

生物发光检测法和国标法检测样品中活菌总数的比较研究

(广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广州 510070)

吴慧清 吴清平*

张菊梅 马永

摘要 采用生物发光法和传统的国标法检测了一个复杂的微生物系统(菌剂)中的活菌总数,通过ATP标准曲线换算成活体菌数的生物发光法,在小于30min的时间内得出菌剂样品中的活菌总数在 $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^{10}$ cfu/mL之间;而传统的国标法在合适条件下培养5d后得出样品中的活菌总数为 2.0×10^8 cfu/mL,两者结果相吻合,而生物发光法更简单、快速。

关键词 生物发光 国标法 活菌总数

Abstract: In this paper, the viable microorganisms of a complicated microbe system (the sample) were detected by two methods—bioluminescent detection and traditional GB method (National standard method). The result of bioluminescent detection with ATP standard plots was $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^{10}$ cfu/mL, it only needed less than 30 minutes. On the other hands, the number of viable microorganisms in the sample detected by traditional GB method after 5 days incubation was 2.1×10^8 cfu/mL. Compared with the two results, both of the two detection methods were consistent but the bioluminescent detection was more simple and rapid.

Key words: bioluminescent technique; national standard method; number of viable microorganisms

中图分类号: TS207.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2004)04-0134-03

目前,通用的国标法^[1]检测细菌总数需要2d,酵母和霉菌需3~5d,孢子经萌发后再培养需更长时间,在时间上难以满足在线检测的要求。对于难培养或不可培养的微生物,很难应用国标法来计算活菌总数,而生物发光法用于在线检测微生物含量有广泛的应用前景。本文采用生物发光法和国标法检测一个比较复杂的微生物系统的活菌总数,以便对这两种方法进行比较,从而探索生物发光法在活菌总数中应用的可行性。

收稿日期: 2003-10-20 * 通讯联系人

作者简介: 吴慧清(1968-),女,助理研究员,研究方向:微生物数量快速检测与试剂盒研究。

基金项目: 广东省重点攻关资助项目。

1 材料与方法

1.1 实验材料

样品为待检液体菌剂,可用于改善鱼塘的水质,用pH试纸测量pH为3.8,酸度较大。

1.2 培养基及培养温度^[2]

细菌培养 营养琼脂(LB), $36 \pm 1^\circ\text{C}$, $48 \pm 2\text{h}$;乳酸菌培养 MC培养基(用于乳酸菌培养),分别在 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 好氧和厌氧条件下培养5d;酵母菌培养 麦芽汁琼脂培养基, $25 \sim 28^\circ\text{C}$,好氧培养5d。

1.3 生物发光的材料与检测设备

萤光素酶 虫光素酶(FL,20mg/mL)(自产),用25mmol/L pH7.8 TRICINE缓冲液(TB)配制;生物发光底物 D-荧光素(Ln,0.5mg/mL)(自合成),用50mmol/L pH7.8 甘氨酸甘氨酸缓冲液(GB)配制;标准ATP Sigma产品,无菌超纯水配成一系列不同的浓度;ATP提取试剂 E-C,是以表面活性剂为基础的专利配方;生物发光仪 上海上立检测仪器厂。

1.4 生物发光检测程序

1.4.1 细胞内ATP的提取 取1mL菌剂,于8000r/min于室温下离心5min,吸去上清液,向菌泥中加ATP提取剂E-C 100 μL ,于室温下振荡作用2min后,加无菌超纯水至1mL刻度;保留菌剂,离心上清液做一些对照检测。

1.4.2 发光检测 100 μL 标准ATP溶液或上述ATP提取液加入发光体系中,将发光管立即置于生物发光仪中,记录1min内发出的光子数,发光体系为0.2mL FL+0.1mL ATP(或样品液)+60 μL Ln+0.64mL GB。

2 结果与分析

2.1 平板检测结果

取25mL菌剂,用225mL生理盐水进行一系列稀释,将不同稀释度的1mL菌剂吸到不同的培养基中,于相应的温度和培养条件下培养合适的时间,计算平板上的菌落数,结果见表1。

表1 平板培养结果

细菌种类	稀释度					平均活菌数 (cfu/mL)	备注
	10 ⁻¹	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷		
细菌	不可计	不可计	不可计	61, 52	4, 0	5.7×10 ⁶	LB, 48h
乳酸菌-1	不可计	不可计	不可计	146	/	1.5×10 ⁸	MC, 好氧, 5d
乳酸菌-2	不可计	不可计	不可计	68	/	6.8×10 ⁷	MC, 厌氧, 5d
酵母菌-1	不可计	不可计	3, 3	0, 0	/	3×10 ⁵	麦芽汁, 5d
酵母菌-2	不可计	不可计	不可计	50	/	5×10 ⁷	MC, 好氧, 5d
酵母菌-3	不可计	不可计	不可计	34	/	3.4×10 ⁷	MC, 厌氧, 5d

乳酸菌在好氧和厌氧培养情况下均能生长,但在好氧培养条件下长得较好,只计好氧培养的菌数;酵母菌在 MC 培养基和麦芽汁培养基上均能生长,且在好氧和厌氧条件下均能生长,但在 MC 琼脂平板上好氧条件下长得最多,因此只计在 MC 琼脂平板上好氧条件下的菌数,合计活菌总数为 2.0×10⁸cfu/mL。

2.2 生物发光法检测结果

2.2.1 生物发光的 ATP 标准曲线 往检测系统中加入不同浓度的 ATP 溶液,立即放入生物发光仪中检测发光值,结果见表 2。

表2 不同浓度的标准 ATP 发光值结果

所用[ATP]mol/L	系统中[ATP]mol/L	CP6S	CPM
CK	CK	31	315
10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	44	496
10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	215	1998
10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	1410	13577
10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	11719	119117
10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	172535	1670796

注:系统中所用荧光素为 7 号。

2.2.2 细化的 ATP 标准曲线 由于预备实验的发光值 CP6S 值约为 4000,为了详细计算提取液中的 ATP 浓度,必须做一个范围较小的 ATP 曲线。从上述 ATP 曲线中可知,大概范围在 10⁻⁷~10⁻⁶mol/L,因此,在此范围做一系列稀释,再进行发光测试,其结果见表 3。

表3 细化的标准 ATP 曲线的发光值结果

所用[ATP]mol/L	系统中[ATP]mol/L	CP6S	CPM
CK	CK	312	2973
2×10 ⁻⁷	2×10 ⁻⁸	1591	16028
5×10 ⁻⁷	5×10 ⁻⁸	3446	36500
6×10 ⁻⁷	6×10 ⁻⁸	4270	44938
1×10 ⁻⁶	1×10 ⁻⁷	8118	84005

注:系统中所用荧光素为 4 号,酶另配,因此 CK 值有所变化。

2.2.3 菌剂检测结果 如材料与方法中提取菌剂中

的 ATP,取菌剂 ATP 样品液和上清液各 100μL 加入发光体系中,在发光仪中检测发光值,结果见表 4。

菌剂提取液中的[ATP]平均为 6.0×10⁻⁷mol/L,而菌剂离心上清液加入发光系统中检测结果比对照还小,说明离心上清液对发光系统有抑制,这与所测 pH 为 3.8 左右是一致的。

2.2.4 生物发光法中活菌总数的计算 根据文献资料记载,每个细菌的 ATP 含量范围为 0.28×10⁻¹⁰~8.9×10⁻¹⁰μg,平均为 3×10⁻¹⁰μg^[3]。菌剂提取液中的[ATP]平均为 6.0×10⁻⁷mol/L,若全部以细菌计,经换算后菌剂中含细菌量为 1.153×10¹⁰~3.63×10⁹cfu/mL,平均为 1.076×10¹⁰cfu/mL。由于菌剂中不仅含有细菌,而且含有酵母菌和其它菌,酵母菌中 ATP 的含量通常是细菌中 ATP 含量的 100 倍左右^[4],因此,若全换算为酵母菌,则菌剂中活菌数为 1.153×10⁸~3.63×10⁷cfu/mL,平均为 1.076×10⁸cfu/mL。实际上菌剂中既有细菌,也有酵母,还有其它微生物,因此,菌剂中活菌总数应在 1.076×10⁸~1.076×10¹⁰cfu/mL 之间。

3 结果与讨论

传统的平板计数法经 5d 培养后得出菌剂中活菌总数为 2.0×10⁸cfu/mL(其中细菌为 1.5×10⁸cfu/mL,酵母等真菌总数为 0.5×10⁸cfu/mL)。生物发光法在不到 30min 的时间内可以得出菌剂中活菌总数在 1.076×10⁸~1.076×10¹⁰cfu/mL 之间的结论,生物发光法的结果与传统的国标法吻合,说明两者有较好的对应性。生物发光法给出一个结果范围,这与生物发光法所固有的特点有关,因其原理是检测 ATP,以此来换算,而 ATP 的含量与菌的种类、大小和细胞所处的生长周期有关,要克服这一固有缺点,还需进行进一步的分级分离工作,但不管怎么样,生物发光法能在很短的时间内给出一个较为确切的活菌数范围,这是传统的平板计数法所无法比拟的。另外,对于不可培养的微生物,生物发光法更具优越性。对于生物

表4 样品用生物发光法检出的发光值结果

样品名	CP6S	CPM	折算为系统中的[ATP](mol/L)	折算为菌剂提取液中的[ATP](mol/L)
菌剂 ATP 样品液 1	4248	44637	6.5×10 ⁻⁸	6.5×10 ⁻⁷
菌剂 ATP 样品液 2	3695	38348	5.5×10 ⁻⁸	5.5×10 ⁻⁷
菌剂离心上清液	25	238		
CK	312	2973		

注:所用荧光素酶和做细化曲线时一致。

(下转第 85 页)

高复原率无明显效果。可能是浓度低,溶液的渗透压也低,不足以把糊精分子扩散到番茄内部,仅在其表面堆积一层糊精。因此,当干燥后复水时,脱水番茄表面的糊精由于吸水而胀润,反而阻止了水向其内部的浸透,所以复原性并无改善;而麦芽糊精浓度达到20%时,复水番茄口感开始出现粘感,见表3。麦芽糊精浓度以15%为宜,不仅 K_b 值明显提高,而且口感鲜嫩。

表3 不同浓度的麦芽糊精液对新疆脱水番茄复水后口感的影响

糊精浓度(%)	口感
0	口感坚韧,有纤维感,无味
5	口感坚韧,有纤维感,无味
10	口感轻韧,有轻微纤维感,略有鲜味
15	口感柔嫩,无纤维感,有鲜味
20	口感柔嫩,略有粘感,有鲜味

2.2 麦芽糊精混合液对新疆脱水番茄复原性的影响

表4 新疆脱水番茄的预处理数据及对应的复水结果

处理方案	K_b (%)	R	W_g (%)	W_g (%)	r_m
1	35.29	4.68	94.10	21.75	0.71
2	36.15	4.74	94.30	25.27	0.80
3	39.97	4.65	94.25	33.10	0.88
4	29.05	4.76	94.80	14.80	0.60

新疆脱水番茄经不同方案(见表1)的麦芽糊精溶液处理后复原率见表4。由表4可知,脱水番茄经麦芽糊精溶液预处理, K_b 、 W_g 都有明显提高;逐步向麦芽糊精溶液中添加糖、盐,脱水番茄的 K_b 、 W_g 值增大。其中,3号方案(麦芽糊精:蔗糖:食盐=3:3:2,且糊精浓度为15%)处理后的新疆番茄,其 K_b 值分别高出1、2、4号方案13.3%、10.6%、37.6%, r_m 值分别高出1、2、4号方案23.9%、10.0%、46.7%,因此,3号方案处理效果较好。

2.3 含水率对新疆番茄复原率的影响

由干制品复原率计算公式可知,复原率的提高主要与复水比R和干制品复水前的含水率 W_g 有关。由表1、表4可知,麦芽糊精预处理对R值影响不大,而对 W_g 的数值有较大的影响。当干制品的含水率较高时,有利于复原率的提高。由于麦芽糊精持水性较高,虽然经其处理的脱水番茄含水率高于普通脱水番茄的含水率,但前者的水分活度一般不超过后者,仍具有较高的耐贮性。

2.4 麦芽糊精及其混合液处理后对新疆脱水番茄组织结构的影响

本试验采用亲水性较强的麦芽糊精,通过干制前的预处理工艺,使麦芽糊精分子渗入到新疆番茄组织中,在干燥过程中,由于渗入的糊精分子结构变化较缓慢,能阻止番茄组织急速收缩,因此可改善干燥时脱水番茄组织收缩的缺陷,尽可能保持番茄原有的组织状态。而当脱水番茄复水时,由于组织空隙内保存有亲水性的麦芽糊精,使水很容易渗透,这就是糊精处理后脱水番茄复原率提高的一个重要原因。

2.5 麦芽糊精处理对嫩度比的影响

嫩度比是衡量干制品复原性的一个重要指标,嫩度比以接近1时为佳,大于1时表明复水样品已开始变糊,而小于1时则变硬。本试验1、2、3、4号方案的嫩度比值分别为0.70、0.80、0.88、0.60,由此可知,麦芽糊精对新疆脱水番茄嫩度的改善有明显效果。

3 结论

3.1 麦芽糊精预处理能显著提高新疆脱水番茄的复原率,糊精浓度比为麦芽糊精:蔗糖:食盐=3:3:2的预处理方案能得到较佳复原率。

3.2 麦芽糊精分子渗入脱水番茄组织中既能阻止其在干燥时的收缩变硬,提高其外观品质,又能加速复原过程中水分渗透,从而提高其复原率。糊精处理浓度以15%为佳;加入糖、盐的麦芽糊精混合液可提高预处理渗透压及脱水番茄的含水率,从而既可提高脱水番茄的复原率,又可保证脱水番茄的耐贮性,是实际生产中适用的预处理工艺。

3.3 麦芽糊精预处理有利于新疆脱水番茄嫩度的改善。

参考文献:

- [1] 张敏.特种脱水蔬菜加工贮藏和复水专论[M].北京:科学出版社,1997.70~90.
- [2] 蒋彩虹,王利,梁智慧,等. β -环状糊精在脱水蔬菜应用中的研究[J].食品科学,2000,21(4):35~37.
- [3] 蒋继丰,吴红艳.麦芽糊精在食品中的应用[J].高师理科学刊,2002,22(3):72~74.
- [4] 黄立新,陈玲,温其标.麦芽糊精在食品中的应用[J].食品工业,1999(3):32.

(上接第135页)发光法,一方面因受检测灵敏度的限制,另一方面对酶的抑制剂敏感,因此当样品复杂或其中活菌数含量太低时需过滤或离心,一方面除去抑制剂,另一方面也将菌浓缩至可以检测的灵敏度范围。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家标准菌落总数测定,GB 4789.2~94.

- [2] 食品和动物饲料中嗜温乳酸菌计数的基本方法,ISO 15214:1998.
- [3] Chappelle, et al. United states patent. 4,385,113 May 24, 1983(Rapid, Quantitative determination of bacteria in water).
- [4] Sharpe, A N, Woodrow, M N JACKSON, A K. Adenosine triphosphate(ATP) levels in foods contaminated by bacteria[J]. Apple Bact, 1970, 33:758~767.