

食品中金黄色葡萄球菌定量检测方法比较研究

谢范英

(宁德市产品质量检验所, 福建 宁德 352100)

摘要:采用 Baird—Parker 平板涂布法、Baird—Parker 倾注法及 Petrifilm 测试纸片法, 对含一定浓度的金黄色葡萄球菌标准菌液进行计数, 并对食品中的金黄色葡萄球菌进行检验。结果表明, 三种方法的检测结果有较好的一致性, 且倾注法和纸片法操作简单、结果稳定、再现性好; 此外, 纸片法在检测简便性、准确性和检测时间等方面的比较中优于倾注法, 综合考虑, 纸片法在相关行业的日常检测中值得推广应用。

关键词:金黄色葡萄球菌; 涂布法; 倾注法; 纸片法

中图分类号: TB

文献标识码: A

文章编号: 1672-3198(2014)17-0197-02

0 引言

随着人们日益增长的生活需求, 食品质量和安全问题备受大家关注。而金黄色葡萄球菌作为一种引起人类和动物化脓感染的重要致病菌和造成人类食物中毒的常见致病菌, 已被列为我国食品卫生微生物常规检测项目之一。食品中金黄色葡萄球菌的定量检测方法多采用 Baird—Parker 法, 其作为检测金黄色葡萄球菌的传统方法已使用多年, 且为大家所接受, 但其操作较繁琐、费时费力。近年来, 为了缩短检测时间、简化检测程序, 国内外很多机构研究了一些新的方法, 美国 3M 公司研制的纸片法就是其中一种被诸多国际权威组织认证的标准化测试方法。此外, 还可利用平板倾注法与鉴别培养基 Baird—Parke 培养基结合的方法, 对金黄色葡萄球菌活菌进行快速检测。本实验对 Baird—Parker 平板涂布法、Baird—Parker 倾注法及 Petrifilm 测试纸片法检测金黄色葡萄球菌进行比较, 旨在探求一种适应微生物实验室要求的快速检测方法, 为今后的食品快速检测方法的研究及应用积累经验。

1 料与方法

1.1 材料与仪器

样品: 熟肉制品、水产品、糕点采集自本市若干市场和超市, 各 10 种。

菌株: 金黄色葡萄球菌 ATCC25923 购置于北京陆桥技术责任有限公司。

仪器: Hfsafe—1500TE 型生物安全柜, 上海力申科学仪器有限公司; LABPower—I 型红外接种环灭菌器, 广州海太光电生物科技有限公司; WX—80A 型旋涡混合器, 上海精科实业有限公司; DNP—9172 型电热恒温培养箱; XSP—2CA 型光学显微镜, 上海光学仪器五厂; LC10063038 型拍击式均质器, iMiX 公司。

试剂: 7.5% 氯化钠肉汤、Baird—Parke 琼脂培养基及配套试剂(亚硫酸钾卵黄液)、脑心浸出液肉汤(BHI)、冻干兔血浆, 由北京陆桥技术责任有限公司生产; Petrifilm 金黄色葡萄球菌快速检测测试片, 由美国 3M 公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 标准菌液的制备

将标准菌株金黄色葡萄球菌 ATCC25923 接种于 7.5%

氯化钠肉汤进行增菌, 36℃ 培养 24h; 将增菌液划线接种于 Baird—Parke 琼脂平板上, 36℃ 培养 45h—48h; 挑取 1—2 个菌落用灭菌生理盐水制成菌浓大约为 1.0×10^8 CFU/mL 的菌悬液。

1.2.2 培养基准备

将 Baird—Parke 琼脂培养基按说明进行配制, 灭菌, 制成平板。同时部分培养基 42℃ 水浴备用。

1.2.3 Baird—Parker 平板涂布法

Baird—Parker 平板涂布法按 GB 4789.10—2010 中第二法进行。

1.2.4 Baird—Parker 倾注法

无菌条件下, 制备 10 倍系列稀释样品匀液, 选择 2 个至 3 个适宜稀释度的样品匀液, 每个稀释度分别吸取 1mL 于培养皿中央, 然后再加入 Baird—Parker 培养基, 快速混匀, 培养基凝固后, 倒置于培养箱培养; 36℃ ± 1℃ 培养 45h—48h, 观察结果。典型菌落形态及鉴定参照 GB 4789.10—2010。

1.2.5 Petrifilm 测试纸片法

选择 2 个至 3 个适宜稀释度的样品匀液, 每个稀释度接种两张测试片。将测试片置于平坦的实验台面上, 揭开上层膜, 吸取 1mL 样液滴于纸片的中央, 将上层膜缓慢盖下, 避免气泡产生, 将压板放置在上层膜中央处, 轻轻摁压使样液均匀覆盖于圆形的培养面积上, 拿起压板, 静置至少 1min 使培养基凝固。将测试片的透明面朝上置于培养箱内, 36℃ ± 1℃ 培养 24h ± 2h。若测试片上无菌落或均为暗紫红色菌落, 则测试结束; 若测试片上出现除典型紫红色以外颜色的菌落, 如黑色、蓝绿色等, 则需使用确认片作进一步确认。

1.2.6 实验方法

(1) 分别用以上三种方法对标准菌液浓度重复性进行实验。

(2) 分别用以上三种方法对食品中的金黄色葡萄球菌进行检验。

2 结果与讨论

2.1 三种方法对金黄色葡萄球菌的计数

三种方法对金黄色葡萄球菌的计数结果如表 1 所示。

表 1 不同方法测得的金黄色葡萄球菌计数
结果比较(×10⁶CFU/mL)

实验 序号	涂布法 (A)	倾注法 (B)	纸片法 (C)	差值 d _{AB}	差值 d _{AC}	差值 d _{BC}	d _{AB} ²	d _{AC} ²	d _{BC} ²
1	123	111	117	-12	-6	6	144	16	64
2	105	115	114	10	9	-1	100	121	1
3	99	110	105	11	6	-5	121	484	121
4	115	108	112	-7	-3	4	49	9	100
5	117	103	110	-14	-7	7	196	0	196
6	102	118	116	16	14	-2	256	324	4
7	93	107	113	14	20	6	196	900	256
8	114	110	115	-4	1	5	16	1	25
9	106	116	109	10	3	-7	100	169	9
10	90	101	116	11	26	15	121	900	361
标准偏差 (离散度)	10.8	5.5	3.8	/	/	/	/	/	/
合计	/	/	/	35	63	28	1299	1493	466

利用 t 检验法对三种方法测定结果两两比较分析,结果如下:

$$t_{AB} = \frac{\overline{d_{AB}}}{s_{\overline{d_{AB}}} / \sqrt{n}} = \frac{34/10}{\sqrt{\frac{1299-35^2/10}{10-1}} / \sqrt{10}} = 0.968$$
$$t_{AC} = \frac{\overline{d_{AC}}}{s_{\overline{d_{AC}}} / \sqrt{n}} = \frac{63/10}{\sqrt{\frac{1493-63^2/10}{10-1}} / \sqrt{10}} = 1.805$$
$$t_{BC} = \frac{\overline{d_{BC}}}{s_{\overline{d_{BC}}} / \sqrt{n}} = \frac{28/10}{\sqrt{\frac{466-28^2/10}{10-1}} / \sqrt{10}} = 1.349$$

从 t 值表查得 $t_{0.05} = 2.262$, 故 $t_{AB} < t_{0.05}$, $t_{AC} < t_{0.05}$, $t_{BC} < t_{0.05}$, $P_{AB} > t_{0.05}$, $P_{AC} > t_{0.05}$, $P_{BC} > t_{0.05}$, 说明涂布法、倾注法和纸片法测得的结果无显著差异,三种方法测得的结果比较接近;而涂布法的离散度为 10.8,倾注法的离散度为 5.5,纸片法的离散度为 3.8,说明纸片法测得的结果精密度、再现性最好,倾注法次之,涂布法最差。

2.2 食品中金黄色葡萄球菌检出结果比较,如表 2 所示。

表 2 三种检测方法的金黄色葡萄球菌检出结果

样品 名称	样品量 (个)	涂布法		倾注法		纸片法	
		检出量 (个)	检出率 (%)	检出量 (个)	检出率 (%)	检出量 (个)	检出率 (%)
熟肉制品	10	1	10	1	20	2	20
糕点	10	0	0	0	0	0	0
水产品	10	2	20	2	20	3	30
总计	30	3	30	3	30	5	50

由表 2 可知,纸片法的检出率最高,为 50%;涂布法和倾注法的检出率比纸片法低,均为 30%。而不同类别的产品检出率也有所不同,被检测样品中水产品的检出率最高,涂布法、倾注法和纸片法的检出率分别为 20%、20% 和 30%;熟肉制品的检出率次之,分别为 10%、10% 和 20%;糕点中金黄色葡萄球菌均未检出,检出率为 0。究其原因,可能与产品的生产加工、包装运输及销售环境等因素有关。

2.3 三种方法检测金黄色葡萄球菌的各项指标比较

三种方法检测金黄色葡萄球菌的各项指标比较如表 3

所示。

表 3 三种方法检测金黄色葡萄球菌的各项指标比较

检测方法	涂布法	倾注法	纸片法
简便性	*	**	***
工作量	***	**	*
检测时间(h)	78	78	24-27
计数准确性	**	**	***
成本	*	*	***

注: * 表示程度。

由表 3 可知,对于简便性和工作量,涂布法和倾注法都包括培养 48h 后对典型菌落做兔血浆凝固酶的实验,操作相当繁琐,同时也加大了工作量;而纸片法由于其培养基系统是预先制备好的,省去了大量繁琐的准备工作,且纸片法对疑似菌落的确认只需加确认反应培养 1h-3h 即可得出结果,与其他两种方法相比工作量最少,操作使用最方便。对于检测时间,涂布法和倾注法从接种培养到典型菌落的验证实验耗时 78h;而纸片法从接种培养到对可疑菌落的确认培养只需 27h 左右,大大地减少了检测时间。对于计数准确性,涂布法和倾注法受人员操作熟练程度影响较大;而纸片法的操作更为标准化,人为误差较小。对于检测成本,涂布法和倾注法的成本相当,而纸片法的成本则要高出许多。

3 结论

采用 Baird-Parker 平板涂布法、Baird-Parker 倾注法及 Petrifilm 测试纸片法对含一定浓度的金黄色葡萄球菌标准菌液进行计数,结果表明,三种方法测得的结果无明显差异,具有较好的一致性;而且纸片法测得的结果稳定、再现性最好,倾注法次之,涂布法最差。通过对食品中的金黄色葡萄球菌进行检验,可知纸片法的检出率最高,涂布法和倾注法的检出率比纸片法低。此外,对这三种方法的其他指标进行比较,可知纸片法在简便性、工作量、检测时间、计数准确性等方面都优于其他两种方法,但是由于所用的测试纸片是进口的,使得纸片法的成本比其他两种方法高出许多,从而在某种程度上制约了其应用。

虽然纸片法的成本高,但是金黄色葡萄球菌的检测结果与传统的 Baird-Parker 平板涂布法无显著差异,且大大缩短了检测时间;操作简便,大大降低了传统检测方法的操作繁琐性及实验时的工作量。所以纸片法在金黄色葡萄球菌定量检测中具有优势,可作为食品中金黄色葡萄球菌快速检测的方法,建议其在检测部门、工厂企业等相关行业得到广泛的应用。

参考文献

[1] 梁景涛,谢翊,林秋芬等. 3 种食品中金黄色葡萄球菌检测方法的比较研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(4): 790-791.

[2] 张琳,李敏,于莉等. 食品中金黄色葡萄球菌检测方法的比较研究[J]. 食品工业科技, 2006, (6): 166-168.

[3] 邓艳华,熊克勇,傅松哲等. 速冻米面制品中两种金黄色葡萄球菌计数方法的比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(8): 1861-1863.

[4] GB4789.10-2010. 食品安全国家标准食品微生物学检验金黄色葡萄球菌检验[S].

[5] 3M 中国有限公司技术中心. 快速检测纸片法技术资料[R]. 2005, (3): 10.

[6] 蔡双福,周芳梅,伍笑平. 食品中金黄色葡萄球菌检测方法的比较研究[J]. 现代食品科技, 2010: 1409-1411.