

抗消毒剂型微生物培养基研究*

吴清平^{1,2} 蔡芷荷² 张菊梅² 周小燕² 姚汝华¹

(华南理工大学 广州 510641)¹

(广东省微生物研究所 广州 510070)²

摘要: 二氧化氯、过氧乙酸、次氯酸钠及过氧化氢等消毒剂高浓度可以杀灭微生物,低浓度可以抑制微生物生长。在微生物检测中,要消除消毒剂的干扰,培养基的抗消毒剂指数必须控制在12.0~24.5之间。消毒剂解抑制剂I的抗消毒剂指数为12.0,对细菌和真菌生长无明显抑制作用,加入经改良和优化的普通培养基后,制得5种抗消毒剂型培养基,在灭菌前后和一年的保存期内,其抗消毒剂指数基本保持不变。当采用大样倾注平板法和液体大样法检测残留消毒剂的样品时,使用抗消毒剂型培养基检出细菌和真菌能力大大高于普通培养基。

关键词: 抗干扰,微生物培养基,消毒剂

中图分类号: Q93335 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(1999)-06-0412-06

* 广东省重点科技攻关项目

收稿日期:1998-10-28, 修回日期:1999-01-18

RESEARCHES ON ANTI-DISINFECTANT MICROBIAL MEDIA

WU Qingping^{1,2} CAI Zhihe² ZHANG Jumei² ZHOU Xiaoyan² YAO Ruhua¹(South China University of Technology Guangzhou 510641)¹(Guangdong Institute of Microbiology Guangzhou 510070)²

Abstract: The microorganisms could be killed by the high concentration disinfectants such as chlorine dioxide, peroxyacetic acid, sodium hypochlorite and hydrogen peroxide, and the microbial growth could be inhibited by the low concentration disinfectants. So, the microbial detectability could be disturbed seriously by the disinfectants remained in the samples. In order to eliminate the disinfectant disturbance on microbial detection, the anti-disinfectant indexes(ADI) must be controlled between 12.0~24.5. The index of the disinfectant removing reagent(DRR) 1 was 12.0, it did not inhibit obviously the bacterial and fungous growth in the plates. The five kinds of the anti-disinfectant media(ADM) could be made up by adding DRR I to the improved and optimized general media. After the media were disinfected or in one year storage life, their ADI could be almost kept stable. When the big sample pouring plate method and the liquid big sample method were applied to detect the samples with the remains of the disinfectants, the bacterial and fungous detectability of the anti-disinfectant media was much higher than that of the general microbial media.

Key words: Anti-disturbance, Microbial media, Disinfectant

食品饮料的卫生与否与消费者的健康息息相关,因此在其生产时,除需要对各个环节进行较严格的控制外,还必须对其生产线上的管道及设备、包装材料、甚至生产所需的原辅材料等采用消毒剂进行消毒处理。目前在食品饮料生产中,国内外常用二氧化氯、过氧乙酸、次氯酸钠及过氧化氢等作为消毒剂,因此在检测消毒效果时,残留的这些消毒剂就必然或多或少地带到所取的样品中,直接干扰到微生物数量的检出,从而影响对消毒剂效果的判断,进而成为影响产品微生物指标的一个重要制约因素^[1,2]。因此,研究抗消毒剂干扰的微生物培养基,最大限度地消除消毒剂对微生物检测的影响,提高微生物检测的灵敏度,准确地反映消毒剂的杀菌效果,做好消毒剂的筛选和使用浓度配置,提高食品饮料质量,是当前食品饮料检测所必需解决的重要问题。迄今为止,尚未见有较系统地研究抗消毒剂型微生物培养基研究的国内外报告^[1-3],本研究在测定消毒剂对微生物的杀灭

作用和抑制作用的基础上,采用抗消毒剂指数评价微生物培养基抗消毒剂干扰能力,通过消毒剂解抑剂的筛选试验和回收率试验,制备抗消毒剂型微生物培养基,然后进行抗消毒剂性能、保存期试验和检测实际样品中细菌和真菌能力的测试。

1 材料与方法

1.1 干扰物质

消毒剂:二氧化氯(Chlorine dioxide, CD),次氯酸钠(Sodium hypochlorite, SH),过氧乙酸(Peroxyacetic acid, PA)及过氧化氢(Hydrogen peroxide, HP)。

1.2 菌株

除参照吴清平等^[4]采用的菌株外,增加恶臭假单胞菌 MIG1.57(*Pseudomonas putida*)。

1.3 对照普通微生物培养基

见参考文献[4]。

1.4 抗消毒剂型微生物培养基研究方法

1.4.1 消毒剂浓度的测定^[5]及抗消毒剂指数测定: 抗消毒剂指数是设计来衡量化学物质溶于水后所具有的抗消毒剂干扰能力而建立的一种指数,其与消毒剂的存在与否无关,其数学模型为 $Y = (B + 0.75)^X \times F/V$, 式中 Y 为抗消毒剂指数, B 为常数 X 为随条件而变的指数, F 为抗消毒剂指数测定剂的用量, V 为测定体系的体积。抗消毒剂指数高代表抗消毒剂干扰能力强;反之,抗消毒剂指数低,则表示其抗消毒剂干扰能力弱。

1.4.2 消毒剂对微生物的杀灭和抑制作用: (1) 消毒剂对微生物的杀灭作用测试 将二氧化氯、过氧乙酸、次氯酸钠及过氧化氢等消毒剂配成一系列较高浓度,然后将测试菌株制备成菌悬液(浓度为 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL),加入到消毒剂中处理 30s 后稀释,最后采用普通倾注平板法进行测定。(2) 消毒剂对微生物的抑制作用将消毒剂直接加入到倾注平板前的灭菌培养基中,制备成含有一系列含有较低浓度消毒剂的普通微生物培养基,然后将测试菌株制备成菌悬液(浓度为 10^3 cfu/mL 以下),要采用普通倾注平板法进行测定。

1.4.3 消毒剂解抑制剂的筛选试验及回收率试验: (1) 消毒剂解抑制剂的筛选试验 作为消毒剂解抑制剂,首先必须有消除消毒剂干扰的能力,然后必须对微生物生长无明显的抑制作用。在试验中首先设计不同组合的配方,筛选能将抗消毒剂指数调整到一定范围的消毒剂解抑制剂,然后配制含有各种不同消毒剂解抑制剂的普通培养基,接着制备测试菌株菌悬液,采用普通倾注平板法测定其抑菌作用。(2) 消毒剂解抑制剂的回收率试验 消毒剂解抑制剂加入到培养基后是否稳定可靠,要通过测定它们在灭菌前后的抗消毒剂指数来确定,在具体操作中以消毒剂解抑制剂溶于一定量的水中作为基准(100%),计算出回收率。

1.4.4 抗消毒剂型微生物培养基的测试: 见参考文献 [6]。

2 结果与讨论

2.1 消毒剂对微生物的杀灭和抑制作用

2.1.1 消毒剂对微生物的杀灭作用: 在消毒剂

对微生物的杀灭作用试验中,所用测试菌株为 MIG1.22、MIG1.45、MIG3.30 及 MIG3.104。在测试中,当其杀灭作用达到 100% 左右时, MIG1.22 及 MIG1.45 需要二氧化氯浓度为 297mg/L, MIG3.30 及 MIG3.104 需要过氧乙酸浓度分别为 1425mg/L 及 2375mg/L (图 1, 图 2)。

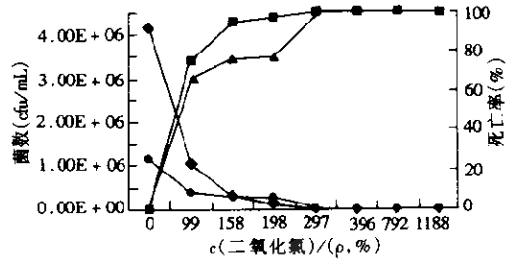


图1 二氧化氯对MIG1.22和MIG1.45的杀灭作用测试
—◇— MIG1.22(菌数), —○— MIG1.45(菌数),
—△— MIG1.45(死亡率), —□— MIG1.22(死亡率)

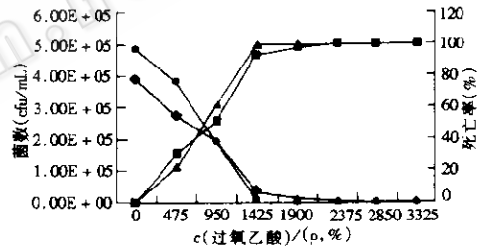


图2 过氧乙酸对MIG3.30和MIG3.104的杀灭作用测试
—◇— MIG3.104(菌数), —○— MIG3.30(菌数),
—△— MIG3.30(死亡率), —□— MIG3.104(死亡率)

2.1.2 消毒剂对微生物的抑制作用: 在消毒剂对微生物的抑制作用试验中,消毒剂亦选择目前较常见的二氧化氯和过氧乙酸,测试菌株为 MIG1.45、MIG1.55、R12 及 MIG3.104。在抑菌作用测试中,消毒剂对各种不同测试菌株的抑制作用差异较大,当抑制作用达到 100% 左右时, MIG1.45 及 MIG1.55 需要二氧化氯的浓度分别为 100mg/L 及 30mg/L, R12 及 MIG3.104 需要过氧乙酸浓度分别为 20mg/L 和 60mg/L (图 3, 图 4)。

2.2 消毒剂解抑制剂的筛选试验及回收率试验

2.2.1 消毒剂解抑制剂的筛选试验: 经测定,要较好地消除以上各种消毒剂对微生物的抑制作

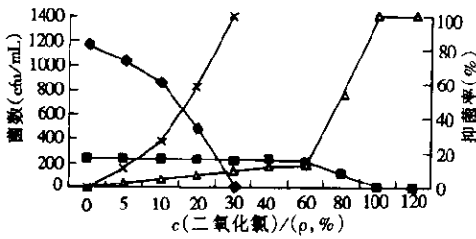


图3 二氧化氯对MIG1.45和MIG1.55的抑制作用
 -■- MIG1.45(菌数), -●- MIG1.55(菌数),
 -△- MIG1.45(抑制率), -x- MIG1.55(抑制率)

所用测试菌株为 MIG1.22、MIG1.45、MIG1.55、MIG1.57、MIG3.104、MIG3.30、MIG2.83 及

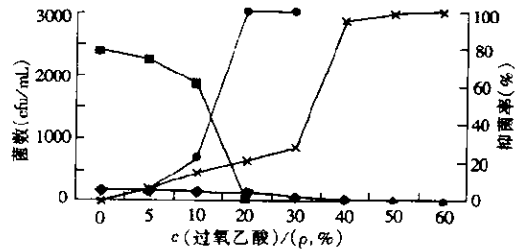


图4 过氧乙酸对R12和MIG3.30的抑制作用
 -■- R12(菌数), -●- MIG3.30(菌数),
 -△- R12(抑制率), -x- MIG3.30(抑制率)

用,其抗消毒剂指数必须在 12.0 以上。在本试验中,通过对设计出的 11 个组合配方的抗消毒剂指数进行测定,发现指数在 12.0 以上的有 7 个,然后选择其中 5 个进行抑菌试验,在试验中

R12,从表 1 可以看出,消毒剂解抑制剂 I 和 II 对所测试的菌株的生长影响最小,消毒剂解抑制剂 I

表1 消毒剂解抑制剂的抑菌试验(cfu/mL)

菌株	对照	消毒剂解抑制剂				
		I(14.7)	II(24.5)	III(49.0)	IV(147.0)	V(245.0)
MIG1.22	1533.0±115.5	1535.7±40.5	1514.7±217.8	1314.7±288.0	1276.0±214.0	685.3±41.1
MIG1.45	698.7±91.0	684.0±95	757.3±60.6	874.7±167.8	842.7±113.5	208.0±27.1
MIG1.55	140.7±3.2	142.3±7.5	133.7±14.6	143.3±8.7	11.3±4.7	0
MIG1.57	1469.3±151.0	1574.3±34.4	1598.7±26.0	1261.3±101.3	1022.7±102.2	149±54.6
MIG3.104	139.0±15.7	138.7±5.7	108.3±13.9	113.3±12.7	129.3±20.2	114.0±19.3
MIG3.30	52.7±10.1	59.0±4.0	43.0±2.6	45.0±5.3	39.3±5.9	42.0±5.3
MIG2.83	119.0±10.1	120.7±6.0	24.0±11.5	0	0	0
R12	148.0±7.5	150.0±3.0	149.7±8.7	0	0	0

注:表中括号内的数字为抗消毒剂指数

与对照无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.2.2 消毒剂解抑制剂的回收率试验: 消毒剂解抑制剂在测定其抑菌作用后,其在培养基中稳定性亦十分重要。本试验以消毒剂解抑制剂溶于一定量水中作为基准(100%),测定到消毒剂解抑制剂 I 在 1×10^5 Pa 灭菌前后其抗消毒剂指数不会下降,回收率无明显差异;另外,把消毒剂解抑制剂 I 加入经改良和优化后的普通培养基后,其中的消毒剂解抑制剂 I 在 1×10^5 Pa 灭菌前后亦比较稳定,其抗消毒剂指数不会下降,回收率在灭菌后亦无明显差异,这表明加入培养基内的消毒剂解抑制剂 I,在培养基灭菌前后,其抗消毒剂性能均能较好地得到保持。

2.3 抗消毒剂型培养基的抗消毒剂性能测试

把消毒剂解抑制剂 I 加入经改变和优化的普

通培养基后,制得抗消毒剂型微生物培养基,它们分别为抗消毒剂型细菌平板计数琼脂培养基(营养琼脂培养基)、细菌大样检测液体培养基(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)、真菌大样检测液体培养基(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 5 种。

本试验所用的消毒剂为二氧化氯、过氧乙酸及次氯酸钠,其浓度根据抑菌作用试验结果来确定,测试菌株为 MIG1.45 及 MIG3.104。在测试中,菌株在普通培养基上均受到极严重的抑制作用,而在抗消毒剂型培养基上,测试菌株的生长状况与生长在不加消毒剂的普通培养基上无明显差异。另外,随着培养时间的延长,在普通培养基上受到严重抑制的测试菌株的抑制

表2 采用MIG1.45测试抗消毒剂型培养基的抗消毒剂性能(cfu/mL)

消毒剂	培养基	处理浓度 (mg/L)	培养时间 (h)	
			24	72
对照	普通		207.0±16.7	209.5±15.3
二氧化氯	普通	70	0	39.3±23.4
		80	0	4.0±6.1
		90	0	0
	抗消毒剂型	70	190.7±11.7	198.0±12.3
		80	199.3±4.7	205.4±6.4
		90	174.7±10.1	190.8±9.5
过氧乙酸	普通	30	0	32.3±3.2
		40	0	10.3±0.6
		50	0	0
	抗消毒剂型	30	168.0±10.6	185.4±10.0
		40	128.7±8.4	173.7±9.5
		50	80.7±10.8	168.9±7.8
次氯酸钠	普通	400	0	7.3±1.2
		500	0	4.7±2.5
		600	0	3.0±1.7
	抗消毒剂型	400	198.0±16.6	200.3±17.0
		500	165.0±7.5	183.4±9.3
		600	167.3±9.1	180.0±10.0

表3 采用MIG3.104测试抗消毒剂型培养基的抗消毒剂性能(cfu/mL)

消毒剂	培养基	处理浓度 (mg/L)	培养时间 (h)	
			72	105
对照	普通		196.3±9.7	198.5±9.4
二氧化氯	普通	20	0	6.7±3.2
		40	0	2.7±2.1
		60	0	0
	抗消毒剂型	20	163.3±9.3	193.5±8.5
		40	165.0±21.0	189.7±19.3
		60	167.3±5.0	183.4±7.5
过氧乙酸	普通	20	137.7±3.1	143.7±6.1
		30	0	16.0±2.0
		40	0	0
	抗消毒剂型	20	166.3±9.7	185.9±9.3
		30	162.3±11.5	182.3±10.5
		40	161.0±18.5	179.8±15.3
次氯酸钠	普通	40	0	22.7±4.5
		60	0	4.0±1.0
		80	0	0
	抗消毒剂型	40	143.7±10.1	185.4±10.5
		60	156.0±11.4	187.0±9.3
		80	148.7±8.4	183.7±9.0

情况略有改善,即平板上的菌落数略有增加(表2及表3)。

2.4 抗消毒剂型培养基的保存期试验

除了抑菌试验及回收率试验外,保存期试验亦为抗消毒剂型微生物培养基质量稳定与否的重要指标。在试验中,以消毒剂解抑剂溶于一定量水中作为基准(回收率100%),然后在12个月以内的不同时间测定抗消毒剂型培养基的抗消毒剂指数,最后计算出消毒剂解抑剂

的回收率。试验结果表明在一年的保存期内,抗消毒剂型培养基中的消毒剂解抑剂没有明显减少,其抗消毒剂的能力没有明显下降。

2.5 抗消毒剂型培养基检测实际样品中细菌和真菌能力的测试

根据在广州、深圳、珠海、顺德、肇庆、高州等十几家矿泉水、蒸馏水、饮用纯水生产企业提供样品的现场测试,结果表明抗消毒剂型培养基检出带有消毒剂样品中的细菌和真菌的能力

表4 抗消毒剂型培养基检测实际样品中细菌和真菌能力的测试

检测样品	产地	检测方法	普通培养基		抗消毒剂型培养基	
			细菌	真菌	细菌	真菌
二氧化氯消毒后的矿泉水瓶	珠海	液体大样法	0.001(ABS ₆₅₀)	0(cells/瓶)	0.321(ABS ₆₅₀)	15.2(cells/瓶)
二氧化氯消毒后的矿泉水瓶盖	珠海	液体大样法	-0.002(ABS ₆₅₀)	3(cells/2个盖)	0.284(ABS ₆₅₀)	57.3(cells/20个盖)
次氯酸钠消毒后的矿泉水	广州	液体大样法	0.035(ABS ₆₅₀)	0(cells/100mL)	0.231(ABS ₆₅₀)	3.7(cells/100mL)
水处理管道水样		大样倾注平板法	0(cfu/5mL)	0(cfu/5mL)	4.3(cfu/5mL)	0(cfu/5mL)
过氧乙酸消毒后的矿泉水瓶	广州	液体大样法	0.014(ABS ₆₅₀)	0(cells/瓶)	0.323(ABS ₆₅₀)	2.8(cells/瓶)
过氧乙酸消毒后的矿泉水瓶盖	广州	液体大样法	0.000(ABS ₆₅₀)	0(cells/25个盖)	0.523(ABS ₆₅₀)	41.7(cells/25个盖)
二氧化氯消毒后的矿泉水	高州	液体大样法	0.000(ABS ₆₅₀)	0(cells/100mL)	0.381(ABS ₆₅₀)	3.4(cells/100mL)
水处理管道水样		大样倾注平板法	0(cfu/5mL)	0(cfu/5mL)	2.5(cfu/5mL)	0.124(cfu/5mL)
						1.7(ABS ₆₅₀)
二氧化氯消毒后的矿泉水瓶盖	广州	液体大样法	0.000(ABS ₆₅₀)	0(cells/2个盖)	0.472(ABS ₆₅₀)	18.2(cells/25个盖)

大大高于普通微生物培养基(表4)。

参 考 文 献

- [1] 吴清平,陈素云,阙绍辉等. 微生物学通报, 1996, 23(3): 173~195.
- [2] 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.
- [3] Sigma Chemical Company. Biochemicals and

Reagents for Life Science Research, 1997, 1585~1784.

- [4] 吴清平,蔡芷荷,张菊梅等. 微生物学通报, 1999, 26(5).
- [5] 黄伟坤等编著. 食品检验与分析. 北京: 轻工业出版社, 1989.
- [6] 吴清平,蔡芷荷,张菊梅等. 微生物学通报, 1999, 26(3): 177~182.