

鲜切菠萝在贮藏过程中的致病菌风险分析

钟燕华¹, 吕冉晖¹, 李 备², 尹青春², 段 杉^{1*}

[1. 华南农业大学食品学院, 广州 510642; 2. 海南省食品检验检测中心(海南省实验动物中心),
国家市场监管重点实验室(热带果蔬质量与安全), 海口 570311]

摘 要: 目的 分析鲜切菠萝中致病菌在不同温度及抑菌处理条件下的生长变化情况, 评估其食品安全风险, 查找降低风险的因素。**方法** 采用 16S rDNA 测序并结合平板计数法分析鲜切菠萝在贮藏中细菌组成和数量变化, 并查找疑似致病菌, 最后以致病菌快速检测片确认鲜切菠萝中的致病菌。**结果** 用 5 个不同产地的原料制作的鲜切菠萝中均含有蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、李斯特菌、志贺氏菌、阪崎肠杆菌 5 种致病菌。这些鲜切菠萝经室温贮藏后仅金黄色葡萄球菌消失; 经 4℃贮藏 6 d 后上述 5 种致病菌均未消失。经 10 mg/kg ClO₂ 处理后, 鲜切菠萝中细菌数量大幅降低, 但蜡样芽孢杆菌和阪崎肠杆菌仍能检出; 继续于室温贮藏 5 d 后, 仅金黄色葡萄球菌消失; 继续于 4℃贮藏 9 d 后, 仅李斯特菌消失。经 1%壳聚糖处理后, 在短时间内鲜切菠萝中致病菌已低至无法检出, 但继续在室温贮藏 5 d, 则仅金黄色葡萄球菌和李斯特菌消失; 继续于 4℃贮藏 9 d 后, 仅李斯特菌、志贺氏菌和阪崎肠杆菌消失。**结论** 鲜切菠萝存在多种致病菌风险; 无论在室温或 4℃贮藏大部分致病菌仍能存活甚至生长; 10 mg/kg ClO₂ 处理不能消除这些风险; 1%壳聚糖处理能显著降低各种致病菌数量, 但残留的致病菌仍能缓慢生长, 并可能最终导致食品安全危害。

关键词: 鲜切菠萝; 贮藏; 致病菌; 16S rDNA

Risk analysis of pathogenic bacteria in fresh-cut pineapple during storage

ZHONG Yan-Hua¹, LV Ran-Hui¹, LI Bei², YIN Qing-Chun², DUAN Shan^{1*}

[1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Key Laboratory of Tropical Fruits and Vegetables Quality and Safety for State Market Regulation, Food Inspection and Testing Center of Hainan Province (Laboratory Animal Center of Hainan Province), Haikou 570311, China]

ABSTRACT: Objective To analyze the growth changes of pathogenic bacteria in fresh-cut pineapple under different temperature and inhibition treatment conditions, assess their food safety risk, and find factors to reduce the risk. **Methods** The 16S rDNA sequencing combined with plate counting was used to analyze the changes in bacterial communities and number of fresh-cut pineapples in storage and to search for suspected pathogenic bacteria, and finally the pathogenic bacteria in fresh-cut pineapples were confirmed by rapid pathogen detection tablets. **Results** In the fresh-cut pineapple made from the raw materials planted at 5 different zones, 5 pathogens including *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria*, *Shigella* and *Enterobacter sakazakii* were found. Only *Staphylococcus aureus* disappeared after storage at room temperature. All the 5 pathogens survived after storage at

基金项目: 国家市场监管重点实验室(热带果蔬质量与安全)基础应用研究课题资助项目(KF-2022001)

Fund: Supported by the Key Laboratory of Tropical Fruits and Vegetables Quality and Safety for State Market Regulation (KF-2022001)

***通信作者:** 段杉, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: duanshan@scau.edu.cn

***Corresponding author:** DUAN Shan, Ph.D, Associate Professor, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China. E-mail: duanshan@scau.edu.cn

4°C for 6 days. The treatment with 10 mg/kg ClO_2 significantly decreased the bacterial population in fresh-cut pineapple, but *Bacillus cereus* and *Enterobacter sakazakii* could still be detected. However, when the fresh-cut pineapple was stored at ambient temperature for 5 days after the ClO_2 treatment, only *Staphylococcus aureus* disappeared, and when stored at 4°C for 9 days after the ClO_2 treatment, only *Listeria* disappeared. After 1% chitosan treatment, the pathogenic bacteria in fresh-cut pineapple were low to undetectable within a short period of time, but only *Staphylococcus aureus* and *Listeria* disappeared after continued storage at room temperature for 5 d. After continued storage at 4°C for 9 d, only *Listeria*, *Shigella* and *Enterobacter sakazakii* disappeared. **Conclusion** Fresh-cut pineapples are at risk for a variety of pathogenic bacteria, most pathogenic bacteria can still survive or even grow whether stored at room temperature or 4°C. 10 mg/kg ClO_2 treatment cannot eliminate these risks. 1% chitosan treatment can significantly reduce the number of various pathogenic bacteria, but residual pathogenic bacteria can still grow slowly and may eventually lead to food safety hazards.

KEY WORDS: fresh-cut pineapple; storage; pathogens; 16S rDNA

0 引言

菠萝作为一种大宗热带水果,在我国广东、海南、云南等省大量种植。鲜切菠萝是一种最常见的菠萝制品,菠萝切割时组织受损,易遭细菌侵染,且菠萝的高糖度有利于细菌生长繁殖;然而,菠萝的高酸度又对细菌有抑制作用,这一矛盾导致鲜切菠萝的细菌群落必定不同于其他鲜切果蔬。

研究表明,鲜切果蔬中除了腐败菌外,还包括致病菌,目前报道的鲜切果蔬中的主要致病菌包括金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、单增李斯特菌、沙门氏菌、志贺氏菌、阪崎肠杆菌等^[1-3]。鲜切菠萝中已发现的细菌很多,其中也包括某些致病菌,例如金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、志贺氏菌等^[4-5],可见,鲜切菠萝可能存在致病菌风险,需加以研究。然而,目前对于鲜切菠萝中致病菌的研究尚很不充分,主要表现为以下两点:第一,目前多数研究仅采用特定致病菌菌株,接种后测定其在鲜切菠萝中的生长情况,这种研究方法虽有一定意义,但也存在明显不足,由于自然界中某致病菌有很多不同菌株,而这些菌株对于菠萝酸性的适应能力肯定存在差异,采用某特定菌株得到的研究结论不一定具有普适性。第二,对于不同来源鲜切菠萝中各种致病菌污染情况未进行过深入调查研究,由于自然条件下污染的菌株千差万别,不同地区、季节等因素均会造成差别,因此,需要对不同来源的菠萝中的致病菌情况进行分析,以避免以偏概全。此外,更多的关于鲜切菠萝中细菌的研究集中在使用抗菌包装、物理杀菌等方式抑制细菌生长,延长鲜切菠萝的保质期,而非关注致病菌的风险,例如一些研究采用二氧化氯(ClO_2)、壳聚糖、臭氧水等成分减少或抑制鲜切菠萝上的细菌^[6-8]。方宗壮等^[9]用 ClO_2 处理鲜切菠萝、张慧欣等^[10]用壳聚糖处理鲜切菠萝、BASAGLIA等^[11]用壳聚糖和肉桂精油共同处理鲜切菠萝,都发现 ClO_2 或壳聚糖在短期内可以减少鲜切菠萝的细菌总数,因此对细菌生长有明显的抑制作用。然而,这种减菌/抑菌处理不可能消灭所

有的细菌,在贮藏过程中这些细菌仍能缓慢生长^[12]。不同贮藏条件对这些细菌的生长,尤其是致病菌的生长有何影响,目前的研究尚不充分^[13-15]。综上所述,目前对于鲜切菠萝中究竟存在何种致病菌,其生长规律及影响因素如何,各种常见的减菌和防腐措施例如 ClO_2 或壳聚糖处理等能否有效控制其生长等相关研究甚少。

鉴于此,本研究选取不同产地的菠萝,采用平板计数法、16S rDNA测序和致病菌快速检测片研究贮藏温度及 ClO_2 或壳聚糖处理对鲜切菠萝中致病菌生长的影响,通过鲜切菠萝中致病菌数量的变化,评估鲜切菠萝的食品安全风险,并找出能有效降低风险的因素,为鲜切菠萝加工和贮藏提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

购买5种不同产地的成熟菠萝,分别为中山神湾菠萝(Z),单果平均质量1.3 kg;云南牛奶凤梨(N),单果平均质量1.5 kg;云南香水菠萝(YS),单果平均质量1.0 kg;海南金钻菠萝(S),单果平均质量1.4 kg;徐闻菠萝(YX),单果平均质量1.2 kg。

二氧化氯(食品添加剂,武城雅洁消毒用品有限公司);壳聚糖(分析纯,广东环凯生物科技有限公司);细菌基因组DNA快速提取试剂盒(No.A3A1258,湖南艾科瑞生物工程有限公司);致病菌快速检测片(广州力测生物科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-1FDA型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);恒温培养箱(上海精密科学仪器有限公司);AL104型万分之一电子天平[Mettler Toledo国际贸易(上海)有限公司];LDZX-40B型立式自控电热蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)。

1.3 鲜切菠萝的制作

菠萝去皮后切成约5 cm×5 cm×2 cm的薄片,然后放入

无菌饭盒中, 分别于室温或 4℃贮藏。减菌/抑菌处理的样品在切片后立即用 10 mg/kg ClO_2 或 1%壳聚糖浸泡 5 min, 沥干后放置室温或 4℃贮藏。根据感官评定确定的最长贮藏天数定期取样分析, 每个样品 3 个平行。制作过程中使用的工具和操作人员的手均以 75%酒精消毒, 制作在超净台中完成。

1.4 测定方法

1.4.1 确定鲜切菠萝贮藏天数

根据色泽、气味、口感、硬度等感官评定结果确定鲜切菠萝在不同温度下最长贮藏天数。

1.4.2 细菌总数的测定

按照 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》测定, 结果以平均值显示。

1.5 细菌群落的组成分析

1.5.1 DNA 提取

根据不同贮藏条件下鲜切菠萝的最长贮藏天数, 定期取 20 g 样品, 放入装有无菌生理盐水的灭菌锥形瓶中以 100 r/min 振荡 30 min, 上清液过 5 μm 滤膜除去脱落的菠萝组织, 然后以 12000 r/min 离心 2 min 后取沉淀。用艾科瑞公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 每个样品 3 个平行。提交上海派森诺生物科技有限公司进行 16S rDNA 测序分析。

1.5.2 16S rDNA 扩增子建库、测序

采用细菌通用引物 338 F (5'-ACTCCTACGGGAGG CAGCA-3')和 806 R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')扩增 16S rDNA 的 V3V4 可变区序列, 采用 Illumina Miseq 测序平台对细菌 DNA 扩增子进行双端(paired-end)测序。

1.6 鲜切菠萝中可疑致病菌的确认

由于许多细菌无法通过 16S rDNA 测序区分到属、种的水平, 因此, 本研究根据测序结果采用致病菌快速检测片对鲜切菠萝中疑似含有的致病菌进一步确认。

1.7 数据处理

实验数据采用派森诺云平台、Illumina 平台、QIIME2 2019.4 软件、R 语言、Excel 2019 软件、Origin 2018 软件进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 确定贮藏天数

根据感官评定结果, 未经处理的鲜切菠萝在室温最长可贮藏 3 d, 在 4℃最长可贮藏 6 d; 经 ClO_2 或壳聚糖处理的鲜切菠萝在室温最长可贮藏 5 d, 在 4℃最长可贮藏 9 d。

2.2 16S rDNA 测序质量

2.2.1 序列分析

对测序后的数据进行处理后, 27 个样品共获得 4825682 条高质量 reads。二代测序的片段长度范围在 300~500 bp, 在 27 个样品中, 41.9%的 reads 长度为 407 bp, 41.7%的 reads 长度为 405 bp, 且不存在异常长度的序列(图 1)。

2.2.2 Shannon 稀疏曲线

Shannon 用以表征细菌群落多样性, 数值越高, 表明群落多样性越高^[16-17]。由图 2 可知, Shannon 稀疏曲线随着测序深度的增加而趋于平缓, 表明测序结果已足够反映当前样本所包含的多样性。

2.2.3 物种累积曲线

物种累积曲线用于衡量和预测群落中物种丰富度随样本量扩大而增加的幅度, 被广泛用于判断样本量是否足够并估计群落丰富度^[18]。27 个样品总 OTU 数目为 8961 个, 根据 OTU 总数绘制物种累积曲线, 随着样品数量的增加, 能检测到的物种数量逐渐增加, 直至曲线末端上升趋势趋于平缓, 说明样本量已足够用于表征不同条件下鲜切菠萝的细菌群落结构特征(图 3)。

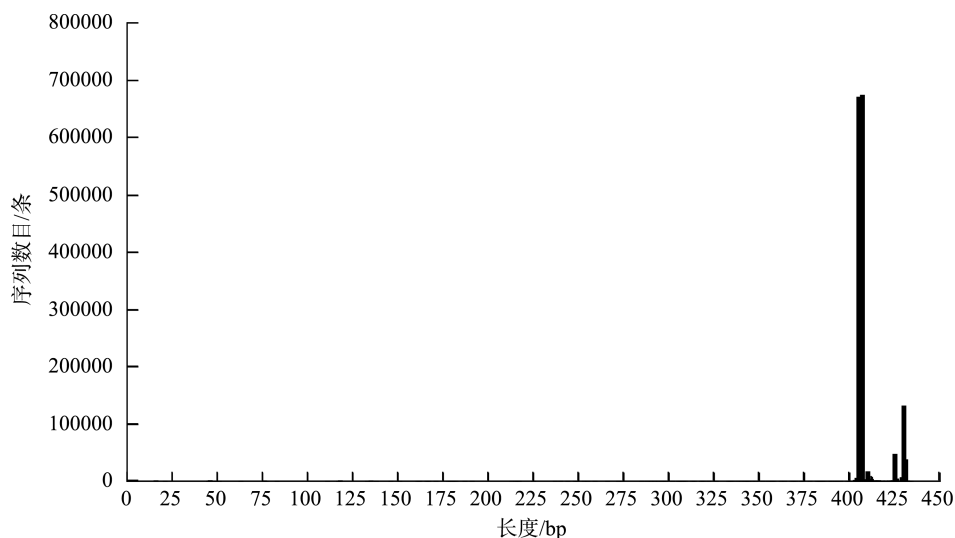
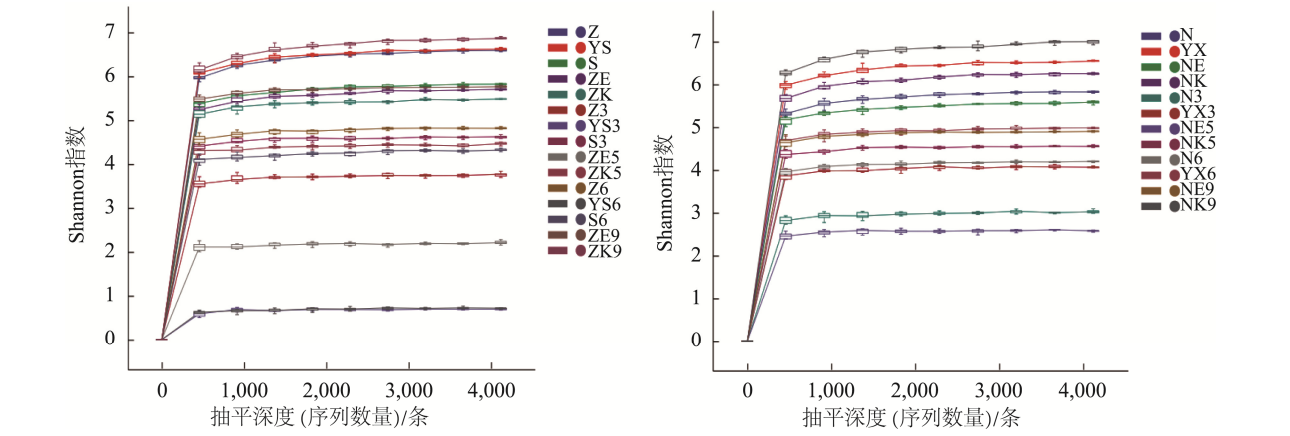


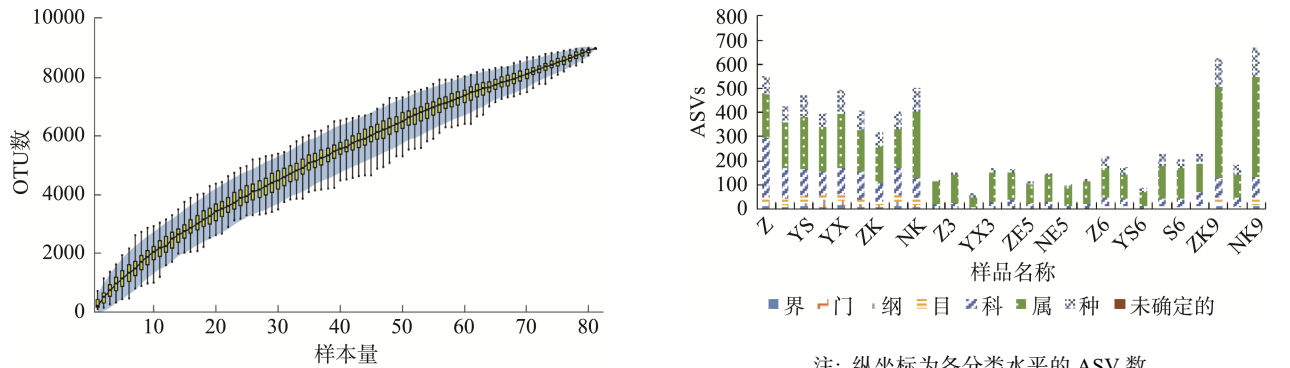
图 1 序列长度分布

Fig.1 Length of sequence



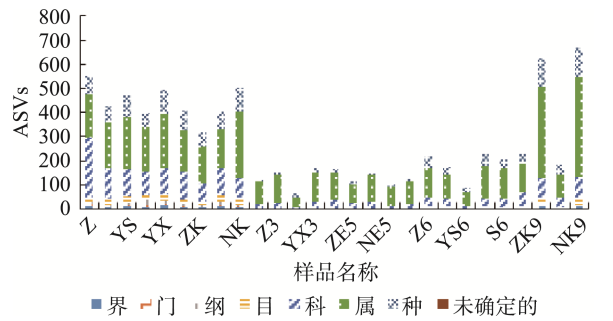
注: 横坐标为抽平深度, 纵坐标为 10 次计算的 Shannon 指数的中位值与箱线图。ZE 和 NE 分别为用 10 mg/kg ClO₂ 处理的 Z 和 N, ZK 和 NK 分别为用 1%壳聚糖处理的 Z 和 N; 字母后的数字表示贮藏天数, 3、5 为室温贮藏的天数, 6、9 为 4℃贮藏的天数, 下同。

图 2 Shannon 稀疏曲线
Fig.2 Shannon's sparse curves



注: 纵坐标为在该样本量时进行 100 次(默认)取样所观测到的物种数。

图 3 物种累积曲线
Fig.3 Species accumulation curves



注: 纵坐标为各分类水平的 ASV 数 (组内样本求均值)。

图 4 各分类水平下物种注释结果堆叠图
Fig.4 Stack diagram of the annotation result at each taxonomic level

2.2.4 物种注释

使用DADA2质控后产生的每个去重的序列称为扩增子序列变体(amplicon sequence variants, ASVs)或特征序列。由图 4 可知 27 个样品中注释到目、科、属和种的 ASV 分别占全部 ASV 的 4%、22%、53%和 17%, 总计 96%, 说明注释到目、科、属、种几个水平的 ASV 占绝大多数, 但种水平的数据较少, 因此将种水平的 ASV 合并到属中, 从目、科、属水平进行物种分析可以较全面反映鲜切菠萝的细菌群落组成。

2.3 不同贮藏条件下鲜切菠萝中致病菌风险分析

根据测序结果, 首先挑出含有致病菌的目、科、属, 然后比较该目的平均相对丰度与该目下所检出的各科的平均相对丰度之和判断该目包括的所有科是否均被检出, 如相对丰度一致, 则说明该目包括的所有科均被检出, 反之则未能全部检出。同理, 可判断属是否均被检出。表 1 为 16S rDNA 测序所得目、科、属水平下细菌平均相对丰度及推测的疑似含有的致病菌。表 1 显示, 16S rDNA 测

序得到芽孢杆菌目的平均相对丰度为 0.07050165, 根据细菌分类检索结果, 芽孢杆菌目包括芽孢杆菌科、葡萄球菌科、李斯特菌科、热放线菌科、类芽孢杆菌科等, 其中芽孢杆菌科、葡萄球菌科、李斯特菌科中含有致病菌。但 16S rDNA 测序仅检出芽孢杆菌科(平均相对丰度 0.04192026)和葡萄球菌科(平均相对丰度 0.00252501), 而此两科的平均相对丰度之和低于芽孢杆菌目的平均相对丰度, 说明鲜切菠萝中还可能含有李斯特菌科细菌未被检出。同理, 由科水平的细菌的平均相对丰度推测属水平的细菌, 再由属水平的细菌推测疑似含有的致病菌。最终, 推测鲜切菠萝疑似含有蜡芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、李斯特菌、志贺氏菌、大肠杆菌 O157:H7、沙门氏菌、阪崎肠杆菌等致病菌。同时根据 16S rDNA 测序所得的相对丰度结合细菌总数, 估算某致病菌的数量(细菌数), 对不同贮藏条件下鲜切菠萝中致病菌风险进行分析。不同贮藏条件下鲜切菠萝的细菌总数变化如表 2 所示。

表 1 16S rDNA 测序所得目、科、属水平下细菌平均相对丰度及推测的疑似含有的致病菌
Table 1 Average relative abundance of bacteria obtained by 16S rDNA sequencing at order, family, and genus levels, and the suspected pathogenic bacteria by speculation

目	科	检出的属及推测的属	推测的种
芽孢杆菌目 ¹ (0.07050165)	芽孢杆菌科 ¹ (0.04192026)	芽孢杆菌属 ¹ (0.03956289)	蜡样芽孢杆菌 ^{2*}
		其他属(0.00235737)(含短芽孢杆菌属 ² 、枝芽孢杆菌属 ² 、脂酸芽孢杆菌属 ² 等)	
	葡萄球菌科 ¹ (0.00252501)	葡萄球菌属 ¹ (0.00234576)	金黄色葡萄球菌 ^{2*}
		其他属(0.00017925)	
	其他科(0.02605638)(含李斯特菌科 ² 、类芽孢杆菌科 ² 、热放线菌科 ² 等)		李斯特菌 ^{2*}
肠杆菌目 ¹ (0.0273267)	肠杆菌科 ¹ (0.0273267)	志贺氏菌属 ¹ (0.00529885)	志贺氏菌 ^{2*}
		其他属(0.02202785)(含埃希氏菌属 ² 、变形杆菌属 ² 、沙门氏菌属 ² 、肠杆菌属 ²)	大肠杆菌 O157:H7 ^{2*}
			沙门氏菌 ^{2*}
			阪崎肠杆菌 ^{2*}

注: ¹ 代表 16S rDNA 测序检出的细菌, ² 代表根据平均相对丰度推测的疑似含有的细菌, *代表致病菌, 括号中的数字表示某细菌在所有样品中相对丰度的均值。

表 2 不同贮藏条件下鲜切菠萝的细菌总数变化
Table 2 Changes in the total number of bacteria in fresh-cut pineapple under different storage conditions

鲜切菠萝样品	细菌总数/[CFU×10 ⁵]/g		
	原料	4℃	室温
Z	0.680±0.070	0.320±0.020	724.240±8.490
N	0.087±0.004	0.116±0.032	14.100±2.300
YS	5.762±0.431	3.672±0.373	50.101±3.874
S	0.371±0.007	1.002±0.261	2.183±0.284
YX	8.043±0.682	2.362±0.624	89.104±7.863
ZE	0.034±0.003	0.644±0.042	1030.480±9.860
ZK	0.012±0.001	0.247±0.033	6.080±0.590
NE	0.0011±0.0001	24.110±3.042	920.420±8.450
NK	0.0012±0.0001	0.022±0.001	6.240±0.562

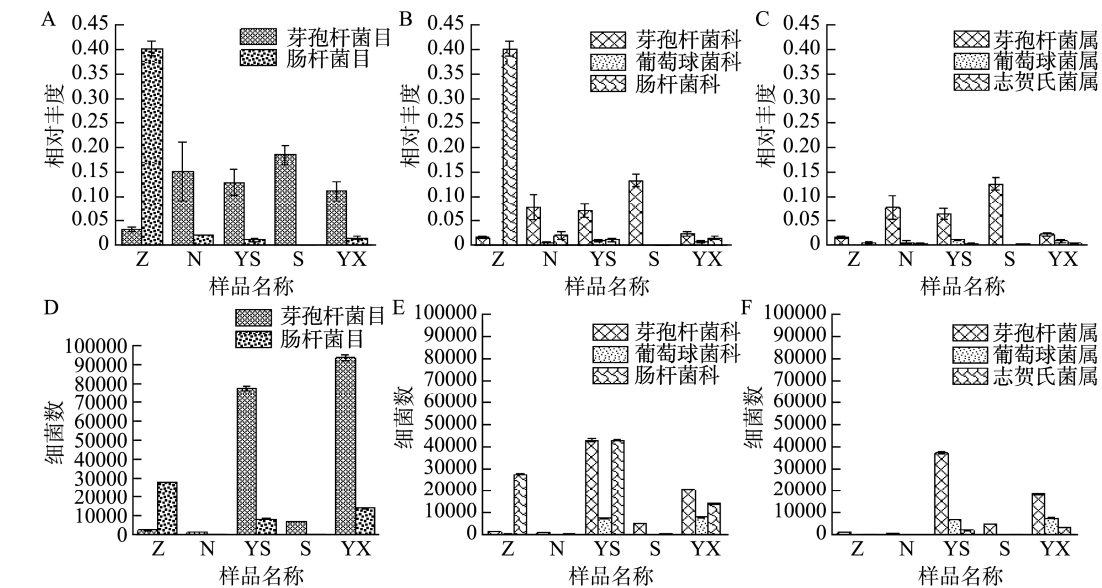
注: 未经处理的鲜切菠萝在室温时的测定天数是 3 d, 在 4℃时的测定天数是 6 d。经 ClO₂ 或壳聚糖处理的鲜切菠萝在室温时的测定天数是 5 d, 在 4℃时的测定天数是 9 d。

由图 5 可知, 5 种鲜切菠萝在目水平上均含有芽孢杆菌目、肠杆菌目等含有致病菌的目; 在科水平上均含有芽孢杆菌科、葡萄球菌科、肠杆菌科等含有致病菌的科; 在属水平上均含有芽孢杆菌属、葡萄球菌属、志贺氏菌属等含有致病菌的属。但上述每种细菌的相对丰度在不同鲜切菠萝中均不相同。根据前述推测方法, 此 5 种鲜切菠萝均可能含有表 1 中推测的各种致病菌。GORN 等^[19]也指出鲜切产品中最相关的致病菌是沙门氏菌属、志贺氏菌属、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等。

由图 6 可知, 室温贮藏后, 5 种鲜切菠萝中上述致病菌的相对丰度均下降, 然而由于细菌总数均增加, 所以致病菌的数量不一定下降, 例如 Z3 菠萝中上述致病菌的数量均增加, YS3 菠萝中上述致病菌的数量均下降, N3 和 S3 菠萝中肠杆菌目、肠杆菌科、志贺氏菌属等致病菌的数量增加, YX3 菠萝中志贺氏菌属的数量增加。综上, 室温贮藏后鲜切菠萝可能含有表 1 推测的各种致病菌风险上升, 但有待进一步验证。FENG 等^[20]的研究也表明在 25℃贮藏时, 鲜切热带水果中李斯特菌的数量显著增加。

由图 7 可知, 4℃贮藏后, 5 种鲜切菠萝中上述致病菌的相对丰度和数量均有所变化。例如 Z6 菠萝中葡萄球菌科、葡萄球菌属等致病菌的相对丰度及数量均增加; N6 菠萝中只有志贺氏菌属的相对丰度及数量增加; YS6 和 YX6 菠萝中上述致病菌的相对丰度及数量均下降; S6 菠萝中只有肠杆菌目、肠杆菌科、葡萄球菌科、葡萄球菌属等致病菌的相对丰度及数量均增加。综上, 4℃贮藏后鲜切菠萝可能含有的蜡样芽孢杆菌、李斯特菌的风险下降, 其他 5 种可能含有的致病菌风险上升, 但有待进一步验证。XING 等^[21]的研究表明鲜切菠萝在 4℃贮藏中细菌数量不断增加。其次, FENG 等^[20]及 HUANG 等^[22]的研究表明低温下李斯特菌可能不生长, 这与本研究结果一致。pH 可能是影响李斯特菌在低温下存活率较低的因素^[23]。

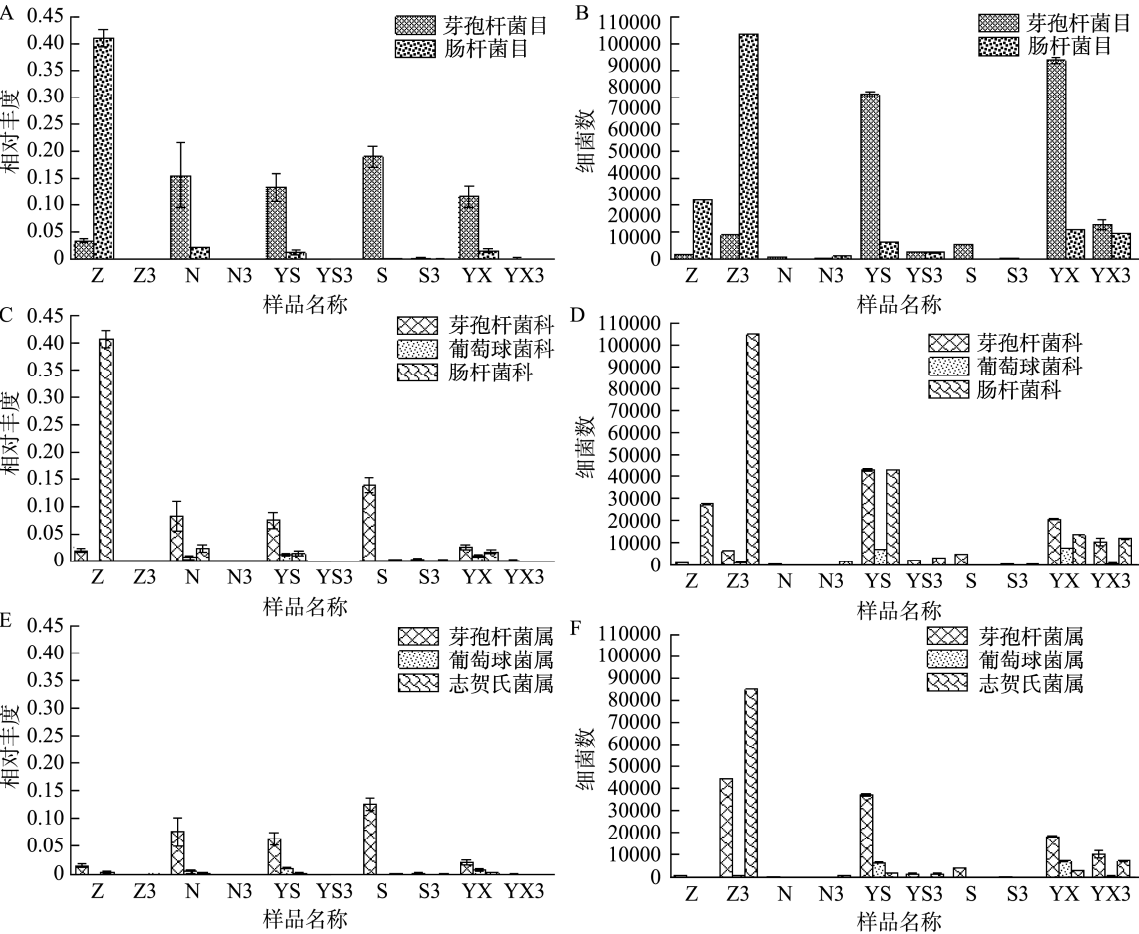
由图 8 可知, 经 10 mg/kg ClO₂ 处理的鲜切菠萝中只有芽孢杆菌目、芽孢杆菌科、芽孢杆菌属、志贺氏菌属等致病菌的相对丰度增加, 因为细菌总数下降, 所以上述各种致病菌的数量均下降。经 ClO₂ 处理的鲜切菠萝在室温贮藏过程中, 上述致病菌的相对丰度均下降, 虽然细菌总数增加, 但葡萄球菌科、葡萄球菌属等致病菌的数量是下降的。经 ClO₂ 处理的鲜切菠萝在 4℃贮藏过程中, ZE9 菠萝中肠杆菌目、肠杆菌科、志贺氏菌属的相对丰度均下降, 而 NE 9 菠萝则相反。然而由于细菌总数增加, 所以致病菌的数量均增加。综上, 处理后鲜切菠萝可能含有的各种致病菌风险均降低, 而继续在 4℃贮藏 9 d, 则结果相反, 但继续在室温贮藏 5 d, 鲜切菠萝可能含有的金黄色葡萄球菌的风险降低, 其他 6 种可能含有的致病菌风险未降低, 但有待进一步验证。张丽等^[24]、王少丹^[25]、王玉丽等^[26]及张丙云等^[27]的研究也表明 ClO₂ 处理可以显著降低鲜切果蔬表面的细菌数量。但随着贮藏时间的增加, 鲜切菠萝的菌落总数都会逐渐增加^[28]。其次, 温度对 ClO₂ 的减菌效果也有影响, 处理后分别置于 0、5、10 及 25℃贮藏, 鲜切莲藕的菌落总数会随贮藏时间延长而升高^[29], 这与本研究结果一致。



注: 横坐标为由不同产地的原料制作的鲜切菠萝样品, A、B、C 图为各样品中细菌在目、科、属水平的相对丰度, E、D、F 图为各样品中致病菌在目、科、属水平的数量。

图 5 鲜切菠萝的细菌群落差异

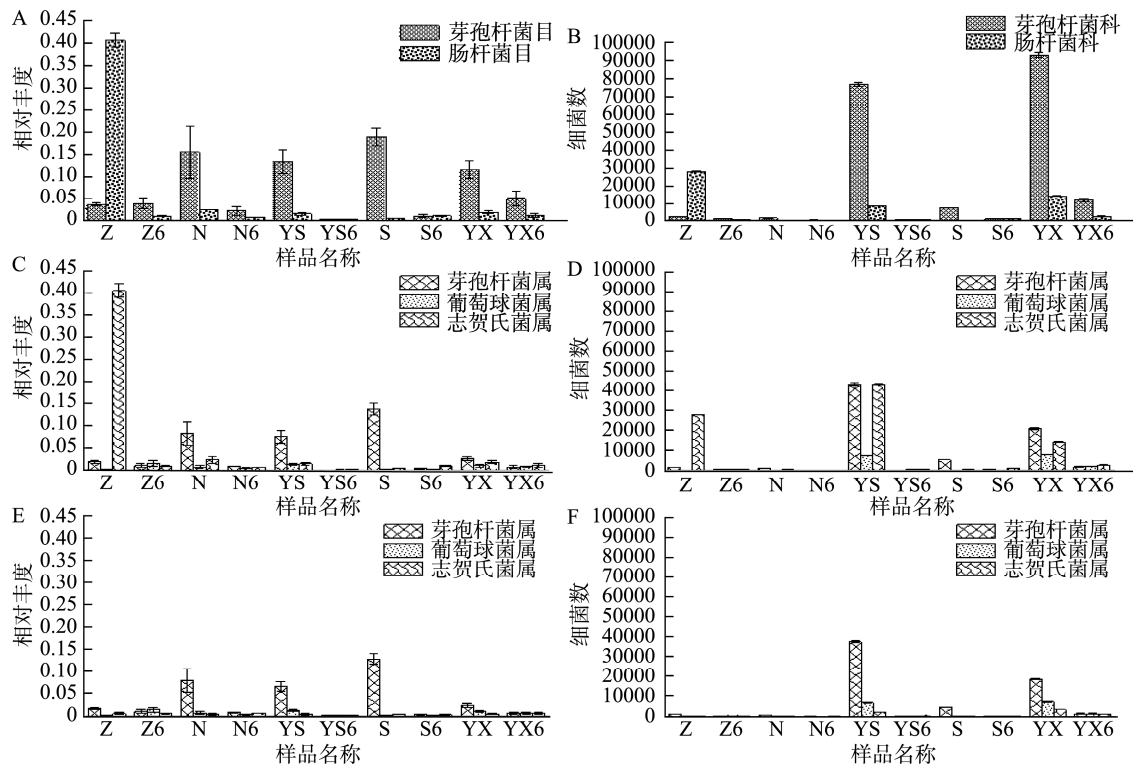
Fig.5 Differences in bacterial communities of fresh-cut pineapples



注: 横坐标为鲜切菠萝室温贮藏前后的样品, A、C、E 图为各样品中细菌在目、科、属水平的相对丰度, B、D、F 图为各样品中致病菌在目、科、属水平的数量。字母后的数字代表贮藏天数, 下同。

图 6 室温贮藏 3 d 后鲜切菠萝的细菌群落变化

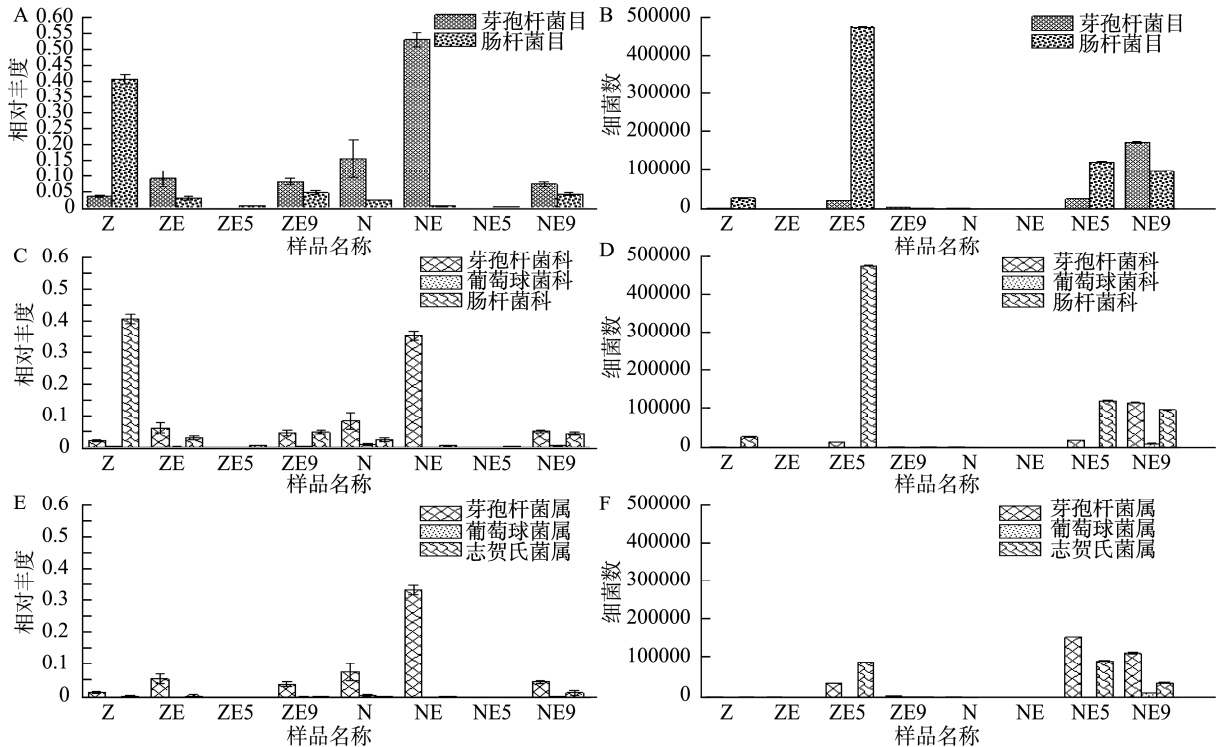
Fig.6 Changes in bacterial communities of fresh-cut pineapples after 3 days storage at ambient temperature



注：横坐标为鲜切菠萝 4℃贮藏前后的样品，A、C、E 图为各样品中细菌在目、科、属水平的相对丰度，B、D、F 图为各样品中致病菌在目、科、属水平的数量。

图 7 4℃贮藏 6 d 后鲜切菠萝的细菌群落变化

Fig.7 Changes in bacterial communities of fresh-cut pineapples after 6 days storage at 4°C



注：横坐标为鲜切菠萝经 ClO₂ 处理后不同温度贮藏前后的样品，A、C、E 图为各样品中细菌在目、科、属水平的相对丰度，B、D、F 图为各样品中致病菌在目、科、属水平的数量。

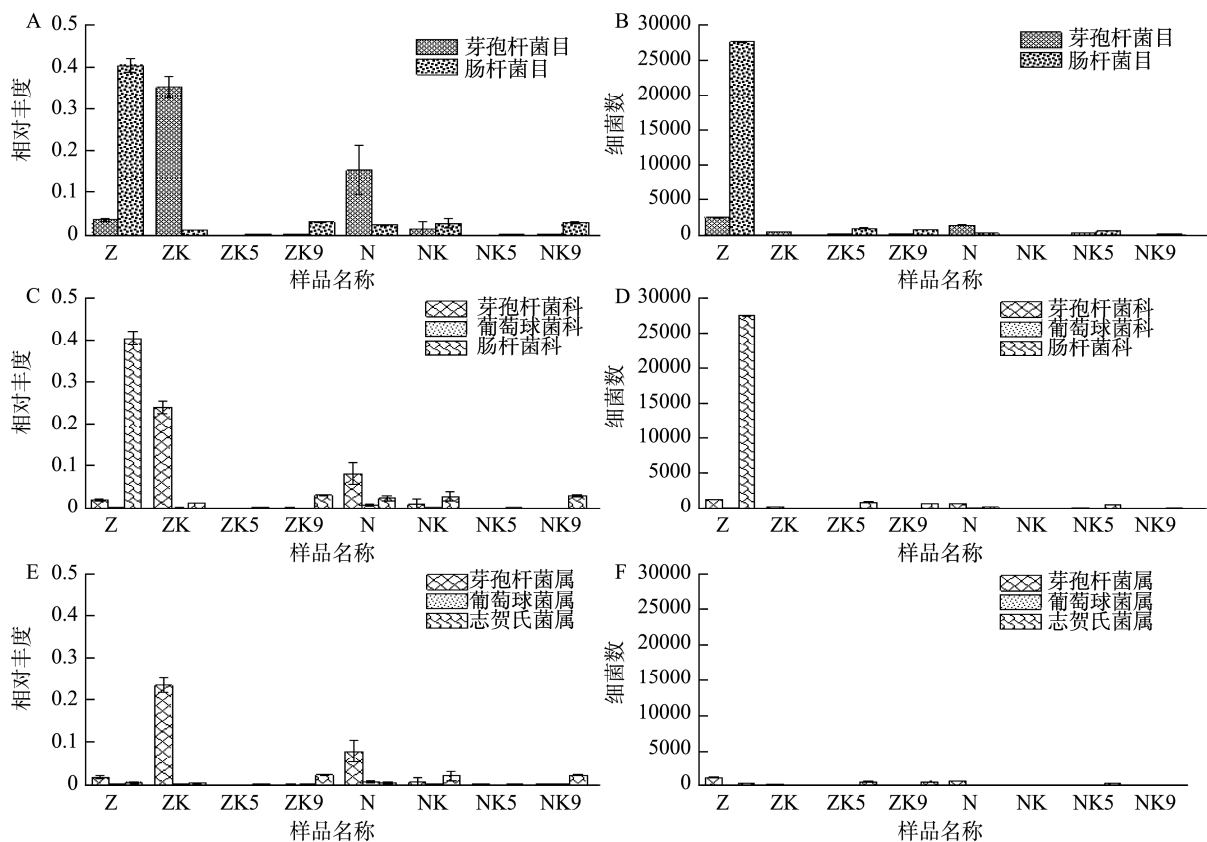
图 8 ClO₂ 处理后鲜切菠萝的细菌群落变化

Fig.8 Changes in bacterial communities of fresh-cut pineapples after treatment with ClO₂

由图 9 可知, 经 1%壳聚糖处理后, ZK 菠萝中芽孢杆菌目、芽孢杆菌科、芽孢杆菌属等致病菌的相对丰度增加, 而 NK 菠萝则相反; 因为细菌总数下降, 所以上述各种致病菌的数量均下降。经壳聚糖处理的鲜切菠萝在室温贮藏过程中, 上述致病菌的相对丰度均下降, 然而由于细菌总数增加, 所以致病菌的数量却不一定下降, 例如 NK5 菠萝中肠杆菌目、肠杆菌科、志贺氏菌属等致病菌的数量增加。经壳聚糖处理的鲜切菠萝在 4℃贮藏过程中, ZK9 和 NK9 菠萝中志贺氏菌属的相对丰度增加, 因为细菌总数下降, 所以致病菌的数量均下降, 但志贺氏菌的数量变化不明显。综上, 处理后或处理后继续于 4℃贮藏时鲜切菠萝可能含有的各种致病菌风险均降低, 但继续于室温贮藏, 则只有金黄色葡萄球菌和李斯特菌的风险降低, 但有待进一步验证。范郁斐^[30]的研究表明壳聚糖处理可以显著抑制鲜切哈密瓜表面菌落总数的增长。时月等^[31]的研究结果也表明壳聚糖处理可以减少鲜切甜瓜表面菌落总数。壳聚糖处理对金黄色葡萄球菌和李斯特菌的抑制效果更显著^[32]。此外, 壳聚糖阻止了细胞的物质传递及菌体对营养物质的摄入, 导致菌体新陈代谢紊乱, 无法生长^[33]。

2.4 鲜切菠萝中疑似含有的致病菌的确认

由于在“2.3 不同贮藏条件下鲜切菠萝中致病菌风险分析”中对致病菌的风险分析结果有一些是基于推测的, 需要针对表 1 中推测疑似含有的致病菌以及表 2 中各致病菌的相对丰度及数量变化进行验证, 因此, 本研究进一步采用致病菌快速检测片对在不同条件下贮藏和经不同条件处理的鲜切菠萝进行检测, 以确认这些致病菌是否存在, 检测结果如表 3 所示。表 3 的验证实验结果显示, 用 5 个不同产地的原料制作的鲜切菠萝中均含有蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、李斯特菌、志贺氏菌、阪崎肠杆菌 5 种致病菌, 这与表 1 推测的结果一致。而表 1 中推测疑似含有的大肠杆菌 O157:H7 和沙门氏菌则未被检测到(表 3), 说明在本研究的鲜切菠萝样品中并无此二种致病菌。表 3 验证结果还显示, 蜡样芽孢杆菌、李斯特菌、志贺氏菌、阪崎肠杆菌这 4 种致病菌无论在室温或 4℃贮藏条件下仍然存在; 而金黄色葡萄球菌虽然能在原料和 4℃贮藏条件下检测到, 但在室温贮藏条件下全部消失。而表 1 的 16S rDNA 测序虽然可以测出葡萄球菌属, 但其下属的种—金黄色葡萄球菌则是推测出的, 显然, 表 3 验证实验的结果



注: 横坐标为鲜切菠萝经壳聚糖处理后不同温度贮藏前后的样品, A、C、E 图为各样品中细菌在目、科、属水平的相对丰度, B、D、F 图为各样品中致病菌在目、科、属水平的数量。

图 9 壳聚糖处理后鲜切菠萝的细菌群落变化

Fig.9 Changes in bacterial communities of fresh-cut pineapples after treatment with 1% chitosan

表 3 通过检测片确认的鲜切菠萝中含有的致病菌
Table 3 Pathogens in fresh-cut pineapples as confirmed with pathogen test sheets

鲜切菠 萝样品	蜡样芽 孢杆菌	金黄色 葡萄球菌	李斯 特菌	志贺 氏菌	阪崎 肠杆菌	大肠杆菌 O157:H7	沙门 氏菌
Z	√	√	√	√	√	×	×
Z3	√	×	√	√	√	×	×
Z6	√	√	√	√	√	×	×
N	√	√	√	√	√	×	×
N3	√	×	√	√	√	×	×
N6	√	√	√	√	√	×	×
YS	√	√	√	√	√	×	×
YS3	√	×	√	√	√	×	×
YS6	√	√	√	√	√	×	×
S	√	√	√	√	√	×	×
S3	√	×	√	√	√	×	×
S6	√	√	√	√	√	×	×
YX	√	√	√	√	×	×	×
YX3	√	×	√	√	√	×	×
YX6	√	√	√	√	√	×	×
ZE	√	×	×	×	√	×	×
ZE5	√	×	√	√	√	×	×
ZE9	√	√	×	√	√	×	×
ZK	×	×	×	×	×	×	×
ZK5	√	×	×	√	√	×	×
ZK9	√	√	×	×	×	×	×
NE	√	×	×	×	√	×	×
NE5	√	×	√	√	√	×	×
NE9	√	√	×	√	√	×	×
NK	×	×	×	×	×	×	×
NK5	√	×	×	√	√	×	×
NK9	√	√	×	×	×	×	×

注: √表示此致病菌在样品中检出, ×表示此致病菌在样品中未检出。

并不完全支持这一推测。对此, 一个合理的解释是菠萝原料中确实含有金黄色葡萄球菌, 且在制作鲜切菠萝的时候会被带入产品中, 然而金黄色葡萄球菌不能耐受菠萝组织的高酸性, 在室温条件下逐渐消失; 但在 4℃贮藏条件下, 它们中的一部分可能转入休眠状态而得以残存。HUDAANEETO 等^[15]的研究也证实了这一点, 尽管加工过程中鲜切水果和蔬菜上都发现了金黄色葡萄球菌, 但在乳酸菌群大量存在下, 金黄色葡萄球菌通常无法增殖。

表 3 显示经 ClO₂ 处理后, 鲜切菠萝中细菌数量大幅降低, 但蜡样芽孢杆菌和阪崎肠杆菌仍能检出。经 ClO₂ 处理后继续于室温贮藏 5 d, 仅金黄色葡萄球菌未被检出, 其他 4 种致病菌均重新生长; 于 4℃贮藏 9 d 后, 仅李斯特菌消失, 其他 4 种致病菌均重新生长。以上验证结果除李斯特菌外, 其他致病菌的情况与“2.3 不同贮藏条件下鲜切菠萝中致病菌风险分析”中的推测一致。至于李斯特菌在推测和验证结果中的差异, 分析其原因如下, 由于表 1 中 16S rDNA 测序仅区分到芽孢杆菌目(该目下属李斯特菌科、属、种), 前述推测李斯特菌风险上升是根据芽孢杆菌目的细菌数量增加推测的, 但实际上芽孢杆菌目细菌数量的增加可能主要由该目中的其他细菌的增长导致, 因此造成上述差异。

表 3 显示经壳聚糖处理后, 鲜切菠萝中的 5 种致病菌已低至无法检出; 但继续在室温贮藏 5 d, 则蜡样芽孢杆菌、

志贺氏菌、阪崎肠杆菌重新被检出; 继续于 4℃贮藏 9 d, 则蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌重新被检出, 这与前述推测基本一致; 但 4℃贮藏 9 d 志贺氏菌并未被检出, 在前述推测中志贺氏菌的数量变化也不明显, 究其原因可能与前述李斯特菌在推测结果和验证结果中的差异类似。

3 结 论

本研究采用 5 个不同产地的菠萝原料制成鲜切菠萝, 对鲜切菠萝在贮藏过程中致病菌风险进行分析, 结果显示, (1)5 种鲜切菠萝中均存在蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、李斯特菌、志贺氏菌、阪崎肠杆菌等多种致病菌, 致病菌风险较高; (2)无论在室温或 4℃贮藏大部分致病菌包括蜡样芽孢杆菌、李斯特菌、志贺氏菌、阪崎肠杆菌等致病菌仍能存活甚至生长; (3) 10 mg/kg ClO₂ 处理仅能减少初始细菌数, 但无法抑制残留细菌继续生长, 因此不能消除这些致病菌风险; (4) 1%壳聚糖处理能显著降低各种致病菌数量, 并能完全抑制李斯特菌的生长, 但对于其他致病菌, 包括蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌、阪崎肠杆菌仅能在短期内消除其风险, 贮藏过程中残留的致病菌仍能缓慢生长, 并可能最终导致食品安全危害。综合来看, 鲜切菠萝经 1%壳聚糖处理后在 4℃贮藏风险较低。

本研究分析了鲜切菠萝在室温及 4℃冷藏条件下以及在经过 ClO₂ 和壳聚糖处理后各种致病菌的变化情况, 初步发现壳聚糖对致病菌的控制有比较明显的效果, 本研究结果为鲜切菠萝在加工和贮藏过程中致病菌风险的评估和控制提供了一些科学依据。但是本研究未对壳聚糖抑制致病菌的条件进行优化, 也未对壳聚糖与其他抑菌剂的协同效果进行研究, 今后可对此进行进一步研究。

参考文献

[1] 马金晶, 李凤琴, 黄敏毅, 等. 鲜切果蔬中食源性致病菌污染研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(7): 2591–2599.
MA JJ, LI FQ, HUANG MY, *et al.* Research progress of food-borne pathogens contamination in fresh-cut fruits and vegetables [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(7): 2591–2599
[2] 王文博, 苑学霞, 邹元娟, 等. 环介导恒温扩增检测生鲜果蔬中致病菌[J]. 山东农业科学, 2018, 50(10): 134–137, 141.
WANG WB, YUAN XX, WU YJ, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of pathogens in fresh fruits and vegetables [J]. Shandong Agric Sci, 2018, 50(10): 134–137, 141.
[3] 白瑶, 马金晶, 黄敏毅, 等. 北京五城区零售鲜切果蔬中重要食源性致病菌污染与耐药性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(6): 692–697.
BAI Y, MA JJ, HUANG MY, *et al.* Study on contamination and drug resistance of important food-borne pathogens in fresh-cut fruits and vegetables retailed in five districts of Beijing [J]. Chin J Food Hyg, 2021, 33(6): 692–697.
[4] BHAVYA ML, SHEWALE SR, RAJORIYA D, *et al.* Impact of blue LED illumination and natural photosensitizer on bacterial pathogens, enzyme activity and quality attributes of fresh-cut pineapple slices [J]. Food Bioproc Technol, 2021, 14(2): 362–372.
[5] HERAS-MOZOS R, GAVARA R, HERNÁNDEZ-MUÑOZ P. Responsive packaging based on imine-chitosan films for extending the shelf-life of refrigerated fresh-cut pineapple [Z]. 2022.
[6] 倪孟侨, 刘琛, 时梦瑶, 等. 二氧化氯在食品保鲜中的发展前景[J]. 应

- 用化工, 2021, 50(8): 2265–2268.
- NI MQ, LIU C, SHI MY, *et al.* Development prospect of chlorine dioxide in food preservation [J]. Appl Chem Ind, 2021, 50(8): 2265–2268.
- [7] MAHARSIH IK, PUSFITASARI MD, PUTRI CAS, *et al.* Performance evaluation of cassava peels starch-based edible coating incorporated with chitosan on the shelf-life of fresh-cut pineapples [J]. IOP Conference Series: Earth and Environ Sci, 2021, 733(1): 012017.
- [8] 李琰儒. 臭氧水处理对鲜切菠萝品质的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.
- LI YR. Effect of aqueous ozone treatment on quality of fresh-cut pineapple [D]. Shenyang: Shenyang Agriculture University, 2019.
- [9] 方宗壮, 谢辉, 段宙位, 等. 不同预处理方法对鲜切菠萝贮藏品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(1): 197–201.
- FANG ZZ, XIE H, DUAN ZW, *et al.* Effects of different pretreatment methods on storage quality of fresh-cut pineapple [J]. Jiangsu Agric Sci, 2019, 47(1): 197–201.
- [10] 张慧欣, 张红, 汪梦, 等. 壳聚糖、壳寡糖涂膜保鲜对鲜切菠萝品质的影响[J]. 中国果菜, 2021, 41(12): 1–6.
- ZHANG HX, ZHANG H, WANG M, *et al.* Effect of chitosan and chitooligosaccharides coating preservation on quality of fresh-cut pineapple [J]. Chin Fruit Veg, 2021, 41(12): 1–6.
- [11] BASAGLIA RR, PIZATO S, SANTIAGO NG, *et al.* Effect of edible chitosan and cinnamon essential oil coatings on the shelf life of minimally processed pineapple (smooth cayenne) [Z]. 2021.
- [12] ADIAN I, VANSHIK A, GUPTA A, *et al.* FTIR-based rapid microbial quality estimation of fresh-cut jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) bulbs [Z]. 2022.
- [13] 窦同心, 孟祥春, 张爱玉, 等. 不同菠萝品种、杀菌剂和褐变抑制剂对鲜切菠萝贮藏品质的影响[J]. 农产品加工(学刊), 2011, (4): 12–15, 19.
- DOU TX, MENG XC, ZHANG AIY, *et al.* Effects of pineapple cultivator, bactericide and browning inhibitors on storage quality of fresh-cut pineapple [J]. Acad Period Farm Prod Process, 2011, (4): 12–15, 19.
- [14] 刘易伟, 胡文忠, 刘程惠, 等. 鲜切果蔬中常见致病菌及其 PCR 快速检测方法[J]. 食品工业科技, 2013, 34(17): 360–364.
- LIU YW, HU WZ, LIU CH, *et al.* Bacterial pathogens in fresh and fresh-cut fruits and vegetables and PCR rapid detection [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(17): 360–364.
- [15] HUDANEETO O, BRINDARAMASAWM Y, ARVINDRUGGO O, *et al.* A comparative assessment of the quality of minimally processed pineapples sold in wet markets and supermarkets of Mauritius [Z]. 2018.
- [16] KENNETH LH, GERALDVAN BELLE, DANIELSIMBERLOF F. Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size [J]. Ecology, 1975, 56(6): 1459–1461.
- [17] KEMP PF, ALLER JY. Bacterial diversity in aquatic and other environments: What 16S rDNA libraries can tell us [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2004. DOI: 10.1016/S0168-6496(03)00257-5
- [18] CHAO A, SHEN TJ. Nonparametric prediction in species sampling [J]. J Agric Biol Environ Stat, 2004. DOI: 10.1198/108571104x3262
- [19] GORNI C, ALLEMAND D, ROSSI D, *et al.* Microbiome profiling in fresh-cut products [J]. Trends Food Sci Technol, 2015. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.10.013
- [20] FENG K, HU WZ, JIANG AL, *et al.* Growth potential of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on fresh-cut tropical fruits [J]. J Food Sci, 2015. DOI: 10.1111/1750-3841.13089
- [21] XING YG, LIAO XM, WU HJ, *et al.* Comparison of different varieties on quality characteristics and microbial activity of fresh-cut pineapple during storage [J]. Foods, 2022. DOI: 10.3390/foods11182788
- [22] HUANG J, LUO Y, ZHOU B, *et al.* Growth and survival of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce and their juice extracts: Impacts and interactions of food matrices and temperature abuse conditions [J]. Food Control, 2019. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.12.035
- [23] SCOLLARD J, MCMANAMON O, SCHMALENBERGER A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth on fresh-cut produce with thyme essential oil and essential oil compound verbenone [J]. Postharvest Biol Technol, 2016, 120: 61–68.
- [24] 张丽, 刘璐, 张文韬, 等. 不同减菌剂对鲜切茼蒿的减菌效果[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(4): 91–104.
- ZHANG L, LIU L, ZHANG WT, *et al.* Effect of different agents on microorganisms fresh-cut coriander [J]. J Food Sci Biotechnol, 2021, 40(4): 91–104.
- [25] 王少丹. 提高鲜切青椒微生物食用安全性的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- WANG SD. Study on improving microbial food safety of fresh-cut green pepper [D]. Taian: Shandong Agriculture University, 2012.
- [26] 王玉丽, 张丙云, 王永刚. 二氧化氯熏蒸对韭黄表面微生物的影响[J]. 食品工业科技, 2008, (11): 211–212.
- WANG YL, ZHANG BY, WANG YG. Effect of chlorine dioxide fumigating of microbial on the surface of leek shoot [J]. Sci Technol Food Ind, 2008, (11): 211–212.
- [27] 张丙云, 郑艳霞, 王永刚. 鲜切韭黄保鲜技术的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(4): 336–338.
- ZHANG BY, ZHENG YX, WANG YG. Study on preservation technologies of fresh-cut leek shoot [J]. Sci Technol Food Ind, 2010, 31(4): 336–338.
- [28] 索慧敏. 鲜切马铃薯保鲜技术研究及货架期预测模型的建立[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2021.
- SUO HM. Study on fresh-cut potato preservation technology and establishment of shelf life prediction model [D]. Inner Mongolia: Inner Mongolia Agriculture University, 2021.
- [29] 刘晓燕. 鲜切莲藕保鲜技术及货架期预测模型的建立[D]. 成都: 四川农业大学, 2018.
- LIU XY. Study on fresh-keeping technology and the predictive model construction of the shelf-life of fresh-cut lotus root [D]. Chengdu: Sichuan Agriculture University, 2018.
- [30] 范郁斐. 不同保鲜剂处理对鲜切紫甘蓝贮藏期内品质与成分的影响[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2019.
- FAN YF. Effects on quality and composition of fresh-cut purple cabbage with different antistaling agents [D]. Hangzhou: Zhejiang Agriculture Forestry University, 2019.
- [31] 时月, 李玥, 王宇滨, 等. 丁香油、壳聚糖及其复合涂膜方式对鲜切甜瓜品质的影响[J]. 农产品加工, 2021, (15): 1–5.
- SHI Y, LI Y, WANG YB, *et al.* Effects of clove oil, chitosan and their complexes coating on qualities of fresh-cut melon [J]. Farm Prod Process, 2021, (15): 1–5.
- [32] 马捷. 壳聚糖涂膜对鲜切哈密瓜品质、抗氧化能力和微生物污染的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
- MA J. Effects of chitosan coating on quality, antioxidant capacity and microbial contamination of fresh-cut Hami melons [D]. Lanzhou: Gansu Agriculture University, 2017.
- [33] 兰维杰, 李心丹, 刘晓燕, 等. 1-MCP、壳聚糖和臭氧在鲜切果蔬保鲜技术中的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(12): 5309–5314.
- LAN WJ, LI XD, LIU XY, *et al.* Application of 1-MCP, chitosan and ozone on fresh-cut fruits and vegetables [J]. Genom Appl Biol, 2017, 36(12): 5309–5314.

(责任编辑: 黄周梅 郑 丽)

作者简介



钟燕华, 硕士研究生, 主要研究方向为食品加工与安全。

E-mail: 1735530532@qq.com



段 杉, 博士, 副教授, 主要研究方向食品生物技术。

E-mail: duanshan@scau.edu.cn