

大肠菌群测量审核结果与分析

杨俊业*, 黄玲玲

(广东产品质量监督检验研究院, 佛山 528300)

摘要: **目的** 通过测量审核提升食品中大肠菌群检测能力和实验室质量管理水平。**方法** 以测量审核作业指导书、GB 4789.3-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》第二法平板计数法为依据, 采用平板计数法、Petrifilm™ 大肠菌群测试片法同时检测样品。运用配对 t 检验法评价 2 种不同方法对乳粉中大肠菌群计数结果一致性的影响。**结果** 平板计数法与 Petrifilm™ 大肠菌群测试片法检测结果无明显差异, 样品 $|Z| < 2$, 结果满意。**结论** 可根据实际情况来选择相应方法检测食品中大肠菌群以提高检测效率和质量。**关键词:** 大肠菌群; 测量审核; 测试片

Results and analysis of coliform bacteria measurement audit

YANG Jun-Ye*, HUANG Ling-Ling

(Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Foshan 528300, China)

ABSTRACT: Objective To improve coliform detection ability and laboratory quality management level in food through measurement review. **Methods** Based on the measurement and verification work instructions and the second plate counting method of GB 4789.3-2016 National food safety standard-Food microbiology test-Coliform group count, the samples were simultaneously detected by plate counting and Petrifilm™ coliform test strips. The effects of 2 different methods on the consistency of coliform count results in milk powder were evaluated by paired t test. **Results** There was no significant difference between the plate count method and Petrifilm™ coliform group test tablet method, $|Z| < 2$, and the result was satisfactory. **Conclusion** The coliform bacteria in food can be detected according to the actual situation to improve the detection efficiency and quality.

KEY WORDS: coliform bacteria; measurement audit; test pieces

1 引言

测量审核作为能力验证计划之一, 是指参加者对被测物品(材料或制品)进行实际测试, 其测试结果与参考值进行比较的活动, 相对于实验室间比对等其他能力验证, 测量审核能够对参加者进行“一对一”能力评价^[1]。因其没有实验室数量的限制, 实施周期短, 样品及测试项目类型选择范围广, 故更具广泛性、常态性和实时性等优势,

测量审核数据也是中国合格评定国家认可委员会(China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS)判断实验室能力的重要技术依据^[2]。通过对测量结果的满意度判定来验证或者是校准的能力^[2]。

大肠菌群属于需氧和兼性厌氧革兰氏阴性无芽胞杆菌, 在一定培养条件下能发酵乳糖、产酸产气。作为世界大多数国家和组织评价食品卫生质量的重要安全性指标之一, 食品中大肠菌群的数量, 表明该食品被粪便污染的程度, 也反映对人体健康危害性风险的大小^[3-5]。GB

*通讯作者: 杨俊业, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: 345805309@qq.com

*Corresponding author: YANG Jun-Ye, Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Foshan 528300, China. E-mail: 345805309@qq.com

4789.3-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验大肠菌群计数》^[6]第一法最可能数(most probable number, MPN)计数法适用于大肠菌群含量较低的食品中大肠菌群的计数, 但 MPN 法是微生物学和统计学结合的一种定量检测法, 其操作繁琐, 且精密度低, 因此有关大肠菌群限量的食品安全国家标准大都推荐采用平板计数法^[5]。第二法平板计数法适用于大肠菌群含量较高的食品中大肠菌群的计数。平板计数法是以结晶紫中性红胆盐琼脂作为培养基, 其中含有的乳糖能够被大肠菌群利用发酵, 产酸产气, 3 号胆盐和结晶紫能抑制革兰氏阳性菌, 并且在中性红指示剂的作用下大肠菌群形成可计数的红色或紫色, 带有或不带有沉淀环^[6]。

PetrifilmTM 大肠菌群测试片为即时可用产品, 此方法以可溶性冷水凝胶为载体, 加入改良的结晶紫中性红(violet red bile, VRB)培养基和显色剂, 大肠菌群经过培养后会产酸产气^[7], 大肠菌群分解乳糖所产生的气体会被 PetrifilmTM 大肠菌群测试片顶膜封住, 因此可以直接确认并计数测试片上带有气泡的红色菌落为大肠菌群^[8], 无需再做进一步验证。

本次测量审核实验以 GB 4789.3-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验大肠菌群计数》第二法平板计数法为依据, PetrifilmTM 大肠菌群测试片法作为对比方法, 同时检测样品, 运用配对 *t* 检验法评价 2 种不同方法对乳粉中大肠菌群计数结果一致性的影响, 为食品中大肠菌群的计数检验以及日后实验室检测食品大肠菌群工作的优化提供参考和依据。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

样品序号为 MA-FD-004, 中国检验检疫科学研究院测试评价中心提供, 白色冻干块状, 包装于真空西林瓶内。

结晶紫中性红胆盐琼脂(violet red bile agar, VRBA)、煌绿乳糖胆盐(brilliant green gactose bile, BGLB)肉汤(广东环凯微生物科技有限公司); PetrifilmTM 菌落总数测试片(3M 中国有限公司)。

CL-40M 高压灭菌锅(日本 ALP 公司); dilumat S 电子稀释器、Easymix 拍击式均质器(法国 AES Chemunex 公司); STERI250 玻璃热珠灭菌器(瑞士 Simon Keller 公司); AC2-6S1 生物安全柜(新加坡 ESCO 公司); GHP-9160 隔水式恒温培养箱(上海一恒科技有限公司)。

2.2 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》^[9]对样品进行前处理并以 GB 4789.3-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验大肠菌群计数》第二法平板计数法为依据, PetrifilmTM

大肠菌群测试片法作为对比方法同时检测样品。

2.3 实验方法

2.3.1 检测样品制备

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 40 mL 灭菌稀释液再水化, 本次选择的稀释液为无菌生理盐水。无菌开启西林瓶后立即加入 4 mL 无菌生理盐水进行再水化。待溶解后, 吸出放入无菌瓶中, 再反复用余下的 36 mL 生理盐水清洗西林瓶内壁, 回收清洗液放入上述无菌瓶中, 此溶液即是待测样品原液(本次冻干的样品等同 40 mL 的乳品样品)。

2.3.2 国标法(平板计数法)

依据 GB 4789.3-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验大肠菌群计数》第二法平板计数法对 2.3.1 中的样品原液进行检测。

2.3.3 PetrifilmTM 大肠菌群测试片法

PetrifilmTM 大肠菌群测试片法的稀释步骤与 2.3.2 中的平板计数法相同。选择 $10^0 \sim 10^7$ 的稀释度, 每个梯度吸取 2 mL, 各加 1 mL 至 2 张测试片中, 加完样液后轻轻盖好测试片的上层膜, 注意避免产生气泡, 必要时可以使用专用压板将样品压匀。置于培养箱(36 ± 1) °C 培养 18~24 h, 计数在测试片上出现的菌落数在 15~150 之间的带气泡的红色菌落。

2.3.4 配对 *t* 检验法比较 2 种方法检测乳粉中大肠菌群计数结果

采用上述 2 种方法同时检测, 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^[10]。

3 结果与分析

平板计数法和 PetrifilmTM 大肠菌群测试片检测样品中大肠菌群计数结果见于表 1。对计数结果进行配对 *t* 检验, 检测结果均为 2 次平行实验结果的平均值。平板计数法和 PetrifilmTM 大肠菌群测试片法两两配对, 运用 SPSS(SPSS Statistics17.0 版本)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 2, 2 种方法对比分析见表 3。

由表 2 可以看出, 平板计数法、PetrifilmTM 大肠菌群测试片法对样品检测结果的均值分别为 447 和 472 CFU/mL。根据 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》^[11]规定, 平板计数方法中平行平板的平均值是允许带有小数点的, 但是乘以稀释倍数后, 必须修约, 以整数表示, 结果保留 2 位有效数字^[12]。因此平板计数法和 PetrifilmTM 大肠菌群测试片法检测结果应修约后报告为 450 和 470 CFU/mL。标准差分别是 61.5 和 64.8。标准差平板计数法标准差 < PetrifilmTM 大肠菌群测

表 1 2 种方法对样品的检测结果
Table 1 Test results of samples by 2 methods

检测编号	国标法(平板计数法) /(CFU/mL)	Petrifilm™ 大肠菌群测试 片法/(CFU/mL)
1	300	560
2	400	570
3	460	430
4	520	560
5	450	400
6	450	450
7	510	420
8	470	440
9	450	450
10	460	440
平均值	450	470

试片法标准差,但由于平板计数法和 Petrifilm™ 大肠菌群测试片法标准差相差不大,说明这两者的检测结果没有出现较大的波动性,不影响结果的复现。平板计数法和 Petrifilm™ 大肠菌群测试片法检测结果的显著性值 P 为 0.482,大于 0.05,说明 2 种方法检测出来的结果差异不显著,一致性较好。

4 结 论

本研究结果表明,国标法(平板计数法)、Petrifilm™ 大肠菌群测试片法用于检测乳粉中大肠菌群效果总体差异不大,但 Petrifilm™ 大肠菌群测试片法检测结果略高于国标法(平板计数法),可能缘于 Petrifilm™ 大肠菌群测试片采用冷接种方式,避免热损伤对大肠菌群计数的影响^[13]。姜勇等^[5]经过试验证明,与平板计数法相比,Petrifilm™ 大肠菌群测试片能显著促进受损大肠菌群的复苏。

表 2 样品检测结果的基本描述统计量及 t 检验结果(n=10)
Table 2 Statistics and t test analysis of detection results(n=10)

检测方法	均值/(CFU/mL)	标准差/(CFU/mL)	均值的标准误差/(CFU/mL)	P
国标法(平板计数法)	447.0000	61.47267	19.43936	0.482
Petrifilm™ 大肠菌群测试片法	472.0000	64.77311	20.48306	

表 3 两种方法对比分析
Table 3 Comparative analysis of 2 methods

国标法(平板计数法)		Petrifilm™ 大肠菌群测试片法
计数原理	CFU 计数	CFU 计数
操作步骤	平板;加样;分析不同的典型菌落;发酵再验证;计算;报告	加样;计数典型菌落并分析;报告
培养时间	72 h	24 h
报告单位	CFU/g 或 CFU/mL	CFU/g 或 CFU/mL

平板计数法中,初次加入培养基后,需放置一段时间再覆盖一层培养基来抑制菌落蔓延;做进一步验证试验时,需区分不同典型菌落。Petrifilm™ 大肠菌群测试片法可以直接确认并计数测试片上带有气泡的红色菌落。省去了制备培养基/琼脂的繁琐步骤,操作更简便;检测时间从平板计数法的 72 h 缩短至 24 h,在更短的时间内获得样品的测试结果,且检测结果的波动性较小,有利于提高实验室检测效率及实验质量。不过,Petrifilm™ 大肠菌群测试片法检测成本相对较高,因此实际操作时可根据具体情况来选择相应方法,这样既可确保检测的准确性,又可提高检测速度。

中国检验检疫科学研究院测试评价中心反馈本实验

室此次上报结果 $Z=-1.1$ 。按照 $|Z| \leq 2.0$ 为满意结果, $2.0 < |Z| < 3.0$ 为可疑结果, $|Z| \geq 3.0$ 为离群结果的原则^[14,15],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^[3],出具的检验报告具有高度的可靠性^[16]。检测机构可利用此手段监控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。

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] 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]. *Chin Measur Test Technol*, 2012, (38): 107–110.
- [4] 程池, 李金霞, 姚栗, 等. 食品安全国家标准食品微生物检验标准菌株图鉴[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2014.
- Cheng C, Li JX, Yao L, *et al.* National food safety standard food microbiological analysis standard strain field guide [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2014.
- [5] 姜勇, 刘振涛, 马淑棉, 等. 不同接种方式对食品中热损伤大肠菌群检测的比较研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(14): 3745–3748.
- Jiang Y, Liu ZT, Ma SM, *et al.* Comparative study of different inoculation methods for detection of heat-injured coliforms in food [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(14): 3745–3748.
- [6] GB 4789.3-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数[S].
- GB 4789.3-2016 National food safety standard-Food microbiology test-Enumeration of coliforms [S].
- [7] 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.
- Wang JN, Xiao QW, Wang YR, *et al.* Research progress of food microorganism test slip [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(2): 701–705.
- [8] 刘秀梅, 卢行安, 顾其芳, 等. AOAC 991.14 Petrifilm™ 大肠菌群测试片法与 GB 4789.3 大肠菌群计数法的比较研究[J]. *中国食品学报*, 2010, 10(6): 167–172.
- Liu XM, Lu XA, Gu QF, *et al.* Evaluation of AOAC 991.14 Petrifilm™ methods and GB 4789.3 methods for enumeration of coliform in foods [J]. *J Food Saf Qual*, 2010, 10(6): 167–172.
- [9] ACAS-TR 710-06-03/00 测量审核作业指导书[Z].
- ACAS-TR 710-06-03/00 Work instruction of measurement audit [Z].
- [10] 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.
- Huang LL, Liu H, Huang BY, *et al.* Comparison of 3 different media and Petrifilm™ for detection of total bacterial count in water-soluble cosmetics [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(10): 2446–2450.
- [11] 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[S].
- GB 4789.2-2016 National food safety standard-Food microbiology test-Detection of aerobic bacterial count [S].
- [12] 王世福, 孙志伟. 食品微生物检验数据处理和结果报告[J]. *食品安全导刊*, 2017, (24): 90–91.
- Wang SF, Sun ZW. Data processing and results of food microbiological inspection [J]. *China Food Saf Magaz*, 2017, (24): 90–91.
- [13] EN ISO 16140 validation of the 3MT™ Petrifilm™ coliform count plates (CC) for total coliforms enumeration with regard to the ISO 4832 reference method [S].
- [14] GB/T 28043-2011/ISO 13528:2005 利用实验室间比对进行能力验证的统计方法[S].
- GB/T 28043-2011/ISO 13528:2005 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons [S].
- [15] 侯美倩. 实验室比对结果评价方法[J]. *山东化工*, 2018, 47(20): 60–62.
- Hou MQ. Evaluation method of laboratory comparison results [J]. *Shandong Chem Ind*, 2018, 47(20): 60–62.
- [16] 方莹, 樊惠华, 刘亚芬, 等. 生活饮用水中微生物学检验能力验证的结果与分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(11): 2652–2656.
- Fang Y, Fan HH, Liu YF, *et al.* Results and analysis of detection ability for microbiological parameters in drinking water [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(11): 2652–2656.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



杨俊业, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 345805309@qq.com