

耐热菌的极限生存条件研究

李 莉, 田 士林

(黄淮学院农林科学系, 河南驻马店 463000)

摘 要: 本试验以从河南三门峡湖滨果汁有限责任公司苹果浓缩汁生产线上分离出的耐热菌和从德国引进的标准耐热菌为试材, 对其热力杀菌进行了系统试验研究。结果表明: 在 80 ℃热处理 45 min 时, 分离耐热菌和标准耐热菌的杀灭率分别为 84.47%、86.67%; 85 ℃热处理 35 min, 杀灭率分别为 92.56%、94.66%; 90 ℃热处理 30 min, 杀灭率分别为 99.85%、98.95%; 95 ℃热处理 11 min, 杀灭率分别为 96.59%、99.01%。可以看出 80、85、95 ℃时, 在相同温度条件分离耐热菌比标准耐热菌更难以被杀死, 但在 90 ℃时, 热处理对标准耐热菌的杀灭率却小于此条件下分离耐热菌的杀灭率。

关键词: 浓缩苹果汁; 耐热菌; 分离; 热处理

中图分类号: S609 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2006)06-0154-03

浓缩苹果汁加工是一种提高苹果附加值的加工方式。2004 年, 我国浓缩苹果汁出口量为 48.7 万 t, 约占世界苹果汁贸易总量的 50%^[1]。但在苹果浓缩汁加工过程中, 存在许多有待解决的问题, 耐热菌便是其中之一^[2]。

所谓耐热菌是指酸土环脂芽孢杆菌, 它属于环脂芽孢杆菌属, 在环脂芽孢杆菌属的 5 个种中仅酸土环脂芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*)^[3] 可经受果汁巴氏杀菌过程而存活, 在合适的条件下, 可迅速生长繁殖而导致果汁感官品质的劣变。在浓缩苹果汁出口时, 国外厂商要求在 10 mL 浓缩汁中该菌含量不大于一个。于是, 对耐热菌的含量控制成为各苹果浓缩生产厂家最迫切解决的问题。

本次试验对苹果浓缩汁生产线上分离出的耐热菌, 采用高温热力杀灭的方法进行杀菌试验研究, 找出了杀灭率较高的温度和热处理时间。以期控制耐热菌含量提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

浓缩苹果汁: 河南三门峡湖滨果汁有限责任公司浓缩苹果汁生产线

标准耐热菌: DSM 3922(购自德国)

增菌培养基: 酵母浸膏 0.5%、葡萄糖 0.2%、蛋白胨 0.5%、浓缩苹果汁 (72brix) 2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.04%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 KH_2PO_4 0.12%、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 NaNO_3 0.3%、 KCl 0.05%、 FeSO_4 0.001%。PDA 培养基^[4]: 水 1 000 mL、琼脂 20 g、葡萄糖 20 g、马铃薯(去皮)200 g。

1.2 仪器

恒温培养箱(DPX-9002B-1)、二氧化碳培养箱、摇床培养箱(HWY-2112)、鼓风干燥箱(DGX-9143BC)、恒温水浴器(HSQ-1)、电子天平(JA2003)、酸度计(PHS-3C)、超低温冰箱(WD900ATL23-2)、菌落计数器(TYJ-2A)、生物洁净工作台(BCN-1360B)、高压蒸汽灭菌器(ZDX-35BI)、超声波清洗机(HS-600D)。

1.3 方法

用热处理对分离耐热菌及标准耐热菌进行杀菌处理, 比较两种耐热菌芽孢的耐热能力。

1.3.1 耐热菌芽孢悬浊液的制备 将分离出的耐热菌于增菌培养基上(pH=3.7) 45 ℃下培养 2 d 转移至 PDA 培养基(pH=5.6)于 43 ℃培养 7 d 直到至少有 80%的芽孢生成, 用约 5 mL 无菌水和柔软无菌的擦拭纸冲洗擦拭培养基表面, 收集悬浮液于 4 ℃下 4 000 g 离心 20 min, 弃去上层清液。用无菌水再次悬浮, 于 4 ℃下 4 000 g 离心 10 min, 重复 4 次。将最终得到的沉淀置于缓冲液(pH=7.0)中制成悬浮液。

1.3.2 热处理杀灭耐热菌^[5] 将标准耐热菌和分离出的耐热菌制备成芽孢悬浊液, 于 70 ℃下处理 30 min 激活芽孢, 再将其注入无菌毛细试管中, 火焰封口, 分别在 80、85、90、95 ℃温度下水浴热处理不同的时间, 热处理后马上取出立即冰水冷却, 浸入 70%乙醇溶液中, 取出, 无菌操作打开一端, 取出溶液 100 μL , 用无菌水稀释成不同倍数, 用涂布法接种 100 μL 于 pH=3.7 的 AAM 培养基上, 45 ℃下培养 72 h, 观察并记录菌落个数。

2 结果与分析

果汁中耐热菌的杀菌试验结果分析如下。

2.1 热处理试验

从表上可以看出, 相同的热处理温度下, 延长处理时间, 菌株的杀灭率提高; 提高热处理温度, 将加快菌株的杀灭。80 ℃条件下, 热处理 45 min, 标准耐热菌杀灭率才达到 86.67%, 分离耐热菌的杀灭率达到 84.47%; 但在 95 ℃条件下, 只要热处理 5 min, 就可以达到相同的杀灭率。表上说明在对耐热菌杀灭的实验中, 提高温度比延长热处理时间更加有效。

2.2 相同杀菌温度下杀灭率与时间的关系(如图 1~4 所示)

比较图 1~4 不同温度下的耐热菌杀灭率与时间的关系, 可以看出在温度为 80、85、95 ℃三个水平中相同处理时间下的标准耐热菌的杀灭率度大于此条件下分离耐热菌的杀灭率, 这表明在相同热处理杀菌条件下, 一般情况下分离耐热菌比标准耐热菌更难以被杀死。此外我们也注意到在热处理温度为 90 ℃时, 热处理对标准耐热菌的杀灭率却小于此条件下

分离耐热菌的杀灭率。

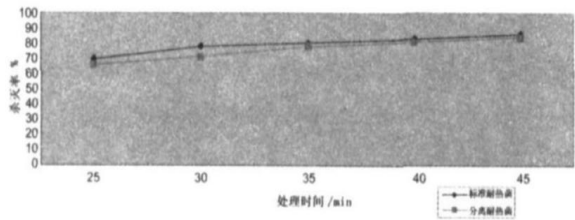


图 1 80 °C以下耐热菌杀灭率与时间的关系

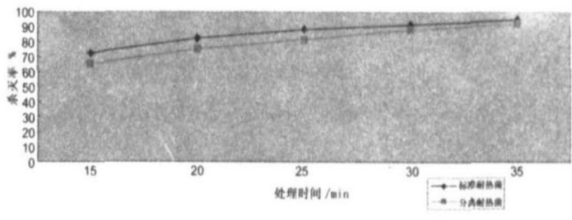


图 2 85 °C以下耐热菌杀灭率与时间的关系

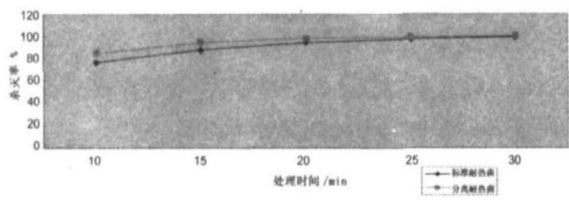


图 3 90 °C以下耐热菌杀灭率与时间的关系

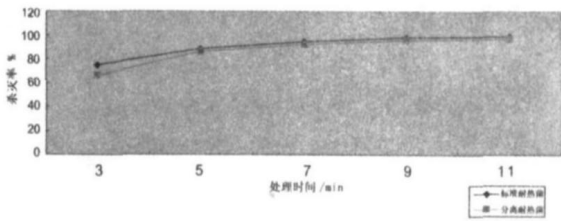


图 4 95 °C以下耐热菌杀灭率与时间的关系

表 1 热处理试验结果

温度 (°C)	菌种	算式	热处理杀菌处理时间(M IN)					
			0	25	30	35	40	45
80	标准热菌菌株	总数值(cfu/m L)× 10 ⁴	36	10.9	7.8	7.0	5.9	4.8
		杀灭率(%)	0	69.72	78.33	80.56	83.61	86.67
	分离耐热菌菌株	总数值(cfu/m L)× 10 ⁴	20.6	6.9	5.9	4.5	3.9	3.2
		杀灭率(%)	0	66.50	71.36	78.16	81.07	84.47
85	标准热菌菌株	算式	热处理杀菌处理时间(M IN)					
			0	15	20	25	30	35
85	标准热菌菌株	总数值(cfu/m L)× 10 ⁴	28.6	7.9	5.0	3.3	2.5	1.5
		杀灭率(%)	0	72.46	82.35	88.52	91.23	94.66
	分离耐热菌菌株	总数值(cfu/m L)× 10 ⁴	20.5	7.1	5.1	3.8	2.4	1.5
		杀灭率(%)	0	65.28	75.20	81.65	88.24	92.56
90	标准热菌菌株	算式	热处理杀菌处理时间(M IN)					
			0	10	15	20	25	30
90	标准热菌菌株	总数值(cfu/m L)× 10 ⁴	29.2	6.9	3.6	1.7	0.76	0.3
		杀灭率(%)	0	76.53	87.64	94.32	97.41	98.95
	分离耐热菌菌株	总数值(cfu/m L)× 10 ⁴	26.5	4.0	1.6	0.53	0.2	0.04
		杀灭率(%)	0	85.02	94.11	98.01	99.20	99.85
95	标准热菌菌株	算式	热处理杀菌处理时间(M IN)					
			0	3	5	7	9	11
95	标准热菌菌株	总数值(cfu/m L)× 10 ⁴	24.8	6.2	3.0	1.4	0.6	0.3
		杀灭率(%)	0	74.98	87.92	94.21	97.62	99.01
	分离耐热菌菌株	总数值(cfu/m L)× 10 ⁴	17.6	6.0	2.4	1.3	0.7	0.6
		杀灭率(%)	0	66.12	86.43	92.85	95.98	96.59

注: 杀灭率: (MIC0－MIC)/ MIC0× 100%(MIC－杀菌处理后的菌体浓度, MIC0－杀菌处理前的菌体原始浓度)

黄瓜黑星病的发生与防治措施

李晓红

(辽东学院农学院园林园艺系, 118003)

中图分类号: S436.421.1⁺9 文献标识码: B

文章编号: 1001-0009(2006)06-0156-01

黄瓜黑星病,又叫疮痂病,此病发生时间早、持续时间长、幼苗、叶片、茎蔓和果实均可被害,严重影响黄瓜的产量和质量,发病后一般减产10%~30%,病瓜味苦失去食用价值,随着设施栽培的发展逐年加重,除黄瓜外,还危害甜瓜、南瓜、西葫芦、冬瓜等葫芦科作物。

1 症状

幼苗期发病,子叶上形成圆形、黄褐色小斑点,扩展后烂掉,植株停止生长导致死亡。成株期发病,叶片、茎蔓、龙头、瓜条等部位均可受害,以瓜条受害最为严重。叶片发病产生褪绿的近圆形的病斑,后变为黄褐色,病斑干枯后会穿孔,边缘呈星芒状;龙头发病生长点萎蔫,发褐,2~3 d 龙头烂掉,形成“秃桩”;茎蔓病斑略呈椭圆形,淡黄褐色,稍凹陷;幼瓜和成瓜病斑水浸状向内发展,褪绿圆形、不规则行至星芒状。茎蔓和瓜条上的病斑表面常有琥珀色胶质物溢出,俗称“冒油”;湿度大时密生灰色霉层;后期病斑表面呈疮痂状,干燥时龟裂。病瓜一般不腐烂,但常生长不均衡,弯曲畸形。

2 发生规律

黑星病的病原菌属半知菌亚门真菌。病菌可产生发达的菌丝体和分生孢子梗、椭圆形的分生孢子。病菌以菌丝体或菌丝块在地表或土壤中越冬,或以菌丝体潜伏在种皮下越冬,或附着在架材上越冬。带菌种子播种后可直接侵染子叶,引起幼苗发病。越冬的菌丝春天产生新的分生孢子,引起田间初次侵染。黄瓜发病后,在适宜条件下病部产生大量的分生孢子,借气流、水和农事操作传播,引起再侵染。低温、弱光和高湿有利于黑星病的发生。最适温度在15~22℃,空气相对湿度在90%以上时,棚室顶部、植株上有水滴的情况下发生

严重。因而春天温度低、湿度大、雨雪天或透光差的棚室早而且严重。

3 防治措施

3.1 加强检疫 黄瓜生长期进行田间检疫检验,发现病株及时采取相应措施;调用无病种子,控制黑星病的传播蔓延。

3.2 消毒处理

3.2.1 种子消毒 选用抗病品种,播种前进行种子消毒,可用55℃温水浸泡15 min 后催芽播种,或用40%甲醛100倍液浸种30 min 洗净晾干后播种,或用25%多菌灵可湿性粉剂300倍液浸种1~2 h,清洗后催芽播种,或用种子重量0.3%~50%多菌灵可湿性粉剂拌种。

3.2.2 棚室消毒 播种前或定植前,用硫磺熏蒸进行环境消毒,每100 m³用硫磺0.25 kg 加锯末0.5 kg 混合后分几堆点燃后熏蒸一夜。

3.2.3 苗床消毒 选用大田土或未种过瓜类蔬菜的土壤。床土消毒可用50%多菌灵可湿性粉剂,或用60%防霉宝可湿性粉剂,或50%凯克星可湿性粉剂,用药8 g/m²,混入干细土5 kg 拌匀配成药土撒施。

3.2.3 定植地块土壤消毒 对于连作的地块在夏季高温季节,每667 m²撒石灰氮35~60 kg 和4~6 cm 长的秸秆1~1.5 t 耕翻30 cm 深,起垄,覆盖透明薄膜,膜下灌足水,四周盖严,用太阳能熏蒸20~30 d。

3.3 栽培管理 与瓜类蔬菜实行3年以上的轮作,施足腐熟的有机肥,增施磷、钾肥提高植株体抗性。使用透光率高、防尘性能好、抗老化、无滴新薄膜;及时清除薄膜上的灰尘,保持薄膜表面清洁;棚膜变松、起皱时,应及时拉平、拉紧等措施增加内的光照。晴天时棚室晚放风,保持较高温度,使棚室顶部露水雾化,棚室温度升高后再放顶风,下午加大放风量,降低湿度。棚室栽培覆盖地膜,露地栽培采用高畦,避免积水,雨后及时排水。合理密植,及时摘除老叶、病叶,清除病瓜、病株等。

3.4 药剂防治 发病初期用45%百菌清烟剂或黑星净烟剂,每667 m²用药300~350 g 7 d 熏1次,连熏4~5次。喷雾用40%杜邦福星乳油8 000~10 000倍液、40%福硅唑乳油8 000~10 000倍液、12.5%腈菌唑乳油800~1 000倍液、50%苯菌灵可湿性粉剂500倍液、4%~6%多抗霉素800~1 000倍液,7 d 1次,晴天连喷3~4次,喷后加强通风。

3 结论

国内外对浓缩果汁中耐热菌进行了大量研究,大部分集中在如何检测^[6~8]和性质^[9~11]方面。本试验选用热力杀菌的方法,杀灭率能达到99.01%,效果较好,但是在加热过程中果汁的营养成分会有所流失。如何能有效热杀菌,又保证果汁的感官、营养、色泽保持不变,是有待解决的问题。

参考文献:

- [1] 2004年陕西果品出口创汇增长44.9%。中国食品工业网, 2005.
- [2] Cerny, G. et al. spoilage of fruit juice by bacillus; isolation and characterization of the spoiling microorganism. Z. Lebensm. Unters. forch, 1984, 179; 224~227.
- [3] Evangelia Komitopoulou, Ioannis S. Bozaris. Alicyclobacillus acidoterrestis in fruit juices and its control by nisin. International journal of food Science & Technology, 1999, 34(1); 81~85.
- [4] 周德庆. 微生物学教程[M]. 高等教育出版社, 1993.
- [5] Mintha Nelly Uboldi Eiroa, Valeria Christina Amstalden Junqueira

Flavio L. Schmidt. Alicyclobacillus orange juice; Occurrence and heat resistance of spores. Journal of food protection, 1999, 62(8). 883~88.

[6] 陈颖, 仇农学. 臭氧对耐酸耐热菌作用的研究[J]. 食品工业科技, 2004, 38(1); 31~32.

[7] 王思新, 焦中高, 王晓燕. 浓缩苹果汁加工中耐热菌的分析与控制[J]. 食品科学, 2000, 31(9); 33~36.

[8] 仇农学, 陈颖. 臭氧溶解特性及对耐热菌非热杀菌的研究[J]. 农业工程学报, 2004, 22(4); 7~11.

[9] Petipher G. L., M. Eosmundson, and J. M. Murphy. Methods for the detection and enumeration of Alicyclobacillus acidoterrestis and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice containing drinks. Lett. Appl. Microbiol, 1997(24); 185~189.

[10] Walls, I., and R. Chuyate. Alicyclobacillus in the juice industry. Dairy Food Environ. Sanit, 1998(18); 585~587.

[11] Hippchen, B., A. Roli, and K. ponalla. Occurrence in soil of thermophilic bacilli possessing cycloheptane fatty acids and hopanoids. Arch. Microbiol, 1981(10); 53~55.