

酸性氧化电解水对金黄色葡萄球菌生物被膜清除效果的研究

Study on removal of *Staphylococcus aureus* biofilm by acidic electrolytic oxidation water

余 铭¹ 张全凯² 罗小军³ 陈海强¹ 杨公明²

YU Ming¹ ZHANG Quan-kai² LUO Xiao-jun³ CHEN Hai-qiang¹ YANG Gong-ming²

(1. 阳江职业技术学院, 广东 阳江 529566; 2. 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642;

3. 广州赛爱环境保护技术开发有限公司, 广东 广州 510663)

(1. Yangjiang Vocational and Technical College, Yangjiang, Guangdong 529566, China;

2. College of Food, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China;

3. Guangzhou C&E Environmental Technology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510663, China)

摘要:研究酸性氧化电解水对金黄色葡萄球菌生物被膜的清除效果。通过观察放大 5 000 倍的金黄色葡萄球菌生物被膜的扫描电镜照片发现,经酸性氧化电解水处理后,细菌外部基质基本被破坏,细胞破裂严重,生物被膜态细菌量下降,清除效果明显。增加保存酸性氧化电解水的时间、提高保存温度以及存在有机干扰物时均会显著降低清除效果;闭口储存的电解水清除生物被膜的能力高于敞口保存。有效氯、pH 值和氧化还原电位对清除效果具有协同作用;有效氯含量较低时,电解水清除能力影响明显,有效氯含量较高时,清除效果无明显影响;低 pH 值条件下,清除效果较好;氧化还原电位与清除效果有明显正相关关系。

关键词:金黄色葡萄球菌;生物被膜;酸性氧化电解水;清除机制

Abstract: The removal efficiency of electrolyzed oxidizing water on biofilm of *Staphylococcus aureus* was studied. Electrolyzed oxidizing water showed obvious damage on the *Staphylococcus aureus* biofilm, including substantially destroyed external matrix, severely destroyed cells and decreased bacterial number observed with SEM(scanning electron microscope) on 5 000-times and 40 000-times. The removal efficiency could be reduced significantly by prolonging storage time of oxidation potential acidic water, raising preservation temperature and the presence of organic interfering substances. The removal efficiency of sealing preservation was superior to opening preservation. The available chlorine, pH value and redox potential had a synergistic effect on the removal efficiency. When the amount of available chlorine was low, the re-

moval efficiency of concentration variation was significant. When the amount of chlorine was high, the removal efficiency of concentration variation was not significant. Under low pH value conditions, the removal efficiency was comparatively better. The redox potential has a significant positive correlation with the removal efficiency.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; biofilm; electrolyzed oxidizing water; removal mechanism

细菌生物被膜是细菌粘附于接触面时分泌的将自身包裹的多糖和蛋白,进而形成细菌聚集膜状物。在食品加工过程中,各种腐败菌和食源性病原菌在潮湿的环境中能生长繁殖,并容易粘附到设备表面形成生物被膜,膜中细菌的代谢活动会腐蚀金属表面和管道,给食品的加工与安全,储运设备带来严重危害^[1-2],金黄色葡萄球菌是一种常见的食源性致病菌^[3],具有强大的形成生物被膜的能力^[4]。通常采用物理或化学的方法破坏生物被膜的结构,高压喷射处理、亚硝酸、过氧化氢、次氯酸等均对金黄色葡萄球菌的生物被膜有一定的破坏作用^[5-7]。二氧化氯、Cu²⁺和季铵化合物联用,以及柠檬酸/亚甲基蓝/对羟基苯甲酸能有效杀灭包括金黄色葡萄球菌在内的生物被膜态细菌^[8-9]。但这些方法不同时具备破坏生物被膜结构和杀灭被膜态细菌的双重作用。酸性氧化电解水主要是通过干扰膜的平衡,使微生物的细胞膜电位发生改变,导致细胞通透性增强、细菌肿胀及细胞代谢酶的破坏,胞内物质溢出、溶解,从而达到杀灭微生物的作用^[10]。其最早用于耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌等临床耐药菌株的灭活^[11],现已广泛应用于医疗、食品加工、环境卫生等行业的杀菌消毒,具有杀菌力强、谱广、迅速等特点^[12]。但在生物被膜的清除方面尚未见研究报道。本试验拟研究酸性氧化电解水保存方法与环境条件对金黄色葡萄球菌生

基金项目:广州市科技计划项目(编号:2013J4400095)

作者简介:余铭(1973—),男,阳江职业技术学院高级工程师,博士。

E-mail: yuemin1973@126.com

收稿日期:2015-09-29

物被膜的清除效果,探索酸性电解水中的有效氯、pH值和氧化还原电位对生物被膜清除效果的影响,并分析酸性氧化电解水清除金黄色葡萄球菌生物被膜的机制,以期为酸性氧化电解水在食品生产中的应用提供指导。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538):广东省微生物研究所;

NaOH、HCl、NaCl、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、 CaCl_2 、卵磷脂、甘氨酸、葡萄糖、吐温-80、戊二醛:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

钼酸、醋酸异戊酯:分析纯,上海凯茵化工有限公司;

琼脂:Saland Chemical Co. LTD;

胰蛋白胨、大豆蛋白胨、牛肉膏、牛血清蛋白:生化试剂,上海中科昆虫生物技术开发有限公司;

营养琼脂培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 5 g,NaCl 5 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1 000 mL^{[13]285};

胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB):胰蛋白胨 1.5%,大豆蛋白胨 0.5%,NaCl 0.5%,蒸馏水配制^{[13]286};

胰蛋白胨大豆肉汤琼脂培养基(TSA):胰蛋白胨 1.5%,大豆蛋白胨 0.5%,NaCl 0.5%,琼脂 1.6%,蒸馏水配制^{[13]286};

中和剂: Na_2HPO_4 2.83 g, KH_2PO_4 1.36 g, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 5.00 g,卵磷脂 3.00 g,甘氨酸 3.00 g,吐温-80 30 mL,蒸馏水 1 L^{[13]82}。

1.1.2 主要仪器设备

环境扫描电镜:FEI-XL30型,飞利浦公司;

电解水机:FX-1型,广州赛爱环境保护技术开发有限公司;

光学显微镜:XSP-7CE型,上海长方光学仪器有限公司;

临界点干燥仪:CPD 030型,瑞士Bal-Tec公司;

生化培养箱:LRH-250A型,天津福元铭仪器设备有限公司;

手提式高压蒸汽灭菌锅:YXQ-LS-18SI型,杭州汇尔仪器设备有限公司;

酶标板:96孔,上海康宁公司;

超净工作台:AIR TECH型,苏净基团安泰公司;

数字型pH计:DELTA320型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

ORP计:PHS-3G数字型,上海雷磁仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 金黄色葡萄球菌生物被膜制备与检测

(1)生物被膜的制备:取一定量金黄色葡萄球菌悬液接入96孔酶标板中,加入TSB培养基在37℃培养一定时间后弃去培养物,用250μL无菌磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.3)冲洗3次,加入甲醇250μL加盖静置15min,吸除甲醇后在30℃环境下自然风干,固定吸附紧密的细菌。

(2)生物被膜的检测:采用结晶紫染色法。在每个孔中加入250μL结晶紫(1%结晶紫溶液),静置染色20min后弃

去染色液,用无菌磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.3)冲洗直至无色,晾干。在染色的孔中加入250μL、95%的乙醇脱色,用空白孔以250μL TSB培养基作为空白调零,测595nm处吸光度(OD),每孔做3个平行,取其平均值^[14]。吸光值越大,生物被膜生长或保存状况越好。

1.2.2 生物被膜形态结构的观察 取金黄色葡萄球菌生物被膜载体,充分漂洗,使用2.5%戊二醛PBS溶液将待测样品固定过夜后,用PBS溶液冲洗数遍后用1%的钼酸固定1h,50%,70%,80%,90%系列浓度乙醇脱水各10min,100%乙醇脱水2次,每次15min,再用醋酸异戊酯置换2次,每次15min,用干燥仪干燥后再喷金。同时制取pH值为3.5,有效氯含量为65mg/L,氧化还原电位为1110mV的酸性氧化电解水处理金黄色葡萄球菌生物被膜,按照前述方法进行处理喷金,然后通过扫描电镜观察酸性氧化电解水处理前后生物被膜微观形态结构^[15]。

1.2.3 生物被膜活菌量的测定 取出培养一定时间的96孔酶标板,用无菌磷酸缓冲液(PBS,pH 7.3)漂洗3次,在无菌状态下用无菌棉球擦拭培养孔数次,将棉球转入装有10mL PBS溶液试管中,将试管放入超声仪中,50Hz超声15min,使棉球上的菌团分散于无菌水中。用无菌磷酸缓冲液(PBS,pH 7.3)进行梯度稀释后,在TSA平板上37℃培养24h后计数,结果以lg(CFU/mL)表示。

1.2.4 有效氯测定 采用间接碘量法^[16]。

1.2.5 酸性氧化电解水清除金黄色葡萄球菌生物被膜效果 取培养了一定时间的96孔酶标板,在其中加入200μL pH 3.5的酸性氧化电解水,放入摇床,设定转速。处理一定时间后在孔中加入200μL中和剂作用10min后弃去处理液,用250μL无菌磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.3)冲洗3次,去除杂质。后续处理参照1.2.1进行。

1.2.6 处理时间与转速对酸性氧化电解水清除生物被膜效果的影响 分别测定不同处理时间(1,3,5,10,15,20,25,30min)与不同转速(0,5,10,20,40,60,80,100r/min)两个因素下pH 3.5的酸性氧化电解水对96孔酶标板中金黄色葡萄球菌生物被膜清除效果的影响,参照1.2.5进行试验。

1.2.7 保存方式对酸性氧化电解水清除生物被膜效果的影响

(1)保存时间:采用敞口见光方式保存条件下,保存时间为12,24,36,48,60,72,84,96h的酸性氧化电解水处理金黄色葡萄球菌被膜,处理时间15min,温度25℃,参照1.2.5进行清除效果观察。

(2)保存温度:采用敞口见光保存48h,保存温度为4,10,15,20,25,30,35,40,45,50℃保存的酸性氧化电解水处理金黄色葡萄球菌被膜,处理时间15min,温度25℃,参照1.2.5进行清除效果观察。

(3)保存容器开闭及光照:在25℃保存48h的条件下,以敞口见光、敞口避光、闭口见光、闭口避光4种方式进行保存的酸性氧化电解水(pH值3.5)处理金黄色葡萄球菌被膜,处理时间15min,温度25℃,参照1.2.5进行清除效果观察。

1.2.8 有机干扰物对酸性氧化电解水清除生物被膜效果的影响 取培养一定时间的96孔板金黄色葡萄球菌生物被膜,

在孔板中加入 0.3% 的牛血清白蛋白(BSA)^{[13]8}。在孔板中再加入 150 μL 的 pH 为 3.0 的酸性氧化电解水,放入摇床,设定转速后,参照 1.2.5 进行清除效果观察。

1.2.9 清除机理 分别配 pH 值为(2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,5.0,6.0),氧化还原电位为(860,930,1 020,1 060,1 110,1 140,1 180 mV),有效氯浓度为(5.5,12.0,18.0,27.0,36.0,50.0,57.0,68.0 mg/L)的酸性氧化电解水处理 96 孔板金黄色葡萄球菌生物被膜试材,分析酸性氧化电解水 3 个特征指标对金黄色葡萄球菌生物被膜清除效果的影响,初步探讨酸性氧化电解水的清除机理。

2 结果与分析

2.1 酸性氧化电解水处理时间与转速对金黄色葡萄球菌生物被膜的清除效果

2.1.1 处理时间的影响 由图 1 可知,随处理时间的增加生物被膜活菌数呈下降趋势,在前 15 min 内生物被膜活菌数急剧下降;15~30 min 时,下降趋于缓慢,说明 pH 3.5 的酸性氧化电解水在处理 15 min 内对金黄色葡萄球菌生物被膜有很好的清除效果。这可能是由于残留氯含量随着处理时间的增加而逐渐降低,从而影响酸洗氧化电解水对金黄色葡萄球菌生物被膜的清除效果。

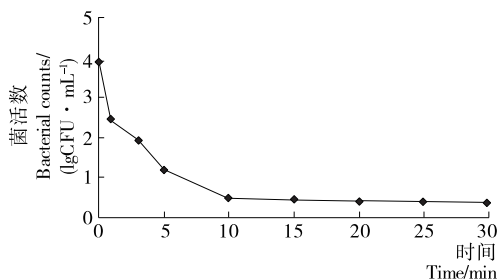


图 1 处理时间对生物被膜活菌数的影响

Figure 1 Effect of treatment time on bacterial counts of biofilm

2.1.2 转速的影响 由图 2 可知,随着转速的增加,经 pH 3.5 的酸性氧化电解水处理的生物被膜活菌数呈缓慢下降趋势,这可能是由于转速越高越有利于酸性氧化电解水接触生物被膜;转速 0 r/min 相比转速 100 r/min 所测生物被膜活菌数要高 0.06 lg(CFU/mL),活菌数对数值相差小于一个数量级,转速对清除效果的影响较小。

2.2 酸性氧化电解水处理对生物被膜形态结构的影响

由图 3 可知,处理前,大量表层菌覆盖在生物被膜表面,

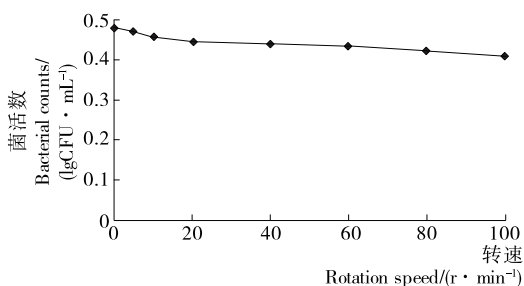
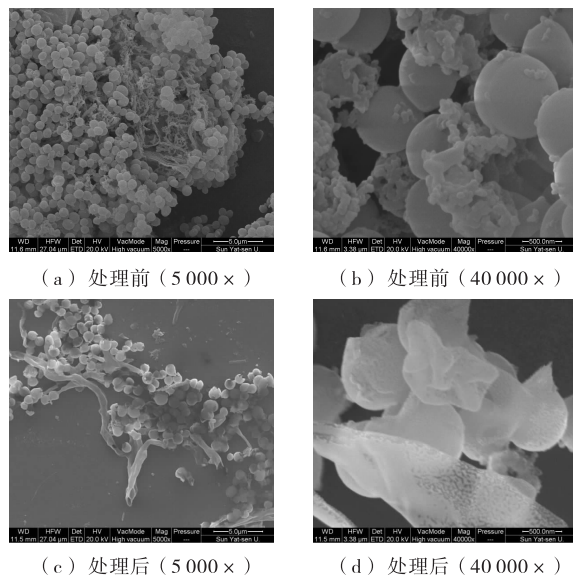


图 2 转速对生物被膜活菌数的影响

Figure 2 Effect of different speed on bacterial counts of biofilm



(a) 处理前 (5 000 ×) (b) 处理前 (40 000 ×)
(c) 处理后 (5 000 ×) (d) 处理后 (40 000 ×)

图 3 处理前后生物被膜形态比较

Figure 3 Comparison of biofilm morphology before and after treatment

被膜态金黄色葡萄球菌菌体呈球形,表面光滑,菌体集聚相连,呈网络状,且菌体表面被大量丝状粘性物质包裹,即菌体分泌的大量胞外物质。经 pH 3.5 的酸性氧化电解水处理后,生物被膜态菌所剩量减少,细菌外部基质明显减少,细胞破裂和变形严重,说明酸性氧化电解水对金黄色葡萄球菌生物被膜清除效果显著。

2.3 保存方式对酸性氧化电解水清除生物被膜效果的影响

2.3.1 保存时间的影响 由图 4 可知,在所有保存时间点,酸性氧化电解水的 pH 越小清除效果越好。5 种 pH 的酸性氧化电解水的清除效果均随保存时间的增加而下降,在前 72 h 的保存时间内,各电解水的清除效果呈线性下降,超过 72 h 后,下降趋势趋于平缓。这可能是因为在保存 72 h 后,酸性氧化电解水的理化特性发生了显著变化。

2.3.2 保存温度的影响 由图 5 可知,随着保存温度的升高,各种酸性氧化电解水清除效果显著下降,其中 pH 值为 2 时酸性氧化电解水清除效果最为显著,pH 值为 5 时酸性氧化电解水清除效果最弱,可能由于随着温度升高,较低的 pH 条件下酸性氧化电解水中的氧化还原电位能保持较高的稳定性。结果表明,较低的保存温度更有利于酸性氧化电解水

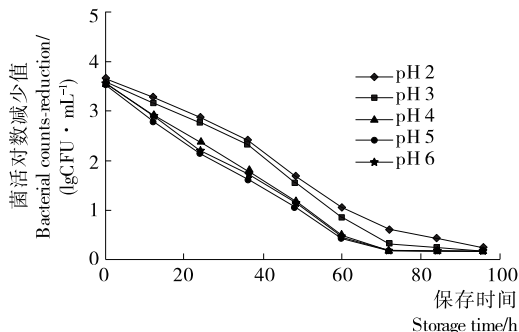


图 4 保存时间对生物被膜活菌数对数减少值的影响

Figure 4 Effect of bacterial counts-reduction of biofilm on storage time of electrolyzed oxidizing water

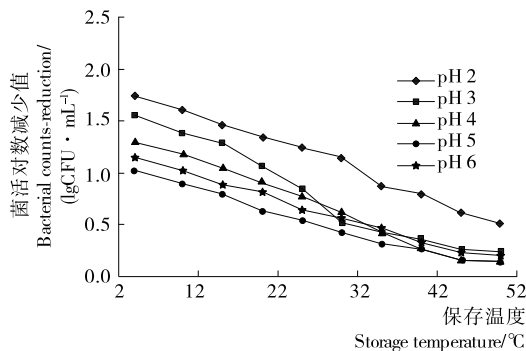


图5 保存温度对生物被膜活菌数对数减少值的影响

Figure 5 Effect of bacterial counts-reduction of biofilm on storage temperature of electrolyzed oxidizing water

清除生物被膜活性的保持。

2.3.3 保存容器开闭及光照的影响 由图6可知,敞口和闭口保存方式下的酸性氧化电解水清除生物被膜效果均有不同程度的下降,见光和避光保存方式差异性不显著($P < 0.05$),说明光线对电解水的清除能力影响不大。敞口保存方式下酸性氧化电解水的清除能力大为下降,闭口保存方式相对于敞口保存方式更容易保持酸性氧化电解水的清除能力。这可能与敞口保存状态下会导致酸性氧化电解水有效氯的大量挥发,以及氧化还原电位下降较快有关。

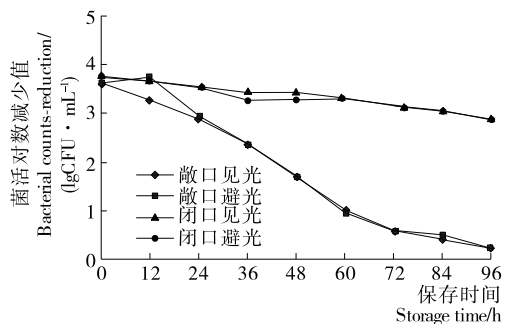


图6 保存容器开闭及光照对生物被膜活菌数对数减少值的影响

Figure 6 Effect of bacterial counts-reduction of biofilm on illumination and container opening/ closing of electrolyzed oxidizing water

2.4 有机干扰物对酸性氧化电解水清除金黄色葡萄球生物被膜效果的影响

无有机干扰物的情况下,酸性氧化电解水可高效清除金黄色葡萄球菌生物被膜,在处理15 min时活菌对数减少值大于3 lg(CFU/mL)。由表1可知,有机干扰物的浓度差异对生物被膜清除效果的干扰影响较为明显,有机干扰物浓度越高,干扰作用越明显。从试验开始,存在有机干扰物的试验组别所测得活菌对数减少值就明显小于空白组,说明有机干扰物的干扰作用是从一开始就存在的。

2.5 酸性氧化电解水对金黄色葡萄球生物被膜清除机制

2.5.1 有效氯含量对酸性氧化电解水清除生物被膜效果的影响 由图7可知,随着有效氯含量的增加,活菌对数减少值

表1 有机干扰物对生物被膜活菌对数减少值的影响

Table 1 Effect of Bacterial counts-reduction of biofilm on interfering electrolyzed oxidizing water by organic substance

有机干扰物	作用时间/min							
	1	3	5	10	15	20	25	30
无菌水	2.230	2.647	3.287	3.876	3.923	3.948	3.955	3.966
2%BSA	1.121	1.452	1.634	1.703	1.722	1.725	1.753	1.759
4%BSA	1.048	1.224	1.418	1.557	1.593	1.611	1.632	1.646
6%BSA	0.911	1.145	1.336	1.472	1.550	1.574	1.581	1.603
8%BSA	0.877	1.080	1.291	1.428	1.494	1.517	1.533	1.542
10%BSA	0.839	0.970	1.135	1.348	1.424	1.452	1.456	1.473

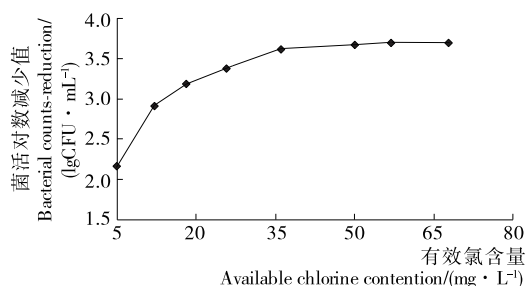


图7 有效氯含量对酸性氧化电解水清除生物被膜效果的影响

Figure 7 Effect of available chlorine content on electrolyzed oxidizing water to remove biofilm efficiency

不断增大,尤其在有效氯含量为5.5~36.0 mg/L时,活菌对数减少值快速增加,但当效氯含量为36~68 mg/L时,活菌对数减少值增长缓慢。因此,有效氯含量不宜过高,而且过高的有效氯含量还会造成氯残留。

2.5.2 pH值对酸性氧化电解水清除生物被膜效果的影响

由图8可知,随着pH值增加,生物被膜活菌对数减少值逐渐减少,但变化不明显,pH值在2~6时,活菌对数仅下降0.1左右,说明pH值对金黄色葡萄球菌生物被膜清除效果极弱;酸性氧化电解水在pH值为6时的杀菌效果较pH值为5的好,可能是有效氯中的HClO是酸性氧化电解水杀菌的重要基础,pH值为6时的酸性氧化电解水有效氯含量虽低,但电解水中HClO的含量会因pH值的不同而发生变化,pH值越高有效氯中HClO的比例越高,由于分子态的HClO杀菌效率很高,是相同浓度ClO⁻的80倍^[17],从而

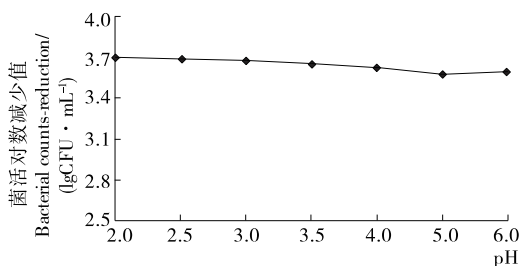


图8 pH值对酸性氧化电解水清除生物被膜效果的影响
Figure 8 Effect of pH on electrolyzed oxidizing water to remove biofilm efficiency

更有利于生物被膜的清除。任占冬等^[18]研究表明,pH 值为 2.6 的盐酸比酸性氧化电解水杀菌能力要弱得多,而酸性环境使物质变性灭活需要较长的时间,所以 pH 值不是酸性氧化电解水高效清除作用的主要因素。

2.5.3 氧化还原电位对酸性氧化电解水清除生物被膜效果的影响 由图 9 可知,随着氧化还原电位的增加,酸性氧化电解水的清除效果呈上升趋势;氧化还原电位为 1 180 mV 和 1 140 mV 的酸性氧化电解水清除生物被膜的效果比 930 mV 和 860 mV 的提高一个数量级。这主要是由于高氧化还原电位的酸性氧化电解水会破坏细胞壁,其氧化作用也会使细胞迅速失去电子,干扰膜平衡,使微生物的细胞膜电位发生改变,导致细胞通透性增强、细菌肿胀及细胞代谢酶的破坏,胞内物质溢出、溶解,从而杀灭微生物^[19]。

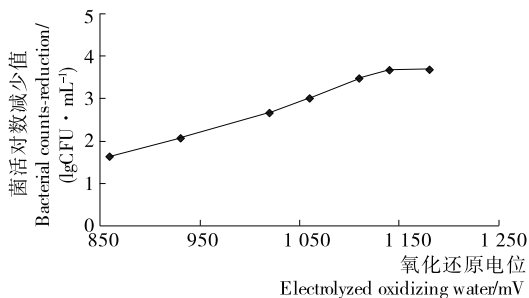


图 9 氧化还原电位对酸性氧化电解水清除生物被膜效果的影响

Figure 9 Effect of oxidation-reduction potential on electrolyzed oxidizing water to remove biofilm efficiency

3 结论

本试验以金黄色葡萄球菌生物被膜为试验对象,探讨酸性氧化电解水对生物被膜的清除效果,并分析其影响因素。研究表明,酸性氧化电解水对金黄色葡萄球菌生物被膜清除效果与保存时间和温度、处理对象中有机干扰剂含量呈负相关性,闭口保存有利于保持酸性氧化电解水的清除能力;经酸性电解水处理后,细菌外部基质被破坏,细胞破裂严重,生物被膜态细菌量减少,清除效果明显;酸性氧化电解水对金黄色葡萄球菌生物被膜的清除能力不是由单一的有效氯、pH 值或氧化还原电位所决定,而是有效氯、pH 值及氧化还原电位三者协同作用的结果,有效氯越高、pH 值越低、氧化还原电位值越高,则酸性氧化电解水清除效果越好,证实了侯梦石等^[20]的试验结果:单独的物理说或化学说并不能有效解释电解水的杀菌机理,酸性氧化电解水的杀菌效果极有可能是多种因素共同影响的结果。

参考文献

[1] Pitts B. A microtiter screening method for biofilm disinfection and removal[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 54(2): 269-276.

[2] Hall-Stoodley L, Costerton J W, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases[J]. Nature Reviews in Microbiology, 2004(2): 95-108.

[3] Cyril J S, Davida S S, Jean K, et al. *Staphylococcus aureus*: From man or animals-an enterotoxin iceberg[C]//Proceeding of an international EU-RAIN conference hosted by the istituto

Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padua, Italy, December 2nd-3rd, Italy; The National Food Center, 2004; 85-102.

[4] Izano E A, Amarante M A, Kher W B, et al. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2008, 74(2): 470-476.

[5] Gibson H, Taylorl J H, Hall K E, et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms [J]. Appl. Microbiol., 1999, 87(1): 41-48.

[6] Tot K, Horemans T, Vander Berghe D, et al. Inhibitory effect of biocides on viable mass and matrix of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. Environ. Microbiol., 2010, 76(10): 3 135-3 142.

[7] Van Der Plas M, Dambrot C, Dambrot C, et al. Combinations of maggot excretions/secretions and antibiotics are effective against *Staphylococcus aureus* biofilms and the bacteria derived therefrom[J]. Antimicrob Chemother, 2010, 65(5): 917-923.

[8] 宗绪岩, 李丽, 罗惠波, 等. 啤酒糟蛋白水解物对金黄色葡萄球菌抑菌能力研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 108-111.

[9] Harrison J J, Turner R J, Jooda, et al. Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(8): 2 870-2 881.

[10] Park C M, Hung Y C, Chun G D. Effects of chlorine and pH on efficacy of electrolyzed water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 91(1): 13-18.

[11] Huang Yu-ru, Hung Yen-con, Hsu Shun-yao, et al. Application of electrolyzed water in the food industry[J]. Food Control, 2008, 19(4): 329-345.

[12] 贾兴真, 银燕, 张聿为. 一种酸性氧化电位水理化性能及杀菌效果研究[J]. 中国消毒学杂志, 2015, 32(5): 440-442.

[13] 卫生部卫生法制与监督司. 消毒技术规范[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2008.

[14] Heilmann C, Gerke C, Perdreau-Remington F, et al. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation[J]. Immun, 1996, 64(1): 277-282.

[15] 李燕杰, 朱小花, 阴冠秀, 等. 不同方法观察单增李斯特菌生物被膜的比较研究[J]. 食品工业科技, 2010(10): 241-246.

[16] 牛晓雯, 常晓玲. 漂液中有效氯含量检测方法的改进[J]. 黑龙江造纸, 2007(1): 58-60.

[17] Kim C, Hung Y C, Brachett R E. Roles of oxidation-reduction potential in electrolyzed oxidizing and chemically modified water for inactivation of food-related pathogens[J]. Journal of Food Protection, 2000, 63(1): 19-24.

[18] 任占冬, 朱玉婵, 刘晔, 等. 肉糜的电位水杀菌工艺与机理[J]. 农业机械学报, 2009(12): 139-143.

[19] Liao Long B, Chen Wei M, Xiao Xian M. The generation and inactivation mechanism of oxidation reduction potential of electrolyzed oxidizing water [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78(4): 1 326-1 332.

[20] 侯梦石, 曹薇, 赵淑梅, 等. 电解水对叶菜杀菌效果的研究[J]. 北方园艺, 2010(24): 46-47.