

土壤病原微生物检测技术研究进展

徐菲, 杨凯, 朱龙吉, 林文芳, 崔丽

引用本文:

徐菲, 杨凯, 朱龙吉, 林文芳, 崔丽. 土壤病原微生物检测技术研究进展[J]. *农业环境科学学报*, 2022, 41(12): 2593–2603.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-1012>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

北苍术根腐病病原菌分离鉴定及其生防菌筛选

李超楠, 李洪涛, 李运朝, 李俊花, 及华, 章丽, 王琳

农业环境科学学报. 2022, 41(12): 2824–2830 <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-1131>

mVOCs在根际免疫中的研究进展及思考

王佳宁, 韦中, RAZAWaseem, 江高飞, 徐阳春, 沈其荣

农业环境科学学报. 2022, 41(4): 691–699 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-1018>

生物炭固定化微生物修复污染土壤研究进展

杜兆林, 陈洪安, 姚彦坡, 安毅

农业环境科学学报. 2022, 41(12): 2584–2592 <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-1169>

畜禽粪污处理处置中危险生物因子赋存与控制研究进展

张俊亚, 隋倩雯, 魏源送

农业环境科学学报. 2021, 40(11): 2342–2354 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-1132>

微生物砷甲基化及挥发研究进展

王培培, 陈松灿, 朱永官, 孙国新

农业环境科学学报. 2018, 37(7): 1377–1385 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0542>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

徐菲, 杨凯, 朱龙吉, 等. 土壤病原微生物检测技术研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(12): 2593–2603.

XU F, YANG K, ZHU L J, et al. Advances in the detection technology of pathogenic microorganisms in soil [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(12): 2593–2603.



开放科学 OSID

土壤病原微生物检测技术研究进展

徐菲^{1,2,3}, 杨凯¹, 朱龙吉¹, 林文芳¹, 崔丽^{1*}

(1. 中国科学院城市环境研究所, 福建省流域生态重点实验室, 福建 厦门 361021; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 福建农林大学资源与环境学院, 福州 350002)

摘要:病原微生物如细菌、病毒、真菌等广泛存在于土壤环境中,其严重威胁着全球公共卫生安全。发展病原微生物快速检测技术,对于减少病原菌扩散传播、防控传染性疾病预防、维护生物安全具有重要意义。本文对病原微生物检测技术的最新研究进展进行了综述,包括显色培养技术、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱、分子生物学技术、拉曼光谱技术、流式细胞技术和生物传感器等,并对其原理、应用及优缺点进行了全面比较。最后,对病原微生物检测技术的未来发展提出展望,旨在促进土壤环境病原微生物的快速检测和生物风险防控。

关键词:生物安全;土壤病原微生物;快速检测技术;分子生物学技术;拉曼光谱

中图分类号:R124 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2022)12-2593-11 doi:10.11654/jaes.2022-1012

Advances in the detection technology of pathogenic microorganisms in soil

XU Fei^{1,2,3}, YANG Kai¹, ZHU Longji¹, LIN Wenfang¹, CUI Li^{1*}

(1. Fujian Key Laboratory of Watershed Ecology, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. College of Resources and Environment, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Pathogenic microorganisms (e.g., bacteria, viruses, and fungi) are ubiquitous in soil environments, threatening global public health. The development of a rapid detection technology for environmental pathogens is of great significance to reduce the spread of pathogens, prevent and control infectious diseases, and maintain biosecurity. This article reviewed the recently developed and state-of-the-art techniques for detecting pathogenic microorganisms, including chromogenic cultivation, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, molecular biology tools, Raman spectroscopy, flow cytometry, and biosensors. A comprehensive overview and comparison of the principles, applications, advantages, and disadvantages of the presented techniques were shown. Finally, we put forward important perspectives for the future development of rapid detection methods, aiming to promote rapid diagnosis of soil pathogenic microorganisms and provide guidance for the control of biological risks.

Keywords: biosafety and biosecurity; soil pathogenic microorganism; rapid detection technique; molecular biology tool; Raman spectroscopy

收稿日期:2022-10-11 录用日期:2022-11-03

作者简介:徐菲(1998—),女,河北衡水人,硕士研究生,从事环境病原微生物快速检测研究。E-mail:fxu@iue.ac.cn

杨凯与徐菲同等贡献

*通信作者:崔丽 E-mail:lcui@iue.ac.cn

基金项目:国家自然科学基金项目(21922608,22176186);中科院“从0到1原始创新”项目(ZDBS-LY-DQC027);福建省自然科学基金项目(2022J05095)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China (21922608, 22176186); Chinese Academy of Sciences (ZDBS-LY-DQC027); The Natural Science Foundation of Fujian Province, China (2022J05095)

随着新型冠状病毒肺炎(COVID-19)疫情的全球蔓延,由病原微生物引起的生物安全受到了全球的关注。病原微生物是长期引起人类传染性疾病的罪魁祸首,严重威胁着公共健康安全。为了有效防控病原微生物的威胁,生物安全被提到了国家安全战略的层面。2020年10月17日通过的《中华人民共和国生物安全法》为维护国家安全、防范和应对生物安全风险、保障人民生命健康,提供了法律准则。另外,我国国家卫生计生委早在2017年就组织制定了《国家致病菌识别网工作实施方案》,明确提出要通过加强国家致病菌识别网建设,建立并不断完善适合我国国情的细菌性传染病监测模式,推进细菌性传染病监测预警新技术和策略应用,从而提高疫情发现和防控能力。

土壤中栖息着地球上最多样和最复杂的微生物群落^[1],是病原微生物赋存和大规模传播的主要媒介之一。并且土壤可耦合空气和水体等媒介,使得土壤病原微生物对植物、动物和人类的健康产生直接或间接的影响(图1)。土壤环境中的病原微生物种类多、来源广、风险异质性高、传播方式复杂多变,可通过环境介质在全球进行传播,造成全球性大流行病^[2-4]。例如,土壤中广泛存在单核细胞增生李斯特菌、炭疽杆菌、大肠杆菌O157:H7、军团菌、诺卡氏菌等病原细菌^[5],并且其中许多病原微生物具有多重抗生素耐药性。除细菌外,土壤中还生存着300多种可感染人类和植物的真菌^[1]。对土壤病原微生物进行快速监测是控制其传播的关键。为提高病原微生物的检测能力,有必要发展快速甚至实时、灵敏、准确的检测技术,以便快速发现和定位环境介质中的病原微生物,



图1 土壤、空气、水体、植物、动物和人类病原微生物之间的联系
Figure 1 Link between soil, air, water, plant, animal and human pathogenic microorganisms

采取适当措施,实施精准消杀,及时有效阻控病原微生物的传播^[6-7],保障生命健康安全。

为此,本文综述了新近发展的多种环境病原微生物检测技术,根据其是否依赖培养划分为两大类,并进一步根据其检测信息(基因型或表型)和原理分成6类(图2),包括显色培养技术、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术、分子生物学技术、拉曼光谱技术、流式细胞技术和生物传感器。本文对这些病原微生物检测技术进行了详细总结和对比,并进一步对未来病原微生物检测技术的发展提出展望,旨在为土壤环境病原微生物的快速检测和防控提供技术指导,保障生物安全。

1 基于培养的病原菌检测技术

1.1 显色培养技术

显色培养技术的原理是利用微生物生长繁殖过程中自身代谢产生的酶与相应显色底物反应显色,从而对目标微生物进行鉴定。该技术可直接对临床和环境中原微生物或者混有多种微生物的样本进行检测,培养时长约为18~24 h,现已成功用于水体^[8]以及临床^[9]中病原微生物的检测。目前常用的主要有大肠杆菌O157:H7、金黄色葡萄球菌、李斯特菌、沙门氏菌等显色培养基,该技术可对病原微生物进行粗筛和分离,其灵敏度和特异性优于传统培养基,但由于环境复杂、干扰较大,显色培养技术存在一定程度的误判,其准确性需要借助其他技术进行进一步确认。

1.2 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术

除显色培养基以外,基于培养的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)也被广泛用于病原微生物的快速检测。MALDI-TOF MS是近年来兴起的基于不同细菌特征蛋白指纹图谱的检测技术,通过对微生物菌落进行检测,并与数据库中已知病原菌信息比来实现病原微生物的快速诊断。该技术具有高通量、快速、准确、流程简单等特点,已成功应用于植物^[10]、临床^[11]病原微生物及其耐药性的相关研究中。

这两种依赖培养的方法虽已实现对病原微生物的检测,但是局限性在于无法对VBNC(Viable But Nonculturable)状态的病原菌或者环境中未培养的微生物开展研究^[12],并且需要对病原微生物进行培养,比较费时。

为了更好地实现环境中病原微生物的快速和准确鉴别,近年来发展出一些不依赖于培养的技术,这些

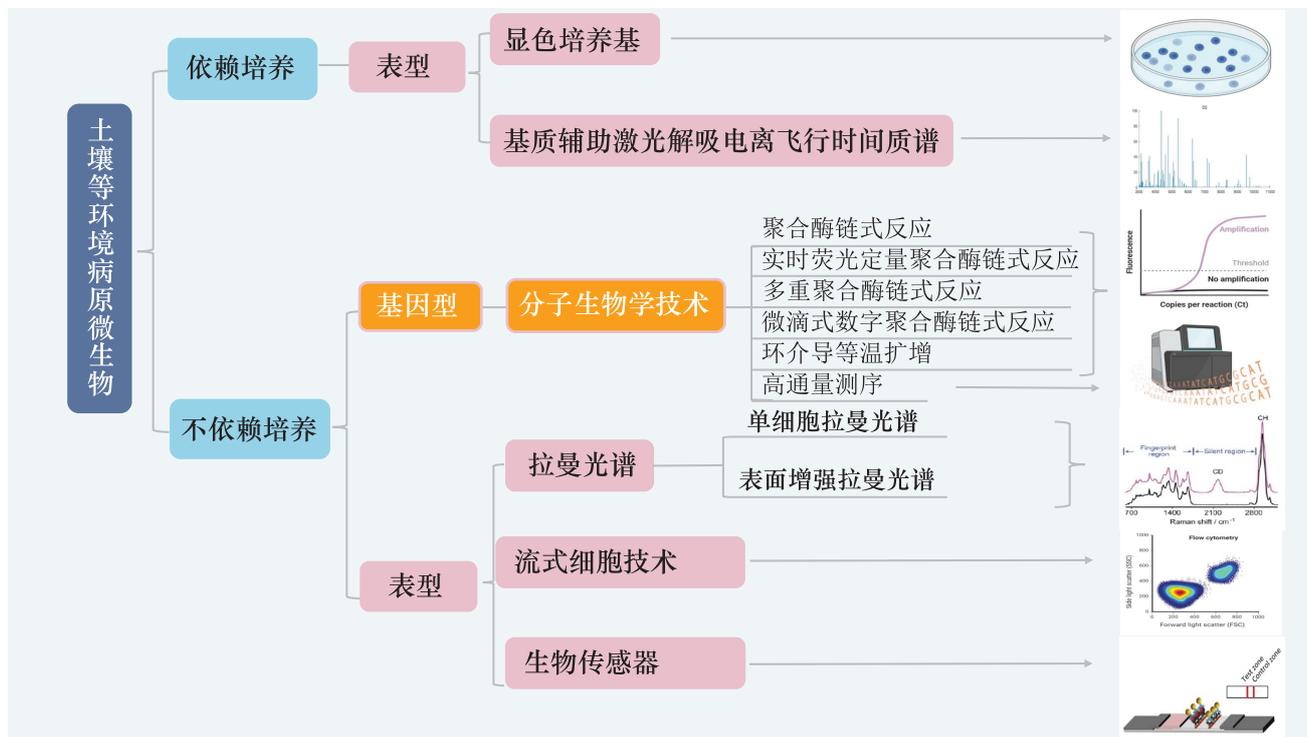


图2 土壤等环境病原微生物检测技术汇总

Figure 2 Summary of detection techniques for pathogenic microorganisms in soil and other environments

技术使得环境中病原微生物的快检得以迅速发展,并已投入到实际环境应用中,显示出巨大的发展潜力。

2 分子生物学技术

分子生物学技术用于快速检测病原微生物,主要是基于病原微生物的特异DNA或RNA标记基因序列进行分析,主要包含聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技术、高通量测序技术等。

2.1 PCR技术

PCR技术是在体外模拟DNA合成过程,通过三步反应循环(变性、退火和延伸)扩增特定的靶DNA序列,实现靶序列的指数扩增(图3A)。

实时荧光定量PCR(qPCR)技术是在PCR技术基础上,引入荧光染料或者探针,在扩增过程中实时监测目的基因的荧光信号强度,通过内参法或者外参法对样品中特定的基因进行定量分析(图3A)。qPCR技术相较于传统培养方法,大幅降低了病原微生物的检测限,且分析快速,目前已广泛用于快速检测和定量土壤、水体和空气等环境中的细菌、真菌等病原微生物。例如,NGUYEN等^[15]利用手持式便携qPCR系统对过滤水样中嗜冷黄杆菌实现了50 min内的快速现场监测。YAO等^[16]利用qPCR和Illumina测序技术

对施用生物炭后土壤细菌和真菌群落的变化进行了长期监测。

考虑到PCR技术检测通量低的局限性,研究者发展出了多重PCR技术。多重PCR技术是在PCR反应管中同时加入多种特异性引物进行PCR扩增,该技术具有高通量、低成本等优点。近年来,多重PCR技术为水环境中病原微生物的联合检测提供了一种快速、灵敏的方法,已成功应用于检测地表水中的大肠杆菌、铜绿假单胞菌、志贺氏菌属、沙门氏菌等病原微生物,检测限为 $3 \times 10^2 \sim 3 \times 10^3$ CFU·mL⁻¹[17]。朱永官团队还开发出病原菌检测的高通量定量PCR技术平台^[18-19](图3B)。该技术可以同时检测23种人类病原菌的68个标记基因和10种粪源宿主的23个标记基因进行定量检测。利用该技术,AN等^[14]对厦门13个海滨浴场的水体进行病原菌检测和污染溯源,为病原菌相关的健康评估提供了数据支持。

微滴式数字PCR(Droplet Digital PCR, ddPCR)是第三代PCR技术(图3A),可用于绝对定量,且比qPCR具有更高的聚合酶链式反应抑制剂的耐受能力,在处理复杂环境样品(如水样沉积物)时具有优势。SINGH等^[20]使用ddPCR和qPCR分别对河流沉积物中的沙门氏菌进行检测,发现ddPCR显著提高了

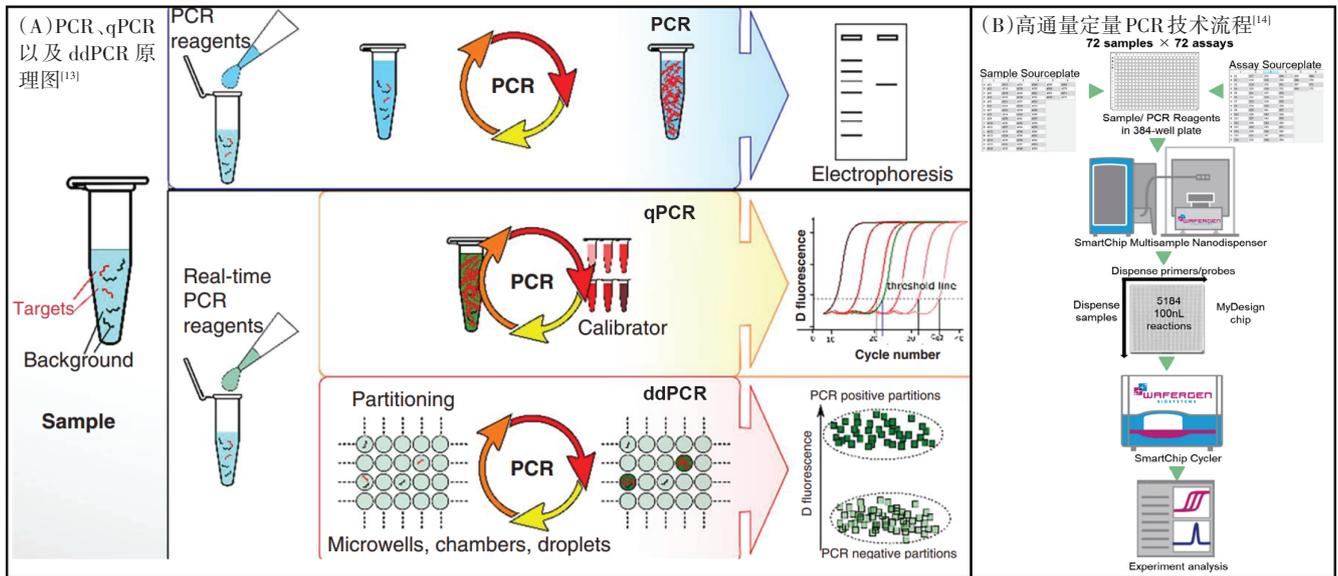


图3 PCR 相关技术原理及流程图
Figure 3 Principles and flowchart of PCR-related technology

分析灵敏度和低浓度沙门氏菌的检测,结果证明 ddPCR 更适用于沙门氏菌的检测,该技术稳定、准确、高通量,并且检测河流沉积物类的环境样品比 qPCR 更加灵敏。

上述 PCR 相关技术的主要缺点是设备昂贵,需要繁琐的热循环、额外的设备以及较高的专业技能。为了加快环境病原微生物的快速检测,环介导等温扩增 (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP) 投入应用,该技术是近年来新开发的一种恒温基因扩增技术^[21],主要包括模板合成、循环扩增以及延长和再循环阶段,具有简便、经济、快速、灵敏度高、特异性强等优点,缺点是扩增效率比较低、常因为非特异性而导致假阳性结果、引物设计复杂、反应体系容易被污染、扩增产物难定量等^[22]。LAMP 可以在资源匮乏地区且无专业技术人员情况下,进行环境中微生物的快速检测^[23],该技术已经被应用于检测空气中的金黄色葡萄球菌^[24]以及水体中的大肠杆菌^[25]、沙门氏菌^[25]等病原菌。

2.2 高通量测序

高通量测序主要利用特异性标记基因、毒力因子和 16S rRNA 基因鉴定致病菌,利用此技术可以获得环境中多种微生物物种、结构、功能以及遗传多样性等方面的丰富信息。该技术具有通量大、可直接测定病原微生物的核酸序列、检测限低等优势,但是检测成本高,难以完全取代常规病原微生物检测方法,且数据分析耗时。目前第二代测序技术是主导的测序

技术,主要的测序平台为 454 测序平台和 Illumina 测序平台^[7]。CAO 等^[26]利用 Illumina HiSeq2000 对雾霾空气微生物宏基因组进行了测序研究,在种的分类水平上对环境空气中细菌、真菌、古菌和 dsDNA 病毒等微生物进行了检测鉴定^[27]。YANG 等^[28]利用 Illumina 对水体环境和塑料际微生物的 16S rRNA 进行测序,并将测序结果与病原菌数据库进行比对,共检测到水体及塑料际包括分枝杆菌、李斯特菌、芽孢杆菌、假单胞菌、肠杆菌等在内的多种人体潜在致病菌。

3 拉曼光谱技术

拉曼光谱正发展成为一种不依赖于培养的微生物快速检测和识别的新兴检测手段。与分子生物学技术相比,拉曼光谱可以直接、快速、无损地对低至单个微生物进行检测,且可借助稳定同位素标记区分死、活细胞,为病原微生物的快速检测提供了新的手段。

3.1 拉曼光谱原理

1928 年,印度物理学家拉曼首次发现拉曼散射现象。拉曼光谱是一种基于分子振动的光谱技术。入射光与分子化学键作用后,发生非弹性拉曼散射,通过检测与入射光频率不同的拉曼散射光,获得物质的化学组成和分子结构等信息。

3.2 单细胞拉曼光谱

单细胞拉曼光谱研究微生物的主要优点包括^[28-29]:①单细胞水平检测。与光学显微镜结合可提供低至 1 μm 的空间分辨率,实现对单个细菌的直接

检测,克服冗长的培养限制,实现快速检测;②丰富的化学信息。拉曼光谱提供微生物所含多种生物分子的指纹图谱,包括核酸、蛋白质、脂质、色素(如类胡萝卜素、细胞色素c等),这些拉曼特征会随种属或生理状态的变化而灵敏改变。与统计分析或机器学习结合时,拉曼光谱可在不同分类水平,如属、种甚至菌株水平区分病原菌;③无损检测。允许下游特定功能单细胞的基因组分析,提供了一种关联拉曼表型和基因型的方法,对于全面深入认识环境中致病菌和抗生素耐药性非常重要^[29]。

近年来,基于不同微生物的特征指纹图谱,拉曼光谱已被用于快速识别土壤、水体、临床中的病原微生物,甚至在低至单个菌株水平上有很高的准确度。例如,WALTER等^[30]采用拉曼光谱结合线性判别分析(Linear Discriminant Analysis, LDA),研究了作为土壤重金属污染的生物指示剂——链霉菌属细菌,识别了不同Ni²⁺浓度培养基中链霉菌的单细胞拉曼光谱,预测精度为88%。此外,有研究者还利用拉曼光谱结合支持向量机鉴定瓶装矿泉水独立样本中的铜绿假单胞菌,准确率达到85%^[31]。SCHUSTER等^[32-33]首先在单细胞水平引入拉曼光谱进行微生物研究,证明拉曼光谱可以作为一种快速、可靠的技术方法用于人类致病菌——军团菌的识别分类。此后,MONTANARI等^[34]将单细胞拉曼技术与经典微生物检测技术相结合,成功鉴别出288份血液透析用水中分离的146种临床酵母菌种,证实了单细胞拉曼光谱对血液透析用水中真菌鉴别的可行性。

由于微生物光谱数据集差异较小,尤其是低信噪比的光谱利用传统的化学计量学方法难以区分,如LDA、偏最小二乘判别分析(Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA)、支持向量机(Support Vector Machine, SVM)以及随机森林(Random Forest, RF)等^[19,35]。为了解决这些挑战,深度学习算法如卷积神经网络(Convolutional Neural Network, CNN)、循环神经网络(Recurrent Neural Network, RNN)、生成式对抗网络(Generative Adversarial Networks, GAN)等成为一种有前景的解决途径,近几年在致病菌快速鉴别方面得到了成功应用。例如,LU等^[36]利用拉曼光谱结合CNN快速鉴定微生物单细胞并进行特征光谱提取(图4A),通过构建14种微生物的拉曼组数据库,在单细胞水平鉴定微生物的平均准确率达到95.64%,并且整个鉴定过程在5 min内完成。另外,拉曼光谱快速鉴别病原微生物也被应用到了临床菌

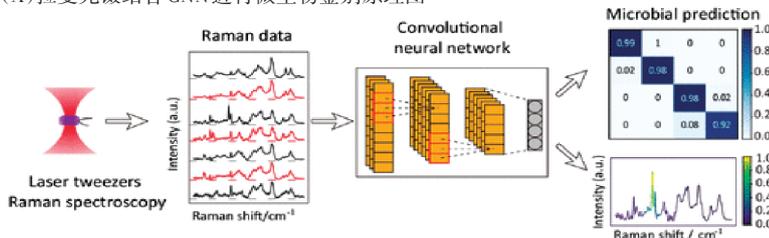
株的鉴定。例如,HO等^[35]利用30个临床病原菌分离菌株的拉曼光谱数据建立参考数据集,利用CNN训练识别模型(图4B),进一步结合独立验证集(临床患者新分离菌株的拉曼谱图)进行模型微调和性能优化,实现了临床患者分离菌株的成功鉴定,且仅10个光谱就可以获得高达99.7%的分类准确度,实现了从模拟到临床应用的转变。此外,QIN等^[37]开发了基于拉曼光谱结合深度学习的方法,实现了对6种典型病原菌细胞外囊泡的快速精准识别和生成机制研究,在菌株水平的分类准确度达到93%。值得注意的是,微生物的生长状态和环境因素很容易引发拉曼光谱特征的变化,因此对于基于拉曼光谱的病原菌鉴别,生理状态(生长阶段、介质)^[38-39]、环境因素(pH、温度、水分等)^[40-41]以及样品处理过程^[42]等都需纳入拉曼数据集,以构建稳定的病原菌鉴别模型。

此外,单细胞拉曼光谱结合稳定同位素标记还可用于研究微生物的活性^[19,29,43],当细菌通过代谢活动摄入²D、¹³C、¹⁵N等同位素标记物后,细胞重要组成成分如脂类、蛋白质、细胞色素、胡萝卜素等的拉曼谱峰会出现显著的“红移”,并且“红移”的程度与同位素摄入量成正比。例如,细菌摄入D₂O之后,细菌拉曼谱峰会在生物静默区出现一个明显的C-D峰(2 040~2 300 cm⁻¹),从而可以灵敏、快速地实现对细菌活性的研究。如YANG等^[28,44]发展了单细胞拉曼光谱结合重水同位素标记的方法,实现了病原菌和塑料际微生物在抗生素压力下的活性研究(图4C)。

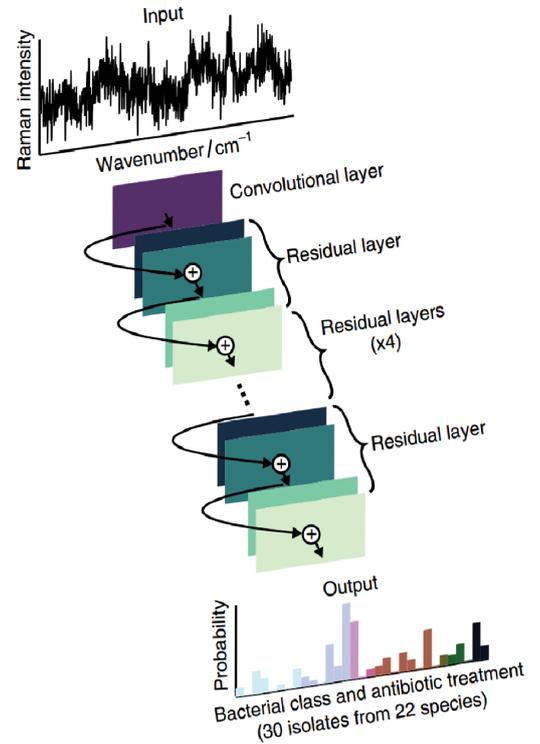
3.3 表面增强拉曼光谱

常规拉曼散射效率低,在一定程度上制约了弱信号和高通量检测。相比之下,表面增强拉曼光谱^[45-48](Surface-enhanced Raman Spectroscopy, SERS)借助金、银等纳米粒子1×10³~1×10⁸倍的表面增强拉曼散射效应,可大幅提高方法检测灵敏度^[49-51]。TADESSE等^[52]通过优化金纳米棒的表面等离子体共振增强效应,以及与细菌之间的静电作用,获得了液体中不同细菌的高质量SERS谱图(图5A)。ZHOU等^[53]通过在细菌表面原位合成银纳米粒子,实现了饮用水中活细菌的SERS检测,并且该方法对细菌拉曼信号的增强作用比简单混合的胶体-细菌悬浮液高约30倍,所需时间仅为10 min。不仅如此,SERS还可以与其他检测技术结合实现环境中致病菌的快速识别。例如,通过抗体、蛋白质、酶等目标特异性识别元素修饰SERS基底,可实现样品中病毒和细菌的快速、高效、低检测限识别。WANG等^[54]利用Fe₃O₄@Ag纳米颗粒作为磁

(A)拉曼光谱结合CNN进行微生物鉴别原理图^[36]



(B)用于致病菌低信噪比光谱鉴别的CNN结构图^[35]



(C)单细胞拉曼光谱结合重水同位素标记揭示塑料际生物膜和浮游细菌的抗生素耐药表型^[28]

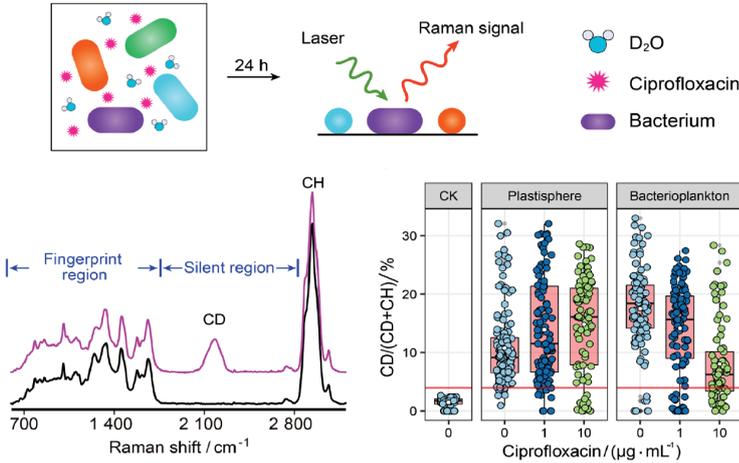


图4 单细胞拉曼光谱在细菌分类及其活性表征中的应用

Figure 4 Application of single-cell Raman spectrum in bacterial classification and its activity character

性SERS纳米标签(图5B),结合双层拉曼染料分子和目标病毒捕获抗体,同时检测甲型H1N1流感病毒和人体腺病毒,实现了在溶液中对目标病毒的特异性识别、磁性富集以及在试纸条带上对病毒的SERS检测。

由于SERS需借助纳米金或银获得增强拉曼信号,纳米基底的构筑以及细菌样品的制备方法对细菌SERS信号影响很大。为此,CUI等^[45,55]系统研究了纳米金和银对细菌SERS谱图特征的影响,发现纳米银的杀菌作用会影响细菌SERS谱图,提出了纳米金更适合作为细菌SERS识别的基底。在此基础上,CUI等^[56]发展了一种基于均匀真空过滤的细菌SERS样品制备技术,实现了多个细菌样品SERS信号的高度重现性和均匀性,并利用该基底建立了SERS灵敏、快速识别抗生素抗性诱导因素的新方法。

3.4 拉曼谱图处理及微生物鉴定算法

微生物拉曼光谱由于其内在复杂性,通常需要借助先进的数据统计方法以从中挖掘出有用信息,实现不同微生物光谱细微差异的准确辨别。在进行统计分析之前,应对原始光谱进行预处理,包括宇宙射线背景去除、基线校正、光谱归一化等,以提高其质量和

可靠性。20世纪90年代,机器学习方法被发现能够有效区分不同分子的光谱^[57],机器学习是多种算法的统称,深度学习是其中之一,二者同属于人工智能的范畴。经典的机器学习算法包括两大类:①无监督学习,如K均值(K-means)、层次聚类(Hierarchical Clustering)、主成分分析(Principal Components Analysis, PCA)、奇异值分解(Singular Value Decomposition, SVD);②监督学习,如线性回归(Linear Regression)、逻辑回归(Logistic Regression)、LDA、决策树(Decision tree)、K邻近(K-nearest Neighbors, KNN)、SVM、RF等,以及深度学习(如CNN等)。无监督学习算法中,PCA和SVD是目前最为常用的方法,广泛用于高维数据降维分析。有监督学习方法目前应用最多的是SVM、LDA以及CNN,它们可以从大量数据中学习目标数据的特征,从而实现精准预测。近年来,随着人工智能的不断创新发展,机器学习算法已被应用于细菌鉴定、诊断应用、材料分析等领域。

4 流式细胞技术

流式细胞技术(Flow Cytometry, FCM)是一种对

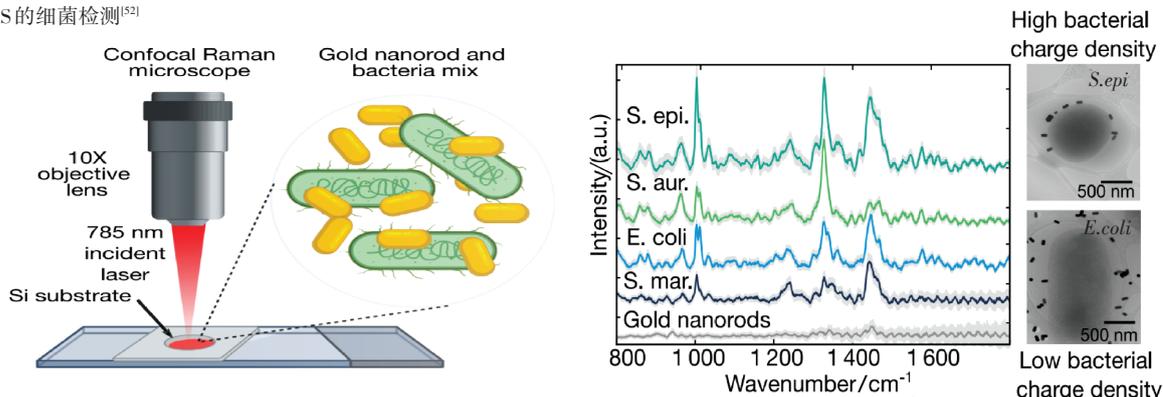
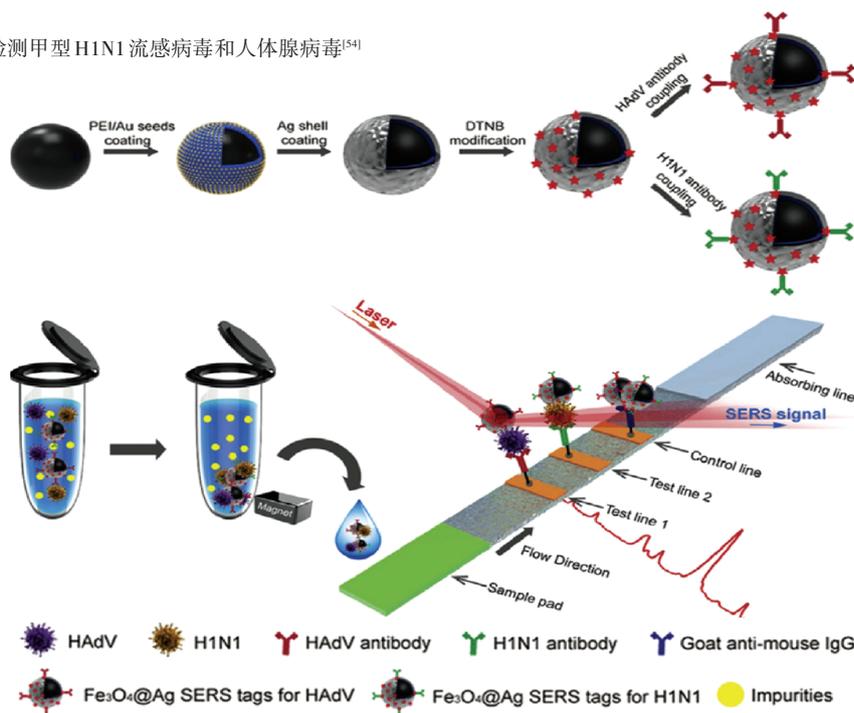
(A) 基于SERS的细菌检测^[52](B) 基于横向流免疫SERS检测甲型H1N1流感病毒和人体腺病毒^[54]

图5 表面增强拉曼光谱在病原微生物检测方面的应用

Figure 5 SERS in the application of pathogenic microorganisms

流过光学或电子检测器的细胞或其他生物微粒(如细菌和真菌)进行定量分析/分选的技术,可实现每秒快速高通量分析/分选 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 个细胞^[58],其设置适用于自动化,是在线监测细菌的良好选择^[59]。但是,该技术也存在一些局限性,如运行成本高、需进行染色预处理、染料与非生物颗粒结合易造成假阳性、检测范围受限^[60]等。

流式细胞技术已被广泛应用于检测或定量土壤及天然水体如河流、湖泊、地下水等环境中的微生物,以评价水处理效能等,并且自动化流式细胞技术可以表征水源地微生物的实时波动状况^[61]。如HERNLEM等^[62]利用表达绿色荧光蛋白的大肠杆菌 O157:H7 喂养土壤分离物中的四膜虫,通过流式细胞术对致病嗜

菌原生动动物进行了检测、计数以及分选。此外,将流式细胞仪与荧光原位杂交技术(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)结合使用,利用特异核酸序列作为荧光探针,可实现对致病菌/功能菌群的标记和检测。例如,ZHU等^[63]利用酶联荧光原位杂交(CARD-FISH)与流式细胞仪相结合,对污泥样品中的厌氧细菌进行了定量分析。除此以外,流式细胞仪结合不同的荧光染料^[64],可区分生物和非生物颗粒、死和活的细胞等,如CHEN等^[64]利用该方法对医院污水处理厂曝气池中产生的细菌和真菌微生物的总浓度和活性进行了准确评估。

随着微生物检测技术的不断进步,在线实时监测逐渐成为可能,BESMER等^[65]在2014年开展了自动在

线流式细胞术原位动态监测水生生态系统微生物的研究,并在2016年首次应用于地下水处理系统^[66],监测期间细菌浓度显示出了前所未有的周期性以及非周期性变化,为饮用水处理系统的原位在线监测提供了技术支持,也为微生物的实时风险评估提供了可能性。

5 生物传感器

生物传感器是一种将生物敏感元件(主要包括抗体、酶、凝集素、核酸等)与靶标之间的物理或化学反应转移到传感器(包括光纤、表面等离子体共振、场效应晶体管等),传感器把接收到的信号转换成可测量的电、声、温信号并输出表示的一种技术^[67]。1962年CLARK等^[68]首次报道了基于酶的生物传感器,而后伴随着生物学、分析化学、纳米材料科学等学科的不断发展与交叉融合,生物传感器得到了迅速发展。根据分子识别原件、信号转换器、被测目标与分子识别原件之间的作用等,可将生物传感器分为多类,如光学、微生物、电流型传感器等。生物传感器具有速度快、灵敏度高、专一性强、成本低、操作简单等优点,缺点是细菌细胞会引起薄膜阻抗增加、革兰氏阴性菌检测限高、光流传感器灵敏度低以及对酸碱度、质量变化、温度非常敏感^[69]等。

光学生物传感器,尤其是比色生物传感器充分体现了生物传感器的优势,如基于侧向流测定的比色光学生物传感器^[70]已投入使用,其可利用抗体在10 min内完成对大肠杆菌O157、李斯特菌和沙门氏菌的检测。OSTROV等^[71]建立了一种简单、可现场检测、高特异性的比色测定法——基于酿酒酵母的病原多肽检测,该方法将G蛋白偶联受体与可见的、无试剂的番茄红素读数相结合,对添加真菌病原多肽的土壤样本进行一步快速试纸检测,证实了这种比色生物传感器在真菌病原体检测方面的实用性。此外,不同材质的生物传感器展现出不同的检测能力,且已成功应用于土壤、水体、空气中的病原微生物快检。

6 总结与展望

近年来,病原微生物感染引起的水传、呼吸道、食源性传染病等问题越来越严重,对环境包括土壤中的病原微生物进行快速检测和识别,是有效控制各类传染性疾病发生的关键性环节。环境中病原微生物的检测技术,逐渐从传统的培养方法,发展为现在的分子生物学技术、拉曼光谱技术、生物传感器等快速检测技术,从而可有效应对生物安全形势面临的各项挑战。

对于未来发展,提出几点展望:

(1)发展土壤病原微生物快速检测技术。本文综述的相关技术虽已部分实现临床和环境病原微生物的快速检测,但是仍存在诸多局限性,其研究主要聚焦人类致病菌,对土壤复杂环境以及土壤-植物体系的病原微生物的研究仍较少。未来病原微生物检测技术需在保证精准性的前提下,向快速、灵敏、便携的方向发展。例如:拓宽分子生物学技术检测范围,实现多种土壤病原微生物的高通量分析,简化预处理阶段,降低成本;对于拉曼光谱技术,应建立土壤病原微生物的标准谱图数据库,并加强共享;对于流式细胞技术,研发针对土壤病原微生物的特异荧光探针,结合土壤微生物预处理技术,将检测领域扩展到水体以外的土壤环境。

(2)实现环境样品采集、处理、检测、分析一体化。环境介质中病原微生物浓度一般较低,不适合仪器设备直接进行检测,大多需要预富集再进行后续步骤,样品制备繁琐、耗时,目前很少有样品预富集-处理-检测一体化设备。实现采样仪器与检测设备的系统集成,对缩短环境中病原微生物的检测时间,提升检测效率,减少在传统采样过程中对病毒等气载病原菌的损伤作用等,具有重要的意义。

(3)多种技术相结合,充分发掘各技术的优势,补齐短板。例如,未来拉曼光谱技术可结合微流控、人工智能、环境微生物大拉曼数据谱库,并构建小型便携的自动检测系统,实现真实环境中(空气、水体、土壤、临床)病原微生物的快速、准确、原位检测。

(4)在技术发展的基础上,推动土壤等环境病原微生物的数据库、风险评估和防控体系建立,具体包括:①建立土壤等环境病原微生物大数据库。加快推进我国环境病原菌识别网的建成,统筹各地疾控、医院、科研单位等不同机构获得的环境病原微生物相关信息,共享病原菌识别、基因组溯源、分子分型、抗生素耐药性相关信息,以期实现环境中细菌性传染病的快速溯源、监测与防控;②增设环境病原微生物的耐药性检测项目。在“*One Health*”框架下,推进环境病原微生物病原识别与抗生素耐药性相关工作;③加快建设适合我国国情的环境微生物定量风险评估系统。针对我国主要出现的优势菌株、相关疾病以及抗生素暴露情况,以问题为导向,构建基础的环境微生物污染和剂量-反应关系等数据库,建立适合我国人群特征、生活方式、优势菌株类型的环境微生物风险评估模型,以期实现对人体暴露于环境病原微生物以及抗生素

耐药菌的潜在风险评估,及时采取措施进行防控。

参考文献:

- [1] BANERJEE S, VAN DER HEIJDEN M G A. Soil microbiomes and one health[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022. doi:10.5167/uzh-220261.
- [2] 李庆梅,张亮亮,张洪,等.基于纳米技术的病原微生物核酸快速检测研究进展[J]. *临床检验杂志*, 2019, 37(7):491-494. LI Q M, ZHANG L L, ZHANG H, et al. Research progress of rapid nucleic acid detection of pathogenic microorganisms based on nanotechnology[J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 2019, 37(7):491-494.
- [3] MOTLAGH M A, YANG Z. Detection and occurrence of indicator organisms and pathogens[J]. *Water Environment Research*, 2019, 91(10):1402-1408.
- [4] JING W, ZHAO W, LIU S, et al. Microfluidic device for efficient airborne bacteria capture and enrichment[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(10):5255-5262.
- [5] BAUMGARDNER D J. Soil-related bacterial and fungal infections[J]. *Journal of the American Board of Family Medicine*, 2012, 25(5):734-744.
- [6] ARTIKA I M, WIYATNO A, MA'ROEF C N. Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2020, 81:104215.
- [7] YOO K, LEE T K, CHOI E J, et al. Molecular approaches for the detection and monitoring of microbial communities in bioaerosols: A review [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2017, 51:234-247.
- [8] KURPAS M, MICHALSKA M, ZAKRZEWSKI A, et al. First report of the presence of *Vibrio vulnificus* in the gulf of Gdansk[J]. *International Maritime Health*, 2021, 72(4):247-251.
- [9] 张银旺,荣媛. CPS4显色培养基在分离鉴定泌尿道病原菌中的价值[J]. *检验医学与临床*, 2014, 12(23):3272-3274. ZHANG Y W, RONG Y. The application value of CPS4 chromogenic culture media in isolation and identification of urinary pathogens[J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2014, 12(23):3272-3274.
- [10] CHUN S, GOPAL J, MUTHU M. A consolidative synopsis of the MALDI-TOF MS accomplishments for the rapid diagnosis of microbial plant disease pathogens[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2022, 156:116713.
- [11] LUETHY P M, JOHNSON J K. The use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the identification of pathogens causing sepsis[J]. *Journal of Applied Laboratory Medicine*, 2019, 3(4):675-685.
- [12] 李晓旭,翁祖峰,曹爱丽,等.室内空气中致病微生物的种类及检测技术概述[J]. *科学通报*. 2018, 63:2116-2127. LI X X, WENG Z F, CAO A L, et al. An overview about varieties and detection methods of pathogenic microorganisms in indoor air[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2018, 63:2116-2127.
- [13] PERKEL J M. PCR past, present & future[J]. *Scientist*, 2013, 27(12):63-65.
- [14] AN X L, WANG J Y, PU Q, et al. High-throughput diagnosis of human pathogens and fecal contamination in marine recreational water [J]. *Environmental Research*, 2020, 190:109982.
- [15] NGUYEN P L, SUDHEESH P S, THOMAS A C, et al. Rapid detection and monitoring of flavobacterium psychrophilum in water by using a handheld, field-portable quantitative PCR system[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2018, 30(4):302-311.
- [16] YAO Q, LIU J, YU Z, et al. Three years of biochar amendment alters soil physicochemical properties and fungal community composition in a black soil of northeast China[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2017, 110:56-67.
- [17] AKHTARI L, MEMARIANI M, RANJBAR R, et al. Multiplex PCR for detection of water-borne bacteria[J]. *Water Supply*, 2017, 17(1):169-175.
- [18] SU J Q, CUI L, CHEN Q L, et al. Application of genomic technologies to measure and monitor antibiotic resistance in animals[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2016, 1388(1):121-135.
- [19] CUI L, LI H Z, YANG K, et al. Raman biosensor and molecular tools for integrated monitoring of pathogens and antimicrobial resistance in wastewater[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2021, 143:116415.
- [20] SINGH G, SITHEBE A, ENITAN A M, et al. Comparison of droplet digital PCR and quantitative PCR for the detection of salmonella and its application for river sediments[J]. *Journal of Water and Health*, 2017, 15(4):505-508.
- [21] NOTOMI T, MORI Y, TOMITA N, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Principle, features, and future prospects[J]. *Journal of Microbiology*, 2015, 53(1):1-5.
- [22] 沈燕,贾舒宇,李紫涵,等.水环境中致病菌分子生物学检测技术研究进展[J]. *环境监控与预警*, 2020, 12(5):1-13. SHEN Y, JIA S Y, LI Z H, et al. A review on molecular biological technologies for detection of pathogenic bacteria in water environments[J]. *Environmental Monitoring and Forewarning*, 2020, 12(5):1-13.
- [23] MARTZY R, KOLM C, BRUNNER K, et al. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of *Enterococcus* spp. in water[J]. *Water Research*, 2017, 122:62-69.
- [24] JIANG X, JING W, SUN X, et al. High-throughput microfluidic device for LAMP analysis of airborne bacteria[J]. *ACS Sensors*, 2016, 1(7):958-962.
- [25] LIN X, HUANG X, ZHU Y, et al. Asymmetric membrane for digital detection of single bacteria in milliliters of complex water samples[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(10):10281-10290.
- [26] CAO C, JIANG W, WANG B, et al. Inhalable microorganisms in Beijing's PM_{2.5} and PM₁₀ pollutants during a severe smog event[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(3):1499-1507.
- [27] 艾铄,张雨杰,肖芃颖,等.高通量测序技术在环境微生物领域的应用与进展[J]. *重庆理工大学学报(自然科学)*, 2018, 32(9):111-121. AI S, ZHANG L J, XIAO P Y, et al. Application and progress of high-throughput sequencing technology in the field of environmental microorganisms[J]. *Journal of Chongqing University of Technology (Natural Science)*, 2018, 32(9):111-121.
- [28] YANG K, CHEN Q L, CHEN M L, et al. Temporal dynamics of antibiotic resistome in the plastsphere during microbial colonization[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54:11322-11332.
- [29] 杨凯,李弘哲,朱永官,等.基于拉曼光谱的快速细菌诊断[J]. *光散*

- 射学报, 2019, 31(4):336-345. YANG K, LI H Z, ZHU Y G, et al. Rapid bacterial diagnosis by raman spectroscopy[J]. *The Journal of Light Scattering*, 2019, 31(4):336-345.
- [30] WALTER A, KUHHI S, REINICKE M, et al. Raman spectroscopic detection of nickel impact on single streptomyces cells: Possible bioindicators for heavy metal contamination[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2012, 43(8):1058-1064.
- [31] KUSIĆ D, KAMPE B, RÖSCH P, et al. Identification of water pathogens by Raman microspectroscopy[J]. *Water Research*, 2014, 48:179-189.
- [32] SCHUSTER K C, REESE I, URLAUB E, et al. Multidimensional information on the chemical composition of single bacterial cells by confocal Raman microspectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2000, 72:5529-5534.
- [33] SCHUSTER K C, URLAUB E, GAPES J R. Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: Spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 42:29-38.
- [34] MONTANARI L B, SARTORI F G, MONTRAZI RIBEIRO D B, et al. Yeast isolation and identification in water used in a Brazilian hemodialysis unit by classic microbiological techniques and Raman spectroscopy[J]. *Journal of Water and Health*, 2018, 16(1/2):311-320.
- [35] HO C-S, JEAN N, HOGAN C A, et al. Rapid identification of pathogenic bacteria using Raman spectroscopy and deep learning[J]. *Nature Communications*, 2019, 10:4927.
- [36] LU W, CHEN X, WANG L, et al. Combination of an artificial intelligence approach and laser tweezers Raman spectroscopy for microbial identification[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(9):6288-6296.
- [37] QIN Y F, LU X Y, SHI Z, et al. Deep learning-enabled Raman spectroscopic identification of pathogen-derived extracellular vesicles and the biogenesis process[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(36):12416-12426.
- [38] HUANG W E, GRIFFITHS R I, THOMPSON I P, et al. Raman microscopic analysis of single microbial cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 76:4452-4458.
- [39] ESCORIZA M F, VANBRIESEN J M, STEWART S, et al. Studying bacterial metabolic states using Raman spectroscopy[J]. *Applied Spectroscopy*, 2006, 60:971-976.
- [40] HE L, WANG S, CORTESÃO M, et al. Single-cell analysis reveals individual spore responses to simulated space vacuum[J]. *NPJ Microgravity*, 2018, 4(1):26.
- [41] HUANG W E, BAILEY M J, THOMPSON I P, et al. Single-cell Raman spectral profiles of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 reflects in vitro and in planta metabolic history[J]. *Microbial Ecology*, 2007, 53(3):414-425.
- [42] PAHLOW S, MEISEL S, CIALLA-MAY D, et al. Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 89:105-120.
- [43] SONG Y, CUI L, LÓPEZ J Á S, et al. Raman-deuterium isotope probing for *in-situ* identification of antimicrobial resistant bacteria in Thames River[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):1-10.
- [44] LI H Z, ZHANG D, YANG K, et al. Phenotypic tracking of antibiotic resistance spread via transformation from environment to clinic by reverse D₂O single-cell Raman probing[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92:15472-15479.
- [45] CUI L, CHEN P Y, CHEN S D, et al. *In situ* study of the antibacterial activity and mechanism of action of silver nanoparticles by surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(11):5436-5443.
- [46] CHEN P Y, CUI L, ZHANG K S. Surface-enhanced Raman spectroscopy monitoring the development of dual-species biofouling on membrane surfaces[J]. *Journal of Membrane Science*, 2015, 473:36-44.
- [47] CUI L, CHEN P Y, ZHANG B F, et al. Interrogating chemical variation via layer-by-layer SERS during biofouling and cleaning of nanofiltration membranes with further investigations into cleaning efficiency[J]. *Water Research*, 2015, 87:282-291.
- [48] CUI L, YANG K, ZHOU G, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy combined with stable isotope probing to monitor nitrogen assimilation at both bulk and single-cell level[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89:5793-5800.
- [49] KNAUER M, IVLEVA N P, NIESSNER R, et al. A flow-through microarray cell for the online SERS detection of antibody-captured *E. coli* bacteria[J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2012, 402(8):2663-2667.
- [50] 杨尹, 梁伟伟, 王小华, 等. 无标记和标记表面增强拉曼光谱技术用于细菌的检测[J]. *分析科学学报*, 2019, 35(5):650-656. YANG Y, LIANG W W, WANG X H, et al. Label-free and label-based surface-enhanced Raman spectroscopy for bacteria detection[J]. *Journal of Analytical Science*, 2019, 35(5):650-656.
- [51] CUI L, ZHANG D, YANG K, et al. Perspective on surface-enhanced Raman spectroscopic investigation of microbial world[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(24):15345-15354.
- [52] TADESSE L F, HO C S, CHEN D H, et al. Plasmonic and electrostatic interactions enable uniformly enhanced liquid bacterial surface-enhanced Raman scattering (SERS)[J]. *Nano Letters*, 2020, 20(10):7655-7661.
- [53] ZHOU H, YANG D, IVLEVA N P, et al. SERS detection of bacteria in water by *in situ* coating with Ag nanoparticles[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(3):1525-1533.
- [54] WANG C W, WANG C G, WANG X L, et al. Magnetic SERS strip for sensitive and simultaneous detection of respiratory viruses[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(21):19495-19505.
- [55] CUI L, CHEN S, ZHANG K. Effect of toxicity of Ag nanoparticles on SERS spectral variance of bacteria[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular & Biomolecular Spectroscopy*, 2015, 137:1061-1066.
- [56] CUI L, ZHANG Y J, HUANG W E, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for identification of heavy metal arsenic(V): Mediated enhancing effect on antibiotic resistance[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(6):3164-3170.
- [57] LIU Y, UPADHYAYA B R, NAGHEDOLFEIZI M. Chemometric data analysis using artificial neural networks[J]. *Applied Spectroscopy*, 1993, 47(1):12-23.

- [58] HATZENPICHLER R, KRUKENBERG V, SPIETZ R L, et al. Next-generation physiology approaches to study microbiome function at single cell level[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(4): 241–256.
- [59] VAN NEVEL S, KOETZSCH S, PROCTOR C R, et al. Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring[J]. *Water Research*, 2017, 113: 191–206.
- [60] 陈倩, 陈昭斌. 微生物快速检验方法新进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(7): 1061–1064. CHEN Q, CHEN Z B. New progress in rapid microbial detection methods[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2016, 26(7): 1061–1064.
- [61] 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]. 中国环境监测, 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.
- [62] HERNLEM B J, RAVVA S V, SARREAL C Z. Rapid detection of predation of *Escherichia coli* O157:H7 and sorting of bacterivorous tetrahymena by flow cytometry[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2014, 4: 57.
- [63] ZHU Y, WANG Y, YAN Y, et al. Rapid and sensitive quantification of anammox bacteria by flow cytometric analysis based on catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(12): 6895–6905.
- [64] CHEN P S, LI C S. Bioaerosol characterization by flow cytometry with fluorochrome[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2005, 7(10): 950–959.
- [65] BESMER M D, WEISSBRODT D G, KRATOCHVIL B E, et al. The feasibility of automated online flow cytometry for *in-situ* monitoring of microbial dynamics in aquatic ecosystems[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 265.
- [66] BESMER M D, EPTING J, PAGE R M, et al. Online flow cytometry reveals microbial dynamics influenced by concurrent natural and operational events in groundwater used for drinking water treatment[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 38462.
- [67] CASTILLO-HENRIQUEZ L, BRENES-ACUNA M, CASTRO-ROJAS A, et al. Biosensors for the detection of bacterial and viral clinical pathogens[J]. *Sensors*, 2020, 20(23): 6926.
- [68] CLARK JR L C, LYONS C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1962, 102(1): 29–45.
- [69] GUNDA N S K, MITRA S K. Rapid water quality monitoring for microbial contamination[J]. *Electrochemical Society Interface*, 2016, 25(4): 73–78.
- [70] YOO S M, LEE S Y. Optical biosensors for the detection of pathogenic microorganisms[J]. *Trends in Biotechnology*, 2016, 34(1): 7–25.
- [71] OSTROV N, JIMENEZ M, BILLERBECK S, et al. A modular yeast biosensor for low-cost point-of-care pathogen detection[J]. *Science Advances*, 2017, 3(6): e1603221.

(责任编辑:李丹)