

电导率法快速检测食品细菌总数的研究

宁初光¹, 杨洋², 吴小勇²

(1. 无限极(中国)有限公司, 广东新会 529156) (2. 广东药学院食品科学学院, 广东中山 528458)

摘要: 电导率法是最近发展起来的应用于微生物检验的一项电化学技术。本研究先建立了利用电导率法测定几种常见食品细菌总数的标准曲线, 然后通过平行实验验证了电导率法快速检测食品细菌总数的重现性, 再通过配对实验比较了电导率法与国标法测定结果符合率; 经统计学卡方检验, 结果 $P > 0.05$, 表明两种方法无显著性差异, 结果符合率为 92.7%; 说明电导率法作为一种快速检测方法用于食品细菌总数的检验是可行的。

关键词: 电导率法; 细菌总数; 快速检测

文章编号: 1673-9078(2012)2-237-240

Study on Conductivity Method-a Rapid Detection Method for Food Total Aerobic Bacterial Count

NING Chu-guang¹, YANG Yang², WU Xiao-yong²

(1. Infinitus (China) Company Ltd, Xinhui 529156, China)

(2. School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China)

Abstract: Conductivity method is a recently-developed electrochemistry technology in the microorganism detection. This study investigated the accuracy and reliability of the conductivity method on the rapid detection of food total aerobic bacterial count. At the first, three standard curves for three kinds of food were built up. And then, repeatability experiments and parallel experiments were conducted. Results indicated that there were no prominence difference between conductivity method and plate count method. The conductivity method can be used as a rapid detection method for total aerobic bacterial count in food.

Key words: Conductivity method; aerobic bacterial count; rapid detection

细菌总数的多少, 不仅可以反应出食品被污染的程度, 而且也可以反应出食品的新鲜程度以及食品生产的一般卫生状况; 细菌总数主要作为判定食品被细菌污染程度的标志, 具有重要的卫生学意义^[1]。目前我国食品中细菌总数测定方法主要采用国标法(具体内容见 GB/T 4789.2-2003^[2]), 该方法对未知样品往往要连续做 3~4 次 10 倍稀释; 因此, 每个样品需做 6~8 个平板, 当样品数目多时, 工作量相当大。此外, 该方法需要 24~48 h 才能得到结果, 耗时较长, 不利于食品卫生的实时监测^[3,4]。随着食品工业等领域对微生物的实时监测需求越来越强烈, 研究开发新的快速检测方法及相应的仪器设备具有重要意义。

在生长繁殖过程中, 微生物会分解培养基中不导电的大分子物质为导电的小分子物质, 也会将培养基中的小分子物质合成大分子物质, 从而使培养基的电导率发生变化; 培养基电导率的变化状况与培养基中的微生物种类和数量有关。因此, 根据培养基电导率的变化状况, 可以推测培养基中的微生

物种类和数量,

收稿日期: 2011-11-23

这就是电导率法快速检测食品细菌总数的原理。与平板计数法相比, 电导率法最大的优点在于快速、灵敏、简便, 其应用越来越受到微生物研究人员和医学临床工作者的重视^[5~7]。该法已实现了自动化, 通过计算机控制对样品进行连续检测, 并自动判断出检测结果。使用自动检测仪器可缩短检测时间, 但成本昂贵, 一般基层单位和中小型食品厂目前还无法采用。本文采用简单的数显电导率仪, 通过检测培养过程中培养基电导率的变化情况, 建立了电导率法检测细菌总数的标准曲线; 并通过与国标法进行比较, 探讨了电导率法用于食品细菌总数快速检测的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

自制不同污染程度(即细菌总数)的饼干、茶

饮料、含乳饮料样品,其中饼干样品 45 个、茶饮料样品 55 个、含乳饮料样品 40 个。

1.1.2 化学试剂和培养基

氯化钠,分析纯,广东汕头光华化工厂;营养肉汤培养基、琼脂粉均为广东环凯微生物科技公司产品。

1.1.3 实验仪器

CY-1000-UL 型微量连续可调移液器,北京青云卓立精密设备有限公司; DDS-11A 型数显电导率仪及分析测量电极,上海虹益仪器仪表有限公司; JA1003 电子天平,上海天平仪器厂; SW-CJ-2F 洁净工作台,上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的建立

在无菌操作的条件下,取样品 25 g (或 25 mL) 转入装有 225 mL 灭菌生理盐水的锥形瓶内,充分振摇均匀得样品稀释液;取 1 mL 样品稀释液接种于装有 50 mL 灭菌营养肉汤的锥形瓶中,然后于 37 °C, 120 r/min 水浴摇床中培养,每隔 30 min 测一次电导率,在获得电导率的突变点(即检出时间,以下简称 DT 值)后可终止测定。

DT 值的确定方法如下:以测定时间为横坐标,以单位时间内电导率变化值(即用前后两次电导率差值除以其对应的时间差的比值)为纵坐标,绘制单位时间内电导率变化值与测定时间之间的关系曲线,曲线上存在一明显的突跃点(如图 1 所示),该点所对应的时间即为 DT 值。

同时用国标法(即传统的平板计数法)检测样品的细菌总数,然后以 DT 值为横坐标,以国标法测得的样品的细菌总数的对数值(即 lg cfu/mL)为纵坐标,在坐标系中绘出该种食品的全部样品所对应的点,然后对这些点进行线性回归,所得直线为该种食品的标准曲线,所得线性方程即为该种食品的细菌总数的对数值(即 lg cfu/mL)与 DT 值之间的关系式。

1.2.2 平行试验

分别从准备好的 3 种食品中任取一个样品,按 1.2.1 所述方法测定样品的 DT 值,然后利用 1.2.1 所建立的细菌总数的对数值(即 lg cfu/mL)与 DT 值之间的关系式,计算出样品的细菌总数。每个样品重复 8 次,以变异系数来表示方法的重现性。

1.2.3 对比试验

准备 3 个污染度(细菌总数的数量级分别在 10^1 、 10^3 和 10^6 cfu/mL)的样品各 10 份,分别用电导法和国标法配对测定,然后利用统计学 t 检验对

测定结果进行分析,比较两种检验方法的差异。

1.2.4 电导率法在含乳饮料细菌总数测定中的应用

准备不同污染程度的含乳饮料试样 41 份,同时用电导法和国标法测定样品细菌总数。用卡方检验对数据进行分析,比较两种方法检测结果相符率。

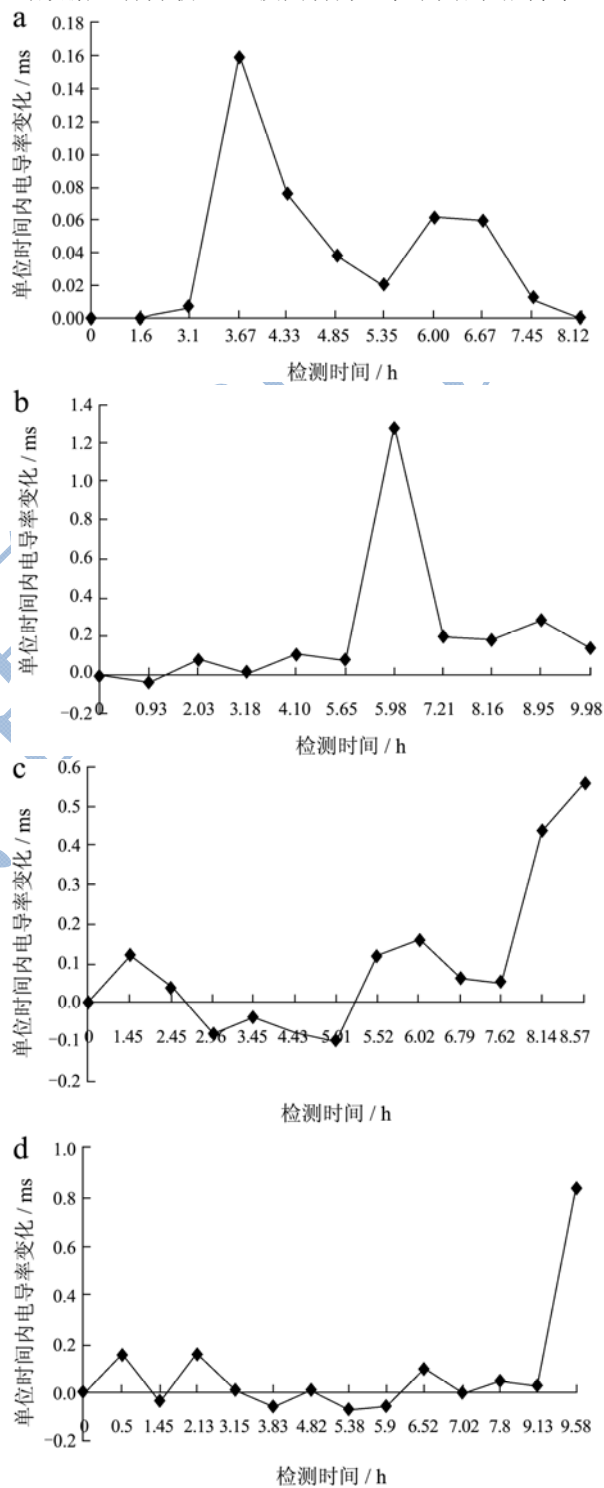


图 1 不同浓度的菌液在培养过程中电导率的变化率与培养时间之间的关系

Fig.1 Relationships between broth conductivity change rates and the incubation time

注: a、b、c、d 分别为菌液浓度在 10^7 、 10^4 、 10^2 、 10^0 cfu/mL 的培养液, 在培养过程中各时间点上菌液电导率的变化率 (即单位时间内电导率的变化值) 情况。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的建立

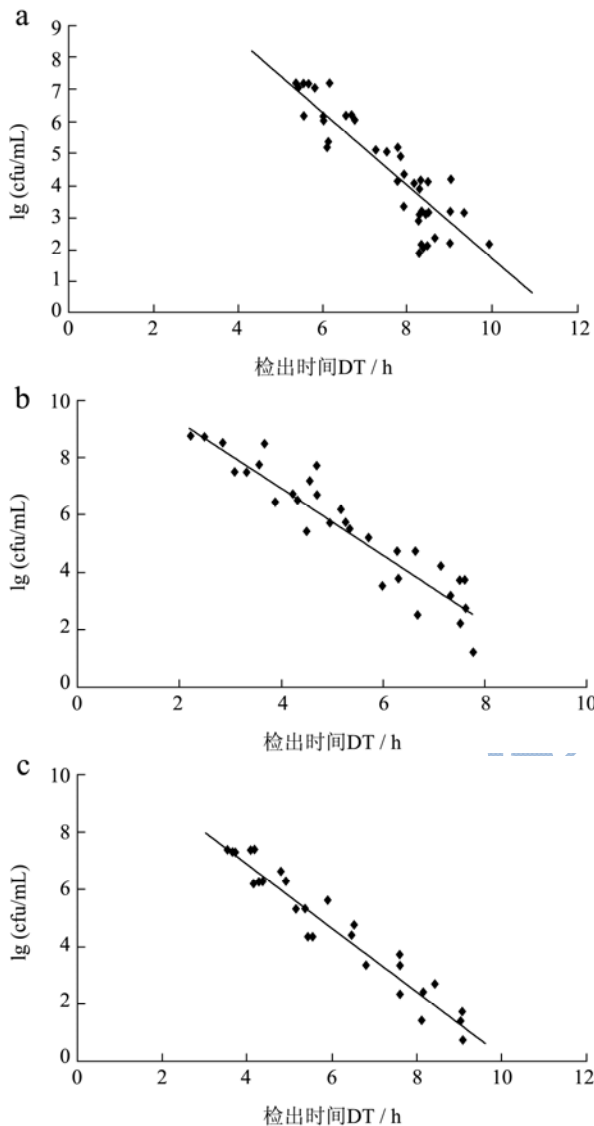


图2 食品细菌总数与DT值之间的关系曲线

Fig.2 Relationships between total number of colonies of foods and the detection times (DT values)

注: a、b、c 分别为饼干、茶饮料、含乳饮料

微生物在培养过程中, 培养基电导率改变的直接原因是电解质容积的变化。一般而言, 培养基各组分是不带电荷或仅带微弱电荷的; 但微生物的新陈代谢作用会使培养基中的电活性物质 (如碳水化合物、类脂、蛋白质) 转化为电活性物质。因此, 随着微生物的生长繁殖, 培养基中电活性分子和离子逐渐取代了电惰性分子, 使培养基的导电性增强。研究表明, 电导率随时间的变化曲线与微生物生长

曲线相似, 出现缓慢增长期、加速增长期、指数增长期和缓慢减少期, 最后趋于稳定期^[8]。电导率变化曲线从加速增长期开始进入指数增长期的点, 即从基线到明显增加的点, 称为检出时间 (即DT值, 下同)。DT值随样品的初始菌数 (即细菌总数) 不同而不同, 样品的细菌总数越多, DT值越小 (即检出时间越短); 相反, 样品的细菌总数越少, DT值越大 (即检出时间越长)。在一定范围内样品的细菌总数的对数值 (即lg cfu/mL) 与DT值呈线性关系; 因此, 通过测定一系列已知样品的细菌总数及其相应的DT值, 就可以得出两者之间的关系曲线和关系式; 这样, 对于未知样品, 只要测定其DT值, 就可以通过关系式计算出样品的细菌总数^[8]。

本研究建立了三种常见食品的细菌总数与其DT值之间的关系曲线 (见图2) 和关系式 (见表1)。图2及表1中的数据表明, 食品的细菌总数与DT值之间呈显著负相关; 说明食品的细菌总数越高, 用电导率法检测时的检出时间越短。此外, 从表1中的数据还可以看出, 三条标准曲线的斜率基本相同; 说明尽管食品种类不一样, 但食品细菌总数的对数值 (lg cfu/mL) 与DT值之间的相关关系基本一致。从表1中的数据还可以看出, 当样品的细菌总数较高时, 数据的离散程度较小; 反之, 当样品的细菌总数较低时, 其它干扰因素对检测结果的影响就相对较大, 造成数据离散程度稍大。

表1 食品细菌总数与其DT值之间的关系式

Table 1 Formulas of total number of colonies of foods and the detection times (DT values)

食品	关系式	r	离散率 显著性检验	
			Syx	检验结果
饼干	$\lg(\text{cfu/mL}) = -1.1432T + 13.145$	-0.8985	0.5801	显著
茶饮料	$\lg(\text{cfu/g}) = -1.1694T + 11.579$	-0.9391	0.5651	显著
含乳饮料	$\lg(\text{cfu/mL}) = -1.1265T + 11.404$	-0.9707	0.4430	显著

2.2 电导法检测结果的重复性

为了验证电导法检测结果的重复性, 本研究把茶饮料、饼干和含乳饮料等三份样品放入培养箱中进行培养增加, 得到三个菌液浓度不同的样品 (菌液浓度分别处于 10^8 、 10^3 、 10^2 cfu/mL)。每个样品均通过电导法平行测定8次, 再根据测得的DT值, 利用相应的关系式 (见表1) 计算出相应的细菌总数, 结果见表2。

从表2可以看出, 样品的细菌总数分别在 10^8 、 10^3 和 10^2 cfu/mL 数量级时, 检出时间的变异系数分别是0.68%、0.86%和1.06%, 均较小, 说明该方法的重复性较好; 细菌总数的变异系数分别为

3.87%、9.20%和 13.91%，均较大，且在样品的细菌总数较少时，检测结果的变异系数较大，结果的重现性较差；可能是当样品的细菌浓度较低时，其它因素对培养基的电导率的影响较大，造成结果的重现性稍差，方法的变异程度增大。

表2 平行实验结果

Table 2 Results of parallel test

序号	含乳饮料		茶饮料		饼干	
	DT 值/h	菌液浓度/ $\times 10^8$ cfu/mL	DT 值/h	菌液浓度/ $\times 10^3$ cfu/mL	DT 值/h	菌液浓度/ $\times 10^2$ cfu/mL
1	4.18	2.33	6.72	5.26	7.58	7.33
2	4.23	2.04	6.70	5.55	7.60	6.95
3	4.20	2.21	6.65	6.35	7.56	7.72
4	4.25	1.93	6.68	5.85	7.62	6.60
5	4.19	2.26	6.75	4.85	7.61	6.78
6	4.22	2.09	6.70	5.55	7.70	5.36
7	4.25	1.93	6.63	6.70	7.54	8.13
8	4.17	2.39	6.72	5.26	7.62	6.60
CV/%	0.68	3.87	0.86	9.20	1.06	13.91

2.3 两种方法检测结果的比较

表3 电导法与国标法的配对比较实验

Table 3 Paired comparison tests between conductivity method and plate count method

样品号	第一组(10^1 cfu/mL)		第二组(10^3 cfu/mL)		第三组(10^6 cfu/mL)	
	电导法	国标法	电导法	国标法	电导法	国标法
1	50.81	80	4.77	2.40	2.57	1.67
2	56.58	10	1.20	1.50	2.07	1.02
3	57.82	25	4.02	2.05	1.23	2.53
4	50.53	15	2.05	3.70	1.74	2.68
5	9.27	15	4.85	2.73	7.35	8.25
6	12.13	10	5.26	2.53	6.78	7.90
7	3.24	40	4.24	2.22	6.09	8.20
8	5.41	20	4.85	2.55	5.77	8.05
9	4.24	25	1.66	2.00	1.26	1.74
10	7.27	20	2.44	2.70	1.32	1.91
标准差	Sx=28.97		Sx=1.56 $\times 10^3$		Sx=1.09 $\times 10^6$	
t 统计量	t=0.0295		t=2.226		t=2.248	
p 值	p>0.5		0.10>p>0.05		0.10>p>0.05	

取饼干、麦片、椰子奶、饮料等试样共 30 份，分为 3 个污染度， 10^1 、 10^3 和 10^6 cfu/mL，分别用电导法和国标法配对测定，结果见表 3。分别对表 3 中的 3 组数据进行配对 t 检验，结果均为 $p>0.05$ ；因此认为电导法检测食品中细菌总数与国标平板计数法无显著性差异，说明本研究所建立的混合菌标准曲线是可以用于食品中细菌总数的测定。

2.4 电导率法在含乳饮料细菌总数测定中的应用

以国标 GB11673-2003^[9]作为含乳饮料细菌总数的标准，国标法中含乳饮料 CFU 少于或等于 10000 cfu/mL 才算是合格食品；根据本研究所做的标准曲线 ($\lg \text{cfu/mL} = -1.1694T + 11.579$)，电导法测定的检出时间必须是大于或等于 6.48 h 时，含乳饮料中细菌总数这项指标才是合格。41 份样品同时用电导法和国标法测定细菌总数的合格率，结果表 4。

表4 电导法与国标法测定 41 份含乳饮料合格率的结果

Table 4 Results of conductivity method and plate count

method applied in milk drinks	合格	不合格	合格率/%
	电导法	18	23
国标法	21	20	51.20

以电导法测定结果作为初筛试验，以国标法测定结果作为确证试验。结果表明，电导法与国标法检测的合格率相差不大，假阳性率为 7.32%，假阴性率为 0。经统计学卡方检验对数据进行深一步的分析，计算得到 $p=1.33$ ， $p<3.84$ ，即 $p>0.05$ ，表明电导法与国标法的检测结果无显著性差异，结果符合率为 92.7% (38/41)。

因此电导法可作为食品检测细菌总数的初筛试验，用 DT 值作为检测食品中细菌总数的检测指标是可行的，尤其在大规模的样品检测时特别适用。只要 DT 值超过合格时间，便可知道这份样品在细菌总数这个指标上是合格的，而省去了平板计数法带来的一系列烦琐工作，可极大地缩短了检测时间。

3 结论

3.1 本研究用电导法快速测定食品的菌落总数，所建立电导法测定菌落总数的标准曲线是可行的，国标法检测的菌落总数的对数 ($\lg \text{cfu/mL}$) 与电导法检测的检出时间 (DT) 呈负相关，细菌数越高，检出时间越短。

3.2 通过平行实验证实，实验的变异系数无大差异，说明该方法的重现性较好，且样品的细菌浓度越高，方法的变异程度越小；当样品的细菌浓度较低时，方法的变异程度增大。

3.3 通过电导法和国标法配对实验，用统计学 t 检验处理数据后，得出结果 $P>0.05$ ，表明电导法检测食品中细菌总数与国标平板计数法无显著性差异；通过比较电导法与国标法测定含乳饮料细菌总数的结果符合率，经统计学卡方检验处理结果，得出 $P>0.05$ ，结果无显著性差异，结果符合率为 92.7%。

因此,在实际工作中电导法可以快速简便地对食品菌落总数进行检测,其作为一种常规方法是可以被接受的。

参考文献

- [1] 李铁牛,蒋作明,廖洪波.细菌总数快速检测研究进展[J].粮油食品科技,2003,11(3):31-32
- [2] 中华人民共和国卫生部.GB/T 4789.2-2003 食品卫生微生物学检验 菌落总数测定[S].中国标准出版社,2003
- [3] 肖琳琳,许钟,杨宪时.阻抗微生物学及其在食品工业中的应用[J].农产品加工,2004,7:39-40
- [4] 刘玲君,朱俊平,赵小强,等.电导微生物技术快速测定原料乳菌落总数的研究[J].中国乳品工业,2003,31(5):45-48
- [5] 周向华,王衍彬,叶兴乾,等.电阻抗法在食品微生物快速检测中的应用[J].粮油加工与食品机械,2003,10:73-75
- [6] 王迪,陈倩.阻抗法快速测定熟肉制品中菌落总数方法的研究[J].中国卫生检验杂志,2005,15(12):1485-1486
- [7] 易敏英,李志勇.电阻抗法快速检测鲜牛奶中细菌总数[J].中国乳品工业,2001,29(3):30-31
- [8] 方海田,刘慧燕,德力格尔桑.牛乳乳汁电导率变化与体细胞数相关关系的研究[J].现代食品科技,2007,23(4):86-88
- [9] 中华人民共和国卫生部.GB 11673-2003 含乳饮料卫生标准[S].中国标准出版社,2003