

Effects of Environmental conditions Such as Temperature and Salinity and pH on Mold Growth

Zhuodi Li¹ Zhenyun Bi²

1. Beijing Yangzhen No.1 Middle School, Beijing, 101309, China
2. Cangzhou Hospital of Integrated TCM-WM, HeBei, 061000, China

Abstract

In this study, the biological shape of food molds was explored by molding mold screening, mold identification, colony purification culture, colony competition culture, dominant bacterial population acquisition and absorption spectrometry, and different temperatures, salinity, pH, etc. were explored by orthogonal experiments, the effect of environmental factors on the growth and development of the dominant flora of mold. The results show that mold is an important microorganism causing food rot, including: *Penicillium*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, etc., of which *Penicillium* is the dominant species; the main order of growth factors of *Penicillium* is: temperature, salinity, pH. The optimal environmental conditions for *Penicillium* growth are: T=23°C, C=0.9%, pH=3.6; *Penicillium* absorption wavelength is 300 nm-550nm, so UVA can be used for food preservation preservation (wavelength 320 nm-400nm) Sterilization.

Keywords

arsenic pollution; soil; morphological distribution; Soil physical and chemical properties

温度、盐度及 pH 等环境条件对霉菌生长的影响

李卓地¹ 毕振云²

1. 北京市杨镇第一中学, 北京, 101309
2. 河北省沧州中西医结合医院, 河北, 061000

摘要

本研究通过发霉食物霉菌筛选、霉菌科属鉴别、菌落净化培养、菌落竞争培养、优势菌群获取与吸收光谱测定探索食物霉菌的生物学形状, 通过正交试验探索不同温度、盐度、pH 等环境因子对霉菌优势菌群生长发育的影响。研究结果表明: 霉菌是导致食物腐烂的重要微生物, 主要包括: 青霉、黄曲霉、黑曲霉等, 其中青霉为优势菌种; 青霉菌生长影响因子主次排序为: 温度、盐度、pH; 青霉菌生长的最佳环境条件为: T=23°C、C=0.9%、pH=3.6; 青霉菌的吸收波长为 300 nm~350nm, 因此食物防腐保存可选用 UVA 紫外线 (波长 320 nm~400nm) 灭菌。

关键词

霉菌; 温度; 盐度; pH

1 引言

霉菌是真菌的一部分, 其特点是菌丝体较发达, 无较大的子实体。霉菌在食物中生长时会产生次生产物毒素, 可使食品转变为有毒物质, 因此霉菌与霉菌毒素对食品的污染日益引起重视^[1]。目前抑制霉菌生长的方法主要有: 物理防霉法, 通过控制食品储藏环境因素如温度、湿度、绝氧等, 达到抑制霉菌生长^[2-3], 或采取辐射方法灭菌^[4]; 化学防霉法, 通过添加防霉剂抑制霉菌生长, 如丙酸及其盐类、山梨酸及其盐类、双乙酸钠、乙氧喹、延胡索酸、胱氨酸醋酸盐、龙胆紫、富马酸二甲酯等防霉剂; 微生物抑制法, 如微生物拮抗抑制^[5];

综合法, 如酶和抗氧化剂耦合使用。相关研究表明, 影响霉菌生长繁殖及产毒的因素诸多, 与食品关系密切的有水份、温度、基质、通风等条件等^[6]。光线灭菌也是灭菌的常用方法^[7], 常用的有紫外线灭菌、红外线灭菌。紫外线是指阳光中波长 10nm~400nm 的光线, 可分为 UVA(紫外线 A, 波长 320nm~400nm, 长波)、UVB(波长 280nm~320nm, 中波)、UVC(波长 100nm~280nm, 短波)。红外线是波长介于微波与可见光之间的电磁波, 红外线可分为三部分, 即近红外线(波长 0.75μm~3μm)、中红外线(波长 2.5μm~40μm)、远红外线(波长 25μm~1500μm)。目前大部分研究集中在温度、水分、含氧量等对霉菌生长的影响^[8], 温度、盐度及 pH 等综合环境

条件对霉菌生长的影响相对较少。本研究通过发霉食物霉菌筛选、霉菌科属鉴别、菌落净化培养、菌落竞争培养、优势菌群获取与吸收光谱测定探索食物霉菌的生物学形状,通过正交试验探索不同温度、盐度、pH 等环境因子对霉菌优势菌群生长发育的影响,以期对食物霉变速率控制与食物灭菌存储提供科学依据。

2 材料与方法

2.1 供试材料

本试验固体培养基材料结构构成见表 1。

表 1 试验固体培养基材料结构构成表

材料	重量 (g)	级别
NaNO ₃	3.00	AR
KH ₂ PO ₄	1.00	AR
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50	AR
KCl	0.50	AR
FeSO ₄	0.01	AR
蔗糖	15.00	
琼脂	20.00	
蒸馏水	1000	

加热溶解,分装后 121℃灭菌 20min。本试验液体培养基材料结构构成见表 2。

表 2 试验液体培养基材料结构构成表

材料	重量 (g)	级别
NaNO ₃	3.00	AR
KH ₂ PO ₄	1.00	AR
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50	AR
KCl	0.50	AR
FeSO ₄	0.01	AR
蔗糖	15.00	
蒸馏水	1000	

加热溶解,分装后 121℃灭菌 20min。本试验其他材料见表 3。

表 3 试验其他材料表

材料	重量 (g)	级别
面包	2000	
NaCl	1000	AR

本试验器材主要包括:面包、烤箱、灭菌锅、恒温摇床、天平(0.0001g)、恒温箱、分光光度计、光电比色计、pH 计、光学显微镜等。

2.2 试验方法

2.2.1 总体试验设计

通过菌群培养、纯化与竞争性培养获得优势菌群,测定优势菌群吸光度,通过正交试验检测不同温度、盐度、pH 条件下霉菌的生长菌数相对系数(72h 培养)与菌液浓度。

2.2.2 菌群培养与纯化

发霉面包置于 25℃、60% 湿度条件下恒温箱中连续培养 72h,并对菌落进行纯化处理。

2.2.3 菌落科属鉴定

纯化培养后的菌落采用 PCR 技术对菌种进行鉴定,采用 SEM 技术对菌落表面特征进行鉴定,确定菌落的科属。

2.2.4 竞争性培养获得优势菌群

对菌落进行竞争培养(120h),获得优势菌群。

2.2.5 优势菌群吸光度测定

对优势菌种进行吸光度测定,获得吸光波长。

2.2.6 正交试验设计

采用 L16(4³) 正交试验探索温度、盐度及 pH 对优势菌群的影响。富氧条件下对青霉菌进行液体培养。影响因素:温度、pH、盐度。温度: T₁=23℃、T₂=27℃、T₃=31℃、T₄=35℃; 盐度(NaCl%): C₁=0.00%、C₂=0.90%、C₃=1.80%、C₄=2.70%; pH: pH₁=3.6、pH₂=5.3、pH₃=7.2、pH₄=9.3。试验共设置 16 个处理,每处理按照随机原则布设 3 个重复,试验设计处理见表 4。

表 4 正交试验设计表

处理编号	T(℃)	C(NaCl%)	pH
T ₁ C ₁ pH ₁	23	0.00	3.6
T ₁ C ₂ pH ₂	23	0.90	5.3
T ₁ C ₃ pH ₃	23	1.80	7.2
T ₁ C ₄ pH ₄	23	2.70	9.3
T ₂ C ₁ pH ₂	27	0.00	5.3
T ₂ C ₂ pH ₁	27	0.90	3.6
T ₂ C ₃ pH ₄	27	1.80	9.3
T ₂ C ₄ pH ₃	27	2.70	7.2
T ₃ C ₁ pH ₃	31	0.00	7.2
T ₃ C ₂ pH ₄	31	0.90	9.3
T ₃ C ₃ pH ₁	31	1.80	3.6
T ₃ C ₄ pH ₂	31	2.70	5.3

T ₄ C ₁ pH ₄	35	0.00	9.3
T ₄ C ₂ pH ₃	35	0.90	7.2
T ₄ C ₃ pH ₂	35	1.80	5.3
T ₄ C ₄ pH ₁	35	2.70	3.6

2.3 分析测定方法

细菌数量：比浊法；菌液细菌浓度：光密度法；吸光度：分光光度计法。

2.4 数据分析方法

所有数据采用 Excel 软件处理，多重比较统计分析由 SAS8.0 数据统计软件完成。分析时，平均值比较采用最小显著差法 (Least Significant Different, LSD)，处理之间的显著性水平 $p < 0.05$ 。

3 结果与分析

3.1 菌群培养与纯化结果

菌群培养与纯化结果见下图。霉菌生长状况见图 1，霉菌竞争性培养结果见图 2，霉菌纯化培养结果见图 3。

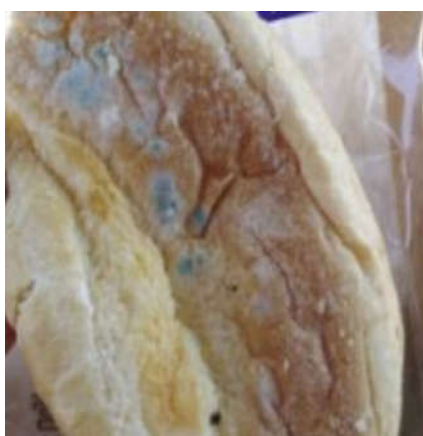


图 1 霉菌生长状况图



图 2 霉菌竞争性培养结果图

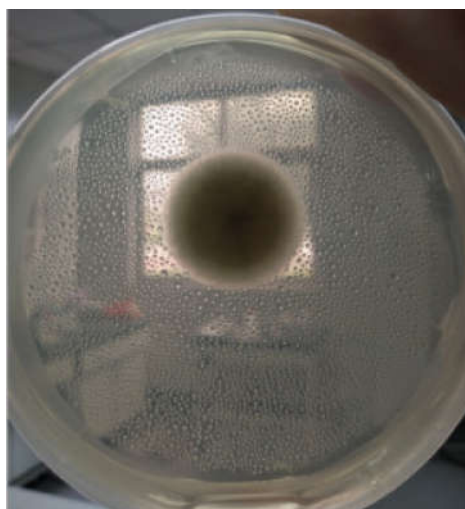


图 3 霉菌纯化培养结果图

3.2 菌落研究与鉴定结果

纯化培养后共有 3 个菌落，分别编号为 A、B、C。采用 SEM 技术对菌落表面特征进行鉴定。

A 菌群表观特征见图 4。经鉴定为子囊菌门，丝孢菌纲，散囊菌目，发菌科，青霉亚属，为青霉。

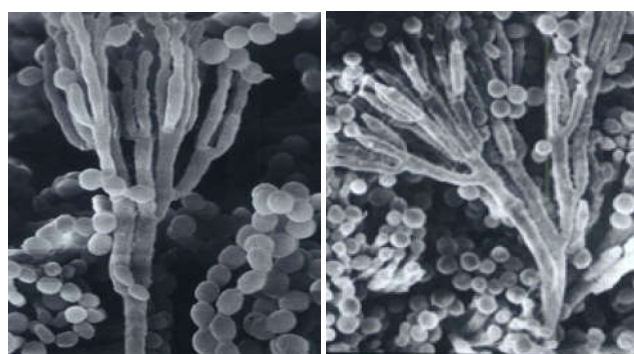


图 4 A 菌群表观特征图

B 菌群表观特征见图 5。经鉴定为子囊菌门，散囊菌纲，散囊菌目，发菌科，曲霉属，为黄曲霉。

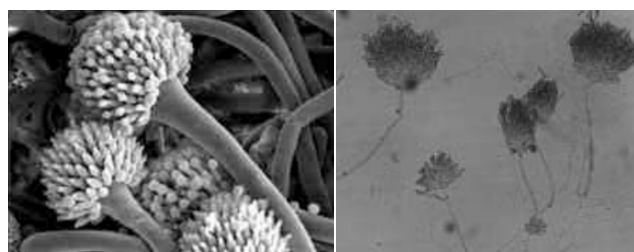


图 5 B 菌群表观特征图

C 菌群表观特征见图 6。经鉴定为半知菌亚门，丝孢菌纲，丝孢目，丛梗孢科，曲霉属，为黑曲霉。

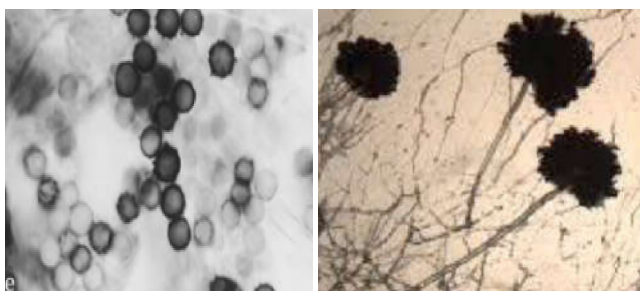


图6 C菌群表现特征图

3.3 优势菌群竞争性培养结果

对3个菌落经过竞争培养(120h),结果见图7,可明显观察到青霉为优势菌种,其可能与青霉次生产物对黄曲霉与黑曲霉有抑制作用有关。

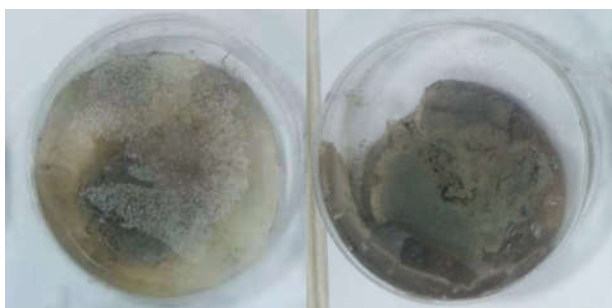


图7 菌落竞争性培养结果图

3.4 优势菌群吸光度测定

3.4.1 $T_1C_1pH_1$ 处理菌群吸光度

$T_1C_1pH_1$ 处理菌群吸光度结果见表5。随着测定光谱波长的增加,培养基与 $T_1C_1pH_1$ 处理的吸光度呈现“先升高后降低”趋势, $T_1C_1pH_1$ 处理在光谱波长为330nm~350nm之间吸光度存在最大值。紫外线A波长为320nm~400nm,可选用作为灭菌光线。

表5 $T_1C_1pH_1$ 处理菌群吸光度结果

测定波长 (nm)	培养基吸光度	$T_1C_1pH_1$ 处理吸光度
200	1.523	1.959
250	1.523	2.097
300	1.036	2.301
330	1.959	3.000
350	1.310	2.523
400	0.186	1.092
450	-0.097	0.947
500	-0.097	0.544
550	-0.097	0.138
600	-0.097	0.111

3.4.2 $T_2C_3pH_4$ 处理菌群吸光度

$T_2C_3pH_4$ 处理菌群吸光度结果见表6。随着测定光谱波长的增加,培养基与 $T_2C_3pH_4$ 处理的吸光度呈现“先升高后降低”趋势, $T_2C_3pH_4$ 处理在光谱波长为330nm~350nm之间吸光度存在最大值。紫外线A波长为320nm~400nm,可选用作为灭菌光线。

表6 $T_2C_3pH_4$ 处理菌群吸光度结果

测定波长 (nm)	培养基吸光度	$T_2C_3pH_4$ 处理吸光度
200	1.523	1.058
250	1.721	2.097
300	1.523	1.796
330	2.301	3.000
350	1.523	2.097
400	0.307	0.544
450	-0.082	0.206
500	-0.097	-0.097
550	-0.097	-0.097
600	-0.097	-0.097

3.4.3 $T_3C_4pH_2$ 处理菌群吸光度

$T_3C_4pH_2$ 处理菌群吸光度结果见表7。随着测定光谱波长的增加,培养基与 $T_3C_4pH_2$ 处理的吸光度呈现“先升高后降低”趋势, $T_3C_4pH_2$ 处理在光谱波长为330nm~350nm之间吸光度存在最大值。紫外线A波长为320nm~400nm,可选用作为灭菌光线。

表7 $T_3C_4pH_2$ 处理菌群吸光度结果

测定波长 (nm)	培养基吸光度	$T_3C_4pH_2$ 处理吸光度
200	1.796	1.620
250	1.620	1.796
300	1.244	1.886
330	2.523	3.000
350	1.495	1.886
400	0.187	0.529
450	-0.097	0.051
500	-0.097	-0.097
550	-0.097	-0.097
600	-0.097	-0.097

3.5 不同温度、盐度及 pH 对青霉菌生长发育的影响

3.5.1 不同温度、盐度及 pH 条件下菌数相对系数

不同处理菌数相对系数情况见表8。青霉菌生长温度、盐度、pH三个影响因子主次排序为温度、盐度、pH,青霉菌生长的最优环境因素组合为 $T=23^{\circ}C$ 、 $C=0.9\%$ 、 $pH=3.6$ 。

表 8 不同处理菌数相对系数表

处理	温度℃	盐度 (NaCl%)	pH	菌数相对系数
T ₁ C ₁ pH ₁	23	0.00%	3.6	0.606
T ₁ C ₂ pH ₂	23	0.90%	5.3	0.814
T ₁ C ₃ pH ₃	23	1.80%	7.2	0.829
T ₁ C ₄ pH ₄	23	2.70%	9.3	0.496
T ₂ C ₁ pH ₂	27	0.00%	5.3	0.605
T ₂ C ₂ pH ₁	27	0.90%	3.6	0.773
T ₂ C ₃ pH ₄	27	1.80%	9.3	0.576
T ₂ C ₄ pH ₃	27	2.70%	7.2	0.643
T ₃ C ₁ pH ₃	31	0.00%	7.2	0.473
T ₃ C ₂ pH ₄	31	0.90%	9.3	0.609
T ₃ C ₃ pH ₁	31	1.80%	3.6	0.675
T ₃ C ₄ pH ₂	31	2.70%	5.3	0.508
T ₄ C ₁ pH ₄	35	0.00%	9.3	0.082
T ₄ C ₂ pH ₃	35	0.90%	7.2	0.054
T ₄ C ₃ pH ₂	35	1.80%	5.3	0.106
T ₄ C ₄ pH ₁	35	2.70%	3.6	0.132
K1	2.745	1.766	2.186	
K2	2.597	2.25	2.033	
K3	2.265	2.186	1.999	
K4	0.374	1.779	1.763	
k1	0.68625	0.4415	0.5465	
k2	0.64925	0.5625	0.50825	
k3	0.56625	0.5465	0.49975	
k4	0.0935	0.44475	0.44075	
极差 R	0.59275	0.121	0.10575	

3.5.2 不同温度、盐度及 pH 条件下菌液浓度

采用比浊法间接地测定细菌的数量，用光密度 (OD 值) 表示样品菌液浓度，不同处理不同波长光密度 (OD 值) 结果见表 9。在 330nm 波长条件下 OD 值最大值为 0.920，对应处理为 T₄C₂ pH₃ 处理，450nm 波长条件下 OD 值最大值为 0.946，对应处理为 T₄C₂ pH₃ 处理，即 T=35℃、C=0.9%、pH=7.2 菌群浓度最高。

表 9 不同处理不同波长光密度 (OD 值) 结果

处理	330nm 光密度(OD 值)	450nm 光密度(OD 值)
T ₁ C ₁ pH ₁	0.279	0.394
T ₁ C ₂ pH ₂	0.105	0.186
T ₁ C ₃ pH ₃	0.070	0.171
T ₁ C ₄ pH ₄	0.000	0.504
T ₂ C ₁ pH ₂	0.350	0.395
T ₂ C ₂ pH ₁	0.073	0.227
T ₂ C ₃ pH ₄	0.368	0.424
T ₂ C ₄ pH ₃	0.020	0.134

T ₃ C ₁ pH ₃	0.432	0.527
T ₃ C ₂ pH ₄	0.347	0.391
T ₃ C ₃ pH ₁	0.268	0.325
T ₃ C ₄ pH ₂	0.460	0.492
T ₄ C ₁ pH ₄	0.879	0.918
T ₄ C ₂ pH ₃	0.920	0.946
T ₄ C ₃ pH ₂	0.818	0.894
T ₄ C ₄ pH ₁	0.854	0.868

4 讨论

本研究通过发霉面包培养霉菌并对相关霉菌进行科属鉴别，研究表明霉菌是导致食物腐烂的重要微生物，鉴别结果显示：本试验中导致面包腐烂的主要微生物为青霉、黄曲霉、黑曲霉。青霉菌常见于腐烂的水果、蔬菜及食品上，多呈灰绿色；黄曲霉多见于发霉的粮食、粮制品及其它霉腐的有机物上；黑曲霉广泛分布于粮食、植物性产品和土壤中。以上导致食物腐烂的主要在自然界中广泛存在，因此在食物的保存上要针对性选取防腐措施。

本研究发现青霉菌为面包类食物腐烂的优势菌种，光线灭菌是生活中食物保存防腐及实验室试验灭菌的常用方法，本试验已探明其青霉菌的吸收波长为 300 nm~350nm，因此食物防腐保存可选用适宜波长的光线灭菌。

5 结语

(1) 霉菌是导致食物腐烂的重要微生物，主要包括：青霉、黄曲霉、黑曲霉等，其中青霉为优势菌种。

(2) 青霉菌生长影响因子主次排序为：温度、盐度、pH。

(3) 青霉菌生长的最佳环境条件为：T=23℃、C=0.9%、pH=3.6。

(4) 青霉菌的吸收波长为 300 nm~550nm，因此食物防腐保存选用 UVA 紫外线 (波长 320~400nm) 灭菌会具备较好效果。

参考文献

- [1] 姜明, 王立凤, 律凤霞. 生物抑菌物质研究进展 [J]. 农学学报, 2013(9):53-55.
- [2] 黄淑霞, 蔡静平, 田海娟. 主要粮食品种储藏期间霉菌活动特性研究 [J]. 中国粮油学报, 2010(1):99-102.
- [3] 侯海峰, 齐永秀, 李群伟. 温度和 pH 的交互作用对黄绿青霉菌产

- 毒影响 [J]. 中国公共卫生, 2007(1):52-53.
- [4] 丁丁, 胡梁斌, 丁武, 等. 紫外线照射对黄曲霉菌产毒影响的研究 [J]. 江西农业学报, 2012 (10):140-141.
- [5] 杨利珍, 周乐, 徐虹, 等. 一株青霉菌的分离鉴定及抑菌活性成分研究 [J]. 西北农业学报, 2009 (4):98-102.
- [6] 王诚, 陈宝成. 储藏温度和水分对稻谷品质的影响 [J]. 现代食品, 2016(5):15-16.
- [7] 张永吉, 刘文君. 紫外线对自来水中微生物的灭活作用 [J]. 中国给水排水, 2005(9):1-4.
- [8] 王祥红. 青霉菌的分离及其形态观察 [J]. 生物学通报, 2008 (12):45-46.