

耐热芽孢杆菌(*Bacillus sporothermodurans*)的研究进展概述

胡长利, 向新华, 韩晓旭, 云战友, 黄小平*

(内蒙古伊利实业集团股份有限公司创新中心, 呼和浩特 010110)

摘 要: 芽孢杆菌是一类能形成芽孢的杆菌或球菌, 一般来说能够耐受巴氏杀菌温度的芽孢杆菌为耐热芽孢杆菌。芽孢杆菌根据菌种不同, 其耐热性也不同, 有的甚至能耐受 100 ℃ 及以上的高温。食品中耐热芽孢杆菌的存在会给食品质量带来一定影响, 有些耐热芽孢杆菌能够产毒素而且具有致病性。耐热芽孢杆菌的普遍存在给食品工业带来巨大的挑战。*Bacillus sporothermodurans*(BSTD)就是一种典型的耐热芽孢杆菌。本文概述了 BSTD 的发现、命名和一些基本的生理生化特性, 介绍了该菌种的来源、分子学鉴定、在食品中存在的健康及质量风险, 从溯源角度进行系统分析, 从热杀菌处理结合其他辅助杀菌工艺分析该菌种的控制方法和技术研究进展, 并对今后的研究和控制方向进行展望。

关键词: 耐热芽孢杆菌; 鉴定; 控制; 食品质量

Research and development of *Bacillus sporothermodurans*

HU Chang-Li, XIANG Xin-Hua, HAN Xiao-Xu, YUN Zhan-You, HUANG Xiao-Ping*

(Inner Mongolia Yili Industrial Group Co., Ltd., Innovation Center, Hohhot 010110, China)

ABSTRACT: *Bacillus* was belonging to the family of bacteria which can form spores. Generally, heat resistant *Bacillus* could tolerate the temperature like experimental pasteurized. According to different strains of *Bacillus* that had different heat resistance, some strains could even tolerate more than 100 ℃. The existence of the heat-resistant bacillus in food can bring some influence to food quality, some heat resistant bacillus could produce toxin and pathogenic, it also caused the risk of food safety. Heat resistant *Bacillus* was widespread in food industry that brought the huge challenge to food industry. *Bacillus sporothermodurans* (BSTD) was a kind of typical heat resistant *Bacillus*. This article summarized the discovery, naming, and some of the basic physiological and biochemical characteristics of BSTD which belong to the heat-resistant *Bacillus* group, in this paper the origin of the strains, molecular identification and security information were introduced, the control method, risk for food safety and health were analyzed. At the same time, the traceability system and technology research progress of the species were also discussed for the future development direction.

KEY WORDS: *Bacillus sporothermodurans*; identification; control; food quality

*通讯作者: 黄小平, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量安全与风险评估。E-mail: huangxiaoping@yili.com

*Corresponding author: HUANG Xiao-Ping, Senior Engineer, Innovation Center, Inner Mongolia Yili Industrial Group Co., Ltd., No. 8, Jinshan Development Zone, Hohhot 010110, China. E-mail: huangxiaoping@yili.com

1 引言

耐热芽孢杆菌 *Bacillus sporothermodurans* (BSTD) 是一类具有较高耐热性能的产内生孢子的细菌, 目前还没有合适的中文译名, 1985 年和 1990 年, 在德国的超高温杀菌处理 (ultra heat treated, UHT) 的牛奶中发现 BSTD, 随后在欧洲的其他国家, 如比利时、法国和西班牙等也相继被发现。在一些食品或环境中这些耐受高温的产芽孢细菌可能存活并繁殖, 且不会明显改变牛奶品质, 也不具有致病性, 容易被忽视。Bertil 等^[1]在 1996 年对 BSTD 进行研究并命名, 该菌种是细菌界、厚壁菌门、杆菌纲、芽孢杆菌目、芽孢杆菌科、芽孢杆菌属、BSTD 种。该菌种的模型菌株编号为 M215(DSMZ 10599)。BSTD 也相继在其他不同的环境中被分离出来, Lara 等^[2]在油田中发现了 BSTD。Prevost 等^[3]采用 PCR 技术在罐头食品中也发现了 BSTD。Christiansson 等^[4]于 1999 年指出牛奶中所检测到的芽孢菌可能经历土壤、饲料、消化、粪便和泌乳等环节。Logan^[5]在土壤和饲料中也发现了 BSTD, 并且推测土壤或饲料是 BSTD 的重要来源, 并且可能污染食品。彭喜春等^[6]根据细菌的 16S rRNA 进行分类, 在我国普洱茶中检测出了一株 BSTD。Florence 等^[7]分析了 90 份样品, 其中 30 份含鸡蛋的食品, 30 份乳制品和 30 份罐头食品, 仅仅在乳制品中检出了 BSTD。Zhang 等^[8]在中国发酵酒的大曲原料中检测芽孢情况, 采样 PCR-DGGE 技术在两个大曲样品中也检测出了 BSTD。

Hammer 等^[9]研究表明, 牛奶经过在 30 °C 下培养 5 d, 其所含的 BSTD 可达到 10^5 个/mL, 但不会造成牛奶的变质和致病。乳制品检出率较高的原因是牛乳是细菌繁殖的最佳培养基, 芽孢杆菌及其芽孢在原料乳中出现的概率很高, 会直接影响到乳制品的品质^[10]。虽然 BSTD 不具有致病性, 也不会给产品带来显著的品质降低, 但是其在环境和食品中广泛存在, 特别是在乳制品的检出能够反映出产品的生产过程存在瑕疵, 给食品安全带来潜在的风险, 这就要求对 BSTD 有全面深入的认识, 从而帮助企业建立更加完善的微生物控制体系。

2 BSTD 的分离鉴定

2.1 分离培养

由于 BSTD 具有很高的抗热性, 根据报道, 在土壤和油田等地均有发现, 在饲料、水果、罐头、酒曲和乳制品中也有发现, 一般来说, BSTD 在 30~60 °C 可较好生长, 其芽孢的抗热性温度广泛, 甚至可耐受 140 °C 以上的超高温瞬时杀菌, 适用的 pH 范围较广, 为好氧耐热芽孢杆菌。目前对 BSTD 分离鉴定的培养条件在不同的研究报告内略有不同, 但总体上没有太大差异。

2.1.1 BSTD 的培养基及培养条件

对 BSTD 的分离纯化, 从文献报道来说, 不同学者在不同培养温度、培养时间和培养介质等方面对分离纯化 BSTD 开展了深入、多样的研究, 但培养基的选择很单一, 基本都是采用了脑心培养基 (brain heart infusion medium, BHI)。Shyama 等^[11]研究了 BSTD 的 DNA 序列, 文中所采用的分离培养方法为首先将被测样品在 100 °C 煮沸 60 min, 充分杀灭其他的耐热芽孢杆菌, 然后接种到 BHI 脑心琼脂培养基中, 在 37 °C 条件下培养 48 h, 然后挑取 BSTD 菌落, 再次进行 24~48 h 的分离划线, 纯化培养, 在室温下可存放两周时间, 如果要长期保存, 可在纯化培养时候, 在 BHI 脑心平板上加入 20% 的甘油, 存储在 -70 °C 的低温冷冻冰箱内。Scheldeman 等^[12]采用的分离培养 BSTD 的方法是样品首先在 100 °C 条件下加热 30 min, 然后倒入 BHI 脑心培养基中, 分别在 20、37 和 55 °C 的温度下培养 48 h, 然后挑取菌落, 纯化培养后的菌株存储在 -80 °C 的冷冻冰箱内。Montanari 等^[13]研究了 UHT 牛奶中耐热芽孢杆菌的情况, 培养分离方法是首先将所有样品在 30 °C 条件下保温 15 d, 然后分别在标准的琼脂计数平板 PCA 上 (添加千分之一的脱脂牛奶) 和 BHI 脑心培养基 (添加 1 mg/L 的 VB12) 上培养, 培养条件为 37 °C 温度下培养 72 h。对 BSTD 的培养分离条件之所以有上述差异, 主要是因为 BSTD 的生长条件苛刻, 且菌落形态较小, 难以很好地分辨, 需要研究者有足够的识别经验。

2.1.2 BSTD 的分离方法

利用 BSTD 的耐热特性, 采用 BHI 脑心培养基, 在不同培养温度下进行选择性分离培养, 以筛选出 BSTD。一般先将疑似的菌落或样品进行 100 °C 的热处理, 处理时间为 30~90 min, 然后进行平板划线或涂布分离, 置于 55 °C 条件下培养 48 h 即可。经过多次分离纯化后, 即可获得耐热性强的芽孢杆菌, 得到的可疑菌落仍然需要经过鉴定之后才能确定是否为 BSTD。

2.2 初步鉴定

芽孢杆菌的初步鉴定一般采用形态学特征结合生理生化特征进行。根据文献报道, BSTD 的形态学特征为: 菌株在 BHI 脑心培养基上 37~55 °C 有氧培养 48 h 即可长出明显的菌落, 在无氧条件下不可生长。BSTD 的菌落形态一般为圆形、表面平坦有光泽、半透明或者不透明、直径为 0.5~5 μm 、革兰氏染色阳性、细胞形态为杆状、产芽孢、芽孢呈现椭圆形或杆状、端生或次端生、有时会使营养细胞膨大; 生理生化特征主要通过过氧化氢酶、pH5.7 条件、pH6.8 条件、伏-普实验 (Voges-Proskauer test)、厌氧条件、酪蛋白水解物、明胶水解物、淀粉水解物、柠檬酸盐、丙氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、吲哚、溶菌酶、NaCl 和产气等方面进行验证^[13]。

对不同来源的 BSTD 各个菌株进行糖耐受实验, 发现

不同菌株对糖类的耐受性差异较大, 总体上所有 *BSTD* 菌株均不耐受乳糖、半乳糖、木糖、棉子糖和阿拉伯糖, 当然针对不同来源的菌株还需开展进一步的生化鉴定, 以明确其生化特征。

可见 *BSTD* 的不同菌株在生理生化方面的特性基本保持一致, 但糖耐受性差异较大, 初步鉴定的基础上结合现代鉴定方法将极大的提高 *BSTD* 的鉴定准确性。

2.3 分子生物学鉴定方法

在细菌菌种鉴定方面, 常用的分子水平的鉴定方法有脱氧核糖核酸(deoxyribose nucleic acid, DNA)组成及杂交试验、16s RNA 序列分析、核糖体分型和聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)鉴定等。分子水平的鉴定方法区别于初步鉴定, 其鉴定依据是比较分析反应基因组特征的核苷酸序列。其中 DNA 组成分析是测定菌株 DNA 中碱基对的百分含量, DNA 杂交技术则是对未知菌和标准菌株进行碱基对排列的相似程度进行分析, 杂交后两株菌的相似度越高越相近, 两株菌的同源性大于 70% 时为统一亚种。大量实验研究表明最适合揭示各类生物亲源关系的是 rRNA, 而应用最为广泛的是 16s RNA。在获得菌株的 16s RNA 序列后, 可以到相应的美国国家生物技术信息中心(national center of biotechnology information, NCBI)微生物数据库中进行比对和相似性分析。此外在菌种生化鉴定方面, 也会用到细胞膜的脂肪酸组分分析、甲基萘醌分析等特征作为鉴定依据^[14]。

关于 *BSTD* 的分子生物学鉴定, 国际上研究较多, 不同学者对各种来源的菌株进行了 DNA 杂交、16s RNA 序列分析、PCR 探针设计和特异性扩增、细胞膜脂肪酸分析等研究。Herman 等^[15]最早在 1997 年就采用 PCR 技术鉴定出了两株 *BSTD*。Lieve 等采用 PCR 和 DNA 杂交技术研究了不同来源的 *BSTD*。通过对 *BSTD* 的 16s RNA 序列分析, 设计出特异性的 PCR 引物, 结果表明 PCR 鉴定技术可以很好的区分不同来源的 *BSTD* 菌株。所用到的引物序列为(5' ACG GCT CAA CCG TGG AG 3') 和 BSPO-R2 (5'GTA ACC TCG CGG TCT A 3), 他们同时对比分析了不同文献报道的 *BSTD* 的 16s RNA 序列, 对其同源性做了比较分析。结果发现来源于超高温处理奶(UHT 奶)、巴氏奶和饲料中的三个菌株 MB 372, MB 385 和 MB 1317 和之前文献报道所鉴定的 M215 T (LMG MG 17894T)菌株同源性达到了 97.5%~99%, 采用 PCR 技术对不同体积牛奶中的 *BSTD* 进行分析发现, 检测限可以达到 9 CFU/ mL, 0.4 CFU/10 mL 和 0.22CFU/100 mL^[16]。

Herman 等采用 REP-PCR 技术, 结合非凝胶变性电泳, 分析来自乳品中的芽孢杆菌, 并成功区分出了 11 株 *BSTD*, 而且深入分析后, 可以将这 11 株菌进行区分^[17]。

Cattani 等^[18]对比 PCR 技术和利用添加叠氮溴化丙锭(PMA)的 PMA-PCR 技术对牛奶中的芽孢杆菌进行快速检

测, 实验证实不添加 PMA 的 PCR 技术的检出限达到 4 CFU/mL, 添加 PMA 的 DNA 检测技术达到的检测限为 100 CFU/mL, 添加 PMA 可以有效地检测出已经死亡的芽孢细胞。这种技术的开发可以使得 PCR 检测涵盖死亡和活的耐热芽孢的细胞体, 提高了检测的准确性。

Vaerewijck 等^[19]研究了饲料中的好氧芽孢杆菌的分布情况, 采用核糖体 DNA 限制性内切酶技术和 16s RNA 序列分析, 分析了 97 株芽孢菌, 鉴定出有枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、*BSTD* 芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、*Bacillus oleronius* 芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌和苍白芽孢杆菌等。

应用随机扩增的多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术和重复序列 PCR(repetitive sequence-based PCR, REP-PCR)技术分析了 UHT 奶中的芽孢杆菌, 在 RAPD 技术中应用的引物序列为 RAPD I [5'-GTCGTTATGCGGTA-3'] 和 RAPD II[5'-GAAGCAGC GTGG-3']。在 REP-PCR 技术中所使用的引物序列为 REP IR-I [5'-IIICGICGICATCIGGC-3'] 和 REP 2-I [5'-ICGICT TATCIGGCCTAC-3']。结果显示来自欧洲不同地区的 UHT 奶中都检出了 *BSTD* 的存在^[20]。

Patsy 等^[21]采用 DNA 杂交技术、核糖体 DNA 限制性内切酶技术、16s RNA 序列分析和脂肪酸甲酯分析技术(FAME)研究了牧场和乳品中的耐热芽孢杆菌, 并通过 FASTA 程序进行相似性检索分析。通过 FAME 技术可以准确的鉴定出 *B. licheniformis*, *Bacillus sphaericus*, *B. subtilis* group, *B. cereus* group, *Brevibacillus agri*, 但是没有准确鉴定出 *BSTD*。

Florence 等^[22]采用多重 PCR 技术, 研究了食品中耐热芽孢杆菌的分布情况, 在 180 份食物样品中分离出了 38 个不同的耐热芽孢杆菌, 其中在乳制品中成功分离出了 *BSTD*。所采用的技术手段是在合理增菌的基础上, 采用了特异性和敏感性相结合的检测方案。

关于 *BSTD* 的生化鉴定方法的研究论文很多, 对不同菌株在分子生物水平上的比较也显示出在 *BSTD* 的鉴定方法方面具有较为成熟的方法, 综合分析后可知, 采用 16s RNA 结合 PCR 技术和 RAPD 技术可以较好地复杂样本中鉴定出 *BSTD*, 这是因为 *BSTD* 的 16s RNA 序列的 V2 区间具有独特性。但最大的难度在于从复杂的芽孢样本中成功分离和纯化, 这需要借助研究人员丰富的微生物研究和鉴别经验, 在初步鉴定的基础上, 利用上述生化手段完成最终的鉴定和分型。

3 *BSTD* 的风险及溯源

3.1 *BSTD* 对牛奶的影响

综合现有的关于 *BSTD* 的研究报道, 在被检测出该芽孢杆菌的产品中, 牛奶的外观品质、稳定性和口感都没有

任何变化,但考虑到长货架期产品的特点,存在可能增殖的芽孢,在芽孢杆菌增殖到一定数量后会导致产品商品品质的降低,该芽孢杆菌所产生的蛋白酶等成分也会影响到产品色泽和稳定性,因此 UHT 牛奶中偶发的风险 *BSTD* 污染仍然是一个值得关注的风险点。有研究表明,牛奶经过在 30 °C 下 5 d 的培养,其所含的 *BSTD* 可达到 10^5 个/mL,但不会造成牛奶的变质和致病,没有其导致疾病的相关文献报道^[23]。另外,到目前为止国内外也没有因为饮用被 *BSTD* 污染的 UHT 奶而患病的报道,这也间接证明了牛奶或其他食品中的 *BSTD* 是非病原菌,该菌的代谢产物对人体是非致病性的。

3.2 *BSTD* 的溯源

关于在食品中,尤其是牛奶中所发现的 *BSTD*,根据不同文献报道中所进行的菌种编号可见菌株有所不同,可以获得商业化的标准菌株。在牛奶中发现的 *BSTD* 来源广泛,目前还没有针对 *BSTD* 菌株更为详细的分类,这也为溯源工作带来了不小挑战。

不同环境中分离出的 *BSTD* 的基因亲缘性的差异主要由不同菌株的 PCR 鉴定、DNA 指纹序列分析和 Ribotyping 核糖体分型图谱来完成。Olivier 等^[24]研究了来自不同国家、地区的饲料、牛奶、豆粕中的 *BSTD*,共分离到了 38 个不同的菌株。利用核糖体分型技术和 REP-PCR 指纹图谱技术对所分离的菌株进行基因水平的差异化研究,结果发现不同的菌株存在一定的基因序列差异,将相似度达到 93% 以上的列为一种,这 38 个菌株可以分为 14 组,相似度最低的仅为 64%,亲缘关系较远。

Patsy 等^[25]讨论分析了 *BSTD* 的来源和分布情况,由于在饲料中发现的 *BSTD* 和原奶中发现的不一样,不能说明牛奶中的 *BSTD* 来自于饲料,推测牛奶中的 *BSTD* 来自于挤奶设备的滤布等微生物富集区域。而且产品中 *BSTD* 和原奶中也不相同,之间没有同源性,可见在加工过程中存在其他的污染点或者可能是由于生物膜的存在导致 *BSTD* 的污染。Hreman 等^[26]在原奶中能够检测到 *BSTD*,但是发现的频次具有偶然性,并不是所有的原奶中都能够检测到 *BSTD* 的存在。Scheldeman 等^[27]研究了牧场的污染情况,在饲料中发现 *BSTD* 的存在,虽然只在 700 个疑似的菌落中发现 17 株 *BSTD*,但这些散发的检出案例,也说明牧场饲料是原奶污染的一个来源。

Chedia 等^[28]研究了突尼斯牧场和牛奶中的耐热芽孢杆菌的分布情况,研究结果表明,在原奶、巴氏奶和 UHT 奶中都发现了耐热芽孢杆菌,在发现的 40 株耐热芽孢杆菌中,有 47.5% 来自于原奶、27.5% 来自于巴氏奶、25% 来自于 UHT 奶,推断这些耐热芽孢来源广泛,不仅仅是原料奶带入,有可能在后续的加工环境中也有污染。

Salem 等^[29]的报告指出,环境条件对芽孢的形成影响显著,特别是在饲料生产、浓缩和干燥过程中,有可能会形

成大量的芽孢,食品原料的浓缩、干燥同样也会产生一定数量的芽孢。这些因素最终导致产品中耐热芽孢杆菌数量的增加。

Patsy 等^[25]分离了来自不同 UHT 产品中的耐热芽孢菌,只在 9 个样品中发现 2 个有 *BSTD*,但在所有的 9 个样品中都发现了其他 19 个菌株,通过 PCR 技术、DNA-DAN 杂交技术和脂肪酸组成分析后,将 *BSTD* 分类于类芽孢杆菌属中,文章推测 *BSTD* 的来源与牧场环境相关。

Scheldeman 等^[30]综述了 *BSTD* 的研究进展,指出采用 PCR 技术进行分析溯源,并采用聚类分析进行同源性分析,发现来自牧场、原料奶和灭菌奶中的菌株离散性很强,只有一例德国的 UHT 产品中发现的菌株可溯源到原料奶中。推测产品中出现的 *BSTD* 来源可能包括原奶、牧场或奶粉。鉴于 *BSTD* 是新近发现的一株耐热芽孢杆菌,推测其在牧场中出现的原因可能是大量浓缩饲料的应用,在这些浓缩饲料中可能藏匿了一些独特的耐热芽孢杆菌,但这种耐热芽孢杆菌的存在是偶然的,在工厂环境或产品中检测出来的情况也比较少见,含量有限。

4 *BSTD* 的控制

4.1 原料、设施及人员的管理

需氧芽孢杆菌在自然环境中普遍存在,在食品原材料及生产环境中也不可避免,但为了更好地控制产品质量,对原料、设施及人员的管理还是需要重点关注的环节。

对原料奶的质量管理要从牧场做起,耐热芽孢的带入很可能是从牧场环节就已经开始,因此加强牧场卫生状况,特别是对浓缩饲料的质量管理、挤奶设备和运输环节都要加强卫生控制。特别是有报道在冬天奶牛集中在棚舍内饲养,会增加环节中芽孢杆菌污染的风险^[31],因此要做好牧场的通风和清洁工作。

耐热芽孢杆菌的富集会受到清洗工艺和加工工艺的影响,因此在进一步了解 *BSTD* 特性的基础上,可优化热加工工艺,做好加工过程中耐热芽孢杆菌的控制。同时开发针对耐热芽孢杆菌的快速检测方法,实现对生产加工环境的及时监测,以便能及时发现问题。例如开发针对 *BSTD* 的 16s RNA PCR-RELP 法快速分离鉴定。Faille 等^[32]研究了在 CIP 清洗过程中,机械剪切力作用和化学清洗剂对 12 种芽孢杆菌的清洁效果,结果表明在不用清洁剂的情况下,500 MPa 的机械剪切力仅仅能清除最多 89% 的芽孢杆菌,但利用含有 NaOH 的清洗剂(浓度为 0.5%,温度为 60 °C,压力为 5 MPa),即可清除大部分的芽孢杆菌,*BSTD* 在 12 种芽孢杆菌中是最难被清水所清洗掉的,在含有化学清洗剂的 CIP 工艺后,残留率为 5.2%。

虽然每个工厂都会制定严格的操作规范,对人员卫生也会有严格要求。但是偶尔的人员疏忽会带来严重的质量安全风险,因此有必要加强人员管理,并采取定期培训、

检查或激励等措施, 来避免因工人操作不当导致耐热芽孢杆菌污染事件的发生。

4.2 抑菌及杀菌技术

热杀菌技术是食品工业重要且不可替代的杀菌技术, 可以极大程度降低食品的微生物风险, 但是对于 *BSTD* 来说, 其热杀菌的动力学还不是很清楚, 只有了解清楚 *BSTD* 在不同条件的动力学参数, 才能更好地设计热杀菌工艺。

Micha 等^[33]研究了耐热芽孢杆菌在 UHT 工艺下的残存曲线和等温曲线, 并进行了有关耐热性参数模型的分析, 建立了不同的参考方程。Smelt 等^[34]综述了食物在热杀菌工艺过程中的必要性和各项指标变化, 指出了 *BSTD* 在水分活度 $a_w > 0.95$, 90 °C, 低酸环境里的 D 值为 11~30 min

Andre 等^[35]研究了 *BSTD* IC4 在不同的食品基料中的热动力学参数, 但是没有开展在牛奶中的动力学参数研究。只有在深入研究 *BSTD* 的热动力学参数的情况下, 才可能对现有的 UHT 工艺做出必要的调整以达到在热处理工艺中消灭 *BSTD* 的目的。

Marina 等^[36]研究了乳制品和可可粉中的好氧耐热芽孢杆菌的热杀菌情况, 发现有地衣芽孢杆菌在 125 °C 的条件下, 处理 30 min 仍然会有存活, 也建立了一个改良的阿伦尼斯模型(Arrhenius model)来描述这类耐热芽孢杆菌的热灭活情况, 但没有开展对 *BSTD* 的研究。

由于 *BSTD* 的芽孢可以抵抗常规的巴氏灭菌和 UHT 杀菌处理, 因此在 UHT 牛奶或其他中性 UHT 产品中可能存在。特别是巴氏杀菌工艺虽然能够杀死大部分的耐热芽孢杆菌的营养体细胞, 但是仍然会有少量存活的芽孢在后续加工环境萌发或增殖, 甚至在最终经过 UHT 处理的产品中存在。因此, 在现有杀菌工艺基础上, 结合新的杀菌技术或工艺改进, 是今后耐热芽孢控制的发展方向。

Aouadhi 等^[37]研究了采用 NISIN、高压技术和温度结合的方式来杀灭 *BSTD* 芽孢的工艺。结果发现牛奶中的 *BSTD* 杀灭效果与 NISIN 的浓度在一定范围内线性相关, 在 53 °C 条件下, 440~500 MPa 压力, NISIN 浓度为 0~150 UI/mL 时, 5 min 可以降低 *BSTD* 的芽孢数量为 5 个数量级。但高压杀菌技术的应用受到设备和工艺等多种因素的限制, 需要进行深入研究以便得以实际应用。

BSTD 对热稳定, 其芽孢不容易被高温杀灭, 但是芽孢萌发后则不能耐受 UHT 工艺, 因此先将 *BSTD* 的芽孢诱导萌发后, 再进行杀灭, 可以有效控制 *BSTD* 的污染。Aouadhi 等^[38]研究了不同营养素对 *BSTD* 芽孢的萌发影响, 发现在 23 种营养素中, 只有 D-葡萄糖, L-丙氨酸和肌酐对 *BSTD* 的芽孢有较强的激活作用, 进一步发现在 35 °C 下培养 60 min, 添加 9 mmol 的 D-葡萄糖或 60 mmol 的 L-丙氨酸, 可以 100% 激活 *BSTD* 的芽孢。Aouadhi 等^[39]也研究了不同压力对 *BSTD* 的芽孢萌发的影响, 通过不同的压力、

温度、压力保持时间、压力后保温的时间等多因素试验, 发现温度不是影响压力激活芽孢的主要因素。以牛奶为介质比以水为介质有利于芽孢的萌发, 但均不能达到 100% 的萌发, 在 200 MPa, 20 °C 条件下处理 5 min, 压力释放 10 min 后检测, 芽孢的萌发率最高可达到 62%。Frederick 等^[40]研究湿热杀菌技术对 *BSTD* 的芽孢的影响, 通过检测吡啶二羧酸(DPA)和芽孢细胞结构被破坏后所释放的可溶性蛋白含量, 来检测芽孢的失活情况, 结果表明, 对两株受试的 *BSTD* 菌株 DSM 10599 和 UP20A, 130 °C 处理 4 min 至少可以达到 7 个数量级的灭活率, 如果处理到 8 min, 则受试菌株全部被灭活。DPA 可以作为 *BSTD* 结构破坏的首要指示物, 而可溶性蛋白的释放具有菌株间的差异, 不能代替 DPA 成为首要指示物。

5 展 望

芽孢杆菌是自然界普遍存在的一种微生物, 种类繁多。芽孢杆菌由于产生内生孢子, 具有较强抵抗外界环境压力的能力, 能够抵抗所生存的环境中由于干燥、热和紫外线辐射所造成的伤害, 维持自身能力不受影响, 有的芽孢杆菌可以分泌有价值的生物活性物质, 值得开发利用, 有的芽孢杆菌则会分泌致病的生物毒素, 需要食品工业加以控制, 而有关 *BSTD* 更多的生物特性、代谢产物和控制技术, 如芽孢形成萌发和耐热性机制等方面的研究还非常欠缺。采用现代分类手段和鉴定手段对 *BSTD* 进行分类研究和代谢研究, 可望获得更多的关于该菌种的信息, 从而有助于尽快实现工业上对该芽孢杆菌的有效防控, 并对建立相应的芽孢杆菌资源库和数据库有重要的意义。

参考文献

- [1] Bertil P, Fritz L, Philipp H, et al. *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores [J]. Int J of systematic bacteriology. 1996, 46: 759–764.
- [2] Lara DS, Karen CM, Simioni P. et al. Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin [J]. Anton Leeuw J G, 2007, 91: 253–266.
- [3] Prevost S, Andre S, Remize F. PCR detection of thermophilic spore-forming bacteria involved in canned food spoilage [J]. Curr Microbiol, 2010, 61: 525–533.
- [4] Christiansson A, Bertilsson J, Svensson B. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period [J]. J Dairy Sci, 1999, 82: 305–314.
- [5] Logan NA, Vos P. Endospore-forming soil bacteria, soil biology 27 [M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 2011.
- [6] 彭喜春, 于淼. 一款 10 年陈熟普洱茶中可培养微生物的分离鉴定[J]. 食品科学, 2011, 15: 196–199.
Peng XC, Yu M. Isolation and identification of culturable microorganisms in a 10-year-old fermented Pu-erh tea [J]. Food Sci, 2011, 32(15): 196–199.
- [7] Florence P, Anne-Gabrielle M, Muriel B, et al. Tracking spore-forming

- bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes [J]. Int J Food Microbiol, 2012, 158: 1–8.
- [8] Zhang LQ, Wu CD, Ding XF, *et al.* Characterisation of microbial communities in Chinese liquor fermentation starters Daqu using nested PCR-DGGE [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2014, 30(12): 3055–3063.
- [9] Hammer PF, Lembke G, Suhren, *et al.* Characterization of a heat resistant mesophilic bacillus species affecting quality of UHT milk—a preliminary report [J]. Kieler Milchw Forsch, 1995, 42: 303–311.
- [10] Crielly EMNA, Logan A, Anderton. Studies on the bacillus flora of milk and milk products [J]. J Appl Bacteriol, 1994, 77: 256–263.
- [11] Shyama De S, Bertil P, Marilena ADM, *et al.* A DNA Probe for the detection and identification of bacillus sporothermodurans using the 16S-23S rRNA spacer region and phylogenetic analysis of some field isolates of bacillus which form highly heat resistant spores system [J]. Sys Appl Microbiol, 1998, 21: 398–407.
- [12] Scheldeman P, Herman L, Goris J, *et al.* Polymerase chain reaction identification of bacillus sporothermodurans from dairy sources [J]. J Appl Microbiol, 2002, 92: 983–991.
- [13] G. Montanari, A. Borsari, C. Chiavari, *et al.* Morphological and phenotypical characterization of Bacillus sporothermodurans [J]. J Appl Microbiol, 2004, 97: 802–809.
- [14] 孔德义, 董佳, 白小琼. 脂环酸芽孢杆菌的研究进展[J]. 粮食与食品工业, 2011, 18: 39–42.
- Kong DY, Dong J, Bai XQ. Research and development of Alicyclobacillus [J]. Cereal Food Ind, 2011, 19(2): 39–42.
- [15] Herman LMF, Vaerewijck MJM, Moermans RJB, *et al.* Identification and detection of bacillus sporothermodurans spores in 1, 10, 100 milliliters of raw milk by PCR [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 3139–3143.
- [16] Lieve MFH, Mario JMV, Renaat JBM. *et al.* Identification and detection of bacillus sporothermodurans spores in 1, 10, and 100 milliliters of raw milk by PCR [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(8): 3139–3143.
- [17] Herman L, Heyndrickx M, Waes G. Typing of Bacillus sporothermodurans and other bacillus species isolated from milk by repetitive element sequence based PCR [J]. Letter Appl Microbiol, 1998, 26: 183–188.
- [18] Cattani F, Ferreira CAS, Oliveira SD, The detection of viable vegetative cells of bacillus sporothermodurans using propidium monoazide with semi-nested PCR [J]. Food Microbiol, 2013, 34: 196–201.
- [19] Vaerewijck MJM, De VP, Lebbel L, *et al.* Occurrence of Bacillus sporothermodurans and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle [J]. J Appl Microbiol, 2001, 91: 1074–1084.
- [20] Nicolette K, Lieve H, Leo L, *et al.* Genotypical and phenotypical characterization of Bacillus sporothermodurans strains, surviving UHT sterilization [J]. Int Dairy J, 1997, 7: 421–428.
- [21] Patsy S, Annelies P, Lieve H. *et al.* Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 1480–1494.
- [22] Florence P, Stéphane B, Florence B, *et al.* A multiparametric PCR-based tool for fast detection and identification of spore-forming bacteria in food [J]. Int J Food Microbiol, 2010(142): 78–88.
- [23] Hammer PF, Lembke G, Suhren, *et al.* Characterization of a heat resistant mesophilic Bacillus species affecting quality of UHT milk—a preliminary report [J]. Kieler Milchw Forsch, 1995, 42: 303–311.
- [24] Olivier G, Patsy S, Joey M. Genetic heterogeneity in Bacillus sporothermodurans as demonstrated by ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR fingerprinting [J]. Appl Environ Microbiol, 2002: 4216–4224.
- [25] Patsy S, Karen G, Marina Rodriguez-Diaz, *et al.* Paenibacillus lactisp. nov, isolated from raw and heat-treated milk [J]. Int J Sys Evolution Microbiol, 2004, 54: 885–891.
- [26] Herman L, Heyndrickx M, Vaerewijck M, *et al.* Bacillus sporothermodurans—a bacillus forming highly heat resistant spores. 3. Isolation and methods of detection [J]. Bull IDF, 357, 2000: 9–14.
- [27] Scheldeman P, Herman L, Goris J, *et al.* Polymerase chain reaction identification of Bacillus sporothermodurans from dairy sources [J]. J Appl Microbiol, 2002, 92: 983–991.
- [28] Chedia A, Abderrazak M, Slah M. Incidence and characterisation of aerobic spore-forming bacteria originating from dairy milk in Tunisia [J]. Int J Dairy Technol, 2014: 95–102.
- [29] Salem SR, Shabeb MSA, Amara AA, Optimization of thermophilic production in bacillus mixed cultures under mesophilic conditions [J]. World J Agric Sci, 2009, 5: 375–383.
- [30] Scheldeman P, Herman L, Foster S, *et al.* Bacillus sporothermodurans and other highly heat-resistant spore formers in milk [J]. J Appl Microbiol, 2006, 101: 542–555.
- [31] Sutherland AD, Murdoch R. Seasonal occurrence of psychrotrophic bacillus species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic Bacillus sporothermodurans [J]. Int J Food Microbiol, 1994, 21: 279–292.
- [32] Faille C, Bénézech T, Blé W, *et al.* Role of mechanical vs. chemical action in the removal of adherent Bacillus spores during CIP procedures [J]. Food Microbiol, 2013, 33: 149–157.
- [33] Micha P, Mark DN, Maria G, *et al.* Estimating the heat resistance parameters of bacterial spores from their survival ratios at the end of UHT and other heat treatments [J]. Crit Rev Food Sci, 2008, 48: 634–648.
- [34] Smelt JPPM, Brul S. Thermal inactivation of microorganisms [J]. Crit Rev Food Sci, 2014, (54): 1371–1385.
- [35] Andrevan Z, Paula M, Alejandro A, *et al.* Characterization of Bacillus sporothermodurans IC4 spores; putative indicator microorganism for optimisation of thermal processes in food sterilization [J]. Food Res Int, 2010, 43: 1895–1901.
- [36] Marina W, Genia LC, Zeynep A, *et al.* Thermal resistance of aerobic spore formers isolated from food products [J]. Int J Dairy Technol, 2011, 64(4): 486–493.
- [37] Aouadhi C, Simonin H, Mejri S, *et al.* The combined effect of nisin, moderate heating and high hydrostatic pressure on the inactivation of Bacillus sporothermodurans spores [J]. J Appl Microbiol, 2013, 115: 147–155.
- [38] Aouadhi C, Simonin H, Abderrazak M, *et al.* Optimization of nutrient-induced germination of Bacillus sporothermodurans spores using response surface methodology [J]. Food Microbiol, 2013, 36: 320–326.
- [39] Aouadhi C, Simonin H, Prévost H, *et al.* Optimization of pressure-induced germination of Bacillus sporothermodurans spores in water and milk [J]. Food Microbiol, 2012, 30: 1–7.
- [40] Frederick T, Tabit, Elna B. The effects of wet heat treatment on the structural and chemical components of Bacillus sporothermodurans spores [J]. Int J Food Microbiol, 2010, 140: 207–213.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



胡长利, 高级工程师, 主要研究方向
为乳品质量与安全。
E-mail: huchangli@yili.com



黄小平, 高级工程师, 主要研究方向
为食品质量与安全与风险评估。
E-mail: huangxiaoping@yili.com

“食品无损检测技术”专题征稿函

随着近年来食品安全问题的不断发生以及国家对食品安全的重视, 越来越多的研究人员致力于各种食品、食品半成品以及食品原材料的安全性检测。因此, 产生了许多新型的食品检测技术。这些技术因其高效、灵敏、快捷等特点得到广泛的应用。食品无损检测技术作为其中的一种新型检测技术, 因其不会破坏待测物原来状态、化学性质等特点而备受研究人员青睐。

鉴于此, 本刊特别策划“食品无损检测技术”专题。由中国农业大学工学院彭彦昆教授担任专题主编。专题将围绕光谱检测法(紫外光谱法、可见光谱法、近红外光谱法等)、机器视觉检测技术、声学特性及超声波检测技术、力学检测技术、X 射线检测技术、电子鼻技术、电子舌技术、生物传感器技术等话题或您认为该领域有意义的话题展开讨论。计划在 2015 年 9 月出版。

编辑部及彭彦昆教授特邀请各位专家为本专题撰写稿件, 综述、研究论文均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在 2015 年 8 月 10 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoods@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部