

实验技术与方法

ATP 荧光检测法快速筛查冷荤间加工现场凉拌菜的细菌污染状况

张尧, 邱金茹, 邓旭峰, 范丽欣, 张涛, 贾珉

(天津市卫生监督所, 天津 300070)

摘要:目的 探讨 ATP(adenosine triphosphate, 三磷酸腺苷) 荧光检测法检测冷荤间加工食品细菌总数的可行性, 为食品细菌污染现场快速检测提供科学依据。方法 从本市餐饮单位中随机抽取 20 家各类餐饮单位, 采集 4 大类 80 份菜品作为冷荤间加工食品检测样品, 分别应用 ATP 荧光检测法与实验室平板计数法检测细菌总数。结果 ATP 荧光检测法所得菌落数与实验室平板计数法检测菌落总数对比, 假阳性率 18.8%, 假阴性率 20.4%。结论 ATP 荧光检测法适用于冷荤间加工食品微生物的快速检测。

关键词: ATP 荧光检测法; 平板计数法; 细菌总数; 食品; 凉菜

中图分类号: R155.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)04-0377-03

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.04.018

Application of the ATP bioluminescence assay to screen bacterial contamination of cold dish

ZHANG Yao, DI Jin-ru, DENG Xu-feng, FAN Li-xin, ZHANG Tao, JIA Min

(Tianjin Health Inspection Bureau, Tianjin 300070, China)

Abstract: Objective To evaluate the feasibility of detecting bacterial contamination for cold dish by ATP bioluminescence assay, and to provide the scientific basis for food hygiene fast detection. **Methods** ATP bioluminescence assay and standard plate counting method were used respectively to detect 80 cold dish from 20 restaurants. **Results** Comparing with the standard plate counting method (cfu/g), the false positive rate of the ATP bioluminescence assay (cfu/g) was 18.8% and the false negative rate was 20.4%. **Conclusion** It was feasible for rapid preliminary test and evaluation of bacterial contamination by ATP bioluminescence assay at cold food institutions.

Key words: ATP bioluminescence assay; standard plate counting method; total bacteria; food; cold dishes

食品加工过程中受到致病微生物污染是造成食品安全事故的一个重要原因。针对菌落总数的检测, 国内外普遍采用的方法是平板计数法, 需要在 37 °C 下培养 48 h 后计数才能得到结果, 不适用于预防性现场处置^[1]。ATP 荧光检测法是近年兴起的一种即时、快速的现场检测方法, 可在 20 min 内得到结果。本研究通过对 ATP 荧光检测法与实验室平板计数法之间的相关性研究, 探讨 ATP 荧光检测法在冷荤间加工食品现场快速检测评价微生物污染的可行性。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

生化培养箱、便携式 ATP 荧光检测仪(精密度:

10^{-18} mol ATP, RSD < 3% ATP, 美国 Biotech)。普通营养琼脂培养基(北京陆桥技术有限责任公司)、266-112 微生物检测试剂盒(美国 Biotech)、营养琼脂(121 °C 高温高压灭菌)、灭菌蒸馏水。

1.2 方法

1.2.1 样品采集

随机抽取某市 20 家餐饮单位, 从其冷荤间用无菌采样袋(不含 ATP)采集蔬菜类、熟肉制品类、海产品类、豆制品类样品共 80 份(20 份/类)。

1.2.2 样品处理

使用洁净无菌袋现场采集样品, 无菌条件下 10 min 内称取样品 25 g, 加入 225 ml 无菌蒸馏水稀释, 边加边摇匀, 反复剧烈振荡 10 次, 静置 10 min。冷藏条件下运送至微生物实验室检测。

1.2.3 样品测定

实验室平板计数法: 按照 GB 47892—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》^[2] 要求, 固体检样在加入稀释液后, 置均质器中以 8 000 ~ 10 000 r/min 处理 1 min, 制成 1:10 的均匀稀释液。每份样品重复测量 2 次。

收稿日期: 2014-03-18

作者简介: 张尧 男 科员 研究方向为卫生监督现场快速检测

E-mail: wake_up@163.com

通讯作者: 贾珉 男 处长 研究方向为卫生监督现场快速检测

E-mail: jdsjiamin@163.com

ATP 荧光检测法检测:用无菌注射器取 10 ml 样液(静置后液体),依次把孔径为 5 和 0.45 μm 的无菌滤器连接在注射器上过滤,取 50 μl 调配好的体细胞消去剂于 0.45 μm 滤膜上,静置 10 min;取 50 μl 微生物细胞裂解剂于 0.45 μm 滤膜上;取 400 μl 调配好的荧光素试剂打入 0.45 μm 滤器,震荡混匀,测得 M1;取出滤器加入 10 μl 标准品,振荡混匀,测得 M2,仪器自动计算样品菌落总数(cfu/g),每份样品重复测量 2 次。

1.2.4 结果判定

GB 2711—2003《非发酵豆制品及面筋卫生标准》^[3]微生物指标规定,散装菌落总数 $\leq 100\ 000$ cfu/g。GB 2726—2005《熟肉制品卫生标准》^[4]微生物指标规定,菌落总数:烧烤肉、肴肉、肉灌肠 $\leq 50\ 000$ cfu/g;酱卤 $\leq 80\ 000$ cfu/g;熏煮火腿、其他熟肉制品 $\leq 30\ 000$ cfu/g;肉松、油酥肉松、肉松粉 $\leq 30\ 000$ cfu/g;肉干、肉脯、肉糜脯、其他肉干制品 $\leq 10\ 000$ cfu/g。符合标准要求为阴性,超过标准要求为阳性。

1.3 统计学分析

对两种检测方法的结果进行分析。以平板计数法为标准,评价 ATP 荧光检测不同菜品菌落总数准确度。

2 结果

根据回归方程计算 ATP 荧光检测结果对应的菌落总数,以平板计数法的结果作为参考,ATP 荧光检测法的准确性分析结果见表 1。超标数据计为阳性,合格结果计为阴性,相对于平板计数法,荧光法的灵敏度为 81.2%,特异度为 79.6%,约登指数为 0.608。可见,ATP 荧光检测法的准确性较好。

表 1 ATP 荧光检测法检测灵敏度及特异度结果分析

Table 1 Research of sensitivity and specificity by

ATP bioluminescence assay

样品类别	样品数/份	ATP 荧光法	平板计数法		合计
			阳性/份 (灵敏度/%)	阴性/份 (特异度/%)	
蔬菜类	20	阳性	2(100)	4	6
		阴性	0	14(77.7)	14
熟肉制品类	20	阳性	4(80)	4	8
		阴性	1	11(73.3)	12
豆制品类	20	阳性	3(75)	2	5
		阴性	1	14(87.5)	15
海产品类	20	阳性	4(80)	3	7
		阴性	1	12(80)	13
合计	80	阳性	13(81.2)	13	26
		阴性	3	51(79.6)	54

3 讨论

ATP 生物荧光检测法测定的原理是利用荧光素酶在镁离子、ATP、氧参与下,催化荧光素氧化脱

羧,产生激活态的氧化荧光素,在 560 nm 处产生荧光。在裂解液的作用下,细菌裂解后释放的 ATP 参与上述酶促反应,用荧光检测仪可定量测定发光值,此发光值与 ATP 含量成线性关系^[5-6],进而反映活体细菌的量。ATP 作为代谢作用的能量载体,存在于所有的动物、植物和微生物的活体细胞中^[7],当微生物死亡后,其体内的 ATP 会很快降解,不会对活体微生物的测量产生影响^[8]。对于一定生理时期内的活体微生物,其体内的 ATP 浓度基本稳定,使得 ATP 浓度与活体微生物的数量之间有良好的线性关系^[9-13]。本方法所用试剂带有 ATP 标准品,可以通过内标法消除干扰,且仪器通过计算可以直接以菌落总数作为检测结果。对比两种检测方法,对于单个样品,平板计数法需要经过稀释、匀质、培养、计数等环节,至少需要 48 小时以上才能得出结果,并且平板计数法环节过多,容易造成样品的污染。而 ATP 荧光检测法在 20 min 内即可得出结果,具有简便、快捷和避免二次污染的优点,目前该方法已广泛应用于食品、工业、医药、生物学等领域^[14]。

本研究结果显示,通过回归方程计算 ATP 荧光检测法对应的菌落总数,判断样品的合格率,此方法的灵敏度为 81.2%,特异度为 79.6%,假阳性率 18.8%,假阴性率 20.4%,约登指数为 0.608。说明 ATP 荧光检测法与平板计数法相比,准确度较好,适用于冷荤间菜品细菌污染的快速检测。

食品自身组织中的细胞释放的 ATP 是对检测结果的重要干扰项,因此样品前处理(包括过滤和消解)过程就显得十分重要。一旦食品中动植物细胞的 ATP 消解不彻底,就会造成检测结果偏高。同时,荧光法仅能反映食品中的细菌总数,但不能进行细菌菌属的确定,故这种方法只能为食品细菌污染的预防性处置工作提供数据支持,或作为一种筛查的手段,而不能作为致病菌污染的确证依据。

ATP 生物发光技术以测量萤火虫荧光素酶和荧光素反应产生的光的数量为基础,为广泛范围内的物质提供简单、快速、高灵敏度的分析方法。对于冷荤间菜品细菌污染的预防性检测,ATP 荧光检测法与实验室平板计数法之间存在较强的对数相关关系,并且在判断菜品是否存在细菌污染方面具有较高的准确性,可用于冷荤间食品细菌污染的现场快速检测。

参考文献

- [1] 杨笑鹤,郭森,杨昊,等. ATP 发光法在微菌含量样品测试中的集菌方式与测试方法的研究[J]. 生物医学工程研究, 2011,30(4):226-228.
- [2] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB

- 47892—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [3] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB 2711—2003《非发酵豆制品及面筋卫生标准》[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [4] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB 2726—2005《熟肉制品卫生标准》[S]. 北京:中国标准出版社,2005.
- [5] 连英姿,安静,李越,等. ATP 生物发光法快速测定生乳中细菌总数的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(4):839-840.
- [6] 黎新宇,高婷,杨鹏,等. 奥运食品检测与人群症状监测结果相关性研究[J]. 现代预防医学,2011,38(4):735-736.
- [7] 黄星奕,林建荣,赵杰文,等. 苹果果梗和缺陷的识别技术研究[J]. 江苏大学学报:自然科学版,2004,25(3):193-195.
- [8] 卜凡艳,韩剑众. 无损检测技术在食品品质检测中的应用[J]. 食品工业科技,2007,28(7):221-224.
- [9] 胥芳,张立彬,计时鸣,等. 基于介电特性的水果品质无损检测方法研究[J]. 浙江工业大学学报,2001,29(3):230-234.
- [10] 马妮,赵虹,张旭,等. ATP 发光技术快速检测食品中菌落总数[J]. 中国卫生工程学,2008,7(5):296-297.
- [11] 陈胤瑜,廖如燕,华志涛,等. 生物荧光检测法快速检测手污染细菌总数的评价[J]. 旅行医学科学,2011,6(2):12-19.
- [12] CHEN F C, Godwin S L. Comparison of a rapid ATP bioluminescence assay and standard plate count methods for assessing microbial contamination of consumers refrigerators [J]. Journal of Food Protection,2006,69(10):2534-2538.
- [13] 解立斌,黄健. 食品快速检测技术应用进展[J]. 国外医学卫生学分册,2007,34(3):193.
- [14] 王绍鑫,周艳琴,张帆,等. ATP 生物荧光法在传染病防治监督领域中的应用研究[J]. 中国消毒学杂志,2011,28(6):751-753.

· 法规文件 ·

农业部关于印发《2014 年国家农产品质量安全风险评估计划》的通知

国卫通〔2014〕3 号

各省、自治区、直辖市及计划单列市农业(农牧、农村经济)、畜牧兽医、农垦、渔业厅(局、委、办),新疆生产建设兵团农业局(水产局),各农业部农产品质量安全风险评估实验室(实验站)及相关单位:

从 2012 年开始,我部依法建立国家农产品质量安全风险评估制度,并按年度组织实施。依据 2014 年农产品质量安全监管工作的部署和安排,我部组织制订了《2014 年国家农产品质量安全风险评估计划》,现予印发。请各省级农业行政主管部门、农业部农产品质量安全风险评估实验室(实验站)及相关单位认真组织实施。在风险评估过程中如有意见和建议,请及时与我部农产品质量安全监管局联系。联系电话:(010)59192123、59193235。

- 附件:1. 2014 年国家蔬菜产品质量安全风险评估项目
 2. 2014 年国家果品质量安全风险评估项目
 3. 2014 年国家柑橘产品质量安全风险评估项目
 4. 2014 年国家茶叶质量安全风险评估项目
 5. 2014 年国家食用菌质量安全风险评估项目
 6. 2014 年国家粮油作物产品质量安全风险评估项目
 7. 2014 年国家畜禽产品质量安全风险评估项目
 8. 2014 年国家生鲜奶质量安全风险评估项目
 9. 2014 年国家水产品质量安全风险评估项目
 10. 2014 年国家特色农产品质量安全风险评估项目
 11. 2014 年国家农产品产地收贮运质量安全风险评估项目
 12. 2014 年国家农产品质量安全环境因子风险评估项目

(相关链接:http://www.moa.gov.cn/zwillm/tzgg/tz/201407/t20140714_3967896.htm)