

文章编号: 1674-5566(2011)05-0779-05

## 低功率 X 射线对生鲜肉污染微生物辐照的致死剂量

段鑫, 欧杰, 李柏林

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

**摘要:** 利用低功率的 X 光机, 在 3.08 到 18.48 戈瑞 (Gy) 范围内对污染生鲜肉的微生物进行辐照, 通过微生物存活率与辐照剂量的相关性分析, 得出在此辐照条件下的  $D_{10}$  值, 并探讨对 X 射线辐照的敏感性。结果表明: 环境污染菌大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌及其芽孢的  $D_{10}$  值分别为 5.41、5.00 和 23.81 Gy, 致病菌金黄色葡萄球菌和单核增生李斯特菌的  $D_{10}$  值分别为 5.35 和 6.45 Gy, 腐败菌荧光假单胞菌、铜绿假单胞菌及青霉菌的  $D_{10}$  值分别为 3.62、4.39 和 16.39 Gy。供试菌株中蜡状芽孢杆菌芽孢和青霉菌孢子对辐照的抗性较强, 荧光假单胞菌和铜绿假单胞菌对辐照较为敏感。

**研究亮点:** 利用低功率的 X 光机, 在 Gy 剂量范围内对污染生鲜肉的微生物进行辐照, 对其杀菌效果进行一定地探索, 得到实验中各供试菌株的辐照杀菌致死剂量, 获得低功率低剂量 X 射线仍可对微生物产生一定杀菌效果的初步结论。

**关键词:** X 射线辐照;  $D_{10}$ ; 蜡状芽孢杆菌; 金黄色葡萄球菌; 单核增生李斯特菌; 荧光假单胞菌

**中图分类号:** TS 201.3

**文献标志码:** A

X 射线是利用电子束轰击重金属靶产生, 其不仅较好地利用了电子加速器的可控性和无放射源的特点, 同时又具有 X 射线较强的穿透能力<sup>[1]</sup>。虽然允许用于食品辐照领域的辐射源包括 X 射线, 但由于技术上和经济上的原因, X 射线辐射加工应用仍处于开发试验阶段<sup>[2]</sup>。但随着对于研究的不断探索和深入, X 射线辐照未来也许会成为食品杀菌技术中一项新的选择。

生鲜肉在屠宰、贮存、运输以及销售过程中极易受到微生物的污染。污染生鲜肉的微生物主要有病原微生物和腐败微生物两大类。病原菌包括: 小肠结肠炎耶尔森氏菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、弯曲杆菌和单核增生李斯特菌等。常见的腐败性微生物有: 假单胞菌属、无色杆菌属、黄杆菌属、微球菌属和霉菌之类。其中, 假单胞菌属是生鲜肉中的优势菌<sup>[3]</sup>。食品辐照具有节能、效率高、不升温、安全可靠和保持食品良好感官品质等优点<sup>[4]</sup>, 可以有效抑制和杀灭污染生

鲜肉的微生物。目前国内外对于这方面的研究已经不少, 但大多数利用的是  $\gamma$  射线和电子束辐照杀菌。近来 ROBERTSON 等<sup>[5]</sup>用 X 射线辐照接种了单核增生李斯特菌的即食熏制鲮鱼, 结果表明: 辐照剂量 0.5、1.0、1.5 千戈瑞 (kGy) 时, 能够使鲮鱼中单核增生李斯特菌数目的对数值分别减少 1.1、1.6、2.1。辐照剂量 2.0 kGy 时可以使该菌的数目达到无检出水平。MAHMOUD<sup>[6]</sup>用 X 射线辐照了纯培养的创伤弧菌及接种了创伤弧菌的半壳牡蛎和全壳牡蛎, 结果表明: 纯培养、半壳牡蛎和全壳牡蛎中创伤弧菌的数量分别在辐照剂量为 0.75、1.0、3.0 kGy 时, 减少 6 个 lg 单位以上, 并且 0.75 kGy 的辐照剂量会使半壳牡蛎中自身存在的微生物数量低于最小检出值  $< 1 \text{lg}(\text{cfu/g})$ 。MAHMOUD 等<sup>[7]</sup>用 X 射线辐照接种了大肠杆菌 O157:H7、肠道沙门氏菌、痢疾杆菌和单核增生李斯特菌的菠菜, 结果表明: 2.0 kGy 的辐照剂量可以使其供试菌的数量都减少 5 个 lg

收稿日期: 2011-02-25

修回日期: 2011-05-20

基金项目: 上海市科学技术委员会重点科技攻关项目 (10391902300)

作者简介: 段鑫 (1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: 15121046588@139.com

通讯作者: 欧杰, E-mail: jou@shou.edu.cn

单位以上,并能够显著减少菠菜自身存在的微生物。但这些研究利用的都是高功率的 X 射线光机,且辐照剂量都是在 kGy 范围内。

本研究的主要目的在于利用低功率的 X 射线光机,研究污染生鲜肉的微生物在 Gy 剂量范围内的辐照效果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 仪 器

射线光机(SEIFERT ID3003)德国,输出功率:3.5 kW;输出电压:60 kV;输出电流:80 mA;分流和放电电阻:600 MΩ ± 1% TC 25。TL3000A 辐射剂量测定仪 成都同创电子技术研究所。

#### 1.1.2 供试菌株

大肠杆菌(*Escherichia coil* BYK0001027)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus* BYK00045-01-01)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* BYK0001080)、单核增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes* BYK0001069)、青霉(*Penicillium* BYK0001005),农业部渔业动植物病原库;荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens* AS 1.33)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* AS 1.262 0),上海市工业微生物研究所。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 菌悬液的制备

挑取活化后大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌、荧光假单胞菌、铜绿假单胞菌的斜面菌苔于营养肉汤培养基中增菌培养,得到的培养液于 5 000 r/min 条件下离心 7 min,用生理盐水收集离心后的菌体,制成菌悬液,保存于 4 ℃ 冰箱中待用。

#### 1.2.2 蜡状芽孢杆菌菌悬液及芽孢悬液的制备

将活化后的蜡状芽孢杆菌接至斜面上培养 16 ~ 18 h,用灭菌的生理盐水冲洗菌苔制成菌悬液,此时的蜡状芽孢杆菌未进入衰亡期,因此菌悬液中大部分是营养细胞。

将活化后的蜡状芽孢杆菌接至斜面上培养 60 h 以上,用灭菌的生理盐水冲洗菌苔制成菌悬液,60 ℃ 水浴 30 min 消毒,此时菌悬液中大部分是芽孢,待冷至室温后,保存于 4 ℃ 冰箱中待用。

#### 1.2.3 青霉孢子悬液的制备

用接种环挑取冰箱保存的斜面菌种一环于

斜面培养基上培养 3 ~ 5 d,待长满大量青色孢子后,吸取灭菌生理盐水至斜面上,用接种环轻轻刮下孢子,装入含有玻璃珠的三角瓶中,盖好塞子振荡数分钟,即制成孢子悬液,保存于 4 ℃ 冰箱中待用。

#### 1.2.4 辐照剂量的测量与计算<sup>[8]</sup>

X 射线光机测试条件:辐照电压 50 kV,辐照电流 40 mA,距出束口 90 cm,测试结果见表 1:

表 1 辐照剂量的测试结果

Tab. 1 Test results of irradiation dose

本底	剂量实测值/cGy	时间实测值/s
-0.008	0.154	10.15
0.015	0.178	10.05
-0.011	0.150	10.09
-0.001	0.170	10.36
0.013	0.186	9.93
0.003	0.164	10.09
0.003	0.176	10.25

经线性回归计算得:  $A = 0.067 19$ ;  $B = 0.009 781$ ;

10 s 时应为 0.165 cGy (1 cGy = 10 mGy),即为 1.65 mGy。

按下式计算样品距出束口 14 cm 处接收的辐照剂量(由于使用的剂量仪量程有限,故辐照剂量是距出束口 90 cm 处测量,测量结果需换算到实验中样品距出束口 14 cm 处的辐照剂量):

$$K = 6MK_{Tp}N_K \quad (1)$$

$$K_{24} = K \frac{S_{90}}{S_{14}} \quad (2)$$

$$D_{\text{样品}} = K_{24} \frac{S_{\text{样品}}}{S_{14}} \quad (3)$$

式中:  $K$  为空气比释动能率  $K$  (mGy/min);  $M$  为剂量计测量七次平均的示值(div);  $K_{Tp}$  为电离室型探测器温度、气压密度修正;  $N_K$  为电离室或半导体探测器空气比释动能率的校准因子(mGy/min div);  $S_{14}$  为样品距出束口 14 cm 处 X 射线辐射的面积;  $S_{90}$  为样品距出束口 90 cm 处 X 射线辐射的面积;  $S_{\text{样品}}$  为样品的面积;  $D_{\text{样品}}$  为样品接收的辐照剂量(mGy/min);

本实验中  $M = 1.65$  mGy,  $K_{Tp} = 0.876$ ,  $N_K = 0.998$ ,  $K = 8.66$  mGy/min,  $K_{14} = 357.79$  mGy/min,  $S_{90} = 440.83$  cm<sup>2</sup>,  $S_{14} = 10.67$  cm<sup>2</sup>,  $S_{\text{样品}} = 3.06$  cm<sup>2</sup>。由上式计算可得  $D_{\text{样品}} = 102.61$  mGy/min。

### 1.2.5 辐照处理

辐照条件为样品距出束口 14 cm,辐照剂量分别为 3.08、6.16、9.24、12.32 和 18.48 Gy。

将每种制备好的菌液分装于 12 只 2 mL 的细菌保存管中,每管中装入 1 mL 菌液,两只样品用于初始菌数的对照,其余用于辐照,每个剂量辐照两只样品。辐照后即测定残存的活菌数。

### 1.2.6 活菌数测定

采用涂布计数法,使用营养琼脂检测大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌及芽孢、金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌、荧光假单胞菌和铜绿假单胞菌的数量,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌于 37 °C 培养 1~2 d,蜡状芽孢杆菌芽孢于 30 °C 培养 3 d,其余供试菌株于 30 °C 培养 1~2 d;马铃薯葡萄糖琼脂检测青霉菌孢子的数量,30 °C 培养 2~3 d。

### 1.2.7 供试菌株 $D_{10}$ 值与存活率的计算<sup>[9]</sup>

$$S(\%) = (N/N_0) \times 100 \quad (4)$$

$$D = -\lg(N_0/N)/b \quad (5)$$

$$D_{10} = -1/b \quad (6)$$

式中: $S$  为供试菌株的存活率; $N$  为辐照后的存活菌数(cfu/mL); $N_0$  为辐照前的初始菌数(cfu/mL); $D$  为微生物数量从  $N_0$  降到  $N$  所需的辐照剂量(Gy); $b$  为辐照剂量与细菌存活率的线性拟合方程的斜率; $D_{10}$  为微生物存活 10% 所需要的辐照剂量(Gy)。

## 2 结果

环境污染菌大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌及芽孢的初始浓度分别为  $6.2 \times 10^6$ 、 $3.35 \times 10^7$ 、 $9.4 \times 10^4$  cfu/mL,致病菌金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌的初始浓度分别为  $1.03 \times 10^7$ 、 $1.5 \times 10^6$  cfu/mL,腐败菌荧光假单胞菌、铜绿假单胞菌及青霉菌孢子的初始浓度分别为  $4.95 \times 10^7$ 、 $2.10 \times 10^6$  和  $9.5 \times 10^3$  cfu/mL。辐照后供试菌株的存活率见图 1。

由图 1 所示,随着辐照剂量的增加,大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌、荧光假单胞菌、铜绿假单胞菌都呈现了较为明显的下降趋势,而蜡状芽孢杆菌芽孢和青霉菌孢子的下降趋势不太明显。

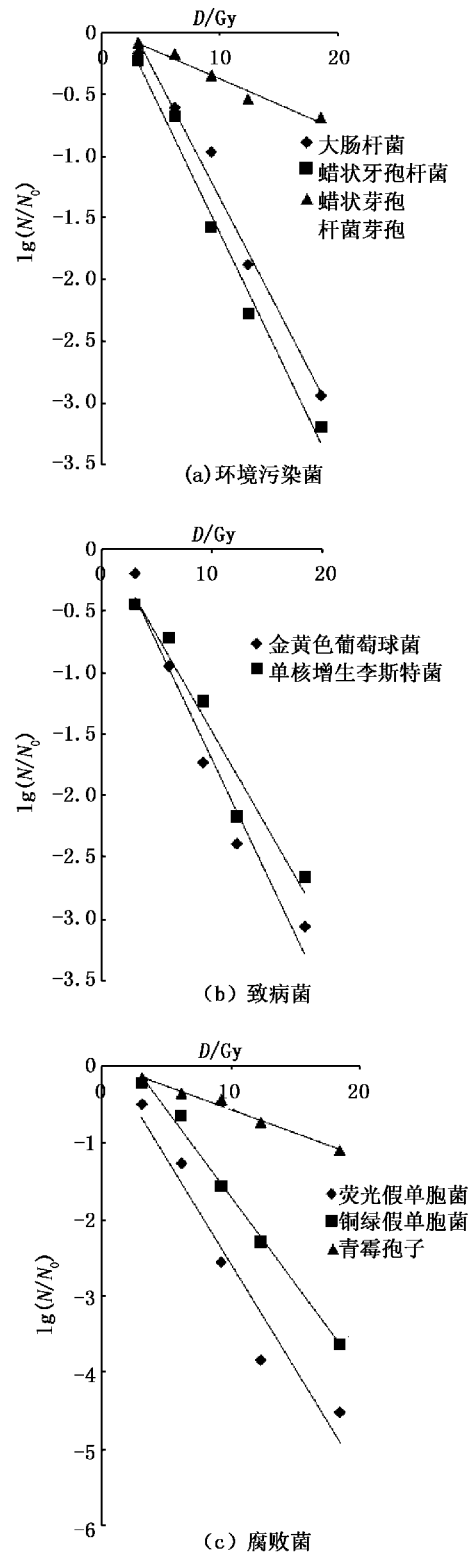


图 1 不同剂量辐照后供试菌株的存活率  
Fig.1 Relationship between strains tested survival rate and irradiation dose

通过对存活率与辐照剂量的相关性分析,得到各供试菌株的线性方程、 $R^2$  值及  $D_{10}$  值,如下表所示:

表2 环境污染菌、致病菌、腐败菌的线性方程、 $R^2$  值及  $D_{10}$  值

Tab.2 The linear equation,  $R^2$  and  $D_{10}$  values of environmental polluted bacteria, pathogenic bacteria and spoilage bacteria

供试菌株	线性方程	$R^2$	$D_{10}/Gy$
大肠杆菌	$y = -0.185x + 0.51$	0.984	5.41
蜡状芽孢杆菌	$y = -0.200x + 0.383$	0.983	5.00
蜡状芽孢杆菌芽孢	$y = -0.042x + 0.047$	0.968	23.81
金黄色葡萄球菌	$y = -0.187x + 0.183$	0.963	5.35
单核增生李斯特菌	$y = -0.155x + 0.085$	0.951	6.45
荧光假单胞菌	$y = -0.276x + 0.194$	0.941	3.62
铜绿假单胞菌	$y = -0.228x + 0.583$	0.993	4.39
青霉孢子	$y = -0.061x + 0.058$	0.983	16.39

注:  $y$  为供试菌株存活率的对数值;  $x$  为辐照剂量。

由表2可见,供试菌株均符合一次线性方程,且大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌、铜绿假单胞菌及青霉孢子的拟合度较高,均大于0.98。说明供试菌株存活率与辐照剂量间呈现明显的一次线性回归关系。

### 3 讨论与结论

从实验结果可知, X 射线辐照对各供试菌株的影响不尽相同。大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌、荧光假单胞菌和铜绿假单胞菌在辐照后,残存菌数的对数值分别减少了2.94、3.21、3.06、2.66、4.51和3.62,可见辐照对上述菌株均有一定的杀菌效果;而蜡状芽孢杆菌芽孢和青霉孢子在辐照后,残存菌数仅减少了0.69和1.09,可见辐照对芽孢及孢子的影响很小。

大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的  $D_{10}$  值分别为5.41和5.35 Gy,可见此两种菌对辐照的敏感性差异不大。王传耀等<sup>[10]</sup>用  $\gamma$  射线辐照大肠杆菌及金黄色葡萄球菌的菌悬液,得出两种菌的  $D_{10}$  值均为0.1~0.2 kGy,LEE等<sup>[11]</sup>用  $\gamma$  射线辐照接种了大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的即食黄瓜,得出两种菌的  $D_{10}$  值分别为0.40和0.42 kGy,可见上述结果与本实验类似。单核增生李斯特菌为6.45 Gy,在营养细胞中对辐照的抗性最强,DION等<sup>[12]</sup>曾研究了7种致病菌对辐照的敏感性,发现

对辐照耐受力最强的是革兰氏染色阳性的单核增生李斯特菌,其结果与本实验相似;荧光假单胞菌和铜绿假单胞菌的  $D_{10}$  值分别为3.62和4.39 Gy,在供试菌株中辐照敏感性相对较强,汪勋清等<sup>[2]</sup>也曾指出,假单胞菌属对辐照相对敏感,其  $D_{10}$  值为20~50 Gy,相对小的辐照剂量就能将这种肉类微生物群体降到很低的水平。在实验中蜡状芽孢杆菌芽孢对辐照的抗性最强,其  $D_{10}$  值为23.81 Gy,而其营养细胞对辐照却较为敏感,  $D_{10}$  值为5.00 Gy, LARA等<sup>[13]</sup>用电子束辐照了两种不同亚型蜡状芽孢杆菌芽孢,得到的  $D_{10}$  值分别为3.0和3.8 kGy, SARRIAS等<sup>[14]</sup>用电子束辐照接种了8种不同亚型蜡状芽孢杆菌芽孢的未碾稻谷,得到的  $D_{10}$  值在2.07~2.68 kGy之间。可见相比于普通的细菌,蜡状芽孢杆菌芽孢的  $D_{10}$  值要大的多,这与本实验结果相似,因此要杀灭芽孢需要相对较大的辐照剂量。青霉孢子虽然比蜡状芽孢杆菌芽孢对辐照敏感,但  $D_{10}$  值相比于普通的细菌仍然较大,为16.39 Gy,说明青霉孢子对辐照的抗性也较强。可见芽孢与孢子对辐照的抗性要比一般细菌营养细胞大得多。

本文使用的辐照剂量在 Gy 范围内,而国外学者<sup>[5-7]</sup>利用 X 射线杀菌使用的辐照剂量在 kGy 范围内,这主要是由于辐照杀菌效果还与辐照时样品量的多少以及所装样品容器的材质等因素相关。如 MAHMOUD<sup>[6]</sup>利用 X 射线辐照纯培养的创伤弧菌,菌液量为5 mL,辐照时所用容器为玻璃试管。而本实验中样品量较少,且所用容器的材质相比于玻璃试管对光的吸收也较少,受这些因素影响,本实验中得到各供试菌株的辐照致死剂量较小。

本次实验中,利用低功率的 X 射线光机,在低剂量范围内对污染生鲜肉的微生物进行辐照,仍然可得到一定的杀菌效果。

感谢中科院上海应用物理研究所罗红心老师及肖体乔老师对本实验的指导。

#### 参考文献:

- [1] 哈益明. 辐照食品及安全性[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [2] 汪勋清, 哈益明, 高美须. 食品辐照加工技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [3] 施培新. 食品辐照加工原理与技术[M]. 北京: 中国农业

- 科学技术出版社, 2004.
- [4] 韩晶,李开熊,李丽华. 食品辐照技术的特性及在肉制品中的应用研究[J]. 肉类研究,2009,119(1):57-62.
- [5] ROBERTSON C B, ANDREWS L S, MARSHALL D L, et al. Effect of X-ray Irradiation on Reducing the Risk of Listeriosis in Ready-to-eat Vacuum Packaged Smoked Mullet [J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(7):1561-1564.
- [6] MAHMOUD B S M. Reduction of *Vibrio vulnificus* in pure culture, half shell and whole shell oysters (*Crassostrea virginica*) by X-ray [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 130(2):135-139.
- [7] MAHMOUD B S M, BACHMAN G, RICHARD H, et al. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Shigella flexneri* on Spinach Leaves by X-ray [J]. Food Microbiology, 2010, 27(1):24-28.
- [8] 国家质量监督检验检疫总局. JJG744—2004, 医用诊断 X 射线辐射源检定规程[S]. 北京:中国计量出版社,2004.
- [9] 哈益明,居华,王峰,等. 辐照对冷却鸡肉中致病微生物的杀灭及贮藏特性的影响[J]. 食品科学,2009,30(19):74-77.
- [10] 王传耀,高美须,蒋梦月. 大肠杆菌、肠炎沙门氏菌、金黄色葡萄球菌及酿酒酵母菌的致死剂量[J]. 核农学通报, 1994,15(4):171-174.
- [11] LEE N Y, JO C, SHIN D H, et al. Effect of  $\gamma$ -irradiation on Pathogens Inoculated into Ready-to-use Vegetables [J]. Food Microbiology,2006,23(7):649-656.
- [12] DION P, CHARBONNEAU R, THIBAUT C. Effect of Ionizing Dose Rate on the Radioresistance of Some Food Pathogenic Bacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1994, 40(5):369-374.
- [13] LARA J D, FERNANDEZ P S, PERIAGO P M, et al. Irradiation of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* with electron beams [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies,2002,3(4):379-384.
- [14] SARRIAS J A, VALERO M, SALMERON M C. Elimination of *Bacillus cereus* Contamination in Raw Rice by Electron Beam Irradiation [J]. Food Microbiology, 2003, 20(3):327-332.

## Lethal dose for microorganisms in contaminated fresh meat by low power X-ray

DUAN Xin, OU Jie, LI Bai-lin

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Low power X-ray irradiator was used to irradiate the microorganisms in contaminated fresh beef from 3.08 to 18.48 Gy.  $D_{10}$  values were gained by correlation analysis of microbial survival rate and irradiation dose in this condition. The radiation sensitivity of them was also discussed. The results showed that: the  $D_{10}$  values for environmental polluted bacteria strains of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and its spores were 5.41, 5.00 and 23.81 Gy respectively. The  $D_{10}$  values for pathogenic bacteria strains of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* were 5.35 and 6.45 Gy respectively. The  $D_{10}$  values for spoilage bacteria strains of *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* and spores of *Penicillium* were 3.62, 4.39, and 16.39 Gy respectively. Among the strains tested, spores of *Bacillus cereus* and *Penicillium* were more resistant to irradiation. *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* were more sensitive to irradiation. After being irradiated by low power X-ray, the strains tested still had some bactericidal effects.

**Key words:** X-ray irradiation;  $D_{10}$ ; *Bacillus cereus*; *Staphylococcus aureus*; *Listeria monocytogenes*; *Pseudomonas fluorescens*