

# 清洁验证：微生物总有机碳回收率和线性

## 简介

在生产消费品时，有效地清洁生产设备对质量控制来说至关重要。清洁工艺的目标是降低产品污染的风险，有效的清洁工艺可以将风险降低到可接受的水平，以确保产品质量。如果无法衡量和验证清洁工艺的有效性，就无法了解产品质量和消费者安全的风险。

根据美国食品和药品管理局（FDA）提供的数据，2017 年食品和饮料行业产品召回的主要原因是微生物对产品的污染。对于减少和消除微生物污染来说，强有力的清洁工艺至关重要，因此监控清洁工艺有效性的方法同样至关重要。

总有机碳（TOC）分析是消费品生产商广泛采用的非专属方法，用于检测产品、清洁剂、以及微生物等污染物的残留量。

为了证明 TOC 分析法适用于预期用途，我们对设备清洁之后可能尚存的残留物进行了回收和线性研究。工厂通常会测试化学污染物和化合物，但很少用 TOC 分析法来测试微生物的回收率。本文旨在探讨对于清洁验证和确认，TOC 分析法能否证明可接受的微生物污染回收率和线性。

## 实验设计和设置

我们同科罗拉多大学博尔德分校合作，用一整夜时间在胰酶大豆肉汤中培养 100 毫升枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）。以 4500 转/分钟的速度将最终培养物的十毫升等分试样离心分离 10 分钟，形成细胞沉淀。

在每次离心之间，倒出上面的液体，用涡旋混合方法用 10 毫升超纯水使沉淀细胞重新悬浮。重复此过程 7 次。设计淋洗循环以除去细胞培养基带来的 TOC 污染。在第 7 次淋洗循环后，根据已有的 4,6-二氨基-2-苯基吲哚（4,6-diaminidino-2-

phenylindole, DAPI）染色任务来对细胞进行重新悬浮、稀释、计数（见图 1）。

确定细胞密度之后，用 Sievers' M9 TOC 分析仪测量 1 ppm 确认标样组，然后进行三次细胞浓度稀释。在测量 TOC 之后，用 0.45 $\mu$ m 灭菌过滤器过滤剩余样品，彻底除去细菌（见图 2）。然后再次测量 TOC 以确定每个样品的非细胞背景 TOC（见图 2）。



图 1：枯草芽孢杆菌在细胞计数的荧光显微镜成像

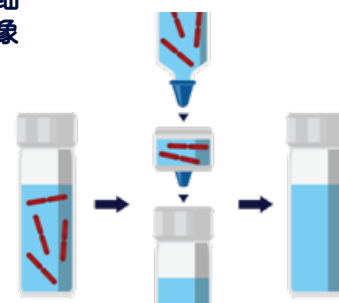


图 2：枯草芽孢杆菌的过滤过程

## 结果

表 1: 微生物细胞密度与 TOC 的相关性结果

细胞密度 (细胞/ml)	原始 TOC (ppb)	标准偏差 (ppb)	过滤的 TOC (ppb)	标准偏差 (ppb)	校正的 TOC (ppb)	标准偏差 (ppb)	% RSD
5.80E+05	262	4.04	191	1.71	71	5.75	8.10
5.80E+06	1650	38.3	349	7.85	1301	46.15	3.55
5.80E+07	12400	1450	3270	35.1	9130	1485.1	16.27
过滤的 MilliQ H <sub>2</sub> O			27	1.83			

表 1 和图 3 是微生物 TOC 相关性研究的结果。线性趋势线的  $R^2$  值为 0.9981, 表明实测细胞密度有良好的线性趋势。根据图 3 所示的线性拟合趋势线方程, 定义为 3 倍噪声的检测水平 (LOD, Level of Detection) 为  $2.74E + 06$  细胞/mL。此外, 根据线性拟合趋势线和 M9 仪器规格, 50 ppm 的最大仪器定量限为  $2.49E + 08$  细胞/mL。

在进行微生物 TOC 定量之后, 分别将 1 毫升的每种细胞密度溶液放在不锈钢试样板上进行试样污染, 然后使试样干燥。此试样污染的目的在于确定微生物 TOC 相关结果的目视检测限。图 4 是微生物试样污染图。

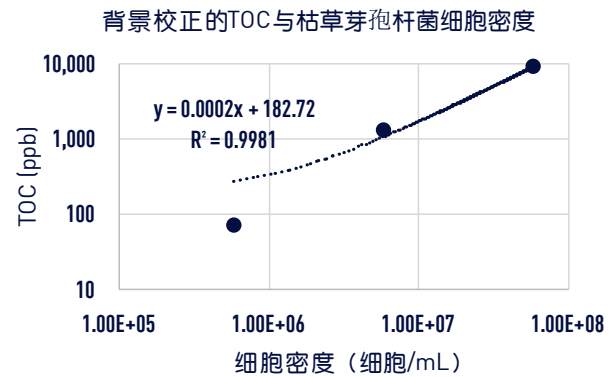


图 3: 微生物细胞密度与 TOC 的线性关系

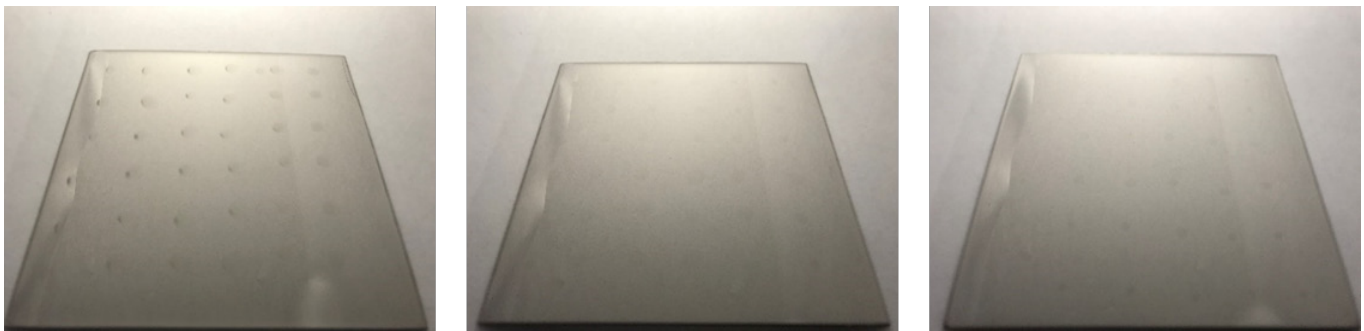


图 4: 微生物试样板污染

(A)  $5.8E+07$  细胞/mL

(B)  $5.8E+06$  细胞/mL

(C)  $5.8E+05$  细胞/mL

## 讨论与结论

微生物 TOC 相关结果和试样污染图都说明了连续监测已有的清洁工艺有效性的重要性。在理想光线下，很容易在试样板上看到最高细胞密度（ $5.8E + 07$  细胞/mL）的污染斑。而对于较低细胞密度，即使光线很好，也很难在试样板上看到污染斑。这表明除了强有力的清洁工艺之外，还需要用非目测的方法来测试清洁工艺的有效性。

根据收集的数据，可以想象用于生产消费品的设备上仍有显著微生物污染，却仅凭目视检查就被投放到生产中，导致严重后果。因此必须连续监测已有的清洁工艺的有效性，才能降低产品质量风险和消费者安全风险。

最后，由于微生物分子组成的不确定性，很难确定微生物溶液的回收率。本研究根据先前在确定活性微生物细胞中的碳含量时的发现，旨在确定微生物溶液的理论回收率。图 5 是理论微生物 TOC 产出量的计算过程。基于每个细胞的碳原子参考数， $5.8E + 07$  细胞/mL 的理论 TOC 浓度为 11.6 ppm。

$$\left\{ 5.8 \times 10^7 \frac{\text{cell}}{\text{mL}} \right\} \times \left\{ 1.0 \times 10^{10} \frac{\text{carbon atoms}}{\text{cell}} \right\} = \left\{ 5.8 \times 10^{17} \frac{\text{carbon atoms}}{\text{mL}} \right\}$$

$$\left\{ 5.8 \times 10^{17} \frac{\text{carbon atoms}}{\text{mL}} \right\} \div \left\{ 6.022 \times 10^{23} \frac{\text{atoms}}{\text{mol}} \right\} = \left\{ 9.67 \times 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{mL}} \right\}$$

$$\left\{ 9.67 \times 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{mL}} \right\} \times \left\{ 12.01 \frac{\text{g of carbon}}{\text{mol}} \right\} = \left\{ 1.16 \times 10^{-5} \frac{\text{g of carbon}}{\text{mL}} \right\}$$

$$\left\{ 1.16 \times 10^{-5} \frac{\text{g of carbon}}{\text{mL}} \right\} == \left\{ 11.6 \frac{\mu\text{g of carbon}}{\text{mL}} \right\} == \{ 11.6 \text{ ppm} \}$$

$$\frac{9.13 \text{ ppm measured}}{11.6 \text{ ppm expected}} \times 100 = 78.7\% \text{ Recovery}$$

图 5：理论微生物 TOC 产出量的维度分析

在本文的实验中，测量到  $5.8E + 07$  细胞/mL 的 TOC 实际回收值为 9.13 ppm，对挑战性的化合物的回收率为 78.7%，从而证明实验方法是成功的。

总之，本研究用 Sievers M9 TOC 分析仪演示了在清洁验证和确认时的细胞密度同目视检测限的关系，成功地证实了微生物 TOC 回收率。实验数据支持使用 Sievers TOC 分析仪来确认设备清洁度，同时表明除了目视检查之外还须考虑使用监测微生物污染的定量方法。TOC 分析法是测量残留物、监测清洁工艺、降低总体风险的有效方法。苏伊士公司提供 Sievers 系列产品，包括能够解决您的一切清洁验证和确认需求的 TOC 解决方案、服务、支持。

### 参考文献

1. Recall Index and Spotlight. Expert Solutions <https://www.stericyclexpertsolutions.com/recall-index/>
2. DAPI Protocol For Fluorescence Imaging Thermo-Fisher Scientific - US <https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/dapi-imaging-protocol.html>
3. Phillips, Rob, and Ron Milo. "A Feeling for the Numbers in Biology." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, no. 51 (December 22, 2009): 21465. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907732106>.



扫二维码，  
关注 Sievers 分析仪官方微信。