

王一舒, 徐 斐, 曹 慧, 等. 低能超声波技术检测牛奶中的金黄色葡萄球菌[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 267-270.

# 低能超声波技术检测牛奶中的金黄色葡萄球菌

王一舒, 徐 斐, 曹 慧, 袁 敏, 郑 政

(上海理工大学食品质量与安全研究所, 上海 200093)

**摘要:**将接种不同浓度金黄色葡萄球菌的牛奶样品在 37 ℃ 下培养, 每隔 2 h 进行低能超声波检测声速、衰减系数、声阻抗的变化情况。结果表明, 在牛奶 pH 值和黏度发生明显变化前, 声参数已经发生较大变化; 金黄色葡萄球菌初始浓度为  $1.61 \times 10^5$  CFU/mL 的样品在 37 ℃ 下培养 10 h 后, 声速、声阻抗、衰减系数的变化率分别为 0.74%、0.73%、33.8%, 其中衰减系数对菌体浓度变化最敏感, 衰减系数与菌体浓度的相关系数为 0.912 6, 因此衰减系数不仅可以用于快速、灵敏地检测牛奶是否存在金黄色葡萄球菌, 还能用于检测金黄色葡萄球菌浓度。

**关键词:**低能超声波; 牛奶; 金黄色葡萄球菌

**中图分类号:** TS252 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0267-03

金黄色葡萄球菌是原料乳中最主要的致病菌, 检测牛奶中金黄色葡萄球菌对于预防和控制金黄色葡萄球菌引起的食物中毒具有重要意义。传统检测方法耗时长、操作复杂<sup>[1-2]</sup>, 低能超声波无损检测技术具有无损、快速、准确的特点, 可对微生物进行在线检测<sup>[3-4]</sup>。早在 1989 年, Ahvenainen 等就利用超声波检测瞬时高温灭菌的牛奶质量<sup>[5]</sup>。随着低能超声波技术和计算机技术的进步, 该技术在细菌检测上应用越来越广泛。本研究用低能超声波检测仪对接种金黄色葡萄球菌的牛奶进行检测, 基于超声波参数对细菌繁殖过程中牛奶理化性质改变的响应, 实现对金黄色葡萄球菌的检测<sup>[6-7]</sup>, 监测牛奶是否受到细菌污染, 并实现微生物的生长控制<sup>[8-9]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

金黄色葡萄球菌 ATCC6538 (广东省微生物菌种保藏中心)、光明纯牛奶 (1 L 装, 光明乳业股份有限公司, 高温瞬时灭菌, 保质期 6 个月)、Baird-Parker 琼脂培养基、卵黄亚磷酸钾增菌剂、无菌生理盐水 (8.5 g 氯化钠溶于 1 L 蒸馏水)

### 1.2 仪器与设备

乌氏黏度计 (上海前锋橡塑玻璃制品厂, 毛细管内径 0.5~0.6 mm)、温度传感器 (厦门宇电自动化科技有限公司, A1 系列)、密度计 (上海长城仪表厂, 1.000~1.100 g/cm<sup>3</sup>)、恒温循环器 (宁波天恒仪器厂, THGD-05)、pH 计 (上海仪电科学仪器股份有限公司, PHS-25 型)、超声波检测仪。

### 1.3 方法

**1.3.1 样品制备** 将纯牛奶在 62.8 ℃ 下处理 30 min, 经检测无菌。将金黄色葡萄球菌接种于该无菌奶中, 37 ℃ 培养 18 h 进行活化, 取适量活化后的细菌悬浮液加入到无菌奶

中, 配制 3 个浓度的污染样品 (浓度是由平板计数法所得, 分别为  $1.59 \times 10^3$ 、 $1.48 \times 10^4$ 、 $1.61 \times 10^5$  CFU/mL), 振荡处理使细菌分散均匀, 分装到试管中于 37 ℃ 下培养, 每隔 2 h 从培养箱中取出样品进行超声波检测, 并用未接种、巴氏消毒处理的无菌牛奶作对照, 在 37 ℃ 下培养, 每隔 2 h 取出检测。对初始浓度为  $1.61 \times 10^5$  CFU/mL 样品每隔 2 h 进行平板计数和物理化学性质检测。

**1.3.2 细菌计数及物理化学性质检测** 平板计数按照 GB 4789.10—2010《国家标准食品微生物学检验金黄色葡萄球菌检验》规定的方法进行检测。对待测样品平板计数, 所有操作均在无菌环境中进行, 物理化学性质检测包括 pH 值、黏度<sup>[10]</sup>、密度检测, 检测时保证样品温度为 37 ℃。

**1.3.3 超声波检测** 由图 1 可见, 检测装置中采用的发射接收换能器直径为 8.3 mm, 焦距为 24 mm, 发射波的中心频率为 9.5 MHz, 带宽为 6 MHz; 样品盒置于水槽中, 水槽内为双蒸水, 盒上端高于水面。5800PR 超声脉冲/接受仪将系统采集到的回波信号经由内置滤波器和放大器后输出, 再传至数据采集。LabVIEW 8.0 和 NI PCI-5124 分别作为软件、硬件平台, 采集并储存数据。用恒温循环器控制样品温度为 37 ℃, 每组样品记录 3 次数据。

**1.3.3.1 声速测量** 通过 Matlab 软件分析超声波在通过样品池时的超声波波形, 利用距离与时间的比值计算声速。图 2 中横坐标是采样点数 (单位为个), 纵坐标为脉冲回波的幅度, 代表回波强度,  $X_1$ 、 $X_2$  为样品池前后内界面的波形, 通过对波形的信号分析, 找出脉冲时间差  $\Delta t$ , 计算声速:

$$\Delta t = (X_2 - X_1) / \text{采样频率} \quad (1)$$

$$V = 2D / \Delta t \quad (2)$$

式中: 采样频率为 60 MHz;  $V$  为声速;  $D$  为样品盒厚度, 0.01 m。

**1.3.3.2 衰减系数测量** 采用双界面回波法测量声衰减<sup>[11]</sup>, 该方法提出的理论依据如图 3 所示。假设一束超声波垂直入射到容器壁, 设入射声波到达前界面时的声压幅度谱为  $P_{in}(f)$ , 前界面、后界面回波的幅度谱分别用  $P_{ra}(f)$  和  $P_{rb}(f)$  表示, 通过比较超声在液体和容器壁构成的前后两个界面上产生的回波幅度谱比值来估计容器内液体的衰减系数。

收稿日期: 2012-12-14

基金项目: 上海市东方学者项目。

作者简介: 王一舒 (1985—), 女, 河南南阳人, 硕士研究生, 研究方向为食品安全检测。E-mail: comeyshu@yaho. cn。

通信作者: 徐 斐, 博士, 教授, 博士生导师, 从事食品安全检测研究。

Tel: (021) 55276049; E-mail: xufi. first@263. net。

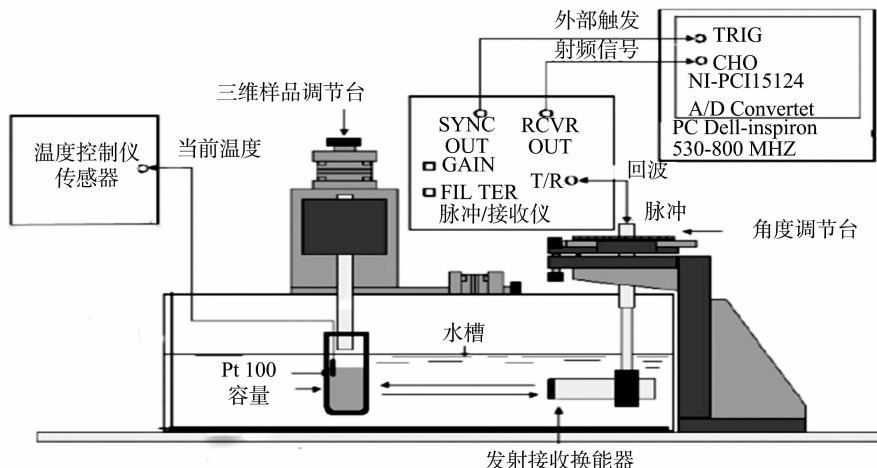


图1 超声波检测仪装置

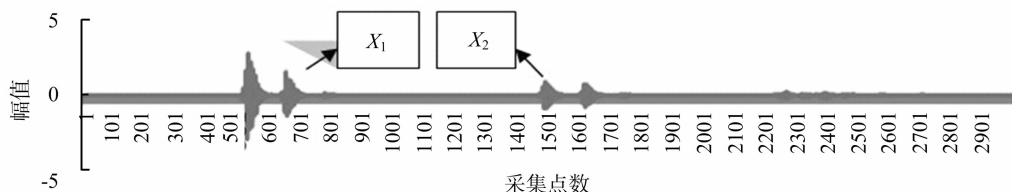


图2 超声波波形

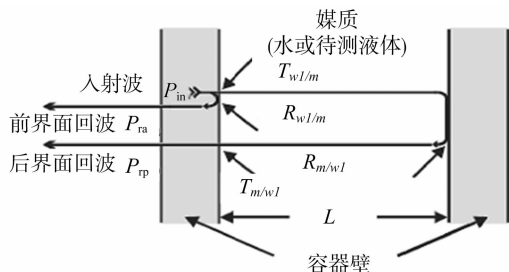


图3 双界面回波法示意图

$$\alpha(f) = \frac{1}{2L} \ln \left| \frac{P_{ra}(f)}{P_{rp}(f)} \right| + \frac{1}{2L} \ln |B_{wt}| \quad (3)$$

式中： $\alpha(f)$ 为待测液体的衰减系数； $L$ 为两界面之间的距离； $B_{wt}$ 为系统修正系数，由声压反射系数 $R$ 、透射系数 $T$ 、声束衍射误差 $ED$ 共同决定。

1.3.3.3 声阻抗测量 声阻抗是表征媒质固有特性的一个重要物理量，称为媒质的特性阻抗，采用下式计算。

$$Z = \rho c \quad (4)$$

式中： $Z$ 为声阻抗； $\rho$ 为物质密度； $c$ 为在介质中传播速度。

1.3.4 统计分析 本研究中物理化学性质及超声检测中测定结果是3次平行测定的平均值。利用各参数的变化率来分析敏感度。

$$\text{变化率} = \left| \frac{\text{（无菌牛乳参数 - 接种金葡萄牛乳参数）}}{\text{无菌牛乳参数}} \right| \times 100\% \quad (5)$$

## 2 结果与分析

2.1 金黄色葡萄球菌培养时间和声参数、物理化学性质的关系

图4、图5、图6是声参数随金黄色葡萄球菌培养时间的

变化情况。无菌对照牛乳和接种金黄色葡萄球菌牛乳的声速、衰减系数、声阻抗都存在明显差别，最初2 h声速和声阻抗变化不大，但是衰减系数变化非常明显。比较不同初始菌体浓度牛乳的处理发现，在0~4 h声参数差别较小，在6~10 h声参数差别较明显。

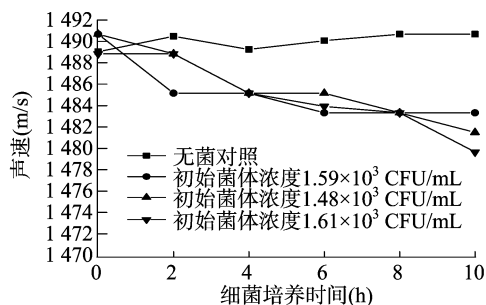


图4 声速随金黄色葡萄球菌培养时间的变化

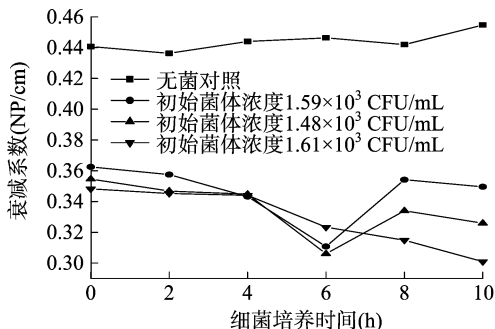


图5 衰减系数随金黄色葡萄球菌培养时间的变化

如图7所示， $1.61 \times 10^5$  CFU/mL菌体浓度处理的样品黏度随着培养时间增加先减小后增大，在6 h时最小。金黄色

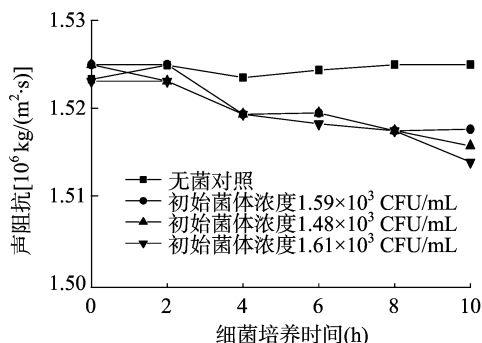


图6 声阻抗随金黄色葡萄球菌培养时间的变化

葡萄球菌分解乳糖,使得样品 pH 值不断减小(图 8)。样品密度几乎不变(图 9)。由图 10 可见,  $1.61 \times 10^5$  CFU/mL 菌体浓度处理的样品声参数和物理化学参数随着细菌培养时间增加,衰减系数的变化率比其他声参数大,衰减系数最大变化率为 33.8%,声速、声阻抗的变化比 pH 值、密度明显,但是不如黏度变化明显。

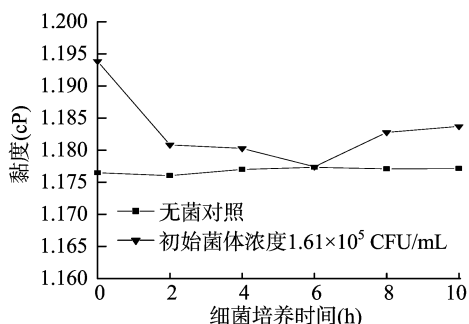


图7 黏度随金黄色葡萄球菌培养时间的变化

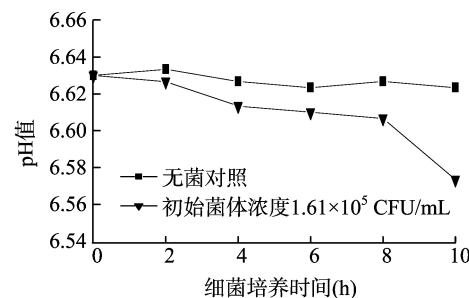


图8 pH值随金黄色葡萄球菌培养时间的变化

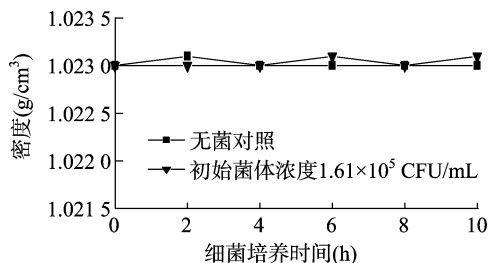


图9 密度随金黄色葡萄球菌培养时间的变化

随着培养时间的增加,菌体浓度不断变大,声速、衰减系数、声阻抗都发生变化,3 种声参数都可以作为鉴别金黄色葡萄球菌存在的参数,相对来说衰减系数更好,因为在菌体浓度有相同变化时,衰减系数变化最显著,说明衰减系数对金黄色

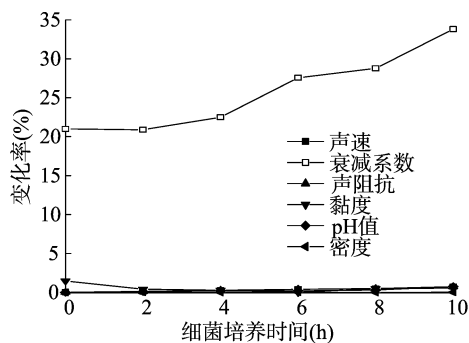


图10 各参数随金黄色葡萄球菌培养时间的变化率

葡萄球菌的生长即浓度变化最敏感,可作为检测金黄色葡萄球菌的敏感参数,可快速鉴别牛奶中是否存在金黄色葡萄球菌,符合快速检测的要求,可以在黏度和 pH 值发生较小变化时就能检测到金黄色葡萄球菌。如果要定量检测金黄色葡萄球菌浓度,在 6 h 以后检测效果更好,在生长初期不同浓度样品参数间差别不大,不利于分辨。

声速、声阻抗在 0~2 h 变化不大,但是 0 h 时衰减系数却明显减小,变化率为 20.99%。如图 7 所示,样品黏度高于对照,并且在最初 2 h 变化很大,说明黏度和接种菌体本身对声速影响较小,对衰减系数影响很大。因为超声波在牛奶中的衰减主要是由牛奶吸收和散射引起,牛奶黏度是引起超声波吸收的主要原因之一,散射主要来自于牛奶中能发生明显散射的粒子—脂肪和蛋白质。金黄色葡萄球菌粒径为  $0.8 \mu\text{m}$  左右,粒径较大,其本身也可能对超声波存在散射作用,使得在 0 h 就检测到衰减系数的变化,金黄色葡萄球菌分解蛋白质,黏度变小,但是随着乳糖的分解,产酸引起蛋白质变性,出现了网状结构的凝胶状态,使牛奶发生了轻微凝固,黏度又变大,以及蛋白质粒子本身的变化都影响衰减系数。如图 9 所示,随着时间变化牛奶密度几乎没有发生变化,而声阻抗是声速和密度的函数,因此声阻抗的变化主要来自于声速的变化,声阻抗适用于检测引起介质密度发生较大变化的细菌,如大肠杆菌等产气型细菌。

## 2.2 金黄色葡萄球菌菌体浓度和衰减系数的关系

将金黄色葡萄球菌初始浓度为  $1.61 \times 10^5$  CFU/mL 的样品于  $37^\circ\text{C}$  下培养,每隔 2 h 进行平板计数,得到菌体浓度和衰减系数的关系(图 11)。衰减系数和金黄色葡萄球菌浓度呈线性相关,相关系数为 0.912 6。因此衰减系数不仅可以用来检测金黄色葡萄球菌是否存在,也可以用于检测其浓度,但对金黄色葡萄球菌的定量检验还须大量试验研究。

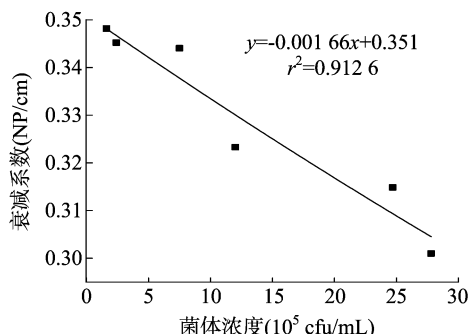


图11 菌体浓度和衰减系数的关系

夏晓华, 张林霞, 司松波, 等. 高效氯氟氰菊酯对泥鳅的急性毒性及生理毒性[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 270–272.

# 高效氯氟氰菊酯对泥鳅的急性毒性及生理毒性

夏晓华, 张林霞, 司松波, 赵炫超, 常重杰

(河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

**摘要:** 为了估测农药高效氯氟氰菊酯对水生生物的毒性, 以泥鳅为受试生物, 研究高效氯氟氰菊酯对泥鳅的急性毒性和生理毒性影响。结果表明, 高效氯氟氰菊酯对泥鳅的 24、48、96 h 的半数致死浓度分别为 32.41、24.40、18.37  $\mu\text{g/L}$ , 安全质量浓度为 4.15  $\mu\text{g/L}$ ; 低浓度高效氯氟氰菊酯处理对泥鳅肝脏谷丙转氨酶和谷草转氨酶活性起诱导作用, 而这 2 个酶的活性在长时间的高浓度处理下则受到抑制。说明高效氯氟氰菊酯对泥鳅具有较强的毒性作用。

**关键词:** 高效氯氟氰菊酯; 泥鳅; 生理毒性; 急性毒性; 谷丙转氨酶; 谷草转氨酶

**中图分类号:** S948 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)06–0270–03

高效氯氟氰菊酯( $\lambda$ -cyhalothrin) 别称三氟氯氰菊酯、功夫菊酯, 属拟除虫菊酯类广谱型杀虫剂。拟除虫菊酯类杀虫剂目前的使用量仅次于有机磷类、氨基甲酸酯类, 是第三大类杀虫剂, 这类杀虫剂在农业生产中使用广泛, 但随着雨水冲刷、地表径流以及在农业生产中的不合理使用等, 使大量农药进入河流、湖泊、海洋等水生生态系统, 对水生生物的生存

造成危害。由于拟除虫菊酯的亲脂性使其很容易被鱼鳃吸收富集而导致鱼类对该类药物敏感, 加之鱼体内缺乏水解菊酯的酶, 导致拟除虫菊酯对鱼类的毒性作用远大于哺乳动物和鸟类<sup>[1]</sup>。鱼类是水体中的主要生物, 也是水生生物链的重要环节, 对水质变化尤其敏感, 是水质污染的高危种群。该研究所选用的试验材料是泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*), 属鱼纲鲤形目鳅科泥鳅属, 是一种对化学诱变剂、致癌剂较敏感的水生生物。泥鳅肉质鲜美, 营养丰富, 富含蛋白质和多种维生素, 而且分布极为广泛, 一年四季皆易捕到, 在室内又极易饲养, 因此是理想的水生生物试验材料<sup>[2]</sup>。高效氯氟氰菊酯杀虫剂作为一种环境毒物对鱼类等水生生物具有潜在的“三致”效应, 而目前国内外研究者对这方面的研究较少。笔者以泥鳅为试验材料, 探究高效氯氟氰菊酯对泥鳅的急性毒性以及对其肝脏谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)活性的影响, 旨在为拟除虫菊酯类杀虫剂的合理使用、保障渔业生产和生物安全性提供一定的科学依据。

收稿日期: 2012–11–27

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31200923); 天津市重点实验室开放基金(编号: 01046651012); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(编号: 12B180011); 河南师范大学引进人才科研项目(编号: 01046500109)。

作者简介: 夏晓华(1982—), 女, 河南漯河人, 博士, 副教授, 从事分子细胞遗传学研究。E-mail: xxhlpf@163.com。

通信作者: 常重杰, 教授, 博士生导师, 从事分子细胞遗传学研究。E-mail: changzhongjie@tom.com。

## 3 结论

低能超声波可以快速检测金黄色葡萄球菌是否存在, 声速、声阻抗的灵敏度低于衰减系数, 刚接种金黄色葡萄球菌的样品中衰减系数就出现变化, 衰减系数可用于快速、灵敏地检测金黄色葡萄球菌。衰减系数和菌体浓度的相关系数为 0.912 6。

## 参考文献:

- [1] 梁宗余. 牛乳中主要致病菌及其控制研究[J]. 食品工程, 2008, 9(3): 59–62.
- [2] 杨蓉生, 王小玲, 唐俊妮. 食品中金黄色葡萄球菌检测方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 459–461.
- [3] Hoche S, Hussein W B, Hussein M A, et al. Time-of-flight prediction for fermentation process monitoring[J]. Engineering in Life Sciences, 2011, 11(4): 417–428.
- [4] Elvira L, Sierra C, Galón B, et al. Ultrasonic non-invasive techniques for microbiological instrumentation[J]. Physics Procedia, 2010, 3(1): 789–794.
- [5] Ahvenainen R, Mattial T, Wirtanen G. Ultrasound penetration through

different packaging materials a non-destructive method for quality control of packaged UHT milk[J]. Lebensm Wissensch Technol, 1989, 22(5): 268–272.

- [6] Segura L E, Francisco M E F, López P R, et al. Non-invasive detection and analysis of microorganisms in dairy products packaged in paper or paperboard based laminated recipients using dry coupling elastic waves; US, 7240553 B2[P]. 2007–07–10.
- [7] Elvira L, Durán C, Sierra C, et al. Ultrasonic measurement device for the characterization of microbiological and biochemical processes in liquid media[J]. Measurement Science and Technology, 2007, 18(7): 789–794.
- [8] Nagata M, Kaneoka T, Imano S, et al. Ultrasonic method of inspecting contents of a package and apparatus thereof; JP, 4821573[P]. 1989–04–18.
- [9] Resa P, Bolumar T, Elvira L, et al. Monitoring of lactic acid fermentation in culture broth using ultrasonic velocity[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78(3): 1083–1091.
- [10] 黄思静, 汪义杰, 蔡青云, 等. 磁弹性无线传感器检测不同液体介质中的金黄色葡萄球菌[J]. 分析化学, 2010, 38(1): 105–108.
- [11] 王芳芳. 非侵入式组织声衰减系数测量方法的研究[D]. 上海: 上海理工大学, 2010.