

抗干扰微生物培养基的抗干扰性能研究*

吴清平^{1,2} 蔡芷荷¹ 张菊梅¹ 周小燕¹ 姚汝华²

(华南理工大学² 广州 510642, 广东省微生物研究所¹ 广州 510070)

摘要 食品饮料中残留防腐剂、消毒剂和臭氧会对其中的细菌和真菌的检出造成严重干扰,当采用大样倾注平板法和液体大样法测定细菌和真菌总数及采用国标大肠菌群测定法测定大肠菌群 MPN 值时,使用抗防腐剂型、抗消毒剂型及抗臭氧型微生物培养基分别检测含有防腐剂山梨酸钾及苯甲酸钠、消毒剂二氧化氯和臭氧的样品,其检出细菌、真菌和大肠菌群的能力大大高于普通微生物培养基,与采用普通微生物培养基检测不含防腐剂、消毒剂及臭氧的样品中的细菌、真菌和大肠菌群的检出能力基本一致。

关键词 抗干扰,微生物培养基,防腐剂,消毒剂,臭氧

分类号 Q93.335 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-03-0175-179

RESEARCH ON ANTI-DISTURBANCE FUNCTION OF ANTI-DISTURBANCE MICROBIAL MEDIA

Wu Qingping^{1,2} Cai Zhihe¹ Zhang Jumei¹ Zhou Xiaoyan¹ Yao Ruhua²

(South China University of Technology Guangzhou 510642²,

Guangdong Institute of Microbiology Guangzhou 510070¹)

Abstract Bacteria, fungi and coliform bacteria measurement can be disturbed seriously by remains of preservatives, disinfectants and ozone in food and beverage. When big sample pouring plate method & liquid big sample method are used to detect the total bacterial and fungous number and state standard coliform bacteria measurement method is used to detect the MPN of coliform bacteria, use the anti-preservative, anti-disinfectant and anti-ozone microbial media respectively to detect the samples which contain the remains of the preservatives potassium sorbate and sodium benzoate, disinfectant chloride dioxide and ozone, the bacteria, fungi and coliform bacteria detectability of the anti-disturbance microbial media is much higher than that of the general microbial media and is almost the same with the detectability of the general microbial media when they are used to detect the samples which do not contain the remains of the preservatives, disinfectants and ozone.

Key words Anti-disturbance, Microbial medium, Preservative, Disinfectant, Ozone

* 广东省重点科技攻关项目

1998-06-26收稿,1998-08-20修回

食品饮料生产中为使产品达到卫生标准,广泛使用着多种消毒剂和防腐剂,常用的消毒剂有二氧化氯、过氧乙酸、次氯酸钠、过氧化氢及臭氧等,常用的防腐剂有山梨酸、山梨酸钾、苯甲酸及苯甲酸钠等。然而,食品和饮料中残留消毒剂和防腐剂,污染的细菌和真菌不易被普通微生物培养基检出。但是,过了一定的期限或遇到适宜的环境,被抑制的菌就会复苏、生长和繁殖,导致食品和饮料腐败变质。提高食品和饮料中有防腐剂和消毒剂残留时检出细菌和真菌的能力,是目前急需解决的问题^[1-3]。

近年来,国内陆续有研究者从事不同培养基对肠球菌检出率的影响,细菌透析袋表面培养法及其蛋白质产物的检测,以及普通微生物培养基研制和质量控制的研究^[4]。而在国外,Debevere^[5]发现含有0.5g/L山梨酸和苯甲酸的具缓冲性的食品酸化剂系统对沙门氏菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有杀菌剂的活性,而对粪链球菌则有抑菌剂的活性。Makdesi等^[6]研制出一种改进后的接合酵母菌选择培养基,适用于蛋黄酱中经热处理并对苯甲酸盐有抗性的接合酵母菌的检测,但不适于其它酵母菌的检测。迄今为止,在国内外均未见有通过消除被检物中的消毒剂、防腐剂等干扰物的影响,提高细菌、霉菌、酵母菌及大肠菌群检出率的培养基的文献报道^[1-8]。针对这一问题,我们研制并生产抗防腐剂型、抗消毒剂型及抗臭氧型三大系列的抗干扰微生物培养基。本研究将这些抗干扰微生物培养基和对照普通微生物培养基进行了抗干扰性能的对比分析测试。

1 材料与方法

1.1 干扰物质

防腐剂:山梨酸钾、苯甲酸钠,测试浓度为2g/L。

消毒剂:二氧化氯,测试浓度分别为25mg/L、50mg/L、75mg/L。

臭氧:测试浓度为0.584mg/L、0.557mg/L、0.608mg/L。

1.2 测试菌株

1.2.1 细菌:大肠杆菌(*Escherichia coli*)MIG 1.42、MIG1.45、HK1.1。

荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)MIG1.49。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)MIG1.55。

1.2.2 真菌:绳状青霉(*Penicillium funiculosum*)MIG3.104。

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)MIG3.30。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)R12。

1.3 测试培养基

1.3.1 抗干扰微生物培养基:抗防腐剂型、抗消毒剂型及抗臭氧型细菌平板计数琼脂培养基(营养琼脂培养基)、细菌液体大样检测培养基(营养肉汤培养基)、真菌平板计数琼脂培养基(虎红琼脂培养基)、真菌液体大样检测培养基(霉菌液体培养基)及大肠菌群测定培养基(乳糖胆盐发酵培养基)等15种。

1.3.2 对照普通微生物培养基:对照普通微生物培养基是浙江省军区后勤部卫生防疫检验所生产的营养琼脂培养基、营养肉汤培养基、虎红琼脂培养基、霉菌液体培养基及乳糖胆盐发酵培养基。

1.4 抗防腐剂型培养基的测试

1.4.1 样品的配制:取灭菌后的不含防腐剂的七喜饮料,加入100g/L灭菌后的山梨酸钾或苯甲酸钠溶液,使得七喜中防腐剂含量为2g/L,并加入一定量的已知菌,处理30min作为样品。在琼脂培养基中,样品含少量菌,在液体培养基及大肠菌群测定培养基中,样品含菌量为琼脂培养基的1/10。

1.4.2 培养基的配制:琼脂培养基按单料配制,液体大样检测培养基按三料配制,大肠菌群测定培养基按国家标准方法配制^[9]。

1.4.3 分析测试:(1)抗防腐剂型细菌及真菌平板计数琼脂培养基:取5mL已制备好的样品置于直径9cm的灭菌培养皿中,加入5mL已灭菌后冷却至45℃~50℃左右的琼脂培养基,摇匀,待凝固后倒置(大样倾注平板法)。(2)抗防腐剂型细菌及真菌液体大样检测培养基:取

100mL已制备好的样品置于装有50mL已灭菌且冷却后的三料液体培养基的250mL三角瓶中,摇匀(液体大样法)。(3)抗防腐剂型大肠菌群测定培养基:按国标测定方法^[9]加入已制备好的样品。(4)培养及观测:细菌在35℃~37℃培养24~48h后观测,真菌则在30℃~32℃培养48~96h后观测。在琼脂培养基平板上可以数出菌落数,在液体培养基中,霉菌亦可以数出菌数,细菌及酵母菌则可在波长为650nm下,测定出其吸光度。

1.5 抗消毒剂型培养基的测试

1.5.1 样品的配制:配制浓度为1000mg/L二氧化氯溶液,然后配制菌悬液,在琼脂培养基中,菌悬液含少量菌,在液体培养基和大肠菌群测定培养基中,菌悬液含菌量为琼脂培养基的1/10。

1.5.2 培养基的配制:参照1.4.2。

1.5.3 分析测试:(1)抗消毒剂型细菌及真菌平板计数琼脂培养基:各菌株采取的消毒剂浓度为: MIG1.55 25mg/L、MIG1.42 50mg/L、MIG1.49 75mg/L、R12 25mg/L、MIG3.104 25mg/L。在已灭菌并冷却至45℃~50℃的琼脂培养基中加入二氧化氯为上述各菌株对应浓度的两倍,然后吸取5mL已配制好的菌悬液置于直径9cm的灭菌培养皿中,并加入5mL带有消毒剂的培养基,摇匀,待冷却后倒置。(2)抗消毒剂型细菌及真菌液体大样检测培养基:各菌株采取的消毒剂浓度为: MIG1.55 25mg/L、MIG1.42 50mg/L、MIG1.49 75mg/L、R12 25mg/L、MIG3.104 50mg/L。在已灭菌并冷却后的三料液体培养基中加入二氧化氯为上述各菌株对应浓度的三倍,然后加入100mL已配制好的菌悬液,摇匀。(3)抗消毒剂型大肠菌群测定培养基:在10mL双料基中加入二氧化氯至浓度为50mg/L,在两套10mL单料基中各加入二氧化氯至浓度分别为2.5mg/L、0.25mg/L,然后按国标测定方法^[9]加入已制备好的菌悬液。(4)培养及观测:参照1.4.3。

1.6 抗臭氧型培养基的测试

1.6.1 样品的配制:配制菌悬液,然后采用臭氧

发生器产生臭氧通入臭氧混合塔中混合,制得含有0.584mg/L、0.557mg/L、0.608mg/L臭氧的臭氧水,水中臭氧浓度采用DPD法^[10]进行测定。

1.6.2 培养基的配制:参照1.4.2。

1.6.3 分析测试:参照1.4.3。

2 结果

2.1 抗防腐剂型培养基的抗干扰性能

2.1.1 细菌和真菌总数的测试:在大样倾注平板法及液体大样法中,测试菌株为MIG1.42、MIG1.49、MIG3.104及R12,当检测样品中含有山梨酸钾或苯甲酸钠时抗防腐剂型培养基的检出能力大大高于对照培养基,在大样倾注平板法中,抗防腐剂型培养基平板上菌落数与空白对照无显著差异(表1)。

2.1.2 大肠菌群MPN值的测试:在国标大肠菌群测定方法中,测试菌株为MIG1.42,当检测样品中含有山梨酸钾或苯甲酸钠时,抗防腐剂型培养基的检出能力大大高于对照普通培养基,与空白对照无明显差异(表2)。

2.2 抗消毒剂型培养基的抗干扰性能测试

2.2.1 细菌和真菌总数的测试:在大样倾注平板法及液体大样法中,测试菌株为MIG1.42、MIG1.49、MIG1.55、MIG3.104及R12。在测试中,当有二氧化氯存在时,抗消毒剂型培养基的检出能力大大高于对照普通培养基,在大样倾注平板法中,抗消毒剂型培养基平板上菌落数与空白对照无明显差异(表3)。

2.2.2 大肠菌群MPN值的测试:在国标大肠菌群测定方法中,测试菌株为MIG1.42。在测试中,当有二氧化氯存在时,抗消毒剂型培养基的检出能力大大高于对照普通培养基,与空白对照无明显差异(表4)。

2.3 抗臭氧型培养基的抗干扰性能测试结果

2.3.1 细菌和真菌总数的测试:在大样倾注平板法及液体大样法中,测试菌株MIG1.45、MIG1.42、MIG3.104及MIG3.30。在测试中,当有臭氧存在时,抗臭氧型培养基的检出能力大大高于对照普通培养基,在大样倾注平板法中,

表1 不同培养基对含有防腐剂的样品中的细菌和真菌的检出能力测试

菌株	大样倾注平板法 (CFU/5mL)					液体大样法 (ABS650nm)				
	空白		S		B		S		B	
	对照	抗	普	抗	普	抗	普	抗	普	
MIG1.42	3	2	0	3	0	0.253	0	0.102	0	
MIG1.49	5	4	0	3	0	0.060	0	0.290	0	
R12	12	11	0	13	0	0.102	0.006	0.417	0	
MIG3.104	8	10	0	11	0	31	0	30	0	

注: S: 山梨酸钾, B: 苯甲酸钠, 抗: 抗防腐剂型微生物培养基, 普: 普通微生物培养基, 空白对照: 用普通培养基培养的未经处理的样品菌液。在液体大样法中, MIG3.104的数据为cells/100mL。

表2 不同培养基对含有防腐剂的样品中的大肠菌群的检出能力测试

样品 (mL)	空白 对照	15管法阳性管数(支)			
		山梨酸钾		苯甲酸钠	
		抗防腐剂型培养基	对照普通培养基	抗防腐剂型培养基	对照普通培养基
10	5	5	0	5	0
1	5	5	0	5	2
0.1	1	3	1	1	0
MPN/100mL	350	920	2	350	4

表3 不同培养基对含有消毒剂的样品中的细菌和真菌的检出能力测试

菌株	大样倾注平板法 (CFU/5mL)			液体大样法 (ABS650nm)	
	空白对照	抗消毒剂型培养基	对照普通培养基	抗消毒剂型培养基	对照普通培养基
MIG1.42	144	137	0	0.080	0.005
MIG1.49	7	6	0	0.196	0.109
MIG1.55	55	51	0	0.125	-0.004
R12	35	42	0	0.718	0
MIG3.104	31	31	0	42	0

注: 在液体大样法中, MIG3.104的数据为cells/100mL

表4 不同培养基对含有消毒剂的样品中的大肠菌群的检出能力测试

样品 (mL)	空白 对照	15管法阳性管数	
		抗消毒剂型 培养基	对照普通 培养基
10	5	5	0
1	5	5	5
0.1	1	2	1
MPN/100mL	350	540	11

抗臭氧型培养基平板上菌落数与空白对照无明显差异(表5)。

2.3.2 大肠菌群 MPN 值的测试: 在国标大肠菌群测定方法中, 测试菌株为 MIG1.42 及 HK1.1。在测试中, 当有臭氧存在时, 抗臭氧型培养基的检出能力大大高于对照普通培养基, 与空白对照无明显差异(表6)。

3 讨论

由表1、表3及表5可见, 当测试样品中含
 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

表5 不同培养基对含有臭氧的样品中的细菌和真菌的检出能力测试

菌株	空白对照	大样倾注平板法 (CFU/5mL)		液体大样法 (ABS650nm)	
		抗臭氧型培养基	对照普通培养基	抗臭氧型培养基	对照普通培养基
MIG1.45	136	128	1	0.229	0.015
MIG1.42	203	227	1	0.277	0.029
MIG3.104	192	196	0	184	10
MIG3.30	280	240	1	150	1

注: 在液体大样法中, MIG3.104及MIG3.30的数据为cells/100mL

表6 不同培养基对含有臭氧的样品中的大肠菌群的检出能力测试

样品 (mL)	MIG1.42的阳性管数(支)			HK1.1的阳性管数(支)		
	空白 对照	抗臭氧型 培养基	对照普通 培养基	空白 对照	抗臭氧型 培养基	对照普通 培养基
10	5	5	0	5	5	2
1	4	5	2	5	5	1
0.1	4	1	5	2	2	5
MPN/100mL	350	350	13	540	540	19

注: 本试验采用15管法。

有防腐剂、消毒剂和臭氧时, 采用大样倾注平板法和液体大样法, 抗干扰培养基组检出细菌和真菌的能力大大高于对照普通培养基组, 除表3中荧光假单胞杆菌 MIG1.49 抗消毒剂型液体大样组为显著性差异 ($p < 0.05$) 外, 其他组均为极显著差异 ($p < 0.01$), 在大样倾注平板法中, 抗干扰培养基平板上菌落数与空白对照组的结果相比较, 则无显著性差异 ($p > 0.05$)。

表2、表4及表6表明, 采用国标大肠菌群测定方法, 抗干扰培养基组检出大肠杆菌的能力大大高于对照普通培养基, 与空白对照组的结果相比较, 则无明显差异。所以, 在检测残留防腐剂、消毒剂和臭氧的食品饮料时, 采用大样倾注平板法和液体大样法测定细菌和真菌总数及采用国标大肠菌群测定大肠菌群 MPN 值, 抗干扰微生物培养基的检出能力大大高于普通微生物培养基。

致谢 本研究得到了广东省卫生防疫站戴昌芳副主任技师的大力支持和帮助, 在此表示衷心

感谢。

参 考 文 献

- [1] 斯佩克 M L 主编, 何晓青等译. 食品微生物学检验方法提要. 北京: 人民卫生出版社, 1982, 238~248.
- [2] 吴清平, 陈素云, 阙绍辉等. 微生物学通报, 1996, 23(3): 173~175.
- [3] 吴清平, 周小燕, 蔡芷荷等. 氨基酸和生物资源, 1996, 18 增刊: 87~92.
- [4] 沈祥熙, 邵惠琴. 微生物学通报, 1991, 18(3): 177~180.
- [5] Debevere F M. Food Microbial, 1988, 5(3): 135~139.
- [6] Makdesi A K, Beuchat L R. Food Microbial, 1996, 13(4): 281~290.
- [7] 陈天寿主编. 微生物培养基的制造与应用. 北京: 中国农业出版社, 1995, 185~612.
- [8] Sigma Chemical Company. Biochemicals and Reagents for Life Science Research, 1997, 1585~1784.
- [9] 罗雪云, 刘宏道主编. 食品卫生微生物检验标准手册. 北京: 中国标准出版社, 1995, 18~29.
- [10] 兵藤良夫等编, 雷席珍译. 最新饮料工艺学. 广东: 广东科技出版社, 1985, 408~409.