

## 臭氧水处理对生鲜草鱼片理化特性及初始菌相的影响

徐国栋<sup>1,3</sup>, 熊善柏<sup>1,2,3</sup>, 尹涛<sup>1,2,3</sup>, 刘茹<sup>1,3</sup>, 黄泽南<sup>1,3</sup>, 任洋莹<sup>1,3</sup>, 尤娟<sup>1,2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>华中农业大学食品科学技术学院 武汉 430070

<sup>2</sup>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 武汉 430070

<sup>3</sup>国家大宗淡水鱼加工技术研发分中心(武汉) 武汉 430070)

**摘要** 为探究臭氧水处理对不同来源生鲜草鱼片初始菌相的影响,以不同采样时间生鲜草鱼片为原料,测定菌落总数、硫代巴比妥酸(TBA)值、pH值、色度值、感官评分,研究臭氧水不同参数处理对生鲜草鱼片理化特性影响,以优化其处理条件。采用优化的条件处理生鲜草鱼片,以传统分离培养结合 16S rRNA 鉴定及高通量测序探究臭氧水处理前、后生鲜草鱼片的菌相变化。结果显示,随着臭氧水质量浓度的升高和处理时间的延长,生鲜草鱼片的残菌数减少,减菌率显著提高,处理后其菌相变化显著( $P<0.05$ )。臭氧水质量浓度和处理时间虽对生鲜草鱼片 TBA、pH 值无明显影响,但对色度有显著影响( $P<0.05$ )。就感官得分而言,虽然臭氧水质量浓度对其无影响,但是处理时间对其影响显著,且随处理时间的延长,感官品质显著下降。用 15 mg/L 臭氧水处理生鲜草鱼片 5 min 后,3 个采样时间生鲜草鱼片的细菌种类分别减少 52.17%,50.00%,60.00%,细菌多样性显著下降( $P<0.05$ ),革兰氏阳性( $G^+$ )菌相对丰度上升。主坐标轴的分析表明,处理后不同采样时间草鱼片的菌相相似。结论:15 mg/L 臭氧水处理生鲜草鱼片 5 min,减菌率达 80.66%。处理后生鲜草鱼片菌相变得简单,不同采样时间的生鲜草鱼片菌相相似程度虽然提高,但是不影响其理化品质。

**关键词** 臭氧水; 草鱼片; 初始菌相; 理化特性

文章编号 1009-7848(2024)08-0325-16 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.08.031

据统计,截止 2022 年,我国预制食品市场规模为 611.4 亿美元,年均增长率达 25%,预计 2026 年市场规模可突破 1 448 亿美元<sup>[1]</sup>,预制食品发展潜力巨大。2022 年,全国水产品总产量达到 6 865.91 万 t,其中鱼类产量 3 634.74 万 t,占水产品总产量的 52.93%<sup>[2]</sup>。将水产鱼类等经过简单预处理做成预制食品,对于水产品行业发展具有重要的现实意义。然而,水产品受收获前生存环境,收获后加工方式,包装方式及贮藏方式的影响,初始菌相会存在差异<sup>[3]</sup>,导致在相同条件下贮藏货架期不一致,限制了预制水产品行业发展。在加工前采用合适的方法进行减菌处理,是解决此难题的有效途径之一。

臭氧处理是一种环境友好型的非热减菌技术,可以有效杀灭水产品中致病菌<sup>[4]</sup>及绝大多数的腐败微生物<sup>[5]</sup>,其作用过程不会引起产品热的变化,利于保持产品口感、风味和色泽,且作用后即

分解,对产品无残留污染,特别适用于生鲜水产品的杀菌消毒。然而,臭氧的强氧化性在杀灭微生物同时亦会对产品品质造成一定影响,如感官色泽改变<sup>[6]</sup>、脂肪氧化<sup>[7]</sup>等。因此,找到适宜的臭氧处理条件,在保证产品微生物质量的同时避免引起产品的化学和感官特征发生显著变化变得尤为重要。Silva 等<sup>[8]</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 的臭氧水浸泡处理罗非鱼片 15 min,减菌率达 88.25%,对鱼片的 pH 值和颜色都没有影响,然而,引起 TBARS 值增加。Crowe 等<sup>[9]</sup>研究臭氧喷雾处理对三文鱼片微生物质量和安全的影响时发现 1.5 mg/L 的臭氧喷雾可有效减少需氧细菌种群的初始数量,并显著减少( $P<0.05$ )无害乳杆菌的数量,而不会导致养殖大西洋鲑鱼的脂质氧化水平显著增加。他们均未对臭氧水处理前、后水产品菌相变化进行系统研究,有关臭氧水处理对生鲜草鱼片初始菌相的影响未见报道。研究臭氧水处理前、后生鲜鱼片初始菌相变化,探明生鲜鱼片中耐受及不耐受臭氧的微生物,对于推动臭氧减菌技术在预制水产品行业的工业化应用具有重要意义。

收稿日期: 2023-08-05

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD2100901)

第一作者: 徐国栋,男,硕士生

通信作者: 尤娟 E-mail: juanyou@mail.hzau.edu.cn

本文以生鲜草鱼片为对象,研究臭氧水处理参数对生鲜草鱼片理化特性的影响,确定适宜的处理条件。采用传统分离培养结合 16S rRNA 鉴定方法和高通量测序方法揭示臭氧水处理对不同采样时间生鲜草鱼片初始菌相的影响,为调理鱼片的质量控制和货架期预测奠定理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

鲜活草鱼[质量(2.8±0.2) kg],采样于华中农业大学校内步行街菜市场,置于冰水中运至实验室。样本 1 草鱼于 2022 年 3 月 28 日采样,样本 2 草鱼于 2022 年 5 月 14 日采样,样本 3 草鱼于 2022 年 5 月 28 日采样。

平板计数琼脂培养基,青岛海博生物技术有限公司;硫代巴比妥酸、三氯乙酸、硼酸,均为分析纯级,国药集团化学试剂有限公司;TSINGKE TSE005 2×T5 Super PCR Mix (Colony),北京擎科生物科技有限公司;DNA 抽提试剂盒(E.Z.N.A.® Soil DNA Kit 型),美国 Omega Bio-Tek 公司;FastPfu Polymerase,中国 TransGen 公司;AxyPrep DNA Gel Extraction Kit,美国 Axygen 公司;建库试剂盒(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

Testo205 型 pH 酸碱计,德国 Testo 集团;CR-400 型色度计,美国 Konica Minolta 公司;UV2600A 型紫外-可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;IKA2000 型高速分散均质机,德国 IKA 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;T100 型梯度 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;Illumina Miseq 型测序仪,美国 Illumina 公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 样品处理

1.3.1.1 草鱼片制作 草鱼击头致死,去除鳞片 and 内脏,清水洗净后置于洁净案板上,用刀取其背部两侧鱼肉去皮,用自来水冲洗 30 s,切成 5 cm×5 cm×1.5 cm 左右的鱼片,装入无菌均质袋,混匀。

1.3.1.2 臭氧水淋洗处理 固定淋洗处理水压,270 kPa,淋洗速度是 1.66 L/min,淋洗高度 25 cm,水温 10 ℃,正反、面淋洗。

1.3.1.3 样品制备 采用 0 (自来水喷淋 5 min),5,10,15,20,25 mg/L 的臭氧水喷淋处理草鱼片 5 min,研究臭氧水处理浓度对生鲜草鱼片理化特性的影响。采用 10 mg/L 的臭氧水喷淋处理 0.0(未做处理),2.5,5.0,7.5,10.0,12.5 min,研究臭氧水处理时间对生鲜草鱼片理化特性的影响。采用优化后的臭氧水淋洗处理条件(15 mg/L,5 min)处理 3 种不同采样时间的草鱼片,研究臭氧水处理对生鲜草鱼片菌相的影响。草鱼片经臭氧水处理后均装入无菌均质袋待测。

1.3.2 臭氧水浓度的测定 参照肖淑婷等<sup>[10]</sup>的方法进行测定。取 10 mL 20%碘化钾溶液和 5 mL 3 mol/L 稀硫酸倒入 500 mL 三角瓶中,待臭氧发生器运行稳定后量取臭氧水约 200 mL,然后立即封口摇匀,静置 5 min,用 0.005 mol/L 的硫代硫酸钠溶液滴至浅黄色时,加入 0.5%淀粉溶液 1 mL 继续滴定至无色。记录硫代硫酸钠标准溶液用量,并将滴定结果用空白试验校正。

1.3.3 硫代巴比妥酸(TBA)值的测定 参照《食品安全国家标准 食品中丙二醛的测定》(GB 5009.181-2016)分光光度法测定样品中丙二醛含量。

1.3.4 pH 值的测定 采用 Testo205 型插入式 pH 计,直接插入鱼肉中进行测定。每个鱼片选不同位置测定 3 次。

1.3.5 色度值的测定 采用 CR-400 型色度仪测定鱼块的亮度值  $L^*$ 、红绿值  $a^*$  和黄蓝值  $b^*$ ,每个鱼片选取 6 个点(两面各 3 个点)测定,白度( $W$ )计算公式如下。

$$W=100-\sqrt{(100-L^*)^2+(a^*)^2+(b^*)^2} \quad (1)$$

1.3.6 菌落总数的测定 参照《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》(GB 4789.2-

2016) 进行菌落总数的测定。残菌数即为菌落总数,单位为lg(CFU/g),减菌率按式(2)计算。

减菌率(%)=(处理前菌落总数-处理后菌落总数)/处理前菌落总数×100 (2)

1.3.7 感官评价 参考 Hao 等<sup>[11]</sup>的方法对草鱼片进行感官评价,评定小组由7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。采用5分制进行评估:非常理想的,5分;可取的,4分;可接受的,3分;无法接受的,2分;非常不能接受的,1分。感官总分为20分,12分为不可接受的限值。

### 1.3.8 传统分离培养结合 16S rRNA 鉴定方法

1.3.8.1 菌种分离与纯化 参考 Wang 等<sup>[12]</sup>的方法进行菌种的分离与纯化。选取菌落总数在30~100的PCA平板,进行菌落特征观察后,挑取平板上的所有菌落,接种于胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)中,30℃培养24~36h,然后反复在琼脂平板上划线,直至得到纯菌落。

1.3.8.2 16S rRNA 基因鉴定 挑取培养基上的单菌落于PCR管中,溶解于10~20 μL 无菌水中,反复吹打数次稀释。PCR反应体系(25 μL):12.5 μL 2×T5 Super PCR Mix (Colony)+1 μL 上游引物+1 μL 下游引物+稀释菌液 1 μL+9.5 μL 无核酶水。PCR反应程序:98℃预变性3min,之后进行35次循环(包括:98℃变性10s,57℃退火10s,72℃延伸45s),最后72℃终延伸5min。反应完后置于-20℃下保存。PCR产物检测:将扩增好的PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳(2 μL 样品+6 μL 溴酚蓝,300V电压,12min),获取鉴定胶图,通过胶图确定扩增产物是否单一,是否弥散,有无非特异性条带。PCR扩增产物委托北京擎科生物科技有限公司进行测序,测序反应以27f、1492R为测序引物,获得菌株部分长度16S rDNA(约1500bp)测序结果通过Eztaxon (<http://www.eztaxon.org/>)进行查询<sup>[13]</sup>,相似度在97%以上时可看作是同一菌种。

### 1.3.9 高通量测序方法

1.3.9.1 DNA 抽提和PCR扩增 根据E.Z.N.A.® soil DNA kit说明书进行微生物群落总DNA抽提,使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA的提取质量,使用NanoDrop2000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℃预变性3min,27个循环(95℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸30s),然后72℃稳定延伸10min,最后在4℃进行保存。PCR反应体系为:5×TransStart FastPfu缓冲液4 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL,上游引物(5 μmol/L)0.8 μL,下游引物(5 μmol/L)0.8 μL,TransStart FastPfu DNA聚合酶0.4 μL,模板DNA 10 ng,补足至20 μL。每个样本3个重复。

1.3.9.2 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。

## 1.4 数据处理

理化部分试验数据平行测定3次,采用IBM SPSS 22.0进行处理,采用OriginLab Origin 9.0进行作图,试验结果显示为( $\bar{x} \pm s$ ),显著性差异采用Duncan模型进行比较检验分析。高通量测序部分试验使用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>[14-15]</sup>的相似度对序列进行操作分类单元(Operational taxonomic units)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 结果与分析

### 2.1 臭氧水质量浓度对生鲜草鱼片理化特性的影响

以自来水淋洗样品为对照,选用5,10,15,

20,25 mg/L 的臭氧水,于 10 °C 淋洗草鱼片 5 min, 沥干 5 min 后无菌取样测定鱼片的菌落总数、色度值、TBA 值、pH 值,并进行感官评分,结果见表 1。臭氧水处理质量浓度对生鲜草鱼片 TBA 值、pH 值、感官得分均无显著影响,而一定质量浓度臭氧水处理对色度值( $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 、 $W$ )、残菌数均有显著性影响( $P<0.05$ )。赵莉君等<sup>[16]</sup>研究草鱼片的臭氧处理工艺时也发现类似现象。随着臭氧水质量浓度升高,色度值变化呈先上升后下降的趋势,当臭氧水质量浓度为 10 mg/L 时,草鱼片的  $L^*$  最大, $W$  最高,这可能是由于臭氧可以使肌红蛋白(Mb)共轭

双键断裂,从而引起生色团氧化断裂导致色泽改变<sup>[17]</sup>。随着臭氧有效作用时间的延长,鱼肉中部分 Mb 和氧合肌红蛋白(MbO<sub>2</sub>)在强氧化剂的作用下转化成高铁肌红蛋白<sup>[18]</sup>,导致鱼片亮度变低。与 5 mg/L 和 10 mg/L 的臭氧水处理相比,臭氧水质量浓度增长为 15 mg/L 时对生鲜草鱼片的减菌效果变得不显著( $P>0.05$ )。10 mg/L 的臭氧水处理对生鲜鱼片 TBA、pH 值、感官得分无显著影响,且与其它各处理组相比,此处理条件下鱼片亮度最大,颜色最好,后续选用该条件进行臭氧水处理时间对生鲜草鱼片理化特性的影响研究。

表 1 臭氧水质量浓度对生鲜草鱼片理化特性的影响

Table 1 Effects of ozonated water mass concentration on the physicochemical properties of fresh grass carp fillets

指标	臭氧水质量浓度/(mg/L)					
	0	5	10	15	20	25
TBA 值/(mg/kg)	0.17 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.14 <sup>a</sup>
pH	6.65 ± 0.01 <sup>a</sup>	6.68 ± 0.01 <sup>a</sup>	6.70 ± 0.05 <sup>a</sup>	6.66 ± 0.19 <sup>a</sup>	6.69 ± 0.08 <sup>a</sup>	6.63 ± 0.09 <sup>a</sup>
$L^*$	57.77 ± 0.63 <sup>bc</sup>	60.07 ± 0.66 <sup>ab</sup>	61.66 ± 1.05 <sup>a</sup>	57.69 ± 1.32 <sup>c</sup>	57.74 ± 1.12 <sup>bc</sup>	58.24 ± 1.84 <sup>bc</sup>
$a^*$	-1.57 ± 0.22 <sup>bc</sup>	-1.01 ± 0.29 <sup>a</sup>	-1.08 ± 0.57 <sup>ab</sup>	-1.75 ± 0.18 <sup>c</sup>	-1.74 ± 0.08 <sup>c</sup>	-1.70 ± 0.74 <sup>c</sup>
$b^*$	-1.90 ± 1.15 <sup>bc</sup>	-0.19 ± 0.10 <sup>a</sup>	-0.49 ± 0.24 <sup>ab</sup>	-1.40 ± 0.67 <sup>bc</sup>	-1.89 ± 0.38 <sup>bc</sup>	-2.15 ± 0.70 <sup>c</sup>
$W$	57.69 ± 0.68 <sup>bc</sup>	60.04 ± 0.65 <sup>ab</sup>	61.64 ± 1.05 <sup>a</sup>	57.63 ± 1.32 <sup>c</sup>	57.66 ± 1.10 <sup>bc</sup>	58.15 ± 1.83 <sup>bc</sup>
感官得分/分	17.33 ± 0.95 <sup>a</sup>	17.47 ± 0.70 <sup>a</sup>	17.13 ± 0.81 <sup>a</sup>	16.93 ± 0.31 <sup>a</sup>	17.07 ± 0.83 <sup>a</sup>	17.20 ± 0.72 <sup>a</sup>
残菌数/[lg(CFU/g)]	2.85 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.54 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.37 ± 0.01 <sup>c</sup>	2.23 ± 0.08 <sup>cd</sup>	2.02 ± 0.08 <sup>d</sup>	2.01 ± 0.12 <sup>d</sup>
减菌率/%		50.75 ± 6.63 <sup>c</sup>	66.54 ± 4.89 <sup>b</sup>	75.96 ± 1.36 <sup>ab</sup>	84.86 ± 4.70 <sup>a</sup>	84.93 ± 5.89 <sup>a</sup>

注:同一行字母不同表示有显著性差异( $P<0.05$ )。

## 2.2 臭氧水处理时间对生鲜草鱼片理化特性的影响

以未处理样品为对照,固定臭氧水质量浓度为 10 mg/L,于 10 °C 淋洗草鱼片 2.5,5.0,7.5,10.0,12.5 min,沥干 5 min 后无菌取样测定鱼片的菌落总数、色度值、TBA 值、pH 值、感官评分,结果见表 2。臭氧水处理时间对生鲜草鱼片 TBA 值、pH 值均无显著影响,对感官得分、色度值( $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 、 $W$ )、残菌数、减菌率均有显著影响( $P<0.05$ )。结合 2.1 节结果可知,臭氧水处理前、后对生鲜草鱼片 TBA 值无显著性影响,这与安玥琦等<sup>[19]</sup>的研究结果一致。然而,康凌<sup>[20]</sup>研究发现臭氧处理使鲭鱼的 TBA 值略有上升,这可能是由于草鱼与海水鱼鲭鱼相比是一种低脂鱼,脂肪含量少。pH 值是评价水产品品质的重要指标,结合 2.1 节结果可知,臭氧水处理对生鲜草鱼片 pH 值无显著影响。Zhao

等<sup>[21]</sup>研究臭氧水预处理对冷冻尼罗罗非鱼鱼片质量影响时发现,与对照组相比,臭氧水处理对肌肉 pH 值没有影响。相同的,Silva 等<sup>[22]</sup>研究了臭氧水处理对尼罗罗非鱼 pH 值的变化,结果发现臭氧水处理对鱼片的 pH 值没有影响。这证实了臭氧水处理未改变草鱼片早期 pH 值的变化。随着臭氧水处理时间的延长,生鲜草鱼片感官得分在 7.5 min 出现拐点,色度值波动变化,草鱼片中残菌数下降,减菌率上升,并逐渐变得不显著。孙继英等<sup>[6]</sup>研究不同质量浓度的臭氧水对军曹鱼片色泽影响时发现,臭氧水处理可以提高鱼片的白度及亮度。然而,Silva 等<sup>[22]</sup>等发现经质量浓度为(0.5,1.0,1.5 mg/L)臭氧水浸泡(5,10,15 min)过的尼罗罗非鱼显示出较低的  $L^*$ ,这可能是由于物种的生物学特性、生长条件、储存条件和它们所受的处理方式、方法等因素的影响造成差异<sup>[23]</sup>。综上,臭氧水处理

7.5 min 对于生鲜草鱼片的感官品质影响较小,且 数细菌。  
能达到 58.38%的减菌率,能够杀灭草鱼片中大多

表 2 臭氧水处理时间对生鲜草鱼片理化特性的影响

Table 2 Effects of ozonated water treatment time on the physicochemical properties of fresh grass carp fillets

指标	处理时间/min					
	0.0	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5
TBA 值/(mg/kg)	0.30 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>a</sup>
pH 值	6.70 ± 0.05 <sup>a</sup>	6.61 ± 0.30 <sup>a</sup>	6.65 ± 0.06 <sup>a</sup>	6.65 ± 0.01 <sup>a</sup>	6.70 ± 0.04 <sup>a</sup>	6.68 ± 0.01 <sup>a</sup>
<i>L</i> <sup>*</sup>	56.95 ± 1.08 <sup>b</sup>	60.66 ± 1.33 <sup>a</sup>	60.47 ± 1.89 <sup>a</sup>	59.57 ± 0.97 <sup>ab</sup>	57.93 ± 0.84 <sup>ab</sup>	58.24 ± 1.07 <sup>ab</sup>
<i>a</i> <sup>*</sup>	-1.67 ± 0.13 <sup>b</sup>	-1.35 ± 0.07 <sup>a</sup>	-1.34 ± 0.10 <sup>a</sup>	-1.46 ± 0.11 <sup>ab</sup>	-1.49 ± 0.14 <sup>ab</sup>	-1.63 ± 0.24 <sup>ab</sup>
<i>b</i> <sup>*</sup>	-1.30 ± 0.52 <sup>b</sup>	-1.84 ± 0.35 <sup>a</sup>	-1.33 ± 0.36 <sup>b</sup>	-2.11 ± 0.33 <sup>a</sup>	-1.84 ± 0.21 <sup>a</sup>	-1.67 ± 0.15 <sup>ab</sup>
<i>W</i>	56.89 ± 1.07 <sup>b</sup>	60.59 ± 1.31 <sup>a</sup>	60.42 ± 1.89 <sup>a</sup>	59.48 ± 0.93 <sup>ab</sup>	57.85 ± 0.89 <sup>ab</sup>	58.17 ± 1.07 <sup>ab</sup>
感官得分/分	18.07 ± 0.31 <sup>a</sup>	17.60 ± 0.72 <sup>a</sup>	17.13 ± 0.42 <sup>ab</sup>	17.27 ± 0.31 <sup>ab</sup>	16.27 ± 0.42 <sup>c</sup>	15.87 ± 0.46 <sup>c</sup>
残菌数/[lg(CFU/g)]	3.18 ± 0.06 <sup>a</sup>	3.05 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.92 ± 0.06 <sup>c</sup>	2.80 ± 0.03 <sup>cd</sup>	2.59 ± 0.07 <sup>de</sup>	2.57 ± 0.07 <sup>e</sup>
减菌率/%		26.60 ± 0.73 <sup>d</sup>	45.57 ± 0.12 <sup>c</sup>	58.38 ± 2.63 <sup>b</sup>	72.81 ± 2.49 <sup>a</sup>	75.40 ± 0.98 <sup>a</sup>

注:同一行字母不同表示有显著性差异( $P < 0.05$ )。

### 2.3 臭氧水处理工艺对生鲜草鱼片理化特性的影响

为优化臭氧水处理生鲜草鱼片减菌工艺,选用 10, 15, 20 mg/L 臭氧水于 10 °C 下淋洗草鱼片 5.0, 7.5, 10 min, 沥干 5 min 后无菌取样测定鱼片的菌落总数、色度值、感官评分,结果见表 3,两因素方差分析见表 4。臭氧水质量浓度对生鲜草鱼片的感官得分无显著影响,臭氧水处理时间对生

鲜草鱼片的感官得分有显著影响,且由表 3 可知随处理时间的延长呈下降趋势。臭氧水质量浓度和处理时间对生鲜草鱼片色度值、减菌效果均有显著影响,其中臭氧水质量浓度对二者影响更为显著。综上,综合考虑效益与成本,15 mg/L 臭氧水喷淋生鲜草鱼片 5 min 可以达到 80.66%的减菌率,且对感官品质的保持效果好,对鱼片的色度值影响小。

表 3 臭氧水处理工艺对生鲜草鱼片理化特性的影响

Table 3 Effects of ozonated water treatment technology on the physicochemical properties of fresh grass carp fillets

质量浓度/(mg/L)	时间/min	指标					
		感官得分/分	<i>L</i> <sup>*</sup>	<i>a</i> <sup>*</sup>	<i>b</i> <sup>*</sup>	<i>W</i>	减菌率/%
10	5.0	16.44 ± 0.52 <sup>Aa</sup>	52.06 ± 0.88 <sup>Aa</sup>	0.40 ± 0.20 <sup>Bb</sup>	-1.36 ± 0.35 <sup>Aa</sup>	52.04 ± 0.88 <sup>Aa</sup>	70.93 ± 4.35 <sup>Bb</sup>
	7.5	15.84 ± 0.90 <sup>Ab</sup>	52.76 ± 0.64 <sup>Aa</sup>	0.41 ± 0.15 <sup>Bb</sup>	-0.93 ± 0.39 <sup>Aa</sup>	52.75 ± 0.64 <sup>Aa</sup>	76.33 ± 4.36 <sup>Ab</sup>
	10.0	15.22 ± 0.33 <sup>Ab</sup>	52.84 ± 0.58 <sup>Aa</sup>	-0.16 ± 0.03 <sup>Ba</sup>	-1.43 ± 0.31 <sup>Ba</sup>	52.82 ± 0.59 <sup>Aa</sup>	78.74 ± 1.57 <sup>Aa</sup>
15	5.0	16.56 ± 0.50 <sup>Aa</sup>	50.64 ± 0.35 <sup>Ba</sup>	0.45 ± 0.12 <sup>Ba</sup>	-1.54 ± 0.37 <sup>Aa</sup>	50.62 ± 0.36 <sup>Ba</sup>	80.66 ± 3.15 <sup>Aa</sup>
	7.5	15.42 ± 0.40 <sup>Ab</sup>	52.13 ± 1.29 <sup>Aa</sup>	0.46 ± 0.2 <sup>Ba</sup>	-1.26 ± 0.31 <sup>Aa</sup>	52.11 ± 1.30 <sup>Aa</sup>	78.14 ± 3.15 <sup>Aa</sup>
	10.0	15.78 ± 0.26 <sup>Ab</sup>	52.25 ± 1.23 <sup>Aa</sup>	-0.2 ± 0.07 <sup>Bb</sup>	-2.2 ± 0.65 <sup>Ba</sup>	52.19 ± 1.26 <sup>Aa</sup>	83.33 ± 0.64 <sup>Aa</sup>
20	5.0	16.78 ± 0.24 <sup>Aa</sup>	50.46 ± 0.39 <sup>Bb</sup>	0.98 ± 0.35 <sup>Aa</sup>	-0.97 ± 0.23 <sup>Aa</sup>	50.44 ± 0.39 <sup>Bb</sup>	80.06 ± 3.02 <sup>Aa</sup>
	7.5	15.82 ± 0.26 <sup>Ab</sup>	50.95 ± 0.74 <sup>Ab</sup>	0.81 ± 0.32 <sup>Aa</sup>	-1.11 ± 0.51 <sup>Aa</sup>	50.94 ± 0.73 <sup>Ab</sup>	81.44 ± 2.29 <sup>Aa</sup>
	10.0	15.54 ± 0.50 <sup>Ab</sup>	52.86 ± 0.87 <sup>Aa</sup>	0.87 ± 0.39 <sup>Aa</sup>	-0.48 ± 0.33 <sup>Aa</sup>	52.85 ± 0.87 <sup>Aa</sup>	84.33 ± 5.86 <sup>Aa</sup>

注:大写字母不同表示不同质量浓度处理有显著性差异( $P < 0.05$ );小写字母不同表示不同处理时间有显著性差异( $P < 0.05$ )。

表4 方差分析表(F/P)  
Table 4 Variance analysis table (F/P)

因素	指标					
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$W$	感官得分	减菌率
臭氧水质量浓度	4.49/0.03	18.31/0.00	5.76/0.01	4.29/0.03	0.46/0.64	8.57/0.00
处理时间	7.65/0.00	6.12/0.00	0.57/0.58	7.65/0.00	13.51/0.00	4.22/0.03

为对优化后的臭氧水处理工艺的减菌效果进行验证,以不同采样时间的草鱼制作成的草鱼片为研究对象,采用15 mg/L臭氧水处理草鱼片5 min,无菌取样测定菌落总数,结果见表5。3种不同采样时间草鱼制作成的草鱼片初始菌数具有显著性差异,经臭氧水处理后减菌率均达到60%以

上,且初始菌数越高,减菌率越高。臭氧水的减菌效果因微生物种群、温度、pH值、食品表面特性和其它可氧化底物的存在而具有很大差异<sup>[24]</sup>。优化后的处理工艺平行性较好,可以有效杀灭生鲜鱼片中绝大多数的微生物,具有显著的减菌效果。

表5 不同采样时间生鲜草鱼片臭氧水处理前后菌落总数变化  
Table 5 Changes in the aerobic plate count of fresh grass carp fillets from different sources before and after ozonated water treatment

	菌落总数/[lg(CFU/g)]		减菌率/%
	处理前	处理后	
样本1	3.39 ± 0.05 <sup>Ab</sup>	2.88 ± 0.11 <sup>Bb</sup>	68.35 ± 4.85
样本2	3.07 ± 0.11 <sup>Ac</sup>	2.64 ± 0.07 <sup>Bc</sup>	62.76 ± 3.14
样本3	4.14 ± 0.12 <sup>Aa</sup>	3.56 ± 0.06 <sup>Ba</sup>	73.18 ± 4.84

注:同一行大写字母不同表示有显著性差异( $P < 0.05$ );同一列小写字母不同表示有显著性差异( $P < 0.05$ )。

## 2.4 臭氧水处理对不同采样时间生鲜草鱼片菌相的影响

2.4.1 传统分离培养结合16S rRNA鉴定 3种不同采样时间的草鱼制作成的草鱼片由于环境历程不同,初始菌相会存在差异,以其为研究对象,采用15 mg/L臭氧水处理草鱼片5 min后,利用传统分离培养结合16S rRNA鉴定技术分析PCA平板的菌株,研究臭氧水处理是否可以将不同来源生鲜鱼片初始菌相变得简单、差异减小。其中采样时间1草鱼片臭氧水处理前、后分离了67株和33株菌,采样时间2处理前、后分离了31株和14株菌,采样时间3处理前、后分离了95株和35株菌。具体菌相鉴定结果见表6。由表6可知,3种不同采样时间的草鱼片中共分离出分属于33个属的58种微生物,其中包含G<sup>-</sup>菌的20个属41种微生物,G<sup>+</sup>菌13个属17种微生物,这表明淡水鱼中微生物以耐冷的G<sup>-</sup>菌为主,谢晶等<sup>[25]</sup>和Wang等<sup>[22]</sup>也分别采用传统分离培养结合16S rRNA鉴定的方法在带鱼、草鱼初始菌相中发现G<sup>-</sup>菌的比

例较高。

3种不同采样时间草鱼片初始主要优势菌分别为约氏不动杆菌、米氏不动杆菌、酪酸半乳杆菌、伪假苍黄菌,水生丛毛单胞菌、睾丸酮丛毛单胞菌、中间气单胞菌,奥斯陆莫拉菌、约氏不动杆菌,表明初始菌相构成具有明显差异,证实以不同采样时间的草鱼作为不同来源的草鱼样本是可行的。经臭氧水处理后样本1草鱼片中微生物由23种变为11种,样本2由16种变为8种,样本3由15种变为6种,分离得到的微生物种类分别下降了52.17%,50.00%,60.00%,菌相趋于简单。曹荣等<sup>[26]</sup>采用臭氧处理牡蛎后也发现分离的菌株由75株变为37株,菌株种类由17种变为5种,菌相变得简单。采样时间1草鱼片经臭氧水处理后约氏不动杆菌、米氏不动杆菌、伪假苍黄菌初始主要优势菌下降甚至消失,初始占比较少的沙质嗜冷杆菌、阿尔本斯不动杆菌、凯斯特拉南极细菌等微生物消失,沃氏葡萄球菌、表皮葡萄球菌、陆生假杆菌等微生物占比上升,特别是葡萄球菌属微生物,

成为占比最高的优势菌属。样本 2 草鱼片经臭氧水处理后水生丛毛单胞菌、鞣丸酮丛毛单胞菌、人参土石面单胞菌等初始主要优势菌下降甚至消失,佐氏库特氏菌、中间气单胞菌、维氏气单胞菌等微生物占比上升。样本 3 草鱼片经臭氧水处理后奥斯陆莫拉菌等初始主要优势菌下降,里波尔气单胞菌、粪球短波单胞菌、布兰尼金黄杆菌等占比较少的微生物消失,约氏不动杆菌、寄鱼不动杆菌等微生物占比上升。综合不同采样时间草鱼片臭氧水处理前后菌相变化可知,不耐受臭氧的微生物,如样本 1 鱼片中约氏不动杆菌、米氏不动杆菌、伪假苍黄菌等微生物,样本 2 菌相中水生丛毛单胞菌、鞣丸酮丛毛单胞菌、人参土石面单胞菌等

微生物,样本 3 菌相中奥斯陆莫拉菌、里波尔气单胞菌、粪球短波单胞菌等微生物被杀灭,从而使臭氧水处理后草鱼片菌相变得简单。3 种不同的草鱼片经臭氧水处理后 G<sup>+</sup>菌占比分别由 41.79%, 12.9%, 1.05% 上升到 69.69%, 21.43%, 11.43%。这表明臭氧水具有广谱杀菌作用,对于鱼片中的所有微生物均可致死,而 G<sup>+</sup>菌比 G<sup>-</sup>菌更耐受臭氧。Restaino 等<sup>[27]</sup>研究表明,单核细胞增生李斯特菌等 G<sup>+</sup>菌比 G<sup>-</sup>菌(大肠杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌)对水相中的臭氧暴露更耐受。这可能是由于 G<sup>+</sup>菌的细胞壁中肽聚糖含量较高,对其起到保护作用。

表 6 臭氧水处理前、后生鲜草鱼片菌相变化

Table 6 Microflora changes of fresh grass carp fillets before and after ozonated water treatment

	相似菌株编号	样本 1		样本 2		样本 3		
		臭氧处理前占比/%	臭氧处理后占比/%	臭氧处理前占比/%	臭氧处理后占比/%	臭氧处理前占比/%	臭氧处理后占比/%	
<b>革兰氏阴性 不动杆菌属(Acinetobacter)</b>								
(G <sup>-</sup> )菌	约氏不动杆菌( <i>Acinetobacter johnsonii</i> )	APON01000005	26.87	21.21	—	—	12.63	25.71
	阿尔本斯不动杆菌( <i>Acinetobacter albensis</i> )	jgi.1102388	2.99	—	—	—	—	—
	米氏不动杆菌( <i>Acinetobacter oryzae</i> )	GU954428	10.45	3.03	—	—	—	—
	植物原体不动杆菌( <i>Acinetobacter plantarum</i> )	KM598254	1.49	—	—	—	—	—
	蛋白溶解性不动杆菌 ( <i>Acinetobacter proteolyticus</i> )	KB849179	—	—	—	—	2.11	—
	秋水仙碱不动杆菌 ( <i>Acinetobacter colistinire-sistens</i> )	KE340374	—	—	—	—	2.11	—
	寄鱼不动杆菌( <i>Acinetobacter piscicola</i> )	MF062566	—	—	—	—	—	8.57
	莫德斯托斯不动杆菌 ( <i>Acinetobacter modes-tus</i> )	KT997474	—	—	—	—	—	2.86
<b>气单胞菌属(Aeromonas)</b>								
	中间气单胞菌( <i>Aeromonas media</i> )	CDBZ01000012	—	—	9.68	21.43	—	—
	维氏气单胞菌( <i>Aeromonas veronii</i> )	CDDK01000015	—	—	3.23	14.29	—	—
	里波尔气单胞菌( <i>Aeromonas rivipollensis</i> )	FR775967	—	—	3.23	0.00	1.05	—
	异常嗜糖气单胞菌 ( <i>Aeromonas allosaccharophila</i> )	CDBR01000068	—	—	6.45	7.14	—	—
	嗜水气单胞菌( <i>Aeromonas hydrophila</i> )	CP000462	—	—	—	—	1.05	—
<b>短波单胞菌属(Brevundimonas)</b>								
	粪球短波单胞菌( <i>Brevundimonas faecalis</i> )	FR775448	—	—	—	—	1.05	—
<b>金黄杆菌属(Chryseobacterium)</b>								
	啤酒神金黄杆菌( <i>Chryseobacterium gambrini</i> )	jgi.1096583	—	—	3.23	—	—	—
	鱼腥金黄杆菌( <i>Chryseobacterium piscicola</i> )	jgi.1096589	—	—	—	14.29	—	—
	布兰尼金黄杆菌( <i>Chryseobacterium buanense</i> )	FJ1713810	—	—	—	—	1.05	—

(续表 6)

	相似菌株编号	样本 1		样本 2		样本 3	
		臭氧 处理 前占 比/%	臭氧 处理 后占 比/%	臭氧 处理 前占 比/%	臭氧 处理 后占 比/%	臭氧 处理 前占 比/%	臭氧 处理 后占 比/%
<b>丛毛单胞菌属(Comamonas)</b>							
水生丛毛单胞菌( <i>Comamonas aquatica</i> )	BBJR01000095	—	—	19.35	—	—	—
睾丸酮丛毛单胞菌( <i>Comamonas testosteroni</i> )	AHIL01000001	—	—	9.68	—	—	—
<b>石面单胞菌属(Epilithonimonas)</b>							
人参土石面单胞菌( <i>Epilithonimonas hominis</i> )	jgi.1096633	—	—	6.45	—	2.11	—
西班牙石面单胞菌 ( <i>Epilithonimonas hispanica</i> )	QNUG01000096	—	—	—	—	1.05	—
<b>短穗杆菌属(Empedobacter)</b>							
假短穗杆菌( <i>Empedobacter falsenii</i> )	AM084341	—	—	3.23	—	—	—
<b>黄杆菌属(Flavobacterium)</b>							
粒状黄杆菌( <i>Flavobacterium granuli</i> )	jgi.1107693	—	—	3.23	14.29	—	—
<b>凯斯特拉菌属(Kaistella)</b>							
凯斯特拉南极细菌( <i>Kaistella antarctica</i> )	JPEP01000002	1.49	—	—	—	—	—
<b>莫拉氏菌属(Moraxella)</b>							
奥斯陆莫拉菌( <i>Moraxella osloensis</i> )	CP014234	—	—	—	—	69.47	48.57
<b>奥托氏菌属(Ottowia)</b>							
北京奥托氏菌( <i>Ottowia beijioensis</i> )	KC755038	1.49	—	—	—	—	—
<b>嗜冷杆菌属(Psychrobacter)</b>							
沙质嗜冷杆菌( <i>Psychrobacter arenosus</i> )	AJ609273	4.48	—	—	—	—	—
近海生嗜冷杆菌( <i>Psychrobacter maritimus</i> )	AJ609272	1.49	—	—	—	—	—
肺嗜冷杆菌( <i>Psychrobacter pulmonis</i> )	AJ437696	—	—	—	—	1.05	—
<b>假单胞菌属(Pseudomonas)</b>							
产氮假单胞菌( <i>Pseudomonas azotoformans</i> )	MNPV01000020	—	—	—	—	1.05	—
副黄假单胞菌( <i>Pseudomonas parafulva</i> )	BBIU01000051	—	3.03	—	—	0.00	—
膝形假单胞菌( <i>Pseudomonas geniculata</i> )	AB021404	—	—	—	7.14	0.00	—
栖麦假单胞菌( <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> )	BBIT01000012	—	—	3.23	—	—	—
<b>希瓦氏菌属(Shewanella)</b>							
栖水鱼希瓦氏菌( <i>Shewanella glacialis piscicola</i> )	AB205571	4.48	3.03	—	—	—	—
以科希瓦氏菌( <i>Shewanella oneidensis</i> )	AE014299	—	—	6.45	—	—	—
<b>申氏菌属(Shinella)</b>							
动胶菌样申氏菌( <i>Shinella zoogloeoides</i> )	X74915	1.49	—	—	—	—	—
<b>寡养单胞菌属(Stenotrophomonas)</b>							
嗜麦芽寡养单胞菌 ( <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> )	JALV01000036	—	—	—	—	1.05	—
<b>鞘脂单胞菌属(Sphingomonas)</b>							
棕榈鞘氨醇单胞菌( <i>Sphingomonas palmae</i> )	KX893410	—	—	—	—	2.11	2.86
<b>乌拉布拉菌属(Uruburuella)</b>							
水氏乌拉布拉菌( <i>Uruburuella suis</i> )	AJ586614	—	—	3.23	—	—	—
<b>福格斯氏菌属(Vogesella)</b>							
透明籍福氏菌( <i>Vogesella perlucida</i> )	EF626691	—	—	6.45	—	—	—
<b>嗜异生质菌属(Xenophilus)</b>							
砷质嗜异生质菌( <i>Xenophilus arseniciresistens</i> )	KC010298	1.49	—	—	—	—	—



(续表 6)

	相似菌株编号	样本 1		样本 2		样本 3	
		臭氧处理前占比/%	臭氧处理后占比/%	臭氧处理前占比/%	臭氧处理后占比/%	臭氧处理前占比/%	臭氧处理后占比/%
<b>革兰氏阳性 (G+) 菌</b>							
<b>气单胞菌属 (<i>Aerococcus</i>)</b>							
马尿气球菌 ( <i>Aerococcus urinaequi</i> )	CP014162	—	3.03	—	—	—	—
<b>芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>)</b>							
暹罗芽孢杆菌 ( <i>Bacillus siamensis</i> )	AJVF01000043	2.99	3.03	—	—	—	—
<b>迪茨氏菌属 (<i>Dietzia</i>)</b>							
气雾迪茨氏菌 ( <i>Dietzia aerolata</i> )	FM995533	1.49	—	—	—	—	11.43
<b>半乳杆菌属 (<i>Galactobacter</i>)</b>							
酪酸半乳杆菌 ( <i>Galactobacter caseinivorans</i> )	QQXL01000012	10.45	15.15	—	—	—	—
<b>库特氏菌属 (<i>Kurthia</i>)</b>							
佐氏库特氏菌 ( <i>Kurthia zopfii</i> )	AB271740	—	—	—	14.29	—	—
<b>考克氏菌属 (<i>Kocuria</i>)</b>							
牛膝考克氏菌 ( <i>Kocuria tytonicola</i> )	CP022039	—	—	—	—	1.05	—
<b>乳球菌属 (<i>Lactococcus</i>)</b>							
鱼乳球菌 ( <i>Lactococcus piscium</i> )	DQ343754	2.99	3.03	—	—	—	—
棉子糖乳球菌 ( <i>Lactococcus raffinolactis</i> )	BCVN01000061	1.49	—	—	—	—	—
<b>苍黄球菌属 (<i>Luteococcus</i>)</b>							
假本苍黄球菌 ( <i>Luteococcus japonicus</i> )	RKHG01000001	1.49	—	—	—	—	—
<b>微杆菌属 (<i>Microbacterium</i>)</b>							
草木春微杆菌 ( <i>Microbacterium caowuchunii</i> )	MG234279	1.49	—	—	—	—	—
<b>假苍黄菌属 (<i>Pseudoclawibacter</i>)</b>							
伪假苍黄菌属 ( <i>Pseudoclawibacter helvolus</i> )	X77440	8.96	—	—	—	—	—
陆生假杆菌 ( <i>Pseudoclawibacter terrae</i> )	KJ769174	1.49	9.09	—	—	—	—
<b>红球菌属 (<i>Rhodococcus</i>)</b>							
佐氏红球菌 ( <i>Rhodococcus qiosheoi</i> )	LRRJ01000016	1.49	—	—	—	—	—
<b>罗斯氏菌属 (<i>Rothia</i>)</b>							
陆生罗斯氏菌 ( <i>Rothia terrae</i> )	DQ822568	—	—	6.45	—	—	—
<b>葡萄球菌属 (<i>Staphylococcus</i>)</b>							
表皮葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus epidermidis</i> )	UHDF01000003	5.97	9.09	—	—	—	—
沃氏葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus warneri</i> )	L37603	1.49	27.27	—	—	—	—
巴氏葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus pasteurii</i> )	AF041361	—	—	6.45	7.14	—	—

注:属名加粗且按首字母排序;“—”表示平板中未发现。

## 2.4.2 高通量测序

2.4.2.1 菌群多样性分析 为进一步对臭氧水处理前、后草鱼片中可培养及不可培养微生物进行比较全面研究,利用高通量测序技术研究臭氧水处理前、后生鲜草鱼片菌相变化。表 7 展示了不同采样时间草鱼片的测序信息及  $\alpha$  多样性指数。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。3 种不同采样时间的草鱼片经臭氧水处理后 Shannon、Chao1、ACE 均显著下降,Simpson 均显著上升,这说明 3 种不同采样时间草鱼片经臭氧水处理后群落多样性及丰富度显著下降。这主要是由于臭氧水杀死草鱼片中大多数微生物,致使微生物的数量下降,

种类减少。其它学者应用不同减菌处理方法处理水产鱼类时也发现类似的现象。吴永祥等<sup>[28]</sup>采用高通量测序技术研究超高压处理对臭鳊鱼群落结构的影响,结果发现,相比于对照组,超高压处理

后的臭鳊鱼细菌群落多样性显著降低。刘慧<sup>[29]</sup>研究电解水处理对草鱼微生物多样性的影响,结果发现电解水处理后显著降低了草鱼肉上的物种总数和物种丰富度。

表7 不同采样时间草鱼片的测序信息及 $\alpha$ 多样性指数

Table 7 Sequencing information and  $\alpha$  diversity index of grass carp fillets from different sampling time

采样时间	类别	OTU	Shannon	Simpson	Chao1	ACE	测序深度指数
1	FCK	183 ± 21 <sup>a</sup>	2.77 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>b</sup>	273.63 ± 3.71 <sup>a</sup>	313.2 ± 39.52 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.00
	FOZ	129 ± 16 <sup>b</sup>	2.59 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>a</sup>	162.30 ± 21.24 <sup>b</sup>	178.46 ± 8.93 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.00
2	SCK	76 ± 5 <sup>a</sup>	1.17 ± 0.30 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.07 <sup>b</sup>	127.99 ± 21.43 <sup>a</sup>	145.81 ± 5.56 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.00
	SOZ	36 ± 6 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.70 ± 0.02 <sup>a</sup>	78.83 ± 10.14 <sup>b</sup>	118.65 ± 1.26 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.00
3	TCK	57 ± 3 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.03 <sup>b</sup>	88.12 ± 7.47 <sup>a</sup>	144.92 ± 22.13 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.00
	TOZ	37 ± 6 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.69 ± 0.07 <sup>a</sup>	58.05 ± 8.14 <sup>b</sup>	71.99 ± 9.15 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.00

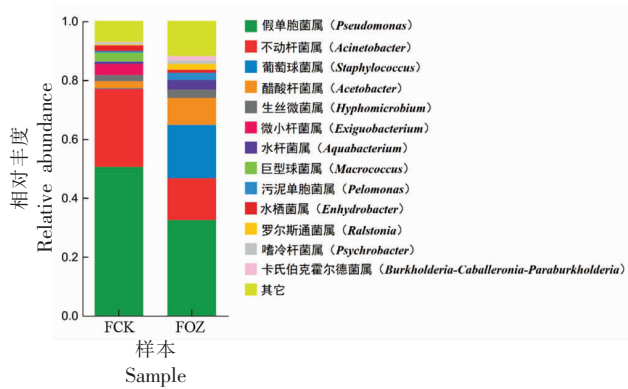
注:不同小写字母表示臭氧水处理前、后草鱼片有显著性差异;FCK、SCK、TCK 分别表样本 1、2、3 臭氧水处理前草鱼片;FOZ、SOZ、TOZ 分别表示样本 1、2、3 臭氧水处理后草鱼片。

2.4.2.2 菌群构成分析 图1显示的是属水平上的不同采样时间草鱼片臭氧水处理前、后细菌相对丰度,统计分析时将相对丰度<1%的物种归为其它。由图1可知,样本1草鱼片主要优势菌为假单胞菌属、不动杆菌属等微生物,样本2为红球菌属、拉乌尔菌属等微生物,样本3为红球菌属、不动杆菌属、拉乌尔菌属等微生物,这表明虽然不同采样时间草鱼片在初始菌相构成及相对丰度上存在差异,与传统分离鉴定得出的菌相具有明显差异结果一致,但不同采样时间草鱼片也有一定相似性。

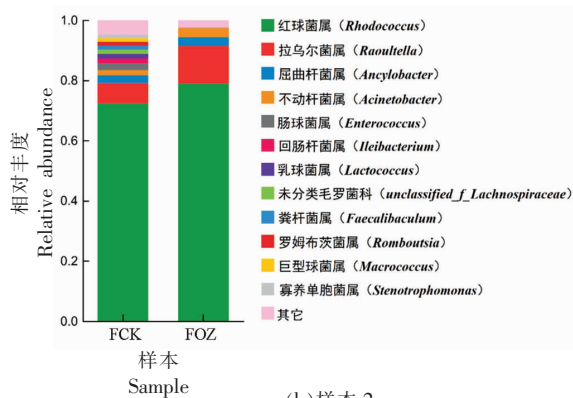
由图1a可知,样本1草鱼片经臭氧水处理后假单胞菌属、不动杆菌属等细菌的相对丰度下降,葡萄球菌属、醋酸杆菌属等相对丰度上升。由图1b可知,样本2草鱼片经臭氧水处理后红球菌属、拉乌尔菌属等相对丰度上升,初始相对丰度低的肠球菌属、回肠杆菌属等微生物相对丰度<1%。由图1c可知,样本3草鱼片经臭氧水处理后不动杆菌属、拉乌尔菌属等微生物经臭氧水处理后相对丰度下降,红球菌属、屈曲杆菌属等微生物相对丰度上升。综上,不同采样时间草鱼片经臭氧水处理后G<sup>+</sup>菌的占比均有所上升,如样本1葡萄球菌属、醋酸杆菌属等微生物的相对丰度上升,样本2与样本3的G<sup>+</sup>菌红球菌属等微生物的相对丰度上升,这与传统分离结合16S rRNA鉴定得出G<sup>+</sup>菌更耐受臭氧结果一致。高通量测序测得菌相构成

结果与上述传统分离结合16S rRNA鉴定得出菌相构成结果具有差异性,如由高通量测序技术测得样本2、样本3臭氧水处理前的草鱼片中占比最高的为占比最高菌属为红球菌属,而传统分离结合16S rRNA鉴定得出样本2、样本3草鱼片中占比最高的菌分别为水生丛毛单胞菌、奥斯陆莫拉菌。差异的主要原因可能是草鱼片菌相中有较多的不可培养微生物(Viable but non-culture)以及传统分离方法不能完全随机挑取菌落,导致挑取的菌落无法准确反应整个微生物群体。高通量测序技术通过提取细菌DNA进行测序,可以检出更多的不可培养的微生物,更全面的分析菌相,曹荣等<sup>[30]</sup>比较了传统纯培养方法与高通量测序方法测得牡蛎菌相的结果,发现高通量测序的研究结果更加全面地反映了牡蛎体附着微生物的物种组成及丰度信息。高通量测序技术不能区分活菌和死菌<sup>[31]</sup>,也不能像传统分离结合16S rRNA技术一样对菌相中微生物较准确的鉴定到种水平。因此,采用2种菌相研究方法得出的结果具有差异,而二者结合可以更全面研究臭氧水处理对生鲜草鱼片菌相影响。

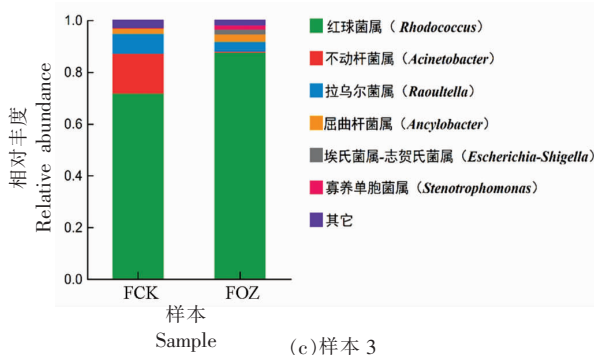
2.4.2.3 菌群构成差异分析 主坐标轴分析(PCoA)是一种降维分析方法,第1主成分(PC1)和第2成分(PC2)的贡献率越大说明主要成分可以较好的反映原来多指标的信息。由图2a可知,PC1为80.72%,PC2为14.41%,PC1和PC2共解



(a) 样本 1



(b) 样本 2



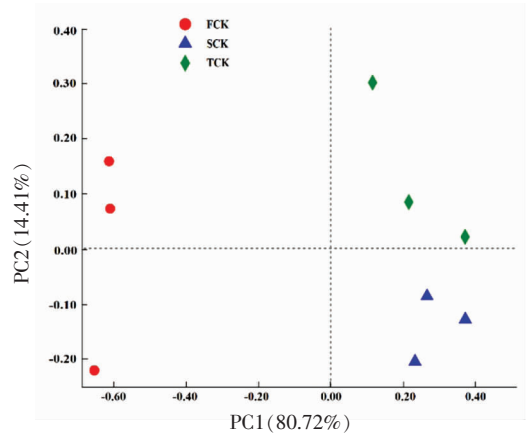
(c) 样本 3

注:FCK,SCK,TCK 分别表示样本 1,2,3 臭氧水处理前草鱼片; FOZ,SOZ,TOZ 分别表示样本 1,2,3 臭氧水处理后草鱼片。

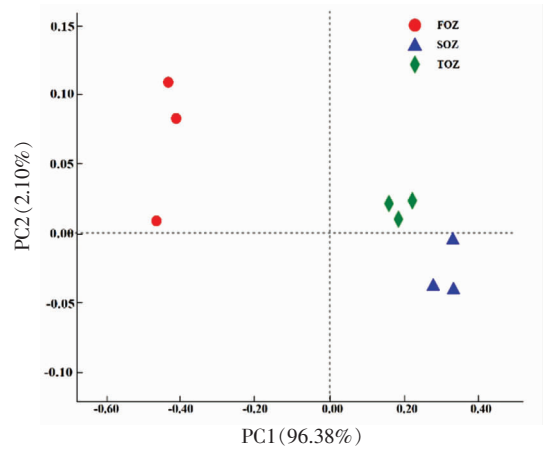
图 1 臭氧水处理对不同采样时间生鲜草鱼片属水平菌相影响

Fig.1 Effects of ozonated water treatment on the microflora of fresh grass carp fillets from different sampling time at genus level

释了 95.13%的数据差异。FCK,SCK,TCK 组草鱼片均未聚到一起,表明不同采样时间草鱼片初始菌相具有明显差异,其中 TCK 和 SCK 组草鱼片在



(a) 处理前



(b) 处理后

注:FCK,SCK,TCK 分别表示样本 1,2,3 臭氧水处理前草鱼片; FOZ,SOZ,TOZ 分别表示样本 1,2,3 臭氧水处理后草鱼片。

图 2 臭氧水处理前、后不同采样时间生鲜草鱼片属水平 PCoA 图

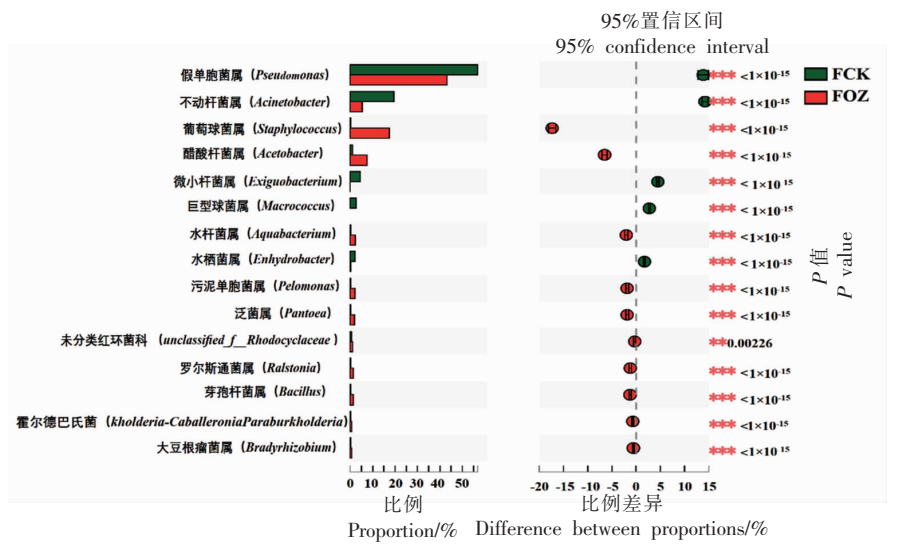
Fig.2 PCoA of fresh grass carp fillets from different sampling time before and after ozonated water treatment at genus level

PC2(14.41%)上距离较远,在 PC1(80.72%)上距离近,TCK 和 SCK 与 FCK 在 PC1(80.72%)上相距较远,表明 TCK 和 SCK 的菌群结构有一定相似性,而与 FCK 的相似度低。由图 2b 可知,PC1 为 96.38%,PC2 为 2.1%,PC1 和 PC2 共解释了 98.48%的数据差异,从整体来看,FOZ,SOZ,TOZ 组草鱼片均未聚到一起,而相比处理前,FOZ,SOZ,TOZ 组草鱼片的各自生物学重复样本变得更集中,且 FOZ,SOZ,TOZ 组草鱼片在 PC1 和 PC2 上距离变得更近,特别是在可解释 96.38%数据差异的 PC1 上,FOZ 与 SOZ 和 TOZ 组草鱼片的距离变得更

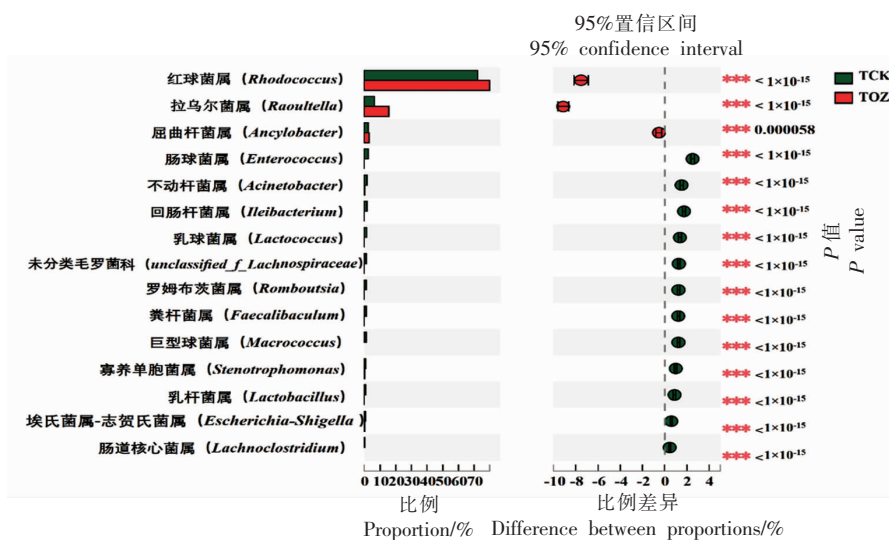
近,以上结果表明相比于臭氧水处理前的草鱼片,臭氧水处理使不同采样时间草鱼片菌群结构变得更相似。其中 TOZ、SOZ 组草鱼片变得更集中,表明初始菌相相似度高的样本,经臭氧水处理后菌相组成变得相似程度更高。

图 3 显示的是 3 种不同采样时间草鱼片臭氧水处理前、后相对丰度排名前 15 菌属的显著性检验结果。由图 3 可知,3 种不同采样时间草鱼片臭氧水处理前、后在相对丰度前 15 的菌属上均具有显著性差异。样本 1 草鱼片臭氧水处理后假单胞

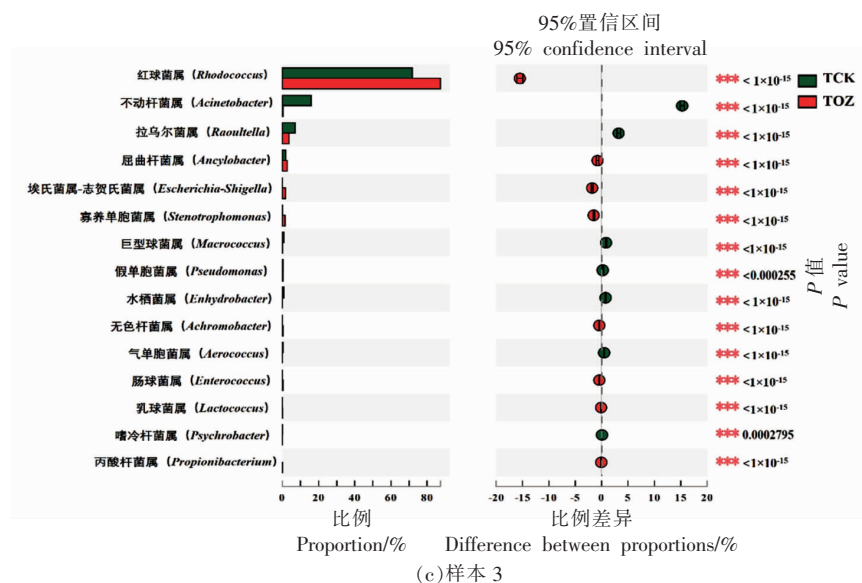
菌属、不动杆菌属等微生物显著减少,葡萄球菌属、醋酸杆菌属等微生物显著增加。样本 2 草鱼片臭氧水处理后肠球菌属、不动杆菌属等微生物显著减少,红球菌属、拉乌尔菌属等微生物显著增加,样本 3 草鱼片臭氧水处理后不动杆菌属等微生物显著减少,红球菌属等微生物显著增加,臭氧水处理前、后草鱼片的菌相差异主要体现在优势菌属的相对丰度上。结果表明了草鱼片中不同微生物对臭氧耐受性不同,臭氧水处理显著改变了草鱼片的菌相构成。



(a) 样本 1



(b) 样本 2



注: FCK, SCK, TCK 分别表示样本 1、2、3 臭氧水处理前草鱼片; FOZ, SOZ, TOZ 分别表示样本 1、2、3 臭氧水处理后草鱼片。

图 3 不同采样时间草鱼片臭氧水处理前、后属水平的菌群差异的显著性检验

Fig.3 Significance tests for differences in bacterial at the genus level before and after ozonated water treatment of grass carp fillets from different sampling time

### 3 结论

臭氧水处理对生鲜草鱼片的菌相有显著影响。随着臭氧水质量浓度升高和处理时间延长, 生鲜草鱼片的残菌数减少、减菌率显著提高, 处理后其菌相发生显著改变。采用 15 mg/L 的臭氧水喷淋处理生鲜草鱼片 5 min, 减菌率达 80.66%, 可显著改变生鲜草鱼片的菌相构成, 而不影响其理化品质。采用 15 mg/L 的臭氧水喷淋处理生鲜草鱼片 5 min 后, 生鲜草鱼片菌相中耐受臭氧的 G<sup>+</sup>菌如葡萄球菌属、醋酸杆菌属、红球菌属等微生物残留下来, 不耐受臭氧的假单胞菌属、不动杆菌属等微生物被杀灭, 微生物多样性和丰富度显著下降, 初始菌相具有显著差异的不同采样时间草鱼片菌相相似程度提高。

### 参 考 文 献

- [1] YI B, XU H. Research and development status of prepared foods in China: A review[J]. Applied Sciences, 2023, 13(14): 7998.
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2023: 2-3. Fisheries and Fisheries Administration of the Min-

istry of Agriculture and Rural Affairs. China fishery statistical yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022: 2-3.

- [3] SHENG L N, WANG L X. The microbial safety of fish and fish products: Recent advances in understanding its significance, contamination sources, and control strategies[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20: 738-786.
- [4] KIM J G, YOUSEF A E. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone [J]. Journal of Food Science, 2000, 65(3): 521-528.
- [5] BRODOWSKA A J, NOWAK A, ŚMIGIELSKI K. Ozone in the food industry: Principles of ozone treatment, mechanisms of action, and applications: An overview[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(13): 2176-2201.
- [6] 孙继英, 吴燕燕, 杨贤庆, 等. 臭氧水对军曹鱼片的减菌效果和品质的影响[J]. 南方水产科学, 2013, 9(6): 66-71. SUN J Y, WU Y Y, YANG X Q, et al. Sterilization and quality effects of ozone water on cobia fillets[J]. South China Fisheries Science, 2013, 9(6): 66-71.
- [7] 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.

- ZHONG Z H. The effects of and control of fat oxidation and protein oxidation on the grass carp by bacteria reduction processing[D]. Wuhan: Huazhong Agriculture University, 2015.
- [8] 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.
- [9] CROWE K M, SKONBERG D, BUSHWAY A, et al. Application of ozone sprays as a strategy to improve the microbial safety and quality of salmon fillets[J]. *Food Control*, 2012, 25(2): 464-468.
- [10] 肖淑婷, 尹涛, 胡杨, 等. 臭氧漂洗过程中鱼肉组分溶出及其对鱼糜品质的影响[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(12): 155-163.
- XIAO S T, YIN T, HU Y, et al. Dissolution of fish components during ozone water rinsing and its effect on the quality of surimi[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(12): 155-163.
- [11] HAO R Y, LIU Y, SUN L M, et al. Sodium alginate coating with plant extract affected microbial communities, biogenic amine formation and quality properties of abalone (*Haliotis discus hannai Ino*) during chill storage[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 81: 1-9.
- [12] WANG H, LUO Y K, HUANG H P, et al. Microbial succession of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) filets during storage at 4 °C and its contribution to biogenic amines formation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 190: 66-71.
- [13] CHUN J, LEE J H, JUNG Y, et al. EzTaxon: A web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57: 2259-2261.
- [14] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [15] 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.
- [16] 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.
- ZHAO L J, GU W R, XIONG S B, et al. Ozone treatment technology of grass carp slices[J]. *Food Science*, 2010, 31(24): 14-18.
- [17] 郝淑贤, 何俊燕, 李来好, 等. 臭氧水对罗非鱼片色泽影响分析[J]. *食品科学*, 2013, 34(13): 50-53.
- HAO S X, HE J Y, LI L H, et al. Effect of ozone water on color of tilapia fillets[J]. *Food Science*, 2013, 34(13): 50-53.
- [18] MUHLISIN M, UTAMA D T, LEE J H, et al. Effects of gaseous ozone exposure on bacterial counts and oxidative properties in chicken and duck breast meat[J]. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2016, 3: 405-411.
- [19] 安玥琦, 郭丹婧, 贾磊, 等. 臭氧水浓度对鲮鱼头减菌效果及鲜度品质的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(11): 4571-4577.
- AN Y Q, GUO D J, JIA L, et al. Effects of ozone water on sterilization pretreatments and freshness quality of bighead carp heads [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2015, 6(11): 4571-4577.
- [20] 康凌. 冷冻鲭鱼的抑菌和抗氧化技术研究[D]. 宁波: 浙江工业大学, 2012.
- KANG L. Study on the technology of antibacterial and antioxidation of frozen mackerel [D]. Ningbo: Zhejiang University of Technology, 2012.
- [21] ZHAO Y Q, YANG X Q, LI L H, et al. Chemical, microbiological, color and textural changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets sterilized by ozonated water pretreatment during frozen storage [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2016, 41: e12746.
- [22] 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: 7.
- [23] ERIKSON U, MISIMI E. Atlantic salmon skin and fillet color changes effected by perimortem handling stress, rigor mortis, and ice storage[J]. *Journal of Food Science*, 2008, 73: C50-C59.
- [24] 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: 1242-1252.
- [25] 谢晶, 刘骁, 杨茜, 等. PCR结合表型鉴定对超高压处理后的冷藏带鱼细菌菌相分析[J]. *农业工程学报*, 2016, 32(5): 307-314.

- XIE J, LIU X, YANG Q, et al. Microbial ecology of *Trichiurus lepturus* of haitail pretreated by high hydrostatic pressure during cold storage based on phenotypic and 16S rRNA gene analysis[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2016, 32(5): 307-314.
- [26] 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, 27(5): 63-65.
- CAO R, XUE C H, XUE Y, et al. Effects of ozonated water on bacterial phase and shelf life of oysters[J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 27(5): 63-65.
- [27] RESTAINO L, FRAMPTON E W, HEMPHILL J B, et al. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(9): 3471-3475.
- [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, 43(7): 81-87.
- WU Y Y, WANG Y, YUAN D X, et al. Effect of ultra high pressure on the changes of bacterial community structure and quality of stinky mandarin fish [J]. Food Science, 2022, 43(7): 81-87.
- [29] 刘慧. 微酸性电解水对草鱼冷藏期间保鲜效果影响的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021.
- LIU H. Effect of the slightly acidic electrolyzed water on preservation of grass carp during the chilling storage[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2021.
- [30] 曹荣, 张井, 孟辉辉, 等. 高通量测序与传统纯培养方法在牡蛎微生物群落分析中的应用对比[J]. 食品科学, 2016, 37(24): 137-141.
- CAO R, ZHANG J, MENG H H, et al. Microbial flora analysis of oyster: A comparison between traditional plate culture method and high throughput sequencing[J]. Food Science, 2016, 37(24): 137-141.
- [31] 张昭寰, 姜阳, 杜苏萍, 等. 分子生物学技术在预测微生物学中的应用与展望[J]. 食品科学, 2017, 38(9): 248-257.
- ZHANG S H, LOU Y, DU S P, et al. Application and prospects of molecular biology techniques in predictive microbiology: A review[J]. Food Science, 2017, 38(9): 248-257.

### Effects of Ozonated Water Treatment on Physicochemical Properties and Initial Microflora of Fresh Grass Carp Fillets

Xu Guodong<sup>1,3</sup>, Xiong Shanbai<sup>1,2,3</sup>, Yin Tao<sup>1,2,3</sup>, Liu Ru<sup>1,3</sup>, Huang Zenan<sup>1,3</sup>, Ren Yangying<sup>1,3</sup>, You Juan<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070

<sup>2</sup>China Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education, Wuhan 430070

<sup>3</sup>National R&D Branch Center for Conventional Fresh Water Fish Processing (Wuhan), Wuhan 430070

**Abstract** In order to explore the effects of ozonated water treatment on the initial microflora of fresh grass carp fillets from different sources, fresh grass carp fillets at different sampling times were used as raw materials to determine the total viable count (TVC), thiobarbituric acid (TBA), pH value, chroma and sensory score, and to study the effects of different parameters of ozonated water treatment on the physicochemical properties of fresh grass carp fillets, so as to optimize the treatment conditions. The optimized conditions were used to treat fresh grass carp fillets, and the changes in the microflora of fresh grass carp fillets before and after ozonated water treatment were investigated using traditional isolation culture combined with 16S rRNA identification and high-throughput sequencing. The results showed that with the increase of ozonated water treatment mass concentration and treatment time, the number of residual bacteria and the rate of bacterial reduction of fresh grass carp fillets improved significantly and the microflora changed significantly after treatment ( $P<0.05$ ). Ozonated water treatment mass concentration and treatment time had no significant effect ( $P>0.05$ ) on TBA and pH of fresh grass carp fillets, but had a significant effect ( $P<0.05$ ) on colour values. In terms of sensory scores, ozonated water treatment mass concentration had no effect, but treatment time had a significant effect and sensory quality decreased significantly with extended treatment time. After treatment of fresh grass carp fillets with 15 mg/L o-

zonated water spray for 5 min, the bacterial species of the three different sampling time of fresh grass carp fillets decreased by 52.17%, 50.00% and 60.00%, respectively, the bacterial diversity decreased significantly ( $P < 0.05$ ) and the proportion of Gram-positive ( $G^+$ ) bacteria increased. The results of the principal co-ordinates analysis showed that the degree of similarity in the microflora of grass carp fillets from different sampling time increased after ozonated water treatment. In conclusion, the treatment of raw grass carp fillets with 15 mg/L ozonated water for 5 min resulted in a reduction rate of 80.66%, and the microflora of fresh grass carp fillets at different sampling time became simple and similar after the treatment.

**Keywords** ozonated water; grass carp fillets; initial microflora; physicochemical characteristics