

Summary of *The Micro Biological Survey Method for microbiological analysis of Total Viable Count and E. coli in Food Samples*

食品样本中菌落总数和大肠杆菌微生物分析的微生物研究方法

论文摘要

¹Giorgia Bottini*, ¹Francesca Losito*, ¹Alessio De Ascentis, ²Francesca Romana Priolisi, ³Annie Tu, ³Philip EC Huang, ²Alberto Mari and ¹Giovanni Antonini

¹Department of Biology, University Roma Tre, 00146 Rome, Italy

²MBS srl, 00131 Rome, Italy

³Royal Biotech GmbH, 14469 Potsdam, Brandenburg, Germany

1. 罗马大学生物系, 00146 罗马, 意大利
2. MBS 有限公司, 00131 罗马, 意大利
3. 德国皇家生物科技, 14469 波茨坦, 勃兰登堡, 德国

Corresponding Author: Prof. Giovanni Antonini, Department of Biology, University Roma Tre, 00146 Rome, Italy, Tel: +39-3290570913; *E-mail:* giovanni.antonini@uniroma3.it

引言

在食品安全的卫生控制过程中, 菌落总数 (TVC) 和大肠杆菌 (*E.coli*) 的检测尤为重要。TVC 针对动物机体中嗜温需要微生物含量给出数量上的判断。这对不同食品中微生物质量的评估提供了重要的理念, 同时也可以用以判断食品的新鲜程度。大肠杆菌 (*E.coli*) 是哺乳动物和鸟内肠道正常的微生物群落的一部分。在 19 世纪初, 大肠杆菌 (*E.coli*) 被确认为判断排泄物污染的好的指示物。标准化方法 (如 ISO 方法) 被作为官方控制的参考分析法。这些标准化方法是基于被广泛用于食品分析实验室的传统微生物培养标准方法。这些技术呈现出几点困难, 如在获得确定的分析结果需要很长的时间 (3-7 天)。在这样的背景下, 我们发明了参考方法替代方法, 称之为 MBS 检测法。这种方法通过比色的快速系统来检测于农产品、水和环境样本中的微生物。MBS 检测法包含用于溶解的分析试剂、即时可用的用于微生物快速分析的反应瓶。分析基于瓶内样本中含有的微生物引起的瓶中物质的颜色变化。整个分析过程即使没有受过专业训练的人也可以在任何地点进行实验操作, 同时除恒温器外无需任何其他实验设备。MBS 检测法测量细菌新陈代谢途径中氧化酶的催化反应, 在这个反应中我们观察到样本中的活细胞数量与酶的反应呈现明确的相关性。颜色变化所需的时间与样本中细菌存在量的对数函数成线性负相关关系; 例如酶的反应, 细菌的数量越多, 颜色变化所需时间越短。

结论

1) 对水样人为污染后的统计分析

用 MBS 检测方法测量的 TVC 和 E.coli 的统计分析是将十个不同样本十次不同稀释以 ISO/TR 13843(2000)、培养基法、ISO9998(1991)作为参考方法。MBS 方法操作可靠性的限值若以培养基法作为参考，范围在 1×10^7 和 <10 CFU/ml。统计分析结果如以下几方面所示：(1)精确度估计；(2)变异数；(3)不确定性。精确度的总体估计根据 ISO/TR 13843 (2000)，使用 ANOVA 分析。根据单边方差分析和双边方差分析都表明：在用 MBS 方法所得的微生物检测结果与用其他参考方法相比不存在统计上的差别。使用 MBS 检测法进行细菌计数的可靠性根据 ISO/TR 13843(2000)用变异数(CV 值)来进行检定。检定的结果 MBS 检测法比其他参考方法更具可靠性。同样，根据 ISO/TR13843(2000)用 χ^2 统计检测结果，用 MBS 检测法进行菌落计数的不确定性小于其他参考检测法。

2) 主要验证

用 MBS 检测法进行 TVC 和 E.coli 的主要验证是根据 ISO 16140(2003)。替代方法必须展示的主要参数包括：线性、精确度和特异性。

- 线性：根据 ISO 16140:2003，MBS 方法和细菌污染程度间成线性负相关关系，相关系数 (R^2) 接近于 1.00，线性关系可以明显确认并观察到。如下图 1 所示：

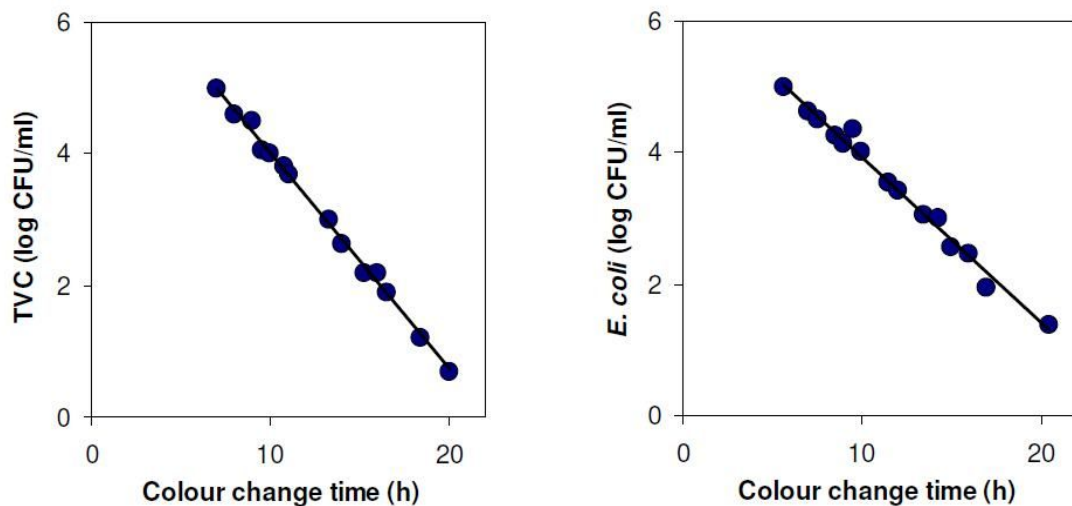


图 1 线性：分析物（TVC 和 E.coli）在 MBS 检测法下含量与变色时间的相关线形图。基于两种方法五种食物样本的比较。

MBS 检测法和微生物的集中度呈线性负相关关系。相关系数(R^2)TVC 是 0.95，E.coli 是 0.98。

- 精确度：相关精确度是 ISO 5725-1:1994/COR 1(1998)中定义的“精确度 accuracy”概念的补充。根据 ISO 16140(2003)，用 MBS 检测法计算的 TVC 和

E.coli 值（以 log CFU/ml 表示）与用其他参考方法计算的值（以 log CFU/ml 表示）在图表中拟合呈直线，说明相关度非常高。实际上，斜率理论上接近 1.00。具体如图 2 所示：

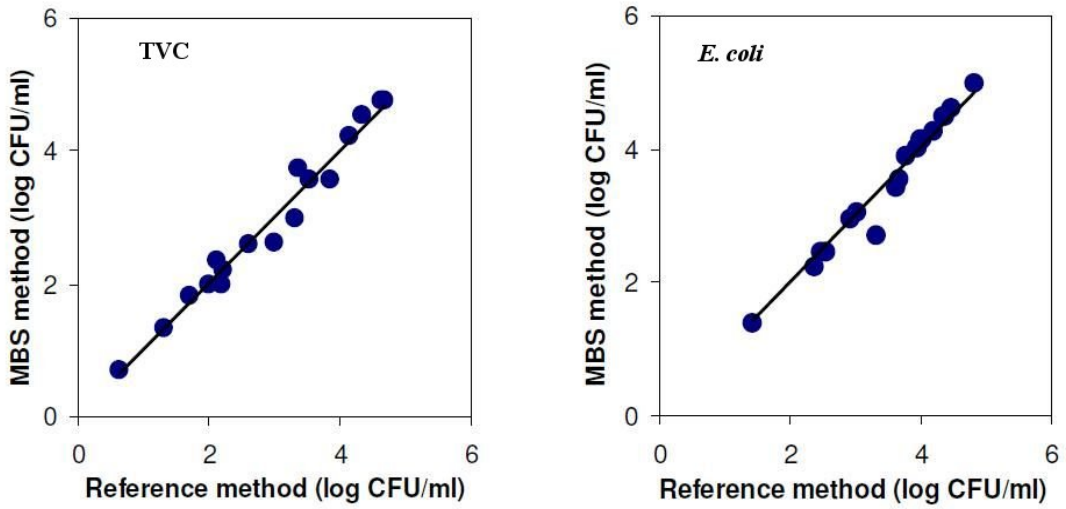


图 2: 精确度: MBS 替代法与其他参考方法在检测 TVC 和 E.coli 时的相关性图形

用培养基法和 MBS 替代法检测获得的细菌数量（以 log CFU/ml 表示）如果相关度良好，则可以被直接观察到。实际上，他们的斜率接近理论值 1.00（具体的，TVC 的斜率为 1.00，E.coli 的斜率为 0.99）。相关系数(R^2)TVC 是 0.94，E.coli 是 0.99。

- 特异性: 根据 ISO 16140(2003), E.coli 只要 1 个即可引起反应瓶的颜色变化。通过实验表明, E.coli 反应瓶对 E.coli 具有特异性, 尽管 E.coli 反应瓶对大肠菌群菌株的特异性较低, 对肠杆菌科的特异性中间, 对革兰氏阳性菌的特异性较高。对于 TVC, 所有需氧菌株 (平均) 只要 1 个即可充分地引起反应瓶变色。

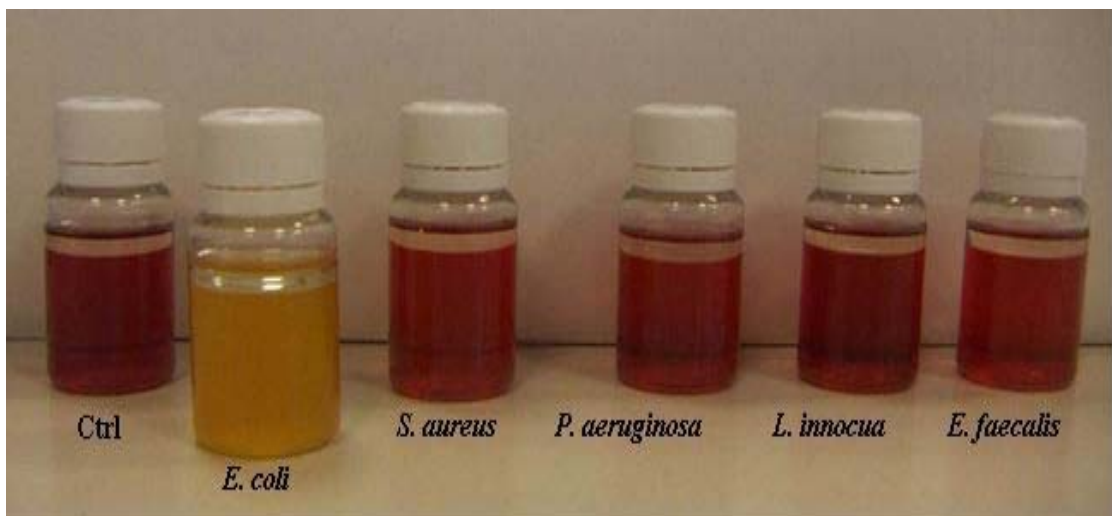


图 3: MBS 替代法检测 E.coli 的特异性

对不同的细菌连珠认为接种后观察其特异性。图 3 显示：将 E.coli 的反应瓶接种五种不同的微生物 24 小时候，只有 E.coli 反应瓶发生了颜色变化，从红色变为黄色。其他颜色不变，证明了其高特异性。

讨论

近几年来，食品工业对微生物质量快速检测的原材料和产成品的需求促使微生物分析的替代分析法的发展和精炼。替代方法相对于参考方法又快又便捷。在这个背景下，本研究的目标就是探讨可替代方法 MBS 检测法对 TVC 和 E.coli 的有效性进行验证，这项验证根据欧盟指令 91/492/CEE，在 $44^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 小时，嗜热大肠菌群从色氨酸产生吲哚。验证意在对比与替代法获得结果的差异。通过线性、精确性、特异性三个层面将 MBS 检测法与其他参考方法进行了比对，统计对比根据 ISO/IEC 17025(2005)和 ISO(2003)的规定进行。**结果表明，在验证水样、自然污染的食物样本中 TVC 和 E.coli，MBS 检测法与其他参考方法的检测结果完全相等。**当对环境样本进行验证时，包括自然污染的样本是非常重要的。我们的研究选择的样本有五种不同的模子：奶酪、蔬菜、白米、红肉和水果。

验证结果在对食品样本进行分析时，MBS 检测法作为替代方法具有非常强的可靠性。线性拟合也非常良好。特异性在假阴性和假阳性的存在方面也非常令人满意。精确性在 125 个自然污染的样本实验中，MBS 方法与其他参考方法相比较表现出了非常好的相关性。

比较 MBS 方法，传统的培养基法虽然肉眼可以观察，但是需要专业的操作人员进行试验，并且操作过程非常复杂。其他的检测方法，如免疫或者基因探针法虽然很灵敏速度也不慢，但是需要昂贵的实验设备，需要专业的操作人员。但实际上，免疫法的灵明度过高（导致有些个别菌株的特异性抓不到），而基因探针法的成本过于高昂。MBS 检测法的比色反应主要基于对新城代谢的测量，而目前大多数检测方法对于 E.coli 的测量以 β -葡(萄)糖苷酸酶活动为基础。然而，这种方法是没办法检测到治病的（尽管通常不会形成）E. coli O157:H7 的 Veto 细胞毒素。而 MBS 方法对于 E. coli O157:H7 的检测是基于检测色氨酸中产生的吲哚，因此可以顺利检测到。

译稿人：Emily Tsui