

即食海蜇菌群分析与腐败菌种分离、鉴定

林以琳¹, 林瑜¹, 缪松², 曾绍校¹, 林少玲^{*1}

(1. 福建农林大学 食品科学学院, 福建 福州 350002; 2. 爱尔兰农业部农业与食品发展局 TEAGASC 食品研究中心, 都柏林 科克 R93XE12)

摘要: 即食海蜇富含蛋白质、必需氨基酸、维生素、碳水化合物等营养物质。但因其营养丰富, 极易引起微生物生长繁殖从而导致即食海蜇腐败变质, 导致其营养价值丧失, 从而引起巨大的经济损失以及食品安全问题。因此, 明确导致即食海蜇腐败变质的微生物种类, 寻找有效抑制其生长的技术, 提高其食用品质及延长其货架期。通过对即食海蜇产品进行菌群分析以及腐败优势菌种的分离、鉴定, 结果显示: 出厂 3 个月的即食海蜇菌落总数已达到 48 000 CFU/g, 超出海蜇相关标准所规定的 30 000 CFU/g。但未检出大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌等典型致病菌; 经分离鉴定后的腐败优势菌种为革兰氏阴性菌-洋葱伯克氏菌。

关键词: 即食海蜇; 菌群分析; 菌落总数; 洋葱伯克氏菌

中图分类号: TS 205 文章编号: 1673-1689(2020)06-0055-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.06.008

Flora Analysis and Identification of Dominant Spoilage Species in Ready-to-Eat Jellyfish

LIN Yilin¹, LIN Yu¹, MIAO Song², ZENG Shaoxiao¹, LIN Shaoling^{*1}

(1. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Teagasc The Agriculture and Food Development Authority, Dublin Co.Cork, R93XE12, Ireland)

Abstract: Fresh jellyfish contains abundant protein, essential amino acids, vitamins, carbohydrates and other nutrients. With the high nutrition, it is easy to cause the excessive growth of microbial in ready-to-eat jellyfish and then lead to the corruption and deterioration which will cause enormous economic losses and food safety issues. Therefore, the quality of the jellyfish should be controlled by identifying the dominant spoilage microorganisms that cause the metamorphism of the jellyfish and looking for the technology that can effectively inhibit their growth. The flora in ready-to-eat jellyfish was analyzed, and the dominant strains were isolated and identified by PCR. The results showed that the total number of colonies in ready-to-eat jellyfish after three months storage was 48 000 CFU/g which exceeded the national standard of 30 000 CFU/g. However, no pathogenic bacteria including *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* were identified in unqualified jellyfish. The dominant spoilage strain was *Burkholderia cepacia* which is

收稿日期: 2018-09-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31501485)。

* 通信作者: 林少玲(1985—), 女, 博士, 讲师, 主要从事食品安全的研究。E-mail: shaoling.lin@fafu.edu.cn

gram-negative bacterium.

Keywords: ready-to-eat jellyfish, total number of colonies, gram-negative bacteria, *Burkholderia cepacia*

即食海蜇是一种水分含量高、低脂肪且营养丰富,具有抗氧化、免疫调节功能的食品^[1]。海蜇含有人体需要的多种营养成分,尤其含有人体饮食中所缺的碘,是一种重要的营养食品。海蜇最主要的成分是胶原蛋白,现代医学研究发现其具有抗氧化、抗疲劳和免疫调节功能,对治疗风湿性关节炎具有一定的效果^[2-3]。海蜇多肽可应用于抗氧化、降血脂、降血压等药物的开发^[4-5]。此外,据文献记载,海蜇对慢性气管炎、风湿、高血压等多种病症具有良好的疗效,已成为一种具有较高食用、营养及药用价值的名贵海洋食品。

新鲜海蜇含水量高,易分解和自溶,因此在加工过程中需要添加大量的食盐和明矾使其迅速脱水,收敛和凝固蛋白质^[6]。加入明矾可显著提高海蜇的贮藏品质,但同时也带来海蜇铝残留量过高的问题。而人体中铝含量过高,则会对神经、骨骼及免疫具有潜在的毒性^[7]。即食海蜇制品通常是三矾盐渍海蜇经过清洗、切割、灭菌、包装等一系列加工处理后得到的即食食品。即食海蜇生产加工中脱铝技术的应用,不仅降低了铝离子对人体的危害^[8]还有效避免了微生物的生长。根据我国农业部发布的 NYT 1515-2007《绿色食品海蜇及制品》^[9],除了不得检出沙门氏菌、志贺氏菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌等致病菌外,大肠菌群和菌落总数也不得超标。随着即食海蜇产品明矾含量及铝残留量的降低,湛江市场对软包装即食海蜇丝制品细菌学品质进行了分析,并对产品中残存细菌的安全性进行了评价^[10]。结果表明:即食海蜇产品大肠菌群数均为 30 MPN/hg,革兰氏阴性杆菌(88.9%)、少量的革兰氏阳性无芽孢球菌(8.3%)、极少量的革兰氏阳性有芽孢杆菌(2.8%)。对即食海蜇的微生物指标问题进行长期监控及有效控制,是当前要解决的问题之一。明确即食海蜇腐败变质的微生物种类,并针对性寻找有效的抑菌方法,有效提高即食海蜇的食用安全性及经济价值。

作者通过对即食海蜇产品进行菌群分析,并对腐败优势菌种进行分离、纯化和 16S rDNA 的 PCR

扩增与序列测定后经过 BLAST 分析,明确腐败优势菌种类。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

即食海蜇:由福州永辉超市购得不同厂家生产的 5 类即食海蜇产品。平板计数琼脂(PCA)培养基、营养肉汤培养基、细菌基因组 DNA 提取试剂盒:Solarbio 公司产品;DreamTaq -TM DNA 聚合酶(EP0702):MBI 公司产品;SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒:上海生工生物工程股份有限公司产品;pMD[®] 18-T Vector 连接试剂盒:Takara 公司产品。

PL202-S100 型精密分析天平:Mettler Toledo (上海)仪器有限公司产品;HPX-9000 型数显电热培养箱:上海博迅实业有限公司医疗设备厂制造;2720 thermal cycler 型 PCR 仪:Applied Biosystems 公司产品;T6 新世纪紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司产品;MR6 数显恒温水浴锅:金坛市双捷实验仪器厂制造;101-0 型电热鼓风干燥箱:上海阳光实验仪器有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 即食海蜇样品中微生物污染状况 各取 10 g 即食海蜇样品,放入含有 90 mL 无菌稀释液的无菌均质袋内,于 8 000 r/min 均质 2 min,制成 1:10(体积比)样品匀液。取 1 mL 样品匀浆,以 1:10(体积比)进行梯度稀释,全过程控制在 15 min 内。以稀释后的即食海蜇样品为原料,进行各种微生物的测定,测定方法如表 1。

1.2.2 腐败优势菌种分离纯化 各取 1 mL 制得的稀释样品加入无菌锥形瓶中置于 30 ℃摇床培养。取 1 mL 培养后的菌液,以 1:10(体积比)进行梯度稀释,得到 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 稀释样品。移取稀释样品各 100 μL,涂布于 PCA 培养基中,倒置于 30 ℃恒温生化培养箱中培养 72 h。取出平板,挑取菌落,转接到新的固体培养基,采用三线划线法接种培养至分离到纯种菌落,重复纯化步骤 5 次。挑取纯种菌

表 1 几种即食海蜇中常见微生物的测定方法

Table 1 Methods for the determination of common microorganisms in ready-to-eat jellyfish

微生物种类	测定方法
菌落总数	GB4789.2-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验菌落总数测定》 ^[11]
大肠杆菌	GB4789.3-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验大肠菌群计数》 ^[12]
蜡样芽孢杆菌	GB/T 4789.14-2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验蜡样芽孢杆菌检验》 ^[13]
沙门氏菌	SN 0170-1992《出口食品中沙门氏菌(包括亚利桑那菌)检验方法》 ^[14]
金黄色葡萄球菌	SN/T 0172-2010《进出口食品中金黄色葡萄球菌检验方法》 ^[15]

落,溶于营养肉汤培养基中进行富集培养,30℃培养24 h,取1 mL培养后菌液与体积分数50%灭菌后甘油1:1(体积比)混合均匀,于-80℃超低温冰箱保藏。

1.2.3 腐败优势菌种 16S rDNA 序列鉴定 根据细菌基因组DNA提取试剂盒抽提腐败优势菌的DNA,并于-20℃冰箱冻存。

1.2.4 16S rDNA 的 PCR 扩增与序列测定 取抽提得到的腐败优势菌DNA进行16S rDNA的PCR扩增,其中正向引物为7F:5'-CAGAGTTTGATCCTGG-CT-3',反向引物为1540R:5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR循环设置:98℃预变性3 min;30个循环:98℃变性25 s,55℃复性25 s,72℃延伸1 min;最后72℃温浴10 min,4℃30 min终止反应。通过琼脂糖凝胶电泳提取DNA片段,送至上海生工技术公司进行测序。

1.2.5 序列分析与系统发育树的构建 利用BLAST对所得腐败优势菌的16S rDNA序列进行相似性对比分析,并使用Bootstrap及Neighbour Joining计算进化距离,构建系统发育树并分析。

2 结果与分析

2.1 即食海蜇样品中微生物污染状况

如表2所示,即食海蜇样品中菌落总数为48 000 CFU/g,远高于国家标准所规定的不得高于30 000 CFU/g,说明该产品被微生物污染。同时,样品中并未检出大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌,说明该产品在加工处理中受致病菌污染的可能性小,但总体上不符合即食海蜇产品的微生物限量标准规定。

2.2 16S rDNA 序列分析鉴定

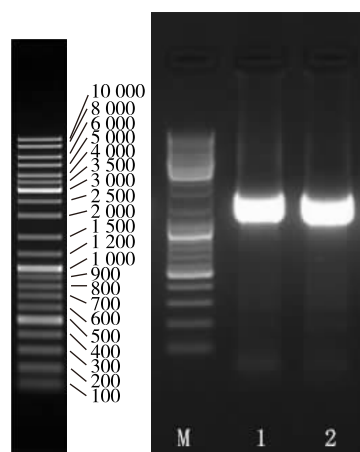
2.2.1 16S rDNA 的 PCR 扩增与序列测定 提取经分离纯化后的2菌株基因组DNA,以其16S rDNA

表 2 即食海蜇细菌学品质指标

Table 2 Bacterial standards of ready-to-eat jellyfish

指标	国家标准	海蜇样品
细菌总数/(CFU/g)	≤30 000	48 000
大肠杆菌总数/(MPN/hg)	≤30	<30
蜡样芽孢杆菌总数/(CFU/g)	不得检出	—
沙门氏菌总数/(CFU/g)	不得检出	—
金黄色葡萄球菌总数/(CFU/g)	不得检出	—

为模板进行PCR扩增(图1)。结果表明2条目标条带约为1.35 kb。将菌株的阳性质粒送至上海生工生物公司测序,测得16S rDNA大部分序列分别为1 348 bp和1 336 bp(图2)。



M:泳道为Maker;1:泳道为菌1的PCR扩增产物;2:泳道为菌2的PCR扩增产物。

图 1 PCR 扩增 16S rDNA 基因

Fig. 1 PCR amplification of 16S rDNA gene

2.2.2 BLAST 同源性搜索与系统发育树的绘制 菌株1和菌株2的16S rDNA的序列分别经过BLAST分析后,Burkholderia属的细菌与菌株1与菌株2的16S rDNA相似度高(表3),其中Burkholderia lata和Burkholderia cenocepacia分别与菌1、菌2序列相似度达到99%和100%,因此菌

CGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGATT
AATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGGCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGAT
TAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGA
TCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAATCCTTGGCT
CTAATACAGTCGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATA
CGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAA
ATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGTGATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATTCCA
CGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGAC
GCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACT
AGTTGTTGGGATTCAITTCCTTAGTAACGTAGTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGTCGCAAG
ATTAAGCTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAAATCGATGCAACGCGAA
AAACCTTACCTACCTTGACATGGTCGGAATCTGCTGAGAGGTGGGAGTGTCTGAAAGAGAACCGGCGCACA
GGTGTGTCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCC
TTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAG
TCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGG
GGAGCTAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTA
GTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGT
GGGTTTACCAGAAGTGG

图 2 菌株的 16S rDNA 碱基序列
Fig. 2 Sequence of 16S rDNA of the strain

表 3 菌株 16S rDNA 序列同 GeneBank 中细菌菌株同源性比较
Table 3 Comparison of 16S rDNA sequence with the bacterial strain homology in GeneBank

菌株	登录号	相似性/%
菌株 1		
<i>Burkholderia lata</i> strain FL-1-2-30-S1-D0	CP013391.1	99
<i>Burkholderia contaminans</i> strain FL-1-2-30-S1-D0	CP013390.1	99
<i>Burkholderia metallica</i> strain FL-6-5-30-S1-D7	CP013403.1	99
<i>Burkholderia metallica</i> strain FL-6-5-30-S1-D7	CP013401.1	99
<i>Burkholderia contaminans</i> strain MS14	CP009744.1	99
菌株 2		
<i>Burkholderia cenocepacia</i> strain	KU749979.1	100
<i>Burkholderia lata</i> strain FL-1-2-30-S1-D0	CP013391.1	100
<i>Burkholderia contaminans</i> strain FL-1-2-30-S1-D0	CP013390.1	100
<i>Burkholderia metallica</i> strain FL-6-5-30-S1-D7	CP013403.1	100
<i>Burkholderia contaminans</i> strain MS14	CP009744.1	100

株 1 种属初步鉴定为 *Burkholderia lata*、菌株 2 为 *Burkholderia cenocepacia*。

将腐败优势菌的 16S rRNA 基因序列与从 Genebank 中选择的 10 株菌进行系统进化分析,得到如图 3 所示的系统发育树。如图所示,菌株 1 与 *Burkholderia lata* strain FL-1-2-30-S1-D0、菌株 2 与 *Burkholderia cenocepacia* strain 的分支的序列一

致性达到 95%,表明它们亲缘关系最近,进一步验证了鉴定结果。

3 结 语

即食海蜇食用方便,但保藏时间短。在贮藏过程中容易受到环境中温度、pH 以及产品包装等方面的影响^[16,19],这些栅栏因子有助于即食海蜇中微

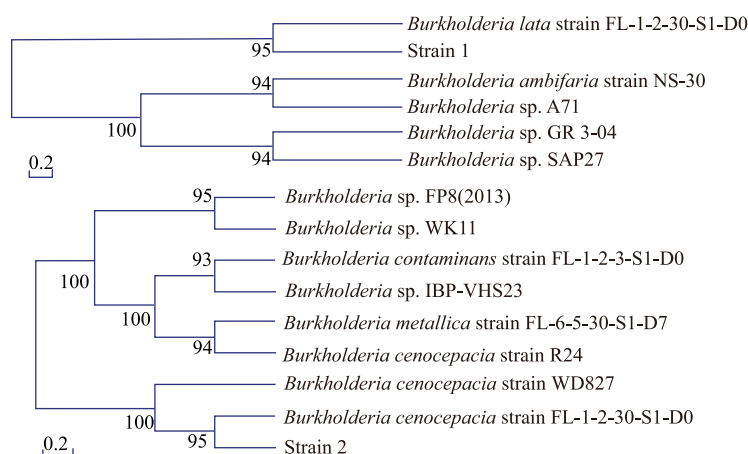


图3 菌株1与菌株2和相关菌株16S rDNA基因序列系统进化树图

Fig. 3 Phylogenetic tree of 16S rDNA gene sequence of strains 1, 2 and related strains

生物的生长^[20]。已有报道,通过PCR技术快速检测出海蜇中的腐败菌有芽孢杆菌、假单胞菌以及腐败希瓦氏菌^[17-18]。本文通过即食海蜇样品的菌群分析,并未检出大肠杆菌、蜡芽孢杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌;但通过菌落总数分析法得知即食海蜇出厂3个月,其菌落总数(48 000 CFU/g)已超出海蜇相关标准所规定(30 000 CFU/g),但样品中说明该产品仍然被微生物污染,菌落总数超标。菌落总数的快速增长严重影响即食海蜇的食用安全。因此,明确腐败优势菌种是十分紧急且必要的。通过对腐败优势菌种进行16S rDNA的PCR扩增与序

列测定后经过BLAST分析,发现腐败优势菌群为革兰氏阴性菌并主要为*Burkholderia*菌属。*Burkholderia*菌属隶属于假单胞菌属,是富有运动性及好氧性,呈现棒状的革兰氏阴性菌。*Burkholderia*在可作为生物降解、生物控制及促进植物生长的主要微生物,对人类免疫可造成潜在危害。并且*Burkholderia*具有对抗生素的抗药性及高运动性,对于人类有较大的威胁。所以,选择合适灭菌技术,有效抑制*Burkholderia*的生长,从而对即食海蜇进行减菌处理具有十分重要的科学意义。

参考文献:

- [1] LIN S L, HU J M, GUO R, et al. Potential dietary toxicity assessment of alum-processed jellyfish[J]. *Bulgarian Chemical Communications*, 2017, 49: 70-77.
- [2] DING J F, LI Y Y, XU J J, et al. Study on effect of jellyfish collagen hydrolysate on anti-fatigue and anti-oxidation[J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(5): 1350-1353.
- [3] ZHANG H L, CUI S H, ZHA X Q, et al. Jellyfish skin polysaccharides: extraction and inhibitory activity on macrophage-derived foam cell formation[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 106: 393-402.
- [4] 金晓石, 吴红棉, 钟敏, 等. 海蜇糖胺聚糖提取、纯化及其降血脂作用研究[J]. *中国海洋药物*, 2007, 26(4): 41-44.
- [5] 张绵松, 孟秀梅, 袁文鹏, 等. 海蜇血管紧张素转化酶抑制肽的超滤分离[J]. *食品与药品*, 2010, 12(1): 20-23.
- [6] 叶湖, 陈英, 赵晓峰, 等. 海蜇中铝限量标准探讨及安全食用建议[J]. *中国食品卫生杂志*, 2013, 25(3): 268-271.
- [7] 庞洁. 铝对人体的毒性及相关食品安全问题研究进展[J]. *内科*, 2011, 6(5): 470-473.
- [8] 李慧, 王红玲, 陈建文. 2015~2017年日照市市售即食海蜇中铝含量检测[J]. *预防医学论坛*, 2017, 23(9): 712-713.
- [9] 刘汉琴. 国外流行新型保健食品[J]. *中国保健食品*, 2009(8): 16-19.
- [10] 谢主兰, 梁丽简, 黄和. 软包装即食海蜇丝的品质特征和细菌学安全分析[J]. *现代食品科技*, 2010, 26(12): 1391-1394.
- [11] HU J, LIN S, TAN B K, et al. Photodynamic inactivation of burkholderia cepacia by curcumin in combination with EDTA[J]. *Food Research International*, 2018, 111: 265-271.
- [12] 陈美洪. 食品中大肠菌群两种测定方法的探讨[J]. *广西轻工业*, 2011(10): 8-9.

- [13] BASSEY D E, GRIGSON S J W. Degradation of benzyldimethyl hexadecylammonium chloride by bacillus niabensis and thalassospira sp. isolated from marine sediments[J]. **Toxicological and Environ Chemistry**, 2011, 93(1): 44-56.
- [14] 中华人民共和国卫生部, 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN 0170-1992 出口食品中沙门氏菌(包括亚利桑那菌)检验方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1992.
- [15] 中华人民共和国卫生部, 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN 0172-2010 进出口食品中金黄色葡萄球菌检验方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [16] 单继航. 影响即食海蜇品质因素的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [17] 娄永江, 柳丽. 即食海蜇中特定腐败菌的分离及 PCR 检测[J]. 食品工业科技, 2014, 12(35): 207-209.
- [18] CHANGHU X, YUXIU Z, LAIHAO L, et al. Development strategy for aquaculture products refinement processing, quality and safety[J]. **Strategic Study of Chinese Academy of Engineering**, 2016, 18(3): 43-48.
- [19] 吕子娟. 即食海蜇标准研究及货架期预测[D]. 大连: 大连工业大学, 2016.
- [20] 李晓明, 陈舜胜. 几种栅栏因子在即食海蜇保鲜中的应用研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(11): 377-380+410.

科技信息

欧盟不批准蜂胶提取物和肥皂草根作为基础物质用于植保产品

据欧盟官方公报消息, 2020 年 5 月 13 日, 欧盟委员会发布 (EU) 2020/640 号和 (EU) 2020/643 号条例, 不批准蜂胶提取物 (propolis extract) 和肥皂草根 (Saponaria officinalis L. roots) 作为基础物质用作植物保护产品。

据了解, 蜂胶提取物旨在作为非食用果皮水果的杀真菌剂或杀菌剂。条例自公布第二日起生效。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟不批准蜂胶提取物和肥皂草根作为基础物质用于植保产品

[EB/OL]. (2020-05-14). <http://news.foodmate.net/2020/05/559998.html>