

食品中大肠菌群计数实验室内部比对研究

陈 玥, 黄家欣, 曾晓琮, 周 露*

(广东省食品检验所, 广州 510435)

摘 要: 目的 监控实验室检测质量和校准结果, 对发现的问题及时采取措施, 以保证实验室的良好检测水平。**方法** 通过采用 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》、SN/T 4547-2017《商品化试剂盒检测方法 大肠菌群和大肠杆菌 方法一》2 种检测方法, 对同一质控样品进行检测, 对 2 名实验人员的实验结果进行分析和能力评定。**结果** 2 名检验人员检验结果具有再现性, 2 种方法的结果也具有一致性。**结论** 组织比对活动, 不断对实验中出现的改进和总结, 积累经验, 可以稳固和进一步提升个人与实验室的能力。2 种检测方法均可对于检测大肠菌群的检测, 在实验中体现了大肠菌群测试片法在操作上和时间内有较大优势。

关键词: 食品; 大肠菌群; 大肠菌群测试片; 内部比对

Coliform colony test and results analysis in food of laboratory internal comparison

CHEN Yue, HUANG Jia-Xin, ZENG Xiao-Cong, ZHOU Lu*

(Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China)

ABSTRACT: Objective To monitor the test quality and calibration results of the laboratory, take timely measures for the problems found to ensure that the laboratory maintains a good test level. **Methods** Through the use of GB 4789.3-2016 *National food safety standards-Food microbiological test coliform count* and SN/T 4547-2017 *Commercial kit method-Coliforms and escherichia coli-Test method I*, the same quality control sample was tested, and the experimental results of two laboratory personnel ability to analyze and assess. **Results** The results of the two inspectors were reproducible and the results of the two methods are consistent. **Conclusion** By organizing the comparison activities, constantly improve and summarize the problems in the experiment, and accumulate experience, the ability of the individual and the laboratory can be stabilized and further improved. Both of the two detection methods can detect coliform group, which is reflected in the experiment, but coliform group test tablet method has a great advantage in operation and time.

KEY WORDS: foodstuff; coliform; 3M coliform count plate; internal alignment

*通讯作者: 周露, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物安全。E-mail: zhoulu1982@sohu.com

*Corresponding author: ZHOU Lu, Ph.D, Senior Engineer, Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China. E-mail: zhoulu1982@sohu.com

1 前言

大肠菌群是一些具有与粪便污染物产生的细菌相似特征的细菌,它由肠杆菌科(Enterobacteriaceae)4个菌属组成,包括埃希氏菌属(*Escherichia*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、克雷伯菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)。它是在食品分析检验工作中衡量食品卫生状况的重要微生物指标。据国家食源性疾病预防网统计结果显示,近年来,5.6%的国内微生物食源性疾病事件是由大肠菌群引起的^[1]。若食品中有粪便污染,食品中存在着肠道致病菌污染的可能性,潜伏着食物中毒和流行病的威胁,对人体健康具有潜在的危险性,因此检测食品中大肠菌群的状况具有特殊意义^[2]。

目前检测大肠菌群的方法包括国标检测法、酶底物法^[3]、微滴数字 PCR 检测法^[4]、分光光度法等^[5],而我国对大肠菌群食品检测标准主要是国家标准和原国家商检局制定的行业标准。其中,国家标准具有准确性和权威性;而行业标准侧重于提升食品质量、检测质量,原国家商检局制定的行业准则采取了与美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)检验标准的原理,主要用于出口食品中大肠菌群数量的检测^[6]。大肠菌群的行业推荐标准是通过使用大肠菌群测试片实现快速测试,这种测试片含有 VRB(violet red bile)培养基,一种冷水可溶性的凝胶剂和四唑翁(tetrazolium)指示剂,可增强菌落计数效果。表面覆盖的胶膜,可留住发酵乳糖的大肠菌群产生的气体^[7]。大肠菌群测试片检测法具有检验操作简单、检验效率高的特点。高献礼等^[8]通过接种 3 株大肠菌群至 75 份香精香料测试比较大肠菌群测试片法和国家标准检测方法,结果经统计学分析 2 种方法实验结果无显著性差异;刘宏伟等^[9]比较大肠菌群测试片法与国家标准检测法对饲料中大肠菌群测定效果,并得出大肠菌群测试片法具有重复性及特异性;该方法也广泛应用于水源水质检验、化妆品检验、农业检验等方面^[10-12]。

CNAS-CL 09:2013《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》^[13]中提到,要求实验室通过参加实验室间的比对或能力验证等措施评估检测人员的能力和确认其资格,以监控检测和校准结果的有效性。实验室质量控制的方法包括内部质量控制(如人员比对、仪器比对、方法比对、留样再测等方法)和外部质量评估(如能力验证及测量审核)。本研究从内部质量控制方面进行,通过重复性检测和比对分析,同一样品由不同检测人员用 2 种不同方法进行相同项目测试,比较分析结果的一致性,评估检测方法的稳定性和可靠性^[14]。

2 材料和方法

2.1 仪器

Milli-Q Reference 超纯水机(德国默克化工技术有限公司); PL6001E 电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); MS3 旋涡混合器(德国 IKA 仪器设备有限公司); Masticator 均质器(西班牙 IUL 公司); HWS-24 电热恒温水浴锅(上海一恒科技仪器有限公司); LRH-250F 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); SW-CJ-2F 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); SX-700 高压灭菌锅(日本 TOMY 公司)。

2.2 试剂

结晶紫中性红胆盐琼脂(violet red bile agar)(北京陆桥技术股份有限公司); 3M 大肠杆菌/大肠菌群测试片(美国 3M 有限公司)。

2.3 实验菌株

质控菌株产品性状为白色冻干粉(产品编号 QC-FD-004,中国检验检疫科学研究院测试评价中心)。

2.4 实验方法

2.4.1 人员

参与质量控制人员 A(培训考核合格上岗,工龄 1 年)与人员 B(培训考核合格上岗,工龄 2 年)对该份质控菌株进行检验。

2.4.2 检验依据

(1)国家标准 GB4789.3-2016《食品安全国家标准 食品微生物检验大肠菌群计数》第二法^[15]。

(2)SN/T4547-2017《商品化试剂盒检测方法 大肠菌群和大肠杆菌》方法一^[16]。

2.4.3 检验步骤

(1)前处理

按照质控菌株产品说明书要求,从冰箱取出菌株待其恢复至室温,准备 40 mL 无菌水。开启西林瓶,取 2 mL 无菌水注入西林瓶水化冻干粉,然后用移液枪将菌液转移至另一无菌空瓶中,再用剩余的 38 mL 无菌水反复清洗西林瓶内壁,并把清洗液均转移至上述无菌瓶中。质控菌株产品水化后视为食品样品。

(2)梯度稀释

①吸取 25 mL 样品至 225 mL 无菌稀释液中,均质,制成 10^{-1} 梯度样品匀液。

②取 1 mL 10^{-1} 梯度样品匀液至 9 mL 无菌稀释液中,混匀,制成 10^{-2} 梯度样品匀液。

③重复 10 倍稀释操作,制得 10 倍稀释系列稀释液,选取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释液作为测试样品,另取无菌水作为空白对照,分别用大肠菌群测试片法和国标

法进行检测, 每个样品均做 2 份, 按要求培养。

3 结果与分析

国标法中大肠菌群的计数方法可参照 GB 4789.3-2016《食品安全国家标准 食品微生物检验 大肠菌群计数》^[15], 大肠菌群在大肠菌群测试片生长状况及结果判定根据产品判读手册进行判断, 计数方法可参照 SN/T4547-2017《商品化试剂盒检测方法 大肠菌群和大肠杆菌》^[16]; 与国标法相比, 大肠菌群测试片法在很大程度上节省了培养基配备的时间, 省去了后续验证的步骤, 结果更直观。2 种标准分析比较详见表 1。

测定结果参考 SN/T 1800-2006《食品和动物饲料微生物学 30 °C 菌落计数方法》^[17], 根据结果再现性的计数要求, 不同操作者检验结果之间的绝对差值不大于再现性限 $R=0.45$ 。ISO 4832:2006《食品和动物饲料的微生物学 大肠杆菌菌落计数水平办法 菌落计数技术》^[18]中提及大肠杆菌不同的计数法重复性限的要求。重复性条件下单次实验结果重复性标准偏差 $Sr=0.20$, 当结果标准偏差在 0.20 以内则表示可以接受。

经检验, 检验人员 A 和人员 B 国标法结果分别为 1.6×10^6 CFU/mL 和 1.4×10^6 CFU/mL; 大肠菌群测试片法结果分别为 1.5×10^6 CFU/mL 和 1.6×10^6 CFU/mL。2 名检验人员使用国标法测定的实验结果的对数值的绝对差值为 0.058; 使用大肠菌群测试片法测定的实验结果的对数值

的绝对差值为 0.029, 2 种方法的检验结果满足再现性要求, 2 名检验人员的结果具有准确性。

比较 2 名人员的 2 种实验结果, 人员 A 2 种实验方法结果的标准偏差为 0.07; 人员 B 两种实验方法结果的标准偏差为 0.14, 2 名人员的检验结果均在重复性标准偏差以内, 因此本次实验符合重复性要求, 大肠菌群测试片法的结果具有一定的精密性。

经 2 种方法检测的平行结果见表 2, 在同一稀释梯度下 2 种方法检出效果相当, 通过标准差可看出, 国标法检测效果相对稳定。

4 结论与讨论

实验室质量控制不仅仅为满足检验检测实验室的要求, 更是对检验机构自身的一种负责的体现。内部质量控制目的在于评价检测结果的可靠性, 并找出和排查质量环节中导致不满意的原因, 从而确保每个工作日检测结果的连贯性, 稳固和提升实验室检测检验能力。实验室内部比对虽然评价结果复杂, 但其形式多样, 应用广泛, 可从多方面进行监督, 排查出细微的问题, 以便及时改进。

通过实验和分析, 本次实验国标法与大肠菌群测试片法的检测结果无明显差异, 虽然大肠菌群测试片法在操作方面等引起的数据结果离散程度相对大, 但其偏差在可接受范围内。通过对比, 大肠菌群测试片法在检验的前期准备和后续验证方面比国标法更简便省时, 提高了检验的效率, 且其轻便的包装节省空间, 具有一定的优势。

表 1 2 种检测方法检验流程及典型菌落形态
Table 1 Inspection process and the typical colony morphology of 2 kinds of detection methods

项目	国标法 (GB 4789.3-2016)	大肠菌群测试片法 (SN/T 4547-2017)
培养基	结晶紫中性红胆盐琼脂(violet red bile agar);	3M 大肠杆菌/大肠菌群测试片
培养条件	(36±1) °C, (18~24) h	(36±1) °C, (24±2) h 或(48±2) h
菌落形态	典型菌落为紫红色, 菌落周围有红色的胆盐沉淀环, 菌落直径为 0.5 mm 或更大	蓝色有气泡的菌落确认为大肠杆菌; 蓝色有气泡和红色有气泡的菌落数之和为大肠菌群数
后续验证	挑取 10 个不同类型的典型和可疑菌落, 移种于 BGLB 肉汤管内, (36±1) °C 培养(24~48) h, 肉汤产气的为大肠菌群阳性。	无

表 2 2 种方法检验数据比较
Table 2 Comparison of detection results of 2 kinds of methods

大肠菌群计数结果	10 ⁻⁴ 国标法	10 ⁻⁴ 纸片法	10 ⁻⁵ 国标法	10 ⁻⁵ 纸片法	10 ⁻⁶ 国标法	10 ⁻⁶ 纸片法
人员 A/(CFU/mL)	148	138	14	13	0	0
	150	153	16	17	0	3
人员 B/(CFU/mL)	141	145	14	23	0	0
	155	155	18	14	4	1
标准差/(CFU/mL)	5.8	7.8	1.9	4.5	2	1.4

现阶段很多食品微生物快速检测方法,如代谢学技术、免疫学技术、分子生物学技术、传感器检测法等^[19]。其检测性能好,效率高,又有准确性,食品快速检测领域有良好的研究价值和应用前景。将来,在食品快速检测法步入成熟阶段,把技术投入至日常检验中,监管部门能快速应对问题食品,将在保障社会食品安全、加强公共卫生建设、预防疾病等方面具有极其重要的意义和作用。

参考文献

- [1] 徐晨雅. 即食食品中大肠菌群污染的分析及控制[J]. 食品安全导刊, 2017, (14): 19.
Xu CY. Analysis and control of coliform contamination in instant food [J]. Chin Food Saf Magaz, 2017, (14): 19.
- [2] Franz CMAP, Den BHMW, Böhnlein, *et al.* Reprint of: Microbial food safety in the 21st century: Emerging challenges and foodborne pathogenic bacteria [J]. Trend Food Sci Technol, 2019.
- [3] 宁倩倩. 大肠菌群主要检测方法研究进展[J]. 山西化工, 2019, 39(6): 23–24, 27.
Ning QQ. Research progress on main detection methods of coliform [J]. Shanxi Chem Ind, 2019, 39(6): 23–24, 27.
- [4] 马薇, 孔义军, 吴伟健, 等. 水中大肠菌群微滴数字 PCR 定量检测方法的建立[J]. 环境保护科学, 2019, 45(1): 58–66.
Ma W, Kong YJ, Wu WJ, *et al.* The establishment of quantitative detection of total coliforms in water based on ddPCR technology [J]. Environ Prot Sci, 2019, 45(1): 58–66.
- [5] 王斌, 郎平. 分光光度法在食品大肠菌群数快速检测中的应用[J]. 食品安全导刊, 2018, (18): 110.
Wang B, Lang P. Application of spectrophotometry in rapid determination of coliform numbers in food [J]. Chin Food Saf Magaz, 2018, (18): 110.
- [6] 徐俊环, 张华. 食品中大肠菌群的测定及分析[J]. 食品安全导刊, 2018, (6): 101.
Xu JH, Zhang H. Determination and analysis of coliforms in food [J]. Chin Food Saf Magaz, 2018, (6): 101.
- [7] 文霞, 李彩玲, 刘静霞, 等. 化妆品中耐热大肠菌群快速检测方法的研究[J]. 日用化学工业, 2019, 49(6): 410–414.
Wen X, Li CL, Liu JX, *et al.* Research on rapid detection method of thermotolerant coliforms in cosmetics [J]. Chin Surfact Detergent Cosmet, 2019, 49(6): 410–414.
- [8] 高献礼, 李超, 李英, 等. 3M 测试片法和国标法检测香料香精中大肠菌群结果的比较[J]. 食品研究与开发, 2006, (6): 132–133.
Gao XL, Li C, Li Y, *et al.* Comparison of coliform group results in 3M test tablet method and national standard method [J]. Food Res Dev, 2006, (6): 132–133.
- [9] 刘宏伟, 高延玲, 邱富娜, 等. 饲料中大肠菌群快速计数法_Petrfilm_TM_测试片法[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2010, (2): 11–13.
Liu HW, Gao YL, Qiu FN, *et al.* Fast counting method of coliform group in feed_Petrfilm_TM_ test film method [J]. Shanghai Anim Husb Vet Commun, 2010, (2): 11–13.
- [10] 薄立超, 李芬, 张晶. Petrfilm 菌数测试片消毒质量检测中的应用研究[J]. 中国消毒学杂志, 2018, 35(3): 180–181, 185.
Bo LC, Li F, Zhang J. Applied research on disinfection quality detection of petrfilm bacterial number test tablets [J]. Chin J Disinfect, 2018, 35(3): 180–181, 185.
- [11] 朱世真, 王立芳, 王尊文. 大肠菌群测试片在化妆品微生物检测中的应用[J]. 中国药师, 2014, 17(9): 1601–1602.
Zhu SZ, Wang LF, Wang ZW. Application of petrfilm colony count plate in microbial detection for cosmetics [J]. Chin Pharm, 2014, 17(9): 1601–1602.
- [12] 杜星. 快速测定水质中总大肠菌群含量方法[J]. 科学技术创新, 2019, (21): 15–16.
Du X. Rapid determination of total coliform in water quality method [J]. Sci Technol Innovat, 2019, (21): 15–16.
- [13] CNAS-CL 09:2013 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 09:2013 Guidance on the application of testing and calibration laboratory competence accreditation criteria in the field of microbiological testing [S].
- [14] 包秘, 唐昭领, 赵大庆. 实验室的质量控制管理体系分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(3): 981–987.
Bao M, Tang ZL, Zhao DQ. Analysis of laboratory quality control management system [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(3): 981–987.
- [15] 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 standards-Food microbiological test coliform count [S].
- [16] SN/T 4547-2017 商品化试剂盒检测方法 大肠菌群和大肠杆菌 方法一[S].
SN/T 4547-2017 Commercial kit method-Coliform and *Escherichia coli*-Test method I [S].
- [17] SN/T 1800—2006 食品和动物饲料微生物学 30 °C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].
- [18] ISO 4832:2006 食品和动物饲料的微生物学 大肠杆菌菌落计数水平办法 菌落计数技术[S].
ISO 4832:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coliforms-Colony-count technique [S].
- [19] 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 XW, Wang YR, *et al.* Research progress of food microbiological test tablets [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(2): 701–705.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



陈 玥, 主要研究方向为食品微生物。
E-mail: jalyn1620@163.com



周 露, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物安全。
E-mail: zhoululu1982@sohu.com