

食源性致病菌和腐败菌的快速检测方法研究进展

傅志丰*, 周 鹤, 张国利, 许文蓓, 张文丽

(九江市检验检测认证中心食品药品检测分中心, 九江 332000)

摘 要: 食源性致病菌和腐败菌污染一直是引发食品安全事件的重要因素。传统的检测方法虽具有较高的准确性, 但需培养及生化实验, 耗费时间长且操作较复杂, 开发高效、快速的检测方法对保障食品安全至关重要。近年来, 科学技术的进步使一些新方法、新技术逐渐被运用, 比传统培养法检测时间更短、效率更高、特异性更好, 具有广阔的应用前景。因此, 本文综述了食源性致病菌和腐败菌快速检测方法的最新研究进展, 包括纸片法、流式细胞术、阻抗法、腺苷三磷酸荧光法、光谱检测技术、分子生物学检测技术、免疫学检测法及生物传感器检测技术等, 着重论述了各种方法的原理、优缺点、应用状况及发展方向, 为致病菌和腐败菌引发的食品安全事件的预防及控制提供参考。

关键词: 食源性致病菌和腐败菌; 食品安全; 快速检测

Research progress on methods for the rapid detection of food-borne pathogenic bacteria and spoilage bacteria

FU Zhi-Feng*, ZHOU He, ZHANG Guo-Li, XU Wen-Bei, ZHANG Wen-Li

(Food and Drug Inspection Sub Center of Jiujiang Inspection, Testing and Certification Center, Jiujiang 332000, China)

ABSTRACT: Food-borne pathogenic bacteria and spoilage bacteria contamination have always been important factors in food safety incidents. Traditional microbial detection methods are accurate, however they take long time and need complicated operation, so it is of great significances to develop efficient and fast methods. With scientific and technological development in recent years, many new methods are gradually applied in the detection, compared with the traditional culture method, the detection time is shorter, the efficiency is higher, the specificity is better, and it has broad application prospect. This paper reviewed the rapid detection technology of food-borne pathogenic bacteria and spoilage bacteria in recent years, such as paper method, flow cytometry, electrical impedance measurement, adenosine triphosphoric acid bioluminescence techniques, spectroscopic techniques, molecular biology detection technology, immunological detection method, biosensors, and so on, discussed the principle, advantages and disadvantages, application progress and development direction of each method. It is expected to provide references for the prevention and control of food safety incidents caused by food-borne pathogenic bacteria and spoilage bacteria.

KEY WORDS: food-borne pathogenic bacteria and spoilage bacteria; food safety; rapid detection

0 引 言

目前, 影响食品安全的因素主要包括物理性污染、化学性污染及微生物污染等, 其中由有害微生物污染引起的

食源性疾病是影响食品安全的首要因素。根据世界卫生组织的统计, 全世界每年的食源性疾病患者中, 70%以上是由于食用微生物污染的食品或者饮用水^[1]。食物中毒是一种常见的食源性疾病, 我国微生物性食物中毒疾病事件时

*通信作者: 傅志丰, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检验技术。E-mail: dsqhlh112@163.com

*Corresponding author: FU Zhi-Feng, Master, Engineer, Food and Drug Inspection Sub Center of Jiujiang Inspection, Testing and Certification Center, East Xingcheng Road, Baliu New District, Jiujiang 332000, China. E-mail: dsqhlh112@163.com

有报出,如湖北省 2008—2018 年食物中毒的主要引发因素便是细菌性污染^[2];2020 年 10 月,由椰毒假单胞菌引发的黑龙江“酸汤子中毒事件”导致 9 人死亡^[3]等。因此,亟待加强食源性有害微生物(主要包括致病菌和腐败菌)的检测以便有效预防和控制食品安全事件。

当前,食源性致病菌及腐败菌的检测方法主要有传统培养法和快速检测法。其中,传统培养法是金标准,方法准确性高、选择性强,但检验周期过长,其中分离培养、形态观察、生化鉴定等一系列步骤操作较烦琐,需专门培训的技术人员来完成。另外,对于某些易腐败变质的食物如三文鱼、生乳等,放置过程将使样品错过最佳检测时间,存在较大的滞后性。近年来,科学技术的进步使一些新方法、新技术逐渐被运用,这些方法比传统培养法检测时间更短、效率更高、特异性更好。目前比较常见的新方法有纸片法、流式细胞术法、阻抗法、腺苷三磷酸荧光法、光谱检测技术、分子生物学检测法、免疫学检测法和生物传感器检测技术等。现有的综述文献大多从某个角度开展论述^[4-5],不够系统和全面,且这些方法近几年产生了许多新成果、新发展趋势,故本文对食源性致病菌和腐败菌快速检测方法的最新研究进展进行综述,着重论述了各种方法的原理、优缺点、应用状况及发展方向,为其引发的食品安全事件的预防控制提供参考。

1 纸片法

纸片法是将培养基、凝胶和显色剂等加载到试纸片上制成产品,通过观察是否出现有颜色的菌斑来检测微生物的方法。该方法省去了培养基配制、消毒等步骤,操作简单、成本低廉,并克服了热琼脂法不利于受损细菌恢复的缺陷^[6]。近几年,相关研究表明纸片法在沙门氏菌、菌落总数及大肠菌群等微生物检测方面与国家标准方法具有等效性。例如,任璐瑶^[7]开发的沙门氏菌快速测试片灵敏度高、特异性强,检测结果与国家标准方法具有良好的一致性,显著地提高了食品中沙门氏菌的检测效率。王曦等^[6]采用试纸片法检测市售饼干和糕点的菌落总数,并将结果与国家标准方法相比较,证实了纸片法对不同菌落数区间检测结果与国家标准方法一致的准确性。目前应用最多的是 3M 试纸片,但其价格较高,国产替代化是一种流行趋势。郭登峰等^[8]筛选适宜的冷水溶性凝胶剂制备菌落总数测试卡,降低了检测卡的制作成本。然而,当样品中细菌数量过大时,由于试纸上培养基营养的限制,结果准确度可能降低。另外,当前市场上快速检测纸片产品无统一的评价标准导致质量参差不齐,行业亟待规范化。

2 流式细胞术

流式细胞术(flow cytometry, FCM)是基于细菌经过荧光染料处理后,在特定波长光的激发下会产生荧光和散射光,荧光信号强度高代表细菌的数量多少,散射光的大小代表细菌细胞的大小^[9]。与传统培养法相比,FCM 更快

速、精准,并且能对细菌的大小、形状进行测定。荧光染料的选择和样品处理是制约该技术应用的一个重要因素,为此,梅仕良^[10]从异硫氰酸荧光素、碘化丙啶、绿色活细胞核酸染料、5(6)-羧基二乙酸荧光素琥珀酰亚胺酯 4 种染料中筛选出检测豆制品菌落总数的最佳染料组合为绿色活细胞核酸染料与碘化丙啶,检出限为 10^3 cell/mL。目前,FCM 应用的局限性主要是仪器运行成本偏高、生成的数据难处理以及样品在制成单细胞悬浮液后可能会影响到细胞结构(如破坏细胞膜),从而降低结果的准确性^[11]。

3 阻抗法

微生物生长代谢时,培养基中营养成分变化会使其阻抗电特性发生改变,据此可推断培养物细菌的数量。阻抗法常被应用于预估乳制品、肉制品、果汁饮料等食品中致病菌和腐败菌污染水平,具有强大的潜力。ZHU 等^[12]采用同轴探针技术测定生牛乳的介电光谱性质,然后结合平板计数结果建模发现,采用 $\epsilon'' + \epsilon'$ 和 ϵ' 建立的模型具有最好的菌落总数预测能力。现代微加工与免疫传感器技术的发展使阻抗法的灵敏度、检测效率进一步提升。例如,FARKA 等^[13]研制的检测牛奶中鼠伤寒沙门氏菌的阻抗型免疫传感器,检测时间为 20 min。然而,阻抗法使用成本较高,且应用前提为目标微生物需具有较高的增长速率,微生物增长速度达到 $6.0 \sim 7.0 \log_{10}$ CFU/mL 时,培养基的介电阻参数才会改变。

4 腺苷三磷酸荧光法

腺苷三磷酸(adenosine triphosphoric acid, ATP)荧光法是基于生物体发光反应的检测技术,其原理为食品中致病菌和腐败菌越多,所含 ATP 量就越高,发出的荧光强度就越大^[14]。该方法检测时间短(30 min 内)、成本低、可实现现场及批量样品检测。近年来,ATP 荧光法的应用范围不断拓展。如郭立芸等^[14]采用便携式 ATP 荧光检测仪对表面短乳杆菌、水质短乳杆菌浓度检测以建立啤酒酿造过程中微生物污染风险的快速评估方法。张志杰^[15]将纳米探针技术与 ATP 荧光法联用检测大肠杆菌,检测时间仅需 20 min,检出限为 350 CFU/mL。但是,ATP 荧光法对检测环境条件要求较高,部分非生物性物质(洗涤剂、消毒剂)或细胞外 ATP 均会对检测结果产生影响,容易造成误差。

5 光谱检测技术

光谱检测技术可应用于食源致病菌和腐败菌污染的快速检测。目前运用较多的主要是近红外光谱法、高光谱成像技术和拉曼光谱法。

5.1 近红外光谱法

近红外光谱法(near infrared spectroscopy, NIR)结合了机器视觉技术与近红外光谱技术的优点,利用样品 780~

2560 nm 波长范围的特征光谱识别聚合物、蛋白质、脂类和碳水化合物等官能团,并可通过测量复杂分子中化学键的振动性质、键角和键长以实现致病菌和腐败菌的检测^[16]。然而,大多数微生物红外光谱非常相似,需借助光谱预处理和化学计量学技术,才能实现定性定量分析。一些常用的光谱预处理方法包括多元散射校正、平滑、归一化和二阶导数变换^[16],光谱经预处理后,化学计量学包括部分最小二乘回归(partial least squares regression, PLSR)、逐步多元线性回归(stepwise multiple linear regression, SMLR)、支持向量机(support vector machine, SVM)、人工神经网络分析(artificial neural network analysis, ANN)等用于定量分析,主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘(partial least squares, PLS)、判别分析(discriminant analysis, DA)、随机森林(random forest, RF)和最小二乘支持向量机(least squares, LS-SVM)用于微生物的描述和分类^[17]。为了评价模型的优劣,需计算校正集、预测集和交叉验证的决定系数(R)和均方根误差(root mean square error, RMSE) (R_C 、 R_P 、 R_{CV} 、 $RMSE_C$ 、 $RMSE_P$ 、 $RMSE_{CV}$),一般好的模型应具有较高的 R 值(接近于1)和较低的 RMSE,且 $RMSE_C$ 与 $RMSE_{CV}$ 或 $RMSE_P$ 之间的差值较小。刘斌等^[18]基于主成分分析和偏最小二乘法对5种常见的食源性致病菌进行近红外光谱检测,结果表明相较于主成分分析模型,偏最小二乘法更适合致病菌的鉴别,预测值和真值无显著性差异。何鸿举等^[16]基于900~1650 nm 光谱,采用高斯滤波平滑预处理,建立整块鸡胸肉菌落总数的 PLS 模型, R_P 为0.964, $RMSE_P=1.022$ 。这些研究表明 NIR 可作为一种快速、准确、无损的检测技术。目前该方法应用的主要挑战为定标建模较为复杂,需投入大量人力、物力及财力。

5.2 高光谱成像技术

高光谱成像技术(hyperspectral imaging technology, HSI)将光谱技术与数字成像技术相结合,可同时获取样品的光谱和空间信息,具有迅速、实时和三维成像的特点。HSI 是一种很好的传统菌落总数测定替代方法,特别是对于肉类产品(猪肉、鸡肉、羊肉、牛肉等)。赵楠等^[19]还采用 HSI 检测鸡蛋液中的菌落总数,结果显示基于特征波段下的支持向量机模型对蛋清、蛋黄以及全蛋液样本定量效果最佳,比国家标准方法操作更简单。HSI 除了能定量分析外,还能对微生物种类进行分类。例如,金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、诺克李斯特菌和大肠杆菌可被 HSI 从它们的混合培养物中准确鉴别^[20]。未来,利用强大的计算机及现代光学工具(摄谱仪或照相机)对高光谱数据处理,还可以更精确、细致地了解细菌的光谱和空间信息^[21],目前 HSI 应用遇到的主要问题是需建立准确的校准曲线、管理大量的数据、建立强大的数据转换模型等。

5.3 拉曼光谱法

拉曼光谱法是基于拉曼散射效应开发的一项技术,测定时,入射光子与样品之间发生能量转移,使拉曼光谱产生特

异性。拉曼光谱法所需样品量少,几分钟即可获得结果,已用于大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌等单细胞食源性病原体的鉴别分析,特异性良好。目前,拉曼光谱法对肉中腐败菌也具有无损检测能力。杨鸿博^[22]采用拉曼光谱结合偏最小二乘算法建立模型预测贮藏牛排的微生物数量,结果显示模型对21 d期的菌落总数和乳酸菌数预测都具有较好的适用性。如今,科学家们正试图通过将拉曼光谱技术与金属纳米粒子结合,开发假单胞菌等致病微生物检测的新方法,以此获得更好的检测结果^[23]。

6 分子生物学检测技术

对于某些特殊的致病菌和腐败菌,传统培养法可能无法适用,这推动了分子生物学检测技术的发展。目前比较常用的主要有聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)及环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)。

6.1 聚合酶链式反应及其衍生技术

PCR 是一种常见的分子生物学检测方法。PCR 的应用类型主要包括常规 PCR、多重 PCR、实时荧光定量 PCR、变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)等。在这些方法中,多重 PCR 运用最广泛,可对多个高度保守的基因序列进行同时扩增,一次同时检验多种细菌^[24],但由于反应时会产生非特异性产物,结果仍然存在不稳定性。实时荧光定量 PCR 则是在传统 PCR 的基础上,加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,该方法无需进行样品扩增后的处理步骤,具有更高的检测效率、灵敏性及准确性^[25]。PCR-DGGE 是一种特殊的电泳形式,它利用碱基序列存在差异的双链 DNA 解链时需要不同的变性剂浓度,在聚丙烯酰胺凝胶中电泳的行为存在差异,从而在电泳中的位置不同的原理实现菌相的检测^[26]。

相对于许多 PCR 方法,数字 PCR 更高效、快速,其将传统 PCR 与荧光探针技术结合,检测时样品被分成许多微滴,每个微滴都进行相同的 PCR 扩增,含有靶序列的微滴产生荧光记为阳性,否则记为阴性,然后根据泊松分布统计样品的 DNA 分子数目与比例,从而实现更灵敏的绝对定量^[27],目前数字 PCR 已实现了牛奶中沙门氏菌^[27]、苹果汁中大肠杆菌的定量分析^[28],检出限分别为5 CFU/25 mL 和2 CFU/mL,具有显著的定量优势。

但是,多数 PCR 技术无法区分死细菌与活细菌,容易造成样品假阳性,为了克服这个缺陷,常结合叠氮溴乙锭(ethidium bromide monoazide, EMA)染料,开发仅检测活细菌的 EMA-PCR 法。马艳琳等^[29]应用 EMA-PCR 检测啤酒中的腐败短乳杆菌,结果表明该方法能有效区分活/死细胞混合体系,并能检出所有的5株污染菌。

6.2 环介导等温扩增技术

LAMP 反应温度保持恒定,通常在60 min内产生约 10^3

倍于常规 PCR 的扩增产物,具有省时、特异性强、成本低的优点。LAMP 检测人工污染猪肉样本中单核增生李斯特菌的灵敏度是传统 PCR 的 10 倍^[30];检测婴幼儿配方乳粉中阪崎肠杆菌的灵敏度为 10^2 CFU/g,耗时显著低于传统培养法^[31]。因此,LAMP 在实际工作中更易推广,已被用于检测各种致病微生物。近年来,由 LAMP 衍生的方法,如原位 LAMP^[32]、多重 LAMP^[33]和实时逆转录 LAMP^[34]也逐渐建立。然而,LAMP 是一种最适扩增区域长为 120~180 bp 的链置换合成法,对 500 bp 以上的长链靶序列很难扩增,并且也会对死细胞微生物的 DNA 序列扩增,从而导致假阳性结果。

7 免疫学检测法

目前常见的免疫学检测法主要有酶联免疫法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、侧流免疫层析法 (lateral-flow assay, LFA)、免疫磁珠分离技术 (immunomagnetic separation method, IMS)、免疫荧光技术等。其中 ELISA 最通用,其利用酶标记抗体与微生物细胞表面特定抗原发生特异性反应,在加入酶底物后,底物颜色因催化作用而改变,从而被检测到。ELISA 特异性好、效率高、成本低、检出限能达到 ng 甚至 pg 水平,并能制成试剂盒,适用于批量样品的分析^[35]。ZHANG 等^[36]基于鸡抗蛋白 A IgY 和任意非特异性哺乳动物 IgG 的双重识别作用建立金黄色葡萄球菌的检测方法,通过优化体系使未经富集的磷酸盐缓冲溶液检出限达到 11 CFU/mL,检测区间为 $5.0 \times 10^2 \sim 5.0 \times 10^4$ CFU/mL,检测时间小于 90 min。尽管 ELISA 已被许多实验室广泛应用,但该方法仍局限于需要酶标仪、恒温箱等设备及受到专业培训的技术人员。因此,更多现场、廉价的方法亟待开发。

基于 LFA 的现场检测技术,如试纸法、免疫层析法、免疫过滤法等正不断被开发应用。LFA 的原理是样品在毛细管作用下沿着固体基质流动,遇到有色试剂(用胶体或金颗粒标记的抗体或抗原)发生混合并穿过基质,当经过用抗体或抗原预处理过的线条或区域时,若样品中存在目标微生物,有色试剂可在测试线区域结合,大多数 LFA 在 5~15 min 产生视觉反应^[37]。MIN 等^[38]开发了 1 种新型的三明治型 LFA,可直接用于检测金黄色葡萄球菌,检出限为 5×10^4 CFU/mL。LFA 可用于多种病原菌检测,但定量能力的不足限制了其应用,随着半定量及定量技术的发展以及磁性免疫层析分析系统等先进阅读设备的开发,这一缺陷正在被不断克服。

IMS 则是将特异性反应与磁珠的磁响应特性相结合的一项分离富集技术,其解决了传统分离检测中由食品成分复杂、微生物菌群多样化带来的分离难、基质干扰大的问题^[39]。由于磁处理速度快、效率高,且对目标的影响很小,IMS 应用越来越多。此外,各种生物活性分子可以结合到 IMS 表面,用于免疫沉淀、分离和鉴定生物分子(如细

胞、病原体和蛋白质)。

目前,定性的免疫学方法常与其他方法相结合。例如 ELISA 与 IMS 结合制成免疫层析试纸条,是一种简单的食品检测方法^[40]。为了开发更灵敏的方法,CHEN 等^[41]将 ELISA 与 PCR 技术结合,实现了阪崎肠杆菌的检测。此外,先进的技术往往结合多种方法才能更加准确,其中大多数是结合免疫学技术和电传感器技术,科学技术进步的历程也表明了免疫学方法单独使用以及与其他方法联用具有强大的应用前景。

8 生物传感器检测技术

8.1 电化学生物传感器

电化学生物传感器主要由生物感受器和换能器两部分组成。检测时,目标分子被生物感受器捕获到电极表面,并通过物理或化学方法固定,然后电极再将生物分子间特异性反应所形成的各种信号转换成电压、电流、电阻或电导等参数。电化学传感器是一种经济有效的检测方法,但与光学生物传感器相比,其灵敏度低、选择性有限。在各类电化学生物传感器中,电流型传感器应用最普遍。电压型传感器应用最少,通常,它们由生物活性物质和离子选择膜组成,在反应过程中产生极小的浓度变化。为提高其性能,新型材料技术如分子印迹技术不断被开发应用,极大地提升了电压生物传感器的检测灵敏度、特异性及效率。ABDELLATIF 等^[42]研制了一种基于孢子印迹聚合物修饰的碳糊电极,对蜡样芽孢杆菌孢子具有良好的亲和性和选择性。而另一类应用广泛的电化学生物传感器为阻抗型传感器,与微加工、纳米技术结合,也有着广阔的应用前景^[43]。

8.2 光学生物传感器

光学生物传感器是利用光纤一端表面固定的能特异性结合微生物的抗体,与细菌反应能形成化学发光、显色或荧光等信号。目前常见的光学生物传感器有比色、等离子体生物和荧光生物传感器,光学生物传感器是迄今为止最智能的微生物检测设备,特别是比色传感器,通过观察反应颜色几分钟内即可判断结果。比色传感器分为平板基底和溶液基底两类。平板基底的典型应用是 LFA 生物传感器,它借助抗体在 1 min 内就能检出金黄色葡萄球菌^[44]。但 LFA 生物传感器灵敏度较低,需结合各种纳米颗粒改进以降低其检出限^[45]。比色生物传感器的另一种形式是溶液基质,通常通过金纳米颗粒聚集使样品颜色变化快速检测病原体。有研究表明,基于溶液的比色生物传感器对鼠伤寒沙门氏菌的检出限可达到 2.42×10^2 CFU/mL^[46]。等离子体生物传感器是又一类光学生物传感器,主要有表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)和表面增强拉曼光谱(surface enhanced raman spectroscopy, SERS)两类,前者的灵敏度较

低,但近年来其与磁分离技术^[47]、金纳米粒子结合^[48],对低浓度致病菌与腐败菌的检测灵敏度也在不断提高。而 SERS 由于具有很高的选择性和灵敏性,在各种食源性致病菌检测中的应用也呈上升趋势。随着光学一体化技术的发展,越来越多优秀的光学生物传感器必将涌现。

8.3 压电生物传感器

压电生物传感器将生物识别元件(酶、抗体、抗原、核酸、细胞、动植物组织等)固定在换能器上,通过换能器将反应结果转变为可以输出的检测信号。近年来,以石英晶体为转换器的压电传感器(quartz crystal microbalance, QCM)应用较广泛。QCM 通过测量石英晶体谐振器频率的变化以检测晶体表面质量的变化,再根据质量-频率的变化预测目标微生物的种类和含量。YU 等^[49]将抗体固定在磁珠上富集细菌,然后采用适体功能化的石英晶体为转换器检测大肠艾希氏菌 O157:H7,结果显示该方法能检测所有富集的细菌,检出限为 1.46×10^3 CFU/mL,检测时间只需 50 min。任佳丽等^[50]建立了 QCM 检测米粉中细菌的方法,通过获得米粉中细菌的典型响应曲线,定义检出时间,所得结果准确度与国家标准方法一致,且对样品菌落总数的检测时间控制在 7.8 h 内。上述压电传感器大都采用在石英晶体表面形成自组装膜、抗体或聚合物等,构建多为共价键结合,另外,部分传感器也可采用石墨烯等纳米材料修饰。如 NEHRA 等^[51]采用滴铸法将石墨烯氧化物修饰在晶体表面,形成一层很薄的石墨烯氧化物层,开发出 1 种检测大肠杆菌的压电生物传感

器,最低抗原检测浓度为 5 ng/mL。鉴于压电生物传感器快速响应的特点,虽然目前其应用较少,但有充分的理由相信它在未来占有一席之地。

食源性致病菌及腐败菌快速检测技术具体应用信息及优势、局限性见表 1。

9 结束语

传统培养法在近一个多世纪来一直是食源性致病菌和腐败菌检测的可靠工具,但耗时较长且操作较复杂。近年来,许多新型的检测方法不断涌现,使检验更便捷、现场、具有实时性。本文综述了食源性致病菌和腐败菌快速检测方法的最新研究进展,这些方法在食品安全监管领域应用前景广阔。然而,任何一种方法都存在一定的应用限制,无法适合所有样品,如纸片法不能测定高浓度微生物、流式细胞术可能破坏细胞膜结构从而降低结果的准确性、ATP 荧光法易受到外源性 ATP 的干扰、传统 PCR 无法区分微生物的死活、免疫学检测法容易造成结果假阳性及交叉污染等,应用时需合理选择,并对现有方法改进,使其更加快速、准确、灵敏、廉价。另外,不同方法之间可以实现优势互补,例如,将 PCR 与免疫胶体金法结合可显著提高方法的灵敏性和特异性;将 IMS 与 ATP 荧光法、PCR 技术或生物传感器技术相结合能有效分离目标微生物并提高方法的灵敏性等,以此开发更先进的新方法,为我们的食品安全保驾护航。

表 1 食源性致病菌和腐败菌快速检测技术
Table 1 Rapid detection technology of food-borne pathogens and spoilage organism

检测方法	目标微生物种类	应用食品类型	检出限	检测时间	优势	局限性	参考文献
纸片法	沙门氏菌	饼干、糕点	10^{-9} CFU/mL	30 h	省去了培养基配制、消毒等步骤,操作简单、成本低,克服了热琼脂法不利于受损细菌恢复的缺陷	细菌数量过大时,准确度降低;市场上产品质量参差不齐	[7]
	菌落总数			48 h			[6]
	菌落总数			24 h			[8]
流式细胞术	菌落总数	豆制品	10^3 cell/mL	1 h	快速、精准,并能对细菌的大小、形状测定	成本偏高、仪器数据难处理,前处理方式影响准确性	[10]
阻抗法	沙门氏菌	牛奶	10^3 CFU/mL	20 min	检测快速便捷	成本较高,目标微生物需具有较高的增长速率	[13]
	菌落总数	生羊奶	35 CFU/mL	2 h			[12]
	短乳杆菌	水质		几分钟			[14]
ATP 荧光法	大肠杆菌		3×10^2 CFU/mL	20 min	操作简单、快速、绿色环保	受到部分非生物性物质或细胞外 ATP 干扰	[15]
	5 种致病菌			1 h			[18]
近红外光谱	菌落总数	鸡胸肉	10^2 CFU/g	1 h	快速、准确、自动化程度高、无损检测	建模较为复杂,需投入大量人、物、财力	[16]
光谱检测技术							
高光谱成像技术	金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、诺克李斯特菌和大肠杆菌			几分钟	迅速、实时及具有三维成像	须建立准确的校准曲线,管理大量的数据,建立强大的数据转换模型	[20]
拉曼光谱法	菌落总数	鸡蛋液	10 CFU/g	几分钟	快速、所需样品量少	图像易受到生长环境、状态及样本制备过程的影响	[19]
	假单胞菌属			<1 h			[23]
	菌落总数和乳酸菌数	牛排	10^3 CFU/g	<1 h			[22]

表 1(续)

检测方法	目标微生物种类	应用食品类型	检出限	检测时间	优势	局限性	参考文献	
分子生物学检测技术	聚合酶链式反应及其衍生技术	沙门氏菌	牛奶	5 CFU/25 mL	8 h	快速、灵敏度、准确度较高	需要设计筛选特异性引物或探针,	[27]
		大肠杆菌	苹果汁	2 CFU/mL	1 h		结果容易假阳性	[28]
		短乳杆菌	啤酒	10 ⁴ CFU/mL	1 h		对死细胞微生物 DNA 序列扩增,	[29]
	LAMP	单核增生李斯特菌	猪肉	100 fg/反应	1 h	省时、特异性强、成本低	结果容易假阳性	[30]
		阪崎肠杆菌	幼儿配方乳粉	10 ² CFU/g	13 h			[31]
免疫学检测技术	ELISA	金黄色葡萄球菌		11 CFU/mL	<90 min	特异性好、效率高、成本低、检出限低, 适用于批量样品的分析	需要酶标仪、恒温箱等设备	[36]
	LFA	沙门氏菌		5×10 ⁴ CFU/mL	5~15 min	现场、廉价、快速	定量能力不足	[38]
	IMS	蜡样芽孢杆菌	熟制食品	4 CFU/mL	约 1 d	解决了样品分离难、基质干扰大的问题	选择的抗原靶标应具有较强的特异性	[39]
生物传感器检测技术	电化学生物传感器	蜡样芽孢杆菌		10 ² CFU/mL	5~15 min	灵敏度低	选择性有限	[42]
	光学生物传感器	金黄色葡萄球菌	碎牛肉、火鸡香肠、生菜和牛奶	40 CFU/mL	1 min	自动化程度高	灵敏度需进一步提升	[44]
	压电生物传感器	大肠艾希氏菌 O157:H7		1.46 × 10 ³ CFU/mL	50 min	快速、灵敏	适用于大分子, 稳定性需进一步提升	[49]
		菌落总数	米粉	10 ² CFU/g	7.8 h			[50]

参考文献

[1] 陈沈梁, 霍柯宇, 金宇宁, 等. 食源性疾病食物链溯源快速检测方法综述[J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31(16): 2045–2048.
CHEN SL, HUO KY, JIN YN, *et al.* Review on rapid detection methods of food chain traceability of foodborne diseases [J]. Chin J Health Lab Technol, 2021, 31(16): 2045–2048.

[2] 蔡晶, 黄淑琼, 张鹏, 等. 2008–2018 年湖北省食物中毒事件流行特征分析[J]. 现代预防医学, 2020, 47(7): 1192–1196.
CAI J, HUANG SQ, ZHANG P, *et al.* Epidemiological characteristics of food poisoning events in Hubei, 2008–2018 [J]. Mod Prev Med, 2020, 47(7): 1192–1196.

[3] 都市现场综合央视新闻. 痛心! 黑龙江“酸汤子”中毒事件唯一幸存者去世, 已致 9 人死亡[EB/OL]. [2020-10-20]. <https://baijiahao.baidu.com/s?id=1681038575461358302&wfr=spider&for=pc> [2020-10-20].
Urban live comprehensive CCTV news. Heartache! The only survivor of the “sour soup” poisoning in Heilongjiang has died, causing 9 deaths. [EB/OL]. [2020-10-20]. <https://baijiahao.baidu.com/s?id=1681038575461358302&wfr=spider&for=pc> [2020-10-20].

[4] 高翔, 崔亚宁. 食品微生物检验技术研究进展[J]. 生物化工, 2020, 6(5): 170–172.
GAO X, CUN YN. Research progress of food microbiological in spection technology [J]. Biol Chem Eng, 2020, 6(5): 170–172.

[5] 王俊韵, 沈静雯, 陆利霞, 等. 食源性病原菌的富集与检测复合技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 348–355.
WANG JY, SHEN JW, LU LX, *et al.* Research progress of compound techniques for enrichment and detection of foodborne pathogens [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(11): 348–355.

[6] 王曦, 苏章庭, 李宏, 等. 平板计数法与纸片法检测食品微生物菌落总数的比较研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(16): 5489–5493.
WANG X, SU ZT, LI H, *et al.* Comparison of plate counting method with paper slice method for detecting total bacterial count in food [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(16): 5489–5493.

[7] 任璐瑶. 食品中沙门氏菌快速检测测试片培养基的开发[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
REN LY. Development of rapid test sheet culture medium for *Salmonella* detection in food [D]. Changchun: Jilin University, 2018.

[8] 郭登峰, 王羚佳, 舒晓梦, 等. 菌落总数测试卡用凝胶培养基和显色剂的优化[J]. 食品与机械, 2018, 34(3): 82–85, 145.
GUO DF, WANG LJ, SHU XM, *et al.* Optimization gelling medium and color developer for bacterial testing slip [J]. Food Mach, 2018, 34(3): 82–85, 145.

[9] 杭海英, 刘春春, 任丹丹. 流式细胞术的发展、应用及前景[J]. 中国生物工程杂志, 2019, 39(9): 68–83.
HANG HY, LIU CC, REN DD. Development, application and prospection of flow cytometry [J]. Chin Biotechnol, 2019, 39(9): 68–83.

[10] 梅仕良. 豆制品中菌落总数的流式细胞术检测研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2019.
MEI SL. Detection of total bacterial count in soybean products by flow cytometry [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2019.

[11] YU YRA, O’KOREN EG, HOTTEN DF, *et al.* A protocol for the comprehensive flow cytometric analysis of immune cells in normal and inflamed murine non-lymphoid tissues [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0150606.

[12] ZHU ZZ, ZHU XH, KONG FR, *et al.* Quantitatively determining the total bacterial count of raw goat milk using dielectric spectra [J]. J Dairy Sci, 2019, 102(9): 7895–7903.

[13] FARKA Z, JUÍK T, PASTUCHA M, *et al.* Rapid Immunosensing of *Salmonella typhimurium* using electrochemical impedance spectroscopy: The effect of sample treatment [J]. Electroanal, 2016, 28(28): 1–8.

[14] 郭立芸, 向杰, 谢鑫, 等. 腺嘌呤核苷三磷酸生物发光法快速检测短乳杆菌[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(18): 232–235.
GUO LY, XIANG J, XIE X, *et al.* Rapid detection of *Lactobacillus brevis* in beer with ATP bioluminescence [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(18): 232–235.

[15] 张志杰. 基于纳米探针与 ATP 发光技术的大肠杆菌快速检测方法研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2018.
ZHANG ZJ. Fast detection of *Escherichia coli* in food using nanoprobe and ATP bioluminescence technology [D]. Jinan: Shandong Normal University, 2018.

[16] 何鸿举, 蒋圣启, 王洋洋, 等. 在线近红外光谱系统快速检测整块鸡胸肉菌落总数含量[J]. 食品工业科技, 2020, 41(16): 232–237.
HE HJ, JIANG SQ, WANG YY, *et al.* Rapid detection of total viable count in whole chicken breast by an online near-infrared spectroscopy system [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, 41(16): 232–237.

[17] 何鸿举, 王魏, 王慧, 等. 基于近红外光谱技术的生鲜猪肉质量检测研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(10): 360–368.
HE HJ, WANG W, WANG H, *et al.* Research progresses on near-infrared spectroscopy for fresh pork quality assessment [J]. Sci Technol Food Ind, 2019, 40(10): 360–368.

[18] 刘斌, 王珺, 李可, 等. 傅里叶近红外光谱法快速检测 5 种常见的食源性致病菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(18): 6018–6021.
LIU B, WANG J, LI K, *et al.* Rapid detection of 5 common foodborne pathogens by Fourier near infrared spectroscopy [J]. J Food Saf Qual,

- 2019, 10(18): 6018–6021.
- [19] 赵楠, 刘强, 孙柯, 等. 高光谱成像技术快速预测鸡蛋液菌落总数[J]. 食品科学, 2019, 40(8): 262–269.
- ZHAO N, LIU Q, SUN K, *et al.* Rapid prediction of total viable count of bacteria in liquid egg using hyperspectral imaging technology [J]. Food Sci, 2019, 40(8): 262–269.
- [20] EADY M, PARK B. Unsupervised classification of individual foodborne bacteria from a mixture of bacteria cultures within a hyperspectral microscope image [J]. J Spectr Imag, 2018, 7(a6): 1–13.
- [21] HE HJ, SUN DW. Hyperspectral imaging technology for rapid detection of various microbial contaminants in agricultural and food products [J]. Trends Food Sci Technol, 2015, 46(1): 99–109.
- [22] 杨鸿博. 拉曼光谱预测牛肉中微生物的初步研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2020.
- YANG HB. Preliminary investigation of the use of raman spectroscopy to predict beef microbial counts [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2020.
- [23] LIU SS, LI HH, HASSAN MM, *et al.* Amplification of Raman spectra by gold nanorods combined with chemometrics for rapid classification of four *Pseudomonas* [J]. Int J Food Microbiol, 2019, 304(1): 58–67.
- [24] 熊苏玥, 米瑞芳, 陈曦, 等. 多重PCR同时检测食品中4种细菌与常见霉菌[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 305–311.
- XIONG SY, MI RF, CHEN X, *et al.* Multiplex PCR for simultaneous detection of four food-borne bacteria and common mold [J]. Food Sci, 2019, 40(4): 305–311.
- [25] 杨旭. 免疫磁分离-两重荧光定量 PCR 法快速检测鲜猪肉中金葡菌和志贺氏菌[J]. 食品安全导刊, 2017, 11(36): 108.
- YANG X. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and *Shigella* in fresh pork by immunomagnetic separation and double fluorescence quantitative PCR [J]. Chin Food Saf Magaz, 2017, 11(36): 108.
- [26] 朱海针, 谢卫华, 龙凯, 等. PCR-DGGE 技术研究淡豆豉炮制过程中微生物菌群的动态变化[J]. 中草药, 2017, 48(9): 1757–1765.
- ZHU HZ, XIE WH, LONG K, *et al.* Study on dynamic changing regularity of microflora in fermentation process of *Sojae semen* Praeparatum by PCR-DGGE [J]. J Tradit Chin Herb Drugs, 2017, 48(9): 1757–1765.
- [27] DU MH, LI JW, LIU QJ, *et al.* Rapid detection of trace *Salmonella* in milk using an effective pretreatment combined with droplet digital polymerase chain reaction [J]. Microbiol Res, 2021, 251: 126838.
- [28] LI H, SIMPSON DJ, GNZLE MG. Detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in food by droplet digital PCR to detect simultaneous virulence factors in a single genome [J]. Food Microbiol, 2020, 90: 103466.
- [29] 马艳琳, 徐振波, 刘君彦, 等. EMA-PCR 法快速检测啤酒中腐败短乳杆菌[J]. 食品科学, 2017, 38(8): 271–276.
- MA YL, XU ZB, LIU JY, *et al.* Development of an ethidium bromide monoazide-polymerase chain reaction assay for rapid detection of the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* [J]. Food Sci, 2017, 38(8): 271–276.
- [30] 纪顺师, 叶长芸. 四种单增李斯特菌常用核酸检测方法的评价与应用[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(12): 1085–1091, 1099.
- JI SS, YE CY. Evaluation and application of four nucleic acid detection methods for *Listeria monocytogenes* [J]. J Chin Zoonoses, 2019, 35(12): 1085–1091, 1099.
- [31] 岳紫馨, 梁玉林, 徐文文, 等. 基于环介导等温扩增技术快速检测阪崎肠杆菌[J]. 食品科技, 2020, 45(6): 366–371.
- YUE ZX, LIANG YL, XU WW, *et al.* Rapid detection of *Enterobacter sakazakii* based on loop-mediated isothermal amplification [J]. Food Sci Technol, 2020, 45(6): 366–371.
- [32] KAUR A, KAPIL A, ELANGOVAR R, *et al.* Highly-sensitive detection of *Salmonella typhi* in clinical blood samples by magnetic nanoparticle-based enrichment and in-situ measurement of isothermal amplification of nucleic acids [J]. PLoS One, 2018, 13(3): e0194817.
- [33] CHEN YT, CHENG N, XU YC, *et al.* Point-of-care and visual detection of *P. aeruginosa* and its toxin genes by multiple LAMP and lateral flow nucleic acid biosensor [J]. Biosens Bioelectron, 2016, 81(1): 317–323.
- [34] WANG HN, CONG F, ZENG FW, *et al.* Development of a real time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method (RT-LAMP) for detection of a novel swine acute diarrhea syndrome Coronavirus (SADS-CoV) [J]. J Virol Methods, 2018, 260(1): 45–48.
- [35] 宋春美, 朱政辉, 李建武, 等. 乳粉中阪崎肠杆菌污染检测试剂盒的研制[J]. 食品科学, 2016, 37(24): 233–238.
- SONG CM, ZHU ZH, LI JW, *et al.* Development of a test kit for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* contamination in milk powder [J]. Food Sci, 2016, 37(24): 233–238.
- [36] ZHANG Y, TAN WQ, ZHANG Y, *et al.* Ultrasensitive and selective detection of *Staphylococcus aureus* using a novel IgY-based colorimetric platform [J]. Biosens Bioelectron, 2019, 142: 111570.
- [37] TOMINAGA T. Rapid detection of total bacteria in foods using a poly-L-lysine-based lateral-flow assay [J]. J Microbiol Meth, 2021, 183: 106175.
- [38] MIN HJ, MINA HA, DEERING AJ, *et al.* Development of a smartphone-based lateral-flow imaging system using machine-learning classifiers for detection of *Salmonella* spp. [J]. J Microbiol Methods, 2021, 188: 106288.
- [39] 平洋, 谭静, 王晓瑞, 等. 免疫磁珠技术分离检测熟制食品中的蜡样芽孢杆菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(20): 6963–6967.
- PING Y, TAN J, WANG XR, *et al.* Separation and determination of *Bacillus cereus* in cooked foods by immunomagnetic beads technology [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(20): 6963–6967.
- [40] PORTANTI O, FEBO TD, LUCIANI M. Sviluppo e validazione di un antigene-capture ELISA basato su anticorpi monoclonali specificiper *Listeria monocytogenes* negli alimenti [J]. Vet Ital, 2011, 47(3): 271–280.
- [41] CHEN QM, LI YH, TAO TT, *et al.* Development and application of a sensitive, rapid, and reliable immunomagnetic separation-PCR detection method for *Cronobacter* spp. [J]. J Dairy Sci, 2017, 100(2): 961–969.
- [42] ABDELLATIF AL, FABIANA A, FLORIGIO L, *et al.* Label-free electrochemical sensor based on spore-imprinted polymer for *Bacillus cereus* spore detection [J]. Sens Actuat B-Chem, 2018, 276: 114–120.
- [43] WANG L, HUO XT, QI WZ, *et al.* Rapid and sensitive detection of *Salmonella typhimurium* using nickel nanowire bridge for electrochemical impedance amplification [J]. Talanta, 2020, 211: 120715.
- [44] SUAIFAN GA, ALHOGAIL S, ZOUROB M. Rapid and low-cost biosensor for the detection of *Staphylococcus aureus* [J]. Biosens Bioelectron, 2017, 90: 230–237.
- [45] 黄炎. 纳米材料标记的侧流层析生物传感器的设计 and 应用[D]. 北京: 北京科技大学, 2018.
- HUANG Y. Design and application of nanomaterial-based lateral flow strip biosensor [D]. Beijing: University of Science & Technology Beijing, 2018.
- [46] 杨涛. 基于纳米金的比色生物传感器的设计及检测核酸和细菌的研究[D]. 西安: 西北大学, 2020.
- YANG T. Design guideline of AuNPs-based colorimetric biosensor and research on detection of nucleic acid and bacteria [D]. Xi'an: Northwestern University, 2020.
- [47] ÖZLEM T, ISMAIL HB, ERHAN T. Comparison of sensing strategies in SPR biosensor for rapid and sensitive enumeration of bacteria [J]. Biosens Bioelectron, 2012, 37(1): 53–60.
- [48] AURA AM, D'AGATA R, SPOTO G. Ultrasensitive detection of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* genomic DNA by nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance imaging [J]. Chem Select, 2017, 2: 7024–7030.
- [49] YU XF, CHEN F, WANG RH, *et al.* Whole-bacterium SELEX of DNA aptamers for rapid detection of *E. coli* O157:H7 using a QCM sensor [J]. J Biotechnol, 2017, 266: 39–49.
- [50] 任佳丽, 马丽娜, 周超, 等. 压电声波传感器快速检测米粉中菌落总数[J]. 中国食品学报, 2012, 12(12): 137–142.
- REN JL, MA LN, ZHOU C, *et al.* Rapid determination of bacteria counts in rice noodles using piezoelectric bulk acoustic wave biosensors [J]. Chin J Food Sci, 2012, 12(12): 137–142.
- [51] NEHRA A, PANDEY K, SINGH KP, *et al.* Determination of *E. coli* by a graphene oxide-modified quartz crystal microbalance [J]. Anal Lett, 2017, 50(12): 1897–1911.

(责任编辑: 郑 丽 张晓寒)

作者简介



傅志丰, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检验技术。

E-mail: dsqhlh112@163.com