

CTP-3 和微波处理对食用菌栽培基质三种常见杂菌的灭菌效果研究

胡志辉, 张繁荣, 周世力, 孙齐英, 王 源

(江汉大学 生命科学院, 湖北 武汉 430056)

摘 要:以食用菌栽培基质为试材,采用新型环保消毒剂 CTP-3 和微波方法,研究了 100%、50%、25%、10%、5%、2.5% 6 种 CTP-3 浓度和 30、60、90、120、150、180、210、240、270、300 s 10 个微波作用时间对食用菌常用栽培基质中大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、木霉菌的灭菌效果,并选取其中最难以清除的菌体使用微波和消毒剂共同作用,观察杀菌效果。结果表明:消毒剂作用时,枯草芽孢杆菌在 CTP-3 25% 浓度下还有生长;大肠杆菌和木霉菌在消毒剂浓度为 10% 之后才有生长;而微波作用菌液时,大肠杆菌在微波 240 s 后全部杀完,木霉菌在微波 210 s 后全部杀完,而枯草芽孢杆菌在 270 s 才全部杀灭,所以枯草芽孢杆菌是最难彻底清除的细菌;当消毒剂稀释 10 倍,并微波处理 180 s 共同作用后可以完全杀菌。

关键词:CTP-3 消毒剂;微波;大肠杆菌;枯草芽孢杆菌;木霉菌;食用菌基质

中图分类号:S 436.46 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)08-0135-03

食用菌营养丰富,具有很高的营养价值。鲜蘑菇的蛋白质含量为 8.5%,并且含有人体所需的 8 种氨基酸,其中赖氨酸和亮氨酸的含量尤为丰富。鲜蘑菇所含的葡聚糖具有很高的医学价值,使人健康长寿,舒缓压力,减少过敏及消除体内有害病菌、病毒,从而加速伤口愈合,增强自身免疫;同时还能调节血糖,使机体远离糖尿病,保护机体免受电离辐射等。

防止杂菌污染是食用菌栽培取得成功的关键。因此,在接种食用菌前通常要对培养料进行灭菌处理,其目的就是杀灭培养料中的杂菌。在生产中一般是高温蒸汽灭菌^[1],这种灭菌方法可防止灭菌的不彻底,但对灭菌温度、压力时间要求严格,要在 100℃ 条件下灭菌 10~12 h。高压灭菌是在 121~126℃ 条件下灭菌 1.5~2.0 h,高压灭菌时间不能太长,如果灭菌时间太长可能会破坏培养基营养成分。由于培养基中含有芽孢,需高温灭菌 3 次,耗时耗力、浪费资源。与目前的蒸汽灭菌方法相比,微波灭菌更节能、更快捷、更方便、更容易操作和控制^[2-6]。

消毒剂是深圳某公司新开发的一种绿色环保的新型氧化性消毒剂,其终产物为二氧化碳、水和氧气,对环境没有危害。为此该试验通过对消毒剂的效用检测,研

究微波和消毒剂共同作用对食用菌培养基基质的常见杂菌全部杀灭的最小浓度和时间。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试灭菌对象为食用菌栽培基质(主要成分棉籽壳)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种培养 大肠杆菌培养:牛肉膏蛋白胨培养液,37℃ 接种培养 24~48 h,挑取光滑的砖红色菌落,液体培养基 37℃ 振荡培养 18 h 备用。木霉菌的培养:配置马铃薯葡萄糖培养液,37℃ 培养 100 h,挑取活性菌落接种至马铃薯葡萄糖培养液中,37℃ 振荡培养 6 d 备用。枯草芽孢杆菌的培养:配置 LB 培养液,涂布于 LB 培养平板上,挑取活性菌 37℃ 接种培养 24~48 h,挑取活性菌落接种至 LB 培养液中,37℃ 振荡培养 18 h 备用。

1.2.2 微波灭菌 制备菌体悬浊液:在无菌操作台中,从固体培养基中挑取光滑、圆润的菌落置于经过高压后的缓冲液中制成悬浊液。微波灭菌试验:将细菌悬浊液稀释倍数为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 的菌液各取 1 mL 放置于微波炉中分别处理 0、30、60、90、120、150、180、210、240、270、300 s。消毒时保持处理的火力与重量不变(处理重量为 500 g,不足部分加水补足)。菌种培养:在无菌操作台里取处理完后的菌液 10 μ L 涂布于固体培养基平板上,置于恒温培养箱中培养。大肠杆菌于 37℃ 培养 24 h,木霉菌 27℃ 培养 3 d,枯草芽孢杆菌 36℃ 培养

第一作者简介:胡志辉(1973-),男,本科,高级实验师,现主要从事植物生理生化的教学与科研工作。E-mail:1259769147@qq.com.

基金项目:武汉市科学计划资助项目(201220837304-2)。

收稿日期:2014-01-15

24 h。

1.2.3 CTP-3 消毒细菌试验 制备不同浓度的 CTP-3 溶液:配制浓度分别为 100%、50%、25%、10%、5%、2.5%。制备菌体悬浊液:向挑取的菌落中添加经高压灭菌的缓冲液来稀释,依次做成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 的细菌悬浊液。消毒剂制备:原消毒剂用蒸馏水稀释至 100%、50%、25%、10%、5%、2.5%。消毒液灭菌:取 CTP-3 消毒剂浓度分别为 100%、50%、25%、10%、5%、2.5% 6 种浓度对试管中的菌液分别进行灭菌,每个菌液灭菌 2 次,作用 10 min。

1.2.4 CTP-3 消毒剂和微波共同作用消毒细菌试验 CTP-3 消毒剂灭菌:按照 1.2.3 方法向不同稀释倍数的细菌悬浊液中消毒剂作用 10 min。微波灭菌:均匀放置经 CTP-3 消毒作用后的细菌悬浊液,微波炉大火强度分别作用各试管 0、30、60、90、120、150、180、210、240、270、300 s,消毒时保持处理的火力与重量不变(处理重量为

500 g,不足部分放入一个无菌烧杯加水补足)。灭菌完成后放置至 10 min 采用稀释平板计数法计数。以上试验均重复 3 次。

1.3 项目测定

采用平板计数法计算微生物数量。

2 结果与分析

2.1 微波灭菌效果比较

从表 1 可以看出,大肠杆菌在微波灭菌 240 s 后被全部杀灭,而枯草芽孢杆菌在微波灭菌 270 s 后被全部杀灭,木霉菌则在微波灭菌 210 s 后被全部杀灭,说明枯草芽孢杆菌比较难以清除。微波作用时间越长,杀菌率越高,180 s 后杀菌率 $\geq 95\%$,而枯草芽孢杆菌表现为开始灭菌效果好,在经过微波 90 s 后杀菌率明显增加,主要原因是枯草芽孢杆菌存在芽孢,有一定的耐受性的关系所致,在灭菌 210 s 和 240 s 后,仅有 1、2 个菌体残留。

表 1 微波处理对大肠杆菌、木霉菌、枯草芽孢杆菌的灭菌效果

CFU/mL

微波处理	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	木霉菌
对照	$(7.0 \pm 0.44) \times 10^9$	$(4.0 \pm 0.45) \times 10^8$	$(7.5 \pm 0.46) \times 10^7$
30 s	$(6.5 \pm 0.36) \times 10^9$	$(2.9 \pm 0.38) \times 10^8$	$(7.0 \pm 0.45) \times 10^7$
60 s	$(6.0 \pm 0.10) \times 10^9$	$(1.0 \pm 0.50) \times 10^8$	$(6.0 \pm 0.45) \times 10^7$
90 s	$(8.9 \pm 0.30) \times 10^8$	$(3.6 \pm 0.45) \times 10^7$	$(3.3 \pm 0.58) \times 10^7$
120 s	$(1.8 \pm 0.20) \times 10^8$	$(1.9 \pm 0.40) \times 10^7$	$(8.5 \pm 0.50) \times 10^6$
150 s	$(8.6 \pm 0.12) \times 10^7$	$(1.3 \pm 0.58) \times 10^6$	$(4.4 \pm 0.25) \times 10^6$
180 s	$(3.5 \pm 0.31) \times 10^7$	$(5.3 \pm 1.53) \times 10^6$	$(1.7 \pm 0.58) \times 10^6$
210 s	$(2.7 \pm 0.31) \times 10^7$	$(1.5 \pm 0.50) \times 10^6$	0
240 s	0	$(1.0 \pm 0.82) \times 10^6$	0
270 s	0	0	0
300 s	0	0	0

2.2 CTP-3 消毒剂灭菌效果比较

表 2 结果表明,大肠杆菌和木霉菌在 10%CTP-3 灭菌后有菌体生长,而枯草芽孢杆菌在 25%CTP-3 时也可以生长。所以要想单独使用消毒剂对食用菌

种植基质灭菌至多稀释 4 倍。说明该消毒剂作用效果很好,即使稀释 40 倍,2.5%CTP-3 也可以杀灭 90%以上的大肠杆菌,而木霉菌与枯草芽孢杆菌的杀灭效果在 70%以上。

表 2 CTP-3 消毒剂对大肠杆菌、木霉菌、枯草芽孢杆菌的灭菌效果

CFU/mL

CTP-3 处理	大肠杆菌	木霉菌	枯草芽孢杆菌
对照	$(6.3 \pm 0.41) \times 10^9$	$(5.6 \pm 0.37) \times 10^7$	$(3.5 \pm 1.28) \times 10^8$
100%CTP-3	0	0	0
50%CTP-3	0	0	0
25%CTP-3	0	0	$(3.2 \pm 1.53) \times 10^6$
10%CTP-3	$(2.0 \pm 0.5) \times 10^6$	$(1.3 \pm 0.51) \times 10^6$	$(5.4 \pm 0.51) \times 10^6$
5%CTP-3	$(7.0 \pm 0.26) \times 10^6$	$(5 \pm 0.26) \times 10^6$	$(1.3 \pm 0.21) \times 10^7$
2.5%CTP-3	$(3.6 \pm 0.25) \times 10^7$	$(8.5 \pm 0.40) \times 10^6$	$(5.0 \pm 0.40) \times 10^7$

2.3 CTP-3 消毒剂和微波共同作用对枯草芽孢杆菌的灭菌效果

表 3 结果表明,在 25%CTP-3 与微波灭菌 120 s 共同作用后枯草芽孢杆菌消灭完全,当 10%CTP-3 和微波

作用 180 s 后,枯草芽孢杆菌也全部消灭,且更加经济实用。所以选用 10%CTP-3,微波 180 s 作为消灭杂菌的最佳组合。

表 3

CTP-3 与微波共同作用对枯草芽孢杆菌的灭菌效果

CFU/mL

微波灭菌时间/s	25% CTP-3	10% CTP-3	5% CTP-3	2.5% CTP-3
30	$(3.6 \pm 0.55) \times 10^6$	$(4.5 \pm 0.37) \times 10^6$	$(7.2 \pm 0.31) \times 10^6$	$(25 \pm 5.0) \times 10^6$
60	$(2.1 \pm 0.81) \times 10^6$	$(3.7 \pm 0.26) \times 10^6$	$(5.6 \pm 0.15) \times 10^6$	$(13 \pm 2.5) \times 10^6$
90	$(1.5 \pm 0.35) \times 10^6$	$(2.8 \pm 0.70) \times 10^6$	$(4.3 \pm 0.61) \times 10^6$	$(7.3 \pm 1.15) \times 10^6$
120	0	$(1.8 \pm 0.76) \times 10^6$	$(3.6 \pm 1.21) \times 10^6$	$(3.4 \pm 1.44) \times 10^6$
150	0	$(1.0 \pm 0.43) \times 10^6$	$(2.4 \pm 1.69) \times 10^6$	$(2.6 \pm 0.90) \times 10^6$
180	0	0	$(1.3 \pm 0.58) \times 10^6$	$(2.0 \pm 1.73) \times 10^6$
210	0	0	0	$(1.7 \pm 0.58) \times 10^6$
240	0	0	0	0

3 讨论与结论

食用菌培养料消毒灭菌大多数采用加热蒸汽灭菌方法,虽然消毒灭菌效果彻底,但费工、费时、成本高,由于芽孢的存在有时要灭菌 3 次,试验采用消毒剂是深圳某公司新开发的一种绿色环保的新型氧化性消毒剂,它的终产物为二氧化碳、水和氧气,符合绿色农业发展的需要,高效且节约成本。王卫国等^[7]研究表明,用一定功率的微波加热食用菌栽培料袋时,菌袋内物料的增温与加热时间成正比,与物料质量成反比;在 0.15 MPa 微波加热加压维持 15 min 与高压蒸汽维持 1.5 h 的灭菌效果相当;2 种灭菌方法对食用菌料袋栽培金针菇没有明显差别。试验中 CTP-3 确实展现出高效的灭菌效果,即使稀释 40 倍对大肠杆菌还是存在 50% 的杀菌作用,而微波在作用杂菌时,表现出开始杀菌较慢,而后加快的现象,当对枯草芽孢杆菌单独作用时,微波需要到 90 s 以后才有明显作用。

该试验表明,食用菌栽培基质中的杂菌,以芽孢最难以除去,若采用 10 倍稀释的消毒剂、微波作用 180 s 可

以对杂菌完全杀灭,但此消毒剂是否在栽培基质中残留,从而对食用菌生长产生影响要进一步试验得知;特别是能否真正用于食用菌生产还要确定其无毒性、有效性和高产性。而微波作用时,其对培养基的作用是否使得培养基成分改变有待进一步研究。

参考文献

- [1] 蔡爱群. 浅谈影响食用菌固体培养基灭菌的因素[J]. 中国食用菌, 1999, 17(6): 6-7.
- [2] 骆琳, 丁青芝, 张勇. 微波灭菌食品工业中应用研究现状[J]. 江苏调味品副食品, 2008, 25(3): 22-29.
- [3] 徐怀德, 王云阳. 食品杀菌新技术[M]. 北京: 科学文献出版社, 2005: 205-218.
- [4] 葛新锋, 刘存祥. 微波对固体培养物料的灭菌工艺的试验研究[J]. 河南农业大学学报, 2007, 41(3): 322-325.
- [5] 姚开, 武丽荣, 谭敏. 微波加热条件下的细菌死亡特性值研究[J]. 食品科学, 1999(4): 20-23.
- [6] 颜志红. 超声微波连续逆流提取、微波灭菌、真空带式干燥技术设备的特点[J]. 中国制药装备, 2010(3): 18-23.
- [7] 王卫国, 李玉薇, 王芳, 等. 食用菌栽培袋的微波灭菌研究[J]. 食用菌, 2011(2): 60-63.

Disinfection Test on Three Kinds of Bacterium in the Edible Fungi Treated With CTP-3 and Microwave

HU Zhi-hui, ZHANG Fan-rong, ZHOU Shi-li, SUN Qi-ying, WANG Yuan
(College of Life Sciences, Jiangnan University, Wuhan, Hubei 430056)

Abstract: Taking culture material of edible mushroom as material, with new environmental protection disinfectant CTP-3; the disinfection effect of 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2.5% six concentration gradient, and 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 s microwave respectively on most common miscellaneous bacteria (escherichia coli, bacillus subtilis, wood mould) in mushroom growing substrate were studied. One of the most difficult to remove of the bacteria use microwave and disinfectant work together. Then its sterilization effect was observated. The results showed that when disinfection function, bacillus subtilis had growth in 25% diluted disinfectant, escherichia coli and wooden mold had growth in 10% diluted of disinfectant. And when microwave function, escherichia was killed all after 240 s microwave, wooden mold was dead after 210 s microwave, but bacillus subtilis was killed after 270 s microwave, so bacillus subtilis was the most difficult competitor to kill completely; when disinfectant diluted 10% role, and microwave processing 180 s were the best combination to kill all miscellaneous bacteria.

Key words: CTP-3 disinfectants; microwave; escherichia; bacillus subtilis; wooden mold disinfection; substrate of edible fungi