疾病监测
DISEASE SURVEILANCE

细菌活性检测方法研究进展及其应用探讨

刘丽 魏强

Research progress and application of bacterial activity detection methods

Liu Li Wei Qiang

在线阅读 View online: https://doi.org/10.3784/jbjc.202309220501

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

细菌耐药性检测技术方法及其应用

Application of different detection techniques for bacterial drug resistance test

疾病监测. 2017, 32(9): 757 https://doi.org/10.3784/j.issn.1003-9961.2017.09.013

艰难梭菌核酸检测方法应用进展

Progress in application of nucleic acid detection methods for *Clostridium difficile*

疾病监测. 2020, 35(9): 856 https://doi.org/10.3784/j.issn.1003-9961.2020.09.019

血流感染病原体分子检测技术研究进展

Progress in research of molecular detection of pathogens in bloodstream infection

疾病监测. 2020, 35(11): 1047 https://doi.org/10.3784/j.issn.1003-9961.2020.11.018

浙江省宁波市耐多药结核分枝杆菌吡嗪酰胺耐药特征及与二线抗结核药物耐药关系

Characteristics of Pyrazinamide resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and its correlation with second-line drug resistance

疾病监测. 2020, 35(3): 237 https://doi.org/10.3784/j.issn.1003-9961.2020.03.013

克罗诺杆菌分种方法研究进展

Progress in research in species identification methods of *Cronobacter* spp.

疾病监测. 2018, 33(5): 413 https://doi.org/10.3784/j.issn.1003-9961.2018.05.014

塔希纳病毒的重组酶介导扩增快速检测方法

Establishment of a reverse transcription recombinase-mediated amplification assay for rapid detection of Tahyna virus

疾病监测. 2020, 35(3): 192 https://doi.org/10.3784/j.issn.1003-9961.2020.03.004

关注微信公众号，获得更多资讯信息

病原菌株标准化专题

细菌活性检测方法研究进展及其应用探讨

开放科学（OSID）

刘丽，魏强

摘要： 细菌活性检测是检验、评价和保藏的关键，快速、灵敏、特异和准确的细菌活性检测方法是十分重要的。目前，细菌活性可以根据细菌生长繁殖能力、新陈代谢能力、细胞膜的完整性以及复制转录能力原理进行检测。不同的检测原理会有不同的检测方法，平板培养计数法是最为经典的活性检测方法，叠氮溴化丙锭结合定量聚合酶链反应（PMA-qPCR）、荧光染料结合流式细胞仪、单细胞拉曼分析技术等是新应用的方法。随着科学技术的不断发展和细菌活性检测的需求，优化的细菌活性检测方法层出不穷，但不同的细菌活性检测方法具有不同的优缺点。本文就目前细菌活性检测原理、方法、应用以及优缺点等方面进行描述，并探讨了细菌活性检测方法在细菌检验和保藏等方面的应用。

关键词： 细菌；活性；检测；评价；保藏

中图分类号： R211; Q939.1; R378 **文献标志码：** A **文章编号：** 1003-9961(2023)12-1519-07

Research progress and application of bacterial activity detection methods

Liu Li, Wei Qiang. National Pathogen Resource Center, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

***Corresponding author**: Wei Qiang,* Email: weiqiang@chinacdc.cn

Abstract: Bacterial activity detection is the key to inspection, evaluation and preservation. Rapid, sensitive, specific and accurate bacterial activity detection methods are very important. At present, bacterial activity can be measured according to the principles of bacterial growth and reproduction ability, metabolic ability, membrane integrity, and replication and transcription ability. Different detection principles will have different detection methods, plate culture counting method is the most classic activity detection method, Propidium Monoazide combined with Quantitative PCR(PMA-qPCR), fluorescent dye-combined flow cytometry, single-cell Raman analysis technology is the new application of instruments. With the continuous development of science and technology and the demand of bacterial activity detection, optimized bacterial activity detection methods are emerging in an endless stream, but different bacterial activity detection methods have different advantages and disadvantages. In this paper, the principle, method, application, advantages and disadvantages of bacterial activity detection were described, and the application of bacterial activity detection method in bacterial inspection and preservation was discussed.

Key words: Bacteria; Activity; Detection; Evaluate; Preservation

This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2022YFC2602200)

细菌广泛存在于自然界和人体内，可以通过空气、土壤等传播途径进行传播[1]。而病原细菌（pathogenic bacteria）是引起传染病和感染性疾病的主要因素之一，据统计全球约有三分之一的死亡与细菌感染性疾病相关[2-3]。病原微生物菌（毒）种作为国家重要的战略资源，也是国家的生物资源，是传染病防治研究的重要基础材料和基本信息来源，是掌握我国重大传染病的过去、现在以及未来发展趋势的重要载体，也是评价其所致疾病防治措施效果的基础和前提[4]。标准菌株保藏是病原微生物菌（毒）种的重要组成部分，国家标准株评价技术标准需要对菌株进行生物学评价、活性评价和稳定性评价，活性评价是其非常重要的环节。但目前并没有统一明确的标准菌株活性评价方法和菌株保藏活性评价方法。

细菌活性检测可根据其生长繁殖能力、新陈代谢能力、细胞膜的完整性以及复制转录能力原理检测，根据这些原理发展了很多检测细菌活性的方法。在细菌活性检测时，可以根据细菌的生物学特性以及实验条件等条件来选择某种合适的活性检测方法。不同的细菌活性检测方法有各自的优缺点，本研究现对细菌活性检测的原理、方法以及优缺点进行综述，以便研究人员选择最合适的细菌活性检测方法检测细菌活性；并对国家标准菌株活性评价和菌株保藏中菌株的活性评估提供一定的参考意义，以完善我国病原微生物菌（毒）种的规范保藏。

基金项目：国家重点研发计划（No. 2022YFC2602200）

作者单位：中国疾病预防控制中心，国家病原微生物资源库/国家病原微生物保藏中心，北京 102206

作者简介：刘丽，女，山东省临沂市人，研究生，主要从事病原微生物研究，Email: liuli12342022@163.com

通信作者：魏强，Tel: 010-58900338，Email: weiqiang@chinacdc.cn

收稿日期：2023-09-22 网络出版日期：2023-12-01

1　细菌活性的相关定义

1.1　细菌生存力　细菌生存力是指细菌在合适的营养培养基中繁殖的能力[5]。微生物的生长是一个动态的过程，传统定义上要求单个“活”细菌必须可以生长并可在液体或固体培养基中产生能够进行光学测量的细胞集落。因此，细菌的生存能力相当于繁殖能力，并且伴随着可培养能力。注意的是，某些细菌缺乏在某些条件下生长和繁殖的能力，但可能是具有功能完整的活细胞，称之为存活但不可培养的细菌（viable but non-cultivable，VBNC）[6]。故真正的“死”细菌应该是缺乏最低限度的结构完整性和执行基本细胞功能（如生理学、代谢和遗传物质的控制和活动）的能力，并且既没有生命力也不具有活力[7]。目前，已经发现了 60 多种细菌可进入 VBNC 状态[8]。值得注意的是，VBNC 仍可进行新陈代谢，而且仍然具有致病性，在食品或消毒等领域进行细菌活性检测中易出现假阴性结果，从而对食品或人类造成一定的威胁。

1.2　活性和活率　细菌的活性表示细菌体内能够发生生理过程或细菌处于活动的状态[9]。微生物总量、浓度和微生物活性有一定的相关性，但在数值上并不成比例。主要是因为具有活性的微生物更容易在适宜的条件下继续生存和繁殖，从而对人类健康、气候效应和空气环境产生重大的影响。通常，活性一般用某种物质的代谢速率来表示。代谢速率越高，以其为标志物的活性就越高，代谢速率是一个具体的特定指标。细菌的新陈代谢是指细菌为维持、发育和繁殖（微生物分裂）而发生的所有反应的总和[10]。而细菌的活率是指活细胞占总细胞数的比例。

2　细菌活性检测的基本原理

2.1　基于细菌生长繁殖能力　细菌活性可通过细菌生长繁殖能力来进行检测，检测细菌生长繁殖能力来反映细菌活性高低[11]。通常情况下，通过单菌落培养计数来反映细菌生长繁殖能力，菌落数量越多表示细菌生长繁殖能力越强，细菌活性就越强。但是，有些细菌处于 VBNC 状态，所以通过细菌培养计数，依靠细菌生长繁殖能力作为活性判断依据时，并不能对 VBNC 进行检测，易产生假阴性结果。

2.2　基于细菌新陈代谢能力　细菌活性可体现在细菌的新陈代谢能力上，当细菌活性高时，其新陈代谢能力高[11]。因此，可通过测量细菌产生的三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）、酶等一系列代谢产物含量以测量细菌活性。细菌新陈代谢水平高，其产生的代谢产物便多，代谢产物含量与活性一般成正比例关系。根据代谢产物特点选择合适的指示剂，并通过分光光度计等仪器定量检测。

2.3　基于细菌细胞膜完整性　细胞死亡后其细胞膜往往会发生变化，如皱缩、溶解、细胞膜破损以及缺失会作为死菌的标志，而活菌有完整的细胞膜[12]。利用生物染料可穿透受损细胞膜或死亡细菌细胞膜原理，生物染料与 DNA 结合，区别活菌和死菌。该方法的染料主要有碘化丙啶（propidium iodide, PI）和叠氮类染料（ethidium monoazide bromide, EMA / propidium monoazide, PMA）。PI 和 EMA/PMA 都是核酸分子染料，不能穿透活菌细胞膜但可穿透死菌细胞膜[13]。进入死菌后，与 DNA 结合，借助流式细胞仪或荧光显微镜进行检测，从而区分活菌和死菌[14]。

2.4　基于细菌复制转录能力　目前，分子生物学技术快速发展，在细菌活性检测也应用广泛，如聚合酶链式反应（polymerase chain reactional，PCR）。这些检测方法能够实现快速检测细菌的同时提高检测特异性以及灵敏度[15]。PCR 是以细菌的 DNA 或 RNA 为目标物进行检测。但是在细菌死亡后，DNA 仍能够保存较长时间，所以仅仅利用常规的 DNA 检测达不到区分活菌和死菌的目的，易造成假阳性结果[16]。与基因组 DNA 相比，mRNA 是活菌细胞的良好指标，可作为活菌和死菌的标志。但 mRNA 的半衰期短，且易被降解[17]。针对这些问题，为了抑制死菌的 DNA 扩增，从而达到区分活菌和死菌的目的，将染料与定量聚合酶链反应（quantitative PCR, qPCR）结合起来开发了 PMA-qPCR 等方法。

3　细菌活性检测常见方法及应用

3.1　基于平板培养计数法　平板培养计数法是依据细菌的生长繁殖能力检测细菌活性的方法，是细菌活性检测方法中使用最为经典、最为广泛的一种检测技术，被认为是细菌诊断的“金标准”，已经有百年的历史[18]。相比于其他细菌活性检测方法，该方法操作简单，具有高灵敏性等优点[19]。但该方法一般需要一天至几天，对实验操作过程严格，易产生假阴性结果[20]；并且当检测样品中的细菌浓度较低时，该方法对许多细菌的分离和鉴定比较困难；此外，有些细菌处于 VBNC 状态，无法对 VBNC 细菌进行检测。目前，平板培养计数法应用于食品卫生检查、化妆品检查、科学研究等领域中，并且发挥着重要的作用。此外，在病原微生物菌（毒）种保藏过程中，平板计数法一直用于菌株的鉴定、传代等过程，其细菌具有可培养、传代特性是菌（毒）种保藏过程中活性评价的重要部分。

3.2　基于 ATP 生物发光法　ATP 是细菌中含量相对

稳定的一种代谢产物。细胞 ATP 浓度会随着环境和生理条件的变化而变化，当细菌生长受限或者死亡后，细胞内的 ATP 会立刻大幅度下降甚至消失[21]。因此，它可以作为指示微生物代谢活性的标志物。ATP 生物发光法的原理是在萤火虫荧光素酶的作用下，将荧火虫发光素和 ATP 氧化成氧化荧光素和单磷酸腺苷（adenosine monophosphate，AMP），可检测发光强度，发光强度与 ATP 含量成正比，利用 ATP 含量与细菌总数相互关系推算细菌总数，反映细菌活性[22]。整个反应释放的光可以用光度计或比色法进行测量。值得注意的是，由于细菌细胞内的 ATP 并不是以游离的形式存在于待检测的样品中，因此，使用 ATP 生物发光法测量之前需要提取细胞内的 ATP。而且 ATP只能揭示细胞或系统能量状态的一部分，必须要考虑其他腺苷酸。

在实际过程中，ATP 生物发光法具有操作简单、反应快速、检测时间短等优点，但仍存在一些问题。首先，与所有的酶促反应相似，反应体系 pH、温度、酶浓度以及底物浓度等都会对实验结果产生一定的影响；其次，ATP 是一种高能磷酸化合物，在室温下极易发生水解反应[23]，因此，ATP 提取时间会严重影响实验结果。张尧等[24]用 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，适用于冷荤间加工食品微生物的快速检测。Puig-Collderram 等[25]使用 ATP 生物发光测定法评估铜绿假单胞菌的抗广泛耐药性，明显优于平板计数法。郭立芸等[26]建立 ATP 快速荧光监测系统监测啤酒酿造过程中的微生物，进行实时监测。可见，ATP 生物发光法可应用于科学研究和食品等领域中，但对于环境样品，需注意潜在的水解作用或其他化学相互作用。目前，在病原微生物菌（毒）种保藏过程中，并没有统一明确的活性评价方法，常用平板计数法来表示细菌的活性，但平板计数法只是基于细菌的生长繁殖能力，并不能体现细菌的新陈代谢能力。而 ATP 生物发光法具有简便的特点，可为保藏过程中菌株活性评价提供一定的参考意义。

3.3 *基于氧化还原法* 氧化还原法检测细菌活性原理是利用细菌在新陈代谢过程中产生的代谢产物将指示剂还原发生颜色变化，产生颜色后，再通过显微镜或流式细胞术进行检测细菌活性。常用的指示剂主要有以下几种：碘硝基四唑紫（iodonitrotetrazolium chloride, INT）、氧化还原染料（5-cyano-2，3-ditolyl tetrazolium chloride, CTC）和刃天青。有研究表明，INT 和 CTC 对细菌有一定的毒性作用，一些活的和可培养的细菌可能不会产生来自 CTC 和 INT 的甲臜，可能会低估实验结果。赵新华和吴卿[27]利用 CTC 技术测定水环境中的细菌活性，相比于平板计数法，极大地提高了检测水环境中细菌活性的速度、灵敏度和准确度。

刃天青是一种传统的氧化还原染料，呈深蓝色或黑色，是一种安全无毒的水溶性染料[28]。其可作为氧化还原指示剂，常用于线粒体的功能检测以及细菌活力和细胞的增殖能力。其检测细菌活性的原理是刃天青可被细菌依赖的氧化还原酶和脱氢酶还原成粉红色有荧光的试卤灵，进而还原成无色无荧光的二氢试卤灵[29]，其颜色变化表现为青蓝色–紫色–粉红色–无色[30]。通过检测刃天青的还原产物试卤灵和二氢试卤灵的荧光度来反映细菌数量和活性。氧化还原法检测细菌活性具有简便、灵敏、有效、简单以及直接表示细菌氧化代谢和存活能力的特点，可应用于饮用水水源、饮用水及其他水环境中的细菌活性和细菌总数的研究。在国家标准株评价技术标准活性评价中，要求其浓度、毒力（滴度）确定，并达到相应功能需要。因此，氧化还原法可检测相应功能所相关的代谢物，以评估菌株的活性，并可评估标准菌株以进行规范保藏。

3.4 *基于 PCR 方法* PCR 对检测细菌时具有较高的灵敏度和特异性，并且具有耗时短的特点，但不能区分活菌和死菌，易高估活菌的数量。实时荧光定量 PCR（quantitative real-time PCR，real-time PCR）指在 PCR 反应体系中加入荧光物质后根据荧光信号积累对整个 PCR 过程进行实时监测，再利用标准曲线定量分析未知模板的方法，此方法实现了由传统定性到定量的跨步[31]。与传统 PCR 技术相比有很多优点，它可用来检测具有特定 DNA 片段的微生物。但是，real-time PCR 仍然不能区分活菌和死菌。

为区分活菌和死菌，可将核酸结合染料与定量 PCR 结合起来以检测细菌的活性。目前，最为常用的核酸结合染料有 PMA。其检测细菌活性的原理是对于膜受损细胞，PMA 可在强光下进入细胞，与 DNA 发生不可逆共价交反应，形成不能经定量 PCR 扩增的化学修饰 DNA[32]。目前，PMA-qPCR 在弯曲杆菌[33]、多粘芽孢杆菌[34]、霍乱弧菌[35]、铜绿假单胞菌[36]、马链球菌[37]、金黄色葡萄球菌[38]等细菌中得到广泛应用。但 PMA 处理抑制死菌信号受多方面的影响，并不能完全去除死菌信号，从而可导致出现假阳性[39]。但 Codony 等[40]研究发现，PMA-qPCR 是以细胞膜的完整性作为检测标准，无法区分完整细胞膜和无代谢活性的死菌。为了加速 PMA 进入细菌内部，凌南[41]应用 SD-PMA-PCR 来检测副溶血弧菌的活性，脱氧胆酸钠（sodium deoxycholate，SD）是一种洗涤剂，可破坏受损和死亡

细胞的细胞膜，使 PMA 加速进入受损和死亡细菌的细胞，减少假阳性结果。

此外，可用 mRNA 代替 DNA 以检测细菌活性。基于 mRNA 的反转录 PCR（reverse transcription PCR，RT-PCR）技术是指以细菌的 mRNA 为模板，先合成 DNA，再对其进行扩增[19]。该技术已应用于单增李斯特菌[42]、沙门菌[43]和霍乱弧菌[44]等食源性致病菌检测。可见，基于 PCR 的一系列检测方法在科学研究中检测细菌活性较为常用。基于 PCR 一系列方法都具有快速、灵敏、自动化的特点，将其用于菌株保藏过程中能够节省人力、节省时间；此外，在《病原微生物菌（毒）种国家标准株评价技术标准》(WS/T812-2022) 活性评价中要求菌株应是纯培养物，无杂菌、支原体、噬菌体等外源因子干扰，PCR 技术能够在鉴定细菌种类基础上，评价菌株的活性，将其进行规范保藏。

3.5　基于流式细胞仪（flow cytometry，FCM）　FCM 是一种对高速直线流动的细胞或生物微粒进行快速定量测定和分析的仪器[45]。它能高效地分析数以万计的细胞，同时对这些细胞的理化性质分析，例如细胞的大小、内部结构、遗传物质、蛋白质、免疫抗原等[46]。FCM 与荧光染料结合使用可根据细胞代谢、膜完整性和膜电位 3 个方面检测细菌活性。

FCM 可结合与细菌代谢相关的染料结合。林怡雯等[47]以大肠埃希菌为例，利用 CTC 结合流式细胞仪（CTC-FCM）方法以选择性检测水环境中具有代谢活性的细菌总数。与培养法对比，发现 CTC-FCM 能很好地区分活菌和死菌，并与培养法有很好的线性关系，且检测时间比培养法大大缩短。FCM 也可结合与细胞膜相关的染料检测细菌活性。目前，常用的染料是 SYBR、Green I 和 PI。刘晓露[48]利用 FCM 对饮用水中的细菌进行快速检测，其利用流式细胞仪结合 SYBR、Green I 和 PI 染色，对水样中细菌的死活状态进行区分。FCM 可通过检测细菌的膜电位来检测细菌活性。Wang 等[49]利用膜电位作为关键生存参数的流式细胞术来准确定量原料奶中的细菌总数。该研究将 DiBAC4（3）与红色透膜 DNA 染料 SYTO64结合，实现了活细胞（红色）和死细胞（红色和绿色）的同时标记，证明膜电位能很好地反映细菌活性。可见，FCM 结合染料检测细菌活性可应用于科学研究和食品等领域中。FCM 结合生物染料检测细菌活性能够达到每秒上万个细胞，并能够分析细胞的内部结构，将其用于菌株保藏中可快速检测细菌活性，并分析其内部结构，节约时间和人力。

3.6　基于单细胞拉曼技术　单细胞拉曼技术是基于拉曼光谱分析原理实现非培养、无标签、快速、高效、低成本揭示物质本质的新方法[50–51]。拉曼散射由光与分子的非弹性相互作用产生，光谱信号对应于化学键的振动，其依靠激发光的非弹性散射和分子共振可以对单个细胞产生独特“指纹图谱”[52–53]。相比于其他方法，单细胞拉曼技术具有高效、快速、自动化等优点，但仍存在一些局限性。如需要更加智能化的分析系统和数据库处理生物学信息；拉曼光谱检测方法繁多，不同类型标本背景信号对不同检测方法的干扰不同[54]，导致标本的前期处理、参数设置等存在一定差异；此外，单细胞拉曼技术目前只应用于几个菌种，还需进一步开发[55]。

近年来，单细胞拉曼技术逐渐应用于病原微生物研究的病原微生物鉴定、药物敏感性检测、活性鉴定以及单细胞的基因组分析等领域。单细胞拉曼技术在非结核分枝杆菌[56]、大肠埃希菌[57]、益生菌[58]以及幽门螺杆菌[59]中都得到过应用。使用单细胞拉曼技术检测细菌活性是使用重水饲喂细菌，根据静默区的重水峰（C-D 峰）来定量细菌的活性。相比于其他检测细菌活性方法，单细胞拉曼分选技术无需对细菌进行标记[51]，不会影响细菌的活性以及结构，更能够体现细菌的活性。

Zhang 等[58]开发了基于拉曼组原理的益生菌单细胞质检技术（single-cell identification，viability and vitality tests，and source-tracking，SCIVVS），利用其 C-D 峰，来量化益生菌的活性[60]，具有耗时短，操作方便的特点。刘聪等[61]采用单细胞拉曼光谱技术测定氨氧化古菌的代谢活性，该方法可定量分析菌的代谢活性，并且是原位检测，具有检测速度快、精度高的特点。目前，单细胞拉曼技术可应用于科学研究、食品卫生检测、工业生产和临床检测等领域中检测细菌活性。将单细胞拉曼技术用于菌株保藏中对菌株进行活性评价，可实现对菌株的无损伤检测，并且能够在非培养的条下对菌株进行活性评价。此外，单细胞拉曼技术可以对菌株进行鉴定，并结合分选技术和多组学，将菌株鉴定、活性评价和测序进行快速完成，有利于病原微生物菌（毒）种快速规范保藏。不同细菌活性检测方法各有优缺点，其详细原理和优缺点见表 1。

4　总结

综上所述，评价细菌活性可从细菌生长代谢、新陈代谢、细胞膜的完整性和复制转录等能力的原理进行评价，可根据不同的评价原理选择不同的检测方法以检测细菌活性。需根据实际需求和实验条件来选择合适的细菌活性检测方法，达到实验结果

表 1　细菌活性检测方法对比分析表

Table 1　Comparative analysis of bacterial activity detection methods

方法	原理	优点	不足
平板培养计数法	生长繁殖能力	1.低成本 2.可区分活菌和死菌 3.无需样本富集	1.所需时间较长（18-72 h） 2.无法检测VBNC细菌，易造成假阴性结果
ATP生物发光法	新陈代谢能力	1.操作简单 2.检测时间短（1-5分钟）	1.提取ATP复杂 2.ATP易降解
氧化还原法		1.操作简单	1.受浓度、温度等多种因素影响 2.指示剂有可能造成细胞毒性
单细胞拉曼技术		1.无需培养细菌 2.无需标记细菌 3.快速、高效、自动化（整个过程只需要5 h）	1.需建立数据库和专业分析软件 2.在细菌活性检测领域应用较少
RT-PCR	复制转录能力	1.灵敏度较高 2.特异性较高 3.自动化操作节省人力 4.可区分活菌和死菌	1.成本较高 2.mRNA的半衰期短，且易被降解，可造成假阴性结果
PMA-qPCR	细胞膜的完整性和复制转录能力	1.灵敏度较高 2.特异性较高 3.自动化操作节省人力 4.可区分活菌和死菌	1.无法完全去除死菌信号，可导致出现假阳性 2.无法区分具有完整细胞膜和无代谢活性的死菌
流式细胞仪	细胞膜的完整性	1.可计数VBNC细菌 2.可区分活菌和死菌 3.所需时间短 (每秒达上万个单细胞或颗粒) 4.可提供详细细胞生理状态信息	1.需荧光染料标记，可能损害细菌活性 2.成本高 3.依赖大型仪器 4.需专业人员操作

注：ATP. 三磷酸腺苷；RT-PCR.反转录PCR；PMA-qPCR：叠氮溴化丙锭结合定量聚合酶链反应；VBNC. 存活但不可培养的细菌

和成本兼顾的效果。随着科学技术的不断发展和需求的不断增多，细菌的活性检测方法有了新的突破，分子生物学技术的新探索、FCM 和单细胞拉曼技术的新发展，不仅实现了细菌活性的准确检测，而且在灵敏度、特异性和实用性方面，更加符合全面、快速、高通量检测的需求，为细菌评价和保藏、临床治疗、科学研究提供及时准确的检测结果。目前，我国病原微生物保藏工作正处在快速发展的阶段，其保藏的核心在于质量，所以有必要通过新的细菌活性评价方法的应用来提升菌株保藏质量，为确保国家生物资源安全提供技术支撑。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *Lancet*, 2022, 400(10369): 2221–2248. DOI: 10.1016/S0140−6736(22)02185−7.

[2] Vikesland PJ, Wigginton KR. Nanomaterial enabled biosensors for pathogen monitoring— a review[J]. *Environ Sci Technol*, 2010, 44(10): 3656–3669. DOI: 10.1021/es903704z.

[3] Jones KE, Patel NG, Levy MA, et al. Global trends in emerging infectious diseases[J]. *Nature*, 2008, 451(7181): 990–993. DOI: 10.1038/nature06536.

[4] 王多春, 姜孟楠, 魏强. 病原微生物菌 (毒) 种国家标准株评价体系[J]. 中华实验和临床病毒学杂，2021，35(5)：490–493. DOI：10.3760/cma.j.cn112866−20210714−00119.
Wang DC, Jiang MN, Wei Q. Evaluation system of national standard strains of pathogenic microorganism[J]. *Chin J Exp Clin Virol*, 2021, 35(5): 490–493. DOI: 10.3760/cma.j.cn112866−20210714−00119.

[5] 邓颖. 基于流式细胞术的 SYTO 9/PI 细菌活性判定方法优化及其机理[D]. 广州: 暨南大学, 2020. DOI: 10.27167/d.cnki.gjinu.2020.001227.
Deng Y. Optimization of bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO 9 and propidium iodide and its mechanism based on flow cytometry[D]. Guangzhou: *Jinan University*, 2020. DOI: 10.27167/d.cnki.gjinu.2020.001227.

[6] Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani GP, et al. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria[J]. *Front Public Health*, 2014, 2: 103. DOI: 10.3389/fpubh.2014.00103.

[7] Davis C. Enumeration of probiotic strains: review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria[J]. *J Microbiol Methods*, 2014, 103: 9–17. DOI: 10.1016/j.mimet.2014.04.012.

[8] Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria[J]. *J Microbiol*, 2005, 43 Spec No: 93−100.

[9] 曾尼卡有限公司. 活细菌: 中国, 94191905.6[P]. 1996−05−01.
Zenica LTD. Live bacteria: CN, 94191905. 6[P]. 1996−05−01.

[10] 贺纪正, 曹鹏, 郑袁明. 代谢异速生长理论及其在微生物生态学领域的应用[J]. 生态学报，2013，33(9)：2645–2655. DOI：10.5846/stxb201202080164.
He JZ, Cao P, Zheng YM. Metabolic scaling theory and its application in microbial ecology[J]. *Acta Ecol Sin*, 2013, 33(9): 2645–2655. DOI: 10.5846/stxb201202080164.

[11] 陈盟, 祁建城, 杜耀华, 等. 活/死菌检测方法的研究进展[J]. 军事医学，2018，42(9)：715–720. DOI：10.7644/j.issn.1674−9960.2018.09.015.
Chen M, Qi JC, Du YH, et al. Research progress in methods for live/dead detection of bacteria[J]. *Mil Med Sci*, 2018, 42(9): 715–720. DOI: 10.7644/j.issn.1674−9960.2018.09.015.

[12] 李凡, 韩梅. 医学微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2014.
Li F, Han M. Medical microbiology[M]. Beijing: *Higher Education Press*, 2014.

[13] Nocker A, Cheung CY, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells[J]. *J Microbiol Methods*, 2006, 67(2): 310–320. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.04.015.

[14] 於颖. PMA-qPCR 定量检测畜禽肉类中食源性致病菌活菌的研

究[D]. 上海: 东华大学, 2015.
Yu Y. Development of a quantitative method to detect viable *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* by PMA-qPCR in livestock and poultry meat[D]. Shanghai: *Donghua University*, 2015.
[15] Chen J, Tang J, Liu J, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of five foodborne pathogens[J]. *J Appl Microbiol*, 2012, 112(4): 823–830. DOI: 10.1111/j.1365−2672.2012.05240.x.
[16] Josephson KL, Gerba CP, Pepper IL. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(10): 3513–3515. DOI: 10.1128/aem.59.10.3513−3515.1993.
[17] Coutard F, Pommepuy M, Loaec S, et al. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state[J]. *J Appl Microbiol*, 2005, 98(4): 951–961. DOI: 10.1111/j.1365−2672.2005.02534.x.
[18] D'Aoust JY, Sewell AM, Warburton DW. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella*[J]. *Int J Food Microbiol*, 1992, 16(1): 41–50. DOI: 10.1016/0168−1605(92)90124−L.
[19] 周平. 基于 PMA-qPCR 快速定量检测牛奶中常见食源性致病菌活菌的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2019. DOI: 10.27232/d.cnki.gnchu.2019.002331.
Zhou P. Research on rapid and quantitative detection of viable common foodborne pathogens in milk by PMA-qPCR[D]. Nanchang: *Nanchang University*, 2019. DOI: 10.27232/d.cnki.gnchu.2019.002331.
[20] Park S, Shukla S, Kim Y, et al. Development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Cronobacter muytjensii* (formerly called *Enterobacter sakazakii*)[J]. *Microbiol Immunol*, 2012, 56(7): 472–479. DOI: 10.1111/j.1348−0421.2012.00466.x.
[21] 陆烨, 胡国庆, 陆龙喜, 等. ATP 生物荧光技术快速测定细菌总数的应用研究[J]. 中国消毒学杂志，2013，30(7)：613–615, 618.
Lu Y, Hu GQ, Lu LX, et al. Research on feasibility of ATP bioluminescence determination of the total number of bacteria[J]. *Chin J Disinfect*, 2013, 30(7): 613–615,618.
[22] 易琳. 微生物检测中 ATP 生物发光法的应用研究现状[J]. 生物化工，2019，5(1)：124–126. DOI：10.3969/j.issn.2096−0387.2019.01.036.
Yi L. Application of ATP bioluminescence in microbial detection[J]. *Biol Chem Eng*, 2019, 5(1): 124–126. DOI: 10.3969/j.issn.2096−0387.2019.01.036.
[23] 田雨, 侯玉柱, 柯润辉, 等. 采用 ATP 生物发光法分析 6 株常见细菌 ATP 含量差异[J]. 食品与发酵工业，2015，41(1)：220–224. DOI：10.13995/j.cnki.11−1802/ts.201501042.
Tian Y, Hou YZ, Ke RH, et al. Study on ATP content difference of six common strains by ATP bioluminescence method[J]. *Food Ferment Ind*, 2015, 41(1): 220–224. DOI: 10.13995/j.cnki.11−1802/ts.201501042.
[24] 张尧, 邸金茹, 邓旭峰, 等. 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[J]. 中国食品卫生杂志，2014，26(4)：377–379. DOI：10.13590/j.cjfh.2014.04.018.
Zhang Y, Di JR, Deng XF, et al. Application of the ATP bioluminescence assay to screen bacterial contamination of cold dish[J]. *Chin J Food Hyg*, 2014, 26(4): 377–379. DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.04.018.
[25] Puig-Collderram B, Domene-Ochoa S, Salvà-Comas M, et al. ATP Bioluminescence assay to evaluate antibiotic combinations against extensively drug-resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(4): e0065122. DOI: 10.1128/spectrum.00651−22.
[26] 郭立芸, 向杰, 谢鑫, 等. 腺嘌呤核苷三磷酸生物发光法快速检测短乳杆菌[J]. 食品与发酵工业，2020，46(18)：232–235. DOI：10.13995/j.cnki.11−1802/ts.024135.
Guo LY, Xiang J, Xie X, et al. Rapid detection of Lactobacillus brevis in beer with ATP bioluminescence[J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(18): 232–235. DOI: 10.13995/j.cnki.11−1802/ts.024135.
[27] 赵新华, 吴卿. 利用 CTC 技术测定水环境中的细菌活性[J]. 中国给水排水，2003，19(8)：97–99. DOI：10.3321/j.issn:1000−4602.2003.08.036.
Zhao XH, Wu Q. Utilization of CTC for detecting bacterial activity in water environment[J]. *China Water Wastewater*, 2003, 19(8): 97–99. DOI: 10.3321/j.issn:1000−4602.2003.08.036.
[28] 张紫莺. 刃天青在食源大肠杆菌活体中的电化学特性研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2018. DOI: 10.7666/d.Y3430454.
Zhang ZY. Study on electrochemical characteristics of resazurin in the living organisms of food-borne *Escherichia coli*[D]. Changsha: *Central South University of Forestry and Technology*, 2018. DOI: 10.7666/d.Y3430454.
[29] Zhang HX, Du GH, Zhang JT. Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(3): 385–389.
[30] 艾玉琴, 王作洲, 张丽萍, 等. 刃天青快速检验乳粉中总菌数的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报，1993，7(2)：96–99
Ai YQ, Wang ZZ, Zhang LP, et al. Study on rapid determination of total bacterial count in milk powder by Jian Tianqing[J]. *J Heilongjiang August First Land Reclamatiou Univ*, 1993, 7(2): 96–99
[31] 王甜, 陈庆富. 荧光定量 PCR 技术研究进展及其在植物遗传育种中的应用[J]. 种子，2007，26(2)：56–61. DOI：10.16590/j.cnki.1001−4705.2007.02.052.
Wang T, Chen QF. The progress of fluorescence qPCR and its application in plant genetics and breeding[J]. *Seed*, 2007, 26(2): 56–61. DOI: 10.16590/j.cnki.1001−4705.2007.02.052.
[32] 陶怡君, 谌志筠, 何秋水. 叠氮溴化丙锭结合 qPCR 检测与区分活菌和死菌的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展，2020，48(6)：63–68. DOI：10.13309/j.cnki.pmi.2020.06.012.
Tao YJ, Chen ZJ, He QS. Advances in detection and differentiation of live and dead bacteria by PMA-qPCR technology[J]. *Prog Immunol Microbiol*, 2020, 48(6): 63–68. DOI: 10.13309/j.cnki.pmi.2020.06.012.
[33] Reichelt B, Szott V, Stingl K, et al. Detection of viable but non-culturable (VBNC)-*Campylobacter* in the environment of broiler farms: innovative insights delivered by propidium monoazide (PMA)-v-qPCR analysis[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(10): 2492. DOI: 10.3390/microorganisms11102492.
[34] Guo JC, Fan F, Wang WL, et al. Development of PMA-qPCR assay to accurately and reproducible quantify viable bacteria of *Paenibacillus polymyxa*[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2023, 76(11): ovad127. DOI: 10.1093/lambio/ovad127.
[35] Yang JS, Xu HB, Ke ZL, et al. Absolute quantification of viable *Vibrio cholerae* in seawater samples using multiplex droplet digital PCR combined with propidium monoazide[J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1149981. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1149981.
[36] Golpayegani A, Douraghi M, Rezaei F, et al. Propidium monoazide-quantitative polymerase chain reaction (PMA-qPCR) assay for rapid detection of viable and viable but non-culturable (VBNC) *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools[J]. *J Environ Health Sci Eng*, 2019, 17(1): 407–416. DOI: 10.1007/s40201−019−00359−w.
[37] Boyle AG, O'Shea K, Stefanovski D, et al. Detection of viable *Streptococcus equi equi* using propidium monoazide polymerase chain reaction[J]. *J Equine Vet Sci*, 2023, 128: 104893. DOI: 10.1016/j.jevs.2023.104893.
[38] Dong L, Liu HM, Meng L, et al. Quantitative PCR coupled with sodium dodecyl sulfate and propidium monoazide for detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk[J]. *J Dairy Sci*, 2018, 101(6): 4936–4943. DOI: 10.3168/jds.2017−14087.
[39] 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]. *J Microbiol Methods*, 2013, 95(1): 32–38. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.06.003.
[40] Codony F, Agustí G, Allué-Guardia A. Cell membrane integrity and distinguishing between metabolically active and inactive cells as a means of improving viability PCR[J]. *Mol Cell Probes*, 2015, 29(3): 190–192. DOI: 10.1016/j.mcp.2015.03.003.
[41] 凌南. 副溶血弧菌 SD-PMA-qPCR 活菌检测方法的建立及应用[D]. 南京: 南京农业大学, 2019. DOI: 10.27244/d.cnki.gnjnu.2019.001739.
Ling N. Establishment and application of SD-PMA-qPCR detection method for *Vibrio paraholyticus*[D]. Nanjing: *Nanjing Agricultural University*, 2019. DOI: 10.27244/d.cnki.gnjnu.2019.001739.
[42] 李善志, 吴清平, 张菊梅, 等. RT-PCR 方法检测单核细胞增生李斯特活菌研究[J]. 中国卫生检验杂志，2006，16(6)：641–643.
Li SZ, Wu QP, Zhang JM, et al. Detection of viable *Listeria monocytogenes* with RT-PCR assay[J]. *Chin J Health Lab*

Technol, 2006, 16(6): 641–643.

[43] 张冲, 刘祥, 陈计峦. 实时荧光定量 RT-PCR 检测沙门氏菌活菌[J]. 食品工业科技，2012，33(6)：91–94. DOI：10.13386/j.issn1002−0306.2012.06.026.
Zhang C, Liu X, Chen JL. Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction detection of live *Salmonella*[J]. *Sci Technol Food Ind*, 2012, 33(6): 91–94. DOI: 10.13386/j.issn1002−0306.2012.06.026.

[44] 王云华, 罗诗龙, 伍朝晖, 等. 实时荧光 RT-PCR 方法检测水及水产品中霍乱弧菌[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2006, 29(5): 311−313. DOI: 10.3969/j.issn.1004-9770.2006.05.017.
Wang YH, Luo SL, Wu ZH, et al. Research on detecting *Vibrio cholerae* in water sample and marine product by real-time fluorescence quantitative RT-PCR[J]. *Chin J Front Health Quar*, 2006, 29(5): 311−313. DOI: 10.3969/j.issn.1004-9770.2006.05.017.

[45] 赵泓, 刘凡. 流式细胞仪[J]. 安徽农学通报，2006，12(12)：39–41,80. DOI：10.3969/j.issn.1007−7731.2006.12.017.
Zhao H, Liu F. Flow cytometry[J]. *Anhui Agric Sci Bull*, 2006, 12(12): 39–41,80. DOI: 10.3969/j.issn.1007−7731.2006.12.017.

[46] 孙福齐, 撒昱, 李奇峰, 等. 流式细胞分选仪研究进展与展望[J]. 中国医学物理学杂志，2023，40(7)：890–898. DOI：10.3969/j.issn.1005−202X.2023.07.016.
Sun FQ, Sa Y, Li QF, et al. Advances and prospect of flow cytometer[J]. *Chin J Med Phys*, 2023, 40(7): 890–898. DOI: 10.3969/j.issn.1005−202X.2023.07.016.

[47] 林怡雯, 杨天, 李丹, 等. 基于 CTC-流式细胞仪活性细菌总数的快速检测技术研究[J/OL]. 环境科学学报, 2013, 33(9): 2511-2515. DOI：10.13671/j.hjkxxb.2013.09.007.
Lin YW, Yang T, Li D, et al. Rapid detection of total active bacteria based on CTC-flow cytometry [J/OL]. Journal of environmental science, 2013, 33 (9) : 2511-2515. DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2013.09.007.

[48] 刘晓露. 利用流式细胞仪对饮用水中细菌的快速检测[D/OL]. 北京，北京林业大学, 2014.
Liu XL. Rapid detection of bacteria in drinking water by flow cytometry [D/OL]. Beijing, Beijing Forestry University, 2014.

[49] Wang M, Bai ZY, Liu SY, et al. Accurate quantification of total bacteria in raw milk by flow cytometry using membrane potential as a key viability parameter[J]. *LWT*, 2023, 173: 114315. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.114315.

[50] 王喜先, 孙晴, 刁志钿, 等. 拉曼光谱技术在单细胞表型检测与分选中的应用进展[J]. 合成生物学，2023，4(1)：204–224.
Wang XX, Sun Q, Diao ZD, et al. Advances with applications of Raman spectroscopy in single-cell phenotype sorting and analysis[J]. *Synth Biol J*, 2023, 4(1): 204–224.

[51] 阮真, 朱鹏飞, 付晓婷, 等. 单细胞拉曼技术在病原微生物检测中的研究进展[J]. 微生物学通报，2021，48(4)：1348–1359. DOI：10.13344/j.microbiol.china.200703.
Ruan Z, Zhu PF, Fu XT, et al. Detection of pathogenic microorganism by single-cell Raman spectroscopy: a review[J]. *Microbiol China*, 2021, 48(4): 1348–1359. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.200703.

[52] Yan J, Yu Y, Kang JW, et al. Development of a classification model for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) using confocal Raman micro-spectroscopy[J]. *J Biophotonics*, 2017, 10(12): 1703–1713. DOI: 10.1002/jbio.201600303.

[53] Huang WE, Griffiths RI, Thompson IP, et al. Raman microscopic analysis of single microbial cells[J]. *Anal Chem*, 2004, 76(15): 4452–4458. DOI: 10.1021/ac049753k.

[54] 宋雨欣, 王东琦, 秦璐, 等. 单细胞拉曼光谱技术在环境和生物研究中的应用[C]//中国环境科学学会 2022 年科学技术年会论文集. 南昌: 中国环境科学学会, 2022: 735−739.
Song YX, Wang DQ, Qin L, et al. Application of Single-cell Raman spectroscopy in Environmental and biological research[C]//Proceedings of the 2022 Annual Science and Technology Conference of the Chinese Society for Environmental Sciences. Nanchang: *Chinese Society for Environmental Sciences*, 2022: 735−739.

[55] 王桢干, 周志慧. 拉曼光谱在微生物研究中的应用[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(71): 151−152. DOI: 10.19613/j.cnki.1671-3141.2019.71.070.
Wang ZG, Zhou ZH. Application of Raman spectroscopy in microbial studies[J]. *World Latest Med Inf Dig*, 2019, 19(71): 151−152. DOI: 10.19613/j.cnki.1671-3141.2019.71.070.

[56] 阮真, 朱鹏飞, 张磊, 等. 基于单细胞拉曼技术鉴定非结核分枝杆菌的方法研究[J]. 光谱学与光谱分析，2021，41(11)：3468–3473. DOI：10.3964/j.issn.1000−0593(2021)11−3468−06.
Ruan Z, Zhu PF, Zhang L, et al. Study on identification of non-tuberculosis mycobacteria based on single-cell Raman spectroscopy[J]. *Spectrosc Spectral Anal*, 2021, 41(11): 3468–3473. DOI: 10.3964/j.issn.1000−0593(2021)11−3468−06.

[57] 李备, 张来明, 李文杰. 单细胞拉曼分选技术在大肠杆菌分离中的应用[J]. 生物化工，2020，6(2)：75–77. DOI：10.3969/j.issn.2096−0387.2020.02.021.
Li B, Zhang LM, Li WJ. Application of single cell Raman sorting technique in separation of Escherichia coli[J]. *Biol Chem Eng*, 2020, 6(2): 75–77. DOI: 10.3969/j.issn.2096−0387.2020.02.021.

[58] Zhang J, Ren LH, Zhang L, et al. Single-cell rapid identification, in situ viability and vitality profiling, and genome-based source-tracking for probiotics products[J]. *iMeta*, 2023, 2(3): e117. DOI: 10.1002/imt2.117.

[59] Liu M, Zhu PF, Zhang L, et al. Single-cell identification, drug susceptibility test, and whole-genome sequencing of *Helicobacter pylori* directly from gastric biopsy by clinical antimicrobial susceptibility test ramanometry[J]. *Clin Chem*, 2022, 68(8): 1064–1074. DOI: 10.1093/clinchem/hvac082.

[60] 中国科学院青岛生物能源与过程研究所. 基于单细胞拉曼技术的益生菌活菌测量方法及其试剂盒: 中国, 202111330295.5[P]. 2022−02−08.
Qingdao Institute of Bioenergy and Process, Chinese Academy of Sciences. Measurement method and kit of probiotic viable bacteria based on single cell Raman technology: CN, 202111330295.5[P]. 2022−02−08.

[61] 刘聪, 张传伦, 谢伟, 等. 一种单细胞拉曼光谱技术测定氨氧化古菌代谢活性的方法: 中国, 201910473050.4[P]. 2019−09−13.
Liu C, Zhang CL, Xie W, et al. A method for the determination of metabolic activity of ammonia-oxidizing archaea by single-cell Raman spectroscopy: CN, 201910473050.4[P]. 2019−09−13.

刘丽

ORCID：0009−0004−6575−6471

作者贡献：

刘丽：文献收集、文章撰写

魏强：研究指导、文章审阅

本文创新点和学术评论句见开放科学（OSID）平台，欢迎扫描开放科学（OSID）二维码，与作者开展交流互动

引用本文：刘丽，魏强. 细菌活性检测方法研究进展及其应用探讨[J]. 疾病监测，2023，38(12)：1519 − 1525. DOI: 10.3784/jbjc.202309220501

Liu L，Wei Q. Research progress and application of bacterial activity detection methods[J]. *Dis Surveill*, 2023, 38(12): 1519 − 1525. DOI: 10.3784/jbjc.202309220501

（本文编辑：杨小平）