

两种不同检测方法分析不同类型天然和人工染菌食品中菌落总数的比较研究

陈怡文, 张晓东, 任秀, 刘娜, 余文, 徐颖华*, 崔生辉*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: **目的** 验证分析测试片检测不同类型食品菌落总数计数的适用性。**方法** 与传统 GB 4789.2—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落数测定》平板计数方法平行比较, 应用测试片检测肉制品、面食、冷饮、奶制品、豆制品、果蔬和坚果 7 大类 70 份天然食品, 以及以最常见的两种食源性微生物金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌作为标准菌株, 制备 22 份不同食品基质的人工染菌样品。所有检测结果使用两种不同数据处理方法进行处理分析, 以此探讨不同方法检测结果的相关性。**结果** 依据 ISO 16140-2 2016 推荐的数据处理分析方法发现测试片和 GB 4789.2—2016 平板计数方法检测不同类型天然和人工染菌食品样品的菌落总数结果对数值差值的平均值均小于 0.5; 同时单因素方差分析结果也证实两种方法检测结果无显著性差异($P>0.05$), 相关系数高达 0.938, 不同方法检测结果之间呈正相关。以此发现本研究随机选择食品中菌落总数最高的分别为豆沙春卷、京酱肉丝和鲜猪皮。**结论** 本研究证实测试片对不同类型食品菌落总数检测结果与 GB 4789.2—2016 平板计数方法结果一致性好, 并且具有简单、快捷、易于标准化的优点, 适用于不同层级食品承检机构。

关键词: 菌落总数; 测试片; 检验技术

Comparative study on the total bacterial colony counts in different types of natural and artificial contaminated foods by 2 kinds of different detection methods

CHEN Yi-Wen, ZHANG Xiao-Dong, REN Xiu, LIU Na, YU Wen, XU Ying-Hua*, CUI Sheng-Hui*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To verify the applicability of the test tablet for total bacterial colony detection of different types foods. **Methods** In parallel with the traditional GB 4789.2—2016 *National food safety standard-Food microbiological inspection-Determination of colony count* plate counting method, the test tablet assay was used to detect 70 natural foods with 7 categories including meat products, pasta, cold drinks, dairy products, soy products, fruits, vegetables and nuts, as well as the 2 kinds of most common food-borne microorganisms *Staphylococcus aureus*

基金项目: 科技部“食品安全关键技术研发”重点专项(2018YFC1603900)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1603900)

***通信作者:** 徐颖华, 博士, 研究员, 主要研究方向为细菌性疫苗质量控制与微生物资源标准化研究。E-mail: xuyh@nifdc.org.cn

崔生辉, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: cuishenghui@aliyun.com

***Corresponding author:** XU Ying-Hua, Ph.D, Professor, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: xuyh@nifdc.org.cn

CUI Sheng-Hui, Ph.D, Professor, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: cuishenghui@aliyun.com

and *Escherichia coli* were used as standard strains to prepare 22 artificial stained samples on different food substrates. All test results were processed and analyzed using 2 kinds of different data methods, of which explored the correlation of test results. **Results** According to the ISO 16140-2 2016 recommended method analysis, it was found that the difference of average value for the logarithmic of the total number of colonies by the test tablet and GB 4789.2—2016 plate counting method of the natural and artificially contaminated food samples was less than 0.5. Furthermore, the one-way analysis of variance also confirmed that the difference of 2 kinds of methods had no significance ($P>0.05$). The correlation coefficient was as high as 0.938, and the test results were positively correlated. Based on this, it was found that the food with the highest total number of colonies randomly selected in this study were spring rolls with bean paste, shredded pork with Beijing sauce and fresh pork skin. **Conclusion** This study confirmed that the results of the test tablet for total bacterial colonies in different types of food are consistent with that of the GB 4789.2—2016 plate counting method, and the test tablet has the advantages of simplicity, speed, and easy standardization, of which shall be suitable for different levels of food inspection agencies.

KEY WORDS: plate count; test tablet; inspection technology

0 引言

食品安全是公共卫生的重要组成部分, 直接关系到每个人的身体健康和生活质量。减少食源性疾病是保障食品安全的重要控制目标, 而微生物性病原又是全球公认的最主要的食源性疾病危害因素之一^[1-4]。为了确保我国食品的安全, 我国食品安全法规定 GB 4789 系列方法为我国食品中微生物检测的强制性检验方法, 其中菌落总数测定作为最基本检测项目, 用于判定食品样品被微生物污染的程度及卫生质量^[4-5]。当前 GB 4789.2—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落数测定》推荐使用传统的平板计数方法, 该方法存在费时费力、计数结果容易受到操作人员与所用培养基等因素影响等缺点^[5-7]。

随着生物技术的发展, 新型菌落总数分析方法—测试片检测方法被报道, 该方法使用特定纸片作为培养基载体, 并将特定的培养基和显色物质放置纸片上, 最终通过观察微生物生长以及显色变化, 从而对样品中所含微生物进行分析^[8-13]。由于方法简单、高效, 经验证已被美国和加拿大等国家批准用于食品相关检测^[14-18]。目前我国研究人员也对两种不同检测方法进行了对比分析, 但主要集中在对单一食品^[19]或人工染菌食品^[7]进行比较研究。为了更加系统地比较测试片检测方法和传统平板计数方法, 本研究选择 7 大类不同食品样品共计 70 批进行菌落总数对比分析, 在此基础上, 将在实际中最常见的两种食源性微生物金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌作为标准菌株, 制备人工染菌食品进一步验证研究, 探讨两种方法检测结果的相关性, 从而为后续测试片检测方法在不同层级食品承检机构的应用提供数据基础。

1 材料与方法

1.1 标准菌株

金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003、大肠埃希菌

CMCC(B)44102(中国食品药品检定研究院医学细菌保藏管理中心)。

1.2 试剂与仪器

平板计数琼脂培养基(plate count agar, PCA, 北京陆桥技术股份有限公司); 菌落总数测试片(3M 中国有限公司)。

PL2002 电子天平(感量为 0.0001 g, 瑞士梅特勒-托利多公司); Thermo 1389 生物安全柜、PR 205050 GCN 恒温生化培养箱(美国 THERMO 公司)。

1.3 试验样品类型

本研究选择 7 大类不同类型食品样品, 包括肉制品、面食、冷饮、奶制品、豆制品、果蔬和坚果, 每大类包括 10 种样品, 共计 70 批食品样品。样品均采购自北京各大超市或市场。参考文献[5]方法, 进行试验样品预处理。针对固体和半固体样品: 分别取 25 g(固体或半固体食品)或 25 mL(液体食品)样品加入盛有 225 mL 灭菌生理盐水的无菌均质袋中, 制成待检样品与灭菌生理盐水稀释液 1:10 (V:V) 的样品匀液, 并依次 10 倍系列稀释至 10^{-6} 备用。

1.4 GB 4789.2—2016 平板计数方法

参考 GB 4789.2—2016 推荐方法进行, 预估不同食品样品污染状况, 选择 3~4 个适宜稀释度的样品匀液, 分别吸取 1 mL 样品匀液于无菌平板内, 每个稀释度做两个平行。然后将冷却的琼脂培养基倾注平板, 混合均匀。放置于 36℃ 培养 48 h 后, 肉眼计数平板计数琼脂培养基上的所有菌落。

1.5 测试片检测方法

按照厂家推荐方法, 针对不同食品类型, 选择 3~4 个适宜稀释度的样品匀液, 分别吸取 1 mL 样品匀液垂直滴加在测试片上, 将上层膜盖上, 使样品均匀覆盖于培养基表面; 每个稀释度做两个平行, 静置 1 min 使培养基凝固, 放置于 36℃ 培养 48 h 后, 计数所有测试片上的红色菌落。

1.6 人工污染样品制备及菌落总数检测分析

将上述不同类型食品样品经菌落总数计数后, 对未见菌落生长的样品, 参考文献[4]方法, 进行人工染菌, 制备人工污染样品, 进一步用于两种方法比较验证研究。即将金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003 和大肠埃希菌 CMCC(B)44102 新鲜菌苔制备麦氏浊度为 2.0 的菌悬液, 将菌悬液进行 10 倍梯度稀释, 混匀后, 作为接种液。将 1 mL 的接种液与 9 mL 上述配制 1:10 的样品匀液中混匀, 使得样品终浓度为 $10^2 \sim 10^3$ CFU。并将制备好的样品重新应用传统平板计数和测试片方法进行检测分析。

1.7 数据处理和统计学分析

将所有检测菌落总数计数结果转化为常用对数后, 依据 ISO 16140-2 2016 推荐的数据处理方法进行分析, 计算两种方法检测结果对数值差值及其平均值, 分析不同方法之间的结果差异性。当两种方法检测结果对数值差值的平均值 ($d \log$) < 0.50, 就表示两种方法无显著性差异; 同时, 采用 SPSS 20.0 对两种方法分析的数据进行单因素方差分析, 当 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义, 并进行两种方法的检测结果相关性分析。

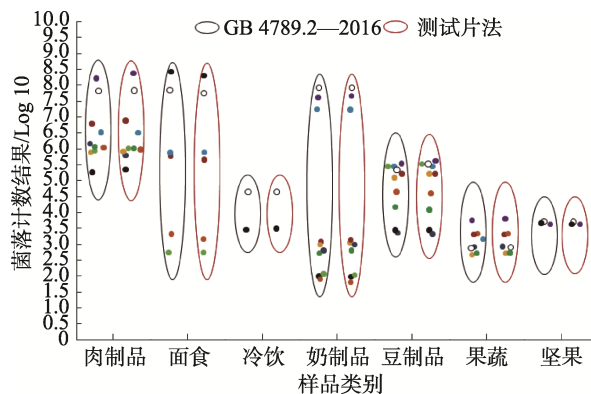
2 结果与分析

2.1 不同天然样品结果比较分析

对采集 70 份食品样品检测发现, 传统平板计数和测试片检测方法结果均显示其中 22 份样品(包括 4 份面食、8 份冷饮、3 份果蔬和 7 份坚果)未发现菌落。而其余样品经两种不同方法检测均发现有菌落生长。本研究菌落总数前 3 位的食品分别为豆沙春卷、京酱肉丝和鲜猪皮, 传统平板计数结果分别为 3.25×10^8 、 2.72×10^8 、 1.38×10^8 CFU/g; 测试片方法检测结果分别为 2.00×10^8 、 4.60×10^8 、 1.38×10^8 CFU/g。比较分析结果显示几乎所有的不同类型天然食品样品的两种方法检测结果均在同一数量级(图 1), 检测结果对数值差值范围为 0~0.41 之间, 不同类型食品对数值差值的平均值均小于 0.5(表 1)。统计学分析结果也证实传统平板计数和测试片方法检测不同类型食品的菌落数的结果无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 不同人工染菌样品结果比较分析

应用两种不同方法对 22 种基于 4 类不同食品基质制备的人工染菌样品分析, 结果显示所有样品的菌落计数结果均在 $10^2 \sim 10^3$ CFU/g (mL) 范围之内(图 2)。除了菠菜卷饼和椰子味雪糕样品的传统平板计数结果分别为 1.04×10^3 和 6.50×10^2 CFU/g, 而测试片方法结果为 9.15×10^2 和 1.80×10^3 CFU/g, 其他 20 种样品结果均在同一个数量级(图 2)。不同方法检测结果对数值差值和平均值均小于 0.5(表 1)。单因素方差统计学分析结果也发现两种方法对人工染菌样品检测结果无显著性差异($P > 0.05$)。



注: 在两种不同方法检测结果中相同颜色的散点代表同一样品, 下同。

图 1 两种不同方法检测不同类型天然食品的菌落计数结果散点图

Fig.1 Scatter plot of total bacterial colony results from 2 kinds of different methods for detecting different types of natural food samples

表 1 两种不同方法检测不同类型天然食品样品和人工染菌样品菌落总数的分析结果汇总表

Table 1 Result summary of 2 kinds of different methods for total bacterial colony in different natural and artificial contaminated food samples

食品类型	天然样品		人工染菌样品	
	n	d log ±SD	n	d log ±SD
肉制品	10	0.15±0.13	/	/
面食	6	0.17±0.09	4	0.05±0.05
冷饮	2	0.19±0.02	8	0.24±0.13
奶制品	10	0.18±0.08	/	/
果蔬	8	0.12±0.08	2	0.06±0.02
豆制品	10	0.09±0.05	/	/
坚果	3	0.13±0.14	7	0.11±0.12

注: |d log|代表不同类型食品菌落总数计数结果对数值差值的平均值; SD 为标准差, standard deviation; /表示无检出。

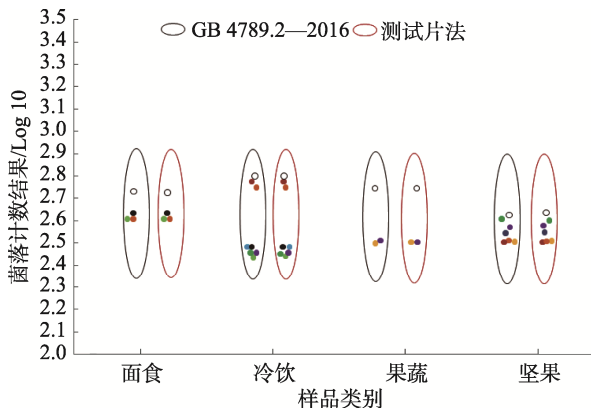


图 2 两种不同方法检测人工染菌食品的菌落计数结果散点图

Fig.2 Scatter plot of total bacterial colony results from 2 kinds of different methods for detecting artificially contaminated food

2.3 相关性分析

为了进一步比较两种菌落计数方法,分析传统平板计数和测试片方法检测结果的相关性。如图 3 所示,48 份天然食品和 22 份人工染菌食品,共计 70 份样品的两种菌落计数结果的相关系数为 0.938, $P < 0.01$,检测结果正相关,进一步表明这两种方法具有良好的一致性。

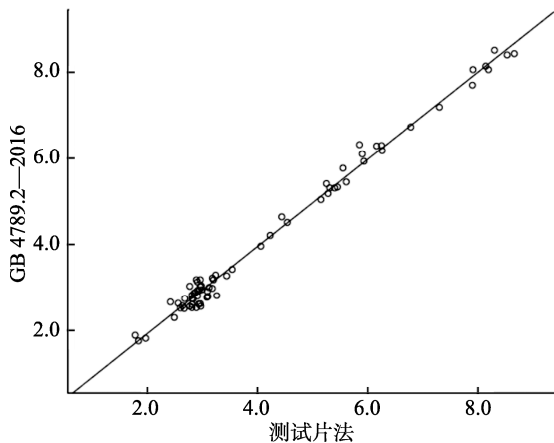


图 3 两种菌落计数方法检测结果相关性分析

Fig.3 Correlation analysis of the results by 2 kinds of bacterial colony counting methods

3 讨论与结论

当进行两种不同检测方法比较验证研究,应用不同的数据处理方法可能获得不同结论^[20-22]。为了系统比较测试片方法与传统菌落总数的 GB 4789.2—2016 平板计数方法检测结果的差异性,本研究选用 ISO 体系推荐数据分析方法以及常用单因素方差统计学分析进行数据结果处理。同时,为了兼顾常规食品检验工作或研究工作两种需求,本研究通过 7 大类 70 种食品以及 22 种人工染菌食品的比对试验,经两种不同结果数据处理分析方法证实,测试片和 GB 4789.2—2016 平板计数方法在进行不同类型食品菌落总数检测分析时结果无显著性差异,且具有高度相关性。并以此发现本研究随机选择食品中菌落总数最高的分别为豆沙春卷、京酱肉丝和鲜猪皮,提示未来应该关注上述类型食品中菌落总数所包含具体细菌种属^[23]。

不同于传统 GB 4789.2—2016 方法需要倾倒琼脂的步骤,测试片检测方法可避免对食品中所含细菌可能造成的潜在热损伤^[24-26]。测试片中包含预制备的培养基,无需人工制备平板培养基,减少操作人员影响结果的因素。且在后续在培养过程中,由于生长菌落接触测试片上层膜中含有显示指示剂,使菌落显色,可以避免 GB 4789.2—2016 方法中由于潜在的食品杂质干扰判读问题而造成的平板法计数不准确^[6,27]。使用测试片方法可简化检测工作流程,省去烦琐的洗刷及培养基制备过程,节省大量的人力和时间成

本,以及快速灵敏的检测结果,使其在国外被广泛用于食品、不同环境表面菌落总数检测以及空气环境的监控^[28-30]。

事实上,目前测试片方法尚未被国内标准采用,但在 2020 年,国家卫健委食品安全标准审评委员会秘书处发布了 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》修订版的征求意见稿,显示增加了使用菌落测试片法进行菌落总数的检测。尽管目前测试片生产水平先进,整个行业蓬勃发展,尤其是随着测试纸片的国产化后,检测成本不断下降。但当前生产测试片的厂家众多,质量也参差不齐。因此,推荐在开始使用某一厂家生产的测试片时,应与 GB 4789.2—2016 方法进行不同类型天然和人工染菌食品进行验证研究,获得该测试片在实验室的验证数据,为后续相应检测方法放行标准的制定提供科学数据支持。

综上,通过比较两种不同菌落总数检测方法,证实菌落总数测试片和 GB 4789.2—2016 平板计数方法针对不同类型食品检测结果无显著性差异,鉴于测试片具有简单、快捷、易于标准化的优点,适用于不同层级食品承检机构。

参考文献

- [1] LEHOTAY SJ. Food safety analysis [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(22): 5329-5330.
- [2] YUE M, BAI L, SONG H, *et al.* Impacts of microbial food safety in China and Beyond [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2018, 18(8): 508-509.
- [3] GIZAW Z. Public health risks related to food safety issues in the food market: A systematic literature review [J]. *Environ Health Prev Med*, 2019, 24(1): 68.
- [4] HE S, SHI X. Microbial food safety in China: Past, present, and future [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2021, 18(8): 510-518.
- [5] 国家食品药品监督管理总局科技和标准司,微生物检验方法食品安全国家标准实操指南[M].北京:中国医药科技出版社,2017. Department of Science, Technology and Standards of China Food and Drug Administration, Food microbiological examination, operation manual [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2017.
- [6] 徐蕾蕊,付博博,汪琦,等.测试片法在食品菌落总数检测中的应用研究[J].食品安全质量检测学报,2021,12(2): 472-478. XU LR, FU PB, WANG Q, *et al.* Application of test piece method in the detection of total bacterial count in food [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(2): 472-478.
- [7] 张建军,唐铁君,李晶,等.基于测试片法与平板计数法对不同类型食品中菌落总数结果的比较分析[J].食品安全质量检测学报,2021,12(14): 5606-5612. ZHANG JJ, TANG YJ, LI J, *et al.* Comparative analysis of the total number of colonies in different types of food based on the Petrifilm aerobic count method and plate count method [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(14): 5606-5612.
- [8] SINCLAIR RG, SOMSAMOUTH K, SAHAR D, *et al.* Microbial contamination in the communal-use Lao tobacco waterpipe [J]. *Int Health*, 2021, 13(4): 344-349.
- [9] MORIN MP, DUBUC J, FREYCON P, *et al.* A calf-level study on colostrum management practices associated with adequate transfer of

- passive immunity in Québec dairy herds [J]. *J Dairy Sci*, 2021, 104(4): 4904–4913.
- [10] KANG JY, LEE SH, JO AH, *et al.* Improving the accuracy of coliform detection in meat products using modified dry rehydratable film method [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2020, 29(9): 1289–1294.
- [11] ABATCHA MG, TAN PL, CHUAH LO, *et al.* Evaluation of 3M™ loop-mediated isothermal amplification-based kit and 3M™ ready-to-use plating system for detection of *Listeria* in naturally contaminated leafy vegetables, chicken, and their related processing environments [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2020, 29(8): 1141–1148.
- [12] KABERA F, DUFOUR S, KEEFE G, *et al.* Evaluation of quarter-based selective dry cow therapy using Petrifilm on-farm milk culture: A randomized controlled trial [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(8): 7276–7287.
- [13] NERO LA, DE-FREITAS CF, FLORES-CARVALHO LMV, *et al.* 3M Petrifilm lactic acid bacteria count plate is a reliable tool for enumerating lactic acid bacteria in Bacon [J]. *J Food Prot*, 2020, 83(10): 1757–1763.
- [14] MASIELLO SN, MARTIN NH, TRMČIĆ A, *et al.* Identification and characterization of psychrotolerant coliform bacteria isolated from pasteurized fluid milk [J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99(1): 130–140.
- [15] BIRD P, FLANNERY J, CROWLEY E. Evaluation of the 3M™ Petrifilm™ rapid aerobic count plate for the enumeration of aerobic bacteria: Collaborative study, first action 2015. 13 [J]. *J AOAC Int*, 2016, 99(3): 664–675.
- [16] VALLE ZD, CASATI G. Food microbiology: Comparison between traditional analysis' methods versus compact dry and 3M Petrifilm methods [J]. *Sci Tecn Lattiero-Casear*, 2009, 60(4): 347–353.
- [17] SCHUMACHER AJ, LINGLE CK, SILBERNAGEL KM, *et al.* Validation of the 3M™ Petrifilm™ coliform count plate for enumeration of coliforms in bottled water: AOAC performance tested method [J]. *J AOAC Int*, 2022, 105(3): 866–875.
- [18] KAREN MS, KATHRYN GL. 3M Petrifilm Enterobacteriaceae count plate method for enumeration of Enterobacteriaceae in selected foods: collaborative study [J]. *J AOAC Int*, 2003, 86(4): 802–814.
- [19] 赵立冬, 赵红阳, 石业娇, 等. 3M-(TM) Petrifilm-(TM)快速菌落总数测试片法与食品中菌落总数检测国标方法(GB 4789.2—2010)的比较 [J]. *中国微生态学杂志*, 2018, 30(10): 1203–1210, 1216.
- ZHAO LD, ZHAO HY, SHI YJ, *et al.* Comparison of 3M TM Petrifilm rapid aerobic count plate method with the national standard (GB 4789.2—2010) in food inspection [J]. *Chin J Microecol*, 2018, 30(10): 1203–1210, 1216.
- [20] STINGL K, HEISE J, THIECK M, *et al.* Challenging the “gold standard” of colony-forming units-validation of a multiplex real-time PCR for quantification of viable *Campylobacter* spp. in meat rinses [J]. *Int J Food Microbiol*, 2021, 359: 109417.
- [21] PACHOLEWICZ E, BUHLER C, WULSTEN IF, *et al.* Internal sample process control improves cultivation-independent quantification of thermotolerant *Campylobacter* [J]. *Food Microbiol*, 2019, 78: 53–61.
- [22] JOHNSON R, MILLS J, PITTET JL, *et al.* Evaluation of the GENE-UP®*Cronobacter* method for the detection of *Cronobacter* species in select foods and environmental surfaces: Collaborative study [J]. *J AOAC Int*, 2020, 103(1): 184–196.
- [23] 张小妹. 北京召回六批次问题食品存在大肠杆菌、菌落总数超标等问题[EB/OL]. [2016-02-27]. https://www.sohu.com/a/60815959_115402 [2021-03-10].
- ZHANG XM. Six batches of problematic food recalled in Beijing have problems such as *Escherichia coli* and excessive total bacterial count [EB/OL]. [2016-02-27]. https://www.sohu.com/a/60815959_115402 [2021-03-10].
- [24] FENG G, HEW A, MANOHARAN R, *et al.* Impact of mannanase-producing *Bacillus* spp. on the accuracy of the 3M Petrifilm aerobic count method [J]. *J Food Prot*, 2017, 80(7): 1117–1122.
- [25] BIRD P, FLANNERY J, CROWLEY E, *et al.* Evaluation of the 3M™ Petrifilm™ rapid yeast and mold count plate for the enumeration of yeast and mold in food: Collaborative study [J]. *J AOAC Int*, 2015, 98(3): 767–783.
- [26] BIRD P, BASTIN B, KLASS N, *et al.* Evaluation of the 3M™ Petrifilm™ rapid *E. coli*/coliform count plate for the enumeration of *E. coli* and coliforms: Collaborative study [J]. *J AOAC Int*, 2020, 103(2): 513–522.
- [27] MORIN MP, DUBUC J, FREYCON P, *et al.* Short communication: Diagnostic accuracy of the Petrifilm culture system for identifying colostrum with excessive bacterial contamination in Quebec dairy herds [J]. *J Dairy Sci*, 2021, 104(4): 4923–4928.
- [28] BENESH DL, CROWLEY ES, BIRD PM. 3M Petrifilm environmental *Listeria* plate [J]. *J AOAC Int*, 2013, 96(2): 225–228.
- [29] KANAGAWA S, OHSHIMA C, TAKAHASHI H, *et al.* Evaluation of Petrifilm lactic acid bacteria plates for counting lactic acid bacteria in food [J]. *J Food Prot*, 2018, 81(6): 1030–1034.
- [30] MEGAHED A, ALDRIDGE B, LOWE J. The microbial killing capacity of aqueous and gaseous ozone on different surfaces contaminated with dairy cattle manure [J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0196555.

(责任编辑: 韩晓红 张晓寒)

作者简介



陈怡文, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为食品微生物。

E-mail: cyw5437@126.com



徐颖华, 博士, 研究员, 主要研究方向为细菌性疫苗质量控制与微生物资源标准化研究。

E-mail: xuyh@nifdc.org.cn



崔生辉, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: cuishenghui@aliyun.com