

孙丽娜, 李裕卫, 刘昌林, 等. 微酸性电解水对肠炎沙门氏菌的杀菌机制初探 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(9): 146–152. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022060100

SUN Lina, LI Yuwei, LIU Changlin, et al. A Preliminary on the Bactericidal Mechanism of Slightly Acidic Electrolyzed Water on *Salmonella enteritidis*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(9): 146–152. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022060100

· 生物工程 ·

微酸性电解水对肠炎沙门氏菌的 杀菌机制初探

孙丽娜¹, 李裕卫², 刘昌林², 袁兴云¹, 王宇辰¹, 贾颖琪¹, 臧一天¹, 莫庆楠¹, 张贝贝¹,
郑家慧¹, 张 冉¹, 舒邓群^{1,*}

(1.江西农业大学动物科学技术学院, 南昌市动物健康与安全生产重点实验室, 江西南昌 330045;
2.南昌市农业科学院, 江西南昌 330299)

摘 要:为研究微酸性电解水 (Slightly Acidic Electrolyzed Water, SAEW) 对肠炎沙门氏菌的杀菌机制, 本文探讨了 SAEW 对肠炎沙门氏菌细胞膜通透性、细胞膜完整性、胞内活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 及胞内 ATP 等的影响。试验结果显示, 有效氯浓度为 10 mg/L 的 SAEW 处理 1 min 后, 可杀灭鸡蛋表面肠炎沙门氏菌 $2.04 \lg$ (CFU/g); 与对照组相比, SAEW 处理组菌悬液的电导率升高, 由 $13.78 \pm 0.13 \text{ ms/cm}$ 显著增加到 $16.32 \pm 0.10 \text{ ms/cm}$ ($P < 0.05$), 蛋白质泄漏量增加, 由 $0.07 \pm 0.04 \text{ g prot/L}$ 显著增长至 $0.30 \pm 0.03 \text{ g prot/L}$ ($P < 0.05$), 核酸泄漏量增加, ROS 积累量增加, 胞内 ATP 含量降低。扫描电镜 (Scanning Electron Microscope, SEM) 显示, 经 SAEW 处理后, 肠炎沙门氏菌的细胞壁结构不完整, 遭到破坏, 有明显的穿孔现象, 且许多细菌表面凹陷变形或破碎粘连。试验结果表明, SAEW 能够显著提高肠炎沙门氏菌细胞膜的通透性并严重破坏细胞膜的完整性, 导致细胞内蛋白质、核酸、ATP 等内容物泄漏, 进而导致肠炎沙门氏菌胞内 ROS 的积累。

关键词:微酸性电解水, 肠炎沙门氏菌, 杀菌机制

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)09-0146-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022060100

本文网刊:



A Preliminary on the Bactericidal Mechanism of Slightly Acidic Electrolyzed Water on *Salmonella enteritidis*

SUN Lina¹, LI Yuwei², LIU Changlin², YUAN Xingyun¹, WANG Yuchen¹, JIA Yingqi¹, ZANG Yitian¹,
MO Qingnan¹, ZHANG Beibei¹, ZHENG Jiahui¹, ZHANG Ran¹, SHU Dengqun^{1,*}

(1.Nanchang Key Laboratory of Animal Health and Safety, College of Animal Science and Technology, Jiangxi
Agricultural University, Nanchang 330045, China;
2.Nanchang Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330299, China)

Abstract: In order to study the bactericidal mechanism of slightly acidic electrolyzed water (SAEW) against *Salmonella enteritidis*, the effects of SAEW on cell membrane permeability, cell membrane integrity, reactive oxygen species (ROS), and intracellular ATP of *Salmonella enteritidis* were studied. The results showed that $2.04 \lg$ (CFU/g) of *Salmonella enteritidis* on the surface of eggshells was inactivated after the SAEW treatment at the available chlorine concentration of 10 mg/L for 1 min. Moreover, relative to the control group, the conductivity of bacterial suspension of *Salmonella enteritidis* was increased from $13.78 \pm 0.13 \text{ ms/cm}$ to $16.32 \pm 0.10 \text{ ms/cm}$ ($P < 0.05$) in the SAEW group. In addition, the protein leakage in the bacterial cells was significantly increased from $0.07 \pm 0.04 \text{ g prot/L}$ to $0.30 \pm 0.03 \text{ g prot/L}$ ($P < 0.05$). Moreover, the SAEW treatment increased the nucleic acid leakage and ROS accumulation and the intracellular ATP content

收稿日期: 2022-06-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31860665); 江西省重点研发计划 (20202BBF63009); 江西省教育厅科学技术研究青年项目 (GJJ190243)。

作者简介: 孙丽娜 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 动物健康与安全生产, E-mail: izzh107680@163.com。

* 通信作者: 舒邓群 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 动物健康与安全生产, E-mail: 13607047771@163.com。

reduction. The result of SEM also showed that, after the SAEW treatment, the cell wall structure of *Salmonella enteritidis* was incomplete, damaged and obviously perforated, and many bacterial surfaces were sunken, deformed or broken and adhered. The results showed that SAEW significantly increased the permeability and seriously destroyed the integrity of the cell membranes of *Salmonella enteritidis*, which led to the leakage of intracellular proteins, nucleic acids, ATP and other contents, leading to the accumulation of ROS.

Key words: slightly acidic electrolyzed water; *Salmonella enteritidis*; sterilization mechanism

肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*, *S. enteritidis*)作为一种重要的食源性病原菌,在自然界中广泛存在^[1-2],据统计,每年由沙门氏菌引起的急性胃肠炎病例数量占食物中毒总数的 40%~60%,尤其是在中国,高居首位^[3]。人感染后的临床症状表现为腹泻、呕吐、发热,严重者可能会引起肠炎;畜禽感染后会引起抵抗力和免疫力下降,还会导致怀孕母畜流产,严重情况下会导致大量死亡,并且肠炎沙门氏菌会将污染的畜禽产品作为载体来危害人类健康^[2,4]。对污染的食品采用微酸性电解水(Slightly Acidic Electrolyzed Water, SAEW)进行售前清洗是解决该问题的方法之一。SAEW 是一种新型的绿色环保消毒剂,因其广谱高效且对环境友好的特点而被广泛应用于食品中^[5-6]。

SAEW 的杀菌效果目前已经得到了广大学者的认可,对于 SAEW 的基础理论研究主要集中在杀菌机制上。近年来,研究人员对于 SAEW 的杀菌机制进行了较多研究,提出了几种可能的杀菌学说,包括有效氯学说、氧化还原电位(Oxidation-Reduction Potential ORP)学说、pH 学说、活性氧学说和自由基学说等,其中,得到广泛认可的是有效氯学说,且有效氯学说被确立为酸性电解水杀灭病原微生物的主要学说^[7]。臧一天^[8]认为 SAEW 中杀菌起主导作用的是以 HClO 形式存在的有效氯。FUKUZAKI^[9]研究 HClO 可以轻易进入细菌、真菌或病毒内,与细胞中一些重要的碳水化合物活性酶发生反应,从而抑制葡萄糖代谢;也可以产生 Cl⁻改变细胞渗透压,使得细胞内容物外流而失活。南松剑等^[10]发现微酸性电解水处理可导致灰葡萄孢菌的孢子细胞皱缩,质壁分离,细胞质溢出,细胞器溶解,最终达到杀菌的效果。LI 等^[11]的研究结果表明,微酸性电解水对单核细胞增生李斯特菌的杀菌机制一方面为破坏细胞膜导致电解质、蛋白质和核酸等物质的泄露,另一方面为抑制抗氧化酶活性,破坏细胞内活性氧平衡最终导致胞内活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)上升。然而 LIAO 等^[12]研究发现 SAEW 并没有导致微生物细胞内活性氧 ROS 的积累,认为 SAEW 对微生物失活与 ROS 无关。关于 SAEW 杀灭细菌时,其胞内是否存在 ROS 上升的现象仍存在很大争议,因此,进一步探究 SAEW 作用于肠炎沙门氏菌时,是否会造成其胞内 ROS 的累积,便成为了一个亟需解决的问题。

本研究通过测定 SAEW 对肠炎沙门氏菌菌悬液的电导率、蛋白质-核酸的泄漏量、胞内 ATP 及胞

内 ROS 等指标的影响,并通过扫描电镜观察 SAEW 对肠炎沙门氏菌的微观结构破坏情况,探究 SAEW 对肠炎沙门氏菌的杀菌机制,以期微酸性电解水在食品行业中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*, *S. enteritidis*, BNCC-103134) 购自商城北纳创联生物科技有限公司;大小均一的新鲜鸡蛋(57±2)g 购于附近农贸市场;活性氧检测试剂盒 中国南京建成生物工程有限公司;ATP 检测试剂盒 碧云天生物工程研究所;0.1% 蛋白胨水溶液培养基、胰蛋白胨大豆肉汤、PBS 缓冲液 均由北京奥博星生物技术有限责任公司生产;NaCl、HCl 分析纯,广东西陇科学股份有限公司;硫代硫酸钠 分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;双蒸水 采用 SZ-93 型自动双重水蒸馏器制取,并采用 DGS-280C 高压灭菌锅进行灭菌后备用。

SZ-93 型自动双重水蒸馏器 上海银泽仪器设备有限公司;DGS-280C 高压灭菌锅 上海力辰邦西仪器科技有限公司;V9 消毒液制造机 中山市李夫人电器有限公司;CHA-S 气浴恒温振荡器 江苏荣华仪器制造有限公司;LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;Sorvall ST 8R 高速冷冻离心机 赛默飞世尔科技有限公司;YXL-1A 有效氯检测仪 上海海争电子科技有限公司;SX-630 型笔式 ORP 计 上海三信仪表厂;HM-30R pH 计 上海雷磁仪器股份有限公司;ATY124 电子天平 日本岛津公司;DDS-11A 电导率仪 上海雷磁仪器股份有限公司;752N 紫外可见分光光度计 杭州精科仪器有限公司;Regulus8100 场发射扫描电子显微镜 日立高新技术公司;3001 Varioskan Flash 多功能读数仪 赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 试验有效氯浓度的确定与电解水制备 有效氯浓度的确定:南松剑等^[10]选用微酸性电解水有效氯浓度为 10 mg/L,对灰葡萄孢菌杀菌效果与作用机制进行研究,故本文选用有效氯浓度为 10 mg/L 对肠炎沙门氏菌的杀菌机制进行研究,该剂量在食品安全应用范围内^[13]。

SAEW 制备:参考袁兴云等^[14]报道的方法,采用消毒液制造机制备,用自来水配制 1 g/L NaCl 溶液 2 L,加入 0.35 mL 浓 HCl 后,电解 1.5 h 制得 pH6.13、有效氯浓度为 42 mg/L 的 SAEW,随后用灭菌过的

双蒸水稀释以得到所需有效氯浓度 10 mg/L, pH6.19 和 ORP 值 880 mV 的 SAEW, 备用。

1.2.2 菌悬液的制备 将 *S. enteritidis* 冻干粉接种到胰蛋白胨大豆肉汤上, 37 °C 振荡培养 24 h 活化, 然后以 1:1 的比例与 40% 的甘油在冻存管中混合后, 置入-80 °C 冰箱保存备用。

取冻存管一根, 37 °C 水浴 2 min 速溶, 倒入胰蛋白胨大豆肉汤中, 37 °C 振荡培养 24 h 后, 取 10 mL 培养物置于冷冻离心机中, 4 °C、4000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀物用 0.1% 的蛋白胨水洗涤 3 次, 离心, 弃上清液, 沉淀物用 10 mL 0.1% 蛋白胨水制成 8~9 lg CFU/mL 菌悬液备用。菌悬液浓度通过接种 0.1 mL 经梯度稀释的原菌液于平板计数琼脂中, 在 37 °C 孵育 24 h, 平板计数确定^[14]。

1.2.3 鸡蛋准备和菌悬液接种 将新鲜鸡蛋用自来水冲洗, 用稀释的 84 消毒液(有效氯浓度 29 mg/L)浸泡 10 min, 取出后用灭菌过的双蒸水反复冲洗以除去表面的 84 消毒液, 将鸡蛋放在超净工作台晾干备用。

用移液枪取 1 mL 原菌液于 200 mL 0.1% 蛋白胨水中, 混合均匀, 将鸡蛋浸入该菌悬液中 10 min, 用无菌鸡蛋夹取出放入超净工作台室温下干燥 1 h, 以便肠炎沙门氏菌在鸡蛋表面附着^[15]。

1.2.4 SAEW 对鸡蛋表面肠炎沙门氏菌的杀菌效果

1.2.4.1 试验分组及处理方式 参考 ZANG 等^[15]报道的方法, 杀菌效果试验分为对照组和处理组, 采用浸泡处理方式, 具体处理方式如下:

CK 组: 将接种的鸡蛋放入装有 600 mL 无菌双蒸水的无菌塑料袋中, 持续 1 min, 处理后, 将鸡蛋放入装有 50 mL 0.1% 无菌蛋白胨水的无菌塑料袋中, 用力摇晃 1 min, 检测 0.1% 蛋白胨水中的活菌数。

SAEW 组: 将接种的鸡蛋放入装有 600 mL SAEW 的无菌塑料袋中, 持续 1 min, 处理后, 将鸡蛋放入装有 50 mL 0.5% 硫代硫酸钠无菌缓冲溶液的无菌塑料袋中, 用力摇晃 1 min, 检测中和缓冲溶液中的活菌群数。

1.2.4.2 微生物分析 采用平板计数法检测对照组和处理组样品的肠炎沙门氏菌菌落总数。将样品用 0.1% 蛋白胨水进行梯度稀释, 取 0.1 mL 涂板在平板计数琼脂上, 每个样品一式三份, 37 °C 培养 24 h 后进行计数。

1.2.5 SAEW 对肠炎沙门氏菌的杀菌机制指标测定

1.2.5.1 试验分组及处理方式 参考 DING 等^[16]报道的方法, 杀菌机制试验分为对照组和处理组, 具体处理方式如下:

CK 组(对照组): 将 1 mL 菌悬液转移到装有 9 mL PBS 缓冲溶液的试管中, 混合 1 min, 将混合后的溶液转移 1 mL 到含有 9 mL 0.85% NaCl 溶液的试管中, 用于后续指标测量。

SAEW 组: 将 1 mL 菌悬液转移到装有 9 mL SAEW 溶液的试管中, 混合 1 min, 将混合后的溶液转移 1 mL 到含有 9 mL 中和缓冲溶液(0.5% 硫代硫酸钠溶液, 用 0.85% NaCl 溶液配制)的试管中, 用于后续指标测量。以上试验重复 3 次。

1.2.5.2 电导率 菌体膜通透性通过菌液中电导率的变化来反映。参考 TANG 等^[17]报道的方法, 将上述处理后的各组溶液, 4000 r/min, 离心 10 min, 取上清液, 用电导率仪(电极常数=1)测量其电导率。

1.2.5.3 蛋白质-核酸泄漏量 蛋白质分子具有-NH₃⁺基团, 当棕红色的考马斯亮蓝显色剂加入蛋白标准液或样品中时, 考马斯亮蓝染料上的阴离子与蛋白-NH₃⁺结合, 使溶液变为蓝色, 通过测定吸光度可计算出蛋白含量。参考 HAO 等^[18]报道的方法, 将上述处理后的各组溶液, 9800 r/min, 离心 3 min, 取 0.05 mL 上清液用 3 mL 显色液染色 10 min, 采用紫外可见分光光度计测定 595 nm 波长下的吸光度值, 测定蛋白质泄露量。

通过紫外可见分光光度计在 260 nm 处测得吸光度值来反映核酸的泄露。参考 ZENG 等^[19]报道的方法, 将上述处理后的各组溶液, 12000 r/min, 离心 3 min, 取上清液, 采用紫外可见分光光度计测定 260 nm 的吸光度值, 确定核酸泄露量。

1.2.5.4 扫描电镜(SEM) 参考林祎^[20]报道的方法, 将上述处理后的各组溶液, 6000 r/min, 4 °C 离心 5 min, 弃上清液, 沉淀用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 加入 1 mL 2.5% 的戊二醛进行固定, 置入 4 °C 冰箱, 16 h 后取出, 用 PBS 缓冲液清洗样品 3 次(目的是清除戊二醛), 随后分别用 30%、50%、70%、80%、90% 的乙醇洗脱一次, 每次 15 min, 再用 100% 乙醇洗脱 2 次, 每次 20 min; 随后用 100% 乙醇与乙酸异戊酯 1:1 的混合物洗脱 1 次, 持续 30 min, 最后用纯的乙酸异戊酯洗脱 1 次, 持续 1 h。每次洗脱都要 8000 r/min, 4 °C 离心 5 min, 弃上清液。将装有沉淀的离心管置入-20、-40、-80 °C 各 8 h, 然后进行冷冻干燥 8 h, 干燥后的样品用牙签挑出, 粘在导电胶带上, 用牙签碾平, 用洗耳球把多余的样品去除, 喷铂, 用扫描电镜观察其微观结构。

1.2.5.5 活性氧(ROS) 参考 YE 等^[21]报道的方法, 采用活性氧检测试剂盒中的荧光探针(DCFH-DA, 2, 7-二氯氢荧光素二乙酸酯)检测肠炎沙门氏菌中的 ROS 水平。荧光强度与 ROS 水平成正比。将上述处理后的各组溶液, 在冷冻离心机中以 2000 r/min 离心 5 min。然后清洗一次, 在 10 μmol/L 的 DCFH-DA 工作溶液中重悬, 37 °C, 黑暗环境下孵育 40 min。采用 Varioskan Flash 多功能读数仪检测 ROS 含量(激发波长为 488 nm, 发射波长为 525 nm)。

1.2.5.6 胞内 ATP 含量 参考 TURGIS 等^[22]报道的方法, 使用 ATP 检测试剂盒测量细胞内 ATP 浓度。将上述处理后的各组溶液, 4 °C, 4000 g 离心 10 min,

弃上清液,然后向细胞沉淀加入 1 mL 的 ATP 裂解缓冲液,4 ℃ 放置 15 min 后,4 ℃,12000 g 条件下离心 5 min,随后,将 20 μ L 的样品添加到 100 μ L ATP 检测工作溶液,利用 luminometer 功能的 Varioskan Flash 多功能读数仪测定 ATP 浓度。检验结果用 URL 值表示。

1.3 数据处理

试验数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。采用 Origin 9.1 软件分析处理数据,运用单因素方差分析对试验数据进行统计,采用 LSD 检验进行显著性分析,以 $P<0.05$ 为差异显著性水平。

2 结果与分析

2.1 SAEW 对鸡蛋表面肠炎沙门氏菌的杀菌效果

鸡蛋表面细菌起始总数为 6.54 ± 0.11 lg(CFU/g),如图 1 所示,经 SAEW 处理 1 min 后鸡蛋表面的肠炎沙门氏菌活菌数为 4.50 ± 0.12 lg(CFU/g),其杀灭值为 2.04 lg(CFU/g)。与对照组之间存在显著差异($P<0.05$)。

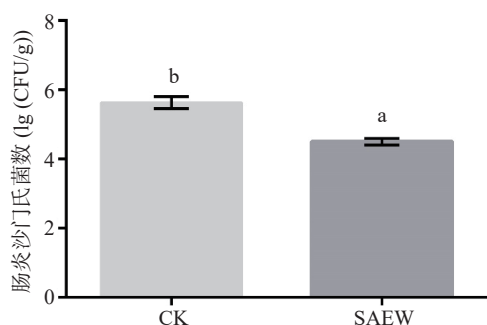


图 1 微酸性电解水对蛋壳表面肠炎沙门氏菌的杀菌效果
Fig.1 Inactivation of *S. enteritidis* on the surface of eggshells by slightly acidic electrolyzed water
注:图中值均为“平均数 $\pm$ 标准差”,不同字母表示各组之间存在显著性差异($P<0.05$);图 2~图 3,图 5~图 6 同。

2.2 SAEW 对肠炎沙门氏菌的杀菌机制指标测定

2.2.1 电导率 如图 2 所示,未经 SAEW 处理的肠炎沙门氏菌菌悬液电导率为 13.78 ± 0.13 ms/cm,但经 10 mg/L 的 SAEW 处理 1 min 后,菌悬液电导率显著增长到了 16.32 ± 0.10 ms/cm($P<0.05$)。TANG 等^[17]发现电解氧化水(Electrolyzed Oxidizing Water,EOW)

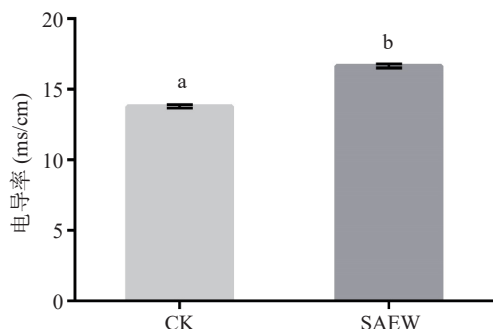


图 2 微酸性电解水对肠炎沙门氏菌电导率的影响
Fig.2 Effect of slightly acidic electrolyzed water on the conductivity of *S. enteritidis*

处理枯草芽孢杆菌时,其电导率上升。丁琳琳等^[23]也发现经 SAEW 处理的黑胸败血芽孢杆菌,细胞膜遭到破坏,电解质外渗,外电导率上升。菌悬液的电导率变化可以反映细胞膜的通透性变化,肠炎沙门氏菌的菌悬液电导率升高可能是因为经 SAEW 处理的肠炎沙门氏菌内容物泄露、电解质外渗,从而导致电导率增加。

2.2.2 蛋白质-核酸泄漏量 由图 3 可知,经 SAEW 处理的肠炎沙门氏菌与对照组相比,蛋白质泄漏量由 0.07 ± 0.04 g prot/L 增长至 0.30 ± 0.03 g prot/L,显著增加($P<0.05$)。这与之前的研究报道相似,ZENG 等^[19]发现,在用电解氧化水处理 1 min 后,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌细胞中蛋白质的泄漏水平分别增加到 20.50 和 15.00 μ g/mL(对应的电解氧化水的有效氯浓度分别为 12.40 mg/L 和 37.30 mg/L),明显高于未处理组。

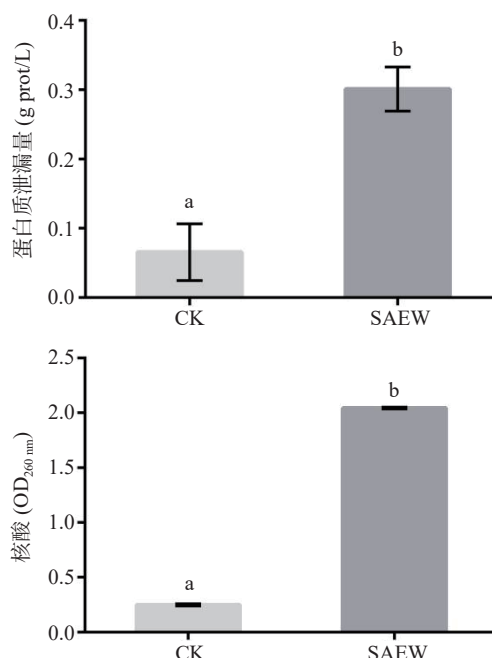


图 3 微酸性电解水对肠炎沙门氏菌蛋白质-核酸泄漏量的影响

Fig.3 Effects of slightly acidic electrolyzed water on the protein-nucleic acid leakage of *S. enteritidis*

SAEW 处理组的核酸泄漏量与对照组相比显著性增加($P<0.05$),OD₂₆₀ 值由 0.25 ± 0.10 增加到 2.04 ± 0.01 。LIU 等^[24]也发现了经电解氧化水处理的假单胞菌,细胞外的核酸水平升高,显著高于未处理组。SAEW 处理细胞外蛋白质和核酸的水平显著性增加,可能是由于 SAEW 处理后的肠炎沙门氏菌的细胞膜受到破坏,导致细胞内蛋白质与核酸等内容的泄漏。可能是由 SAEW 中的有效氯成分 HOCl 和 OCl⁻攻击细胞膜,引起沙门氏菌细胞膜损伤导致的^[9]。

2.2.3 扫描电镜(SEM) 图 4 显示,处理前的肠炎沙门氏菌菌体大多形态两端钝圆,表面光滑平整,呈现典型的短杆状,大小较为一致,且没有出现损伤和细胞内物质流出。经 SAEW 处理后,细胞壁结构不完

整,遭到破坏,有明显的穿孔现象,且许多细菌表面凹陷变形或破碎粘连,这些都是细胞内容物泄露的表现。KIM等^[25]研究了微酸性电解水对鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌的细胞形态的影响,结果显示细胞形态发生改变,但仍维持细胞形状,内容物紊乱,细胞功能受到影响;随着处理浓度的增加,观察到细胞膜完整性被破坏,细胞通透性改变。扫描电镜图验证了前面所提的SAEW处理可改变细胞膜的通透性和破坏细胞膜的完整性,导致菌悬液电导率升高,细胞内蛋白质、核酸等内容物泄露的结果。

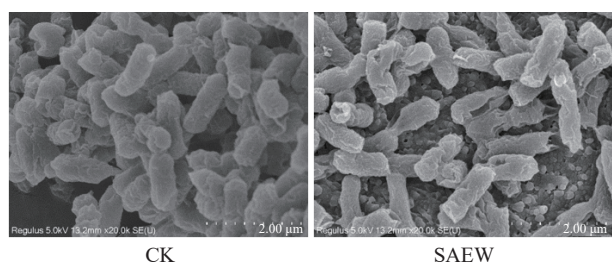


图4 微酸性电解水对肠炎沙门氏菌菌体形态的影响
Fig.4 Effect of slightly acidic electrolyzed water on the bacterial morphology of *S. enteritidis*

2.2.4 活性氧(ROS) 由图5所示,对照组的ROS含量为 8.66 ± 0.20 AU,经SAEW处理的肠炎沙门氏菌ROS含量为 9.66 ± 0.29 AU,表明SAEW处理会导致ROS的含量显著性增加($P < 0.05$)。YE等^[21]在研究SAEW对同为革兰氏阴性菌的大肠杆菌的杀菌机制时,也发现SAEW处理后大肠杆菌中ROS含量显著性增加的现象。

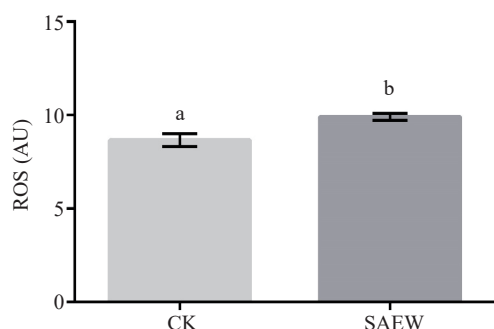


图5 微酸性电解水对肠炎沙门氏菌活性氧的影响
Fig.5 Effects of slightly acidic electrolyzed water on the ROS of *S. enteritidis*

在各种类型的细胞中,ROS是诱导细胞凋亡的重要因素^[26]。ROS是由细菌细胞代谢产生的,过量的ROS会损害细菌的功能,包括影响DNA的稳定性和诱导脂质的氧化变性,细菌可以通过自由基清除系统来控制ROS水平^[17]。在本研究中,SAEW处理的肠炎沙门氏菌ROS含量显著性增加($P < 0.05$)。DING等^[16]发现SAEW处理金黄色葡萄球菌时可以使TTC-脱氢酶的相对活性降低65.84%。脱氢酶是呼吸链中的关键酶,脱氢酶活性的降低可能导致了

ROS的积累。因此,推测经SAEW处理的肠炎沙门氏菌细胞内ROS含量增加的主要原因可能是SAEW有效氯的主要成分HOCl进入细菌细胞内,攻击线粒体电子呼吸链的还原酶,导致ROS的累积。对于SAEW导致沙门氏菌内部ROS上升的具体机制的问题,在本次研究中未曾探讨,值得进一步研究探索。

2.2.5 胞内ATP含量 由图6可知,经SAEW处理后的肠炎沙门氏菌,胞内ATP显著性降低($P < 0.05$),由7416.42 URL降低到5725.77 URL。CAI等^[27]在研究酸性电解水对荧光假单胞菌细胞内ATP影响时发现,与对照组相比,ATP浓度显著下降,并且随着酸性电解水处理浓度的增加而显著下降。王艳艳^[28]也发现,用微酸性电解水处理的阪崎克罗诺杆菌与未处理组相比,胞内ATP的含量降低。

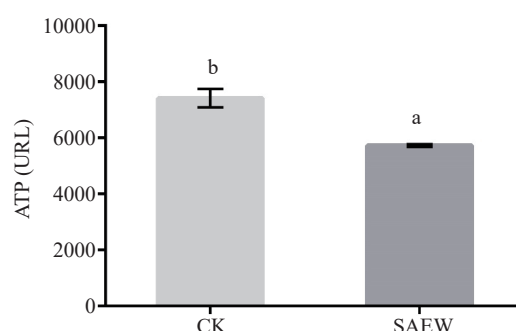


图6 微酸性电解水对肠炎沙门氏菌胞内ATP的影响
Fig.6 Effects of slightly acidic electrolyzed water on the intracellular ATP of *S. enteritidis*

ATP是生物体最直接的能量来源,是微生物存活不可或缺的物质^[29]。在正常情况下,细菌细胞内ATP浓度会保持稳定,但当细菌细胞膜受到损伤或死亡时,细胞内ATP含量会受到影响^[30]。试验结果表明,经SAEW处理后的肠炎沙门氏菌,胞内ATP显著性降低($P < 0.05$)。这可能是由于肠炎沙门氏菌的完整性被SAEW破坏,菌体细胞膜通透性增加,导致ATP流失,胞内ATP大量减少。此外,也有可能是SAEW的有效氯成分次氯酸进入到线粒体中,破坏掉线粒体中的电子呼吸传递链,进而造成线粒体电子呼吸传递紊乱,ROS产生的同时,使电子无法传递,无法偶联使ADP与PI合成ATP,从而导致检测的含量降低^[31]。

3 结论

本文以电导率、蛋白质-核酸泄漏量、扫描电镜、ROS和胞内ATP含量为指标,研究了SAEW对肠炎沙门氏菌的杀菌机制。结果显示,与对照组相比,当SAEW的有效氯浓度为10 mg/L,处理时间为1 min时,菌悬液的电导率升高,蛋白质-核酸泄漏量增加,扫描电镜显示,经SAEW处理后的肠炎沙门氏菌细胞壁结构不完整,遭到破坏,有明显的穿孔现象,且许多细胞表面凹陷变形或破碎粘连,与此同时,胞内ATP含量降低,ROS含量增加。综上所述,SAEW处理能够显著地提高细胞膜的通透性和严重破坏细

胞膜的完整性,导致细胞膜内蛋白质、核酸、ATP 等内容物泄漏以及 ROS 的上升。

参考文献

- [1] 吕兴帮,郝贺,张博,等.鸡肠炎沙门氏菌研究进展[J].*畜禽业*,2022,33(5):8-11. [LÜ X B, HAO H, ZHANG B, et al. Research progress of *Salmonella enteritis* in chicken[J]. *Livestock Industry*, 2022, 33(5): 8-11.]
- [2] DEREU K, MESSENS W, HEYNDRIX M, et al. Bacterial contamination of table eggs and the influence of housing systems[J]. *World's Poultry Science Journal*, 2008, 64(1): 5-19.
- [3] 王军,郑增忍,王晶钰.动物源性食品中沙门氏菌的风险评估[J].*中国动物检疫*,2007(4):23-25. [WANG J, ZHENG Z R, WANG J Y. Risk assessment of *Salmonella* in foods of animal origin[J]. *China Animal Quarantine*, 2007(4): 23-25.]
- [4] 刘乐文.盲肠 mRNAs 与 miRNAs 对鸡肠炎沙门氏菌感染的表达调控[D].泰安:山东农业大学,2021. [LIU L W. Regulation of mRNAs and miRNAs in the response to *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* infection in chicken cecum[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2021.]
- [5] RAO H, XUE F, MA S H, et al. Contribution of slightly acidic electrolytic water (SAEW) to food safety, nutrients enrichment, and allergenicity reduction of peanut sprouts[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2022, 46(3): e16396.
- [6] LAN W Q, LANG A, ZHOU D P, et al. Combined effects of ultrasound and slightly acidic electrolyzed water on quality of sea bass (*Lateolabrax japonicus*) fillets during refrigerated storage[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021, 81: 105854.
- [7] 杨楠.微酸性电解水对南美白对虾虾仁杀菌效果及品质影响的研究[D].杭州:浙江大学,2013. [YANG N. Study on sterilization of slightly acidic electrolyzed water to white shrimp and effects on its qualities[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.]
- [8] 臧一天.微酸性电解水对进入鸡场物品表面消毒方法研究[D].北京:中国农业大学,2015. [ZANG Y T. Study on methods of slightly acidic electrolyzed water disinfection on facility surfaces entering the poultry farm[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.]
- [9] FUKUZAKI S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes[J]. *Biocontrol Science*, 2006, 11(4): 147-157.
- [10] 南松剑,黄晓伶,王朔,等.微酸性电解水对灰葡萄孢菌杀菌效果与作用机制研究[J].*农业机械学报*,2019,72(2):1-10. [NAN S J, HUANG X L, WANG S, et al. Investigation on microbicidal potential and action mechanism for *Botrytis cinerea* of slightly acidic electrolyzed water[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2019, 72(2): 1-10.]
- [11] LI H Y, LIANG D, HUANG J, et al. The bactericidal efficacy and the mechanism of action of slightly acidic electrolyzed water on *Listeria monocytogenes* survival[J]. *Foods*, 2021, 10(11): 2671.
- [12] LIAO X Y, XUAN X T, LI J, et al. Bactericidal action of slightly acidic electrolyzed water against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* via multiple cell targets[J]. *Foods*, 2017, 79(1): 380-385.
- [13] DENG L Z, MUJUMDAR A S, PAN Z, et al. Emerging chemical and physical disinfection technologies of fruits and vegetables: A comprehensive review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(15): 2481-2508.
- [14] 袁兴云,张贝贝,莫庆楠,等.微酸性电解水对受鸡粪液污染鸡蛋表面沙门氏菌的喷雾消毒效果[J].*农业工程学报*,2021,37(20):333-338. [YUAN X Y, ZHANG B B, MO Q N, et al. Disinfection efficacy of slightly acidic electrolyzed water sprayed on *Salmonella* on the chicken manure contaminated eggs[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2021, 37(20): 333-338.]
- [15] ZANG Y T, BING S H, LI Y J, et al. Efficacy of slightly acidic electrolyzed water on the microbial safety and shelf life of shelled eggs[J]. *Poultry Science*, 2019, 98(11): 5932-5939.
- [16] DING T, XUAN X T, LI J, et al. Disinfection efficacy and mechanism of slightly acidic electrolyzed water on *Staphylococcus aureus* in pure culture[J]. *Food Control*, 2016, 60: 505-510.
- [17] TANG W W, ZENG X P, ZHAO Y S, et al. Disinfection effect and its mechanism of electrolyzed oxidizing water on spores of *Bacillus subtilis* var. *niger*[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2011, 20(4): 889-895.
- [18] HAO J X, WU T J, LI H J, et al. Differences of bactericidal efficacy on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis* of slightly and strongly acidic electrolyzed water[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2017, 10(1): 155-164.
- [19] ZENG X P, TANG W W, YE G Q, et al. Studies on disinfection mechanism of electrolyzed oxidizing water on *E.coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Food Science*, 2010, 75(5): 253-260.
- [20] 林伟.声热复合处理对液态乳中致病菌的杀菌效果与理化特性影响研究[D].杭州:浙江大学,2018. [LIN Y. Effect of thermo-sonication treatment on pathogens inactivation and physico-chemical properties of liquid milk[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018.]
- [21] YE Z Y, WANG S, CHEN T, et al. Inactivation mechanism of *Escherichia coli* induced by slightly acidic electrolyzed water[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 6279.
- [22] TURGIS M, HAN J, CAILLET S, et al. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*[J]. *Food Control*, 2009, 20(12): 1073-1079.
- [23] 丁琳琳,苏斌,王文文,等.微酸性电解水对家蚕黑胸败血芽孢杆菌的杀灭效果及机制研究[J].*蚕业科学*,2021,47(2):156-162. [DING L L, SU B, WANG W W, et al. Sterilization effect and mechanism of slightly acidic electrolyzed water on *Bacillus bombyseptieus*[J]. *Sericulture Science*, 2021, 47(2): 156-162.]
- [24] LIU X, ZHANG M L, MENG X, et al. Inactivation and membrane damage mechanism of slightly acidic electrolyzed water on *Pseudomonas deceptionensis* CM2[J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 1012.
- [25] KIM H J, TANGO C N, CHELLIAH R, et al. Sanitization efficacy of slightly acidic electrolyzed water against pure cultures of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* spores, in comparison with different water hardness[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 1-14.
- [26] DIMMELER S, ZEIHNER A M. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin ii and proatheros-

lerotic factors[J]. [Regulatory Peptides](#), 2000, 90: 19–25.

[27] CAI L L, HU H J, LU Q, et al. Morphophysiological responses of detached and adhered biofilms of *Pseudomonas fluorescens* to acidic electrolyzed water[J]. [Food Microbiology](#), 2019, 82: 89–98.

[28] 王艳艳. 微酸性电解水对阪崎克罗诺杆菌的杀菌作用及应用研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2020. [WANG Y Y. The bactericidal action and application of *Cronobacter sakazakii* induced by slightly acidic electrolytic water[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2020.]

[29] 马翠霞. 冷等离子体与丁香精油纳米纤维对蔬菜表面大肠杆菌 O157:H7 生物膜的协同抗菌作用[D]. 镇江: 江苏大学, 2017.

[MA C X. Synergetic antibacterial efficacy of cold plasma and clove oil loaded nanofilms against *Escherichia coli* O157:H7 biofilms on vegetables[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2017.]

[30] KACPRZYK L, RYDENGARD V, MORGELIN M, et al. Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions[J]. [Biochimica et Biophysica Acta \(BBA\)-Biomembranes](#), 2007, 1768(11): 2667–2680.

[31] BING S, ZANG Y T, LI Y J, et al. The synergistic effects of slightly acidic electrolyzed water and UV-C light on the inactivation of *Salmonella enteritidis* on contaminated egg shells[J]. [Poultry Science](#), 2019, 98(12): 6914–6920.