DOI:10.12441/spyswjs.20241115004 [文章编号] 1673-1689(2025)07-0114-11

酱腌菜主要腐败菌的鉴定与致腐能力分析

朱 礼[1,2] 李慧敏[1,2] 袁列江[3,4] 彭灿灿[5,6] 周 波[5,6] 宋 晟[3,4] 吴海智[3,4] 朱明扬[1,2]
王芳妹[3,4] 刘 宇[1,2] 胡宇倩[1,2] 李 格[1,2] 孙逸清[1,2] 周 毅[1,2]

(1. 岳阳市检验检测中心,湖南 岳阳 410042; 2. 湖南省酱腌菜产品质量监督检验中心,湖南 岳阳 410042; 3. 湖南省产商品质量检验研究院,湖南 长沙 410007; 4. 食品安全监测与预警湖南省重点实验室,湖南 长沙 410111; 5. 中南林业科技大学食品科学与工程学院,湖南 长沙 410004; 6. 林产可食资源安全与加工利用湖南省重点实验室,湖南 长沙 410004)

摘要:【目的】研究酱腌菜腐败过程中的主要腐败菌及其致腐能力。【方法】采用高通量测序法,对前期、中期、后期3个腐败时期酱腌菜样品进行微生物群落组成动态分析,以分离、纯化主要腐败菌,采用菌落形态学、生化分析结合16S rDNA/ITS序列进行菌种鉴定,通过回接试验进一步验证酱腌菜中的主要腐败菌。【结果】酱腌菜3个腐败时期的主要优势腐败菌属为不动杆菌属和芽孢杆菌属,其中芽孢杆菌属随时间迁移而快速增长,该属在3个腐败时期的相对丰度分别为2.25%(早期)、18.31%(中期)、44.19%(后期),这说明芽孢杆菌属相对丰度增加可能是引起酱腌菜后期腐败的主要原因。经分离、纯化与鉴定,5株优势腐败菌分别是贝莱斯芽孢杆菌、鲍曼不动杆菌、盐枝芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和膜醭毕赤酵母;回接验证结果表明,5株腐败菌均会影响酱腌菜的脆度,且具有明显的致腐能力。【结论】该研究可为针对性地控制酱腌菜腐败菌的生长提供理论依据。

关键词:酱腌菜;高通量测序;腐败菌;分离鉴定

Identification and Spoilage Capacity Analysis of Main Spoilage Bacteria in Pickles

ZHU Li[1,2] *LI Huimin*[1,2] *YUAN Liejiang*[3,4] *PENG Cancan*[5,6] *ZHOU Bo*[5,6] *SONG Sheng*[3,4]
WU Haizhi[3,4] *ZHU Mingyang*[1,2] *WANG Fangmei*[3,4] *LIU Yu*[1,2] *HU Yuqian*[1,2] *LI Ge*[1,2]
SUN Yiqing[1,2] *ZHOU Yi*[1,2]

(1. Yueyang Inspection and Testing Center, Yueyang 410042, China; 2. Hunan Provincial Pickles Product Quality Supervision and Inspection Center, Yueyang 410042, China; 3. Hunan Provincial Institute of Product and Goods Quality Inspection, Changsha 410007, China; 4. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Early Warning, Changsha 410111, China; 5. College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 6. Hunan Key Laboratory of Edible Forest Resources Safety, Processing and Utilization, Changsha 410004, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to identify the main spoilage bacteria and evaluate their spoilage capacity in the spoilage process of pickles. [**Method**] High-throughput sequencing was employed to analyze the microbial community dynamics in the samples of pickles at the early, middle, and late stages of spoilage. The key spoilage bacteria were isolated, purified, and then identified through a combination of colony morphology observation, biochemical analysis, and 16S rDNA/ITS sequencing. Re-inoculation experiments were carried out for further validation of the primary spoilage bacteria in pickles. [**Result**] *Acinetobacter* and *Bacillus* were the dominant

基金项目:湖南省自然科学基金科技项目(2023JJ60552);湖南省市场监督管理局科技计划项目(2023KJJH36)。
通信作者:朱礼(1983—),女,硕士,高级工程师,主要从事食品质量控制与风险防控研究。E-mail:251866823@qq.com
收稿日期:2024-11-15 **修回日期:**2025-01-03

spoilage bacterial genera across the three spoilage stages. Notably, *Bacillus* exhibited rapid growth over time, with the relative abundance of 2.25%, 18.31%, and 44.19%, respectively, at the early, middle, and late stages of spoilage. This result indicated that the increase in the relative abundance of *Bacillus* might be the main cause of late spoilage in pickles. After isolation, purification, and identification, the five dominant spoilage bacterial strains were *Bacillus velezensis*, *Acinetobacter baumannii*, *Virgibacillus salarius*, *Bacillus pumilus*, and *Pichia membranifaciens*. The results of re-inoculation experiments showed that all the five strains affected the crispness of pickles, demonstrating considerable spoilage capacities. [**Conclusion**] These findings provide a theoretical foundation for targeted control against spoilage bacteria in pickles.

Keywords: pickle; high-throughput sequencing; spoilage bacterium; isolation and identification

酱腌菜是一道历史悠久且深受人们喜爱的开胃小菜和下饭菜，其主要以新鲜蔬菜为原料，经过腌渍或酱渍加工制成[1-4]。酱腌菜富含营养物质和水分，且为保持其脆度，无法进行高温杀菌，因此终产品在贮藏、运输过程中容易出现褐变、组织溶烂、风味丧失和胀包等现象[5-6]。研究表明，芽孢杆菌属和毕赤酵母属是引起酱腌菜腐败的主要微生物[7-8]。目前对于蔬菜制品中微生物的鉴定，主要采用传统分离培养法和分子生物学鉴定法[9-10]。敖晓琳等[11]从酱腌菜中分离、鉴定出导致酱腌菜产膜醭的腐败微生物为枯草芽孢杆菌、高空芽孢杆菌、盔形毕赤酵母、库德里阿兹威氏毕赤酵母和热带假丝酵母。蔡炯等[12]发现引起酱腌菜“生花”、软化和腐臭等变质现象的主要腐败菌为营养型芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和膜醭毕赤酵母。高通量测序是近些年兴起的研究微生物多样性的方法，相比于传统微生物研究方法，该方法可以更准确地反映样品中微生物的组成。Wu等[13]研究表明，酸菜在发酵过程中的微生物群落有乳杆菌属、芽孢杆菌属、明串珠菌属和德巴利酵母属等，其中乳杆菌属表现出较强的产酸能力和抑菌性。Park等[14]发现，韩国泡菜在发酵初期的主要优势菌为魏斯氏菌和乳酸菌，而明串珠菌和清酒乳杆菌在泡菜发酵末期发挥重要的产酸作用。郭倩倩等[15]发现，晴隆酸菜中的微生物菌群在4个发酵时期均存在动态变化，其主要优势菌属为魏斯氏菌属、乳酸杆菌属、明串珠菌属和鞘脂单胞菌属。高通量测序可动态分析腐败菌的组成，而传统微生物分离培养法可对主要腐败菌进行鉴定，然而将这2种方法相结合用于蔬菜制品微生物污染的研究鲜有报道。

以芥菜为原料加工各类酱腌菜是湖南省华容县的支柱型农业加工业，为有效控制酱腌菜中腐败菌的增殖，提高产品品质，促进华容县酱腌菜产业的提质升级。该研究结合高通量测序和传统微生物分离培养法对变质酱腌菜中的微生物进行分离、纯化与鉴定，并通过形态学特征观察、16S rDNA/ITS序列分析等方法鉴定酱腌菜中的主要腐败菌，最后将腐败菌接种于酱腌菜中进行回接验证判断其致腐特性，旨在为酱腌菜产业有效控制腐败菌的生长提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酱腌菜腐败早期、中期和后期样品：湖南海霸食品有限公司；麦浊比色管、无菌采样袋、一次性接种环：湖南比克曼生物科技有限公司。

营养琼脂培养基、孟加拉红培养基、LB肉汤培养基、LM肉汤培养基、革兰氏染色试剂盒、无菌磷酸盐缓冲溶液：青岛海博生物技术有限公司；香柏油：分析纯，上海懿洋仪器有限公司。

1.2 仪器与设备

高压灭菌锅：HVA-85型，日本Hirayama公司；生物安全柜：BIOsafe12型，上海力申科学仪器有限公司；生化培养箱：LRH-250型，上海一恒科技有限公司；恒温培养箱：BOI-250型，上海三腾仪器有限公司；拍打式均质器：SJ-133型，法国Znterscience公司；生物显微镜：BX53型，深圳市星辰光学仪器有限公司；pH计：SJ-142型，上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 高通量测序

将腐败早期、中期、后期样品分别编号为：F_1、F_2和F_3，将样品送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行高通量测序。首先提取酱腌菜样品

的总 DNA，根据保守区间设计通用引物，在引物末端区间进行测序接头。对 PCR 扩增产物进行纯化、定量和均一化来构建测序文库，将质检合格的测序文库在 Illumina NovaSeq 6000 测序平台上进行分析，最后进行数据处理。

1.3.2 优势腐败菌的分离与纯化培养

在无菌室内称取 25 g 酱腌菜腐败样品，放入含有 225 mL 无菌磷酸盐缓冲溶液的均质袋中，置于拍打式均质器内拍打 2 min 制成样品匀浆。将样品匀浆进行 10 倍梯度稀释后，选取 3~5 个适宜的稀释梯度样液，分别吸取 0.1 mL 样液涂布于营养琼脂培养基和孟加拉红培养基上，将细菌于 37 ℃下培养 24~48 h，真菌于 28 ℃下培养 48~72 h。培养完成后，观察并记录菌落形态，挑取典型的单一菌落，采用平板划线法对菌落进行分离纯化 2~3 次，对分离纯化后的腐败菌进行培养，于斜面培养基中冷藏备用。

1.3.3 优势腐败菌的形态学特征观察

对菌落形态特征进行观察并记录，参照李明珠等[16]的方法鉴定菌株产气和产酸情况，参照谭啸等[17]的方法对菌株进行革兰氏染色检验。

1.3.4 优势腐败菌的鉴定

将 PCR 扩增产物送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序，将所得序列在 Blast 数据库上进行同源性比对，选取近似菌种的序列，用 MEGA 11.0 软件构建系统发育树。

1.3.5 微生物回接验证

分别吸取 1 mL 浓度为 1×10^6 CFU/mL 的 5 种腐败菌菌液，分别接种至装有 50 g 酱腌菜样品的无菌采样袋中，以不加菌液为空白对照组，密封包装。将酱腌菜样品置于 38 ℃恒温培养箱中培养 72 h，观察酱腌菜样品的腐败现象并测定 pH。

1.3.6 数据处理和分析

在 Blast 数据库上进行同源性比对，采用 Excel 绘制数据表，使用 MEGA 11.0 软件构建系统发育树。

2 结果与讨论

2.1 α 多样性分析

由表 1 可知，3 个样本微生物群落的覆盖率>99.9%，表明酱腌菜样品测序结果可以代表微生物群落信息的真实情况。Chao1 指数和 ACE 指数越大，说明物种的丰富度越高；Shannon 指数越大或 Simpson 指数越小，则说明物种的多样性越高。由表 1 可知，F_2 样本中 ACE 指数、Chao1 指数和 Shannon 指数均最大，Simpson 指数最小，说明微生物群落的丰富度和多样性在腐败中期的酱腌菜中最高，可能是腐败中期适合大部分微生物生长繁殖，呈现了较为丰富的群落多样性。随后 ACE 指数、Chao1 指数和 Shannon 指数均出现不同程度的下降，而 Simpson 指数上升，表明微生物群落在酱腌菜腐败后期的丰富度和多样性下降。可能的原因是：随着腐败时间的延长，一些有益菌（如乳杆菌属、消化伴生乳杆菌属和乳球菌属）产生了大量乳酸导致 pH 下降，使部分耐酸性较弱的微生物死亡；腐败后期微生物产生的次级代谢产物（如邻苯二甲酸二（2-乙基己基）酯、抗菌肽和乳酸链球菌素）也会对微生物有抑制作用[18-20]；一些腐败菌产生的毒素和酶，如不动杆菌属分泌的外膜蛋白、芽孢杆菌属产生的异辛醇和毕赤酵母属分泌的蛋白质毒素，会使其他微生物的生长繁殖受到抑制[21-23]。综上所述，微生物群落丰富度和多样性在酱腌菜腐败过程中呈现出先增后降的趋势。

表 1 微生物群落的 α 多样性分析

Table 1 Analysis of microbial community α-diversity

样品编号	观测到的基因数目/个	Chao1 指数	ACE 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	覆盖率/%
F_1	173 654	175 487.459 0	175 797.564 4	9.971 3	0.998 9	99.91
F_2	186 664	187 791.609 2	187 570.218 5	9.981 9	0.998 7	99.98
F_3	177 656	180 626.167 0	180 511.761 3	9.816 9	0.999 7	99.95

2.2 物种分布柱状图

如图 1 所示，在门水平上，3 种样品中相对丰度较高的前 5 个细菌门依次为：厚壁菌门（Bacillota）、假单胞菌门（Pseudomonadota）、子囊菌门（Ascomycota）、放线菌门（Actinomycetota）和拟杆菌门（Bacteroidota）。其中厚壁菌门和假单胞菌门是不同样品的主要优势菌门，而子囊菌门是次要优势菌门。随着腐败时间的延长，厚壁菌门

在腐败后期相对丰度明显提高，从腐败早期的30.52%提高至腐败后期的92.13%；而假单胞菌门在腐败早期和中期属于优势菌门，但其相对丰度在腐败后期明显下降，从腐败早期的69.33%下降至腐败后期的1.96%。这与Franco等[24]的研究结果类似，该研究团队发现厚壁菌门中绝大多数革兰氏阳性菌是引起酱腌菜腐败的主要微生物。相较而言，3种样品的菌门组成在总体上大致相似，但是相对丰度有很大差异，说明酱腌菜腐败过程中，从未胀气到胀气再到消气阶段，优势菌门发生了明显的动态变化，这与刁体伟等[25]的研究结果相似。

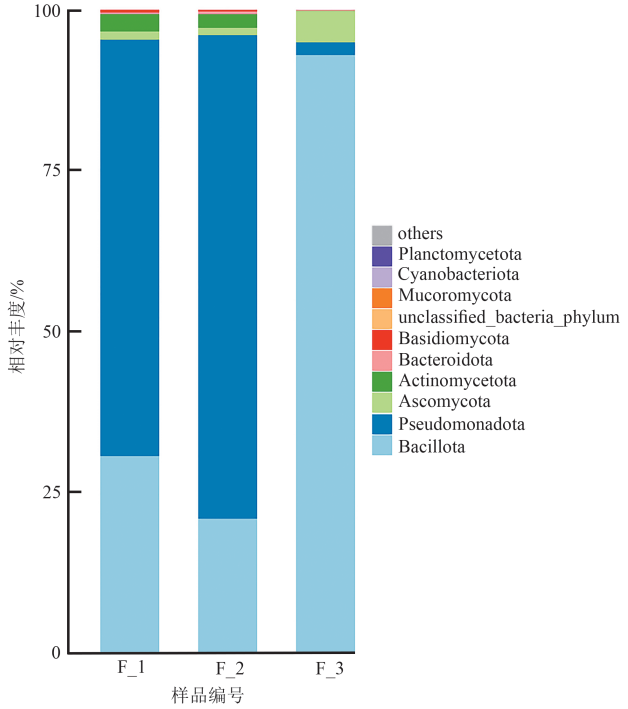


图1　门水平上微生物群落的相对丰度

Fig. 1　Relative abundance of microorganisms at the phylum level

如图2所示，在属水平上，3种样品中相对丰度较高的前6个菌属依次为：不动杆菌属（*Acinetobacter*）、芽孢杆菌属（*Bacillus*）、乳杆菌属（*Lactiplantibacillus*）、消化伴生乳杆菌属（*Companilactobacillus*）、乳球菌属（*Lactococcus*）和毕赤酵母属（*Pichia*）。不动杆菌属和芽孢杆菌属是优势菌属，它们分别属于假单胞菌门和厚壁菌门，广泛分布于水和土壤等生态环境中[26]，因此，酱腌菜中的不动杆菌属和芽孢杆菌属可能来源于土壤。此外，酱腌菜中还存在一些优势有益菌属，如乳杆菌属、消化伴生乳杆菌属和乳球菌属，它们可能来源于酱腌菜发酵原液[27]。随着腐败时间的延长，不动杆菌属相对丰度明显下降，从腐败早期的28.62%下降至腐败后期的5.87%；而芽孢杆菌属相对丰度在腐败后期明显提高，从腐败早期的2.25%提高至腐败后期的44.19%。敖晓琳等[11]已证实造成泡菜“生花”的主要菌属为酵母菌属和芽孢杆菌属，它们在酸性条件下更容易形成膜醭，是引起泡菜在发酵过程中产膜的主要微生物。而Armitano等[28]发现不仅芽孢杆菌属能够形成膜醭，不动杆菌属也能形成膜醭。在腐败过程中，若芽孢杆菌属污染严重，通常会引起酱腌菜样品汤汁浑浊、质构变软，还会导致“生花”现象的发生[8]，这说明芽孢杆菌属相对丰度增加可能是引起酱腌菜后期腐败的主要原因。

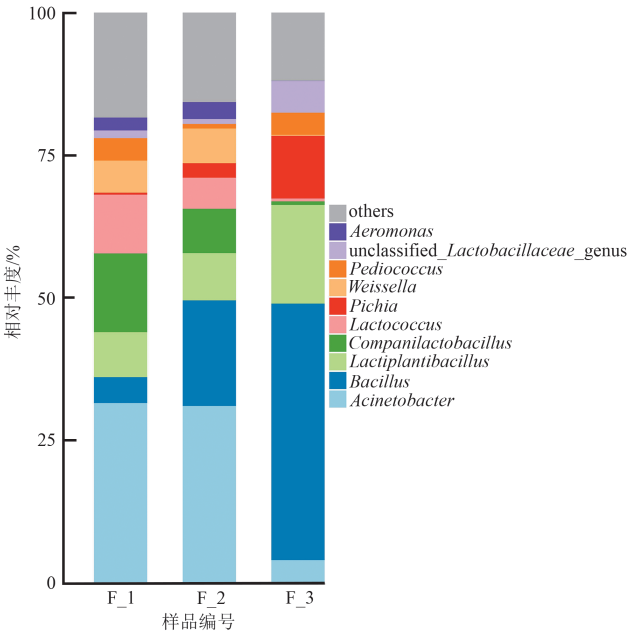


图2　属水平上微生物群落的相对丰度

Fig. 2　Relative abundance of microorganisms at the genus level

2.3　微生物群落组成的共线性关系

如图3所示，酱腌菜中的主要优势菌种为贝莱斯芽孢杆菌（*Bacillus velezensis*）、鲍曼不动杆菌（*Acinetobacter baumannii*）和消化伴生乳杆菌（*Companilactobacillus alimentarius*）等，其相对丰度分别为42.53%、25.97%、21.86%。其中，贝莱斯芽孢杆菌在腐败后期样本中的相对丰度（39.69%）较大；而鲍曼不动杆菌和消化伴生乳杆菌主要存在于腐败早期和中期样本中，且两者存

在较高的共线性关系。有研究表明，鲍曼不动杆菌是一种需氧和非乳糖发酵条件要求严格的致病菌[29]，可能是腐败后期氧气不足，从而导致鲍曼不动杆菌相对丰度下降。此外，一些有益菌在酱腌菜3个样本之间也存在共线性关系，如植物乳植杆菌（*Lactiplantibacillus plantarum*）和乳酸乳球菌（*Lactococcus lactis*），其在发酵过程中产生的乙酸和乳酸会使pH下降，从而抑制腐败菌的生长繁殖[30]。贝莱斯芽孢杆菌属于耐酸细菌，能够产生蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶等物质，使其在腐败后期营养物质缺乏的条件下继续生长繁殖，所以其相对丰度较大[31]。

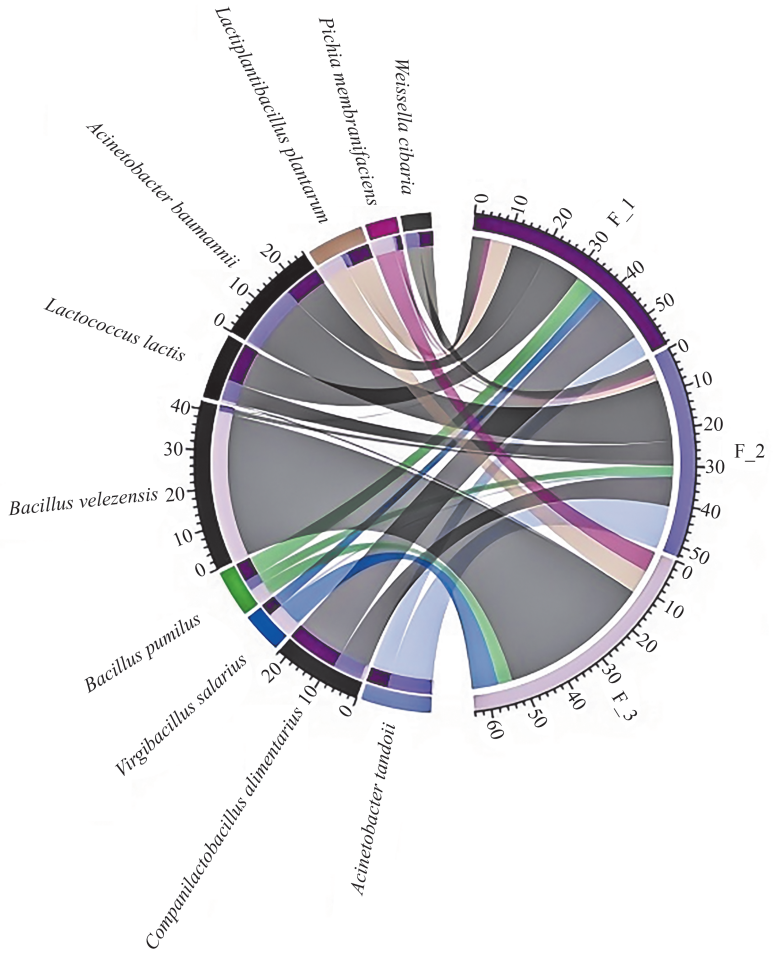


图3　微生物群落组成的共线性关系

Fig. 3　Collinear relationship of microbial community composition

2.4　KEGG功能基因预测分析

基于PICRUSt2软件进行KEGG功能基因预测分析。由图4可知，新陈代谢（Metabolism）是3种酱腌菜样品中微生物基因的主要功能。同时，对3种样品中不同菌群基因的二级功能层进行预测分析，并比较组间基因数目差异，发现占比较大的前4个为：全局和总览图谱（Global and overview maps）、碳水化合物代谢（Carbohydrate metabolism）、氨基酸代谢（Amino acid metabolism）和能量代谢（Energy metabolism）。菌群通过这些代谢途径持续合成有机物质和各种功能蛋白质，以获得能量来维持细胞活性，并不断生长和繁殖，从而提高对外部环境的适应能力[32]。结果表明，酱腌菜腐败环境中的微生物群落代谢活动主要与碳水化合物代谢有关，而这些微生物通过相关活性酶来参与碳水化合物代谢过程。

如图5所示，能催化碳水化合物代谢的相关酶系包含以下4类：氧化还原酶（auxiliary activities，AAs）、类酯解酶（carbohydrate esterases，CEs）、糖苷水解酶（glycoside hydrolases，GHs）和糖基转移酶（glycosyl transferases，GTs）。其中，催化碳水化合物代谢的相关酶主要以AAs为主，AAs能够促进有

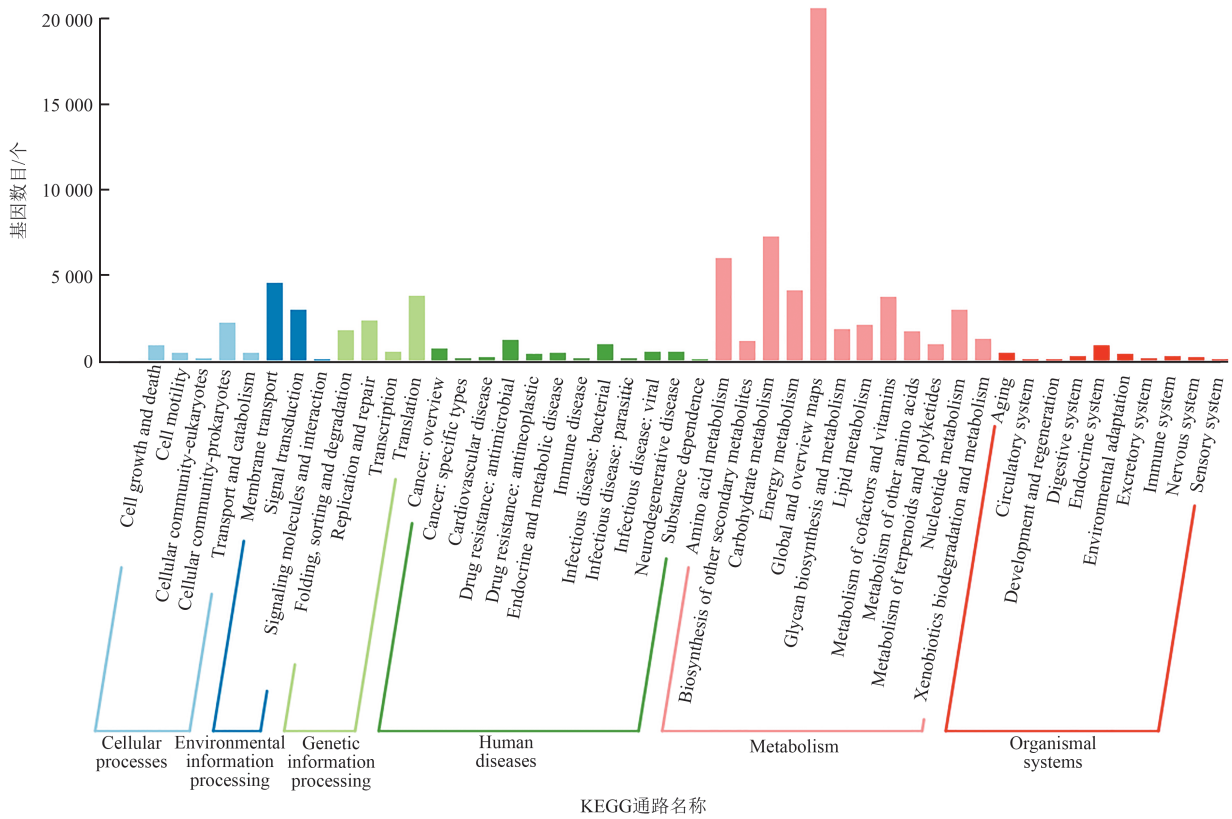


图 4　KEGG 功能基因预测分析柱状图

Fig. 4　Histogram of KEGG functional gene prediction analysis

毒害作用的过氧化物的分解，可以有效防止微生物在新陈代谢中产生过量的过氧化氢，避免其对微生物自身产生毒害作用[33]。

2.5　酱腌菜中优势腐败菌的形态学特征观察

采用平板划线法对腐败酱腌菜样品中的腐败菌进行分离纯化，共获得 4 株细菌和 1 株真菌（编号 A、B、C、D、E，统称 5 株腐败菌）。各菌株在显微镜下的形态特征如图 6 所示。菌株 A、C、D 的革兰氏染色结果均为阳性（呈蓝紫色），菌体形态为杆状；菌株 B 的革兰氏染色结果为阴性（呈粉红色），菌体形态为杆状；菌株 E 为真菌，菌体形态呈椭圆形球状。对所获得的 5 株腐败菌进行菌落形态学特征观察、革兰氏染色镜检和葡萄糖产气产酸试验，结果见表 2。

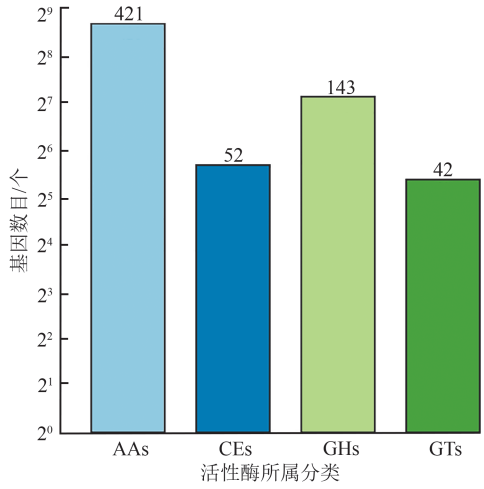


图 5　碳水化合物代谢相关酶的注释柱状图

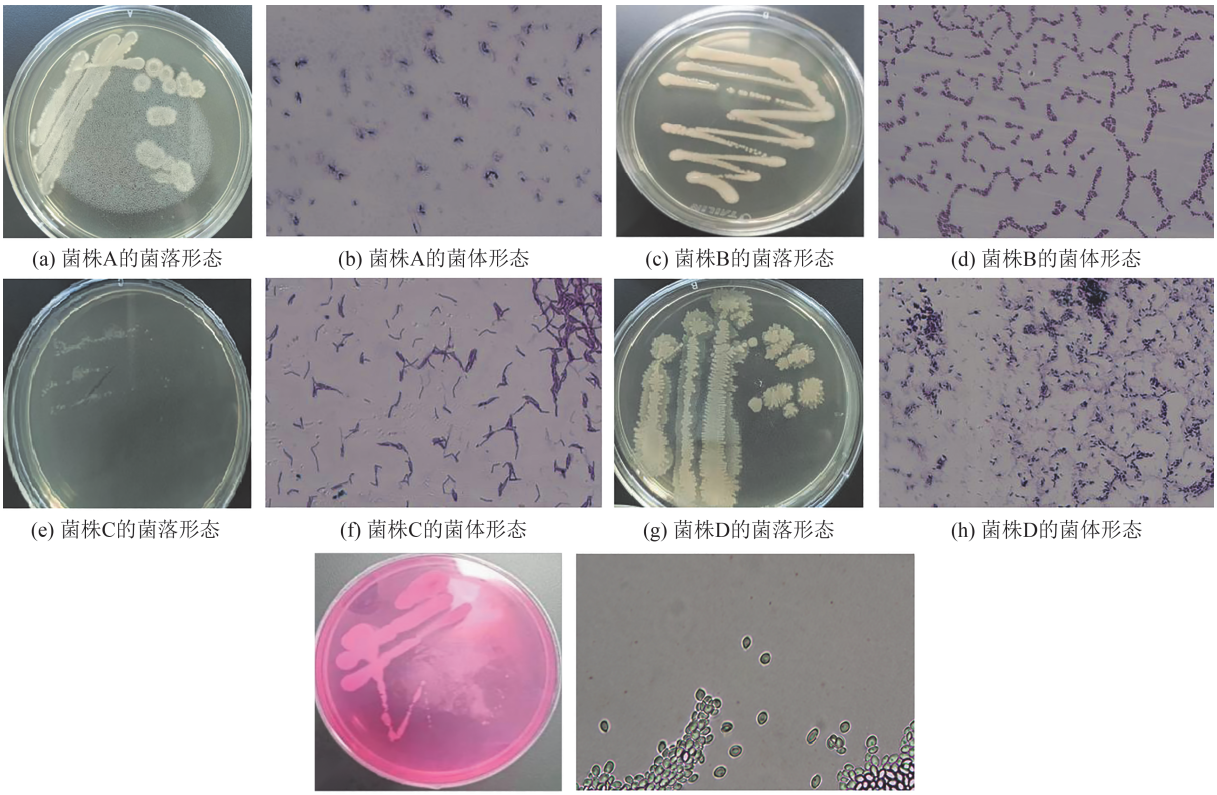
Fig. 5　Histogram of carbohydrate metabolism-related enzyme annotation

2.6　酱腌菜中优势腐败菌的鉴定

如图 7 所示，将 5 株腐败菌测序结果在 Blast 数据库进行比对后，发现 5 株腐败菌 A、B、C、D、E 分别和 *Bacillus velezensis*、*Acinetobacter baumannii*、*Virgibacillus salarius*、*Bacillus pumilus*、*Pichia membranifaciens* 聚为一类，同源性达 99% 以上。故酱腌菜中腐败菌的鉴定结果为：菌株 A 为贝莱斯芽孢杆菌，菌株 B 为鲍曼不动杆菌，菌株 C 为盐枝芽孢杆菌，菌株 D 为短小芽孢杆菌，菌株 E 为膜醭毕赤酵母。

2.7　微生物回接验证及腐败现象分析

将上述 5 株腐败菌回接到酱腌菜中，由表 3 可



(a) 菌株A的菌落形态 (b) 菌株A的菌体形态 (c) 菌株B的菌落形态 (d) 菌株B的菌体形态

(e) 菌株C的菌落形态 (f) 菌株C的菌体形态 (g) 菌株D的菌落形态 (h) 菌株D的菌体形态

(i) 菌株E的菌落形态 (j) 菌株E的菌体形态

图 6 腐败菌的菌落形态和菌体形态

Fig. 6 Colony morphology and cell morphology of spoilage bacteria

知，5株腐败菌不会引起酱腌菜胀袋，而会引起酱腌菜质构变软。其中贝莱斯芽孢杆菌、鲍曼不动杆菌和短小芽孢杆菌是导致酱腌菜发臭和变软的主要原因；贝莱斯芽孢杆菌会引起酱腌菜渗水；鲍曼不动杆菌会造成酱腌菜发黑；而鲍曼不动杆菌、短小芽孢杆菌和膜醭毕赤酵母会使pH升高。整体而言，酱腌菜的脆度都有所降低（变软），主要是因为腐败菌通过产生胞外酶降解蔬菜组织中的果胶，随腐败时间延长，pH升高促使果胶转化为果胶酸，从而引起组织结构变软[34]。Moon等[35]将毕赤酵母属接种到酱腌菜后，其质地变软，主要原因是毕赤酵母产生的聚半乳糖醛酸酶活性很高，导致果胶发生水解。有研究者[36]在一些芽孢杆菌属的发酵试验中发现，此类菌株产生的氧化还原酶可以降解黑色素及相关产物，从而减少美拉德反应的发生，减缓酱腌菜的褐变速度。彭鑫等[37]将腐败菌接种到湘味豆干中，也发现芽孢杆菌会导致样品发臭，同时鲍曼不动杆菌会引起样品质构变软。鲍曼不动杆菌、短小芽孢杆菌和膜醭毕赤酵母引起pH升高，可能是因为菌株在生长繁殖过程中会利用代谢产物乳酸和乙酸，从而引起酱腌菜的pH升高。研究表明，

表 2 腐败菌的形态学特征

Table 2 Morphological characteristics of spoilage bacteria

菌株编号	颜色	表面	质地	形状	菌落直径/mm	边缘形状	透明度	隆起度	革兰氏染色结果	产气结果	产酸结果	细胞形态
A	淡黄色	湿润	不易挑起	不规则形状	2~5	不规则	不透明	隆起	阳性	不产气	产酸	杆状
B	乳白色	较湿润	易挑起	圆形	1~3	规则	不透明	隆起	阴性	不产气	产酸	杆状
C	淡黄色	较湿润	不易挑起	圆形	0~1	规则	透明	扁平	阳性	不产气	产酸	杆状
D	淡黄色	湿润	易挑起	不规则形状	3~6	不规则	半透明	隆起	阳性	不产气	产酸	杆状
E	乳白色	较湿润	易挑起	圆形	1~3	规则	不透明	隆起		不产气	产酸	椭圆形

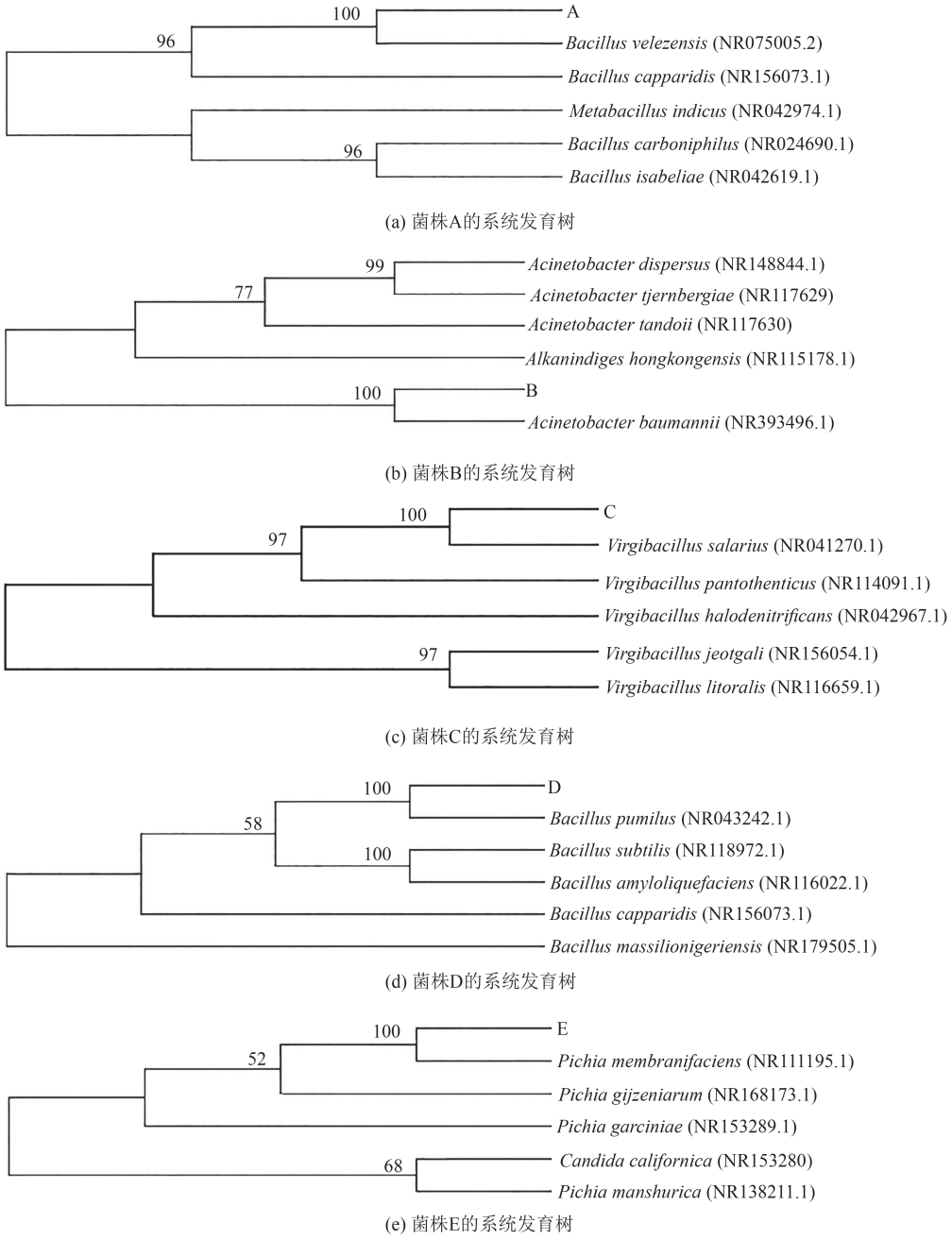


图 7　5 株腐败菌的系统发育树

Fig. 7　Phylogenetic tree of five strains of spoilage bacteria

表 3　腐败菌的回接试验结果

Table 3　Re-inoculation experiment results of spoilage bacteria

腐败菌	胀袋	渗水	变软	发黑	发臭	pH
贝莱斯芽孢杆菌	−	+	+	−	+	3.7
鲍曼不动杆菌	−	−	+	+	+	3.8
盐枝芽孢杆菌	−	−	+	−	−	3.7
短小芽孢杆菌	−	−	+	−	+	3.8
膜醭毕赤酵母	−	−	+	−	−	3.9
对照组（未加菌种）	−	−	−	−	−	3.7

注：“−”代表无明显变化；“+”代表变化明显。

一些芽孢杆菌和酵母菌在液体培养基中培养时，开始形成膜醭时的 pH 高于 5.0，说明它们除了能产生膜醭外还能引起 pH 升高，这一特性与能利用乳酸和乙酸引起酱腌菜腐败的微生物相同，这也是酱腌菜腐败的另一典型特征[24,38]。结果表明，贝莱斯芽孢杆菌、鲍曼不动杆菌、盐枝芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和膜醭毕赤酵母是导致酱腌菜变质的主要微生物。

3 结论

作者采用高通量测序技术，分析了变质酱腌菜在早期、中期、后期3个腐败阶段的微生物多样性变化。结合菌落形态观察、16S rDNA/ITS序列鉴定及回接试验对酱腌菜中的腐败菌进行鉴定。结果显示，微生物群落在酱腌菜腐败过程中呈动态变化，主要优势腐败菌属为不动杆菌属和芽孢杆菌属。筛选出的5株腐败菌鉴定为：贝莱斯芽孢杆菌、鲍曼不动杆菌、盐枝芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和膜醭毕赤酵母。回接验证结果表明，贝莱斯芽孢杆菌、鲍曼不动杆菌和短小芽孢杆菌均会导致酱腌菜发臭和软化；贝莱斯芽孢杆菌会导致酱腌菜渗水；鲍曼不动杆菌会导致酱腌菜发黑；鲍曼不动杆菌、短小芽孢杆菌和膜醭毕赤酵母均会导致酱腌菜pH上升。

该研究通过高通量测序技术对腐败菌进行鉴定，并通过回接试验证实了5株腐败菌的致腐能力，分析了其动态变化对酱腌菜品质的影响，为揭示酱腌菜中优势腐败微生物的致腐机理以及开发有效的抑菌防腐保鲜技术提供理论依据。然而，鉴于腐败过程的复杂性，仍需深入探究这些腐败微生物的来源及其具体的致腐机制。后期可结合前期研究成果和生产记录，追溯腐败菌的来源，重点考察原料、加工环境及生产工具等因素的影响。同时，针对腐败菌的生长特性，探索是否能通过调整腌制时间、温度和盐分等条件来抑制其生长，以期进一步提升酱腌菜的品质与安全性。

参考文献

[1] 贺蓓蓓，彭晓顺，杨逸飞，等. 乳酸菌发酵酸菜研究进展[J]. 绿色科技，2021，23(20)：257-260，265.
HE B B，PENG X S，YANG Y F，et al. Research progress of sauerkraut fermented by lactic acid bacteria[J]. Journal of Green Science and Technology，2021，23(20)：257-260，265.(in Chinese)

[2] 余春平，许春芳. 肉桂酸钾在酱腌菜中的应用研究[J]. 食品工程，2023(1)：65-69.
YU C P，XU C F. Application of potassium cinnamate in pickled vegetables[J]. Food Engineering，2023(1)：65-69.(in Chinese)

[3] 任彩霞，王立霞，丁毅. 西安市售酱腌菜中防腐剂和糖精钠的检测与分析[J]. 保鲜与加工，2022，22(8)：76-81.
REN C X，WANG L X，DING Y. Determination and analysis of preservatives and saccharin sodium content in commercial pickles in Xi'an[J]. Storage and Process，2022，22(8)：76-81.(in Chinese)

[4] LI W F，CHEN C L，CHEN M T，et al. Salted and unsalted Zhàcài (*Brassica juncea* var. *tumida*) alleviated high-fat diet-induced dyslipidemia by regulating gut microbiota：a multiomics study[J]. Molecular Nutrition & Food Research，2020，64(24)：e2000798.

[5] CINIVIZ M，YILDIZ H. Determination of phenolic acid profiles by HPLC in lacto-fermented fruits and vegetables (pickle)：effect of pulp and juice portions[J]. Journal of Food Processing and Preservation，2020，44(7)：e14542.

[6] 卢新，宗红，陆信曜，等. 乳酸菌在酱类开封后腐败控制中的应用研究[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(7)：165-172.
LU X，ZONG H，LU X Y，et al. Study on the application of lactic acid bacteria in spoilage control of sauce products after unsealing [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43(7)：165-172.(in Chinese)

[7] ZHANG F，TANG Y，REN Y，et al. Microbial composition of spoiled industrial-scale Sichuan Paocai and characteristics of the microorganisms responsible for Paocai spoilage [J]. International Journal of Food Microbiology，2018，275：32-38.

[8] 敖晓琳，蒲彪，蔡义民，等. 能抑制引起泡菜“生花”腐败菌的乳酸菌的筛选[J]. 食品工业科技，2014，35(14)：234-236，249.
AO X L，PU B，CAI Y M，et al. Screening *Lactobacillus* to inhibit spoilage microorganism isolated from film-forming pickle [J]. Science and Technology of Food Industry，2014，35(14)：234-236，249.(in Chinese)

[9] 杨颖，胡梅，王望舒，等. 酱腌菜防腐技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报，2020，11(7)：2044-2049.
YANG Y，HU M，WANG W S，et al. Research progress on antiseptic technology of pickles [J]. Journal of Food Safety & Quality，2020，11(7)：2044-2049.(in Chinese)

[10] 尹含靓，刘洋，谭益升，等. 泡椒凤爪溶烂腐败菌的鉴定及其致腐能力分析[J]. 食品科学，2023，44(16)：312-317.
YIN H L，LIU Y，TAN Y S，et al. Identification of dominant spoilage bacteria in chicken feet with pickled peppers and analysis of their spoilage capacity[J]. Food Science，2023，44(16)：312-317.(in Chinese)

[11] 敖晓琳，蔡义民，夏姣，等. 引起泡菜“生花”腐败微生物的分离鉴定[J]. 食品科学，2013，34(21)：204-208.
AO X L，CAI Y M，XIA J，et al. Isolation and identification of spoilage microorganisms from Sichuan pickles[J]. Food Science，2013，34(21)：204-208.(in Chinese)

[12] 蔡炯，迟原龙，汪冬冬，等. 腐败四川泡菜菌相构成及主要腐败菌特性分析[J]. 食品科技，2017，42(1)：279-283.
CAI J，CHI Y L，WANG D D，et al. Microflora and characteristics of main spoilage microorganisms in putrid Sichuan pickle[J]. Food Science and Technology，2017，42(1)：279-283.(in Chinese)

[13] WU R N，YU M L，LIU X Y，et al. Changes in flavour and microbial diversity during natural fermentation of Suan-cai，a traditional food made in Northeast China[J]. International Journal of Food Microbiology，2015，211：23-31.

[14] PARK J M，SHIN J H，LEE D W，et al. Identification of the lactic acid bacteria in Kimchi according to initial and over-ripened fermentation using PCR and 16S rRNA gene sequence analysis[J]. Food Science and Biotechnology，2010，19(2)：541-546.

[15] 郭倩倩，卢彪. 晴隆酸菜发酵过程中微生物菌群多样性动态分析[J]. 中国酿造，2020，39(8)：86-91.
GUO Q Q，LU B. Dynamic analysis of microbial flora diversity in the Qinglong sauerkraut fermentation process[J]. China Brewing，2020，39(8)：86-91.(in Chinese)

[16] 李明珠，李翠萍，冯金晓，等. 青岛蓝丰蓝莓表皮微生物分离与初步鉴定[J]. 武汉轻工大学学报，2019，38(5)：19-23.
LI M Z，LI C P，FENG J X，et al. Isolation and identification of microorganisms of Lanfeng blueberry epidermis in Qingdao[J]. Journal of Wuhan Polytechnic University，2019，38(5)：19-23.(in Chinese)

[17] 谭啸，章熙东. 革兰氏染色法观察与区分细菌[J]. 生物学教学，2019，44(7)：71-72.
TAN X，ZHANG X D. Observation and differentiation of bacteria by Gram staining method[J]. Biology Teaching，2019，44(7)：71-72.(in Chinese)

[18] JAVED M R，SALMAN M，TARIQ A，et al. The antibacterial and larvicidal potential of bis-(2-ethylhexyl) phthalate from *Lactiplantibacillus plantarum* [J]. Molecules，2022，27(21)：7220.

[19] WANG T，WANG S X，DONG S C，et al. Interaction of *Companilactobacillus crustorum* MN047-derived bacteriocins with gut microbiota[J]. Food Chemistry，2022，396：133730.

[20] SONG A A，IN L L A，LIM S H E，et al. A review on *Lactococcus lactis*：from food to factory[J]. Microbial Cell Factories，2017，16(1)：55.

[21] DOUGHARI H J，NDAKIDEMI P A，HUMAN I S，et al. The ecology，biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.：an overview[J]. Microbes and Environments，2011，26(2)：101-112.

[22] 张凯歌，魏琛，余璐，等. 枯草芽孢杆菌PW2挥发性产物对黄曲霉的抑制作用[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(5)：122-129.
ZHANG K G，WEI C，YU L，et al. Inhibition of *Aspergillus flavus* by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* PW2[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43(5)：122-129.(in Chinese)

[23] BELDA I，RUIZ J，ALONSO A，et al. The biology of *Pichia membranifaciens* killer toxins[J]. Toxins，2017，9(4)：112.

[24] FRANCO W，PÉREZ-DÍAZ I M. Microbial interactions associated with secondary cucumber fermentation[J]. Journal of Applied Microbiology，2013，114(1)：161-172.

[25] 刁体伟，陈晓姣，魏鑫，等. 基于可培养法与高通量测序对大头菜致腐菌筛选及细菌结构分析[J]. 中国调味品，2022，47(6)：44-49，60.
DIAO T W，CHEN X J，WEI X，et al. Screening and bacterial structure analysis of spoilage bacteria in kohlrabi based on culturable method and high-throughput sequencing[J]. China Condiment，2022，47(6)：44-49，60.(in Chinese)

[26] 云周苗，简清梅，韩佳钰，等. 蟠龙菜贮藏期间细菌多样性及优势腐败菌分析[J]. 肉类研究，2024，38(4)：9-16.
YUN Z M，JIAN Q M，HAN J Y，et al. Changes in bacterial diversity and dominant spoilage bacteria during storage of Panlongcai，a traditional steamed dish in Zhongxiang，Hubei[J]. Meat Research，2024，38(4)：9-16.(in Chinese)

[27] 贾晶晶，赵虎威，燕平梅. 酸菜发酵过程中细菌群落结构变化及驱动机制[J]. 中国食品学报，2023，23(8)：354-368.
JIA J J，ZHAO H W，YAN P M. The changes and driving mechanism of bacterial community structure during Paocai fermentation[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology，2023，23(8)：354-368.(in Chinese)

[28] ARMITANO J，MEJEAN V，JOURLIN-CASTELLI C. Gram-negative bacteria can also form pellicles[J]. Environmental Microbiology Reports，2014，6(6)：534-544.

[29] 孙利梅，朝鲁门其其格，张晓蒙，等. 鲍曼不动杆菌诱导细胞凋亡的相关研究[J]. 内蒙古医科大学学报，2024，46(2)：200-203，209.
SUN L M，Chaolumenqiqige，ZHANG X M，et al. Study on apoptosis induced by *Acinetobatter baumannii*[J]. Journal of Inner Mongolia Medical University，2024，46(2)：200-203，209.(in Chinese)

[30] 李艳，董振玲，李佳，等. 羊羔美酒大曲中乳酸菌多样性及分子鉴定[J]. 食品科学，2015，36(13)：167-171.
LI Y，DONG Z L，LI J，et al. Diversity and molecular biological identification of lactic acid bacteria from Yanggaomeijiu Daqu，a traditional Chinese liquor fermentation starter[J]. Food Science，2015，36(13)：167-171.(in Chinese)

[31] 徐锦，冯文聪，朱澳迪，等. 不同香型大曲微生态结构及其发酵特性相关性分析[J]. 食品科学，2024，45(13)：104-114.
XU J，FENG W C，ZHU A D，et al. Correlation analysis between microecological structure and fermentation characteristics of different aroma types of Daqu[J]. Food Science，2024，45(13)：104-114.(in Chinese)

[32] 魏丽，张雨雁，白俊英，等. 植物乳植杆菌CCFM8661缓解重金属铅诱导小鼠肝肾损伤的剂量效应[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(4)：81-89.
WEI L，ZHANG Y Y，BAI J Y，et al. Dose effect of *Lactiplantibacillus plantarum* CCFM8661 in alleviating heavy metal lead-induced liver and kidney injury in mice[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43(4)：81-89.(in Chinese)

[33] VISSER S，PARKINSON D. Soil biological criteria as indicators of soil quality：soil microorganisms[J]. American Journal of Alternative Agriculture，1992，7(1/2)：33-37.

[34] 刘鑫，王家旺，隋雨萌，等. 中国传统发酵蔬菜中微生物多样性及其对品质形成影响研究进展[J]. 食品科学，2024，45(10)：290-297.
LIU X，WANG J W，SUI Y M，et al. Microbial diversity and its influence on quality development in Chinese traditional fermented vegetables：a review[J]. Food Science，2024，45(10)：290-297.(in Chinese)

[35] MOON S H，CHANG M，KIM H Y，et al. *Pichia kudriavzevii* is the major yeast involved in film-formation，off-odor production，and texture-softening in over-ripened Kimchi[J]. Food Science and Biotechnology，2014，23(2)：489-497.

[36] DET-UDOM R，PRAKITCHAIWATTANA C，MAHAWANICH T. Autochthonous microbes and their key properties in browning reduction during soy sauce fermentation[J]. LWT-Food Science and Technology，2019，111：378-386.

[37] 彭鑫，李冰鑫，马芳，等. 湘味卤豆干中腐败微生物的分离鉴定及控制[J]. 食品与机械，2024，40(4)：172-178.
PENG X，LI B X，MA F，et al. Isolation，identification and control of spoilage microorganisms in Xiangwei stewed bean[J]. Food & Machinery，2024，40(4)：172-178.(in Chinese)

[38] AO X L，YAN J L，CHEN C，et al. Isolation and identification of the spoilage microorganisms in Sichuan homemade Paocai and their impact on quality and safety[J]. Food Science & Nutrition，2019，7(9)：2939-47.

（责任编辑：闫林红）