基(批号: 1076661)(广东环凯微生物科技有限公司)。

2.4 试剂、耗材

硝酸盐还原试剂(批号: 180719)、革兰氏染色液(批号: 180911)(北京陆桥技术有限责任公司); 3%过氧化氢酶试剂(临用新配)。

赛多利斯无菌滤膜, 直径 47 mm, 孔径 0.22 μm 滤膜(批号: 20190110); VITEK2 革兰氏厌氧菌及棒状杆菌鉴定卡(批号: 2440699203)(法国生物梅里埃); C-31 厌氧培养基盒装(密封培养罐+厌氧产气袋+氧气指示剂, 日本三菱公司)。

2.5 标准菌株

产气荚膜梭菌(ATCC13124), 购自中国食品药品检定研究院。

2.6 检验依据

以中国检验检疫科学研究院测试评价中心提供的 ACAS-TR710-06-03/00《测量审核作业指导书》^[10]对样品进行前处理并以 GB 8538—2016《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》滤膜法为依据, 联合采用 GB 4789.13—2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验》^[11]中的 TSC 培养基作为对比, 同时检测测量审核样品和模拟矿泉水样。参照 GB 4789.28-2013《食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求》^[12]比较 SPS 培养基和 TSC 培养基的产气荚膜梭菌回收率。

2.7 实验方法

2.7.1 检测样品制备

测量审核样品的处理方法: 根据中国检验检疫科学研究院测试评价中心提供的《测量审核作业指导书》, 总计需要用 520 mL 灭菌稀释液再水化, 稀释液为灭菌 0.1%(质量分数, 全文同)蛋白胨水。无菌开启西林瓶后立即加入 10 mL 灭菌 0.1%蛋白胨水进行再水化, 待溶解后, 吸出放入无菌瓶中, 再反复用余下的灭菌 0.1%蛋白胨水清洗西林瓶内壁, 回收清洗液放入上述无菌瓶中, 此溶液即是待测样品原液(本次冻干的能力验证样品等同于 520 mL 的待测矿泉水样品)。

模拟水样的制备方法: 将产气荚膜梭菌(ATCC13124)菌株接种于 FTG 培养基(36 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 18~24 h, 取新鲜菌悬液通过平板计数法和比浊法计数加入灭菌 0.1%蛋白胨水制成浓度约 $2.5\times 10^3\sim 5\times 10^3$ CFU/mL 的菌悬液, 取菌悬液 1 mL 加入到 49 mL 灭菌 0.1%蛋白胨水中, 使灭菌 0.1%蛋白胨水含菌浓度约为 50~100 CFU/50 mL, 即为 1 份 50 mL 模拟水样。

2.7.2 4 种方法测定样品

1) 4 种方法

方法 1: 国标法, 按 GB 8538-2016《食品安全国家标

准 饮用天然矿泉水检验方法》, 简称为 SPS(单)法;

方法 2: 按 GB 8538-2016《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》进行过滤后增加一步骤, 即用冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 的 SPS 培养基[可放置于(50 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱中保温]5~10 mL 倾注于培养皿的膜上, 然后放置厌氧培养, 简称为 SPS(双)法;

方法 3: 测定培养基采用 TSC 培养基, 按 GB 8538-2016《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》进行过滤和培养, 简称为 TSC(单)法;

方法 4: 测定培养基采用 TSC 培养基, 按 GB 8538-2016《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》进行过滤后增加一步骤, 即用冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 的 TSC 培养基[可放置于(50 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱中保温]5~10 mL 倾注于培养皿的膜上, 然后放置厌氧培养, 简称为 TSC(双)法。

2) 测量审核样品

(1) 推测性检验

10^{-1} 稀释度样液: 取上述按 2.7.1 方法制备的待测矿泉水样品原液 50 mL 加入 450 mL 灭菌 0.1%蛋白胨水中, 混匀, 即得。

10^{-2} 稀释度样液: 取 50 mL 10^{-1} 稀释度样液加入 450 mL 灭菌 0.1%蛋白胨水中, 混匀, 即得。

取上述按 2.7.1 方法制备的待测矿泉水样品原液、 10^{-1} 稀释度样液、 10^{-2} 稀释度样液各 50 mL, 分别用 0.22 μm 薄膜过滤, 待滤液全部通过滤膜后, 再加适量灭菌 0.1%蛋白胨水进滤杯, 清洗杯壁并过滤。按照上述 1) 中的 4 种方法分别操作后, 置于(36 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 24 h, 计数黑色菌落。用 50 mL 灭菌 0.1%蛋白胨水直接过滤, 作为空白对照, 同时用自制加标水样做阳性对照。

(2) 确证性检验

挑取 5 个黑色菌落接种到 FTG 培养基, (36 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h, 对培养物进行革兰氏染色镜检等确证性试验。同时采用 VITEK 2 Compact 全自动微生物生化鉴定系统鉴定黑色可疑菌落。根据黑色菌落的计数和确证性实验的结果, 计算每 50 mL 水样中的产气荚膜梭菌数量。

3) 测量模拟水样

取按 2.7.1 方法制备的模拟水样 50 mL 直接用 0.22 μm 薄膜过滤, 待滤液全部通过滤膜后, 再加适量灭菌 0.1%蛋白胨水进滤杯, 清洗杯壁并过滤。之后操作方法同测量审核样品。由于是标准菌株加标样品, 不再做确证性实验。

2.7.3 SPS 培养基、TSC 培养基的产气荚膜梭菌回收率实验

选用国内 3 个不同品牌分别标注为 A 厂家(广东环凯微生物科技有限公司)、B 厂家(青岛海博生物技术有限公司)、C 厂家(北京陆桥技术有限责任公司)的 SPS 培养基、TSC 培养基进行产气荚膜梭菌标准菌株的回收率测定实验, 比较不同培养基对产气荚膜梭菌的促菌生长能力。

取按 2.7.1 方法制备的模拟水样 50 mL, 直接用 0.22 μm 薄膜过滤,待滤液全部通过滤膜后, 再加适量灭菌 0.1%蛋白胨滤杯, 清洗杯壁并过滤。以无菌操作方法将滤膜正面朝上分别贴于 SPS 培养基、TSC 培养基上, 置于 (36±1) °C 厌氧培养 24 h。重复 2 次。以 A 厂家的 TSC 培养基为参比培养基计算回收率。

生长率=选择性培养基上的菌落数/参比培养基上的菌落数×100%

2.7.4 检验方法

采用上述 4 种方法, 按 2.7.2 方法操作, 检测测量审核样品重复 2 次, 运用 SPSS 软件采用方差分析, 比较其结果是否存在差异; 检测模拟水样, 重复 10 次, 运用 SPSS 软件采用配对 *t* 检验对比分析, 比较其结果是否存在差异^[13]。

3 结果与分析

3.1 4 种方法对测量审核样品检测结果的影响

4 种方法检测测量审核样品产气荚膜梭菌结果见表 1, 运用 SPSS 软件按照方差分析进行评价, 设临界水平 *a* =0.05, 数据分析结果见表 2。目标菌菌落特征见表 3。由表 1、表 3 可以看出, 样品 MA19-A710 采用 4 种方法检测均无菌生长, 检测结果为 0 CFU/50 mL。由表 2 可以看出, 4 种方法检测样品 MA19-A264 的结果显著性值 *P* 为 0.363, 大于 0.05, 说明 4 种方法检测出来的结果差异不显著, 一致性较好。样品 MA19-A264 的 SPS(单)、SPS(双)、TSC(单)、TSC(双) 4 种方法检测结果分别为 985、890、1020、945 CFU/50 mL。可见 TSC 培养基的检测结果略高。

表 1 测量审核样品产气荚膜梭菌检测结果(n=2)
Table 1 Test results of *Clostridium perfringens* test samples(n=2)

检品编号	检验过程	不同方法、不同稀释度过滤样液平板目标菌落数/(CFU/膜)											
		SPS(单)			SPS(双)			TSC(单)			TSC(双)		
MA19-A264	推测性检验	原液	10 ⁻¹	10 ⁻²	原液	10 ⁻¹	10 ⁻²	原液	10 ⁻¹	10 ⁻²	原液	10 ⁻¹	10 ⁻²
		多不可计	100	10	多不可计	85	10	多不可计	106	15	多不可计	92	13
	多不可计	97	13	多不可计	93	7	多不可计	94	12	多不可计	97	10	
	确证性检验	/	100	/	/	85	/	/	106	/	/	92	/
	结果(CFU/50 mL)		97			93			94			97	
MA19-A710	推测性检验		1000			850			1100			920	
			970			930			940			970	
MA19-A710	推测性检验	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MA19-A710	结果(CFU/50 mL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注: “/”表示未进行实验或结果报告

表 2 测量审核样品检测结果的基本描述统计量及方差分析结果(n=2)
Table 2 Basic description statistics and ANOVA results (n=2)

样品编号	不同方法检测结果(平均值±标准差)					<i>F</i>	<i>P</i>
	SPS(单)(n=2)	SPS(双)(n=2)	TSC(单)(n=2)	TSC(双)(n=2)			
MA19-A264	985.00±21.21	890.00±56.57	1020.00±113.14	945.00±35.36		1.409	0.363
MA19-A710	/	/	/	/		/	/

注: “/”表示未进行结果分析

表 3 测量审核样品产气荚膜梭菌菌落特征(n=2)
Table 3 Characteristics of *Clostridium perfringens* colonies(n=2)

实验方法	SPS(单)	SPS(双)	TSC(单)	TSC(双)
样品编号				
MA19-A264	白至微灰色	黑色	大部分白至微灰色、少部分黑色	黑色, 菌落较大
MA19-A710	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长
阳性菌对照	白至微灰色	黑色	少部分白至微灰色、大部分黑色	黑色, 菌落较大

由表 3 可以看出,在不经倾注上层培养基培养的情况下,目标菌均难以呈黑色,经倾注上层培养基培养后目标菌均能显黑色,干扰菌非黑色,区分明显,同时观察到目标菌在 TSC 培养基经倾注上层培养基培养后得到的菌落更黑、更大,之所以产生这种现象,是由于产气荚膜梭菌能利用 SPS 培养基、TSC 培养基中的亚硫酸盐、枸橼酸铁或铁铵,使其发生生化反应而使菌落呈黑色。硫化物的产生及铁离子的吸收是产气荚膜梭菌在 SPS 培养基、TSC 培养基的生长过程中,使菌落呈现黑色的关键环节。铁离子吸收主要通过微生物菌体与铁离子的直接接触将铁离子传递进入细胞内^[14,15]。在矿泉水检测国标方法中,滤膜使产气荚膜梭菌不能直接接触培养基,继而使菌体不能完全与游离铁离子接触,难以产生黑色的硫化亚铁物质,菌落也就难以呈黑色。采用倾注上层培养基方法后,菌体能完全直接接触到培养基中的游离铁离子,因此培养后出现了黑色菌落。在培养基配方中 TSC 培养基的亚硫酸盐和枸橼酸铁铵浓度是 SPS 培养基的 2 倍,因而在 TSC 培养基上产气荚膜梭菌能使更多黑色的硫化亚铁物质产生,菌落更容易变黑且更大更易于计数。

实验中还发现采用 SPS 培养基检测的干扰菌数量多于采用 TSC 培养基,原因是 2 种培养基中所加的抗生素对产气荚膜梭无抑制作用,但 TSC 培养基中的环丝氨酸对除梭菌属细菌外的大多数其他细菌的抑制作用比 SPS 培养基中的多粘菌素 B 和磺胺嘧啶钠强^[16]。结合以上几点,可见 TSC 培养基优于 SPS 培养基。

样品 MA19-A264 检测结果中,SPS(双)、TSC(双)法比 SPS(单)、TSC(单)法的检测结果稍低,这是由于样品添加了大量白色干扰菌,目标菌在未经倾注上层培养基培养的情况下不显黑色或者只有少部分显黑色,与干扰菌色差不明显,较难区分,导致计数时把少部分干扰菌误判为目标菌,最后计数结果偏高。经倾注上层后培养,两种培养基上目标菌均显黑色,样品所加干扰菌未显黑色,容易区分,计数值更接近参考值。

3.2 SPS 培养基、TSC 培养基对产气荚膜梭菌回收率结果的影响

SPS、TSC 2 种培养基的产气荚膜梭菌回收率结果见表 4,结果表明国内 3 个厂家差异不大,TSC 培养基回收率略高。

3.3 4 种方法对模拟水样中产气荚膜梭菌检测结果的影响

4 种方法检测模拟水样中的产气荚膜梭菌检测结果见表 5。SPS(单)法分别与其他 3 种方法两两配对。运用 SPSS 软件按照配对 t 检验进行分析,设临界水平 $\alpha=0.05$,数据分析结果见表 6。由表 6 可以看出,SPS(单)、SPS(双)、TSC(单)、TSC(双)4 种方法对模拟水样检测结果均值分别为 83.5、84.9、89.4、89 CFU/50 mL。标准差分别为 9.24、9.06、9.07、7.32。标准差 TSC(双)<SPS(双)<TSC(单)<SPS(单),但由于 4 种方法的标准差相差不大,说明这 4 种方法的检测结果没有出现较大的波动,不影响结果复现。SPS(单)与 SPS(双)、SPS(单)与 TSC(单)、SPS(单)与 TSC(双)检测结果的显著性值 P 分别为 0.723、0.302、0.129,三者均大于 0.05,说明 SPS(单)法与其他 3 种方法检测出来的结果差异不显著。4 种检测方法的检测结果一致性较好,但是 TSC(双)法得到的检测结果较高,标准差最小,说明波动也最小。

3.4 测量审核报告结果对实验室检测能力和质量管理水平的影响

中国检验检疫科学研究院测试评价中心反馈本实验室此次上报 MA19-A264 结果 $|Z|=1.4$,MA19-A710 为空白样品/干扰样品。按照 $|Z|\leq 2.0$ 为满意结果, $2.0 < |Z| < 3.0$ 为可疑结果, $|Z|\geq 3.0$ 为离群结果,空白样品/干扰样品,按照定性方案评价,检测结果为 0 CFU/50 mL,评判为满意的原则^[17],此次测量审核结果为满意。这说明本实验室和主导实验室对被测样品的折算质量修正值的差值比样品所规定的允差值小^[18],出具的检验报告具有高度的可靠性^[19]。

表 4 SPS 培养基、TSC 培养基的产气荚膜梭菌回收率实验结果(%) $(n=2)$
Table 4 Recovery results of *Clostridium perfringens* in SPS medium and TSC medium(%) $(n=2)$

培养基 菌株	SPS(A)	SPS(B)	SPS(C)	TSC(A)	TSC(B)	TSC(C)
产气荚膜梭(ATCC13124)	94	85	85	100	95	97
	88	93	86	100	91	105
每个厂家的回收率均值	91	89	86	100	93	101
标准差	4.243	5.657	0.707	0	2.828	5.657
3 个厂家回收率均值		89			98	

表5 模拟水样产气荚膜梭菌检测结果(CFU/50 mL)(n=10)
Table 5 Detection results of *Clostridium perfringens* in simulated water samples (CFU/50 mL) (n=10)

实验方法 编号	SPS(单)	TSC(单)	SPS(双)	TSC(双)
1	83	93	81	93
2	92	79	73	87
3	76	82	99	103
4	95	87	83	91
5	73	101	84	91
6	97	77	92	96
7	75	91	73	81
8	73	105	81	79
9	82	93	85	83
10	89	86	98	86

表6 模拟水样检测结果的基本描述统计量及配对t检验分析结果(n=10)
Table 6 Basic description of simulated water sample test results and paired t test analysis results (n=10)

名称	配对(平均值±标准差)		差值(配对1-配对2)	t	p
	配对1	配对2			
SPS(单)配对SPS(双)	83.50±9.24	84.90±9.06	-1.40	-0.365	0.723
SPS(单)配对TSC(单)	83.50±9.24	89.40±9.07	-5.90	-1.095	0.302
SPS(单)配对TSC(双)	83.50±9.24	89.00±7.32	-5.50	-1.671	0.129

参考文献

- [1] GB/T 27043-2012 合格评定能力验证的通用要求[S]. GB/T 27043-2012 Conformity assessment-General requirements for proficiency testing [S].
- [2] 毛歆, 于欣, 肖镜, 等. 2011~2014年药品检测实验室测量审核分析[J]. 中国药师, 2015, (8): 1423-1425. Mao X, Yu X, Xiao J, et al. Analysis on measurement audit in drug testing laboratories during 2011-2014 [J]. China Pharm, 2015, (8): 1423-1425.
- [3] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. Dong XZ, Cai MY. Manual for systematic identification of common bacteria [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [4] 方向红, 戴丽红, 颜友荣. 安徽部分地区冷鲜鸡产气荚膜梭菌的污染分析[J]. 现代畜牧兽医, 2019, (9): 50-53. Fang XH, Dai LH, Yan YR. Contamination analysis of *Clostridium perfringens* in chilled chickens in some areas of Anhui province [J]. Mod J Anim Husband Veter Med, 2019, (9): 50-53.
- [5] 钟燕. 一例疑似产气荚膜梭菌感染所致气性坏疽患者的病例分析[J]. 健康必读, 2018, (27): 230-231. Zhong Y. Case analysis of a patient with suspected gas gangrene caused by *Clostridium perfringens* infection [J]. Health Required, 2018, (27): 230-231.
- [6] 文明, 王开功. 几种分离产气荚膜梭菌培养基的比较[J]. 中国兽医杂志, 2002, 38(12): 16-17. Wen M, Wang KG. Comparison of several cultures of *Clostridium perfringens* [J]. Chin J Veter Med, 2002, 38(12): 16-17.
- [7] 邓志爱, 李孝权, 李钊华, 等. 食品中产气荚膜梭菌的分离鉴定与基因分型[J]. 热带医学杂志, 2006, 6(6): 682-684. Deng ZA, Li XQ, Li CH, et al. Isolation, identification and genotyping of *Clostridium perfringens* in food [J]. J Trop Med, 2006, 6(6): 682-684.
- [8] GB 8538-2016 食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法[S]. GB 8538-2016 National food safety standard-Test method for drinking natural mineral water [S].
- [9] 潘宝怡, 吴清平, 彭飞艇, 等. 饮用天然矿泉水中产气荚膜梭菌检测国标方法的改进[J]. 现代食品科技, 2012, 28(9): 1236-1238, 1265. Pan BY, Wu QP, Peng FT, et al. Improvement of detection method for *Clostridium perfringens* in drinking natural mineral water of the national standards [J]. Mod Food Sci Technol, 2012, 28(9): 1236-1238, 1265.
- [10] ACAS-TR 710-06-03/00 测量审核作业指导书[S].

4 结论与讨论

本研究对比了采用 TSC 培养基或 SPS 培养基, 以及是否采用滤膜法倾注上层培养基, 2 个变量, 共计 4 种方法对测定矿泉水中产气荚膜梭菌测量审核结果的影响。结果表明, 经倾注上层后培养, 2 种培养基上目标菌均显黑色, 能避免目标菌和干扰菌颜色难以区分的问题, 有利于提高计数结果准确性。4 种方法中, 同时采用 TSC 培养基和滤膜法倾注上层培养基这一方法的标准差最小, 最为稳定。有文献^[20]报道, 矿泉水中产气荚膜梭菌能力验证(ACAS-PT553)有 26 家实验室参加, 18 家实验室结果满意, 7 家实验室结果不满意, 1 家实验室结果可疑, 满意率为 69.2%, 比对结果满意率较矿泉水其他微生物验证项目偏低。据多家实验室反馈造成结果不满意的主因是国标方法问题, 完全按照国标方法操作目标菌和干扰菌无法区分, 最后导致结果偏离。因此建议采用倾注上层培养基的方法测定矿泉水中产气荚膜梭菌, 能避免此类情况的发生, 并建议优先采用 TSC 培养基, 从而确保检测结果的准确性并且提高实验室质量管理水平。

- ACAS-TR 710-06-03/00 Work instruction of measurement audit [S].
- [11] GB 4789.13-2012 食品安全国家标准食品 微生物学检验 产气荚膜梭菌检验 [S].
GB 4789.13-2012 National food safety standard-Microbiology inspection-*Clostridium perfringens* [S].
- [12] GB 4789.28-2013 食品微生物学检验培养基和试剂的质量要求[S].
GB 4789.28-2013 Food microbiology test medium and reagent quality requirements [S].
- [13] 丁秀琼, 杨劲, 刘骁, 等. 3 种方法检测食品中单增李斯特菌能力验证结果分析[J]. 检验检疫学刊, 2018, 28(6): 15-18.
Ding XQ, Yang J, LX, *et al.* Three methods for testing the ability of *Listeria monocytogenes* in food analysis of the results of the certificate [J]. J Inspect Quar, 2018, 28(6): 15-18.
- [14] 许伟, 胡佩, 李艳红, 等. 微生物铁呼吸机制研究进展[J]. 生态学杂志, 2008, 27(6): 1037-1042.
Xu W, Hu P, Li YH, *et al.* Progress in microbial iron respiration mechanism [J]. Chin J Ecol, 2008, 27(6): 1037-1042.
- [15] 崔艳华, 董爱军, 曲晓军. 微生物铁载体运输系统[J]. 生命的化学, 2008, 28(6): 786-790.
Cui YH, Dong AJ, Qu XJ. Microbial iron carrier transport system [J]. Chem Life, 2008, 28(6): 786-790.
- [16] 王静, 陈萍, 李倩倩, 等. 产气荚膜梭菌选择性显色培养基的研制[J]. 卫生研究, 2013, 42(4): 656-659.
Wang J, Chen P, Li QQ, *et al.* Development of selective chromogenic medium for *Clostridium perfringens* [J]. J Hyg Res, 2013, 42(4): 656-659.
- [17] ACAS-TR 713-06-03/01 测量审核报告[R].
ACAS-TR 713-06-03/01 Measurement audit report [R].
- [18] 刘颖, 薛靓. 测量审核的实施方法及满意度评定[J]. 中国测试, 2012, (38): 107-110.
Liu Y, Xue L. Implementation of measurement audit and satisfaction evaluation [J]. China Meas Test, 2012, (38): 107-110.
- [19] 杨俊业, 黄玲玲. 大肠菌群测量审核结果与分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(14): 4718-4721.
Yang JY, Huang LL. Results and analysis of coliform bacteria measurement audit [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(14): 4718-4721.
- [20] 丁秀琼, 黄武, 刘建芳, 等. 矿泉水中微生物检测能力验证结果与分析[J]. 检验检疫学刊, 2019, 29(2): 22-26.
Ding XQ, Huang W, Liu JF, *et al.* Verification results and analysis of detection capability of microbiological in mineral water [J]. J Inspect Quar, 2019, 29(2): 22-26.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



谢耐珍, 主管药师, 主要研究方向为食品、药品、化妆品质量与安全检测。
E-mail: 2132725853@qq.com



李鑫, 主管药师, 主要研究方向为食品、药品、化妆品质量安全检测。
E-mail: lixin3170243@163.com