

# 流式细胞术检测单增李斯特菌与酿酒酵母

黄生权<sup>1</sup>, 付萌<sup>1</sup>, 唐青涛<sup>1</sup>, 黄韵<sup>2</sup>, 胡双芳<sup>2</sup>, 余以刚<sup>2</sup>, 肖性龙<sup>2</sup>

(1. 无限极(中国)有限公司, 广东江门 529156) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 为探讨流式细胞术对单增李斯特菌和酿酒酵母的活菌与热灭活菌的检出效果, 本文采用荧光染色试剂 SYTO-9 和碘化乙锭 (PI) 对单增李斯特菌和酿酒酵母的活菌与热灭活菌的细胞悬液进行染色, 采用流式细胞仪同时测量红色荧光与绿色荧光从而得出细胞悬液中的细菌和酵母的含量。结果表明经核酸荧光染料染色后, 再结合流式细胞术对细菌与酵母菌进行检测, 步骤简单、耗时短。该法不仅简化了测量步骤且分辨率高, 对单增李斯特菌和酿酒酵母均具有良好的检出结果, 能分辨同一体系中同一菌种的活细胞与热灭活细胞和同一体系中的细菌与酵母活细胞; 该法检出限低, 将单增李斯特菌稀释后, 最低检出限可达  $1.2 \times 10^4$  cells/mL, 将酿酒酵母稀释后, 最低检出限可达  $6 \times 10^3$  Cells/mL, 因此能大大缩短增菌时间或者避免繁复的增菌步骤。

**关键词:** 流式细胞术; 荧光; 李斯特菌; 酿酒酵母

文章编号: 1673-9078(2014)3-195-200

## Detection of *Saccharomyces cerevisiae* and *Listeria monocytogenes* by Flow Cytometry

HUANG Sheng-quan<sup>1</sup>, FU Meng<sup>1</sup>, TANG Qing-tao<sup>1</sup>, HUANG Yun<sup>2</sup>, HU Shuang-fang<sup>2</sup>, YU Yi-gang<sup>2</sup>,  
XIAO Xing-long<sup>2</sup>

(1. Infinitus (China) Co. Ltd., Jiangmen 529156, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The viable and heat-treated microorganisms such as *Listeria monocytogenes* and *Saccharomyces cerevisiae* were investigated in this study. They were stained by fluorescent staining reagents SYTO-9 and Propidium Iodide (PI) and then the red and green fluorescence signals were detected using flow cytometry to get the concentration of cells in samples. The results showed that flow cytometry was able to detect bacteria and yeast after the nucleic acid fluorescent staining. This method simplified the procedure for *L. monocytogenes* and *S. cerevisiae* detection, shortened the time of detection procedures, and also distinguished viable with heat-treated micrograms and viable bacteria with yeast in the same system. This method was capable of detecting as few as  $1.2 \times 10^4$  cells/mL *L. monocytogenes* and  $6 \times 10^3$  cells/mL *S. cerevisiae*. This improvement might shorten the time consuming of culture enrichment or simplify the process.

**Key words:** flow cytometry; fluorescent; *Listeria*; *Saccharomyces cerevisiae*

由于保健品原料中污染的微生物往往含量很低, 或在加工过程中受到损伤活性低, 给快速检测带来许多困难, 由此造成的漏检给保健品生产企业带来重大的经济损失与资源浪费<sup>[1]</sup>。如何快速准确的检出保健品原料中的腐败菌与致病菌是目前研究的热点之一。传统方法存在灵敏度不高、检测周期长、步骤繁琐等

收稿日期: 2013-11-14

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(31101279); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金新教师类资助课题(20110172120034); 华南理工大学中央高校基本科研业务费重点项目(2013ZZ068)

作者简介: 黄生权(1977-), 男, 博士, 高级工程师, 主要研究方向: 食品工程、食品营养与安全

通讯作者: 肖性龙(1977-), 男, 博士, 助理研究员, 主要研究方向: 食品安全与检测

缺点<sup>[2]</sup>已经不适应现代检测的快速灵敏、准确高效等需求。然而新型检测方法如基于免疫技术的检测方法和以 DNA 杂交为基础的探针、芯片等检测方法, 虽特异性高但一般需要进行繁复的增菌培养<sup>[3]</sup>; 以 DNA 扩增技术为基础的 PCR、多重 PCR 和 RT-PCR 等检测方法, 在核酸抽提与 PCR 扩增过程中容易偏差, 降低了精确度<sup>[4]</sup>。流式细胞术 (Flow Cytometry, FCM) 检出限低能避免繁复的增菌步骤和繁琐的核酸提取过程, 目前在血液学、病理学、临床检验等领域得到广泛应用<sup>[5]</sup>, 但将其应用于食品中食源性致病菌快速检测的研究还比较少。Herve Alexandre 等采用已知荧光标记的单链核酸特异性探针结合 FCM 技术对酒香酵母 (*Brettanomyces*) 浓度进行实时监控, 能在葡萄酒腐败变质前有效控制腐败酵母菌数<sup>[6]</sup>。王宁等对生乳

进行热处理,经荧光染料碘化丙锭染色后用FCM能快速检测生乳中热损伤的 *E.coli* 和 *S.aureus* [7]。Malacrino 等用FCM结合荧光染色的方法对葡萄酒中酵母菌进行检测,计数结果与平板计数法相关性高,对酵母最低检出限达  $10^{3.8}$ 。上述研究表明FCM对复杂的食品样品中的目标菌和热损伤菌具有良好的检出效果,且具有检出限低的优势,适应于保健品原料中微生物污染的检测要求。

保健品原料中常见的腐败菌和致病菌包括酵母菌与细菌,但FCM能否同时对酵母与细菌进行检测,对其热损伤菌能否检出尚未见报道。本实验中采用的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 广泛存在于食品中的腐败酵母菌 [9]; 单增李斯特菌 (*Listeria monoeytogenes*) 是食源性致病菌,被WHO列为食品四大致病菌之一 [10]。本文采用FCM技术鉴别同一体系中的酿酒酵母与单增李斯特菌,活菌与热损伤菌,同时测得其含量。探讨利用流式细胞仪快速检测保健品原料中可能出现的食源性致病菌和腐败菌的可行性,克服其他快速检测方法的不足。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 菌株与培养基

实验中所用菌种分别为 *Listeria monoeytogenes* (CMCC34761)、*Saccharomyces cerevisiae* (ATCC9763), 均为华南理工大学食品安全与检测中心保藏菌种。

LB (Luria-Bertani) 液体培养基: 蛋白胨 10 g/L、酵母浸粉 5 g/L、NaCl 10 g/L, 调 pH 至 7.0, 固体培养基加入 15 g/L 琼脂粉, 121 °C, 20 min 高压灭菌后使用。

YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) 液体培养基: 蛋白胨 20 g/L、酵母浸粉 10 g/L、葡萄糖 20 g/L, 固体培养基加入 15 g/L 琼脂粉, 121 °C, 20 min 高压灭菌后使用。

#### 1.1.2 主要试剂

SYTO-9 和 PI, 购自美国 Invitrogen 公司。

### 1.2 主要仪器

FA2004B 电子天平, 雷磁 PHS-3Cx 型 pH 计, 购自上海精密仪器科学有限公司; YXQ-LS-18S1 高压灭菌锅、SPX-250B 生化培养箱, 购自上海博讯实业有限公司; QL-866 旋涡振荡仪, 购自江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司; Guava EasyCyte 6-2L 流式细胞仪, 购自美国默克生物技术有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 菌株活化

用接种环沾取甘油管保存的 *L. monoeytogenes* 菌液, 在 LB 固体培养基上划线, 于 37 °C 培养 24 h。挑取单菌落接种于 LB 液体培养基, 37 °C 培养至对数生长期 ( $OD_{600} \approx 1.0$ ) 制成活化的种子液 [11]。用接种环沾取甘油管保存的 *S. cerevisiae* 菌液, 在 YPD 固体培养基上划线, 于 30 °C 培养 48 h。挑取单菌落接种于 YPD 液体培养基, 30 °C 培养至对数生长期 ( $OD_{600} \approx 2.0$ ) 制成活化的种子液 [12]。

#### 1.3.2 细胞悬液制备

将制好的种子液, 摇匀后取 1 mL 于 1.5 mL 离心管中, 此为活菌培养液。

热灭活菌的制备参考 Soejima 等 [13] 的研究方法。吸取 1 mL 处于对数期的细菌培养液于 1.5 mL 离心管中, 在沸水浴中处理 50 s 后立即置于冰上冷却, 吸取 100  $\mu$ L 涂布于 LB 固体培养基, 37 °C 培养 72 h 后未有菌落长出。通过该处理, 使细胞壁与细胞膜有不同程度损伤, 达到病菌受损的目的。通过上述操作, 则制成热灭活菌培养液。混合菌培养液为活菌培养液与热灭活菌培养液的等体积混合液。

取待测菌液 1 mL (待测菌液中细胞量约为  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  cells/mL), 8000 r/min 离心 2 min, 弃上清液, 用灭菌去离子水洗涤。重复上述操作, 离心弃上清后将细胞重悬至 0.5 mL 灭菌去离子水中, 用旋涡振荡仪混匀 2 min, 则制成待测活细胞悬液、热灭活细胞悬液和混合细胞悬液。

#### 1.3.3 平板计数

吸取 100  $\mu$ L 三个浓度梯度的 *L. monoeytogenes* 培养液涂布于 LB 固体培养基, 每个梯度做三个平行, 37 °C 培养 24 h 计数; 吸取 100  $\mu$ L 三个浓度梯度的 *S. cerevisiae* 培养液涂布于 YPD 固体培养基, 每个梯度做三个平行 30 °C 培养 48 h 计数。

#### 1.3.4 染色方法

实验中使用的染色剂为 SYTO-9 和 PI 两种核酸荧光染料。其中, SYTO-9 是一种能渗入具有完整细胞膜细胞内的小分子, 呈绿色荧光, PI 则是一种仅能渗入到细胞膜破损的菌体内且呈红色荧光的大分子, 并且与 SYTO-9 竞争核酸着染位点, 最终使得死菌被 PI 染色而活菌被 SYTO-9 染色, 经这两种试剂染色后, 发出绿色荧光的即为活菌, 而发出红色荧光的为死菌 [14]。

将含 SYTO-9 和 PI 两管染色剂分别以 3:1000 的比例用灭菌去离子水稀释, 实验时等比例混合或单独

使用<sup>[15]</sup>。在活细胞液中加入含 SYTO-9 荧光染料的溶液, 在热灭活细胞溶液中加入含 PI 荧光染料的溶液, 在混合细胞液中加入含等体积 SYTO-9 和 PI 荧光染料的溶液, 将待测细胞液与配好的染色剂按 1:1 的比例混合均匀后, 37 °C 避光负载 15 min 以保证染色均匀有效。利用 Guava EasyCyte 6-2L FCM 检测染色后活细胞悬液、热灭活细胞悬液和混合细胞悬液的颜色与绿色荧光强度, 绘制以绿色荧光和红色荧光为坐标的散点图。

### 1.3.5 FCM 分析

实验中采用由美国默克生物技术有限公司生产的 Guava EasyCyte 6-2L 流式细胞仪, 该系统使用六个参数 (4 个荧光色、2 个光散射) 可提供细胞绝对计数, 其中全固态激光器蓝色激光为 488 nm (40 mW)、红色激光为 640 nm (40 mW)。当细胞液柱内的细胞经过测量区时, 在激发光的照射下, 产生特异的荧光信号和非特异的前向角散射与侧向角散射信号, 荧光信号由 PMT 检测, 前向角散射由光电二极管检测。因此, 流式细胞仪可同时检测同一个细胞的至少三种参数, 前散射角 (forward scatter, FSC)、测散射角 (side scatter, SSC) 和荧光信号。荧光信号的种类与产生荧光的化学物质以及与特异荧光色素结合的化学物质有关, 90°侧散射光的大小与细胞内部的颗粒有关, 前向角散射光的强度与细胞的大小有关。使用流式细胞仪初步预估 2 种菌液中细胞含量, 根据细胞含量加入适量的染色剂, 上机测试, 约 1 min 既可得出检测结果。

### 1.3.6 数据分析

采用模块化软件 Incyto2.6 进行数据分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 细胞悬液中细胞量预估

将未添加荧光染料的待测细胞悬液上样检测, 由于细胞大小的影响光的散射, 通过筛选经过光路的颗粒大小去除细胞碎片等可得到细胞浓度, 稳定的液流推进装置使样本呈单列, 每个细胞以均等的时间依次通过激光照射区, 当细胞通过光路时, 受照射后产生散射光信号, 又分为前向散射光 (Forward scatter, FSC), 一般与细胞体积的大小呈正比; 侧向散射光 (Side scatter, SSC), 与细胞的颗粒度和复杂性有关。以单增李斯特菌为例, 如图 1 所示 R1 所标示的区域为细胞出现的区域。根据 FSC 与 SSC 散点图上设置的门可对细胞悬液中的细胞量进行预估, 其中单增李斯特菌活细胞悬液中细胞量为  $3.30 \times 10^6$  cells/mL, 热

灭活菌细胞悬液中细胞量为  $4.30 \times 10^6$  cells/mL; 酿酒酵母活细胞悬液中细胞量为  $8.70 \times 10^5$  cells/mL, 热灭活菌细胞悬液中细胞量为  $7.80 \times 10^5$  cells/mL。FCM 检测过程中, 浓度过低时会使得收集信号过低, 无法计数; 浓度过高时, 由于细胞不容易打散而粘附在一起而影响实验结果的准确性。据文献报道<sup>[7]</sup>, FCM 检出限大约在  $10^4 \sim 10^7$  cells/mL, 因此实验中所使用的细胞悬液均在可检出范围内。

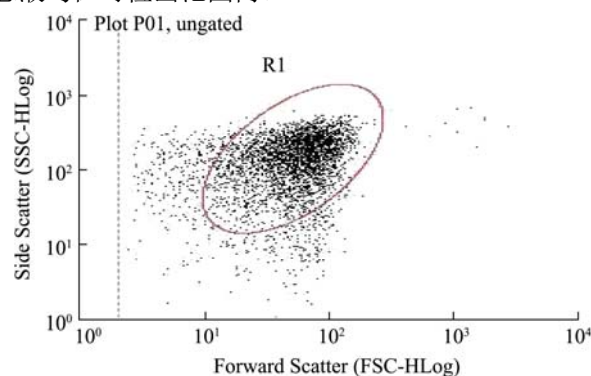


图 1 单增李斯特菌的散射光散点图

Fig.1 Plot of forward scatter versus side scatter of *L. monocytogenes*

### 2.2 单增李斯特菌的 FCM 检测结果

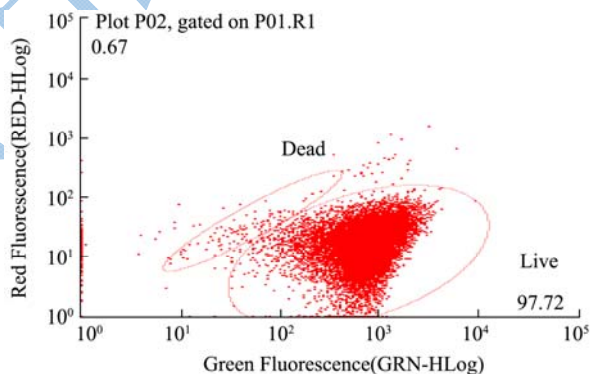


图 2 单增李斯特菌活细胞的荧光散点图

Fig.2 Plot of green fluorescence versus red fluorescence of viable *L. monocytogenes*

利用 Guava easyCyte 6-2L FCM 检测染色后活细胞菌液、热灭活细胞菌液中细胞量以及活细胞群与热灭活细胞群的分布区域并进行标记。结果表明, 采用 SYTO-9 和 PI 两种核酸荧光染料可以很好的区分单增李斯特菌细胞悬液中的活细胞与热灭活细胞, 由于 SYTO-9 进入活细胞呈绿色, 因此其分布在红色荧光强度低而绿色荧光强度较高的区域 (如图 2 所示), 而反之由于 PI 进入热灭活细胞呈红色, 因此其分布在红色荧光强度高而绿色荧光强度较低的区域 (如图 3 所示)。同时可得出悬液中细胞含量, 其中活菌样品中细胞量为  $1.30 \times 10^6$  cells/mL, 为所测总细胞量的 97.72%;

死菌样品中细胞量为  $0.85 \times 10^6$  cells/mL, 为所测总细胞量的 97.47%。由于染色后能有效去除细胞碎片对计数的影响, 因此细胞含量计数结果均比未进行染色时预估的细胞含量更低。

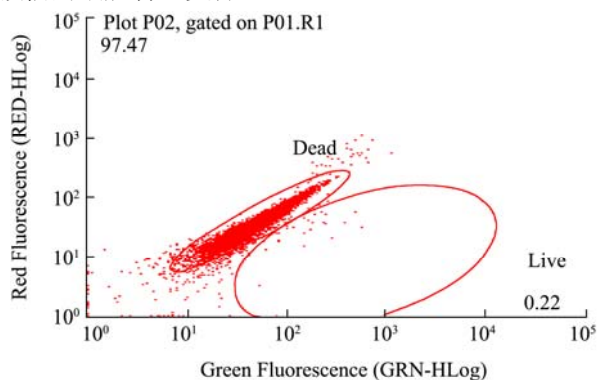


图3 单增李斯特菌热灭活细胞的荧光散点图

Fig.3 Plot of green fluorescence versus red fluorescence of heat-treated *L. monoeytogenes*

为研究 FCM 是否能同时检测单增李斯特菌的活细胞与热灭活细胞以获得其活性状态。将两者等体积混合, 同时将含 SYTO-9 和 PI 荧光染料的溶液等体积混合, 将待测细胞液与配好的染色剂按 1:1 的比例混合均匀后, 37 °C 避光负载 15 min 以保证染色均匀有效。经 FCM 检测, 结果表明可以通过荧光强度的不同而分开活细胞与热灭活细胞 (如图 4 所示)。活细胞与热灭活细胞等比例混合样品中细胞量为  $1.07 \times 10^6$  cells/mL, 混合后, 死亡率为 62.12% 和存活率为 36.98%, 基本为平均值, 符合理论值。

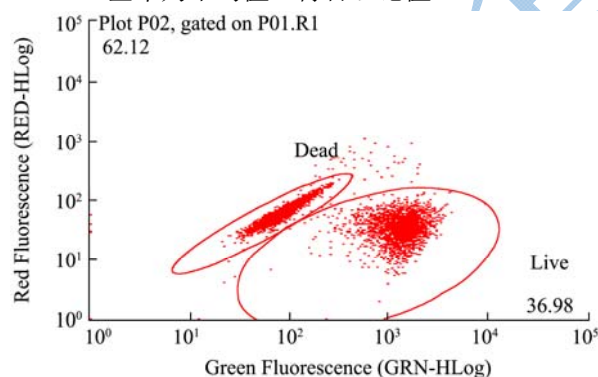


图4 单增李斯特菌活细胞与热灭活细胞混合液的荧光散点图

Fig.4 Plot of green fluorescence versus red fluorescence of viable and heat-treated *L. monoeytogenes*

将含活细胞的单增李斯特菌细胞悬液进行梯度稀释, 上机检测。结果如图 5 所示, 将李斯特菌稀释后, 最低检测限可达  $1.2 \times 10^4$  cells/mL, 而 ELISA 方法需要增菌后要达到  $10^5$  及以上才能检出<sup>[16]</sup>, 因此可能避免繁复的增菌步骤或者大大缩短增菌时间。

### 2.3 酿酒酵母菌的 FCM 检测结果

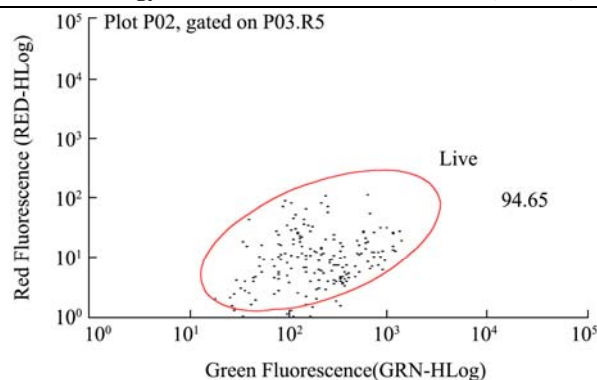


图5 低浓度的单增李斯特菌的荧光散点图

Fig.5 plot of green fluorescence versus red fluorescence of viable *L. monoeytogenes* in low concentration

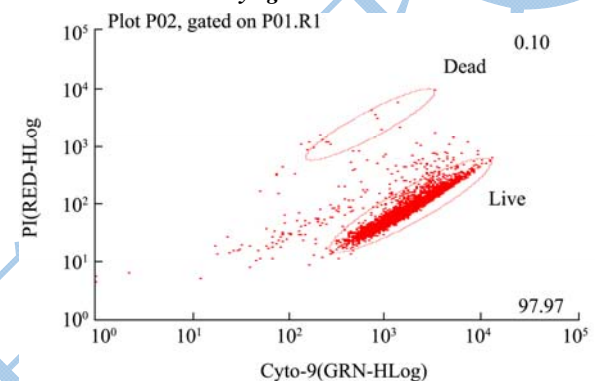


图6 酿酒酵母活细胞的荧光散点图

Fig.6 Plot of green fluorescence versus red fluorescence of viable *S. cerevisiae*

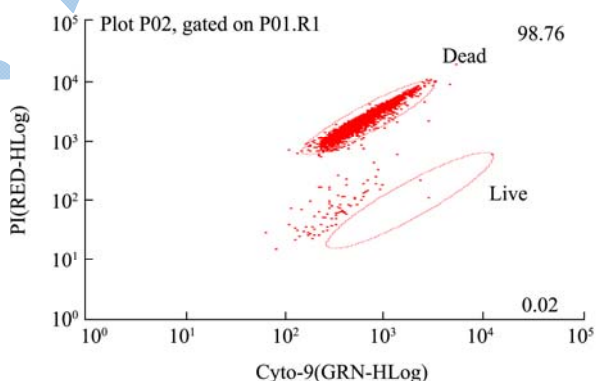


图7 酿酒酵母热灭活细胞的荧光散点图

Fig.7 Plot of green fluorescence versus red fluorescence of heat-treated *S. cerevisiae*

同样利用 Guava easyCyte 6-2L FCM 检测染色后活细胞菌液、热灭活细胞菌液中细胞量以及活细胞群与热灭活细胞群的分布区域并进行标记。结果表明, 采用 SYTO-9 和 PI 两种核酸荧光染料也可以很好的区分酿酒酵母细胞悬液中的活细胞与热灭活细胞, 由于 SYTO-9 进入活细胞呈绿色, 因此其分布在红色荧光强度低而绿色荧光强度较高的区域 (如图 6 所示), 而反之由于 PI 进入热灭活细胞呈红色, 因此其分布在红色荧光强度高而绿色荧光强度较低的区域 (如图 7 所

示)。同时可得出悬液中细胞含量,其中活菌样品中细胞量为  $0.84 \times 10^6$  cells/mL,为所测总细胞量的 97.97%;死菌样品中细胞量为  $1.09 \times 10^6$  cells/mL,为所测总细胞量的 98.76%。由于酿酒酵母存在出芽生殖方式,通过细胞大小预估细胞悬液中细胞含量的过程中可能将处在出芽生殖阶段的体积较大的酵母和粘附在一起未打散的酵母去除,因此预估细胞量比经染色后测得的细胞量低,因此以 SYTO-9 和 PI 两种核酸荧光染料染色可以有效防止酿酒酵母细胞由于粘附或出芽生殖导致的计数偏小的问题。

为研究 FCM 是否能同时检测酿酒酵母的活细胞与热灭活细胞以获得其活性状态。将两者等体积混合,同时将含 SYTO-9 和 PI 荧光染料的溶液等体积混合,将待测细胞液与配好的染色剂按 1:1 的比例混合均匀后,37 °C 避光负载 15 min 以保证染色均匀有效。经 FCM 检测,结果表明可以通过荧光强度的不同而分开活细胞与热灭活细胞。活细胞与热灭活细胞等比例混合样品中细胞量为  $0.86 \times 10^6$  cells/mL (如图 8 所示),混合后,死亡率为 43.01%和存活率 52.85%,为初始细胞液的平均值,符合理论值。

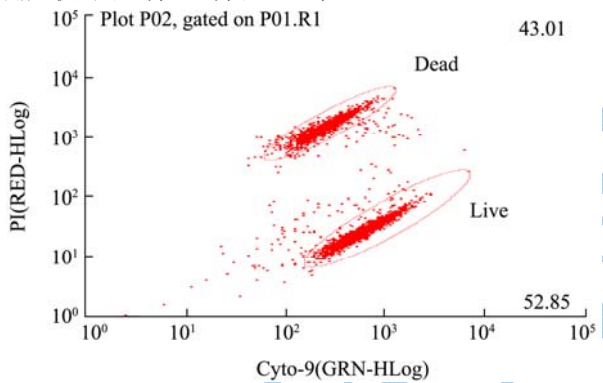


图 8 酿酒酵母活细胞与热灭活细胞混合液的荧光散点图  
Fig.8 Plot of green fluorescence versus red fluorescence of viable and heat-treated *S. cerevisiae*

为得到 FCM 对酿酒酵母的检出限,将含活细胞与热灭活细胞的酿酒酵母细胞悬液进行梯度稀释,上机检测。结果如图 9 所示,将酿酒酵母稀释后,可检测得到  $6 \times 10^3$  cells/mL,可达到  $10^3$  数量级,与 Malacrinò P<sup>[8]</sup>报道的结果一致。

#### 2.4 平板计数法验证

分别对 *L. monoeytogenes* 和 *S. cerevisiae* 的活菌样品按 1.3.3 的方法进行平板计数,并与 FCM 计数结果进行比较,结果如下表 1 所示。由表 1 可知,FCM 测量结果与平板计数法测量结果基本相符,且 FCM 能有效测量平板计数法无法测得的热灭活菌含量。

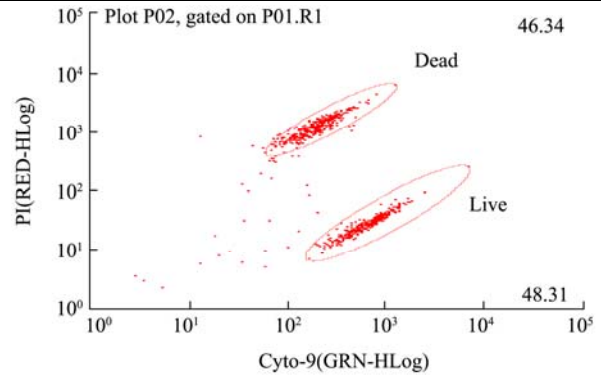


图 9 低浓度的酿酒酵母的荧光散点图

Fig.9 Plot of green fluorescence versus red fluorescence of viable *S. cerevisiae* in low concentration

表 1 FCM 与平板计数结果对比

Table 1 Results of FCM and Plate Counting

含量	<i>L. monoeytogenes</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
	FCM /(cells/mL)	PC /(cfu/mL)	FCM /(cells/mL)	PC /(cfu/mL)
活菌	$1.30 \times 10^6$	$1.68 \times 10^6$	$0.84 \times 10^6$	$0.95 \times 10^6$
热灭活菌	$0.85 \times 10^6$	<1	$1.09 \times 10^6$	<1

#### 2.5 细菌与酵母混合样品的鉴别

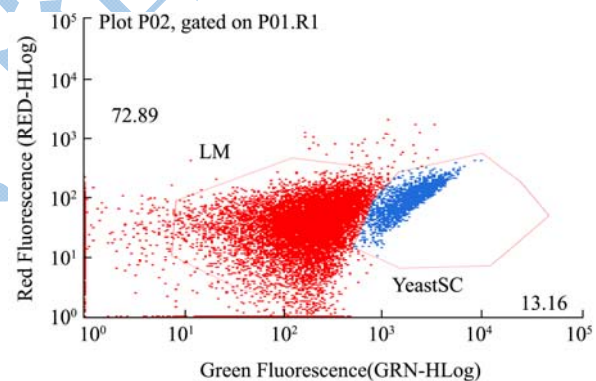


图 10 单增李斯特菌与酿酒酵母活细胞混合液的荧光散点图

Fig.10 Plot of green fluorescence versus red fluorescence of viable *L. monoeytogenes* and *S. cerevisiae*

为研究 FCM 是否能分辨同一样品中的单增李斯特菌与酿酒酵母,将单增李斯特菌和酿酒酵母的活细胞悬液混合后,将待测细胞液与含 SYTO-9 的荧光染料的溶液等体积混合,按 1:1 的比例混合均匀后,37 °C 避光负载 15 min 以保证染色均匀有效。进行检测,如图 10 所示为单增李斯特菌和酿酒酵母活细胞混合液的 FCM 荧光染色结果图,在图中能将李斯特菌和酿酒酵母区分开。

### 3 结论

#### 3.1 流式细胞术对食品中致病菌单增李斯特菌和腐

败菌酿酒酵母进行检测具有以下三个优点:

(1) 利用 SYTO-9 和 PI 两种核酸荧光染料染色后,再结合流式细胞术对细菌与酵母菌进行检测,步骤简单、耗时短。

(2) 检出限低,将单增李斯特菌稀释后,最低检出限可达  $1.2 \times 10^4$  cells/mL,将酿酒酵母稀释后,最低检出限可达  $6 \times 10^3$  cells/mL,因此能避免或者大大缩短繁复且耗时的增菌步骤。

(3) 分辨率较高,能有效分辨同一体系下的细菌总数以及活细胞与热灭活细胞的含量,有效防止酿酒酵母的休眠状态和单增李斯特菌的 VBNC 状态而造成的漏检;且能分辨在同一体系下的细菌和酵母菌,能同时对食品中细菌与酵母进行检测。

3.2 本文探讨了利用流式细胞仪快速检测保健品原料中可能出现的食源性致病菌和腐败菌的可行性,克服其他快速检测方法的不足,拓展了 FCM 在食品安全与检测中的应用范围。不足之处是实验中所使用的染料为通用性核酸染料,对目标菌的特异性不够,可寻找适合的染色剂最终实现流式细胞术检测食品中常见致病菌与腐败菌的高特异性与低检出限的兼得。

## 参考文献

- [1] 顾敦旺.HACCP 在灵芝类保健品生产中的应用[D].南京:南京农业大学,2010  
GU D W. Study on the application of HACCP system in the production of ganoderan [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010
- [2] Beverly J, Me Carbe sellers, Samuel E, et al. Food safety: Emerging trends in food Bomeillnes surveillance and Prevention [J]. Journal of the American Dietetic Association, 2004, 104: 1708-1717
- [3] Dwivedi HP, Jaykus LA. Detection of pathogens in food: the current state-of-the-art and future direction [J]. Crit. Rev. Micro. Boil., 2011, 37(1): 40-63
- [4] Yano A, Kaneko N, Ida H, et al. Real-time PCR for quantification of Streptococcusmutans mutans [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 217(1): 23-30
- [5] 李超,韩金路,王玉刚,等.流式细胞仪的工作原理及应用[J].中国实用医药,2009,4(20):235-236  
Li C, Han J L, Wang Y G, et al. The Principle of Flow Cytometer and its Application[J]. China Prac. Med., 2009, 4(20): 235-236
- [6] Virginie Serpaggi, Fabienne Remize, Anabelle Sequeira-Le Grand et al. Specific Identification and Quantification of the Spoilage Microorganism Brettanomyces in Wine by Flow Cytometry: A Useful Tool for Winemakers [J]. Cytometry Part A, 77A: 497-499, 2010
- [7] 王宁,刘宁.流式细胞术快速检测生乳中细菌总数[J].食品工业科技,2007,28(9):197-200  
Wang N, Liu N. FCM for Rapid Detection of total Bacteria in Raw Milk [J]. Science and Technology of Food Industry, 2007, 28(9): 197-200
- [8] Malacrinò P, Zapparoli G, Torriani S, et al. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry [J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, 45(2): 127-134
- [9] V H Tourmas, J H eeres, L Burgess. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices [J]. Food Microbiology, 2006, 23: 684-688
- [10] 严剑波,王虹玲,朱水荣,等.单增李斯特菌 LMAP 方法的建立[J].中国卫生检验杂志,2009,19(9):2048-2050  
YAN J B, WANG H L, ZHU S R, et al. Establishm ent of loop-mediated isothermal amplification technique for detection of Listeria monocytogene [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2009, 19(9): 2048-2050
- [11] 李聪聪,余以刚,邱杨,等.PMA-qPCR 方法快速检测活性 E. coli O157:H7[J].食品科学,2012,33(22):217-220  
LI C C, YU Y G, QIU Y, et al. Rapid Detection of Live E. coli O157: H7 by PMA-qPCR Method [J]. Food Science, 2012, 33(22): 217-220
- [12] 杨继旺,李琳,何春兰,等.荧光图像分析法进行酿酒酵母生长过程活力分析[J].中国酿造,2013,32(5):99-102  
YANG J W, LI L, HE C L, et al. Assessment of Saccharomy cescerevisiae vitality by fluorescence imaging analysis[J]. China Brewing, 2013, 32(5): 99-102
- [13] SOEJIMA T, IIDA K, QIN T. Method to detect only live bacteria during PCR [J]. Amplification Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(7): 2305-2313
- [14] 梁鹏,黄霞.利用 LIVE/DEAD Baclight 染色测定活性污泥中的活菌水平[J].环境化学,2007,26(5):598-601  
Liang P, Huang X. Assessment of Level of living bacterium in sludge by LIVE/DEAD Baclight staining [J]. Environmental Chemistry, 2007, 26(5): 598-601
- [15] LIVE/DEAD Baclight Bacterial Viability Kits. Product Information. 26. January, 2001 School of Birmingham, John Wiley & Sons, Inc. 2001
- [16] Cavaiuolo M, Paramithiotis S, Drosinos E H, et al. Development and optimization of an ELISA based method to detect Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157 in fresh vegetables [J]. Anal. Methods, 2013, 5(18): 4622-4627

现代食品科技