

# 从蔬菜中回收细菌的前处理方法研究

代晓航<sup>1,2\*</sup>, 魏超<sup>1,2</sup>

(1. 四川省农业科学院分析测试中心, 成都 610066;  
2. 农业部农产品质量安全风险评估实验室(成都), 成都 610066)

**摘要: 目的** 结合细菌的回收效果, 探究生菜和黄瓜微生物检测的最佳样品前处理方法。**方法** 以生菜和黄瓜为研究对象, 通过电镜观察细菌在经过样品处理后蔬菜中的附着与内化, 结合细菌回收实验设计 3 种前处理方法, 分别是不同取样量, 不同取样部位和不同稀释方法, 采用 SPSS 软件对 3 种处理下细菌的回收结果进行差异性分析。**结果** 实验设计的 3 种方法对细菌的回收效果差异显著( $P < 0.05$ )。黄瓜和生菜中微生物检测样品前处理方法选取 50 g 取样量, 并采用匀浆的方式最有效地回收细菌, 取样部位如果考虑将食用风险最大化, 建议选择表面取样, 如果需考虑整体污染水平, 建议对样品表面及内部进行整体取样。**结论** 改进后的新鲜果蔬前处理方法能更有效地回收得到果蔬样品中的细菌, 对制订相关检测标准或是开展果蔬微生物研究样品前处理方法提供了有效建议。

**关键词:** 蔬菜; 细菌; 回收; 前处理

## Study on pretreatment methods for recovering bacteria from vegetables

DAI Xiao-Hang<sup>1,2\*</sup>, WEI Chao<sup>1,2</sup>

(1. Analysis and Testing Center of Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China;  
2. Security Risk Assessment Laboratory of Ministry of Agriculture (Chengdu), Chengdu 610066, China)

**ABSTRACT: Objective** To explore the best sample preparation method for microbial detection of lettuce and cucumber combined with the recovery effect of bacteria. **Methods** Taking lettuce and cucumber as research objects, the adhesion and internalization of bacteria in the vegetables after sample treatment were observed by electron microscope. A total of 3 kinds of pretreatment methods were designed in combination with bacterial recovery experiments, which were different sampling amounts, different sampling sites and different dilution methods. The SPSS software was used to analyze the results of the recovery of bacteria under 3 treatments. **Results** The 3 methods of experimental design had significant differences in the recovery of bacteria ( $P < 0.05$ ). The pretreatment method for microbial test samples in cucumber and lettuce used 50 g sample volume, and the homogenization method was adopted to achieve the most effective recovery of bacteria. If the sampling site was to maximize the risk of eating, it was recommended to select surface sampling. If the overall pollution level needed to be considered, it was recommended to sample the surface and interior of the sample as a whole. **Conclusion** The improved pretreatment method of fresh fruit and vegetable can more effectively recover the bacteria in the fruit and vegetable samples, and provides effective suggestions for formulating relevant testing standards or pre-treatment methods for fruit and

基金项目: 2019 年国家农产品质量安全风险评估项目(GJFP2019005)

Fund: Supported by the National Agricultural Product Quality and Safety Risk Assessment Project in 2019 (GJFP2019005)

\*通讯作者: 代晓航, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为农产品、农业环境微生物。E-mail: 1016836084@qq.com

\*Corresponding author: DAI Xiao-Hang, Master, Associate Professor, Analysis and Testing Center of Sichuan Academy of Agricultural Sciences, No.20-102, Jingjushi Road, Jingjiang District, Chengdu 610066, China. E-mail: 1016836084@qq.com

vegetable microbial research samples.

**KEY WORDS:** vegetables; bacteria; recovering; pretreatment

## 1 引言

病原微生物在自然界分布广泛,可通过多种途径污染生鲜果蔬。而生鲜果蔬通常不需加热,在简单的清洗后即可直接食用,因此存在食物中毒的风险。国外已发生多起食用生鲜果蔬引起的食源性疫情,同时,因致病微生物污染果蔬致产品召回事件也时有发生,造成不同程度的经济损失,多个国家近几年都有因食用被致病微生物污染生鲜果蔬引起的疫情暴发,其中涉及的果蔬种类包括生菜、黄瓜、甜瓜、芽苗菜等<sup>[1-3]</sup>。虽然我国还没有出现因食用生鲜果蔬而发生大规模疫情的安全事件,但病原微生物常有检出。另外据 WHO 估计,发达国家食源性疾病的漏报率在 90%左右,过去中国的食源性数据大多是被动监测,属于发现疫情之后上报,因此漏报率会更高<sup>[4]</sup>。

目前,我国已有少量针对即食生鲜果蔬中病原微生物的研究,包括对污染<sup>[5-8]</sup>、预测生长<sup>[9-13]</sup>、清洗<sup>[14,15]</sup>等方面的研究。这些对果蔬中微生物的研究多数时候需要基于对细菌的计数。而国家标准对不同样品的前处理方法是一个比较笼统的规定,缺少针对新鲜果蔬样品更有效的前处理方法,相关的报道也较少。

本次研究通过电镜观察细菌在浸泡处理后蔬菜中的附着与内化,结合细菌的回收效果确定针对果蔬的最佳样品前处理方法,为相关标准的制订和微生物研究工作的有效开展提供科学依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 研究对象

实验选择了生菜和黄瓜 2 种蔬菜为研究对象。这 2 种蔬菜均为可生食类蔬菜,易受微生物污染,均引起过食源性疫情的暴发。生菜代表的是叶类蔬菜,黄瓜代表的是瓜果类蔬菜,食用方式既可以去皮也可以带皮。样品均来自成都市农贸市场。

### 2.2 试剂与仪器

氯化钠、无水乙醇、磷酸盐缓冲液(分析纯,西陇化工公司);平板计数琼脂(北京陆桥技术股份有限公司)。

Baby Gravimat 重量稀释仪(法国 interscience 公司);LS-75HD 压力蒸汽灭菌器(江阴滨江医疗设备有限公司);SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);HFsafe-1200 生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);LRH-500F 培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司);SU3500 扫描电镜(日本 HITACHI 公司)。

### 2.3 分析方法

针对 2 种蔬菜,不同取样部位、不同取样量,不同稀释处理操作下细菌进行菌落计数,每个处理均获得 3 个平行数据,采用 Excel 与 SPSS20.0 软件对实验数据进行差异分析<sup>[16]</sup>,实验设计详见表 1,菌落计数采用 GB 4789.2-2016<sup>[17]</sup>。

电镜实验方法:为了更直观地了解不同样品处理部位细菌的附着情况,对同一样品在相同的处理下分别对表面和内部进行观察。处理方法为:用磷酸盐缓冲液(pH 7.2)漂洗样品 10 min,共 3 次;梯度脱水,分别用 30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇,充分浸泡样品,每次 10 min 最后用无水乙醇充分浸泡样品,每次 15 min,共 2 次。戊二醇固定冷藏过夜,10%乙醇+CO<sub>2</sub> 临界点交换,临界点干燥仪 35 °C 交换 1 h 后喷金,送入扫描电镜进行观察。

表 1 葡萄、生菜中细菌总数回收实验处理方法  
Table 1 Experimental method for recovering total bacteria in grapes and lettuce

试验目的	取样部位	取样量/g	稀释液	处理方法
取样量比较	整瓜	25	生理盐水	均质
	整瓜	50	生理盐水	均质
	瓜皮	25	生理盐水	匀浆
不同取样部位比较	整瓜	25	生理盐水	匀浆
	瓜肉	25	生理盐水	匀浆
	整瓜	25	生理盐水	均质
不同处理方式比较	整瓜	25	生理盐水	匀浆
	整瓜	25	生理盐水	浸泡
取样量比较	生菜整体	25	生理盐水	均质
	生菜整体	50	生理盐水	均质
	生菜外侧	25	生理盐水	均质
不同取样部位比较	生菜内侧	25	生理盐水	均质
	生菜整体	25	生理盐水	均质
不同处理方式比较	生菜整体	25	生理盐水	浸泡
	生菜整体	25	生理盐水	匀浆
不同处理方式比较	生菜整体	25	生理盐水	匀浆
	生菜整体	25	生理盐水	均质

## 3 结果与分析

### 3.1 差异性分析结果

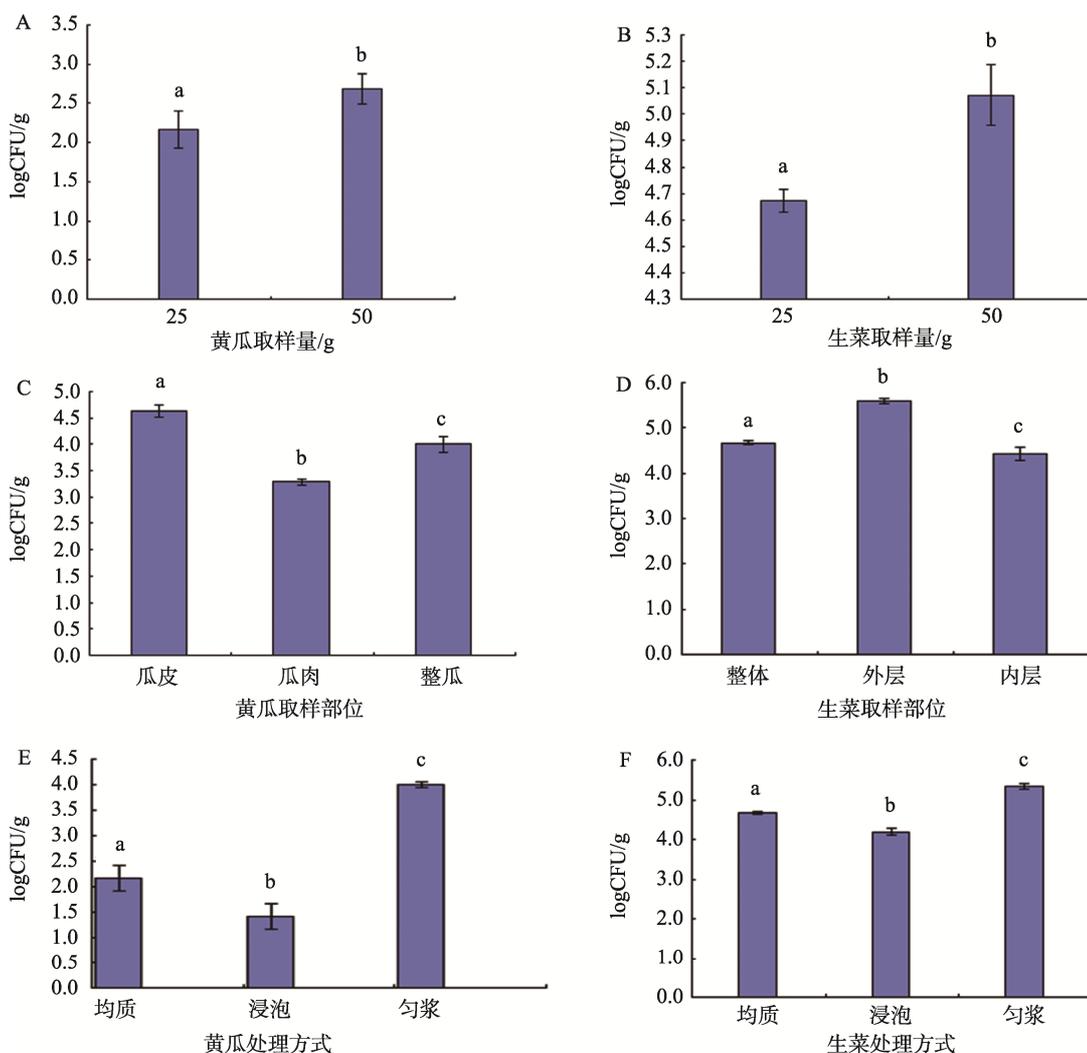
图 1 为不同处理方法对细菌总数计数结果的影响。其中图 1A、B 为不同取样量之间的比较,可以看出 25 g 取样量计数结果小于 50 g 计数结果,且差异显著( $P < 0.05$ )。

微生物在样品中分布本身具有不均匀的特点, 加之果蔬产品多在自然环境中生长, 微生物分布不均匀性程度更大。在本次实验中, 如果参照国家标准 GB 4789.2-2016 进行取样, 一根普通大小黄瓜只需要取 1/5 长度、生菜通常仅需取 2~3 片叶子即可达到 25 g 的取样量要求。相对果蔬大批量的生产、销售模式, 25 g 的取样量显然太少, 50 g 取样量则能回收更多的细菌。

图 1C 为黄瓜不同取样部位细菌总数计数结果比较, 同样具有显著差异( $P<0.05$ ), 整体瓜计数结果明显高于黄瓜内部, 瓜皮明显带有大量微生物。黄瓜在食用时, 可去皮也可不去皮, 因此在进行微生物学评价时, 应充分考虑其食用方式, 取整瓜检测。图 1D 为生菜不同取样部位细菌总数计数结果比较, 同样具有显著差异( $P<0.05$ ), 计数结果外层 > 整体 > 内层。外层细菌总数明显高于内层, 因为外层更易受外界微生物的污染, 内层由于被包裹在里面, 受外界

微生物污染较少, 因此在做这类包裹式蔬菜时, 最好整体取样。如果按照风险最大化原则, 也可取外层进行检测。

图 1E、F 为取样后不同处理方式进行比较。结果表明, 浸泡、均质和匀浆 3 种方法对计数结果的影响差异显著, 且匀浆 > 均质 > 浸泡。但 2 种不同类型的果蔬差异不完全一致。黄瓜匀浆、均质、浸泡相邻处理方式之间相差 1 个对数单位, 匀浆和浸泡之间最大相差 2 个对数单位。生菜 3 种处理方法之间最大相差 1 个对数单位。因此, 不同处理方式对不同样品微生物计数结果影响程度不同。匀浆能最大限度的破坏样品组织, 检测到样品表面及内部的微生物, 且样品能最大程度融于稀释液, 样品均匀性更好; 均质可以一定程度上破坏样品性状, 但是不如匀浆效果好, 果蔬内部及表面微生物一定程度能被处理到稀释液中; 浸泡效果最差, 普通水洗或是浸泡仅能使小部分微生物被脱洗下来。因此建议果蔬样品处理最好采用匀浆的方式, 尤其是带皮果蔬。



注: 相同字母表示无显著差异,  $P>0.05$ ; 不同字母表示差异显著,  $P<0.05$ 。

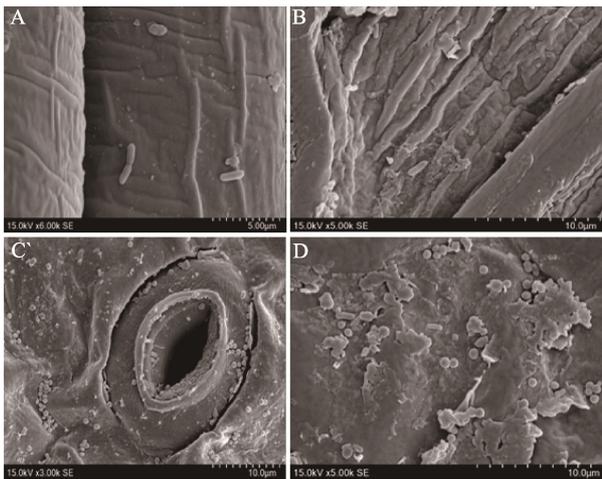
图 1 不同处理方法细菌总数计数结果差异性分析

Fig.1 Difference analysis of total bacterial count results of different treatment methods

### 3.2 微生物附着观察

已有多项研究表明,果蔬表皮组织或结构能为微生物的附着和内化提供条件<sup>[18,19]</sup>。本研究中,将生菜浸泡后,对其表面及侧切后内部的细菌进行了电镜观察,发现浸泡并不能完全将生菜表面细菌回收到稀释液中,在生菜表面仍可见细菌的附着,见图2A。而侧切面同样可见细菌的附着,侧切面的细菌在生菜不被破碎的情况下则更不易进入到稀释液中,从而降低回收率,见图2B。

在对黄瓜的电镜观察中,选取了黄瓜浸泡后表面及内部细菌进行观察,见图2C、D。在图2C中,可以明显地看到黄瓜在浸泡后表面仍附着有大量细菌,且气孔处细菌更容易堆积,同时通过气孔等组织,细菌进入到黄瓜内部,如图2D。因此浸泡也不能将黄瓜表面细菌回收到稀释液中,在不破坏黄瓜组织的情况下,内化的细菌同样难以回收。



注:生菜表面(A)和侧切面(B),黄瓜表皮(C)和瓜肉(D)。

图2 微生物的附着情况

Fig.2 Adhesion of microorganisms

## 4 结论

在我国,现阶段对于新鲜果蔬食用安全的关注主要集中在化学性的危害上,无论是日常监管还是国家产品标准、方法标准的制订上都有相对完善的体系。但随着人们消费习惯的改变,以及国外关于新鲜果蔬食品源性病原微生物疫情的暴发,我们对新鲜果蔬中病原微生物的关注度已逐步提高,国家农业农村部等监管部门已经开展了多年相关领域的研究工作。果蔬微生物检测样品前处理方法作为一项基础研究,对相关领域工作的开展具有重要意义。本次研究结果表明,果蔬样品与预包装食品相比,微生物污染分布的不均匀性更大,针对果蔬的微生物检测应充分考虑样品在植物中的部位(果实、叶、茎、花、根等)被污染的程度,同时考虑表面附着和可能内化的微生物,来选

择最佳实验方法。此外还有一些可能影响细菌回收效果的因素如稀释液的种类、处理时间、表面化学残留等需要在未来的研究中进一步探索和完善。

### 参考文献

- [1] Lynch MF, Tauxe RV, Hedberg CW. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: Risks and opportunities [J]. *Epidemiol Infect*, 2009, 137(3): 307-315.
- [2] Brandl MT, Cox CE, Teplitski M. *Salmonella* interactions with plants and their associated microbiota [J]. *Phytopathology*, 2013, 103(4): 316-325.
- [3] Deering AJ, Mauer LJ, Pruitt RE. Internalization of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in plants: A review [J]. *Food Res Int*, 2012, 45(2): 567-575.
- [4] Coleman P. The microbiological risk assessment of food [J]. *Risk Anal*, 2003, 23(6): 1351.
- [5] 陈岩, 徐学万, 杨慧, 等. 鲜切蔬菜微生物污染来源及控制措施研究 [J]. *产品质量与安全*, 2017, (6): 76-81.  
Chen Y, Xu XW, Yang H, *et al.* Study on microbial pollution sources and control measures of fresh-cut vegetables [J]. *Product Qual Saf*, 2017, (6): 76-81.
- [6] 成黎. 鲜蔬菜中的微生物污染危害, 检测和控制方法研究进展 [J]. *食品科学* 2015, 36(23): 347-352.  
Cheng L. Hazards, detection and control of microbial contamination in fresh vegetables [J]. *Food Sci*, 2015, 36(23): 347-352.
- [7] 张可可, 赵光华, 郝学飞, 等. 2015年郑州市即食生鲜果蔬病原微生物调查与风险分析 [J]. *河南预防医学杂志*, 2017, 28(5): 325-328.  
Zhang KK, Zhao GH, Hao XF, *et al.* Investigation and risk analysis of pathogenic microorganisms on instant fresh fruits and vegetables in Zhengzhou in 2015 [J]. *Henan J Prev Med*, 2017, 28(5): 325-328.
- [8] 代晓航, 郭灵安, 魏超. 生菜中肠杆菌污染分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(7): 1011-1013.  
Dai XH, Guo LA, Wei C. Analysis of *Enterobacteriaceae* contamination in fresh lettuce [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2014, 24(7): 1011-1013.
- [9] 马晨, 李建国, 程景. 沙门氏菌在鲜切蔬菜中生长行为及其预测模型构建 [J]. *食品工业科技*, 2016, 37(4): 123-127.  
Ma C, Li JG, Cheng J. Behaviour of *Salmonella* sp. on fresh-cut vegetables and predictive models for growth [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2016, 37(4): 123-127.
- [10] Kaitlin EC, Anthony D, Hitchins R, *et al.* Comparison of *Listeria monocytogenes* recoveries from spiked mung bean sprouts by the enrichment methods of three regulatory [J]. *Food Microbiol*, 2017, (66): 40-47.
- [11] 赵新, 王永, 刘娜. 金针菇中单增李斯特菌生长预测模型的建立 [J]. *生物加工过程*, 2016, 14(6): 12-17.  
Zhao X, Wang Y, Liu N. Establishment of *Listeria monocytogenes* growth predictive models in edible mushroom *Flammulina velutipes* [J]. *Chin J Bioproc Eng*, 2016, 14(6): 12-17.
- [12] Elena D, Elena CC, Paola M, *et al.* *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheese: Study of the behaviour throughout the process and growth prediction during shelf life [J]. *Ternat J Food Microbiol*, 2017, (262): 71-79.
- [13] 代晓航, 郭灵安, 魏超, 等. 金黄色葡萄球菌在草莓上生长模型试验研究 [J]. *食品卫生杂志*, 2017, 9(1): 1-4.

- Dai XH, Guo LA, Wei C, *et al.* Study of simulation growth of *Staphylococcus aureus* on strawberry [J]. *Chin J Food Hyg*, 2017, 9(1): 1-4.
- [14] 魏超, 代晓航, 郭灵安. 不同处理方法对芽苗菜表面微生物的控制和消除[J]. *现代食品科技*, 2018, 34(8): 240-245.
- Wei C, Dai XH, Guo LA. Different methods to control and eliminate the microorganisms [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2018, 34(8): 240-245.
- [15] 徐学玲, 赵晓燕, 张超, 等. 不同清洗液对草莓中微生物杀灭效果的研究[J]. *食品科学*, 2013, 34(19): 58-61.
- Xu XL, Zhao XY, Zhang C, *et al.* Bactericidal effect of different rinsing solutions on microorganisms in strawberries [J]. *Food Sci*, 2013, 34(19): 58-61.
- [16] 丁雪梅, 徐向红, 邢沈阳. SPSS 数据分析及 Excel 作图在毕业论文中的应用[J]. *实验室研究与探索*, 2012, 31(3): 122-128.
- Ding XM, Xu XH, Xing SY. Application of data analysis by spss and figure construction by excel in the graduation thesis [J]. *Res Explor Lab*, 2012, 31(3): 122-128.
- [17] GB 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定 [S].
- GB 4789.2-2016 National food safety standard-Food microbiological examination-Total number of colonies test [S].
- [18] Dong Y, Iniguez AL, Ahmer BMM, *et al.* Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of medicago sativa and medicago truncatula [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(3): 1783-1790.
- [19] Der-Linden IV, Eriksson M, Uyttendaele M, *et al.* Is there a relation between the microscopic leaf morphology and the association of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 with iceberg lettuce leaves? [J]. *J Food Protect*, 2016, 79(10): 1784-1788.

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介

代晓航, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为农产品、农业环境微生物。  
E-mail: 1016836084@qq.com



## “食源性致病微生物”专题征稿函

食源性疾病是指通过摄食而进入人体的有毒有害物质(包括生物性病原体)等致病因子所造成的疾病。近年来,由食源性致病微生物菌污染食物导致中毒或死亡事件在全球频发,食源性致病微生物引起的疾病已成为危害人类健康的头号杀手。食源性疾病的发病率居各类疾病总发病率的前列,是当前世界上最突出的公共健康卫生问题。

鉴于此,本刊特策划“食源性致病微生物”专题,由上海交通大学施春雷教授担任专题主编,主要围绕**食源性致病微生物新型快速检测技术、食源性致病微生物的分离与检测、食源性致病微生物的毒力与耐药性、食源性致病微生物风险评估、食源性致病微生物的监测与风险控制与监测分析、食源性致病微生物防控与风险评估**等展开论述和研究。本专题计划在2019年9月正刊出版。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣,主编吴永宁技术总师及专题主编施春雷教授特别邀请您为本专题撰写稿件,综述、研究论文、研究简报均可,以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在2019年8月10日前通过网站或Email投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下,再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式: 注明“**食源性致病微生物**”专题

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)

E-mail: [jfoodsqq@126.com](mailto:jfoodsqq@126.com)

《食品安全质量检测学报》编辑部