

# 基于高通量测序分析蟹糊微生物菌群多样性

李 成<sup>1</sup>, 孔晓雪<sup>1</sup>, 余炬波<sup>2</sup>, 邹小欠<sup>3</sup>, 罗海波<sup>1,\*</sup>

(1. 南京师范大学食品与制药工程学院, 江苏 南京 210097; 2. 宁波南联冷冻食品有限公司, 浙江 宁波 315191; 3. 安徽科技学院食品工程学院, 安徽 凤阳 233100)

**摘 要:** 为探索不同贮藏温度下蟹糊微生物菌群结构, 应用Illumina MiSeq高通量测序技术研究蟹糊在-20 ℃和4 ℃贮藏3 d后的微生物菌群多样性。结果表明: -20 ℃贮藏3 d的蟹糊样品V1-V3和V3-V4区域扩增所得微生物菌属分别为18属和26属, 4 ℃贮藏3 d的蟹糊样品V1-V3和V3-V4区域扩增所得微生物菌属分别为16属和19属。相对丰度大于1%的菌属为肉食杆菌属(*Carnobacterium*)、*Jeotgalibaca*、环丝菌属(*Brochothrix*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、弧菌属(*Vibrio*)。-20 ℃贮藏3 d的蟹糊样品优势菌属为肉食杆菌属(V1-V3, 68.81%; V3-V4, 69.29%)和弧菌属(V1-V3, 16.75%; V3-V4, 14.39%)。4 ℃贮藏3 d的蟹糊样品优势菌属为肉食杆菌属(V1-V3, 73.37%; V3-V4, 70.35%)、*Jeotgalibaca*(V1-V3, 11.82%; V3-V4, 12.35%)和葡萄球菌属(V1-V3, 5.45%; V3-V4, 5.01%), 同时*Jeotgalibaca*和葡萄球菌属相对丰度显著高于-20 ℃贮藏的蟹糊样品。以上结果表明, 蟹糊在不同贮藏温度下菌群多样性、优势菌属及其相对丰度均存在显著差异( $P < 0.05$ )。本研究为有效预防腌制生食蟹糊食源性疾病的发生及控制技术的开发提供理论依据。

**关键词:** 蟹糊; 高通量测序; 菌群结构

## Analysis of Microbial Community Diversity of Crab Paste by High-Throughput Sequencing

LI Cheng<sup>1</sup>, KONG Xiaoxue<sup>1</sup>, YU Jubo<sup>2</sup>, ZOU Xiaoqian<sup>3</sup>, LUO Haibo<sup>1,\*</sup>

(1. School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;

2. Ningbo Nanlian Frozen Food Co. Ltd., Ningbo 315191, China;

3. College of Food Engineering, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

**Abstract:** In order to explore the microbial community structure of crab paste stored at different temperatures, the microbial diversity before and after 3 days of storage at -20 or 4 ℃ were investigated by using Illumina MiSeq high-throughput sequencing technique. The results showed that a total of 18 and 26 genera of microorganisms from crab paste samples stored at -20 ℃ for 3 days, as well as 16 and 19 genera from those stored at 4 ℃ for 3 days were obtained through amplification of the 16S rRNA V1-V3 and V3-V4 regions, respectively. The main genera with relative abundance over 1% were *Carnobacterium*, *Jeotgalibaca*, *Brochothrix*, *Staphylococcus*, *Psychrobacter* and *Vibrio*. The dominant genera at -20 ℃ were *Carnobacterium* (V1-V3, 68.81%; V3-V4, 69.29%) and *Vibrio* (V1-V3, 16.75%; V3-V4, 14.39%). The dominant genera at 4 ℃ were *Carnobacterium* (V1-V3, 73.37%; V3-V4, 70.35%), *Jeotgalibaca* (V1-V3, 11.82%; V3-V4, 12.35%) and *Staphylococcus* (V1-V3, 5.45%; V3-V4, 5.01%). Meanwhile, the relative abundances of *Jeotgalibaca* and *Staphylococcus* at 4 ℃ were markedly higher than those at -20 ℃. These results indicated that the microbial diversity, dominant genera and their abundances in crab paste varied significantly with storage temperature ( $P < 0.05$ ). This study provides a theoretical basis for the prevention and control of foodborne diseases caused by pickled raw crab paste.

**Keywords:** crab paste; high-throughput sequencing; bacterial community

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180920-233

中图分类号: TS201.3; TS254.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2020)04-0134-06

收稿日期: 2018-09-20

基金项目: 宁波市农业重大项目(2017C110009); 宁波市科技富民项目(2015C10015)

第一作者简介: 李成(1993—)(ORCID: 0000-0001-9515-4376), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品工程。

E-mail: 18851195668@163.com

\*通信作者简介: 罗海波(1979—)(ORCID: 0000-0001-5978-707X), 男, 副教授, 博士, 研究方向为水产品加工与贮藏。

E-mail: luohaibo\_1216@126.com

引文格式:

李成, 孔晓雪, 余炬波, 等. 基于高通量测序分析蟹糊微生物菌群多样性[J]. 食品科学, 2020, 41(4): 134-139.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180920-233. <http://www.spkx.net.cn>

LI Cheng, KONG Xiaoxue, YU Jubo, et al. Analysis of microbial community diversity of crab paste by high-throughput sequencing[J]. Food Science, 2020, 41(4): 134-139. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20180920-233.

<http://www.spkx.net.cn>

梭子蟹营养丰富、脂膏肥满、味道鲜美，以其独特的风味而闻名。蟹糊是将新鲜梭子蟹漂洗、去壳腮、斩碎、加入少许盐、味精等调味品制成的腌制生食水产品<sup>[1]</sup>。蟹糊生产中无热加工过程，能充分保持原料鲜美等优点，是我国沿海地区的特色水产品，深受当地居民喜爱。然而，传统腌制蟹糊产品因其加工工艺的特殊性，存在极高的食品安全风险隐患，具体表现在加工设备简陋、环境卫生较差，同时员工缺乏卫生安全意识，导致微生物指标普遍超标<sup>[2]</sup>。徐景野等<sup>[3]</sup>对瓶装蟹糊的调查表明溶藻弧菌和金黄色葡萄球菌的检出率很高。杨宪时等<sup>[4]</sup>研究表明，市售蟹糊优势菌中存在葡萄球菌。消费者食用污染后的产品会引起食源性疾病，具有安全隐患，严重限制了这一产品的推广与发展。探究瓶装蟹糊腐败变质的微生物种类，有利于对腐败菌进行靶向抑制，延长产品货架期。

关于腌制生食水产品微生物菌相分析, 目前已有报道。张春丹等<sup>[5]</sup>采用16S rDNA技术研究了瓶装蟹糊中的细菌多样性, 发现蟹糊中存在马胃葡萄球菌、嗜冷杆菌、海嗜冷杆菌、消化嗜冷杆菌、盐弧菌属、肋生弧菌等菌。马超等<sup>[6]</sup>运用生理生化 and Sensititre 细菌鉴定系统对市购蟹糊进行鉴定, 主要菌群为葡萄球菌、玫瑰色库克菌、棒状杆菌, 同时检测出少量的马红球菌。但是, 由于传统微生物鉴定方法受到培养基和培养条件的限制, 绝大多数微生物难以分离。大量研究表明, 用传统分离培养方法鉴定的微生物所占比例不到环境样品中的1%, 因而分析结果不能全面反映出样本中微生物菌落情况<sup>[7]</sup>。

近年来,随着分子生物学的发展,高通量测序技术已广泛应用于环境微生物多样性分析。高通量测序又称下一代测序技术,可以在短时间内对几十万甚至百万计的序列进行检测分析,具有同时分析多个样品、安全性和自动化程度高、数据量大、误差小、分析全面等特点<sup>[8]</sup>,将其应用于食品微生物菌群研究中有利于食源性病原菌的快速分析。目前,高通量测序技术已成功应用于南美白对虾<sup>[9]</sup>、牡蛎<sup>[10]</sup>、虾夷扇贝柱<sup>[11]</sup>等水产品微生物菌群多样性分析。但运用高通量测序技术分析蟹糊菌群多样性的研究鲜见报道。本实验以传统腌制蟹糊为研究对象,采用Illumina MiSeq高通量测序技术分析不同贮藏温度下蟹糊菌群结构及变化规律,为后期靶向抑制其腐败及防腐保鲜提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

蟹糊 宁波南联冷冻食品有限公司; MagicPure  
Size Selection DNA Beads 法国Transgen公司; Qubit3.0  
DNA检测试剂盒 美国Life公司; 2×*Taq* Master Mix  
美国Vazyme公司; E.Z.N.A.Soil DNA试剂盒 美国  
Omega公司。

## 1.2 仪器与设备

Pico-21型台式离心机 美国Thermo Fisher公司；  
32866型Qubit3.0荧光计 美国Invitrogen公司；GL-88B  
型旋涡混合器 海门市其林贝尔仪器制造有限公司；  
Q<sup>32866</sup>型QubitT100™ Thermal Cycler型聚合酶链式反应  
(polymerase chain reaction, PCR) 仪 美国Bio-Rad  
公司；DYY-6C型电泳仪电源、DYCZ-21型电泳槽  
北京市六一仪器厂；凝胶成像系统 美国UVP公司。

### 1.3 方法

### 1.3.1 样品前处理

蟹糊样品2组, 每组1 200 g, 1组在4℃条件下贮藏3 d, 另1组置于-20℃条件下贮藏3 d。

### 1.3.2 pH值的测定

参考GB 5009.237—2016《食品pH值的测定》<sup>[12]</sup>方法进行测定。

### 1.3.3 TVB-N含量测定

参考GB/T 5009.228—2016《食品中挥发性盐基氮的测定》<sup>[13]</sup>方法,采用自动凯氏定氮仪对挥发性盐基氮(total volatile basic nitrogen, TVB-N)含量进行测定。

#### 1.3.4 TVC值测定

参考GB 4789.2—2016《食品微生物学检验 菌落总数测定》<sup>[14]</sup>方法进行测定,微生物菌落总数(total viable count, TVC)测定结果表示为lg(CFU/g)。

### 1.3.5 DNA的提取

采用基因组DNA提取试剂盒（美国Omega公司，按产品说明书进行，网址链接<http://omegabiotek.com/store/product/soil-dna-kit>）对不同温度下蟹糊微生物基因组进行DNA抽提，并用1%的琼脂糖凝胶电泳检测提取效果。

### 1.3.6 PCR扩增及高通量测序

以提取的基因组DNA作为模板，对16S rDNA序列的V1-V3和V3-V4区域进行扩增，正向引物上接有不同

碱基的标签 (barcode) 序列以区分不同样品, 对应的引物如下:

V1-V3:

V1F: 5'-CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTG  
(barcode) AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

V3R: 5'-GACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAAT  
TCCAACCGCGGCKGCTGGC-3'

V3-V4:

341F: 5'-CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTG  
(barcode) CCTACGGGNGGCWGCAG-3'

805R: 5'-GACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAA  
TTCCAGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

PCR扩增两轮结束后, 用琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 纯化后的样品用Qubit 3.0 DNA检测试剂盒对DNA进行定量, 产物回收后送至生工生物工程(上海)股份有限公司, 进行Illumina MiSeq高通量测序。

#### 1.4 数据处理及分析

MiSeq测序序列中含有barcode序列, 首先取出引物接头序列, 再根据PE reads之间的overlap关系, 将成对的reads拼接成一条序列, 随后按照barcode区分样品得到各样本数据。除去末端质量值20以下及含N部分序列, 并过滤低复杂短序列。然后除去嵌合体及非特异性扩增序列, 得到各样本有效数据。最后按照序列间的距离进行聚类, 将相似性在97%以上的序列进行归并生成操作单元 (operational taxonomic unit, OTU) 根据聚类分析结果, 进行 $\alpha$ 多样性分析, 其中菌群丰度可由ACE指数、Chao1指数进行评估, 其数值越高表明群落物种丰富度越高; 菌群多样性由Shannon指数、Simpson指数进行评估, Shannon指数与群落多样性呈正相关, Simpson指数呈负相关。Coverage值是测序深度指标, 代表每个样品文库的覆盖率。基于分类学信息, 讨论蟹糊在不同贮藏温度下的微生物菌群结构。利用Mothur 1.30.1软件、FLASH 1.2.3软件、Pear 0.9.6软件、Usearch 5.2.236软件、Cytoscape 3.2软件、R3.2、SPSS 19.0等软件进行数据处理分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 蟹糊在不同贮藏温度下的品质变化

表1 不同贮藏温度下蟹糊样品的品质变化  
Table 1 Quality changes of crab paste samples stored at different temperatures

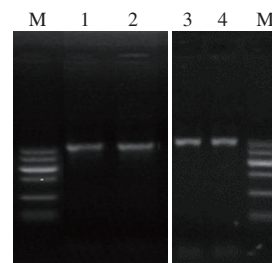
组别	TVC值 (lg (CFU/g))	TVB-N含量/ (mg/100 g)	pH
初始	4.19±0.02 <sup>b</sup>	7.22±0.07 <sup>b</sup>	7.00±0.04 <sup>b</sup>
-20℃贮藏3 d	4.21±0.07 <sup>b</sup>	7.84±0.02 <sup>b</sup>	6.76±0.01 <sup>c</sup>
4℃贮藏3 d	4.90±0.15 <sup>a</sup>	49.14±0.42 <sup>a</sup>	8.19±0.00 <sup>a</sup>

注: 同列小写字母不同表示显著差异 ( $P<0.05$ )。

从表1可以看出, 蟹糊样品TVC值、TVB-N含量和pH初始值分别为(4.19±0.02) (lg (CFU/g))、(7.22±0.07) mg/100 g、7.00±0.04, -20℃贮藏3 d后TVC值和TVB-N含量与初始值接近, 无显著变化 ( $P>0.05$ ), 而4℃贮藏3 d后TVC值和TVB-N含量分别达到(4.90±0.15) (lg (CFU/g))、(49.14±0.42) mg/100 g, 均显著超过GB 10136—2015《动物性水产制品》规定的限值 (TVC<4.70 (lg (CFU/g)), TVB-N<25.0 mg/100 g), pH值显著升高 ( $P<0.05$ ), 同时出现轻微的腐败臭味, 这可能与蛋白质在细菌及其相关酶的作用下分解为氨和胺类等碱性物质有关。

### 2.2 PCR扩增结果

以提取的基因组DNA作为模板, 用16S rDNA V1-V3和V3-V4区的通用引物扩增出目的片段 (图1), 条带清晰, 可以满足后续测序实验要求。



M. DNA分子质量标准; 1. 4℃、V1-V3; 2. -20℃、V1-V3; 3. 4℃、V3-V4; 4. -20℃、V3-V4。

图1 PCR扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoretograms of PCR-amplified products

### 2.3 测序数据分析

Illumina MiSeq高通量测序获得的样本原始序列总数为199 523, 经质控和优化后共得到174 943 条有效序列 (表2)。每个组的有效序列数均在30 000以上, 有效序列百分比达80%以上, 表明所得到的有效序列可达到后续微生物多样性分析的要求。进而对样品的序列进行聚类分析, 在97%相似水平下的OTU生物信息统计发现, 不同扩增区域的结果均显示4℃贮藏3 d的蟹糊样品OTU数量比-20℃多, 说明在4℃贮藏温度下蟹糊的微生物多样性可能比-20℃更丰富。

表2 各组样品有效序列与OTU数量统计  
Table 2 Observed valid sequence and OTU numbers in crab pastes stored at different temperatures

扩增区域	分组	处理前 总序列	细胞器组织 序列数目	非靶区域 序列数目	嵌合体 数目	处理后 剩余序列	OTU 数量
V1-V3	-20℃	59 741	6	1	6 708	53 026	4 596
	4℃	64 966	0	0	11 307	53 659	4 945
V3-V4	-20℃	35 595	7	0	2 022	33 566	1 700
	4℃	39 221	0	0	4 529	34 692	1 909



2.4  $\alpha$ 多样性分析

根据97%相似性水平下的OTU信息,采用 $\alpha$ 多样性指标的ACE指数、Chao1指数、Shannon指数及Simpson指数对样品微生物物种丰富度和多样性进行评估,结果见表3。所有样本测序覆盖率均在90%上,表明样品中序列未被测到的概率较低。Shannon-Wiener曲线可以反映各样本在不同测序数量时的微生物多样性,当曲线趋向平坦时,说明测序数据量足够大,可以反映样品中绝大多数的微生物信息。由图2可以看出,所有样本的曲线都随着横坐标而逐渐稳定,说明测序数据量合理,所含菌种数较多。

表3 不同贮藏温度下蟹糊 $\alpha$ 多样性指数  
Table 3  $\alpha$  diversity index of crab pastes stored at different temperatures

扩增区域	分组	ACE指数	Chao1指数	Shannon指数	Simpson指数	Coverage指数
V1-V3	-20 °C	347 030.81	102 453.24	2.80	0.20	0.92
	4 °C	252 198.12	85 935.68	3.07	0.21	0.91
V3-V4	-20 °C	49 154.24	20 145.24	1.82	0.43	0.95
	4 °C	50 831.27	22 734.40	1.92	0.44	0.95

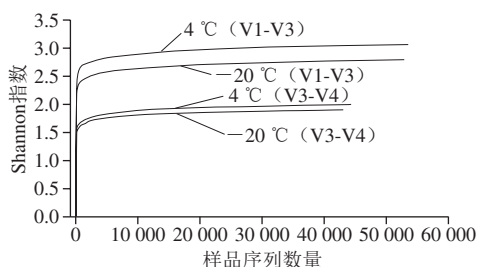


图2 Shannon-Wiener曲线分析

Fig. 2 Shannon-Wiener curves

## 2.5 群落多样性分析

对不同贮藏温度下样品获得的OTU属水平上进行物种注释,统计分析结果见表4,其中属水平上相对丰度大于1%的菌群柱状分布图见图3。相对丰度大于1%的有肉食杆菌属(*Carnobacterium*)、*Jeotgalibaca*、环丝菌属(*Brochothrix*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、弧菌属(*Vibrio*)。-20 °C贮藏3 d的蟹糊样品优势菌属为肉食杆菌属(V1-V3, 68.81%; V3-V4, 69.29%)、弧菌属(V1-V3, 16.75%; V3-V4, 14.39%)。4 °C贮藏3 d的蟹糊样品优势菌属为肉食杆菌属(V1-V3, 73.37%; V3-V4, 70.35%)、*Jeotgalibaca* (V1-V3, 11.82%; V3-V4, 12.35%)、葡萄球菌属(V1-V3, 5.45%; V3-V4, 5.01%)。-20 °C和4 °C贮藏3 d的蟹糊样品肉食杆菌属均为优势菌属,表明其可能在蟹糊腐败变质中起重要作用。与-20 °C贮藏样品相比,4 °C贮藏3 d的蟹糊样品菌群多样性降低、菌群结构发生了变化,环丝菌属(*Brochothrix*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)丰度保持基本不变。*Jeotgalibaca*、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)丰度显著升高,而弧菌属(*Vibrio*)明显降低。

表4 不同贮藏温度及扩增区域下样品菌群在属水平上的分布  
Table 4 Relative abundance of bacterial genera at different storage temperatures and in different amplification regions

种属	-20 °C 贮藏3 d		4 °C 贮藏3 d	
	V1-V3	V3-V4	V1-V3	V3-V4
肉食杆菌属 ( <i>Carnobacterium</i> )	68.81	69.29	73.37	70.35
菌属1 ( <i>Jeotgalibaca</i> )	6.39	6.84	11.82	12.35
环丝菌属 ( <i>Brochothrix</i> )	4.31	4.98	4.42	5.13
葡萄球菌属 ( <i>Staphylococcus</i> )	0.14	0.21	5.45	5.01
嗜冷杆菌属 ( <i>Psychrobacter</i> )	2.15	2.27	2.8	2.61
弧菌属 ( <i>Vibrio</i> )	16.75	14.39	1.11	1.59
未分类菌 (unclassified)	1.16	1.05	0.47	2.4
碱杆菌属 ( <i>Alkalibacterium</i> )	0.06	0.05	0.37	0.2
德库菌属 ( <i>Desemzia</i> )	0.01	0.1	0.01	0.09
菌属2 ( <i>Pisciglobus</i> )	0.02	0.01	0.02	0.02
气球菌属 ( <i>Aerococcus</i> )	0.05	0.07	0.04	0.05
菌属3 ( <i>Aliroseovarius</i> )	0.05	0	0.01	0
菌属4 ( <i>Isobaculum</i> )	0.01	0	0.01	0
动性球菌属 ( <i>Planococcus</i> )	0.01	0	0.01	0.01
假交替单胞菌属 ( <i>Pseudoalteromonas</i> )	0	0.01	0.05	0.03
产乳酸细菌属 ( <i>Lactococcus</i> )	0	0.01	0.02	0.03
海生乳杆菌属 ( <i>Marinilactibacillus</i> )	0	0	0.01	0.01
菌属5 ( <i>Shimia</i> )	0.01	0	0	0
菌属6 ( <i>Phaeodactylibacter</i> )	0.01	0	0	0
副球菌属 ( <i>Paracoccus</i> )	0.01	0.01	0	0
射光杆菌属 ( <i>Lucibacterium</i> )	0.01	0.01	0	0
假单胞菌属 ( <i>Pseudomonas</i> )	0.01	0.01	0	0
菌属7 ( <i>Trichococcus</i> )	0	0.01	0	0.01
菌属8 ( <i>Sporanaerobacte</i> )	0	0	0	0.01
鲸杆菌属 ( <i>Cetobacterium</i> )	0	0	0	0.01
菌属9 ( <i>Salirhabdus</i> )	0	0	0	0.01
奇异单胞菌属 ( <i>Allomonas</i> )	0	0.09	0	0.01
伯克氏菌属 ( <i>Burkholderia</i> )	0	0.01	0	0
气单胞菌属 ( <i>Aeromonas</i> )	0	0.01	0	0
代尔夫特菌属 ( <i>Delftia</i> )	0	0.33	0	0
沙雷氏菌属 ( <i>Serratia</i> )	0	0.12	0	0
别弧菌属 ( <i>Aliivibrio</i> )	0	0.01	0	0
菌属10 ( <i>Vallitalea</i> )	0	0.01	0	0
科尔韦氏菌属 ( <i>Colwellia</i> )	0	0.01	0	0
简纳氏菌属 ( <i>Jannaschia</i> )	0	0.01	0	0
肠杆菌属 ( <i>Flummatobacter</i> )	0	0.01	0	0
其他	0.03	0.07	0.01	0.07

注: 菌属1~10.目前无中文名或统一名称的菌属。

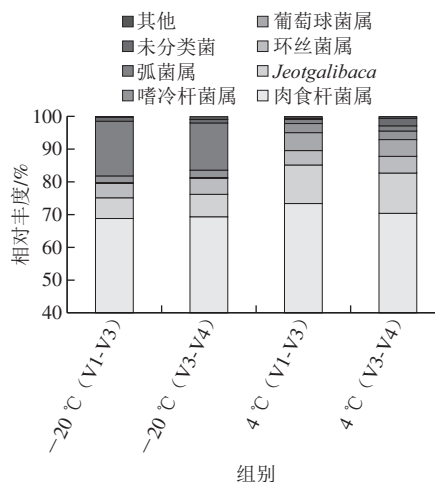


图3 不同贮藏温度下蟹糊样品微生物物种组成(属水平)

Fig. 3 Bacterial community compositions at the genus level in crab pastes stored at different temperatures

### 3 讨论

微生物是影响腌制生食蟹糊品质和食用安全性的主要因素,而在不同温度下其腐败特性存在较大差异。本实验采用 $-20^{\circ}\text{C}$ 模拟产品加工后工厂贮藏温度, $4^{\circ}\text{C}$ 模拟家庭冷藏温度,在两种温度下分别贮藏3 d,测定其TVC值、TVB-N含量和pH值,结果发现 $-20^{\circ}\text{C}$ 贮藏3 d后各指标与初始值均无显著差异( $P>0.05$ ),而 $4^{\circ}\text{C}$ 贮藏3 d后相关品质指标均已显著超过国家标准规定限值( $P<0.05$ ),同时出现轻微腐败迹象。因此,有必要分析不同贮藏温度下蟹糊的菌群结构,为企业生产和消费者提供指导。

关于蟹糊菌群结构的分析,张春丹等<sup>[5]</sup>采用16S rDNA扩增法对蟹糊细菌多样性进行研究,共鉴定出12个细菌种属。马超等<sup>[6]</sup>应用生理生化 and Sensitire细菌鉴定系统对市购蟹糊进行分析,成功鉴定出4个主要细菌种属。本实验通过Illumina MiSeq高通量测序技术分析了不同贮藏温度下蟹糊菌群结构,结果发现 $-20^{\circ}\text{C}$ 贮藏3 d的蟹糊样品V1-V3和V3-V4区域扩增所得微生物菌属分别为18属和26属, $4^{\circ}\text{C}$ 贮藏3 d的蟹糊样品V1-V3和V3-V4区域扩增分别获得16属和19属,表明 $-20^{\circ}\text{C}$ 贮藏蟹糊中的微生物多样性比 $4^{\circ}\text{C}$ 贮藏3 d更丰富。同时,也可以看出V3-V4较V1-V3区域,所得微生物丰富性更高。此外,在蟹糊中发现了很多小类微生物菌属和未知菌属,虽然它们在微生物菌群结构中占比较小,通过其他技术未必能分离出来,但它们可能在蟹糊的腐败中有一定作用。

微生物能够利用水产品丰富的营养物质,产生生物胺、酮、醛、酯、硫化氢、有机酸等挥发性物质,生成不良气味,品质改变,导致产品在感官上不可接受<sup>[15]</sup>。在水产品的腐败中,只有少数特定种类细菌占据主导地位,使产品腐败变质,这类细菌就是特定腐败菌<sup>[16]</sup>。肉食杆菌属是在真空冷藏包装和气调包装海鲜中的发现的主要腐败菌<sup>[17-18]</sup>。曾有研究报道,这种细菌可产生大量挥发性物质,如2,3-丁二酮和2,3-戊二酮<sup>[19]</sup>,这两种物质在纯条件下可释放出强烈的黄油气味,在肉制品中也有肉食杆菌属产生黄油气味的报道<sup>[20]</sup>。本实验不同贮藏温度下样品的总菌群中,肉食杆菌属相对丰度均在70%左右,表明该菌可能是蟹糊的特定腐败菌。*Jeotgalibaca*发现于韩国传统腌制海产品,为球形,需氧、耐盐的革兰氏阳性菌,近年来相关报道多为该菌属新菌种的发现<sup>[21-22]</sup>,鲜见其在水产品中腐败的作用研究。本实验发现,*Jeotgalibaca*在 $4^{\circ}\text{C}$ 贮藏3 d样品中相对丰度较高,表明该菌可能在蟹糊腐败中起重要作用,需对其理化性质作进一步研究。

葡萄球菌属和弧菌属是常见的水产品食源性致病菌。葡萄球菌属种类较多,其中金黄色葡萄球菌与食源

性疾病密切相关,该菌在人体主要存在皮肤、黏膜以及外界相通的各种腔道。有些菌株可产生肠毒素等毒性蛋白,引起急性金黄色葡萄球菌血症<sup>[23]</sup>。目前,已在多宝鱼<sup>[24]</sup>、带鱼<sup>[25]</sup>等海产品中检测出金黄色葡萄球菌。弧菌属在海洋环境中广泛存在,其中一些成员是重要的食源性病原体,尤其是副溶血性弧菌,该菌引起的感染可导致人类发生不同种类的疾病,最常见的是急性胃肠炎。关于副溶血性弧菌,已有较多报道发现其存在于贝类<sup>[26]</sup>、三文鱼<sup>[27]</sup>等多种海产品中。本实验中,在不同温度条件下均检出这两种菌,其中葡萄球菌属在 $4^{\circ}\text{C}$ 贮藏3 d时丰度较高,而弧菌属在 $-20^{\circ}\text{C}$ 温度下丰度较高,表明蟹糊产品存在着较高的食品安全风险隐患,但在不同贮藏温度下主要致病菌存在差异。

嗜冷菌属和环丝菌属是水产品中发现的重要腐败菌。嗜冷菌属能够分解脂类和水解蛋白质,从而引起轻微腥味和发霉的气味<sup>[28-29]</sup>。张皖君等<sup>[30]</sup>研究表明,嗜冷菌属是鲈鱼TVB-N含量与K值呈显著正相关的主要菌属。目前,在牡蛎<sup>[10]</sup>、虾夷扇贝柱<sup>[11]</sup>、带鱼<sup>[31]</sup>等海产品中均有检测出。环丝菌属生长温度范围广,这种细菌能够在好氧和厌氧条件下生长,其属中的热杀索氏菌具有很强分解蛋白和脂肪的能力<sup>[32]</sup>,可引起海产品腐败产生焦糖异味(2,3-丁二酮)<sup>[33]</sup>。有报道显示,该菌已在虾类<sup>[34]</sup>等多种水产品中被检测到。本实验不同温度下均检测出嗜冷菌属和环丝菌属,表明这两种菌属可能是蟹糊腐败过程中产生各种腐败异味的重要菌群。

### 4 结论

本实验采用Illumina MiSeq高通量测序技术分析了不同贮藏温度下蟹糊样品中菌群结构及变化情况,16S rDNA V1-V3和V3-V4区域扩增测序结果显示菌群结构及丰度较为相似,对菌群整体无太大影响,但通过V3-V4区域扩增测序所得微生物丰富性更高,建议今后测序选用V3-V4区域。蟹糊 $-20^{\circ}\text{C}$ 贮藏温度下优势菌属为肉食杆菌属和弧菌属,表明冷冻蟹糊存在一定的致病风险。 $4^{\circ}\text{C}$ 贮藏3 d蟹糊样品,优势菌属为肉食杆菌属、*Jeotgalibaca*和葡萄球菌属,这可能是蟹糊 $4^{\circ}\text{C}$ 放置时间过长易导致食源性中毒的重要原因。为此,应当加强原料减菌处理、严格控制加工环境、辅助添加天然保鲜剂等手段抑制微生物的生长繁殖,保障产品卫生安全。

### 参考文献:

- [1] 刘青梅,杨性民,巨文华,等.蟹糊微生物控制方法的探讨[J].中国食品学报,2009,9(2):138-143. DOI:10.16429/j.1009-7848.2009.02.018.
- [2] 邱维丰.蟹糊、醉泥螺加工企业卫生学调查、产品质量分析[J].中国公共卫生管理,2004,20(6):558-559. DOI:10.3969/j.issn.1001-9561.2004.06.045.

- [3] 徐景野, 于梅, 傅小红, 等. 宁波市瓶装蟹糊(股)细菌污染情况调查[J]. 预防医学文献信息, 2003, 9(1): 20-21. DOI:10.3969/j.issn.1672-9153.2003.01.013.
- [4] 杨宪时, 马超, 许钟, 等. 蟹糊贮藏中的品质变化及变质菌分析[J]. 海洋渔业, 2008, 30(4): 376-381. DOI:10.13233/j.cnki.mar.fish.2008.04.002.
- [5] 张春丹, 陈燕, 全晶晶, 等. 瓶装泥螺和蟹糊中细菌多样性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(1): 185-188.
- [6] 马超, 许钟, 杨宪时. 冷藏瓶装蟹糊微生物学品质安全特征研究[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(2): 222-226.
- [7] 舒畅, 吴春生, 钟慈平, 等. 发酵食品微生物多样性研究方法进展[J]. 食品科学, 2013, 34(15): 397-402. DOI:10.7506/spkx1002-6630201315076.
- [8] 米其利, 李雪梅, 管莹, 等. 高通量测序在食品微生物生态学研究中的应用[J]. 食品科学, 2016, 37(23): 302-308. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201623049.
- [9] 邓晓影, 张宾, 汤贺, 等. 基于高通量测序的南美白对虾中微生物群落分析[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 302-308. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201824023.
- [10] 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201624021.
- [11] 江艳华, 王联珠, 许东勤, 等. 基于高通量测序分析虾夷扇贝柱菌群结构及腐败优势菌[J]. 食品科学, 2018, 39(20): 140-145. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201820021.
- [12] 国家卫生和计划生育委员会. 食品pH值的测定: GB 5009.237—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [13] 国家卫生和计划生育委员会. 食品中挥发性盐基氮的测定: GB 5009.228—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [14] 国家卫生和计划生育委员会. 食品微生物学检验菌落总数测定: GB 4789.2—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [15] GRAM L, DALGAARD P. Fish spoilage bacteria-problems and solutions[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13(3): 262-266. DOI:10.1016/S0958-1669(02)00309-9.
- [16] GRAM L, RAVN L, RASCH M, et al. Food spoilage: interactions between food spoilage bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 78(1/2): 79-97. DOI:10.1016/S01681605(02)00233-7.
- [17] AFZAL M I, JACQUET T, DELAUNAY S, et al. *Carnobacterium maltaromaticum*: identification, isolation tools, ecology and technological aspects in dairy products[J]. Food Microbiology, 2010, 27(5): 573-579. DOI:10.1016/j.fm.2010.03.019.
- [18] LAURSEN B G, BAY L, CLEENWERCK I, et al. *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2005, 28(2): 151-164. DOI:10.1016/j.syapm.2004.12.001.
- [19] JOFFRAUD J J, LEROI F, ROY C, et al. Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 66(3): 175-184. DOI:10.1016/S0168-1605(00)00532-8.
- [20] BORCH E, KANTMUERMANS M L, BLIXT Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products[J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 33(1): 103-120. DOI:10.1016/0168-1605(96)01135-X.
- [21] LEE D G, TRUJILLO M E, KANG H, et al. *Jeotgalibaca dankookensis* gen. nov., sp. nov., a member of the family Carnobacteriaceae, isolated from seujeot (Korean traditional food)[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(5): 1729-1735. DOI:10.1099/ijs.0.057059-0.
- [22] ZAMORA L, PÉREZ-SANCHO M, DOMÍNGUEZ L, et al. *Jeotgalibaca porci* sp. nov. and *Jeotgalibaca arthritis* sp. nov., isolated from pigs, and emended description of the genus *Jeotgalibaca*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(5): 1473-1477. DOI:10.13590/j.cjfh.2015.02.023.
- [23] 向红, 周黎, 廖春, 等. 金黄色葡萄球菌及其引起的食物中毒的研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(2): 196-199. DOI:10.13590/j.cjfh.2015.02.023.
- [24] 丁洁, 侯红漫, 刘彦泓, 等. 养殖多宝鱼细菌菌相分析[J]. 食品工业科技, 2009, 30(7): 112-114. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2009.07.044.
- [25] 蓝蔚青, 谢晶. 传统生理生化鉴定技术结合PCR法分析复合保鲜剂对冷藏带鱼贮藏期间菌相变化的影响[J]. 食品工业科技, 2012, 33(10): 330-335. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2012.10.017.
- [26] 高玮, 金沁, 赵冉. 贝类产品中副溶血性弧菌的污染状况调查[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 258-259. DOI:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.02.239.
- [27] 古小莉, 李惠青, 吕晓瑜, 等. 生食三文鱼中副溶血性弧菌污染调查及耐药性分析[J]. 水产科学, 2018, 37(2): 267-270. DOI:10.16378/j.cnki.1003-1111.2018.02.021.
- [28] BROEKAERT K, HEYNDRIKX M, HERMAN L, et al. Molecular identification of the microbiota of peeled and unpeeled brown shrimp (*Crangon crangon*) during storage on ice and at 7.5 °C[J]. Food Microbiology, 2013, 36(2): 123-134. DOI:10.1016/j.fm.2013.04.009.
- [29] PRAPAIWONG N, WALLACE R K, ARIAS C R. Bacterial loads and microbial composition in high pressure treated oysters during storage[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 131(2/3): 145-150. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.014.
- [30] 张皖君, 蓝蔚青, 段贤源, 等. 基于高通量测序分析不同保鲜冰处理对鲈鱼菌群组成与代谢功能的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(5): 234-241. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180123-314.
- [31] 高乾坤, 焦琳舒, 杜贺超, 等. 高通量测序分析不同产地带鱼冷藏时微生物的群落多样性[J]. 食品科学, 2018, 39(1): 127-132. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201818020.
- [32] NOWAK A, PIOTROWSKA M. Biochemical activities of *Brochothrix thermosphacta*[J]. Meat Science, 2012, 90(2): 410-413. DOI:10.1016/j.meatsci.2011.08.008.
- [33] FALL P A, PILET M F, LEDUC F, et al. Sensory and physicochemical evolution of tropical cooked peeled shrimp inoculated by *Brochothrix thermosphacta* and *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 during storage at 8 °C[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 152(3): 82-90. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.015.
- [34] JAFFRÈS E, SOHIER D, LEROI F, et al. Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 131(1): 20-29. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.017.