

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 低溫處理時 *E. coli* O157:H7 之存活 及冷凍壓力後菌體一些特性

### Survival of *E. coli* O157:H7 upon low temperature treatments and some characters of freeze-stressed cells

計畫編號：NSC87-2313-B-002-105

執行期限：86年8月1日至87年7月31日

主持人：周正俊 國立台灣大學食品科技研究所

#### 一、中文摘要

本研究乃就 *E. coli* O157:H7 在低溫貯存過程之存活與受傷，及菌體受低溫壓力後不同培養基中之檢出，在一些環境壓力(結晶紫、膽鹽、食鹽及酒精)下之敏感性，及營養需求之影響進行探討。

*E. coli* O157:H7 在-5，-18，-28 之低溫下貯存，其死亡菌數之百分率均隨著貯存時間之延長而增加，菌體死亡之百分率以在-18 貯存者最大，其次依序為在-28 及-5 貯存者；在-28 及-18 下貯存時，菌數之減少以在最初凍藏一天後之情形最為顯著；受傷菌體及未受傷菌體之百分率，則隨著貯存時間之延長而呈減少之現象。

經低溫處理之 *E. coli* O157:H7 菌體對於所試結晶紫、膽鹽、食鹽及酒精之敏感性均呈增加之情形，但以於-28 及-18 下貯存者對所試之藥劑敏感性之增加最明顯，於-5 下貯存者，對所試之藥劑敏感性的增加很少，*E. coli* O157:H7 對所試藥劑之敏感性大致隨著低溫(無論於所試何種低溫下)貯存時間之延長而增加。

不同碳、氮源會影響凍傷 *E. coli* O157:H7 菌體之復甦情形，在所試之氮源中以 tryptone 及 soytone 最佳，而碳源則以葡萄糖及麥芽糖最佳。而在含相同氮源或碳源之 minimal medium 中，*E. coli* O157:H7 生長之遲滯期大致均隨冷凍時間之延長而增加。

關鍵詞：出血性大腸桿菌，低溫，存活，敏感性

#### Abstract

The percentage of death cells increased progressively during the low temperature storage at -5，-18 and -28. The percentage of death cells in different storage temperature followed the order -18 > -28 > -5. The most pronounced injury and death of *E. coli* O157:H7 was noted after 1 day storage at -18 or -28. The percentage of injured and unharmed cells decreased as low-temperature storage extended.

The low temperature treatments increased the susceptibility of *E. coli* O157:H7 to crystal violet, bile salt, sodium chloride, and ethanol. The susceptibility of low temperature-stressed cells to the tested agents increased most significantly when *E. coli* O157:H7 was subjected to -28 or -18 storage. On the other hand, less susceptibility increase to the tested agents was found for *E. coli* O157:H7 which had been exposed to -5 storage. Generally, the susceptibility of *E. coli* O157:H7 to the tested agents increased as the low temperature-storage extended, regardless of storage temperature.

Different nitrogen or carbon sources affected the recovery of freeze-stressed *E. coli* O157:H7 cells. Among the various nitrogen and carbon sources tested, tryptone

and soytone were the most effective nitrogen sources, while glucose and maltose were the most effective carbon sources for the recovery of the freeze-stressed cells. It was noted that when growing the freeze-stressed *E. coli* O157:H7 in minimal medium containing the same nitrogen source or carbon source, their lag time increased as the time of frozen storage increased.

**Keywords:** *Escherichia coli* O157:H7, low temperature, survival, susceptibility

## 二、緣由與目的

*E. coli* O157:H7 係屬於出血型大腸桿菌(Levine,1987),具有 O157 及 H7 之血清凝集陽性反應,能引起感染者痙攣性腹痛與大量血便,且經常併發嚴重的尿道感染及溶血性尿毒綜合症(Riley *et al.*, 1983),對嬰幼兒、老人有高致死率。近年來世界各地包括加拿大、英國、美國 (Doyle, 1991; Anonymous, 1995)、墨西哥 (Cravioto *et al.*, 1990)、中國 (Xu *et al.*, 1990)、阿根廷 (Lopez *et al.*, 1989) 均有此病原菌引起中毒之報告。而日本於 1996 年發生由 *E. coli* O157:H7 感染的食物中毒事件,造成一萬人多中毒(陳, 1996)。故如何避免此出血型大腸桿菌在食品中之污染與生長,乃目前食品衛生單位與食品業者所迫切注意者。

低溫處理包括冷藏與凍藏是目前最普通之食品保存方法。在低溫處理之過程會傷害細胞膜影響菌體之通透性(Ingram and Mackey, 1976),而若有冰晶及濃縮效應之產生時則更進一步造成菌體之損傷、死亡(Fennema and Powrie, 1964)。一些文獻也指出,不同種類之細菌在低溫處理過程中之存活率不一致(Georgala and Hurst, 1963; Davies and Obafemi, 1985)。此外在低溫處理過程中,受到傷害未死亡之菌體特性亦曾被報告有所改變(Postgate and Hunter, 1963; Sinskey and Silverman, 1970; Golden *et al.*, 1988),甚至無法在一些原先進行分離時所使用之選擇性或選擇性兼分辨性培養基中存活(Abdul-Raouf *et al.*, 1993b;

Clavero and Beuchat, 1995; Conner and Hall, 1994)。因此本研究乃企圖探討 *E. coli* O157:H7 在低溫貯存過程中,其存活與受傷情形,及其受低溫壓力後,在不同培養基中之檢出,在一些環境壓力(結晶紫、膽鹽、食鹽及酒精)下之敏感性,及不同氮源與碳源影響 *E. coli* O157:H7 凍傷菌體復原之情形。

## 三、結果與討論

懸浮於 TSB 中之 *E. coli* O157:H7 在不同溫度下貯存不同時間後利用 TSA 及 TSA+bile salt 培養基分別測得存活(受傷與未受傷)及未受傷之菌體數目。在-28 及-18 貯存過程中,無論用何種培養基所測得之 *E. coli* O157:H7 之菌數均有明顯下降之情形。在-28 經 21 天之貯存後,*E. coli* 之菌數由最初之約 8.02 log CFU/ml 降低至分別由 TSA 及 TSA+bile salt 培養基所測得之 7.19 log CFU/ml 與 6.17 log CFU/ml。至於在-18 貯存時則 *E. coli* O157:H7 活菌數降低之幅度較大,21 天貯存後亦分別減少至由 TSA 所測得之 6.30 log CFU/ml 及 TSA+bile salt agar 所測得之 5.03 log CFU/ml,至於在-5 貯存者則無論在 TSA 及 TSA+bile salt 培養基所測得菌數僅有些微之減少而已。此外,在-28 及-18 下貯存時,菌數之減少以在最初凍藏一天後之情形最為顯著,繼續凍藏則菌數減少之現象趨緩;Moss and Speck (1963) 進行 *S. lactis* 之冷凍貯存試驗時,發現菌體在冷凍貯存初期之受傷與死亡最多,隨著凍藏時間的延長,其死亡速率則趨緩,本實驗的結果與之相似。

在-5 下菌體死亡之百分率比在-28 或-18 者低,可能主要因在-5 尚未有凍結之情形發生,而不致有冰晶及溶質濃度效應加速菌體死亡之結果。此外,在本試驗所發現在-28 貯存的 *E. coli* O157:H7 死亡的程度比在-18 貯存者低。

結晶紫後存活之情形。未受低溫處理之 *E. coli* O157:H7 對所試之結晶紫 (3 mg/L) 並不敏感,但於-28 及-18 下凍藏 1 天後,其對於結晶紫的敏感性大幅增加,

且凍藏 14 天之 *E. coli* O157:H7 菌體對結晶紫的敏感性顯著高於凍藏 1 天或 7 天者。

未受低溫處理之 *E. coli* O157:H7 對於膽鹽 (0.3%) 並不敏感，經過 60 分鐘之接觸後，菌數並未呈顯著減少之情形；然而低溫處理增加 *E. coli* O157:H7 對膽鹽敏感性，其程度依次為 -18，-28 及 -5。

*E. coli* O157:H7 菌體經冷凍後，對食鹽(4%)的敏感性呈增加之現象，這可能是菌體在受冷凍傷害後，其細胞膜受損，使其細胞通透性增加，使較多的鈉離子與氯離子擴散到細胞內、使鎂離子流失、干擾酵素作用等，而使受傷之菌體死亡(Banwart, 1979)；本項試驗所得低溫處理造成 *E. coli* O157:H7 菌體對食鹽敏感性增加之結果與 Lee 等(1977)之報告相一致，他們指出，低溫處理過之菌體會對食鹽敏感乃因細胞色素 (cytochromes) 與其他的細胞膜構造間的鍵結在低溫過程中受到破壞，使細胞膜失去其完整性及功能之結果。

在 -28 及 -18 下凍藏後之 *E. coli* O157:H7 菌體，在 8% 乙醇之存在下之存活率大致上均隨暴露時間之延長而呈顯著減少之情形。如在凍藏 7 天之菌體在 60 分鐘暴露後，存活率僅約為未受低溫處理者之 10.3 及 6.35%，在 -5 下貯存者，其於乙醇存在下之存活率亦有些微之降低(75.9%)，但在此低溫條件下，存活率之降低並不如在 -18 或 -28 時顯著，顯示在所試之 -5 條件下對菌體所造成之傷害並不如在凍藏時嚴重。

低溫是食品保藏時所常使用之方法之一，此類環境壓力與乾燥、加熱等壓力一樣，會對菌體細胞壁之成分、ribosomes、RNA、DNA 及細胞膜造成傷害(Ray, 1986)；綜合本項實驗所得之數據顯示 *E. coli* O157:H7 經冷藏、凍藏後，其菌體對所試之結晶紫、膽鹽、食鹽及酒精之敏感性均呈增加之情形，主要可能因菌體細胞膜受傷害所致(Brennam *et al.*, 1986)。

此外一些文獻(Leyer and Johnson, 1992, 1993; Linton *et al.*, 1992; Lou and Yousef, 1996; Martin *et al.*, 1989)指出，菌體受熱或其他壓力後，引發對同類或其他壓

力之更大抵抗力之結果剛好相反。在受熱、酸度、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及飢餓壓力下之菌體會產生所謂之熱擊蛋白(heat-shock protein)，被認為與提高菌體對後續壓力之抵抗力有關(Lou and Yousef, 1996) 而 Leyer *et al.* (1993) 也進一步指出，菌體受環境壓力如酸度，除引起菌體形成特定外膜蛋白質外，造成菌體表面疏水性之增加，亦為促進這些菌體對後續壓力之抵抗力提高之原因之一。低溫之壓力是否不像其他壓力促使菌體內產生一些特定之蛋白，以致對後續之壓力反而呈現更敏感之情形，其詳細之機制尚待了解。

不同碳、氮源會影響凍傷 *E. coli* O157:H7 菌體之復甦情形，在所試之氮源中以 tryptone 及 soytone 最佳，而碳源則以葡萄糖及麥芽糖最佳，與 Sinskey and Silverman (1970)，Moss and Speck (1996a)，Straka and Stoke (1959) 之報告相一致，低溫處理會增加 *E. coli* O157:H7 對營養之需求。在含相同氮源或碳源之 minimal medium 中，*E. coli* O157:H7 生長之遲滯期大致均隨冷凍時間之延長而增加。

#### 四、計畫成果自評

本計畫執行所獲得有關出血性大腸桿菌在低溫下存活之性狀，及這些受冷壓(cold-stress) 菌體對其他後續環境壓力之敏感性資料，除具學術意義外，將可作為未來設計、檢測低溫處理食品中，*E. coli* O157:H7 之方法及防制此病原菌引發食品中毒所採取措施之參考依據。

#### 五、參考文獻

1. Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J. Infect. Dis. 155: 377-389.
2. Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson,

- L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A. and Cohen, M. L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681-685.
3. Doyle, M. P. 1991. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 12:289-302.
  4. Anonymous. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 out linked to commercially dry-cured salami. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 44(9):157-160.
  5. Cravioto, A., Reyes, R. E., Trujillo, F., Uribe, F., Navarro, A., DeLaRaca, J. M., Hernandez, J. M., Perez, G. and Vazquez, V. 1990. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am. J. Epidemiol.* 131:886-904.
  6. Xu, J. G., Quan, T. S., Xiao, D. L., Fan, T. R., Li, L. M., Wang, C. A., Li, W. and Liu, H. M. 1990. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains in China. *Curr. Microbiol.* 20:299-303.
  7. Lopez, E. L., Diaz, M., Grinstein, S., Medilharzu, F., Murray, B. E., Ashkenazi, S., Rubeglio, E., Woloj, M., Vasquez, M., Turco, M., Pickering, L. K. and Cleary, T. G. 1989. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *J. Infect. Dis.* 160:469-475.
  8. 陳建斌, 1996。 (日本)病原性大腸桿菌 O-157事件的始末與省思。 *低溫食品*, 29:2-4。
  9. Ingram, M. and Marckey, B. M. 1976. In: "Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes." Skinner, F. A. and Hugo, W. B. (eds.) Academic Press, London.
  10. Fennema, O. and Powrie, W. 1964. Fundamentals of low- temperature food preservation. *Adv. Food Res.* 13:219-347.
  11. Georgala, D. L. and Hurst, A. 1963. The survival of food poisoning bacteria in frozen foods. *J. Appl. Bacteriol.* 26:346-358.
  12. Davies, R. and Obafemi, A. 1985. Response and micro-organism to freeze-thaw stress, p.83-107. In: "Microbiology of frozen foods." Robinson, R. K. (ed.) Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.
  13. Postgate, R. J. and Hunter, J. R. 1963. Metabolic injury in frozen bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 26:405-414.
  14. Sinskey, T. J. and Silverman, G. J. 1970. Characterization of injury incurred by *Escherichia coli* upon freeze-drying. *J. Bacteriol.* 101:429-437.
  15. Golden, D. A., Beuchat, L. R. and Brackett, R. E. 1988. Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing. *Food Microbiol.* 5:17-23.
  16. Abdul-Raouf, U. M., Beuchat, L. R. and Ammar, M. S. 1993b. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2364-2368.
  17. Clavero, M. R. S. and Beuchat, L. R. 1995. Suitability of selective media for recovering heat- or freeze-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3268-3273.
  18. Conner, D. E. and Hall, G. S. 1994. Efficacy of selected media for recovery of *Escherichia coli* O157:H7 from frozen chicken meat containing sodium chloride, sodium lactate or polyphosphate. *Food Microbiol.* 11:337-344.
  19. Moss, C. W. and Speck, M. L. 1963. Injury and death of *Streptococcus lactis* due to freezing and frozen storage. *Appl. Microbiol.* 11:326-329.
  20. Banwart, G. J. 1979. *Basic Food Microbiology.* AVI Publishing, Westport, Conn.
  21. Lee, S. K., Calcott, P. H. and Macleod, R.

- A. 1977. Relationship of cytochrom content to the sensitivity of bacteria to NaCl on freezing and thawing. *Can. J. Microbiol.* 23:413-419.
22. Ray, B. 1986. Impact of injury and repair in food microbiology : Its past, present and future. *J. Food Prot.* 49:651-655.
23. Brennan, M., Wanismail, B., Johnson, M. C. and Ray, B. 1986. Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Prot.* 49:47-53.
24. Leyer, G. J. and Johnson, E. A. 1992. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2075-2080.
25. Leyer, G. J. and Johnson, E. A. 1993. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1842-1847.
26. Linton, R. H., Webster, J. B., Pierson, M. D., Bishop, J. R. and Hackney, C. R. 1992. The effect of sublethal heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.* 55:84-87.
27. Lou, Y. and Yousef, A. E. 1996. Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses. *J. Food Prot.* 59:465-471.
28. Martin, A., Auger, E. A., Blum, P. H. and Schultz, J. E. 1989. Genetic basis of starvation survival in nondifferentiating bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:293-316.
29. Sinskey, T. J. and Silverman, G. J. 1970. Characterization of injury incurred by *Escherichia coli* upon freeze-drying. *J. Bacteriol.* 101:429-437.
30. Moss, C. W. and Speck, M. L. 1966a. Release of biologically active peptides from *Escherichia coli* at subzero temperature. *J. Bacteriol.* 91: 1105-1111.
31. Straka, R. P. and Stokes, J. L. 1959. Metabolic injury to bacteria at low temperatures. *J. Bacteriol.* 78:181-185.