

三种不同前处理方法对检测调理肉制品中菌落总数准确性的比较研究

王娟，严大银，熊坤

恩施州公共检验检测中心 湖北恩施

【摘要】目的 调理肉制品中的防腐剂、酸度调节剂等添加剂会抑制微生物生长，可能导致依据《GB4789.2-2022》的检测结果不准确。本研究比较三种前处理方法对调理肉制品菌落总数检测结果的影响，为建立更精准的检测方案提供依据。**方法** 以市售预调理黑椒风味鸡胸肉为对象，人工接种大肠埃希氏菌（Escherichiacoli）ATCC25922 和金黄色葡萄球菌（Staphylococcus aureus）ATCC6538 的混合菌悬液，分别采用国标法（方法 A：无菌生理盐水均质）、国标法+中和剂法（方法 B：含中和剂的稀释液均质）和均质洗涤离心法（方法 C）处理，然后按 GB4789.2-2022 培养计数。**结果** 方法 A 的检测结果显著低于其他方法 ($P<0.05$)，回收率仅 62.4%，菌落形态偏小且不均一。方法 B 回收率显著提升至 89.7%，菌落形态饱满、大小均匀。方法 C 回收率最高 (95.3%)，但操作繁琐。**结论** 常规国标法用于调理肉制品易因添加剂抑制导致结果偏低。在样品均质时添加广谱中和剂（方法 B）是一种高效、准确且实用的优化方法，推荐作为此类产品菌落总数检测的标准前处理。

【关键词】 调理肉制品；菌落总数；前处理；中和剂；GB4789.2-2022；准确性

【收稿日期】 2025 年 10 月 16 日 **【出刊日期】** 2025 年 11 月 26 日 **【DOI】** 10.12208/j.jafs.20250010

Comparative study on the accuracy of three different pretreatment methods for the detection of total viable count in seasoned meat products

Juan Wang, Dayin Yan, Kun Xiong

Enshi Prefecture Public Inspection and Testing Center, Enshi, Hubei

【Abstract】Objective Additives such as preservatives and acidity regulators in seasoned meat products may inhibit microbial growth, potentially leading to inaccurate test results based on 《GB 4789.2-2022》. This study aimed to compare the effects of three pretreatment methods on the detection results of total viable count (TVC) in seasoned meat products, providing a basis for establishing a more accurate detection protocol. **Methods** Commercial pre-seasoned black pepper-flavored chicken breast was used as the test material. A mixed bacterial suspension of Escherichia coli ATCC 25922 and Staphylococcus aureus ATCC 6538 was artificially inoculated. Three pretreatment methods were applied: the national standard method (Method A: homogenization with sterile saline), the national standard method with neutralizer (Method B: homogenization with neutralizer-containing diluent), and the homogenization-washing-centrifugation method (Method C). Colony counting was performed according to 《GB 4789.2-2022》. **Results** The detection result of Method A was significantly lower than those of the other two methods ($P < 0.05$), with a recovery rate of only 62.4% and colonies appearing smaller and uneven in size. Method B significantly improved the recovery rate to 89.7%, with colonies appearing plump and uniform in size. Method C achieved the highest recovery rate (95.3%), but the procedure was more cumbersome. **Conclusion** The conventional national standard method tends to yield underestimated results for seasoned meat products due to additive inhibition. Adding a broad-spectrum neutralizer during sample homogenization (Method B) is an efficient, accurate, and

作者简介：王娟（1987-）女，河南信阳，汉，研究生，助理工程师，检验员，食品微生物，食品检测；严大银（1986-）女，湖北恩施，土家族，本科，助理工程师，检验员，聚焦食品添加剂、重金属等有害物质的检测技术；熊坤（1982-）男，湖北省恩施市，土家族，质量工程师，生物检测所所长，食品生产与加工，食品检测。

practical optimization strategy, recommended as the standard pretreatment method for TVC detection in such products.

【Keywords】 Seasoned meat products; Total viable count; Pretreatment; Neutralizer; 《GB 4789.2-2022》; Accuracy

1 引言

调理肉制品是指以畜禽肉为主要原料, 添加调味料、食品添加剂, 并经滚揉、腌制、成型等工艺制成的预包装生制或熟制品。因其食用方便、风味多样而广受欢迎。菌落总数是评价食品卫生质量、反映产品卫生状况及预测货架期的重要微生物指标, 其检测准确性对保障消费者安全和指导企业生产至关重要^[1]。

目前, 我国检测食品中菌落总数的主要依据是《食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定》(GB 4789.2-2022)^[2]。在此之前的数年间, 该项检测则一直遵循 GB 4789.2-2016 标准^[3]。该标准适用于各类食品中菌落总数的测定。然而, 调理肉制品成分复杂, 通常含有多种防腐剂(如乳酸链球菌素、 ϵ -聚赖氨酸)、酸度调节剂(如柠檬酸盐、乳酸盐)以及香辛料提取物等^[4]。这些添加剂在加工过程中被均匀混入产品内部, 在发挥防腐、保鲜、调味作用的同时, 也会在检测过程中持续抑制微生物的生长, 即使经过标准稀释步骤, 其残留效应仍可能导致计数结果显著偏低, 甚至出现假阴性, 严重低估产品的真实微生物污染水平^[5]。

前处理是微生物检测的关键第一步, 其目的是使样品中可能存在的细菌细胞充分、均匀地释放到稀释液中, 同时尽可能减少对细菌的损伤和抑制。针对含抑制剂食品的微生物检测, 国内外研究者提出了一些前处理优化方案, 主要包括: (1) 在稀释液中添加化学中和剂, 如卵磷脂和吐温 80 用于中和季铵盐类及醛类消毒剂, 硫代硫酸钠用于中和含氯消毒剂等^[6]; (2) 物理分离方法, 如通过离心洗涤去除水不溶性抑制剂^[7]。然而, 这些方法在调理肉制品这一特定品类中的应用效果如何, 缺乏系统的比较研究。

因此, 本研究以市售黑椒风味调理鸡胸肉为模型, 通过人工接种标准菌株, 系统比较国标法、国标法+中和剂法及均质洗涤离心法三种前处理方法对菌落总数检测结果的影响, 旨在筛选出最能真实反映调理肉制品卫生状况的准确、高效的前处理方法, 为相关标准的修订和实验室检测实践的优化提供数

据支持。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

样品: 市售同一批次预调理黑椒风味鸡胸肉(生制), 配料表显示含有食用盐、白砂糖、香辛料、酱油、大蒜、味精、酵母抽提物、三聚磷酸钠、焦磷酸钠、D-异抗坏血酸钠、乳酸链球菌素等。购入后立即于4℃冷藏保存, 并于24小时内使用。

菌株: 大肠埃希氏菌(Escherichiacoli) ATCC25922、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus) ATCC6538, 均由中国科学院武汉病毒研究所微生物菌(毒)种保藏中心提供。

培养基与试剂: 平板计数琼脂(PCA), 北京陆桥技术股份有限公司; 根据 GB4789.2-2022 的要求, 使用无菌生理盐水(0.85%NaCl)和无菌磷酸盐缓冲液; 中和剂(按 GB4789.28-2013[8]推荐配方: 卵磷脂3.0g, 吐温8030.0g, 硫代硫酸钠5.0g, L-组氨酸1.0g, 溶于1000mL磷酸盐缓冲液中, pH7.2±0.2, 121℃高压灭菌15min)。

2.2 仪器与设备

拍击式均质器(BagMixer400, 法国 Interscience公司); 恒温培养箱(SPX-250B-Z, 上海博讯实业有限公司); 超净工作台(SW-CJ-2FD, 苏州安泰空气技术有限公司); 电子天平(ME204E, 梅特勒-托利多公司); 立式压力蒸汽灭菌器(SX-500, 日本 Tomy公司)。实验涉及的恒温装置用于融化并保温培养基, 其温度设置参照 GB4789.2-2022 调整为46℃±1℃。

2.3 实验方法

2.3.1 菌悬液制备与样品接种

将活化后的两株试验菌分别用生理盐水制备成约 1×10^8 CFU/mL的菌悬液, 按1:1比例混合。取25 g无菌调理肉制品样品(经预实验证本底菌落总数<10 CFU/g), 加入1 mL上述混合菌悬液, 使初始接种水平约为 4×10^6 CFU/g。充分揉搓混匀10 min, 确保菌液均匀分布。

2.3.2 前处理方法

设置三种前处理方法, 每个方法做 5 个平行。

方法 A(国标法): 参照 GB4789.2-2022。取 25g 接种后样品于 225mL 无菌生理盐水 (0.85%NaCl) 中, 用拍击式均质器均质 1min~2min (本实验统一为 2min), 制成 1:10 的无菌培养皿, 然后进行 10 倍系列稀释。

方法 B(中和剂法): 操作同方法 A, 但将均质稀释液由无菌生理盐水替换为含中和剂的稀释液。

方法 C(均质洗涤离心法): 参考 Kang&Fung (1999)的方法并稍作修改。取 25g 样品于 225mL 无菌生理盐水中均质 2min, 将匀液于 4°C、5000r/min 离心 10min, 弃去上清液, 用 225mL 无菌生理盐水重悬沉淀, 再次离心, 重复洗涤一次。最后用 225mL 无菌生理盐水重悬沉淀, 作为 1:10 的无菌培养皿, 再进行系列稀释。

2.3.3 培养计数

选择 2~3 个适宜稀释度, 吸取 1mL 无菌培养皿

表 1 不同前处理方法对调理肉制品中菌落总数检测结果的影响 (n=5)

前处理方法	检测结果 (CFU/g, ×10 ⁶)	回收率 (%)
方法 A: 国标法	2.50±0.21c	62.4%
方法 B: 中和剂法	3.59±0.28b	89.7%
方法 C: 洗涤离心法	3.81±0.19a	95.3%

注: 同列数据后不同字母表示差异显著 (P<0.05)。

由表 1 可知, 方法 A 的检测结果最低, 显著低于方法 B 和方法 C (P<0.05), 其回收率仅为 62.4%, 存在明显的抑制效应。方法 B 通过添加中和剂, 有效缓解了抑制, 回收率显著提高至 89.7%。方法 C 通过物理洗涤去除了绝大部分水溶性抑制剂和样品基质, 回收率最高, 达到 95.3%, 与方法 B 的结果无显著差异 (P>0.05), 但极显著高于方法 A。

3.2 菌落形态学观察

在培养计数过程中, 观察到三组实验的菌落形态存在明显差异。方法 A(国标法)的平板上, 菌落形态普遍偏小, 直径不均一, 且部分平板背景呈现浑浊状态, 疑似有大量受损菌体未能形成可见菌落。方法 B(中和剂法)的平板上, 菌落形态饱满、大小均匀、边缘整齐, 易于辨认和计数。方法 C(均质洗涤离心法)的平板菌落形态与方法 B 相似, 菌落形态正常, 计数清晰。不同方法间菌落形态的差异, 直观地反映了前处理方法对微生物复苏和生长的影

响。于无菌平皿中, 倾注冷却至 46°C±1°C 的 PCA 培养基, 混匀, 待琼脂凝固后, 倒置于 36±1°C 培养 48±2h。计数, 计算每克样品中所含的菌落总数 (CFU/g)。

2.3.4 数据处理与统计分析

回收率 (%) = (某方法测得的平均菌落数/理论接种菌落数) × 100%

理论接种菌落数通过测定接种用混合菌悬液在 PCA 上的活菌数并经换算得到。

所有实验数据以平均值±标准差表示。采用 SPSS25.0 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 并用 Duncan's 多重比较检验进行组间差异显著性分析, P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 三种前处理方法菌落计数结果的比较

三种前处理方法得到的菌落总数检测结果及回收率如表 1 所示。

响。

3.3 相对准确度分析

以回收率最高的方法 C 的结果作为参照基准 (100%准确), 计算方法 A 和方法 B 的相对准确度。方法 A 的相对准确度为 65.6%, 再次证实其严重低估了真实菌量。方法 B 的相对准确度高达 94.2%, 表明其检测结果非常接近经有效去抑制处理后的“真实值”, 准确性显著优于方法 A。

4 讨论

本研究结果清晰地表明, 使用标准的无菌生理盐水作为稀释液 (方法 A) 会因调理肉制品中残留的多种抗菌成分 (如磷酸盐、乳酸链球菌素、D-异抗坏血酸钠等) 的持续抑制作用, 导致菌落总数检测结果严重失真, 回收率不足 65%。这与 Hilgren 等 (2007)^[5] 在检测经消毒剂处理的食品时报道的抑制现象一致。这些抑制剂可能损伤细胞膜、干扰酶活性或破坏 DNA, 从而阻止受损细胞在琼脂培养基

上复苏和形成菌落^[6]。

添加含有卵磷脂、吐温 80 和硫代硫酸钠的广谱中和剂(方法 B)是解决这一问题的有效手段。卵磷脂和吐温 80 是非离子表面活性剂,能有效中和季铵盐类、酚类及某些抗生素(如乳酸链球菌素);硫代硫酸钠可中和氧化性杀菌剂(如 D-异抗坏血酸钠的降解产物可能具有氧化性);L-组氨酸则有助于中和醛类制剂^[8]本研究中,方法 B 将回收率从 62.4%提升至 89.7%,极大地提高了检测的准确性,且操作上仅需更换稀释液,简便易行,非常适合常规检测实验室采用。

均质洗涤离心法(方法 C)通过物理方式去除了绝大部分可溶性抑制剂和复杂的肉糜基质,获得了最高的回收率(95.3%)。该方法虽效果最佳,但操作步骤繁多、耗时较长(约需额外 40 分钟),且在反复离心洗涤过程中可能会对部分本身已经受损的菌体造成机械性损伤,导致少量菌体损失^[7]。因此,该方法更适用于作为方法学研究或仲裁检测的参考方法。

综上所述,对于日常检测而言,在国标方法基础上于稀释液中添加广谱中和剂(方法 B)是在准确性、操作便捷性和检测效率之间取得最佳平衡的方案。本研究建议在修订相关检测标准时,应考虑将中和剂法纳入针对调理肉制品等含抑制剂食品的微生物检测标准操作程序中,以确保检测结果的科学性和准确性。

5 结论

本研究通过比较三种前处理方法,证实了调理肉制品中固有添加剂对菌落总数国标检测法存在显著抑制干扰。主要结论如下:

常规国标法(生理盐水稀释)由于无法消除样品中抑菌剂的干扰,导致菌落计数结果严重偏低,回收率仅为 62.4%,易造成误判。

在稀释液中添加复合中和剂能有效中和多种抗菌成分,显著提高菌落回收率至 89.7%,且菌落形态正常,操作简便,是优化调理肉制品菌落总数检测的首推方法。

均质洗涤离心法虽回收率最高(95.3%),但操

作繁琐,可作为验证性实验或方法学研究的选择。

本研究结果为实验室准确评估调理肉制品的微生物卫生质量提供了可靠的方法学改进依据,建议在相关检测实践中推广应用中和剂法。

参考文献

- [1] JAYJM,LOESSNERMJ,GOLDENDA.ModernFoodMicrobiology,7thed.[M].NewYork:Springer,2005:45-60.
- [2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会,国家市场监督管理总局.GB4789.2-2022 食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定[S].2022.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.GB4789.2-2016 食品微生物学检验菌落总数测定[S].2016.
- [4] 王守伟,张顺亮,赵冰,等. 调理肉制品加工技术研究进展[J]. 肉类研究, 2020, 34(11): 83-89.
- [5] HILGREN J, SALVERDA J. Inhibition and neutralization of sanitizers and disinfectants[J]. Journal of AOAC International, 2007, 90(3): 887-892.
- [6] SUTTON S, MITCHELL S, LAMBRECHT M, et al. The role of neutralizers in the recovery of microorganisms from surfaces following treatment with chemical disinfectants [J]. Journal of Microbiological Methods, 2019, 162: 1-7.
- [7] KANG D H, FUNG D Y C. Application of a thin agar layer method for recovery of injured foodborne pathogens[J]. Journal of Food Protection, 1999, 62(11): 1346-1349.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 4789.28-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求[S]. 2013.(该标准附录 B 中提供了中和剂的配方)

版权声明: ©2025 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS