

副溶血弧菌在玻璃器皿上的粘附及去除

高璐, 张琦, 居翔玉, 杨振泉, 饶胜其, 方维明* (扬州大学食品科学与工程学院, 江苏扬州 225127)

摘要 [目的] 研究副溶血性弧菌在玻璃器皿上的粘附及去除技术。[方法] 以载玻片模拟厨房中的玻璃类和陶瓷类厨具, 选用酒精、醋酸及乳酸链球菌素作为抑菌剂对人工污染粘附到载玻片上的副溶血性弧菌进行处理, 通过观察副溶血性弧菌在载玻片上的存活数和去除率考察3种抑菌剂及其协同抑菌作用。[结果] 载玻片上粘附的副溶血性弧菌的活菌数经生理盐水和不同浓度的酒精、醋酸和乳酸链球菌素作用后均有一定程度的降低, 抑菌剂组残留的活菌数(残留率)明显低于生理盐水对照组, 各抑菌组的抑菌能力均随着抑菌剂浓度的增加而增强。协同抑菌试验结果表明, pH 4.0、35%酒精、1.0 g/L乳酸链球菌素的组合能有效抑制副溶血性弧菌在玻片上的粘附, 具有良好的协同效应。[结论] 副溶血性弧菌在玻璃器皿上有一定的粘附力, 但酒精、醋酸和乳酸链球菌素具有较好的除菌效果。

关键词 副溶血弧菌; 粘附; 除菌

中图分类号 S182; R187.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)36-13015-03

The Remaining *Vibrio parahaemolyticus* on Glassware and Removal Technology

GAO Lu, ZHANG Qi, JU Xiang-yu, FANG Wei-ming* et al (College of Food Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225127)

Abstract [Objective] To study the adhesion and degerming of *Vibrio parahaemolyticus* on glassware. [Method] The effects of three natural edible components including acetic acid, alcohol and Nisin on the survival rate of *Vibrio parahaemolyticus* on glassware were explored through single factor and orthogonal array experiments. [Result] It was found that bacterial population on glassware was reduced when *Vibrio parahaemolyticus* cells were treated with acetic acid, alcohol and Nisin, and the residual rate is lower than the normal saline control group obviously. The orthogonal array optimization showed that the combined treatment of acetic acid, alcohol and Nisin could result in a synergistic inhibitory effect on *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio parahaemolyticus* could be effectively inhibited after treatment with acetic acid solution (pH 4.0) containing 35% alcohol and 1.0 g/L Nisin. [Conclusion] These results suggest that *Vibrio parahaemolyticus* can adhere to the glassware, and the combined use of acetic acid, alcohol and Nisin can offer a compound antibacterial agent for reducing the risk of *Vibrio parahaemolyticus* infection during seafood consumption.

Key words *Vibrio parahaemolyticus*; Adhesion; Degerming

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, 简称VP)是一种革兰氏阴性嗜盐性细菌, 是我国特别是沿海城市引起食源性疾病的首要致病菌之一, 这主要是由于沿海地区的居民有生食或半生水产食品的习惯, 也有调查显示是由于厨房用具受到污染而引起^[1]。我国华东沿海沿江地区副溶血性弧菌的检出率高达57.4%~66.5%, 夏秋季节更加严重^[2]。因此, 研究开发针对水产食品中及其厨具表面副溶血性弧菌的粘附能力及其天然抑菌剂等杀菌技术, 减少污染, 是控制其引起食物中毒的关键。资料显示, 酒精、醋酸及乳酸链球菌素(Nisin)对食源性致病菌如大肠杆菌 O157: H7 型(*Escherichia coli* O157: H7)、单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)及肠道致病菌等均具有明显抑菌效果^[3-5], 但对水产品中尤其是厨房器具上污染的副溶血性弧菌的粘附与去除研究甚少见报道。笔者主要用载玻片模拟厨房中的玻璃和陶瓷类厨具, 选用酒精、醋酸及乳酸链球菌素作为抑菌剂, 研究副溶血性弧菌在玻璃器皿上的粘附和去除作用。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 试验用菌株。致病性副溶血性弧菌菌株 ATCC33847

基金项目 国家自然科学基金项目(31271945); 江苏省自然科学基金项目(BK2011448)。

作者简介 高璐(1976-), 女, 江苏靖江人, 讲师, 硕士, 从事食品有害微生物的研究。*通讯作者, 教授, 硕士生导师, 从事食品发酵微生物的研究。

收稿日期 2014-11-26

(*tdh* 基因阳性)由扬州大学食品微生物实验室保藏。

1.1.2 培养基与试剂。TCBS 培养基为杭州微生物试剂有限公司产品; LBS 培养基为细菌肉汤培养基(LB, 杭州微生物试剂有限公司产品)添加 2.5% NaCl 配制; 乳酸链球菌素(NISIN)为浙江银象生物工程有限公司产品; 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器。UV-7504C 分光光度计, 上海欣茂仪器有限公司; SX-500 型高压蒸汽灭菌锅, 日本 TOMMY 公司; DGX-9053B-2 型生化培养箱, 上海福玛实验设备有限公司; ZHJH-C1209B 型超净工作台, 上海智诚分析仪器制造有限公司; PHS-3C 精密酸度计, 上海精密科学仪器有限公司; 载玻片(25.4 mm × 76.2 mm)。

1.2 方法

1.2.1 副溶血弧菌的复苏及菌悬液的制备。副溶血弧菌保种液 0℃解冻, 无菌吸取 200 μl 接种 10 ml LBS 液体培养基中, 37℃振荡培养 16 h; 取培养物划线于 TCBS 平板, 37℃培养 20 h, 挑取单菌落接种 5 ml LBS 液体培养基, 37℃恒温振荡培养 18 h 后取出 8 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 沉淀用灭菌 PBS 悬浮, 调整菌液浓度约至 10⁸ CFU/ml, 备用。

1.2.2 抑菌剂的配制。无菌操作配制体积分数为 15%、20%、25%、30%、35% 的酒精; pH 为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 的冰醋酸; 质量体积浓度为 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 g/L 的乳酸链球菌素作为抑菌剂, 灭菌生理盐水作为对照。

1.2.3 副溶血弧菌的粘附与抑菌试验。将无菌载玻片浸没到副溶血性弧菌的菌悬液中 10 min 后取出, 沥去表面多余液

体后再分别浸入3组不同浓度的抑菌剂中,3~4 min后取出,沥去表面多余液体,用蘸有无菌生理盐水的棉签,在载玻片2个表面反复擦拭5次,并随之转动棉签,然后剪去手接触部分,将棉签放入装有10 ml生理盐水的试管中,充分振荡后进行10倍稀释,取3个不同的稀释度各100 μ l涂布TCBS平板,37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养16~18 h,计数。每个处理均做3个平行试验,取平均值。

1.2.4 协同抑菌试验。根据以上单因素试验的结果,设计3因素4水平的协同抑菌试验。选用 $L_{16}(4^4)$ 正交试验设计表,因素水平设计如表1,用无菌生理盐水配制4种体积分数酒精,再滴加冰醋酸调节体系pH,最后加入乳酸链球菌素溶解,保证体系中各物质浓度、pH与设定的因素水平一致。各体系的抑菌方法同“1.2.3”。

表1 协同抑菌试验因素水平设计

水平	因素		
	醋酸(pH)(A)	酒精(B) // %	乳酸链球菌素(C) // g/L
1	4.5	20	0.8
2	4.0	25	1.0
3	3.5	30	1.2
4	3.0	35	1.4

2 结果与分析

2.1 抑菌剂对副溶血弧菌粘附量的影响 无菌载玻片在副溶血性弧菌悬液中浸泡10 min,让副溶血性弧菌自然粘附于玻片上,再分别浸泡于不同浓度的抑菌剂中,取出计数玻片上残留副溶血性弧菌的总活菌数,结果见表2。

表2 抑菌剂对副溶血弧菌粘附与去除力的影响

试剂	水平	细菌总数 // CFU/cm ²	残留率 // %
不处理	-	1.9×10^5	-
生理盐水	-	6.6×10^4	34.5
酒精	15%	2.7×10^4	14.1
	20%	2.1×10^4	11.0
	25%	8.1×10^3	4.2
	30%	4.6×10^3	2.4
	35%	2.6×10^3	1.3
醋酸	pH 5.0	3.8×10^4	20.0
	pH 4.5	3.1×10^4	16.3
	pH 4.0	2.8×10^4	15.0
	pH 3.5	1.4×10^4	7.4
	pH 3.0	3.6×10^3	1.9
乳酸链球菌素	0.6 g/L	4.4×10^4	23.2
	0.8 g/L	3.5×10^4	18.3
	1.0 g/L	2.4×10^4	12.8
	1.2 g/L	1.2×10^4	6.4
	1.4 g/L	1.9×10^3	1.0

由表2可以看出,载玻片上粘附的副溶血性弧菌的活菌数经生理盐水和不同浓度的酒精、醋酸抑菌、乳酸链球菌素作用后具有一定程度的降低,抑菌剂组残留的活菌数(残留率)明显低于生理盐水对照组,且各抑菌组的抑菌能力均随着抑菌剂浓度的增加而增强。

生理盐水对载玻片上粘附的副溶血性弧菌可以去除65%左右。25%的酒精对副溶血性弧菌去除率接近96%,

35%的酒精处理后副溶血性弧菌的残留率仅约为1%。醋酸对粘附于载玻片上的副溶血性弧菌也有较好的清除效果,当pH 3.5时玻片上的副溶血性弧菌残留率仅为7.4%,当pH达3.0时的去除率更佳,残留率仅为1.9%。而经乳酸链球菌素处理后,也是随其浓度的增加其去除效果更好,当乳酸链球菌素浓度达1.2 g/L时,其残留率只有6.4%。这些数据显示,这3种抑菌剂对副溶血性弧菌的粘附与生长均具有一定的抑制作用。

2.2 抑菌剂协同后对副溶血弧菌粘附量的影响 由表3极差R值可知,主要影响因素为酒精体积分数和酸度,其次为乳酸链球菌素质量浓度。当3个因素的组合为 $A_2B_4C_2$ 、 $A_3B_4C_3$ 和 $A_4B_4C_4$ 时,能使玻片上残留的副溶血性弧菌含量去除将近3个数量级,具有较好的效果。根据K值,其最优组合为 $A_4B_4C_4$,但即使是最优组合,也没能全部去除玻片上残留的副溶血性弧菌,这可能与试验所选择的作用时间较短(3~4 min)有一定的关系。且在实际厨房用具上的带菌量没有试验中模拟的这么多,并考虑抑菌剂的用量,故选择 $A_2B_4C_2$ 为最佳组合,即pH 4.0、35%酒精、1.0 g/L乳酸链球菌素的组合能有效抑制副溶血性弧菌在玻片上的粘附,且各抑菌成分浓度较低,有良好的协同效应。

对正交协同试验结果进行方差分析,并对各因素进行显著性检验,结果显示, $F_A = 33.47$, $F_B = 41.91$, $F_C = 21.00$,3个因素均差异显著。通过方差分析及方差齐性检验可知,酸度、酒精体积分数与乳酸链球菌素质量浓度对副溶血性弧菌的抑菌效果均为极显著($F_{0.05} < F < F_{0.01}$)

3 讨论

酒精和醋酸分别是酒、食醋的主要成分,是天然的抑菌物质。乳酸链球菌素(Nisin),又称乳酸链球菌肽或乳链菌肽,是由乳酸链球菌经特定发酵所产生的多肽类抗菌物质,能有效地抑制容易引起食品腐败变质的大多数革兰氏阳性菌和部分革兰氏阴性致病菌。Nisin是一种纯天然的安全生物防腐剂^[6]。目前,我国已批准Nisin作为一种纯天然食品防腐剂广泛用于乳制品、发酵饮品、罐藏食品、肉类及肉制品的防腐保鲜^[7-9]。

所以该研究选用酒精、醋酸及乳酸链球菌素作为抑菌剂,以载玻片模拟厨房中的玻璃和陶瓷类厨具,研究副溶血性弧菌在玻璃器皿上的粘附和去除作用。试验结果表明,酒精、醋酸和乳酸链球菌素均对副溶血性弧菌的粘附和生长具有明显的抑制作用。

然而,单因素试验结果表明,酒精、醋酸及乳酸链球菌素的抑制效果与其浓度密切相关。而日常食用时的浓度往往达不到高浓度,这会直接影响到抑菌效果,因此仅仅依靠其中一种很难达到较好的抑菌效果。同时,有研究指出酒的抑菌效果要优于与其度数相同浓度的酒精,如将酒中挥发性物质(主要为酒精)除去后剩下的难挥发性物质(主要为有机酸类)仍有较好的抑菌效果^[10]。Sheth等研究也表明,含有苹果酸、酒石酸等有机酸的低度酒(pH 3.5,酒精体积分数10%)可以使得副溶血性弧菌含量下降3~6个数量级^[11]。

这也说明了将不同有抑菌活性的食用成分复合使用,可以增强抑菌效果。从该试验结果可知,它们之间的协同抑菌效果

是很明显的,能在降低各组分实际浓度的同时保持较好的抑菌效果。

表 3 协同试验抑菌效果分析

试验号	因素				菌数 \log_{10} (CFU/cm ²)			
	A	B	C	空列	I	II	III	平均值
不处理	-	-	-	-	5.25	5.27	5.29	5.27
生理盐水	-	-	-	-	4.79	4.77	4.81	4.79
1	1	1	4	1	3.76	3.77	3.84	3.79
2	1	2	3	4	3.73	3.76	3.84	3.78
3	1	3	2	2	3.53	3.49	3.49	3.50
4	1	4	1	3	3.15	3.14	3.12	3.14
5	2	1	3	3	3.83	3.73	3.76	3.77
6	2	2	4	2	3.56	3.49	3.76	3.60
7	2	3	1	4	3.40	3.38	3.41	3.40
8	2	4	2	1	2.89	2.94	2.83	2.89
9	3	1	2	4	3.67	3.62	3.67	3.65
10	3	2	1	1	3.71	3.67	3.62	3.67
11	3	3	4	3	3.09	3.13	3.15	3.13
12	3	4	3	2	2.79	2.88	2.83	2.83
13	4	1	1	2	3.56	3.56	3.56	3.56
14	4	2	2	3	3.39	3.36	3.41	3.39
15	4	3	3	1	3.11	3.08	3.11	3.10
16	4	4	4	4	2.71	2.77	2.73	2.74
K_1	14.21	14.77	13.77	13.45				
K_2	13.66	14.44	13.43	13.49				
K_3	13.28	13.13	13.48	13.43				
K_4	12.79	11.60	13.26	13.57				
R	0.35	0.79	0.12	0.04				

参考文献

- [1] SU Y C, LIU C C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety[J]. Food Microbiology, 2007, 24(6): 549-558.
- [2] YANG Z Q, JIAO X A, ZHOU X H, et al. Isolation and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fresh, low-temperature preserved, dried, and salted seafood products in twocoastal areas of eastern China[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125(3): 279-285.
- [3] MORETTO T, DAESCHEL M A. Wine is bactericidal to food-borne pathogens[J]. Food Science, 2004, 69(9): 251-257.
- [4] 葛新, 刘丽英, 刘海玲, 等. 食醋对肠道杆菌抑菌作用的观察[J]. 实用预防科学, 2005, 1(12): 181-182.
- [5] CARRATURO A, RAIETA K, OTTAVIANI D, et al. Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* by a bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by *Vibrio mediterranei* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006 (101): 234-241.

- [6] DELVES B J. Nisin and its uses as a food preservative [J]. Food Technol, 1999, 44(3): 100-117.
- [7] 庞瑞霞, 宗楠. Nisin 及其在食品工业中的应用[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(9): 218-220.
- [8] 吕淑霞, 白泽朴, 代义, 等. 乳酸链球菌素(Nisin)抑菌作用及其抑菌机理的研究[J]. 中国酿造, 2008(5): 87-91.
- [9] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB 2760-2007: 食品添加剂使用卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [10] LIU C C, CHEN R Y, SU Y C. Bactericidal effects of wine on *Vibrio parahaemolyticus* in oysters [J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(8): 1823-1828.
- [11] SHETH N K, WISNIEWSKI T R, FRANSON T R. Survival of enteric pathogens in common beverages: an *in vitro* study[J]. American Journal of Gastroenterology, 1988, 83(6): 658-660.

(上接第 13006 页)

中的适宜范围, 建议控制最佳进水 COD 浓度范围为 190 ~ 220 mg/L, 最佳 HRT 为 6 h, 最适宜 DO 范围为 2.5 ~ 3.5 mg/L。

参考文献

- [1] 李绍伟, 路征远, 张莉. 浅析工程项目公司知识管理体系的构建[J]. 交通企业管理, 2007(12): 39-40.
- [2] 江苏省政府. 江苏将实施有偿环保 工地扬尘要收“排污费”[J]. 环境监测管理与技术, 2006(4): 6.
- [3] 胡进军. 浅谈建筑工地如何减少环境污染[J]. 中国建设信息, 2002(23): 13-14.
- [4] 尤子敬. 曝气生物滤池处理生活污水的试验研究[J]. 环境保护与循环经济, 2009, 29(11): 54-56.
- [5] 刘冬林. 利用曝气生物滤池工艺处理油田生活污水[J]. 油气田地面工程, 2013, 32(3): 50-51.

- [6] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [7] HE S B, XUE G, WANG B Z. Factors affecting simultaneous nitrification and de-nitrification (SND) and its kinetics model in membrane bioreactor [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 168(2/3): 704-710.
- [8] 王莹, 周巧红, 梁威, 等. 人工湿地高效好氧反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(6): 1193-1198.
- [9] 赵义. A²/O 生物膜法处理焦化废水中试研究[D]. 太原: 太原理工大学, 2006.
- [10] ZHAO Y X, ZHANG B G, FENG C P, et al. Behavior of autotrophic denitrification and heterotrophic denitrification in an intensified biofilm-electrode reactor for nitrate-contaminated drinking water treatment[J]. Biore-source Technology, 2012, 107: 159-165.
- [11] 王莹, 周巧红, 梁威, 等. 人工湿地高效好氧反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(6): 1193-1198.
- [12] 罗国荣, 孙小斐. 气水比对曝气生物滤池处理微污染水的影响[J]. 地下水, 2012(3): 110-111.