

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.07.042

超声协同次氯酸钠杀灭腐败菌效果与动力学研究

迟媛¹ 弓敏² 马艳秋² 迟玉杰²

(1. 东北农业大学工程学院, 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 为研究超声协同次氯酸钠的杀菌效果及微生物致死动力学,选取大肠杆菌、考克氏菌和枯草芽孢杆菌3种典型菌为试验菌株,研究超声协同次氯酸钠的杀菌效果。采用一级动力学、Weibull 和 Logistic 模型,对以上3种典型菌株超声协同次氯酸钠失活曲线进行动力学模型拟合,并对杀菌前后菌体形态结构的破坏程度及细胞内物质损失情况进行测定。结果表明:当超声功率 150 W、NaClO 质量浓度 200 mg/L、处理时间 180 s 时,对3种菌的致死率绝对值分别为 4.54、4.28、3.97 个对数值,较相同时间下单独次氯酸钠的杀菌对数值提高了 13% ~ 67%。超声协同次氯酸钠杀菌过程更加符合非线性的动力学曲线,且随超声强度及次氯酸钠浓度的增加,Weibull 模型较 Logistic 模型更适于描述该杀菌的动力学过程($R^2 > 0.95$)。由扫描电镜结果及菌体细胞内物质损失情况发现,超声协同次氯酸钠会破坏菌体细胞外层结构,使细胞质溢出,部分细胞器溶解及细胞皱缩,最终致使细胞死亡。本研究可为超声协同次氯酸钠广泛用于微生物杀菌提供方法依据。

关键词: 超声; 次氯酸钠; 动力学; 杀菌机制

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2020)07-0372-10 OSID: 

Bactericidal Effect of Three Typical Strains by Ultrasonic Combined with Sodium Hypochlorite

CHI Yuan¹ GONG Min² MA Yanqiu² CHI Yujie²

(1. College of Engineering, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China
2. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Three kinds of typical bacteria were selected as the experimental strains, *E. coli*, *K. marina* and *B. subtilis*, in order to study the bactericidal effect of ultrasonic combined with sodium hypochlorite and the lethal kinetics of microorganism. Three common models were selected, namely first-order kinetics, Weibull, and Logistic models, to fit the inactivation curve of three typical strains by ultrasonic combined with sodium hypochlorite. Besides, the damage degree of the morphological structure of the bacteria before and after sterilization and the loss of materials in the cells were measured. The results showed that when the ultrasonic power was 150 W, the concentration of NaClO was 200 mg/L, and the treatment time was 180 s, the lethal dose logarithm to three kinds of bacteria was 4.54, 4.28 and 3.97, which was 13% ~ 67% higher than that of sodium hypochlorite alone at the same time. With the increase of ultrasonic intensity and the concentration of sodium hypochlorite, Weibull model was more suitable to describe the sterilization process than logistic model ($R^2 > 0.95$). At the same time, through the results of scanning electron microscopy and the loss of material in the cell, it was found that the combination of ultrasound and sodium hypochlorite can destroy the outer structure of the cell, make the cytoplasm overflow, the organelle dissolve and the cell shrink, and finally cause the cell death. The research result can provide an important method basis for the combination of ultrasound combined with sodium hypochlorite widely used in microbial sterilization.

Key words: ultrasound; sodium hypochlorite; kinetics; germicidal mechanism

收稿日期: 2020-05-13 修回日期: 2020-06-06
基金项目: 农业农村部蛋鸡产业技术体系岗位科学家项目(CRAS-40-K25)
作者简介: 迟媛(1974—),女,副教授,主要从事流体传动与控制研究,E-mail: cy207@126.com
通信作者: 迟玉杰(1963—),女,教授,博士,主要从事食品化学及农畜产品深加工研究,E-mail: yjchi323@126.com

0 引言

食品原材料的清洗杀菌是食品加工中必不可少的环节,采用有效的杀菌方法可杀灭腐败菌和致病菌,以保证食品质量安全。存在于食品中的微生物种类繁多,其中大肠埃希氏菌是食品中重要的腐生菌,能发酵多种糖产酸、产气,造成食品腐败变质,而且大肠杆菌产生的肠毒素、外毒素、志贺毒素、黏附素等致病物质会增加人体患病风险^[1-2];芽孢杆菌属已被证实为多种食品中常见的食品腐败菌,其中枯草芽孢杆菌可分解食品中蛋白质、糖类等营养物质,造成食品的风味和口感产生不期望的变化,从而引起食品的腐败变质^[3];考克氏菌广泛存在于海洋食品、腐乳、肉类等蛋白质含量高的产品中,同样极易造成食品的变质^[4]。因此,对食品中典型腐败菌种进行有效的杀灭是保证产品质量安全的关键所在。

化学杀菌剂杀菌操作简便、成本低,目前国外食品加工企业一般采用次氯酸钠杀菌剂对蛋源进行杀菌处理,但是其单独作用于菌体细胞时,渗透性较差,对菌体仅造成亚致死损伤,杀菌效果差^[5]。超声作为一种新型的非热杀菌技术被广泛应用,在食品加工中一般以液体为介质,作用过程产生空化效应,破坏菌体细胞结构,使微生物细胞处于亚损伤状态,但是单独作用时低强度下杀菌效果不明显,需要大幅度增加超声强度来提高杀菌效果,易造成能源的浪费。因此,将超声与化学杀菌剂联合作用会大幅度提高杀菌效果^[6-7]。国内外研究者对超声协同化学杀菌剂产生的强化杀菌效应进行了研究,文献[8]研究发现,超声和臭氧共同作用对单增李斯特菌的杀菌效果比单一杀菌技术提升约 30%;文献[9]研究发现,万古霉素和超声协同作用会显著提高对葡萄球菌的杀菌效果;文献[10]研究发现,超声会显著提高戊二醛对孢子悬浮液的杀灭效果;文献[11]研究发现,超声结合牛至精油对生菜中大肠杆菌 O157:H7 的杀菌比单一牛至精油杀菌效果提高了 26%。

微生物杀菌效果的动力学模型是研究杀菌技术的关键理论之一,对其实际应用具有理论指导意义^[12-13]。目前,关于超声协同化学杀菌剂的研究多数集中在证明二者之间的协同效应,对其协同杀菌动力学过程缺乏详细研究。本文以食品中常见的 3 株典型菌种为模型菌,研究超声协同次氯酸钠对模型菌的杀菌效果,采用一级动力学、Weibull、Logistic 模型拟合杀菌动力学曲线,并对模型拟合度进行定量评价,利用生物电镜观察菌种微观结构破坏情况,并测定杀菌处理后 3 种指示菌细胞内物质的损失,以期微生物杀菌提供重要的方法依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

指示菌:大肠杆菌(*E. coli*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、考克氏菌(*K. marina*),为实验室保存菌种。

培养基及化学试剂:伊红美蓝培养基、平板计数培养基,青岛海博生物科技有限公司;次氯酸钠(NaClO)溶液,天津市凯通化学试剂有限公司。中和试剂:5 g/L 的硫代硫酸钠溶液,天津市天力化学试剂有限公司。戊二醛固定液,北京华越洋生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

KQ3200DE 型数控超声清洗器,昆山市超声仪器有限公司;DHP-9272 型电热恒温培养箱,上海齐欣科学仪器有限公司;核酸蛋白分析仪,北京维欣仪奥科技发展有限公司。S-3400 N(HITACHI)型扫描电镜,日本 Giko 公司。

1.3 方法

1.3.1 菌悬液的制备

将斜面保存的 *E. coli*、*B. subtilis*、*K. marina* 取出,并分别加入 2 mL 质量分数为 0.85% 的灭菌生理盐水,将菌苔充分洗涤并吸取 1 mL 菌悬液到带有玻璃珠的三角瓶中,加入质量分数为 0.85% 的无菌生理盐水进行稀释并振荡 30 min,将菌苔打碎,用核酸蛋白分析仪测定细胞浓度,调整菌悬液菌体浓度至 10^7 cfu/mL。

1.3.2 悬液定量杀菌试验

参照 GB 15981—1995 中悬液定量的方法评价化学消毒剂的杀灭效果,用灭菌蒸馏水将 10 g/L 的 NaClO 溶液稀释成质量浓度为 50、100、200 mg/L,吸取 4.5 mL 的 NaClO 溶液于灭菌试管中,加入 0.5 mL 菌悬液,混匀,并超声处理,设置超声功率 60、120、150 W,超声时间 60、90、120、150、180 s。杀菌处理后,同时取 0.5 mL 菌液加入到 4.5 mL 的中和试剂内终止消毒剂继续杀菌,中和 10 min,采用平板计数法对不同杀菌条件下的残留活菌数进行计数。利用杀菌处理前后样品微生物残存率对数值表示超声协同 NaClO 致死效果(致死率 C 为负数,其绝对值越大表示致死效果越强),空白组为不经过超声处理(即单独次氯酸钠杀菌处理),试验重复 3 次,致死率计算公式为

$$C = \lg \frac{N}{N_0} \tag{1}$$

式中 N_0 ——超声辅助次氯酸钠杀菌前细菌菌落菌体浓度,cfu/mL

N ——超声辅助次氯酸钠杀菌后细菌菌落菌体浓度,cfu/mL

1.3.3 微生物杀菌动力学模型

微生物杀灭效果的动力学模型是研究杀菌技术的关键理论,对其实际应用具有重要的理论指导意义。本研究选用一级动力学、Weibull、Logistic 模型对超声协同次氯酸钠对 3 种典型菌株的杀菌动力学过程进行拟合并对 3 种模型进行比较分析。

(1)一级动力学模型

一级动力学模型的使用是假设微生物具有相同的抗逆性,随时间的变化微生物下降的对数值呈现线性变化^[14],模型公式为

$$\lg \frac{N}{N_0} = - \frac{t}{D_p} \tag{2}$$

式中 t ——杀菌处理时间,s
 D_p ——指数递减时间,即某处理条件下每杀死 90% 的活菌数所需时间,s

(2)Weibull 模型

Weibull 模型用于描述各种线性 and 凹凸型曲线的非线性模型^[15-16],该模型假设菌体对杀菌强度的抗性具有差别且符合 Weibull 模型分布,文献[17]研究发现 Weibull 模型能够较好地拟合微酸性电解水与苯扎氯铵联合温和热处理对蜡样芽孢杆菌的杀菌动力学过程,本研究在 Hussain 基础上做了简化处理,公式为

$$\lg \frac{N}{N_0} = - \left(\frac{t}{a} \right)^b \tag{3}$$

式中 a ——规模参数,表示一定条件下降低一个对数级细菌所需时间
 b ——形状因子,当 $b < 1$ 时曲线向上凹; $b > 1$ 时曲线向下凹; $b = 1$ 时为一条直线

(3)Logistic 模型

Logistic 模型假设菌体对杀菌强度的抗性具有差别,文献[18]发现该模型能够很好地拟合微波对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的杀菌动力学过程,本研究在文献[18]基础上做了简化处理,公式为

$$\lg \frac{N}{N_0} = \frac{p}{1 + qe^{-mt}} \tag{4}$$

式中 p ——最低的残存细菌菌落菌体浓度对数值
 $q、m$ ——曲线方程的参数

(4)模型评价

$A_f、B_f、R^2$ 和均方根误差 4 个参数通常作为一种定量的方法来评价模型^[19], A_f 是精确因子,表示预测值与实测值偏离程度。 B_f 是偏差因子, $B_f > 1$ 表示模型预测值比实测值高; $B_f < 1$ 表示模型预测值比实测值低;当 B_f 越接近 1,模型拟合度越高;均方根误差和 R^2 均表示模型的精确度、可靠度,当 R^2 越接近于 1,均方根误差越小,模型拟合度越好。

1.3.4 扫描电镜观察

将 3 株菌种的单菌落分别接入液体培养基中,培养 48 h,取出。将含有菌株的液体培养基加到已灭菌的 10 mL 离心管中,8 000 r/min 离心 3 min,弃掉上清液,加入质量浓度为 200 mg/L 的次氯酸钠溶液 5 mL,同时置于超声体系,超声强度 150 W,时间 120 s。加入等量中和剂终止杀菌,离心 10 min,弃掉上清液,加入无菌生理盐水进行洗脱 2 次,转移到 1.5 mL 的离心管内,得到灭菌处理过后的菌泥,加入戊二醛固定液于 4℃ 条件下固定 2 h。用磷酸盐缓冲液冲洗 3 次,每次 10 min;然后采用 50%、70%、90%、100% 的乙醇进行逐级脱水各 1 次,每次 10 min;采用 1:1 的 100% 乙醇/叔丁醇进行置换 10 min;临界点干燥、喷金,电镜下观察、拍照,获得电镜结果图,未经杀菌处理的对照样本作同样处理。

1.3.5 细菌细胞内物质损失的测定

参考文献[20]的方法对杀菌前后 3 种菌株菌悬液中可溶性蛋白及还原糖含量进行测定,取经过超声处理、超声联合次氯酸钠、单独次氯酸钠杀菌处理后的 3 种菌株的菌悬液,各吸取 2 mL 菌液至乳糖胆盐培养基中,37℃ 恒温培养,每隔 1 h 取出,在 7 000 r/min 下离心 10 min,取上层清液采用直接滴定法测定杀菌前后菌悬液中的还原糖含量。采用牛血清蛋白浓度-吸光度标准曲线法测定可溶性蛋白含量,同样取杀菌后的菌悬液样品 2 mL,在 -20℃ 冰箱中冷冻 12 h,加入 0.01 mol/L Tris-HCl (pH 值 8.0) 缓冲液,准确吸取 0.1 mL 各处理样品于 10 mL 具塞试管中,加入 5 mL 考马斯亮蓝 G 250 染色剂,混合后放置 2 min,并于波长 595 nm 处测定吸光度,从标准曲线查得相应样品的蛋白含量。

1.4 试验数据处理及分析

应用 SPSS Statistics 19.0 软件对试验数据进行方差分析,采用 Origin 软件作图,使用 Curve Expert 进行模型拟合。

2 结果与分析

2.1 超声协同次氯酸钠溶液的杀菌效果

次氯酸钠具有强氧化性,属于一种安全高效消毒液,被广泛应用于食品原料的清洗杀菌过程中。研究发现次氯酸钠溶于水后水解形成次氯酸,次氯酸能够穿透菌体细胞壁并进一步破坏蛋白质及酶系统,影响细胞生命活动从而杀死微生物^[21]。本研究选用 60、120、150 W 超声与 50、100、200 mg/L 的次氯酸钠联合作用,研究超声协同次氯酸钠溶液对 *E. coli*、*K. marina*、*B. subtilis* 杀灭效果,杀菌动态曲线如图 1 所示。

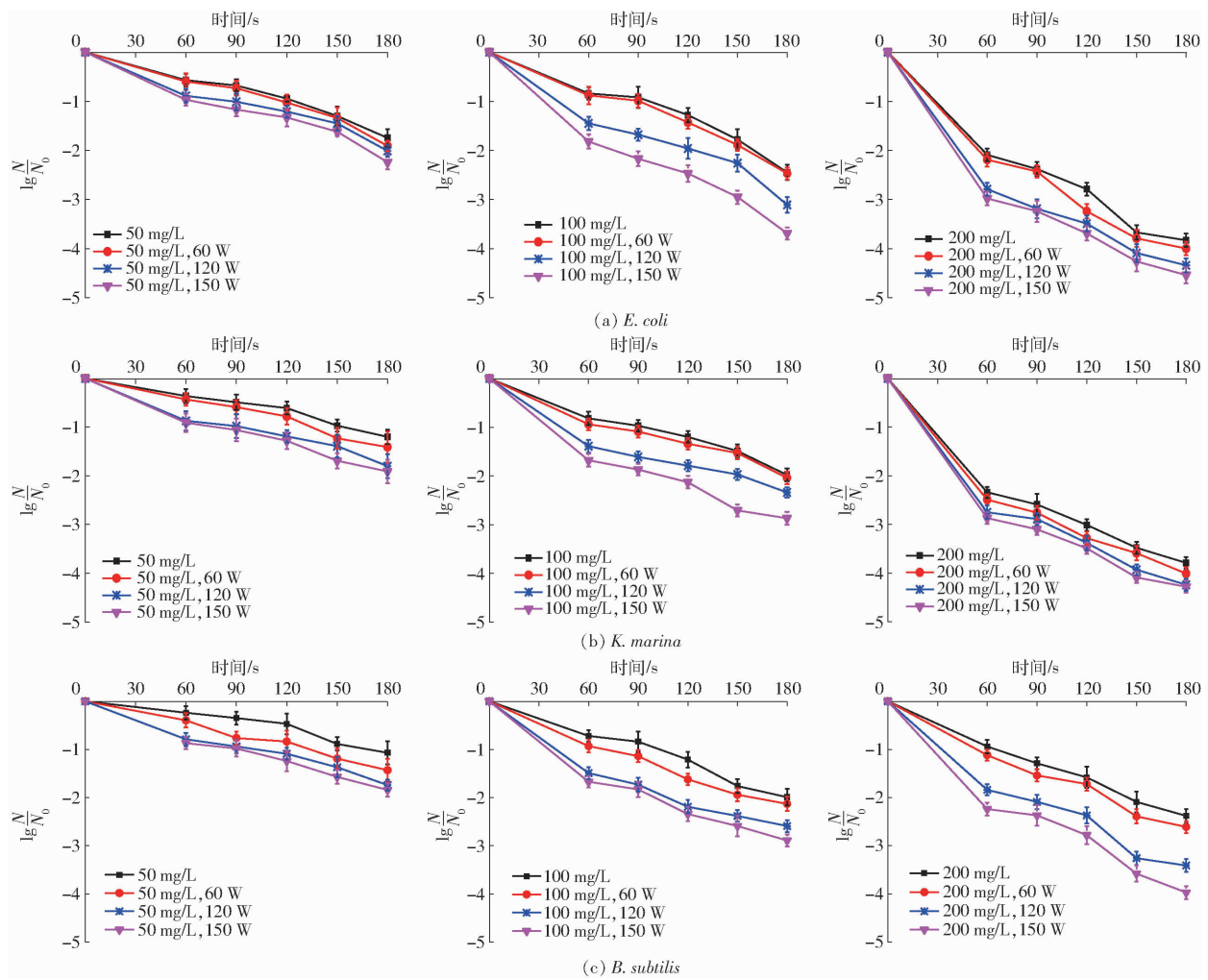


图 1 超声协同次氯酸钠对 3 种指示菌的杀菌效果

Fig.1 Effect of different ultrasonic treatments assisted sodium hypochlorite on inactivation of indicator bacteria

由图 1 可知, *E. coli*、*K. marina*、*B. subtilis* 的致死量随 NaClO 质量浓度的增加而不断增加, 且不同质量浓度的 NaClO 对 3 种指示菌的致死量具有显著差异 ($P < 0.05$)。当 NaClO 质量浓度达 200 mg/L, 单独杀菌 180 s 后, 菌悬液中 *E. coli*、*K. marina*、*B. subtilis* 致死率为 (-3.83 ± 0.134) 、 (-3.79 ± 0.122) 、 (-2.38 ± 0.136) 个对数值, 由此可见 *E. coli* 对 NaClO 的抗性较低, *K. marina* 次之, 而 *B. subtilis* 对 NaClO 具有较强的抗性, 文献[22]也研究了 NaClO 对 *E. coli* 和 *B. cereus* 的杀菌效果, 研究结果得出当 NaClO 质量浓度为 100 mg/L 时对 *E. coli* 的损坏程度较大, 而对 *B. cereus* 的杀菌较弱, 与本研究结果相一致, 这可能是由于具有芽孢结构的菌株对 NaClO 消毒液具有较强的抗性, 加之菌体外层具有一层生物膜, NaClO 难以渗透进入菌体内部, 导致 NaClO 对芽孢杆菌的杀灭能力较弱^[23-24]。同样, 文献[25]研究了氯、二氧化氯和过氧乙酸对 *B. cereus* 孢子结构的杀菌效果, 发现该菌株对 3 种化学杀菌剂具有较强的抗性, 需要湿热条件对其进行联合

杀菌, 才能达到良好的杀菌效果。

在 NaClO 质量浓度相同的情况下, 不同功率的超声协同 NaClO 杀菌, 随处理时间的增加, 对 *E. coli*、*K. marina*、*B. subtilis* 的致死量逐渐增大。当 NaClO 质量浓度为 200 mg/L, 超声 150 W 处理 180 s 时, 对 *E. coli* 的致死率绝对值为 (4.54 ± 0.164) 个对数值, 对 *K. marina* 和 *B. subtilis* 的致死率绝对值分别为 (4.28 ± 0.123) 、 (3.97 ± 0.134) 个对数值, 较相同 NaClO 浓度单独处理相同时间相比致死量显著提高, 提高了 13% ~ 67%。此外, 处理时间相同、NaClO 质量浓度相同的情况下, 对 3 种菌的致死量随超声强度的增强而增加, 且高强度的超声对低强度的超声的协同杀菌效果显著增加 ($P < 0.05$)。当 NaClO 质量浓度为 50、100、200 mg/L, 超声功率 60 W, 处理时间 60 ~ 180 s, 对比未经过超声处理的杀菌量不存在显著差异 ($P > 0.05$); 当超声功率为 150 W 时, 对比超声功率 60 W, 相同时间对 3 种指示菌的致死效果显著增加。相似地, 文献[26]研究了超声波辅助二氧化氯对鸡蛋表面大肠杆菌、金黄色

葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的杀灭效果,研究得出 59 kHz 超声协同 50 mg/L 二氧化氯,处理 5 min,对 3 个菌种的杀菌量达 4 个对数值,与本研究得出相同的规律,即超声波会显著提高杀菌剂的杀菌效果,可能是协同作用时超声波优先作用于菌体生物被膜结构,通过强烈的空化效应破坏生物被膜三维结构使内部菌体暴露,导致细菌通透性增加,菌体蛋白质及 DNA 渗漏,代谢酶活性降低,杀菌剂便可直接作用于裸露的菌体,强化杀菌效应^[27-29]。文献[30]做了前期工作,采用 160 W 的超声波和 5~62℃ 的热处理联合使用,发现比二者单独使用具有更好的杀菌效果,且处理时间短,耗能少。文献[31]研究同样得出超声在微生物杀菌过程中与其他灭菌技术联合效果更好,如热处理,氯化作用,

加压条件下等。

2.2 超声协同次氯酸钠溶液杀菌效果动力学分析

运用一级动力学、Weibull、Logistic 模型对超声协同 NaClO 对 *E. coli*、*K. marina*、*B. subtilis* 的灭活动力学曲线进行拟合,其拟合模型参数如表 1~3 所示。

决定系数一般用来对模型拟合程度做一个总体评价^[32],由表 1~3 可知,采用一级动力学模型拟合获得不同杀菌处理条件下的直线,其部分决定系数 R^2 小于 0.95,尤其当 NaClO 质量浓度及超声强度增大后线性拟合效果较差。而利用 Weibull 模型拟合的动力学曲线,其 R^2 均大于 0.95。Logistic 模型对高强度的超声体系协同 NaClO 的杀菌动力学曲线进行拟合, R^2 在 0.90~0.95 之间。一级动力学模型

表 1 3 种模型拟合超声协同次氯酸钠对 *E. coli* 致死效果的动力学模型参数

Tab.1 Kinetic curve parameters of three models fitting lethal effect of ultrasound combined with sodium hypochlorite on <i>E. coli</i>										
质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	超声 功率/W	一级动力学模型		Weibull 模型			Logistic 模型			
		D_p/s	R^2	a	b	R^2	p	q	m	R^2
50	0	112.360	0.971	117.755	1.222	0.979	-2.839	16.285	0.018	0.973
	60	105.260	0.965	111.917	1.251	0.974	-3.587	18.345	0.017	0.971
	120	93.460	0.955	85.969	0.835	0.955	-2.512	8.412	0.018	0.921
	150	83.330	0.956	75.258	0.832	0.957	-2.751	8.323	0.018	0.922
100	0	81.300	0.960	90.475	1.230	0.965	-4.80	18.318	0.016	0.965
	60	77.520	0.979	83.310	1.129	0.979	-2.458	9.34	0.019	0.944
	120	59.172	0.943	44.180	0.749	0.958	-3.755	7.862	0.019	0.921
	150	46.393	0.944	28.536	0.680	0.981	-2.784	7.585	0.033	0.936
200	0	42.373	0.926	20.904	0.628	0.983	-3.875	7.903	0.029	0.943
	60	40.000	0.923	18.264	0.614	0.989	-4.006	8.832	0.032	0.958
	120	35.714	0.821	5.676	0.423	0.996	-3.994	10.930	0.048	0.953
	150	34.130	0.818	4.939	0.419	0.995	-4.174	10.140	0.047	0.947

表 2 3 种模型拟合超声协同次氯酸钠对 *K. marina* 致死效果的动力学模型参数

Tab.2 Kinetic curve parameters of three models fitting lethal effect of ultrasound combined with sodium hypochlorite on <i>K. marina</i>										
质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	超声 功率/W	一级动力学模型		Weibull 模型			Logistic 模型			
		D_p/s	R^2	a	b	R^2	p	q	m	R^2
50	0	161.290	0.967	157.617 0	1.273 0	0.979	-1.795	17.258	0.020	0.975
	60	133.330	0.973	134.373 0	1.221 0	0.982	-1.815	16.859	0.023	0.978
	120	99.010	0.950	87.289 0	0.725 8	0.974	-1.877	7.317	0.023	0.926
	150	90.910	0.967	78.312 5	0.762 2	0.986	-2.039	8.358	0.025	0.950
100	0	94.340	0.976	90.123 0	0.902 0	0.973	-2.458	9.344	0.019	0.944
	60	88.500	0.957	77.025 0	0.761 0	0.972	-2.167	7.623	0.022	0.929
	120	69.930	0.854	32.660 0	0.473 0	0.991	-2.077	9.529	0.043	0.939
	150	55.866	0.895	26.695 0	0.551 0	0.986	-2.784	7.585	0.033	0.936
200	0	41.841	0.857	11.134 1	0.474 9	0.995	-3.523	8.743	0.040	0.946
	60	39.526	0.845	8.879 0	0.456 2	0.996	-3.683	9.484	0.043	0.950
	120	37.037	0.834	7.153 3	0.443 7	0.990	-3.908	8.660	0.423	0.936
	150	35.970	0.805	4.939 0	0.403 6	0.993	-3.942	10.666	0.049	0.946

表 3 3 种模型拟合超声协同次氯酸钠对 *B. subtilis* 致死效果的动力学模型参数

Tab.3 Kinetic curve parameters of three models fitting lethal effect of ultrasound combined with sodium hypochlorite on *B. subtilis*

质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	超声 功率/W	一级动力学模型		Weibull 模型			Logistic 模型			
		<i>D_p</i> /s	<i>R</i> ²	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>R</i> ²	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>m</i>	<i>R</i> ²
50	0	188.670	0.953	171.015	1.621 6	0.972	-1.594	31.125	0.023	0.978
	60	128.210	0.985	129.820	1.087 0	0.984	-1.644	13.920	0.024	0.971
	120	104.170	0.965	95.674	0.790 0	0.976	-1.926	7.927	0.021	0.936
	150	94.339	0.970	84.514	0.776 0	0.986	-1.977	8.337	0.024	0.945
100	0	91.743	0.981	94.994	1.096 0	0.980	-2.450	13.974	0.023	0.973
	60	78.740	0.979	68.800	0.809 0	0.992	-2.227	11.076	0.029	0.976
	120	60.976	0.885	28.940	0.526 0	0.996	-2.479	9.627	0.038	0.964
	150	55.560	0.895	25.858	0.543 0	0.993	-2.758	8.364	0.035	0.950
200	0	73.529	0.992	67.387	0.884 5	0.996	-2.582	10.621	0.025	0.973
	60	65.359	0.975	54.340	0.806 4	0.986	-2.775	9.556	0.026	0.960
	120	48.077	0.928	27.028	0.649 0	0.975	-3.503	7.630	0.028	0.934
	150	41.841	0.916	19.443	0.609 5	0.977	-3.966	6.955	0.027	0.924

认为微生物残留菌数量与时间呈现线性关系^[33],而本研究发现超声协同 NaClO 杀菌更符合非线性模型,在超声功率及 NaClO 质量浓度较低的情况下的杀菌动力学过程中 Weibull 模型和 Logistic 模型均可以很好地拟合动力学曲线,随超声功率及 NaClO 质量浓度的增加,Weibull 模型更加符合杀菌过程。因此,超声协同 NaClO 对 3 种典型菌株的杀菌过程更加符合 Weibull 模型。

2.3 模型拟合度评价

为了进一步比较 Weibull 模型和 Logistic 模型对超声协同 NaClO 杀菌过程的拟合度,进一步比较分析了模型评价参数 *A_f*、*B_f*、均方根误差和 *R*²。由表 4 可知,Weibull 模型的 *A_f* 和均方根误差均低于 Logistic 模型,说明 Weibull 模型预测的平均精确度较高,离散程度较低,同时 Weibull 模型的 *B_f*和 *R*²较 Logistic 模型更接近于 1。因此,Weibull 模型从整体上能够很好地拟合超声协同 NaClO 的杀菌动力学过程。

通过比较 Weibull 模型和 Logistic 模型回归方

表 4 数学模型评价参数的比较

Tab.4 Comparison of evaluation indices of mathematics model

模型	参数	<i>E. coli</i>	<i>K. marina</i>	<i>B. subtilis</i>
Weibull	<i>A_f</i>	1.080 2	1.062 7	1.058 4
	<i>B_f</i>	1.018 9	1.000 3	1.004 6
	均方根误差	0.142 5	0.119 1	0.099 8
	<i>R</i> ²	0.983 8	0.985 8	0.985 3
Logistic	<i>A_f</i>	1.101 7	1.097 9	1.092 6
	<i>B_f</i>	1.043 0	0.975 6	0.964 1
	均方根误差	0.215 0	0.210 4	0.161 3
	<i>R</i> ²	0.965 3	0.963 6	0.964 4

程所得预测值和实测值的接近程度,以实测数据为横坐标,模型预测数据为纵坐标作图,利用线性拟合得到的相关性方程及决定系数 *R*²来判断预测值和实测值的差异。由图 2 可知,Weibull 模型和 Logistic 模型对超声协同 NaClO 对 3 种典型菌株致死率的预测值与实测值之间具有较好的相关性。线性相关方程的斜率及截距越接近于 0, *R*²越接近于 1,表明模型拟合效果越好。Weibull 模型对 *E. coli*、

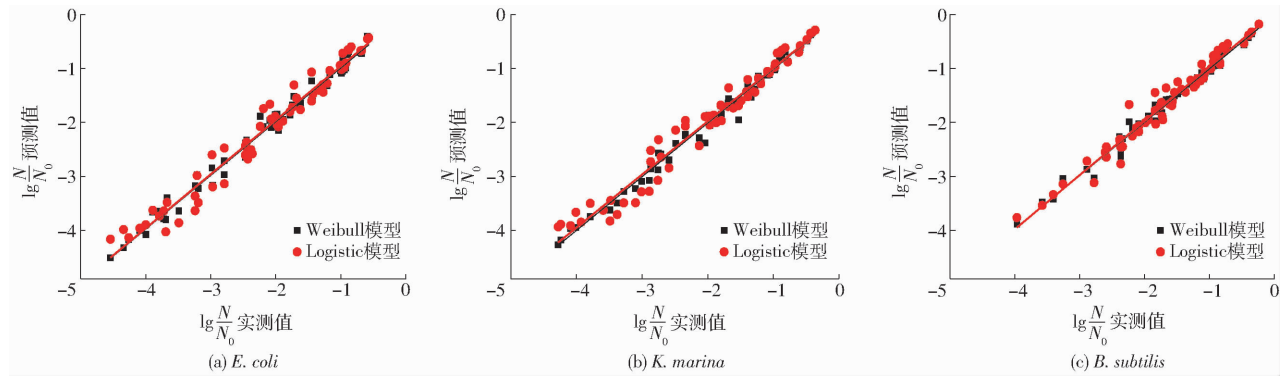


图 2 超声协同次氯酸钠溶液杀菌效果预测值和实测值的相关性

Fig.2 Correlation between observed and predicted values for inactivation effects of sodium hypochlorite combined with ultrasonic treatment

K. matina、*B. subtilis* 杀菌拟合得到的方程分别为 $y = 1.002\,52x + 0.007\,36$ 、 $y = 0.994\,97x - 0.021\,13$ 、 $y = 0.990\,0x - 0.003\,6$ ，对应的决定系数分别为 0.983 8、0.985 8、0.985 3；Logistic 模型拟合得到的方程分别为 $y = 0.996\,99x + 0.046\,92$ 、 $y = 0.985\,78x - 0.007\,16$ 、 $y = 1.003\,1x + 0.015\,2$ ，对应的决定系数分别为 0.965 3、0.963 6、0.964 4。因此，Weibull 模型较 Logistic 模型能够较好地模拟超声协同 NaClO 杀菌的动力学过程。

2.4 Weibull 模型参数与超声强度的关系分析

通过比较得出 Weibull 模型较线性模型和 Logistic 模型能够很好地拟合超声协同次氯酸钠的杀菌动力学过程。参数 a 可以反映杀菌的效果^[34]，由图 3 和表 5 分析得出，参数 a 与超声强度具有很好的负相关， R^2 均不小于 0.917。模型公式中形状参数 b 与超声强度呈现较好的负相关， R^2 均不小于 0.852， b 值随超声强度的增加逐渐减小，且较高强度的超声协同作用下参数 b 均小于 1，参数 b 反映的是曲线形状，说明曲线拖尾明显，在同一超声强度作用下，延长杀菌时间并不一定能够显著提高杀菌效果，而且由相关研究同样证明超声强度增加到一定程度后，其空化效应会减弱，杀菌率也会趋于平缓，与其他相关研究结果一致^[35]。

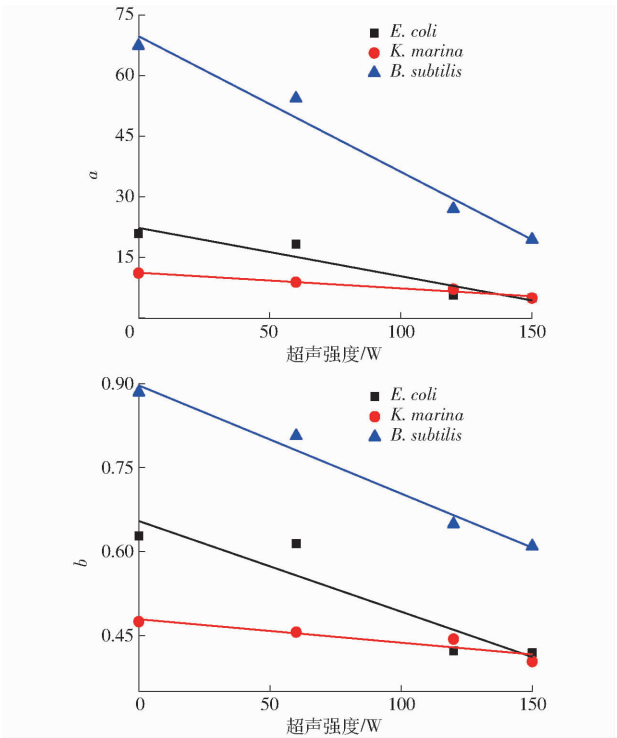


图3 Weibull 模型参数 a 和 b 与超声强度的关系
Fig.3 Correlation between Weibull model parameter a or b and ultrasonic intensity

2.5 超声协同次氯酸钠的杀菌机理分析

2.5.1 扫描电镜观察结果

为了进一步探究超声协同 NaClO 对 3 种典型

表 5 相关性方程			
Tab.5 Correlation equation			
模型参数	指示菌	线性方程	决定系数
a	<i>E. coli</i>	$y = -0.119\,7x + 22.323$	0.917
	<i>K. marina</i>	$y = -0.038\,9x + 11.238$	0.977
	<i>B. subtilis</i>	$y = -0.335\,7x + 69.743$	0.978
b	<i>E. coli</i>	$y = -0.001\,6x + 0.654\,5$	0.867
	<i>K. marina</i>	$y = -0.000\,4x + 0.479\,2$	0.852
	<i>B. subtilis</i>	$y = -0.001\,9x + 0.896\,7$	0.979

菌株细胞菌体破坏情况，本研究利用生物扫描电镜对超声协同 NaClO 及单独 NaClO 处理前后 *E. coli*、*K. matina*、*B. subtilis* 的微观结构进行观察，结果如图 4 所示。

由单独 NaClO 溶液及超声协同 NaClO 溶液杀菌处理前后 3 种指示菌扫描电镜结果(图 4，放大倍数 2 000 ~ 3 500)，可以看出 3 种菌株杀菌前后菌体形态结构的变化。未经杀菌处理的 *E. coli*(图 4a)呈现规则的长杆状，菌体胞壁周围完整，轮廓清晰，胞质均匀；*K. marina*(图 4d)表现为球形，胞壁光滑完整，轮廓清晰，胞质均匀；*B. subtilis* 为规则的梭形，胞壁光滑完整，且细胞壁与细胞膜之间无间隙，胞质均匀饱满。

由图 4b、4e、4h 可知，经过 NaClO 单独处理后 3 种指示菌菌体塌陷，原生质溶出，其中 *E. coli* 菌体中部凹陷严重且存在部分细胞碎片，*K. marina* 细胞壁裂解，细胞皱缩，*B. subtilis* 表现严重的皱缩现象，细胞质损失严重。而超声协同 NaClO 处理后，3 种指示菌菌体破坏大，其中 *E. coli* 形态变化最为严重(图 4c)，多数菌体已呈现碎片状态，*K. marina* 细胞壁破裂崩解，胞质溶出，*B. subtilis* 菌体表面起皱，胞质溶出并向外渗出，细胞发生严重皱缩且残存少部分细胞碎片。关于菌体杀菌机理目前多数研究学者认为细菌的死亡是通过破坏菌体细胞壁使菌株内部结构暴露，引起菌体对外界环境的抗性降低，进而在杀菌条件下致使其死亡^[36-38]。超声协同 NaClO 会加速菌体裂解死亡，可能原因是在杀菌过程中超声优先作用于菌体细胞壁，破坏了菌体外层结构，NaClO 便直接作用于裸露的菌体，加速菌体细胞死亡。文献[39]建立了超声波产生的剪切力造成微生物表面附近塌陷的模型，进一步阐明了超声波能够破坏菌体外层结构，此外，文献[40]关于超声波的杀菌机制进行了阐释，认为超声产生的空化效果，即微泡的形成、生长和溃灭导致机械效应，进而破坏菌体结构。

2.5.2 细菌细胞内物质损失

为了进一步研究超声协同 NaClO 对 3 种典型菌株菌体的破坏情况，测定并比较了超声协同

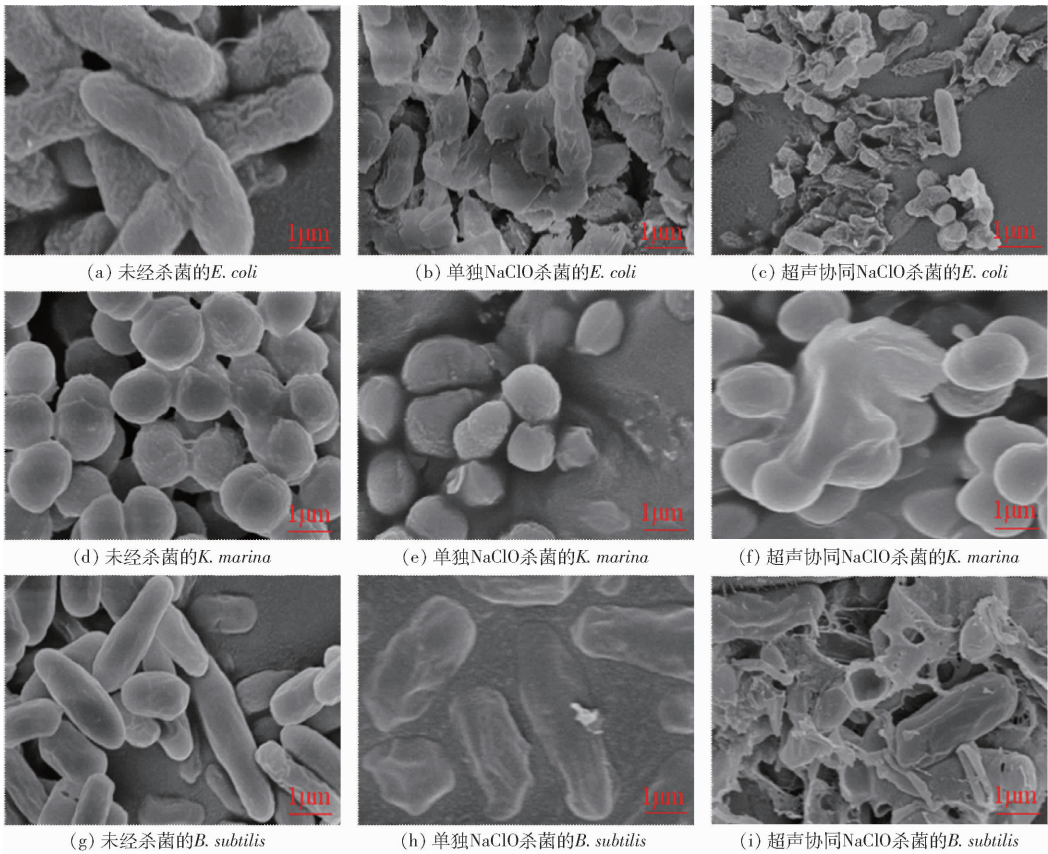


图 4 超声协同次氯酸钠对指示菌处理前后的扫描电镜图

Fig.4 SEM photos of indicator bacteria before and after treatment with ultrasound combined with sodium hypochlorite

NaClO 和单独 NaClO 杀菌处理前后细菌细胞内物质损失情况，其中单独 NaClO 溶液处理条件为 200 mg/L、2 min，超声协同 NaClO 处理条件为 150 W、200 mg/L、180 s，结果如图 5 所示。

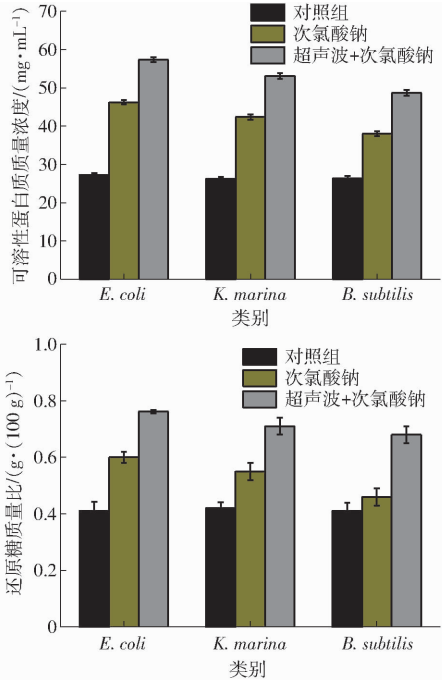


图 5 超声协同次氯酸钠杀菌对细菌细胞内物质损失的影响
Fig.5 Effect of ultrasonic assisted sodium hypochlorite sterilization on loss of intracellular material of bacteria

由图 5 可知，经过杀菌处理的 3 种菌株菌悬液中还原糖及可溶性蛋白质均出现增加的现象，超声联合 NaClO 杀菌处理较单独 NaClO 杀菌，菌悬液中还原糖及可溶性蛋白质含量显著增加，还原糖及可溶性蛋白质含量均增长了近 30%，尤其以 *E. coli* 菌悬液最为明显，还原糖含量（质量比）及可溶性蛋白质含量（质量浓度）分别达到 0.76 g/(100 g)、57.36 mg/mL。由此可见，超声协同 NaClO 会极大地损伤菌体细胞膜，进而改变细胞膜通透性，使菌体中可溶性蛋白质及还原糖渗出，加速了菌体死亡，与扫描电镜结果相一致。

3 结束语

超声协同 NaClO 对 3 种典型菌种的致死起到了一定的协同作用，且表现为高强度的超声功率（60 W 以上）能够显著提高 NaClO 的杀菌效果，在超声功率 150 W、NaClO 质量浓度 200 mg/L、作用时间 180 s 的条件下对大肠杆菌、考克氏菌、枯草芽孢杆菌的杀菌量分别为 (4.54 ± 0.164) 、 (4.28 ± 0.123) 、 (3.97 ± 0.134) 个对数值，对比单独 NaClO 的杀菌量提高了 13% ~ 67%。对其杀菌效果动力学过程进行分析得出，与一级动力学模型和 Logistic 模型相比，Weibull 模型整体上能更好地拟合超声协同次氯酸钠对大肠杆菌、考克氏菌、枯

草芽孢杆菌的失活动力学过程。通过观察超声协同次氯酸钠对3种典型菌株微观结构的变化发现,超声协同次氯酸钠会破坏菌体细胞壁,导致质壁分离,细胞膜结构被破坏,从而导致细胞质外

溢,促使胞质内部还原糖及蛋白质等物质渗出,部分细胞器溶解及细胞皱缩,最终致使细胞死亡。该研究可为超声协同次氯酸钠广泛用于微生物杀菌提供方法依据。

参 考 文 献

- [1] 殷泽禄, 万虎. 大肠杆菌的研究综述[J]. 甘肃畜牧兽医, 2019, 49(5): 33-35.
- [2] 吴颜菲. 不同养殖模式蛋壳表面微生物污染及大肠杆菌生物学特征性研究[D]. 邯郸: 河北工程大学, 2017.
WU Yanfei. Study on the surface microbial contamination of egg shell and the biological characteristics of *Escherichia coli* in different culture patterns [D]. Handan: Hebei University of Engineering, 2017. (in Chinese)
- [3] MOSES S, SINNER T, ZAPRASIL A, et al. Proline utilization by *Bacillus subtilis*: uptake and catabolism [J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(4): 745-758.
- [4] 弓敏, 马艳秋, 王瑞红, 等. 鸡蛋蛋壳表面典型菌株的分离鉴定及对全蛋液致腐能力的分析[J/OL]. 食品科学. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200320.1656.010.html>.
GONG Min, MA Yanqiu, WANG Ruihong, et al. Isolation and identification of typical strains on eggshell surface and spoilage capability to the whole egg liquid [J/OL]. Food Science. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200320.1656.010.html>. (in Chinese)
- [5] SATOSHI F. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes [J]. Biocontrol Science, 2006, 11(4): 147-157.
- [6] 刘丽艳, 张喜梅, 李琳, 等. 超声波杀菌技术在食品中的应用[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 778-780.
LIU Liyan, ZHANG Ximei, LI Lin, et al. Application of ultrasound sterilization technique in food industry [J]. Food Science, 2006, 27(12): 778-780. (in Chinese)
- [7] JATZWALK L, SCHÖNE H, PIETSCHE H. How to improve instrument disinfection by ultrasound [J]. Journal of Hospital Infection, 2001, 48(4): 80-83.
- [8] BAUMANN A R, MARTIN S E, FENG H. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone [J]. Journal of Food Protection, 2009, 72(6): 1306-1309.
- [9] CARMEN J C, NELSON J L, BECKSTEAD B L, et al. Ultrasonic-enhanced gentamicin transport through colony biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* [J]. Journal of Infection & Chemotherapy, 2004, 10(4): 193-199.
- [10] SIERRA G, BOUCHER R M. Ultrasonic synergistic effects in liquid-phase chemical sterilization [J]. Appl. Microbiol., 1971, 22(2): 160-164.
- [11] MILLAN-SANGO D, MCELHATTON A, VALDRAMIDIS V P. Determination of the efficacy of ultrasound in combination with essential oil of oregano for the decontamination of *Escherichia coli* on inoculated lettuce leaves [J]. Food Research International, 2015, 67: 145-154.
- [12] 钟葵, 吴继红, 廖小军, 等. 高压脉冲电场对植物乳杆菌的杀菌效果及三种模型的比较分析[J]. 农业工程学报, 2006, 22(11): 238-243.
ZHONG Kui, WU Jihong, LIAO Xiaojun, et al. Inactivation effect of pulsed electric field on *Lactobacillus plantarum* in apple juice and comparative analyses of three models [J]. Transaction of the CSAE, 2006, 22(11): 238-243. (in Chinese)
- [13] 孙波, 迟玉杰, 徐宁, 等. 液全蛋与杀菌液全蛋中微生物预测模型的建立 [J]. 食品科学, 2009, 30(19): 173-176.
SUN Bo, CHI Yujie, XU Ning, et al. Establishment of prediction model for microorganisms in liquid whole egg and sterilized liquid whole egg [J]. Food Science, 2009, 30(19): 173-176. (in Chinese)
- [14] 靳志强, 王顺喜, 韩培. 微波杀灭霉变玉米中寄生曲霉动力学模型 [J]. 农业机械学报, 2011, 42(12): 148-153.
JIN Zhiqiang, WANG Shunxi, HAN Pei. Inactivation kinetics model of *Aspergillus parasiticus* in mouldy maize by microwave processing [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2011, 42(12): 148-153. (in Chinese)
- [15] MAFART P, COUVERT O, GAILLARD S, et al. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 72(1): 107-113.
- [16] 王若平, 夏长高, 朱茂桃. 随机变量多重 Weibull 统计模型及参数最优估计 [J]. 农业机械学报, 2006, 37(11): 41-44.
WANG Ruoping, XIA Changgao, ZHU Maotao. Multi-Weibull statistical model of random variables and optimal estimation of its parameters [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2006, 37(11): 41-44. (in Chinese)
- [17] SHAKHAWAT H M, NKUFI T C, HWAN O D. Inactivation kinetics of slightly acidic electrolyzed water combined with benzalkonium chloride and mild heat treatment on vegetative cells, spores, and biofilms of *Bacillus cereus* [J]. Food Research International, 2019, 116: 157-167.
- [18] 杭锋, 陈卫, 陈帅, 等. 食品微波加热杀菌动力学描述模型的选择 [J]. 农业工程学报, 2008, 24(6): 49-52.
HANG Feng, CHEN Wei, CHEN Shuai, et al. Comparison of inactivation kinetics models for microwave heating food [J]. Transactions of the CSAE, 2008, 24(6): 49-52. (in Chinese)
- [19] ROSS T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology [J]. Journal of Applied Bacteriology,

- 2010, 81(5): 501 – 508.
- [20] PING W, XIANG-RONG Y, YA-YUAN Z, et al. Effect of different sterilization ways on quality of low-sugar banana jam[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(7): 97 – 100.
- [21] FOLKES L K, CANDEIAS L P, WARDMAN P. Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions [J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 1995, 323(1): 120 – 126.
- [22] KWAK S J, JO H J, YOON K S. Effect of sodium hypochlorite (NaClO) sanitizer-induced stress on growth kinetics and morphological changes in *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* spores [J]. Food Science & Biotechnology, 2014, 23(3): 815 – 821.
- [23] 段燕文, 黄英. 化学消毒剂杀灭细菌芽胞机理研究的进展 [J]. 中国消毒学杂志, 1991(4): 233 – 237.
- [24] DONG W, GREEN J, KORZA G, et al. Killing of spores of bacillus species by cetyltrimethylammonium bromide[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 126(5): 1391 – 1401.
- [25] RYU J H, BEUCHAT L R. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer [J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(12): 2614 – 2622.
- [26] 王耀峰, 宫智勇, 方敏, 等. 二氧化氯和超声波协同作用对鲜蛋表面消毒效果的研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(23): 150 – 153.
- WANG Yaofeng, GONG Zhiyong, FANG Min, et al. Disinfection effect of chlorine dioxide combined with ultrasonic treatment on egg surface [J]. Food Science, 2009, 30(23): 150 – 153. (in Chinese)
- [27] NANDHINI P, BRENT S, ADRIAN T, et al. Low frequency ultrasound inactivation of thermophilic bacilli (*Geobacillus* spp. and *Anoxybacillus flavithermus*) in the presence of sodium hydroxide and hydrogen peroxide [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2018, 51: 325 – 331.
- [28] LI J, AHN J, LIU D, et al. Evaluation of ultrasound-induced damage on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by flow cytometry and transmission electron microscopy [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2016, 82(6): 1828 – 1837.
- [29] LI J, SUO Y, LIAO X, et al. Analysis of *Staphylococcus aureus* cell viability, sublethal injury and death induced by synergistic combination of ultrasound and mild heat [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 39: 101 – 110.
- [30] PIYASENA P, MOHAREB E, MCKELLAR R C. Inactivation of microbes using ultrasound: a review [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 87(3): 207 – 216.
- [31] MCCLEMENTS D J. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing [J]. Trends in Food Science & Technology, 1995, 6(9): 293 – 299.
- [32] 王军, 董庆利, 丁甜. 预测微生物模型的评价方法 [J]. 食品科学, 2011, 32(21): 268 – 272.
- WANG Jun, DONG Qingli, DING Tian. An overview of evaluation methods for predictive microbial growth models [J]. Food Science, 2011, 32(21): 268 – 272. (in Chinese)
- [33] SIMPSON R K, GILMOUR A. The resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure in foods [J]. Food Microbiology, 1997, 14(6): 567 – 573.
- [34] 申光辉, 陈安均, 陈妹娟, 等. 超高压对泡萝卜的杀菌效果及其动力学研究 [J]. 食品科学, 2016, 37(5): 67 – 71.
- SHEN Guanghui, CHEN Anjun, CHEN Shujuan, et al. Inactivation and kinetics analysis of microorganisms in pickled radish processed by high hydrostatic [J]. Food Science, 2016, 37(5): 67 – 71. (in Chinese)
- [35] 栗星, 包海蓉. 超声波对橙汁的杀菌特性研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(8): 346 – 350.
- LI Xing, BAO Hairong. Study on sterilization characteristics of ultrasound for orange juice [J]. Food Science, 2008, 29(8): 346 – 350. (in Chinese)
- [36] ZENG X, TANG W, YE G, et al. Studies on disinfection mechanism of electrolyzed oxidizing water on *E. coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(5): 253 – 260.
- [37] LIN L, WANG X, LI C, et al. Inactivation mechanism of *E. coli* O157:H7 under ultrasonic sterilization [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 59: 104751.
- [38] 张赟彬, 缪存铅, 宋庆, 等. 荷叶精油对肉类食品中常见致病菌的抑菌机理 [J]. 食品科学, 2010, 31(19): 63 – 66.
- ZHANG Yunbin, MIAO Cunqian, SONG Qing, et al. Anti-bacterial mechanism of essential oil from lotus leaves on commonly found pathogens in meat foods[J]. Food Science, 2010, 31(19): 63 – 66. (in Chinese)
- [39] GAO S, LEWIS G D, ASHOKKUMAR M, et al. Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 2. A simple model for the inactivation mechanism [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2014, 21(1): 454 – 460.
- [40] KADKHODAEI R, POVEY M J W. Ultrasonic inactivation of *Bacillus* α -amylase. I. effect of gas content and emitting face of probe [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2008, 15(2): 133 – 142.