论著

串珠镰刀菌辐照效应的研究

王　昊　计　融　李玉伟　李凤琴　韩春卉　张宏元
(中国疾控中心营养与食品安全所，北京　100021)

摘　要:为研究γ射线在常温下对生理盐水和玉米中不同浓度串珠镰刀菌(*Fusarium momiliforme*)孢子的辐照杀灭效果，用不同剂量的^{60}Coγ射线对生理盐水和玉米中高、低2种浓度串珠镰刀菌孢子进行辐照，采用PDA培养基平板稀释法计数孢子数。γ射线辐照剂量与存活串珠镰刀菌数有明显的剂量—反应关系，生理盐水中高、低浓度串珠镰刀菌孢子试样中D_{10}值为0.57、0.60 kGy，最小杀灭剂量为4.0、3.0 kGy；玉米中高、低浓度串珠镰刀菌孢子试样中D_{10}值为0.66、0.81 kGy，最小杀灭剂量为4.0、3.0 kGy。γ射线对串珠镰刀菌孢子有明显的杀灭作用，4.0 kGy可全部杀灭实验浓度的串珠镰刀菌孢子。

关键词:镰刀菌属；食品辐射；辐射效应

Study on effect of irradiation on Fusarium momiliforme

WANG hao, JI rong, LI Yu-wei, LI Feng-qin, HAN Chun-hui, ZHANG Hong-yuan
(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: To study the killing effect of γ-ray irradiation on different concentrations of *Fusarium momiliforme* spore in physiological saline or corn at room temperature, different doses of ^{60}Coγ-ray were used to irradiate physiological saline and corn with high and low concentration of *Fusarium momiliforme* spore. Spore quantities were measured with PDA substrate slab dilution method. γ-ray irradiation dose had obvious dose-reaction relationship with spore survivals quantities. D_{10} values of the high and low concentration of *Fusarium momiliiforme* spore in physiological saline were 0.57 kGy and 0.60 kGy respectively with the minimum elimination doses being 4.0 kGy and 3.0 kGy respectively. D_{10} values of the high and low concentration of *Fusarium momiliforme* spore in corn were 0.66 kGy and 0.81 kGy respectively with the minimum elimination doses being 4.0 kGy, and 3.0 kGy respectively. γ-ray had evident killing effect on *Fusarium momiliforme* spore. *Fusarium momiliforme* spore in experiment concentrations can be killed completely by γ-ray irradiation at a dose of 4.0 kGy.

Key word: Fusarium; Food Irradiation; Radiation Effects

食品辐照是利用核技术开发出来的一种食品保藏方法。它是利用放射性^{60}Co或^{137}Cs发出的γ射线或利用电子加速器产生的电子束(最大能量10 MeV)或X射线(最大能量5 MeV)在一定的剂量范围内辐射食品，杀灭食品中的害虫，消除食品中病原微生物，或抑制食品(如水果、蔬菜等)的生理生化过程(发芽和成熟)，从而达到食品保藏或保鲜的目的。食品辐照经过几十年的研究已被证明是一种有效的延长食品货架期的方法，具有操作方便、无二次污染、安全可靠、节省能源等优点[1]，已经被许多国家广泛应用于食品加工与储藏。我国政府已经颁布了18种辐照食品的卫生标准，但尚未制定粮食中常见真菌的辐照标准。本文就γ射线对不同介质中不同浓度的串珠镰刀菌孢子的杀灭及抑制作用进行研究。

1　材料与方法

1.1　材料

供试菌株　串珠镰刀菌3.2960号，购自中国科学院微生物研究所。

基金项目:国家"十五"重大科技专项(2001BA804A23-2)
作者简介:王昊　男　硕士生
通讯作者:计融　男　研究员

This work was supported by The Grant from National Science and Technology Program Funds of China. (2001BA804A23-2)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

主要试剂　葡萄糖 - 马铃薯 - 琼脂(PDA)培养基,购自中国药品生物制品检定所。

主要仪器和材料　显微镜(OLYMPUS CH-B145-T),电子分析天平(Mettler PB602-E),塑料接缝机(SF-300),旋涡振荡器(德国 IKA 公司),霉菌培养箱(MJX 智能型),高压灭菌锅(北京将台医疗设备厂)。

辐照源　^{60}Co γ 射线(中国农科院农产品加工所提供)。

1.2　方法

无菌玉米的制备　在每个密实袋中装入玉米 25 g,密封后用^{60}Co 25 kGy 照射,辐照后随机抽取 10 袋玉米进行检测,均无菌落生长,证明玉米经 25 kGy 照射后已经到达无菌程度。

串珠镰刀菌的培养　在 500 ml 的克氏瓶中装入 150 ml PDA 培养基制成斜面,将串珠镰刀菌接种在斜面上,于(28 ±1) ℃,相对湿度 50 %条件下培养 7～10 d 备用。

染菌浓度的选择　据文献报道,我国正常储藏粮食的带菌量一般在 10^2～10^3 CFU/g,而正常粉状饲料带菌量为 10^3～10^5 CFU/g,饲料中霉菌带菌量远远高于粮食[2]。同时参考文献的染菌量,本次实验选用了 2 个浓度范围,高浓度孢子数为 10^5～10^4 CFU/ml或 10^5～10^4 CFU/g,低浓度孢子数为 10^3～10^2 CFU/ml或 10^3～10^2 CFU/g。

串珠镰刀菌生理盐水孢子悬液的制备　用无菌生理盐水洗下克氏瓶中菌苔,用振荡器充分混匀后,配制成串珠镰刀菌高、低 2 个浓度(高浓度为 10^5～10^4 CFU/ml,低浓度为 10^4～10^3 CFU/ml)的孢子悬浮液,分装在 160 mm ×16 mm 的试管中,每支试管装 10 ml。高、低 2 浓度均随机分为 7 组(每组 3 只试管,作平行样)。

染菌玉米试样的制备　用无菌生理盐水洗下克氏瓶中菌苔,用振荡器充分混匀后,配制成串珠镰刀菌高、低 2 个浓度(高浓度为 10^6～10^5 CFU/ml,低浓度为 10^5～10^4 CFU/ml)的孢子悬浮液,然后用 2 ml 一次性注射器在每袋玉米中注入 1 ml 孢子悬浮液,封口后反复揉搓使其充分混匀。高、低 2 浓度均随机分为 7 组(每组 3 袋玉米,作平行样)。

试样辐照

在中国农科院农产品加工所常温下进行γ射线辐照,辐照源为^{60}Co。

D_{10}值的辐照剂量设计　生理盐水孢子悬浮液和染菌玉米 7 个组相对应的辐照剂量分别为 0.00、0.15、0.30、0.45、0.60、0.75、0.90 kGy。

最小杀灭剂量的辐照剂量设计　根据寄生曲霉孢子在生理盐水及玉米中的 D_{10}值,估算出粗略的最小杀灭剂量,在此估算值周围设计 6 个辐照剂量,同时设一个空白对照组,然后再用^{60}Co 进行辐照。

菌落总数的测定　用平皿倾注稀释分离法进行测定[3]。

杀菌率和 D_{10}值的计算

$$杀菌率 = \frac{对照组活菌数 - 每个剂量辐照后存活菌数}{对照组活菌数} \times 100\ \%$$

D_{10}值　求每个剂量辐照后存活菌数的对数值与辐照剂量的回归方程,由数学公式 $\log N = B - kD$ 表示,式中,N 为存活微生物数,D 为使微生物数量从初始浓度降至 N 所需要辐照剂量,D_{10}值为杀灭 90 %微生物所需辐照剂量;根据数学推算,回归系数 k 的倒数值即为 D_{10}值,即 $D_{10} = 1/k$[3]。

2　结果与分析

2.1　生理盐水及玉米中高、低浓度串珠镰刀菌孢子的辐照 D_{10}值

2.1.1　不同辐照剂量对生理盐水中高、低浓度串珠镰刀菌孢子的杀灭效应,见表 1。

表 1　不同辐照剂量对生理盐水中高、低浓度串珠镰刀菌孢子的杀灭效应

高浓度孢子悬浮液(初始浓度 10^6 CFU /ml)				低浓度孢子悬浮液(初始浓度 10^4 CFU/ml)			
D 辐照剂量(kGy)	N 存活菌数(CFU/ml)	杀菌率(%)	$\log N$	D 辐照剂量(kGy)	N 存活菌数(CFU/ml)	杀菌率(%)	$\log N$
0.00	2.4×10^5	0.00	5.38	0.00	3.5×10^3	0.00	3.55
0.15	1.6×10^5	34.66	5.19	0.15	2.4×10^3	31.60	3.38
0.30	8.3×10^4	65.48	4.92	0.30	1.3×10^3	62.88	3.12
0.45	4.7×10^4	80.54	4.67	0.45	6.9×10^2	80.42	2.84
0.60	1.6×10^4	93.51	4.19	0.60	3.5×10^2	90.20	2.54
0.75	1.1×10^4	95.23	4.06	0.75	2.1×10^2	94.06	2.32
0.90	8.4×10^3	96.47	3.93	0.90	1.3×10^2	96.27	2.12
				1.05	1.2×10^2	96.65	2.07

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

由表 1 可见,γ 射线对生理盐水中串珠镰刀菌 3.2960 号菌株的高、低浓度孢子均有明显的杀灭作用,并具有良好的剂量 - 反应关系。

对高浓度串珠镰刀菌 0.45 kGy 的辐照剂量即可杀死 80.54 %的孢子,0.6 kGy 的剂量可杀死 93.51 %。做存活菌数(对数)与辐照剂量关系的曲线(见图 1):$\log N = 5.41 - 1.75D$ ($R^2 = 0.977$, $n = 7$)。由此得出在生理盐水这种介质中,该浓度串珠镰刀菌 D_{10} 值约为 0.57 kGy,推算出该浓度串珠镰刀菌的理论杀灭剂量为 3.09 kGy。

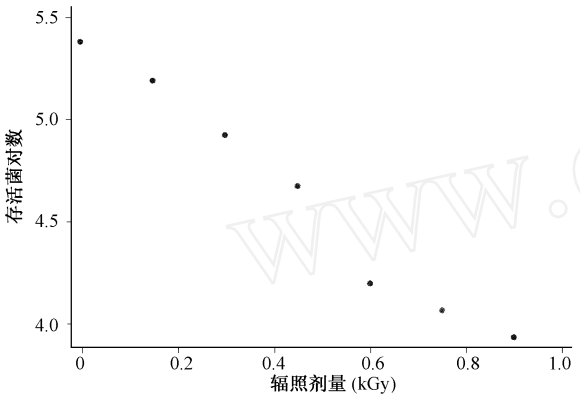

图 1 γ 射线与生理盐水中高浓度串珠镰刀菌孢子的剂量效应曲线

对低浓度串珠镰刀菌 0.45 kGy 的辐照剂量即可杀死 80.42 %的孢子,0.6 kGy 的剂量可杀死 90.19 %。做存活菌数(对数)与剂量关系的曲线(见图 2):$\log N = 4.66 - 1.53D$ ($R^2 = 0.987$, $n = 8$)。由此得出在生理盐水这种介质中,该浓度串珠镰刀菌 D_{10} 值约为 0.66 kGy,推算出该浓度串珠镰刀菌的理论杀灭剂量为 3.05 kGy。

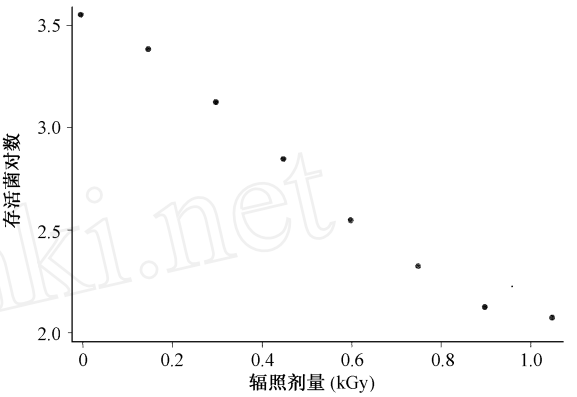

图 2 γ 射线与生理盐水中低浓度串珠镰刀菌孢子的剂量效应曲线

2.1.2 不同辐照剂量对玉米中高、低浓度串珠镰刀菌孢子的杀灭效应,见表 2。

表 2 不同辐照剂量对玉米中高、低浓度串珠镰刀菌孢子的杀灭效应

玉米中高浓度孢子(初始浓度 10^6 CFU/g)				玉米中低浓度孢子(初始浓度 10^4 CFU/g)			
辐照剂量 (kGy)	存活菌数 (CFU/ml)	杀菌率 (%)	$\log N$	辐照剂量 (kGy)	存活菌数 (CFU/ml)	杀菌率 (%)	$\log N$
0.00	4.7×10^4	0.00	4.70	0.00	1.1×10^3	0.00	3.67
0.15	3.3×10^4	29.60	4.52	0.15	2.7×10^3	43.11	3.43
0.30	1.3×10^4	71.89	4.12	0.30	1.5×10^3	68.87	3.17
0.45	9.4×10^3	79.79	3.97	0.45	1.3×10^3	72.97	3.11
0.60	5.0×10^3	89.39	3.69	0.60	8.8×10^2	81.34	2.94
0.75	3.1×10^3	93.46	3.50	0.75	5.2×10^2	89.10	2.71
0.90	2.3×10^3	95.07	3.36	0.90	3.1×10^2	93.46	2.49

由表 2 可见,γ 射线对玉米中串珠镰刀菌 3.2960 号菌株的高、低浓度孢子均有明显的杀灭作用,并具有良好的剂量 - 反应关系。

对高浓度串珠镰刀菌 0.6 kGy 的辐照剂量即可杀死 89.39 %的孢子,0.75 kGy 的剂量可杀死 93.46 %。做存活菌数(对数)与剂量关系的曲线(见图 3):$\log N = 4.66 - 1.53D$ ($R^2 = 0.987$, $n = 7$)。由此得出在玉米这种介质中,该浓度串珠镰刀菌 D_{10} 值约为 0.66 kGy,推算出该浓度串珠镰刀菌的理论杀灭剂量为 3.05 kGy。

对低浓度串珠镰刀菌 0.75 kGy 的辐照剂量即可杀死孢子 89.10 %的孢子,0.9 kGy 的剂量可杀死 93.46 %。做存活菌数(对数)与剂量关系的曲线(见图 4):$\log N = 3.63 - 1.24D$ ($R^2 = 0.984$, $n = 7$)。由此得出在玉米这种介质中该浓度串珠镰刀菌 D_{10} 值约为 0.81 kGy,推算出该浓度串珠镰刀菌的理论杀灭剂量为 2.93 kGy。

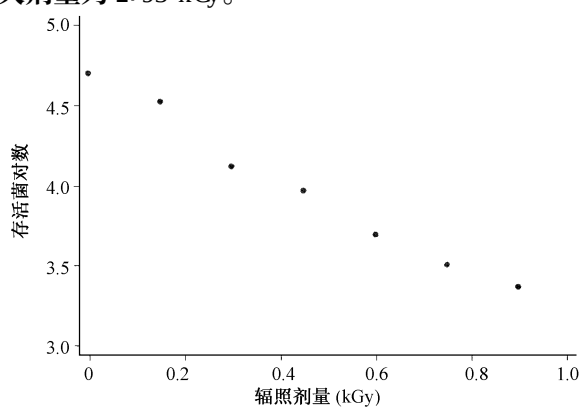

图 3 γ 射线与玉米中串珠镰刀菌高浓度孢子的剂量效应曲线

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

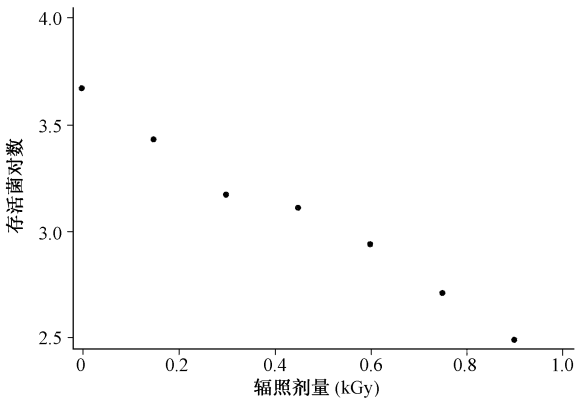

图 4　γ射线与玉米中串珠镰刀菌低浓度孢子的剂量效应曲线

2.2　生理盐水及玉米中高、低浓度串珠镰刀菌孢子的辐照最小杀灭剂量,见表 3。

由表 3 可知,生理盐水中高、低浓度串珠镰刀菌孢子悬浮液的最小杀灭剂量为 4、3 kGy,玉米中高、低浓度串珠镰刀菌孢子的最小杀灭剂量为 4、3 kGy。

综合上述实验结果可见,γ射线对串珠镰刀菌 3.2960 号菌株的孢子有明显的致死作用,且辐照剂量与存活菌数的剂量 - 反应关系明显。在实验设计的孢子浓度下,生理盐水中的 D_{10} 值为 0.57～0.60 kGy,在玉米中的 D_{10} 值为 0.66～0.81 kGy。2.5 kGy 可杀灭绝大部分实验浓度的串珠镰刀菌孢子,4.0 kGy 即可全部杀灭实验浓度的孢子。

表 3　生理盐水及玉米中高、低浓度串珠镰刀菌孢子的辐照杀灭效果

辐照剂量 (kGy)	生理盐水中高浓度孢子		生理盐水中低浓度孢子		玉米中高浓度孢子		玉米中低浓度孢子	
	存活菌数 (CFU/g)	杀菌率 (%)	存活菌数 (CFU/g)	杀菌率 (%)	存活菌数 (CFU/g)	杀菌率 (%)	存活菌数 (CFU/g)	杀菌率 (%)
0.0	3.34×10^5	0.00	5.30×10^3	0.00	3.07×10^4	0.00	4.12×10^3	0.00
0.5	—	—	—	—	—	—	—	—
1.0	—	—	1.14×10^2	97.84	—	—	2.01×10^2	95.10
1.5	—	—	18.50	99.65	—	—	38.33	99.07
2.0	1.40×10^2	99.96	1.67	99.97	31.67	99.90	11.67	99.72
2.5	18.67	99.99	0.50	99.99	8.33	99.97	3.33	99.92
3.0	6.67	99.99	0.00	100.00	6.67	99.98	0.00	100.00
3.5	1.17	100.00	—	—	3.33	99.99	—	—
4.0	0.00	100.00	—	—	0.00	100.00	—	—

注:“—”为未做

3　讨论

由本研究结果可以发现,γ射线对该串珠镰刀菌有明显的抑制和杀灭作用。大多数霉菌的存活曲线都呈指数型,由图 1～图 4 可见,串珠镰刀菌的存活曲线也呈指数型,据靶学说原理,当存活曲线呈指数型时,表示微生物的“靶”只需要被击中 1 次,细胞即死亡[4]。当孢子浓度低时,射线击中“靶”的几率较低,孢子浓度高时,射线击中“靶”的几率较高,因此可能导致高浓度孢子的辐照 D_{10} 值偏低,这也与实验结果相符合。生理盐水中串珠镰刀菌孢子的辐照 D_{10} 值低于玉米中串珠镰刀菌孢子的辐照 D_{10} 值,可能因为射线在不同介质中的穿透力不同,导致其杀灭效应的差别。研究报道 3 kGy 的辐照剂量就能抑制大部分曲霉属孢子的生长,3.5 kGy 能抑制谷物中特定的曲霉属孢子的生长。美国农业部已经批准玉米的 ^{60}Co 辐照灭菌剂量为 2 kGy[5]。此次实验结果显示,串珠镰刀菌孢子的辐照 D_{10} 值在 0.57～0.81 kGy 之间,4 kGy 剂量的γ射线能杀灭 10^4 及 10^5 CFU/ml 浓度的串珠镰刀菌孢子。目前,我国还没有制定出粮食的常见霉菌的辐照灭菌剂量标准,尽快制定粮食辐照灭菌规范,充分利用食品辐照保藏的优点,将会产生很大的经济效益。

参考文献

[1] 吴永宁,主编. 现代食品安全科学[M]. 北京:化学工业出版社, 2003.

[2] 殷蔚申,张耀东,吴小荣. 我国饲料中的霉菌和霉菌毒素[J]. 中国粮油学报,1992,7(2):32-37.

[3] 中华人民共和国国家标准,食品卫生检验方法 - 微生物学部分[S].

[4] 徐冠仁,主编. 核农学导论[M]. 北京:原子能出版社,1995,251.

[5] Applegate KL, Chipley J R. Production of ochratoxin A by Aspergillus ochraceus NRRL - 3174 before and after exposures to ^{60}Co irradiation[J]. Appl Environ Microbiol, 1976,31(3):349-353.

[收稿日期:2005 - 06 - 26]

中图分类号:R15;Q949.32　　文献标识码:A　　文章编号:1004 - 8456(2005)05 - 0390 - 04

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net