

DOI: 10.19333/j.mfkj.2017110251004

羽毛羽绒中微生物含量检测

郑红军 陈 嘉

(内蒙古自治区计量测试研究院, 内蒙古 呼和浩特 010020)

摘要: 参照 GB/T 10288—2003《羽绒羽毛检测方法》中的微生物含量测试方法, 基于单因素试验分析, 重点研究了搅拌速度、搅拌温度、搅拌时间与培养时间对羽毛羽绒中嗜温性需氧菌、亚硫酸还原梭状芽孢杆菌、粪链球菌和沙门氏菌检测结果的影响。结果表明: 搅拌速度、搅拌温度、搅拌时间和培养时间对微生物检测结果具有显著影响。得出的羽毛羽绒微生物检测的最优工艺条件为: 搅拌速度 150 r/min、搅拌温度 20℃、搅拌时间 3 h, 其中, 嗜温性需氧菌的培养时间 72 h、粪链球菌的培养时间 48 h、亚硫酸还原梭状芽孢杆菌的培养时间 36~48 h。

关键词: 羽毛羽绒; 检测; 微生物含量; 工艺优化

中图分类号: TS 102.3 文献标志码: A

Detection of microbiological content in feather and down

ZHENG Hongjun, CHEN Jia

(Inner Mongolia Institute of Metrology Testing and Research, Hohhot, Inner Mongolia 010020, China)

Abstract: Based on the testing methods of microbiological content detection in GB/T 10288—2003 "feather detection methods", the influences of stirring speed, temperature, time and incubation time on the detection results of thermophilic aerobic bacteria, sulfurous acid reduction clostridium, streptococcus faecalis and salmonella were investigated by using single factor analysis method. The obtained results showed that the effect of stirring speed, stirring temperature, stirring time and incubation time on the testing results were significant. The optimum process conditions of microbiological test were as follows: stirring speed 150 r/min, stirring temperature 20 °C, stirring time 3h with an incubation time of thermophilic aerobic bacteria 72 h, an incubation time of sulfurous acid reduction clostridium 36~48 h and an incubation time of streptococcus faecalis 48 h.

Keywords: feather and down; detection; microbiological content; process optimization

我国具有丰富的羽毛羽绒资源, 数据显示, 羽毛羽绒年产量高达六十多万吨, 占世界总产量的60%^[1-2]。日常生活中, 羽毛羽绒依其优良的蓬松性、柔软性和保暖性, 得到了广大消费者的青睐^[3]。在当前提倡的“绿水青山就是金山银山”的经济发展背景下, 羽毛羽绒及其制品的安全、卫生及环保性愈发引起人们的关注^[4]。检测过程中发现, 羽毛羽绒中含有的微生物主要为嗜温性需氧菌、粪链球菌、亚硫酸还原梭状芽孢杆菌和沙门氏菌4种, 上述微生物含量超过标准限量要求后, 都会对人体健康造

成较为严重的影响^[5]。为了检测分析羽毛羽绒中含有的微生物数量, 国内外制定了相关的检测标准, 如 GB/T 10288—2003《羽绒羽毛检测方法》、FZ/T 80001—2002《水洗羽毛羽绒试验方法》、DIN EN 12935—2001《羽毛和羽绒 卫生和清洁要求》和 NF D90-214—1998《羽毛和羽绒 测试方法 微生物状态的测定》等^[6-7]。

本文主要按照 GB/T 10288—2003《羽绒羽毛检测方法》, 系统研究搅拌速度、搅拌温度、搅拌时间与培养时间对羽毛羽绒中嗜温性需氧菌、亚硫酸还原梭状芽孢杆菌、粪链球菌和沙门氏菌检测结果的影响, 以利于当前羽毛羽绒微生物检测工作的改进, 并对今后羽毛羽绒微生物相关检测标准的制定提供一定的理论参考。

收稿日期: 2017-11-22

第一作者简介: 郑红军, 高级工程师, 主要研究方向为化学计量。E-mail: mhj6088@sina.com。

1 试验部分

1.1 主要实验材料

羽毛羽绒(送检样品)、蛋白胨、葡萄糖、酵母浸膏、琼脂、蒸馏水等。

1.2 主要试验仪器与设备

电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); CL-32 L 高压灭菌器(美国 Nicolet 公司); 恒温磁力搅拌器(日本电子株式会社); 电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.3 试验方法

通过多次前期试验检测验证,羽毛羽绒的洗脱液中未发现沙门氏菌,因此参照 GB/T 10288—2003《羽绒羽毛检验方法》,主要对送检的羽毛羽绒样品进行嗜温性需氧菌、粪链球菌、亚硫酸还原梭状芽孢杆菌和沙门氏菌4种微生物含量进行检测,并将所得结果与 GB/T 17685—2003《羽绒羽毛》中微生物的限量进行对比^[8],以判定送检样品安全性。具体方法如下:

①原始滤液制备:从送检的羽毛羽绒中分别取出2份各12g,精确到0.1g;将试样分别放入装有1200~1400 mL 1%蛋白胨生理盐水的烧杯中,搅拌1~5 h;在无菌条件下,过滤2份洗脱液,并混合均匀,得到试验原始滤液;

②嗜温性需氧菌培养:分别取1 mL 原始滤液、1 mL 十进制稀释液和15 mL 营养琼脂进行充分混合,待混合液凝固后放入(30±1)℃恒温箱内培养24~84 h,用于后续检测;

③粪链球菌培养:分别取1 mL 原始滤液、1 mL 十进制稀释液,涂布预先制备好的 Slatetz/Bartley 氏培养基上,倒置平皿于(30±2)℃培养24~84 h,用于后续检测;

④亚硫酸还原梭状芽孢杆菌培养:取上述原始滤液5 mL,置于75℃水浴处理10 min,取1 mL 处理后的原始滤液和十进制稀释液与亚硫酸铁-多黏菌素B琼脂混合均匀,凝固后,再用5 mL 相同培养基覆盖表层,倒置平皿于厌氧罐中,在37℃恒温培养箱中厌氧培养24~84 h,用于后续检测;

⑤沙门氏菌培养:取上述部分原始滤液置于亚硒酸盐胱氨酸增菌液中,将该增菌液在恒温(43±2)℃条件下,培养18 h,分别接种到营养物为HE琼脂和胆硫乳琼脂的培养皿中,在37℃的电热恒温培养箱中,培养36~72 h,用于后续检测。

2 结果与讨论

2.1 搅拌温度对微生物含量的影响

通常微生物的生长周期可分为迟缓期、对数生长期、稳定期和衰亡期4个阶段^[8-9],温度对微生物各个生长阶段的影响较大。同时,不同微生物生长过程受温度变化的影响也各不相同。如嗜温性需氧菌的最适生长温度是45~55℃,在此温度范围内,有利于嗜温性需氧菌的生长,若温度超过最高生长温度,即会改变嗜温性需氧菌的形态和代谢,从而使其蛋白质凝固变性而死亡^[10];粪链球菌可以在10~45℃,pH值9.6或含6.5% NaCl 肉汤培养基中生长,并能耐65℃高温长达30 min^[11];而亚硫酸还原梭状芽孢杆菌由于具有厚而致密的壁,并含有吡啶二羧酸特殊结构,使得其对温度的抵抗力较强,在100℃高温下仍可以存活6~17 min^[1]。

为研究搅拌温度对微生物含量检测的影响,设定搅拌温度分别为10、20、30、40和50℃,其他检测条件为:搅拌时间3 h、搅拌速度150 r/min、培养时间24~84 h,得到的搅拌温度对含菌量的影响见图1。

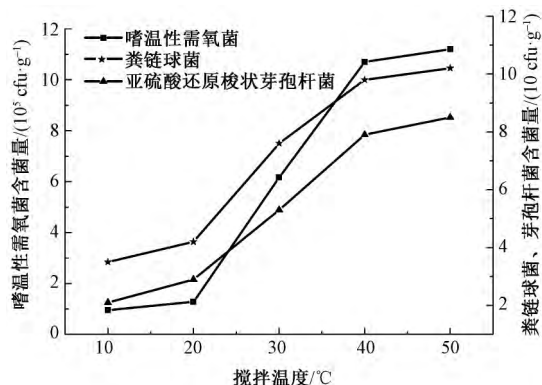


图1 搅拌温度对含菌量的影响

由图1可知,搅拌温度由10℃升高到20℃时,嗜温性需氧菌、粪链球菌和亚硫酸还原梭状芽孢杆菌含量增长速度较为缓慢,继续升高温度,在20~40℃之间,嗜温性需氧菌、粪链球菌和亚硫酸还原梭状芽孢杆菌增长速度最快;当搅拌温度达到40℃后,嗜温性需氧菌含量达到 1.07×10^6 cfu/g,粪链球菌与亚硫酸还原梭状芽孢杆菌含量达到 0.98×10^2 和 0.79×10^2 cfu/g;继续升高搅拌温度,对嗜温性需氧菌、粪链球菌和亚硫酸还原梭状芽孢杆菌含量影响较小。这主要是由于搅拌温度在20~40℃之间,为嗜温性需氧菌、粪链球菌和亚硫酸还原梭状芽孢杆菌的对数生长期,该期间内微生物的细胞代谢和生长繁殖速度迅速,之后进入生长稳定期,升高搅拌

温度对微生物含量的变化影响不大^[5,11]。由于嗜温性需氧菌、粪链球菌和亚硫酸还原梭状芽孢杆菌含量是由羽毛羽绒本身具有的含量和后期自身繁殖生长的含量2部分组成,为了保证试验检测的准确性,在检测过程中,要尽量减少微生物后期自身繁殖的数量。为此在实验检测中,羽毛羽绒搅拌温度选为20℃。

2.2 搅拌时间对微生物含量的影响

设定搅拌时间分别为1、2、3、4、5 h,其他工艺条件为:搅拌温度20℃、搅拌速度150 r/min、培养时间24~72 h,所得的搅拌时间对含菌量的影响见图2。

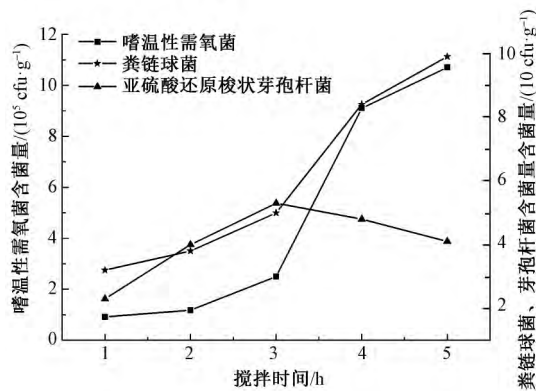


图2 搅拌时间对含菌量的影响

如图2所示,搅拌时间在1~3 h时,羽毛羽绒上的含菌量随搅拌时间延长而增大的幅度较小,再继续延长搅拌时间后,羽毛羽绒中嗜温性需氧菌和粪链球菌含量出现较大增长,而亚硫酸还原梭状芽孢杆菌的含量则有降低的趋势。这主要是由于搅拌时间延长后,羽毛羽绒洗脱液中氧气含量逐渐增多,当搅拌3 h时,洗脱液中的氧气含量可以维持嗜温性需氧菌、粪链球菌和亚硫酸还原梭状芽孢杆菌大部细胞的自身新陈代谢,及小部分细胞的自身代谢物质的积累与转化^[8,11];当搅拌时间超过3 h后,洗脱液中含有的足量氧气有利于细胞的快速繁殖,并去除了微生物代谢过程中产生的废气,导致嗜温性需氧菌和粪链球菌的含量直线增长;然而,亚硫酸还原梭状芽孢杆菌属于厌氧性微生物,在氧气充足的条件下不利于自身繁殖,使得其含量降低^[10]。因此,为了减少检测羽毛羽绒中微生物含量的误差,搅拌时间优选为3 h。

2.3 搅拌速度对微生物含量的影响

设定搅拌速度分别为50、100、150、200、250 r/min,其他工艺条件为:搅拌温度20℃、搅拌时间3 h、培养时间24~84 h,搅拌速度对含菌量的影响见图3。

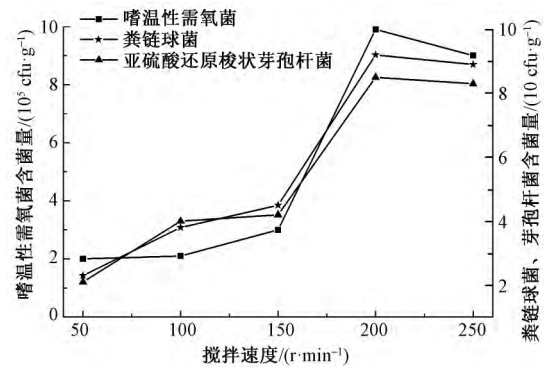


图3 搅拌速度对含菌量的影响

由图3可知,搅拌速度在50~150 r/min范围内,嗜温性需氧菌、粪链球菌和亚硫酸还原梭状芽孢杆菌含量未见较大变化,但随着搅拌速度的提高,微生物菌丝体含量不断增大,当搅拌速度增加到200 r/min时,羽毛羽绒中微生物生长速度最快,且其含量达到最高;继续提高搅拌速度,微生物含量则略微下降。这主要是因为搅拌速度增快,羽毛羽绒洗脱液对微生物菌丝体的剪切作用力增大,使得菌丝体易于被打断,从而对微生物细胞产生较大损伤,不利于细胞繁殖^[12]。因此,实验中的搅拌速度优选为150 r/min。

2.4 培养时间对微生物含量的影响

设定培养时间分别为24、36、48、60、72和84 h,其他工艺条件为:搅拌温度20℃、搅拌时间3 h、搅拌速度150 r/min,所得培养时间对含菌量的影响见图4。

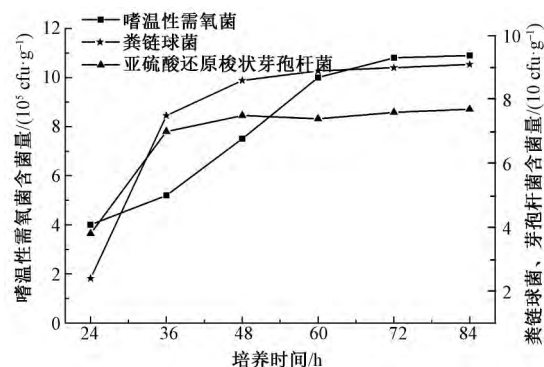


图4 培养时间对含菌量的影响

如图4所示:培养时间由24 h增加到48 h时,嗜温性需氧菌、粪链球菌和亚硫酸还原梭状芽孢杆菌的含量逐渐增多,其中,培养时间增加到36~48 h时,亚硫酸还原梭状芽孢杆菌的含量增长趋势较为稳定,达到菌种的增长平稳期;培养时间延长到48 h后,粪链球菌的含量基本达到稳定,之后继续延长培养时间对粪链球菌的繁殖增长几乎没有影响;当培养时间增加到72 h时,嗜温性需氧菌含量达到最大

值继续增加培养时间,其含量趋于稳定。这主要是由于微生物菌种不同,对其生长繁殖的培养时间不同。培养时间过短,微生物菌种繁殖不充分,生成的菌落数量较少,菌落数量不易检测,使得菌落检测数值偏小;而培养时间过长,易于造成菌种感染,不利于嗜温性需氧菌、粪链球菌和亚硫酸还原梭状芽孢杆菌的生长,也会影响检测结果的准确性^[8]。因此,综合考虑后,嗜温性需氧菌的培养时间选为72 h,粪链球菌的培养时间选为48 h,亚硫酸还原梭状芽孢杆菌的培养时间选为36~48 h。

3 结 论

①采用不同的搅拌温度、搅拌时间、搅拌速度和培养时间对羽毛羽绒中嗜温性需氧菌、粪链球菌和亚硫酸还原梭状芽孢杆菌的含菌量分析,发现搅拌温度、搅拌时间、搅拌速度和培养时间对嗜温性需氧菌、粪链球菌和亚硫酸还原梭状芽孢杆菌的含菌量检测结果会产生较大的影响。

②羽毛羽绒微生物检测的最优工艺条件为:搅拌温度20℃、搅拌时间3 h、搅拌速度150 r/min、嗜温性需氧菌的培养时间72 h、粪链球菌的培养时间48 h、亚硫酸还原梭状芽孢杆菌的培养时间36~48 h。

参考文献:

[1] 张娟. 羽毛纤维的前处理与染色工艺研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2012.
[2] PRIIT Kilgas, PAULI Saag, MARKO Mägi, et al. Variation in assemblages of feather bacteria in relation to

plumage color in female great tits [J]. *Condor*, 2012, 114(3): 606-611.
[3] 赵玉萍, 张娟, 郭雅琳, 等. 基于响应面分析法的超声波洗涤羽毛纤维工艺条件优化 [J]. *纺织学报*, 2012, 33(7): 24-30.
[4] 张娟, 赵玉萍, 王玫, 等. 利用线性回归方程分析羽毛纤维的染色性能 [J]. *毛纺科技*, 2013, 41(3): 5-9.
[5] 黄怡, 谭玉静, 陈慧, 等. 羽毛羽绒微生物检测方法初步研究 [J]. *中国纤检*, 2008(10): 44-47.
[6] MOUSAVI Somayeh, SALOUTI Mojtaba, SHAPOURY Reza, et al. Optimization of keratinase production for feather degradation by bacillus subtilis [J]. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2013, 6(8): 463-468.
[7] 涂貌贞. 水洗羽毛羽绒检验中的常见问题探讨 [J]. *中国纤检*, 2011(23): 62-63.
[8] ELISA Adella, SALVADOR Calvet, ADRIANO Pérez-Bonillab, et al. Air disinfection in laying hen houses: effect on airborne microorganisms with focus on *Mycoplasma gallisepticum* [J]. *Biosystems Engineering*, 2015, 129: 315-323.
[9] 万旺军, 胡巍. 出口羽绒微生物状况合格控制点研究 [J]. *纺织科技进展*, 2009(6): 54-56.
[10] 王华雄, 宋保国. 羽绒羽毛微生物问题浅析 [J]. *检验检疫科学*, 2006(2): 58-60.
[11] 周德庆. 微生物学教程 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
[12] 毛勇, 毛健, 李华钟, 等. 溶氧控制条件对双孢菇发酵产胞外多糖的影响 [J]. *食品科学*, 2013, 34(1): 155-159.