实时光电微生物法快速检测生鲜乳中的嗜冷菌

许振伟[1,2]，韩奕奕[1,2]，郑小平[1,2]，孟瑾[1,2]，邹明辉[1,2]，周众[1,2]，朱红[1,2]，高磊[1,2]
（1. 上海德诺产品检测有限公司，上海 200436）（2. 农业部食品质量监督检验测试中心(上海)，上海 200436）

摘要：对50份生鲜牛乳样品中的嗜冷菌同时采用实时光电微生物快速检测方法和平板计数法进行检测，分析比较两种检测方法所得的嗜冷菌检测数据。结果表明：采用嗜冷菌检测标准曲线：Lg CFU/mL= -0.417*DT+7.91的实时光电微生物法检测的嗜冷菌含量在2.3~3.7×10^6 CFU/mL，检出时间在3.2~18.1 h。采用平板计数法的检出结果范围在4.0~3.0×10^6 CFU/mL。当实时光电微生物检测方法的检出时间大于18 h时，样品检测结果均为未检出，此时平板计数法的检测结果均为<1 CFU/mL。实时光电微生物法检测结果对数值与平板计数法检测结果对数值的差值范围在-0.9~0.8，两者差值的绝对值均<1。采用实时光电微生物法和平板计数法两种检测方法的检测结果相当吻合，实时光电微生物法检测生鲜牛乳中嗜冷菌具有良好的适用性，可大大缩短检测时间，且方法准确、简便易行。

关键词：生鲜乳；嗜冷菌；实时光电微生物法；检测

文章篇号：1673-9078(2012)12-1792-1795

Enumeration of Psychrophilic Bacteria in Raw Milk by Rapid Real-time Optoelectronic Microbiological Method

XU Zhen-wei[1,2], HAN Yi-yi[1,2], ZHENG Xiao-ping[1,2], MENG Jin[1,2], ZOU Ming-hui[1,2]
ZHOU zhong[1,2], ZHU Hong[1,2], GAO Lei[1,2]
(1.Shang Hai Dts China Co., Ltd, Shanghai 200436, China) (2.The Ministry of Agriculture Food Quality Supervision and Inspection Center (Shanghai), Shanghai 200436, China)

Abstract: Psychrophilic bacteria from 50 raw milk samples were enumerated by rapid real-time optoelectronic microbiological method and aerobic plate counting method in the same time. Testing data of psychrophilic bacteria was assayed and compared deriving from the two detection methods. The results showed that counts of psychrophilic bacteria using standard curve: Lg CFU/mL= -0.417*DT+7.91 of rapid real-time optoelectronic microbiological method were 2.3~3.7×10^6 CFU/mL and the detection time was of 3.2 to 18.1 h. The result of aerobic plate counting was 2.3~3.7×10^6 CFU/mL. When the detection time of rapid real-time optoelectronic microbiological method was more than 18 h, the psychrophilic bacteria was not detected. Meanwhile the results of aerobic plate counting were <1 CFU/mL. The difference of logarithm of testing results between the two detection method was -0.9~0.8 with the absolute values of <1. The testing results from the two methods were quite consistent. These results indicated that using rapid real-time optoelectronic microbiological method to detect psychrophilic bacteria in raw milk had high applicability, greatly shorten the testing time, and the method was also accurate, simple and easy.

Key words: raw milk; psychrophilic bacteria; real-time optoelectronic microbiological method; detection

生鲜乳营养丰富，是乳制品生产的主要原料，同时也属于高风险性的食品原料，是微生物的良好培养基。嗜冷菌是一类在低温环境下存活，最高生长温度不超过 20 ℃，最适生长温度在 15 ℃，在 0 ℃仍可生长繁殖的微生物统称；绝大多数为革兰氏阴性菌，已鉴定的嗜冷菌属有假单胞菌、弧菌、无色杆菌、黄杆菌、嗜纤维菌和螺菌等[1,2]。

收稿日期：2012-07-17

基金项目：上海市科委项目(10DZ2292400、1002H120200)

作者简介：许振伟（1986-），男，助理工程师，硕士研究生，食品安全与质量控制研究

通讯作者：孟瑾

生鲜乳采用冷藏运输方式，嗜冷菌在生鲜乳低温冷藏过程中普遍存在，并大量繁殖。虽然这类微生物经巴氏杀菌或超高温灭菌可被杀死，但其产生的耐热蛋白酶和脂肪酶仍具有残留的酶活性，这些耐热酶在乳制品储藏流通过程中继续分解脂肪和蛋白质，从而影响乳制品质量安全。

国际乳品联合会的检测标准(IDF 标准)和我国现行的农业部检测标准（NY 标准）检测周期较长，达不到企业快速检测的要求。利用实时光电微生物法快速测定生鲜乳中嗜冷菌可以大大缩短检测时间，是一个即快速又准确的方法，适合工业化应用，同时对我国生鲜乳中嗜冷菌含量检测方法的建立、相关规范或

方法标准的建立具有实际的应用和指导意义，是保护企业和消费者权益的需要，也为有关职能部门的监控提供技术依据和保障。

1 材料与方法

1.1 实验材料

生鲜牛乳 50 份，采集于上海地区光明乳业各种不同规模牧场，冷藏运输 4 h 内运送到实验室。用于嗜冷菌-实时光电微生物方法和嗜冷菌-平板计数法两种方法的比较。

1.2 实验方法

1.2.1 嗜冷菌-实时光电微生物方法

1.2.1.1 实时光电微生物法检测原理

检测原理：实时光电微生物系列食品微生物快速分析仪是基于传统的培养基理论和染色技术，结合光电计数(OptoElectronic Counting Technology)和计算机技术进行微生物检测[3]。样品放入专门的培养基检测瓶中后，当微生物在培养瓶中生长时，会发生代谢产物改变培养基pH值或释放CO_2等生化反应，从而引起指示剂的颜色变化，使培养基的颜色发生变化，再反射到位于检测瓶底部的琼脂感应层上，同时利用光电检测仪器，每隔一定时间监测试剂瓶底部胶体栓的颜色变化，得到的光信号转换成电信号由计算机进行监测，可以随时监测了解微生物的生长繁殖情况，检测时间根据样品检测项目和含菌量而定[4,5]。

1.2.1.2 嗜冷菌-实时光电微生物检测方法标准曲线的建立

利用实时光电微生物检测系统的嗜冷菌检测方法和《NY/T 1331-2007 乳与乳制品中嗜冷菌、需氧芽孢及嗜热需氧芽孢数的测定》中嗜冷菌的平板计数方法，对不同污染程度的生鲜牛乳中的嗜冷菌同时进行检测、记录、采集平板计数有效的嗜冷菌菌落数和实时光电微生物检测系统的检测时间，获得大量有效的相关数据，并生成采用实时光电检测微生物系统建立检测生鲜牛乳中嗜冷菌的标准曲线。根据标准曲线进行定量测试，以实现利用实时光电微生物检测系统对生鲜牛乳中嗜冷菌的定量检测的目的。

通过大量实验建立实时光电微生物系统嗜冷菌检测的标准曲线：Lg CFU/mL = -0.417*DT + 7.91。式中：DT为实时光电微生物快速分析仪的检出时间，单位：h；Lg CFU/mL为检出时间DT时样品嗜冷菌数的对数值。

1.2.1.3 嗜冷菌-实时光电微生物法检测方法

摇匀生鲜牛乳样品，取1 mL生鲜牛乳样品加入到嗜冷菌-实时光电微生物检测专用培养瓶中，旋紧培养瓶盖子，上下倒置2次使样品和培养基充分混匀。轻微旋松培养瓶盖子，使培养过程中产生的气体及时逸出。将培养瓶放入实时光电微生物仪器培养箱中，使检测瓶底部光感区和光电检测仪器发射光源对应。

调节培养箱温度为21 ℃，选择嗜冷菌检测标准曲线：lg CFU/mL = -0.417*DT + 7.91。

1.2.2 嗜冷菌-平板计数法

嗜冷菌平板计数法参照《NY/T 1331-2007 乳与乳制品中嗜冷菌、需氧芽孢及嗜热需氧芽孢数的测定》方法进行[6]。

摇匀生鲜牛乳样品，无菌操作做成几个适当倍数的稀释液，选择三个适宜稀释度，各取1 mL分别加入无菌培养皿内，每皿内加入适量MPC琼脂培养基。6.5 ℃±0.5 ℃，培养10 d，菌落计数。

2 结果与分析

对上海地区的50份生鲜牛乳样品，同时通过嗜冷菌-实时光电微生物方法和嗜冷菌-平板计数法两种方法进行检测，分析比较嗜冷菌-实时光电微生物快速检测方法对生鲜乳中嗜冷菌检测的实用性，以及嗜冷菌检测标准曲线：Lg CFU/mL = -0.417*DT+7.91的适用性。50个样品的检测结果比较如表1所示。

从50个样品的检测结果来看，生鲜牛乳中嗜冷菌-实时光电微生物检测方法的检出时间范围在3.2~24.5 h，嗜冷菌菌数检出结果在$2.3\sim3.7\times10^6$ CFU/mL。生鲜牛乳中嗜冷菌-平板计数法的检出结果范围在$4.0\sim3.0\times10^6$ CFU/mL。其中8个生鲜牛乳样品使用实时光电微生物法检测嗜冷菌时的检测结果为未检出，使用平板计数法检测时检测结果为<1 CFU/mL。对50个生鲜牛乳样品嗜冷菌的检测结果取Log10，生鲜牛乳中嗜冷菌-实时光电微生物检测方法的检出结果范围在0~6.6 lg(CFU/mL)，平板计数法的检出结果范围在1~6.5 lg(CFU/mL)，实时光电微生物法检测结果对数值与平板计数法检测结果对数值的差值范围在-0.9~0.8，两者差值的绝对值均<1。

从50个生鲜牛乳的验证数据来看，生鲜牛乳中嗜冷菌采用实时光电微生物法和平板计数法两种检测方法的检测结果相当吻合，表明采用实时光电微生物法检测生鲜牛乳中嗜冷菌具有良好的适用性，建立的标准曲线：lg CFU/mL = -0.417*DT+7.91适用于实时光电微生物法检测生鲜牛乳中嗜冷菌。

表 1 生鲜牛乳中嗜冷菌-实时光电微生物方法和平板计数法的比较

Table 1 Comparison of psychrophilic bacteria in raw milk by real-time optoelectronic microbiological method and aerobic plate count method

样品序号	光电法检出时间 DT/h	光电法结果/(CFU/mL)	平板数法结果/(CFU/mL)	光电法结果对数值 lg (CFU/mL)	平板数法结果对数值 lg (CFU/mL)	光电法与平板法对数值的差值
1	4.9	7.2E+05	3.3E+05	5.9	5.5	0.4
2	9.8	6.5E+03	4.5E+03	3.8	3.7	0.1
3	6.9	1.1E+05	6.4E+05	5.0	5.8	-0.8
4	10.2	4.4E+03	3.6E+03	3.6	3.6	0.0
5	3.2	3.7E+06	1.2E+06	6.6	6.1	0.5
6	15.1	4.0E+01	5.0E+01	1.6	1.7	-0.1
7	9	1.4E+04	1.2E+04	4.1	4.1	0.0
8	11.9	8.7E+02	7.7E+02	2.9	2.9	0.0
9	10.6	3.0E+03	3.9E+03	3.5	3.6	-0.1
10	18.1	2.3E+00	4.0E+00	0.4	0.6	-0.2
11	6.2	2.1E+05	3.3E+04	5.3	4.5	0.8
12	15	4.4E+01	5.0E+01	1.6	1.7	-0.1
13	9.7	7.2E+03	1.1E+04	3.9	4.0	-0.1
14	10.3	4.0E+03	2.7E+04	3.6	4.4	-0.8
15	3.5	2.8E+06	3.0E+06	6.4	6.5	-0.1
16	8	3.7E+04	1.9E+05	4.6	5.3	-0.7
17	5.6	3.7E+05	2.9E+06	5.6	6.5	-0.9
18	9.6	7.9E+03	1.3E+04	3.9	4.1	-0.2
19	7.6	5.4E+04	1.2E+05	4.7	5.1	-0.4
20	7.9	4.0E+04	3.6E+04	4.6	4.6	0.0
21	9.5	8.7E+03	1.3E+04	3.9	4.1	-0.2
22	6.4	1.7E+05	3.9E+04	5.2	4.6	0.6
23	9	1.4E+04	5.5E+03	4.1	3.7	0.4
24	9.1	1.3E+04	3.5E+04	4.1	4.5	-0.4
25	5.6	3.7E+05	1.1E+06	5.6	6.0	-0.4
26	8.1	3.3E+04	5.5E+04	4.5	4.7	-0.2
27	5.3	4.9E+05	8.4E+04	5.7	4.9	0.8
28	9.4	9.6E+03	1.3E+04	4.0	4.1	-0.1
29	5	6.5E+05	1.5E+05	5.8	5.2	0.6
30	11.8	9.5E+02	1.0E+03	3.0	3.0	0.0
31	13.1	2.7E+02	3.0E+02	2.4	2.5	-0.1
32	20.5	ND	<1	0.0	0.0	0.0
33	13.5	1.9E+02	2.0E+02	2.3	2.3	0.0
34	9	1.4E+04	7.0E+03	4.1	3.8	0.3
35	9	1.4E+04	4.0E+03	4.1	3.6	0.5
36	18.8	ND	<1	0.0	0.0	0.0
37	14.2	9.5E+01	1.0E+02	2.0	2.0	0.0
38	23	ND	<1	0.0	0.0	0.0
39	22.6	ND	<1	0.0	0.0	0.0
40	8.2	3.0E+04	1.9E+04	4.5	4.3	0.2
41	21.5	ND	<1	0.0	0.0	0.0
42	22	ND	<1	0.0	0.0	0.0
43	21.5	ND	<1	0.0	0.0	0.0
44	7.9	4.0E+04	3.0E+04	4.6	4.5	0.1
45	10.4	3.7E+03	1.0E+03	3.6	3.0	0.6
46	24.5	ND	<1	0.0	0.0	0.0
47	7.7	4.9E+04	5.0E+04	4.7	4.7	0.0
48	13.4	2.1E+02	2.2E+02	2.3	2.3	0.0
49	5.5	4.0E+05	3.3E+05	5.6	5.5	0.1
50	9.5	8.7E+03	7.9E+03	3.9	3.9	0.0

注：“ND”代表未检出。

3 结论

3.1 生鲜牛乳中最常见的嗜冷菌为假单胞菌属(*pseudomonas spp.*)，特别是荧光假单胞菌(*pseudomonas fluorescens*)，荧光假单胞菌产生的脂肪酶在产品经过商业无菌热处理工艺后还能存活下来，荧光假单胞菌产生的蛋白酶是一种耐高温酶，水解牛乳中活性成分[7,8]。关于生鲜牛乳中嗜冷菌的检测方法研究诸多，如利用嗜冷菌产生的脂肪酶活性和菌数间的直接关系，间接测定嗜冷菌数[9]；3M细菌测试片法[10]；选择假单胞菌属特异性引物进行PCR扩增代表生鲜乳中的嗜冷菌，建立嗜冷菌快速PCR计数的方法[11]；目前利用现代技术研究出的检测方法应用而生，如：rDNA核酸序列、凝胶电泳[12]、肽核酸探针[13]、荧光标记物[14]等方法。这些方法所需设备和耗材成本高、操作专业性较强、更无法满足中小型企业的检测需要。

3.2 目前国际上嗜冷菌检测的标准方法是国际乳品联合会的检测标准(IDF标准)，IDF Standard101A中嗜冷菌数的检测方法为：在6.5 ℃条件下培养10 d计数[15]；IDF Standard 132A中嗜冷菌数的检测方法为：在21 ℃条件下培养25 h计数[16]。我国现行的用于生鲜乳及巴氏杀菌乳中嗜冷菌数的测定方法是《NY/T 1331-2007 乳与乳制品中嗜冷菌、需氧芽孢及嗜热需氧芽孢数的测定》此方法参照IDF Standard101A中嗜冷菌数的检测方法。这些标准方法的检测时间长，达不到企业快速检测的要求。而嗜冷菌-实时光电微生物检测方法的检测时间根据样品含菌量而定，样品含菌量越高，检测时间越短，检测系统的灵敏度为每25克样品中1个微生物，最高检测限为10^8 CFU/mL。根据嗜冷菌标准曲线：lg CFU/mL = -0.417*DT+7.91，从50个生鲜牛乳样品检测结果来看，样品含菌量在2.3~3.7×10^6 CFU/mL时，检出时间在3.2~18.1 h，当实时光电微生物检测方法的检出时间大于18 h时，样品检测结果均为未检出，此时采用平板计数法的检测结果均为<1 CFU/mL。因此，利用实时光电微生物检测方法检测生鲜牛乳中嗜冷菌可大大缩短检测时间，且方法准确。

3.3 嗜冷菌-实时光电微生物检测方法相对于传统检测方法和现代技术具有检测时间短、操作简单、可自动化操作、检测结果准确、监测数据可溯源和成本低、实用性强等特点，成为生鲜牛乳质量与安全监控的重要方法。

参考文献

[1] Morita R Y. Psychrophilic bacteria [J]. Bacteriol. Rev., 1975, 39: 144-167

[2] Ingram M. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms [J]. Ann. Inst. Pasteur Lille., 1965, 16: 111-118

[3] 张喆.Soleris微生物实时光电检测系统-微生物检测技术革命的产物[J]食品安全导刊,2008,4:44-45

[4] 于宝军.Soleris实时光电微生物快速检测系统[J].食品安全导报,2010,9:41-42

[5] 于宝军.Soleris微生物快速检测系统：专注微生物快速检测保障食品安全[J].2011,5:34-35

[6] NY/T 1331-2007,乳与乳制品中嗜冷菌、需氧芽孢及嗜热需氧芽孢数的测定[S].

[7] 于春宇,孙彦琴,余爱英,等.生乳中嗜冷菌的危害及其控制[J].河南畜牧兽医,2007,28(1):36-37

[8] 孙妍,母智深,邱承光.荧光假单胞菌蛋白酶水解牛乳的免疫活性研究[J].现代食品科技,2008,24(8):767-769

[9] 任静,张兰威.原料乳中嗜冷菌的检测[J].食品工业科技,2007,28(3):218-221

[10] 纪振杰,郭德军,王欣.原料乳中嗜冷菌数的检测方法的比较[J].乳业科学与技术,2007,124(3):131-132

[11] 关晶岩,赵新淮.原料乳样品中嗜冷菌快速PCR计数方法研究[J].食品工业,2009,5:63-65

[12] V Berchet, D Boulanger, A M Gounot. Use of gel electrophoresis for the study of enzymatic activities of cold-adapted bacteria [J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 40: 105-110

[13] Henrik Stender, Adam Broomer, Kenneth Oliveira, Heather Perry-O'Keefe. Rapid detection, identification, and enumeration of Pseudomonas aeruginosa in bottled water using peptide nucleic acid probes [J]. Journal of Microbiological Methods, 2000,42: 245-253

[14] M B Cassidy, K T Leung, H Lee, J T Trevors. A comparison of enumeration methods for culturable *pseudomonas fluorescens* cells marked with green fluorescent protein [J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 40: 135-145

[15] Enumeration of psychrotrophic microorganisms-colony count at 6.5 ℃. International Dairy Federation. Fed Int Laiterie-Int Dairy Fed Standard no.101A, Brussels, Belgium, 1991

[16] Estimation of numbers of psychrotrophic microorganisms (rapid colony count technique, 25 hours at 21 ℃). International Dairy Federation. Fed Int Laiterie-Int Dairy Fed Standard no. 132A, 1991