

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240814003

基于流式细胞仪提高乳制品商业无菌检验时效性的研究

刘娜, 王亚萍, 李景云*, 崔生辉*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: **目的** 基于流式细胞仪探究提高乳制品商业无菌检验项目时效性。**方法** 以地衣芽孢杆菌 CMCC(B) 63552 和蜡样芽孢杆菌 CMCC(B) 63303 菌株制备定量参考品。以 4 种灭菌乳为基质, 制备染菌浓度分别为 800、8000、80000 CFU/mL 的菌悬液, 测试流式细胞仪法灵敏度。制备染菌浓度为 8 CFU/样品和 80 CFU/样品的灭菌乳和调制乳样品, 经(36±1) °C 保温(24±2) h 后, 按照 GB 4789.26 法和流式细胞仪法进行检测, 并分析比较两种方法检测结果。**结果** 在灭菌乳基质中, 染菌浓度为 800 CFU/mL 时, 流式细胞仪法对人工污染地衣芽孢杆菌样品的阳性检出率为 75%, 而对人工污染蜡样芽孢杆菌的样品均未检出阳性; 染菌浓度为 8000 CFU/mL 和 80000 CFU/mL 时, 流式细胞仪法对地衣芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌污染样品的阳性检出率均为 100%。对人工污染 8 CFU 和 80 CFU 地衣芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌的灭菌乳和调制乳样品, 经保温处理后, 流式细胞仪法检出率为 100%, GB 4789.26 法中未见样品膨胀, 但是镜检和培养结果检出率为 100%。**结论** 当样品中染菌浓度 ≥ 8000 CFU/mL 时, 流式细胞仪法可稳定检出。人工污染地衣芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌的灭菌乳和调制乳样品经保温处理(24±2) h 后, 流式细胞仪法和 GB 4789.26 法检出率均为 100%。

关键词: 商业无菌; 地衣芽孢杆菌; 蜡样芽孢杆菌; 乳制品; 流式细胞仪

Research on improving the timeliness of commercial sterile testing of dairy products based on flow cytometry

LIU Na, WANG Ya-Ping, LI Jing-Yun*, CUI Sheng-Hui*

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

ABSTRACT: Objective To improve the timeliness of commercial sterile testing projects for dairy products based on flow cytometry. **Methods** The quantitative reference materials were prepared using *Bacillus licheniformis* CMCC(B) 63552 and *Bacillus cereus* CMCC(B) 63303 strains. The bacterial suspensions with bacterial concentrations of 800, 8000, and 80000 CFU/mL were prepared using 4 types of sterilized milk as matrices, and the sensitivity of flow cytometry was tested. The sterilized milk and formulated milk samples with bacterial concentrations of 8 CFU/sample and 80 CFU/sample were prepared, and after insulation at (36±1) °C for (24±2) h,

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1604303)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program Project (2018YFC1604303)

*通信作者: 李景云, 主任技师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: lijingyun@nifdc.org.cn

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

*Corresponding author: LI Jing-Yun, Chief Technician, National Institute for Food and Drug Control, No.2, Tiantanxili, Dongcheng District, Beijing 100050, China. E-mail: lijingyun@nifdc.org.cn

CUI Sheng-Hui, Professor, National Institute for Food and Drug Control, No.2, Tiantanxili, Dongcheng District, Beijing 100050, China. E-mail: cuishenghui@aliyun.com

were detect according to GB 4789.26 method and flow cytometry method, and the results of the two methods were analyzed and compared. **Results** In the sterilized milk matrix, when the concentration was 800 CFU/mL, the positive detection rate of flow cytometry for artificially contaminated *Bacillus licheniformis* samples was 75%, while no positive results were detected for artificially contaminated *Bacillus cereus* samples. When the concentration are 8000 CFU/mL and 80000 CFU/mL, the positive detection rates of flow cytometry for contaminated samples of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus cereus* were 100%. In the insulation test, the detection rates of sterilized and modified milk samples artificially contaminated with 8 CFU and 80 CFU of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus cereus* were 100% using flow cytometry. The GB 4789.26 method showed no expansion in the samples, but positive rate was 100% in microscopic detection. **Conclusion** When the concentration is not smaller than 8000 CFU/mL, the flow cytometry method can show positive results stably. For the samples contaminate with 8 CFU and 80 CFU of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus cereus*, the detection rates of GB 4789.26 and flow cytometry methods are 100% after insulation (24±2) h.

KEY WORDS: commercial sterility; *Bacillus licheniformis*; *Bacillus cereus*; dairy products; flow cytometry

0 引言

乳制品含有丰富的蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素和矿物质,已成为人们重要的营养来源。然而,乳制品也容易受到微生物的污染而发生腐败变质^[1-2]。因此,对乳制品的无菌检验是保障乳制品安全的重要措施。乳制品行业也在不断发展^[3-4],随着超高温瞬时杀菌^[5]等技术的使用,常温储存^[6]的灭菌乳和调制乳等产品越来越多^[7]。关于此类产品质量控制,美国等发达国家和地区实行的是过程控制规范与终产品检验并行的方式^[8]。而我国当前主要通过终产品检测来管理风险^[9],商业无菌检验是防控微生物污染的重要保障。国家执行标准为 GB 25190—2010《食品安全国家标准 灭菌乳》,其中关于微生物检验部分则是依据 GB 4789.26—2023《食品安全国家标准 食品微生物学检验 商业无菌检验》^[8,10],包括孵育、镜检和培养等过程,至少需要 3~5 d,对于不产气微生物则需要 7 d 以上时间^[11],时效性差一直是该项目的瓶颈^[12]。一直以来,研究者在不断从免疫^[13]和纳米^[14-15]等方面^[16]研究,希望打破限制,实现微生物准确快速的检验^[17]。

为提高商业无菌检验时效性,有不少研究者从腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)方面着手^[18-20],但是该方法不能直观反映产品中菌含量。流式细胞仪结合了免疫荧光、流体学和激光光学等^[21],不仅可实现定量检测靶细胞数目^[22],还具有高灵敏度、高准确性和高通量等优点,已在临床和科研检验等多个生物化学^[23]领域广泛应用^[24],随着在饮用水微生物^[25-26]检测的应用,为食品微生物快速检测方法^[17,27]提供了更多选择性。

本研究聚焦于两种广泛存在于环境中的不产气细菌—地衣芽孢杆菌^[28]与蜡样芽孢杆菌^[29],采用流式细胞仪方法与 GB 4789.26 法分别进行检测,并对两者的检测结果进行了全面系统的对比分析。旨在探索提升商业无菌检

验效率的途径,特别是针对不产气微生物,期望能缩短商业无菌检测时间,从而为食品安全检测领域带来实质性的改进。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

袋装利乐枕纯牛奶、盒装纯牛奶、盒装早餐奶(麦香味)、盒装早餐奶(核桃味)(国内某品牌 A);袋装利乐枕纯牛奶、盒装纯牛奶、盒装红枣早餐奶、袋装核桃早餐奶(国内某品牌 B);所有样品均检测为商业无菌。

磷酸盐缓冲液(美国 Gbico 公司);平板计数琼脂培养基(plate count agar, PCA)培养基(美国 BD 公司);生理盐水(国药集团化学试剂公司);冻干保护剂(中国食品药品检定研究院)。

地衣芽孢杆菌 CMCC(B) 63552、蜡样芽孢杆菌 CMCC(B) 63303(中国食品药品检定研究院)。

1.2 主要仪器设备

CHEMUNEX®流式细胞仪(法国 bioMérieux 公司); Thermo1389 恒温培养箱、Thermo 205050GC 生物安全柜(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); auto-flex 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)(德国 Bruker 公司); LABCONCO FreeZone 12 L 冷冻干燥机(德国 LABCONCO 公司)。

1.3 方法

1.3.1 检测方法

平板计数法:取 100 μL 待测样品,用 L 棒涂布于 PCA 平板,置于(36±1) °C 培养(24±2) h 后,计数菌落数量。

GB 4789.26 法:依据 GB 4789.26—2023《食品安全国家标准 食品微生物学检验 商业无菌检验》进行检验。

流式细胞仪法: 依照仪器说明书配制约 2.0 mL 测试试剂, 加入 0.5 mL 待测样品(无需前处理)(待测样品被稀释 5 倍), 放入仪器进行检测。仪器说明书中结果判定原则: counts/mL>150 为阳性, counts/mL≤150 为阴性。

1.3.2 定量参考品研制和均匀性检验

选择不产气且环境中常见的地衣芽孢杆菌 CMCC(B) 63552 和蜡样芽孢杆菌 CMCC(B) 63303 作为待测菌株, 并用 MALDI-TOF MS 对菌株进行确认。

将地衣芽孢杆菌 CMCC(B) 63552 和蜡样芽孢杆菌 CMCC(B) 63303 二代新鲜培养物重悬于冻干保护剂中, 以 20 μL/样品进行速冻后, 冷冻干燥, 通过冻干前后菌落计数, 计算存活率, 制备实验用参考样品(10^6 CFU/样品)。从制备的两种参考样品中各随机抽取 20 瓶, 将每瓶参考品溶解于 1 mL 生理盐水溶液中, 按平板计数法测定活菌浓度, 并用单因素方差分析法分析样品的均匀性。

1.3.3 灵敏度测定

分别取地衣芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌参考样品溶于磷酸盐缓冲液中, 用 4 种灭菌乳稀释, 分别制备 800、8000、80000 CFU/mL 的菌悬液, 每种灭菌乳的每个染菌浓度做 3 个平行样, 即制备每种平行样 12 个, 共计 36 包染菌样品。分别通过平板计数法和流式细胞仪法检测, 测定方法的灵敏度。

1.3.4 GB 4789.26 法和流式细胞仪法对比测试

将地衣芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌参考样品分别稀释至 8 CFU/mL(低浓度)和 80 CFU/mL(高浓度), 用无菌注射器接种至 4 种灭菌乳产品中, 每包产品接种 1 mL 菌悬液, 并用无菌胶带封住注射口, 放置于(36±1) °C 保温(24±2) h。每种灭菌乳分别接种低浓度菌液 26 包和高浓度菌液 10 包, 其中 1/2 染菌样品按照 GB 4789.26 法进行检验, 另 1/2 染菌样品用流式细胞仪法检测。另取 4 种未开封灭菌乳样品

各一包, 放置于 2~8 °C 作为对照。

1.4 数据处理

采用 Microsoft Excel 2021 进行数据分析, 每个实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 菌种确认与参考品制备

地衣芽孢杆菌 CMCC(B) 63552 和蜡样芽孢杆菌 CMCC(B) 63303 经 MALDI-TOF MS 测定后, 分别确认为 *Bacillus licheniformis* 和 *Bacillus cereus*, 与预期结果一致。分别对冷冻干燥后的参考样品($n=20$)进行测试, 地衣芽孢杆菌的均值为 1.31×10^6 CFU/样品, 蜡样芽孢杆菌均值为 1.22×10^6 CFU/样品, 两种参考品数值分布均符合正态分布, 均匀性良好。

2.2 灵敏度测试结果

流式细胞仪法灵敏度测试结果见表 1。人工污染地衣芽孢杆菌样品中, 染菌浓度为 800 CFU/mL ($n=12$)时, 有 3 份为阴性, 其他 9 份为阳性; 平板计数结果在 760~960 CFU/mL 之间。染菌浓度为 8000 CFU/mL ($n=12$)和 80000 CFU/mL ($n=12$)时, 流式细胞仪法测试结果均为阳性; 平板计数法结果均为多不可计。

人工污染蜡样芽孢杆菌样品中, 染菌浓度为 800 CFU/mL ($n=12$)时, 结果均为阴性; 平板计数法结果在 940~1140 CFU/ml 之间。染菌浓度为 8000 CFU/mL ($n=12$)和 80000 CFU/mL ($n=12$)时, 结果均为阳性; 平板计数法结果均为多不可计。

流式细胞仪法测试过程中, 由于待测样品已被相关试剂稀释 5 倍, 因此在测试 800 CFU/mL 浓度时检测结果应接近仪器的检测阈值(150 counts/mL)。

表 1 流式细胞仪法灵敏度测试结果
Table 1 Sensitivity results of flow cytometry

菌株名称	菌液浓度 (CFU/mL)	方法	样品 编号	品牌 A 纯牛奶		品牌 B 纯牛奶	
				袋装利乐枕	盒装	袋装利乐枕	盒装
地衣芽孢 杆菌	800	平板计数法 (CFU/mL)	1	900	960	920	760
			2	760	880	960	820
			3	900	800	840	900
		流式细胞仪法 (counts/mL)	1	210	220	230	130
			2	120	140	210	180
			3	260	180	230	190
	8000	平板计数法 (CFU/mL)	1	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
			2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
			3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
		流式细胞仪法 (counts/mL)	1	1349	1119	1119	1319
			2	1519	1368	1229	1039
			3	1669	1399	1169	1379

表 1(续)

菌株名称	菌液浓度 (CFU/mL)	方法	样品 编号	品牌 A 纯牛奶		品牌 B 纯牛奶	
				袋装利乐枕	盒装	袋装利乐枕	盒装
蜡样芽孢 杆菌	80000	平板计数法 (CFU/mL)	1	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
			2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
			3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
		流式细胞仪 (counts/mL)	1	18758	14832	16321	16754
			2	20732	15998	17361	15976
			3	19635	15805	17336	18338
	800	平板计数法 (CFU/mL)	1	940	980	1140	920
			2	1000	1080	1020	1020
			3	900	1000	960	880
		流式细胞仪法 (counts/mL)	1	130	90	110	90
			2	120	120	100	80
			3	120	60	70	60
	8000	平板计数法 (CFU/mL)	1	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
			2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
			3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
		流式细胞仪法 (counts/mL)	1	860	740	600	630
			2	759	909	929	759
			3	570	839	789	849
	80000	平板计数法 (CFU/mL)	1	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
			2	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
			3	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
		流式细胞仪法 (counts/mL)	1	16239	19058	17681	19199
			2	16012	19285	18644	18310
			3	15951	20441	18898	19335

注: TNTC 表示多不可计。

2.3 GB 4789.26 法和流式细胞仪法测试灭菌乳保温样品结果

人工污染地衣芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌的灭菌乳经保温孵育后,流式细胞仪法检测结果见表 2。地衣芽孢杆菌污染的样品(8 CFU/样品, $n=104$)中,52 份经流式细胞仪法检测均为阳性,检出率为 100%;52 份样品经 GB 4789.26 法检测,均未涨袋,但镜检和培养结果均为阳性。地衣芽孢杆菌污染的样品(80 CFU/样品, $n=40$)中,20 份经流式细胞仪法检测,结果均为阳性,检出率为 100%;20 份样品经 GB 4789.26 法检测,均未涨袋,但镜检和培养结果均为阳性。蜡样芽孢杆菌污染样品的检测结果与地衣芽孢杆菌一致。

人工污染地衣芽孢杆菌的 4 种灭菌乳样品经保温孵育后,pH 变化见表 3 和表 4。4 种灭菌乳样品 pH 均出现一定程度的降低,地衣芽孢杆菌污染组变化值介于 0.05~0.16

之间,蜡样芽孢杆菌污染组变化值在 0.15~0.23 之间。依据 GB 4789.26—2023 中 pH 相差 0.5 及以上判为显著差异,地衣芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌人工污染 4 种灭菌乳后 pH 均没有发生显著差异。

2.4 GB 4789.26 法和流式细胞仪法测试调制乳保温样品结果

人工污染地衣芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌的调制乳经保温孵育后,流式细胞仪法检测结果见表 5。流式细胞仪法测试地衣芽孢杆菌污染的样品(8 CFU/样品, $n=52$; 80 CFU/样品, $n=20$),结果均为阳性,检出率为 100%;GB 4789.26 法检测测试地衣芽孢杆菌污染的样品(8 CFU/样品, $n=52$; 80 CFU/样品, $n=20$),均未涨袋,但镜检和培养结果均为阳性。蜡样芽孢杆菌污染的样品测试结果同于地衣芽孢杆菌。

表 2 流式细胞仪法测试灭菌乳保温样品结果
Table 2 Results of sterilized milk insulation samples using flow cytometry

菌株名称	加菌量 /CFU	样品编号	结果/(counts/mL)			
			品牌 A 纯牛奶		品牌 B	
			袋装利乐枕	盒装	袋装利乐枕	盒装
地衣芽孢杆菌	8	1	2466474	2716945	3081755	2536878
		2	2437872	2768486	3054801	2350149
		3	1920589	2256176	3074940	2672321
		4	2176986	2332193	3142819	2559255
		5	2281581	2931796	3204891	2420329
		6	2187396	2983926	3495424	2453116
		7	1941646	2726165	3035661	2654229
		8	1892308	2507245	3015604	2625007
		9	2454637	2591001	3064282	2551656
		10	2406927	2562293	3089903	2513288
		11	2023532	2606274	3109540	2665544
		12	2036554	2514335	3080800	2832268
		13	1867827	2515219	3615906	2581171
蜡样芽孢杆菌	80	1	2275957	2436516	3215988	2765617
		2	2461319	2506080	3330790	2807945
		3	1058723	2453562	3262769	2794767
		4	2756470	2585934	838563	2628059
		5	2689910	2529285	896818	2677671
		1	1976696	2575611	2251956	1060666
		2	2095295	2739011	2284655	1152423
		3	1863722	1649391	2250588	1077841
		4	1926010	1736668	2308792	1119307
		5	1897181	1632541	2217578	963179
		6	1946023	1692184	2201741	1081533
		7	1892272	1819246	2833010	835392
		8	1973474	1887917	2969678	915998
9	1920685	1497051	2220023	1325640		
10	1950768	1579815	2215425	1423528		
11	1816769	1751453	2284654	1127361		
12	1899304	1807304	2345081	1132570		
13	1916943	1801172	2420468	1161745		
	80	1	2045273	2027500	1515778	1097450
		2	1823415	1914649	1202640	1894667
		3	1964698	1981338	1435418	1931163
		4	989578	2067172	1790228	2198080
		5	1980015	1451550	1093713	2265480

表 3 人工污染地衣芽孢杆菌灭菌乳样品保温后 pH 测试结果
Table 3 pH results of sterilized milk samples contaminated
Bacillus licheniformis artificially after insulation

样品名称	pH		
	阴性对照	8 CFU/样品	80 CFU/样品
品牌 A 袋装利乐枕 纯牛奶	6.66	6.56~6.59	6.61~6.64
品牌 A 盒装奶	6.64	6.56~6.58	6.56~6.57
品牌 B 袋装利乐枕 纯牛奶	6.68	6.52~6.55	6.54~6.56
品牌 B 盒装奶	6.72	6.61~6.63	6.58~6.60

表 4 人工污染蜡样芽孢杆菌灭菌乳样品保温后 pH 测试结果
Table 4 pH results of sterilized milk samples contaminated
Bacillus cereus artificially after insulation

样品名称	pH		
	阴性对照	8 CFU/样品	80 CFU/样品
品牌 A 袋装利乐枕 纯牛奶	6.79	6.57~6.59	6.62~6.64
品牌 A 盒装奶	6.77	6.56~6.58	6.56~6.57
品牌 B 袋装利乐枕 纯牛奶	6.80	6.57~6.59	6.60~6.61
品牌 B 盒装奶	6.83	6.63~6.64	6.63~6.64

表 5 流式细胞仪法测试调制乳保温样品结果
Table 5 Results of insulation modified milk samples using flow cytometry

菌株 名称	加菌量/CFU	样品 编号	结果/(counts/mL)			
			品牌 A 早餐奶		品牌 B 早餐奶	
			麦香味	核桃味	红枣	核桃
地衣 芽孢 杆菌	8	1	100692	51842	2228	1200
		2	114894	33200	2169	1229
		3	115018	30105	2109	1339
		4	205664	49106	21864	7707
		5	233430	46536	23581	8549
		6	247348	36605	29863	9071
	80	7	331578	46998	15501	2618
		8	327304	216199	12059	2539
		9	361422	228642	14469	2899
		10	110976	245823	5876	12115
		11	92905	286313	6884	13693
		12	104455	234890	5606	12588
		13	143773	283433	6213	14159
蜡样 芽孢 杆菌	8	1	1970728	2006663	5704	6308
		2	1983516	1999012	6375	6342
		3	2226472	2043759	10644	6237
		4	2342137	2005136	10018	6107
		5	2401291	2328563	11670	6897
		6	1378844	2840686	113961	1312649
	80	7	1436061	2947997	126148	3647327
		8	1468677	2976271	128230	3631381
		9	2509145	3240834	2364128	3718104
		10	2581533	3392671	2484702	3751475
		11	2572898	3401856	2486314	1203583
		12	2569056	5265	2403762	2947867
		13	2731259	8073	2390156	2966129
80	8	1	1842306	2000290	2305139	3097026
		2	1879365	2061980	2402676	2269645
		3	1907222	2128579	2432248	2293172
		4	1912633	2125646	2457444	2765474
		5	2903456	2216812	353336	2734004
		6	2878775	2283296	352790	4129323
	80	7	2236635	2265431	385437	4172839
		8	2331542	2213462	2675921	3971956
		9	2158033	2262137	2848445	4182159

人工污染地衣芽孢杆菌的 4 种调制乳样品经保温孵育后, pH 变化见表 6 和表 7。地衣芽孢杆菌污染组变化值介于-0.14~0.01 之间, 蜡样芽孢杆菌污染组变化值于-0.77~0.01 之间。依据 GB 4789.26—2023 标准, 地衣芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌人工污染 4 种调制乳后 pH 均没有发生显著差异。

表 6 人工污染地衣芽孢杆菌调制乳样品保温后 pH 测试结果
Table 6 pH results of modified milk samples contaminated *Bacillus licheniformis* artificially after insulation

样品名称	pH		
	阴性对照	8 CFU/样品	80 CFU/样品
品牌 A 早餐奶 (麦香味)	6.82	6.82~6.83	6.68~6.70
品牌 A 早餐奶 (核桃味)	6.82	6.81~6.83	6.82~6.83
品牌 B 红枣早餐奶	6.73	6.71~6.72	6.72~6.73
品牌 B 核桃早餐奶	6.75	6.76~6.77	6.75~6.77

表 7 人工污染蜡样芽孢杆菌调制乳样品保温后 pH 测试结果
Table 7 pH results of modified milk samples contaminated *Bacillus cereus* artificially after insulation

样品名称	pH		
	阴性对照	8 CFU 样品	80 CFU 样品
品牌 A 早餐奶 (麦香味)	6.85	6.24~6.30	6.64~6.80
品牌 A 早餐奶 (核桃味)	6.82	6.36~6.40	6.82~6.83
品牌 B 红枣早餐奶	6.73	6.18~6.32	5.96~6.18
品牌 B 核桃早餐奶	6.76	6.50~6.51	6.54~6.72

3 讨论与结论

本研究以平板计数法为参考, 用地衣芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌参考品测试了流式细胞仪法的灵敏度, 当样品中染菌浓度 ≥ 8000 CFU/mL 时, 流式细胞仪法可稳定检出; 当小于该浓度时, 测试结果可能因菌株种属不同而不同。用 4 种灭菌乳和 4 种调制乳为基质, 比较了 GB 4789.26 法和流式细胞仪法检测保温样品的结果, 在(24 \pm 2) h 保温处理后, 流式细胞仪法检出率均为 100%, 与 GB 4789.26 法镜检结果一致。

灵敏度测试中, 比较 800 CFU/mL 和 8000 CFU/mL 浓度结果, 发现流式细胞仪法测试地衣芽孢杆菌的数值普遍高于蜡样芽孢杆菌; 而测试 80000 CFU/mL 浓度的结果, 则没有前面所述现象。本研究中的流式细胞仪法是检测样品中的活菌数目, 其原理是对样品中的活菌进行荧光标记, 并采用激光照射流体状态下的单细胞悬液, 通过检测和记录被激发的荧光信号, 从而对细胞进行分析^[30]。结合本研

究结果, 标记活细胞的试剂并不能使所有活细胞均被标记, 标记比例与细胞种属有关系。因此, 对于低浓度污染样品, 流式细胞仪法可能会出现假阴性结果。

保温样品检测是本研究的核心部分。通过比较 GB 4789.26 法和流式细胞仪法的测试结果, 发现针对人工污染 8 CFU 和 80 CFU 地衣芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌的灭菌乳和调制乳样品经(24 \pm 2) h 保温后, GB 4789.26 法和流式细胞仪法检出率均为 100%。由于选择的两种菌都不产气且为兼性厌氧菌, 污染样品保温至 7 d 时, 小部分样品才开始出现轻微膨胀, 依照 GB 4789.26 法, 需要将样品保温至膨胀或 7 d 后才需要检验, 而实际情况是(24 \pm 2) h 后的镜检和培养结果均为阳性。该结果提醒: 外观检测样品膨胀与否和实际污染情况可能不一致。而流式细胞仪法是基于样品内有活性微生物的实际浓度, 一旦超过阈值就判定为阳性, 无需通过外观检测。

从时效性上分析, 对于活性微生物超过阈值的样品, 流式细胞仪法无需等到样品膨胀即可快速检出。但是该方法也有不足之处, 一般乳制品最小包装至少为 100 mL, 而流式细胞仪法取样量为 0.5 mL, 对于活性微生物在阈值附近的样品, 则有可能因为取样量小而导致假阴性。GB 4789.26 法虽然在判断膨胀后或保温至 7 d 后才开始检验, 但是前期是基于整个包装进行保温, 出现假阴性的概率较流式细胞仪法更小, 并且成本更低。

本研究通过对比分析 GB 4789.26 法和流式细胞仪法, 证明了提高商业无菌检验时效性的可行性: 流式细胞仪法测试高浓度(本研究中为不小于 8000 CFU/mL)污染的样品时, 可以不经保温及时稳定检出阳性; 测试低浓度污染的样品时, 则需要适当保温后[本研究中为(24 \pm 2) h)]才能稳定检出阳性。对于突发事件中的商业无菌检验项目, 可以适当引入流式细胞仪法提高检验效率, 为监管部门及时提供准确数据。

参考文献

- [1] 蔡亚洁, 乌日娜, 周津羽, 等. 乳制品中有害微生物检测新技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(1): 41-47.
CAI YJ, WU RN, ZHOU JY, et al. Research progress in new technologies for detecting harmful microorganisms in dairy products [J]. J Food Saf Qual, 2024, 15(1): 41-47.
- [2] 肖沙, 赵格, 赵建梅, 等. 生鲜乳中 16 种致病微生物多重荧光定量 PCR 集成检测技术的建立与初步应用[J]. 中国动物检疫, 2024, 41: 86-96.
XIAO S, ZHAO G, ZHAO JM, et al. Establishment and application of multiplex integrated qPCR system for 16 kinds of pathogenic microorganisms in raw milk [J]. China Anim Health Inspect, 2024, 41: 86-96.
- [3] 朱盼盼. 常温奶酪加工技术研究及产品货架期稳定性评价[D]. 银川: 宁夏大学, 2020.
ZHU PP. Processing technology and shelf life stability prediction of room

- temperature cheese [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2020.
- [4] 张俊龙, 杨小剑, 张淑丽, 等. 改善调制乳核桃奶加工工艺达到商业无菌快检要求[J]. 食品安全导刊, 2020(12): 146-147.
ZHANG JL, YANG XJ, ZHANG SL, *et al.* Improve the processing technology of modulated milk core peach milk to meet the requirements of commercial sterile rapid testing [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2020(12): 146-147.
- [5] ANDERSON NM, LARKIN JW, COLE MB, *et al.* Food safety objective approach for controlling *Clostridium botulinum* growth and toxin production in commercially sterile foods [J]. *J Food Protect*, 2011, 74(11): 1956-1989.
- [6] 梁俊健, 林淑仪, 朱震, 等. 超高温灭菌乳的无菌包装概念与工艺质控[J]. 中国乳业, 2021, 6: 79-82.
LIANG JJ, LIN SY, ZHU Z, *et al.* Aseptic packaging concept and process quality control of ultra-high temperature sterilized milk [J]. *China Dairy Ind*, 2021, 6: 79-82.
- [7] 冉露霞, 王俊杰, 成臣, 等. 超高压和巴氏杀菌对百香果汁贮藏期品质的影响[J]. 食品工业科技, 2023, 44(3): 56-66.
RAN LX, WANG JJ, CHENG C, *et al.* Effect of ultra-high pressure sterilization and pasteurization on the quality of passion fruit juice during storage [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2023, 44(3): 56-66.
- [8] 东思源, 仇凯, 孟镇, 等. 食品商业无菌国内外标准法规对比研究及标准化工作思考[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(22): 305-310.
DONG SY, QIU K, MENG Z, *et al.* Comparative study of domestic and foreign standards and regulations for aseptic food business and reflection on standardization work [J]. *Food Ferment Ind*, 2022, 48(22): 305-310.
- [9] 王一恬, 荧光假单胞菌耐热性蛋白酶特性及其对液态乳品质影响的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2023.
WANG YT. Characteristic of heat resistance protease from pseudomonas fluorescens and its effects on liquid milk quality [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2023.
- [10] 苏涛, 毛永杨, 田金兰, 等. 食品安全标准中微生物检验指标的问题分析及建议[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(9): 2801-2807.
SU T, MAO YY, TIAN JL, *et al.* Analysis and suggestion on microbiological examination index in food safety standard [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(9): 2801-2807.
- [11] 胡凤月, 周燕霞, 巩有博, 等. 灭菌乳中嗜热脂肪芽孢杆菌商业无菌的最低可视浓度的测定[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9409-9414.
HU FY, ZHOU YX, GONG YB, *et al.* Determination of the lowest visible concentration of commercial sterility of *Geobacillus stearothermophilus* in sterilized milk [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(24): 9409-9414.
- [12] 房玉国, 王克新, 张丽宏, 等. 灭菌乳商业无菌检验方法的探讨[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(1): 29-30.
FANG YG, WANG KX, ZHANG LH, *et al.* The probe about examination method of commercial sterilization of sterilized [J]. *China Dairy Ind*, 2002, 30(1): 29-30.
- [13] 苏娜, 明亮, 何静, 等. 免疫检测技术在食源性致病菌中的应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(12): 343-352.
SU N, MING L, HE J, *et al.* Research progress on application of immunoassays in foodborne pathogens [J]. *Food Ferment Ind*, 2024, 50(12): 343-352.
- [14] 王亦纯, 张迎弟, 陈鹭庆, 等. 纳米酶在食源性病原微生物检测中的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(12): 90-102.
WANG YC, ZHANG YD, CHEN LQ, *et al.* Recent application progress on nanozymes for foodborne pathogenic microorganisms detection [J]. *J Food Saf Qual*, 2024, 15(12): 90-102.
- [15] 高家昊, 酆娟, 褚冲, 等. 纳米抗体在食源性微生物污染检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(9): 11-18.
GAO JH, LI J, CHU C, *et al.* Application of nanobodies in the detection of foodborne microbial contamination [J]. *J Food Saf Qual*, 2024, 15(9): 11-18.
- [16] 王帅, 杨艳歌, 吴占文, 等. 重组酶聚合酶扩增、重组酶介导等温扩增及酶促重组等温扩增技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(9): 297-285.
WANG S, YANG YG, WU ZW, *et al.* A review of the application of recombinase-aided amplification and enzymatic recombinase amplification in rapid detection of foodborne pathogens [J]. *Food Sci*, 2023, 44(9): 297-285.
- [17] 范秋佳, 邓蕊. 食品安全快速检测技术研究[J]. 食品安全导刊, 2024(19): 178-180.
FAN QJ, DENG R. Research on fast food safety detection technology [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2024(19): 178-180.
- [18] 杜丽, 宋晓东, 喻东威, 等. ATP 法测定奶中的细菌含量[J]. 中国食品工业, 2011, 7: 58-59.
DU L, SONG XD, YU DW, *et al.* Determination of bacterial content in milk by ATP method [J]. *China Food Ind*, 2011, 7: 58-59.
- [19] 林木娣, 黄诗韵, 杨爱君, 等. Promicol ATP 微生物快速检测系统在 UHT 灭菌奶商业无菌检测上的应用研究[J]. 中国乳业, 2017, 186: 69-74.
LIN MD, HUANG SY, YANG AIJ, *et al.* The application of Promicol ATP microbial rapid detection system in UHT milk commercial sterility test [J]. *China Dairy Ind*, 2017, 186: 69-74.
- [20] 张桐, 谢茂梅, 刘艺丹, 等. 三磷酸腺苷生物发光法在提高复杂样品细菌检测能力方面的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(14): 1-8.
ZHANG T, XIE MM, LIU YD, *et al.* Research progress on the application of adenosine triphosphate bioluminescence method in improving the detection ability of bacteria in complex samples [J]. *J Food Saf Qual*, 2024, 15(14): 1-8.
- [21] SERVAIN VS, AKNIN ML, DOMENICHINI S, *et al.* A flow cytometry method for safe detection of bacterial viability [J]. *Cytom Part A*, 2024, 105(2): 146-156.
- [22] 严心涛, 王策, 裴智果, 等. 快速定量检测细菌的 FCM 系统研制及性能评估[J]. 光学精密工程, 2019, 6: 1245-1254.
YAN XT, WANG C, PEI ZG, *et al.* Development and performance evaluation of flow cytometry for rapid quantitative detection of bacteria [J]. *Opt Prec Eng*, 2019, 6: 1245-1254.
- [23] 杨玲玲. 超高灵敏流式检测仪的多方位改进及其在化学生物学研究中的应用[D]. 厦门: 厦门大学, 2011.
YANG LL. Multi-directional improvement of ultra-high sensitivity flow cytometer and its application in chemical biology research [D]. Xiamen: Xiamen University, 2011.
- [24] 刘婷婷. 流式细胞术在微生物检测中应用研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2021.
LIU TT. Research on the application of flow cytometry in microbial

- detection [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2021.
- [25] 严心涛, 吴云良, 查巧珍, 等. 流式细胞术在饮用水微生物检测中的应用及挑战[J]. 中国给水排水, 2020, 1: 89-95.
- YAN XT, WU YL, ZHA QZ, *et al.* Applications and challenges of microbial detection in drinking water by flow cytometry [J]. China Water Wastewater, 2020, 1: 89-95.
- [26] 潘露华. 水质环境监测中微生物检测技术的应用分析[J]. 实验室检测, 2024, 2(7): 118-121.
- PAN LH. Application analysis of microbial detection technology in water quality and environmental monitoring [J]. Lab Test, 2024, 2(7): 118-121.
- [27] 赵晓美, 王婷曲, 天铭, 等. 基于流式细胞仪技术的快速检测试剂盒在生乳菌落总数检测中的应用[J]. 质量安全与检验检测, 2023, 1: 7-15.
- ZHAO XM, WANG PQ, TIAN M, *et al.* Application of rapid detection kit based on flow cytometry technology in the detection of total plate count in raw milk [J]. Qual Saf Inspect Test, 2023, 1: 7-15.
- [28] 王银环, 钱凌, 董芳华, 等. 流式细胞术和平板计数法用于地衣芽孢杆菌活菌制剂检测的比较研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(3): 352-356.
- WANG YH, QIAN L, DONG FH, *et al.* Comparative research on the detection of viable organism preparation of *Bacillus licheniformis* between flow cytometry and plate counting method [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2018, 35(3): 352-356.
- [29] 张慧娟, 李伟, 魏建春. 蜡样芽孢杆菌群分类学研究进展[J]. 疾病监测, 2024, 39(3): 355-362.
- ZHANG HJ, LI W, WEI JC. Research progress on taxonomy of *Bacillus cereus* group [J]. Disease Surveill, 2024, 39(3): 355-362.
- [30] 祁岩, 游春萍. 流式细胞术在乳品微生物检测中的应用[J]. 食品与机械, 2023, 39(2): 221-227.
- QI Y, YOU CP. Application of flow cytometry in microbial detection of dairy products [J]. Food Mach, 2023, 39(2): 221-227.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介

刘 娜, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: xinyiliuna@163.com

李景云, 主任技师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: lijingyun@nifdc.org.cn

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