

ATP 生物发光法评价餐饮具的微生物污染研究

张凤兰, 徐 潇, 王海燕, 高 飞, 单 纯, 崔生辉*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘 要: 目的 对 ATP 生物发光法与平板计数法在评价餐饮具微生物污染的检出限及检出率进行评价, 并对 2 种方法的相关性进行研究。**方法** 应用 3 家国内公司生产的 ATP 生物发光检测仪, 分别对不同浓度的 ATP 标准溶液检测并绘制标准曲线; 以不同浓度的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌菌液及人工接种大肠杆菌的餐饮具作为被检品, 分别应用 ATP 生物发光法和平板计数法进行检测, 绘制 ATP 生物发光法对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌检测的标准曲线, 并对 2 种检测方法在人工污染餐饮具检测的相关性绘制曲线。**结果** 3 家公司的 ATP 生物发光检测仪对 ATP 标准溶液、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的检出限差异较大, 但在某一检测范围内, 3 家公司 ATP 生物发光检测仪的检测 RLU 值与 ATP 标准溶液、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌量均有良好的线性相关性。3 家公司 ATP 生物发光检测仪对人工接种大肠杆菌餐饮具的检测显示, ATP 生物发光法与平板计数法有良好的线性相关性。**结论** 3 家公司的 ATP 生物发光法对 ATP、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的检出限存在不同检测仪的仪器误差, 且差异较大, 目前, ATP 生物发光法不能替代传统的平板计数法来评价餐饮具的微生物污染状况。

关键词: ATP 生物发光法; 平板计数法; 餐饮具; 微生物

Evaluation of microorganism on tableware by ATP bioluminescence

ZHANG Feng-Lan, XU Xiao, WANG Hai-Yan, GAO Fei, SHAN Chun, CUI Sheng-Hui*

(National Institutions for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the detection limit and detection rate of the ATP bioluminescent method and the plate count method for tableware microbial contamination, and investigate the correlation between the 2 methods. **Methods** The standard solution with different concentrations were detected by the different ATP bioluminescent detectors produced by domestic companies (A, B, and C, respectively) and the standard curve was drawn after detection. Using different concentrations of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* bacteria liquid and artificial inoculation of *E. coli* tableware as goods, the ATP bioluminescence detector and the plate count method were used to detect them respectively, and then the standard curve of detection value between the 2 methods for quantity of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and tableware in artificial pollution and the correlation curve were drawn between the 2 methods. **Results** The detection limit of ATP standard solution, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were different among the 3 kinds of ATP bioluminescence detectors from different companies; but while in a detection range, the 3 kinds of different ATP bioluminescence detectors had a good linear correlation. And the 2 different methods have a good linear correlation. **Conclusion** There is an obvious instrument error between the different detectors from 3 companies on the detection limit for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. And the difference is obvious,

*通讯作者: 崔生辉, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: cuishenghui@aliyun.com

*Corresponding author: CUI Sheng-Hui, Professor, National Institutions for Food and Drug Control, No.2 Tiantan Xili, Beijing 100050, China. E-mail: cuishenghui@aliyun.com

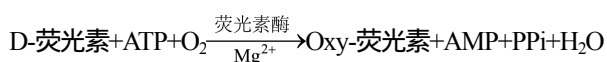
therefore, the ATP bioluminescent method cannot replace the traditional plate count method for evaluating the microbial contamination condition of tableware at present.

KEY WORDS: ATP bioluminescence; plate counting; tableware; microorganism

1 引言

餐饮具洁净度检测是监控餐饮食品污染的一道重要程序,《食品安全法》中要求餐饮具在使用前应当彻底洗净并消毒^[1]。餐饮具的污染主要来自微生物、食物残渣或油脂等,微生物污染一直是餐饮具洁净度监控中的首要目标群。传统的平板计数法是检测微生物污染的“金标准”,但因其检测周期长,不能进行实时监控,在监管工作中受到了限制。目前,ATP生物发光法作为一种快速检测方法,已初步用于食品生产过程、厨房、冰箱、铁路站车食品器具及餐饮具等处的清洁度检测^[2-6]。

ATP(adenosine triphosphate)即三磷酸腺苷,是微生物能量的主要载体,存在于所有动植物细胞中。ATP生物发光法的基本原理就是通过裂解破坏细胞壁将ATP释放出来,在 Mg^{2+} 存在时,ATP在荧光素酶和D-荧光素的作用下,使ATP释放磷酸基团并同时发出荧光,然后通过检测相对荧光强度(relative light unit, RLU)推算餐(饮)具被细菌、食物残渣等污染的程度。反应式如下所示。



Omidbakhsh等^[7]曾对国外4个不同品牌的ATP生物发光检测仪的灵敏度进行对比研究,发现不同品牌的仪器间的灵敏度存在较大差异。本研究首次对我国不同品牌的3款ATP生物发光检测仪,对ATP标准溶液、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的检出限进行评价,并在餐饮具表面细菌的检出效率方面与传统的平板计数法^[8]进行相关性研究,以确定ATP生物发光法是否能够替代传统的平板计数法来评价餐饮具表面的微生物污染状况。

2 材料与方法

2.1 菌株与试剂

标准菌株:金黄色葡萄球菌(ATCC29213)和大肠杆菌(ATCC25922)(美国菌种保藏中心ATCC)。三磷酸腺苷二钠(ATP,美国Sigma公司)。

2.2 仪器与设备

ATP生物发光检测仪(含有本公司配套的擦拭子):A、B、C公司为我国国产公司,A和B公司生产手持式ATP生物发光检测仪,C公司为便携式ATP生物发光检测系统;培养箱(美国Thermo公司);离心机(美国Thermo公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 ATP生物发光检测仪的ATP标准曲线建立

用高压灭菌的去离子水配制浓度为 10^{-2} mol/L的ATP溶液,并用去离子水按照1:10、1:100进行倍比稀释。从浓度为 10^{-14} 、 10^{-13} 、……和 10^{-5} mol/L的ATP溶液中各取10 μ L(A和B公司)或50 μ L(C公司)加入到拭子上,应用生物发光检测仪测定其RLU值($n=3$)。溶剂(去离子水)作为空白对照组。以ATP含量的对数值为横坐标,以生物发光检测仪的测量值RLU的对数值为纵坐标,绘制标准曲线。

2.3.2 ATP生物发光检测仪的细菌量标准曲线建立

将新鲜培养的大肠杆菌(ATCC25922)和金黄色葡萄球菌(ATCC29213)接种于无菌的胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB),37 $^{\circ}$ C培养20 h后,3000 r/min离心10 min,弃上清;用无菌0.85%的生理盐水重悬沉淀,3000 r/min离心10 min,弃上清,重复上述操作一次。最后,用0.85%的无菌生理盐水重悬沉淀,并对菌液浓度进行调节,使其100倍稀释菌液浊度为1.0 MCF,而后用0.85%的生理盐水按1:10、1:10²、1:10³、1:10⁴、1:10⁵进行倍比稀释。

按照食品安全国家标准GB 4789.2-2010^[8]方法检测上述菌液浓度,同时操作空白对照组(0.85%的无菌生理盐水)。取不同浓度的菌液各10 μ L(A和B公司)或50 μ L(C公司)加入到ATP生物发光检测仪的擦拭子上,测其RLU值($n=3$)。同时操作空白对照组(0.85%的无菌生理盐水)。

以细菌数量(CFU)的对数值为横坐标,以ATP测量值RLU的对数值为纵坐标,绘制标准曲线。

2.3.3 餐(饮)具人工污染样品的检测

取洗净的瓷盘120个,在瓷盘中央画出4个5 cm $\times$ 5 cm的正方形,每两个正方形之间彼此隔开。160

烘烤4 h灭菌备用。

将120个瓷盘分5组进行染菌,每组染菌24个瓷盘:包括用不同浓度菌悬液(5个浓度,每个浓度染4个瓷盘)染菌及4个空白对照(0.85%的生理盐水)瓷盘。具体染菌方式如下:将2.3.2中 $1:10$ 、 $1:10^2$ 、 $1:10^3$ 、 $1:10^4$ 、 $1:10^5$ 稀释的大肠杆菌(ATCC25922)菌悬液各取20 μL ,缓慢均匀加入到每个瓷盘的25 cm^2 正方形中间,每个瓷盘的4个正方形均染相同浓度的大肠杆菌。而后将这24个瓷盘进行盲法编号备用。

取盲法编号的染菌瓷盘,用棉签蘸取0.85%的生理盐水,从每个瓷盘上的其中一个25 cm^2 正方形方格中涂抹回收细菌,按食品安全国家标准GB 4789.2-2010方法检测细菌数量。在读取菌落总数结果时,为方便结果的对数转换统计,如果平板上未见菌落生长,则该平板菌落数记为1 CFU。分别用3个公司的ATP生物发光检测仪对编号的染菌瓷盘中每个25 cm^2 正方形中的大肠杆菌进行快速检测。

按照样品编号,以细菌数量(CFU)的对数值为横坐标,以ATP测量值RLU的对数值为纵坐标,做剂量反应曲线。

3 结果与分析

3.1 ATP生物发光法的标准曲线

A、B和C公司的ATP生物发光检测仪对ATP标准溶液的检出限分别为:1、10、0.5 fmol(1 fmol= 10^{-15} mol)(表1),在 10^{-14} mol与 10^{-9} mol浓度间,ATP含量的对数值与RLU的对数值间均有良好的线性关系,线性相关系数都在0.95以上。见图1。

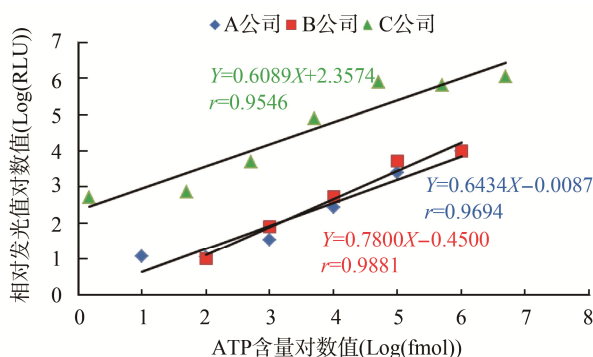


图1 ATP生物发光法的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of ATP bioluminescence

3.2 ATP生物发光方法与大肠杆菌量的标准曲线

A、B和C公司的ATP生物发光检测仪对大肠杆菌的检出限分别为: 1.47×10^4 、 1.47×10^3 、 7.35×10^1 CFU(表1)。大肠杆菌含量在 1.47×10^4 CFU与 1.47×10^8 CFU间,3家公司的ATP生物发光检测仪的RLU对数值与细菌量对数值间均有良好的线性关系,线性相关系数均在0.94以上。见图2。

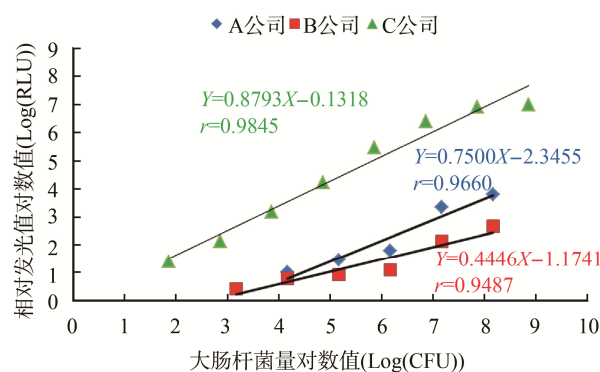


图2 ATP生物发光方法与大肠杆菌量的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of ATP bioluminescence and the amount of *E. coli*

3.3 ATP生物发光方法与金黄色葡萄球菌量的标准曲线

A、B和C公司的ATP生物发光检测仪对金黄色葡萄球菌的检出限分别为: 1.55×10^5 、 1.55×10^4 、 7.75×10^1 CFU(表1)。金黄色葡萄球菌含量在 1.55×10^5 CFU与 1.55×10^8 CFU间,3家公司的ATP生物发光检测仪的RLU对数值与细菌量对数值间均有良好的线性关系,线性相关系数均在0.98以上。见图3。

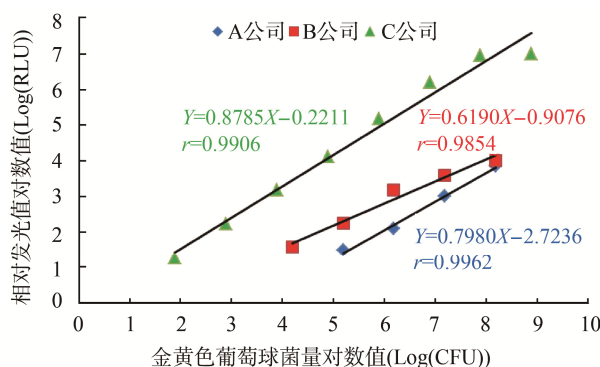


图3 ATP生物发光方法与金黄色葡萄球菌量的标准曲线

Fig. 3 Standard curve of ATP bioluminescence and the amount of *S. aureus*

表 1 ATP 生物发光检测仪对 ATP 标准溶液、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的检出限
Table 1 The detection limit of ATP standard solution, *E. coli* and *S. aureus* by ATP meter

	ATP(fmol)	大肠杆菌(CFU)	金黄色葡萄球菌(CFU)	接种餐饮具上的大肠杆菌(CFU)
A	1	1.47×10^4	1.55×10^5	1.55×10^3
B	10	1.47×10^3	1.55×10^4	2.95×10^2
C	0.5	7.35×10^1	7.75×10^1	2.95×10^2

3.4 ATP 生物发光法与平板计数法的相关性

对人工污染不同浓度大肠杆菌的瓷盘进行检测, 接种最低浓度大肠杆菌的瓷盘表面按食品安全国家标准 GB 4789.2-2010 方法回收的菌量为 2.95×10^2 CFU, 接种最高浓度大肠杆菌的回收菌量为 1.0×10^5 CFU。B 公司和 C 公司的 ATP 生物发光仪均能检测到瓷盘上最低浓度组的 2.95×10^2 CFU 大肠杆菌; 而 A 公司的 ATP 生物发光仪不能检测到瓷盘上的 2.95×10^2 CFU 大肠杆菌, 能检测较高浓度组瓷盘上的 1.55×10^3 CFU 大肠杆菌。在平板计数法回收的大肠杆菌 2.95×10^2 CFU 与 1.0×10^5 CFU 浓度间, 用 3 家公司的 ATP 生物发光检测仪所得的 RLU 对数值与用平板计数法对大肠杆菌计数的对数值间均有良好的线性关系, 线性相关系数均在 0.93 以上。见图 4。

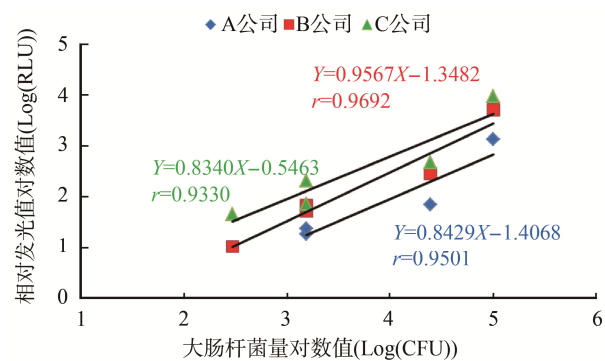


图 4 ATP 生物发光法与平板计数法的线性相关图
Fig. 4 Linear correlation of ATP bioluminescence method and plate counting method

4 结论与讨论

本研究中, 从我国市场上抽取的 3 家国产公司的 ATP 生物发光检测仪的结构和功能都存在差异。A 公司和 B 公司的 ATP 生物发光检测仪均为手持式, 轻巧便携, 拭子插入反应液中, 很快就能读数, 最大读

数均为 9999; C 公司为 ATP 生物发光检测系统, 携带不便, 需逐步加入反应试剂, 读数较慢, 最大读数为 10^6 , 最低检测体积为 50 μL , 而不是 10 μL 。A、B、C 公司检测仪对 ATP 标准溶液的检出限均低于 10 fmol, 在 10 fmol 与 10^6 fmol 浓度间, ATP 含量的对数值与 RLU 对数值间的线性相关系数均在 0.95 以上, 与文献报道的研究结果一致^[9,10]。

A、B、C 公司检测仪对大肠杆菌的检出限均低于金黄色葡萄球菌, 其中 C 公司的检测仪灵敏度最好, 比 B 和 C 公司的低 2~3 个 Log。但在检测范围内, ATP 的检测值与细菌量间均有良好的线性相关性。Omidbakhsh 等^[7]曾对国外 4 个不同品牌的 ATP 生物发光检测仪的灵敏度进行对比研究, 对金黄色葡萄球菌的检出限也相差 3 个 Log。这可能与不同公司使用的擦拭子、ATP 提取剂、 Mg^{2+} 浓度、荧光素酶活性等存在差异有关, 对细菌 ATP 提取效果不同, ATP 反应的条件存在差异, 导致不同仪器的灵敏度存在差别^[11-15]。

Turner^[10] 用 Charm Sciences 公司生产的 novaLUM 生物发光检测仪对金黄色葡萄球菌的检出限为 10^2 CFU, 但 Omidbakhsh 等^[7]应用 Charm Sciences 公司对金黄色葡萄球菌的检出限为 10^5 CFU。同一家公司的检测仪对金黄色葡萄球菌的检出限存在差异可能与细菌处于不同的生长状态有关, Turner 等检测的是对数生长期的金黄色葡萄球菌, 此时细菌细胞中的 ATP 含量较高, 而 Omidbakhsh 等检测的是处于静止期的金黄色葡萄球菌, 此时细胞分裂后消耗 ATP, 细菌细胞内的 ATP 含量较少。本研究检测的也是生长处于静止期的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 检出限较高。

为评价生物发光检测仪是否能够实际反映餐饮具微生物污染的状况, 本研究在瓷盘上人工污染大肠杆菌, 分别应用 3 家公司的仪器与平板计数法同时进行检测。结果显示, 2 家公司的 ATP 生物发光检测

仪均能检测到 2.95×10^2 CFU 的大肠杆菌,1家公司能检测到 1.55×10^3 CFU 大肠杆菌,3家公司的检测值与平板计数法的线性相关系数均高于 0.93。文献报道,在我国曾利用 ATP 生物发光仪对餐饮具进行过检测,与传统平板计数法的检验结果差异无统计学意义^[2,16]。

但在实际检测餐饮具时,微生物可能会处于“饥饿状态”,被命名为“VBNC(viable but not culturable)”,此时,仅有 1/100 的细菌能够培养,并且细菌细胞内所含 ATP 的量较少,此时,ATP 生物发光法的检测值会低于实际的微生物量^[9,17];但当有食物残渣和体液及脱屑的细胞污染时,ATP 检测值就要高于实际的微生物含量^[18]。此外,ATP 检测值还受到化学消毒剂或洗涤剂的影响^[7]。在检测人工污染的大肠杆菌时,因接种大肠杆菌的程序复杂,大肠杆菌对湿度的要求较高,使大肠杆菌的接种回收率较低(实验数据未公布)。而此时大肠杆菌中的 ATP 含量可能仍处于较高状态,因此,A 和 B 公司的生物发光检测仪对餐饮具上大肠杆菌的检出限低于对菌液的检出限。

ATP 生物发光检测仪在对餐饮具进行实时监控方面能够发挥重要作用,但不同仪器间的性能存在较大差异,并且其检测值受到诸多因素的影响,很难制定统一的标准。因此,在目前情况下,ATP 生物发光法还不能替代食品安全国家标准 GB 4789.2-2010 中的传统平板计数法来评价餐饮具的微生物污染状况。

参考文献

- [1] 中华人民共和国食品安全法[S]. Food Safety Law of the People's Republic of China [S].
- [2] 曹利蓉,张伟,晁蕊,等. ATP 生物发光法在铁路车站食品器具卫生学检验中的应用[J]. 铁道劳动安全卫生与环保, 2004, 31(2): 86-87. Cao LR, Zhang W, Zhao R, *et al.* ATP bioluminescence method in the application of the railway station tableware hygiene inspection [J]. Railway Labor Saf Health Environ Prot, 2004, 31(2): 86-87.
- [3] 许卓睿,郭智成,姚海斌,等. ATP 生物荧光法检测餐饮具集中消毒清洁效果分析[J]. 浙江预防医学, 2014, 26(11): 1150-1152. Xu ZR, Guo ZC, Yao HB, *et al.* Effect of disinfect in cleaning tableware by ATP bioluminescence [J]. Zhejiang Prev Med, 2014, 26(11): 1150-1152.
- [4] Champiat D, Matas N, Monfort B, *et al.* Applications of biochemiluminescence to HACCP [J]. Luminescence, 2001, 16(2): 193-198.
- [5] Aycicek H, Oguz U, Karci K. Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen [J]. Int J Hyg Environ Health, 2006, 209(2): 203-206.
- [6] Chen FC, Godwin SL. Comparison of a rapid ATP bioluminescence assay and standard plate count methods for assessing microbial contamination of consumers' refrigerators [J]. J Food Prot, 2006, 69(10): 2534-2538.
- [7] Omidbakhsh N, Ahmadpour F, Kenny N. How reliable are ATP bioluminescence meters in assessing decontamination of environmental surfaces in healthcare settings [J]. PLoS One, 2014, 9(6).
- [8] GB 4789.2-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. GB 4789.2-2010 National food safety standard-Food microbiological examination: Aerobic plate count [S].
- [9] Vogel SJ, Tank M, Goodyear N. Variation in detection limits between bacterial growth phases and precision of an ATP bioluminescence system [J]. Lett Appl Microbiol, 2014, 58(4): 370-375.
- [10] Turner DE, Daugherty EK, Altier C, *et al.* Efficacy and limitations of an ATP-based monitoring system [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2010, 49(2): 190-195.
- [11] Davidson CA, Davidson CA, Griffith CJ, *et al.* Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness-ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing [J]. Luminescence, 1999, 14(1): 33-38.
- [12] Moore G, Griffith C. Problems associated with traditional hygiene swabbing: the need for in-house standardization [J]. J Appl Microbiol, 2007, 103(4): 1090-103.
- [13] Landers TF, Hoet A, Wittum TE. Swab type, moistening and preenrichment for Staphylococcus aureus on environmental surfaces [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(6): 2235-2236.
- [14] 伍季,朱海华,章建军,等. 季铵盐类表面活性剂对细菌 ATP 提取作用的研究[J]. 江西农业学报, 2008, 20(9): 124-125. Wu J, Zhu HH, Zhang JJ, *et al.* Research on effect of quaternary ammonium surfactants in extract of ATP [J]. Jiangxi Acta Agric, 2008, 20(9): 124-125.
- [15] Ishida A, Yoshikawa T, Nakazawa T, *et al.* Enhanced firefly bioluminescence assay of ATP in the presence of ATP extractants by using diethylaminoethyl-dextran [J]. Anal Biochem, 2002, 305(2): 236-241.
- [16] 张周建,顾健,吴正和,等. 南通市餐饮具集中消毒行业卫生现状调查[J]. 中国消毒学杂志, 2012, 29(7): 588-590.

Zhang ZJ, Gu J, Wu ZH, *et al.* Investigation of health status of tableware concentrate disinfection trade of Nantong [J]. *Chin J Disinf*, 2012, 29(7): 588–590.

- [17] Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, 309(1): 1–7.
- [18] Lappalainen J, Loikkanen S, Lappalainen J, *et al.* Microbial testing methods for detection of residual cleaning agents and disinfectants-prevention of ATP bioluminescence measurement errors in the food industry [J]. *J Food Prot*, 2000, 63(2): 210–215.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



张凤兰, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品化妆品安全性评价。

E-mail: flzhang2007@163.com



崔生辉, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品微生物。

E-mail: cuishenghui@aliyun.com