

流式细胞术在乳品微生物检测中的应用

Application of flow cytometry in microbial detection of dairy products

祁 岩^{1,2,3} 游春苹^{1,2,3}

QI Yan^{1,2,3} YOU Chun-ping^{1,2,3}

(1. 乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436; 2. 上海乳业生物工程技术研究中心, 上海 200436; 3. 光明乳业股份有限公司乳业研究院, 上海 200436)

(1. State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Shanghai 200436, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Dairy Biotechnology, Shanghai 200436, China; 3. Dairy Research Institute, Bright Dairy and Food Co., Ltd., Shanghai 200436, China)

摘要:阐述了流式细胞仪的工作原理、结构及流式细胞术在乳品微生物检测中的方法和应用,并展望了未来的研究方向。

关键词:流式细胞术;乳品;微生物;检测

Abstract: The principles and structures of flow cytometer, the methods and applications of flow cytometry in microbial detection of dairy products were introduced in this review, and the future research direction was prospected.

Keywords: flow cytometry; dairy products; microorganism; detection

乳是理想的天然食品之一。它包括多种品类,例如液态乳、发酵乳制品(如酸奶和奶酪)和经干燥提炼后的乳制品(如奶粉和炼乳)^[1]。乳品中可能存在多种微生物,有影响产品质量和消费者健康的腐败菌和致病菌,也有可以改善乳品发酵工艺和功能性的益生菌。鉴于微生物对乳品的影响,目前乳品微生物检测越来越受到关注。

现阶段,常用的乳品微生物检测技术包括传统计数法、免疫分析检测技术、PCR 技术、ATP 生物荧光技术和基因芯片技术等^[2-3]。这些技术在乳品微生物检测方面各有优势,也各有不足之处,如传统计数法检测成本低、操作简单,但检测时效长。传统 PCR 技术快速、简单,但无法区分死活细胞。

流式细胞术是应用流式细胞仪,对悬浮单细胞进行

快速定量分析和分选,是集电子技术、激光技术和计算机技术于一体的先进的生物学测定技术,具有高灵敏度、高通量、高精度和多参数检测等多个功能特征^[4-5]。流式细胞术起初应用在医学临床检验领域,随着科技的发展和仪器不断的改进与完善,目前该技术已被应用于分子生物学、免疫学、病毒学、癌症生物学、传染病监测和食品检测等多个学科^[4,6]。

近年来,流式细胞术在乳品微生物检测领域发挥了广泛的作用。文章拟结合国内外相关研究,探讨流式细胞术在乳品微生物检测方面的进展,旨在为流式细胞术在乳品领域中进一步的开发提供参考。

1 流式细胞术

1.1 流式细胞术的发展

流式细胞术最早可追溯到 20 世纪 30 年代。1934 年, Moldaven 提出了流式细胞仪的概念原型,他设想让细胞检测自动化,并使光电记录仪记录通过单根毛细管的细胞数量。1949 年, Coulter 提出了在悬液中计数粒子的方法。1953 年, Parker 和 Hutcheon 描述了全血细胞计数装置,是流式细胞仪的雏形。1967 年, Kamemtsky 和 Melamed 提出了细胞分选方法。1969 年, Van Dilla Fulwyler 等发明了第一台荧光检测细胞仪。20 世纪 70 年代,流式细胞术开启了商业化进程,一批生产流式细胞仪的公司如 Becton Dickinson 和 Beckman Coulter 逐渐涌现;90 年代开始,流式细胞术迈向了低成本、易操作、多用途、高精尖的发展历程。迄今为止,流式细胞术的发展已日臻完善,研究人员越来越侧重于检测样品的制备、软件开发等方面,以扩大流式细胞术在不同领域的应用范围^[7-8]。

基金项目:上海市优秀技术带头人计划(编号:20XD1430100);上海乳业生物工程技术研究中心(编号:19DZ2281400)

作者简介:祁岩,女,光明乳业股份有限公司研究员,博士。

通信作者:游春苹(1982—),女,光明乳业股份有限公司正高级工程师,博士。E-mail: youchunping@brightdairy.com

收稿日期:2022-08-18 **改回日期:**2022-10-14

1.2 流式细胞仪的工作原理和结构

流式细胞仪的基本工作原理是利用激光对鞘液中的染色细胞标志物进行测量,并记录其荧光宽度、荧光强度和散射光强度等参数^[8]。传统的流式细胞仪主要由液流系统、光学系统和电子系统三部分组成(图 1)。液流系统包括液流驱动系统和流动室。液流驱动系统主要提供压力和进行压力调节。细胞悬液在压力作用下进入流动室,同时被加压后的鞘液也自鞘液管进入流动室,在鞘液的包被下,细胞悬液由流动室的喷嘴喷出形成细胞液柱。

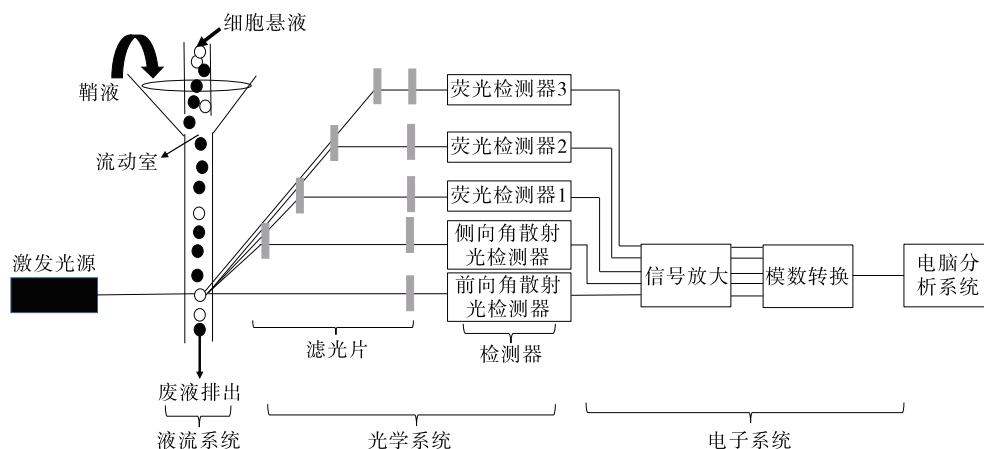


图 1 流式细胞仪结构示意图^[9]

Figure 1 Schematic diagram of flow cytometer

2 流式细胞术检测乳品微生物的方法

应用流式细胞术检测乳品中微生物需要经过样品前处理、样品染色、流式细胞仪测定等过程。样品前处理方法、缓冲液的选择、荧光染料的选择等都会影响检测结果的准确性。

2.1 样品前处理

乳及乳制品中含有丰富的乳蛋白和乳脂肪等物质,在使用流式细胞仪检测前,需要经过一定的样品前处理以减少背景干扰。针对非液态乳品,需要将其转化为液体基质进行后续研究。Wang 等^[13]将奶粉溶于缓冲蛋白胨水中制成液相。Yanachkina 等^[14]采用液压奶酪压榨机将磨碎的奶酪挤出奶酪汁备用。针对液态乳品,通常的做法是将样品用纱布过滤去除杂质,用蛋白酶降解蛋白质,加入 TritonX-100 以破碎牛乳体细胞,通过离心实现脂肪分离^[15-17]。除了用通常的样品前处理方法,刘思渊等^[16]还采用牛奶中微生物快速纯化试剂盒处理样品,该试剂盒可直接去除牛奶中的脂肪和蛋白质颗粒,使样品纯化时间由传统的 30 min 缩短至 15 min。

2.2 缓冲液的选择

样品经过前处理后得到细胞悬液。细胞悬液需要用缓冲液稀释,缓冲液中的阳离子含量可影响染色质量和检测结果。Sahalan 等^[18]和 Kathrin 等^[19]均发现缓冲液

光学系统包括激发光源和光束收集系统。细胞液柱在激发光的照射下,产生荧光信号和散射光信号,之后,光束收集系统中的滤光片将荧光信号引导至特定检测器。电子系统将来自检测器的信号经过放大和模数转换使其成为计算机可以读取的数字信号,该信号被送至计算机,经过数据处理和分析得出结果。值得一提的是具有分选功能的流式细胞仪还包括了分选系统。细胞的分选是指将待测液滴给予不同电荷,使其在高压电场作用下发生偏转,落入指定的收集容器内,实现细胞的分离^[6,10-12]。

阳离子缺乏可影响大肠杆菌(*Escherichia coli*)细胞膜的稳定性和活力,进而影响荧光信号,因此,建议用 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 来补充缓冲液。Haruta 等^[20]研究表明使用标准缓冲液,经过流式细胞仪分析仪可检测到低于 30% 的大肠杆菌和低于 40% 的鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella* Typhimurium)阳性信号,而向标准缓冲液中添加 Ca^{2+} 后,大肠杆菌阳性信号检出可达 90% 以上,鼠伤寒沙门氏菌阳性信号检出可达 80% 以上。Kathrin 等^[19]还用磷酸缓冲盐溶液、M9 缓冲盐溶液和 Tris-HCl 分别培养大肠杆菌,应用流式细胞仪进行检测,对比 3 种缓冲液对荧光信号的影响,发现磷酸缓冲盐溶液更适宜用于稀释。目前在乳品微生物检测中大多应用未补充阳离子的磷酸缓冲盐溶液,可建议在缓冲盐溶液中适当添加阳离子以提高检测质量。

2.3 荧光染料的选择

流式细胞术对乳品中微生物的定量以及活性的检测依赖于荧光染料。染料稳定性、染色强度等均影响染料作用效果^[21]。表 1 列举了乳品微生物检测时常用的染料种类及原理。根据不同检测目的,可选择不同染料品类。孙芝杨等^[15]选用 PI 染料定量乳品的细菌总数。刘思渊等^[16]用偶联有荧光染料 FITC 的细菌单克隆抗体对大肠杆菌 O157:H7 进行特异性标记,通过流式检测方法,快

表 1 乳品微生物检测常用的荧光染料

Table 1 Fluorescent dye commonly used for microbial detection of dairy products

染料名称	原理	用途	参考文献
碘化丙啶(PI)	不能通过活细胞膜,仅能对膜受损的细胞进行染色	单独使用可定量受损细胞;可	[15]
7 氨基放线菌素 (7-AAD)	与 PI 作用相似,但发射波谱较 PI 窄,是一种核酸染料,可发出红色荧光,不能透过正常质膜,随着细胞受损程度的增加,荧光强度越大	以与 SYTO®9 等染料双色联用,定量活细胞和死细胞	[22]
噻唑橙二聚体-1 (TOTO-1)	核酸染料,不能通过正常细胞质膜,可发出黄绿色荧光信号		[23]
溴化乙锭(EB)	核酸染料,不能通过正常细胞质膜,可发出橙红色荧光信号		[24]
绿色荧光染料 SYTO®9/24	核酸染料,可对活和死细菌进行染色;染色效果可能由于不同细胞种类略有差异,因此研究者需要视情况选用不同型号的绿色荧光染料	可与 PI 等染料联用,用于定量活细胞和死细胞	[25—26]
绿色荧光染料 SYBR® Green	可结合双链 DNA 分子发出绿色荧光		[27—28]
吖啶橙(AO)	染料可渗透入活细胞和死细胞中,并通过嵌入或静电吸引与 DNA 和 RNA 相互作用,结合单链 DNA/RNA 可发出红色荧光,双链 DNA 可发出绿色荧光	可以准确检测革兰氏阴性菌和真菌,可定量活细胞和死细胞	[29]
羧基荧光素双乙 酸酯(cFDA)	本为非荧光分子,扩散到细胞内,与胞内酯结合,产生荧光物质聚集于活细胞生成荧光产物,可在活细胞内进行积累。易受细胞种类的影响,可能由于胞内酯差异所致	用于活细胞定量,可与 PI 等染料联用	[30—31]
异硫氰酸荧光素 (FITC)	可与抗体蛋白结合作用于待检测细菌,并释放出绿色荧光	对检测物质进行特异性标记,快速定量检测污染物	[16]

速定量牛乳中的大肠杆菌 O157: H7。He 等^[25]采用 SYTO9 和 PI 两种染料双色联用研究乳品中乳酸菌(Lactic acid bacteria)的存活情况。经过染色后,流式细胞仪可通过检查荧光信号强度定量细胞总数或对细胞的死活以及损伤状态等方面进行判断。

3 流式细胞术在乳品微生物检测中的应用

3.1 乳品质量安全方面的应用

目前乳品行业发展迅速,微生物引发的乳品质量安全问题也愈发凸显。微生物检测是监控乳品质量安全不可缺少的一个环节。现阶段,在乳品工业中,乳品微生物检测一般采用计数法,该方法需要对细菌进行增菌、培养等一系列步骤,耗时较长。多数乳品的保质期较短,需要尽快销售,所以当在实验室完成检测时,产品可能已经销售掉了。因此,需要进行乳品中微生物的快速且准确检测,帮助生产者对乳品质量实施在线控制并及时规避风险。流式细胞术可对乳品中的细菌总数及活菌数进行快速定量和鉴定。孙芝杨等^[15]用流式细胞术可在 1 h 内测得液态乳中细菌总数。Liu 等^[32]应用流式细胞仪通过高选择性荧光标记抗体和 PI 定量奶粉和液态奶中金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)活菌数,可在 6 h 内(包

括 5 h 增菌过程)检测出金黄色葡萄球菌,在奶粉和液态奶中的检出限分别为 8.30,7.50 mL⁻¹。Wnuk 等^[29]应用成像流式细胞仪(Imaging flow cytometry, IFC)结合 AO 染料,同时应用多个 IFC 参数进行表征,成功且快速地筛选出牛奶中的 8 种细菌。表 2 为应用流式细胞仪快速检测乳品中微生物的相关参数,对比费时耗力的平板计数法,运用流式细胞术检测效率得到了极大提高,有助于乳品质量的保障。

在乳品的有害菌中,还存在着一类活的非可培养态(Viable but non-culturable, VBNC)微生物,其引发的安全风险不容忽视。VBNC 意为微生物在不良环境下进入异常的生理状态,它们具有代谢活性,却不能被培养或进行繁殖,但在某些特殊复苏条件下,可恢复正常生理状态^[35—36]。在乳品加工中,存在着诸多环境胁迫因素,例如低 pH、低水分活度和抗生素,它们都可以诱导微生物进入 VBNC 状态,使其在常规微生物检测中不能被发现。同时,还有研究^[37]表明 VBNC 态的微生物比可培养态的微生物对抑菌物质具有更大的耐受性。因此,鉴别 VBNC 态微生物在乳品质量安全领域具有实用价值。运用流式细胞术可通过细胞形态或生理情况等判断乳品中的 VBNC 态微生物^[38—39]。Zhang 等^[39]应用流式细胞术等方法研究了用于奶牛疾病治疗的氨苄青霉素诱导阪崎

表 2 乳品微生物流式检测的相关系数

Table 2 Correlation coefficient of microbial flow cytometry in dairy products

研究对象	样品	检测时间	检出限	参考文献
沙门氏菌	奶粉	<7 h (包括 6 h 增菌)	1 (25 g) ⁻¹	[13]
	牛奶	<7 h (包括 6 h 增菌)	20 CFU/mL	[33]
金黄色葡萄球菌	超高温瞬时灭菌奶	45~55 min	10 ³ CFU/mL	[33]
	牛奶	约 30 min	10 ³ CFU/mL	[34]
大肠杆菌	超高温瞬时灭菌奶	40~60 min	10 ⁴ CFU/mL	[33]
	牛奶	60 min	10 ³ CFU/mL	[33]
单增李斯特菌	牛奶	30 min	1.3×10 ³ CFU/mL	[33]

克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*)进入 VBNC 态的能力。阪崎克罗诺杆菌是污染奶粉的主要病原菌之一,它可对免疫力低下人群尤其是婴幼儿健康产生危害。Zhang 等^[39]研究发现了 10⁴~10⁵ mL⁻¹不可培养的活细菌,这些细菌可以在适宜条件下复苏,其形态较正常细胞不同,具有呼吸链活性,判断细菌进入了 VBNC 状态,及时避免了抗生素诱导的 VBNC 态阪崎克罗诺杆菌可能造成的健康风险。目前,国内外应用流式细胞仪评估乳品中 VBNC 态有害微生物的研究相对较少,仍需要进一步丰富。

流式细胞术还可以通过检测乳品中有害微生物的生理状态快速评估加工工艺和抑菌物质的抑菌效果。Li 等^[40]应用流式细胞术和平板计数法对比了微波容积加热与传统的管式换热对脱脂牛奶中原生细菌和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)及其内生孢子的灭活作用。两种检测方法均证明了微波容积加热与管式换热以相似的程度灭活了细菌和内生孢子。相比平板计数法,运用流式细胞仪检测速度较快,还可提供细胞渗透性等一系列生理数据,这些数据可以整合到未来乳品质量控制和风险评估策略中。Mieszkina 等^[41]使用乳酸菌作为生物保护培养物防止发酵乳中酵母的腐败,应用流式细胞术评估了酵母活力、膜电位、细胞内 pH 和活性氧的产生,提供了乳酸菌抗真菌机制的信息,为防止乳制品真菌腐败的栅栏技术选取提供更多理论依据。

3.2 乳品发酵方面的应用

对乳酸菌进行定量分析是评估发酵剂和发酵乳制品质量的重要因素。中国制定了 GB 19302—2010《食品安全国家标准 发酵乳》,规定乳酸菌数≥1×10⁶ CFU/mL (或 CFU/g)。益生菌常被加入发酵乳及乳饮料中,其菌种的生长和存活可以改善乳品发酵工艺和提高乳品的功能性。2015 年 12 月,国际标准化组织(International Standard Operation, ISO)制定了标准化方法 ISO19344: 2015,介绍了用流式细胞仪分析乳制品发酵剂中乳酸菌和益生菌的活性和总量。目前,已有研究人员采用流式细胞术对乳酸菌和益生菌展开了活细胞快速定量分析。

杜耿记等^[42]采用流式细胞仪对 29 种市售酸奶中的乳酸菌进行了快速定量检测,与传统的国标检测方法(GB 4789.35—2010)数据相近,且培养时间由 48 h 缩短至 13 min,极大提高了检测速度。王杰等^[43]通过流式细胞术对发酵乳饮料和发酵乳中的乳酸菌快速检测,检测结果与平板计数法具有较好的相关性,且单样品检测时间不超过 10 min。Chiron 等^[44]应用流式细胞术结合多克隆抗体针对 5 种不同物种的益生菌进行了计数、鉴定和活力评估研究,该检测方法仅耗时 2 h。

除了对发酵菌种进行快速定量检测外,流式细胞术还可检测发酵细菌的生理状态。Yanachkina 等^[14]采用流式细胞仪研究了不同盐分和脂肪含量在切达奶酪成熟过程中对发酵剂中细菌生理状态的影响,发现盐和脂肪水平的变化会影响发酵剂中细胞的自溶、透化以及细胞内酶释放等性能。Poudel 等^[27]运用流式细胞仪研究了奶酪发酵剂中细菌在奶酪贮藏过程中的存活情况,发现奶酪中约 5%的总发酵剂培养细胞在贮藏 6 d 后死亡,另外 3%~19%的细胞被认定为具有半透性的活细胞,它们具备代谢活性,可释放细胞内酶进入奶酪,促使奶酪贮藏中风味物质的形成,由此可见,鉴定发酵菌细胞的生存状态对于评估乳制品的风味具有重要意义。

4 结语与展望

流式细胞术在乳品微生物检测领域已有一定的应用与发展,但仍存在一些不足。检测方法方面:① 流式细胞仪价格昂贵,检测样品的制备和数据的分析都需要专业人员完成。目前,流式细胞仪大多在科研机构和医学领域应用,较难在工业界推广。② 乳品样品的前处理方法仍有待开发和完善。液态乳、发酵乳、奶粉和奶酪已有相关前处理方法,但主要是针对蛋白质和脂肪的去除,消除其他乳品成分造成的背景信号干扰的相关研究仍较为缺乏。检测项目方面:检测项目较为单一,目前,多数研究围绕乳品中微生物快速定量或生理状态展开,研究内容有待进一步拓展。

针对上述不足,流式细胞术可以从以下方面发展。检测方法方面:① 使流式细胞仪便携化,目前智能手机类

似于微型计算机,具有通信、拍照、信息处理和加工等功能,可将智能手机上设定检测分析程序,远程对检测结果进行分析。② 开发新型的智能算法,使数据分析更为方便,同时也节约了人员培训的成本。③ 进一步挖掘样品前处理技术,尽最大可能减少不同种类乳品造成的背景干扰。检测项目方面:① 应用流式细胞仪检测乳品加工管道中生物膜。生物膜可附着于管道、机械等地方,它可以对抗菌物质进行理化防御,降低抑菌效率。与浮游细菌相比,细菌生物膜更难以应付^[45-46]。因此,寻求快速量化该类菌体的方法显得至关重要。目前运用流式细胞仪检测乳品微生物的研究仍基本围绕浮游微生物展开,乳品管道内生物膜检测仍需补充。② 进一步开发特异性抗体,鉴别不同种类甚至不同品系的菌种,为乳品中微生物的快速溯源提供有效支持。③ 将流式细胞术与组学技术相结合,通过流式细胞术可获得细菌表现型信息,组学技术可获得基因相关信息,更加清晰地了解乳品中微生物的生理状态。

总之,乳品微生物检测一直是乳品工业界关注的热点。流式细胞术具有检测速度快,可鉴定细胞存活状态等优点,在乳品领域应用越来越广泛。随着时代的进步,流式细胞术也在不断地更新迭代,流式细胞术在检测中存在的问题也将会被一一解决。

参考文献

- [1] 郭本恒. 乳品安全[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 3, 179-195.
GUO B H. Dairy safety[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015: 3, 179-195.
- [2] 陈嘉惠, 陈沁, 钮冰. 乳品中有害微生物检测技术的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(5): 32-36.
CHEN J H, CHEN Q, NIU B, et al. Research progress on detection techniques of harmful microorganisms in dairy products[J]. China Dairy Industry, 2019, 47(5): 32-36.
- [3] 韩利慧. 乳制品中快速微生物检测技术分析[J]. 中国标准化, 2018(24): 185-186.
HAN L H. Analysis of rapid microbial detection in dairy products[J]. China Standardization, 2018(24): 185-186.
- [4] 刘婷婷, 于靓, 孟冬青, 等. 流式细胞术在液体基质食品检测中的应用研究进展[J]. 上海师范大学学报, 2020, 49(6): 630-636.
LIU T T, YU J, MENG D Q, et al. Progress on the application of flow cytometry in the detection of liquid matrix foods[J]. Journal of Shanghai Normal, 2020, 49(6): 630-636.
- [5] 夏天爽. 流式细胞术在食品微生物检测领域的研究进展[J]. 食品安全导刊, 2019(34): 62-64.
XIA T S. Research progress of flow cytometry in the detection of food microorganisms[J]. China Food Safety, 2019(34): 62-64.
- [6] MCKINNON K M. Flow cytometry: An overview [J]. Current Protocols in Immunology, 2018, 120: 5.1.1-5.1.11.
- [7] 杭海英, 刘春春, 任丹丹. 流式细胞术的发展、应用及前景[J]. 中国生物工程杂志, 2019, 39(9): 68-83.
HANG H Y, LIU C C, REN D D. Development, application and prospect of flow cytometry[J]. China Biotechnology, 2019, 39(9): 68-83.
- [8] 赵书涛, 武晓东, 王策, 等. 流式细胞仪的原理、应用及最新进展[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(22): 4 378-4 381.
ZHAO S T, WU X D, WANG C, et al. Principles, applications and latest developments of flow cytometer [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(22): 4 378-4 381.
- [9] CASTILLO-HAIR S. FlowCal: Software for analysis and calibration of flow cytometry data[EB/OL]. (2016-07-06) [2022-04-21]. <https://benchling.com/pub/tabor-flowcal>.
- [10] 王建红. 流式细胞技术在医学检验中的应用研究进展[J]. 临床检验杂志, 2017, 6(1): 149-150.
WANG J H. Advances in the application of flow cytometry in medical examination[J]. Clinical Laboratory Journal, 2017, 6(1): 149-150.
- [11] 张艺. 流式细胞仪构成与工作原理[J]. 医疗设备信息, 2005, 20(8): 25-26.
ZHANG Y. The introduction to the flow cytometer[J]. Information of Medical Equipment, 2005, 20(8): 25-26.
- [12] 何克建. 流式细胞技术与流式细胞仪[J]. 医疗设备, 2000, 13(5): 6-8.
HE K J. Flow cytometry and flow cytometer [J]. Medical Equipment, 2000, 13(5): 6-8.
- [13] WANG B, LIU S, SUI Z, et al. Rapid flow cytometry detection of single viable *Salmonella* cells in milk powder [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2020, 17(7): 447-458.
- [14] YANACHKINA P, MCCARTHY C, GUINEE T, et al. Effect of varying the salt and fat content in Cheddar cheese on aspects of the performance of a commercial starter culture preparation during ripening [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 224: 7-15.
- [15] 孙芝杨, 黄闯, 李新建, 等. 流式细胞法对乳制品细菌总数的快速检测研究[J]. 食品工业, 2016, 37(11): 180-182.
SUN Z Y, HUANG C, LI X J, et al. Rapid determination of total number of bacterial in dairy products by flow cytometry[J]. The Food Industry, 2016, 37(11): 180-182.
- [16] 刘思渊, 古少鹏, 隋志伟, 等. 流式分析技术快速定量检测牛乳中大肠杆菌 O157:H7[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 302-306.
LIU S Y, GU S P, SUI Z W, et al. Rapid and quantitative detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk by flow cytometry[J]. Food Science, 2018, 39(6): 302-306.
- [17] GUNASEKERA T S, ATTFIELD P V, VEAL D A, et al. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(3): 1 228-1 232.
- [18] SAHALAN A Z, AZIZ A H A, LIAN H H, et al. Divalent cations (Mg^{2+} , Ca^{2+}) protect bacterial outer membrane damage by polymyxin B[J]. Sains Malaysiana, 2013, 42(3): 301-306.
- [19] KATHRIN T, BERGMILLER T, GUET C. Lack of cations in flow cytometry buffers affect fluorescence signals by reducing membrane stability and viability of *Escherichia coli* stains [J].

- Journals & Biotechnology, 2018, 268: 40-52.
- [20] HARUTA S, LINO T, OHKUM A, et al. Ca^{2+} in hybridization solutions for fluorescence in situ hybridization facilitates the detection of Enterobacteriaceae[J]. Microbes and Environments, 2017, 32(2): 142-146.
- [21] 王锐敏, 贾瑞宝, 逯南南, 等. 流式细胞术在水质检测领域的研究进展[J]. 中国环境检测, 2020, 36(3): 114-121.
- WANG R M, JIA R B, LU N N, et al. Progress of flow cytometry in the field of water quality testing[J]. Environmental Monitoring in China, 2020, 36(3): 114-121.
- [22] 杨莉婷, 何丽, 何海宁, 等. 流式细胞术对生乳中微生物检测的应用研究[J]. 广西师范大学学报, 2017, 35(2): 112-116.
- YANG L T, HE L, HE H N, et al. The application of flow cytometry in testing bacteria of raw milk[J]. Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition), 2017, 35(2): 112-116.
- [23] BUNTHOF C J, ABEE T. Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(6): 2 934-2 942.
- [24] CASSOLI L D, LIMA W J, ESGUERRA J C, et al. Do different standard plate counting (IDF/ISSO or AOAC) methods interfere in the conversion of individual bacteria counts to colony forming units in raw milk[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(4): 1 052-1 058.
- [25] HE S, HONG X, HUANG T, et al. Rapid quantification of live/dead lactic acid bacteria in probiotic products using high-sensitivity flowcytometry [J]. Methods and Applications in Fluorescence, 2017, 5(2): 024002.
- [26] GENNOVESE M, POULAIN E, DOPPLER F, et al. Bacillus spore enumeration using flow cytometry: A proof of concept for probiotic application[J]. Journal of Microbiological Methods, 2021, 190: 106336.
- [27] POUDEL R, THUNELL R K, OBERG C J, et al. Comparison of growth and survival of single strains of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus cremoris* during cheddar cheese manufacture [J]. Journal of Dairy Science, 2022, 105(3): 2 069-2 081.
- [28] BENSCH G, RÜGER M, WASSERMANN M, et al. Flow cytometric viability assessment of lactic acid bacteria starter cultures produced by fluidized bed drying [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(11): 4 897-4 909.
- [29] WNUK M, LEWINSKA A. Imaging flow cytometry-based analysis of bacterial profiles in milk samples[J]. Food and Bioprocesses, 2021, 128: 102-108.
- [30] GENG J, CHIRON C, COMBRISSE J. Rapid and specific enumeration of viable *Bifidobacteria* in dairy products based on flow cytometry technology: A proof of concept study [J]. International Dairy Journal, 2014, 37: 1-4.
- [31] GANDHI A, SHAH N P. Effect of salt on cell viability and membrane integrity of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* as observed by flow cytometry [J]. Food Microbiology, 2015, 49: 197-202.
- [32] LIU S, WANG B, SUI Z, et al. Faster detection of *Staphylococcus aureus* in milk and milk powder by flow cytometry[J]. Foodborne Pathogen and Disease, 2021, 18(5): 346-353.
- [33] 梅仕良, 姜凯, 张娜娜, 等. 流式细胞仪检测技术在食源性致病菌检测中的应用[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2017, 46(5): 757-761.
- MEI S L, JIANG K, ZHANG N N, et al. Application of flow cytometry technique in detection of foodborne pathogens [J]. Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences), 2017, 46(5): 757-761.
- [34] 李萍, 温平威, 许恒毅, 等. 流式细胞术在食源致病菌检测中的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(14): 375-379.
- LI P, WEN P W, XU H Y, et al. Research progress in application of flow cytometry in detection of foodborne pathogen[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(14): 375-379.
- [35] 王亚利, 包秋华, 王俊国, 等. 乳酸菌活的非培养态的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2016, 44(3): 41-45.
- WANG Y L, BAO Q H, WANG J G, et al. Progress on the viable but non-culturable (VBNC) state of Lactic acid bacteria[J]. China Dairy Industry, 2016, 44(3): 41-45.
- [36] 郭慧玲, 邵玉宇, 高姝冉, 等. 细菌活的非可培养态研究[J]. 中国乳品工业, 2014, 42(1): 31-36.
- GUO H L, SHAO Y Y, GAO S R, et al. Research on the viable but non-culturable (VBNC) state of bacteria[J]. China Dairy Industry, 2014, 42(1): 31-36.
- [37] 李静薇, 杨雅迪, 李婷婷, 等. VBNC 细菌的抗生素耐受机制及治疗研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册), 2022, 43(1): 1-9.
- LI J W, YANG Y D, LI T T, et al. Research progress on antibiotic tolerance mechanism and treatment of bacteria in VBNC state[J]. World Notes on Antibiotics, 2022, 43(1): 1-9.
- [38] 赵黎黎, 包秋华, 赵国芬. 细菌 VBNC 态检测技术的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(4): 96-101.
- ZHAO L L, BAO Q H, ZHAO G F. Advances in test techniques of viable but non-culturable state of bacteria [J]. Journal of Microbiology, 2016, 36(4): 96-101.
- [39] ZHANG J, WANG L, SHI L, et al. Survival strategy of *Cronobacter sakazakii* against ampicillin pressure: Induction of the viable but nonculturable state [J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 334: 108819.
- [40] LI N, SANTILLAN-URQUIZA E, CRONIN U, et al. Assessment of the response of indigenous microflora and inoculated *Bacillus licheniformis* endospores in reconstituted skim milk to microwave and conventional heating systems by flow cytometry[J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(9): 9 627-9 644.
- [41] MIESZKIN S, HYMERY N, DEBAETS S, et al. Action mechanisms involved in the bioprotective effect of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1.Np against *Yarrowia lipolytica* in fermented milk[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 248: 47-55.

(下转第 235 页)

- [35] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中氯丙醇及其脂肪酯含量的测定: GB 5009.191—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. National food safety standards determination of chloropropanols and its fatty acid esters in foods: GB 5009.191—2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [36] HAKME E, HERRMANN S S, POULSEN M E. Chlorate and perchlorate residues in food products on the Danish market[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2021, 39(3): 551-559.
- [37] 詹胜群, 张浩, 周钧, 等. 超高效液相色谱—串联质谱法测定婴幼儿配方乳粉中氯酸盐和高氯酸盐[J]. 食品科技, 2022, 47(1): 312-318.
- ZHAN S Q, ZHANG H, ZHOU Y, et al. Determination of chlorate and perchlorate in infant formula milk powder by UPLC-MS/MS [J]. Food Science and Technology, 2022, 47(1): 312-318.
- [38] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中指示性多氯联苯含量的测定: GB 5009.190—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National Food Safety Standards determination of indicative polychlorinated biphenyls in foods: GB 5009.190—2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.
- [39] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中丙烯酰胺的测定: GB 5009.204—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standards determination of acrylamide in food: GB 5009.204—2014 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.
- [40] 杨琳, 于欣平, 王梦, 等. 中国 12 个省份母乳中全氟化合物前体物质含量分析[J]. 中华预防医学杂志, 2015, 49(6): 529-535.
- YANG L, YU X P, WANG M, et al. Analysis of perfluoroalkyl substances precursors in human milk from 12 provinces of china [J]. Chinese Preventive Medicine, 2015, 49(6): 529-535.
- [41] MACHEKA L R, OLOWOYO J O, MUGIVHISA L L, et al. Determination and assessment of human dietary intake of per and polyfluoroalkyl substances in retail dairy milk and infant formula from South Africa[J]. Science of the Total Environment: Part 2, 2021, 755(10): 142697.

(上接第 220 页)

- [52] 冯佳雯, 郑云芳, 张芳, 等. 超声处理对鲈鱼肌原纤维蛋白结构和功能特性的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(17): 95-103.
- FENG J W, ZHENG Y F, ZHANG F, et al. Effects of ultrasonic treatment on structural and functional properties of myofibrillar protein in sea bass[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(17): 95-103.
- [53] DENG S, LU L, YANG W, et al. Effect of electron irradiation on the gel properties of *Collichthys lucidus* surimi [J]. Radiation Physics & Chemistry, 2017, 130(1): 316-320.
- [54] 罗华彬, 林露, 高星, 等. 电子束辐照对带鱼鱼糜内源性蛋白酶活性及其构象单元的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(9): 23-28.
- LUO H B, LIN L, GAO X, et al. Effect of electron beam irradiation on the activity and conformational unit of endogenous proteases from hairtail surimi [J]. Food Science, 2019, 40(9): 23-28.
- [55] 张晗, 高星, 宣仕芬, 等. 电子束辐照对鲈鱼肉肌原纤维蛋白生化特性及其构象的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(13): 81-86.
- ZHANG H, GAO X, XUAN S F, et al. Effect of electron beam irradiation on biochemical properties and structure of myofibrillar protein from *Lateolabrax japonicus* meat[J]. Food Science, 2019, 40(13): 81-86.
- [56] 李钊, 秦荣, 袁孝瑞, 等. 超高压对鲤鱼肉糜-MgCl₂凝胶特性的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(16): 53-58.
- LI Z, QIN R, YUAN X R, et al. Effects of high pressure processing on gel properties of carp surimi containing magnesium chloride[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(16): 53-58.

(上接第 226 页)

- [42] 杜耿记, 金珠, 吴小慧, 等. 流式细胞仪快速检测酸奶中乳酸菌含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(7): 2 810-2 814.
- DU G J, JIN Z, WU X H, et al. Determination the content of lactic acid bacteria in yogurt by flow cytometry [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2017, 8(7): 2 810-2 814.
- [43] 王杰, 郑亦舟, 姜凯, 等. 乳酸菌计数结果的比较研究[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2018, 47(6): 713-718.
- WANG J, ZHENG Y Z, JIANG K, et al. Comparative study on counting results in *Lactobacillus* counting method [J]. Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences), 2018, 47(6): 713-718.
- [44] CHIRON C, TOMPKINS T A, BURGUIÈRE P. Flow cytometry: A versatile technology for specific quantification and viability assessment of microorganisms in multi-strain probiotic products[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124(2): 572-584.
- [45] BARROS C, FULAZ S, VITALE S, et al. Interactions between functionalised silica nanoparticles and *Pseudomonas fluorescens* biofilm matrix: A focus on the protein corona[J]. PLoS One, 2020, 15(7): e0236441.
- [46] 张云, 邓彬. 幽门螺杆菌生物膜的形成及其在抗生素耐药中的作用[J]. 国际医药卫生导报, 2020, 26(22): 3 375-3 378.
- ZHANG Y, DENG B. Biofilm formation by *Helicobacter pylori* and its role in antibiotic resistance[J]. International Medicine and Health Guidance News, 2020, 26(22): 3 375-3 378.