

多管发酵法测定食品中大肠菌群的方法学验证及质量控制



邱小凤*, 戴朝洲, 杨玉玲, 宋苑菲

赣州美科检测科技有限公司, 江西赣州 341000

摘要: 提供客观证据以证明试验能够正确运用多管发酵法测定食品中大肠菌群, 确保结果的准确性, 并对不确定度、注意事项等方面进行探讨, 为多管发酵法测定大肠菌群的准确性提供一定参考和技术保障, 以期更好服务于食品监测工作。采用多管发酵法测定食品中大肠菌群, 参考 RB/T 033—2020《微生物检测方法确认与验证指南》, 通过使用低、中、高 3 个接种水平人为污染的样品, 验证方法的估计偏差、精密度等, 并对不确定度、注意事项和优缺点等方面进行探讨。结果表明, 该方法低、中、高 3 个接种水平与非选择培养基计数结果的估计偏差分别为 0.180、0.097、0.064, 精密度分别 9.8%、1.4%、5.2%。验证参数估计偏差与精密度等均符合要求, 多管发酵法可在实验室开展并保证结果的准确性。

关键词: 方法学验证; 食品; 大肠菌群; 多管发酵法

DOI: [10.57237/j.wjfse.2023.03.001](https://doi.org/10.57237/j.wjfse.2023.03.001)

Method Validation and Quality Control for Determination of Coliform in Food by Multi-tube Fermentation

Qiu Xiaofeng*, Dai Chaozhou, Yang Yuling, Song Yuanfei

Ganzhou Meike Testing Technology Co., Ltd., Ganzhou 341000, China

Abstract: Objective evidence is provided to prove that the experiment can correctly use the multi-tube fermentation method to determine coliform in food, to ensure the accuracy of the results, and uncertainty, precautions and other aspects are discussed, to provide a certain reference and technical guarantee for the accuracy of the multi-tube fermentation method to measure coliform, hoping to better serve the food monitoring work. Coliform in food was determined by multi-tube fermentation method, and the estimation deviation and precision of the method were verified by using artificially contaminated samples at low, medium and high inoculation levels according to RB/T 033—2020 Guidelines for Confirmation and Verification of Microbial Detection Methods. The uncertainty, precautions, advantages and disadvantages of the method were discussed. Results showed that the estimated deviations between low, medium and high inoculation levels and the results of non-selective medium count were 0.18, 0.097 and 0.064, and the precision was 9.8%, 1.4% and 5.2%, respectively. The estimation deviation and precision of verification parameters met the requirements. The multi-tube fermentation method can be carried out in laboratory and ensure the accuracy of the results.

*通信作者: 邱小凤, 530177378@qq.com

Keywords: Methodological Verification; Food; Coliform Bacteria; Multi-tube Fermentation

1 引言

大肠菌群是一类与动物粪便有关的细菌, 需氧和兼性厌氧的革兰阴性无芽胞杆菌, 在温度 37℃ 条件下能发酵乳糖、产酸产气[1, 2]。大肠菌群是评价食品卫生情况及受污染程度的最常用指标之一[3, 4]。大肠菌群的检测是食品安全检测中必不可少的项目, 大肠菌群数量超标在食品中是常见的, 并且在很多地区的食品加工业及餐饮业进行卫生检查后大肠菌群数量超标是最突出的问题。大肠菌群的检测方法有平板计数法、MPN 法, 平板计数法运用较广, 但是 MPN 也是非常重要的一个方法, 特别是保健食品, 其产品标准(GB 16740-2014)指定用 MPN 法检测, 相比平板计数法, 其检测下限较低, 检测准确性更高[5]。

目前考察微生物检测方法是否可行, 大部分实验室仅核查实验室的人员、设施设备、环境条件等是否满足要求或者验证微生物方法验证的方法参考药品微生物限度检查法[6], 但该方法本身不适合食品中微生物检测方法的确认及验证, 目前可参考 RB/T 033—2020《微生物检测方法确认与验证指南》[7], 因此从该标准为参考, 设计试验方案, 验证 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》[8] MPN 法是否满足其方法要求, 可获得准确的数据, 并对不确定度、注意事项等方面进行探讨, 为多管发酵法测大肠菌群的准确性提供一定参考和技术保障, 以期能够更好服务食品监测工作。

2 材料与方法

2.1 仪器

UW4200H 型电子天平(岛津企业管理中国有限公司); BXM-100VE 型立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限医疗设备厂); SPX-250 型生化培养箱(常州普天仪器制造有限公司)。

2.2 试剂

产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*) (ATCC 13048, 广东环凯微生物科技有限公司); 粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) (ATCC 29212, 上海工业微

生物研究所); 月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤、煌绿乳糖胆盐(BGLB)肉汤、磷酸盐缓冲液、营养琼脂(NA)均来自广州环凯生物技术有限公司; 维生素C咀嚼片购买至药店。

2.3 方法

2.3.1 菌液的制备

接种产气肠杆菌、粪肠球菌储备菌株接种到营养琼脂连续传代至(第3代菌), 取的新鲜培养物(第3代菌)至100 mL生理盐水中, 采用平板计数法检测菌液浓度, 此浓度的菌液作为备用菌液。

2.3.2 样品验证组制备

取3份25 g维生素C咀嚼片样品分别加入225 mL磷酸盐缓冲液中, 加入不同量的菌悬液使样品污染程度分别为低、中、高接种水平, 3份样品编号分别为A、B、C, 混匀调节至pH 6.5~7.5备用。

2.3.3 样品组

取25 g维生素C咀嚼片加入225 mL磷酸盐缓冲液中, 混匀调节至pH 6.5~7.5备用, 样品分别编号为D。

2.3.4 初发酵试验

根据对样品污染状况的估计, 将样品匀液用磷酸盐缓冲液稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} 。选择3个适宜的连续稀释度的样品匀液, 即 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} , 每个稀释度接种3管月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤, 每管接种1 mL。36℃培养24 h, 观察倒管内是否有气泡产生, 24 h产气者进行复发酵试验(证实试验), 如未产气则继续培养至48 h, 产气者进行复发酵试验。未产气者为大肠菌群阴性。

2.3.5 复发酵试验(证实试验)

用接种环从产气的LST肉汤管中分别取培养物1环, 接种于煌绿乳糖胆盐肉汤(BGLB)管中, 36℃培养48 h, 观察产气情况。产气者, 计为大肠菌群阳性管。

2.3.6 数据处理

精密度依据结果取对数后，按照 $RSD \leq 10\%$ 进行评估，估计偏差依据 RB/T 033—2020《微生物检测方法确认与验证指南》进行判定，按照惯例，在计算前，数据（微生物计数结果）单位从 CFU/g 或 CFU/mL 转换为 \log_{10} (CFU/g) 或 \log_{10} (CFU/mL) [9]。

3 分析与讨论

3.1 空白试验

每次试验均用无菌生理盐水按照步骤进行空白测定，培养后无任何颜色变化，测定结果均符合试验要求。

3.2 阴阳性对照

将大肠菌群的标准菌株制成一定浓度的菌悬液，分别取相应水量的菌悬液按接种的要求接种于试管中，然后按试验要求培养，阳性菌株（产气肠杆菌）呈阳性反应，阴性菌株（粪肠球菌）呈阴性反应，见图 1，该测定结果符合试验要求。

3.3 精密度分析

精密度（Precision）指在规定测试条件下，同一份均匀样品多次取样测试结果之间的接近程度，分为重复性和重现性。对于经典微生物分析方法，测量精密度的前提是认为微生物在充分混匀的培养基上随机分布，符合泊松分布。精密度分为四个水平：实验室内重复性、实验室内重现性、实验室间重复性、实验室间重现性[10, 11]。本次验证采用实验室内重复性来验证精密度。

对 3 种浓度的样品进行 10 次重复测定，并计算其

反对数，求反对数的 RSD，检验该方法的精密度。从测定结果得出，样品 A 平均值 15 MPN/g，取对数后 RSD 为 9.8%；样品 B 平均值 40 MPN/g，取对数后 RSD 为 1.4%；样品 C 平均值 116 MPN/g，取对数后 RSD 为 5.2%。样品的精密度结果均符合验证要求（ $\leq 10\%$ ）具体测定结果见表 1。



注：左边阴性菌不产气，右边阳性菌产气
Note: Negative bacteria on the left do not produce gas, positive bacteria on the right produce gas

图 1 阴阳性对照产气试验

Figure 1 Negative and positive control gas production test

表 1 样品中大肠菌群 MPN 值

样品	10 个平行测定值/(MPN g ⁻¹)										平均值/(MPN g ⁻¹)	取对数后 RSD/%
样品 A	11	11	18	11	18	11	11	18	18	18	15	9.8
样品 B	38	42	42	42	42	38	38	38	42	42	40	1.4
样品 C	93	93	150	93	150	93	93	93	150	150	116	5.2
样品 D	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0	/

3.4 准确度分析

准确度（Accuracy）指测量结果与真实值之间的接近程度，真实值可以用已知的、可接受的参比

值代替；偏差（Bias）指测量结果与参比值之间的差异。准确度用于一组测量结果时，是随机因素（随机误差）和偏倚因素（总的系统误差）的综合体现[12]。微生物定量分析方法的准确度可采用与非选择性培养

基平板计数结果的估计偏差来评价准确度。

因试验采用的样品为人为污染样品，且没有可同步进行的对照方法，故采用非选择性培养基平板计数琼脂另计数添加菌悬液的样品，考虑 1 mL 样品进行平板计数需要点出菌落数，因此样品的污染程度要足够高，否则无法进行点数，此外，MPN 法最高准确定量的值为 1100 MPN/g，高于 1100 MPN/g 则无法准确知道菌含量的数值，故方法验证方案设计要综合考虑平板计数与 MPN 法可读取数值的范围。

样品验证组与非选择性平板计数，估计偏差 R 计算如式(1)。

$$R=|lg(MPN\ 值)-lg(平板计数菌落数)| \tag{1}$$

从表 2 可知，不同污染程度样品 MPN 法检测结果与平板计数法检测结果相比，估计偏差分别为 0.18、0.097、0.064 均<0.5，估计偏差符合要求。样品具体测定结果见表 2。

采用多管发酵法检测食品中的大肠菌群，对样品进行空白对照、阴阳性对照，以及对精密度和准确度进行验证，结果都在满意范围内。实验室可获得准确的数据，满足其方法要求。

表 2 样品中非选择性培养基平板计数结果及与 MPN 法结果比较

样品组	MPN 平均值/(MPN g ⁻¹)	平板计数菌落数/(CFU g ⁻¹)	取反对数差值
A	15	10	0.180
B	40	38	0.097
C	116	100	0.064
D	<3.0	<10	/

3.5 不确定度分析

影响大肠菌群 MPN 值计算结果不确定度的因素有很多，如培养基称量配制过程的误差、取样稀释过程引起的误差、样品保存条件、购买培养基质量的好坏、培养时间长短、培养温度的控制等[13]。实验室内再现性标准偏差是获取测量不确定度的首选。实验室可以据此在检测报告中给出测量不确定度值。试验方法的理论缺陷是无法考虑到偏倚。

3.6 注意事项

样品分析应从样品稀释、初发酵试验、复发酵试验等方面注意，试验前 1 d 进行菌液浓度的测定，将菌液放置于冰箱（4 ℃ 以下待用），发现第 2 d 使用时，产气大肠杆菌会死亡或繁殖，导致检测结果偏小或偏大，建议在试验过程中多稀释几个梯度。发酵试验过程中应注意阳性管的判断。试管装培养基经过高温灭菌后，很大一部分试管中的小倒管会存在小气泡，这部分培养基只能弃用，导致资源浪费，实验室常规消除气泡的方法是用针管向小倒管里注满培养基后放入试管中，待灭菌锅内温度冷却至室温时开盖[14]，该方法有效消除试管残留气泡的干扰。试验发现有些试管只产酸未产气的为疑似阳性管，初发酵时需要进一步进行复发酵以证实结果，复发酵不明显时需延长

培养时间至 48±2 h。

4 结论

综上所述，采用多管发酵法检测食品中的大肠菌群，对该方法的主要技术要素空白对照、阴阳对照、估计偏差、精密度对方法进行验证，低、中、高 3 个接种水平样品经检测，其 MPN 法检测结果与非选择性琼脂平板计数检测结果相比，估计偏差均<0.5，RSD 分别 9.8%、1.4%、5.2%，估计偏差与精密度均符合要求。因此实验室可获得准确的数据，满足其方法要求。方法验证工作是一项复杂、耗时耗材的操作过程，周期长，干扰因素多，控制不当很难达到验证要求和效果，所以拿到一个新方法，我们得采取有力的措施，杜绝不采取检测方法的验证，导致日常检测的失控现象[15]。本研究希望能给食品微生物方法验证提供一定的参考依据，建立科学、准确、可行、可信的验证方法。

参考文献

[1] 邓泽, 鲁朝旭, 袁姁, 等. 多管发酵法测定水体中粪大肠菌群的方法验证及质量控制 [J]. 科技风, 2021, 4 (10): 181-182.

[2] 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 (06): 101. DOI: 10.16043/j.cnki.cfs.2018.06.075.

- [3] 孟庆红, 吕新, 贾培培, 等. Soleris 检测技术在冰淇淋中大肠菌群检测的应用研究 [J]. 中国奶牛, 2014, 34 (2): 14-17.
- [4] 陈灿映. 大肠菌群快速检测培养基的研制及评价 [D]. 郑州: 郑州大学, 2012.
- [5] 涂楚国. LTSE 法快速检测水质、食品、冷饮、餐具大肠菌群的研究 [J]. 中国公共卫生, 1990 (11): 500-502.
- [6] 《中国药典》微生物限度检查法 [M]. 中国标准出版社, 2020.
- [7] 国家认证认可监督管理委员会. 微生物检测方法确认与验证指南: RB/T 033—2020 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验大肠菌群计数: GB 4789.3—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [9] 食品微生物定量检测的测量不确定度评估指南: RB/T 151—2016 [S]. 国家认证认可监督管理委员会, 2016.
- [10] 安春艳, 井良义, 陈卓等. 药品微生物经典分析方法的验证探讨 [J]. 中国药品标准, 2023, 24 (02): 109-116. DOI: 10.19778/j.chp.2023.02.001.
- [11] 侯雪, 郑卫东, 胡莉, 等. 浅析化学检测实验室的方法确认和方法验证 [J]. 实验室研究与探索, 2016, 35 (2): 255-258.
- [12] 刘艳霞, 梁文文, 卢仑等. 浅谈食品检测实验室的方法验证和方法确认 [J]. 食品安全导刊, 2023 (12): 162-164. DOI: 10.16043/j.cnki.cfs.2023.12.030.
- [13] 张贵刚, 黄博珠. 粪大肠菌群多管发酵法不确定度的评定 [J]. 资源节约与环保, 2018 (8): 37, 48.
- [14] 黎尧, 张绍斌. 多管发酵法测定水质粪大肠菌群的探讨 [J]. 环境与发展, 2019 (5): 116-118.
- [15] 付伟超, 郝凤霞. 检测实验室方法验证和方法确认探讨 [J]. 轻工标准与质量, 2018 (04): 59-61. DOI: 10.19541/j.cnki.issn1004-4108.2018.04.020.