

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241017007

引用格式: 宫钰洁, 吴书香, 王鹏, 等. 防腐剂对牡蛎中耐药菌群结构的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(3): 195–202.

GONG YJ, WU SX, WANG P, *et al.* Effects of preservatives on the flora structure of antimicrobial-resistant bacteria in *Crassostrea gigas* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(3): 195–202. (in Chinese with English abstract).

## 防腐剂对牡蛎中耐药菌群结构的影响

宫钰洁<sup>1,2</sup>, 吴书香<sup>1,2</sup>, 王鹏<sup>2</sup>, 姚琳<sup>1</sup>, 曲梦<sup>1</sup>, 李凤铃<sup>1</sup>, 王联珠<sup>1</sup>, 江艳华<sup>1\*</sup>

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

**摘要:** **目的** 探究常用食品防腐剂对牡蛎中耐药共生菌的影响作用。**方法** 以 4 °C 冷藏为对照组, 以分别经山梨酸钾、壳聚糖、乳酸链球菌素、 $\epsilon$ -聚赖氨酸浸泡处理后进行 4 °C 冷藏为实验组, 通过耐药平板计数法分析不同食品防腐剂处理后牡蛎中耐药菌含量的变化情况, 并通过 16S rRNA 扩增子高通量测序分析耐药菌群结构的变化。**结果** 山梨酸钾与壳聚糖能显著降低单种与多重抗菌药的耐药菌数; 乳酸链球菌素能显著降低复方新诺明耐药菌数、氯霉素耐药菌数、庆大霉素耐药菌数和同时耐受 2、3、4 种药物的耐药菌数;  $\epsilon$ -聚赖氨酸能显著降低环丙沙星耐药菌数、复方新诺明耐药菌数、氯霉素耐药菌数、庆大霉素耐药菌数和同时耐受 3、4 种药物的耐药菌数。山梨酸钾与壳聚糖对四环素与环丙沙星耐药菌群的组成影响较大, 乳酸链球菌素与  $\epsilon$ -聚赖氨酸对复方新诺明耐药菌群的组成影响较大。**结论** 本研究表明通过应用合适的食品防腐剂可以控制牡蛎中耐药菌的含量, 食品防腐剂可以影响牡蛎中可培养耐药菌群的组成且不同防腐剂能抑制特定的抗菌药耐药菌, 为建立牡蛎中耐药菌的控制措施提供了新思路。

**关键词:** 防腐剂; 牡蛎; 耐药菌; 耐药菌丰度; 菌群结构

### Effects of preservatives on the flora structure of antimicrobial-resistant bacteria in *Crassostrea gigas*

GONG Yu-Jie<sup>1,2</sup>, WU Shu-Xiang<sup>1,2</sup>, WANG Peng<sup>2</sup>, YAO Lin<sup>1</sup>, QU Meng<sup>1</sup>,  
LI Feng-Ling<sup>1</sup>, WANG Lian-Zhu<sup>1</sup>, JIANG Yan-Hua<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, China, 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: Objective** To explore the effects of common food preservatives on the abundance and flora structure of antimicrobial-resistant bacteria in *Crassostrea gigas*. **Methods** The control group was refrigerated at 4 °C, and the experimental group was refrigerated at 4 °C after soaking with potassium sorbate, chitosan, Nisin and  $\epsilon$ -polylysine, respectively. The change of antimicrobial-resistant bacteria content in *Crassostrea gigas* treated

收稿日期: 2024-10-17

基金项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2023TD76); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022024022)

第一作者: 宫钰洁(2001—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品加工与安全。E-mail: g15650167869@163.com

\*通信作者: 江艳华(1980—), 女, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为水产品中生物危害物检测与控制。E-mail: jiangyh@ysfri.ac.cn

with different food preservatives was analyzed by antimicrobial-resistant plate counting method. The structural changes of antimicrobial-resistant bacteria were analyzed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicon. **Results** Potassium sorbate and chitosan could significantly reduce the number of resistant bacteria of single and multiple antimicrobials; Nisin significantly reduced the number of resistant bacteria to co-trimoxazole, chloramphenicol, gentamicin, and bacteria resistant to 2, 3, or 4 antimicrobials simultaneously;  $\epsilon$ -polylysine significantly decreased the number of ciprofloxacin resistant bacteria, co-trimoxazole resistant bacteria, chloramphenicol resistant bacteria, gentamicin resistant bacteria and resistant bacteria resistant to 3 or 4 kinds of antimicrobials at the same time. Potassium sorbate and chitosan had a significant effect on the composition of tetracycline and ciprofloxacin resistant bacteria, and Nisin and  $\epsilon$ -polysine had a significant effect on the composition of co-trimoxazole resistant bacteria. **Conclusion** The research results show that the content of antimicrobial-resistant bacteria in *Crassostrea gigas* can be controlled by applying appropriate food preservatives, food preservatives can affect the composition of culturable antimicrobial-resistant bacteria in *Crassostrea gigas* and different preservatives can inhibit specific antimicrobial-resistant bacteria, which provides a new idea for the establishment of antimicrobial-resistant bacteria control techniques in *Crassostrea gigas*.

**KEY WORDS:** preservatives; *Crassostrea gigas*; antimicrobial-resistant bacteria; abundance of antimicrobial-resistant bacteria; flora structure

## 0 引言

抗菌药能够抑制或杀灭微生物,广泛用于治疗和控制在细菌感染引发的疾病。然而,抗菌药物的反复使用会导致细菌耐药性的出现<sup>[1]</sup>。细菌耐药性已对全球人类公共卫生安全造成严重威胁<sup>[2-6]</sup>,据 2015 年欧洲国家的数据统计,每年有数万人因耐药菌感染而死亡<sup>[7]</sup>。据估计,到 2050 年,全球因细菌耐药性导致的死亡人数将达到 1000 万<sup>[8]</sup>。目前,防治水产细菌性疾病的手段仍以抗菌药为主<sup>[9-10]</sup>,虽然开放海域养殖的水生动物基本不会用药,但由于环境污染<sup>[11]</sup>以及耐药基因可以在细菌间水平转移等原因,也会导致水生动物体内细菌产生耐药性<sup>[12-13]</sup>。

牡蛎是中国近海养殖的重要海产品,其产量位居中国海水养殖产品之首,具有味道鲜美、营养价值高的特点。作为滤食性动物,牡蛎的移动能力较差,当生长的水环境受到污染时,牡蛎体内极易富集包括微生物在内的多种有害物质<sup>[12]</sup>。前期研究报道显示牡蛎中含有耐药菌且多重耐药现象较为严重<sup>[14-19]</sup>,生食或食用未完全煮熟的牡蛎可能会导致这些耐药菌进入人体,如果耐药菌为致病菌,则直接导致人体发生疾病,如果耐药菌为非致病菌,其含有的耐药基因也可能转移到肠道菌群中使其产生耐药性<sup>[20-22]</sup>,危害人体健康。因此有必要探究牡蛎中耐药菌的控制措施。

水产品由于含水量较高,如果储存不当,其中的微生物极易生长繁殖,导致产品的腐败及食用安全风险。防腐剂能够有效抑制微生物生长,阻止微生物繁殖,是水产品常用的保鲜方式之一,但防腐剂是否具有抑制耐药菌的作用不得而知。山梨酸钾、乳酸链球菌素、 $\epsilon$ -聚赖氨酸

与壳聚糖是我国允许使用且常用于水产品保鲜的防腐剂,本研究将分析这 4 种食品防腐剂在牡蛎保鲜过程中对耐药菌的影响作用,并探讨不同防腐剂对耐药菌的作用是否具有种属特异性,为建立牡蛎中耐药菌的控制措施奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

三倍体长牡蛎,采自威海乳山牡蛎养殖场,低温保存并于当天运回实验室后立即进行实验。

### 1.2 试剂

2216E 培养基(青岛海博生物技术有限公司);琼脂粉(北京索莱宝生物科技有限公司);四环素(tetracycline, TE)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、复方新诺明[甲氧苄啶:磺胺甲恶唑(sulphamethoxazole:trimethoprim)=1:19, SXT]、氯霉素[(chloramphenicol, C), 美国药典级]、庆大霉素(gentamicin, CN)、山梨酸钾(纯度 99%)、壳聚糖[生工生物工程(上海)股份有限公司];乳酸链球菌素、 $\epsilon$ -聚赖氨酸(浙江新银象生物工程有限公司);E.Z.N.A™Mag-Bind Soil DNA Kit(美国 Omega Bio-Tek 公司);Qubit dsDNA HS 分析试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 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]。

### 1.3 仪器与设备

BT 4202S 电子分析天平[精度 0.01 g, 北京赛多利斯公司];NU-425-600E 型 ClassII 生物安全柜(美国 Nuair 公司);MIR-254 型生化培养箱(日本 SANYO 公司);Pico-21 型

台式离心机、Q33238 型 Qubit®4.0 荧光计[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂);FR-1000 型凝胶成像系统(上海复日科技有限公司);ETC 811 型 PCR 仪(北京东胜创新生物科技有限公司)。

## 1.4 实验方法

### 1.4.1 样品处理

流水冲净牡蛎表面,用灭菌刀具撬取牡蛎所有可食用部分用于实验。将牡蛎肉置于无菌袋中,4 °C 保存 10 d,作为空白组。实验组则将牡蛎肉在 4 °C 条件下分别浸泡于 0.1% 的山梨酸钾溶液、0.6% 的壳聚糖溶液、0.5% 的乳酸链球菌素溶液、0.25% 的  $\epsilon$ -聚赖氨酸溶液中 30 min,取出沥干后,置于无菌袋中 4 °C 储存。储存 2、4、7 和 10 d 时采集样品进行耐药菌的测定,每个时间点测定 3 份样品,实验重复 3 次。

### 1.4.2 牡蛎中耐药菌的测定

每份样品取 25 g 加入 225 g 无菌磷酸盐缓冲液,充分匀浆后进行 10 倍梯度稀释,选择适宜浓度的稀释液 0.1 mL 分别涂布单抗平板(2216E 培养基中分别含药物终浓度为 TE 16 mg/mL (TE16)、TE 32 mg/mL (TE32)、CIP 4 mg/mL、SXT 80 mg/mL [甲氧苄啶:磺胺甲恶唑=4:76 (mg/mL)]、C 32 mg/mL、CN 16 mg/mL、多抗平板[2216E 培养基分别含 TE 16 mg/mL+SXT 80 mg/mL (TS)、TE 16 mg/mL+SXT 80 mg/mL+CIP 4 mg/mL (TSC)、TE 16 mg/mL+SXT 80 mg/mL+CIP 4 mg/mL+CN 16 mg/mL (TSCCN)]以及空白平板(不含药物, K),每个稀释度涂布 3 个平板,对于低浓度的耐药菌,则取 1 mL 涂布 3 个耐药平板(检出限为 10 CFU/g)。将平板置于 30 °C 恒温培养箱中培养 72 h $\pm$ 3 h。对各个平板上的菌落进行计数,并计算出样品中各类抗菌药耐药菌的数量(以 lg CFU/g 计)。当样品中菌落数低于本方法的检出限 10 CFU/g 时,以检出限的二分之一计算。

### 1.4.3 耐药平板菌群基因组 DNA 的提取

选择 1.4.2 中对照组和经防腐剂处理 7 d 的实验组涂布后,选择含有适宜菌数的耐药平板。向平板中加入适量磷酸盐缓冲液,用无菌接种环轻轻刮取菌落,将菌液混匀后转移至无菌离心管中。重复上述步骤 2 次,合并菌液,于 8000 r/min 离心 20 min,弃去上清液,沉淀用 E.Z.N.A™ Mag-Bind Soil DNA Kit 提取试剂盒提取基因组 DNA,并通过电泳检测确定 DNA 浓度。

### 1.4.4 聚合酶链反应扩增与高通量测序

对基因组 DNA 进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增,采用 2 轮 PCR 扩增方法。第一轮采用上游引物(Nobar\_341F: 5'-CCTACGGGNG GCGCAG-3')和下游引物(Nobar\_805R: 5'-GACTACHV GGGTATCTA ATCC-3')对 16S rRNA 基因的 V3~V4 可变区进行扩增。第一轮 PCR 扩增体系: 2 $\times$ Hieff®Robust PCR Master Mix 15  $\mu$ L, 上下引物各 1  $\mu$ L, 模板 10~20 ng, 超纯水补充至 30  $\mu$ L。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 20 s, 55 °C

退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 进行 5 个循环, 72 °C 延伸 5 min, 最后 10 °C 保温。

第二轮扩增引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物进行扩增。第二轮 PCR 扩增体系: 2 $\times$ Hieff®Robust PCR Master Mix 15  $\mu$ L, 上下引物各 1  $\mu$ L, 模板 20~30 ng, 超纯水补充至 30  $\mu$ L。反应条件为 95 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 20 s, 55 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 进行 5 个循环, 72 °C 延伸 5 min, 最后 10 °C 保温。扩增结束后,通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测文库大小,并使用 Qubit 4.0 荧光定量仪测定文库浓度。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。

测序后获得双端序列数据,使用 Cutadapt<sup>[23]</sup>软件去除引物接头序列,然后依据 PE reads 间的 overlap 关系使用 PEAR<sup>[24]</sup>软件将成对的 reads 拼接(merge)成一条序列。根据 barcode 标签序列区分各样本数据,通过质控过滤得到用于后续分析的有效数据。采用 RDP classifier<sup>[25]</sup>软件对 97% 相似度水平的操作分类单元(operational taxonomic unit, OUT)代表序列进行分类学分析,并在属水平统计各个样本的菌群组成。

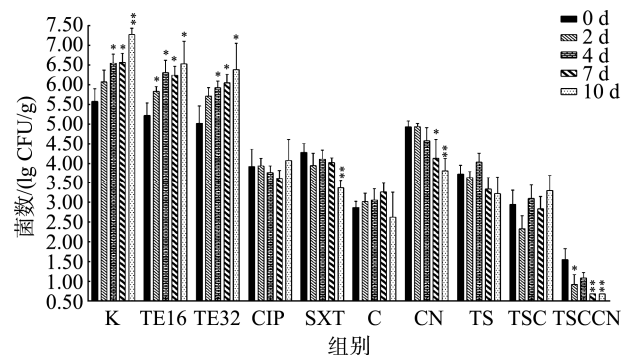
## 1.5 数据处理

实验结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示,使用 GraphPad Prism 9 进行绘图,通过 SPSS 25 进行 *t* 检验分析,  $P < 0.05$  表示具有显著性差异,  $P < 0.01$  表示具有极显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 冷藏条件下牡蛎中耐药菌含量的变化

冷藏条件下牡蛎中耐药菌含量的变化见图 1。在 10 d 的储存过程中,空白平板(K)的细菌总数以及 TE 耐药菌数整体上呈上升趋势,且以空白平板表现的最为明显,这表明细菌在冷藏条件下仍能生长。储存 10 d 后, K、TE16 和 TE32 的耐药菌数分别增加了 1.69、1.31 和 1.35 lg CFU/g, CIP 耐



注: \* $P < 0.05$  表示具有显著性差异, \*\* $P < 0.01$  表示具有极显著性差异, 下同。

图 1 4 °C 冷藏下对照组牡蛎中耐药菌含量的变化  
Fig.1 Content changes of antimicrobial-resistant bacteria in *Crassostrea gigas* in control group under refrigeration at 4 °C

药菌数、C 耐药菌数、同时耐受 TE 和 SXT 双重抗菌药(TS)的耐药菌数以及同时耐受 TE、SXT 和 CIP 三重抗菌药(TSC)的耐药菌数没有显著变化, SXT 耐药菌数、CN 耐药菌数、同时耐受 TE、SXT、C 和 CN 四重抗菌药(TSCCN)的耐药菌数与初始相比极显著下降( $P<0.01$ ), 分别降低了 0.92、1.12 和 0.86 lg CFU/g。TSCCN 的耐药菌数在储存 7 d 后降低至检出限以下。由此可见, 冷藏过程只能显著降低牡蛎中 SXT、CN 与 TSCCN 的耐药菌数。

## 2.2 防腐剂处理下牡蛎中耐药菌含量的变化

山梨酸钾处理后牡蛎中耐药菌含量的变化见图 2。经过山梨酸钾处理后, 牡蛎中的细菌总数整体上不断下降, 这表明山梨酸钾能抑制细菌的生长。两种浓度的 TE 耐药菌数变化趋势相似, 在储存 2 d 菌数下降的最为明显, 在 4~10 d 菌数下降缓慢。储存 10 d 后, TE16、TE32 的耐药菌数显著降低( $P<0.05$ ), 其他单种和多重药物耐药菌数降低更为明显( $P<0.01$ ), CIP、SXT、C、CN、TS、TSC 耐药菌数分别降低了 1.52、2.08、1.02、1.16、1.42 和 1.93 lg CFU/g。TSCCN 的耐药菌数在储存 4 d 后降低至检出限以下。与空白组相比, 山梨酸钾还可显著降低 TE、CIP、C、TS 与 TSC 的耐药菌数。

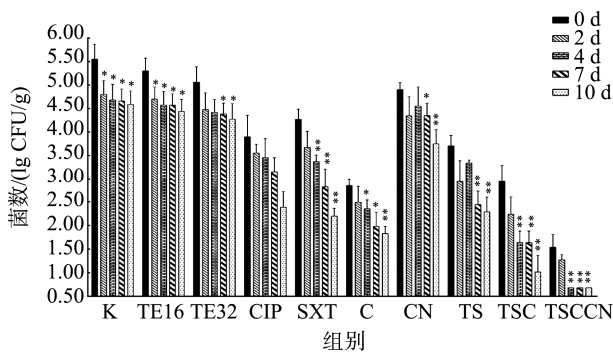


图 2 山梨酸钾处理后牡蛎中耐药菌含量的变化

Fig.2 Content changes of antimicrobial-resistant bacteria in *Crassostrea gigas* treated with potassium sorbate

乳酸链球菌素处理后牡蛎中耐药菌含量的变化见图 3。储存 10 d 后, 牡蛎中的细菌总数与各耐药菌数均有所下降, 但 TE32 耐药菌数和 CIP 耐药菌数变化并不显著( $P>0.05$ ), SXT、C、CN、TS、TSC 耐药菌数分别降低了 1.78、1.84、1.18、1.30 和 1.92 lg CFU/g。TSCCN 的耐药菌数在储存 7 d 后降低至检出限以下。与空白组相比, 乳酸链球菌素还可显著降低 C、TS 与 TSC 的耐药菌数。

$\epsilon$ -聚赖氨酸处理后牡蛎中耐药菌含量的变化见图 4。储存 10 d 后, 细菌总数、TE 耐药菌数与 TS 耐药菌变化不显著( $P>0.05$ ), CIP、SXT、C、CN 耐药菌数显著降低, 分别减少了 1.08、1.33、0.74 和 2.15 lg CFU/g。TS 与 TSC 耐药菌数在 7 d 时达到最低后, 10 d 时的耐药菌数反而升高,

可能是由于有些对  $\epsilon$ -聚赖氨酸耐受的菌得到了进一步的增殖。TSCCN 的耐药菌数在储存 4 d 后降低至检出限以下。与空白组相比,  $\epsilon$ -聚赖氨酸还可显著降低 CIP、C 与 TSC 的耐药菌数。

壳聚糖处理后牡蛎中耐药菌含量的变化见图 5。不同类型的抗菌药耐药菌数在 2 d 后都显著下降。细菌总数与 TE 耐药菌数的变化趋势相似, 且 10 d 后耐药菌数均降低了 2.00 lg CFU/g 以上。CIP、SXT、C、CN、TS、TSC 的

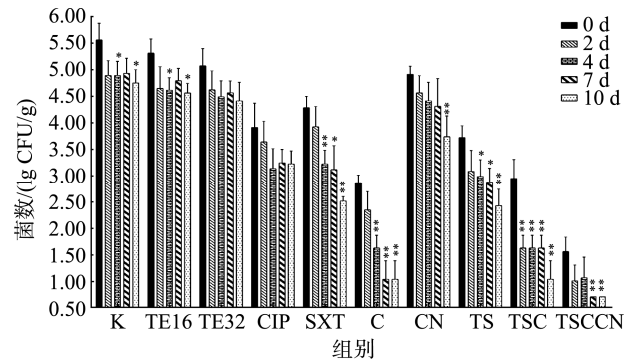


图 3 乳酸链球菌素处理后牡蛎中耐药菌含量的变化

Fig.3 Content changes of antimicrobial-resistant bacteria in *Crassostrea gigas* treated with Nisin

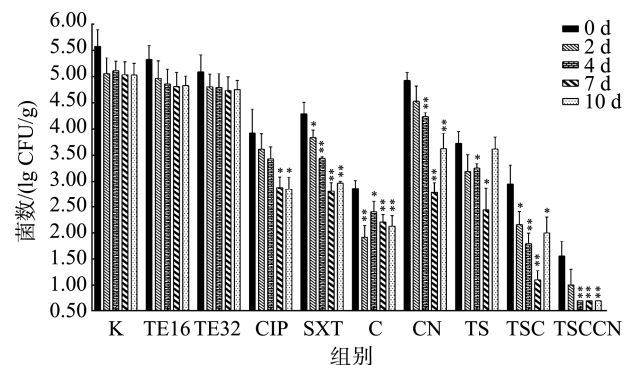


图 4  $\epsilon$ -聚赖氨酸处理后牡蛎中耐药菌含量的变化

Fig.4 Content changes of antimicrobial-resistant bacteria in *Crassostrea gigas* treated with  $\epsilon$ -polylysine

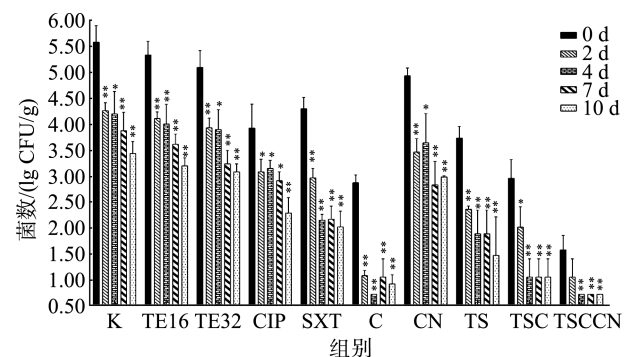


图 5 壳聚糖处理后牡蛎中耐药菌含量的变化

Fig.5 Content changes of antimicrobial-resistant bacteria in *Crassostrea gigas* treated with chitosan

耐药菌数在 10 d 后均降低了 1.60 lg CFU/g 以上, 其中以 C 耐药菌数较低的最明显, 降低了 1.97 lg CFU/g。TSSCN 的耐药菌数在储存 4 d 后降低至检出限以下。壳聚糖可显著降低细菌总数与各药物耐药菌数, 表明壳聚糖的抑菌效果最好。

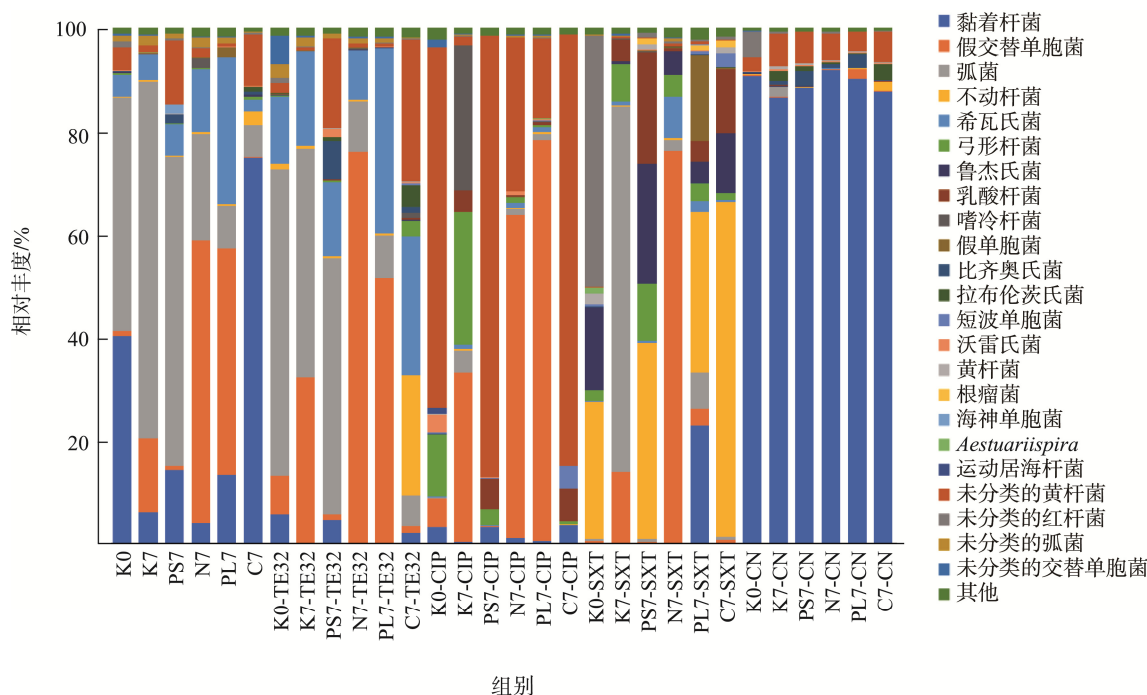
### 2.3 防腐剂处理下牡蛎中可培养耐药菌群的组成变化

经过防腐剂的处理并冷藏 7 d 后, 牡蛎中耐药菌数发生显著变化, 因此测定了 7 d 后耐药菌群的组成变化情况, 结果见图 6。

未经防腐剂处理的对照组样品初始菌群以黏着杆菌 (*Tenacibaculum*) 和弧菌 (*Vibrio*) 为主, 占比分别为 40.27% 与 45.13%。冷藏 7 d 后, 细菌菌群 (K7) 的相对丰度有明显不同, 其中黏着杆菌下降了 6.26%, 而假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas*) 与弧菌的相对丰度分别上升了 13.26% 与 23.77%。防腐剂处理后, 细菌组成与相对丰度发生了很大变化, 其中山梨酸钾组 (PS7) 以弧菌为主, 占比超过 59.79%, 黄杆菌 (*Flavobacterium*) 的相对丰度较对

照组有所上升, 乳酸链球菌组 (N7) 以假交替单胞菌、希瓦氏菌 (*Shewanella*) 和弧菌为主,  $\epsilon$ -聚赖氨酸组 (PL7) 以假交替单胞菌和希瓦氏菌为主, 壳聚糖组 (C7) 以黏着杆菌占绝对比重。由此可见, 经不同防腐剂处理后, 牡蛎中细菌菌群组成差异明显, 说明防腐剂的抑菌作用具有种属特异性。

对于牡蛎中的 TE 耐药菌, 对照组初始样本以弧菌、希瓦氏菌、假交替单胞菌为主, 占比分别为 59.34%、12.94%、7.47%, 冷藏 7 d 后仍以这 3 种菌为主, 占比分别为 44.25%、18.32%、32.26%。经防腐剂处理后, TE 耐药菌群的相对丰度发生变化; 山梨酸钾处理后 (PS7-TE32), 仍以弧菌占比最大, 假交替单胞菌所占比重大大降低, 黄杆菌的相对丰度有所增加; 乳酸链球菌素处理后 (N7-TE32), 以假交替单胞菌占绝对优势, 弧菌与希瓦氏菌比重下降;  $\epsilon$ -聚赖氨酸处理后 (PL7-TE32) 的物种组成与 N7-TE32 相似; 壳聚糖处理后 (C7-TE32) 则以不动杆菌 (*Acinetobacter*)、希瓦氏菌和黄杆菌为主。由此可见, 山梨酸钾与壳聚糖对 TE 耐药菌群的组成有较大影响。



注: K0: 对照组初始的平板菌群; K0-TE32: 对照组初始的 32 mg/mL TE 平板菌群; K0-CIP: 对照组初始的 CIP 平板菌群; K0-SXT: 对照组初始的 SXT 平板菌群; K0-CN: 对照组初始的 CN 平板菌群; K7: 对照组 7 d 时的平板菌群; K7-TE32: 对照组 7 d 时的 32 mg/mL TE 平板菌群; K7-CIP: 对照组 7 d 时的 CIP 平板菌群; K7-SXT: 对照组 7 d 时的 SXT 平板菌群; K7-CN: 对照组 7 d 时的 CN 平板菌群; PS7: 山梨酸钾处理组的空白平板菌群; PS7-TE32: 山梨酸钾处理组的 32 mg/mL TE 平板菌群; PS7-CIP: 山梨酸钾处理组的 CIP 平板菌群; PS7-SXT: 山梨酸钾处理组的 SXT 平板菌群; PS7-CN: 山梨酸钾处理组的 CN 平板菌群; N7: 乳酸链球菌素处理组的空白平板菌群; N7-TE32: 乳酸链球菌素处理组的 32 mg/mL TE 平板菌群; N7-CIP: 乳酸链球菌素处理组的 CIP 平板菌群; N7-SXT: 乳酸链球菌素处理组的 SXT 平板菌群; N7-CN: 乳酸链球菌素处理组的 CN 平板菌群; PL7:  $\epsilon$ -聚赖氨酸处理组的空白平板菌群; PL7-TE32:  $\epsilon$ -聚赖氨酸处理组的 32 mg/mL TE 平板菌群; PL7-CIP:  $\epsilon$ -聚赖氨酸处理组的 CIP 平板菌群; PL7-SXT:  $\epsilon$ -聚赖氨酸处理组的 SXT 平板菌群; PL7-CN:  $\epsilon$ -聚赖氨酸处理组的 CN 平板菌群; C7: 壳聚糖处理组的空白平板菌群; C7-TE32: 壳聚糖处理组的 32 mg/mL TE 平板菌群; C7-CIP: 壳聚糖处理组的 CIP 平板菌群; C7-SXT: 壳聚糖处理组的 SXT 平板菌群; C7-CN: 壳聚糖处理组的 CN 平板菌群。

图 6 防腐剂处理后牡蛎中耐药菌群的组成

Fig.6 Composition of antimicrobial-resistant bacteria in *Crassostrea gigas* treated with bacteriostatic agents

对于 CIP 耐药菌, 对照组初始样本以未分类的黄杆菌(*unclassified-Flavobacteriaceae*)为主, 冷藏 7 d 后, 菌群结构变化较大, 以假交替单胞菌、嗜冷杆菌(*Psychrobacter*)和弓形杆菌(*Arcobacter*)为主。经 4 种防腐剂处理后, 与 K7-CIP 相比, 嗜冷杆菌的相对丰度下降最明显; N7-CIP 与 PL7-CIP 均以假交替单胞菌占比最大, 而 PS7-CIP 与 C7-CIP 以黄杆菌为主, 相对丰度均在 80%以上。由此可见, 山梨酸钾与壳聚糖对 CIP 耐药菌群的组成有较大影响。

对于 SXT 耐药菌, 对照组初始样本以未分类的红杆菌(*unclassified-Rhodobacteraceae*)为主, 冷藏 7 d 后, 假交替单胞菌和弧菌的比率有所增加。经不同防腐剂处理后, N7-SXT 以假交替单胞菌占绝对优势, 其占比为 75.99%; PL7-SXT 主要以黏着杆菌、不动杆菌和假单胞菌(*Pseudomonas*)为主; PS7-SXT 与 C7-SXT 组成相似, 均以不动杆菌、鲁杰氏菌(*Ruegeria*)和乳酸杆菌(*Lactobacillus*)为主, 说明乳酸链球菌素与  $\epsilon$ -聚赖氨酸对 SXT 耐药菌群的组成有较大影响。

无论是否采用防腐剂处理, 牡蛎中 CN 耐药菌群均以黏着杆菌占绝对优势, 相对丰度超过 85%, 说明防腐剂对 CN 耐药菌群的组成无较大影响。

### 3 讨论与结论

前期已有牡蛎中耐药菌的相关研究报道, FLORES-VILLASENOR 等<sup>[14]</sup>发现牡蛎中的副溶血性弧菌约 73.5%对至少一种抗菌药耐受, 25%的菌株对多种药物具有耐药性; WANG 等<sup>[15]</sup>从牡蛎中分离出的所有菌株对 4 种或更多抗菌药具有耐药性; ZANGOEI-FARD 等<sup>[16]</sup>从牡蛎中分离出的弧菌属对 TE 的耐药率最高; 李炳等<sup>[17]</sup>利用单种抗菌药平板从香港牡蛎消化道分离的 310 株异养细菌对 20 种抗菌药存在一定程度耐药性; 王瑞旋等<sup>[19]</sup>发现来自阳江的香港牡蛎养殖水体与牡蛎体内的异养细菌多重耐药状况严重, 异养菌多重耐药比例较高。本研究采用判定为耐药性的最小抑菌浓度作为药物的使用浓度制备耐药平板, 由于前期发现 TE 的耐药程度较为严重, 因此增加了二倍最小抑菌浓度的 TE 耐药平板, 通过这些耐药平板测定样品中的耐药菌数。结果发现牡蛎对 TE、CIP、SXT、C、CN 均有一定的耐受性, 其中以 TE 耐药菌含量最高, TE 的浓度影响不显著, 其次为 CN 耐药菌, 多重耐药程度也较为严重, 也验证了牡蛎体内耐药菌污染水平较高。由于耐药基因可以通过质粒或其他可移动基因元件发生水平转移<sup>[26-27]</sup>, 从而造成耐药菌污染范围的扩大, 因此有必要探寻耐药菌的控制技术, 保障牡蛎的食用安全和人类健康。

防腐剂能够有效抑制微生物生长, 是水产品常用的保鲜方式之一。山梨酸钾、乳酸链球菌素、 $\epsilon$ -聚赖氨酸与壳聚糖是我国允许使用且常用于水产品保鲜的防腐剂。山

梨酸钾能有效抑制鱼、虾、贝等水产品中的霉菌和好氧性细菌<sup>[28]</sup>;  $\epsilon$ -聚赖氨酸抑菌谱广, 对大部分革兰氏阴性菌和阳性菌、酵母菌和霉菌均具有较高的抑菌活性, 是一种安全性高的生物抑菌剂, 对海产品有较好的保鲜作用<sup>[29]</sup>; 乳酸链球菌素通常能抑制大部分革兰氏阳性菌及其芽孢的生长, 而对革兰氏阴性菌抑菌范围较窄<sup>[30]</sup>, 不仅能有效杀灭单增李斯特菌形成的成熟生物膜<sup>[31]</sup>, 还能够抑制高水分烤虾中腐败菌的生长以延长产品货架期<sup>[32]</sup>; 壳聚糖对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌都具有抑制作用, 对革兰氏阳性菌的抑制作用强于革兰氏阴性菌<sup>[33]</sup>。本研究按照 GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》中规定的最大使用量来配制防腐剂的浓度, 以期探究防腐剂正常使用过程中对耐药菌的抑制作用。经 4 种食品防腐剂处理后, 牡蛎中的细菌总数与耐药菌数均有所降低, 进一步验证了以上 4 种食品防腐剂对水产品中细菌的抑制作用。通过对耐药菌数计数发现, 食品防腐剂能够抑制耐药菌的生长, 不同防腐剂对不同药物耐药菌的抑制作用不同, 其中壳聚糖的抑制效果最好。壳聚糖的抑菌作用有两方面, (1)能渗透进细胞体内, 吸附细胞体内带有阴离子的细胞质并发生絮凝作用, 扰乱细胞正常生理活动, 从而杀灭细菌; (2)壳聚糖能吸附在细胞表面, 形成一层高分子膜, 阻止了营养物质向细胞内的运输, 从而起到抑菌、杀菌作用<sup>[34]</sup>, 因此表现出较强的抑菌活性。防腐剂在抑制微生物的同时, 还具有降低牡蛎中蛋白质的降解、改善牡蛎品质的作用<sup>[35]</sup>。

通过 16S 扩增子高通量测序分析耐药平板中的菌群结构特征, 结果表明不同防腐剂对不同种类抗菌药耐药菌种属的抑制作用有所不同。山梨酸钾主要抑制耐受 TE 的假交替单胞菌和黏着杆菌、耐受 CIP 的假交替单胞菌、弓形杆菌和嗜冷杆菌以及耐受 SXT 的假交替单胞菌和弧菌。经壳聚糖处理后, TE 与 SXT 耐药菌群中弧菌与假交替单胞菌的相对丰度大大降低, CIP 耐药菌群中假交替单胞菌、弓形杆菌与嗜冷杆菌的相对丰度大大降低, 壳聚糖在 3 种耐药菌群中的抑制作用有所不同, 可能是由不同耐药菌群中优势菌的性质差异造成的。乳酸链球菌素与  $\epsilon$ -聚赖氨酸对 TE 与 SXT 耐药菌群中弧菌的抑制作用明显, 对 CIP 耐药菌群中弓形杆菌与嗜冷杆菌的抑制作用明显。但无论是否使用防腐剂, CN 耐药菌群中均以黏着杆菌占绝对优势, 其他种属的菌群结构变化不明显, 表明防腐剂对不同种属 CN 耐药菌群的抑制率相似。从结果可以看出, 假交替单胞菌、弧菌更容易受到防腐剂的抑制。目前并没有防腐剂对耐药菌的抑菌研究报道, 下一步需要深入开展相关研究, 通过分离不同种属耐药菌, 探讨抑菌剂对不同种属耐药菌的抑制作用, 从分子水平解析抑菌的种属特异性机制。

总之, 本研究初步探讨了常用食品防腐剂对牡蛎中

耐药共生菌的抑制作用,表明食品防腐剂能够影响牡蛎中可培养耐药菌群的组成,通过应用合适的食品防腐剂可以控制牡蛎中耐药菌的含量以提高牡蛎的食用安全性。下一步将探讨更为有效的控制措施对耐药菌的抑制作用及抑制机制,以期建立高效的耐药菌防控技术。

### 参考文献

- [1] SILVA DA. Antimicrobial resistance [J]. *Molecular Microbiology*, 2022, 117(5): 959–960.
- [2] LEON-BUITIMEA A, MORONES-RAMIREZ JR, YANG JH, *et al.* Editorial: Facing the upcoming of multidrug-resistant and extensively drug-resistant bacteria: Novel antimicrobial therapies (NATs) [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 636278.
- [3] LIN Z, YUAN T, ZHOU L, *et al.* Impact factors of the accumulation, migration and spread of antibiotic resistance in the environment [J]. *Environmental Geochemistry and Health*, 2021, 43(5): 1741–1758.
- [4] LIU Q, WU Q, XU T, *et al.* Thanatin: A promising antimicrobial peptide targeting the heel of multidrug-resistant bacteria [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(17): 94–96.
- [5] QIN K, ZHANG P, LI Z. Specific detection of antibiotic-resistant bacteria using CRISPR/Cas9 induced isothermal exponential amplification reaction (IEXPAR) [J]. *Talanta*, 2023. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.124045
- [6] SUN S, CHEN X. Mechanism-guided strategies for combating antibiotic resistance [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2024, 40(10): 1–20.
- [7] CASSINI A, HOGBERG LD, PLACHOURAS D, *et al.* Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A population-level modelling analysis [J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2019, 19(1): 56–66.
- [8] ENDALE H, MATHEWOS M, ABDETA D. Potential causes of spread of antimicrobial resistance and preventive measures in one health perspective-A review [J]. *Infection and Drug Resistance*, 2023, 16: 7515–7545.
- [9] BECEIRO A, TOMAS M, BOU G. Antimicrobial resistance and virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world? [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013, 26(2): 185–230.
- [10] FUKUDA A, TSUNASHIMA R, USUI M. Antimicrobial resistant bacteria monitoring in raw seafood retail: A pilot study focused on vibrio and aeromonas [J]. *Food Safety*, 2023, 11(4): 65–77.
- [11] 杨泽禹, 黎慧, 吴志强, 等. 水产动物致病菌耐药性研究现状与防控对策[J]. *中国渔业质量与标准*, 2023, 13(5): 39–45.  
YANG ZY, LI H, WU ZQ, *et al.* Current status, prevention and control strategies on antimicrobial resistance of pathogenic bacteria in aquatic animals [J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2023, 13(5): 39–45.
- [12] 谢庆超, 李豪, 栗瑞红, 等. 牡蛎中细菌及其抗性基因多样性分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2022, 31(5): 1260–1271.  
XIE QC, LI H, LI RH, *et al.* Diversity analysis of bacteria and their resistance genes in oyster [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, 31(5): 1260–1271.
- [13] RODRIGUES G, SOUZA SL, FRANCO OL. Antimicrobial peptides controlling resistant bacteria in animal production [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 874153.
- [14] FLORES-VILLASENOR H, VELAZQUEZ-ROMAN J, LEON-SICAÍROS N, *et al.* Serodiversity, antibiotic resistance, and virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters collected in coastal areas of Northwestern Mexico between 2012 and 2020 [J]. *Food Microbiology*, 2024, 123: 104567.
- [15] WANG R, LI B, ZHANG L, *et al.* Antibiotic resistance in bacterial communities of the oyster *Crassostrea rivularis* from different salinity zones in Qin Zhou Bay, Beibu Gulf, China [J]. *Elementa-Science of the Anthropocene*, 2021. DOI: 10.1525/elementa.2020.00095
- [16] ZANGOEI-FARD S, RAHIMI E, SHAKERIAN A. Incidence and phenotypic pattern of antibiotic resistance of vibrio species isolated from seafood samples caught from the Persian Gulf [J]. *Egyptian Journal of Veterinary Science*, 2020, 51(3): 337–347.
- [17] 李炳, 王瑞旋, 谢燕纯, 等. 广东沿海香港牡蛎消化道异养菌统计及其耐药性研究[J]. *海洋科学*, 2020, 44(3): 50–58.  
LI B, WANG RX, XIE YC, *et al.* Investigation on the quantity and species of bacteria and their antibiotic resistance in *Crassostrea hongkongensis* from the coast in Guangdong Province [J]. *Marine Sciences*, 2020, 44(3): 50–58.
- [18] 李炳, 王瑞旋, 张立, 等. 北部湾养殖牡蛎体内异养细菌数量及其耐药性研究[J]. *热带海洋学报*, 2021, 40(4): 70–83.  
LI B, WANG RX, ZHANG L, *et al.* The number and antibiotic resistance of heterotrophic bacteria in *Crassostrea hongkongensis* in aquaculture areas of Beibu Gulf [J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2021, 40(4): 70–83.
- [19] 王瑞旋, 李炳, 林华剑, 等. 牡蛎体内及其养殖水体中细菌耐药性研究[J]. *海洋科学*, 2020, 44(6): 56–63.  
WANG RX, LI B, LIN HJ, *et al.* Study on antibiotic resistance of bacteria in oysters and their farming water [J]. *Marine Sciences*, 2020, 44(6): 56–63.
- [20] JIAN Z, ZENG L, XU T, *et al.* Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2021, 61(12): 1049–1070.
- [21] 李海北, 杨沂嫡, 李君文, 等. 人类肠道菌群中抗生素耐药基因的研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021, 35(2): 81–89.  
LI HB, YANG YD, LI JW, *et al.* Research progress in antibiotic resistance genes in human gut microbiota [J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2021, 35(2): 81–89.
- [22] 吴书香, 李丽倩, 姚琳, 等. 海产源多重耐药共生菌的耐药表型及耐药基因分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(2): 248–255.  
WU SX, LI LQ, YAO L, *et al.* Analysis of antimicrobial resistance

- phenotype and genotype of multiple antimicrobial resistant commensal bacteria from marine products [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2023, 14(2): 248–255.
- [23] MARTIN MJEJ. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads [J]. *Embnet Journal*, 2011, 17(1): 10–12.
- [24] JIAJIE Z, KASSIAN K, FLOURI T, *et al.* PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(5): 614–620.
- [25] WANG Q, GARRITY GM, TIEDJE JM, *et al.* Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261–5267.
- [26] ALLEN HK, DONATO J, WANG HH, *et al.* Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(4): 251–259.
- [27] 王瑞旋, 耿玉静, 冯娟, 等. 杂色鲍哈维弧菌耐药质粒的鉴定和分析[J]. *南方水产科学*, 2012, 8(2): 1–6.
- WANG RX, GENG YJ, FENG J, *et al.* Identification and analysis of resistant plasmid of pathogenic bacteria *Vibrio harveyi* isolated from *Haliotis diversicolor* [J]. *South China Fisheries Science*, 2012, 8(2): 1–6.
- [28] 吴得海, 张思维, 李东梅, 等. 山梨酸及其钾盐类在食品中的应用[J]. *农业科技与信息*, 2023(7): 149–152.
- WU DH, ZHANG SW, LI DM, *et al.* Application of sorbate and potassium salts in food [J]. *Agricultural Science-Technology and Information*, 2023(7): 149–152.
- [29] 冯建岭, 魏敏, 刘海燕, 等.  $\epsilon$ -聚赖氨酸应用于海鱼保藏的研究展望[J]. *食品工业*, 2016, 37(2): 233–236.
- FENG JL, WEI M, LIU HY, *et al.* Research on prospect of  $\epsilon$ -polylysine applying to marine fish preservation [J]. *The Food Industry*, 2016, 37(2): 233–236.
- [30] 唐春红, 冯敏, 张春晖, 等. 天然防腐剂与抗氧化剂[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2010.
- TANG CH, FENG M, ZHANG CH, *et al.* Natural preservatives and antioxidants [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2010.
- [31] 范祥昊, 李金兰, 房帅虎, 等. 乳酸链球菌素对单增李斯特菌生物膜的杀灭效果研究[J]. *中国消毒学杂志*, 2023, 40(10): 725–727, 732.
- FAN XH, LI JL, FANG SH, *et al.* Study on the killing effect of nisin on *Listeria monocytogenes* biofilm [J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2023, 40(10): 725–727, 732.
- [32] 杨絮, 鲁淑彦, 郭全友. 乳酸链球菌素对高水分烤虾贮藏中品质的影响[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(10): 330–335.
- YANG X, LU SY, GUO YQ. Effect of nisin on the quality change of roasted shrimp with high water content during storage [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(10): 330–335.
- [33] 凌萍华, 谢晶. 涂膜及气调保鲜对南美白对虾品质的影响[J]. *农业工程学报*, 2010, 26(6): 368–374.
- LING PH, XIE J. Effects of film-forming combined with modified atmosphere packaging on qualities of Pacific white shrimp [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2010, 26(6): 368–374.
- [34] 刘瑶, 钟志梅. 壳聚糖及其衍生物的抑菌活性研究概述[J]. *科技资讯*, 2021, 19(11): 112–130.
- LIU Y, ZHONG ZM. Study on antibacterial activity of chitosan and its derivatives [J]. *Science & Technology Information*, 2021, 19(11): 112–130.
- [35] 王军华, 王易芬, 裘纪莹, 等.  $\epsilon$ -聚赖氨酸对牡蛎的防腐抗菌效果[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(24): 270–275.
- WANG JH, WANG YF, QIU JY, *et al.* Antiseptic and antimicrobial effects of  $\epsilon$ -polylysine on oysters [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(24): 270–275.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)