

## PMA-qPCR 法检测冷冻基质中非可培养状态(VBNC) 副溶血性弧菌

黄新新<sup>1\*</sup> 杨娟<sup>1</sup> 郑江<sup>1</sup> 何宇平<sup>1</sup> 蔡强<sup>2</sup>

(1. 上海出入境检验检疫局动植物与食品检验检疫技术中心 上海 200135)

(2. 浙江清华长三角研究院 浙江 嘉兴 314006)

**摘要:**【背景】副溶血性弧菌为冰鲜产品及肉制品中常见的污染微生物,致病性强,危害严重,出入境运输及加工的肉食品常采取冷冻冷藏的处理手段来防止微生物污染及生长,以保持食物新鲜。而残留的部分副溶血性弧菌会进入活的非可培养状态(Viable but non-culturable state, VBNC),从而构成潜在的风险隐患。【目的】建立可用于冷冻食品中 VBNC 副溶血性弧菌的快速检测方法,并探讨其适用性。【方法】将大西洋鲑鱼 1:10 匀浆,加入终浓度为  $6.6 \times 10^5$  CFU/mL 的副溶血性弧菌,  $-20^\circ\text{C}$  分别诱导 10、20、30 和 50 d。建立实时荧光 PCR 技术(qPCR)方法,测定其特异性、灵敏度及稳定性。利用 PMA-qPCR 法对不同冷冻时期样品中的副溶血性弧菌进行检测,同时与 qPCR、平板培养法进行比较。【结果】建立的 qPCR 方法特异性好,与其他阴性参考株无交叉反应;灵敏度高,检测限为 19.8 CFU/mL;重复性好,  $C_q$  值的变异系数(CV)均在 1.5% 以下;标准曲线为  $y = -3.272x + 45.310$ , 线性回归系数  $R^2$  为 0.996, 定量范围为  $1 \times 10^2 - 1 \times 10^9$  CFU/mL。在低温诱导 10-50 d 后, qPCR 法的  $C_q$  值在 26.32-27.34 之间,与诱导前相比几乎没有变化;叠氮溴化丙锭(PMA)-qPCR 法的  $C_q$  值则从诱导前的 26.43 逐步上升到 38.84,呈现明显的上升趋势,表明死菌的数量在显著上升。经过比较及统计, PMA-qPCR 检测的活菌数均高于平板培养法测出的数量,差异显著( $P < 0.05$ )。【结论】PMA-qPCR 特异性及灵敏度高,能有效抑制对死菌的扩增,同时能克服传统平板培养法对 VBNC 的漏检缺陷,可方便、快捷地用于冷冻食品中受损致病微生物,尤其是进入 VBNC 状态的细菌检测。

**关键词:** 副溶血性弧菌, 冷冻食品, 非可培养状态(VBNC), 叠氮溴化丙锭-实时荧光 PCR 技术(PMA-qPCR)

**Foundation items:** Natural Science Foundation of Shanghai City (15ZR1414700); National Bureau of Quality Inspection Technology Project of China (2016IK221); National Key Joint Laboratory Open Fund of Tsinghua University (16K03ESPCT); National Important Project on Science Instrument of China (2012YQ15008705)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-38620560; E-mail: huangxinxin@shciq.gov.cn

**Received:** August 08, 2017; **Accepted:** November 02, 2017; **Published online** (www.cnki.net): November 10, 2017  
基金项目: 上海市自然科学基金(15ZR1414700); 国家质检总局科技项目(2016IK221); 清华大学重点联合实验室开放基金(16K03ESPCT); 国家重大科学仪器设备开发专项项目(2012YQ15008705)

\*通信作者: Tel: 86-21-38620560; E-mail: huangxinxin@shciq.gov.cn

收稿日期: 2017-08-08; 接受日期: 2017-11-02; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-11-10

## Propidium monoazide based real-time PCR to detect *Vibrio parahaemolyticus* in a viable but nonculturable state

HUANG Xin-Xin<sup>1\*</sup> YANG Juan<sup>1</sup> ZHENG Jiang<sup>1</sup> HE Yu-Ping<sup>1</sup> CAI Qiang<sup>2</sup>

(1. Technical Center for Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine, Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

(2. Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Jiaxing, Zhejiang 314006, China)

**Abstract:** [Background] *Vibrio parahaemolyticus*, which is highly pathogenic and harmful to public health, is a common contaminating microorganism in chilled food and meat products. To keep them fresh, imported and exported food are often refrigerated or frozen to prevent microorganism growth during transportation and machining. However, residual *V. parahaemolyticus* can enter a viable but non-culturable (VBNC) state, which poses potential risks. [Objective] This study aimed to establish a method to detect *V. parahaemolyticus* in a VBNC state in frozen food and to explore its applicability. [Methods] A solution containing *V. parahaemolyticus* was added to homogenized Atlantic salmon matrix to a final concentration of  $6.6 \times 10^5$  colony forming units (CFU)/mL. Aliquots of the mixture were induced for 10, 20, 30, and 50 days at  $-20^\circ\text{C}$ . A propidium monoazide (PMA)-based quantitative real-time PCR (qPCR) method was established to detect the *V. parahaemolyticus* in the samples of different frozen periods and compared with the results of qPCR and plate culture methods. [Results] The established PMA-qPCR method showed good specificity and no cross-reaction with other negative reference strains. The sensitivity of the method was also high and the quantitative limit was 19.8 CFU/mL. The variation coefficients (CV) of  $C_q$  values were all below 1.5%. The standard curve was  $y = -3.272x + 45.310$  and the linear regression coefficient,  $R^2$  was 0.996. The quantitative range was  $1 \times 10^2$  to  $1 \times 10^9$  CFU/mL. After the low temperature induction from 10–50 d, the  $C_q$  value of the qPCR method was between 26.32 and 27.34 which showed little change. However, the  $C_q$  value of the PMA-qPCR increased from 26.43 to 38.84, showing a significant increase in the number of dead bacteria. After comparison and statistical analyses, the number of live bacteria detected by PMA-qPCR was higher than that of plate culture, and the difference was significant ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] The established PMA-qPCR method had high specificity and sensitivity and could effectively inhibit the amplification of dead bacteria. It was also an effective and fast method to detect VBNC bacteria, which could overcome the limitations of the traditional plate culture method.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*, Frozen food, Viable but non-culturable (VBNC), PMA-qPCR

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, *V. parahaemolyticus*) 是一种革兰氏阴性嗜盐性细菌, 广泛分布于海洋和盐湖等环境中, 主要污染海鱼、贝类和虾等海产品, 可引起急性胃肠炎, 临床症状包括腹泻、呕吐、恶心、腹部绞痛、低烧、寒战等, 近 50% 以上的食物中毒由副溶血性弧菌引起, 它是一种重要的食源性致病菌<sup>[1]</sup>。上海作为全国重要口岸, 每年进口大量海产品, 尤其冰鲜类产品如大西洋鲑鱼、金枪鱼、海胆等, 副溶血性弧菌是这些海鲜产品的必检致病微生物。由于新鲜程度是产品质量的关键因素, 在海产品制备及运输过程中通

常采用冷冻冷藏等处理工艺手段。但部分病原菌在低温及消毒剂、防腐剂作用下, 可进入具有活性但不可培养状态<sup>[2-3]</sup>。处于非可培养状态 (Viable but non-culturable state, VBNC) 的病原菌丧失了传统培养基上生长繁殖的能力, 采用常规培养检测法无法检出, 但仍保留原有的致病性和毒力因子<sup>[4-5]</sup>。VBNC 状态作为病原菌抵御外界不良环境的存活机制, 仍具有代谢活性和转录性, 可在冷冻食品储存和输送过程中复活并大量繁殖, 从而引发严重的微生物安全风险, 威胁人体健康。据相关统计, 在检验不合格的冷冻食品中, 有害微生物的感染占了绝

大多数,因此微生物残留已成为食品冷冻过程中的最大安全隐患。建立冷冻食品储存和运输系统中 VBNC 病原菌监测体系及有效控制方法,对于保障食品安全具有重要的现实意义。

随着分子生物学的发展,实时荧光 PCR 技术(qPCR)应用于快速检测食品中副溶血性弧菌。虽然该方法具有耗时短、精确度高的优点,但只能检测食品中总的细菌数,无法区分活性菌和非活性菌<sup>[6]</sup>。叠氮溴化丙锭(Propidium monoazide, PMA)作为一种新型的核酸染料,可以透过受损细菌的细胞膜与 DNA 发生共价交联反应,在光照作用下使 DNA 构象发生改变,抑制后续的 PCR 反应,但不会对活菌 DNA 产生影响<sup>[7-11]</sup>。PMA-qPCR 法不仅能选择性地检测活性菌,而且还具有快速、特异性强、灵敏度高特点,能达到冰鲜类海产品的检测要求。本研究采取在冷冻环境中低温诱导三文鱼基质中的副溶血性弧菌使其进入 VBNC 状态,采用 PMA-qPCR 法来选择性检测不同冷冻时期副溶血性弧菌的数量,并与传统培养法比较,了解 VBNC 状态菌的动态,在此基础上探讨 PMA-qPCR 法应用于日常检测的适用性。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

副溶血性弧菌 ATCC 17802、溶藻弧菌 ATCC 33787、创伤弧菌 ATCC 27562、粪肠球菌 ATCC 49452、铜绿假单胞菌 ATCC 27853、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、大肠杆菌 ATCC 35218、迟缓爱德华氏菌 ATCC 15947 均购自上海汉尼生物技术有限公司;霍乱弧菌 VbO FSCC 232004 购自广东省食品安全工程技术研发中心。所有菌株-80 °C 保存于 10% (质量体积比)甘油肉汤中。

### 1.2 主要试剂和仪器

叠氮溴化丙锭(Propidium monoazide, PMA), 美国 Biotium 公司; TIANamp Bacteria DNA Kit, TIANGEN 公司; Premix ExTaq<sup>TM</sup>, 大连宝生物工程有限公司; 脑心浸液培养基、缓冲蛋白胨水、营养

肉汤、硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基, 北京陆桥技术有限责任公司; 弧菌显色培养基, 上海欣中生物工程有限公司; CFX96 Real-Time System, 美国 Bio-Rad 公司; PMA-Lite<sup>TM</sup> LED Photolysis Device, 美国 Biotium 公司; 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; ESCO 生物二级安全柜, 新加坡艺思高科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 菌种复苏

从甘油冻存管中取 100  $\mu$ L 菌液接种到 5 mL 脑心浸液培养肉汤中, 37 °C、150 r/min 振荡培养过夜。

#### 1.3.2 样品预处理及冷冻状态 VBNC 诱导

按照 GB4789.1-2010《食品安全国家标准食品微生物学检验总则》的有关规定进行样品采集。无菌采集 25 g 三文鱼样品置于 225 mL 缓冲蛋白胨水的均质袋中, 拍打均匀, 分装到无菌罐中。添加副溶血性弧菌至终浓度为  $6.6 \times 10^5$  CFU/mL, 放置于 -20 °C。10、20、30 和 50 d 后对取出样品解冻后立即进行检测。

#### 1.3.3 平板法检测细菌数

用无菌 PBS 对菌液进行 10 倍梯度稀释, 取稀释后的样品 1 mL 加入灭菌培养皿, 倒入 56 °C 恒温水浴的弧菌显色琼脂, 轻轻摇匀, 冷却后置生化培养箱, 37 °C 恒温倒置培养 24 h, 每个梯度做 3 个平行对照, 同时设 PBS 为空白对照。选取菌落数在 30-300 之间的平板进行菌落计数。

#### 1.3.4 PMA 反应

将 2.5  $\mu$ L 20 mmol/L PMA 加到 1 mL 待测样品中, 终浓度为 50  $\mu$ mol/L。上下混匀数次, 使样品与 PMA 染料充分接触, 避光反应 5 min。将 1.5 mL 离心管置于冰上, LED 灯照射 15 min, 距离 20 cm。反应结束后 8 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。

#### 1.3.5 细菌总 DNA 抽提

副溶血性弧菌及各参考菌株, 经 37 °C 培养过夜, 各取 1 mL 菌液置 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。用细菌基因组提取试剂盒抽提 DNA, -20 °C 保存备用。

### 1.3.6 实时荧光 PCR (qPCR)方法的建立

选取 GenBank 上已发表的副溶血弧菌 *tlh* 基因, 在 NCBI 中进行比对, 取保守序列, 利用 ABI Primer Express 3.0 软件设计引物及 TaqMan 探针, 大连宝生物工程有限公司合成与标记, 具体序列和探针标记见表 1。qPCR 反应体系: Premix ExTaq™ 12.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, 探针(10 μmol/L)各 1.0 μL, DNA 模板 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 10.0 μL。反应条件: 95 °C 20 s; 95 °C 3 s, 60 °C 30 s, 50 个循环。于 60 °C 进行 FAM 通道的荧光信号检测, 设立阴性及空白对照, 样品检测设 3 个复孔。

### 1.3.7 qPCR 特异性检测

用建立的 *tlh* 实时荧光 PCR 方法对副溶血性弧菌标准菌株——溶藻弧菌、霍乱弧菌、创伤弧菌、粪肠球菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、迟缓爱德华氏菌等参考菌株的 DNA 模板进行检测, 验证 qPCR 方法的特异性。

### 1.3.8 qPCR 灵敏度检测及标准曲线绘制

将培养过夜的副溶血性弧菌菌液充分混匀后, 用无菌 PBS 进行 10 倍梯度稀释, 参照 1.3.3 利用平板法检测副溶血性弧菌的数量, 选取菌落数在 30–300 之间的平板计数, 计算培养过夜菌液的浓度。取各稀释度的菌液 1 mL, 参照 1.3.5 提取 DNA 模板, 用建立的 *tlh* 实时荧光 PCR 方法检测, 记录结果。根据培养液浓度和 qPCR 的结果制作标准曲线, 并推算该方法检测的灵敏度。

### 1.3.9 qPCR 方法的重复性试验

根据灵敏度的结果, 选取不同稀释度副溶血性弧

菌的菌液模板进行 qPCR 检测, 每个稀释度平行重复 3 次, 通过对各次试验结果所得  $C_q$  值的平均值及变异系数 CV 进行分析来评价反应体系的稳定性。

### 1.4 数据统计

利用 Excel 数据分析软件计算 qPCR 方法重复性试验的变异系数 CV, 即标准偏差 SD 与平均值 Mean 的比值的百分数。当  $CV < 15\%$  时, 说明两组数据的离散度越低, 数据有效。采用 SPSS 软件对不同阶段样品中 PMA-qPCR 与常规 qPCR 的  $C_q$  值之间、PMA-qPCR 换算成细胞对应数后与培养法的检测结果之间的差异分别进行单因素方差分析。 $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 qPCR 法的特异性

用优化后的 qPCR 方法, 对标准副溶血性弧菌和阴性参考菌株溶藻弧菌、霍乱弧菌、创伤弧菌、粪肠球菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、迟缓爱德华氏菌进行检测。结果副溶血性弧菌出现相应针对 *tlh* 的特异性扩增曲线, 阴性参考菌株及灭菌双蒸水均没有荧光信号产生。结果表明所建立的 qPCR 方法的特异性好, 与其他阴性参考菌株无交叉反应(图 1)。

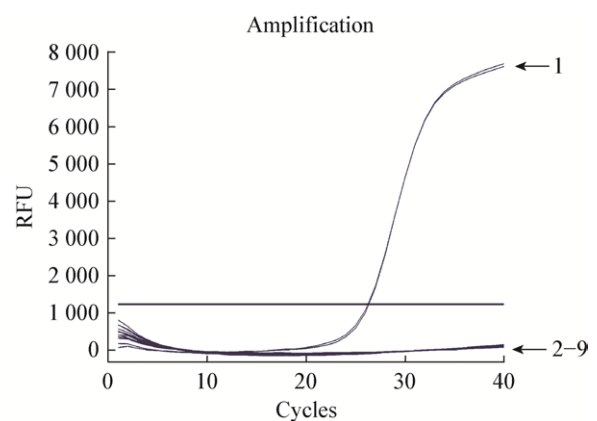


图 1 副溶血性弧菌 qPCR 特异性试验

Figure 1 The specificity test of qPCR for *V. parahaemolyticus*  
Note: 1: *V. parahaemolyticus*; 2: *V. alginolyticus*; 3: *V. cholerae*; 4: *V. vulnificus*; 5: *E. faecalis*; 6: *P. aeruginosa*; 7: *S. aureus*; 8: *E. coli*; 9: *E. tarda*.

表 1 副溶血性弧菌毒力因子 *tlh* 的引物和探针序列  
Table 1 Primers and probe sequences of virulence factors for *Vibrio parahaemolyticus*

引物名称	引物序列
Primers	Primers sequence (5'→3')
上游引物	GCAAGGTTACAACATCACGTTG
Forward primer	
下游引物	GATGAGCGTTGATGTCCAA
Reverse primer	
探针	FAM-CACGCCTTGTTTCGAGACGCTAACT-BHQ1
Probe	

## 2.2 qPCR 方法的灵敏度及标准曲线

根据平板计数结果,副溶血性弧菌过夜培养物的浓度为  $1.98 \times 10^9$  CFU/mL。将培养过夜的菌液 10 倍梯度稀释,提取基因组 DNA 进行实时荧光 PCR 检测,从左到右依次是  $1.98 \times 10^9 - 1.98 \times 10^1$  (图 2)。菌液浓度的对数值为横坐标,临界循环数  $C_q$  为纵坐标,建立 qPCR 的标准曲线(图 3)。标准曲线的线性回归方程为  $y = -3.272x + 45.310$ ,斜率为  $-3.272$ ,线性回归系数  $R^2$  为 0.996,PCR 扩增效率  $E$  为 102.1%,检测限为 19.8 CFU/mL。

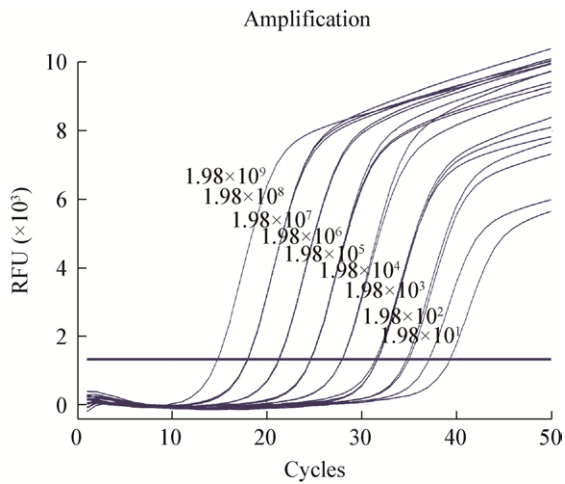


图 2 副溶血性弧菌 qPCR 灵敏性试验  
Figure 2 The sensitivity test of qPCR for *V. parahaemolyticus*

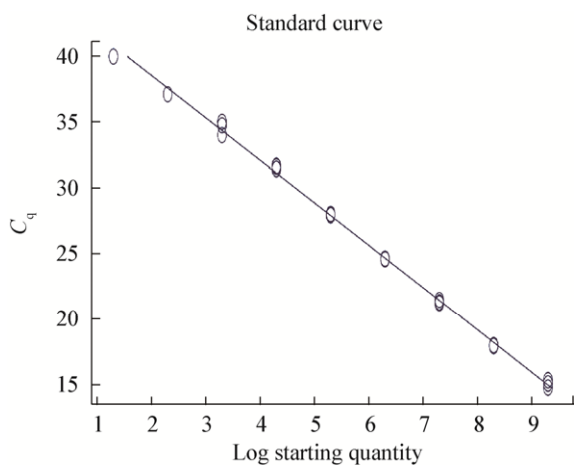


图 3 副溶血性弧菌 qPCR 的标准曲线  
Figure 3 The standard curve of qPCR for *V. parahaemolyticus*

## 2.3 qPCR 方法的重复性试验

将培养过夜的副溶血性弧菌悬液作 10 倍稀释成 6 个稀释度进行荧光定量 PCR 检测,每个稀释度做 3 个平行。结果显示根据 *tlh* 毒力基因建立的 qPCR 法的  $C_q$  值变异系数均在 2% 以下(表 2),说明建立的荧光定量 PCR 检测方法重复性好,结果稳定可靠。

## 2.4 PMA-qPCR 检测不同阶段冷冻基质中副溶血性弧菌

利用常规 qPCR 和 PMA-qPCR 法对不同冷冻阶段样品中副溶血性弧菌进行检测(图 4)。结果显示,qPCR 检测副溶血性弧菌各个冷冻阶段的  $C_q$  值分别为  $26.57 \pm 0.23$ 、 $26.35 \pm 0.09$ 、 $26.55 \pm 0.15$  和  $27.34 \pm 0.09$ ,与冷冻前(0 d)的  $C_q$  值  $26.32 \pm 0.04$  相比

表 2 qPCR 检测副溶血性弧菌的重复性试验  
Table 2 The reproducibility test of qPCR for *V. parahaemolyticus*

稀释度 Dilution	$C_q$			平均值 Mean	CV (%)
	1	2	3		
$10^{-1}$	17.99	17.93	17.91	17.94	0.23
$10^{-2}$	21.46	21.21	21.28	21.32	0.61
$10^{-3}$	24.57	24.62	24.61	24.60	0.11
$10^{-4}$	27.91	27.95	28.02	27.96	0.20
$10^{-5}$	31.60	31.66	31.42	31.56	0.40
$10^{-6}$	34.99	34.74	34.00	34.58	1.49

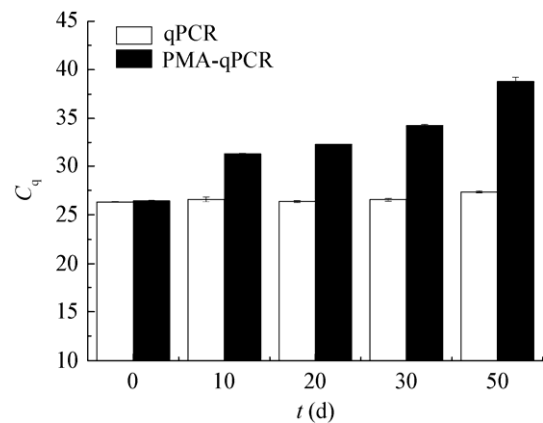


图 4 不同阶段副溶血性弧菌的 qPCR 和 PMA-qPCR 的  $C_q$  值  
Figure 4 The  $C_q$  of *V. parahaemolyticus* in different stages by qPCR and PMA-qPCR

没有明显变化,而 PMA-qPCR 检测的各阶段  $C_q$  值则在 10 d 后由冷冻前的  $26.43 \pm 0.05$  很快变为  $31.24 \pm 0.06$ 、 $32.32 \pm 0.03$ 、 $34.25 \pm 0.12$  和  $38.84 \pm 0.36$ ,数值呈明显增加趋势;同一冷冻阶段 PMA-qPCR 检测的  $C_q$  值也均高于 qPCR 检测的结果,且两者之间的  $C_q$  值差异显著( $P < 0.05$ )。说明随着时间的延长,冷冻样品中存留的活菌数量明显减少,用常规的 qPCR 方法不能有效地追踪及检测。

### 2.5 培养法与 PMA-qPCR 法对不同冷冻阶段样品中副溶血性弧菌检测的比较

根据标准曲线及 PMA-qPCR 的结果计算出对应阶段样品中的副溶血性弧菌的数目,同时利用传统的平板计数法测定不同阶段中的目标菌数目(表 3)。PMA-qPCR 法检测 4 个阶段活性菌的数量分别为  $19\ 981 \pm 852$ 、 $9\ 335 \pm 197$ 、 $2\ 400 \pm 214$  和  $96 \pm 25$  CFU/mL。平板计数法计算出 4 个阶段样品中可培养的细菌数分别为  $7\ 866 \pm 251$ 、 $1\ 933 \pm 57$ 、 $306 \pm 41$  和 0 CFU/mL。PMA-qPCR 法与培养法的检测结果之间具有显著的差异性( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论与结论

病原菌的活性一般是指在含有营养物质培养基上进行细胞增殖并且形成菌落的能力<sup>[12]</sup>。然而,VBNC 病原菌的发现及其引发的食品安全风险使这一传统定义受到质疑<sup>[13]</sup>。目前,科学界已经提出基于病原菌不同生理特性和分子生物学特征的活性评价标准,包括可培养性(Culturability)、可转录性(Transcript ability)、代谢活性(Metabolic ability)以及细胞膜完整性(Membrane integrity)等。基于代谢活性的染料法结合流式细胞分析技术在快速检测和分选染

色后的活性菌和非活性菌方面显示出优势,但该方法局限性是不能特异性地检测复杂环境样品中某一种病原菌。而将叠氮类染料与分子生物学方法相结合,便可特异性地检测复杂环境样品中的特定活性菌。自 2006 年第一次报道使用 PMA 可用于区别死、活细菌以来,PMA 已被广泛应用于微生物领域。PMA-qPCR 检测过程中 PMA 浓度对结果的影响较大,许多研究者均对 PMA 作用的浓度及时间进行了摸索和探讨<sup>[14]</sup>。PMA 浓度较低时( $5\text{--}10\ \mu\text{mol/L}$ ),其渗透到细胞膜受损的细胞中与其 DNA 结合的效果也差;而如果浓度过大,则增加了对活细胞的毒性。Wu 等研究表明,当 PMA 浓度  $> 80\ \mu\text{mol/L}$  时,活细胞的数量下降至  $26.47\%\text{--}5.92\%$ ;当 PMA 浓度  $> 160\ \mu\text{mol/L}$  时,活细胞的数量则会下降至  $7.67\%\text{--}0.31\%$ 。PMA 渗透入死菌阻止 DNA 扩增的作用在 20 min 之内随着光照时间延长效果会增加,超过 20 min 则影响不大。因而通常选择  $20\text{--}50\ \mu\text{mol/L}$  PMA 作用 20 min<sup>[15]</sup>。

实时荧光定量 PCR 技术中引物探针的设计是关键,本研究根据副溶血性弧菌 *tlh* 毒力基因设计的引物探针经测试能特异性扩增出副溶血性弧菌 *tlh* 毒力基因,而对于其他弧菌如溶藻弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌及金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌等革兰氏阳性和阴性杆菌、球菌等均未能扩增到该基因,特异性达到 100%,灵敏度检测可达到 19.8 CFU/mL,与市售试剂盒比较效果相当(结果未显示)。重复性试验变异系数均  $< 2\%$ ,表明建立的 qPCR 法可靠稳定,可用于副溶血性弧菌的灵敏、快速检测。

表 3 PMA-qPCR 法及培养法检测不同冷冻时期副溶血性弧菌

Table 3 Detection of *V. parahaemolyticus* in different frozen periods by PMA-qPCR and culture method

冷冻时间 Frozen period (d)	PMA-qPCR					平板培养法 Culture methods				
	1	2	3	Mean	SD	1	2	3	Mean	SD
10	18 999	20 528	20 417	19 981	852	8 100	7 600	7 900	7 866	251
20	9 333	9 533	9 139	9 335	197	2 000	1 900	1 900	1 933	57
30	2 285	2 269	2 648	2 400	214	260	320	340	306	41
50	126	85	79	96	25	0	0	0	0	0

出入境的冰鲜制品及肉制品中,副溶血性弧菌及单增李斯特菌是重要的检测项目。相对于单增李斯特菌,副溶血性弧菌对低温尤其敏感。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存的副溶血性弧菌即使加入海藻糖、甘油等保护剂,死亡比例也相当高。但同时有研究显示,在极端环境中,细菌会通过相容性溶质的积累、适应性细胞膜和蛋白质组修饰等机制来应对压力环境<sup>[16-17]</sup>。为了应对低温环境,细菌会通过自身的变化来适应环境,也会更容易进入 VBNC 状态。本研究中,副溶血性弧菌在大西洋鲑鱼的冷冻基质中 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存至 10 d 时,PMA-qPCR 显示活菌数由最初的  $6.6\times 10^5$  CFU/mL 下降为  $19\ 981\pm 852$  CFU/mL,平板培养法则下降更快,低至  $7\ 866\pm 251$  CFU/mL;到 50 d 时分别低至  $96\pm 25$  CFU/mL 和 0 CFU/mL。显示在此过程中有相当数量的副溶血弧菌成为 VBNC,单纯应用传统的平板培养法有很高的漏检风险。

本研究中,常规 qPCR 在冷冻前后扩增循环数  $C_q$  值一致处于 26 附近,几乎无变化;而 PMA-qPCR 则由最初的 26.43 逐步上升为 31.24、32.32、34.25 和 38.84。与常规 qPCR 相比,PMA-qPCR 的检测结果在一定程度上去除了来自于非活性菌的 DNA 对检测结果的影响,能够更准确地反映样品中病原菌的浓度水平。与培养法相比,PMA-qPCR 不仅能够更为快速地对样品中的病原菌进行检测(检测时间从 1-2 d 缩短到约 3 h),并且能够检测到进入 VBNC 状态的病原菌,且检测结果相比于传统检测方法更为准确。

鉴于此,在冰鲜产品及肉类冷冻运输及加工时,PMA-qPCR 技术在确定疾病暴发的流行病学调研或应用于食品安全的控制措施方面,都将是很有前途的分析手段。

## REFERENCES

- [1] Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, et al. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 20(1): 39-48
- [2] Oliver JD, Dagher M, Linden K. Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater[J]. *Journal of Water and Health*, 2005, 3(3): 249-257
- [3] Liu YM, Wang C, Tyrrell G, et al. Production of Shiga-like toxins in viable but nonculturable *Escherichia coli* O157: H7[J]. *Water Research*, 2010, 44(3): 711-718
- [4] Saux MFL, Hervio-Heath D, Loaec S, et al. Detection of cytotoxin-hemolysin mRNA in nonculturable populations of environmental and clinical *Vibrio vulnificus* strains in artificial seawater[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(11): 5641-5646
- [5] Berry D, Xi CW, Raskin L. Effect of growth conditions on inactivation of *Escherichia coli* with monochloramine[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(3): 884-889
- [6] Duarte A, Botteldoorn N, Coucke W, et al. Effect of exposure to stress conditions on propidium monoazide (PMA)-qPCR based *Campylobacter* enumeration in broiler carcass rinses[J]. *Food Microbiology*, 2015, 48: 182-190
- [7] Josefsen MH, Löfström C, Hansen TB, et al. Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(15): 5097-5104
- [8] Bae S, Wuertz S. Survival of host-associated Bacteroidales cells and their relationship with *Enterococcus* spp., *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, and adenovirus in freshwater microcosms as measured by propidium monoazide-quantitative PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(4): 922-932
- [9] Li BG, Chen JQ. Development of a sensitive and specific qPCR assay in conjunction with propidium monoazide for enhanced detection of live *Salmonella* spp. in food[J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13: 273
- [10] Lee ES, Lee MH, Kim BS. Evaluation of propidium monoazide-quantitative PCR to detect viable *Mycobacterium fortuitum* after chlorine, ozone, and ultraviolet disinfection[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 210: 143-148
- [11] Cattani F, Barth VC, Nasário JSR, et al. Detection and quantification of viable *Bacillus cereus* group species in milk by propidium monoazide quantitative real-time PCR[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(4): 2617-2624
- [12] Roth BL, Poot M, Yue ST, et al. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(6): 2421-2431
- [13] Nocker A, Camper AK. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 291(2): 137-142
- [14] Pacholewicz E, Swart A, Lipman LJA, et al. Propidium monoazide does not fully inhibit the detection of dead *Campylobacter* on broiler chicken carcasses by qPCR[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 95(1): 32-38
- [15] Wu B, Liang WL, Kan B. Enumeration of viable non-culturable *Vibrio cholerae* using propidium monoazide combined with quantitative PCR[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2015, 115: 147-152
- [16] Csonka LN. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1989, 53(1): 121-147
- [17] Sleator RD, Hill C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, 26(1): 49-71