

张娇娇, 吴海虹, 孙晋跃, 等. 超声波联合乳酸对金黄色葡萄球菌的杀菌效果[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(6): 1686-1693.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2022.06.027

## 超声波联合乳酸对金黄色葡萄球菌的杀菌效果

张娇娇<sup>1</sup>, 吴海虹<sup>2</sup>, 孙晋跃<sup>2</sup>, 孙远成<sup>3</sup>, 孙芝兰<sup>2</sup>, 刘芳<sup>1,2</sup>, 徐为民<sup>2</sup>

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014; 3. 徐州荣炫食品有限公司, 江苏 徐州 221000)

**摘要:** 研究超声波(US, 400 W, 50 kHz)、乳酸(LA, 质量分数为 0.5%, 1.0%)和超声波联合乳酸处理(US+0.5% LA, US+1.0% LA)对游离和生物膜状态下的金黄色葡萄球菌的抗菌和抗生物膜机制, 并且选用 US+0.5% LA 对羊肉上的金黄色葡萄球菌进行杀菌处理。结果显示, 超声波联合乳酸处理对金黄色葡萄球菌的杀菌作用明显, 显著降低了生物膜胞外多糖的含量, 破坏了生物膜的胞外基质( $P<0.05$ ); 通过扫描电子显微镜观察发现, 超声波联合乳酸处理使得菌体细胞产生了严重的凹陷; 激光共聚焦电镜和核酸泄露试验结果表明, 超声波联合乳酸处理对菌体的细胞膜造成了严重破坏, 使其通透性显著增加, 进而造成内部核酸大量泄露; US+0.5% LA 处理可以显著地控制羊肉上金黄色葡萄球菌的生长。因此, 超声波联合乳酸处理通过影响菌体细胞膜的完整性、改变细胞膜的通透性, 使生物膜胞外多糖含量降低及内部核酸泄露, 进而发挥杀菌作用。

**关键词:** 超声波; 乳酸; 金黄色葡萄球菌; 羊肉

**中图分类号:** TS251.5<sup>+</sup>3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)06-1686-08

## Bactericidal effect of ultrasound combined with lactic acid against *Staphylococcus aureus*

ZHANG Jiao-jiao<sup>1</sup>, WU Hai-hong<sup>2</sup>, SUN Jin-yue<sup>2</sup>, SUN Yuan-cheng<sup>3</sup>, SUN Zhi-lan<sup>2</sup>, LIU Fang<sup>1,2</sup>, XU Wei-min<sup>2</sup>

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. Xuzhou Rongzhao Food Co., Ltd., Xuzhou 221000, China)

**Abstract:** The antibacterial and anti-biofilm mechanism of ultrasound treatment (US, 400 W, 50 kHz), lactic acid treatment (LA, the mass fractions were 0.5% and 1.0%) and ultrasound combined with lactic acid treatment (US+0.5% LA, US+1.0% LA) against planktonic and biofilm cell-type *Staphylococcus aureus* were studied. In addition, treatment of US+0.5% LA was used to sterilize the *S. aureus* on mutton. The results showed that, US+LA treatment had obvious synergistic bactericidal effect on *S. aureus* cells and decreased the content of exopolysaccharides (EPS) in the biofilm significantly ( $P<0.05$ ), while destroyed the extracellular matrix of biofilm. It was discovered by scanning electron microscope that, US+LA treatment caused severe sunken of the bacterial cells. Results of laser confocal electron microscopy and nucleic acid leakage showed that, US+LA treatment caused severe damage to the cell membrane of the bacteria, which increased the permeability of their cell membranes significantly and caused massive leakage of internal nucleic acids. In addition, US+0.5% LA treatment could control the growth of *S. aureus* on mutton significantly. Therefore, US+LA treatment plays a synergistic bactericidal role through affecting the integrity of the bacterial cell membranes, changing the

收稿日期: 2022-03-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31871866); 江苏省政策引导类计划(苏北科技专项)(XZ-SZ202012); 江苏省普通高校毕业生科研创新计划项目(SJCX20\_1428)

作者简介: 张娇娇(1997-), 女, 安徽灵璧人, 硕士研究生, 研究方向为畜禽产品加工与质量控制。(E-mail) 1656040130@qq.com

通讯作者: 刘芳, (E-mail) fangliu82@163.com

age showed that, US+LA treatment caused severe damage to the cell membrane of the bacteria, which increased the permeability of their cell membranes significantly and caused massive leakage of internal nucleic acids. In addition, US+0.5% LA treatment could control the growth of *S. aureus* on mutton significantly. Therefore, US+LA treatment plays a synergistic bactericidal role through affecting the integrity of the bacterial cell membranes, changing the

permeability of cell membranes, decreasing EPS content in the biofilm and causing the leakage of inner nucleic acid.

**Key words:** ultrasound; lactic acid; *Staphylococcus aureus*; mutton

羊肉营养物质丰富,与猪肉相比脂肪含量和胆固醇含量都偏低,肉质软嫩可口,深受消费者的青睐<sup>[1-2]</sup>。但在羊肉加工、储藏、运输过程中,由于羊肉中维生素、矿物质以及蛋白质含量比较高,因此很容易受到一些食源性致病菌的污染<sup>[3-4]</sup>。金黄色葡萄球菌可以引起人类和动物的下呼吸道和手术部位感染,引发败血症和肺炎<sup>[5-6]</sup>。此外,金黄色葡萄球菌还具有较强的生物膜形成能力<sup>[7-8]</sup>。一旦生物膜形成,由于蛋白质、多糖和磷脂等大分子的存在,增加了不同抑菌手段对其进行有效抑制的难度<sup>[9]</sup>。因此,研究对金黄色葡萄球菌生物膜的高效抑菌方法以控制羊肉中金黄色葡萄球菌的生长就显得尤为重要。

有机酸被认定为一类安全、有效的抗菌剂<sup>[10]</sup>。乳酸作为三大有机酸中的一种,在抑制食品中微生物生长方面具有明显的作用。Anang 等<sup>[11]</sup>报道了乳酸在延长鸡胸肉货架期方面具有明显的作用,它可以有效控制鸡胸肉中假单胞菌的菌群数量。Youssef 等<sup>[12]</sup>报道了 5% 的乳酸可以使牛肉中大肠杆菌菌落数量减少 4lg(CFU/g) 以上。Li 等<sup>[13]</sup>报道了 2% 的乳酸可以有效地减少鸡蛋壳上面肠炎沙门氏菌的数量。作为一种环保的非热杀菌方法,超声波得到了广泛的应用。但有研究表明,虽然超声波可很大限度地保留食品性质,但单独使用时抑菌效果不是特别明显<sup>[14]</sup>。因此,通常需要跟其他抑菌方法一起协同作用。毕秀芳等<sup>[15]</sup>报道了超声波联合乳酸链球菌素处理可以有效控制胡萝卜汁中菌群数量。盖作启<sup>[16]</sup>报道了超声波联合热处理可以有效控制牛奶中的微生物数量,且不会对牛奶品质产生任何不利的影响。Cichoski 等<sup>[17]</sup>的研究结果表明,超声波联合酸性电解水处理鸡胸肉,可有效地减少鸡胸肉中嗜冷细菌、乳杆菌和中温菌的数量,且不会损坏鸡胸肉的感官品质。Yu 等<sup>[18]</sup>报道了超声波联合二氧化氯处理可以协同有效地控制金黄色葡萄球菌生物膜的生长。然而,关于超声波联合乳酸处理的协同抗菌和抗生物膜机制以及超声波联合乳酸处理对羊肉中金黄色葡萄球菌菌落数控制的研究还未见报道。

因此,本研究以金黄色葡萄球菌为指示菌,分别研究超声波、乳酸以及超声波+乳酸对金黄色葡萄

球菌游离和生物膜细胞菌落数的杀菌效果,并且对超声波+乳酸联合处理的协同抗菌和抗生物膜机制进行研究,以期降低乳酸的使用浓度。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

指示菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),为本实验室保存的菌种。脑心浸液肉汤(BHI)液体、BHI 固体培养基,产自青岛海博生物科技有限公司。氯化钠,产自国药集团化学试剂有限公司。乳酸,产自南京寿德实验器材有限公司。Nunc™ Lab-Tek™ 8 孔腔室盖玻片系统,产自赛默飞世尔科技公司。24 孔聚氯乙稀培养板,产自美国康宁公司。羊肉,购自南京盒马网络科技有限公司。

BHC-1300IIA/B3 型生物洁净安全柜,产自苏州净化设备有限公司。PE(Ultra View VOX)转盘式激光共聚焦显微镜,产自美国珀金埃尔默股份有限公司。EVO-LS10 扫描电子显微镜,产自德国卡尔蔡司股份公司。KQ-800KD 超声波清洗机,产自中国昆山超声波仪器有限公司。酶标仪,产自美国 BioTek Instruments 有限公司。Centrifuge 5810 R 离心机,产自德国 Eppendorf 公司。THZ-C 台式恒温振荡器,产自太仓市华美生化仪器厂。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 菌株的培养** 将金黄色葡萄球菌菌液从 -80 ℃ 保存条件中取出,在 BHI 培养基中 37 ℃ 培养至对数期,然后重复此步骤,继续按照 1% 的接种量接种于 BHI 培养基中培养 12 h,所得菌液用于后续操作<sup>[19]</sup>。

**1.2.2 超声波、乳酸、超声波联合乳酸处理对金黄色葡萄球菌游离和生物膜细胞的杀菌作用** 将对数期的金黄色葡萄球菌菌液离心(5 000 g, 10 min, 4 ℃)后,去除上层培养基,将沉淀用 0.85% 生理盐水洗涤 3 次<sup>[20]</sup>。超声波(400 W, 50 kHz)单独处理(US)时,向沉淀中加入等体积的 0.85% 生理盐水并充分混匀,置于超声波清洗机中。乳酸(LA)单独处理(质量分数为 0.5%、1.0%)时,向沉淀中分别加入等体积的浓度为 0.5% 或 1.0% 的乳酸并充分混匀,在室温条件下进行杀菌处理。二者联合处理

(US+0.5% LA、US+1% LA) 时,向菌泥中加入等体积的 0.85% 生理盐水并充分混匀,然后置于超声波清洗机(400 W, 50 kHz) 中。此外,在室温条件下分别放置菌悬液作为对照组。所有处理均在 5 min、10 min、20 min、30 min、60 min 时取样、计数。迅速吸取 1 ml 的菌液与 9 ml 0.1 mol/L 的磷酸缓冲盐溶液(PBS) 调节 pH。将菌液稀释进行平板计数,培养条件为 37 °C 静置 24 h<sup>[21]</sup>。

根据 Liu 等<sup>[21]</sup> 的方法,将菌液进行培养并活化,之后定量加到 Nunc™ 24 孔聚氯乙稀培养板中,随后将孔板在 37 °C 静置培养 3 d。培养过程中每隔完整的 1 d 更换 BHI 肉汤培养基,操作时先沿每个孔壁慢慢提取培养基,然后缓慢加入新鲜的培养基以保持细菌活性。培养 3 d 后,缓慢吸除上清液,用 1 ml 0.01 mol/L PBS 冲洗生物膜 3 次以备用。金黄色葡萄球菌生物膜的杀菌方法和菌落计数的方法参考金黄色葡萄球菌游离细胞的杀菌方法<sup>[21]</sup>。

1.2.3 生物膜胞外多糖含量的测定 参照文献[21]、[23] 的方法测定生物膜胞外多糖含量。不同处理后,收集各孔中的生物膜细胞以测定其多糖含量。将对应于一个样品的 3 个孔的生物膜内容物混合并离心,取沉淀用于下一步操作,上清液用于测定可溶性多糖含量。将所得沉淀加入到含有 0.85% NaCl 及 0.22% 甲醛的溶液中,水浴 30 min,温度为 80 °C,在 4 °C 条件下离心 30 min,转速 12 000 r/min。

1.2.4 扫描电子显微镜和激光共聚焦显微镜分析

参考方法 1.2.3,将经过 US、1% CA 和 US+1% CA 处理 30 min 后的金黄色葡萄球菌菌悬液迅速与 0.1 mol/L PBS 混合,离心(6 000 g, 5 min, 4 °C),在 4 °C 用 2.5% 戊二醛固定至少 12 h,用于扫描电子显微镜分析。此外,将离心后所获得的沉淀用 LIVE/DEAD BacLight™ 试剂在室内黑暗条件下进行染色处理 30 min,然后再次离心(6 000 g, 5 min, 4 °C),用 0.85% 生理盐水反复洗涤 3 次,用于激光共聚焦显微镜分析<sup>[22]</sup>。

生物膜的培养方法参考方法 1.2.3,将活化后的菌液定量添加到 8 孔腔室盖玻片中。培养结束后,将生物膜分别用 US、1% LA 和 US+1% LA 处理 30 min,然后移除上层溶液,将生物膜在超净工作台中自然风干。将风干后的生物膜按照网格线裁开,然后将样品在 4 °C 下放置 12 h,使其自然干燥,之后用

1% 四氧化锇固定 2 h,再用 2.5% 戊二醛固定至少 12 h,用扫描电子显微镜拍摄金黄色葡萄球菌生物膜细胞。将风干后的生物膜用 LIVE/DEAD BacLight™ 试剂在室温以及黑暗条件下进行染色处理 30 min,然后用 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,将生物膜再次风干,并去除隔板<sup>[21-22]</sup>,用激光共聚焦显微镜拍摄金黄色葡萄球菌生物膜细胞。

1.2.5 核酸物质泄露的测定 参考方法 1.2.3 培养金黄色葡萄球菌游离和生物膜细胞。将经 US、0.5% LA、1.0% LA、US+0.5% LA 和 US+1.0% LA 不同处理 30 min 后的菌体离心(4 °C, 3 000 g, 10 min),取上清液测定其  $OD_{260}$  值<sup>[24]</sup>。

1.2.6 超声波联合乳酸处理对羊肉中金黄色葡萄球菌的灭活作用及对羊肉 pH 的影响

1.2.6.1 羊肉的处理 将从超市买来的羊肉用无菌刀切成正方体形状,每份 10 g。首先测定羊肉中原有的菌群数量,约为 4 lg(CFU/g)。然后将羊肉浸泡在含量为 7 lg(CFU/g) 的金黄色葡萄球菌菌液中 2 h,最终测得羊肉上的金黄色葡萄球菌菌群数量约为 6.11 lg(CFU/g)。将羊肉用 US+0.5% LA 分别处理 5 min、10 min、20 min、30 min、60 min。

1.2.6.2 微生物计数 按照国家标准进行菌落总数<sup>[25]</sup> 以及金黄色葡萄球菌菌数<sup>[26]</sup> 的测定。将 10 g 肉放入均质袋中,在无菌条件下加入 90 ml 0.01 mol/L PBS,并放入 4 °C 摇床振荡 1 h。用 0.85% 生理盐水进行 10 倍连续稀释<sup>[27-28]</sup>,然后参照方法 1.2.3 进行微生物计数。

1.2.7 数据统计与分析 所有试验数据均为 3 次独立试验的平均值,表示为“平均值±标准差”。使用 SPSS 软件通过方差分析(ANOVA) 进行统计分析。使用 Origin 9.5 软件进行图形绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 超声波、乳酸以及二者联合处理对金黄色葡萄球菌游离和生物膜细胞的杀菌效果

图 1 显示了超声波、乳酸以及二者联合处理对金黄色葡萄球菌不同菌体状态的杀菌效果。对照组中菌落数约为 9 lg(CFU/g),US 单独处理 30 min 时,分别仅使金黄色葡萄球菌游离和生物膜细胞菌落数降低了 0.31 lg(CFU/g) 和 0.22 lg(CFU/g),这与 Li 等<sup>[29]</sup> 的研究结果一致。400 W 的 US 处理 15 min,仅仅使得金黄色葡萄球菌游离细胞的菌落数降低了



0.31lg(CFU/g)。0.5% LA 和 1.0% LA 的乳酸处理 30 min, 金黄色葡萄球菌游离细胞的菌落数分别降低了 1.82lg(CFU/g) 和 2.64lg(CFU/g), 金黄色葡萄球菌生物膜细胞的菌落数分别降低了 1.02lg(CFU/g) 和 2.01lg(CFU/g)。Wang 等<sup>[30]</sup>报道了 0.5% LA 可以完全有效地抑制肠沙门氏菌、大肠杆菌和单核增生性李斯特菌的生长。Omori 等<sup>[31]</sup>报道了 0.5% LA 和 1.0% LA 可以有效地降低单核增生性李斯特菌的菌落数量。

超声波与乳酸联合处理(US+LA)对菌体的抑菌作用明显增强。US+0.5% LA 和 US+1.0% LA 处理 30 min 时, 金黄色葡萄球菌游离细胞的菌落数分别降低了 2.73lg(CFU/g) 和 3.51lg(CFU/g), 金黄色葡萄

球菌生物膜细胞的菌落数分别降低了 1.96lg(CFU/g) 和 3.39lg(CFU/g)。当用 US+LA 处理时, US 通过自身的空化作用使菌体的细胞膜通透性增加, LA 可以通过破损的细胞膜进入菌体细胞发挥抑菌作用, 造成菌体细胞内的物质泄露, 从而导致菌体细胞死亡。因此, 二者联合处理具有明显的协同杀菌效果<sup>[14,18]</sup>。综上, US+0.5% LA 的杀菌效果和 1.0% LA 单独处理的杀菌效果相似。许愈等<sup>[32]</sup>的研究结果表明, 超声波与酸性电解水联合处理可以有效地减少副溶血性弧菌的菌落数量。He 等<sup>[33]</sup>报道了超声波与百里香精油纳米乳液联合处理可以提高对金黄色葡萄球菌的杀菌效果。

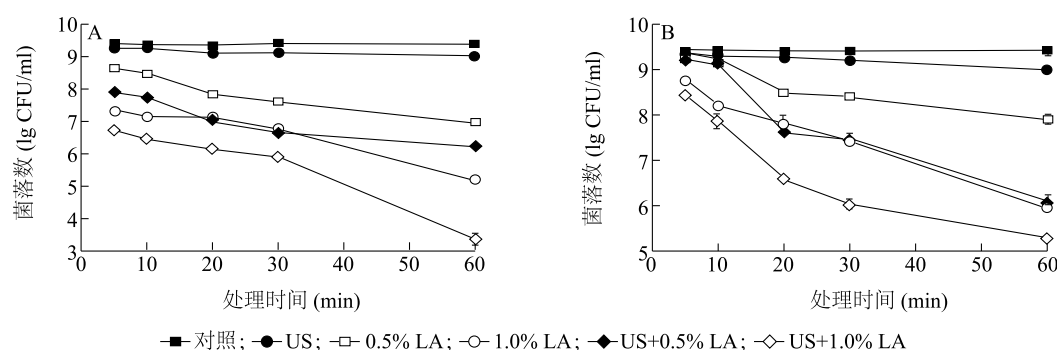


图1 超声波(US)、乳酸(LA)和US+LA处理对金黄色葡萄球菌游离(A)和生物膜(B)细胞的杀菌效果

Fig.1 Bactericidal effect of ultrasound (US), lactic acid (LA) and US +LA treatments on planktonic cells (A) and biofilm cells (B) of *Staphylococcus aureus*

## 2.2 生物膜胞外多糖含量的测定结果

由图2可见,与对照组相比,US、0.5% LA、US+0.5% LA 处理使金黄色葡萄球菌生物膜中可溶性多糖含量分别降低 16.20%、25.99% 和 34.43%, 使不可溶性多糖含量分别降低 16.30%、25.91% 和 40.33%, 这表明与单独处理相比,超声波与乳酸联合处理可以使生物膜中所含的可溶性多糖与不可溶性多糖含量呈现显著下降的变化趋势。胞外多糖含量在生物膜胞外基质中占比最高,可使生物膜中的细胞黏附在一起,从而增强生物膜细胞对外界不良因素的干扰<sup>[34]</sup>。由于US破坏了生物膜的结构,导致黏附在一起的生物膜细胞出现孔隙,因此LA可以更好地通过生物膜的外层基质,进而提高对致病菌的杀灭作用<sup>[22]</sup>。US+0.5% LA 处理后金黄色葡萄球菌生物膜中多糖含量与 1.0% LA 处理后的多糖含量无显著性差异,这进一步表明联合处理

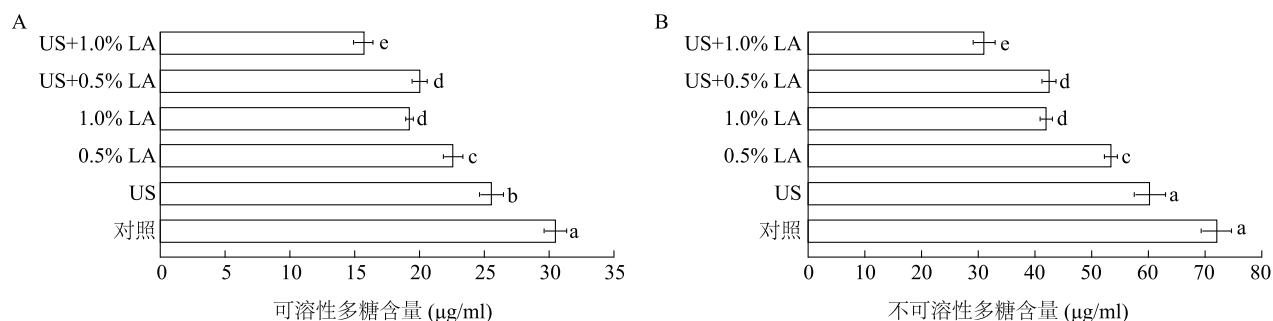
可以降低LA的使用浓度。

## 2.3 扫描电子显微镜和激光共聚焦显微镜分析结果

空白对照组的金黄色葡萄球菌游离细胞呈饱满的球状且表面光滑,激光聚焦电镜图片中未见有被染成红色的细胞,这表明所有细菌的细胞膜保持完整的状态,且通透性未发生改变(图3A1、图3B1)。US处理30 min后,菌体表面出现褶皱,少部分细胞被染成红色(图3A2、图3B2)。1.0% LA 处理30 min后,菌体表面开始出现凹陷,但大部分菌体依然保持完整的形态,被染成红色的细胞数量与US单独处理相比显著增加,这与微生物计数的结果相一致,LA单独处理的杀菌效果要比US单独处理好(图3A3、图3B3)。图3A4、图3B4结果表明,US+1.0% LA 可以对金黄色葡萄球菌游离细胞产生严重的损伤,大量细胞变得干瘪,被染成红色的细胞的比例与单独处理相比显著增加。

对照组的金黄色葡萄球菌生物膜细胞排列较紧密,生物膜厚度较大,且菌体结构完整,未受到破坏(图 4A1、图 4B1)。US 处理 30 min 后,有少数细胞呈现红色荧光,表明此时有少数细胞受到伤害(图 4A2、图 4B2)。与 US 单独处理相比,LA 处理下呈现红色荧光的细胞数量明显增加,密集的生物膜逐渐被瓦解,菌体状态明显变化,褶皱增加(图 4A3、图

4B3)。图 4A4、图 4B4 结果表明 US+1.0% LA 处理的生物膜细胞外部基质损害严重,生物膜开始变得疏松,大量菌体细胞表面变得凹陷。这与迟媛等<sup>[14]</sup>的研究结果一致,超声波协同次氯酸钠处理会加速菌体的死亡速度。许愈等<sup>[32]</sup>报道,超声波可损伤菌体的细胞壁,因此酸性电解水会更好地渗入细胞,从而使得菌体细胞遭到严重的破坏。



不同处理对应柱上标有不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 2 超声波 (US)、乳酸 (LA) 和 US+LA 处理后金黄色葡萄球菌生物膜的可溶性多糖 (A) 与不可溶性多糖 (B) 含量

Fig.2 Soluble (A) and insoluble (B) polysaccharide contents in *Staphylococcus aureus* biofilm cells after treated by ultrasound (US), lactic acid (LA) and US+LA

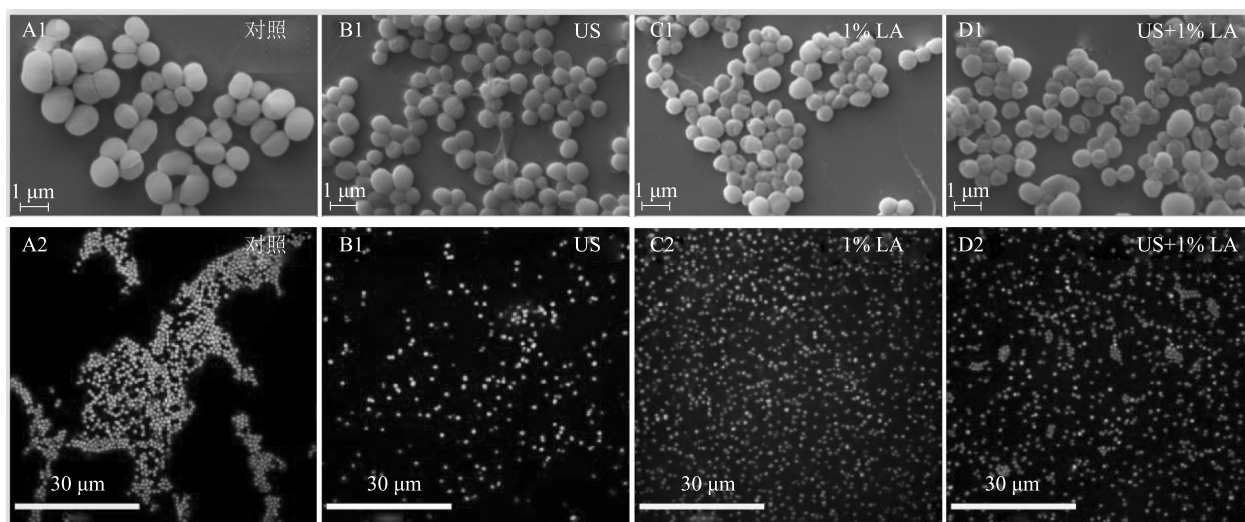


图 3 超声波 (US)、乳酸 (LA) 和 US+LA 处理后金黄色葡萄球菌游离细胞的扫描电子显微镜与激光共聚焦电镜结果

Fig.3 Scanning electron microscopy and laser confocal electron microscopy images of *Staphylococcus aureus* planktonic cells after treated by ultrasound (US), lactic acid (LA) and US+LA

## 2.4 核酸物质泄露的测定结果

核酸物质的泄露量可以进一步反映菌体细胞膜的完整性和流动性变化。由图 5 可见,US 单独处理后核酸的泄露并不明显,而 LA 单独处理使得核酸的泄露量明显增加,这与扫描电子显微镜 (SEM) 与激光共聚焦电子显微镜 (CLSM) 的结果相一致,LA

可以对菌体的细胞膜造成严重损伤,进而增加细胞的损害程度。此外,US+LA 处理后,核酸泄漏量急剧增加,原因为 US+LA 处理破坏了菌体细胞膜的完整性和通透性,造成内部物质大量泄露。许愈等<sup>[32]</sup>研究发现,超声波联合酸性电解水处理对细胞结构产生显著影响,与本研究结果一致。

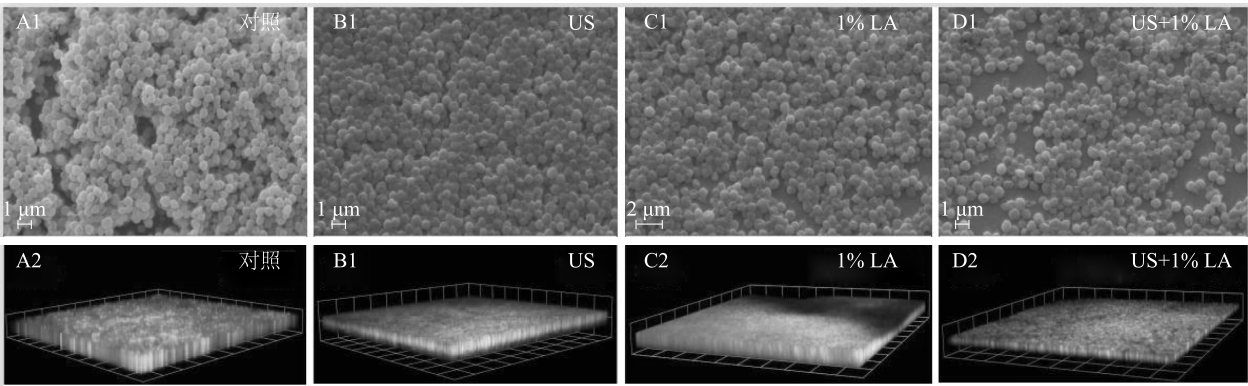
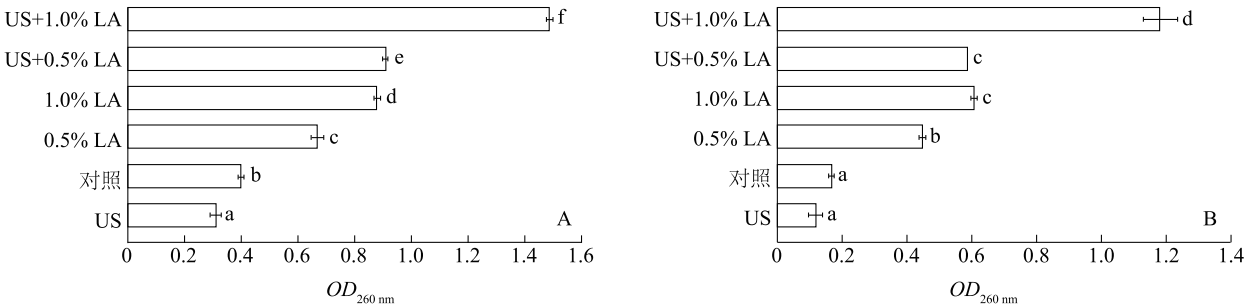


图 4 超声波 (US)、乳酸 (LA) 和 US+LA 处理后金黄色葡萄球菌生物膜扫描电子显微镜与激光共聚焦电镜图  
Fig.4 Scanning electron microscopy and laser confocal electron microscopy images of *Staphylococcus aureus* biofilm cells after treated by ultrasound (US), lactic acid (LA) and US +LA



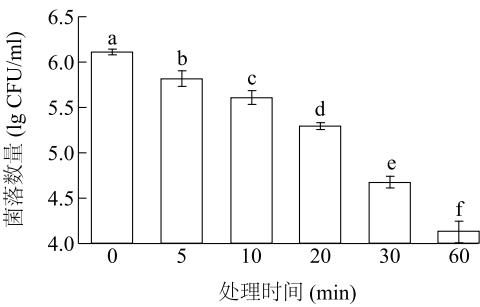
不同处理对应柱上标有不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 5 超声波 (US)、乳酸 (LA) 和 US+LA 处理后金黄色葡萄球菌游离和生物膜细胞的核酸泄露

Fig.5 Release of nucleic acids in *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm cells after treated by ultrasound (US), lactic acid (LA) and US +LA

2.5 超声波联合乳酸处理对羊肉中金黄色葡萄球菌的杀菌效果

由图 6 可见,US+0.5% LA 处理可以显著降低羊肉上金黄色葡萄球菌的菌落数量 ( $P < 0.05$ )。随着处理时间的增加,羊肉上金黄色葡萄球菌的菌落数量逐渐降低。US+0.5% LA 处理 60 min,可使羊肉上金黄色葡萄球菌的菌落数量较处理前降低 1.97lg(CFU/g)。因此 US+LA 处理是一种良好的杀菌方式,它可以显著控制羊肉上金黄色葡萄球菌的菌落数量。毕秀芳等<sup>[15]</sup>报道了超声波联合乳酸链球菌素可有效控制胡萝卜汁中的微生物数量,且不影响胡萝卜汁的品质。Ramezani 等<sup>[35]</sup>报道了乳酸联合壳聚糖以及气调包装可以显著延长鹌鹑肉的货架期。González-Fandos 等<sup>[36]</sup>报道了乳酸和山梨酸钾可以有效地减少鸡肉上单细胞增生性李斯特菌的数量。



不同处理对应柱上标有不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 6 US+0.5% LA 处理对羊肉上金黄色葡萄球菌的杀菌效果

Fig.6 Bactericidal effect of US+0.5% LA treatment on *Staphylococcus aureus* of mutton

3 结论

US+LA 协同处理的杀菌作用显著,二者联合处理时对致病菌的杀菌效果显著强于单独处理时的杀



菌效果。经 US+LA 处理后,金黄色葡萄球菌生物膜细胞多糖含量显著降低,菌体细胞产生严重凹陷,细胞膜通透性增加,核酸泄露量显著增加( $P<0.05$ )。此外,US+0.5%LA 能显著降低羊肉上金黄色葡萄球菌的菌群数量。因此,US+LA 是一种良好的杀菌方式,它可以降低 LA 的使用浓度。

## 参考文献:

- [1] 马惠敏,王振宇,黄彩燕,等. 包装对羊肉冷藏过程中热休克蛋白表达及羊肉品质的影响[J]. 肉类研究, 2021, 35(3): 35-40.
- [2] 薛婉瑞,张海生,赵鑫帅,等. 复合天然保鲜剂对冷却羊肉的保鲜效果[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(5): 240-247.
- [3] 刘 婷,张 瑞,吴建平,等. 牛至精油结合不同包装方式对冷却羊肉保鲜效果的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(4): 139-145.
- [4] 李 鹏. 2018 年酒泉市部分地区市售牛羊肉食源性致病菌污染情况调查与分析[J]. 中国草食动物科学, 2020, 40(5): 59-61.
- [5] COSTA R S, LINS M O, HYARIC M L, et al. In vitro antibacterial effects of *Zanthoxylum tingoassuiba* root bark extracts and two of its alkaloids against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Rev Bras Farmacogn, 2016, 27(2): 195-198.
- [6] 宁亚维,苏 丹,付浴男,等. 抗菌肽 brevilaterin 与  $\epsilon$ -聚赖氨酸对金黄色葡萄球菌的协同抑菌机理[J]. 食品科学, 2020, 41(5): 15-22.
- [7] 戴雨芸,李 超,袁中伟,等. 香芹酚抑制金黄色葡萄球菌生物被膜的形成[J]. 微生物学通报, 2020, 47(3): 813-820.
- [8] SHIVAE A, RAJABI S, FARAHANI H E, et al. Effect of sub-lethal doses of nisin on *Staphylococcus aureus* toxin production and biofilm formation [J]. Toxicon, 2021, 197(4): 1-5.
- [9] BAI M, LI C Z, CUI H Y, et al. Preparation of self-assembling *Litsea cubeba* essential oil/ diphenylalanine peptide micro/nanotubes with enhanced antibacterial properties against *Staphylococcus aureus* biofilm [J]. LWT, 2021, 146(3): 111394.
- [10] GONZALEZ-AANDOS E, MARTINEZ-LAORDEN A, PEREZ-ARNEDO I. Efficacy of combinations of lactic acid and potassium sorbate against *Listeria monocytogenes* in chicken stored under modified atmospheres [J]. Food Microbiol, 2020, 93: 103596.
- [11] ANANG D M, RUSUL G, LING F H, et al. Inhibitory effects of lactic acid and lauricidin on spoilage organisms of chicken breast during storage at chilled temperature [J]. Int J Food Microbiol, 2010, 144(1): 152-159.
- [12] YOUSSEF M K, YANG X, BADONI M, et al. Effects of spray volume, type of surface tissue and inoculum level on the survival of *Escherichia coli* on beef sprayed with 5% lactic acid [J]. Food Control, 2012, 25(2): 717-722.
- [13] LI Z Y, GUO R X, WANG F, et al. Inactivation of *Salmonella enteritidis* on eggshells by lactic acid spray [J]. Food Control, 2019, 104: 201-207.
- [14] 迟 媛,弓 敏,马艳秋,等. 超声波协同次氯酸钠杀灭腐败菌效果与动力学研究[J]. 农业机械学报, 2020, 51(7): 372-381.
- [15] 毕秀芳,陈丽伊,潘泓桦,等. 超声波结合 nisin 对胡萝卜汁的杀菌效果[J]. 中国食品学报, 2018, 18(1): 211-216.
- [16] 盖作启. 热-超声波联合处理对牛奶的杀菌效果及其品质影响的研究[D]. 广州:华南理工大学, 2009.
- [17] CICHOSKI A J, FLORES D, MENEZES C, et al. Ultrasound and slightly acid electrolyzed water application: an efficient combination to reduce the bacterial counts of chicken breast during pre-chilling [J]. Int J Food Microbiol, 2019, 301: 27-33.
- [18] YU H, LIU Y, YANG F W, et al. Synergistic efficacy of high-intensity ultrasound and chlorine dioxide combination for *Staphylococcus aureus* biofilm control [J]. Food Control, 2021, 122: 107822.
- [19] 索 标,赵雅健,李 真,等. 单辛酸甘油酯对即食湿面中金黄色葡萄球菌的抑制模型[J]. 中国食品学报, 2019, 19(5): 191-200.
- [20] 蔡林林,胡海静,衣晓坤,等. 酸性电解水对肉源性荧光假单胞菌的致死效应[J]. 中国农业科学, 2019, 52(9): 1614-1623.
- [21] LIU F, WANG F T, DU L H, et al. Antibacterial and antibiofilm activity of phenyllactic acid against *Enterobacter cloacae* [J]. Food Control, 2018, 84: 442-448.
- [22] LIU F, TANG C, WANG D B, et al. The synergistic effects of phenyllactic acid and slightly acid electrolyzed water to effectively inactivate *Klebsiella oxytoca* planktonic and biofilm cells [J]. Food Control, 2020, 20: 107804.
- [23] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Anal Chem, 1956, 28: 350.
- [24] 蔡晓军,孙杨赢,潘道东,等. 迷迭香主要组分对沙门氏菌的抑制机理[J]. 中国食品学报, 2019, 19(3): 134-140.
- [25] 食品安全国家标准食品微生物学检测菌落总数: GB 4789.2—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [26] 食品安全国家标准食品微生物学检测金黄色葡萄球菌: GB 4789.10—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [27] 李莎莎,计红芳,张令文,等. 冰温保鲜过程中鸡肉品质及微观结构的变化[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(16): 201-207.
- [28] 王光宇,李 晴,唐文倩,等. nuoB 对莓实假单胞菌生理特性及在冷鲜鸡肉中致腐能力的影响[J]. 中国农业科学, 2021, 54(8): 1761-1771.
- [29] LI J, SUO Y J, LIAO X Y, et al. Analysis of *Staphylococcus aureus* cell viability, sublethal injury and death induced by synergistic combination of ultrasound and mild heat [J]. Ultrason Sonochem, 2017, 39: 101-110.
- [30] WANG C J, CHANG T, YANG H, et al. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*

- [J]. Food Control, 2015, 47:231-236.
- [31] OMORI Y, MIAKE K, NAKAMURA H, et al. Influence of lactic acid and post-treatment recovery time on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* [J]. Int J Food Microbiol, 2017, 257: 10-18.
- [32] 许 愈, 张昭寰, 赵 莉, 等. 应用酸性电解水联合超声波波杀灭副溶血性弧菌[J]. 上海海洋大学学报, 2020, 29(4): 578-584.
- [33] HE Q, ZHANG L J, SONG L Y, et al. Inactivation of *Staphylococcus aureus* using ultrasound in combination with thyme essential oil nanoemulsions and its synergistic mechanism [J]. LWT - Food Sci Technol, 2021, 147:111574.
- [34] 王心磊. 超声波杀菌技术对大肠杆菌 O157:H7 及其生物膜的杀菌机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2020.
- [35] RAMEZANI F, NAJAFI M A, RAHNAMA M, et al. Separate and combined effects of lactic acid, chitosan and modified atmosphere packaging on the shelf life of quail carcass under chilled conditions [J]. Int J Food Microbiol, 2019, 289: 215-222.
- [36] GONZÁLEZ-FANDOS E, MARTINEZ-LAORDEN A, PEREZ-ARNEDO I. Efficacy of combinations of lactic acid and potassium sorbate against *Listeria monocytogenes* in chicken stored under modified atmospheres [J]. Food Microbiol, 2020, 93: 103596.

(责任编辑: 张震林)