



土霉素残留对蔬菜发酵过程微生物群落演替及代谢产物的影响

蔡婷, 熊海波, 周晓红, 向文良*, 张大凤, 潘茂沅

西华大学食品与生物工程学院 四川省食品生物技术重点实验室 西华大学古法酿造生物技术研究所,
四川 成都 610039

蔡婷, 熊海波, 周晓红, 向文良, 张大凤, 潘茂沅. 土霉素残留对蔬菜发酵过程微生物群落演替及代谢产物的影响[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 206-219.

CAI Ting, XIONG Haibo, ZHOU Xiaohong, XIANG Wenliang, ZHANG Dafeng, PAN Maoyuan. Oxytetracycline residue alters profiles of microbial communities and metabolites during vegetable fermentation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 206-219.

摘要: 【目的】探究土霉素残留对蔬菜自然发酵过程中微生物群落演替和代谢产物动力学的影响, 为评估抗生素残留对蔬菜发酵的影响提供理论基础。【方法】超高效液相色谱-串联质谱法测定土霉素残留; 高效液相色谱法测定有机酸、电子鼻和气相色谱-质谱联用测定挥发性成分和高通量技术测定微生物种类。【结果】蔬菜自然发酵过程中, 土霉素残留从 4.00 mg/L 下降到 2.53 mg/L; 不含抗生素残留的蔬菜发酵含有同型和异型乳酸发酵, 而土霉素残留的蔬菜发酵仅含有同型乳酸发酵; 同时, 其特征微生物由 *Lactobacillus pentosus* 和 *Lactobacillus plantarum* 转变为 *Lactobacillus paratarrginis*、*Lactobacillus buchneri* 和 *Lactobacillus kisonensis*; 土霉素残留明显影响了乳酸、柠檬酸、乙酸、香茅醇、3-辛醇、异硫氰酸烯丙酯、乙酸香叶酯、乙烯基硬脂醚和异硫氰酸苯乙酯等代谢产物的含量。【结论】土霉素残留影响了蔬菜乳酸发酵的类型、微生物群落的演替、有机酸和挥发性化合物的形成过程, 因此应将抗生素残留纳入发酵蔬菜原料的质量控制指标。

关键词: 土霉素残留; 自然发酵; 微生物群落; 有机酸; 挥发性化合物

资助项目: 国家自然科学基金(31571935); 成都市科技项目(2020-YF09-00007-SN); 西华大学人才引进项目(Z211009)
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31571935), the Chengdu Science and Technology Project (2020-YF09-00007-SN), and the Talent Introduction Program of Xihua University (Z211009).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-28-87725899, E-mail: biounicom@mail.xhu.edu.cn

Received: 2022-04-14; Accepted: 2022-06-30; Published online: 2022-07-18

Oxytetracycline residue alters profiles of microbial communities and metabolites during vegetable fermentation

CAI Ting, XIONG Haibo, ZHOU Xiaohong, XIANG Wenliang*, ZHANG Dafeng, PAN Maoyuan

College of Food and Bioengineering, Key Laboratory of Food Biotechnology of Sichuan, Institutes of Ancient Fermentation & Brewing Technology, Xihua University, Chengdu 610039, Sichuan, China

Abstract: [Objective] To study the changes in microbial communities and metabolites during the vegetable fermentation exposed to oxytetracycline residue and further provide a theoretical basis for evaluating the effects of antibiotic residue on vegetable fermentation. [Methods] In this study, we determined the oxytetracycline residue by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), organic acids by high performance liquid chromatography (HPLC), volatile components by the electronic nose and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS), microbial species by high-throughput sequencing. [Results] The oxytetracycline residue decreased from 4.00 mg/L to 2.53 mg/L in spontaneous vegetable fermentation. The vegetable without oxytetracycline residue experienced homolactic and heterolactic fermentation, while that with oxytetracycline residue only experienced homolactic fermentation. Meantime, the characteristic microorganisms changed from *Lab. pentosus* and *Lab. plantarum* to *L. paratararginis*, *Lab. buchneri*, and *Lab. kisonensis*. Furthermore, oxytetracycline residue significantly affected the content of lactic acid, citric acid, acetic acid, citronellol, 3-octanol, allylsenevol, geranyl acetate, and phenylethyl isothiocyanate. [Conclusion] Oxytetracycline residue affected the type of vegetable lactic acid fermentation, the succession of microbial communities, and the production of organic acids and volatile compounds. Therefore, the antibiotic residue should be listed as a quality control indicator of raw vegetable materials for fermentation.

Keywords: oxytetracycline residue; spontaneous fermentation; microbial communities; organic acids; volatile compounds

近年来,食物原料中抗生素残留引起的安全风险受到了广泛关注^[1-3]。抗生素出现在土壤、地下水、灌溉水和有机肥料等农业环境中,是食物原料中抗生素残留的主要来源^[4]。当抗生素在土壤中积累到一定量时就会产生不利的生态效应,并被作物吸收和累积从而污染食物原料,最终影响人体健康^[5]。更糟糕的是,食物原料中不断上升的抗生素残留对食品安全标准提出了巨大挑战^[3-4,6]。然而,人们对抗生素残留的关注,

多数仍集中在种植环境污染、食物残留检测和对人体健康不利影响方面^[1,3],很少关注食物原料中抗生素残留对食品加工过程的影响。

自然发酵是时令蔬菜最古老的加工和保存方法之一^[7],多种微生物参与发酵过程产生的复杂代谢产物,如维生素、有机酸、氨基酸和挥发性物质等成分,共同决定了发酵蔬菜的营养、味道、气味等特性^[8]。然而,这些微生物群落及演替极易受到发酵条件影响,如蔬菜原

料、温度、pH 值和环境胁迫等。抗生素是一种抗菌药物，可以杀死或抑制微生物生长、代谢和繁殖。因此，蔬菜原料中的抗生素残留不可避免地会影响发酵过程微生物群落及演替，从而改变代谢产物的形成过程^[6]。然而，抗生素残留对蔬菜发酵过程中微生物群落的演替和代谢产物的生成动力学尚不清楚。

四川泡菜是中国发酵蔬菜的代表，与韩国 Kimchi，欧洲酸黄瓜，德国甜酸甘蓝齐名。生姜、萝卜、青菜和豇豆是四川泡菜的大宗发酵原料^[9-10]。用未经处理的动物粪便作为有机肥料种植蔬菜时，有机肥中残留的抗生素会向蔬菜转移，并在不同组织器官中沉积^[11]。四环素类抗生素是使用量最大、应用最广泛的兽用抗生素，其土壤中残留量通常高于其他类抗生素^[12]。当蔬菜种植在这些残留有四环素类抗生素的土壤中时，蔬菜中沉积的四环素类抗生素势必会影响其自然发酵过程中的微生物群落结构和代谢产物。因此，本研究以常用的兽类四环素类抗生素—土霉素(oxytetracycline, OTC)为研究对象，探究其残留量对蔬菜发酵过程中微生物群落演替和代谢产物动力学的影响，其结果将为评估抗生素残留对蔬菜发酵生产的影响以及蔬菜原料中抗生素残留的安全控制提供一定参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

新鲜蔬菜和泡菜辅料购买于成都某农贸市场，所有原材料均未检测出抗生素残留。

1.2 培养基

平板计数培养基(g/L): 胰蛋白胨 5.0, 酵母浸粉 2.5, 葡萄糖 1.0, 琼脂 20.0, pH 7.0。

MRS 琼脂培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 5.0, 葡萄糖 20.0, 酵母粉 4.0, 乙酸钠 5.0, 磷酸氢二钾 2.0, 硫酸镁 0.2, 柠檬酸三铵 2.0,

硫酸锰 0.05, 碳酸钙 10.0, 琼脂 20.0, 吐温-80 1 mL, pH 6.2。

1.3 主要试剂和仪器

盐酸土霉素标品，上海源叶生物科技有限公司；甲醇、乙腈、甲酸，默克公司；草酸、抗坏血酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、 α -酮戊二酸标品，美仑生物科技有限公司；Soil DNA Extration 试剂盒，成都福际生物技术有限公司；C7-C40 饱和烷烃混合物，Sigma-Aldrich 公司；其他均为分析纯，科龙化工试剂厂。

pH S-3C 酸度计，成都世纪方舟科技有限公司；XevoTQD 超高压液相色谱-串联质谱仪、Water 2695 高效液相色谱仪，Waters 公司；6890N 气相色谱-质谱联用仪，Agilent 公司；T-1 Thermoblock PCR 自动扩增仪，Biometra Tgradient 公司；720BR 电泳凝胶成像分析仪，Bio-Rad 公司；PEN2 型便捷式电子鼻系统，Airsens 公司。

1.4 泡菜的制作

采用传统四川泡菜的方法泡制泡菜^[9]，将 640 g 新鲜蔬菜用自来水冲洗 3 次然后沥干。与 1.5 L 6% 的盐水加入 2 L 的带盖陶罐中。然后将 100 mL 陈年盐水(6%)作为发酵剂加入陶罐中，实验组添 4.0 mg/L 土霉素(OTC)模拟抗生素污染现状，并以未加土霉素的正常发酵为对照组(CON)，将罐子加水密封，置于 25 °C 温度发酵 10 d。每个处理重复 3 次。取样前将发酵液充分混匀，然后用无菌移液管取陶罐内上、中和下 3 个同样位置的发酵液置于无菌离心管中，再次混匀。离心收集的上清液进行 pH 和总酸度的测定，新鲜发酵液一部分用于微生物计数，其余置于-80 °C 保存备用。

1.5 发酵液中土霉素残留的测定

对实验组发酵液中土霉素浓度按照李佳楠研究方法进行测定^[13]。液相条件：采用 Waters

ACQUITY UPLC HSS TS C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱; 柱温: 40 °C; 进样量: 5 μL; 流速: 0.3 mL/min; 流动相 A: 0.1%甲酸; 流动相 B: 乙腈, 进行梯度洗脱; 质谱条件: 离子源: 电喷雾电离源; 离子化模式: ESI+; 离子源温度: 500 °C; 雾化器压力(GS1): 379 KPa; 涡轮离子压力(GS2): 345 KPa; 气帘气压力(CUR): 138 KPa; 碰撞气压力(CAD): 10; 离子源电压(IS): -4 500/5 500 V。以正常发酵液除菌后添加 4.0 mg/L 土霉素为对照组 CAT; 以 6% 生理盐水添加 4.0 mg/L 土霉素为对照组 CBT。

1.6 pH 和总酸的测定

pH 值的变化使用 pH S-320 酸度计进行监测; 总酸的测定参照国标《GB 12456—2021 食品安全国家标准 食品中总酸的测定》中的酸碱滴定法。

1.7 有机酸的测定

标准曲线的绘制: 精密配制 0.36 mg/mL 的抗坏血酸和草酸, 6 mg/mL 的乳酸、α-酮戊二酸、乙酸和柠檬酸作为有机酸标准储备液。系列梯度稀释后得到有机酸标准溶液, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制各有机酸的标准曲线。样品处理^[8]: 取 2 mL 样品 8 000 r/min 离心 2 min 后再取上清液 1 mL 于 0.22 μm 滤膜过滤。检测条件: 使用 Inertsil ODS-3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇:0.01 mol/L 磷酸二氢钾=3:97 (体积比)为流动相; 流速为 0.5 mL/min, 紫外吸收检测波长为 210 nm; 进样体积为 10 μL; 柱温 30 °C。通过与标准品的保留时间和峰面积比较, 对有机酸进行表征和定量。

1.8 电子鼻分析

电子鼻测试采用直接顶空吸气法, 进样针直接插入盛有样品的密封杯进行测定。测定条件: 采样时间 1 s/组; 传感器自清洗 100 s; 传感器归零时间 10 s; 样品准备 5 s; 进样流量

400 mL/min; 分析采样 60 s。将电子鼻分析采集的数据, 用其自带的软件进行统计分析和作图。

1.9 挥发性物质的测定

取 5.0 mL 发酵液于 20 mL 的顶空萃取瓶中, 加入 0.5 g 氯化钠, 采用顶空固相微萃取方法处理样品^[8], 密封后置于 40 °C 恒温槽中水浴加热保温 10 min, 然后插入 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头顶空萃取 30 min 后, 将萃取头插入 GC 进样口, 250 °C 解吸 5 min。

气相色谱条件: 色谱柱为 Rtx-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm)弹性石英纤维毛细管柱; 升温程序: 35 °C 保持 5 min, 以 5 °C/min 升至 160 °C, 保持 5 min; 再以 13 °C/min 升至 250 °C, 保持 5 min; 载气(He)流速为 1.20 mL/min, 压力为 100 kPa, 进样方式: 不分流。

质谱条件: EI 离子源, 电子能量为 70 eV, 接口温度 250 °C, 离子源温度 230 °C, 扫描范围: 30–400 *m/z*。以 C7–C40 饱和烷烃混合物作为外标定量其挥发性香气成分。

1.10 微生物菌落测定

泡菜发酵过程中微生物数量的测定参照 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》及 GB 4789.35—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》进行测定。细菌用平板计数琼脂培养基计数, 乳酸菌用 MRS 琼脂培养基进行计数, 均添加有 10 mg/kg 的放线菌酮以防止酵母菌和霉菌生长。

1.11 细菌群落结构分析

取 CON 和 OTC 组的 5 mL 发酵液在 3 000 r/min 下离心 5 min, 用 1.5 mL 0.02% tween-20 的磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH 7.4)进行重悬。泡菜水总 DNA 的提取按照 Soil DNA Extraction 提取试剂盒说明书进行, 全长 16S rRNA 扩增使用正向 27F 引物(5'-GA

GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和反向 1541R 引物(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。扩增产物利用 AMPure XP 磁珠(Beckman coulter GmbH)进行纯化。使用 SMRTbell barcode Adapter Complete Prep-96 kit (Pacific Bioscience)试剂盒将每个扩增子连接特定的 barcode 序列后等质量混合。扩增子混合物使用 Pacific Biosciences Template Prep kit 1.0 试剂盒构建测序文库并在 PacBio RS II 上进行测序。

1.12 统计分析

试验数据用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行处理,所有的分析重复 3 次,结果以平均值±标准差表示。采用双向方差分析(two-way ANOVA)检验差异是否显著。利用 Circos 软件(<http://circos.ca>)对样品中微生物群落的分布、相对丰度和绝对丰度进行可视化处理,微生物群落与挥发性化合物的相关性通过 R 语言进行处理。

2 结果与分析

2.1 发酵液中土霉素含量的变化

在实验组和对照组样品中,土霉素的含量随着发酵的进行均出现逐渐降低的现象(图 1)。对照组 CAT 及 CBT 中土霉素含量持续缓慢减

少可能是由于土霉素在水溶液中存在水降解途径^[14]。OTC 实验组中土霉素总体呈减少趋势,且含量远低于对照组,这是因为发酵液中土霉素除了存在水降解,还存在微生物降解途径,这类微生物介导的抗生素降解机制主要为水降解和差向异构化作用^[15]。在发酵 0–3 d,实验组中土霉素残留量迅速降低,OTC 组土霉素下降了 27.82%,从 4.00 mg/L 降至 2.93 mg/L。第 3 天后,土霉素的含量降低速率相对缓慢,稳定在 6.12%左右,在发酵第 7 天后,对照组的土霉素残留量为 3.50 mg/L 左右,而 OTC 组明显低于对照组为 2.53 mg/L ($P<0.01$)。

2.2 蔬菜发酵过程中 pH 和总酸的变化

泡菜自然发酵过程中 pH 值和总酸变化是重要的发酵参数,是发酵系统中微生物代谢活动的综合指标,它不仅与不同的微生物的生长速率有关,还与其代谢产物的形成与积累速率有关^[16-17]。在发酵 1–3 d,OTC 组的 pH 值明显高于 CON 组($P<0.01$),CON 组 pH 值在第 3 天降至 3.27 后趋于稳定,而 OTC 组的 pH 值经过第 1 天的短暂回升后迅速降低,到发酵第 5 天降至 3.34。在第 5 天至发酵结束时两组发酵液最终 pH 值稳定在 3.40 左右(图 2A)。随着发酵

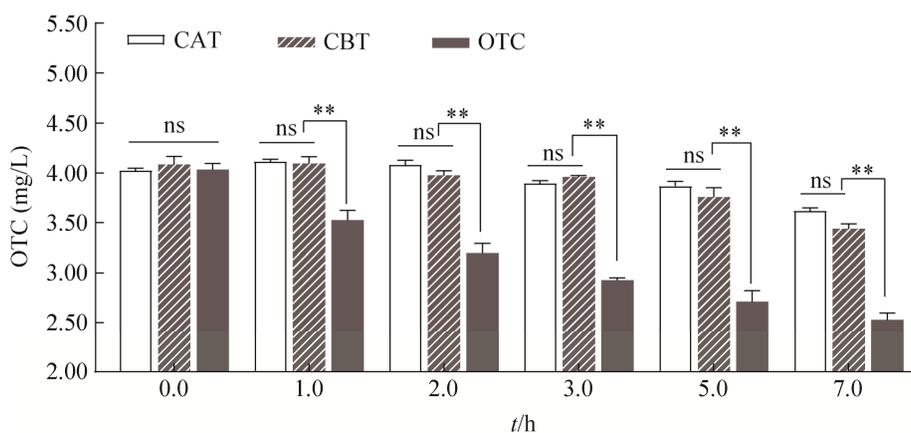


图 1 发酵过程中土霉素含量的变化

Figure 1 Changes in oxytetracycline content during fermentation. **: $P<0.01$; ns: $P>0.05$.

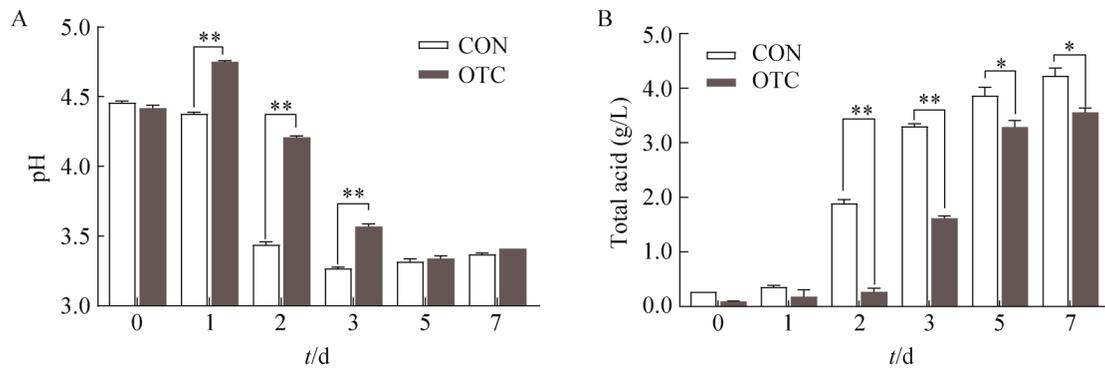


图 2 发酵过程中 pH 值(A)和总酸(B)的变化

Figure 2 Changes in pH value (A) and total acid (B) during the fermentation. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

的进行, 发酵液的酸度在不断的增强, CON 组总酸度在发酵 1-3 d 时迅速升高, 5-7 d 继续缓慢升高, 而 OTC 组总酸度变化出现了延迟现象, 从发酵第 2 天后才开始迅速升高, 且在整个发酵过程中总酸含量远低于 CON 组(图 2B)。

2.3 蔬菜发酵过程中有机酸含量的变化

有机酸含量的变化不仅可以反映泡菜的发酵程度, 也是泡菜整体风味和口感的重要元素^[18]。土霉素残留显著影响乳酸、柠檬酸和乙酸的代

谢动力学($P < 0.05$), 但对抗坏血酸和草酸的代谢动力学无明显影响($P > 0.05$)。土霉素残留对 α -酮戊二酸的影响仅在 2-3 d ($P < 0.05$), 其他时间对 α -酮戊二酸的影响也不大($P > 0.05$) (表 1)。

乳酸是四川泡菜发酵过程中生成的最主要的有机酸。在发酵第 2-7 天, CON 组的乳酸含量明显高于 OTC 组($P < 0.05$)。在 CON 组, 发酵第 1-5 天, 乳酸菌含量从 2 211.68 mg/L 急剧上升到 7 997.37 mg/L, 在第 7 天时开始出现缓慢

表 1 土霉素残留对发酵过程中有机酸含量的影响

Table 1 Effect of oxytetracycline residue on organic acid content during the fermentation

Organic acids (mg/L)	Group	Fermentation time (d)						
		0	1	2	3	5	7	
Oxalic acid	CON	152.48±8.87	72.47±2.95	65.46±8.77	55.53±16.72	35.60±1.18	33.75±2.33	
	OTC	131.52±15.94	73.42±1.85	56.24±2.50	44.72±1.52	34.03±1.99	32.34±0.49	
Lactic acid	CON	2 240.90±80.32	2 211.68±14.08	4 426.08±96.83	6 605.88±99.32	7 997.37±43.42	7 885.95±95.90	
	OTC	2 050.57±11.90	2 089.29±26.45	2 526.69±57.38**	4 084.62±15.77**	6 729.62±97.33*	5 991.23±23.35**	
α -ketoglutaric acid	CON	156.37±7.31	168.11±7.17	172.76±3.56	182.74±4.56	199.26±4.86	199.92±1.25	
	OTC	151.91±9.43	174.56±4.11	201.29±1.19**	199.82±5.03**	203.25±3.16	194.65±0.97*	
Ascorbic acid	CON	15.82±3.87	46.24±2.65	67.23±10.96	78.52±2.56	102.61±2.71	88.27±8.48	
	OTC	12.1±0.49	50.24±4.02	78.38±4.93	80.55±2.56	114.26±17.35	79.40±5.52	
Acetic acid	CON	0.79±0.02	0.78±0.01	0.71±0.01	0.87±0.01	1.04±0.01	1.03±0.01	
	OTC	0.88±0.11	0.82±0.01*	0.87±0.03**	0.96±0.02**	1.11±0.01*	1.17±0.02**	
Citric acid	CON	304.84±0.05	322.84±3.02	376.14±5.39	525.53±18.16	779.71±20.34	834.74±9.03	
	OTC	302.26±2.58	328.13±5.47	347.47±7.07*	447.47±6.09*	752.89±35.34	765.91±4.78**	
Total	CON	2 871.29	2 822.16	5 194.67	7 449.16	9 135.12	9 042.80	
	OTC	2 649.15	2 721.42	3 211.04	4 758.15	7 839.19	7 065.43	

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

下降至 7 885.95 mg/L;但是在 OTC 组,发酵的第 0-2 天,其含量从 2 050.57 mg/L 缓慢增加到 2 526.69 mg/L,随着发酵的进行从第 3 天乳酸含量开始大幅度增加,在第 5 天达到 6 729.62 mg/L,在第 7 天也出现缓慢下降至 5 991.23 mg/L。乙酸含量整体呈增加趋势,可能是由于泡菜中乳酸菌的异型发酵及醋酸菌的醋酸发酵产生的乙酸。在发酵第 7 天分别为 1.03 mg/L 和 1.17 mg/L。此外,在整个发酵过程中,土霉素残留对柠檬酸的影响不如对乳酸和乙酸影响显著,柠檬酸含量随着发酵的进行逐渐增加,CON 组浓度从 304.84 mg/L 增加到 834.74 mg/L,OTC 组浓度从 302.26 mg/L 增加到 765.91 mg/L。

2.4 蔬菜发酵过程中挥发性物质的变化

2.4.1 电子鼻分析

电子鼻 Loadings 分析可以考察样品中气体物质起主要区分作用,并判别其贡献率的大小。电子鼻结果经主成分分析显示,同一发酵组平行检测的数据构成独立的组群,表明电子鼻分

析检测的重现性良好(图 3)。样品的特征气味聚集成 2 个主成分,显示了样品间的差异显著。第一主成分的贡献率为 91.75%,第二主成分的区别贡献率为 7.19%,两个主成分的累积区分贡献率为 98.94%,表明两个主成分可以代表发酵泡菜中香气成分的主要特征。其中 1、7 和 8 号对第一主分的贡献率较高,3 号和 5 号对第二主分的贡献率较高。根据电子鼻检测的特征气味信息,进行线性判别分析(LDA),结果见图 3B,发酵泡菜的气味特征可以明显分成 4 类,即发酵第 1 天的 CON-1d 和 OTC-1d,发酵第 2-3 天的 CON-2d、CON-3d、OTC-2d 和 OTC-3d,以及发酵第 5、7 天的 CON 组(CON-5d 和 CON-7d)和 OTC 组(OTC-5d 和 OTC-7d),表明在发酵第 1-3 天,其土霉素的残留对发酵的特征气味影响不大,但是随着发酵的进行,第 5-7 天的特征气味 CON 组和 OTC 组明显区分开来,且差异主要表现在第一主分,即 S1、S7 和 S8 号对应的芳香成分、硫化物和醇类。

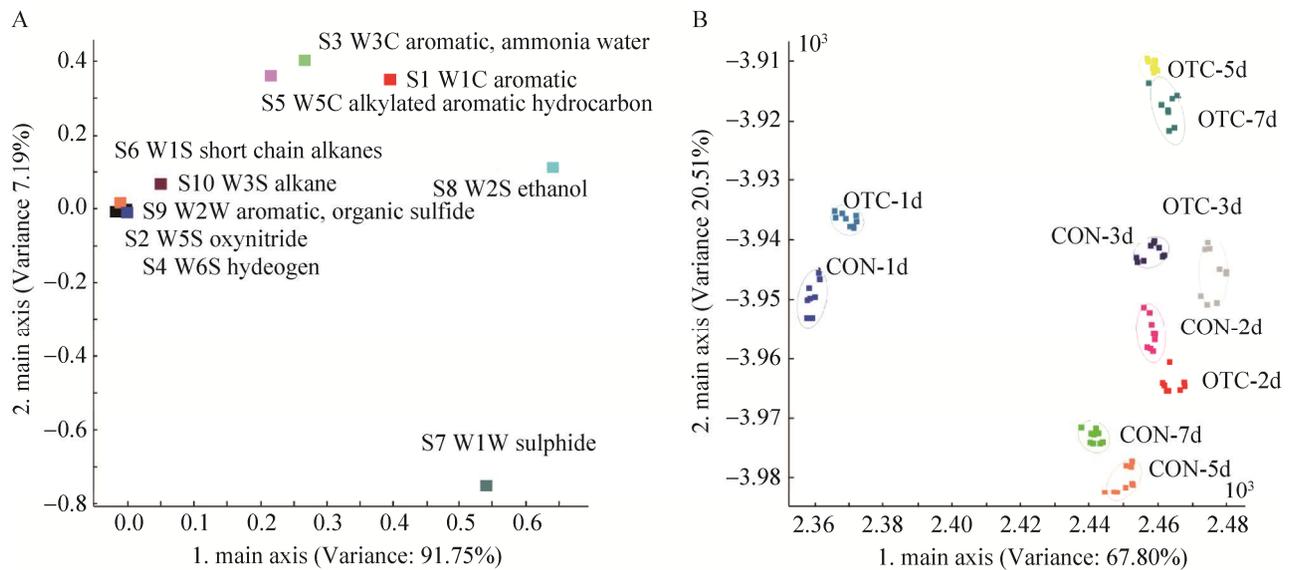


图 3 电子鼻分析结果

Figure 3 Electronic nose analysis result. A: Principal component analysis of electronic nose sensor performance. B: Linear discriminant analysis of odor.

2.4.2 OPLS-DA 分析

利用 SIMCA 14.1 软件对 CON 和 OTC 组发酵过程中的挥发性风味物质进行正交偏最小二乘判别(OPLS-DA)分析处理, 其结果如图 4 所示, $R^2X(\text{cum})=0.832$, $R^2Y(\text{cum})=1$, $Q^2(\text{cum})=0.568$ 。OPLS-DA 模型通过将 X 轴矩阵信息分解成与 Y 相关和不相关的两类信息, 能够过滤掉与分组不相关的变量, 结合差异性变量的重要性投影值(variable importance in the projection, VIP), 从而使获得的差异性代谢物更加可靠。通过 OPLS-DA 模型快速准确地筛选出土霉素残留下发酵蔬菜的差异挥发性风味物质, 探究抗生素残留对发酵蔬菜挥发性风味物质形成的影响。

图 4A 表示 CON 和 OTC 两组中总挥发性物质的分布情况, 图 4B 表示所有挥发性物质对两组发酵样品的差异贡献情况。结果表明采用

偏最小二乘法判别分析方法, 对于 CON 和 OTC 两组样本具有良好的分离性(图 4A), 分别位于得分图的两侧, 区分显著, 并都处于 95%置信区间内。图 4B 表示不同挥发性化合物与两组发酵样品的差异相关性, 化合物离坐标中心点越远, 代表化合物对样品之间的差异性的贡献越大, 结合图 4C, 共有 16 种挥发性风味物质的贡献值(VIP)值均大于 1, 说明这些挥发性风味物质的两组间含量存在显著性差异。其中, 有 6 种挥发性化合物是 CON 的重要变量, 包括肉豆蔻醚、 α -松油烯、氧化乙基己基、辛乙二醇、2-乙基-5-甲基咪唑和乙酸薰衣草酯; 10 种挥发性化合物是 OTC 的重要变量, 包括香茅醇、异硫氰酸烯丙酯、乙酸香叶酯和乙烯基硬脂醚等(图 4), 因此结果表明在发酵过程中, 土霉素残留对挥发性化合物的形成有显著的影响。

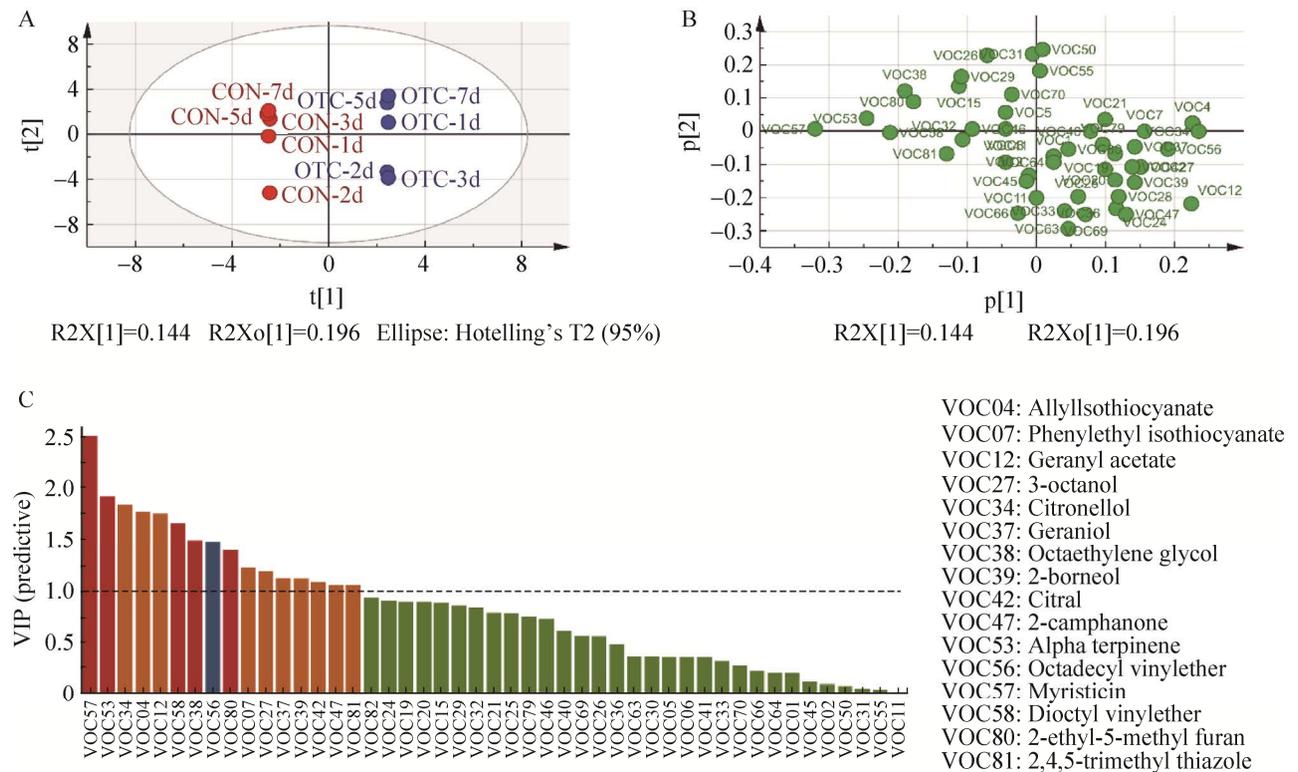


图 4 OPLS-DA 分析结果

Figure 4 OPLS-DA analysis result. A: Score plot. B: Load diagram. C: VIP predictive value distribution map.

2.5 蔬菜发酵过程中微生物群落的变化

2.5.1 细菌总数和乳酸菌总数的变化

四川泡菜的自然发酵过程中,乳酸菌的数量占比相对较大。总体上细菌总数与乳酸菌数的变化情况基本一致,在发酵 0–3 d 迅速增加,第 5–7 天增加较为缓慢(图 5)。泡菜发酵是微生物群落的种类和数量不断演替变化的过程,其变化是微生物同环境相互作用的结果,而在微生物代谢过程中,环境的变化会对微生物的生长发育和繁殖产生很大的影响。由于土霉素残留的影响,发酵过程中细菌和乳酸菌在数量和动态变化方面存在一定程度的差异。由图 5 可知发酵第 1–3 天,对照组 CON 和实验组 OTC 细菌总数和乳酸菌数量均具有明显差异($P<0.05$)。细菌总数在发酵的第 2 天差异达到最大,CON 组为 7.51 log (CFU/mL),而 OTC 组为 5.20 log (CFU/mL)。而乳酸菌数量在发酵第 3 天达到最大,CON 组为 7.42 log (CFU/mL),而 OTC 组为 6.54 log (CFU/mL)。在发酵第 5–7 天,细菌与乳酸菌总数在 CON 和 OTC 组中的差异性逐渐缩小,最终细菌总数稳定在 8.65 log (CFU/mL)左右,而乳酸菌菌数稳定在 8.30 log (CFU/mL)左右。

2.5.2 微生物群落的 β 多样性分析

β 多样性分析的主要目的是考察不同样本之间群落结构的相似性。所有发酵液样品被分为三类,一类是 Initial、OTC-1d、OTC-2d 和 CON-1d, OTC-3d、OTC-5d 和 OTC-7d 为第二类, CON-2d、CON-3d、CON-5d 及 CON-7d 为第三类(图 6)。其中起始样本 Initial 与 OTC-1d 的距离最近,为 0.435,即两者 OTUs 组成最为相似,而样本 Initial 与 CON-1d 距离为 0.829。这可能是由于在发酵第 1 天时,OTC 中土霉素抑制了微生物的生长,未启动发酵,从而使得发酵系统中微生物结构没有产生明显差异。此外,对照组 CON 和实验组 OTC 在发酵第 2 天样品距离最远,为 0.938,而到发酵第 7 天其样品距离为 0.825 (图 6)。由前面研究可知,OTC 中 pH、总酸和细菌总数等理化特性较对照组 CON 出现了明显的延迟现象,在发酵第 2 天开始明显变化,而随着发酵系统中土霉素的降解及微生物对环境的适应,发酵系统功能开始恢复。

2.5.3 微生物群落的结构分布及动态变化

微生物演替是自然发酵过程中普遍存在的现象,也是对外源胁迫的一种响应^[19]。在泡菜的发酵过程中,除了陈年盐卤发酵剂中的乳酸菌

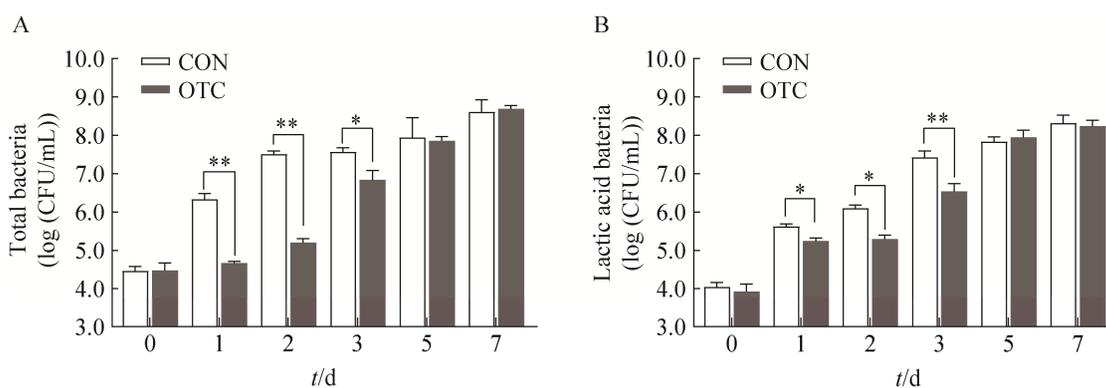


图 5 发酵过程中细菌总数(A)和乳酸菌数(B)的变化

Figure 5 Changes in total number of bacteria (A) and lactic acid bacteria (B) during fermentation. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

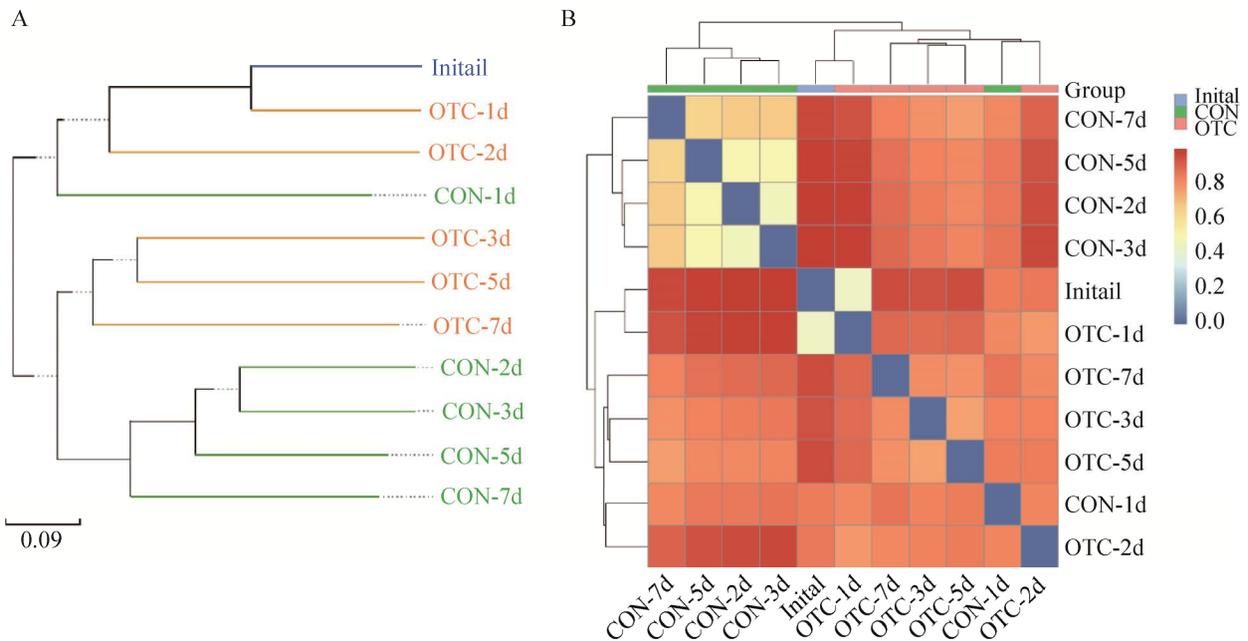


图 6 微生物群落层级聚类树(A)和距离 heatmap 图(B)

Figure 6 Hierarchical clustering tree (A) and distances heatmap (B) on OTU level of bacterial community.

菌株外, *Lactococcus*、*Leuconostoc* 和 *Weissella* 属已进入发酵阶段。同时, 土霉素残留影响了微生物群落繁殖、分布和演替。在所有的乳酸菌菌株中, CON 和 OTC 的陈年卤水发酵剂中的优势菌种为 *Lab. acetotolerans* (85.64%) 和 *Lab. buchneri* (10.16%)。随着发酵时间的进行, CON 组的优势乳酸菌在发酵第 1 天转变为 *Lac. acetotolerans* (22.52%)、*Lab. plantarum* (17.81%) 和 *P. ethanolidurans* (10.45%), 发酵第 2-5 天转变为 *Lab. plantarum* (47.90-48.65%) 和 *Lab. pentosus* (30.15-34.00%), 发酵第 7 天为 *Lab. plantarum* (42.07%)、*Lab. pentosus* (21.25%) 和 *Lab. buchneri* (13.44%), 该结果与 Cao^[20] 等研究结果一致。然而, 在 OTC 组中的优势微生物群落与 CON 组有明显的差异, 在发酵第 1 天优势菌株为 *Lab. acetotolerans* (55.54%)、*Lab. buchneri* (16.32%) 和 *Lab. parafarraginis* (12.12%), 第 2 天为 *Lab. parafarraginis* (30.71%)、*Lab. buchneri* (26.26%) 和 *Lab. acetotolerans*

(11.69%), 第 3 天为 *Lab. parafarraginis* (25.04%)、*Lab. plantarum* (20.06%) 和 *Lab. buchneri* (19.90%), 第 5 天为 *Lab. plantarum* (24.27%)、*Lab. parafarraginis* (24.26%)、*Lab. buchneri* (19.90%) 和 *Lab. pentosus* (11.47%), 第 7 天为 *Lab. plantarum* (16.67%)、*P. ethanolidurans* (13.25%) 和 *Lab. buchneri* (16.89%) (图 7)。结果表明, 土霉素的残留明显改变了泡菜发酵过程中的微生物群落的结构分布。

2.6 微生物与挥发性物质的关联分析

通过 LEfSe (LDA effect size) 分析筛选 CON 组和 OTC 组中具有显著性差异的生物标志菌群 (biomarker)。CON 组中特征微生物科有 *Leuconostocaceae*, 种水平有 *Lab. pentosus* 和 *Lab. plantarum*; OTC 组中特征微生物科有 *Lactobacillaceae*, 种水平有 *Lab. paratararginis*、*Lab. buchneri* 及 *Lab. kisonensis* (图 8A)。代谢产物的类型和水平与发酵过程中存在的微生物密切相关^[21], 将检测的重要性挥发性物质

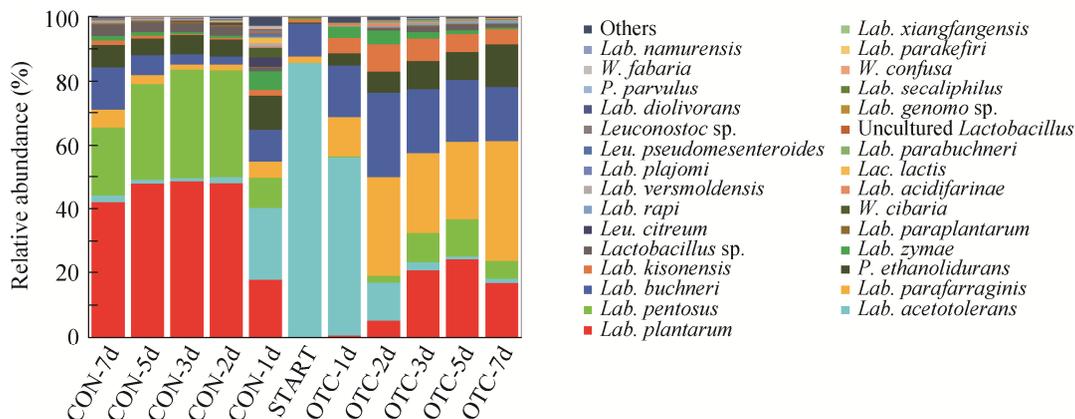


图 7 发酵过程中细菌群落种水平相对丰度分布

Figure 7 Distribution of relative species abundance in bacterial community during fermentation.

与微生物进行关联分析发现，肉豆蔻醚、 α -松油烯、氧化乙基己基、辛乙二醇、乙酸薰衣草酯与一种或多种乳酸菌呈正相关，其中肉豆蔻醚与 *Lac. lactis*、*Leu. citreum*、*Leu. pseudomesenteroides* 和 *Leuconostoc* sp. 呈显著正相关($P < 0.05$)，香茅醇、异硫氰酸苯乙酯、乙酸香叶酯、乙烯基硬脂醚、香叶醇、柠檬醛与一种或多种乳酸菌为负相关，其中，柠檬醛与 *Lactobacillus* 的菌株均为显著负相关($P < 0.05$)，包括 *Lab. pentosus*、*Lab. plantarum*、*Lab. parafarraginis*、*Lab. buchneri* 和 *Lab. kisonensis* 等(图 8B)。

3 讨论与结论

目前抗生素残留对蔬菜发酵是否有影响尚不清楚。以往的研究已经对蔬菜发酵过程中微生物的群落结构和风味代谢产物有了较为深入的了解^[22-23]，但对抗生素残留对其影响的研究却知之甚少。因此，分析抗生素残留对自然发酵过程中微生物群落演替和代谢产物的影响，对于深入了解抗生素残留对蔬菜发酵的不良影响具有重要意义。

Leuconostoc 和 *Weissella* 是自然发酵泡菜

前期的异型乳酸发酵优势菌，后期转向以乳酸杆菌为主的同型乳酸发酵^[8,24]。然而，在土霉素残留 OTC 组中没有发现 *Leuconostoc* 和 *Weissella* 等异型乳酸发酵乳酸菌，而在 CON 组中却出现(图 7 和图 8C)。因此，土霉素的残留改变了四川泡菜的发酵过程，使原本发生的同型和异型乳酸发酵转变为仅同型乳酸发酵。同时，土霉素残留也影响了乳酸菌的生长、繁殖和演替。尽管在食品中允许抗生素残留的存在，但必须要低于特定的浓度^[25]。大量研究报告已经证明原材料中抗生素的存在会导致生物处理过程中微生物群落的变化^[26]，然而这些研究主要集中在环境方面。在食品发酵中抗生素残留是否会影响微生物群落结构尚未见报道。

有机酸是蔬菜发酵过程中碳水化合物代谢的主要产物，其浓度和成分可根据发酵类型进行表征^[7]，异型和同型乳酸发酵主要产生乳酸、乙酸和柠檬酸等^[8]。总的来说，土霉素残留中乳酸和柠檬酸的浓度明显低于 CON (表 1)。然而，有趣的是尽管 OTC 组中没有异型乳酸发酵，但乙酸的浓度仍然高于 CON 组(表 1)。Choi 等^[18]和 Rao 等^[27]报道了在发酵蔬菜中，乳酸菌种的 *Lab. parafarraginis* 和 *Lab. buchneri*

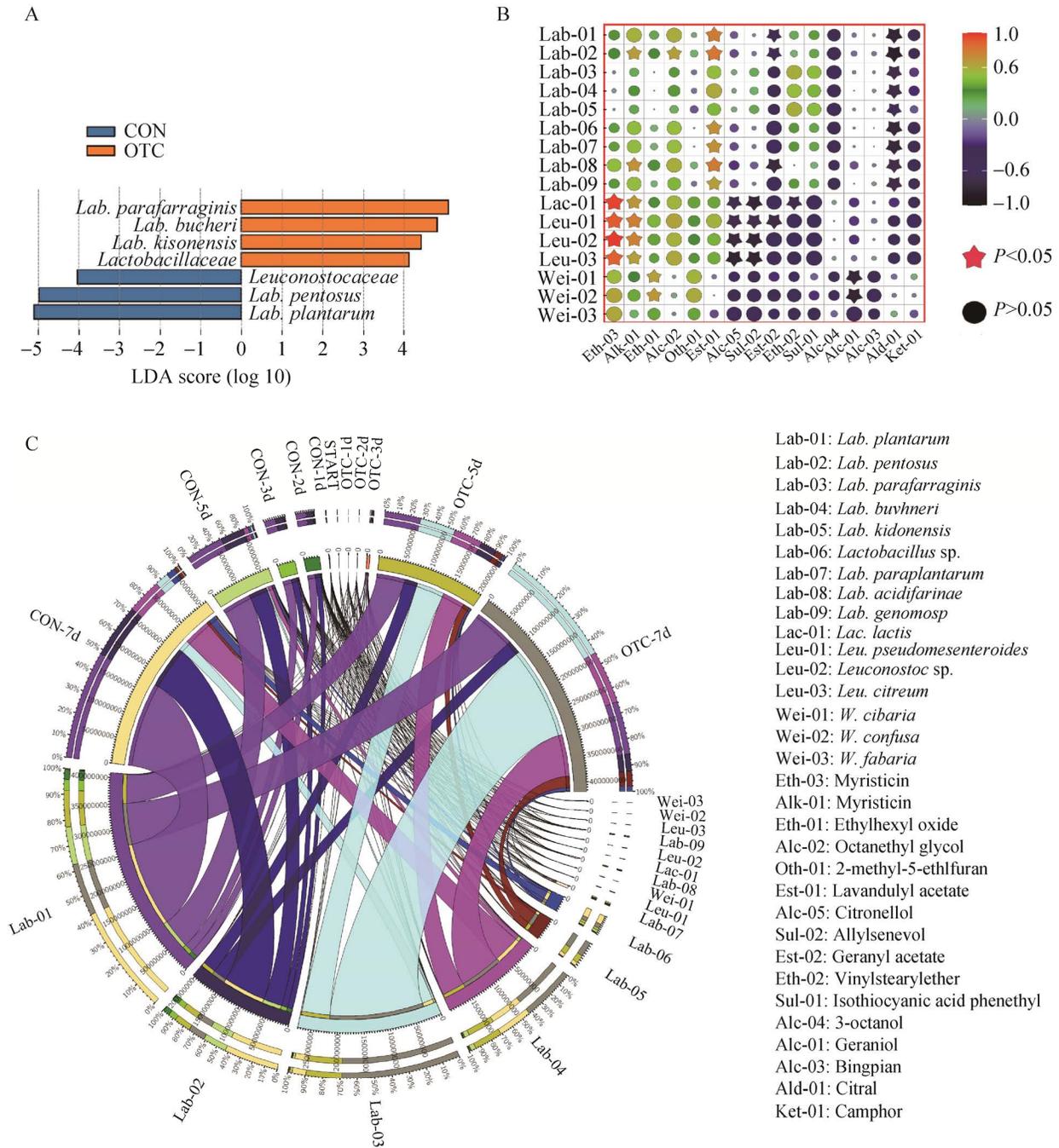


图 8 微生物与挥发性物质的关联分析

Figure 8 The co-occurrence patterns between volatile compounds and LABs. A: Characteristic microbial species. B: Association analysis between characteristic microorganisms and important volatile substances. C: The succession of microbial community in OTC and CON during fermentation.

能将乳酸转化为乙酸。在 OTC 组中, *Lab. parafarraginis* 和 *Lab. buchneri* 在泡菜发酵中占主导地位, 特别是在发酵后期, 且其绝对丰度

显著高于 CON 组, 导致乳酸大量转化为乙酸 (图 7)。通过 LEfSe 分析发现 CON 组中特征微生物有 *Lab. pentosus* 和 *Lab. plantarum*, 与其他

蔬菜正常发酵过程的特征微生物相似^[20], 然而在土霉素影响下, 特征微生物与正常发酵相比发生较大差异, 转变为 *Lab. paratarrginis*、*Lab. buchneri* 及 *Lab. kisonensis*。此外, 该研究也在 OTC 组中发现了能降解土霉素这类四环素类抗生素的菌株, 如: *Acinetobacter* sp.、*Citrobacter freundii*、*Pseudomonas* sp. 和 *Sphingomonas* sp., 为前期实验中发现 OTC 实验组中土霉素残留量显著低于对照组作出了合理的解释, 证实了 OTC 组中存在微生物介导抗生素降解途径。

蔬菜自然发酵是一个复杂的系统, 其中涉及到多种微生物, 特别是乳酸菌的参与, 不同微生物群落结构对挥发性成分的贡献不同。由于微生物群落的差异, 在发酵过程中 CON 和 OTC 组中挥发性成分的种类和浓度存在显著差异(图 4)。其中有 6 种挥发性化合物, 包括肉豆蔻醚、 α -松油烯、氧化乙基己基、辛乙二醇、2-乙基-5-甲基呋喃和乙酸薰衣草酯仅在 CON 组检测到; 香茅醇、异硫氰酸烯丙酯、乙酸香叶酯、乙烯基硬脂醚和异硫氰酸苯乙酯等 10 种挥发性化合物在 OTC 组中含量显著高于 CON 组。乙酸香叶酯和香茅醇是腌制泡菜中重要的特征风味成分, 其浓度与乙酸浓度呈正相关^[28]。因此, 乙酸浓度越高, OTC 中乙酸香叶酯和香叶醇的合成越好。有趣的是, OTC 组中挥发性异硫氰酸烯丙酯和异硫氰酸苯乙酯的浓度显著高于 CON (图 4), 这可能与 CON 组中高酸度有关^[11]。综上, 自然发酵体系中, 土霉素的残留显著改变微生物的群落结构, 有机酸和挥发性香气成分, 为可为蔬菜发酵过程中抗生素残留的生态风险评估以及蔬菜原料中抗生素残留的安全控制提供一定的参考。

参考文献

- [1] PAN M, CHU LM. Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 599/600: 500-512.
- [2] SHAHID M, KHAN MS. Tolerance of pesticides and antibiotics among beneficial soil microbes recovered from contaminated rhizosphere of edible crops[J]. *Current Research in Microbial Sciences*, 2021, 3: 100091.
- [3] PAN M, CHU LM. Transfer of antibiotics from wastewater or animal manure to soil and edible crops[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 231: 829-836.
- [4] PROSSER RS, SIBLEY PK. Human health risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in plant tissue due to biosolids and manure amendments, and wastewater irrigation[J]. *Environment International*, 2015, 75: 223-233.
- [5] ZHI D, YANG DX, ZHENG YX, YANG Y, HE YZ, LUO L, ZHOU YY. Current progress in the adsorption, transport and biodegradation of antibiotics in soil[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 251: 109598.
- [6] ANAL AK, PERPETUINI G, PETCHKONGKAEW A, TAN R, AVALLONE S, TOFALO R, NGUYEN HV, CHU-KY S, HO PH, PHAN TT, WACHÉ Y. Food safety risks in traditional fermented food from South-East Asia[J]. *Food Control*, 2020, 109: 106922.
- [7] XIAO YS, XIONG T, PENG Z, LIU CG, HUANG T, YU H, XIE MY. Correlation between microbiota and flavours in fermentation of Chinese Sichuan Paocai[J]. *Food Research International*, 2018, 114: 123-132.
- [8] XIANG WL, ZHANG ND, LU Y, ZHAO QH, XU Q, RAO Y, LIU L, ZHANG Q. Effect of *Weissella cibaria* co-inoculation on the quality of Sichuan pickle fermented by *Lactobacillus plantarum*[J]. *LWT*, 2020, 121: 108975.
- [9] RAO Y, QIAN Y, TAO YF, SHE X, LI YL, CHEN X, GUO SY, XIANG WL, LIU L, DU HJ, XIAO H. Characterization of the microbial communities and their correlations with chemical profiles in assorted vegetable Sichuan pickles[J]. *Food Control*, 2020, 113: 107174.
- [10] 林凯, 蔡婷, 徐顾榕, 宋菲菲, 袁春红, 陈功, 向文良, 张庆. 有机白萝卜表皮附生乳酸菌抗生素耐药性分析[J]. *食品科学*, 2015, 36(11): 145-149.
LIN K, CAI T, XU GR, SONG FF, YUAN CH, CHEN G, XIANG WL, ZHANG Q. Antibiotic resistance of epibiotic lactic acid bacteria on the surface of organic white radish[J]. *Food Science*, 2015, 36(11): 145-149 (in Chinese).

- [11] LIU DQ, ZHANG CC, ZHANG JM, XIN XT, LIAO XJ. Metagenomics reveals the formation mechanism of flavor metabolites during the spontaneous fermentation of potherb mustard (*Brassica juncea* var. *multiceps*)[J]. Food Research International, 2021, 148: 110622.
- [12] LIU XH, LV Y, XU K, XIAO XX, XI BD, LU SY. Response of ginger growth to a tetracycline-contaminated environment and residues of antibiotic and antibiotic resistance genes[J]. Chemosphere, 2018, 201: 137-143.
- [13] 李佳楠. 城市污水系统中典型抗生素、抗性基因和抗性细菌的丰度与关联性研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2014.
- LI JN. The abundance and relationships between typical antibiotics and corresponding resistance in municipal wastewater treatment system[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2014 (in Chinese)
- [14] LI ZJ, QI WN, FENG Y, LIU YW, EBRAHIM S, LONG J. Degradation mechanisms of oxytetracycline in the environment[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2019, 18(9): 1953-1960.
- [15] HALLING-SØRENSEN B, SENDELØV G, TJØRNELUND J. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2002, 42(3): 263-271.
- [16] WATTS EG, JANES ME, PRINYAWIWATKUL W, SHEN YX, XU ZM, JOHNSON D. Microbiological changes and their impact on quality characteristics of red hot chilli pepper mash during natural fermentation[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2018, 53(8): 1816-1823.
- [17] CHEN ZD, KANG JY, ZHANG Y, YI XX, PANG XN, LI-BYARLAY H, GAO XZ. Differences in the bacterial profiles and physicochemical between natural and inoculated fermentation of vegetables from Shanxi Province[J]. Annals of Microbiology, 2020, 70(1): 1-12.
- [18] CHOI YJ, YONG S, LEE MJ, PARK SJ, YUN YR, PARK SH, LEE MA. Changes in volatile and non-volatile compounds of model kimchi through fermentation by lactic acid bacteria[J]. LWT, 2019, 105: 118-126.
- [19] XIANG WL, LI K, LIU S, XING YG, LI MY, CHE ZM. Microbial succession in the traditional Chinese Luzhou-flavor liquor fermentation process as evaluated by SSU rRNA profiles[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29(3): 559-567.
- [20] CAO JL, YANG JX, HOU QC, XU HY, ZHENG Y, ZHANG HP, ZHANG LB. Assessment of bacterial profiles in aged, home-made Sichuan Paocai brine with varying titratable acidity by PacBio SMRT sequencing technology[J]. Food Control, 2017, 78: 14-23.
- [21] THIERRY A, POGAČIĆ T, WEBER M, LORTAL S. Production of flavor compounds by lactic acid bacteria in fermented foods[A]//Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Chichester[M]. UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015: 314-340.
- [22] SAWADA K, KOYANO H, YAMAMOTO N, YAMADA T. The relationships between microbiota and the amino acids and organic acids in commercial vegetable pickle fermented in rice-bran beds[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 1791.
- [23] EINSON JE, RANI A, YOU XM, RODRIGUEZ AA, RANDELL CL, BARNABA T, MAMMEL MK, KOTEWICZ ML, ELKINS CA, SELA DA. A vegetable fermentation facility hosts distinct microbiomes reflecting the production environment[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(22): e01680-e01618.
- [24] PASOLLI E, de FILIPPIS F, MAURIELLO IE, CUMBO F, WALSH AM, LEECH J, COTTER PD, SEGATA N, ERCOLINI D. Large-scale genome-wide analysis links lactic acid bacteria from food with the gut microbiome[J]. Nature Communications, 2020, 11: 2610.
- [25] GAUDIN V. The growing interest in development of innovative optical aptasensors for the detection of antimicrobial residues in food products[J]. Biosensors, 2020, 10(3): 21.
- [26] Yang XH, Song XF, Hallerman E, Huang ZT. Microbial community structure and nitrogen removal responses of an aerobic denitrification biofilm system exposed to tetracycline[J]. Aquaculture, 2020, 529: 735665.
- [27] RAO Y, QIAN Y, TAO YF, SHE X, LI YL, CHE ZM, LI HH, LIU L. Influence of oxygen exposure on fermentation process and sensory qualities of Sichuan pickle (Paocai)[J]. RSC Advances, 2019, 9(66): 38520-38530.
- [28] LUO SM, LI Q, CHEN AJ, LIU XY, PU B. The aroma composition of baby ginger Paocai[J]. Journal of Food Quality, 2017, 2017: 1-9.