

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240208005

基于高通量测序分析干条斑紫菜及海苔的 细菌多样性与优势菌

江 珊^{1,2}, 李 娜², 戴卫平³, 郭莹莹², 黄宇川³, 姚 琳², 朱文嘉²,
曲 梦², 江艳华^{2*}, 王联珠^{2*}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266520; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所
农业农村部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 青岛 266071; 3. 江苏省紫菜协会, 南通 226007)

摘 要: **目的** 探究干条斑紫菜与其加工产品——海苔的细菌多样性与优势菌, 分析海苔产品菌落总数超标的原因。**方法** 采用平板计数法对干条斑紫菜及海苔产品的菌落总数进行测定, 同时通过高通量测序对总细菌菌群及可培养细菌菌群进行分析。**结果** 干条斑紫菜加工成海苔后, 菌落总数略有下降, 高温烘烤的杀菌效果不明显。干条斑紫菜与海苔样本中总细菌菌群均以蓝细菌(*Cyanobacteria_Chloroplast*)为主, 加工前后总细菌菌群结构变化不大; 不同来源的干条斑紫菜样品可培养细菌菌群结构有所差异, 主要有巨型球菌(*Macrococcus*)、水栖菌(*Enhydrobacter*)、异常球菌(*Deinococcus*)、不动杆菌(*Acinetobacter*)、金黄杆菌(*Chryseobacterium*)等, 经过加工后, 可培养细菌菌群多样性下降, 海苔样本均以巨型球菌为优势菌。**结论** 本研究揭示了干条斑紫菜及海苔的细菌多样性及优势菌属, 为进一步探究烤紫菜产品菌落总数的控制技术奠定基础。

关键词: 海苔; 干条斑紫菜; 菌落总数; 高通量测序; 细菌多样性; 优势菌

Analysis of bacterial diversity and dominant bacteria in dried *Neopyropia yezoensis* and roasted laver using high-throughput sequencing

JIANG Shan^{1,2}, LI Na², DAI Wei-Ping³, GUO Ying-Ying², HUANG Yu-Chuan³,
YAO Lin², ZHU Wen-Jia², QU Meng², JIANG Yan-Hua^{2*}, WANG Lian-Zhu^{2*}

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266520, China; 2. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. The Laver Association of Jiangsu Province, Nantong 226007, China)

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金资助项目(CARS-50)、国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(32061133008)、中国水产科学研究院基本科研业务费资助项目(2023TD76)

Fund: Supported by the China Agriculture Research System (CARS-50), the National Natural Science Foundation of China International (Regional) Cooperation and Exchange Programs (32061133008), and the the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2023TD76)

***通信作者:** 江艳华, 高级工程师, 主要研究方向为水产品生物危害物风险评估与控制。E-mail: jiangyh@ysfri.ac.cn

王联珠, 研究员, 主要研究方向为水产品质量安全与标准化。E-mail: wanglz@ysfri.ac.cn

***Corresponding author:** JIANG Yan-Hua, Senior Engineer, Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, No.106, Nanjing Road, Shinan District, Qingdao 266071, China. E-mail: jiangyh@ysfri.ac.cn

WANG Lian-Zhu, Professor, Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, No.106, Nanjing Road, Shinan District, Qingdao 266071, China. E-mail: wanglz@ysfri.ac.cn

ABSTRACT: Objective To explore the bacterial diversity and dominant bacteria of dried *Neopyropia yezoensis* and its processed products-roasted laver. Analyze the reasons for the excessive total bacterial count in roasted laver products. **Methods** The aerobic plate count of dried *Neopyropia yezoensis* and roasted laver products were measured using the plate counting method, and the total bacterial community and culturable bacterial community were analyzed through high-throughput sequencing. **Results** After processing dried *Neopyropia yezoensis* into roasted laver products, the aerobic plate count slightly decreased, and the sterilization effect of high-temperature roasting was not significant. The total bacterial community in dried *Neopyropia yezoensis* and roasted laver products is mainly composed of *Cyanobacteria*. And there is little change in the structure of the total bacterial community before and after processing. The culturable bacterial community structure of dried *Neopyropia yezoensis* samples from different sources varies, mainly including *Macrococcus*, *Enhydrobacter*, *Deinococcus*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, and so on. After processing, the diversity of cultivable bacterial communities decreases. And the roasted laver samples were dominated by *Macrococcus*. **Conclusion** This study reveals the bacterial diversity and dominant bacteria of dried *Neopyropia yezoensis* and roasted laver products, laying the foundation for further exploration of the control technology for the total bacterial count of roasted laver products.

KEY WORDS: roasted laver; dried *Neopyropia yezoensis*; aerobic plate count; high-throughput sequencing; diversity of bacterial community; dominant bacteria

0 引言

条斑紫菜,红毛藻科紫菜属植物,是我国重要的经济海藻之一,产值占我国紫菜总值的一半左右,其养殖主要集中在江苏省沿海,山东省沿海也有少量^[1-2]。条斑紫菜是一种优质海藻食品,富含蛋白质、膳食纤维、维生素、多糖等营养物质^[3]。新鲜条斑紫菜在采收之后,经过过去杂清洗、脱水、切菜、调和、浇饼脱水、一次干燥、二次干燥等工艺加工成为干条斑紫菜。再以干条斑紫菜作为原料,经过烤制、调味、切割等二次加工工艺制成各种原味烤紫菜和调味烤紫菜产品。原味烤紫菜,又称寿司紫菜,是将干条斑紫菜不添加任何调味料直接经过烘烤加工成的深绿色产品;调味烤紫菜则是将干条斑紫菜通过烘烤、添加各种调味料、再次烘烤而成的产品,口感更加丰富,是生活中常见的一种即食休闲食品,也称海苔。海苔产品作为一种即食紫菜制品,味道鲜美,有益健康,在中国、日本、韩国等亚洲国家以及很多西方国家广受欢迎^[4-5]。在我国,GB 19643—2016《食品安全国家标准 藻类及其制品》中对即食藻类制品的菌落总数有限量规定,但近几年,海苔产品出现了菌落总数超标的现象^[6-7],引发了公众的关注。菌落总数是用来判定食品被污染程度的一项指标,可以反映加工、储藏等过程中食品及环境的卫生状况^[8-9]。前期有研究表明,海苔产品的微生物主要来自于作为原料的干条斑紫菜,干条斑紫菜的微生物数量在很大程度上会影响海苔产品的菌落总数^[10]。经过调研发现,海苔产品因菌落总数超标而不能出厂,给企业带来了较大的经济损失。因此,有必要对海苔产品加工前后菌落总数和细菌菌群结构的变化情况进行分析,探究合适的控制方法,有效地降低海苔产

品的菌落总数。

目前最常用的食品微生物检测方法主要是传统培养法,但自然界中绝大多数微生物无法通过实验室培养分离获得,传统的分离培养鉴定方法仅能检测到少量优势菌,无法对样品中的微生物结构组成进行完整的分析^[11-12]。16S 扩增子高通量测序技术作为新一代分子生物学技术,是一种非培养分析法,它克服了传统培养法的局限性,可以直接从样品 DNA 中确定微生物的种类和相对丰度,从而客观地分析出食品中微生物群落的结构及时空动态变化,效率与准确度高,在食品微生物多样性、群落结构变化以及功能微生物的研究中发挥着重要作用^[13-15]。

本研究以菌数偏高的干条斑紫菜以及对应加工得到的海苔作为研究对象,采用平板计数法对加工前后菌落总数的变化规律进行分析,同时,采用 16S 扩增子测序技术对样品的总细菌菌群与可培养细菌菌群的结构特征变化进行分析,探究海苔产品在加工前后细菌的变化规律及优势菌,为解析海苔产品菌落总数超标的原因、建立产品的细菌控制技术、提高食用安全性提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

干条斑紫菜:来自江苏省不同地区不同企业的 10 份菌落总数偏高的样品,编号分别定为 G1、G2、G3、G4、G5、G6、G7、G8、G9、G10;海苔:由每批干条斑紫菜经过高温烘烤(200~300℃烘烤 8~30 s)、添加酿造酱油、白砂糖加工而成,编号分别定为 H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10。

平板计数琼脂、磷酸盐缓冲液(北京陆桥技术股份有限公司); E.Z.N.A™ Mag-Bind Soil DNA Kit(美国 Omega 公司); Qubit dsDNA HS 分析试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 2×Hieff® Robust PCR Master Mix、Hieff NGSTM DNA Selection Beads(中国 Yeasen 公司)。

1.2 仪器与设备

Pico-21 台式离心机、Q33238 Qubit® 4.0 荧光计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BG-power600 电泳仪(北京百晶生物); Infinity 3000 凝胶成像系统(法国 Vilber Lourmat 公司); ETC 811 PCR 仪(北京东胜创新生物科技有限公司); MiSeq 高通量测序仪(美国 Illumina 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌落总数的测定

按照 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》进行测定。

1.3.2 细菌多样性分析

(1)宏基因组 DNA 的提取

使用 E.Z.N.A™ Mag-Bind 土壤 DNA 试剂盒对样本进行总基因组 DNA 抽提,使用琼脂糖凝胶电泳和 Qubit 4.0 测定 DNA 浓度与完整性。

(2)可培养细菌基因组 DNA 的提取

样品进行菌落总数测定时,吸取适宜 10 倍梯度稀释液各 100 μL 涂布 PCA 平板,36℃培养 48 h±2 h。用磷酸盐缓冲液收集平板上所有菌落,8000 r/min 离心 10 min,弃去上清,用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,沉淀用 E.Z.N.A™ Mag-Bind 土壤 DNA 试剂盒提取基因组 DNA,即为样品的可培养细菌基因组 DNA。

(3)PCR 扩增与高通量测序

DNA 提取后进行 PCR 扩增。采用 2 轮 PCR 扩增方法,将建库过程融入 PCR 过程,第一轮采用两种通用引物(正向引物 CCTACGGGNGGCWGCAG 与反向引物 GACTACHVGGGTATCTAATCC)对 16S rRNA 基因的 V3-V4 可变区进行扩增,第一轮 PCR 扩增体系: 2×Hieff® Robust PCR Master Mix 15 μL,正反向引物各 1 μL,模板 10~20 ng,超纯水补充至 30 μL。PCR 反应条件为 95℃预变性 3 min,5 个循环(94℃变性 20 s,55℃退火 20 s,72℃延伸 30 s),72℃延伸 5 min,10℃保温。

第二轮引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物进行扩增。第二轮 PCR 扩增体系: 2×Hieff® Robust PCR Master Mix 15 μL,正反向引物各 1 μL,模板 20~30 ng,超纯水补充至 30 μL。反应条件: 95℃预变性 3 min,5 个循环(94℃变性 20 s,55℃退火 20 s,72℃延伸 30 s),72℃延伸 5 min,最后 10℃保存。PCR 扩增后,通过 2%琼脂糖凝胶电泳检测文库大小,使用 Qubit4.0 荧光定量仪进行浓度测定,所有样本按照 1:1 等量混合后依托生工生物工程(上海)股份有限公司的 Illumina MiSeq 测序平台进行高通量测序。

(4)测序数据分析

测序后得到的原始序列数据,使用 Cutadapt^[16]去除引物接头序列,根据 PE reads 之间的 overlap 关系使用 PEAR^[17]将成对 reads 拼接成一条序列,最后对各样本数据的质量进行质控过滤,得到各样本的有效数据。之后采用软件 Usearch^[18]进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)分析,并利用软件 Mothur^[19]计算 Chao、Ace、Shannon、Simpson、Coverage 指数进行 Alpha 多样性指数分析,利用 R 软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)与主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA),使用 R 的 hclust 函数构建聚类树,并利用 ape^[20] package 绘制树状图进行层级聚类分析,采用 RDP classifier^[21]软件对 97%相似度水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,并在门和属水平统计各个样品的菌群组成。

2 结果与分析

2.1 干条斑紫菜与海苔产品的菌落总数分析

10 份干条斑紫菜与其相对应的海苔产品的菌落总数如表 1 所示。10 份干条斑紫菜样品的菌落总数均较高,均在 6.00 lg CFU/g 以上,其中,干条斑紫菜 G3 的菌数最高,为 7.45 lg CFU/g。所有干条斑紫菜在加工成为海苔后,菌落总数均有所下降。其中,G6 样本经过烤制后,菌数下降幅度最大,下降了 1.71 lg CFU/g;其次为 G10 样本与 G3 样本,均下降了 1.66 lg CFU/g。干条斑紫菜 G8 在烤制之后,菌落总数没有明显变化,仅下降了 0.22 lg CFU/g;G1 样本的菌数下降了 0.50 lg CFU/g,下降幅度也较小。

表 1 干条斑紫菜与对应海苔产品的菌落总数(lg CFU/g)
Table 1 Aerobic plate count of dried *Neopyropia yezoensis* and the corresponding laver products (lg CFU/g)

干条斑紫菜		海苔产品		差值
G1	6.71±0.21	H1	6.21±0.39	0.50
G2	6.86±0.13	H2	5.60±0.51	1.26
G3	7.45±0.13	H3	5.79±0.19	1.66
G4	6.91±0.32	H4	5.89±0.44	1.02
G5	6.50±0.44	H5	5.65±0.46	0.85
G6	6.74±0.23	H6	5.03±0.41	1.71
G7	6.71±0.16	H7	5.89±0.28	0.82
G8	6.52±0.44	H8	6.30±0.18	0.22
G9	6.86±0.06	H9	6.05±0.50	0.81
G10	6.97±0.15	H10	5.31±0.76	1.66

2.2 细菌多样性分析

2.2.1 Alpha 多样性分析

对样品的 Alpha 多样性指数进行统计,结果见表 2 和表 3。所有样本的 Coverage 指数均大于 0.99,说明测序结

表 2 干条斑紫菜与对应海苔产品的总细菌菌群多样性指数
Table 2 Diversity indexes of total bacterial community of dried *Neopyropia yezoensis* and the corresponding laver products

样品	Number	OTUs	Chao	Ace	Shannon	Simpson	Coverage
G1	56611	145	198.000000	198.478378	0.147976	0.967014	0.99>
G2	50597	129	172.384615	181.924696	0.141789	0.967716	0.99>
G3	60295	154	221.777778	226.649734	0.184643	0.954843	0.99>
G4	46030	121	197.555556	189.437388	0.136651	0.969149	0.99>
G5	54749	132	169.600000	187.098927	0.140376	0.968026	0.99>
G6	48535	127	191.565217	235.849873	0.138780	0.968541	0.99>
G7	50656	129	160.935484	179.282994	0.191628	0.950624	0.99>
G8	44771	117	149.620690	193.724389	0.144180	0.967495	0.99>
G9	47570	142	175.176471	186.643959	0.182844	0.956467	0.99>
G10	50626	134	210.250000	263.798818	0.162145	0.961383	0.99>
H1	48778	148	247.047619	285.932112	0.202500	0.950071	0.99>
H2	42911	171	216.750000	232.069515	0.336667	0.903538	0.99>
H3	35088	135	201.500000	244.780862	0.193023	0.954246	0.99>
H4	43222	155	243.440000	235.835279	0.204383	0.950450	0.99>
H5	51522	176	251.115385	239.045490	0.252838	0.937465	0.99>
H6	47749	163	266.884615	320.586988	0.193657	0.953658	0.99>
H7	48119	163	220.096774	224.258696	0.182806	0.958574	0.99>
H8	52440	159	258.400000	253.493105	0.229208	0.941517	0.99>
H9	41398	133	180.357143	194.059840	0.164185	0.961617	0.99>
H10	47857	159	249.230769	248.203104	0.233980	0.941151	0.99>

表 3 干条斑紫菜与对应海苔产品的可培养细菌菌群多样性指数
Table 3 Diversity indexes of culturable bacterial community of dried *Neopyropia yezoensis* and the corresponding laver products

样品	Number	OTUs	Chao	Ace	Shannon	Simpson	Coverage
G1c	49802	101	140.000000	184.998827	0.28642	0.914513	0.99>
G2c	50632	116	140.391304	150.009013	0.899792	0.578669	0.99>
G3c	39393	120	153.066667	146.106413	1.832125	0.221658	0.99>
G4c	40080	113	185.066667	214.208321	0.851665	0.600316	0.99>
G5c	45025	108	164.894737	178.444166	0.734425	0.674817	0.99>
G6c	47750	125	164.000000	158.617056	0.912023	0.557829	0.99>
G7c	44971	126	155.640000	164.298747	1.301855	0.376521	0.99>
G8c	47746	87	122.769231	150.332798	0.756898	0.560124	0.99>
G9c	35127	108	126.600000	135.761803	1.865585	0.223916	0.99>
G10c	56962	128	153.161290	163.987114	1.158233	0.384753	0.99>
H1c	54446	92	121.062500	126.241281	0.205021	0.948249	0.99>
H2c	47237	95	116.136364	129.040835	0.400681	0.854388	0.99>
H3c	45829	84	113.000000	140.935999	0.544821	0.788179	0.99>
H4c	42655	86	142.100000	160.137215	0.215539	0.945083	0.99>
H5c	41364	93	128.000000	135.953302	0.198259	0.950394	0.99>
H6c	49952	84	115.000000	143.955255	0.800512	0.552660	0.99>
H7c	48081	98	153.500000	142.707030	0.218576	0.944095	0.99>
H8c	48218	130	181.041667	230.616245	0.886692	0.519790	0.99>
H9c	35668	87	129.500000	170.590602	0.208753	0.947332	0.99>
H10c	41818	84	132.000000	125.283422	0.717837	0.677841	0.99>

果足以覆盖样本中大多数细菌,测序结果可信。通过计算干条斑紫菜与海苔样本的总细菌菌群 Alpha 指数(表2)发现,10 份干条斑紫菜样本中,有 8 份经过加工后 OTUs 数增多,物种丰富度升高,而干条斑紫菜 G3 与 G9 在加工后 OTUs 数下降,总细菌菌群丰富度降低。大多数干条斑紫菜样本在加工成为海苔产品后,Chao 指数与 Ace 指数上升,总细菌菌群丰富度升高;并且 Shannon 指数上升, Simpson 指数下降,总细菌菌群多样性也有所上升。而干条斑紫菜 G7 与 G9 在烤制后,Shannon 指数下降, Simpson 指数上升,总细菌菌群多样性降低。

由表 3 所示,对于干条斑紫菜与海苔产品可培养细菌菌群的 Alpha 多样性指数,除 H8 样本外,其他 9 份海苔样本与干条斑紫菜样本相比,OTUs 数都有明显的减少,说明菌群丰富度降低。多数干条斑紫菜加工成为海苔产品后,Chao 指数、Ace 指数与 Shannon 指数有所下降, Simpson 指数上升,可培养细菌菌群的丰富度与多样性均有所下降。而干条斑紫菜 G8 在加工后 Chao 指数与 Ace 指数上升,并且 Shannon 指数上升, Simpson 指数下降,菌群丰富度与多样性均有所升高。海苔产品 H9 与干条斑紫菜 G9 相比,Chao 指数与 Ace 指数略有上升,可培养细菌菌群丰富度升高。

2.2.2 基于属水平的细菌菌群结构分析

根据 OTU 分析结果,对测序数据在属水平上进行分类学分析,计算每个样本相对丰度占比,结果如图 1 所示。干条斑紫菜与海苔产品的宏基因组测序结果显示,所有样品均以蓝细菌(*Cyanobacteria_Chloroplast*)为主,占比在 95%以上,而其他菌属的占比均低于 1%。干条斑紫菜经过加工成为海苔产品后,总细菌菌群中巨型球菌(*Macrococcus*)的占比略有增多,由原来的 0.31%~0.42%增长到 0.52%~1.16%。异常球菌(*Deinococcus*)在所有干条斑

紫菜样本的总细菌菌群中占比均低于 0.1%,而经过加工后,其占比有小幅度的上升,其中在 H2、H5、H8 3 份海苔产品中的占比分别增多至 0.56%、0.47%和 0.58%。

对所有样品的可培养细菌菌群结构进行分析,结果与总细菌菌群有很大差异。所有干条斑紫菜中均检测出占比较大的巨型球菌和异常球菌,但 10 份样本的优势菌组成和比例均有所不同。G1、G2、G4、G5、G6、G8、G10 7 份干条斑紫菜样本均以巨型球菌为主要优势菌,占比均超过 50%; G7 样本中水栖菌(*Enhydrobacter*)表现出相对优势丰度,占比达 55.27%; G3 样本的可培养细菌菌群丰度最高,莫拉氏菌科(*unclassified_Moraxellaceae*)占比最大,为 33.69%,其次为异常球菌和不动杆菌(*Acinetobacter*),占比分别为 23.19%和 21.95%,在该样本中还检测出了 8.70%的考克氏菌(*Kocuria*)、4.89%的巨型球菌以及 1.99%的假单胞菌(*Pseudomonas*),而假单胞菌在其他干条斑紫菜样本中几乎没有检出; G9 样本的可培养细菌菌群结构也较为丰富,优势菌为不动杆菌和金黄杆菌(*Chryseobacterium*),占比分别为 41.33%和 34.72%,另外占比较大的还有水栖菌(7.62%)、巨型球菌(5.31%)、考克氏菌(4.67%)和异常球菌(4.45%)。

干条斑紫菜经过加工后,可培养细菌菌群多样性显著降低,10 份海苔产品均以巨型球菌为主要优势菌。所有海苔样本与干条斑紫菜样本相比,异常球菌的占比均有所下降,不动杆菌的相对丰度占比均降至很低甚至 0%。经过烤制等加工过程,所有海苔样本中莫拉氏菌、假单胞菌与金黄杆菌的占比几乎都降至 0%。干条斑紫菜 G3 加工成为海苔产品 H3 后,菌群丰富度显著下降,其中多种菌属占比降为 0%。H5 样本中嗜冷菌(*Psychrobacter*)由原来的 8.87%降至 0%。G3、G6、G7、G9、G10 5 份干条斑紫菜样本中的水栖菌与考克氏菌在加工后的海苔产品中占比均降至

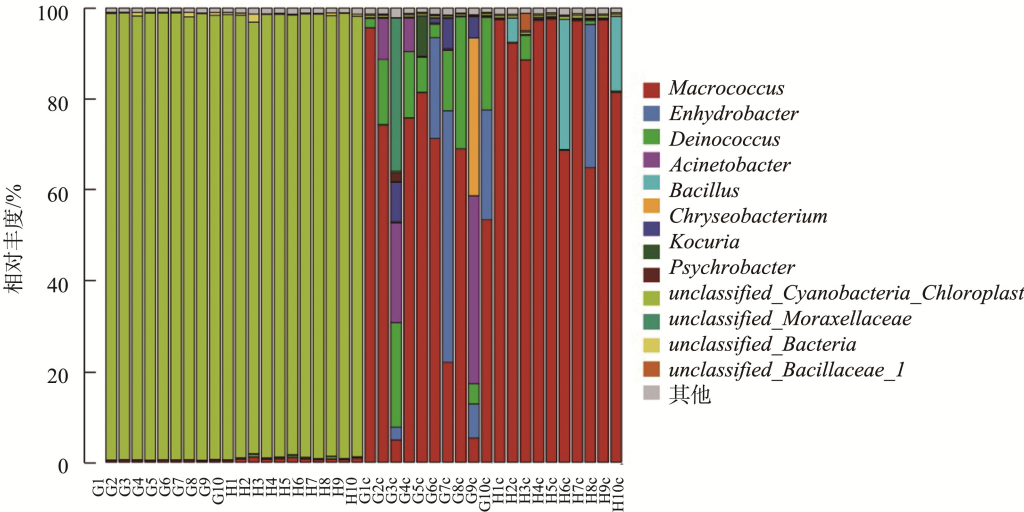


图1 总细菌菌群与可培养细菌菌群属水平物种分布柱状图
Fig.1 Barplot of total bacterial communities and cultivable bacterial communities distribution at the genus level

0.01%以下。芽孢杆菌(*Bacillus*)在所有干条斑紫菜样品中占比均低于 1%, 而经过加工后呈现出上升趋势, 尤其是在 H2、H6、H10 样本中占比分别达到 5.32%、28.62%和 16.39%。另外, 干条斑紫菜 G8 的可培养细菌菌群中水栖菌占比低于 0.01%, 但经过加工后, 水栖菌显著增多, 在 H8 样本中占比达到了 31.44%。

2.2.3 Beta 多样性分析

Beta 多样性主要用来反映样品的微生物组成相似程度^[22]。PCA 可以直观显示不同样本中微生物群落的相似性和差异性, 判断样本之间群落结构是否相近。PCoA 分析是一种研究数据相似性或差异性的可视化方法, 可以观察个体或群体间的差异。在 PCA 分析与 PCoA 分析中, 样品中的菌群越相似, 则样品间的距离越接近。由图 2 和图 3 可知, 所有样品的总细菌菌群与可培养细菌菌群有较大差异。所有干条斑紫菜样本与海苔样本的总细菌菌群样本距离十分相近, 菌群结构相似程度高。对样品的可培养细菌菌群进行分析, 10 份干条斑紫菜样本较为分散, 菌群结构组成各不相同。经过烤制后, H1c、H4c、H5c、H7c 与 H9c 5 个样本有明显的聚集, 可培养细菌菌群结构十分相似。G1c 与 H1c 两个样本之间的距离很近, 说明该干条斑紫菜在经过加工后, 菌群结构变化不大。而 G3c、G7c、与 G9c 样本在经过烤制之后, 样本位置变化比较大, 相应的海苔样本与之距离较远, 说明可培养细菌菌群结构在经过加工后发生了明显的变化。

距离树状图能直观地反映样本微生物组成的差异与相似关系, 越相似的样本之间的共同分支越短。从图 4 可以看出, 样品的可培养细菌菌群与总细菌菌群在属水平上为两个不同分支的簇, 菌群结构差异显著。对样品的总细菌菌群结构进行分析, 所有干条斑紫菜与海苔样本之间的

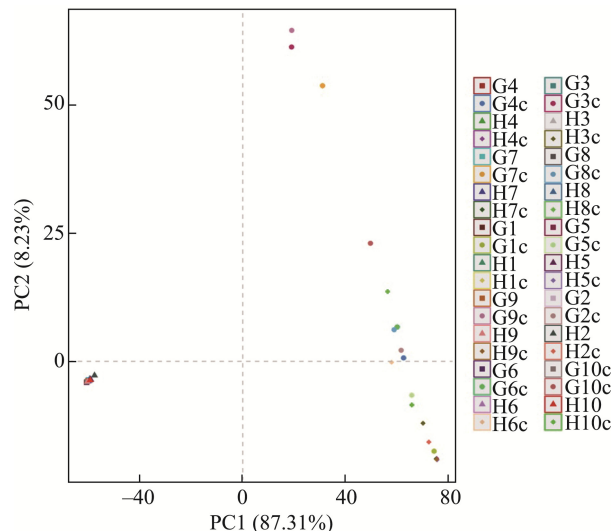


图2 可培养细菌菌群与总细菌菌群属水平的PCA分析
Fig.2 PCA analysis of culturable bacterial community and total bacterial flora at the genus level

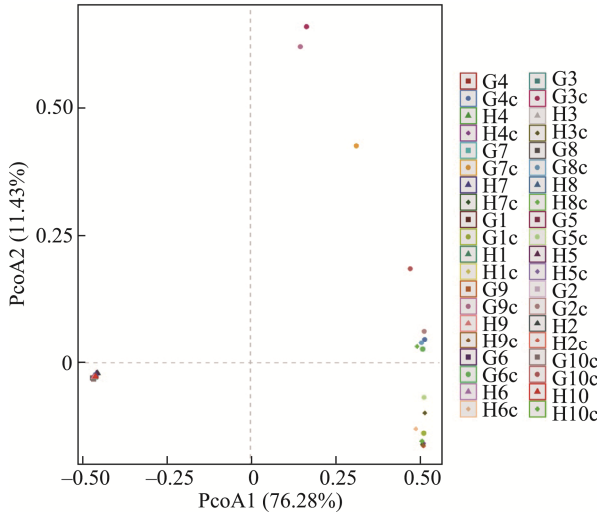


图3 可培养细菌菌群与总细菌菌群属水平的PCoA分析
Fig.3 PCoA analysis of culturable bacterial community and total bacterial flora at the genus level

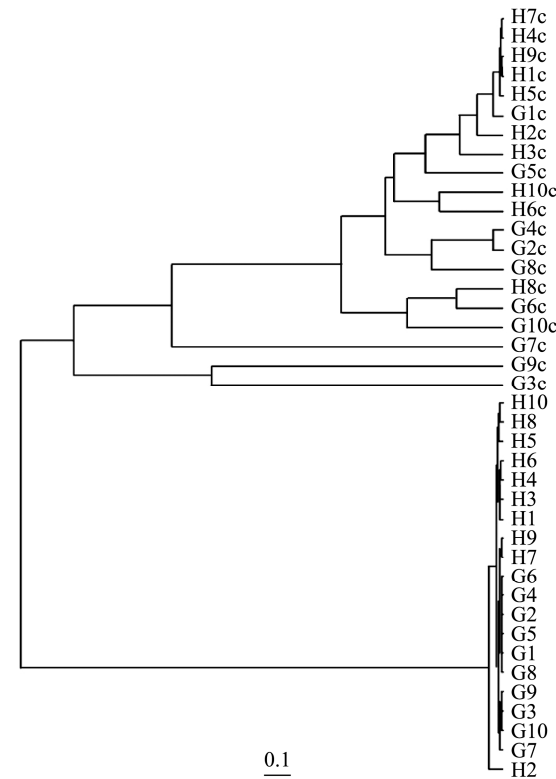


图4 总细菌菌群与可培养细菌菌群属水平的样本距离树状图
Fig.4 Tree diagram of distance of total bacterial communities and culturable bacterial communities at the genus level

分支均很短, 菌群组成没有较大差异。从样品的可培养细菌菌群分析来看, H1c与G1c之间的分支较短, 加工前后菌群结构变化不大。而 G3c与H3c、G7c与H7c、G9c与H9c之间较长的分支, 这 3 份干条斑紫菜经过加工之后, 可培养细菌菌群结构变化较大。此外, H1c、H4c、H5c、H7c

与 H9c 5 个样本之间分支很短,说明这 5 份海苔产品的可培养细菌菌群结构相似程度较高。

3 讨论与结论

条斑紫菜是世界上重要的大型经济红藻,我国是主要的条斑紫菜生产国,目前我国已形成了较为完整的条斑紫菜产业化体系。以条斑紫菜为原料加工成原味烤紫菜和调味烤紫菜的即食食品,市面上比较流行的有寿司烤紫菜、调味海苔、夹心海苔等,以香脆可口、营养丰富、食用方便的特点创造了巨大的经济价值。但近几年发现海苔产品存在菌落总数超标的问题^[6-7]。本研究采用传统培养法与高通量测序技术分析干条斑紫菜在经过烤制等加工工艺成为海苔产品后菌群结构与优势菌变化规律,探究海苔产品菌数超标的原因及安全风险,以便进一步研究具有针对性的微生物控制方法。

本研究对干条斑紫菜加工成为海苔后菌落总数的变化情况进行了探究,结果显示,所有干条斑紫菜样品在加工成为海苔产品后,菌落总数均有所下降;但下降幅度很小,说明 200~300℃ 的高温烘烤没有明显的杀菌效果。一般情况下,100℃ 以上的高温可使多数细菌致死^[23],但干条斑紫菜在二次加工过程中,高温烘烤仅 8~30 s,时间太短,对微生物的杀灭效果可能不够彻底。此外,有研究表明,微生物在低水分活度食品中耐热性增强^[24-26],干条斑紫菜在烘烤时,水分活度降低,可能提高了部分菌属的耐热性能,使其在高温状态下仍可存活,因此杀菌效果有限,菌落总数得不到大幅度的降低。本试验所用的干条斑紫菜样品菌数偏高,加工得到的海苔产品菌落总数均超过了食品安全国家标准规定的 3×10^4 CFU/g 的限量要求。干条斑紫菜属于初级农产品,我国并没有明确的菌落总数限量标准,但从研究结果中可以看出,菌数偏高的干条斑紫菜加工得到的海苔产品超标的概率较大。本研究中的海苔是一种调味烤紫菜,其在加工过程中,会加入酿造酱油、白砂糖进行调味。这些配料的加入,虽然会引入其他微生物,但其菌落总数很低,对海苔产品的菌落总数不会造成明显影响,在进行可培养菌群分析时几乎收集不到来自这些配料的菌落。

随着高通量测序技术的广泛应用,其在食品微生物研究和食源性疾病监控等方面发挥着越来越重要的作用。该技术相较于传统的细菌分离培养方法,操作简便,耗时短,增加了测序的深度和覆盖度,可检出不可培养的细菌与低丰度微生物。本研究通过宏基因组结合高通量测序技术对所有干条斑紫菜样品和海苔样品的总细菌组成进行分析,结果发现,所有样品的总细菌菌群中蓝细菌表现出绝对的丰度优势,且烤制加工后菌群结构变化不大,只有个别菌属出现小幅度的增多。蓝细菌分布十分广泛,对不良环境的具有较强抵抗能力^[27-28]。干条斑紫菜中携带的蓝细

菌经过二次加工的高温短时烘烤,表现出一定的耐受性,在海苔样品中仍占比很高。

菌落总数指标反映的是样本中的可培养细菌,因此本研究还对干条斑紫菜与海苔产品进行平板分离培养结合高通量测序分析样品的可培养细菌菌群结构,探究导致菌落总数超标的优势菌。虽然不同细菌在琼脂平板上的菌落大小会稍有差异,提取平板上菌落的基因组 DNA 不能准确反映样品中各种细菌的比例,但该方法省时省力,可以粗略估算它们的相对丰度,具有参考价值。实验结果显示,干条斑紫菜的可培养细菌菌群结构与总细菌菌群有明显差异。10 份干条斑紫菜样品来自不同地区的不同加工企业,储藏时间也有所不同,可培养细菌菌群结构呈现出一定的差异性。10 份干条斑紫菜中均检出了占比较大的异常球菌,异常球菌分布及适应范围广泛,对辐射、干旱、高温等极端环境具有一定抗性^[29-30]。在高温胁迫过程中,异常球菌主要通过分子伴侣和蛋白酶组成的蛋白质量控制系统、膜蛋白和转运系统以及多个代谢途径保护细胞免受损伤^[31-32]。经过高温烘烤之后,海苔产品中可培养细菌菌群的丰富度和多样性显著降低,说明部分菌属在高温中失去活性。但所有海苔样品中仍检测出较高丰度的巨型球菌,推测巨型球菌对高温环境具有一定的耐受性,但具体耐受机制还有待研究。巨型球菌在很大程度上被认为是动物共生菌,但有研究发现,巨型球菌会引发水产动物的细菌性疾病^[33-34]。另外,个别样本中芽孢杆菌在烤制后明显增多,可能是在加工过程中受到了污染。芽孢杆菌广泛分布于土壤、空气、水体等环境中,是一种可以产芽孢的耐热菌,一般对哺乳动物无害,可作为人和动物的益生菌^[35]。在杀菌过程中,应把这些优势菌作为首要的考虑因素。从结果中也可以看出,海苔样品中大多数细菌菌属主要来自于烤制所用的干条斑紫菜原料,虽然这些菌均为海产品或加工环境常见的共生菌,对人体健康的危害较小,但也不容忽视,为了降低海苔产品的菌落总数,有效地控制干条斑紫菜中的微生物也十分重要。

本研究分析了干条斑紫菜加工成为海苔后菌落总数的变化情况,同时揭示了干条斑紫菜在加工前后细菌菌群结构及优势菌的变化情况,对开发烤紫菜产品在加工过程中的微生物控制技术,保障烤紫菜产品的食用安全性具有十分重要的意义。建议在加工过程中,严格控制环境与设备的卫生状况,保持仪器与物料的接触面洁净;严格执行烘烤参数,在不损害产品品质的前提下适当增加高温烘烤的时间。同时,烤制采用的干条斑紫菜原料也应经过严格的验收,避免使用菌数偏高的干条斑紫菜。可根据实际加工条件,使用适宜的新型灭菌技术,例如射频杀菌、辐照处理、微波处理等,降低对紫菜品质、营养成分的影响,实现对高温干燥过程中耐热菌的杀灭。

参考文献

- [1] 张盼盼, 杨锐, 吴小凯. 江苏省条斑紫菜产业现状调研[J]. 宁波大学学报(理工版), 2014, 27(1): 18–22.
ZHANG PP, YANG R, WU XK. Laver industry in Jiangsu Province: Investigation [J]. J Ningbo Univ (Nat Sci Eng Ed), 2014, 27(1): 18–22.
- [2] YANG LE, DENG YY, XU GP, *et al.* Redefining *pyropia* (*Bangiales*, *Rhodophyta*): Four new genera, resurrection of *porphyrella* and description of *Calidia pseudolobata* sp. nov. From China (1) [J]. J Phycol, 2020, 56(4): 862–879.
- [3] 田雨, 江艳华, 郭莹莹, 等. 紫菜营养品质及食用价值研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(12): 4929–4936.
TIAN Y, JIANG YH, GUO YY, *et al.* Research progress on nutritional quality and edible value of *Porphyra* [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(12): 4929–4936.
- [4] PARK JS, SHIN SK, WU H, *et al.* Evaluation of nutrient bioextraction by seaweed and shellfish aquaculture in Korea [J]. J World Aquac Soc, 2021, 52(5): 1118–1134.
- [5] BANACH JENNIFER L, KOCH SOPHIE JI, HOFFMANS Y, *et al.* Seaweed value chain stakeholder perspectives for food and environmental safety hazards [J]. Foods, 2022, 11(10): 1514.
- [6] 杨舒然, 荫硕焱, 裴晓燕, 等. 2014 年中国十四省(自治区、直辖市)市售即食藻类制品微生物污染状况[J]. 卫生研究, 2019, 48(6): 998–1000.
YANG SR, MENG SY, PEI XY, *et al.* Microbial contamination status of ready-to-eat algae products sold in 14 provinces (autonomous regions, municipalities directly under the central government) of China in 2014 [J]. J Hygi Res, 2019, 48(6): 998–1000.
- [7] 朱文嘉, 王联珠, 郭莹莹, 等. 我国紫菜产业现状及质量控制[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(13): 3353–3358.
ZHU WJ, WANG LZ, GUO YY, *et al.* Industry status and quality control of laver in China [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(13): 3353–3358.
- [8] 刘迎. 食品微生物检验菌落总数测定中纸片法的应用效果评价[J]. 食品安全导刊, 2023, (34): 77–79, 84.
LIU Y. Evaluation of the application effect of the paper method in the determination of total bacterial count in food microbiology testing [J]. Chin Food Saf Magaz, 2023, (34): 77–79, 84.
- [9] 卢福荣, 李杰, 邵悦, 等. 食品中菌落总数能力验证的结果分析与质量控制探讨[J]. 现代食品, 2021, (16): 217–219.
LU FR, LI J, SHAO Y, *et al.* Analysis of the results of proficiency verification of the total number of bacterial colonies in food and discussion on quality control [J]. Modern Food, 2021, (16): 217–219.
- [10] 李艳飞, 孙祖丽. 生活饮用水中菌落总数检测与能力验证分析[J]. 食品安全导刊, 2023, (34): 62–64.
LI YF, SUN ZL. Detection and ability verification analysis of total number of colonies in drinking water [J]. Chin Food Safety Magaz, 2023, (34): 62–64.
- [11] FEIFEI Z, ZHEN Z, CHENLONG W, *et al.* Microbial analysis of the production line for roasted seaweed snacks [J]. LWT, 2023, 187: 115372.
- [12] 范鹏飞, 冯武, 肖瑶, 等. 基于高通量测序与培养基鉴定法分析不同省份不同养殖模式下小龙虾菌群的多样性[J]. 食品工业科技, 2023, 44(1): 181–188.
FAN PF, FENG W, XIAO Y, *et al.* Analysis of microbial diversity of Crayfish under different culture modes in different provinces based on high-throughput sequencing and traditional culture methods [J]. Sci Technol Food Ind, 2023, 44(1): 181–188.
- [13] SUN W, XIAO H, PENG Q, *et al.* Analysis of bacterial diversity of Chinese Luzhou-flavor liquor brewed in different seasons by Illumina Miseq sequencing [J]. Annal Microbiol, 2016, 66(3): 1293–1301.
- [14] 李桂澜, 匡华. 高通量测序技术在食品微生物检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(15): 5091–5097.
LI GL, KUANG H. Applications of high-throughput sequencing technologies for food microbiome detection [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(15): 5091–5097.
- [15] 杨光萍. 高通量测序技术在食品微生物检测中的应用[J]. 食品安全导刊, 2022, (30): 182–185.
YANG GP. Application of high-throughput sequencing technology in food microbial detection [J]. China Food Saf Magaz, 2022, (30): 182–185.
- [16] MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads [J]. Embnet Journal, 2011, 17(1): 10–12.
- [17] ZHANG J, KOBERT K, FLOURI T, *et al.* PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd merger [J]. Bioinformatics, 2014, 30(5): 614–620.
- [18] EDGAR RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460–2461.
- [19] SCHLOSS PD, WESTCOTT SL, RYABIN T, *et al.* Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(23): 7537–7541.
- [20] EMMANUEL P, KLAUS S, RUSSELL S. Ape 5.0: An environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R [J]. Bioinformatics, 2019, 35(3): 526–528.
- [21] WANG Q, GARRITY GM, TIEDJE JM, *et al.* Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(16): 5261–5267.
- [22] 林依乐, 杜涓, 韩千慧, 等. 基于高通量测序分析加工处理与贮藏时间对生鲜鸭肉中菌群结构及多样性的影响[J]. 食品科技, 2022, 47(12): 313–321.
LIN YL, DU J, HAN QH, *et al.* Bacterial communities structure and diversity in chilled duck meat during processing and cold storage based on high-throughput sequencing technology [J]. Food Sci Technol, 2022, 47(12): 313–321.
- [23] 王潇彬, 孔阳芷, 张艳玲, 等. 杀菌技术的作用机制及在食品领域中的应用[J]. 中国酿造, 2022, 41(2): 1–8.
WANG XD, KONG YZ, ZHANG YL, *et al.* Mechanism of sterilization technology and its application in food field [J]. China Brew, 2022, 41(2): 1–8.
- [24] JIN Y, TANG J, ZHU MJ. Water activity influence on the thermal resistance of salmonella in soy protein powder at elevated temperatures [J]. Food Control, 2020, 113(18): 107160–107168.
- [25] KOSEKI S, NAKAMURA N, SHIINA T. Comparison of desiccation tolerance among *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula [J]. J Food Prot, 2015, 78(1): 104–110.
- [26] 黄晓燕, 刘毓琨, 李长城, 等. 低水分活度食品微生物控制技术研究现状[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(23): 286–292.
HUANG XY, LIU CJ, LI CC, *et al.* Research progress in microbiological control of food with low water activity [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(23): 286–292.
- [27] TANG J, JIANG D, YIFAN L. Potential new genera of cyanobacterial

- strains isolated from thermal springs of western Sichuan, China [J]. *Algal Res*, 2018, 31: 14–20.
- [28] 张婷, 孙绘梨, 齐凤霞, 等. 嗜热蓝细菌高温适应机制及生物技术应用[J]. *生物工程学报*, 2023. DOI: 10.13345/j.cjb.230645
- ZAHNG T, SUN HL, QI FX, *et al*. High-temperature adaptation mechanisms and biotechnological potentials of thermophilic cyanobacteria [J]. *Chin J Biotechnol*, 2023. DOI: 10.13345/j.cjb.230645
- [29] DALY, MICHAEL J. A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans* [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(3): 237–245.
- [30] 王玮, 朱静, 张志东, 等. 原核耐辐射微生物资源研究及其应用前景[J]. *核农学报*, 2013, 27(2): 177–182.
- WANG W, ZHU J, ZHANG ZD, *et al*. Research progress and application prospect of radiation-resistant prokaryotic microbe [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2013, 27(2): 177–182.
- [31] 赵明明. 耐辐射异常球菌蛋白水解酶 Lon1 和 Lon2 在高温胁迫条件下的表达与功能分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- ZHAO MM. The expression and functional analysis of proteases Lon1 and Lon2 in *Deinococcus radiodurans* R1 under high temperature stress [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.
- [32] 赵明明, 唐殷, 郭磊周, 等. Lon1 蛋白酶参与耐辐射异常球菌高温胁迫及细胞分裂的功能研究[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(5): 149–158.
- ZHAO MM, TANG Y, GUO LZ, *et al*. Function analysis of Lon1 protease involved in high temperature stress and cell division of *Deinococcus radiodurans* R1 [J]. *Biotechnol Bullet*, 2022, 38(5): 149–158.
- [33] 李少丽, 邓建朝, 李春生, 等. 生食大眼金枪鱼中生物胺产生菌的分离与鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(14): 121–126.
- LI SL, DENG JZ, LI CS, *et al*. Isolation and identification of biogenic amine-producing bacteria from raw bigeye tuna (*Thunnus obesus*) [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(14): 121–126.
- [34] 蓝胜华, 王利, 邓麟杰, 等. 黄颡鱼溶酪巨型球菌的鉴定与药敏试

验[J]. *水产科学*, 2015, 34(12): 778–782.

LAN SH, WANG L, DENG LJ, *et al*. Identification and drug sensitivity of *Megasphaera* from yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Fishes Sci*, 2015, 34(12): 778–782.

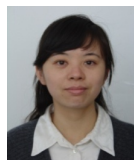
- [35] LIU CH, CHIU CS, HO PL, *et al*. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto [J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 107(3): 1031–1041.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

作者简介



江 姍, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品加工与安全。
E-mail: ssjiang1998@163.com



江艳华, 高级工程师, 主要研究方向为水产品生物危害物风险评估与控制。
E-mail: jiangyh@ysfri.ac.cn



王联珠, 研究员, 主要研究方向为水产品质量安全与标准化。
E-mail: wanglz@ysfri.ac.cn