

# 自贡冷吃兔生产环境中细菌的鉴定及溯源分析

袁先铃<sup>1</sup>, 郑贻丹<sup>1</sup>, 罗焱<sup>1</sup>, 林洪斌<sup>2</sup>

(1. 四川轻化工大学生物工程学院, 四川宜宾 644005) (2. 西华大学食品与生物工程学院, 四川成都 610039)

**摘要:** 利用自然沉降法和涂抹采样法对自贡冷吃兔生产环境进行微生物监测, 采用传统培养法结合 16S rDNA 测序技术鉴定, 确定生产环境中细菌的主要种属, 建立潜在污染细菌库, 最后通过构建系统发育树进行溯源分析。本次研究从生产环境中共分离出 61 株菌, 分别属于 21 个属; 生产车间空气、生产人员、设备与器具均检出不动杆菌属细菌, 其次为气单胞菌属、假单胞菌属和葡萄球菌属; 冷吃兔辅料处理间、辅料储存间、炒制间、冷却间、内包装间的菌落总数在生产过程中变化较小, 原料处理间受人员操作影响变化较大。通过研究发现不动杆菌属在自贡冷吃兔生产环境中分布广泛; 冷吃兔加工设备器具表面和人员手部是冷吃兔产品潜在的污染源; 真空包装冷吃兔腐败样品中芽孢杆菌属细菌主要来源于各生产车间空气微生物, 葡萄球菌属细菌主要来源于炒制人员以及炒制间空气微生物。本研究深入了解了自贡冷吃兔生产环境的污染情况并能为其风险控制提供一定的科学依据。

**关键词:** 自贡冷吃兔; 生产环境; 细菌; 鉴定; 溯源分析

文章编号: 1673-9078(2022)01-112-125

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.1144

## Identification and Traceability Analysis of Bacteria in the Production

### Environment of Zigong Lengchitu

YUAN Xianling<sup>1</sup>, ZHENG Yidan<sup>1</sup>, LUO Yi<sup>1</sup>, LIN Hongbin<sup>2</sup>

(1. College of Biological Engineering, Sichuan University of Science and Engineering, Yibin 644005, China)

(2. College of Food and Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China)

**Abstract:** The natural sedimentation and smear sampling methods were used to monitor microorganisms in the Zigong Lengchitu's production environment. The traditional culture method combined with 16S rDNA sequencing technology was used to identify the main species and genera of bacteria in this production environment, whereupon a database of potential bacterial pollutants was established. Finally, a phylogenetic tree was constructed for traceability analysis. In total, 61 strains belonging to 21 genera were isolated from this environment. The predominant bacteria detected in the air and on production personnel, workshop equipment, and instruments were *Acinetobacter* strains, followed by *Aeromonas*, *Pseudomonas*, and *Staphylococcus* species. The total number of colonies in the food processing, storage, frying, cooling, and inner packing rooms changed only slightly during the Zigong Lengchitu's production process, whereas that in the raw material processing room changed greatly under the influence of personnel operation. In particular, *Acinetobacter* was widely distributed in the production environment, with surfaces of processing equipment and workers' hands being the potential contamination sources. Strains belonging to *Bacillus* and *Staphylococcus* were mainly from the air of each production workshop and from the air of the roasting room and the corresponding staff, respectively. This study provided an in-depth understanding of the sources of bacterial pollution in the production environment of Zigong Lengchitu and some scientific basis for their contamination risk control.

**Key words:** Zigong Lengchitu; production environment; bacteria; appraisal; traceability analysis

引文格式:

袁先铃, 郑贻丹, 罗焱, 等. 自贡冷吃兔生产环境中细菌的鉴定及溯源分析[J]. 现代食品科技, 2022, 38(1): 112-125

YUAN Xianling, ZHENG Yidan, LUO Yi, et al. Identification and traceability analysis of bacteria in the production environment of Zigong Lengchitu [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 112-125

自贡冷吃兔是自贡乃至川南地区的一种特色传统

收稿日期: 2021-10-14

基金项目: 四川省科技计划项目 (2020YFN0151)

作者简介: 袁先铃 (1979-), 女, 副教授, 研究方向: 食品安全工程, E-mail:

82745373@qq.com

肉制品, 以鲜兔肉为原料, 辅以辣椒、花椒、姜等香辛料, 经预煮、腌制、炒制等工艺加工而成<sup>[1]</sup>。目前, 自贡冷吃兔的品种有冷吃兔丁、香辣兔头、兔腿, 口味有香辣味、麻辣味、酱香味、无香味等<sup>[2]</sup>。兔肉质细嫩, 味道鲜美, 营养丰富, 颇受消费者的喜爱<sup>[3-5]</sup>。

兔产业目前发展迅速尤其是在发展中地区并且世界兔产业具有巨大的发展潜力<sup>[6]</sup>。根据自贡市统计局公布的数据显示,2014~2017年,自贡市从事冷吃兔加工企业数量10余家增至60余家,以“前店后厂”模式生产加工冷吃兔的小作坊达100多户增至1000余户,其中每年规模以上加工企业数量呈现逐年增加趋势<sup>[7]</sup>。2014年自贡市冷吃兔的产值为2.5亿,2018年增至13.5亿<sup>[8]</sup>。

生产环境中存在多种致病性、变质性微生物造成的微生物污染,可能会损害食品安全和质量。食品和生产环境监测相结合,是提高食品安全和质量的杠杆<sup>[9]</sup>。

自贡冷吃兔属于高温肉制品,能够达到商业无菌,但仍会残存部分细菌。在熟肉制品中,乳酸菌、葡萄球菌以及肠杆菌常被分离出来<sup>[10-11]</sup>。Yi等<sup>[12]</sup>对36种熏肉进行研究,发现鞘氨单胞菌(*Sphingomonas*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、葡萄球菌(*staphylococcus*)、明串珠菌(*Leuconostoc*)和肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)的丰度较高。李冉等<sup>[13]</sup>对气调包装狮子头冷藏过程中微生物变化及菌群结构分析,发现狮子头腐败时期的菌群结构主要由芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)、链球菌属(*Streptococcus* spp.)、不动杆菌属(*Acinetobacter* spp.)、热杀索丝菌属(*Brochothrix* spp.)、肠杆菌属(*Enterobacter* spp.)、乳酸菌属(*Lactobacillus* spp.)以及嗜冷杆菌属(*Psychrobacter* spp.)组成。图尔荪阿依·图尔贡等<sup>[14]</sup>从腐败香辣蟹中分离出15株腐败菌,其中3株属于葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp.),6株属于白色杆菌属(*Leucobacter* sp.),3株属于变形杆菌属(*Proteus* sp.),2株属于普罗威登斯菌(*Providencia vermicola*),1株属于节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)。

本研究通过对自贡冷吃兔生产加工车间、生产器具与设备、操作人员手的微生物进行数量测定,分离筛选出主要微生物,了解自贡冷吃兔加工生产过程中细菌污染状况及其分布情况,为确定关键控制点与污染源、规范操作流程,构建自贡冷吃兔污染微生物数据库提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与设备

采样于四川省自贡市某冷吃兔工厂。

主要试剂:PCA平板计数琼脂、Baird-Parker琼脂基础、MRS培养基、结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂(VRBGA)、LB培养基和亚蹄酸盐卵黄增菌液,购

于青岛海博生物技术有限公司;氯化钠(分析纯)购于上海源叶生物科技有限公司;甘油购于上海麦克林生化科技有限公司;1×TSE101金牌mix、TSINGKE高纯度低电渗琼脂糖、DNA凝胶回收试剂盒和DL5000 Marker购于Tsingke。

主要设备:HLD-30002电子天平,杭州友恒称重设备有限公司;DK-98-11万用电炉,北京科伟永兴仪器有限公司;LS-75HD立式压力蒸汽灭菌器,江阴滨江医疗设备有限公司;101-3AB数显恒温鼓风干燥箱,北京中兴伟业仪器有限公司;DZKW-D-2电热恒温水浴锅,上海科恒实业发展有限公司;Hws-250B恒温恒湿培养箱,天津市宏诺仪器有限公司;SW-CJ-2FD净化工作台,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;QYC-2102双层小容量全温恒温摇床,上海福玛实验设备有限公司;3730XL测序仪,Applied Biosystems;Legend Micro17离心机,Thermo;2720 thermal cycler PCR仪,Applied Biosystems;JY300C电泳仪、JYDF(定制)电泳槽、JY04S-3C凝胶成像仪,君意东方;DFD-700水浴锅,北京中兴伟业;L550板式离心机,cence湘仪。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 样品的采集

##### 1.2.1.1 采样方法

涂抹采样:用经杀菌后蘸有无菌生理盐水棉球擦拭取样框内表面(框内面积为50 cm<sup>2</sup>),擦完后将棉球放入盛有10 mL无菌生理盐水的试管中,此试管中溶液每1 mL代表5 cm<sup>2</sup>,密封带回微生物室备用<sup>[15]</sup>。

自然沉降法:参考GB/T 18204《公共场所卫生检验方法 第3部分:空气微生物》中自然沉降法进行采样<sup>[16]</sup>。

##### 1.2.1.2 采样位置

生产器具:主要针对生产中与冷吃兔半成品、成品有接触的器具,包括切刀、沥水器具、盛放器具、转移器具、摊凉器具、预煮机内壁、腌制机内壁、炸制机内壁、炒制机内壁,采用涂抹取样。

人员:宰切人员、预煮人员、腌制人员、炸制人员、包装人员,采用涂抹取样。

生产车间:原料处理间、辅料处理间、辅料储存间、炒制间、冷却间、包装间,采用自然沉降法。

#### 1.2.2 生产环境中细菌数量测定

参照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》<sup>[17]</sup>、GB 4789.35-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》<sup>[18]</sup>、GB 4789.41-2016《食品安全国家标准 食品微生物

物学检验 肠杆菌科检验》<sup>[19]</sup>和 GB 4789.10-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》<sup>[20]</sup>对原辅料进行菌落总数、乳酸菌数量、肠杆菌数数量、葡萄球菌数量测定,在无菌条件下,将取

样品悬液 10 倍梯度稀释,选取 3 个稀释度,分别接种至不同培养基,每个稀释度做 2 个重复,各种微生物选择培养基及其培养条件列于表 1。培养结束后,记录各种培养基上菌落数量。

表 1 细菌的培养条件

Table 1 Bacterial culture conditions

微生物	培养基	培养温度/°C	培养时间/h
菌落总数	平板计数琼脂 (PCA)	36±1	48
乳酸菌	MRS 培养基	36±1	72
肠杆菌	结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂 (VRBGA)	36±1	24
葡萄球菌	Baird-Parker 琼脂基础	36±1	48

表 2 冷吃兔生产车间菌落总数数量变化

Table 2 Changes in the total number of colonies in the cold-eating rabbit production workshop

采样地点	活菌数/(CFU/皿)				
	生产前 (0 h)	生产过程中 (0.5 h)	生产过程中 (1 h)	生产过程中 (1.5 h)	生产结束 (2 h)
辅料处理间	1±1.41	1±0.82	1±0.82	1±1.41	1±0.82
辅料储存间	1±1.41	2±0.82	1±0.82	/	1±0.82
原料处理间	3±1.6	18±2.44	22±1.6	14±0.82	4±0.82
炒制间	2±0.82	5±1.41	4±0.82	7±2.16	4±0.82
冷却间	/	1±1.41	1±0.82	1±0.82	2±11.41
内包装间	1±1.41	1±0.82	2±0.82	3±1.41	2±0.82

注:表中数值表示为平均值±标准偏差, /表示未检出。

### 1.2.3 生产环境中细菌的分离纯化

挑选菌落数量测定后菌落数量在 30~300 的培养基,观察菌落的颜色、大小、形态、边缘结构、隆起程度、光泽度及透明度等特征。挑选典型菌落,进行革兰氏染色,在显微镜下观察,并进行划线分离纯化,至少进行 3 次划线,直至得到纯化单菌落。挑取纯菌落于 LB 培养基中,过夜培养,加入终浓度为 20% 的甘油, -20 °C 保藏、备用。

### 1.2.4 细菌的分子鉴定

#### 1.2.4.1 扩增与测序

取 1 mL 保藏的菌液转接于 LB 培养基, 37 °C 过夜培养, 4 °C, 8000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 获得细菌菌体沉淀。采用 TSINGKE 植物 DNA 提取试剂盒(通用型)提取纯化菌株的 DNA, 以提取的 DNA 样品作为模版, 采用 16S rDNA 细菌通用引物 27F: 5' -AGT TTGATCMTGGCTCAG-3', 1492R: 5' -GGTTACCT TGTTACGACTT-3' 为引物, PCR 扩增反应体系为 25 μL: 上下游引物各 1 μL, 模版 2 μL, 10 μL 2×Tap Master Mix, 补 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL。反应程序为: 98 °C 预变性 2 min, 38 个循环 (98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 15 s), 72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 由北京擎科生物科技有限公司进行测序。

#### 1.2.4.2 序列比对分析

将返回的 16S rDNA 基因测序结果通过美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库对各菌株进行 Blast 相似序列检索, 选取同源性高的菌株序列 (≥99%), 以确定细菌种类。

#### 1.2.5 数据的处理

每组实验均进行 3 次及以上平行测定, 采用 Microsoft Excel 2016、SPSS Statistics 22 和 Origin 2019 对实验数据进行处理、统计和制图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 生产车间空气微生物数量变化

利用自然沉降法对冷吃兔生产车间(辅料处理间、辅料储存间、原料处理间、炒制间、冷却间、内包装间)进行微生物检测, 结果如表 2 所示。根据国家标准 GB/T 17093-1997《室内空气中细菌总数卫生标准》<sup>[21]</sup>, 对室内空气细菌总数做了限量规定, 采用自然沉降法的标准值为 ≤45 CFU/皿。在一个生产周期内, 辅料处理间、辅料储存间沉降细菌总数为 1 CFU/皿且基本不变, 原料处理间、炒制间、冷却间、内包装间的

微生物数量变化较大,原料处理间生产前(0 h)微生物沉降数目为 2.5 CFU/皿,在生产 1 h 后达到 22 CFU/皿,炒制间初始沉降数目为 2 CFU/皿,最高时为 7 CFU/皿,冷却间和内包装间微生物数量在加工中保持低值,各车间细菌沉降总数均远小于 $\leq 45$  CFU/皿,清洁程度高符合国家标准。人员的流动是车间微生物变化的重要原因,宰切原料时剧烈震动是原料处理间沉降菌数目变化的主要原因。

## 2.2 人员与生产器具细菌变化

在一个生产周期内,对冷吃兔生产工序中与半成品、成品有接触机会的各器具、设备和人员进行微生物监测,结果如表 3 所示。根据国家标准食品生产通用卫生规范及相关卫生操作程序,对生产过程中与食品接触的接触物表面菌落总数建议标准为:低于 50 CFU/cm<sup>2</sup> 为极满意水平,在 50~10<sup>4</sup> CFU/cm<sup>2</sup> 之间为可接受水平,高于 10<sup>4</sup> CFU/cm<sup>2</sup> 为不可接受水平<sup>[22,23]</sup>。据此,在生产加工前各人员和加工器具表面菌落总数均大于 10<sup>4</sup> CFU/cm<sup>2</sup>,经过生产之前清洗杀菌步骤,与冷吃兔加工过程有接触的宰切人员 1、宰切人员 2、预煮人员、腌制人员、炸制人员、炒制人员和沥水网的表面微生物菌落总数分别为 5.63 lg(CFU/cm<sup>2</sup>)、5.09 lg(CFU/cm<sup>2</sup>)、5.03 lg(CFU/cm<sup>2</sup>)、5.26 lg(CFU/cm<sup>2</sup>)、5.03 lg(CFU/cm<sup>2</sup>)、4.84 lg(CFU/cm<sup>2</sup>)、4.78

lg(CFU/cm<sup>2</sup>),仍处于 10<sup>4</sup> CFU/cm<sup>2</sup> 以上,疑似为冷吃兔成品中腐败细菌的主要来源。生产前后,冷吃兔生产人员、设备与器具分别进行消毒,能显著降低接触物表面细菌总数。在生产中,宰切、预煮、腌制人员手表面细菌总数均上升,炒制和炸制人员手表面细菌总数稍微下降,包装人员手表面细菌总数保持稳定,可能是宰切、预煮、腌制人员与原料兔肉接触紧密,炒制和炸制人员生产环境高,包装人员生产车间洁净且经过严格消毒环节。各生产器具接触表面细菌呈上升趋势,主要是原辅料接触形成交叉污染;设备接触表面细菌总数变化与加工温度变化相关。孟静<sup>[24]</sup>研究发现,在鸭肉制品生产过程中,车间空气、解冻水及所用器具接触面都是鸭肉制品潜在污染源,这与本研究结果一致。包装人员、解剖刀、切刀、转移器具、盛放容器和摊凉容器,在冷吃兔生产加工前执行严格的清洗或消毒环节,表面细菌总数均小于 10<sup>4</sup> CFU/cm<sup>2</sup>,符合清洁作业标准。预煮机内壁、卤制机内壁、炸制机内壁和炒制机内壁经清洗消毒,且在加工过程中温度维持 80 ℃ 以上,表面细菌得到良好控制,但其残存的细菌具备耐高温特点,极易成为冷吃兔腐败细菌的污染源。加工过程中,操作人员手表面菌落总数平均最高,可能是在操作过程中与兔肉、兔血等直接接触造成的,应当执行严格的生产卫生操作程序,并佩戴一次性手套,避免手与兔肉交叉污染。

表 3 冷吃兔生产操作人员及器具菌落总数数量变化

Table 3 Changes in total number of colonies of the production operators and utensils of cold-eating rabbits

采样地点	活菌数/lg(CFU/cm <sup>2</sup> )				
	生产前(0 h)	生产过程(0.5 h)	生产过程(1 h)	生产过程(1.5 h)	生产结束(2 h)
宰切人员	4.81±0.20	5.36±0.15	5.63±0.22	5.72±0.22	4.09±0.07
预煮人员	5.08±0.10	5.03±0.12	5.15±0.08	5.20±0.08	4.05±0.15
腌制人员	4.97±0.14	5.26±0.04	5.44±0.05	5.58±0.13	4.50±0.12
炸制人员	4.95±0.08	5.03±0.11	5.15±0.06	5.32±0.18	4.21±0.09
炒制人员	5.12±0.06	4.84±0.19	4.52±0.13	4.36±0.11	3.98±0.11
包装人员	4.42±0.10	0.66±0.16	0.90±0.13	0.94±0.14	1.14±0.10
预煮机内壁	6.56±0.08	2.57±0.14	3.16±0.09	3.69±0.11	3.80±0.12
卤制机内壁	6.92±0.09	2.77±0.19	3.16±0.09	3.33±0.15	3.26±0.08
炸制机内壁	6.43±0.11	0.49±0.13	/	/	/
炒制机内壁	6.28±0.12	1.57±0.09	1.58±0.16	1.30±0.21	1.10±0.13
解剖刀	6.72±0.05	3.79±0.12	5.47±0.10	5.76±0.10	4.41±0.17
切刀	6.04±0.09	3.05±0.08	4.61±0.11	4.66±0.13	2.96±0.19
沥水网	6.81±0.07	4.78±0.13	5.32±0.11	5.41±0.17	4.20±0.04
转移器具	5.65±0.13	2.51±0.14	2.01±0.09	1.61±0.19	1.45±0.10
盛放容器	4.54±0.08	2.91±0.12	2.79±0.14	2.93±0.23	3.96±0.12
摊凉容器	4.58±0.08	2.63±0.18	2.53±0.14	2.78±0.21	3.09±0.09

注:表中的数值表示为平均值±标准差,/表示未检出。

### 2.3 细菌生理形态特征分析

通过4种选择培养基对冷吃兔生产车间、人员以及各种加工设备的细菌进行稀释涂布筛选,至少3次平板划线得到单菌落,共分离到59株菌,选取数量占比大的菌株进行菌落形态特征描述,见表4。

### 2.4 16S rDNA PCR 扩增产物电泳图谱

对分离纯化得到的细菌单菌落采用试剂盒提取DNA片段,并用通用引物27F/1492R进行PCR扩增,通过1%琼脂糖凝胶电泳检测,选取其中部分菌株电泳图,如图1所示。

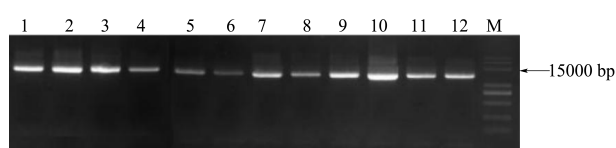


图1 部分菌株16S rDNA PCR 扩增产物电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis patterns of 16S rDNA PCR amplification products of some strains

注:“M”为DNA Maker;“1~12”分别代表编号R4、R8、R9、R10、R14、J5、J7、J10、FC1、C5、N1、N2的菌株。

如图1所示,均得到大约1500 bp的PCR扩增片段,条带明亮清晰,满足后续测序要求,随后送往北京擎科生物科技有限公司测序。

### 2.5 菌种鉴定结果

用ContigExpress拼接测序结果,并去除两端不准的部分,将拼接好的序列在NCBI数据库(blast.ncbi.nlm.nih.gov)中进行比对,选取同源性最高的菌株序列,结果如表5、6、7所示。

#### 2.5.1 生产车间空气中细菌

通过对车间微生物进行菌落总数测定,从琼脂平板中筛选特征菌落,分离纯化后送检测序鉴定,结果如表5所示。辅料储存与处理间相通,其空气中菌落组成相同,主要有巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)<sup>[25]</sup>、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)<sup>[26]</sup>两种菌构成。从原料处理间空气中共鉴定出5株菌,其中Z1、Z5属于嗜根考克氏菌(*Kocuria rhizophila*)<sup>[27]</sup>,Z2属于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)<sup>[28]</sup>,Z3属于法氏沃氏黄杆菌(*Wautersiella falsenii*)<sup>[29]</sup>,Z4属于碘短杆菌(*Brevibacterium iodinum*)<sup>[30]</sup>,与酸乳生产车间空气分离结果一致<sup>[31]</sup>。从冷吃兔炒制间空气中共鉴定出6株菌,其中1株浅绿气球菌(*Aerococcus viridans*)<sup>[32]</sup>,2株(C5、C6)鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)<sup>[33]</sup>,3株属于葡萄球菌属(*Staphylococcus*),C2被鉴定为科氏葡萄球菌(*Staphylococcus cohnii*)<sup>[34]</sup>、C3与C4被鉴定为腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*)<sup>[35]</sup>,这与刘卫德等的研究结果相似<sup>[36]</sup>。冷却间与内包间相通,筛选出2株菌,分别为N1解琼胶烂泥杆菌(*Macrocooccus goetzii*)<sup>[37]</sup>和弗氏志贺菌(*Shigella flexneri*)<sup>[38]</sup>。考克氏菌属、不动杆菌属、葡萄球菌属普遍存在于肉制品生产车间空气<sup>[24,39-41]</sup>。

表4 部分细菌的菌落特征与形态

Table 4 Colony characteristics and morphology of some bacteria

序号	菌株编号	形态	隆起度	颜色	光泽度	透明度	菌落大小/mm	革兰氏染色
1	R4	圆形	轻微凸起	淡白色	有光泽	半透明	3	G+
2	R8	圆形	轻微凸起	淡棕色	有光泽	半透明	2~3	G-
3	R9	圆形	轻微凸起	乳白色	有光泽	不透明	3	G-
4	R10	米粒状	/	白色	无光泽	不透明	/	G-
5	R14	圆形	扁平	黄色	无光泽	不透明	1	G+
6	J5	圆形	中间镂空	白色	有光泽	半透明	3	G-
7	J7	圆形	中间凹陷	不透明	淡黄色	不透明	2~3	G-
8	J10	圆形	轻微凸起	乳白色	有光泽	不透明	4	G-
9	FC1	圆形	轻微凸起	淡黄色	有光泽	不透明	1~2	G+
10	C5	圆形	凸起	淡白色	半透明	不透明	1	G-
11	N1	圆形	轻微凸起	中间棕色,边缘淡白色	有光泽	半透明	2	G-
12	N2	圆形	轻微凸起	棕黄色	有光泽	不透明	1	G-

注:菌株编号大写字母表示菌株来源,R为生产人员,J为生产器具,FC为辅料储存与处理间,C为炒制间,N为冷却间与内包间。

表5 生产车间空气中细菌鉴定结果

Table 5 Bacteria identification results in the air of the production workshop

菌株编号	序列长度/bp	Genbank 最高相似菌种 (登录号)	中文名称	相似度/%
FC1	1342	<i>Bacillus megaterium</i> (MN830159.1)	巨大芽孢杆菌	99
FC2	1312	<i>Bacillus licheniformis</i> (MK859971.1)	地衣芽孢杆菌	99
Z1	1300	<i>Kocuria rhizophila</i> (MT377849.1)	嗜根考克氏菌	100
Z2	1331	<i>Bacillus subtilis</i> (MT605412.1)	枯草芽孢杆菌	100
Z3	1312	<i>Wautersiella falsenii</i> (AM238681.1)	法氏沃氏黄杆菌	99
Z4	1305	<i>Brevibacterium iodinum</i> (KY992559.1)	碘短杆菌	99
Z5	1317	<i>Kocuria rhizophila</i> (MK465368.1)	嗜根考克氏菌	99
C1	1324	<i>Aerococcus viridans</i> (MN932266.1)	浅绿气球菌	99
C2	1357	<i>Staphylococcus cohnii</i> (MT235755.1)	科氏葡萄球菌	100
C3	1332	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (MH396752)	腐生葡萄球菌	100
C4	1347	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (MH396752.1)	腐生葡萄球菌	99
C5	1350	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (MF988732.1)	鲁氏不动杆菌	99
C6	1346	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (KF836535.1)	鲁氏不动杆菌	99
N1	1355	<i>Macrococcus goetzii</i> (MH044690.1)	解琼胶烂泥杆菌	100
N2	1345	<i>Shigella flexneri</i> (MN746200.1)	弗氏志贺菌	100

注: 菌株编号大写字母表示菌株来源, J 为生产器具, FC 为辅料储存与处理间, C 为炒制间, N 为冷却间与内包间。

表6 生产器具表面细菌鉴定结果

Table 6 Identification results of bacteria on the surface of production equipment

菌株编号	序列长度/bp	Genbank 最高相似菌种 (登录号)	中文名称	相似度/%
J1	1356	<i>Exiguobacterium indicum</i> (MT214231.1)	菊微小杆菌	100
J2	1299	<i>Acinetobacter</i> sp (MK789746.1)	不动杆菌	100
J3	1305	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (MK439529.1)	约氏不动杆菌	99
J4	1313	<i>Acinetobacter</i> sp (KX955254.1)	不动杆菌	100
J5	1341	<i>Pseudomonas</i> sp (JX997891.1)	假单胞菌	99
J6	1308	<i>Wautersiella</i> sp (JQ359100.1)	沃氏菌	99
J7	1313	<i>Wautersiella falsenii</i> (JX100832.1)	法氏沃氏黄杆菌	99
J8	1347	<i>Shewanella xiamenensis</i> (KX271664.1)	厦门希瓦氏菌	100
J9	1336	<i>Aeromonas salmonicida</i> (MT576565.1)	杀鲑气单胞菌	99
J10	1342	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (KC790277.1)	约氏不动杆菌	99
J11	1310	<i>Citrobacter murlinae</i> (KU161313.1)	穆氏柠檬酸杆菌	99
J12	1307	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (KF831405.1)	约氏不动杆菌	99
J13	1346	<i>Pantoea agglomerans</i> (KU922326.1)	成团泛菌	99
J14	1342	<i>Pseudomonas fragi</i> (KT767885.1)	莓实假单胞菌	100
J15	1316	<i>Macrococcus caseolyticus</i> (MG722794.1)	溶酪大球菌	100
J16	1306	<i>Kluyvera cryocrescens</i> (MK047301.1)	栖冷克品沃尔氏菌	100
J17	1357	<i>Acinetobacter bouvetii</i> (JX867756.1)	包氏不动杆菌	99

注: 菌株编号大写字母表示菌株来源, J 为生产器具。

## 2.5.2 生产器具表面细菌

各生产器具表面细菌种类组成相似性, 可能存在交叉污染, 如表6所示, 从生产器具表面共分离到17株菌, 分布于10个属, 其中不动杆菌属(*Acinetobacter*) 6株, J2、J4为不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)<sup>[42]</sup>, J3、

J10与J12为约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*)<sup>[43]</sup>, J17为包氏不动杆菌(*Acinetobacter bouvetii*)<sup>[44]</sup>; 2株假单胞菌属(*Pseudomonas*), J5为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)<sup>[45]</sup>、J14为莓实假单胞菌(*Pseudomonas fragi*)<sup>[46]</sup>; 2株属于沃氏菌属

(*Wautersiella*), J6 为沃氏菌 (*Wautersiella* sp.), J7 为法氏沃氏黄杆菌 (*Wautersiella falsenii*)<sup>[29]</sup>; 其余 7 株为别是: J1 是菊微小杆菌 (*Exiguobacterium indicum*)<sup>[47]</sup>、J8 厦门希瓦氏菌 (*Shewanella xiamenensis*)<sup>[48]</sup>、J9 杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*)<sup>[49]</sup>、J11 穆氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter murlinae*)<sup>[50]</sup>、J13 成团

泛菌 (*Pantoea agglomerans*)<sup>[51]</sup>、J15 溶酪大球菌 (*Macrococcus caseolyticus*)<sup>[52]</sup>、J16 栖冷克品沃尔氏菌 (*Kluyvera cryocrescens*)<sup>[53]</sup>。主要菌属为不动杆菌属, 与柴艳兵研究结果一致<sup>[31]</sup>, 假单胞菌属、气单胞菌属等常见于肉制品加工设备表面, 也是冷却肉的重要腐败菌<sup>[54-55]</sup>。

表 7 生产人员手表面细菌鉴定结果

Table 7 Identification results of bacteria on the hand surface of production personnel

菌株编号	序列长度/bp	Genbank 最高相似菌种 (登录号)	中文名称	相似度/%
R1	1373	<i>Shewanella xiamenensis</i> (MN216251.1)	厦门希瓦氏菌	100
R2	1365	<i>Serratia liquefaciens</i> (MF083085.1)	液化沙雷氏菌	99
R3	1341	<i>Aeromonas caviae</i> (JF920485.1)	豚鼠气单胞菌	100
R4	1343	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (MT539735.1)	溶血葡萄球菌	100
R5	1341	<i>Serratia quinivorans</i> (MK883139.1)	食奎尼酸沙雷氏菌	99
R6	1354	<i>Aeromonas hydrophila</i> (MG428739.1)	嗜水气单胞菌	99
R7	1367	<i>Kurthia gibsonii</i> (MN758867.1)	吉氏库特氏菌	100
R8	1324	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> (MN889340.1)	耐冷假单胞菌	100
R9	1302	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (MK548500.1)	约氏不动杆菌	100
R10	1329	<i>Aeromonas media</i> (CP038443.1)	中间气单胞菌	100
R11	1351	<i>Pseudomonas entomophila</i> (MF083046.1)	喜昆虫假单胞菌	100
R12	1313	<i>Acinetobacter</i> sp (MN830151.1)	不动杆菌	100
R13	1359	<i>Kurthia zopfii</i> (MK253317.1)	佐氏库特氏菌	99
R14	1360	<i>Exiguobacterium</i> sp (MK415037.1)	微小杆菌	99
R15	1358	<i>Exiguobacterium indicum</i> (MT367825.1)	菊微小杆菌	100
R16	1282	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (MN216260.1)	约氏不动杆菌	99
R17	1274	<i>Pseudomonas lundensis</i> (MN746219.1)	隆德假单胞菌	99
R18	1304	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (MN220559.1)	约氏不动杆菌	99
R19	1269	<i>Aeromonas rivipollensis</i> (MN216272.1)	河流气单胞菌	100
R20	1327	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (KC790277.1)	约氏不动杆菌	99
R21	1302	<i>Leclercia adecarboxylata</i> (MT133354.1)	非脱羧勒克氏菌	99
R22	1290	<i>Pseudomonas fulva</i> (MG836000.1)	副黄假单胞菌	100
R23	1314	<i>Salmonella enterica</i> (KY616651.1)	肠道沙门氏菌	99
R24	1343	<i>Exiguobacterium indicum</i> (KR233792.1)	菊微小杆菌	99
R25	1284	<i>Acinetobacter</i> sp (KT767793.1)	不动杆菌	100
R26	1335	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (MN197857.1)	约氏不动杆菌	99
R27	1284	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> (KX817287.1)	溶血不动杆菌	100
R28	1306	<i>Aeromonas media</i> (MK656347.1)	中间气单胞菌	100
R29	1327	<i>Wautersiella falsenii</i> (AM238678.1)	法氏沃氏黄杆菌	99

注: 菌株编号大写字母表示菌株来源, R 为生产人员。

### 2.5.3 生产人员手表面细菌

冷吃兔生产车间人员流动大, 生产人员手表面细菌菌群结构相似, 从生产人员手表面共筛选出 29 株菌, 如表 7 所示。其中 8 株属于不动杆菌属 (*Acinetobacter*), R9、R16、R18、R20 与 R26 为约氏不动杆菌 (*Acinetobacter johnsonii*)<sup>[43]</sup>, R12、R25

为不动杆菌 (*Acinetobacter* sp.)<sup>[42]</sup>, R27 为溶血不动杆菌 (*Acinetobacter haemolyticus*)<sup>[56]</sup>; 5 株属于气单胞菌属 (*Aeromonas*), R10、R28 为中间气单胞菌 (*Aeromonas media*)<sup>[57]</sup>, R3 为豚鼠气单胞菌 (*Aeromonas caviae*)<sup>[58]</sup>, R6 为嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)<sup>[59]</sup>, R19 为河流气单胞菌

(*Aeromonas rivipollensis*)<sup>[60]</sup>; 4 株属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*), R8 为耐冷假单胞菌 (*Pseudomonas psychrotolerans*)<sup>[61]</sup>, R11 为喜昆虫假单胞菌 (*Pseudomonas entomophila*)<sup>[62]</sup>, R17 为隆德假单胞菌 (*Pseudomonas lundensis*)<sup>[63]</sup>, R22 为副黄假单胞菌 (*Pseudomonas fulva*); 3 株微小杆菌属 (*Exiguobacterium*), R14 为微小杆菌 (*Exiguobacterium sp.*)<sup>[64]</sup>, R15、R24 为菊微小杆菌 (*Exiguobacterium indicum*)<sup>[47]</sup>; 2 株属于库特氏菌 (*Kurthia*)<sup>[65]</sup>, 分别为 R7 吉氏库特氏菌 (*Kurthia gibsonii*)<sup>[66]</sup>、R13 佐氏库特氏菌 (*Kurthia zopfii*)<sup>[67]</sup>; 2 株属于沙雷氏菌属 (*Serratia*), 分别为 R2 液化沙雷氏菌 (*Serratia liquefaciens*)<sup>[68]</sup>、R5 食奎尼酸沙雷氏菌 (*Serratia quinivorans*)<sup>[69]</sup>; 其余分别为 R1 厦门希瓦氏菌 (*Shewanella xiamenensis*)<sup>[49]</sup>、R4 溶血葡萄球菌 (*Staphylococcus haemolyticus*)<sup>[70]</sup>、R21 非脱羧勒

克氏菌 (*Leclercia adecarboxylata*)<sup>[71]</sup>、R23 肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)<sup>[72]</sup>、R29 法氏沃氏黄杆菌 (*Wautersiella falsenii*)<sup>[29]</sup>。其他研究表明<sup>[73-77]</sup>, 葡萄球菌属是操作人员手表面的主要微生物, 与本文研究差异性较大, 可能是由于冷吃兔生产加工人员在生产前消毒不彻底, 且加工过程未佩戴手套, 与加工器具、原料等交叉污染。

#### 2.5.4 腐败冷吃兔中的细菌

从腐败终点样品 (25 °C 贮藏至产生气泡、胀袋) 共筛选 16 株菌, 分属于 3 个属, 11 株 (FB-1、FB-2、FB-4、FB-6、FB-7、FB-8、FB-9、FB-12、FB-14、FB-15、FB-16) 表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)<sup>[78]</sup>、1 株 (FB-5) 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)<sup>[79]</sup>、1 株 (FB-3) *Rummeliibacillus stabekisii*<sup>[80]</sup>、2 株 (FB-10、FB-11) *Bacillus paralicheniformis*<sup>[81]</sup>、1 株 (FB-13) 蔬菜芽孢杆菌 (*Bacillus oleronius*)<sup>[82]</sup>。

表 8 腐败冷吃兔中细菌鉴定结果

Table 8 Bacteria identification results in spoilage Leng-Chi rabbit

菌株号	Genbank 最高相似菌种 (登录号)	中文名称	相似度/%
FB-1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT585523.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT604781.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-3	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i> (MT585557.1)	-	100
FB-4	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT613456.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-5	<i>Bacillus licheniformis</i> (MT534569.1)	地衣芽孢杆菌	100
FB-6	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT409907.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-7	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT581477.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-8	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT613456.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-9	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT505647.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-10	<i>Bacillus paralicheniformis</i> (MT065812.1)	-	100
FB-11	<i>Bacillus paralicheniformis</i> (MT459810.1)	-	100
FB-12	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT613456.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-13	<i>Bacillus oleronius</i> (KY773585.1)	蔬菜芽孢杆菌	100
FB-14	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (KT719989.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-15	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MT585400.1)	表皮葡萄球菌	100
FB-16	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MF429180.1)	表皮葡萄球菌	100

注: 菌株编号大写字母表示菌株来源, FB 为腐败冷吃兔。

## 2.6 腐败细菌与生产环境细菌同源性分析

将从腐败冷吃兔筛选得到的 16 株腐败菌和生产环境中细菌进行多序列比对, 采用 NJ 法构建系统发育树, 去除低置信度分支, 结果如图 2 所示。样品中葡萄球菌属细菌与 R4、C2 和 C3 的同源性极高, 说明了加工人员与炒制间空气是葡萄球菌重要的污染源, 表皮葡萄球菌是人体皮肤表面的正常菌群, 可以推测可能是加工人员的操作和流动, 引起了葡萄球菌

属细菌的污染。腐败样品中 FB-5、FB-11 和 FB-13 与原料处理间 Z2 处于一个分支, 属于芽孢杆菌属细菌, 表明了原料处理间空气是样品中芽孢杆菌属细菌的重要来源, 可能是由于原料宰切剧烈, 与人员、空气形成交叉污染。由表 5、6、7 可知, 从生产环境中分离出 61 株菌, 分别属于 21 个属, 其中 16 株为不动杆菌属 (*Acinetobacter sp.*), 6 株属于气单胞菌属 (*Aeromonas sp.*), 6 株属于假单胞菌属 (*Pseudomonas sp.*), 4 株属于葡萄球菌属 (*Staphylococcus sp.*), 4 株



属于沃氏菌属 (*Wautersiella* sp.), 4 株微小杆菌属 (*Exiguobacterium* sp.), 2 株考克氏菌属 (*Kocuria* sp.), 2 株库特氏菌属 (*Kurthia* sp.), 2 株属于巨大球菌属 (*Macrococcus* sp.), 2 株希瓦氏菌 (*Shewanella* sp.), 2 株沙雷氏菌 (*Serratia* sp.), 其余分别为气球菌属 (*Aerococcus* sp.)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter* sp.)、泛菌属 (*Pantoea* sp.)、克吕沃尔氏菌属 (*Kluyvera* sp.)、志贺菌属 (*Shigella* sp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)、短杆菌属 (*Brevibacterium* sp.) 等。从冷吃兔生产环境的优势细菌以不动杆菌属、假单胞菌属、气单胞菌属、葡萄球菌属、沃氏菌属、微小杆菌属为主。不动杆菌属细菌广泛存在肉制品加工环境中, 属于非发酵条件致病菌, 是许多肉及其肉制品的重要腐败菌<sup>[83-86]</sup>。假单胞菌属是肉制品、乳制品、水产品等常见腐败菌<sup>[87-89]</sup>, 也是肉制品中常见的嗜冷腐败菌<sup>[90]</sup>。

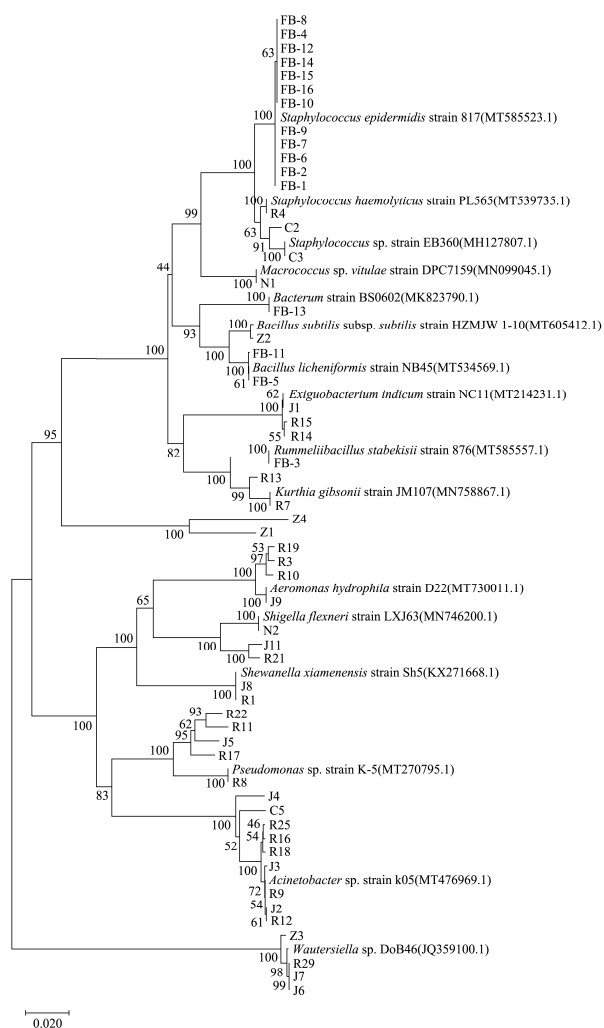


图 2 腐败细菌与生产环境细菌同源性系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of homology between spoilage bacteria and bacteria in production environment

### 3 结论

3.1 通过对生产加工环境中微生物进行检测, 分析生产车间空气、生产人员手以及与产品直接接触的设备器具表面微生物数量, 筛选分离出主要细菌, 发现冷吃兔辅料处理间、辅料储存间、炒制间、冷却间、内包装间的菌落总数在生产过程中变化较小, 原料处理间受人员操作影响变化较大。因此, 认为冷吃兔加工设备器具表面和人员手部是冷吃兔产品潜在的污染源。建议在生产之前严格要求生产人员做好消毒步骤, 正确佩戴无菌工作服、工作帽与手套, 严格做到生产前后对生产设备器具清洗、杀毒、灭菌。从分离结果来看, 从生产环境中共分离出 61 株菌, 分别属于 21 个属, 其中生产车间空气、生产人员、设备与器具均检出不动杆菌属细菌, 表明不动杆菌属在冷吃兔生产环境中分布广泛, 其次为气单胞菌属、假单胞菌属和葡萄球菌属。真空包装冷吃兔腐败样品中芽孢杆菌属细菌主要来源于各生产车间空气微生物, 葡萄球菌属细菌主要来源于炒制人员以及炒制间空气微生物。

3.2 本研究确定生产环境中细菌的主要种属, 建立潜在污染细菌库, 为完善溯源系统和 HACCP 体系提供了理论基础。为健全体系, 还需探明原辅料中的食源性致病细菌、原料库房的最优储存条件、最优防腐工艺和杀菌工艺, 来提高自贡冷吃兔的食用安全性, 为传统的冷吃兔生产提供保障。

### 参考文献

[1] 四川牧天食品有限公司.冷吃兔的制备方法:CN 201410204534.6[P].2014-07-23  
Sichuan Mutian Food Co., Ltd. Preparation method of cold eating rabbit: CN201410204534.6 [P]. 2014-07-23

[2] 罗焱,钟世荣,袁先铃,等.自贡冷吃肉制品研究现状与存在问题解析[J].中国调味品,2021,46(5):185-188  
LUO Yi, ZHONG Shirong, YUAN Xianling, et al. Analysis of research status and existing problems of Zigong cold meat products [J]. China Condiment, 2021, 46(5): 185-188

[3] Marco Cullere, Antonella Dalle Zotte. Rabbit meat production and consumption: state of knowledge and future perspectives [J]. Meat Science, 2018, 143: 137-146

[4] 李韬,袁先铃,于跃,等.不同品种兔肉营养成分与质构比较研究[J].肉类研究,2020,34(5):6-10  
LI Tao, YUAN Xianling, YU Yue, et al. Comparative study of nutritional composition and texture of meat from different rabbit breeds [J]. Meat Research, 2020, 34(5): 6-10

[5] A V Antipov, Antipov A V, Prantsuz O S, et al. Methods of storing rabbit meat to ensure functional nutrition [J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2020,

- 548(7): 6
- [6] 王航,杨智玲,鞠荣华.世界兔产业的发展现状及展望[J].中国养兔,2017,5:13-15  
WANG Hang, YANG Zhiling, JU Ronghua. Development status and prospect of world rabbit industry [J]. Chinese Journal of Rabbit Farming, 2017, 5: 13-15
- [7] 自贡市地方志办.自贡年鉴[DB/OL].<http://www.zg.gov.cn/zh/web/sdfzb/-88/-/articles/12859892.shtml>  
Zigong local chronicles office. Zigong Yearbook [DB/OL]. <http://www.zg.gov.cn/zh/web/sdfzb/-88/-/articles/12859892.shtml>
- [8] 自贡市地方志办.麻辣鲜香、回味悠长的自贡冷吃[OL].(2019).<http://www.zg.cn/web/sdfzb/-86/-/articles/9927903.shtml>  
Local chronicles of Zigong city. Zigong cold eating rabbit with spicy, delicious and long aftertaste [OL]. (2019). <http://www.zg.cn/web/sdfzb/-86/-/articles/9927903.shtml>
- [9] De Oliveira Mota Juliana, Boué Géraldine, Prévost Hervé, et al. Environmental monitoring program to support food microbiological safety and quality in food industries: a scoping review of the research and guidelines [J]. Food Control, 2021, 130: 108283
- [10] 甯雨莽,田靛,袁先铃,等.市售笋子烧牛肉中优势腐败菌的分离与鉴定[J].农产品加工(下半月),2021,4:51-55  
NING Yuqiao, TIAN Liang, YUAN Xianling, et al. Identification of dominant spoilage bacteria in bamboo shoots and beef [J]. AEM Roducts Rocessing, 2021, 4: 51-55
- [11] 肖欢,曹宏,翟建青,等.地方特色卤鸭掌优势腐败菌的鉴定[J].核农学报,2017,31(1):66-72  
XIAO Huan, CAO Hong, ZHAI Jianqing, et al. The identification to the dominant spoilage organisms on bitter duck paws with local flavor [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2017, 31(1): 66-72
- [12] Yi Langbo, Guirong Su, Guang Hu, et al. Diversity study of microbial community in bacon using metagenomic analysis [J]. Journal of Food Safety, 2017, 37(3): e12334
- [13] 李冉,朱和源,叶可萍,等.气调包装狮子头冷藏过程中微生物变化及菌群结构分析[J].食品工业科技,2020,11:99-105  
LI Ran, ZHU Heyuan, YE Keping, et al. Analysis of microbial counts and bacterial community in modified atmosphere packaging meatballs [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 11: 99-105
- [14] 图尔荪阿依·图尔贡,葛达娥,潘建林,等.香辣蟹中特征性腐败菌的分离鉴定以及香料的抑制作用研究[J].食品安全质量检测学报,2019,10(9):2539-2544  
TURSUNAY Turgun, GE Dae, PAN Jianlin, et al. Isolation and identification of specific spoilage bacteria in spicy crab and antibacterial evaluation of spices [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(9): 2539-2544
- [15] 梁雅洁.发酵乳中微生物溯源技术的研究与应用[D].大连:大连工业大学,2014  
LIANG Yajie. Research and Application of Microbial Sourcetracking in Fermented Milk [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2014
- [16] GBT 18204.3-2013.公共场所卫生检验方法 第3部分:空气微生物[S]  
GBT 18204.3-2013. Hygienic Inspection Methods for Public Places Part 3: Air Microorganism [S]
- [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 Standard for Food Safety Microbiological Examination of Food Determination of Total Bacterial Count [S]
- [18] GB 4789.35-2016.食品安全国家标准 食品微生物学检验乳酸菌检验[S]  
GB 4789.35-2016. National Standard for Food Safety Microbiological Examination of Food Examination of Lactic Acid Bacteria [S]
- [19] GB 4789.3-2016.食品安全国家标准 食品微生物学检验肠杆菌科检验[S]  
GB 4789.3-2016. National Standard for Food Safety Microbiological Examination of Food Enterobacteriaceae [S]
- [20] GB 4789.10-2016.食品安全国家标准 食品微生物学检验金黄色葡萄球菌检验[S].  
GB 4789.10-2016. National Standard for Food Safety Microbiological Examination of Food Examination of *Staphylococcus aureus* [S]
- [21] GB/T 17093-1997.室内空气中细菌总数卫生标准[S]  
GB/T 17093-1997. Hygienic Standard for Total Number of Bacteria in Indoor Air [S]
- [22] 于小乔.屠宰和分割工序对真空包装冷却牛肉贮藏过程微生物多样性的影响[D].泰安:山东农业大学,2012  
YU Xiaoqiao. Effect of microbial contamination conditions of slaughtering and splitting process on microbial diversity of chilled vacuum-packaged beef during storage [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2012
- [23] G-L Nortjé, Nel L, Jordaan E, et al. A quantitative survey of a meat production chain to determine the microbial profile of the final product [J]. Journal of Food Protection, 1990, 53(5): 411-417

- [24] 孟静. 鸭肉制品生产过程中微生物污染分析及复合防腐剂保鲜研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2016  
MENG Jing. Analysis of microbial contamination sources and study on preservation in the processing of duck products [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2016
- [25] 方春玉, 吕枫, 赵兴秀, 等. 1株巨大芽孢杆菌特性、解磷条件研究及其应用初探[J]. 环境科学与技术, 2021, 44(3): 16-22  
FANG Chunyu, LYU Feng, ZHAO Xingxiu, et al. Research on the growth characteristics, phosphate-solubilizing conditions and application of a strain *Bacillus megaterium* [J]. Environmental Science & Technology, 2021, 44(3): 16-22
- [26] 布帕提买木·麦麦提, 潘姣姣, 阿迪莱·卡哈曼, 等. 地衣芽孢杆菌的分离和鉴定[J]. 农业与技术, 2020, 40(17): 14-18  
BUPATI Maemumaimaiti, FAN Jiaojiao, Adilai Kahaman, et al. Isolation and identification of *Bacillus licheniformis* [J]. Agriculture and Technology, 2020, 40(17): 14-18
- [27] Pierron A, Zayet S, Toko L, et al. Catheter-related bacteremia with endocarditis caused by *Kocuria rhizophila* [J]. Médecine et Maladies Infectieuses, 2021, 51(1): 97-98
- [28] XU Yinglei, YU Yang, SHEN Yuanyuan, et al. Effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunity, short chain fatty acid production, antioxidant capacity, and cecal microflora in broilers [J]. Poultry Science, 2021, 100(9): 101358
- [29] Cesira Giordano, Margherita Falleni, Anna-Lisa Capria, et al. First report of *Wautersiella falsenii* genomovar 2 isolated from the respiratory tract of an immunosuppressed man [J]. IDCases, 2016, 4: 27-29
- [30] S Antoniou, A Dimitriadis, F Polydorou, et al. *Brevibacterium iodinum* peritonitis associated with acute urticaria in a CAPD patient [J]. Peritoneal Dialysis International, 1997, 17(6): 614-615
- [31] 柴艳兵, 岳田利, 李兴佳, 等. 酸乳生产中微生物分布图谱的建立[J]. 食品科技, 2015, 40(11): 2-8  
CHAI Yanbing, YUE Tianli, LI Xingjia, et al. Establishment of the microbial distribution spectrum in yogurt producing process [J]. Food Science and Technology, 2015, 40(11): 2-8
- [32] Nguyen Van Giap, Kim Cheong Ung, Do Hai Quynh, et al. Characteristics of *Aerococcus viridans* isolated from porcine fetuses in Korean farms [J]. Veterinary Medicine and Science, 2021, 7(4): 1325-1331
- [33] Kulkarni Grishma, Challa Jaswanth. The first Indian viridescant *Acinetobacter lwoffii* [J]. Indian Journal of Medical Microbiology, 2021, 39(1): 130-132
- [34] Liene Tobias, Schnitt Arne, Hammerl Jens Andre, et al. Multidrug-resistant *Staphylococcus cohnii* and *Staphylococcus urealyticus* isolates from German dairy farms exhibit resistance to beta-lactam antibiotics and divergent penicillin-binding proteins [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 6075
- [35] Lawal Opeyemi U, Barata Marta, Fraqueza Maria J, et al. *Staphylococcus saprophyticus* from clinical and environmental origins have distinct biofilm composition [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 663768
- [36] 刘卫德, 刘绪平, 熊骏, 等. 无菌药品生产洁净车间环境菌鉴定与溯源分析[J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50(11): 1335-1340  
LIU Weide, LIU Xuping, XIONG Jun, et al. Identification and traceability analysis of environmental bacteria in clean room of sterile drug manufacturing [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2019, 50(11): 1335-1340
- [37] Mazhar Shahneela, Altermann Eric, Hill Colin, et al. Draft Genome Sequences of *Macrocooccus caseolyticus*, *Macrocooccus canis*, *Macrocooccus bohemicus*, and *Macrocooccus goetzii* [J]. Microbiology Resource Announcements, 2019, 8(19): 10.1128
- [38] Elsherif Walaa M, Talaat A L Shrief Lamiaa M. Effects of three essential oils and their nano-emulsions on *Listeria monocytogenes* and *Shigella flexneri* in Egyptian Talaga cheese [J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 355(4): 109334
- [39] Xie Huadong, Lijun Bu, Zhengze Zhong, et al. Tracking microorganisms in production and sale operations of spiced geese [J]. Food and Nutrition Sciences, 2013, 4(9): 950-955
- [40] Li Xing, Xiuqiong Ou, Shaohong Jing, et al. Analysis on microbial flora changes during processing and storage of spiced goose based on PCR-DGGE combined with conventional microbial culture methods [J]. E3S Web of Conferences, 2020, 145: 01018
- [41] Diyantoro, Wardhana Dhandy-Koesoemo. Risk factors for bacterial contamination of bovine meat during slaughter in ten Indonesian abattoirs [J]. Veterinary Medicine International, 2019, 19: 2707064
- [42] Jerin Israt, Rahi Md Sifat, Sultan Tanjia, et al. Diesel degradation efficiency of *Enterobacter* sp., *Acinetobacter* sp., and *Cedecea* sp. isolated from petroleum waste dumping site: a bioremediation view point [J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(8): 5075-5084
- [43] Jia Jia, Guan Yongjing, Li Xiangju, et al. Phenotype profiles and adaptive preference of *Acinetobacter johnsonii* isolated

- from Ba River with different environmental backgrounds [J]. Environmental Research, 2021, 196(3): 110913
- [44] Reitz Zachary L, Butler Alison. Precursor-directed biosynthesis of catechol compounds in *Acinetobacter bouvetii* DSM 14964 [J]. Chemical Communications (Cambridge, England), 2020, 56: 12222-12225
- [45] Choi Okhee, Lee Yeyeong, Kang Byeongsam, et al. Bacterial blight on *Sansevieria cylindrica* caused by *Pseudomonas* sp [J]. Australasian Plant Disease Notes, 2021, 16(1): 23
- [46] WANG Guangyu, QING li, TANG Wenqian, et al. AprD is important for extracellular proteolytic activity, physicochemical properties and spoilage potential in meat-borne *Pseudomonas fragi* [J]. Food Control, 2021, 124(7): 107868
- [47] Shiyong Zhang, Cong Fan, Yunsheng Xia, et al. Characterization of a novel bacteriophage specific to *Exiguobacterium indicum* isolated from a plateau eutrophic lake [J]. Journal of Basic Microbiology, 2019, 59(2): 206-214
- [48] Leangapichart Thongpan, Hadjadj Linda, Gautret Philippe, et al. Comparative genomics of two *Shewanella xiamenensis* strains isolated from a pilgrim before and during travels to the Hajj [J]. Gut Pathogens, 2021, 13(1): 10.1186
- [49] 刘智鹏. 杀鲑气单胞菌的筛选及其细胞毒素的鉴定[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2020
- LIU Zhipeng. Screening of *Aeromonas salmonicida* and identification of its cytotoxin [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2020
- [50] Chen Yuhao, Brook Thomas C, Alcon-Giner Cristina, et al. Draft genome sequences of *Citrobacter freundii* and *Citrobacter murlinae* strains isolated from the feces of preterm infants [J]. Microbiology Resource Announcements, 2019, 8(33):
- [51] Mirtella Dora, Fedeli Piergiorgio, Scendoni Roberto, et al. A case of nosocomial outbreak of *Pantoea agglomerans* related to parenteral nutrition procedures [J]. Healthcare (Basel, Switzerland), 2021, 9(6):
- [52] Ramos G L P A, Vigoder H C, Nascimento J S. Technological applications of *Macrococcus caseolyticus* and its impact on food safety [J]. Current Microbiology, 2020: 11-16
- [53] KANG Xuemei, CAI Xue, LIU Zhiqiang, et al. Secretory expression and characterization of a novel amidase from *Kluyvera cryocrescens* in *Bacillus subtilis* [J]. Biotechnology Letters, 2020: 2367-2377
- [54] C Merritt, Angelini P, Wierbicki E, et al. Chemical changes associated with flavor in irradiated meat [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1975, 23(6): 1037-1041
- [55] J-E Harries. Problems associated with microbiological validation of sterilization by ionizing radiation [J]. Medical Device Technology, 1998, 9(6): 18-21
- [56] BAI Liang, ZHANG Shaocun, DENG Yong, et al. Comparative genomics analysis of *Acinetobacter haemolyticus* isolates from sputum samples of respiratory patients [J]. Genomics, 2020, 112(4): 2784-2793
- [57] 曾本和, 杨成年, 邱玉林, 等. 1株拉萨裸裂尻鱼源致病性中间气单胞菌的分离鉴定[J]. 水产科学, 2021, 40(4): 603-609
- ZENG Benhe, YANG Chengnian, QIU Yulin, et al. Identification of a pathogenic *Aeromonas media* isolated from *Schizopygopsis younghusbandi* [J]. Fisheries Science, 2021, 40(4): 603-609
- [58] 郭莹, 周淼, 李艳和, 等. 罗氏沼虾豚鼠气单胞菌的分离鉴定[J]. 中国农学通报, 2020, 36(33): 147-153
- GUO Ying, ZHOU Miao, LI Yanhe, et al. *Aeromonas caviae* from *Macrobrachium rosenbergii*: isolation and identification [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2020, 36(33): 147-153
- [59] Yu Jing, Ramanathan Srinivasan, Chen Liangchuan, et al. Comparative transcriptomic analysis reveals the molecular mechanisms related to oxytetracycline-resistance in strains of *Aeromonas hydrophila* [J]. Aquaculture Reports, 2021, 21: 100812
- [60] Elisabet Marti, José Luis Balcázar. *Aeromonas rivipollensis* sp. nov., a novel species isolated from aquatic samples [J]. Journal of Basic Microbiology, 2016, 55(12): 1435-1439
- [61] Elke Hauser, Peter Kämpfer, Hans-Jürgen Busse. *Pseudomonas psychrotolerans* sp. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(5): 1633-1637
- [62] LI Mengyi, MA Yueyuan, ZHANG Xu, et al. Tailor-made polyhydroxyalkanoates by reconstructing *Pseudomonas entomophila* [J]. Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.), 2021, 33(41): 2102766
- [63] 顾春涛, 洪小利, 王雅莹, 等. 顺反式肉桂醛对肉源隆德假单胞菌生物被膜和致腐性的抑制作用[A]. 中国食品科学技术学会. 中国食品科学技术学会第十六届年会暨第十届中国食品业高层论坛论文集摘要集[C]. 中国食品科学技术学会. 中国食品科学技术学会, 2019: 2
- GU Chuntao, HONG Xiaoli, WANG Yaying, et al. Effects of cis-trans cinnamaldehyde on biofilm and putricity of *Pseudomonas londri* from meat [A]. Chinese Institute of Food Science and Technology. Abstracts of the 16th Annual

- conference of Chinese Society of Food Science and Technology and the 10th Sino-US Food Industry Forum [C]// Chinese Institute of Food Science and Technology: Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019: 2
- [64] Cavanaugh Nicole T, Parthasarathy Anuthaman, Wong Narayan H, et al. *Exiguobacterium* sp. is endowed with antibiotic properties against Gram positive and negative bacteria [J]. BMC Research Notes, 2021, 14(1): 230
- [65] 高云航,王晓青,赵化丹,等.库特氏菌属细菌的研究进展[J].生物资源,2021,43(1):26-33  
GAO Yunhang, WANG Xiaoqing, ZHAO Huadan, et al. Research progress on the genus *Kurthia* [J]. Biotic Resources, 2021, 43(1): 26-33
- [66] Shaw Steven, Keddie Ronald M. A numerical taxonomic study of the genus *Kurthia* with a revised description of *Kurthia zopfii* and a description of *Kurthia gibsonii* sp. nov. [J]. Urban & Fischer, 1983, 4(2): 253-276
- [67] N V Cherevach, T P Tourova, V L Belikova. DNA-DNA homology studies among strains of *Kurthia zopfii* [J]. FEMS Microbiology Letters, 1983, 19(2-3): 243-245
- [68] Begrem Simon, Jérôme Marc, Leroi Françoise, et al. Genomic diversity of *Serratia proteamaculans* and *Serratia liquefaciens* predominant in seafood products and spoilage potential analyses [J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 354: 109326
- [69] Kevin E Ashelford, John C Fry, Mark J Bailey, Martin J Day. Characterization of *Serratia* isolates from soil, ecological implications and transfer of *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora* Grimont et al. 1983 to *Serratia quinivorans corrig.*, sp. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(6): 2281-2289
- [70] Eltwisy Hala O, Abdel Fattah Medhat, Elsisi Amani M, et al. Pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus* on primary human skin fibroblast cells [J]. Virulence, 2020, 11(1): 1142-1157
- [71] Garza González Elvira, Bocanegra Ibarias Paola, Rodríguez Noriega Eduardo, et al. Molecular investigation of an outbreak associated with total parenteral nutrition contaminated with NDM-producing *Leclercia adecarboxylata* [J]. BMC Infectious Diseases, 2021, 21(1): 235
- [72] 李玉莹.饮食(服务)行业从业人员肠道沙门氏菌检测结果分析[J].中国卫生产业,2015,12(12):25-26  
LI Yuying. Diet (service) detection and analysis of *Salmonella* industry practitioners [J]. China Health Industry, 2015, 12(12): 25-26
- [73] 梁荣蓉,张一敏,李飞燕,等.鸡肉调理制品生产过程中污染微生物的调查研究[J].食品科学,2010,31(5):274-278  
LIANG Rongrong, ZHANG Yimin, LI Feiyan, et al. Microbial survey during preparation processing of chicken products [J]. Food Science, 2010, 31(5): 274-278
- [74] 梁荣蓉.生鲜鸡肉调理制品菌群结构分析和货架期预测模型的研究[D].泰安:山东农业大学,2010  
LIANG Rongrong. Bacterial community and shelf-life predictive model of freshly prepared chicken products [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2010
- [75] 万红芳,赵勇,王正全,等.生产菌种及环境微生物与腐乳品质关系研究进展[J].食品与发酵工业,2019,45(6):255-261  
WAN Hongfang, ZHAO Yong, WANG Zhengquan, et al. Research progress on the relationship between production strains, environmental microorganisms and sufu quality [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(6): 255-261
- [76] 徐全华,王羿.无菌药品生产环境微生物的鉴定和种群分析[J].中国药事,2019,33(12):1411-1418  
XU Quanhua, WANG Yi. Identification and population analysis of microorganisms in sterile drug manufacturing environment [J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2019, 33(12): 1411-1418
- [77] 喻世哲,范熠,韩北忠,等.低盐腐乳生产过程及加工环境中的微生物分析[J].中国酿造,2017,36(12):18-22  
YU Shizhe, FAN Yi, HAN Beizhong, et al. Analysis of microorganism during the production and processing environment of low-salt sufu [J]. China Brewing, 2017, 36(12): 18-22
- [78] Curry Elyse C, Hart Ryan G, Habtu Danni Y, et al. Detection and partial characterization of extracellular inducers of persistence in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Medical Microbiology, 2021, 70(6): 10.1099
- [79] 于秀菊,韩小涛,李钰钰,等.地衣芽孢杆菌类细菌素的分离、鉴定及其原核表达[J].生物工程学报,2021,37(7):2453-2462  
YU Xiujun, HAN Xiaotao, LI Yuyu, et al. Isolation, identification and prokaryotic expression of a bacteriocin-like substance from *Bacillus licheniformis* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(7): 2453-2462
- [80] Tan Heng Yih, Chen Sai-Wei, Hu Shao-Yang. Improvements in the growth performance, immunity, disease resistance, and gut microbiota by the probiotic *Rummeliibacillus stabekisii* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 92: 265-275

- [81] Abdelgalil Soad A, Soliman Nadia A, AboZaid Gaber A, et al. Author correction: dynamic consolidated bioprocessing for innovative lab-scale production of bacterial alkaline phosphatase from *Bacillus paralicheniformis* strain APSO [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1)
- [82] Rodney Owusu-Darko, Mushal Allam, Arshad Ismail, et al. Comparative genome analysis of *Bacillus sporothermodurans* with its closest phylogenetic neighbor, *Bacillus oleronius*, and *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* groups [J]. Micro Organisms, 2020, 8(8): 1185
- [83] 张秋勤.生鲜鸡肉中腐败菌群体感应信号分子研究[D].南京:南京农业大学,2014  
ZHANG Qiuqin. Study on quorum-sensing signal of spoilage bacteria in raw chicken meat [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014
- [84] 赵丹丹,姜珊,彭玲玲,等.真菌发酵鱼糜中鲍式不动杆菌的腐败能力及其群体感应现象[J].中国食品学报,2018,18(9): 232-238  
ZHAO Dandan, JIANG Shan, PENG Lingling, et al. Spoilage ability and quorum sensing of *Acinetobacter abaloni* in fungal fermented surimi [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(9): 232-238
- [85] 朱素芹,张军宁,曾惠,等.凡纳滨对虾优势腐败菌鉴定及其致腐能力的初步研究[J].食品科技,2012,37(1):36-40  
ZHU Suqin, ZHANG Junning, ZENG Hui, et al. The identification and putrefaction potential of dominant spoilage bacteria in *Litopenaeus vannamei* [J]. Food Science and Technology, 2012, 37(1): 36-40
- [86] 史云娇,刘芳,孙芝兰,等.藏羊肉中优势腐败不动杆菌的分离鉴定及其生物膜形成特性[J].江苏农业学报,2019,35(1): 195-203  
SHI Yunjiao, LIU Fang, SUN Zhilan, et al. Isolation and identification of *Acinetobacter* in Tibetan mutton and the biofilm formation characteristics [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2019, 35(1): 195-203
- [87] 杜瑞,王柏辉,罗玉龙,等.应用 Illumina MiSeq 测序技术比较传统发酵乳、肉食品中细菌多样性[J].中国食品学报,2021, 21(2):269-277  
DU Ri, WANG Baihui, LUO Yulong, et al. Comparison of bacterial diversity in traditional fermented milk and meat foods by Illumina MiSeq sequencing [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(2): 269-277
- [88] P-Alves Maura, Rafael L-Salgado, Monique R-Eller, et al. Temperature modulates the production and activity of a metalloprotease from *Pseudomonas fluorescens* 07A in milk [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 101(2): 992-999
- [89] Wang Zhigang, Chunlong Wang, Yimin You, et al. Response of *Pseudomonas fluorescens* to dimethyl phthalate [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 167: 36-43
- [90] F-Mendes J, H H-A-Martins, C G-Otoni, et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Eugenia brejoensis* essential oil nanoemulsions against *Pseudomonas fluorescens* [J]. LWT, 2018, 93: 659-664

---

(上接第 111 页)

- [32] 李佳辉,黄艺潇,马声,等.405-nm LED对不锈钢片表面金黄色葡萄球菌生物被膜的清除作用[J/OL].现代食品科技,DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.0404  
LI Jiahui, HUANG Yixiao, MA Sheng, et al. The effect of 405-nm LED on the removal of *Staphylococcus aureus* biofilm on the surface of stainless steel [J]. Modern Food Science and Technology, DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.0404
- [33] 王硕,邓海潮,郭都,等.反式肉桂醛对副溶血性弧菌毒力因子的抑制作用[J].食品科学,2020,41(15):88-95  
WANG Shuo, DENG Haichao, GUO Du, et al. Anti-virulence effect of trans-cinnamaldehyde against *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Food Science, 2020, 41(15): 88-95
- [34] 綦国红,陈金辉,陈贵堂,等.肉桂提取物对铜绿假单胞菌生物膜产生的抑制作用研究[J].食品与生物技术学报,2018,37(8): 807-811  
QI Guohong, CHEN Jinhui, CHEN Guitang, et al. Inhibition of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by cinnamon extract [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(8): 807-811