

沙门氏菌在不同环境下辣椒中的存活情况

张宏梅, 尹小慧, 林育成, 姜燕

(广东工业大学轻工化工学院, 广东广州 510006)

摘要: 研究沙门氏菌在不同温度和水活度辣椒中的生存情况。采用稀释涂布法检测沙门氏菌 48 h 内在不同水活度辣椒粉中的生长情况, 及其能生长的最低水活度; 分析在高、低水活度以及不同温度下沙门氏菌长期存活情况; 利用扫描电镜及粘附强度实验观察沙门氏菌在高和低水活度辣椒块内外表皮粘附状况。结果表明 48 h 内各水活度沙门生长情况不同 ($p < 0.05$); 在测试的辣椒粉中, 最低能生长的水活度为 0.92 ± 0.01 ; 长期存活实验中, 沙门菌在 37°C 较 25°C 衰减得快, 高水活度较低水活度衰减得快, 最长存活时间为 25°C 低水活度下达到 70 d; 另外, 高水活度辣椒块内表皮粘附情况特别严重, 远大于外表皮。可见, 沙门一旦污染了辣椒粉, 其在辣椒中的长时间存活能力不可忽视, 并且与常规思维不同的是低温保存其实有可能会延长沙门的寿命, 从而带来食品安全隐患。而由于辣椒外表皮粘附情况没有内表皮严重, 提示辣椒干完整保存有利于保证食品安全。

关键词: 沙门氏菌; 辣椒; 水活度; 生存

文章编号: 1673-9078(2017)4-236-240

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.036

Survival of *Salmonella* in Red Pepper under Different Environmental Conditions

ZHANG Hong-mei, YIN Xiao-hui, LIN Yu-cheng, JIANG Yan

(Faculty of Light and Chemical, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The survival of *Salmonella* at different temperatures and water activity (a_w) levels was assessed in red pepper. The agar plate dilution method was used to detect the growth of *Salmonella* at different a_w levels in red pepper over 48 hours to determine the minimum a_w for growth. Scanning electron microscopy and adhesion strength tests were used to observe the adhesion ability of *Salmonella* to the inner and outer skins of red pepper at high and low a_w values. The results showed that the growth of *Salmonella* differed significantly at different a_w values in red pepper over 48 hours ($p < 0.05$). In the test on pepper powder, the a_w threshold for growth was determined as 0.92 ± 0.01 . In the long-term survival experiment, the rate of *Salmonella* population decline at 37°C was higher than that at 25°C , the decline rate at high a_w values was higher than that at low a_w values, and the maximum survival time of *Salmonella* at 25°C and low a_w value was 70 d. In addition, at high a_w value, the adhesion of *Salmonella* to the inner skin of pepper was more severe than that to the outer skin. Therefore, once pepper powder is contaminated with *Salmonella*, attention should be paid to the long-term survival capability of the bacteria. In addition, in contrast to conventional thinking, low-temperature storage can actually extend the life of *Salmonella*, thus increasing food safety risk. The fact that the adhesion of *Salmonella* on the outer skin was not as severe as that on the inner skin suggested that the preservation of complete peppers is beneficial to ensure food safety.

Key words: *Salmonella*; pepper; water activity; survival

以谷物类、坚果、巧克力、花生酱、调味料以及乳粉等为代表的低水活度食品, 含有较低的自由水, 具有较长的商品货架期和较强的耐储存能力, 也易于被判为非致病菌存留环境, 极易容易被使用人群忽略其安全性。辣椒是餐桌常见的一种可不经烹饪灭菌的调味料, 属于低水活度食品, 人们通常认为其不易存

收稿日期: 2016-03-10

基金项目: 广东省科技计划项目 (2016A010105021); 国家自然科学基金资助项目 (31301480)

作者简介: 张宏梅 (1975-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物

在或生长致病菌。然而, 近年辣椒、胡椒、谷物、花生油、巧克力和奶粉等低水活度食品^[1]因含致病菌引发疾病爆发事件却频繁增加, 耐低水活度的食源性致病菌和腐败菌被不断地发现。这使人们对低水活度食品中微生物存在有了新的认识, 虽然低水活度环境可以抑制微生物的生长和繁殖, 但部分微生物仍然可以存活数月甚至数年, 遇条件适合即可进行生长和繁殖, 给人类的健康和财产带来极大损失。

目前已经发现在低水活度环境生长的致病菌中, 沙门氏菌 (*Salmonella*) 是检出率最高的致病微生物之

一。沙门氏菌是一种革兰氏阴性病原菌,会引起人类细菌性肠胃炎,使人体出现发烧,头痛及腹泻等症状,损害人体的健康^[2],并且对干燥,高盐,冷冻等恶劣环境具有极强的耐受能力,是一种环境卫生与食品安全控制方面最为棘手的病原微生物。不仅如此,在低水分活度环境中生存的沙门氏菌与高水分活度环境的菌体相比,通常具有较强的耐高温特性以及对其他不良环境(如酸,消毒剂和辐射等)的耐受性^[3],在不影响这些食品的水分,感官和风味的前提下,几乎不可能将这些致病菌杀灭,这比高水活度食品中致病菌的控制措施更具挑战。目前,辣椒已逐渐发展成为世界消费量最大的调味品之一,中国作为全球最大的辣椒生产、消费和出口国。辣椒在生产、加工和储存各环节中都存在着沙门氏菌污染的风险,而且日常饮食过程中辣椒往往不经加热烹调,如果沙门氏菌在该产品中存留时间较长,在条件适宜的情况下可能存在致病菌生长的情况,成为产生极大的食品安全隐患。本文以辣椒为研究对象,分析在不同的条件下沙门氏菌的生存情况,探讨沙门氏菌在食品调味料中生长和长久存活的物理条件,为有效控制该病原微生物的在调味品等低水活度食品中的残留和生长提供一定的理论研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料、细菌与试剂

沙门氏菌 ATCC14028;胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)购自广东环凯微生物科技有限公司;胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)购自青岛海博生物技术有限公司;木糖赖氨酸脱氧胆酸钠培养基(XLD)购自青岛海博生物技术有限公司;氯化钠蛋白胨缓冲液(BPW)购自青岛海博生物技术有限公司;磷酸氢二钠购自广州化学试剂有限公司;磷酸二氢钠购自天津市科密欧有限公司;细辣椒粉(韩广和 A 级辣椒粉);辣椒块(四川小米椒)。

1.2 仪器与设备

AW-1 型智能水分活度测定仪(江苏无锡市碧波电子厂)。

1.3 方法

1.3.1 沙门氏菌的培养及辣椒的预处理

从-80℃冰箱中取5μL沙门氏菌接种于2mL、3%的TSB液体培养基中,在150r/min的恒温摇床中37℃培养24h,取100μL菌液涂布在TSA上37℃

培养24h,加1mL磷酸缓冲溶液(0.5M, pH7.0)到琼脂表面,用无菌涂布棒收集菌液到50mL的圆锥管中。一个培养皿大约可以收集到0.5mL约11logCFU/mL的菌液,待用。辣椒粉及辣椒块于121Pa高压灭菌锅里灭菌15min。

1.3.2 沙门氏菌在不同水活度中的生长情况

用磷酸缓冲溶液(0.5M, pH7.0)稀释菌液至5logCFU/mL左右。每个实验组含不同质量辣椒粉,加入无菌水,再加入100μL的菌液(菌液中的水也作为总水量的一部分),使最终辣椒粉和无菌水的比例为过量水、1:6、1:3、1:1、3:1,总质量为1g左右,其中过量水实验组是添加0.02g辣椒粉。水活度的检测方法按该仪器的说明书进行操作,菌体数量的检测方法参照文献^[4]并做适当改良,其中以BPW作为稀释溶液,用十倍稀释涂布法在TSA上涂布,使用XLD确定其为沙门氏菌(下同)。为模拟辣椒粉生产和储存情况及排除其他微生物影响,各样品盖紧盖子,于37℃恒温静置培养,0h、24h及48h时测定水活度与菌数量。以上全部设置3个平行组,每个平行组重复计数三次,取平均值(下同)。由于使用稀释涂布法测菌数量的时候,BPW等加入有可能导致细菌的生长繁殖,所以定义菌落数增加2Log为细菌生长(下同)。

1.3.3 沙门氏菌在辣椒粉中能生长的最低水活度

根据1.2.2的实验方法,使辣椒粉和无菌水的比例分别为1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1和2:1,37℃恒温静置培养5d后测定其水活度与菌体数量。

1.3.4 沙门氏菌在辣椒粉中的长期存活情况

取1g辣椒粉于无菌袋子中,每袋添加10μL约11logCFU/mL的菌液,混合均匀,此时菌浓度为9logCFU/g左右。分别设置高水活度组和低水活度组,为模拟平常生产及储存环境,低水活度实验组敞开袋子静置储存在25℃及37℃恒温培养箱中,高水活度实验组敞开袋子放入含有97%硫酸钾饱和溶液的密闭容器中,25℃及37℃静置恒温箱中培养。每隔一段时间测水活度和菌数量。

1.3.5 沙门氏菌于高水活度和低水活度辣椒块内外表皮扫描电镜及粘附强度实验

取初浓度约为7logCFU/mL的沙门菌接种于1×1cm大小高水活度(约为0.99)及低水活度(约为0.54±0.01)的辣椒块中25℃静置培养5d。

扫描电镜:用无菌的镊子取出,以适量PBS(0.1M, pH=7.3)轻柔冲洗以除去未黏附的细菌,3%戊二醛(PBS调配)固定,4℃冷冻后,PBS轻柔冲洗,梯度乙醇脱水,冷冻干燥1d,喷金后于15kV电压扫

描电镜放大 3000 倍观察沙门氏菌粘附情况。

粘附强度：取出辣椒块用 PBS (0.1 M, pH=7.3) 冲洗表面易脱落的细菌，采用稀释涂布法计算浮游菌数量，记为弱粘附菌。添加 1 mL PBS，超声波震荡辣椒块 30 min，使强粘附菌完全脱落，其数目记为强粘附菌。

$$\text{粘附强度}(\%) = \frac{\text{强粘附细菌}}{\text{强粘附细菌} + \text{弱粘附细菌}} \times 100^{[5]}$$

1.3.6 统计学 SPSS 22.0 分析

使用单因素方差对结果进行统计学分析， $p < 0.05$ 具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 沙门氏菌在不同水活度辣椒粉中的生长

情况

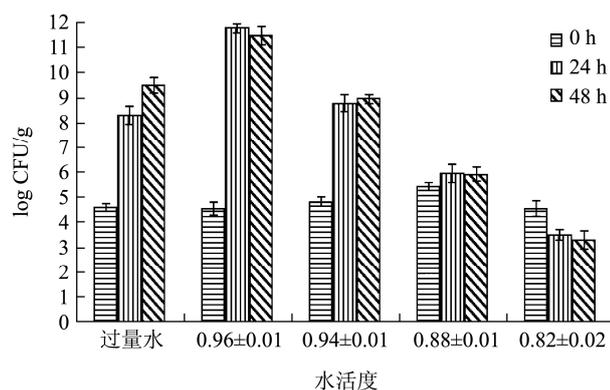


图 1 48 h 各水活度下生长情况

Fig.1 Growth of *Salmonella* at different a_w levels in red pepper over 48 hours

由于盖紧盖子，48 h 内水活度变化不大，均小于 0.02，但各水活度下沙门生长情况不同， $p < 0.05$ 。由图可见，水活度为 0.96 的实验组中沙门氏菌从初始浓度为 4.50 Log 左右生长到 48 h 的 11.50 Log，表明沙门在这个水活度下是生长的。虽以往有实验表明辣椒具有抑制作用^[6]，但其是单独把辣椒碱提取出来做抑菌实验的，而这里是整颗辣椒粉，营养物质为沙门氏菌的生长带来可能；过量水实验组从初浓度 4.60 Log 左右生长到 48 h 的 9.50 Log，菌生长量没有 0.96 水活度实验组的大，由于培养温度相同，水分均充足，产生这种情况的原因可能是辣椒提供的营养物质较 0.96 水活度实验组的少，不足以满足更多的细菌生长繁殖；由图可以看到水活度小于 0.96 的实验组其生长趋势变小，而水活度为 0.82 实验组的细菌不但没有生长趋势，并有死亡现象。原因是水对微生物的生长是必要的，

微生物需要在一定的水活度范围内进行生长^[7]。该部分实验说明在水分含量适合的情况下，沙门氏菌可以在辣椒粉中生长增殖。

2.2 沙门氏菌在辣椒粉中能生长的最低水活度

表 1 各水活度下沙门氏菌第 5 d 生长情况

Table 1 Growth of *Salmonella* at different a_w levels in red pepper after 5 d

辣椒粉/g:	初始水	初始菌浓度	第 5 d 菌浓度
水/mL	活度	/ (logCFU/g) (n=3)	/ (logCFU/g) (n=3)
1:6	0.96±0.01	4.52±0.08	9.22±0.18
1:5	0.95±0.01	5.13±0.06	8.94±0.10
1:4	0.95±0.01	5.30±0.06	8.52±0.18
1:3	0.94±0.01	4.83±0.10	8.22±0.15
1:2	0.92±0.01	4.52±0.14	6.70±0.20
1:1	0.88±0.01	5.43±0.10	3.30±0.21
2:1	0.85±0.02	5.22±0.08	2.60±0.17

实验测定了原料辣椒粉和水在不同比例组成中对应的样本水活度大小，同时也检测了在系列水活度样品中沙门氏菌的生长情况。结果表明，在实验测试的样品中沙门氏菌能生长的最低水活度为 0.92±0.01。此活度下的辣椒粉，其表面颜色及存在状态与低水活度辣椒粉相差不大，但是沙门氏菌可在此水活度进行生长繁殖，表明可能为致病菌提供良好水分的辣椒粉的表面状态并不会引起人们注意，存在极大的安全风险。另外，结果显示，沙门氏菌在水活度为 0.85 的实验组中培养 5 d 后也没有全部死亡，低剂量沙门氏菌的存在有可能带来安全隐患，具体的衰亡速率及存活时间由下一步实验进行研究。

2.3 沙门氏菌在辣椒粉中长期生存情况

在辣椒粉的长期储存实验中，设置了高低两个温度和两个水活度作为变量。高水活度实验组中，水活度渐渐升高，从 0.70 升到 0.90 左右，而低水活度组的水活度在 0.40~0.60 的范围内浮动。所有实验组沙门氏菌数量在前 20 d 内均有较大的下降趋势，37 °C 下降速度比 25 °C 的快 ($p=0$)，高水活度组比低水活度的快 ($p=0$)，然后均保持相对缓慢的下降趋势，最后 37 °C 与 25 °C 的高水活度组在 50 天时都检测不到菌的存在，低水活度 37 °C 实验组在 60 d 时检测不到菌存在，低水活度 25 °C 实验组在 80 d 时检测不到菌存在。即所有实验组里，低水活度 25 °C 实验组沙门的生存时间最长，至少达到 70 d。

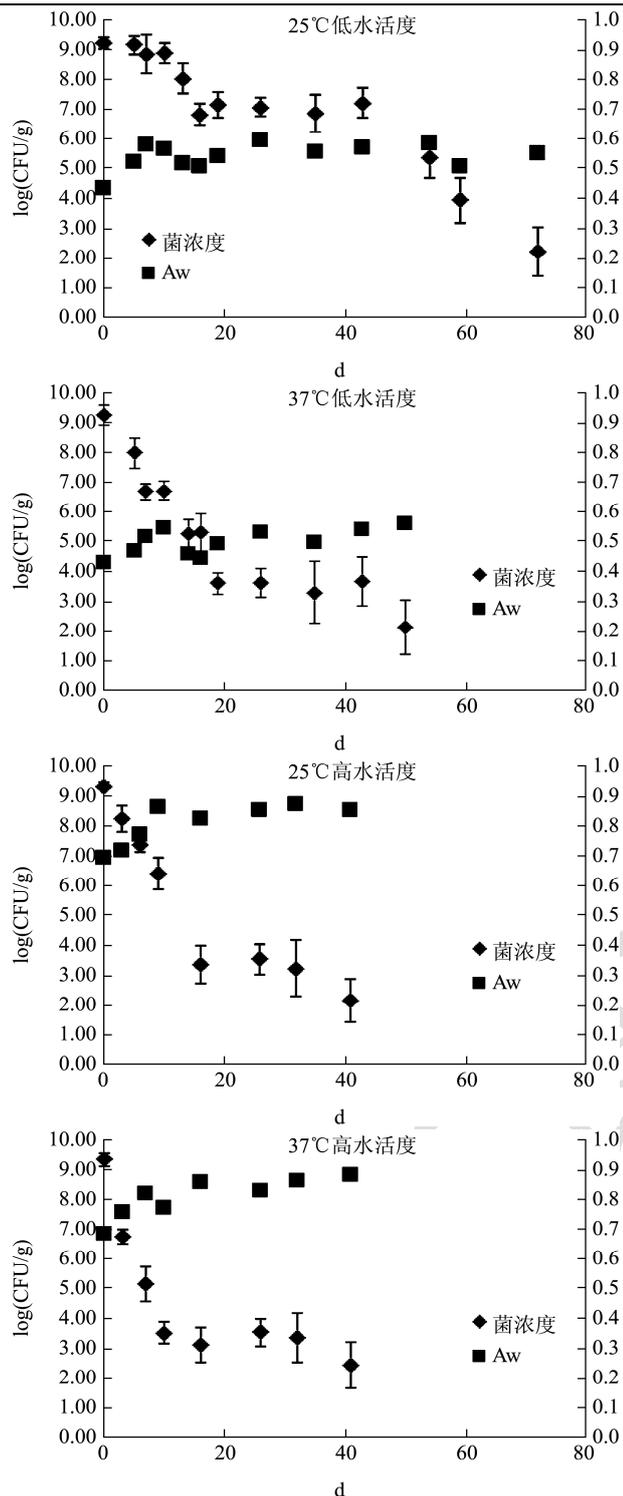


图2 沙门氏菌在不同温度及水活度辣椒粉中的长期生存情况
Fig.2 Long-term survival of *Salmonella* at different temperatures and a_w values

沙门氏菌在高水活度实验组中比低水活度组衰亡的快，能在低水活度辣椒粉中长期存活这么久的原因可能是在干燥条件下，细胞可通过改变细胞膜内外钾离子的浓度，维持渗透压及代谢，其基因组转录的 *Pro P*、*Pro U* 和 *Osm U* 蛋白可以控制甘氨酸-甜菜碱、脯氨酸及四氢甲基嘧啶羧酸等物质的进出，进而限制细

胞水分的流失。另外，菌体生物被膜、细菌表面丝状物质、谷氨酸合成系统和脂肪酸分解系统等都有利于细胞内水分的保存^[1]。提示应该致力关注致病菌在低水活度食品中的生存情况，并且注意致病菌在低水活度中的生存能力可能比高水活度中还要强。

而结果显示沙门在 37 °C 辣椒粉中比 25 °C 衰亡得快的原因有可能是不同温度下细菌胞外聚合物、菌毛、细胞膜存在状态不同^[8]。Beuchat^[9]和 Uesug^[10]的实验也发现沙门在高温下较低温度死亡得快。提示存放食品时，温度不一定较低越的更安全，适当高温存放可能更有利于细菌的死亡，提高食品安全性。

2.4 扫描电镜及粘附强度定量实验

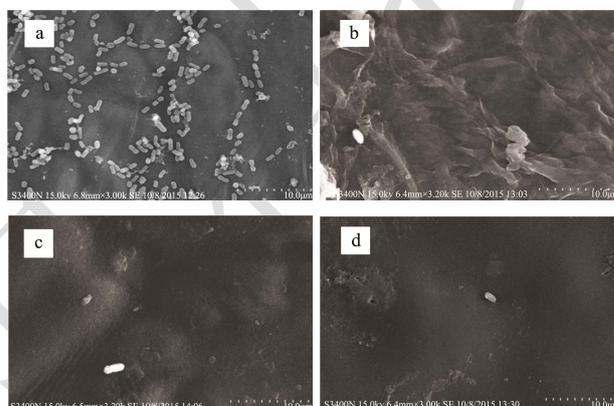


图3 辣椒内外表皮扫描电镜

Fig.3 Scanning electron microscope images of inner and outer skins of red pepper

注：a 表示高水活度内表皮；b 表示低水活度内表皮；c 表示高水活度外表皮；d 表示低水活度外表皮。

实验检测了沙门氏菌在高低两种水活度短时间培养时沙门氏菌的粘附情况。在低水活度粘附强度实验中，弱粘附菌及强粘附菌都没检测到，结合扫描电镜图进行分析，可能由于水活度较低，沙门氏菌体量少所致。

高水活度实验组弱粘附菌数约为 7.62 $\log\text{CFU}/\text{cm}^2$ ，强粘附菌约为 8.66 $\log\text{CFU}/\text{cm}^2$ ，粘附强度为 $53.19 \pm 0.51\%$ ，结合扫描电镜图，发现高水活度实验组内表皮沙门粘附严重，较牢固甚至成团，提示即使辣椒块经过清洗也不能把细菌完全洗去，不经烹饪的辣椒风险极大；而外表皮粘附菌较少，原因可能是不同的表面材料，细菌粘附能力不同。因此，由于辣椒块内表皮比外表皮易粘附细菌，完整辣椒的储存可一定程度上降低沙门氏菌污染的风险。

3 结论

沙门氏菌不仅具有很强的存活能力，可以在只添

加水的高水活度辣椒粉中生长繁殖,而且具有很强的耐旱能力,可在 25 °C 低水活度中存活长达 70 d。同时,由于沙门在辣椒内表皮粘附强度大,病原微生物有可能残留在表面,食用辣椒前若不经彻底加热会存在潜在危害。一旦储存过程中由于空调滴水或雨水造成局部辣椒粉水活度偏高,达到其能生长的最低水活度,可能会导致沙门氏菌旺盛生长,因此应严格控制其水活度。另外,低温储藏反而可能会提高致病菌的生存率,适当提高温度也许能促进细菌死亡。病原微生物污染辣椒粉的途径很多,包括昆虫及鸟类的排泄物、土壤、空气及污水等,因此监视供应商的原材料十分重要;机器的设计及供水系统要完善,防止积水漏水的情况出现;建立完整的消毒体系,加强人员的监管力度;有足够的工厂区域,新旧辣椒不宜交叉存放,时间不宜过长,防止再次污染和交叉污染。此研究为致病菌在低水活度食品中的生存情况这一研究领域提供理论内容。

参考文献

- [1] Sarah Finn, Orla Condell, Peter Mc Clure, et al. Mechanisms of survival, responses and sources of *Salmonella* in low-moisture environments [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4(10): 331-331
- [2] Hung-ming Chen, Yue Wang, Lin-hui Su, et al. Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy [J]. *Pediatrics & Neonatology*, 2013, 54(3): 147-152
- [3] Gruzdev N, Pinto R, Sela Saldinger S. Persistence of *Salmonella enterica* during dehydration and subsequent cold storage [J]. *Food Microbiology*, 2012, 32(32): 415-422
- [4] Edyta Margas, Nicolas Meneses, Beatrice Conde-Petit, et al. Survival and death kinetics of *Salmonella* strains at low relative humidity, attached to stainless steel surfaces [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 187(2014): 33-40
- [5] Jitendra Patel, Manan Sharm. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 139(1-2): 41-47
- [6] Molina-Torres J, García-Chávez A, Ramírez-Chávez E. Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 1999, 64(3): 241-248
- [7] Podolak R, Enache E, Stone W, et al. Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods [J]. *Journal of Food Protection*, 2010, 73(10): 1919-1936
- [8] A P White, D L Gibson, W Kim, et al. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(9): 3219-3227
- [9] L R Beuchat, A J Scouten. Combined effects of water activity, temperatures and chemical treatments on the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 on alfalfa seeds [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92(3): 382-395
- [10] A R Uesugi, M D Danyluk, L J Harris. Survival of *Salmonella enteritidis* phage Type 30 on inoculated almonds stored at -20, 4, 23, and 35 °C [J]. *Journal of Food Protection*, 2006, 69(8): 1851-1857