

食品微生物定量检测内部质量控制方法的应用

郭启新^{1*}, 张 蕾¹, 张妮妮¹, 赵 芳¹, 杨碧垚², 和小梅²

(1. 大理州质量技术监督综合检测中心, 大理 671000; 2. 宾川县食品药品检验检测院, 大理 671600)

摘 要: **目的** 加强实验室食品微生物定量检测的内部质量控制。**方法** 以蜂蜜中嗜渗酵母检测为例, 根据内部质量控制技术以及 GB 14963-2011《食品安全国家标准 蜂蜜》的要求, 采用空白对照、暴露实验、培养基质控、人员比对、加标回收、方法比对实验, 对检测过程和结果进行质量控制。**结果** 空白对照和暴露实验结果有效, 生长率为 0.81, 人员比对绝对差值 $0.21 \log_{10}(\text{CFU/g})$, 加标回收率 73%~93%, 方法比对绝对差值 $0.11 \log_{10}(\text{CFU/g})$ 。**结论** 该方法可用于食品微生物定量检测的内部质量控制。

关键词: 食品微生物; 定量检测; 内部质量控制

Application of internal quality control method in food microbiological quantitative detection

GUO Qi-Xin^{1*}, ZHANG Lei¹, ZHANG Ni-Ni¹, ZHAO Fang¹, YANG Bi-Yao², HE Xiao-Mei²

(1. Dali Quality and Technical Comprehensive Supervision Testing Center, Dali 671000, China;
2. Binchuan Institute for Food and Drug Control, Dali 671600, China)

ABSTRACT: Objective To strengthen the internal quality control of food microbiological quantitative detection in laboratory. **Methods** The detection of *Osmophilic yeast* in honey was taken as an example, according to the internal quality control technical requirements and GB 14963-2011 *Honey*, blank control, exposure experiment, culture medium quality control, personnel comparison, spike recovery, method comparison experiment were used to perform quality control on the detection process and results. **Results** Blank control and exposure experiment results were valid, the growth rate was 0.81, the absolute difference of personnel comparison was $0.21 \log_{10}(\text{CFU/g})$, the recovery rates were 73%~93%, and the absolute difference of method comparison was $0.11 \log_{10}(\text{CFU/g})$. **Conclusion** This method can be used for internal quality control of food microbial quantitative detection.

KEY WORDS: food microorganism; quantitative determination; internal quality control

1 引 言

微生物定量检测是按照一定的检测程序和质量控制措施, 确定单位样品中某种或某类微生物的数量。由于微生物本身及其在食品中的分布特点, 食品微生物检验通常不可复检, 这是有别于食品理化检验的最大特点, 正是因为不可复检, 不正确的结果将对客户带来不必要的损失, 同时也造成公众对于微生物检验结果的质疑和不信任, 所

以对于微生物检测结果的质量控制工作尤为重要。

食品微生物内部质控方式有多种, 可以通过标准物质核查、实验室内部比对、留样再测、加标回收、空白试验、重复性测试、使用质量控制图等方式开展实验室内部技术验证活动, 进一步对实验室人员、仪器设备、检测程序和工作质量有更为客观的了解和评价, 有利于对发现的问题及时进行纠正^[1-3]。尽管实验室认证认可体系文件对微生物检测结果的质量保证进行了相应的规定和要求^[4-7],

*通讯作者: 郭启新, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 45542746@qq.com

*Corresponding author: GUO Qi-Xin, Engineer, Dali Quality and Technical Comprehensive Supervision Testing Center, Dali 671000, China. E-mail: 45542746@qq.com

但是因为有关文件及标准规定过于笼统,可操作性不强,特别是食品微生物检测质量控制方式、质量控制评价方法等都没有进行具体细化,基层实验室理解不一致,造成实验室间做法不一,检测结果的有效性不强,凸显实验室的食品微生物检测结果质量能力不足和方法偏颇。

本研究以蜂蜜中嗜渗酵母检测为例,采用空白试验、暴露实验、培养基质控、人员比对、加标回收、方法比对实验对检测过程和结果进行内部质控,旨在合理有效开展微生物定量检测内部质量控制工作。

2 材料与方 法

2.1 仪器、试剂与材料

葡萄糖(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);氯硝胺 18%甘油 DG18(批号:1066181,广东环凯微生物科技有限公司);沙氏培养基(广东环凯微生物科技有限公司);嗜渗酵母工作菌株(嗜渗-Y3-2019121805-01,实验室保存);市售蜂蜜样品。

BG-160 隔水式电热恒温培养箱(上海博迅实业);YXQ-LS-75G 型高压灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);JY 系列电子天平(上海方瑞仪器有限公司);MS3 型漩涡混合器(德国 IKA 公司);Millipore-Direct-Q5 纯水机(美国 Millipore 公司);SJ-CJ-2F(D)超净工作台(苏洁医疗器械有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 空白对照和暴露实验

按照 GB 14963-2011《食品安全国家标准 蜂蜜》^[8]要求进行接种、培养和计数,同时做空白对照。为了监测检测环境对检测结果影响,本次实验按照 GB 16294-2010《医药工业洁净室(区)沉降菌的测试方法》^[9]对超净工作台环境进行沉降菌监测的暴露实验。

2.2.2 生长率实验

按照 GB 4789.28-2013《食品安全国家标准食品微生物学检验培养基和试剂的质量要求》^[10]要求,采用实验室分离保存一株嗜渗酵母菌株(嗜渗-Y3-2019121805-01)对选择性培养基 G18 生长率指标质控,生长率计算公式为:

$$P_R = \frac{N_s}{N_o} \quad (1)$$

其中, P_R 为生长率; N_s 为 G18 培养基平板上得到的菌落总数; N_o 为参比培养基平板上得到的菌落总数。

2.2.3 接种方法和菌落计数

选取 1 名熟练操作检测人员,分别以 a、b、c、d 方式对同一稀释度菌悬液进行涂布接种和菌落计数,其中 a: 分别取 0.1 mL 稀释液,平行接种 2 个平板,计算 2 个平板菌落数平均值; b: 取 1 mL 接种液,每个平板接种 0.1 mL,平行接种 10 个平板,计算 10 个平板菌落数之和; c: 取

1 mL 接种液,每个平板接种 0.2 mL,平行接种 5 个平板,计算 5 个平板菌落数之和; d: 取 1 mL 接种液,分别接种 0.3 mL、0.3 mL、0.4 mL 共 3 个平板,计算 3 个平板菌落数之和;其中 a 接种方式为国家标准 GB 14963-2011 方法^[8]。

3 结果与分析

3.1 空白对照和暴露试验

按照 2.2.1 方法进行空白对照和暴露实验,空白对照和暴露实验的结果均未生长,说明本次实验结果有效。

3.2 培养基质控

挑取单一菌落,用稀释液制备 10 倍系列稀释的菌悬液,选择并移取合适稀释度的工作菌悬液 0.1 mL,均匀涂布接种于待测平板 G18 和参比平板(沙氏葡萄糖琼脂),每一稀释度接种两个平板,25 °C、培养 7 d 后进行菌落计数。各稀释度培养基检测结果见表 1。选择接种水平为 20~200 CFU 平板进行生长率计算,从表 1 可知,采用 10^{-6} 稀释度检测结果按公式(1)计算生长率为 0.81。按照 GB 4789.28-2013 对选择性计数固体培养基上目标菌的生长率一般不小于 0.7 要求^[10],该批次 G18 培养基质量符合要求。

表 1 各稀释度培养基检测结果
Table 1 Testing results of each dilution

稀释度	G18 培养基结果/(CFU/g)	参比培养基结果/(CFU/g)
10^{-4}	多不可计	多不可计
10^{-5}	多不可计	多不可计
10^{-6}	130	160
10^{-7}	13	14

3.3 方法比对与加标回收实验

称取市售蜂蜜 25 g,置于 225 mL 已灭菌 30%葡萄糖水溶液中,加入 0.1 mL $10^5 \sim 10^7$ CFU/mL 菌悬液,混匀,制备成一定浓度的菌悬液稀释液,按照 2.2.3 规定 4 种方法分别涂布接种、培养和计数,计算每克样品中嗜渗酵母数。同时取 0.1 mL 同一稀释度菌悬液倾注平板,接种两个平板,作接种量计数用。倾注平板法接种、培养和菌落计数,接种量为 4.4×10^3 CFU/g。4 种接种方式检测结果见表 2, b、c、d 3 种接种方法检测结果绝对差值最大值 c 为 0.11 \log_{10} (CFU/g),参照 SN/T 1800-2006 对重复性要求,单次实验绝对差值不大于 0.25 \log_{10} (CFU/g)^[11],4 种接种方法检测结果均满足要求,说明接种量对检测结果无影响,4 种接种方法中 a 接种方式最简单,易操作。另外, a 接种方法回收率最低为 73%, c 接种方法回收率最高为 93%。b、c、d 3 种接种方法回收率差别不大,但 c 接种方法结果最接近接

种量 4.4×10^3 CFU/g。d 接种方法较 b 和 c 简单, 但接种量较大, 涂布后培养基不易吸收, 影响检测结果。

3.4 人员比对

从 2 个取得相应资质实验室中选取 6 名熟练操作的检测人员, 按照 GB 14963-2011 独立进行检测^[8], 检测结果见表 3, 6 名检测人员中, A 检测结果最小, C 检测结果最大, 以 A 检测结果作为参考值, 取对数最大绝对差值为 $0.21 \log_{10}(\text{CFU/g})$, 参照 SN/T 1800-2006 对再现性绝对差值不大于 $0.45 \log_{10}(\text{CFU/g})$ 要求^[11], 6 名检测人员检测结果均满意。

4 结论与讨论

本研究结果显示, 3 种涂布接种方法与国家标准 GB 14963-2011 检测结果取对数绝对差值均小于 $0.25 \log_{10}(\text{CFU/g})$, 加标回收率为 73%~93%, 参照 GB4789.28-2013 对选择性培养基生长率大于等于 0.7 质控, 说明 4 种涂布接种方法均能满足要求。本研究中 a 接种方法回收率偏低, 可能与涂布法接种、稀释液浓度

和接种量有关。涂布法接种量较小, 涂布过程中涂布棒会沾取一定量稀释液, 因而造成涂布法计算结果较倾注法结果偏低, 且同一稀释度两个平板计数结果较难平行^[12], 但涂布法较倾注法能更好地观察嗜渗酵母菌落大小和典型菌落形态^[13], 由于蜂蜜中微生物种类较多, 为使检测结果更准确可靠, 应选择合适接种量, 采用涂布法接种。在日常检测中, 建议每个稀释度取 1 mL 接种液, 每个平板接种 0.2 mL, 平行接种 5 个平板, 计算 5 个平板菌落数之和。

食品微生物定量检测的内部质控在实施过程中有其专业特点和技术要求, 本文结合实验室的实际情况, 参考有关微生物质量保证的标准、试验方法等技术文件, 对微生物定量检测过程和结果采用人员比对、培养基质控、方法验证等质控方法是可行的。在日常检测工作中, 实验室应定期使用标准菌株或从样品分离保存菌株以一种或多种方式开展微生物定量检测内部质控, 另外, 有计划参加实验室间能力验证, 及时发现问题, 采取措施, 确保检测结果准确可靠^[14,15]。

表 2 方法比对结果与回收率
Table 2 Results and recovery of method comparison

接种方法	检测结果/(CFU/g)	取对数/[$\log_{10}(\text{CFU/g})$]	与 a 取对数结果绝对差值/[$\log_{10}(\text{CFU/g})$]	回收率/%
a	3200	3.51	0	73
b	4100	3.61	0.10	91
c	4200	3.62	0.11	93
d	3900	3.59	0.08	87

表 3 人员比对结果与数据处理
Table 3 Results and data processing of personnel comparison

人员	检测结果/(CFU/g)	取对数/[$\log_{10}(\text{CFU/g})$]	与 A 取对数绝对差值/[$\log_{10}(\text{CFU/g})$]
A	3200	3.51	0
B	4600	3.66	0.11
C	5300	3.72	0.21
D	3500	3.54	0.03
E	3700	3.57	0.06
F	4100	3.61	0.10

参考文献

- [1] 柳宏斌, 胡鹏, 王银平. 浅议食品微生物检验及其质量控制[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(9): 2624-2628.
- [2] 郑晶. 浅谈食品微生物实验室内部技术验证工作[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(6): 540-542.
- [3] 范媛媛, 王树祥. 食品微生物实验室内部质量控制[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 12(17): 2322-2323.
- [4] 范 YY, 王 SX. Internal quality control of microorganism testing laboratory of food [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 12(17): 2322-2323.
- [5] Zheng J. Brief discussion on internal technical verification of food microbiology laboratory [J]. Chin J Food Hyg, 2006, 18(6): 540-542.

- [4] CNAS-CL 01-2018 检测和校准实验室能力认可准则[S].
CNAS-CL 01-2018 Accreditation criteria for the competence of testing and calibration laboratories [S].
- [5] CNAS-CL 01-A001-2018 检测和校准实验室能力认可准则在微生物检测领域的应用说明[S].
CNAS-CL 01-A001-2018 Guidance on the application of testing and calibration laboratory competence accreditation criteria in the field of microbiological testing [S].
- [6] RB/T 214-2017 检验检测机构资质认定能力评价 检验检测机构通用要求[S].
RB/T 214-2017 Competence assessment for inspection body and laboratory mandatory approval-General requirements for inspection body and laboratory [S].
- [7] GB/T 27405-2008 实验室质量控制规范 食品微生物检测[S].
GB/T 27405-2008 Laboratory quality control standard-Food microorganism detection [S].
- [8] GB 14963-2011 食品安全国家标准 蜂蜜[S].
GB 14963-2011 National food safety standard-Honey [S].
- [9] GB 16294-2010 医药工业洁净室(区)沉降菌的测试方法[S].
GB 16294-2010 Test method for settling microbe in clean room (zone) of the pharmaceutical industry [S].
- [10] GB 4789.28-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求[S].
GB 4789.28-2013 National food safety standard-Food microbiology examination-Quality requirements of culture medium and reagents [S].
- [11] SN/T 1800-2006 食品和动物饲料微生物学 30℃菌落计数方法[S].
SN/T 1800-2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Colony-count method at 30 °C [S].
- [12] 苏华, 罗兆飞, 覃艳淑, 等. 倾注法与涂布法对蜂蜜中嗜渗酵母计数的比较分析[J]. 福建畜牧兽医, 2017, 39(2): 9-12.
Su H, Luo ZF, Qin YS, *et al.* Comparative analysis of the osmophilic yeast counting in honey by pouring method and coating method [J]. Fujian J Anim Husb Vet Med, 2017, 39(2): 9-12.
- [13] 杨蕙, 闫丽红, 尹潇, 等. 比较倾注法与涂布法接种培养菌数的差异[J]. 中国消毒学杂志, 2017, 34(1): 76-77.
Yang H, Yan LH, Yin X, *et al.* Comparison of the difference between pouring method and coating method in inoculating and culturing bacteria [J]. Chin J Disinfect, 2017, 34(1): 76-77.
- [14] 李志勇, 谢钧宪, 许龙岩, 等. 食品微生物检验的质量控制[J]. 检验检疫学刊, 2004, 14(4): 5-9.
Li ZY, Xie JX, Xu LY, *et al.* Quality control of food microbiological inspection [J]. J Insp Quar, 2004, 14(4): 5-9.
- [15] 雷质文. 食品微生物实验室质量管理手册[M]. 北京: 中国标准出版社.
Lei ZW. Handbook of quality management for food microbiology laboratory [M]. Beijing: China Standard Press.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



郭启新, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: 45542746@qq.com