

# 嗜冷微生物和冷育微生物的研究

## IV. 冰箱中产生怪味的冷育微生物

周宇光 崔存起 李钟庆

(中国科学院微生物研究所,北京)

**摘要** 由冰箱中存放的豆制品、猪肉、蔬菜等食品中分离到 34 株产生不良气味的细菌。它们都是革兰氏阴性细菌,经鉴定分别属于假单胞菌属、气杆菌属、产碱菌属、欧文氏菌属和沙门氏菌属。它们都可以在 5℃ 以下生长,最高生长温度均高于 30℃,故都是冷育细菌。经气相色谱分析,形成不良气味的原因是在细菌生长过程中,产生了硫化氢、氨和一些挥发性有机酸等代谢产物,不良气味即这些混合气体所致。

**关键词** 冷育细菌

白文响同志协助进行气相色谱分析,特此致谢。

在我国随着人们生活水平的提高,家用电冰箱已较普遍的被使用。用它贮存食物应重视嗜冷微生物的活动。因为嗜冷微生物可在较低温度(-5—-12℃)下生长<sup>[1,2]</sup>,在食品冷藏过程中它们会引起食物的腐败、变质或产生令人感觉不舒服的气味。嗜冷微生物在冷藏食物中的繁殖,无疑会潜在地危害到人类的身体健康。所以,国外不少人对嗜冷微生物进行了研究<sup>[3-9]</sup>。

我们在研究嗜冷和冷育微生物的过程中,从家用冰箱中冷藏的蔬菜、猪肉、豆制品上分离到34株产生不良气味的冷育细菌,它们分别属于气杆菌属、产碱菌属、欧文氏菌属、假单胞菌属和沙门氏菌属。通过生化试验和气相色谱分析,初步得知不良气味的主要成分为氨、硫化氢、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸和己酸等。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌种

由冰箱中存放的豆制品、猪肉和蔬菜中取样,用营养肉汁于7℃富集培养,再经营养肉汁琼脂反复划线培养(7℃),分离到34株产生不良气味的细菌(表1)。

### (二) 菌种的鉴定

根据文献[10]、[11]和[12]等所介绍的方法。

### (三) 生长温度试验

取20℃培养24小时的营养肉汁菌液0.1毫升,接种于容有25毫升肉汁的250毫升三角瓶中,分别置3°、20°、32°和37℃培养,定时从中取样,用721型分光光度计于660nm测光密度。另取于20℃培养24小时的液体菌种,直针接种于澄清肉汁中,分别置各种温度下培养一周,观察生长情况。

### (四) 产硫化氢和产氨试验

采用文献[12]的方法。

### (五) 气相色谱分析

参考文献[13]。具体作法是采用含有葡萄糖的肉汁,接种后置20℃培养5天,用菌液

直接进行气相色谱分析。分析条件如下:氮气为65 ml/min,空气为0.5 kg/cm<sup>2</sup>,氢气为0.6 kg/cm<sup>2</sup>,柱温210℃,进样器温度为220℃,进样量0.5 μl,氢焰检测器,衰减1/4,灵敏度为100,使用的仪器主机为岛津-7AG,微处理机为岛津-C-RIB。

气相色谱分析中所用标准样品为混合物,其成分和浓度如下:

乙酸为6.05 g/l,丙酸为7.40 g/l,丁酸为8.81 g/l,异丁酸为8.811 g/l,戊酸为5.106 g/l,异戊酸为5.107 g/l,己酸为5.808 g/l。

## 结 果

### (一) 菌种的鉴定

所分离的34株细菌经鉴定分别属于荧光假单胞菌,铜绿假单胞菌,产碱假单胞菌,恶臭假单胞菌,丁香假单胞菌,产气气杆菌,沙门氏菌,欧文氏菌和产碱杆菌,详见表1。

### (二) 产氨和产硫化氢试验

在34株菌中经测定13株产生H<sub>2</sub>S,23株产生氨,其中一些菌株既产氨也产硫化氢(表1)。

### (三) 生长温度

在34株菌中有24株能在-3℃生长,7株可在0℃生长,只有2株丁香假单胞菌最低生长温度为3℃。它们的最适生长温度都在15—25℃之间。其最高生长温度分别在30—35℃,只有一株产气气杆菌和2株沙门氏菌为40℃,此外3株荧光假单胞菌为38℃,详见表1。因而它们都属于冷育细菌(psychrotrophs)。此外,所选择的恶臭假单胞菌110号于4种温度(3°,20°,32°,37℃)下的生长曲线见图1。该菌最适生长温度为20℃,然而在3℃、96小时可达生长高峰(即对数生长期的末期)。一般观察嗜冷微生物的生长,在5℃以下要延长至1周看其能否生长<sup>[9]</sup>。该菌株在37℃不能生长,其光密度一直处在接种时(0小时)所测的光密度的数值。

### (四) 气相色谱分析

各菌株的培养液经气相色谱分析,不同菌

表 1 冰箱中的冷冻细菌

细菌名称	分离号	最低生长温度 (°C)	最高生长温度 (°C)	产 H <sub>2</sub> S 阳性	产 NH <sub>3</sub> 阳性
荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	1, 4, 15	-3	38	15*	1, 4*
	9, 12, 16, 457	-3	35	457	457
	7	0	32	7	
铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	454	-3	35		454
产碱假单胞菌 <i>P. alcaligenes</i>	2, 5, 8, 11	-3	32		5, 8
	13, 103, 108, 109	-3	35		13, 103, 108, 109
恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i>	460, 461, 10 455, 110, 459	-3	35	110	450, 461, 459, 10, 110
	102	0	35	102	102
	458	-3	32	458	458
丁香假单胞菌 <i>P. syringae</i>	121, 124	3	32	121, 121	121, 124
产气气杆菌 <i>Aerobacter aerogenes</i>	456	0	40	456	
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	3, 6	0	40	3, 6	3, 6
欧文氏菌 <i>Erwinia</i>	462	0	32	462	462
产碱杆菌 <i>Alcaligenes</i>	123	0	30	123	123

\* 产生 H<sub>2</sub>S 和产生氨阳性的菌株号

表 2 混合菌株培养液的气相色谱分析结果

标准样品			混合培养液		
名称	出峰时间 (min)	浓度 (mg/l)	出峰时间 (min)	浓度 (mg/l)	产物
乙酸	0.25	605	0.245	1593.39	乙酸
丙酸	0.42	740	0.417	306.31	丙酸
丁酸	0.73	881	0.728	146.57	丁酸
异丁酸	0.65	881.1	0.65	140.65	异丁酸
戊酸	1.41	510.6			
异戊酸	1.20	510.7	1.20	125.79	异戊酸
己酸	2.71	580.8	2.77	61.03	己酸
			0.137		未知物
			2.07		未知物

株代谢产物中有机酸组分有所不同, 但是将菌株混合培养时其代谢产物中有机酸组分有下列几种: 乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸、己酸

等。其中以乙酸和丙酸含量最高。另外还有二种未知物, 见表 2。通过将这几种有机酸标准试剂混合, 嗅其气味, 与冰箱中所产生的怪味相

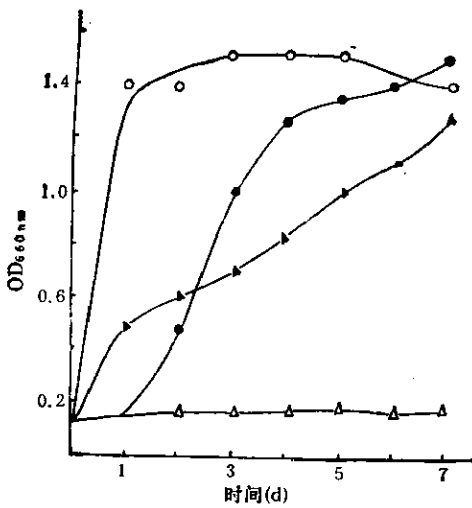


图1 110号菌株温度生长曲线

注: ●: 3°C 生长曲线, ○: 20°C 生长曲线, ▲: 32°C 生长曲线, △: 37°C 生长曲线

似。

## 讨 论

按照 Morita 及 Eddy 的假说<sup>[14,15]</sup>,嗜冷微生物 (psychrophile) 是指能在 0°C 或更低的温度生长,最适生长温度为 15°C 或更低,最高生长温度不超过 20°C 的微生物。凡在 5°C 或更低的温度有生长能力者,不考虑其最适生长温度如何,最高生长温度超过 20°C,都称为冷育微生物 (psychrotrophs)。根据生长温度试验,我们分离到的 34 株细菌都是冷育细菌。除两株外,均能在 0°C 或更低的温度生长,而一般家用冰箱的温度范围为 0—10°C (只有冰室的温度能达到 -10°C 以下),这样的温度正适合它们的生长。

一般用冰箱保存食品都会出现不良的怪气味。经我们用气相色谱分析,这些怪气味主要是因冷育细菌繁殖时生成了一些有机酸,如乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸、己酸等以及氨和硫化氢的混合物。当它们在空气中的浓度达到  $10^{-8}$ — $10^{-10}$  mol 时,人的嗅觉就可以感觉到

它们的存在。我们将上述几种有机酸标准试剂混合后,其气味与冰箱中的怪气味类似,也说明了这一结论。

我们用恶臭假单胞菌 110 号菌株作不同温度生长曲线试验,无论在 3°C、20°C 和 32°C 培养,7 天后都能达到相近的生物量,不同的是在 20°C 培养 18 小时生物量达到最高,3°C 培养,需要 144 小时生物量才达最高,32°C 培养,需 168 小时达到最高生物量。说明即使在 3°C 保存食品,在 2—3 天内,便会繁殖一定量的冷育细菌,它们足以形成令人讨厌的气味。虽可在冰箱中加入除味的吸附剂,但其作用甚小,即便脱除一些气味,但细菌并未除去,所以使用冰箱保存食品也并非绝对安全。

## 参 考 文 献

- [1] Morita, R. Y.: *Bacteriol.*, 39: 144—167, 1975.
- [2] 崔存起,李钟庆: *微生物学报*28(3): 226—234,1988.
- [3] Shehate, T. E. and E. B. Collins: *Appl. Microbiol.*, 21: 466—469, 1971.
- [4] Hanna, W. O. et al.: *J. Food Protect.* 45: 78—81, 1982.
- [5] Suresh, E. R. et al.: *J. Appl. Bacteriol.*, 52: 1—4, 1982.
- [6] Brocklehurst, T. F. and B. M. Lund: *J. Appl. Bacteriol.*, 53: 355—361, 1982.
- [7] McGibbon, L. and N. J. Russell: *J. G. Microbiol.*, 131: 2293—2302, 1985.
- [8] Mitchell, P. et al.: *Appl. En. Microbiol.*, 49: 1332—1334, 1985.
- [9] Ingraham, J. L. and J. L. Stokes: *Bacteriol. Rev.*, 23: 97—108, 1959.
- [10] *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Buchanan, & N. E. Gibbons, Baltimore, Williams & Wilkins, 1974.
- [11] N. 冈查洛夫: 《异养细菌鉴定的检索与方法》(徐浩译),科学出版社,北京,1973 年。
- [12] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著: 《一般细菌常用鉴定方法》,科学出版社,北京,1978 年。
- [13] 周方,朱厚础译编: 《气相色谱法在微生物学和医学中的应用》,科学出版社,北京,1984 年。
- [14] Eddy, B. P.: *J. Appl. Bacteriol.* 23: 189—190, 1960.
- [15] *Modern Food Microbiology*, second edition, James M. Jay, 1978.