

TEMPO/TVC 法与国标方法测定食品中 菌落总数的比较研究

杨红 凌秀梅 李俊霞 周浩 邓堃 叶梅 万渝平*

(成都市产品质量监督检验院 四川 成都 610041)

摘要:【目的】确证 TEMPO/TVC 计数食品中菌落总数的检测性能。【方法】使用 TEMPO/TVC 法和国标方法 GB4789.2 对熟肉制品、方便食品、速冻食品、膨化食品、糖果、糕点、调味品 7 类食品进行菌落总数测定。【结果】TEMPO/TVC 法和国标方法检测食品中菌落总数的检测结果一致性较好(符合率 95.4%); 且两种方法检测 7 类食品样品的检测结果 P 值均大于 0.05, 无显著性差异。【结论】TEMPO/TVC 法具有操作简便、快速、高效和人为误差小的特点, 在日常检测中值得推广应用。

关键词: TEMPO/TVC 法, 国标法, 菌落总数, 食品

The comparing study of TEMPO/TVC method for determination of aerobic plate count with national food safety standard method in foods

YANG Hong LING Xiu-Mei LI Jun-Xia ZHOU Hao DENG Kun
YE Mei WAN Yu-Ping*

(Chengdu Product Quality Supervision and Inspection Institute, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: [Objective] To confirm the detecting property of TEMPO/TVC method in foods. [Methods] TEMPO/TVC method compared with national food safety standard GB4789.2 aerobic plate count method in foods, including cooked meat products, convenience food,

*通讯作者: Tel: 86-28-85173317; 信箱: cdzjwyp@163.com

收稿日期: 2011-12-14; 接受日期: 2012-05-15

quick-frozen food, puffed food, candy, pastry, condiment. **[Results]** The results of TEMPO/TVC method and national food safety standard method showed good agreement; and the *P* value was greater than 0.05, no significance difference between the two methods. **[Conclusion]** TEMPO/TVC method is a rapid and accurate method, worthy of promoting in routine examination.

Keywords: TEMPO/TVC method, National food safety standard method, Aerobic plate count, Food

菌落总数(Aerobic plate count, APC)是用来判定食品被细菌污染的程度及卫生质量,它反映食品在生产过程中是否符合卫生要求,以便对被检样品做出适当的卫生学评价。菌落总数的多少在一定程度上标志着食品卫生质量优劣。我国对食品中菌落总数的检测主要采用PCA倾注法,该经典方法在食品微生物领域被广泛接受并沿用至今,其结果具有权威性,但传统的培养方法在操作程序和判定结果的时间方面存在不足之处:工作效率低,检测的准确性容易受到培养基质量与配制水平的影响^[1]。TEMPO/TVC(Total viable count)法是使用 TEMPO[®]自动微生物定量检测仪对食品进行菌落计数的一种快速检测方法。

本研究对 TEMPO/TVC 法与国标方法 GB4789.2^[2]检测食品中菌落总数进行了比较研究,旨在探求一种适应微生物实验室要求的快速、高效的检测方法,以满足食品突发事件对快速检测的要求,为今后的食品快速检测方法的研究及应用积累经验。

1 材料与方法

1.1 试剂和培养基

磷酸盐缓冲液、平板计数琼脂、TSA 琼脂 北京陆桥技术有限责任公司; TEMPO[®]菌落总数计数卡、TEMPO[®]菌落总数培养基瓶、TEMPO[®]无菌过滤袋,法国梅里埃公司。

1.2 菌株

大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC8099、金黄

色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC6538 和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) ATCC11778 均购于北京陆桥。甲型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi A*)和白葡萄球菌(*S. albus*)来自本实验室菌种室。

1.3 设备

HVE-50 高压蒸汽灭菌锅,日本 HIRAYAMA 公司; MIR-253 生化培养箱(36 °C±0.5 °C),日本 SANYO 公司; MIX2 拍击式均质器,法国 AES 公司; MS3 digital 漩涡混合器,德国 IKA 公司; AR5120 天平(精确度 0.01 g),梅特勒中国; TEMPO[®]自动微生物定量检测仪配有 TEMPO[®]充填器、TEMPO[®]读数器,法国梅里埃公司。

1.4 TEMPO/TVC 法原理概述^[3]

TEMPO/TVC 测试包含专门用于检测菌落总数的培养基和卡片。培养基接种待测样本,再通过 TEMPO[®]充填器传输到有 3 种不同规格的 48 孔的卡片中。TEMPO[®]充填器同时也会密封卡片以避免在随后的处理过程中带来污染的风险。培养期间,卡片中存在的微生物分解培养基中的底物,并产生能被 TEMPO[®]读数器检测到的荧光信号。按照 MPN^[4]方法的原理,TEMPO[®]系统根据阳性孔的大小和数目来推算出原始样本中的微生物数量,以 CFU/g (mL)报告。

1.5 样品类型

本研究选取 240 个食品样品,样品涵盖熟肉制品、方便食品、速冻食品、膨化食品、糖果、糕点、调味品,以代表各类食品样品。

1.6 样品制备

1.6.1 标准菌株混合菌悬液的制备: 将标准菌株大肠杆菌 ATCC8099、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、蜡样芽孢杆菌 ATCC11778、甲型副伤寒沙门氏菌和白葡萄球菌分别用 TSA 琼脂复活后, 使用接种环挑取菌落到无菌蒸馏水制成单一菌悬液, 分别吸取 1 mL 单一菌悬液混匀制成混合菌悬液, 无菌操作进行 10 倍递增稀释。

1.6.2 自然样品制备: 样品制备按照 GB4789.2 方法: 无菌操作取 25 g (mL) 样品于无菌过滤袋中, 加入 225 mL 磷酸盐缓冲液, 拍击均质, 制成 1:10 的样品匀液, 然后依次制成 10 倍递增稀释的样品匀液, 同时用于国标法和 TEMPO/TVC 法的测定。

1.7 样品检测

1.7.1 国标法测定: 选用适宜稀释度标准菌株混合菌悬液和自然样品匀液, 吸取 1 mL 于无菌平皿内, 每个稀释度做 2 个平皿。及时将 15–20 mL 冷却至 46 °C 的平板计数琼脂培养基倾注平皿, 并转动平皿使其混合均匀。待琼脂凝固后, 将平板翻转, 36 °C±1 °C 培养 48±2 h。培养后, 立即计数每个平板上的菌落数。

1.7.2 TEMPO/TVC 法: 向专用培养基瓶中加入

3.0 mL 或 3.9 mL 无菌水溶解干粉培养基, 精确移取 1.0 mL 或 0.1 mL 1:10 标准菌株混合菌悬液和自然样品匀液加入 3.0 mL 或 3.9 mL 已溶解的专用培养基中, 充分混匀。打开 TEMPO 准备软件, 输入相应的样品信息, 扫描 TEMPO/TVC 培养基瓶及 TEMPO/TVC 测试卡上的条形码, 通过 TEMPO 充填器将样品液充填至测试卡上, 将样品制备成 1:40 (计数范围为 $10-4.9 \times 10^4$ CFU/g) 或 1:400 (计数范围为 $100-4.9 \times 10^5$ CFU/g) 的 TEMPO/TVC 测试卡。将制备好的 TEMPO/TVC 测试卡置于生化培养箱内, 36 °C±1 °C 培养 40 h。读卡在 TEMPO 读卡器, 由读卡箱通过光学方法对测试卡进行自动读取, 由电脑对结果进行统计分析并显示检测结果。

2 结果与讨论

2.1 标准菌株添加试验

自然样品中微生物种类繁多, 本文选取具有代表性的革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌作为添加试验的标准菌株, 将制备的标准菌株混合菌悬液用 TEMPO/TVC 法和国标方法同时进行检测, 结果见表 1。

表 1 两种方法对标准菌株添加试验结果
Table 1 Results of specificity test of two methods

| lg TVC ^a | lg APC ^b | 结果评价 ^c Results ^c |
|---------------------|---------------------|---|
| 5.59 | 5.35 | $P=0.322>0.05$ |
| 4.89 | 4.55 | |
| 4.08 | 3.65 | |
| 3.15 | 2.96 | |
| 2.00 | 2.38 | |
| 1.52 | 1.30 | |

注: ^a: lg TVC 指 TEMPO 读数的对数值; ^b: lg APC 指国标方法菌落计数的对数值; ^c: t 检验^[5]。

Note: ^a: lg TVC, the log value of TEMPO/TVC method's numerical reading; ^b: lg APC, the log value of GB method's numerical reading; ^c: t test^[5].

如表 1 所示, TEMPO/TVC 法与国标方法的检测结果经 t 检验无显著差异。

2.2 TEMPO/TVC 法与国标方法检测结果的符合性分析

同时采用 TEMPO/TVC 法与国标方法对不同 类型食品样品进行菌落总数测定, 将检测结果 进行符合率比较, 结果见表 2。

如表 2 所示, TEMPO/TVC 法和国标方法在 对 240 个不同种类食品样品的检测比较中, 总符 合率高达 95.4%, 表明两种方法检测结果有很高

的符合性。240 个食品样品中仅有 11 个样品的 检测结果不符合, 其原因为: 原料含有强抑制剂 (如香料、高盐分产品)或样品色泽较深影响读数 器的荧光判断; 同时, TEMPO/TVC 法由仪器进 行自动的读数, 也会因固有设置而产生测量不 确定度^[7]。

2.3 TEMPO/TVC 法与国标方法检测结果的 统计分析

对 TEMPO/TVC 法与国标方法检测菌落总数 的结果进行统计分析, 结果见表 3。

| 表 2 两种方法检验不同类型食品样品的符合率 | | | | |
|---|---------------|--|--|---------------------------|
| Table 2 Agreement rates of two methods for the testing of different types of food | | | | |
| 样品种类 Sample types | 样品数 Number | 符合 ^a 的样品数 Number of agreement ^a | 不符合 ^b 的样品数 Number of disagreement ^b | 符合率 Agreement rate (%) |
| 熟肉制品 Cooked meat products | 48 | 46 | 2 | 95.8 |
| 方便食品 Convenience food | 26 | 24 | 2 | 92.3 |
| 速冻食品 Quick-frozen food | 33 | 33 | 0 | 100 |
| 膨化食品 Puffed food | 32 | 32 | 0 | 100 |
| 糖果 Candy | 35 | 33 | 2 | 94.3 |
| 糕点 Pastry | 45 | 41 | 4 | 91.1 |
| 调味品 Condiment | 21 | 20 | 1 | 95.2 |
| 共计 Total | 240 | 229 | 11 | 95.4 |

注: ^a: “符合”系指 $|\lg \text{TVC} - \lg \text{APC}| < 1$, 表明细菌计数值在同一数量级之内; ^b: “不符合”系指 $|\lg \text{TVC} - \lg \text{APC}| > 1$, 表明细菌计数值超出同一数量级。^[6]

Note: ^a: “Agreement” means $|\lg \text{TVC} - \lg \text{APC}| < 1$, indicating that the bacteria count in the same order of magnitude; ^b: “dis-agreement” means $|\lg \text{TVC} - \lg \text{APC}| > 1$, indicating that the bacteria count beyond the same order of magnitude.^[6]

| 表 3 两种方法检验不同类型食品样品结果的统计分析 | | |
|---|---------------------------------|--|
| Table 3 Statistical analysis of results from two methods for the testing of different types of food | | |
| 样品种类 Sample types | t 检验样本数 Number of t test | 阳性样品 t 检验的 P 值 The P value of positive samples t test |
| 熟肉制品 Cooked meat products | 48 | 0.349 |
| 方便食品 Convenience food | 26 | 0.144 |
| 速冻食品 Quick-frozen food | 33 | 0.158 |
| 膨化食品 Puffed food | 32 | 0.619 |
| 糖果 Candy | 35 | 0.267 |
| 糕点 Pastry | 45 | 0.783 |
| 调味品 Condiment | 21 | 0.240 |

TEMPO/TVC 法与国标方法分别检测 7 类食品样品, 其配对 t 检验的 P 值分别为: 0.349、0.144、0.158、0.619、0.267、0.783 和 0.240, 均大于 0.05, 表明两种方法的检测结果不存在显著性差异。

2.4 TEMPO/TVC 法与国标方法检测结果的相关性分析

TEMPO/TVC 法和国标菌落总数测定法的相关性见图 1。

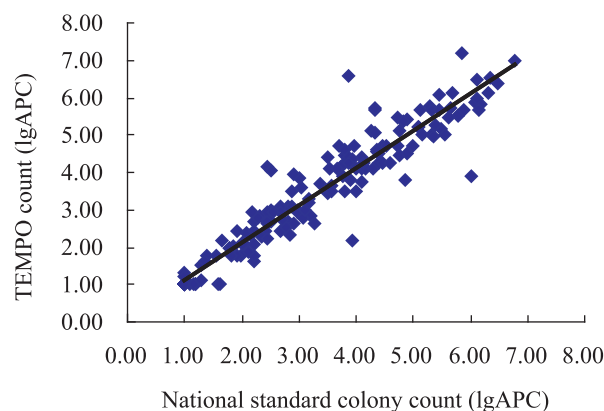


图 1 两种方法检验不同类型食品样品结果的相关性
Fig. 1 Linear regression of the results from two methods for the testing of different types of food

可以看出, 这两种方法测定 240 个样品所得菌落总数的相关系数为 0.91, 说明这两种方法具有很高的相关性和一致性。

3 结论

本文研究表明, TEMPO/TVC 法与食品安全国家标准方法对菌落总数的检测结果符合率较高, 具有很高的相关性和一致性; 且两种方法检测 7 类食品样品的结果无统计学差异。TEMPO/TVC 法不适用于原料含抑制剂或色泽较深的样品, 但是作为一种全新的自动微生物定量检测法, TEMPO/TVC 法具有全面自动化的特点, 加样充填、读数、报告均由仪器完成, 流程标准

化, 并且每张 TEMPO/TVC 测试卡都有独立的条码, 保证检测结果的唯一性和可追溯性; 无需传统方法中倾倒琼脂的步骤, 从而避免了对细菌可能造成的热损伤; 在检测量较大的情况下, TEMPO/TVC 法使用 TEMPO[®]充填器进行样品的递增稀释, 节省大量人力、物力, 同时避免了样品的二次污染, 检测结果由 TEMPO[®]读数器判读, 减少检测结果的人为误差。综上所述, 在食品安全相关领域的实验室, 可选用 TEMPO/TVC 法进行食品菌落总数的快速检验。

参 考 文 献

- [1] 卢行安, 顾其芳, 袁宝君, 等. AOAC PetrifilmTM 菌落总数测试片法与食品中菌落总数测定国标方法的比较研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(3): 164-167.
- [2] 国家卫生部. GB 4789.2-2010. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [3] Johnson R, Mills J, Bezzole L. BioMérieux TEMPO[®]TVC test granted PTM status[J]. AOAC Research Institute News, 2008(5): 23-25.
- [4] 陆苏颺. MPN 法的原理与局限性分析[J]. 食品工业, 2004(7): 23-24.
- [5] 陆建身, 赖麟. 生物统计学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 68-76.
- [6] Baylis C, Jewell K, Oscroft C, et al. Guidelines for Establishing the Suitability of Food Microbiology Methods[M]. Chipping Campden: Campden & Chorleywood Food Research Association Group, 2001: 72.
- [7] 韩伟, 顾鸣, 金伟青. 基于 MPN 原理的 TEMPO/TVC 法检测食品中的细菌总数及其测量不确定度的评定[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 668-671.