

Inactivation Regularity of *Bacillus cereus* on Composting Waste of Catering Food

Jijuan Cao^{1*}, Jinling Wang¹, Zhongyou Jian¹, Suang Wang², Liji Jin²

¹Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian

²Dalian University of Technology, Dalian

Email: *cjj0909@163.com

Received: Nov. 7th, 2012; revised: Nov. 21st, 2012; accepted: Nov. 29th, 2012

Abstract: Objective: This thesis focuses on building small-scale processing of domestic waste contained *Bacillus cereus* biosafety static compost, and exploring the degradation efficiency of *Bacillus cereus* to evaluate the safety and feasibility of this compost system. **Method:** Cow manure and straw were used as major material to build a composting system to dispose chicken carcasses. We examined temperature, pH value and moisture to evaluate this system. **Result:** By using domestic wastes and *Bacillus cereus* mixture as model, we enumerated *Bacillus cereus* in both samples in compost piles and in room temperature controls. During the forty-day composting period, the temperature reached 50°C on second day after composting. It had maintained above 55 for 6 continuous days. The physical and chemical properties, moisture (59% - 69%) and pH (8.5 - 9.0) are suitable for composting. The results of enumeration and certification test shows that, *Bacillus cereus* mixed with manure in composting condition were inactive within 12 days. Even when the temperature of composting pile dropped below 40°C, the existence of this pathogen was still negative. In those samples mixed without manure in compost piles, *Bacillus cereus* survived after 18 days. **Conclusion:** For *Bacillus cereus* are fully inactive rapidly, this inexpensive and relatively simple composting system shows its advantage to be a solution of domestic wastes contaminated by *Bacillus cereus*. The factors of inactivity are the whole condition pressure of composting including heat, the activity of microbes and the change of the character of composting material.

Keywords: Inactivation Regularity; Composting; *Bacillus Cereus*; Inactivation Regularity

餐饮垃圾堆肥中蜡样芽孢杆菌的灭活规律

曹际娟^{1*}, 王金玲¹, 简中友¹, 王 爽², 金礼吉²

¹辽宁出入境检验检疫局, 大连

²大连理工大学, 大连

Email: *cjj0909@163.com

收稿日期: 2012年11月7日; 修回日期: 2012年11月21日; 录用日期: 2012年11月29日

摘要: 目的: 通过建立处理含有蜡样芽孢杆菌食物垃圾的堆肥, 考察堆肥发酵过程中致病芽孢杆菌的灭活情况, 评价利用堆肥技术处理含致病芽孢杆菌餐饮垃圾的安全性和可行性。**方法:** 运用牛粪和秸秆建造静态堆肥体系。检测堆制过程中堆体的温度、pH值、含水量; 制作混有蜡样芽孢杆菌的食物垃圾样本, 在不同堆制时间取样, 检测该微生物数量。**结果:** 建造堆体的第2天, 温度已超过55°C, 并能持续6天; 堆体湿度维持在59%~69%, pH值范围在8.5~9.0。平板计数与验证实验显示, 堆肥温度下与堆料混合的蜡样芽孢杆菌在第12天被灭活, 并且在第40天温度下降后依然检测不到。堆肥中仅承受热压力组蜡样芽孢杆菌在第18日依然存在。**结论:** 本研究结果说明所建立的处理含有蜡样芽孢杆菌的静态堆肥系统能够有效杀灭病原微生物, 热压力及堆肥内微生物的及堆料性质共同起到灭活作用。

*通讯作者。

关键词：餐饮垃圾；堆肥；蜡样芽孢杆菌；灭活规律

1. 引言

在人们的日常生活中，大多数食物中毒都是由有害细菌引起的，在细菌性食物中毒中，蜡样芽孢杆菌食物中毒是比较常见的。据我国食品污染物和食源性疾病监测网络统计，2003年，蜡样芽孢杆菌引起的食品中毒占所有食物中毒事件的4.0%，为细菌性食物中毒的第四位，而实际数据很可能远大于各国官方报道，并且有增长的趋势。乳品、米、蒸煮的米饭和炒饭、调料、干制品(面粉、奶粉等)、豆类食品、肉制品、焙烤食品等食品都与蜡样芽孢杆菌引发的食物中毒有关。

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)为革兰氏阳性菌，兼性厌氧，部分菌株具有致病性，易污染食物，引起胃肠疾病等中毒症状^[1,2]。1994~2003年间，中国报道的蜡样芽孢杆菌食物中毒47起，进食人数2541人，中毒者1758人，发病率69.19%，无死亡报道。致病芽孢菌引发的食物中毒事件与人们生活息息相关，在重视食品安全的今天，我国需要进一步加强对食品中致病性芽孢菌的监控，有效地控制该菌在食品中的污染。对食品及生活垃圾中可能潜在的禽流感病毒致病芽孢菌进行无害化处理意义重大。

生物发酵法以其安全、高效、环保、适用性广、低成本等特点，已成为无害化处理领域的研究热点^[3]。堆肥是利用土著微生物或人工接种剂在一定温度、湿度、pH等条件下降解有机废物，形成类似腐殖质土壤的发酵过程^[4]。堆肥在微生物好氧发酵的过程中热量不断积累，堆体最高温度可达55℃~65℃，能有效灭活大多数病原微生物^[5,6]。然而由于芽孢的耐热性使得鲜有使用堆肥方法处理蜡样芽孢的研究。本实验考虑堆肥内部致病微生物的灭活是由于堆肥体系内综合因素的影响，故设计实验探索使用静态堆肥方法处理含蜡样芽孢杆菌食物垃圾的安全性。

2. 材料与方法

2.1. 材料与试剂

氯化钠(国药集团 F20090402)，亚硫酸盐-多粘菌素-碘胺嘧啶琼脂基础(北京陆桥 100427)，甘露醇

卵黄多粘菌素琼脂基础(北京陆桥 100324)，硫乙醇酸盐液体培养基(北京陆桥 080707)，无水亚硫酸钠(国药集团 F20090714)，营养琼脂(北京陆桥 100521)，碘胺嘧啶钠(北京陆桥 091118)，多粘菌素 B(北京陆桥 100625, 100706)，厌氧酶(美国 BD)。

2.2. 仪器与设备

实时荧光PCR仪(美国 ABI 公司/7500)，PCR 仪(美国伯乐公司/S1000)，PCR 工作台(美国 UVP 公司/Uv3HEPA WORKSTATION)，恒温混匀仪(德国 Enperdor/ Thermomixer Comfort)，低温高速离心机(德国贺利氏)，GDS-8000 型凝胶成像系统(美国 UVP)，培养箱(美国/L120-2)，震荡培养箱(瑞士伊孚森/Ecotron)，生物安全柜(美国热电/Forma Class II)，灭菌锅(日本三洋/MLS-3780)，灭菌锅，超净工作台，低温培养箱，显微镜，温度传感器，pH 计，冷冻干燥机，堆肥箱(尺寸：170 cm × 140 cm × 100 cm，无底，壁厚 10 cm)。

2.3. 方法

2.3.1. 堆肥的建立

收集大连市某牛场新鲜牛粪，与秸秆充分混合后晾晒，调整碳氮比(C/N)和含水量，使成为适宜堆料。如图1所示，在两个堆肥箱中建立平行的生物安全静态堆肥体系，堆体实际长和宽为150 cm 和 120 cm。箱顶覆盖塑料布，遮雨保湿但不阻止堆肥与外界的气体交换。自下而上依次铺放10 cm 稻草，40 cm 厚堆料，待检测样本，30 cm 厚堆料。使堆料占箱体体积的80%。

2.3.2. 样本的设置

使用蜡样芽孢杆菌(ACCC63301)的培养液与食物垃圾物模拟待处理的含有致病芽孢杆菌的食品。含有分别制作仅承受热压力和与堆肥物料混合的微生物污染食品垃圾样本及其对照组，方法如下：

取过夜生长的蜡样芽孢杆菌培养液60 ml 与300 g 食物垃圾混合，放置6 h，再与300 g 牛粪混合，静置30 min，再混合。取50 ml 离心管，装入上述牛粪：食物垃圾：微生物混合物(5:5:1)40 g，使用纱布封住

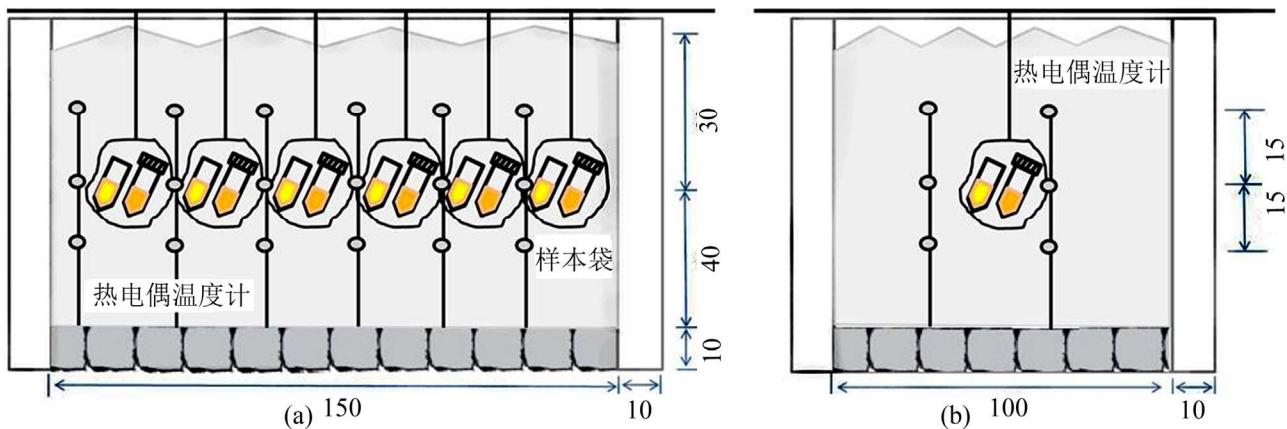


Figure 1. Structure graph of composting system (a: front view, b: overhead view, unit: cm)
图1. 堆肥体系结构图(a: 主视图, b: 侧视图, 单位: cm)

试管口。保持与外界的气体交换。如此制作 15 个样本。对照组制作方法相同, 区别在于, 使用牛粪为灭菌牛粪。

另取同样的 60 ml 微生物培养液, 与 600 g 食物垃圾混合, 静置 1 h 后再次混合。取 50 ml 离心管, 每管装入 40 g 上述食物垃圾:微生物混合物(10:1), 拧紧离心管口密封。

将样本离心管放置在堆体 25 cm 深处。室温对照组的样本放置在背光阴凉处。

如上所述, 将每次检测的样本为如下四组: 放置在堆肥中的混有堆料的食物垃圾(热 - 堆料 - 食物)组(1 组)和室温对照(堆料 - 食物)组(2 组); 堆肥中未混合堆料的食物垃圾(热 - 食物)组(3 组)和室温对照(食物)组(4 组)。

2.3.3. 堆肥过程的监测

在堆肥发酵过程中, 检测堆肥体系的温度、堆料的含水量和 pH 值。本实验通过埋放在堆体 25 cm, 40 cm 和 55 cm 深度的热电偶, 每日检测 9:00 和 17:00 记录堆体温度。在微生物检测的取样日(第 0, 2, 4, 8, 12 和 20 日)以及堆肥第 40 日, 采多点堆肥样本, 检测发酵堆料 pH 值。具体操作为, 称取 2 g 堆肥样本, 放入 50 ml 试管中, 加入 18 ml 蒸馏水, 漩涡振荡器上震荡 5 min 后静止 30 min 后用 pH 计测量上清液的 pH 值^[7]。将取得的样本冷冻干燥 72 h, 计算含水量。

2.3.4. 蜡样芽孢杆菌数量的检测

将 10 g 样本使用灭菌生理盐水稀释为 $10^{-1} \sim 10^{-6}$,

取各稀释液 100 μ l, 接种在两个选择性培养基-甘露醇卵黄多粘菌素琼脂培养基上, 37°C 培养 24 h~20 h, 选取适当菌落数的平板进行计数, 蜡样芽孢杆菌在此培养基上的菌落为粉红色(表示不发酵甘露醇)周围有粉红色的晕(表示产生卵磷脂酶)。计数后, 挑取十个此种菌落做蜡样芽孢杆菌证实试验, 根据证实的菌落数计算出该平板上的菌落数。例如: 将 100 μ l 10^{-4} 样品稀释液涂布于 MYP 平板上, 其可疑菌落为 25 个, 取 10 个鉴定, 证实 8 个菌落为蜡样芽孢杆菌, 则 1 g 检样中所含蜡样芽孢杆菌数为 2×10^6 。

2.3.5. 翻堆及最终检测

堆肥发酵 20 天后, 微生物检测显示堆肥样本中病原微生物全部灭活, 进行翻堆: 将塑料箱内物料全部取出, 更换稻草; 晾晒并混合原来的堆料, 使之具备良好的好氧条件并且含水量适宜堆肥。依照之前的方式重新填入堆肥箱, 继续堆肥。再次发酵 20 天后, 对食品垃圾样本中微生物的存活进行最终检测, 同时检测堆料的含水量和 pH 值。

3. 结果与分析

3.1. 堆肥体系温度, 含水量和 pH 值的变化

对堆体三个深度的温度检测数据绘制图 2。三个测量深度的温度由高至低依次为 25 cm, 40 cm 和 55 cm。堆肥在堆置 24 h 内温度迅速升高。其中埋放样品深度处温度在第二天超过 55°C, 保持 6 天, 最高温度为 58°C, 出现在第 6 天, 同时也是本阶段堆肥的最高温度。25 cm 深度处温度超过 50°C, 保持 5 天。堆

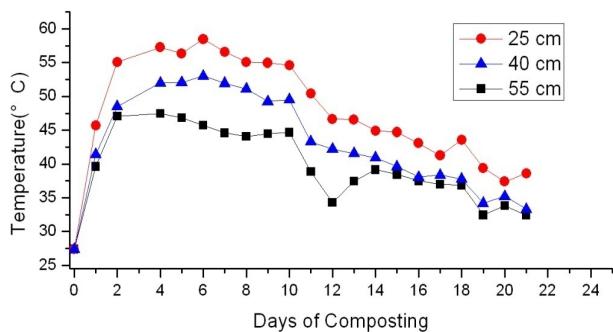


Figure 2. Temperature changes on composting waste of catering food

图 2. 食品垃圾堆肥温度的变化趋势

肥第 10 天开始，堆肥温度出现明显下降趋势。

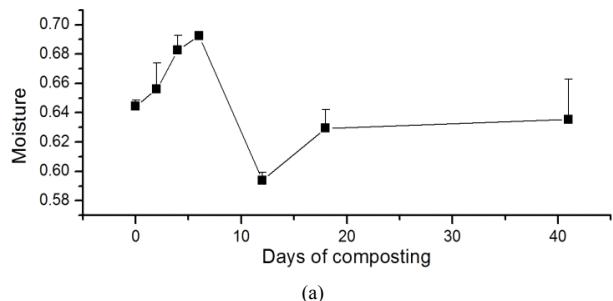
在堆肥过程中，堆料 pH 值的变化范围是 8.50~8.98。并且在第一轮(20 天)的静态堆肥过程中，pH 值逐渐降低(图 3(b))。堆料含水量的变化范围是 59%~69%。呈现先升高再降低的趋势(图 3(a))。因为在静态发酵过程的初期，微生物代谢旺盛，产生的水分大于堆体的蒸发量，故含水量上升。在第 8 天之后，由于微生物代谢的降低，以及为了保持好氧静态堆肥的氧气供应量而减少塑料薄膜覆盖时间等通风措施，使得水分生成量减少，散失量增加，从而使堆料含水量降低。

3.2. 蜡样芽孢杆菌的灭活

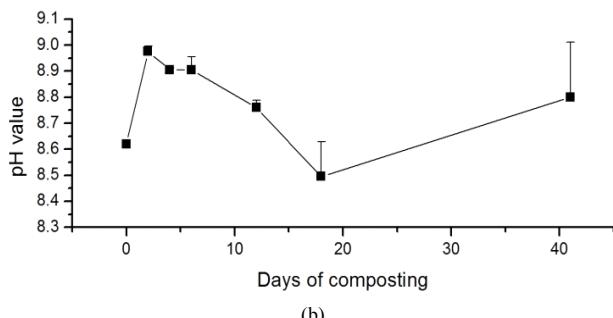
由图 4 可知，1 组(热 - 堆料 - 食物)，2 组(堆料 - 食物)，3 组(热 - 食物)和 4 组(食物)中微生物起始数量均超过 $7\log_{10} \text{CFU/g}$ 。1 组中芽孢杆菌在前 4 天中数量迅速减少至 $4\log_{10} \text{CFU/g}$ 之下，之后数量出现短暂平台期，而后又从第 6 天开始再次下降，从第 12 天开始检测不到。其它三组目标病微生物数量缓慢减少，第 12 天均在 $3\log_{10} \text{CFU/g}$ 之上。在第 18 天，含有牛粪堆料的样本中微生物灭活，3 组和 4 组中芽孢杆菌依然存活。翻堆后，继续堆置 20 天，在第 40 天的微生物最终检测时，堆肥样本中未见蜡样芽孢杆菌。这一现象表明：即便温度下降至 40°C 之下——适宜其生长的范围，蜡样芽孢杆菌未生长。

4. 讨论

垃圾堆肥法是依靠自然界广泛分布的细菌、真菌等微生物，有控制的促进可被生物降解的有机物向稳定的腐殖质转化的生物化学过程^[8,9]。



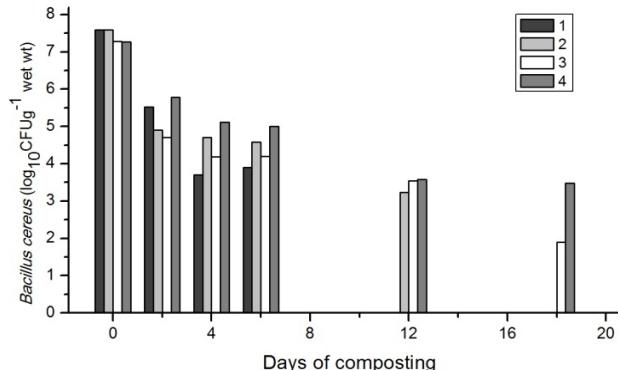
(a)



(b)

Figure 3. Changes of water content (Fig.a) and pH (Fig.b) on composting waste of catering food

图 3. 食品垃圾堆肥过程中堆料含水量(A 图)和 pH 值(B 图)的变化趋势



(1 为热 - 堆料 - 食物组，2 为 1 组的室温对照，3 为热 - 食物组，4 为 3 组的室温对照)

Figure 4. Inactivation regularity of bacillus cereus on composting waste of catering food

图 4. 餐饮垃圾堆肥中蜡样芽孢杆菌的灭活规律

温度对堆肥内病原微生物的灭活起到重要影响。温度超过 72°C 会影响原发微生物对堆料的降解，温度低于 55°C 起不到灭活病源微生物的作用^[10]。本实验建立的堆肥体系温度在此范围之内，并且超过 55°C，这一大多数病源微生物的灭活临界温度，持续 6 天。可以认为很大程度上使粪便中的病原微生物灭活，将其对人和环境的威胁降至最低。

堆肥过程中堆料的 pH 先升高再降低主要有两点可能的原因。其一，检测样本取自食品垃圾附近，动

物源物质中大量的脂肪和蛋白质经微生物代谢后的产物呈酸性，使得堆料的 pH 值降低；其二，堆料本身含有的碳源物质，如秸秆在堆肥腐熟的过程中，也会产生如腐植酸等酸性物质，使 pH 值降低。同时，在堆肥过程中，堆料的 pH 值始终呈碱性，且在适宜堆肥原发微生物的范围之内变化。堆肥的碱性环境对致病芽孢菌的生长也产生一定压力，故有助于对其灭活。

关于堆料的含水量，值得注意的是，堆肥过程中产生的水分(受热蒸发^[7])始终有向堆体底部移动的趋势，堆肥箱底部含水量在堆肥过程中逐渐升高，不利于底部的好氧发酵。故在第 20 天进行翻堆，重新混合堆料，调整含水量。在堆肥结束时，检测堆料最终的含水量为 63.5%，意即在翻堆之后，堆料的含水量始终保持在适宜发酵的范围内。

芽孢杆菌的灭活实验中，对比几组样本可以发现，在堆肥初期，温度迅速升高阶段，1 组蜡样芽孢杆菌受温度压力数量迅速减少。在逐渐适应高温环境后，数量趋于稳定。当堆肥发酵开始一段时间，堆肥原发微生物代谢产生的物质和堆肥本身的种种理化压力再次抑制蜡样芽孢杆菌的存活。且 1 组蜡样芽孢杆菌灭活速度显著超出 2 组，说明堆肥的热压力为致使芽孢杆菌数量降低的原因之一。同时 1 组与 3 组的对比说明，仅仅是热压力的存在不足以灭活耐热的芽孢杆菌，堆料中其它微生物的活动以及堆料的理化性质也起到了协助灭活的作用。

5. 结论

研究表明，芽孢杆菌耐高温，最高生长温度为 48 °C~50 °C^[11]。在 28~35 °C 适宜温度可大量繁殖^[12]。本实验研究发现，在静态堆肥发酵过程中，超过 55 °C 的持续高温和这一复杂体系中微生物和环境的压力，也使得食品垃圾中的蜡样芽孢杆菌有效灭活。而且，室温对照组中和堆料混合的食品垃圾中，芽孢菌未有增殖，也间接的说明除温度外，堆料的理化性质压力有助于这类致病微生物的灭活。故合理的静态堆肥系统

不仅可以用来处理生活垃圾，也可以处理致病芽孢杆菌污染的餐饮垃圾。但由于不同种类的微生物对温度和堆肥环境的响应有较大差别(如灭活所需时间及灭活所要达到的温度)，所以针对不同待处理的目标微生物，需要借鉴成熟的方法或者实验得到最优的堆置方法和堆置时间，从而有效并且高效的处理受微生物污染的餐饮垃圾。

6. 致谢

本研究得到了国家自然科学基金国际重大合作项目(30620120430)和大连市科技攻关计划项目(2009E11SF133)的资助。

参考文献 (References)

- [1] R. K. Young, et al. Development of a fluorogenic probe-based PCR assay for detection of *Bacillus cereus* in nonfat dry milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1453-1459.
- [2] F. Hiroshi, et al. Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food or waterborne pathogens in stools. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(11): 5134.
- [3] T. Reuter, et al. Purification of polymerase chain reaction (PCR)-amplifiable DNA from compost piles containing bovine mortalities. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 3343-3349.
- [4] R. Gajdos. The use of organic waste materials as organic fertilizers-recycling of plant nutrients. *Acta Horticulturae*, 1992, 302: 325-331.
- [5] Rebollido, et al. Microbial populations during composting process of organic fraction of municipal solid waste. *Applied Ecology and Environmental Research*, 2008, 6(3): 61-67.
- [6] M. P. Bernal, et al. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 5444-5453.
- [7] W. Xu, et al. A biosecure composting system for disposal of cattle carcasses and manure following infectious disease outbreak. *Journal of Environmental Quality*, 2009, 38(3): 437-450.
- [8] 石文军等.全程高温好氧堆肥快速降解城市生活垃圾[J].环境科学学报, 2009, 29(10): 2126-2133.
- [9] 杨建波等.城市生活垃圾的生物工程堆肥化利用[J].再生资源与循环经济, 2009, 2(6): 35-40.
- [10] M. Kristine, et al. A review of the effectiveness of current time-temperature regulations on pathogen inactivation during composting. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 2007, 6(5): 573-586.
- [11] 褚小菊等.巴氏牛奶中蜡样芽孢杆菌的风险评估[J].中国乳品工业, 2006, 6(34): 23-26.
- [12] 张伟伟等.食品中蜡样芽孢杆菌的研究进展[J].中国酿造, 2010, 5(218): 1-4.