

# 臭氧水处理对草鱼片贮藏过程中微生物群落结构的影响

徐国栋<sup>1</sup>, 安玥琦<sup>1,2</sup>, 熊善柏<sup>1,2</sup>, 尹涛<sup>1,2</sup>, 覃凤阳<sup>1</sup>, 陈萍<sup>1</sup>, 尤娟<sup>1,2\*</sup>

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 国家大宗淡水鱼加工技术研发分中心(武汉), 湖北武汉 430070)

(2. 长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心, 湖北武汉 430070)

**摘要:** 为探究臭氧水处理对调理水产品微生物群落结构的影响, 该研究采用高通量测序技术, 研究臭氧水处理方式(冲淋和浸泡)以及贮藏温度(4 °C和10 °C)对草鱼片细菌群落组成和多样性的影响。结果表明, 臭氧水冲淋组草鱼片常温贮藏1 d后的感官得分、TVB-N 值显著高于臭氧水浸泡组和对照组草鱼片; 与对照组相比, 臭氧水冲淋、浸泡处理草鱼片的 Shannon、ACE、Chao1 指数值均下降, Simpson 指数值上升, 链球菌科、气单胞菌科微生物相对丰度显著下降。在4 °C、10 °C贮藏条件下与对照组相比, 臭氧水处理草鱼片的 Shannon 指数值下降, Simpson 指数值上升。与对照组菌群结构相比, 臭氧水处理草鱼片在4 °C贮藏后其不动杆菌属、沙雷氏菌属等显著减少, 布丘氏菌属、乳球菌属等显著增加, 而在10 °C下不动杆菌属显著减少, 沙雷氏菌属、假单胞菌属等显著增加 ( $p < 0.05$ )。综上所述, 臭氧水处理显著改变草鱼片群落结构, 降低草鱼片菌群的多样性, 且处理后贮藏温度对草鱼片菌群结构有显著性影响。

**关键词:** 臭氧; 草鱼片; 菌群结构; 高通量测序

文章编号: 1673-9078(2023)01-134-143

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.1.0255

## Effect of Ozonated Water Treatment on the Microbial Community Structure of Grass Carp Fillets during Storage

XU Guodong<sup>1</sup>, AN Yueqi<sup>1,2</sup>, XIONG Shanbai<sup>1,2</sup>, YIN Tao<sup>1,2</sup>, QIN Fengyang<sup>1</sup>, CHEN Ping<sup>1</sup>, YOU Juan<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Food Science and Technology, National R&D Branch Center for Conventional Fresh Water Fish Processing (Wuhan), Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(2. China Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** To determine the effect of ozonated water treatment on the microbial community structure of prepared aquatic products, high-throughput sequencing technology was used to investigate the effects of different ozonated water treatment methods (rinsing and soaking) and storage temperatures (4 and 10 °C) on the bacterial community composition and diversity of grass carp fillets. The sensory score and total volatile basic nitrogen content in the ozonated water rinsing group 1 day after storage at room temperature were significantly higher than the ozonated water soaking and control groups. Compared with the control group, the ozonated water rinsing and soaking groups had decreased Shannon, ACE, and Chao1 indices, increased Simpson index, and significantly decreased *Streptococcaceae* and *Aeromonadaceae* relative abundance. The Shannon index of the ozonated water-treated grass carp fillets decreased when stored at 4 or 10 °C and the Simpson index increased compared with the control group. After storage at 4 °C, *Acinetobacter* and *Serratia* abundances were significantly decreased, whereas

引文格式:

徐国栋, 安玥琦, 熊善柏, 等. 臭氧水处理对草鱼片贮藏过程中微生物群落结构的影响[J]. 现代食品科技, 2023, 39(1): 134-143

XU Guodong, AN Yueqi, XIONG Shanbai, et al. Effect of ozonated water treatment on the microbial community structure of grass carp fillets during storage [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(1): 134-143

收稿日期: 2022-03-08

基金项目: 中央高校基本科研业务费用专项项目(2662020SCP006); 现代农业产业技术体系专项项目(CARS-45-28)

作者简介: 徐国栋(1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工与贮藏, E-mail: kmnxuguo Dong@163.com

通讯作者: 尤娟(1985-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品加工与贮藏, E-mail: juanyou@mail.hzau.edu.cn

*Buttieuella* and *Lactococcus* abundances were significantly increased in the ozonated water-treated grass carp fillets compared with the control group. At 10 °C, *Acinetobacter* was significantly decreased, but *Serratia* and *Pseudomonas* abundances were significantly increased in the ozonated water-treated grass carp fillets ( $p<0.05$ ). In conclusion, ozonated water treatment significantly altered the bacterial community structure and decreased the bacterial diversity of grass carp fillets. Post-treatment storage temperature also exerted a substantial effect on bacterial community structure.

**Key words:** ozone; grass carp fillets; microbial community structure; high-throughput sequencing

当前,居民饮食消费不断升级,新零售、新餐饮经济模式迅猛发展,我国预制调理食品行业处于快速增长阶段<sup>[1]</sup>。由于疫情期间“到家经济”的助推,消费者主动购买预制食品的意愿大幅提高,更进一步推动行业发展。我国水产资源丰富<sup>[2]</sup>,将水产鱼类等经过简单预处理做成调理水产品,对于水产品行业发展具有重要的现实意义。但是由于大部分的调理水产品为半成品,采用传统的热处理使产品达到商业无菌要求,无法保证其感官与营养品质<sup>[3]</sup>,且处理后常在低温下进行贮藏、销售以保持产品新鲜口感和质地,因此特别容易受到微生物污染<sup>[4]</sup>,造成产品的腐败变质。这将给调理水产品的品质保持、质量安全、贮藏稳定性带来挑战。

臭氧是一种环境友好型的非热杀菌技术。臭氧及其分解产物(超氧自由基、羟基自由基等)氧化破坏微生物细胞膜组分(蛋白、呼吸酶、饱和脂肪酸)、细胞壁(肽聚糖)、细胞质(酶、核酸)、孢子外壳和病毒衣壳,从而对各类微生物均具有杀灭作用<sup>[5]</sup>,且适量的臭氧处理对产品的品质影响小<sup>[3]</sup>,特别适用于调理水产品的杀菌保鲜。目前,臭氧水在水产品应用方面的研究主要集中在两个方面,一方面是研究臭氧水处理条件对水产品杀菌效果的影响,方敏等<sup>[6]</sup>研究臭氧水处理方式对鲫鱼体表杀菌效果的影响,结果显示臭氧水冲洗方式杀菌效果最好,其次是流水浸渍,静水浸渍最差。Silva等<sup>[7]</sup>研究臭氧水浓度和时间对罗非鱼减菌效果的影响,结果表明1.5 mg/L的臭氧水处理罗非鱼片15 min,减菌率达88.25%。臭氧对微生物灭活的同时,亦可能会造成蛋白变性<sup>[8]</sup>、脂肪氧化<sup>[9]</sup>等问题,因此另一个方面是研究臭氧水处理条件对产品品质的影响。张红杰等<sup>[10]</sup>研究臭氧水处理对罗非鱼片品质的影响,结果发现臭氧水处理提高了罗非鱼片亮度,改善了罗非鱼片的硬度和咀嚼性,但促进了贮藏过程中蛋白质的变性和脂肪氧化。Zhang等<sup>[11]</sup>研究臭氧水处理对鳙鱼中土腥素去除及理化品质的影响,结果发现臭氧水处理可有效去除鳙鱼中土腥素,提高盐溶性蛋白,  $Ca^{2+}$ -ATPase 酶活性,且对过氧化值、TBA 值改变不大。调理食品不同于传统包装加工食品,在稳定贮藏环境下货架期是恒定的<sup>[12]</sup>。不同来源的水

产品加工成的调理水产品会由于初始菌相不同,导致在贮藏期间微生物的消长以及品质变化存在差异,最终致使贮藏时货架期终点不一致,给调理水产品的贮藏销售带来困难。目前研究表明,臭氧水处理可显著降低食品中微生物的种类和数量,从而可能将不同来源水产品菌相变得相似。因此研究臭氧水处理对水产品菌相影响尤为重要,但是目前研究较少。

已有研究者采用传统分离鉴定技术<sup>[13]</sup>及PCR-DGGE技术<sup>[14]</sup>研究臭氧水处理对牡蛎、鳕鱼片菌群结构的影响,但是均未采用高通量测序技术对臭氧水处理水产品的微生物群落结构进行较全面研究。本文以草鱼片为研究对象,采用高通量测序技术研究臭氧水处理方式对草鱼片菌群结构的影响及臭氧水处理对冷藏草鱼片微生物菌群结构的影响,分析臭氧水处理对草鱼片细菌群落组成和多样性的影响。以期进一步探究臭氧抑菌保鲜的机理,推进臭氧杀菌技术在生鲜调理水产品行业的应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鲜活草鱼(质量2.5~3 kg),购于菜市场,置于冰水中运至实验室;平板计数琼脂培养基,青岛海博生物技术有限公司;氢氧化钠、硼酸、氯化钠、甲基红、溴甲基绿均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;DNA抽提试剂盒(E.Z.N.A.® Soil DNA Kit型),美国Omega Bio-Tek公司;琼脂糖(biowest agArose型),西班牙biowest公司;FastPfu Polymerase,中国TransGen公司;AxyPrep DNA Gel Extraction Kit,美国Axygen公司;文库试剂盒(NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit型),美国Bioo Scientific公司;测序试剂盒(MiSeq Reagent Kit v3/NovaSeq Reagent Kits),美国Illumina公司。

### 1.2 仪器与设备

AVANTI J-26XP型高速冷冻离心机,美国Beckman公司;IKA2000型高速分散均质机,德国IKA公司;FOSS kjeltec8400型自动凯氏定氮仪,丹麦FOSS

公司。HD-1360 型水平流超净工作台, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司。GCQJ-1-3 型电解式高浓度臭氧气机, 武汉威蒙环保科技有限公司; SHP-350 型生化培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; NanoDrop2000 型超微量分光光度计, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Quantus™型微型荧光仪, 美国 Promega 公司; DYY-6C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; ABI GeneAmp®9700 型 PCR 仪, 美国 ABI 公司; Illumina Miseq 型测序仪, 美国 Illumina 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 样品处理

草鱼击头致死, 去除鳞片和内脏, 清水洗净后置于消毒过的案板上, 用无菌刀取其背部两侧鱼肉去皮, 用自来水冲洗 30 s, 转入超净工作台切成 5 cm×5 cm×2 cm 左右的鱼片。将鱼片随机分为 3 组, 一组未做处理 (CK 组), 另两组分别用 0.85 mg/L<sup>[15]</sup>的臭氧水浸泡 10 min (CYJP 组) 和冲淋 10 min (CYCL 组), 各组处理后在超净工作台沥干水分装于无菌均质袋 (每组分装 9 袋, 每袋 8 个鱼片), 随机取各组 3 袋鱼片 (3 个平行) 进行各项指标的测定 (每袋中三个鱼片用于感官评价, 两个鱼片用于菌落总数测定, 两个鱼片用于 TVB-N 的测定, 一个鱼片-80 °C 冻藏用于高通量测序), 其余置于 25 °C 培养箱贮藏。每隔 1 d 随机取各组 3 袋鱼片进行指标的检测。取各组冻存腐败样品以

及新鲜鱼肉样品进行基于细菌 16S rRNA 高通量测序。

按上述方法制作鱼片。混匀后将鱼片分成两组。一组用 0.85 mg/L 臭氧水冲淋 10 min (A 组), 一组用清水冲淋 10 min (B 组) 做对照, 处理后在超净工作台沥干水分。将 A 组和 B 组鱼片分装于无菌均质袋中 (A 组 60 袋、B 组 60 袋, 每袋 4 个鱼片)。随机取 A、B 组草鱼片各 36 袋置于 4 °C 恒温箱中贮藏, 分别为 4 °C-A 组、4 °C-B 组; 取 A、B 组草鱼片各 24 袋置于 10 °C 的恒温箱中贮藏, 分别为 10 °C-A 组、10 °C-B 组。每隔一天随机取出 3 袋 (三个平行) 进行感官评价 (每袋三片鱼片用于感官评价, 一片鱼片冻藏用于高通量测序) 取臭氧处理后达到感官拒绝点的草鱼片进行基于细菌 16S rRNA 的高通量测序, 4 °C 贮藏两组腐败草鱼片分别为 4-9-A、4-9-B 组, 10 °C 贮藏两组腐败草鱼片分别为 10-5-A 组、10-5-B 组。

#### 1.3.2 感官评价

参考 GB 2733-2015《食品安全国家标准鲜、冻动物性水产品》并结合黄渊等<sup>[16]</sup>的方法对草鱼片进行感官评价, 评定小组由 15 名食品科学专业硕士生组成, 分别从色泽、气味、肌肉形态、肌肉弹性 4 个方面进行打分, 每项总分均为 5 分, 以 3 分作为可接受度临界值。评分标准见表 1, 感官总分=色泽得分+气味得分+肌肉形态得分+肌肉弹性得分。感官总分低于 12 分时表明样品不可接受。

表 1 草鱼片感官评分标准

Table 1 Sensory evaluation standard of grass carp slices

分值	色泽	气味	肌肉形态	肌肉弹性
5	色泽正常, 呈正常鱼片白色, 肌肉内切面富有光泽	鱼肉固有的香味, 清新	肌肉组织致密完整, 纹理很清晰; 表面湿润清爽, 无汁液渗出	坚实富有弹性, 手指轻压后凹陷不裂, 放手后迅速恢复
4	色泽正常, 鱼片偏白, 肌肉切面有光泽	固有的香味, 较清新	肌肉组织较致密完整, 纹理较清晰; 表面较湿润清爽, 无汁液渗出	坚实有弹性, 手指轻压后凹陷不裂, 放手后迅速恢复
3	色泽略暗淡, 呈少许黄绿色, 肌肉切面有光泽	固定的香味清淡, 略带异味	肌肉组织不紧密但不松散; 表面略粘腻, 有少量汁液渗出	较有弹性, 手指轻压后凹陷边缘松散, 放手后恢复较慢
2	色泽较暗淡, 呈现黄绿色, 肌肉切面无光泽	固有的香味消失, 有腥臭味或氨臭味	肌肉组织不紧密, 局部松散; 表面较粘腻, 有较多汁液渗出	稍有弹性, 手指轻压后凹陷有裂痕, 放手后恢复很慢
1	色泽暗淡, 呈现明显黄绿色, 肌肉切面无光泽	有强烈的腥臭味或氨臭味	肌肉组织不紧密且松散; 表面粘腻, 有大量汁液渗出	无弹性, 手指轻压后凹陷有裂痕, 放手后凹陷不恢复

#### 1.3.3 总挥发性盐基氮的测定

参照 GB 5009.228-2016《食品安全国家标准食品中挥发性盐基氮的测定》<sup>[17]</sup>自动凯氏定氮仪法测定样品 TVB-N 含量。称取打碎的鱼肉样品 10 g 于蒸馏管内, 加入 75 mL 水, 振摇, 使试样在样液中分散均匀, 浸渍 30 min 后加入 1 g 氧化酶和 2 mL 消泡剂, 立刻连接到蒸馏器上, 按照仪器设定的条件 (标准滴定酸

浓度 0.10 mol/L; 加碱、加水体积为 0 mL; 硼酸+指示剂接收液 30 mL; 蒸馏时间 180 s) 和仪器操作说明书开始测定。

#### 1.3.4 菌落总数的测定

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>[18]</sup>进行菌落总数测定。无菌条件下取鱼肉样品 25 g 于无菌均质袋中, 加入

225 mL 无菌生理盐水,用拍击式均质器拍打 1 min,制成 1:10 的样品匀液,取制得的拍打上清液 (1 mL) 用生理盐水连续 10 倍梯度稀释,选择 3 个适当的稀释度,将稀释液 (1 mL) 转移到培养皿中,每个稀释度做 2 个平皿。然后及时将冷却至适宜温度的平板计数培养基 (灭菌后,放置于  $(46\pm 1)^\circ\text{C}$  水浴中保温) 注入培养皿,约 15 mL,并转动培养皿混合均匀,同时培养基倾入加有 1 mL 稀释液灭菌培养皿内作空白对照。待琼脂凝固后,倒置平板,在  $30^\circ\text{C}$  温箱内培养  $(72\pm 3)$  h。选取菌落数在 30 CFU~300 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数。

### 1.3.5 高通量测序

#### 1.3.5.1 DNA 抽提和 PCR 扩增

根据 E.Z.N.A.® soil DNA kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.) 说明书进行微生物群落总 DNA 抽提,使用  $m=1\%$  的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取质量,使用 NanoDrop 2000 测定 DNA 浓度和纯度;使用 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增,扩增程序如下:  $95^\circ\text{C}$  预变性 3 min, 27 个循环 ( $95^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $55^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 30 s), 然后  $72^\circ\text{C}$  稳定延伸 10 min, 最后在  $4^\circ\text{C}$  进行保存。PCR 反应体系为:  $5\times\text{TransStart FastPfu}$  缓冲液 4  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu\text{L}$ , 上游引物 (5  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.8  $\mu\text{L}$ , 下游引物 (5  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.8  $\mu\text{L}$ ,  $\text{TransStart FastPfu}$  DNA 聚合酶 0.4  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 10 ng, 补足至 20  $\mu\text{L}$ 。每个样本 3 个重复。

#### 1.3.5.2 Illumina Miseq 测序

将同一样本的 PCR 产物混合后使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物,利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 进行回收产物纯化,2% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用 Quantus™ Fluorometer 对回收产物进行检测定量。使用 NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit 进行建库: (1) 接头链接; (2) 使用磁珠筛选去除接头自连片段; (3) 利用 PCR 扩增进行文库模板的富集; (4) 磁珠回收 PCR 产物得到最终的文库。利用 Illumina 公司的 Miseq PE300/NovaSeq PE250 平台进行测序。

### 1.3.6 数据处理

理化部分实验数据采用 IBM SPSS 22.0 进行处理,采用 OriginLab Origin 9.0 进行作图,实验结果显示为平均值  $\pm$ SD,显著性差异采用 Duncan 模型进行比较检验分析。高通量测序部分实验使用 fastp (<https://github.com/OpenGene/fastp>, version 0.20.0) 软件对原始测序序列进行质控;使用 FLASH (<http://www.cbcb.umd.edu/>

software/flash, version 1.2.7) 软件进行拼接;使用 UPARSE 软件 (<http://drive5.com/uparse/>, version 7.1), 根据 97%<sup>[19,20]</sup> 的相似度对序列进行 OTU 聚类并剔除嵌合体。利用 RDP classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>, version 2.2) 对每条序列进行物种分类注释,比对 Silva 16S rRNA 数据库 (v138), 设置比对阈值为 70%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 臭氧水处理方式对草鱼片微生物菌群结构的影响

#### 2.1.1 货架期终点的判定

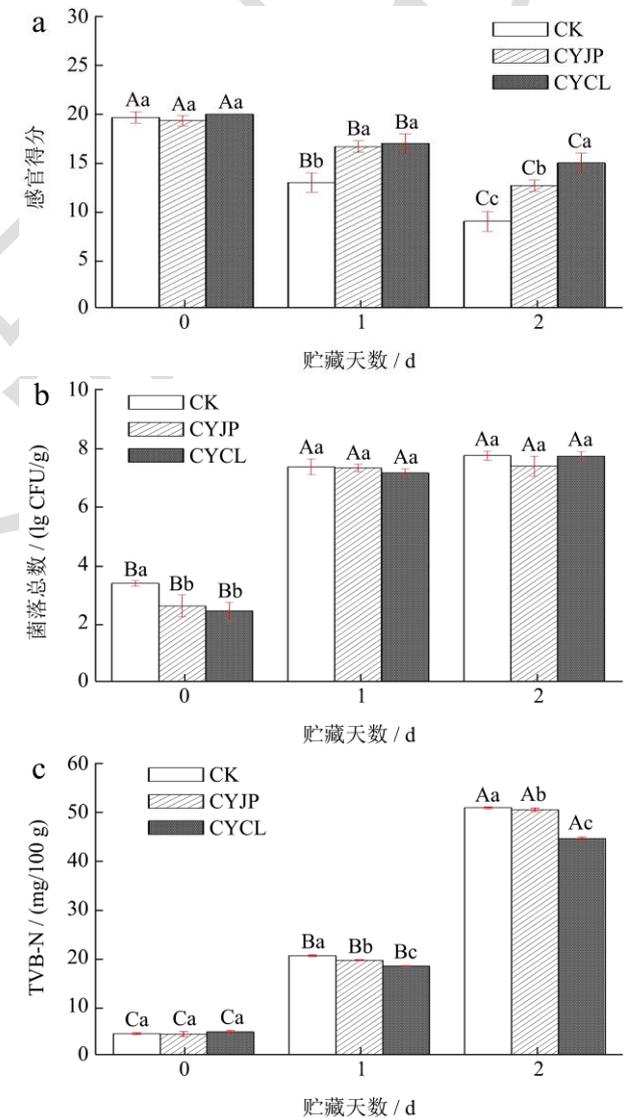


图 1 臭氧水处理方式对常温贮藏草鱼片品质的影响

Fig.1 Effect of ozonated water treatment methods on the quality of grass carp slices stored at room temperature

注: a: 感官品质的影响; b: 菌落总数的影响; c: TVB-N 值的影响。同一天小写字母不同代表不同处理间存在显著性差异

( $p < 0.05$ ); 不同天大写字母不同代表同一处理间存在显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

图 1 显示的是不同臭氧水处理方式对常温贮藏草鱼片品质的影响。由图 1a、1b、1c 可以看出, 3 组草鱼片在第 0 天, 感官得分、TVB-N 值均无显著性差异 ( $p > 0.05$ ), 但 CYJP 组、CYCL 组草鱼片菌落总数显著低于对照组。贮藏 1 d 后, 各处理组菌落总数均超出食品微生物规范国际委员会<sup>[21]</sup>规定的限量值 7.00 lg CFU/g, 但此时 CYCL、CYJP 组草鱼片感官得分仍显著高于 CK 组草鱼片 ( $p < 0.05$ ), TVB-N 值显著低于 CK 组草鱼片 ( $p < 0.05$ ), 微生物指标与感官指标、化学指标之间存在差异的主要原因是鱼肉中部分微生物没有或者仅具有较小的致病能力<sup>[22]</sup>, 因此尽管鱼肉微生物数量达到 7.0 lg CFU/g, 但其感官品质仍可接受, TVB-N 值仍未超标。并且此时 CK 组草鱼片出现明显的腥臭味, 感官上已无法接受, 且 TVB-N 值达到 20.48 mg/100 g, 超出我国 GB 2733-2015《食品安全国家标准鲜、冻动物性水产品》规定的限值 (20 mg/100 g)。贮藏 2 d 后, 虽然 CYCL 组草鱼片感官得分仍显著高于其它两组 ( $p < 0.05$ ), TVB-N 值显著低于其它两组 ( $p < 0.05$ ), 但此时各处理组草鱼片均肌肉组织松散, 色泽暗淡, 有强烈的腥臭味, 且草鱼片 TVB-N 值皆超出国标规定的限值, 均已腐败。综合各处理组感官得分、TVB-N 值的变化以及菌落总

数变化, 结果表明常温贮藏 1 d 后 3 组处理草鱼片均已到达货架期终点。

### 2.1.2 菌群多样性分析

用于测序的 4 组样品共获得优化序列 182 930, 平均序列长度 449 bp。Coverage 指数是样品的测序深度也表明测序对样品的覆盖率。4 组样品的 Coverage 值均在 0.99 以上, 表明样品达到足够的测序深度, 且序列未被检测到的可能性较低, 用于后续的分析结果可信。 $\alpha$  多样性指数包括 Shannon、Simpson、Chao1、ACE 指数。其中 Shannon 指数越大表明样品的群落多样性越高, Simpson 指数越大, 表明群落多样性越低, ACE、Chao1 指数越大表明样品的群落物种丰富度越高。各处理组  $\alpha$  多样性指数值的大小由表 2 所示。综合各  $\alpha$  指数值大小可知, 对照组新鲜草鱼片微生物群落多样性高于各组腐败草鱼片微生物群落多样性, CYCL 组、CYJP 组腐败草鱼片群落多样性低于 CK 组腐败草鱼片微生物群落多样性。这可能是由于鱼类在贮藏至腐败过程中, 不同菌种之间相互竞争, 初始丰度较低的菌种以及竞争能力弱的菌种逐渐消亡, 优势菌群最终占据主导地位, 致使腐败鱼类的菌群多样性减少<sup>[23]</sup>。而草鱼片经臭氧处理后, 不耐受臭氧的微生物均被杀死, 腐败菌相是臭氧以及贮藏条件共同选择的结果, 因而菌群构成更简单, 多样性降低。

表 2 不同处理组草鱼片的测序信息及  $\alpha$  多样性指数

Table 2 Sequencing information and alpha diversity index of grass carp fillets in different treatment groups

组别	序列数	OTUS	平均长度	Shannon	Simpson	Chao1	ACE	Goods coverage
CK_0D	35 398	149	447	2.30	0.22	127.00	127.00	1.00
CK_1D	44 970	67	450	1.96	0.23	58.00	59.74	0.99
CYJP_1D	50 698	63	450	1.28	0.47	47.14	51.26	0.99
CYCL_1D	51 864	63	450	1.50	0.39	48.00	48.49	0.99

### 2.1.3 菌群构成分析

图 2 显示的是门水平 (a) 和科水平 (b) 上的不同处理组草鱼片细菌相对丰度, 统计分析时将相对丰度  $< 1\%$  的物种归为 others。由图 2a 可知, 与 CK 组腐败草鱼片相比, CYCL、CYJP 组腐败草鱼片中厚壁菌门 (Firmicutes) 的相对丰度增大, 其它菌门均减少, 表明臭氧水处理抑制了常温贮藏草鱼片中除厚壁菌门外其它菌门的生长繁殖。由图 2b 可知, CK 组新鲜草鱼片菌群主要由葡萄球菌科 (Staphylococcaceae)、莫拉氏菌科 (Moraxellaceae)、链球菌科 (Streptococcaceae) 等微生物构成。Zhang 等<sup>[24]</sup>在新鲜草鱼片中发现莫拉氏菌科、链球菌科是其 主要细菌科, 蓝蔚青等<sup>[25]</sup>在鲳鱼中发现葡萄球菌

科微生物是新鲜鲳鱼块的主要优势菌。与 CK\_1D 组腐败草鱼片相比, CYJP 组、CYCL 组腐败草鱼片菌群构成中葡萄球菌科、莫拉氏菌科和链球菌科的微生物相对丰度大于 90%, 占有绝对优势, 其它类菌群占比少, 这与上述菌群  $\alpha$  多样性分析结果一致, 即臭氧水处理降低草鱼片菌群多样性, 并且臭氧水处理组中链球菌科、气单胞菌科微生物相对丰度下降明显, 表明臭氧水处理可以有效抑制常温贮藏草鱼片中链球菌科、气单胞菌科微生物的生长繁殖。顾卫瑞<sup>[26]</sup>采用传统分离鉴定方法, 发现臭氧可以有效杀灭气单胞菌属 (Aeromonas) 的细菌。张清平等<sup>[27]</sup>在流动杀菌实验中发现臭氧水对粪链球菌的杀菌率在 99.99%。

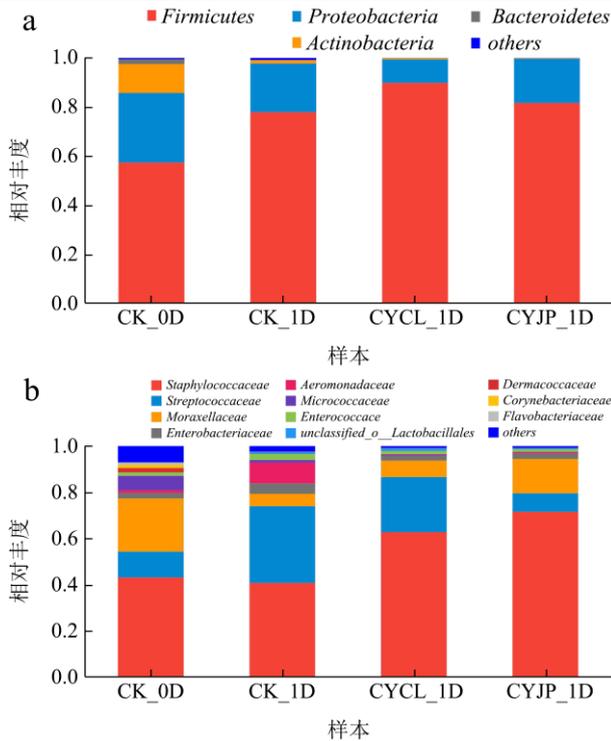


图2 门水平 (a) 和科水平 (b) 上的草鱼片细菌相对丰度分析

Fig.2 Analysis of relative abundance of bacteria in grass carp fillets at the phylum level (a) and family level (b)

2.1.4 菌群构成差异分析

图3是不同处理组草鱼片在分类学属水平上相对丰度排名前50的物种组成热图。群落热图可将高丰度和低丰度菌群分块展示，通过颜色变化来反映不同分组在各分类学水平上群落组成的相似性和差异性。横向聚类上两样本越近，表示两样本中各物种变化趋势越相似。从相对丰度来看，CK\_0D组新鲜草鱼片各类菌属在热图中颜色的对比没有各组腐败草鱼片中各类菌属颜色对比明显，说明新鲜草鱼片的微生物群落构成更加均匀。从横向聚类来看，CYJP组和CYCL组腐败草鱼片微生物群落组成相似度高于其它各组，表明草鱼片经臭氧处理后，菌群结构相似性提高。吴永祥等<sup>[28]</sup>采用超高压技术处理臭鳊鱼，结果发现超高压处理对臭鳊鱼的菌相组成影响显著，其能使微生物组成类型明显减少，漫游球菌属 (*Vagococcus*) 和冷杆菌属 (*Psychrobacter*) 为超高压处理后的优势腐败菌。这说明贮藏前采用非热杀菌技术对不同来源的水产品进行处理，有可能将水产品的初始菌相变得简单，以控制不同来源的水产品加工成的调理水产食品的贮藏稳定性。

为进一步比较分析臭氧浸泡处理和臭氧冲淋处理草鱼片微生物菌群结构的差异，对CYJP组和CYCL组腐败草鱼片中细菌相对丰度排名前十的菌属进行显著性检验。由图4可知，CYJP组、CYCL组腐败草

鱼片在相对丰度排名前十的菌属中均存在显著性差异。特别是在主要的优势菌群葡萄球菌属、乳球菌属、不动杆菌属的相对丰度上。表明臭氧水冲淋、浸泡处理对草鱼片菌群结构影响不同。这可能是由于臭氧作用过程易分解，臭氧水冲淋处理可连续提供新鲜臭氧且起到冲洗减菌作用，而与臭氧水浸泡处理具有不同的杀菌效果，方敏等<sup>[6]</sup>研究臭氧水处理方式对鲫鱼体表杀菌效果的影响，结果显示臭氧水冲洗方式杀菌效果最好，其次是流水浸渍。Chawla等<sup>[29]</sup>研究喷雾处理和浸泡处理对去皮虾肉的影响，结果发现对其具有不同的杀菌效果。

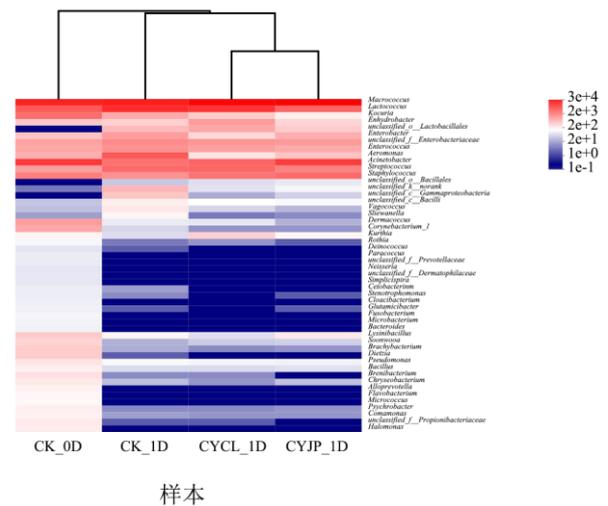


图3 属水平上草鱼片的细菌物种组成热图

Fig.3 Heat map of bacterial species composition of grass carp

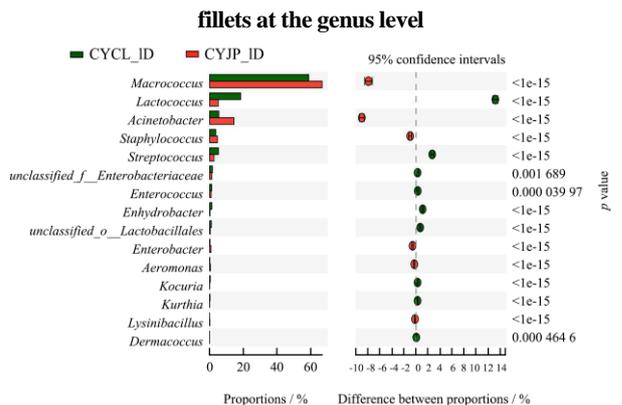


图4 CYJP与CYCL组草鱼片属水平的菌群差异的显著性检验

Fig.4 Significance test of the difference of the bacteria community at the level of genus of grass carp in CYJP and CYCL groups

臭水冲淋处理草鱼片可达到更高的减菌率，且对草鱼片感官品质的保持效果好。不同的臭氧水处理方式对草鱼片菌群结构具有显著差异，这种差异可能会对草鱼片后续品质保持、贮藏稳定性有很大的影响。通过分析不同臭氧处理方式对贮藏草鱼片品质及菌相

的影响,明确后续采用臭氧水冲淋处理草鱼片,研究臭氧水处理对冷藏草鱼片腐败菌相的影响。

## 2.2 臭氧水处理对冷藏草鱼片微生物菌群结构的影响

### 2.2.1 腐败终点的判定

Gram 等<sup>[30]</sup>指出虽然微生物在食品腐败过程中发挥重要作用,但食品腐败(即货架期终点)的界定主要取决于感官评价。不同处理组草鱼片在冷藏时引起感官品质的变化如图 5 所示。由图 5 可以看出,随着冷藏时间的延长,臭氧水未处理组和臭氧水处理组的草鱼片感官品质均不断下降,但臭氧水处理组(A 组)品质下降速度明显慢于臭氧水未处理组(B 组),表明臭氧水处理可以有效延缓草鱼片感官品质的下降。4℃、10℃下贮藏的各处理组草鱼片在第 0 天感官得分均无显著性差异( $p < 0.05$ )。4℃下贮藏的 A 组和 B 组草鱼片在第 3 天感官品质出现显著性差异( $p < 0.05$ ),且分别在贮藏的第 9 天和第 6 天感官得分降低到 12 分以下,感官上已不可接受。10℃下贮藏的两组草鱼片, A 组在贮藏第 5 天, B 组在贮藏第

4 天,感官得分降低到 12 分以下,到达感官拒绝点。综上,臭氧水处理后草鱼片 4℃下贮藏,可延缓感官品质劣变 3 d。臭氧水处理后草鱼片 10℃下贮藏,可延缓感官品质劣变 1 d。已有研究者应用臭氧水对罗非鱼<sup>[31]</sup>和鳕鱼<sup>[32]</sup>进行处理,均发现可有效延缓品质劣变,延长货架期。

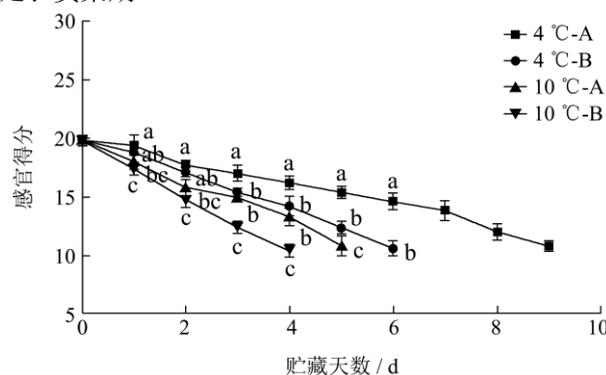


图 5 臭氧水处理对冷藏草鱼片感官得分的影响

Fig.5 Effect of ozonated water treatment on sensory scores of grass carp fillets during cold storage

注: 同一天小写字母不同代表不同处理间存在显著性差异( $p < 0.05$ )。

### 2.2.2 菌群多样性分析

表 3 草鱼片的测序信息及  $\alpha$  多样性指数

Table 3 Sequencing information and application of grass carp fillets with different treatments  $\alpha$  diversity index

组别	序列数	OTUS	平均长度	Shannon	Simpson	Chao1	ACE	Goods coverage
4-9-A	41 323	268	427	2.29	0.16	381.00	419.80	0.99
4-9-B	39 631	255	427	2.51	0.14	325.55	376.93	0.99
10-5-A	37 628	272	427	2.46	0.14	389.05	447.21	0.99
10-5-B	43 584	272	427	2.88	0.09	345.12	379.16	0.99

注: 4-9-A 表示 4℃下贮藏臭氧处理组腐败样品; 4-9-B 表示 4℃下贮藏臭氧未处理组腐败样品; 10-5-A 表示 10℃下贮藏臭氧处理腐败样品; 10-5-B 表示 10℃下贮藏臭氧处理组腐败样品。

表 3 是在 Illumina Miseq™平台上进行高通量测序的 4 组样品的测序信息及  $\alpha$  多样性指数。4 组样品共获得质控后序列 162 166, 平均序列长度 427 bp。在 97% 的序列相似度下, 共获得 1 067 个 OTU。4 组样品的 Coverage 指数值均在 0.99 以上, 可用于后续分析。由表 3 可知, 4℃、10℃下贮藏臭氧处理组腐败草鱼片 Shannon 指数均低于 4℃、10℃下贮藏臭氧未处理组腐败草鱼片, Simpson 指数大于 4℃、10℃下贮藏臭氧未处理组腐败草鱼片, ACE、Chao1 指数均大于 4℃下和 10℃下贮藏臭氧未处理组腐败草鱼片。综合  $\alpha$  多样性分析结果, 臭氧水处理降低草鱼片微生物群落多样性, 而又保持其微生物群落物种丰富度, 使冷藏草鱼片中微生物群落结构变得具有高丰富度而低均匀性。

### 2.2.3 菌群构成分析

图 6 显示的是门水平 (a) 和科水平 (b) 上的不同处理组草鱼片细菌相对丰度。由图 6a 可知, 4℃、10℃下贮藏臭氧处理组草鱼片与臭氧未处理组草鱼片相比, 拟杆菌门、放线菌门相对丰度下降, 表明臭氧水处理抑制了冷藏草鱼片中拟杆菌门、放线菌门的生长繁殖。由图 6b 可知, 4℃、10℃下贮藏臭氧处理组和未处理组腐败草鱼片科水平上的菌群均主要由肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)、假单胞菌科 (Pseudomonadaceae)、链球菌科、李斯特菌科 (Listeriaceae)、莫拉氏菌科微生物构成, 但两组草鱼片在主要菌群的相对丰度上存在较大差异。臭氧水处理对莫拉氏菌科微生物生长的抑制效果最为显著, 在 4℃下贮藏臭氧处理后腐败草鱼片莫拉氏菌科微生物相对丰度从 12.81% 下降到 3.54%, 在 10℃下贮藏臭氧处理后腐败草鱼片莫拉氏菌科微生物相对丰度从

29.88% 下降到 8.19%。

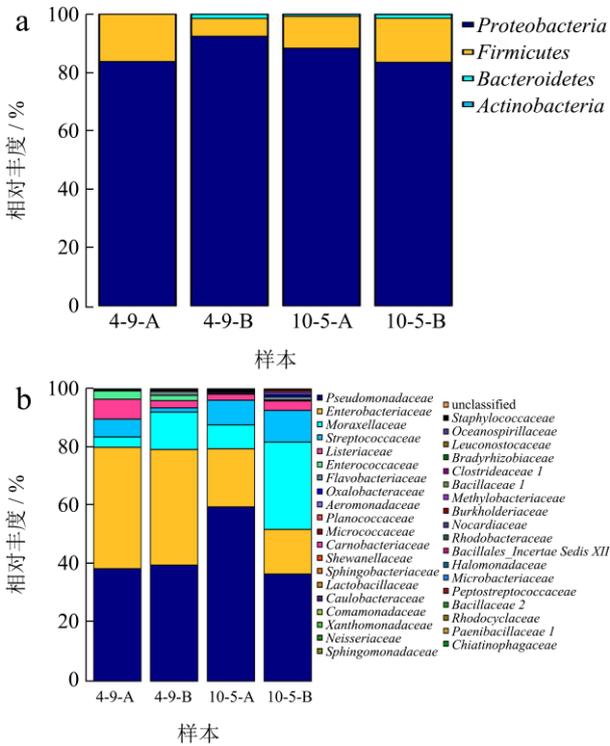


图 6 门水平 (a) 和科水平 (b) 上的草鱼片细菌相对丰度分析

Fig.6 Analysis of relative abundance of bacteria in grass carp fillets at the phylum level (a) and family level (b)

2.2.4 菌群构成差异分析

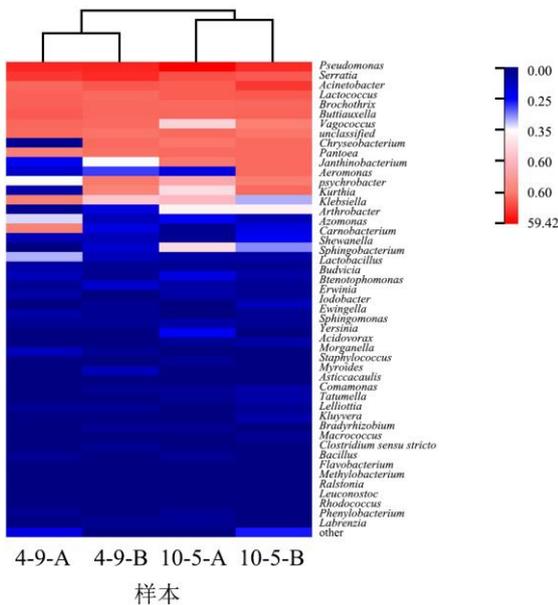


图 7 草鱼片属水平上的微生物群落组成热图

Fig.7 Heat map of microbial community composition at the level of grass carp

图 7 是不同处理组草鱼片在分类学属水平上相对丰度排名前 50 的物种组成热图。从热图横向聚类来看,不同冷藏温度下贮藏的臭氧处理组与未处理组腐败草鱼片群落结构更相似,表明相比于臭氧水处理对草鱼

片菌群结构的改变,后续贮藏条件的改变对菌群结构的影响更大。4℃、10℃下贮藏各组腐败草鱼片中主要优势菌为假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*)、不动杆菌属、乳球菌属、环丝菌属 (*Brochothrix*)、布丘氏菌属 (*Buttiauxella*)。假单胞菌属于假单胞菌科 (*Pseudomonadaceae*),已有大量研究表明耐冷的假单胞菌属微生物是冷藏水产品常见的特定腐败菌<sup>[33]</sup>,布丘氏菌属、沙雷氏菌属属于肠杆菌科,生活在受污染水域的水产品中肠杆菌科微生物检出率高<sup>[34]</sup>,沙雷氏菌属是肉产品的常见腐败菌,多次在肉制品中被检测到<sup>[35]</sup>。乳球菌属属于链球菌科,不动杆菌属属于莫拉氏菌科,环丝菌属属于李斯特菌科,皆是水产品中常见的微生物。

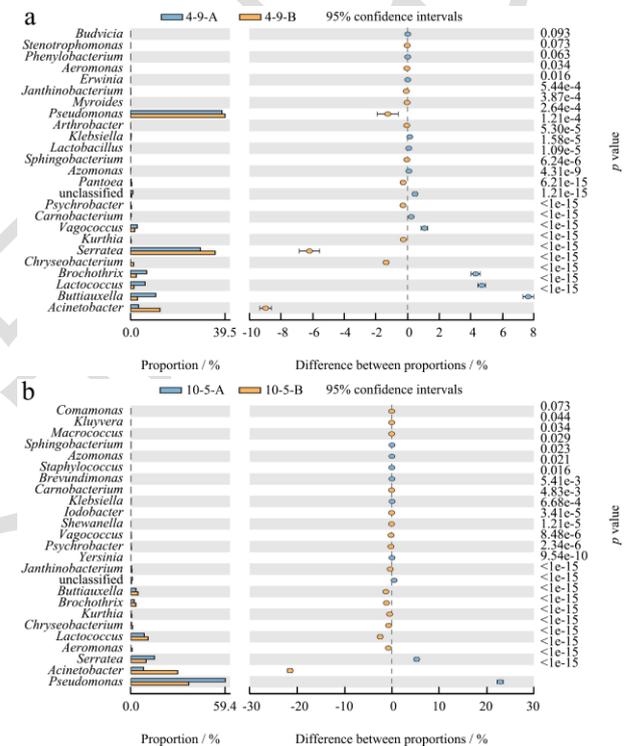


图 8 冷藏草鱼片属水平的菌群差异的显著性检验

Fig.8 Significant test of the difference of the bacterial community at the level of genus of chilled grass carp

注: a: 4℃, b: 10℃。

为进一步比较不同冷藏温度下臭氧处理组和未处理组腐败草鱼片微生物菌群结构的差异,对 4℃、10℃下贮藏臭氧处理组和未处理组腐败草鱼片中相对丰度排名前 25 的菌属进行显著性检验。结果如图 8a 和图 8b 所示,图中标红的菌种表示在两组中具有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。由图 8a 可知,4℃贮藏臭氧处理组和未处理组腐败草鱼片在相对丰度占比前 25 的菌属中,22 个在相对丰度上存在显著性差异。臭氧处理后 4℃贮藏至腐败草鱼片中不动杆菌属、沙雷氏菌属等微生物显著减少,布丘氏菌属、乳球菌属、环丝菌属

等微生物显著增加。由图 8b 可知, 10 °C 贮藏臭氧处理组和未处理组腐败草鱼片在相对丰度占比前 25 的菌种中, 24 个存在显著性差异, 臭氧处理后 10 °C 贮藏至腐败草鱼片中不动杆菌属显著减少 ( $p < 0.05$ ), 沙雷氏菌属、假单胞菌属显著等微生物显著增加。表明臭氧处理显著改变了贮藏草鱼片的微生物群落结构, 特别对相对丰度高的优势菌群影响更显著。

### 3 结论

臭氧水冲淋处理草鱼片可达到更高的减菌率, 且对草鱼片感官品质的保持效果好。臭氧水冲淋处理、臭氧水浸泡处理均会改变草鱼片菌群结构, 降低草鱼片菌群多样性, 常温下可有效抑制链球菌科、气单胞菌科微生物生长繁殖。但不同的臭氧水处理方式对草鱼片微生物菌群结构具有显著性差异, 特别是在相对丰度高的优势菌葡萄球菌属、乳球菌属、不动杆菌属相对丰度方面差异更显著。草鱼片经臭氧水冲淋处理后在 4 °C、10 °C 下冷藏感官品质的劣变均显著减缓, 且在门、科、属水平上均可抑制部分相同微生物的生长繁殖, 特别是不动杆菌属微生物; 但不同冷藏温度仍会导致菌群结构差异显著。臭氧水处理对草鱼片微生物菌群结构的影响研究可为臭氧杀菌技术在生鲜调理水产品行业的应用奠定基础。

### 参考文献

- [1] 蔡悦. 浅谈我国餐饮产业链中央厨房中预制菜的发展趋势[J]. 食品安全导刊, 2021, 23: 187-188
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局. 2021 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021: 1-5
- [3] 李沛生, 黄雅婷, 阮征. 非热杀菌技术在生食水产品中的应用研究进展[J]. 水产学报, 2021, 45(7): 1259-1276
- [4] 韦佩贝, 戚穗坚. 疫情全球化常态化趋势下中国预制调理食品市场发展现状[J]. 食品与机械, 2020, 36(9): 18-25
- [5] Khadre M A, Yousef A E, Kim J G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review [J]. Journal of Food Science, 2001, 66(9): 1242-1252
- [6] 方敏, 沈月新, 王鸿, 等. 臭氧水在水产品保鲜中的应用研究[J]. 食品研究与开发, 2004, 02: 132-136
- [7] Silva A M D, Goncalves A A. Effect of aqueous ozone on microbial and physicochemical quality of Nile tilapia processing [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2017, 41(6): 7
- [8] 颜明月. 臭氧水处理对罗非鱼片蛋白质和脂质氧化及品质的影响[D]. 南宁: 广西大学, 2015
- [9] 钟智豪. 减菌处理对草鱼片脂肪氧化及蛋白质氧化的影响和控制[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015
- [10] 张红杰. 臭氧减菌化处理罗非鱼片冰温贮藏过程中品质变化及蛋白质降解抑制研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016
- [11] Tao Z, Yong X, Zhaojie L, et al. Effects of ozone on the removal of geosmin and the physicochemical properties of fish meat from bighead carp [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2016, 34: 16-23
- [12] 史策, 钱建平, 韩帅, 等. 水产品货架期预测模型的研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(15): 294-301
- [13] 曹荣, 薛长湖, 薛勇, 等. 臭氧水对牡蛎细菌菌相及货架期的影响[J]. 食品工业科技, 2006, 5: 63-65
- [14] Hovda M B, Sivertsvik M, Lunestad B T, et al. Microflora assessments using PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis of ozone-treated and modified-atmosphere-packaged farmed cod fillets [J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(11): 2460-2465
- [15] 赵莉君, 顾卫瑞, 熊善柏, 等. 草鱼片的臭氧处理工艺研究[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 14-18
- [16] 黄渊, 曹琼璐, 刘琛, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯保持冷藏草鱼鱼片的新鲜度[J]. 现代食品科技, 2020, 36(4): 98-104
- [17] GB 5009.228 2016, 食品安全国家标准食品中挥发性盐基氮的测定[S]
- [18] 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]
- [19] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998
- [20] Stackebrandt E, Goebel B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(4): 846-849
- [21] International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microorganisms in Foods 2. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications [M]. Toronto, University of Toronto Press, 1986
- [22] Liu X, Li D, Li K, Luo Y. Monitoring bacterial communities in  $\epsilon$ -Polylysine-treated bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillets using culture-dependent and culture-independent techniques [J]. Food Microbiology, 2018, 76: 257-266
- [23] Zhuang S, Hong H, Zhang L, et al. Spoilage-related microbiota in fish and crustaceans during storage: Research progress and future trends [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(1): 252-288
- [24] Zhang J, Li Y, Liu X, et al. Characterization of the microbial composition and quality of lightly salted grass carp

- (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets with vacuum or modified atmosphere packaging [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 293: 87-93
- [25] 蓝蔚青,谢晶,施建兵,等.冷藏鲳鱼贮藏期间的细菌种群变化[J]. *食品与生物技术学报*,2013,32(11):1141-1148
- [26] 顾卫瑞.草鱼片的臭氧处理及贮藏特性研究[D].武汉:华中农业大学,2009
- [27] 张永清,吴清平,张菊梅,等.臭氧对矿泉水中致病菌的杀灭效果[J]. *湖北农业科学*,2014,53(7):1543-1545,1550
- [28] 吴永祥,王玉,袁德现,等.超高压处理对臭鳊鱼细菌群落结构和品质的影响[J]. *食品科学*,2022,7:81-87
- [29] Chawla A, Bell J W, Janes M E. Optimization of ozonated water treatment of wild-caught and mechanically peeled shrimp meat [J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2007, 16(2): 41-56
- [30] Gram L, Ravn L, Rasch M, et al. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 78: 79-97
- [31] Gelman A, Sachs O, Khanin Y, et al. Effect of ozone pretreatment on fish storage life at low temperatures [J]. *Journal of Food Protection*, 2005, 68(4): 778-784
- [32] Laura P, Marta B, Gabriel S, et al. Use of sterile and ozonated water as a strategy to stabilize the quality of stored refrigerated fresh fish [J]. *Food Control*, 2008, 19(8): 772-780
- [33] 李萌,马永生,李莹,等.噬菌体防控水产品中细菌生物膜污染的研究进展[J]. *水产科学*,2021,40(3):467-474
- [34] 李琳,潘子强.水产品特定腐败菌的确定及生长模型建立研究进展[J]. *食品研究与开发*,2011,32(6):152-156
- [35] Lindberg A M, Ljungh A, Ahme S, et al. *Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 39(1-2): 11-17