DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20241224001 http://www.yykxjz.cn/

李娜, 江姗, 王联珠, 郭莹莹, 姚琳, 朱文嘉, 曲梦, 江艳华. 基于高通量测序对干条斑紫菜加工过程的菌群变化分析. 渔业科学进展, 2026, 47(1): 199–211

LI N, JIANG S, WANG L Z, GUO Y Y, YAO L, ZHU W J, QU M, JIANG Y H. Microbial community changes during dried *Porphyra yezoensis* processing based on high-throughput sequencing. Progress in Fishery Sciences, 2026, 47(1): 199–211

基于高通量测序对干条斑紫菜加工过程的菌群变化分析*

李 娜[1] 江 姗[1,2] 王联珠[1] 郭莹莹[1] 姚 琳[1]
朱文嘉[1] 曲 梦[1] 江艳华[1①]

(1. 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 山东 青岛 266071;
2. 中国海洋大学食品科学与工程学院 山东 青岛 266404)

摘要 干条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)作为烤紫菜的主要原料, 其微生物的种类和含量直接影响终产品的食用安全性。为探究干条斑紫菜在加工过程中细菌多样性的变化情况, 筛选导致菌落总数超标的优势菌种, 本研究对加工过程重点环节中条斑紫菜的菌落总数进行监测, 通过高通量测序技术解析总细菌菌群及可培养细菌菌群的变化情况, 同时, 对优势菌进行菌种鉴定与耐受特性分析。结果显示, 条斑紫菜原藻经过清洗后菌落总数下降, 干燥处理后样品菌落总数变化不一致, 干燥环节杀菌效果不明显; 不同海区采收的原藻细菌菌群结构有显著差异, 紫菜原藻中总细菌菌群多样性丰富, 相对丰度较高的有沃雷氏菌属(*Olleya*)、海杆菌属(*Maribacter*)、十八杆菌属(*Octadecabacter*)、亚硫酸杆菌属(*Sulfitobacter*)等; 经干燥后, 样品总细菌菌群多样性降低, 以蓝细菌(Cyanobacteria_Chloroplast)为优势菌; 可培养优势菌为巨型球菌(*Macrococcus*)、异常球菌(*Deinococcus*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、不动杆菌(*Acinetobacter*)、金黄杆菌(*Chryseobacterium*)等; 实验分离出导致菌落总数超标的优势菌种为巨型球菌, 其对温度耐受性较差, 但具有较强的抗干旱能力。本研究揭示了干条斑紫菜细菌总数升高的关键加工环节及加工过程中的细菌菌群变化, 探讨了优势菌的耐受特性, 为企业加工过程中微生物含量把控提供了依据, 也为进一步研发干条斑紫菜菌落总数的控制技术奠定了理论基础。

关键词 条斑紫菜; 菌落总数; 细菌多样性; 高通量测序

中图分类号 S126 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2026)01-0199-13

条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)是世界重要的大型经济红藻, 也是我国人工养殖海藻中最具经济价值的品种, 其产值在我国紫菜总产值中的占比高达 50%, 97%以上的条斑紫菜养殖分布在江苏省沿海(张盼盼等, 2014)。条斑紫菜富含蛋白质、膳食纤维及维生素, 极具营养价值和药用价值(田雨等, 2021; 杨贤庆等, 2020)。近年来, 烤紫菜产品微生物超标事件频发, 严重影响了条斑紫菜产业的健康发展(杨舒然等, 2019;

* 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-50)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2023TD76)共同资助。李 娜, Email: lina251821@163.com

① 通信作者: 江艳华, 副研究员, Email: jiangyh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2024-12-24, 收修改稿日期: 2025-03-10

刘玉等, 2021; 朱文嘉等, 2018)。干条斑紫菜是原味烤紫菜(寿司紫菜)和调味烤紫菜(海苔)产品的原料。通过调研和前期实验发现，干条斑紫菜的微生物数量是影响烤紫菜产品菌落总数超标的最主要原因，因原料的不合格给烤紫菜加工企业带来巨大的经济损失。因此，通过对干条斑紫菜在加工过程中的菌落总数和细菌菌群结构变化及优势菌进行分析，对于探究有效的微生物控制方法具有重要意义(赵玲等, 2021)。

目前，对干条斑紫菜加工过程中菌落总数变化规律的相关研究较少，且对微生物的研究主要集中在菌落总数的变化，对菌群多样性及优势菌的分析还未见报道，因而无法进行针对性的控制技术研究(刘玉等, 2021; 孙文珂等, 2022)。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局限性大，无法完整地揭示样品中的微生物结构组成，且操作复杂、费时费力(熊盈盈等, 2021)。16S 扩增子高通量测序技术是一种非培养分析法，直接从样品 DNA 中确定微生物的种类和相对丰度，能检出传统培养法无法检出的微生物，客观分析食品中微生物群群落的结构及时空动态变化，具有效率高、准确度高和测序范围广等优点，为食品微生物多样性、群落结构变化及功能微生物的研究提供了重要技术手段(Sun *et al*, 2016; 李桂澜等, 2019; 张咚咚等, 2023)。

干条斑紫菜是新鲜条斑紫菜原藻在采收之后，经过去杂、清洗、脱水、切菜、调和、浇饼脱水、一次干燥和二次干燥等工艺加工而成。在干条斑紫菜加工过程中，原藻、清洗、调和、一次干燥和二次干燥是影响菌落总数变化的 5 个关键环节。为进一步解析加工过程中的菌落总数和细菌菌群结构变化并筛选优势菌，选取了江苏省不同海区的 3 家代表性企业的干条斑紫菜为研究对象，采用平板计数法对加工过程中 5 个关键环节的菌落总数变化规律进行分析，采用 16S 扩增子高通量测序技术对样品的总细菌菌群进行分析，同时，对干燥环节样品的总细菌菌群与可培养细菌菌群的结构特征进行对比，分离鉴定优势菌并进行耐受特性分析。以上研究可为创建紫菜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

1.1.1 样品　采集江苏省南通和连云港海区的 3 家代表性企业 A、B、C 的紫菜原藻以及清洗、调和、一次干燥和二次干燥关键加工环节的紫菜样品，每个企业每个环节的样品各 3 份。采集后的样品低温保存并立即运回实验室进行分析。

1.1.2 试剂　平板计数琼脂(PCA)、磷酸盐缓冲液，北京陆桥技术股份有限公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒，天根生化科技(北京)有限公司；Premix *Taq*™，日本 TaKaRa 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 公司；2×Hieff® Robust PCR Master Mix、Hieff NGS™ DNA Selection Beads，翌圣生物科技(上海)股份有限公司。

1.2 仪器与设备

台式离心机，美国 Thermo Fisher 公司；电泳仪(BG-power600)，北京百晶生物技术有限公司；凝胶成像系统(Infinity 3000)，法国 Vilber Lourmat 公司；Qubit® 4.0 荧光计，美国 Thermo Fisher 公司；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，结果按去除水分含量后的干基计算。

1.3.2 水分含量的测定　按照 GB 5009.3-2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》中的直接干燥法进行测定。

1.3.3 细菌多样性分析　宏基因组 DNA 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 提取，使用琼脂糖凝胶电泳和 Qubit 4.0 测定 DNA 浓度与完整性。

可培养细菌基因组 DNA 的提取。干燥环节的样品进行菌落总数测定时，吸取 10 倍梯度稀释液 100 μL 涂布 PCA 平板，36 ℃培养(48±2) h。用磷酸盐缓冲液收集平板上所有菌落，8 000 r/min 离心 10 min，弃上清液，磷酸盐缓冲液洗涤 2 次，使用 E.Z.N.A™ Mag-Bind 土壤 DNA 试剂盒提取沉淀中基因组 DNA，即为样品的可培养细菌基因组 DNA。

DNA 提取后进行 PCR 扩增与高通量测序。采用两轮 PCR 扩增法，将建库过程融入 PCR 过程，第 1 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 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，10 ℃保温。

第 2 轮引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物进行扩增。第 2 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 Qubit 4.0 荧光定量仪进行浓度测定，所有样品按照 1∶1 等量混合后使用 Illumina MiSeq 测序平台进行高通量测序。

1.3.4 *优势菌的分离鉴定及耐受特性分析*　细菌的分离纯化及染色镜检。称取 10 g 干条斑紫菜样品于无菌袋中，加入 490 mL 无菌磷酸盐缓冲液，充分混匀，依次进行 10 倍梯度稀释。吸取适宜浓度的稀释液各 100 μL 涂布 PCA 平板，36 ℃培养(48±2) h，观察菌落形态，挑取菌落形态各异的单菌落进行分离纯化。将纯化的菌株用甘油液(终浓度 20%)保存于 –80 ℃。对培养好的菌株进行革兰氏染色，在油镜下观察菌体形态(刘妮等, 2024)。

16S rRNA 基因测序。将纯化的菌株接入营养肉汤中，36 ℃、150 r/min 振荡培养过夜，采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株的基因组 DNA。以提取的 DNA 为模版,采用通用引物 27F(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和 1492R(5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′)扩增 16S rRNA 基因序列。50 μL 反应体系包括 25 μL Premix *Taq*、1 μL 0.25 μmol/L 正向引物、反向引物、约 50 ng 基因组 DNA 模板。PCR 条件：94 ℃, 5 min；94 ℃ 60 s，55 ℃ 60 s，72 ℃ 90 s，35 个循环；72 ℃ 5 min，4 ℃保温。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测，并进行 16S rRNA 基因测序。

优势菌的鉴定。通过平板上分离菌落的 16S rRNA 基因测序结果和 16S 扩增子高通量测序结果获得菌株的丰度大小，从而确定其中的优势菌属。对其中分离的 5 株优势菌属——巨型球菌(*Macrococcus*) (命名为 J1~J5)使用 MEGA 软件(11.0.13)以 neighbor-joining 法对菌株序列构建系统发育树。

温度耐受性。实验将其中一株巨型球菌接入营养肉汤中，36 ℃、150 r/min 振荡培养约 24 h，将培养后的菌液稀释至麦氏浓度约 1.0。分别取稀释液 1 mL 于无菌 EP 管中，置于 40 ℃、45 ℃、50 ℃、55 ℃、60 ℃水浴中孵育 10、20、30、40、50、60 min，对处理后的菌液进行 10 倍梯度稀释，吸取稀释后适宜梯度的菌液 100 μL 涂布于 PCA 平板上，36 ℃培养 48 h 后进行计数。

抗干旱实验。将其中一株巨型球菌接入营养肉汤中，36 ℃、150 r/min 振荡培养约 24 h，将培养后的菌液稀释至麦氏浓度约 1.0。分别配制含 10%、20%、30%、40%、50%、60% PEG6000 的营养肉汤，吸取稀释液 50 μL 于 4.95 mL 含有不同 PEG6000 浓度的营养肉汤中，振荡混匀，36 ℃放置 24 h。对处理后的菌液进行 10 倍梯度稀释，吸取稀释后适宜梯度的菌液 100 μL 涂布于 PCA 平板,36 ℃培养 48 h 后进行计数。

1.3.5 *数据分析*　菌落总数与水分含量的数据采用 Microsoft Excel 软件进行计算，并按去除水分含量后的干基计算最终的菌落总数，采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析，以 Mean±SD 表示，组间比较采用 *t* 检验。$P<0.05$ 为有显著差异。

测序后得到的原始序列数据使用 Cutadapt 去除引物接头序列，根据 PE reads 之间的 overlap 关系使用 PEAR 将成对 reads 拼接成一条序列，质控过滤后得到各样本的有效数据(Martin, 2011; Zhang *et al*, 2014)。采用 Usearch 软件进行操作分类单元(OTU)分析，并利用 Mothur 软件计算 Chao、ACE、Shannon、Simpson、Coverage 指数进行 Alpha 多样性指数分析(Edgar *et al*, 2010; Schloss *et al*, 2009)。利用 R 软件进行 PCA 主成分分析与 PCoA 主坐标分析，使用 R 的 hclust 函数构建聚类树,并利用 ape package 绘制树状图进行层级聚类分析，采用 RDP classifier 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(Paradis *et al*, 2019; Wang *et al*, 2007)。

2　结果与分析

2.1　干条斑紫菜加工过程中菌落总数的变化

来自 3 家代表性企业 5 个加工环节的条斑紫菜菌落总数变化情况如表 1 所示。原藻样品中 A 企业的菌落总数最高，为 6.89 lg(CFU/mL)，其次为 B 企业，C 企业的原藻菌数最低，为 5.81 lg(CFU/mL)。样品在经过清洗后,菌落总数均有所下降,分别下降了 1.28、1.61 和 0.51 lg(CFU/mL)。进入干燥环节后，A 企业的样本菌落总数逐渐降低至 5.15 lg(CFU/mL)，而 B 企业和 C 企业的样本在经过一次干燥和二次干燥后菌落总数高于清洗和调和环节，二次干燥后终产品的菌落总数分别为 7.41 lg(CFU/mL)和 7.79 lg(CFU/mL)。

表 1 3 家企业不同加工环节样品的菌落总数

Tab.1 Aerobic plate count of samples from different processing stages of three enterprises

加工环节 Processing step	样本的菌落总数(lg(CFU/mL)，以干基计) Aerobic plate count of samples/(lg(CFU/mL), dry basis)		
	A 企业 Enterprise A	B 企业 Enterprise B	C 企业 Enterprise C
原藻 Original seaweed	6.89±0.12[a]	6.81±0.59[b]	5.81±0.13[c]
清洗 Washing	5.61±0.91[b]	5.20±0.04[d]	5.30±0.06[d]
调和 Blending	5.74±0.80[b]	5.83±0.09[c]	5.51±0.18[d]
一次干燥 First drying	5.16±0.85[b]	6.91±0.55[b]	7.40±0.01[b]
二次干燥 Secondary drying	5.15±0.28[b]	7.41±0.12[a]	7.79±0.46[a]

注：同一列的小写字母不同，代表同一企业不同加工环节的样本菌落总数存在显著差异(P<0.05)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicating that there are significant differences (P<0.05) in the total bacterial count samples from different processing links of the same enterprise.

表 2 3 家企业不同加工环节样品中细菌多样性指数

Tab.2 Diversity indexes of bacterial communities of samples from different processing stages of three enterprises

菌群类别 Group of bacteria	样品 Sample	数量 Number	OTUs	Chao 指数 Chao index	ACE 指数 ACE index	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	覆盖度 Coverage
总细菌菌群 Total bacterial flora	A1	89 222±5 683	248±69	303.36±68.67	299.10±66.74	2.34±0.39	0.20±0.04	>0.99
	A2	89 078±21 803	168±12	227.42±16.84	271.73±35.10	1.16±0.01	0.54±0.02	>0.99
	A3	72 122±33 477	122±18	162.53±9.32	167.96±5.97	0.77±0.08	0.70±0.05	>0.99
	A4	65 690±24 731	52±21	107.04±64.84	176.72±76.11	0.08±0.06	0.98±0.02	>0.99
	A5	74 549±9 495	52±30	103.75±50.45	190.95±109.59	0.06±0.06	0.98±0.02	>0.99
	B1	94 201±17 177	160±30	214.39±47.50	265.23±70.88	1.43±0.30	0.39±0.11	>0.99
	B2	76 606±10 600	122±31	166.85±48.22	185.92±75.29	1.03±0.17	0.58±0.07	>0.99
	B3	92 014±7 601	152±37	202.55±63.49	235.16±82.68	0.92±0.27	0.64±0.12	>0.99
	B4	69 844±23 246	62±17	125.23±52.45	175.89±49.43	0.05±0.01	0.99±0.00	>0.99
	B5	55 025±9 090	67±9	103.94±14.78	132.80±38.61	0.08±0.04	0.98±0.01	>0.99
	C1	86 631±12 876	298±18	350.16±39.14	346.05±42.00	3.19±0.24	0.08±0.02	>0.99
	C2	93 834±56 488	263±59	310.13±51.55	309.33±52.95	2.82±0.12	0.12±0.03	>0.99
	C3	85 902±3 717	230±3	308.87±11.99	323.77±22.22	2.60±0.05	0.13±0.01	>0.99
	C4	113 867±76 700	184±3	248.05±31.41	274.44±55.52	0.86±0.26	0.71±0.10	>0.99
	C5	87 598±9 118	176±23	208.50±30.49	216.03±37.98	0.96±0.20	0.68±0.08	>0.99
可培养细菌菌群 Culturable bacterial flora	Ac4	39 775±2 676	67±3	88.78±16.08	88.73±13.54	1.46±0.12	0.36±0.03	>0.99
	Ac5	41 814±2 070	55±6	68.30±12.58	75.43±14.15	1.05±0.08	0.43±0.03	>0.99
	Bc4	34 032±4 470	68±12	72.56±13.82	75.73±14.22	1.19±0.18	0.42±0.03	>0.99
	Bc5	32 068±3 619	48±6	59.31±2.44	63.04±7.81	0.30±0.12	0.88±0.07	>0.99
	Cc4	39 997±3 647	79±6	95.46±5.01	94.27±3.49	1.70±0.20	0.28±0.07	>0.99
	Cc5	47 564±6 459	62±37	67.83±43.04	69.92±44.85	2.03±0.23	0.18±0.05	>0.99

注：“A、B、C”分别表示企业，字母后的“1、2、3、4、5”分别代表各企业的原藻样本、清洗环节样本、调和环节样本、一次干燥样本、二次干燥样本；Ac4、Bc4 和 Cc4 分别表示 A、B 和 C 企业一次干燥样本的可培养菌群，Ac5、Bc5 和 Cc5 分别表示 A、B 和 C 企业二次干燥样本的可培养菌群。下同。

Notes: "A, B, and C" represent enterprises, and "1, 2, 3, 4, and 5" following the letters represent the original algae, cleaning process, blending process, first drying, and second drying samples of each enterprise; Ac4, Bc4, and Cc4 represent the cultivable bacterial communities of the first drying samples of enterprises A, B, and C respectively, while Ac5, Bc5, and Cc5 respectively represent the cultivable bacterial communities of the second drying samples of enterprises A, B, and C. The same below.

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。所有样品的 Coverage 指数均>0.99，说明测序结果足以覆盖样品中大多数细菌，测序结果可信。各企业二次干燥后的终产品 OTU 数与原藻相比均有所下降，物种丰富度均有所降低；其中，A 企业下降幅度最大，下降了 79.0%，

C 企业下降了 40.9%，下降幅度最小。二次干燥环节与一次干燥环节相比，所有样品的总细菌菌群与可培养细菌菌群的 OTU 数均变化不大。通过计算 3 家企业的样品总细菌菌群 Alpha 指数发现，条斑紫菜经过加工，Chao 指数和 ACE 指数整体呈下降趋势，细菌丰富度降低；3 家企业原藻的 Shannon 指数均低于终产品，而 Simpson 指数均高于终产品，表明加工之后样品的总细菌菌群多样性均有所降低。调和环节，B 企业的 Chao 指数与 ACE 指数以及 C 企业的 ACE 指数都有所升高，说明经过调和样本的总细菌菌群丰富度有所升高。C 企业样本在二次干燥后，Shannon 指数升高，Simpson 指数降低，总细菌菌群多样性有所升高。对一次干燥与二次干燥环节样品的可培养细菌菌群的 Alpha 多样性指数进行计算发现，经过二次干燥后，A 企业、B 企业的干条斑紫菜样本 Chao、ACE、Shannon 指数降低，Simpson 指数上升，细菌菌群丰富度与多样性均有所降低；而 C 企业的干条斑紫菜 Chao、ACE 指数降低，菌群丰富度降低，Shannon 指数升高，Simpson 指数下降，菌群多样性较一次干燥后有所升高。

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，计算每家企业各环节样本相对丰度占比的均值。如图 1 所示，宏基因组测序结果显示，所有样品中共鉴定出 22 个细菌属及其他未分类的细菌。3 家企业原藻的菌群丰富度、优势菌组成和比例均不相同。A 企业采收的原藻优势菌为沃雷氏菌(*Olleya*)，占比 39.1%；B 企业的原藻菌群丰富度较低，蓝细菌(Cyanobacteria_Chloroplast)表现出相对优势丰度，比例达到 52.7%；C 企业的原藻样本菌群丰度最高，优势菌属为沃雷氏菌，占比 21.2%，其次为亚硫酸杆菌(*Sulfitobacter*)与十八杆菌(*Octadecabacter*)，占比分别为 12.1%与 8.9%。此外，γ-变形杆菌(*Gammaproteobacteria*)、淀粉杆菌(*Amylibacter*)、极地杆菌(*Polaribacter*)与海水菌(*Aquimarina*)在 C 企业采收的样本中占比分别为 5.4%、2.7%、2.6%与 2.5%，而在 A 企业与 B 企业的原藻中占比均低于 1.0%；A 企业的原藻中硅藻(Bacillariophyta)与嗜冷单胞菌(*Psychromonas*)占比均为 4.7%，而在 B 企业与 C 企业的原藻中几乎没有检出。经过清洗和调和环节，A 企业与 B 企业的样本除蓝细菌与部分未分类的细菌占比有所上升，大多数细菌占比下降，总细菌菌群多样性减少，其中，A 企业的嗜冷单胞菌和硅藻的占比降至 0.1%以下，B 企业的嗜冷杆菌(*Psychrobacter*)由 6.6%降至 1%以下；C 企业的样本在清洗与调和之后，总细菌菌群多样性变化不大，各菌属的占比也没有明显的变化，蓝细菌占比有小幅度上升。进入干燥环节，3 家企业的条斑紫菜样品总细菌菌群多样性降低，均以蓝细菌为优势菌属。A 企业与 B 企业条斑紫菜样本中蓝细菌占比约为 99%，其余菌属占比均低于 1%；而 C 企业的条斑紫菜进入干燥环节后，总细菌菌群多样性高于 A 企业与 B 企业，除占比 83.2%的蓝细菌外，十八杆菌占比 4.4%，沃雷氏菌占比 1.6%，赖文氏菌(*Lewinella*)占比 1.1%；此外，绿藻(Chlorophyta)占比明显增多，其在原藻、清洗与调和环节均低于 1%，进入干燥环节后，占比上升至 4.4%。

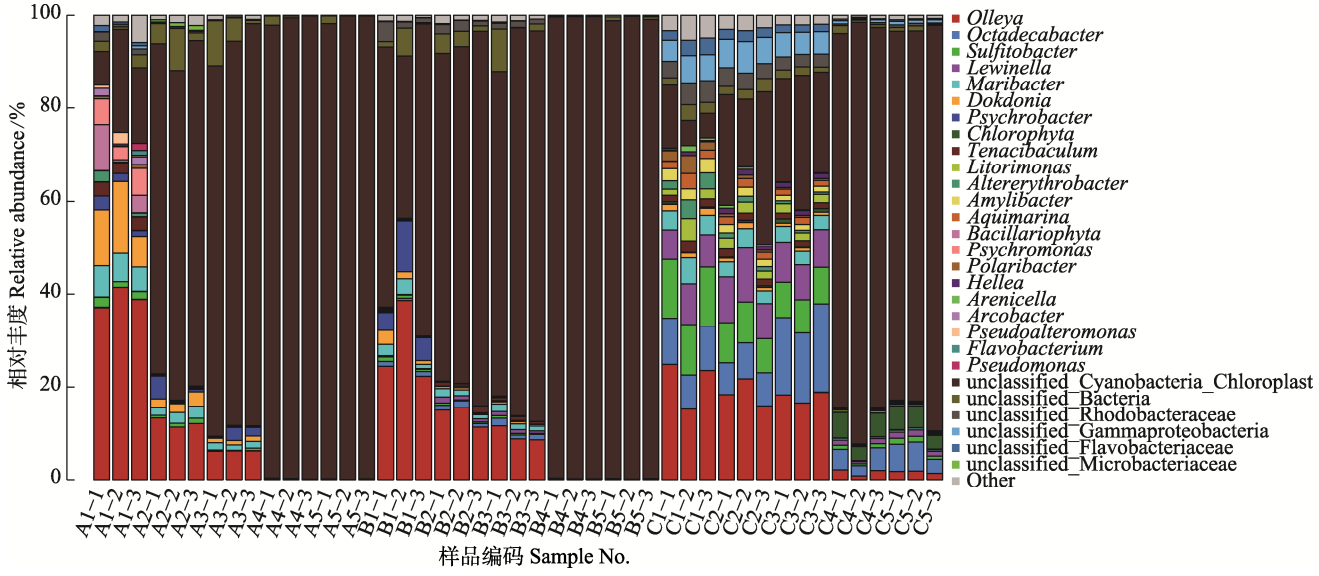

图 1　总细菌菌群属水平物种分布

Fig.1　Total bacterial communities distribution at the genus level

如图 2 所示，经过干燥后的条斑紫菜可培养细菌菌群的组成及优势菌与总细菌菌群差异很大。经过一次干燥后，A 企业的样本中优势菌为芽孢杆菌(*Bacillus*)和异常球菌(*Deinococcus*)，占比分别为 48.0%和 21.1%；B 企业的样本菌群多样性较低，其中，巨型球菌占比最大，为 47.3%，其次为异常球菌，占比为 19.8%；C 企业的样本中可培养细菌菌群较为丰富，占比较大的主要有巨型球菌(21.8%)、莫拉氏菌科(unclassified_Moraxellaceae) (21.7%)、不动杆菌(*Acinetobacter*) (21.5%)、金黄杆菌(*Chryseobacterium*) (14.0%)、考克氏菌(*Kocuria*) (6.1%)和副球菌(*Paracoccus*) (4.9%)。此外，从图 2 可以看出，经过二次干燥后，A 企业的样本可培养细菌菌群多样性略有降低，一次干燥样本中的假单胞菌(*Pseudomonas*)与节杆菌(*Arthrobacter*)在二次干燥之后几乎没有检出；B 企业的条斑紫菜经过二次干燥后，除巨型球菌、异常球菌与芽孢杆菌分别占比 93.6%、4.2%与 1.5%外，其他菌属均降至 0.1%以下；而 C 企业一次干燥与二次干燥环节的样本中可培养细菌菌群的组成相似。

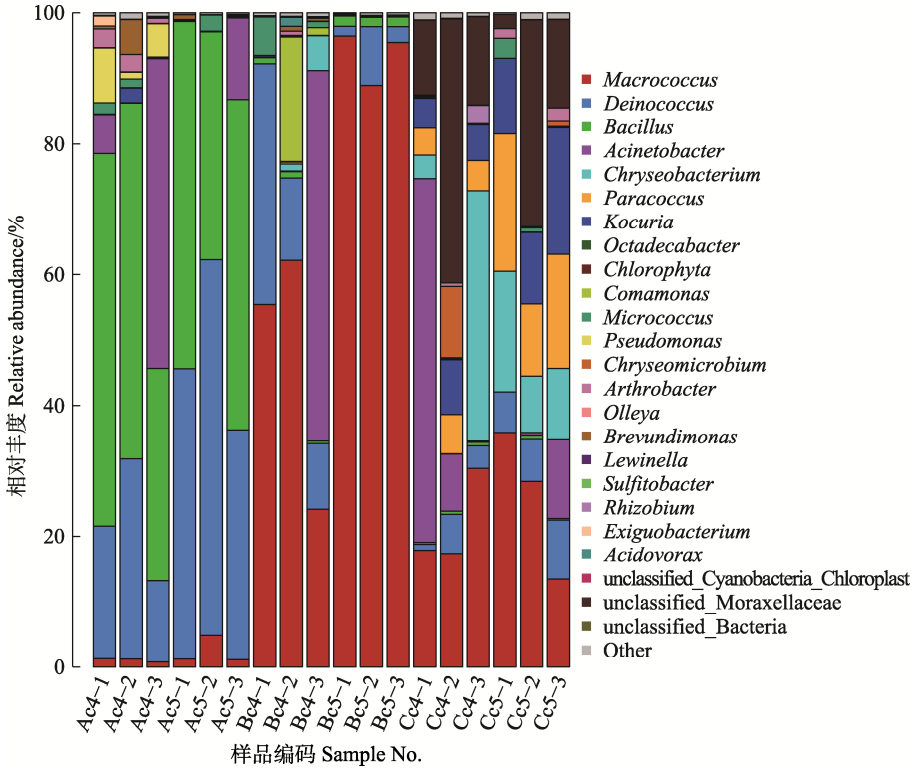

图 2 干燥环节样本中可培养细菌菌群属水平物种分布

Fig.2 Cultivable bacterial communities distribution at the genus level in samples after the drying process

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。主成分分析(principal component analysis, PCA)可以直观显示不同加工环节的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(任文博等, 2023)。样本中的菌群越相似，则样本间的距离越接近。由总细菌菌群的 PCA 图(图 3)可知，A 企业与 B 企业的原藻样本之间距离较近，而 C 企业的原藻样本与另外两家企业的距离很远，原藻的总细菌菌群多样性差异大。同时，在清洗与调和环节，A 企业与 B 企业样本的位置变化基本一致，且一次干燥与二次干燥环节的样本有明显的聚集，群落结构相似程度高。C 企业各环节样本与 A 企业、B 企业均距离较远，总细菌菌群结构差别较大。由图 4 可知，干燥环节的样本可培养细菌菌群结构与总细菌菌群有较大差异。A 企业两个干燥环节的样本十分接近，但与 B 企业和 C 企业的样本距离较远，说明 A 企业的条斑紫菜在二次干燥后，与一次干燥环节的样本相比，菌群结构变化不大，并且该企业样本的菌群结构组成与另外两家企业的样本有所差异。C 企业一次干燥与二次干燥环节的样本间距离也很近，菌群结构十分相似。而 B 企业两个干燥环节的样本间有一定的距离，该企业的条斑紫菜在经过二次干燥后，菌群结构组成变化较为明显；另外，从图 5 可以看出，B 企业一次干燥环节的样本与 C 企业的样本距离较近，在菌群结构组成上有一定的相似度。

距离树状图能直观地反映样本微生物组成的差

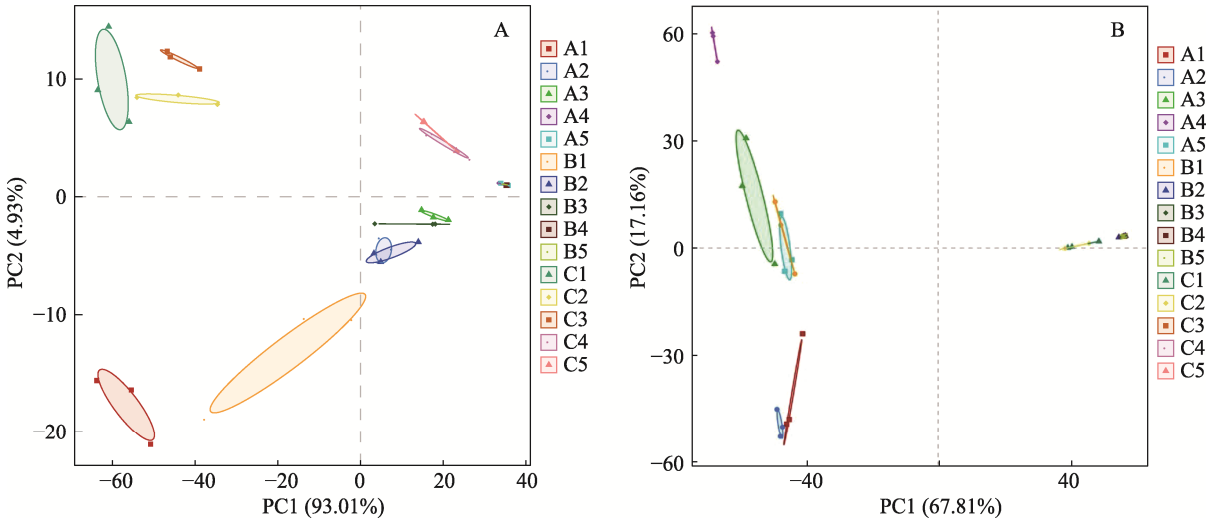

图 3　总细菌菌群属水平的 PCA 分析(A)和可培养细菌菌群与总细菌菌群属水平(B)

Fig.3　Total bacterial flora at the genus level (A), and culturable bacterial community and total bacterial flora at the genus level (B)

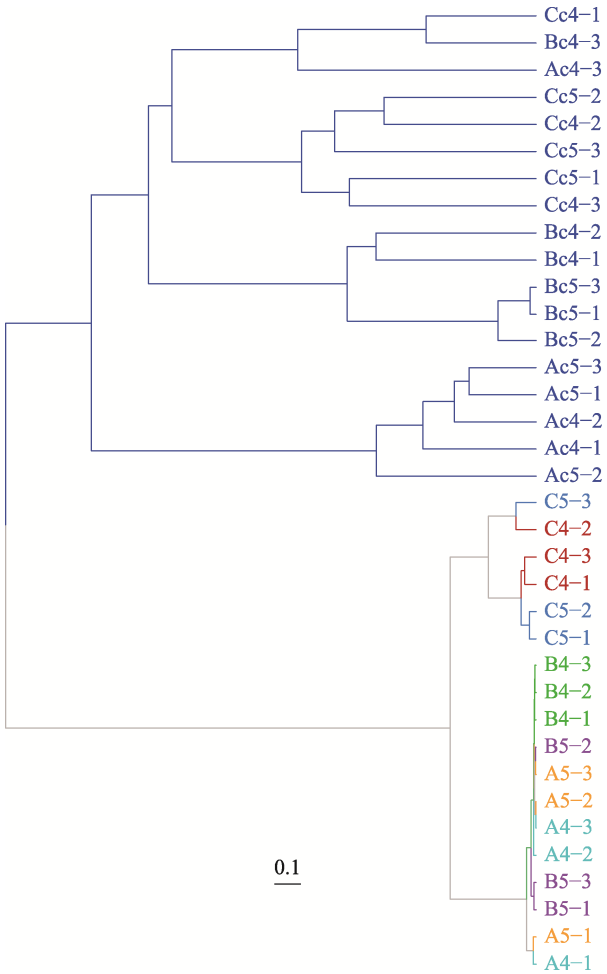

图 4　干燥环节样本中总细菌菌群与可培养细菌菌群属水平的样本距离树状图

Fig.4　Tree diagram of distance of total bacterial communities and cultivable bacterial communities at the genus level in samples after the drying process

异与相似关系，越相似的样本之间的共同分支越短。从图 5 可以看出，干燥环节的样本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，菌群结构差异明显。从样品的总细菌菌群分析来看，C 企业与 A 企业、B 企业为两个分支，菌群结构有所不同；对样品的可培养细菌菌群进行分析，除个别样本外，企业 A、B、C 各自为一个分支的簇。

2.2.4　优势菌的鉴定及耐受特性　　对平板上的菌落进行分离纯化，通过菌落形态观察、革兰氏染色镜检、16S rRNA 基因测序结果，结合 16S 扩增子高通量测序结果，获得干条斑紫菜样品中的优势菌——巨型球菌。对 5 株分离的巨型球菌构建系统发育树，均与 *Macrococcus bovicus* 关系最接近(图 5)。探讨了其中一株巨型球菌 J1 的温度耐受性及抗干旱特性。

巨型球菌 J1 在 40 ℃ 和 45 ℃ 作用 1 h 后，菌数没有明显变化，当作用温度为 50 ℃ 时，菌数随时间的增长缓慢减少，1 h 后菌数降至 4.68 lg(CFU/mL)；当温度为 55 ℃ 时，菌数迅速下降，30 min 后均死亡(图 6)。利用不同浓度的 PEG6000 模拟不同干旱条件，测定巨型球菌 J1 的抗干旱能力，当 PEG6000 的浓度低于 40%时，菌株的生长基本不受影响；当 PEG6000 浓度达到 50%时，菌数降至 5.42 lg(CFU/mL)；之后随着 PEG6000 浓度的升高，菌数趋于稳定(图 7)。

3　讨论

条斑紫菜是我国最重要的人工栽培海藻之一，其产值占我国紫菜总产值的一半左右，目前，我国条斑紫菜已形成比较完整的产业化体系(张美如等, 2012)。

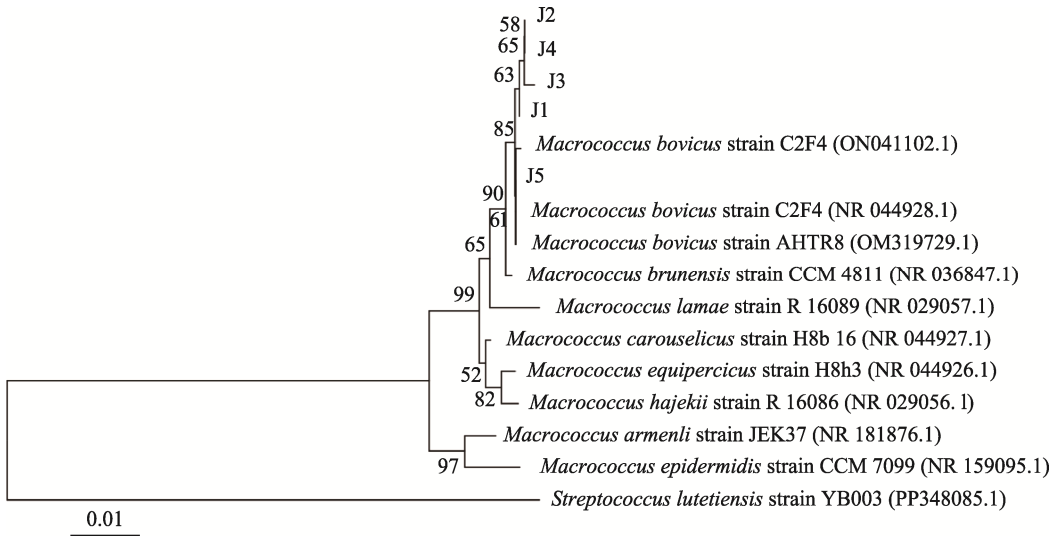

图 5 巨型球菌分离株的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of *Macrococcus* isolates

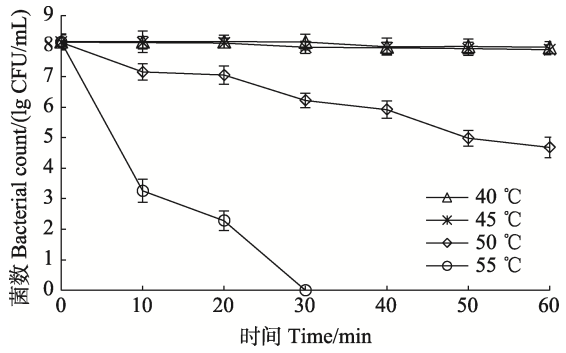

图 6 温度对巨型球菌 J1 生长的影响(n=3)

Fig.6 Effect of temperature on the growth of *Macrococcus* sp. J1 (n=3)

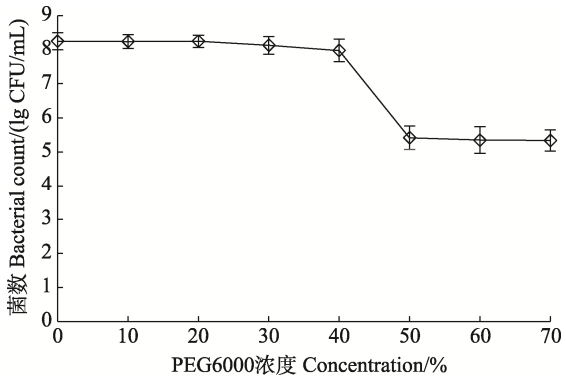

图 7 PEG6000 对巨型球菌 J1 生长的影响(n=3)

Fig.7 Effect of PEG6000 on the growth of *Macrococcus* sp. J1 (n=3)

干条斑紫菜作为烤紫菜的原料，细菌总数过高成为烤紫菜产品菌数超标的主要原因，因此，对干条斑紫菜在加工过程中的菌落总数和细菌菌群结构变化进行分析，对于探究有效的烤紫菜产品微生物控制方法具有重要意义。江苏省是我国条斑紫菜的主产省份，干条斑紫菜的加工也集中在南通市、连云港市等紫菜主产区。本研究选取来自江苏省不同海区的 3 家企业，其具有一定生产规模，生产设施先进，加工过程遵循农业行业标准 SC/T 3014-2022《干条斑紫菜加工技术规程》，具备目前国内干条斑紫菜生产现状的代表性。

干条斑紫菜中的细菌主要来自原藻、清洗用的海水、调和用的淡水、一次干燥环节前采用的脱水海绵等，因此，本研究对采自 3 家企业的原藻、清洗、调和、一次干燥与二次干燥等 5 个关键环节的条斑紫菜样品的菌落总数进行了测定。结果显示，两家企业的原藻的菌落总数>6.8 lg(CFU/mL)。海水中含有大量微生物，而附着性是海洋微生物的普遍特性(张晓华, 2007; Carrias *et al*, 2009)，海洋中的部分细菌附着在条斑紫菜表面，随着原藻的采收进入了加工环节。在清洗环节，采用海水清洗原藻上的泥沙和杂质，样品经过清洗之后，菌落总数均有所下降。在调和环节，将切碎的紫菜与淡水混合，制成一定比例的紫菜混悬液，该环节条斑紫菜的菌落总数没有明显的变化。调和之后，通过浇饼机将紫菜混悬液注入浇饼框中，采用海绵挤压进行脱水，最后经过一次干燥和二次干燥成为干条斑紫菜。其中两家企业的样品在经过一次干燥之后菌落总数显著上升。推测可能的原因有两点：一是样品在浇饼脱水环节因海绵的更换不及时而造成一定程度的污染，二是一次干燥过程的温度较低，通常在 35~55 ℃，且干燥环境的湿度较高，较低的温度和高湿度环境下某些细菌可能发生增殖。二次干燥后样本的菌数无明显降低，表明二次干燥的高温没有明显的杀菌效果，微生物没有得到有效的控制和减少。微生物在低水分活度食品中耐热性增强(Jin *et al*,

2020; Koseki *et al*, 2015; 黄晓燕等, 2020)，条斑紫菜经过干燥后，水分活度下降，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，菌落总数得不到降低。通常认为低水分活度食品能抑制微生物的生长繁殖，基本不存在腐败变质的安全隐患，但其中的微生物存活较长时间，也可能对人体健康产生威胁。

传统的细菌分离培养方法操作复杂、耗时长，无法检出不可培养的细菌与低丰度微生物，基于宏基因组的高通量测序技术能完整快速地反映样品中的微生物组成。本研究通过宏基因组联合高通量测序技术对 3 家企业 5 个关键环节的条斑紫菜样品的总细菌组成进行分析，结果发现，不同海区采收的原藻细菌菌群丰度及多样性有明显差异，这与前期的研究结果基本一致(武洪庆, 2012)。清洗处理后，A 企业与 B 企业的样本总细菌菌群多样性有明显降低，而 C 企业的样本在清洗与调和后总细菌菌群结构变化不大。进入干燥环节，由于温度的升高，样品的微生物多样性显著降低，各企业均以蓝细菌为主要菌群。这可能是因为多数附着在条斑紫菜表面的海洋细菌经过高温干燥而失去活性，而蓝细菌对高温、干燥等极端条件具有一定的耐受性，在生态系统中有较强的竞争优势，从而得以存活(Tang *et al*, 2018; 张婷等, 2024)。

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 3 家企业一次干燥与二次干燥环节的样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，探究导致菌落总数增多的优势菌。虽然不同细菌在琼脂平板上的菌落大小稍有差异，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，具有一定的参考价值。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。从结果可以看出，多数企业干燥后的样本中含有较高丰度的巨型球菌，巨型球菌是一类革兰氏阴性球菌，主要存在于动物肠道中，可产淀粉酶、蛋白酶，能参与水产品的腐败变质过程，也会引发水产动物的细菌性疾病(郑居神等, 2023; 蓝胜华等, 2015; 蔡秋杏等, 2009; 李少丽等, 2020)。此外，样本中异常球菌占比也较高，异常球菌分布及适应范围广泛，具有对辐射、干旱、高温、氧化胁迫的极端抗性，在高温胁迫过程中，其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(赵明明, 2021; 赵明明等, 2022)。除此之外，不动杆菌在 3 家企业的干条斑紫菜中也均有较高的占比，不动杆菌广泛分布在外界环境中，是一种条件致病菌，可能诱发动物感染和炎症(Hamouda *et al*, 2011)；不动杆菌的增多也会加速水产品品质的劣变，影响水产品品质特征(刘爱芳等, 2018)。A 企业的干条斑紫菜中，芽孢杆菌为主要优势菌之一。芽孢杆菌可形成芽孢，是一类革兰氏阳性菌，一般对哺乳动物无害，可作为人和动物的益生菌。但有多项研究认为，芽孢杆菌是多种水产品在储藏过程中的主要优势腐败菌，使水产品变质，缩短货架期(张永进等, 2013; 谢丽丹等, 2016)。芽孢的生成使芽孢杆菌对周围环境的耐受能力增强，加热杀菌很难将其杀灭(檀茜倩等, 2023)。为了降低干条斑紫菜的菌落总数，对样本中优势菌的生长进行控制非常重要。

本研究结合前期的高通量测序和平板分离实验结果发现，大多数干条斑紫菜与海苔样品中的可培养细菌均以巨型球菌为优势菌，巨型球菌也是导致海苔产品菌落总数超标的主要细菌，该菌在经过高温的干燥与烤制加工后仍有大量存活(江姗等, 2024)，因此，对巨型球菌的耐受特性进行分析十分必要。本研究选择其中一株巨型球菌进行温度和干旱耐受特性分析，结果表明，50 ℃以上的温度导致菌株数量显著下降，可能是高温会使菌株体内蛋白质类物质的活性下降，影响代谢过程。有研究发现，多种菌株在 35%以上的 PEG6000 浓度中基本无法生长繁殖(周利平等, 2010)，而巨型球菌 J1 在浓度达到 50%时，生长才受到显著抑制，表明巨型球菌 J1 具有较强的抗干旱能力。实验结果显示，在液体环境中巨型球菌的耐热性并不强，但具有一定的抗干旱能力，推测其在干紫菜制品中的强耐受性可能与低水分活度有关。下一步将探讨巨型球菌在实际干紫菜样品中的耐受机制。

4　结论与展望

本研究获得了 3 家代表性企业的干条斑紫菜加工过程中菌落总数的变化情况，同时揭示了干条斑紫菜在加工过程中细菌菌群结构的变化情况，并初步探究了共有优势菌——巨型球菌的耐受特性：1)条斑紫菜浇饼脱水和干燥环节是导致产品菌落总数升高的关键环节；2)紫菜原藻中总细菌菌群多样性丰富，不同海区采收的原藻细菌菌群结构有显著差异，干燥后样品总细菌菌群多样性降低，多数样本中的优势菌为巨型球菌等；3)分离的优势菌——巨型球菌在液体环境中对温度耐受性较差，但具有较强的抗干旱能力。实验结果对开发干条斑紫菜的微生物控制技术，保障烤紫菜产品的食用安全性具有重要意义。通过以上研究，建议在加工过程中严格控制环境与设备的卫生状况，使用符合标准的海水与淡水，定期更换脱水海绵。

同时，可根据本研究证实的优势菌及耐受特点，探究更具针对性的新型杀菌技术，例如射频杀菌技术、微波杀菌技术等，实现对干燥过程中优势菌的杀灭，从而达到菌落总数的控制效果。

参 考 文 献

蔡秋杏, 李来好, 陈胜军, 等. 液熏罗非鱼片加工过程中微生物群落的 PCR-DGGE 分析. 食品科学, 2009, 30(23): 35–40 [CAI Q X, LI L H, CHEN S J, *et al*. PCR-DGGE analysis of bacterial community during processing of liquid-smoked tilapia. Food Science, 2009, 30(23): 35–40]

黄晓燕, 刘铖珺, 李长城, 等. 低水分活度食品微生物控制技术研究现状. 食品与发酵工业, 2020, 46(23): 286–292 [HUANG X Y, LIU C J, LI C C, *et al*. Research progress in microbiological control of food with low water activity. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(23): 286–292]

江姗, 李娜, 戴卫平, 等. 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. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(7): 242–250 [JIANG S, LI N, DAI W P, *et al*. Analysis of bacterial diversity and dominant bacteria in dried *Neopyropia yezoensis* and roasted laver using high-throughput sequencing. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(7): 242–250]

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. 水产科学, 2015, 34(12): 778–782 [LAN S H, WANG L, DENG L J, *et al*. Identification and drug sensitivity of *Megasphaera* from yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. Fisheries Science, 2015, 34(12): 778–782]

李桂澜, 匡华. 高通量测序技术在食品微生物检测中的应用. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(15): 5091–5097 [LI G L, KUANG H. Applications of high-throughput sequencing technologies for food microbiome detection. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(15): 5091–5097]

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. 食品与发酵工业, 2020, 46(14): 121–126 [LI S L, DENG J C, LI C S, *et al*. Isolation and identification of biogenic amine-producing bacteria from raw bigeye tuna (*Thunnus obesus*). Food and Fermentation Industries, 2020, 46(14): 121–126]

刘爱芳, 谢晶, 钱韻芳. 冷藏金枪鱼优势腐败菌致腐败能力. 食品科学, 2018, 39(3): 7–14 [LIU A F, XIE J, QIAN Y F. Spoilage potential of dominant spoilage bacteria from chilled tuna (*Thunnus obesus*). Food Science, 2018, 39(3): 7–14]

刘妮, 于永翔, 王印庚, 等. 浒苔暴发前后青岛沿岸水体和藻体的细菌群落结构与生态环境因子相关性分析. 渔业科学进展, 2024, 45(6): 24–37 [LIU N, YU Y X, WANG Y G, *et al*. Correlation analysis of bacterial community structure and eco-environmental factors in water and algae along Qingdao coast before and after the outbreak of *Ulva prolifera*. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(6): 24–37]

刘玉, 王灵昭, 何大星, 等. HACCP体系在夹心海苔生产中的应用. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(8): 3399–3404 [LIU Y, WANG L Z, HE D X, *et al*. Application of hazard analysis and critical control point system during the production of sandwich seaweed. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(8): 3399–3404]

任文博, 陈楠, 律娜, 等. 郫县豆瓣细菌多样性及群落结构动态变化. 微生物学报, 2023, 63(7): 2809–2821 [REN W B, CHEN N, LÜ N, *et al*. Diversity and dynamics of bacteria in Pixian broad-bean paste. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2809–2821]

孙文珂, 沈照鹏, 权浩严, 等. 基于近红外光谱的条斑紫菜菌落总数快速检测技术. 食品工业科技, 2022, 43(16): 322–328 [SUN W K, SHEN Z P, QUAN H Y, *et al*. Rapid detection of total bacterial count of *Porphyra yezoensis* based on near infrared spectroscopy. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(16): 322–328]

檀茜倩, 王丹, 程笑笑, 等. 虾酱源芽孢杆菌的筛选及其益生特性. 中国食品学报, 2023, 23(12): 51–60 [TAN X Q, WANG D, CHENG X X, *et al*. Screening and probiotic characteristics of shrimp paste originated *Bacillus* spp. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(12): 51–60]

田雨, 江艳华, 郭莹莹, 等. 紫菜营养品质及食用价值研究进展. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(12): 4929–4936 [TIAN Y, JIANG Y H, GUO Y Y, *et al*. Research progress on nutritional quality and edible value of *Porphyra*. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(12): 4929–4936]

武洪庆. 不同养殖海藻表面附着细菌多样性分析. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2012 [WU H Q. Epibacterial community structure of several macroalgae. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2012]

谢丽丹, 李蕾蕾, 王素英, 等. 低温贮藏南美白对虾特定腐败菌的分离鉴定及腐败能力分析. 食品与发酵工业, 2016, 42(3): 67–74 [XIE L D, LI L L, WANG S Y, *et al*. Isolation and identification of particular spoilage bacteria in *Penaeus vannamei* stored under low temperature and analysis on their spoilage ability. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(3): 67–74]

熊盈盈, 莫祯妮, 邱树毅, 等. 未培养环境微生物培养方法的研究进展. 微生物学通报, 2021, 48(5): 1765–1779 [XIONG Y Y, MO Z N, QIU S Y, *et al*. Research progress on culture methods of uncultured environmental microorganisms. Microbiology China, 2021, 48(5): 1765–1779]

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. 卫生研究, 2019, 48(6): 998–1000 [YANG S R, YIN S Y, PEI X Y, *et al*. Microbial pollution of ready-to-eat algae products in 14 provinces (autonomous regions and municipalities directly

under the Central Government) of China in 2014. Journal of Hygiene Research, 2019, 48(6): 998–1000]

杨贤庆, 黄海潮, 潘创, 等. 紫菜的营养成分、功能活性及综合利用研究进展. 食品与发酵工业, 2020, 46(5): 306–313 [YANG X Q, HUANG H C, PAN C, *et al*. Advances on nutrient components, biological activities and comprehensive utilization of *Porphyra*. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(5): 306–313]

张咚咚, 赵金凤, 谢思源, 等. 基于高通量测序的玉米中微生物多样性分析. 中国食品学报, 2023, 23(10): 305–314 [ZHANG D D, ZHAO J F, XIE S Y, *et al*. Analysis of microbial diversity in maize based on high-throughput sequencing. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(10): 305–314]

张美如, 陆勤勤, 许广平. 条斑紫菜产业现状及对其健康发展的思考. 中国水产, 2012(11): 15–19 [ZHANG M R, LU Q Q, XU G P. Present situation of *Porphyra yezoensis* industry and its healthy development. China Fisheries, 2012(11): 15–19]

张盼盼, 杨锐, 吴小凯. 江苏省条斑紫菜产业现状调研. 宁波大学学报(理工版), 2014, 27(1): 18–22 [ZHANG P P, YANG R, WU X K. Laver industry in Jiangsu Province: Investigation. Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering), 2014, 27(1): 18–22]

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. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1752–1775 [ZHANG T, SUN H L, QI F X, *et al*. High-temperature adaptation mechanisms and biotechnological potentials of thermophilic cyanobacteria. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1752–1775]

张晓华. 海洋微生物学. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2007 [ZHANG X H. Marine microliology. Qingdao: China Ocean University Press, 2007]

张永进, 魏静, 王伟, 等. 巴氏灭菌即食小龙虾特定腐败菌的16S rRNA 鉴定. 渔业现代化, 2013, 40(6): 46–51 [ZHANG Y J, WEI J, WANG W, *et al*. Molecular identification of specific spoilage organisms from ready-to-eat crayfish sterilized by pasteurization. Fishery Modernization, 2013, 40(6): 46–51]

赵玲, 曹荣, 王联珠, 等. 条斑紫菜烤制前后特征风味变化研究. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 199–207 [ZHAO L, CAO R, WANG L Z, *et al*. Study on the characteristic flavor change of *Porphyra yezoensis* before and after roasting. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 199–207]

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. 生物技术通报, 2022, 38(5): 149–158 [ZHAO M M, TANG Y, GUO L Z, *et al*. Function analysis of lon1 protease involved in high temperature stress and cell division of *Deinococcus radiodurans* R1. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(5): 149–158]

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. 中国农业科学院硕士研究生学位论文, 2021 [ZHAO M M. Expression and function analysis of proteolytic enzymes Lon1 and Lon2 in radiation-tolerant abnormal coccus under high temperature stress. Master's Theisis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021, 37–71]

郑居神, 何浣纱, 胡奥, 等. 16S rDNA 克隆文库法分析小龙虾肠道细菌多样性. 食品工业, 2023, 44(3): 168–171 [ZHENG J S, HE H S, HU A, *et al*. Diversity of endophytic bacteria in crayfish gut analyzed by 16S rDNA clone library. The Food Industry, 2023, 44(3): 168–171]

周利平, 刘文杰, 马焕成, 等. 根瘤菌菌株和接种根瘤菌植株的耐旱性研究进展. 安徽农业科学, 2010, 38(22): 11978–11980, 11983 [ZHOU L P, LIU W J, MA H C, *et al*. Research progress on drought resistance of *Rhizobium* strains and plants inoculated with *Rhizobium*. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(22): 11978–11980, 11983]

朱文嘉, 王联珠, 郭莹莹, 等. 我国紫菜产业现状及质量控制. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(13): 3353–3358 [ZHU W J, WANG L Z, GUO Y Y, *et al*. Industry status and quality control of laver in China. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(13): 3353–3358]

CARRIAS J F, SIME-NGANDO T. Bacteria, attached to surfaces. Encyclopedia of Inland Waters, 2009, 182–192

EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460–2461

HAMOUDA A, FINDLAY J, AL HASSAN L, *et al*. Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. International Journal of Antimicrobial Agents, 2011, 38(4): 314–318

JIN Y Q, TANG J M, ZHU M J. Water activity influence on the thermal resistance of *Salmonella* in soy protein powder at elevated temperatures. Food Control, 2020, 113: 107160

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. Journal of Food Protection, 2015, 78(1): 104–110

MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet Journal, 2011, 17(1): 10

PARADIS E, SCHLIEP K. Ape 5.0: An environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. Bioinformatics, 2019, 35(3): 526–528

SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, *et al*. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537–7541

SUN W N, XIAO H Z, PENG Q, *et al*. Analysis of bacterial diversity of Chinese Luzhou-flavor liquor brewed in different seasons by Illumina Miseq sequencing. Annals of Microbiology, 2016, 66(3): 1293–1301

TANG J, JIANG D, LUO Y F, *et al*. Potential new Genera of cyanobacterial strains isolated from thermal springs of western Sichuan, China. Algal Research, 2018, 31: 14–20

WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, *et al*. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261–5267

ZHANG J J, KOBERT K, FLOURI T, *et al*. PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. Bioinformatics, 2014, 30(5): 614–620

(编辑 冯小花)

Microbial Community Changes During Dried *Porphyra yezoensis* Processing Based on High-Throughput Sequencing

LI Na[1], JIANG Shan[1,2], WANG Lianzhu[1], GUO Yingying[1], YAO Lin[1], ZHU Wenjia[1], QU Meng[1], JIANG Yanhua[1①]

(1. *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*; 2. *College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao* 266404, *China*)

Abstract *Porphyra yezoensis* is a widely cultivated red alga. *P. yezoensis* is the most economically valuable species among artificially cultivated seaweeds in China. However, microbial exceedance in roasted *P. yezoensis* products has frequently occurred, affecting the development of the *P. yezoensis* industry. Dry *P. yezoensis* is the raw material used for the original roasted (sushi laver) as well as roasted and flavored (laver) products. The microbial load in dry *P. yezoensis* is the main factor causing the aerobic plate count in roasted *P. yezoensis* products to exceed the standard. The use of substandard raw materials has resulted in huge economic losses for companies processing roasted *P. yezoensis*. Therefore, the changes in the aerobic plate count, bacterial community structure, and dominant bacteria during the dry *P. yezoensis* processing must be analyzed for developing effective microbial control methods. Fresh *P. yezoensis* is subjected after harvesting to a series of processes to obtain the final dried products: impurity removal, cleaning, dehydration, cutting, blending, cake-pressing and dehydration, first drying, and secondary drying. The raw algae, cleaning, blending, initial drying, and secondary drying are the five critical aspects among these steps that affect the aerobic plate count. Dried *P. yezoensis* samples were selected from three representative enterprises in different maritime regions in Jiangsu Province, China, to analyze the changes in the aerobic plate count and bacterial community structure during processing, and the dominant bacteria were screened. The plate count method was used to analyze the variations in the aerobic plate count at five steps processing critical. The total bacterial community in the samples was examined using 16S amplicon high-throughput sequencing. The structural characteristics of the total and culturable bacterial communities in the samples during the drying step were compared. The dominant bacteria were isolated and identified, and their tolerance to the processing steps were analyzed. The number of bacteria decreased after washing. The aerobic plate count of the samples inconsistently changed after drying, and the drying process did not produce substantial sterilization effects. The aerobic plate counts of the samples from two enterprises substantially increased after the first drying process for two reasons. First, the samples were contaminated if the sponge was not replaced as needed during

① Corresponding author: JIANG Yanhua, Email: jiangyh@ysfri.ac.cn

cake-pressing dehydration. Second, the low-temperature and high-humidity environment during the initial drying was conducive to bacterial proliferation. The number of microorganisms in the samples did not markedly decrease after the second drying process, indicating that the high-temperature process did not sterilize the samples, and that the microorganisms were not effectively controlled or reduced. The raw seaweed harbored a diverse bacterial community, with relatively high abundances of *Olleya*, *Maribacter*, *Octadecabacter*, and *Sulfitobacter*. The bacterial flora structures widely differed with the algal harvesting area. The diversity of the total bacterial community decreased after drying, and *Cyanobacteria* became the dominant bacteria. The dominant culturable bacteria were *Macrococcus*, *Deinococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, and *Chryseobacterium*. The isolated dominant bacterium, *Macrococcus*, was poorly tolerant to high temperature but strongly resistant to drought. This study revealed the critical processing stages that increase the bacterial counts in dried *P. yezoensis* and the changes that occur in bacterial communities during processing. The tolerance of the dominant bacteria to drought and heat were preliminarily determined. These results provide the basis for controlling the microbial content in *P. yezoensis* during processing, laying a theoretical foundation for further the research and development of techniques for controlling bacteria in dried *P. yezoensis*.

Key words　*Porphyra yezoensis*; Aerobic plate count; Diversity of bacterial community; High-throughput sequencing