

产气荚膜梭菌质控样品的研制

任敏[#], 刘悦[#], 王秋水, 邓婕, 马凯, 左嘉, 袁立艳, 高丽娟^{*}

(北京市理化分析测试中心, 北京市食品安全分析测试工程技术研究中心, 北京 100089)

摘要: **目的** 制备产气荚膜梭菌质控菌株质控样品。**方法** 将产气荚膜梭菌悬液于36℃厌氧培养至浓度为 10^7 CFU/mL, 以10%(m/m, 下同)脱脂奶粉、5%海藻糖、5%蔗糖、1%谷氨酸钠、0.5%抗坏血酸钠为菌体保护剂, 使用冷冻干燥法制备冻干菌剂。依据CNAS-CL03-A001:2019《能力验证提供者认可准则在微生物领域的应用说明》, 通过均匀性、运输稳定性、储藏稳定性等指标对制备出的菌剂进行评价。**结果** 在均匀性实验中样品 F 值为3.00, 小于 F 临界值 $F_{0.05}(9,10)=3.02$; 模拟运输稳定性实验中, 于4、15和25℃温度下模拟运输5 d, 检验 t 值均小于临界值 $t_{0.05}(24)=2.0639$; 在储藏稳定性实验中, 于4、-20和-80℃下储藏28 d内, 检验 t 值均小于临界值 $t_{0.05}(24)=2.0639$, 都符合标准要求。**结论** 制备的产气荚膜梭菌质控菌株均匀性、储藏稳定性和运输稳定性良好, 可以作为实验室质控样品使用。

关键词: 产气荚膜梭菌; 质控样品; 冷冻干燥

Preparation of the quality control samples for *Clostridium perfringens*

REN Min[#], LIU Yue[#], WANG Qiu-Shui, DENG Jie, MA Kai, ZUO Jia, YUAN Li-Yan, GAO Li-Juan^{*}

(Beijing Center for Physical & Chemical Analysis, Beijing Engineering Research Center of Food Safety Analysis, Beijing 100089, China)

ABSTRACT: Objective To prepare quality control samples of *Clostridium perfringens*. **Methods** The suspension of *Clostridium perfringens* was anaerobically cultured at 36 °C to a concentration of 10^7 CFU/mL. Using 10% (m/m, the same below) skim milk powder, 5% trehalose, 5% sucrose, 1% sodium glutamate and 0.5% sodium ascorbate as bacterial protective agents, the lyophilized bacterial agent was prepared by freeze-drying method. According to CNAS-CL03-A001:2019 *Specification for application of accreditation criteria for proficiency testing providers in the field of microbiology*, the prepared microbial agents were evaluated by the uniformity, transportation stability, storage stability and other indicators. **Results** In the uniformity experiment, the F value of the sample was 3.00, which was less than the critical F value $F_{0.05}(9,10)=3.02$. In the simulation transportation stability experiment, the simulated transportation was carried out at 4, 15 and 25 °C for 5 days, and the test t value of the sample was less than the critical value $t_{0.05}(24)=2.0639$. In the storage stability experiment, within 28 days of storage at 4, -20 and -80 °C, the test t value was less than the critical value $t_{0.05}(24)=2.0639$, which all met the standard requirements.

基金项目: 北京市科学技术研究院改革发展培育项目(PY2020JK44)、北京市科学技术研究院市级财政项目(PXM2020_178305_000007)

Fund: Supported by the Beijing Academy of Science and Technology-Reform and Development (PY2020JK44), Municipal Financial Project of Beijing Academy of Science and Technology (PXM2020_178305_000007)

[#]任敏、刘悦为共同第一作者。

[#]REN Min and LIU Yue are Co-first Authors.

*通信作者: 高丽娟, 研究员, 主要研究方向为应用微生物学。E-mail: aglj889@163.com

*Corresponding author: GAO Li-Juan, Professor, Beijing Center for Physical & Chemical Analysis, Beijing Engineering Research Center of Food Safety Analysis, Beijing 100089, China. E-mail: aglj889@163.com

Conclusion The prepared quality control strain of *Clostridium perfringens* has good uniformity, storage stability and transportation stability, and can be used as a laboratory quality control sample.

KEY WORDS: *Clostridium perfringens*; quality control samples; freeze-drying

0 引言

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*), 又称魏氏梭菌(*Clostridium welchii*), 是一种革兰氏阳性(G⁺), 且可以产生芽孢的厌氧致病菌^[1-2], 产气荚膜梭菌广泛存在于空气、污水、土壤、各种食品以及动物和人类的胃肠道中, 是导致食源性疾病和人类食物中毒、非食源性腹泻及创伤性气性坏疽的主要病原菌之一^[3-5]。

近年来, 食品安全越来越引起人们的关注, 食源性疾病的爆发与食品安全紧密相连, 促使人们对影响健康的致病菌更为重视。产气荚膜梭菌是一种食源性致病菌, 每年都有大量的动物因感染产气荚膜梭菌而死亡^[6-7]。产气荚膜梭菌因能造成食品胀袋、腐败而受到广泛关注, 尤其是其芽孢是在环境胁迫(如低温/干燥或营养缺乏等)下形成的一种微生物休眠体^[7]。芽孢的热抵抗力很强, 可以在 114 °C 的高温下存活 1~4 h。该菌在普通营养琼脂上就可以生长, 在液体培养基中大量产生 CO₂ 和 H₂, 创造厌氧环境, 促进自身增殖^[8]。且形成的芽孢对各种胁迫因素(如高温、高压、有毒化学物质和辐射)具有极强的抗逆性^[9-10], 不易杀死, 在适宜条件下萌发并产生毒性, 对食品安全产生极大威胁。

产气荚膜梭菌产生的外毒素是其主要的致病因子^[3,12-13]。该菌产生的毒素一旦出现在肠道内, 就会与肠上皮细胞的受体结合, 进入到细胞膜内, 毒素随后改变细胞膜的渗透性, 导致肠胃炎, 主要症状包括腹泻腹痛, 也可能出现恶心、呕吐、发烧。但对幼儿、老人和病患可能致命^[14-15]。

目前在食品安全检测和环境污染控制监测过程中, 质量保证和质量控制的要求也越来越高。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》和 GB 8538—2016《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》在检测食品或饮用天然矿泉水中产气荚膜梭菌时, 需要用产气荚膜梭菌标准菌株作为阳性对照, 以保证检验结果的准确性。GB/T 5750.12《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》中也新增了产气荚膜梭菌的检验方法, 新修订标准即将发布。复杂的食品基质、水基质或其他因素可能会影响检测结果的准确性, 所以在检测过程中需要稳定的微生物质控样品对整个检验过程进行质量控制, 从而保证检验数据的准确性和有效性。目标微生物质控菌株在检测过程中为质量控制的进行和数据的准确性提供了重要参考依据。目前市场上还缺少成熟、稳定的产气荚膜梭菌质控菌株来指导实验人员完成质量控制

实验, 所以研制一款性状稳定且数量明确的产气荚膜梭菌质控菌株显得尤为重要。本研究详述了产气荚膜梭菌的研制过程, 并对其均匀性、稳定性进行了考察, 以证明此方法制备的冻干菌剂可以作为质控标准菌株满足实验室质控要求, 又可以用于微生物日常检测工作中阳性对照实验, 以期对产气荚膜梭菌的准确检测提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

VaCo2 型冷冻干燥机(德国 ZIRBUS 科技股份有限公司); SQP 型电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司); BHC-1600 IIA/B3 型生物安全柜(AIRTECH 苏州安泰空气技术有限公司); AW200SG 型厌氧培养工作站(英国依莱泰科公司); 5430R 型低速自动平衡离心机(艾本德中国有限公司); MDF-C8V1 型-80 °C超低温冰箱(松下电器中国有限公司); LRH-150 型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*, CICC 22949)、D-海藻糖(纯度 ≥ 98.0%)、脱脂奶粉(纯度 ≥ 99.0%)、L-谷氨酸钠(纯度 ≥ 98.0%)、蔗糖(纯度 ≥ 99.9%)、抗坏血酸钠(纯度 ≥ 99.0%)(北京索莱宝科技有限公司); 胰月示-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂基础(tryptose sulfite cycloserine, TSC)、脑-心浸出液肉汤(brain heart infusion, BHI)(北京陆桥技术股份有限公司); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)(美国 BD 公司)。

1.2 乳粉中质控样品的制备及验证

1.2.1 产气荚膜梭菌质控样品的生产制备流程

将产气荚膜梭菌 CICC 22949 划线接种于血平板, 36 °C 厌氧培养过夜。用接种环刮取菌苔接种于 BHI 肉汤, 36 °C 厌氧培养过夜, 得到 10⁷ CFU/mL 的菌悬液。量取 200 mL 超纯水, 按质量比例加入 10%脱脂奶粉、5%海藻糖、5%蔗糖、1%谷氨酸钠、0.5%抗坏血酸钠, 加热煮沸作为保护剂, 放凉备用。将产气荚膜梭菌新鲜培养的 BHI 菌液以 4000 r/min 离心 5 min, 倾倒弃上清液获得菌体。加入 200 mL 保护剂将菌体重悬并充分混匀, 按 2 mL/瓶分装至 20 mL 西林瓶中。

-80 °C 预冻 4 h, 使混悬液冷冻凝结。放入真空冷冻干燥机中冻干过夜, 待样品充分干燥后取出, 密封压盖冷藏。以此方法制成每瓶菌含量为 10⁵ CFU 的样本(以此方法制成菌含量为 3.2×10⁵ CFU/g 的样本。)

1.2.2 产气荚膜梭菌质控样品的均匀性实验

随机抽取 10^5 CFU/瓶质控样品 10 瓶, 每瓶加入 10 mL PBS 缓冲液, 将产气荚膜梭菌冻干物充分溶解, 进行适当梯度稀释后, 取 1 mL 于平皿中, 倾注 TSC 培养基, 置 36°C 厌氧培养 24 h, 进行菌落计数, 每个样品重复测试 2 次。根据 CNAS-CL03-A001:2019 《能力验证提供者认可准则在微生物领域的应用说明》对结果进行单因子方差分析, 评价样品的均匀性。

1.2.3 运输条件稳定性模拟实验

模拟实验周期为 5 d。样品分别保存在 4°C 、 15°C 和 25°C 环境, 每个温度随机抽取 3 个样品, 每个样品重复 2 次, 每天进行菌落计数, 以验证此温度下产气荚膜梭菌质控样品的稳定性能否满足考核要求。根据 CNAS-GL002 对结果进行 t 检验分析, 评价样品的稳定性。

1.2.4 储藏稳定性的模拟实验

将制备的产气荚膜梭菌质控样保存于 4°C 、 -20°C 和 -80°C , 连续 28 d, 每 7 d 对产气荚膜梭菌的质控样品取出进行检验, 每个温度随机抽取 2 个样品, 每个样品重复 2 次, 观察其检出率的变化。

1.2.5 统计学数据分析

实验涉及的 F 值计算、 t 检验等计算方法参考 CNAS-CL03-A001:2019 《能力验证样品提供者认可准则在微生物领域的应用说明》^[16-20]。

(1) 样品均匀性检验

均匀性检验采用单因子方差分析。

为检验样品的均匀性, 抽取 i 个样品 ($i=1, 2, \dots, m$), 每个样品在重复条件下测试 j 次 ($j=1, 2, \dots, m$)。

$$\text{每个样品测试平均值: } \bar{x}_i = \sum_{j=1}^n x_{ij}/n$$

$$\text{全部样品测试总平均值: } \bar{x} = \sum_{i=1}^m \bar{x}_i/m$$

$$\text{测试总次数: } N = \sum_{i=1}^m n_i$$

$$\text{样品间平方和: } SS_1 = \sum_{i=1}^m n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2$$

$$\text{均方: } MS_1 = \frac{SS_1}{f_1}$$

$$\text{样品内平方和: } SS_2 = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$$

$$\text{均方: } MS_2 = \frac{SS_2}{f_2}$$

$$\text{自由度: } n_1 = m - 1, n_2 = m - 1$$

$$\text{统计量: } F = \frac{MS_1}{MS_2}$$

(2) 样品稳定性检验

稳定性检验采用 t 检验法。 $t = \frac{|\bar{x}_2 - \bar{x}_1|}{\sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1+n_2-2} \cdot \frac{n_1+n_2}{n_1 \cdot n_2}}}$

式中: x_1 —第一次测试数据的平均值;

x_2 —第二次测试数据的平均值;

s_1 —第一次测试数据的标准偏差;

s_2 —第二次测试数据的标准偏差;

n_1 —第一次测试次数;

n_2 —第二次测试次数。

注: 为了保证平均值和标准偏差的准确度, n_1 和 n_2 均 ≥ 6 。

若 $t <$ 显著性水平 α (通常 $\alpha=0.05$) 自由度为 n_1+n_2-2 的临界值 $t_{\frac{\alpha}{2}}(n_1+n_2-2)$, 则 2 个平均值之间无显著差异, 表明样品是稳定的。

2 结果与分析

2.1 样品均匀性的检验结果

对 10 瓶样品均匀性检测, 样品中菌落总数的平均值为 1.59×10^5 CFU/瓶 (3.2×10^5 CFU/g)。根据 1.2.5 中的方法, 使用 SPSS 软件计算, 样品 F 值为 3.00, 小于 F 临界值 $F_{0.05}(9,10)=3.02$, 表明该样品符合均匀性的要求。具体见表 1 所示。

表 1 稀释 10^2 均匀性测试结果 (CFU/mL)
Table 1 Homogeneity of the 100 times dilution sample (CFU/mL)

样品序号	a	b	结果 a 对数 转换值	结果 b 对数 转换值
1	197	214	2.294	2.330
2	180	166	2.255	2.220
3	170	151	2.230	2.178
4	184	180	2.264	2.255
5	157	116	2.195	2.064
6	180	162	2.255	2.209
7	204	153	2.309	2.184
8	165	170	2.217	2.230
9	151	147	2.178	2.167
10	149	130	2.173	2.113
总平均值			2.221	

注: 其中 a、b 代表一个样品的 2 次重复测试。

均匀性 F 临界值 $F_{0.05}(9,10)=3.02$, 计算 F 值为 3.00, 该值 $<$ F 临界值, 表明在 0.05 显著水平时, 菌剂是均匀的。具体见表 2 所示。

表 2 均匀性统计分析结果
Table 2 Statistical analysis results of homogeneity

方差来源	自由度	平方和	均方	Ss
样品间	9	0.059	0.0066	3.00
样品内	10	0.022	0.0022	

2.2 质控样品运输稳定性检验

将 2.1 中均匀性检验数据作为稳定性检验的第一次测试数据(即表 4 中的计数结果平均值对数 \bar{x}_1)。模拟运输条件放置

5 d, 每天分别从 4、15、25 °C 样品中各随机抽取 3 个样品, 5 d 合计 45 个样品, 每个样品在重复条件下进行稳定性检验测试 2 次, 计数结果平均值对数统一称为。测试结果见表 3 和表 4。

表 3 菌剂稀释 10² 运输稳定性测试结果(CFU/mL)
Table 3 Transport stability of the 100 times dilution sample (CFU/mL)

温度/°C	样品	1 d		2 d		3 d		4 d		5 d	
4	1	27	33	10	18	32	43	39	45	35	31
	2	20	16	14	18	35	28	37	60	43	49
	3	18	14	12	17	12	12	47	35	24	23
	4	24	7	16	13	23	15	18	43	22	22
15	5	36	30	18	21	20	18	26	22	35	29
	6	14	18	19	22	16	13	19	30	19	22
	7	18	15	19	10	30	22	39	35	20	29
25	8	27	12	16	19	23	20	24	20	23	29
	9	17	22	18	13	17	18	50	41	22	24

表 4 菌剂稀释 10⁰ 运输稳定性检验分析结果(对数值)
Table 4 Results of transport stability of the 100 times dilution sample(logarithmic value)

	4 °C					15 °C					25 °C				
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
\bar{x}_1	2.221														
\bar{x}_2	1.329	1.171	1.431	1.642	1.534	1.332	1.259	1.243	1.421	1.395	1.267	1.200	1.336	1.542	1.389
s_1	23.253														
s_2	6.625	3.078	11.518	8.375	9.459	9.725	3.023	3.304	8.498	5.459	4.856	3.337	4.269	10.189	3.403
n_1	20														
n_2	6														
t	0.09	0.11	0.08	0.06	0.07	0.09	0.10	0.10	0.08	0.08	0.10	0.01	0.09	0.07	0.09

根据 1.2.5 中的方法计算, 在 0.05 显著水平下, 自由度为 24 的临界值 $t_{0.05}(24)=2.0639$ 。上述计算得出的 4、15 和 25 °C 模拟运输温度下, 在模拟运输的第 1、2、3、4 和 5 d 检验 t 值均小于临界值 $t_{0.05}(24)=2.0639$, 表明 2 个平均值之间无显著差异, 模拟运输过程中样品是稳定的, 稳定性可以满足能力验证的要求。

2.3 质控样品储藏稳定性检验

冻干燥后 0 d 计数结果为 10⁵ CFU/瓶(3.2×10⁵ CFU/g), 标记为第一次测试结果。同 2.2 中运输稳定性评价原则一致, 将 2.1 中均匀性检验数据作为稳定性检验的第一次测试数据(即表 4 中的计数结果平均值对数 \bar{x}_1)。储藏条件 4、-20 和 -80 °C 下保存连续 28 d, 分别于第 7、14、21 和 28 d 从 4、-20 和 -80 °C 样品中各随机抽取 3 个样品, 合计 36 个样品, 每个样品在重复条件下进行稳定性检验测试 2 次, 计数结果平均值对数统一称为 \bar{x}_2 , 标记为第 2 次测试结

果。测试结果见表 5 和表 6。

表 5 菌剂稀释 10² 储藏稳定性测试结果(CFU/mL)
Table 5 Storage stability of the 100 times dilution sample (CFU/mL)

温度/°C	样品	7 d		14 d		21 d		28 d	
4	1	32	19	32	32	47	37	51	30
	2	39	25	37	31	31	28	46	35
	3	30	28	35	38	40	35	48	38
	4	59	62	63	54	30	43	75	46
-20	5	56	67	71	68	42	58	23	41
	6	58	66	68	61	55	43	33	41
	7	38	45	64	54	17	27	30	32
-80	8	62	51	35	60	22	38	33	48
	9	40	43	50	41	38	41	35	41

表6 菌剂稀释 10^2 储藏稳定性检验 t 检验分析结果
Table 6 The t test results of storage stability of the 100 times dilution sample

	4 °C				-20 °C				-80 °C			
	7 d	14 d	21 d	28 d	7 d	14 d	21 d	28 d	7 d	14 d	21 d	28 d
\bar{x}_1							2.221					
\bar{x}_2	1.460	1.534	1.560	1.611	1.788	1.807	1.655	1.635	1.667	1.705	1.484	1.562
s_1							23.253					
s_2	6.149	2.672	6.155	7.151	4.069	5.640	9.227	16.025	8.057	10.127	9.032	6.185
n_1							20					
n_2							6					
t	0.07	0.07	0.07	0.06	0.04	0.04	0.06	0.06	0.06	0.05	0.08	0.07

用 t 检验法进行判定。在0.05显著水平下,自由度为24的临界值 $t_{0.05}(24)=2.0639$ 。上述计算得出的4、-20和-80 °C储藏温度下,在储藏的第7、14、21和28 d检验 t 值均小于临界值 $t_{0.05}(24)=2.0639$,表明2个平均值之间无显著差异,样品是稳定的,稳定性可以满足能力验证的要求。

3 结论与讨论

本研究研制的产气荚膜梭菌质控样品通过均匀性、储藏稳定性和运输稳定性检验,证实制备的菌剂样品均匀、储藏稳定性和运输稳定性良好,满足标准要求,可用于实验室能力验证考核。此外在样品制备过程中需注意选择容量适宜的西林瓶,加入含有保护剂菌液的体积以不超过5 mm左右高度为宜,否则过高的液面可能导致样品冻干过程不够充分,含水量过高影响储存;将预冻好的样品转移到冻干机中进行冻干的操作应尽量迅速并佩戴隔温手套,且冻干机中的托盘也应提前一同预冷,否则可能导致样品在冻干步骤开始之前出现化冻,会导致冻干效果不佳而影响样品的储藏。

参考文献

- [1] JIA Z, LIU Y, HWANG CA, *et al.* Effect of combination of oxyrase and sodium thioglycolate on growth of *Clostridium perfringens* from spores under aerobic incubation [J]. Food Microbiol, 2020, 89: 103413.
- [2] 陆承平. 兽医微生物学5版[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013. LU CP. Veterinary microbiology fifth edition [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013.
- [3] MONMA C, HATAKEYAMA K, OBATA H, *et al.* Four foodborne disease outbreaks caused by a new type of enterotoxin-producing *Clostridium perfringens* [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53: 859-867.
- [4] REGAN SB, ANWAR Z, MIRAFLOR P, *et al.* Identification of *epsilon* toxin-producing *Clostridium perfringens* strains in American retail food [J]. Anaerobe, 2018, 54: 124-127.
- [5] 任宏荣, 李苗云, 朱瑶迪, 等. 产气荚膜梭菌在食品中的危害及其控制研究进展[J/OL]. 食品科学: 1-12. [2021-04-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200722.1106.016.html>.
- REN HR, LI MY, ZHU YD, *et al.* Research progress on harm and hazard control of *Clostridium perfringens* in foods [J/OL]. Food Sci: 1-12. [2021-04-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200722.1106.016.html>.
- [6] XIU L, LIU Y, WU W, *et al.* Prevalence and multilocus sequence typing of *Clostridium perfringens* isolated from 4 duck farms in Shandong province, China [J]. Poultry Sci, 2020, 99(10): 5105-5117.
- [7] 梁栋, 陈芳, 胡小松. 芽孢萌发研究进展[J]. 中国食品学报, 2018, 18(6): 221-228.
- LIANG D, CHEN F, HU XS. Research progress on the spore germination [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2018, 18(6): 221-228.
- [8] 王柏森, 谷长勤, 佟建南. 产气荚膜梭菌检测方法研究进展[J]. 当代畜牧, 2020, (10): 37-42.
- WANG BS, GU CQ, TONG JN. Research progress on detection methods of *Clostridium Perfringens* [J]. Contemp Anim Husband, 2020, (10): 37-42.
- [9] ABBONA CC, STAGNITTA PV. *Clostridium perfringens*: Comparative effects of heat and osmotic stress on non-enterotoxigenic and enterotoxigenic strains [J]. Anaerobe, 2016, 39: 105-113.
- [10] RAHAYU WP, FARDIAZ D, KARTIKA GD, *et al.* Estimation of economic loss due to food poisoning outbreaks [J]. Food Sci Biotechnol, 2016, 25(1): 157-161.
- [11] MAURICIO N, BRUCE MC, FRANCISCO U. Mechanisms of action and cell death associated with *Clostridium perfringens* toxins [J]. Toxins, 2018, 10(5): 212.
- [12] UZAL FA, VIDAL JE, MCCLANE BA, *et al.* *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases [J]. Open Toxinol J, 2010, 3(2): 24-42.
- [13] 刘芳芳, 黄慧文, 张学成, 等. 产气荚膜梭菌的血清型和致病性及其防治措施[J]. 当代畜牧, 2017, (10): 20-22.
- LIU FF, HUANG HW, ZHANG XC, *et al.* Serotype and pathogenicity of *Clostridium perfringens* and its control measures [J]. Contemp Anim Husband, 2017, (10): 20-22.
- [14] 雷宇. 产气荚膜梭菌的分离鉴定及PCR检测方法的建立[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017.
- LEI Y. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* and establishment of detection method [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2017.

- [15] RAY B, BHUNIA A. 基础食品微生物学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2014.
RAY B, BHUNIA A. Fundamental food microbiology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2014.
- [16] 曹文博. 食品微生物能力验证样品的研制与检测[D]. 大连: 大连工业大学, 2015.
CAO WB. Preparation and detection of food microbiology proficiency testing samples [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2015.
- [17] 王琳. 干酪乳杆菌冷冻干燥保护剂筛选及作用机理研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2011.
WANG L. Research on cryoprotectant selection and protective mechanism for *Lactobacillus casei* [D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2011.
- [18] 解慧. 金黄色葡萄球菌定量质控菌株的制备及其在检验工作中的应用[J]. 天津药学, 2018, 30(5): 7-10.
XIE H. Preparation of quantitative quality control strains of *Staphylococcus aureus* and its application in inspection [J]. Tianjin Pharm, 2018, 30(5): 7-10.
- [19] 刘娜, 骆海朋, 陈怡文, 等. 食品中副溶血性弧菌检验能力验证样品的研制及其应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(7): 1816-1820.
LIU N, LUO HP, CHEN YW, *et al.* Preparation of quality control samples of *Vibrio parahaemolyticus* and their application in the proficiency test [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(7): 1816-1820.
- [20] 骆海朋, 陈怡文, 权亚茹, 等. 沙门氏菌质控样的研制及其在能力验证中的应用[J]. 中国药事, 2014, 28(9): 995-1000.

LUO HP, CHEN YW, QUAN YR, *et al.* The studies of the quality control samples of *Salmonella* and the application in the proficiency test [J]. Chin Pharm Affair, 2014, 28(9): 995-1000.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



任 敏, 助理研究员, 主要研究方向为应用微生物学。

E-mail: renmin@bcpcac.ac.cn



刘 悦, 助理工程师, 主要研究方向为应用微生物学。

E-mail: liuyue@bcpcac.ac.cn



高丽娟, 研究员, 主要研究方向为应用微生物学。

E-mail: aglj889@163.com