

微生物检测的快速方法与自动化

冯贻泽 梁超

(美国堪萨斯州立大学, 曼哈顿)

过去十五年间, 在下述地点召开了一系列关于微生物学快速方法及自动化的国际专题讨论会: 斯德哥尔摩(1973), 英国剑桥(1976), 华盛顿(1981), 西柏林(1984), 意大利佛罗伦萨(1987)。第六次会议将于1990年在芬兰赫尔辛基举行。部分会议的文献汇编, 已由下列编辑整理出版: Heden 和 Illeni^[1,2], Johnson 和 Newsom^[3], Tilton^[4], 和 Habermehl^[5]。Piereson 和 Stern 曾撰写一篇精彩的文献综述, 论述食物传染微生物及其毒素的快速测定方法^[6]。笔者从1981年开始, 每年在美国堪萨斯州立大学主办一次微生物学快速方法及自动化的国际性研讨会。第八届研讨会将于今年7月在美国堪萨斯州曼哈顿城举行。

上述专题讨论会及研讨会旨在全面研究任何检测、分离、鉴定及确认临床、食品、环境及工业样品中的微生物。在第六届国际生物腐蚀专题讨论会上, 笔者曾回顾总结了微生物测数、估计及鉴定快速方法的新发展^[7,8]。本文将介绍在这个领域的一些新动态。

(一) 常规操作微型化及诊断工具的发展

从1968年开始, 笔者对大量的微生物学常规实验方法进行了微型化^[9]。这些微型化方法已成功地应用于好气细菌的鉴定^[10-13]。Wilkins 和 Walke 以及 Wilkins 等人全面研究了厌氧细菌的概念和分离步骤^[14,15]。近来, 这些方法已成功地在本实验室中用于食物酵母菌的研究^[16-19]。现在, 这些方法正在试图推广到食物、霉菌的研究之中。

从商业角度来说, 大量的诊断工具, 譬如 API, Enterotube, R/B 系统, Minitex 系统,

MicroID 和 IDS 已经经过全面的鉴定^[20,21], 结果表明, 这些诊断工具和常规方法相比较, 具有90—95%的精确性。它们在临床诊断和食品微生物学中的实用性将愈来愈受到重视。最近, 一种称为 Spectrum 10 的新系统已经上市。它的准确性为 MicroID 及 API 系统的95—96%, 它对微生物属的准确性为93%, 对种的准确性为82%^[22]。

(二) 活细胞计数方法的改进

“标准平皿计数”(standard plate count)仍然是测定食品及环境中活菌的“标准”方法。但这种方法在操作和取得数据均颇费时间。现在已有一些新方法能提高“标准平皿计数法”的效率。旋转接种法(spiral plating method)是将液态样品涂抹到琼脂平皿表面。其原理是把液态样品螺旋式并不断稀释地接种到一个旋转的平皿中。这一系统在美国已被广泛采用^[23]。该系统的缺陷之一是当采用固体样品时, 接种管可能堵塞。为了克服这一不足, Konuma 和 Kurate 改良了 stomacher 袋, 即在袋中放置一过滤网以阻止固态粒子进入接种管^[24]。

等格法(Isogrid method)是用疏水性栅过滤样品, 然后把疏水性栅放置在相应的固体培养基中培养, 最后观察细菌、酵母或霉菌菌落。疏水性栅保证所有菌落都是正方形的, 从而便于人工或机械计数。这种方法已被成功地应用于许多食品的活菌计数^[25,26]。Lin 等研制的台盼蓝培养基, 使等格法能直接用于食物酵母菌的测定^[16]。

皿膜系统(pertrifilm SM system)和即用膜(Redigil), 都是对标准平皿测数的改良。皿

膜系统采用含脱水营养基质薄膜,液态样品(1ml)直接接种到薄膜上,经适宜条件下培养后便可计数。这种方法已经用于牛奶和鲜碎牛肉中好气微生物测定^[27,28]。本实验室的数据(表1)表明,皿膜系统与常规活菌测数方法之间的相关系数为0.99。“即用胶”系统具盛有无菌液体培养基的试管,把样品(譬如1ml食物样品)倾入该试管中,混匀后再将混合物倒入一个装有胶质的特殊培养皿中。混合物与胶质接触后便形成与琼脂相似的复合物,经培养后便可计数菌数。以上两种系统都是包装好的产品,用时不需灭菌。它们极适合做野外测定。作者实验室数据表明:“即用胶”与常规方法之间的相关性很好。目前,这种系统正在受到美国 AOAC 的鉴定。

另一种快速方法 DEFT,是利用紫外光显微镜来快速测定活菌数。首先用一特殊滤膜过滤样品,经吖啶橙染色后,用紫外光显微镜观察。活细胞呈橙色荧光,死细胞呈绿色荧光。Pittipher 及其同事深入地研究了这一技术,认为这种方法在测定牛奶样品时,可以与活细胞测数法相比较^[29-30]。

(三) 估计微生物数量新方法的发展

这一领域主要是利用新知识和新技术来估测微生物数量。所有生物都含有 ATP,当萤火虫酶系统和 ATP 接触时,就会发光。已有一些公司出品了利用生物发光原理的仪器。Littel 等人最近报道^[31],ATP 方法能够估计牛肉和鸡肉中 0.5 log 10 水平上的实际活菌数。肉类样品的可测下限为 5 × 10⁴ 菌落形成单位/克。Ward 等人^[32]发现,ATP 方法和常规方法在测定鱼肉样品时呈正相关。生物发光 ATP 测定方法,还成功地应用于酒类的质量管理中^[33]。

阻抗测定法原理是,当细菌生长时,其周围液体的电导发生变化。通过测定阻抗或电导变化,可以了解微生物的活动情况。Bactomatic 系统利用阻抗变化来测量许多样品中的微生物活动^[34]。Malthus Microbial Analyser 系统则是利用测定电导变化。Gibson 和 Ogden 采用这种方法研究了鱼肉的质量^[35]。目前,英国

表1 标准平皿测数法与皿膜法 (Petrifilm) 测定 虾、河鲈等的活菌数量的比较

样品	菌落形成单位/g	
	标准平皿法	皿膜法 (SM)
虾	1	2.1 × 10 ⁴
	2	9.3 × 10 ³
	3	1.5 × 10 ⁴
	4	4.4 × 10 ⁴
	5	2.0 × 10 ⁴
河鲈	1	1.4 × 10 ³
	2	5.4 × 10 ²
	3	8.0 × 10 ²
	4	5.0 × 10 ²
	5	1.0 × 10 ³
鳕	1	1.2 × 10 ²
	2	2.2 × 10 ²
	3	1.0 × 10 ⁴
	4	2.1 × 10 ⁴
	5	1.2 × 10 ⁴
牙鳕	1	3.0 × 10 ²
	2	5.8 × 10 ²
	3	1.2 × 10 ³
	4	5.4 × 10 ²
	5	8.8 × 10 ²

样品经无菌缓冲液稀释后在 stomacher 中磨碎 1 分钟,用标准方法测定活菌数。培养条件为 32℃, 48 小时。所有样品都做重复。两种方法之间的相关系数为 0.99。数据来源: Fung 等(1986)。

Malthus 仪器公司(位于 stoke-on-Trent)正在对这一系统做重大改进。

放射测量法 (Radiometric) 利用细菌在代谢碳水化合物时产生 CO₂ 的原理。把微量的放射性标记引入葡萄糖或其他糖类分子中,细菌生长时,糖被利用并放出含放射标记的 CO₂。有一种仪器 (Bactec) 可用来测定放射性 CO₂。放射量与菌数成正比。这一方法已用于测定食品中的细菌^[36,37]。Radiometric 方法在临床上应用效果很好,但目前还没有广泛的应用到其它的微生物学领域中。

微量量热法 (Microcalorimetry) 是利用细菌生长时产生热量的原理设计而成的。现已有能测定微小温度变化的仪器。Gram 和 So-gaard^[38] 最近用 Microcalorimetric 方法测定了碎肉样品。他们报道,在 10⁵—10⁸ 菌落形成单位/克范围之内,一种叫做 BioActivity moni-

tor 的仪器是测定菌落的有效工具。

鲎试剂测定法(Limulus Amoebocyte lysate method)是目前最灵敏的测定革兰氏阴性细菌细胞壁中内毒素(脂多糖)的方法。其原理是内毒素与鲎溶解物之间发生生化反应,一小时后形成一种胶状物。

另一种新方法是利用接触酶反应来估计食品中的菌数。由这一原理设计出的仪器被称为接触酶测定仪(catalasometer)。其原理是通过计算一个含有接触酶的纸盘(譬如来自一个细菌样品),在盛有 H_2O_2 的试管中的漂浮时间来估计菌数。接触酶与 H_2O_2 之间产生生化反应,放出氧气,后者使纸盘由试管底部浮到表面。当样品中接触酶含量高时(表明接触酶阳性细菌含量高),纸盘上浮的时间短(以秒计)。反之,如果接触酶的浓度低,纸盘上浮的时间长(以100秒至1000秒计)。如果没有接触酶,纸盘就不上浮。由于大多数商品化食品都是在好气条件下冷藏的,所以主要的腐败微生物是嗜冷性细菌。而大多数嗜冷性细菌是接触酶阳性,所以可以用接触酶反应水平来估计某些食品中的嗜冷性菌群。Wang 和 Fung 对食品微生物接触酶的意义作过详尽的综述^[39],认为采用接触酶反应作为鸡肉表面微生物量指标是可行的^[40]。图1表示菌数(*Micrococcus luteus*)与 Catalasometer 纸盘浮漂时间之间的关系。它们

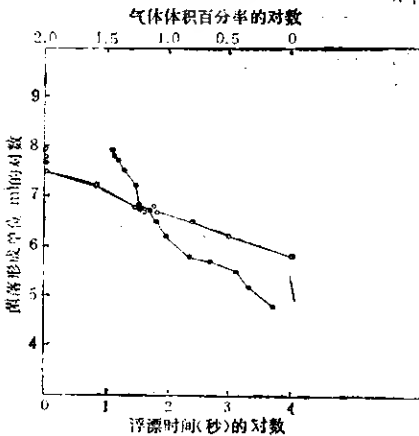


图1 接触酶测定法与气体体积法测定 *Micrococcus luteus* 中的接触酶活性

○—○ 气体体积百分率的对数
●—● 浮漂时间的对数

呈负相关(即菌数愈多,漂浮时间愈短)。这种细菌的最低测试灵敏度为 10^5 。当样品经过过滤之后,这个限制可以降低。在这张图上,还报道了一种更简单的气体体积法^[41]。虽然气体体积法不如接触酶测定仪灵敏,但其操作极为简单。结果表明,在毛细管中,接触酶含量愈高,气体体积愈大。如果没有接触酶,便无气体产生。

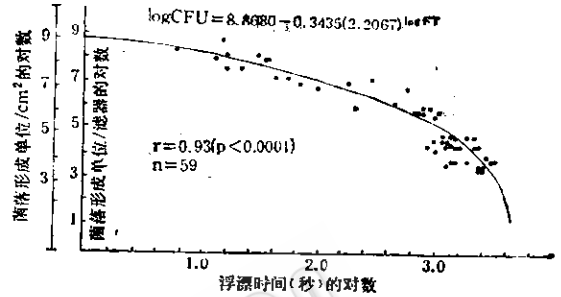


图2 接触酶测定仪测定经膜滤处理的冷藏鸡肉表面上嗜冷菌群的接触酶活性

图2为冷藏鸡肉表面嗜冷细菌数量与浮漂时间的关系。在这一研究中,样品经过过滤,培养基也被酸化。因为血液能干扰这一测定,而当培养基 pH 为 3.5 时,非细菌接触酶活性降到最低。由该图可知,浮漂时间少于 100 秒表明鸡肉表面细菌很多。当浮漂时间在 1000 秒之内 ($\log_{10} 3$ 秒) 曲线上呈现一个陡降,这说明在这一区域,人们可以通过反应鸡肉表面菌数的浮漂时间来确定食品的优劣。尽管接触酶测

表2 理想的微生物学自动化分析系统需要考虑的因素

1. 准确——灵敏性,最小可测下限;测试系统的专一性;多功能,潜在的应用与参照方法的比较
2. 快速——取得数据;每天、每次测定的样品数量
3. 成本——投资费用,每次测试耗费等
4. 可靠性——被科学界承认,被官方检测机构承认
5. 操作简单——样品的制备,仪器的操作,电脑的多用性
6. 人员训练——需多长时间才能上机操作,训练官员的质量要求
7. 试剂——试剂的准备,稳定性,可得性和一致性
8. 公司的名声
9. 技术服务——速度和可得性,技术实力,产品
10. 使用和场地要求

定仪还需要更多的研究和发展,但它的快速性将日益显出其诱人的吸引力。

(四) 利用复杂的仪器和步骤鉴定微生物

本文的基本目的是综述如何估计微生物数量。但值得提出的是,当今世界上,人们更迫切地希望有更好、更快的手段来鉴定临床、食品及环境中的微生物。现在已有一些很好的系统,如AMS系统(Vitek),DNA 探针(Gene-Trak),EIA(Organon Teknika),Salmonella One-Two测定(Biocontrol),蛋白质谱分析(AMBIS system)。这些系统和方法,可以几乎不需人工检索而直接鉴定出特定的微生物或病原菌。

现在,人们对上述观念和手段所提出的问题之一是:使用哪一种最合适?表2归纳了作者对理想的自动化微生物分析系统的观点。

简言之,本文概述了目前日益得到承认的在临床、食品和环境样品中估计生物量及微生物鉴定方法。微生物快速方法和自动化是一项方兴未艾的事业,因为应用微生物学家们将会不断寻求更灵敏,更有效和更可靠的方法去研究微生物。

参 考 文 献

- [1] Heden, C. G. and T. Illeni. (eds): Automation in Microbiology and Immunology, John Wiley and sons, New York. 1975.
- [2] Heden, C. G. and T. illeni. (eds): New Approaches to the Identification of Microorganisms, John Wiley and Sons, New York. 1975.
- [3] Johnson, H. H. and S. W. B. Newsom (eds): Rapid Methods and Automation in Microbiology, Learned Information Ltd. Oxford, 1976.
- [4] Filton, R. C. (ed): Rapid Methods and Automation in Microbiology, Amer. Soc. Microbiol. Washington. D. C., 1982.
- [5] Habermehl, K. O. (ed): Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology, Springer-Verlag, Berlin, 1985.
- [6] Pierson, M. D. and N. J. Stern (eds): Foodborne Microorganisms and Their Toxins: Developing Methodology, Marcel Dekker, Inc. New York, 1986.
- [7] Fung, D. Y. C. et al: Rapid methods and automated procedures for microbiological evaluation of sea food, In: Kramer, D. E. and J. Liston (ed). Seafood quality determination, Elsevier Sci. Publisher, Amsterdam, pp. 247—253, 1986.
- [8] Cox, N. A. et al: Rapid methods for the detection and identification of microorganisms in foods. Food

- Protection Technology, C. W. Felix, pp. 125—131. Lewis Pub., Chelsea, MI. 1987.
- [9] Fung, D. Y. C. and P. A. Hartman: Miniaturized microbiological techniques for rapid characterization of bacteria, In Heden, C. G. and T. Illeni (eds), New approaches to the identification of microorganisms, John Wiley and Sons, Inc. New York, pp. 347—370, 1975.
- [10] Fung, D. Y. C. and R. D. Miller: *Appl. Microbiol.*, 20: 527—528, 1970.
- [11] Fung, D. Y. C. and R. D. Miller: *J. Milk Food Technol.*, 35: 328—329, 1971.
- [12] Fung, D. Y. C. and R. D. Miller: *Appl. Microbiol.*, 25: 793—799, 1973.
- [13] Fung, D. Y. C. and M. Neimeic: *Lab Health Sci.*, 14: 273—278, 1977.
- [14] Wilkins, T. D. and C. B. Walker: *Appl. Microbiol.*, 30: 825—830, 1975.
- [15] Wilkins, T. D.: *Appl. Microbiol.*, 30: 831—837, 1975.
- [16] Lin, C. C. S. et al. *J. Microbiol.* 30: 1405—1407, 1984.
- [17] Lin, C. C. S. and D. Y. C. Fung: *J. Food Science*, 50: 241—244, 1985.
- [18] Lin, C. C. S. and D. Y. C. Fung: *CRC Press*, 14(4): 273—289, 1987.
- [19] Lin, C. S. and D. Y. C. Fung, *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 7(1): 1—16, 1987.
- [20] Cox, N. A. et al.: *J. Food Protect.*, 40: 866—872, 1977.
- [21] Fung, D. Y. C. and N. A. Cox: *J. Food Protect.*, 44: 877—880, 1981.
- [22] Cox, N. A. et al.: *J. Food Protect.*, 48: 76—79, 1985.
- [23] Schalkowsky, S.: Plating systems. In M. D. Pierson and N. J. Stern (eds), Foodborne microorganisms and their toxins; Developing methodology, Marcel Dekker, New York, 1966.
- [24] Konuma, H. A. and H. Kurata: *Appl. Environ. Microbiol.*, 44: 765—769, 1982.
- [25] Entis, P.: *Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66: 897—904, 1983.
- [26] Entis, P.: Membrane filtration systems. In Pierson, M. D. and N. J. Stern (eds), Foodborne microorganisms and their toxins: Developing Methodology. Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 91—106, 1986.
- [27] Ginn, R. E. et al.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69: 527—571, 1986.
- [28] Smith, L. B. et al.: *J. Food Protect.*, 48: 1044—1045, 1986.
- [29] Pettipher, G. L. et al.: *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 423—429, 1980.
- [30] Pettipher, G. L. and U. M. Rodrigues: *J. Appl. Bacteriol.*, 50: 157—166, 1980.
- [31] Littell, K. J.: *J. Food Protect.*, 49: 18—22, 1986.
- [32] Ward, D. R. et al.: *J. Food Protect.*, 49: 647—650, 1986.
- [33] Pavelka, R.: Use of a bioluminescence ATP assay in winery quality control, In Downing, D. L. and Y. D.

- Hang (eds), Rapid microbiological methods, New York Agr. Exp. Station, Cornell University, No. 60 p. 7, 1987.
- [34] Eden, R. and G. Eden, Impedance Microbiology, John Wiley and Sons, Inc. New York, 1985.
- [35] Gibsin, D. M. and I. D. Ognon: *J. Appl. Bacteriol.*, **49**: 12—18, 1980.
- [36] Limpi, R. A.: *Food Technol.*, **28**: 52—58, 1974.
- [37] Rowley, D. R. et al.: *J. Food Protect.*, **42**: 335—341, 1979.
- [38] Gram, L. and H. Sogaard: *J. Food Protect.*, **48**: 341—345, 1986.
- [39] Wang, G. I. J. and D. Y. C. Fung: *J. Food Safety*, **8**: 47—67, 1986.
- [40] Wang, G. I. J. and D. Y. C. Fung: *J. Food Science*, **51**: 1442—1444, 1986.
- [41] Fung, D. Y. C. et al.: Rapid methods in enumeration, estimation, and identification of microorganisms, In Biodeterioration VI. Barry, S. et al (eds), The Biodeterioration Society, U. K. pp. 433—438, 1986.