

微生物不同生长期及介质参数对脉冲磁场杀菌效果的影响

马海乐¹, 吴琼英¹, 高梦祥², 储金宇¹

(1. 江苏大学生物与环境工程学院, 镇江 212013; 2. 长江大学生命科学学院, 荆州 434023)

摘要: 利用脉冲磁场对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在不同生长阶段、不同介质温度及pH值的情况下进行杀菌试验, 结果表明: 这两种菌在对数生长期比稳定生长期和延迟生长期对磁场更敏感, 两种细菌在对数生长期的后期杀菌效果均出现反弹变差的现象, 反弹趋势延长至稳定生长期, 并趋于平缓; 介质温度越高, 脉冲磁场杀菌效果越好, 但该温度远低于热致死温度; 介质pH值越偏中性, 杀菌效果越差, pH值小于5时, 杀菌效果较好。

关键词: 脉冲磁场; 杀菌; 生长阶段; 温度; pH值

中图分类号: TS205.9; TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2004)05-0215-03

0 引言

目前, 有关学者对磁场杀菌的理论解释为磁场对生物体细胞的抑制效应。生物体对于磁场是可透过性的, 因其磁导率与真空条件下的磁导率 μ_0 接近, 因而磁场更容易透入生物体, 从而对生物体内部的器官、组织, 以及细胞核发生作用。同时也提出对磁场的作用也应考虑到其变化的情况, 即交变磁场和脉冲磁场的作用与恒定磁场作用有所不同。高频交变磁场在生物体内将产生感应电场及高频热效应。在磁场频率变化不高时, 热效应较小, 但细胞膜电位的变化影响可能很显著, 严重时可导致膜的击穿破裂^[1]。脉冲磁场杀菌就是利用磁场的变化激发微生物细胞膜电位的变化, 致使膜击穿破裂, 导致微生物死亡。笔者曾就磁场强度、波形、脉冲时间对杀菌效果的影响进行了深入细致的研究^[2,3]。本文将分别以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的影响为例, 研究微生物的不同生长阶段、杀菌处理的温度(这一温度远低于食品的热杀菌温度)以及pH值对杀菌效果的影响。

1 设备和方法

1.1 试验设备与材料

脉冲磁场杀菌设备(自行研制); DHZ-D 冷冻恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂); W FJ7200 型分光光度计(尤尼柯(上海)仪器有限公司); PHS-3C 型精密pH计(上海精密科学仪器有限公司); WC/09-05 型超级恒温器(重庆试验设备厂); SR-1 快速混匀器(深圳天南海北有限公司); YXQ. SG41. 280 型手提式压力蒸汽灭菌锅(上海医用核子仪器厂); SZX-3 型微生物接种箱(通州市沪通制药机械厂); 250B 型生化培养箱(通州市沪通制药机械厂)。

微生物及其菌株号: 金黄色葡萄球菌 *S. taphylococcus aureus* AS 1. 89, 大肠埃希氏杆菌 *Escherichia coli* AS 1. 129。以上菌株均来自中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC)。

1.2 试验方法

1.2.1 微生物检测

本文采用分光光度计法测试细菌菌落数。笔者通过实验建立的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌标准曲线(细菌菌落数(平板菌落计数法测定) M (cfu/mL)的对数值 $\log M$ 与波长为600 nm时的吸光度 A_{600} 之间的关系曲线)分别如图1和图2所示^[4]。

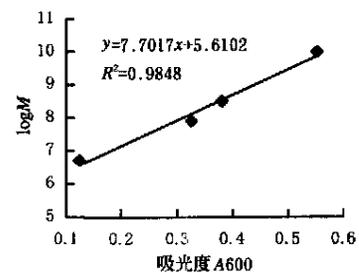


图1 大肠杆菌菌落数的对数与吸光度 A_{600} 的对应关系

Fig 1 Relationship between absorbance A_{600} and

$\log M$ of cfu of *Escherichia coli*

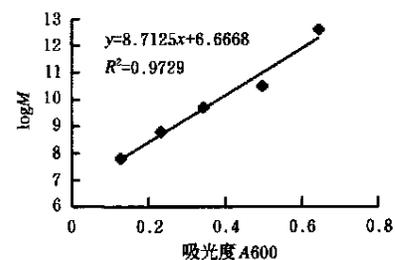


图2 金黄色葡萄球菌菌落数的对数与吸光度 A_{600} 的对应关系

Fig 2 Relationship between absorbance A_{600} and

$\log M$ of cfu of *S. taphylococcus aureus*

1.2.2 细菌生长曲线测定及不同生长期菌液制备

取36支无菌大试管, 用记号笔标明培养时间。分别取5 mL 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的过夜培养液(培养10~12 h)转入盛有50 mL LB (Luria-Bertani) 液体培养基的三角瓶内, 混合均匀后分别取5 mL 混合液放入上述标记的36支无菌大试管中。将已接种的试管置摇床37℃振荡培养(振荡频率250 r/min), 用未接种的LB液体培养基作空白对照, 每培养0.5 h时用分光光

收稿日期: 2004-02-04 修订日期: 2004-04-15

基金项目: 江苏省教育厅“青蓝工程”学术带头人基金项目

作者简介: 马海乐(1963-), 男, 陕西咸阳市人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事食品功能因子及其分离、食品冷杀菌技术研究。镇江江苏大学生物与环境工程学院, 212013

度计于 600 nm 波长测一次吸光值(每次作 2 个平行样品), 绘制生长曲线。再以生长曲线划分出细菌的延迟期、对数期和稳定期。在相对应的各生长期选取 3 个菌液平行样, 用于杀菌处理。菌液中菌的浓度控制在 1×10^8 cfu/mL 左右, 介质的 pH 值调整为 7。

1.2.3 不同介质参数(pH 值和温度)菌液的制备

用 LB 液体培养基对培养 10~12 h 的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌用无菌 0.9% 的生理盐水洗脱下来, 吸入无菌三角烧瓶中用此盐水稀释并在混合均匀后, 分装样品瓶中, 每瓶分装 5 mL。菌液中菌的浓度控制在 1×10^8 cfu/mL 左右。放入不同温度的水浴锅中 10 min 后或用无菌 NaOH 或 HCl 调节至不同 pH 值后, 用于杀菌处理。每个菌液样品作 3 个平行样, 测试其大肠杆菌、金黄色葡萄球菌含量, 取平均值。

1.2.4 脉冲磁场杀菌

本文使用的脉冲磁场杀菌设备是通过螺旋管产生轴向磁场, 最大磁场强度 12 T, 磁场强度可调, 频率 59 Hz。杀菌室设在螺旋管内, 杀菌室内径为 50 mm, 长 400 mm。将菌液样品装入样品瓶中(直径为 10 mm, 容积为 6 mL 的圆柱玻璃瓶), 贴好标签, 放入磁场线圈中进行杀菌。每进行一次, 让磁场发生器停几分钟, 然后再进行下一次的试验。用分光光度计测试杀菌前后菌液的吸光度, 通过图 1 或图 2 按照吸光度的数值计算对应的菌落数。以 N/N_0 的百分数表示细菌残存率, N_0 代表杀菌前菌落总数, N 代表杀菌后菌落总数。

2 结果与讨论

2.1 生长阶段的影响

测试获得的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长曲线如图 3 所示。由图 3 可知, 就大肠杆菌而言, 0~0.5 h 为延迟生长期, 0.5~4.5 h 为对数生长期, 从 4.5 h 起进入稳定生长期; 就金黄色葡萄球菌而言, 0~0.5 h 为延迟生长期, 0.5~5 h 为对数生长期, 从 5 h 起进入稳定生长期。

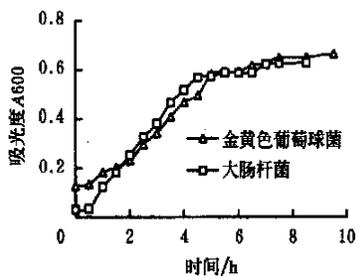


图 3 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长曲线
Fig. 3 Growth curve of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

为了探讨细菌不同生长期对脉冲磁场的敏感程度的差异, 对不同生长阶段的细菌进行了杀菌试验研究。杀菌试验采用的磁场强度为 3.37 T, 介质温度为 20℃, 脉冲数为 10 或 20。试验结果示于图 4。试验结果表明:

1) 细菌在对数生长期比稳定生长期和延迟生长期对脉

冲磁场更为敏感, 即细菌在对数生长期时, 杀菌效果最好; 2) 金黄色葡萄球菌和大肠杆菌在对数生长期对脉冲磁场最敏感的区域不同。大肠杆菌在 0.5~1.5 h 之间, 金黄色葡萄球菌在 1.5~2.5 h 之间。大肠杆菌的最敏感区段更趋于对数生长期的前段。这一结论体现出不同菌种之间的差异性; 3) 这两种细菌在对数生长期的后期(大肠杆菌在 3.5 h, 金黄色葡萄球菌在 4.5 h)杀菌效果开始出现反弹变差, 反弹趋势延长至稳定生长期, 并趋于平缓; 大肠杆菌的反弹幅度大于金黄色葡萄球菌。

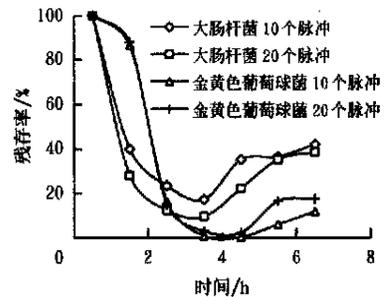


图 4 不同生长期对脉冲磁场杀菌效果的影响
Fig. 4 Effect of microorganism growth stage on the pulsed magnetic fields inactivation

2.2 介质温度的影响

调整 pH 值为 7, 在细菌处于稳定生长期, 测得介质温度对脉冲磁场杀菌效果的影响示于图 5。由图 5 可知, 磁场强度为 3.37 T, 脉冲数为 20 的条件下经杀菌处理后, 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的残存率都随介质温度的升高而降低, 表明温度升高对磁场杀菌有协同效应。这可能因为温度越高, 磁场越容易影响到蛋白质、核酸等生物大分子的结构与功能以及细胞结构, 如细胞膜的流动性及完整性, 进而影响微生物的生长、繁殖和新陈代谢。

在 5~10℃ 较低的温度范围内, 介质温度的改变对脉冲磁场杀菌效果影响较为显著。

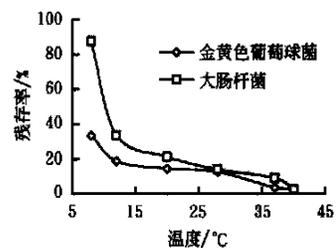


图 5 温度对杀菌效果的影响
Fig. 5 Effect of temperature on inactivation of microorganism

2.3 介质 pH 值的影响

在细菌处于稳定生长期, 测得介质 pH 值对脉冲磁场杀菌效果的影响示于图 6。由图 6 可知, 磁场强度 3.37 T、介质温度为 20℃、脉冲数为 20 的条件下经杀菌处理后, 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的残存率在 pH 值为 6 时均出现最大值, 即细菌不易死亡。这是因为大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长最适 pH 值为 6.5~7.5, 而

pH 值对微生物生命活动所起的作用与微生物保持介质中的 pH 值与细胞核的 pH 值接近的能力有关。经磁场处理后, 细胞膜的通透性增加, H^+ 的运输也增加, 从而打破了细胞周围渗透平衡。这样, 介质中的 H^+ 在磁场作用下, 引起细胞内 pH 值的变化, 进而可能诱导细胞中重要物质如 DNA、ATP 发生化学变化^[5,6]。同时, 氧化还原反应使得磁场可能更易诱变细胞结构的变化^[7]。

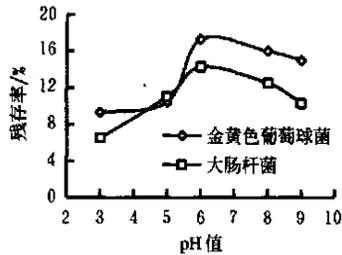


图 6 pH 值对杀菌效果的影响

Fig 6 Effect of pH on inactivation of microorganism

3 结论

1) 微生物在对数生长期比稳定生长期和延迟生长期对磁场更敏感。

2) 金黄色葡萄球菌和大肠杆菌在对数生长期对脉冲磁场最敏感的区段不同, 大肠杆菌的最敏感区段更趋于对数生长期的前段。

3) 两种细菌在对数生长期的后期杀菌效果均出现反弹变差现象, 反弹趋势延长至稳定生长期, 并趋于平缓; 大肠杆菌的反弹幅度大于金黄色葡萄球菌。

4) 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的杀菌效果在本试验条件下均随介质温度的升高而改善, 温度越高, 杀菌效果越好, 但这个温度远低于热致死温度。

5) 介质 pH 值越偏中性, 杀菌效果越差; pH 值小于 5 时, 杀菌效果较好。

[参考文献]

- [1] 徐传骧, 钟力生, 崔秀芳. 生物体的介电性质及外电磁场对其影响作用探讨[J]. 电工技术杂志, 1993, 12(1): 25- 27.
- [2] 马海乐, 邓玉林, 储金宇. 西瓜汁的高强度脉冲磁场杀菌试验研究与机理分析[J]. 农业工程学报, 2003, 19(2): 163- 166.
- [3] 马海乐, 邓玉林, 储金宇. 生啤酒的磁激发脉冲电磁场杀菌的试验研究[J]. 食品科学, 2003, 24(4): 52- 54.
- [4] 高梦祥. 高强度脉冲磁场杀菌研究[D]. 西北农林科技大学, 2004. 3.
- [5] Coster H G L, Zimmernann U. The mechanisms of electrical breakdown in the membrane of *Valonia utricularis* [J]. *J Membrane Biol*, 1975, 22: 73- 90.
- [6] Dolowy K. Uniform hypothesis of cell behavior: movement, contact inhibition of movement, adhesion, chemotaxis, phagocytosis, pinocytosis, division, contact inhibition of division, fusion [J]. *J Theor Biol*, 1975, 52: 83- 97.
- [7] Gilliland S E, Speck M L. Mechanism of the bactericidal action produced by electrohydraulic shock [J]. *Appl Microbiol* 1967, 15: 1038- 1044.

Influence of growth stage of microorganisms and medium parameters on bactericidal effect of pulsed magnetic fields

Ma Haile¹, Wu Qiongying¹, Gao Mengxiang², Chu Jinyu¹

(1. College of Biological and Environmental Engineering, Jiangsu University, Zhengjiang 212013, China;

2. College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou, 434023, China)

Abstract The *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* under different growth phases and different temperatures and pH values were inactivated by pulsed magnetic field. Logarithmic-phase microorganisms were more sensitive than stationary- and lag-phase microorganisms to the pulsed magnetic field. Inactivation effects of two microorganisms begin to be poorer at later period of logarithmic-phase and this rebound trend prolonged to lag-phase and tended gradually to smoothness. The rate of inactivation increased with the increase of temperature. The temperature was much less than the one of microorganism death caused by heating. The more pH value tended to neuter, the poorer effect of inactivation was; when pH value was less than 5, effect of inactivation was better.

Key words: pulsed magnetic field; inactivation; growth phase; temperature; pH value