

绿豆芽生产过程中微生物的生长、分布及 消毒剂处理效果评价

Growth and distribution of microorganisms in the production of green bean sprouts and evaluation of disinfectant treatment

罗欣 傅亮 郝天瑶 方良月

LUO Xin FU Liang HAO tian-yao FANG Liang-yue

(暨南大学食品科学与工程系, 广东 广州 510632)

(Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

摘要:研究绿豆芽生产过程中微生物的生长情况及种类分布,采用2种不同类型的消毒剂进行处理及效果评价,并用16S rRNA方法对豆芽中主要微生物进行鉴定。结果表明,成品绿豆芽中的微生物总量为 5.8×10^7 CFU/g,微生物的种类主要为克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、不动杆菌(*Acinetobacter*)、肠杆菌(*Enterobacter*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)等。有效氯浓度1 000~3 000 mg/L的NaClO处理芽菜30 min,菌落总数分别降至 $1.2 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^5$ CFU/g,而直接处理单独培养的模式对照组则平均降至 $2.3 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^3$ CFU/mL。25 mg/L AgNO_3 可使菌落总数降至 3.8×10^5 CFU/g,消毒效果同样差于模型对照组。扫描电子显微镜观察分析芽菜表面微生物可形成明显的生物膜,显著强化了细菌对消毒剂的耐受力。

关键词:绿豆芽;微生物;菌种鉴定;消毒剂;生物膜

Abstract: The distribution of microbes in the process of green bean sprouts, and the treatment and effect of the two different types disinfectants were studied. The results showed that the total amount of microorganisms in the mung beans sprouts was 5.8×10^7 CFU/g, and the microbial species were mainly *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* and *Pseudomonas*. The total amount of microorganisms in the mung bean sprouts was decreased to 1.0×10^5 CFU/g when the effective chlorine concentration was 1 000~3 000 mg/L NaClO, while the model control group decreased to 1.0×10^3 CFU/g. The effect of Ag^+ was worse than NaClO, but it also showed a similar law. Using the scanning electron microscopy (SEM) to observe the sprouts, the surface of microbes formed a visible biofilm, which significantly enhanced the tolerance of bacteria to disinfectants.

作者简介:罗欣,女,暨南大学在读硕士研究生。

通信作者:傅亮(1968—),男,暨南大学副教授,博士。

E-mail: tfuliang@jnu.edu.cn

收稿日期:2017-05-19

Keywords: mung bean sprouts; microorganisms; identification of bacteria; disinfectant; biofilm

绿豆芽在中国芽菜消费中占比最大,口感好,营养丰富^[1]。芽菜以鲜活的形式上市,极富脆性,含有丰富的Vc,是人们生活中不可缺少的食品原料。近年来,中国芽菜产业发展迅速,从作坊式发豆芽方式逐步转为工业化规模生产,出现了大量日产50~100 t的芽菜工厂。但目前,在中国的果蔬生产中,由于采摘不当,贮藏不善,运输不及时或生理病害及微生物污染的影响,往往导致20%~30%的损耗^[2-3]。规模化生产后芽菜产业遇到了三大技术问题:①芽菜生产多采用淋水保温(20~25℃)发芽方式,生产过程中极易出现团状、窝状烂菜或大面积烂根问题,严重影响芽菜品质与产量;②芽菜的保鲜期极短,常温下只有1~2 d,在低温冷藏条件下也只有3~5 d,严重制约了芽菜产能和销售半径,极大影响了企业效益;③有关芽菜的安全性问题频发^[4]。2000年,美国爆发了由沙门氏菌污染的绿豆芽而引发的食源性疾病^[5];2011年,德国爆发了肠出血性大肠杆菌污染芽菜事件,近30人死亡^[6]。由于豆种含有天然内生菌,生产过程中进行保温淋水,生产周期长达4~7 d,芽菜本身也易受到机械性损伤导致汁液流出,这些条件都为微生物的生长及繁殖创造了良好条件。可以说,芽菜生产过程中的微生物问题直接影响了芽菜规模化生产后的质量及安全。因此,分析芽菜生产过程中微生物的生长、分布规律及对消毒效果进行评价成为解决上述3个技术问题的基础。

孔凡春等^[7]利用臭氧控制微生物的生长以延长果蔬的货架期,但过度使用会导致脱色和风味变化。H.H.Jin等^[8]研究了用 ClO_2 和气调包装联合使用的方法杀灭绿豆芽中沙门氏菌和李斯特菌的效果,可降低原豆芽菜中的微生物数

量,但会影响芽菜的质量和口感。M.L.Bari等^[9]采用细菌素联合植酸柠檬酸等使用,以减少鲜切果蔬中李斯特菌数量。更有J.X.Ye等^[10]使用噬菌体抑制苜蓿菜中沙门氏菌的生长及M.L.Bari等^[11]研究了在低温条件下运用物理辐射的方法杀灭豆芽菜中李斯特菌。上述研究虽有一定的抑菌效果,但未从根本上认识芽菜与微生物之间的关系。

NaClO是鲜切果蔬和自来水消毒中常用的消毒剂^[12],对微生物有很好的杀灭效果,按规定量使用具有安全高效的特点。另外,Ag⁺是一种无机消毒剂^[13],广泛用于水和其它领域。在美国、加拿大等地被认为是一种安全的消毒剂,其作用机理是Ag⁺与微生物中巯基结合,使某些酶失活,从而达到杀菌或抑菌作用,当菌体被杀灭后Ag⁺又被释放出来,保持持续的消毒作用^[14]。根据美国FDA 21 CFR 172.167条规定允许AgNO₃在瓶装水中使用,并作为抗菌剂来防止水中微生物的污染;赵清凤等^[13]采用AgNO₃研究了大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌作用及机制,取得了一定的抗菌效果。

本研究拟讨论绿豆芽发芽过程中的微生物生长规律、种类的分布,初步探讨2种常见的消毒剂对芽菜消毒除菌的效果,并分析芽菜中微生物难以有效清除的原因,旨在为生产出优质、高产、安全和保鲜期更长的产品。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

绿豆:市售;

平板计数营养琼脂培养基(PCA)、营养肉汤等培养基:广东环凯微生物科技有限公司;

细菌基因组DNA提取试剂盒:天根生化科技有限公司。

电子天平:HR-120型,上海精密仪器厂;

电热恒温培养箱:HN-403型,上海邦西仪器科技有限公司;

超净工作台:SW-CJ-1BU型,苏州安泰空气技术有限公司;

蒸汽灭菌锅:YQX-SG46-280S型,上海博讯实业有限公司;

PCR仪:VERITI 2.0型,美国AB公司;

电泳仪:HE99型,美国通用电气公司;

凝胶成像系统:BOX EF型,美国基因有限公司;

豆芽机:DYJ-A01型,中山荣威电器厂;

扫描电子显微镜(SEM):TM3030型,日本日立有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 绿豆芽生长过程中菌落总数的测定 称取健康饱满的绿豆60g,无菌水冲洗数次,除去表面灰尘、杂质。豆芽机用体积分数75%的酒精洗涤,臭氧柜内消毒3h后无菌水洗净。绿豆放入豆芽机发芽,每隔8h更换无菌水。根据不同发芽时间取样,按GB 4789.2—2010测定菌落总数。

1.2.2 绿豆芽中细菌分离与amp;鉴定

(1) 细菌分离:取成熟完整的绿豆20g,以有效氯浓度为3000mg/L的NaClO溶液浸泡豆种30min,取出后用无

菌水清洗3~5次后发芽,发芽4d后用PCA平板培养基进行浓度梯度培养。选取菌落形态不同、菌落独立清晰、出现频率最高的10种菌进行单独纯化培养,纯化10次,得到菌种分别编号M1~M10。

(2) DNA提取:采用DNA提取试剂盒分别提取10种菌的DNA。

(3) 16S rRNA的PCR扩增:将提取的基因组作为模板进行PCR扩增^[15],体系见表1。扩增引物为通用引物27F和1495R。扩增条件为:95℃预变性5min,95℃变性1min,55℃复性45s,72℃延伸2min,30个循环,最后72℃延伸10min。

表1 PCR扩增体系

Table 1 Composition of PCR system

试剂	使用量/ μ L	试剂	使用量/ μ L
Buffer	5.00	下游引物	2.00
MgCl ₂	3.00	Taq DNA聚合酶	0.25
dNTP	4.00	DNA模板	2.00
上游引物	2.00	去离子水	31.75

(4) PCR电泳检测:吸取4 μ L PCR产物与1 μ L DNA Loading Buffer混匀,在1%琼脂糖凝胶上点样,100V电泳45min^[16]。结束后EB染色,用凝胶成像系统进行观察。

送至广州生工生物工程公司测序。测序结果提交至NCBI的GenBank数据库,与已知序列进行Blast比较,采用Neighbour-joining法用Mega 7.0软件进行系统发育树分析。确定与试验菌株亲缘关系最近的种属。

1.2.3 不同消毒剂常规处理新鲜绿豆芽

(1) 配制有效氯浓度为1000,2000,3000mg/L的NaClO溶液,称取3份20g的绿豆芽分别浸入不同浓度的NaClO溶液中,浸泡30min。有效氯浓度以GB 19106—2013中碘量法确定。用无菌去离子水洗净直至NaClO不得检出。测量菌落总数,并进行感官评定。

(2) 配制浓度为5,15,25mg/L的AgNO₃溶液,另取3份20g绿豆芽浸入不同浓度的AgNO₃溶液,浸泡30min。用无菌去离子水洗净至AgNO₃残留不得检出。测量菌落总数,并进行感官评定。

以上试验至少进行3次平行,取平均值。另空白对照组用无菌水代替消毒液进行相同步骤的处理。

1.2.4 不同消毒剂单独处理绿豆芽中的细菌 取10mL离心管多个,装入营养肉汤培养基10mL,灭菌后分别接种已纯化好的M1~M10菌种。37℃培养至菌体浓度10⁷CFU/mL左右,冷藏备用。并测量菌落总数。

在装有菌液的离心管中分别加入NaClO和AgNO₃,使浓度与1.2.3相同,室温下振摇30min,测量离心管中的菌落数。作为模型对照。

1.2.5 感官评定 绿豆芽感官评价标准见表2。挑选10位评价员,按GB 19547—2004的要求对绿豆芽进行感官评价。

表 2 绿豆芽感官评价标准

Table 2 The standard of sensory evaluation of mungbean sprouts

评价指标	评分标准
子叶颜色	颜色呈褐色(2~8),深黄色(10~14),淡黄色(16~20)
胚轴颜色	胚轴无光泽,呈黄褐色(2~8),无光泽,白色(10~14),有光泽,白色(16~20)
胚轴软化度	拿起绿豆芽,胚轴呈软卧状(2~8),弯曲状(10~14),直挺状(16~20)
根部颜色	颜色呈黑色(2~6),深红色(8~12),红色(14~16),浅红色(18~20)
气味	有异味(2~8),无异味无豆芽味(10~14),有豆芽清香味(16~20)

1.2.6 扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)观察绿豆芽中菌的形态 取豆芽数根,在体积分数 2.5%的戊二醛中浸泡 2 h,用磷酸缓冲液清洗 30 min,体积分数 50%,70%,80%,90%浓度梯度的乙醇各清洗 10 min,无水乙醇清洗 30 min,醋酸异戊酯清洗 30 min。临界点干燥法干燥,样品用导电胶固定在扫描电镜样品台上,喷金后观察^[17]。

2 结果与分析

2.1 绿豆发芽过程中细菌总数生长规律

由图 1 可知,经无菌水洗净后的豆种,细菌总数为 4.2×10^3 CFU/g(3.62 lg CFU/g);避光淋水发芽 12 h 后,菌落总数增长到 5.2×10^5 CFU/g(5.72 lg CFU/g);24 h 后菌落总数快速增长至 3.0×10^7 CFU/g(7.48 lg CFU/L);36 h 后细菌总数增长趋势缓慢;96 h 后芽菜中的菌落总数约为 5.8×10^7 CFU/g(7.76 lg CFU/L),说明芽菜发芽过程中,前期细菌快速繁殖,后期菌落总数保持相对稳定。最终芽菜中的细菌总数含量极高,对芽菜的安全和保鲜都带来了极大隐患。

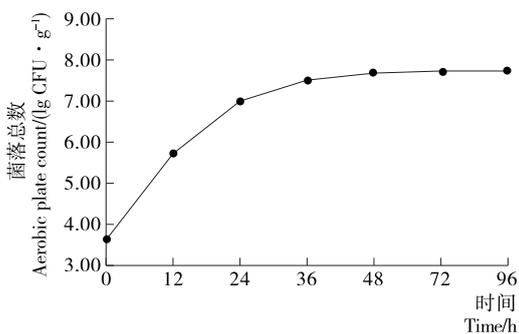
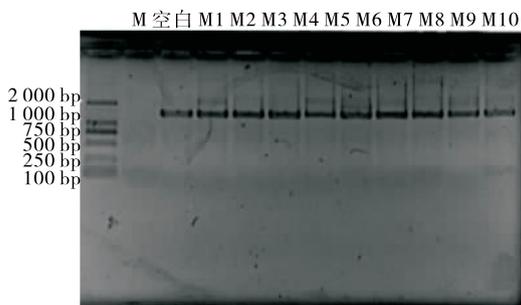


图 1 绿豆发芽过程中细菌总数变化规律

Figure 1 Growth curve of bacterial in mungbean sprouts

2.2 绿豆芽细菌分离与鉴定

2.2.1 PCR 电泳检测结果 根据 1.2.2 提取各组 DNA 后,紫外检测,可见清晰的 PCR 产物带。如图 2 所示,PCR 产物带都处于同一直线上,介于 Marker 分子量 1 000~2 000 bp,可推断该 10 种菌的 PCR 产物分子量约为 1 400 bp。与空白相比产物单一无杂质。



M. DL2 000 DNA Marker M1~M10. 10 种菌 DNA 经 PCR 后的产物

图 2 PCR 扩增后凝胶电泳图

Figure 2 The result of gel electrophoresis after PCR

2.2.2 绿豆芽中菌种类分布 将 M1~M10 提取 DNA 测序后在 NCBI 的 Genbank 数据库中进行 Blast 比较,结果见表 3。菌株 M2、M7、M9 属于克雷伯氏菌属(*Klebsiella*),其中肺炎克雷伯氏菌对人致病性较强,是重要的条件致病菌和医源性感染菌之一。菌株 M5、M10 属于埃希氏菌属(*Escherichia*),M1、M4 属于不动杆菌属(*Acinetobacter*),M3 属于假单胞菌(*Pseudomonas*),M6 属于肠杆菌属(*Enterobacter*),M8 属于假食酸菌(*Pseudacidovorax*)。其中肺炎克雷伯氏菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希氏菌容易产生细菌生物膜。此前已有学者^[18]提出生物膜的概念,认为自然界中 99% 的菌都可以附着于物体表面形成生物膜结构。

分别选取与 M1~M10 10 种菌相似的几种进行比对,将相似度高的几种序列通过 MEGA7.0 进行同源性分析并构建系统发育树。M1~M10 10 种菌的发育树见图 3。

表 3 绿豆芽中微生物种类分布

Table 3 Distribution of microbial species in mungbean sprouts

菌株	相似性/%	鉴定(最相似模式菌株)	GenBank 登录号
M1	99	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain B9	JQ579640.1
M2	99	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain HS11286	NC016845.1
M3	99	<i>Pseudomonas otitidis</i> strain M61	KU551193.1
M4	99	<i>Acinetobacter junii</i> strain 65	NZ_CP019041.1
M5	99	<i>Escherichia coli</i> strain: V266	LC056477.1
M6	98	<i>Enterobacter</i> sp. VITNC1	JQ398852.1
M7	99	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain JPR9	KM083804.1
M8	99	<i>Pseudacidovorax</i> sp. ptl-2	FJ581042.3
M9	97	<i>Klebsiella</i> sp. ZSL4	KM272270.1
M10	98	<i>Escherichia</i> sp. P14	GU113084.1

2.3 消毒剂常规处理绿豆芽

由图 4、5 可知,新鲜豆芽中的原始菌落数为 5.8×10^7 CFU/g(7.77 lg CFU/g),水洗 30 min 后,菌落总数减少至 4.8×10^7 CFU/g(7.69 lg CFU/g)。本试验选取了 1 000, 2 000, 3 000 mg/L 的 NaClO 浸泡豆芽 30 min,分别将豆芽中的菌落总数减少至 1.2×10^7 , 2.9×10^5 , 1×10^5 CFU/g。但绿豆芽中菌落数仍达到 1×10^5 CFU/g(5 lg CFU/g),远

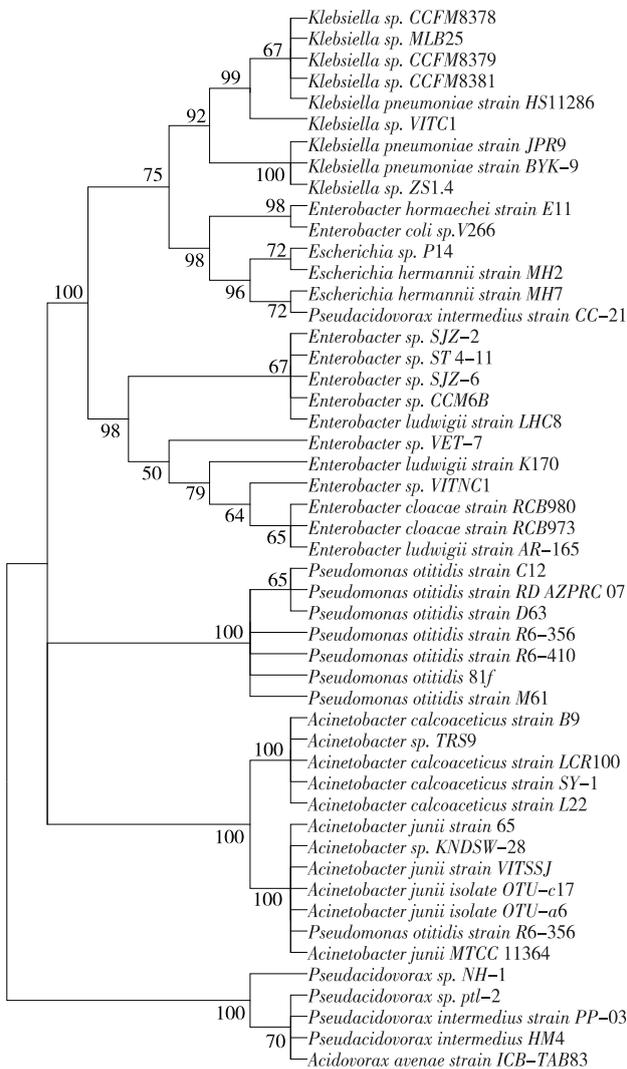


图3 M1~M10 10种菌的系统发育树
Figure 3 Phylogenetic trees of M1-M10

多于普通果蔬中的菌落数。经感官评价,3 000 mg/L的NaClO处理绿豆芽会造成显著的化学性损伤,豆芽变软、变黄,汁液流失明显,货架期大大缩短。

采用不同浓度的AgNO₃溶液清洗芽菜,结果表明5 mg/L的AgNO₃溶液几乎没有消毒作用,15 mg/L的AgNO₃溶液可以将菌落总数降低1.0~1.2 lg CFU/g,对豆芽消毒效果不

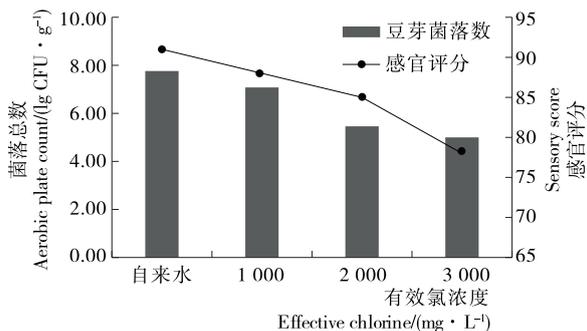


图4 有效氯浓度的NaClO对绿豆芽的消毒效果
Figure 4 The disinfection effect of NaClO with effective chlorine on mungbean sprouts

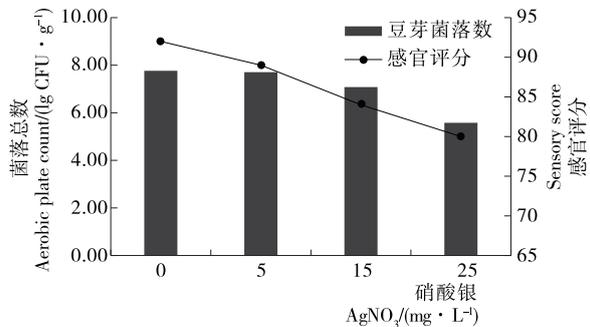


图5 AgNO₃浓度对绿豆芽的消毒效果
Figure 5 The disinfection effect of AgNO₃ on mungbean sprouts

显著。增加AgNO₃浓度至25 mg/L,可将菌落总数降至3.8×10⁵ CFU/g(5.5 lg CFU/g),与对照相比降低了2.0~2.2 lg CFU/g,显示出Ag⁺具有一定的消毒效果,但效果次于NaClO。25 mg/L AgNO₃溶液对豆芽外观有一定的影响,会使豆芽硬度和脆性降低。

2.4 消毒剂直接处理绿豆芽中细菌效果评价

由图6可知,2种消毒剂对每种菌的消毒效果明显,NaClO的消毒效果更优于AgNO₃。3 000 mg/mL NaClO溶液可使离心管中的菌减少(4.5~5.5 lg CFU/mL),最后约剩1×10³ CFU/mL(3 lg CFU/mL)。特别是对M4 Acinetobacter junni的杀菌效果最强,最终残留量为2.9 lg CFU/mL。25 mg/mL AgNO₃溶液处理,菌落数下降3 lg CFU/mL,相比于相同方法处理的新鲜绿豆芽,杀菌效果平均提高了2~3 lg CFU/g。说明存在于豆芽中的细菌比单独培养的模式对照组的同类细菌更难杀灭。

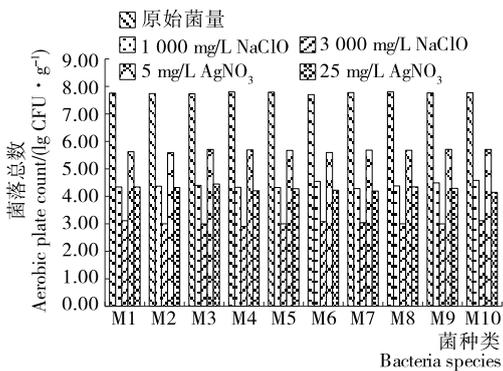


图6 不同消毒剂处理豆芽后菌落总数条形图
Figure 6 The results of different disinfectant on bacterium M1~M10

2.5 扫描电镜(SEM)观察结果

图7为子叶,大量菌体聚集在芽菜细胞表面。菌体与菌体之间,菌体与芽菜细胞之间多数呈丝状连接,丝状物分布广泛,局部区域丝状物连接成膜状。菌体表面也有大量的丝状或成膜状物覆盖、缠绕。图8为豆芽下胚轴,其表面微生物分布密集,数量远多于子叶部位。图8箭头所示部位是微生物已大量聚集。微生物之间和微生物与芽菜细胞之间也

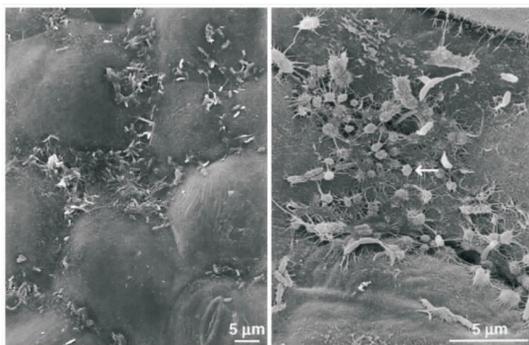


图 7 绿豆芽子叶微生物 SEM 显微观察图

Figure 7 The observed result about cotyledons with SEM

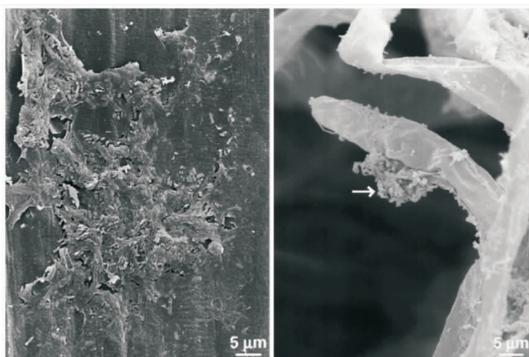


图 8 绿豆芽下胚轴微生物 SEM 观察图

Figure 8 The observed result about hypocotyls with SEM

有大量的丝状物存在,丝状物的积累最后会成膜并包裹微生物。

3 结论

绿豆芽中的微生物以克雷伯氏菌属和埃希氏菌属数量最多,二者均属于条件致病菌,处理不当将对人体健康造成危害。采用不同消毒剂进行浸泡消毒,可使豆芽中的细菌总数降低一定的数量,但仍然约有 5 lg CFU/g。当采用同样的方法单独处理 10 种菌的培养物,最终可将的菌总数降到约 3 lg CFU/mL,杀菌效果相比于含菌芽菜的处理有显著差异。通过扫描电镜直接观察豆芽表面微生物,可看到大量丝状物分布在微生物细胞之间,丝状物的积累形成厚实的膜状物,包裹着大量菌体。初步判断为细菌生物膜结构。

芽菜是一种较为脆弱的蔬菜,难以耐受高强度消毒剂的处理,而且微生物聚集成膜加大了消毒的难度。故为了有效降低芽菜的原始含菌量,温和有效地消除致病菌,而不破坏芽菜本身口感,提高芽菜的保鲜和安全性,需进一步探究其生物膜的特点及如何破坏芽菜表面导致细菌成膜的生物聚合基质。

参考文献

[1] 李建英,田中艳,周长征,等. 绿豆芽菜萌发条件及物质含量测定[J]. 黑龙江农业科学, 2010(7): 37-40.
 [2] 雷昊,谢晶. 新鲜蔬菜采后清洗、包装处理研究进展[J]. 食品与机械, 2016, 32(6): 215-219.
 [3] 严灿,刘升,贾丽娥,等. 蔬菜冷链物流技术研究进展[J]. 食品

与机械, 2015, 31(4): 260-265.

[4] WEISS A, HERTEL C, GROTHE S, et al. Characterization of the cultivable microbiota of sprouts and their potential for application as protective cultures[J]. Systematic & Applied Microbiology, 2007, 30(6): 483-493.
 [5] PIÉRARD D, GREVE H D, HAESBROUCK F, et al. O157: H7 and O104: H4 Verotoxin-producing *Escherichia coli* outbreaks; respective role of cattle and humans[J]. Veterinary Research, 2012, 43(1): 1-12
 [6] 成黎. 新鲜蔬菜中的微生物污染危害、检测和控制方法研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(23): 347-352.
 [7] 孔凡春,陆胜民,王群. 臭氧在果蔬保鲜和农残降解上的应用[J]. 食品与机械, 2003(5): 24-26.
 [8] JIN H H, LEE S Y. Combined effect of aqueous chlorine dioxide and modified atmosphere packaging on inhibiting *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in mungbean sprouts[J]. Journal of Food Science, 2007, 72(9): 441-445.
 [9] BARI M L, UKUKU D O, KAWASAKI T, et al. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(7): 1 381-1 387.
 [10] YE Jian-xiong, KOSTRZYNSKA M, DUNFIELD K, et al. Control of *Salmonella* on sprouting mung bean and alfalfa seeds by using a biocontrol preparation based on antagonistic bacteria and lytic bacteriophages[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(1): 9-17.
 [11] BARI M L, NAKAUMA M, TODORIKI S, et al. Effectiveness of irradiation treatments in inactivating *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables at refrigeration temperature [J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(2): 318-323.
 [12] 许思笑,马文娟. 人工模拟肠炎沙门氏菌在绿豆芽中的内化定殖能力及其消毒处理研究[J]. 现代食品科技, 2016(12): 93-98.
 [13] 赵清风,陈介南,张林,等. AgNO₃ 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌作用及机制[J]. 生物加工过程, 2011, 9(3): 52-56.
 [14] 墙蕾,倪红卫,幸伟,等. 银的抗菌作用机理[J]. 武汉科技大学学报, 2007, 30(2): 121-124.
 [15] 刘重喜. 大豆根部内生放线菌的筛选、鉴定及其活性代谢产物研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013: 17-19.
 [16] 费鹏,白洪健,程述震,等. PCR-DGGE 法分析婴儿肠道菌群多样性[J]. 食品与机械, 2013, 29(2): 60-63.
 [17] FETT W F, COOKE P H. Scanning electron microscopy of native biofilms on mung bean sprouts[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2003, 49(1): 45-50.
 [18] BENDOUAH Z, BARBEAU J, HAMAD W A, et al. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*, is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis[J]. Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2006, 134(6): 991-996.