

青菜腌制过程中腐败表层细菌的多样性分析与群落演替

李 可¹, 张 庆^{1*}, 陈 功², 林 凯¹, 袁春红¹, 贾碧洪¹, 钟小廷¹, 向文良¹

(1.西华大学生物工程学院, 四川省食品生物技术重点实验室, 西华大学古法发酵(酿造)生物技术研究所, 四川 成都 610039; 2.四川省食品发酵工业研究设计院, 四川 成都 611130)

摘 要: 通过构建16S rRNA基因文库揭示青菜腌制过程中腐败表层细菌群落构成, 利用Shannon-Weaver (H')、Chao、ACE、Simpson、覆盖度和相关性指数分析群落的多样性及演替关系。系统发育分析显示, 从样品中获得的16S rRNA基因序列分别被归为*Vibrio*、*Halomonas*、*Pseudoalteromonas*、*Shewanella*、*Marinomonas*、*Geobacillus*、*Pseudomonas*、*Psychrobacter*、*Cobetia*、*Oceanobacillus*、*Pantoea*和*Lactobacillus*属。其中能够产生亚硝酸盐的致病性*Vibrio*属细菌为腐败表层卤水中的优势菌, 分别占腌制7、22、60 d细菌总数的45.8%、74.2%、44.9%, *Pseudoalteromonas*、*Shewanella*、*Pseudomonas*等属腐败性细菌主要分布在第7天的样品中, 受高盐环境的影响, *Cobetia*、*Halomonas*等嗜盐菌和*Lactobacillus*属细菌的数量随时间的延长逐渐增多。7、22、60 d样品菌群相关性系数由0.5131降至0.4064, 随之又升高至0.8168。结果表明: 腐败表层卤水中细菌在青菜腌制过程中介导腐败并产生有害成分, 其群落结构随腌制过程演替。

关键词: 青菜腌制; 盐卤; 细菌多样性; 16S rRNA; 群落演替

Diversity and Community Succession of Surface Spoilage Bacteria in Leaf Mustard during Pickling Process

LI Ke¹, ZHANG Qing^{1*}, CHEN Gong², LIN Kai¹, YUAN Chun-hong¹, JIA Bi-hong¹, ZHONG Xiao-ting¹, XIANG Wen-liang¹

(1. Provincial Key Laboratory of Food Biotechnology of Sichuan, Institute of Ancient Brewing Technology, College of Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China; 2. Sichuan Academy of Food and Fermentation Industries, Chengdu 611130, China)

Abstract: 16S rRNA analysis was employed to investigate the microbial populations in putrefactive surface layer during leaf mustard pickling process. The microbial diversity and dynamics were assessed by Shannon-Weaver, Chao, ACE, Simpson, rarefaction analysis and similarity coefficient. All 16S rRNA gene sequences retrieved from brine samples with pickling for 7, 22 d and 60 d were assigned to *Vibrio*, *Halomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Marinomonas*, *Geobacillus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Cobetia*, *Oceanobacillus*, *Pantoea* and *Lactobacillus*. Among these genera, the dominant bacterium during the pickling process was pathogenic *Vibrio* and its number in these three samples was 45.8%, 74.2% and 44.9%, respectively. The spoilage bacteria such as *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* and *Pseudomonas* were mainly observed on day 7, and the number of *Lactobacillus*, *Cobetia* and *Halomonas* was gradually increased with the pickling process. The community similarity coefficient was decreased to 0.4064 from 0.5131 and then increased to 0.8168. The results indicated that the bacterial succession was associated with the pickling process and such succession is responsible for the spoilage of leaf mustard and the production of some noxious ingredients. These results provide a useful guidance for quality and safety control of pickled leaf mustard.

Key words: leaf mustard pickling; brine; bacterial diversity; 16S rRNA; succession

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)01-0180-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201401035

蔬菜的腌制是中华民族对世界食品发展的特殊贡献之一, 并在人类文明发展历程中成为全球最普遍和大

众化的蔬菜贮藏和加工方式。蔬菜腌制主要以各种蔬菜为原料, 同时添加食盐、葱、姜、蒜、香辛料等多种成

收稿日期: 2013-01-26

基金项目: 四川省泡菜产业链项目(2012NZ0002-8); 西华大学重点科研基金项目(Z1220531); 成都市自主创新一般项目(Z0102234)

作者简介: 李可(1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物与微生态。E-mail: like2341@126.com

*通信作者: 张庆(1979—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: biozhangq@163.com

分,借助于蔬菜表面附着的微生物在盐卤中发酵而成^[1]。在发酵过程中,不同微生物以蔬菜为营养基质,借助其生长与代谢特性的差异,通过竞争、协同等作用调节蔬菜腌制过程中微生物的种类和数量消长,从而形成腌制蔬菜特殊的风味^[2-3]。但是,在腌制过程中往往由于酵池封闭不严、操作不当和生产环境因素等的影响,会造成表层腌制蔬菜中大量的腐败微生物滋生。这些腐败微生物的存在打破了蔬菜腌制系统中原有的微生物生态平衡,不仅改变了腌制蔬菜的特有风味,而且存在极大的食品安全风险。

腐败微生物引起的腌制蔬菜腐败是蔬菜腌制过程中最主要的腐败原因。目前,对于蔬菜制品腐败微生物的研究,多见于对1种腐败微生物腐败特性或食品中腐败微生物控制方法上的研究^[4-5],而鲜有文献对腐败食品中微生物种类及菌群结构进行研究。四川泡菜是中国泡菜的典型代表,在四川泡菜生产的腌制环节中每年由于腐败微生物引起的蔬菜腐败约占泡菜加工量的5%~7%,直接经济损失8~10亿元人民币^[6]。然而,目前还未见有关四川泡菜腌制过程中腐败微生物的相关报道。

基于此,本研究主要以四川泡菜生产环节中的腌制青菜为对象,直接从腌制青菜腐败表层的盐卤中提取总DNA,利用16S rRNA基因文库分析技术解析青菜腌制过程中表层腐败细菌的多样性,同时利用Baroni-Urbani相关性系数探寻这些细菌伴随腌制过程而发生的群落演替关系,为下一步探寻合理、有效控制四川泡菜生产环节中青菜腌制腐败的措施提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验样品为四川某泡菜公司青菜腌制池上层腌制7 d (P1)、22d (P2)和60 d (P3)的含7 g/100 mL NaCl的盐卤。

A.E.Z.N.A.™ Soil DNA Kit Plasmid Mini Kit I 美国Omega公司;pGEM-T Easy Vector System I 美国Promega公司;Taq DNA聚合酶 日本TaKaRa公司。

1.2 方法

1.2.1 盐卤样品总DNA提取及16S rRNA基因PCR扩增

样品采集后立即按照A.E.Z.N.A.™ Soil DNA Kit进行总DNA的提取,提取的总DNA经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,PCR扩增细菌的16S rRNA基因。PCR体系:30 μL ddH₂O, 5 μL 10×PCR Reaction Buffer (无Mg²⁺), 6 μL MgCl₂ (25 mmol/L), 4 μL dNTP (2.5 mmol/L), 引物Eu27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、1490 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')各1 μL, 1 μL Taq聚合酶 (2.5 U/μL), 2 μL总DNA模板。PCR程序参考Xiang Wenliang等^[7]的方法,简述如下:95℃预变

性5 min;95℃变性1 min,50℃退火1 min,72℃延伸2 min,30个循环;72℃保持10 min。

1.2.2 16S rRNA 基因克隆文库构建

按照pGEM-T Easy Vector System I说明将PCR产物连接至pGEM-T载体,并转化至感受态细胞*E.coli* DH5α中,涂布于含Amp (100 μg/mL)、IPTG (24 μg/mL)和X-gal (40 μg/mL)的LB培养基平板上,筛选阳性克隆子。

1.2.3 16S rRNA测序及系统发育树构建

挑取阳性克隆子,按照Plasmid Mini Kit I说明提取重组质粒,经EcoR I酶切检测后含有完整16S rRNA的重组质粒采用Applied Biosystems DNA Sequencer (model 377)自动测序。测序结果与数据库NCBI BLAST比对后,再通过Clustal X1.8软件将代表序列与数据库中获得序列进行完全比对,利用MEGA5.0软件Neighbor-Joining法进行1 000次步长计算构建系统发育树。代表序列提交至GenBank数据库,获得序列号:KC502871~KC502885。

1.2.4 数据分析及基因文库评估

获得的序列用CLASSIFIER (RDPII, <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>)进行分类,利用BioEdit软件对所有序列进行两两比对,同源性大于97%的归为同一个操作分类单元(OTU)。根据所得OTU个数以及每个OTU样本丰富度,利用Rarefaction 1.3软件进行分析并绘制稀释度曲线。采用Estimates Win 8.0计算Shannon-Weaver、*S*_{obs}、*S*_{Chao1}、*S*_{ACE}等多多样性指数以及Simpson优势度指数分析比较细菌物种的多样性,利用下式计算文库覆盖度指数;利用DPS v7.05软件计算不同腌制时期腐败细菌的群落结构的Baroni-Urbani相关性系数,探寻微生物菌群伴随腌制过程而表现的演替关系。

$$\text{覆盖度}/\% = S_{\text{obs}} / \left(\frac{S_{\text{Chao1}} + S_{\text{ACE}}}{2} \right) \times 100$$

2 结果与分析

2.1 青菜腌制腐败表层盐卤中微生物的多样性

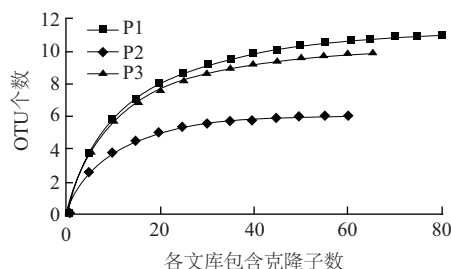


图1 基于OTU丰富度及OTU分类个数的16S rRNA基因文库稀释度曲线分析

Fig.1 The rarefaction analysis of 16S rRNA clone libraries based on abundance and classification number of OTU

稀释度曲线是一种有效的形态学和分类多样性分析方法^[8]，在本研究中，稀释度曲线分析发现，3个样品中OTU数目随着16S rRNA克隆子数的增加而增加，并趋于平缓，如图1所示。这表明本研究中构建的3个16S rRNA文库已趋于饱和，所获得的克隆子代表的微生物种类和数量能够比较全面和真实地表征样品细菌群落，体现群落的结构类型、组织水平和发展阶段。此外，细菌的多样性分析结果进一步证明以上结论，其中，青菜腌制7、22、60 d的腐败表层v中细菌的丰富度指数 S_{ACE} 和 S_{Chao1} 分别为10.5和10、6和6、10.5和10，覆盖度分别为97.6%、100%和97.6%（表1）。3个样品中的多样性指数分别为1.98、1.25和2.02，Simpson优势度指数分别为6.26、2.48和7.02。以上结果表明，该方法所检测的微生物结构菌群能够表征青菜腌制池中97.6%到100%的腐败微生物种类及数量。

表1 青菜不同发酵时期盐卤样品中OTU丰富度和多样性评估

Table 1 The abundance and diversity estimation of OTU derived from brine samples during different fermentation periods

样品	克隆子个数	S_{ACE}	S_{obs}	S_{Chao1}	Shannon-Weaver指数	Simpson优势度指数	覆盖度/%
P1	83	10	10	10.5	1.98	6.26	97.6
P2	62	6	6	6	1.25	2.48	100
P3	69	10	10	10.5	2.02	7.02	97.6

2.2 青菜腌制腐败表层微生物的分布

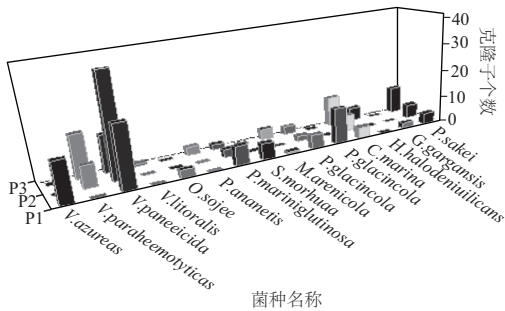
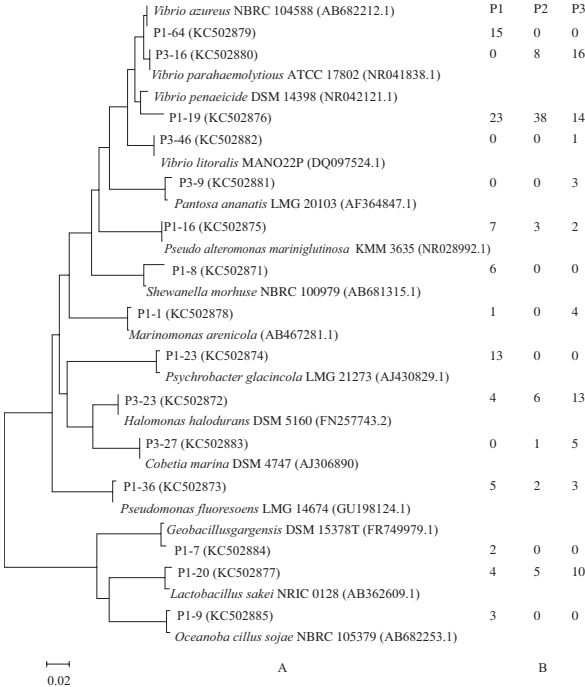


图2 不同发酵时期盐卤样品中各种细菌分布

Fig.2 Bacterial distribution in three samples during different periods of pickled leaf mustard

将所测得的序列提交至RDP进行分类。该214个克隆子分别归于*Vibrio*、*Halomonas*、*Pseudoalteromonas*、*Shewanella*、*Marinomonas*、*Geobacillus*、*Pseudomonas*、*Psychrobacter*、*Cobetia*、*Oceanobacillus*、*Pantoea*和*Lactobacillus*。其中*Vibrio*（38/83）和*Psychrobacter*（13/83）为P1期的优势菌群，*Vibrio*（46/62）为P2期的优势菌群，*Vibrio*（31/69）、*Cobetia*（11/69）和*Lactobacillus*（10/69）为P3时期的优势群，具体细菌分布情况如图2所示。根据以上3个样品所得序列构建克隆文库，分别从发酵7、22、60 d样品中得到83、62、69个克隆子，再分别将各文库中序列的同源性>97%的聚成一个OTU，3个文库分别获得10、6和10个OTU，大部分OTU均含有多个克隆子，仅少数OTU仅含有一个克隆子。

2.3 青菜腌制腐败表层微生物的系统发育



A. 系统发育树；B. A图中各菌株克隆子数量。

图3 基于16S rRNA构建的青菜不同发酵时期盐卤中细菌系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of bacteria in brine samples during different fermentation periods based on 16S rRNA sequence

Devereux等^[9]认为当16S rRNA的序列同源性≥97%时可以认为是一个属，同源性≥98%时则可以认为是同一个种。为了进一步探明青菜腌制腐败表层卤水中微生物的系统发育地位及进化信息，选取每个OTU的代表序列与GenBank中菌株的16S rRNA序列进行全序列比对，找到相近序列后，利用Neighbor-Joining方法计算各16S rRNA序列之间的亲缘关系，构建系统发育树，结果如图3所示。除代表序列P1-19外，各OTU代表序列都与NCBI数据库中典型菌株16S rRNA序列同源性在98%以上，分别与Vibrionales目的*Vibrio azureus*、*Vibrio parahaemolyticus*、*Vibrio litoralis*；Bacillales目的*Oceanobacillus sojae*和*Geobacillus gargensis*；Lactobacillales目的*Lactobacillus sakei*；Enterobacteriales目的*Pantoea ananatis*；Alteromonadales目的*Pseudoalteromonas mariniglutinosa*和*Shewanella morhuensis*；Pseudomonadales目的*Pseudomonas fluorescens*和*Psychrobacter glacincola*；Oceanospirillales目的*Marinomonas arenicola*、*Cobetia marina*和*Halomonas halodurans*聚为一枝。P1-19与NCBI数据库中典型菌株*Vibrio penaeicida*序列同源性为97%，在系统发育树上聚为一簇，说明它们在进化上同源性较高，但有可能是潜在的新种，具体分类有待进一步研究。

2.4 青菜腌制腐败表层中微生物群落的演替

微生物群落的演替是存在于各种环境的一种常见现象,由于微生物具有较短的代时且其对环境变化较为敏感,在蔬菜腌制过程中,微生物群落结构的变化能够及时反应环境的变化,并且决定环境及产品的特性。因此,可以通过了解微生物种群之间的演替关系评估和判断腌制过程。由表2可知,在青菜腌制过程中,随着腌制时间的延长,3个时期微生物相关性系数由0.513 1降低至0.406 4,随之又升高至0.816 8。结果表明,微生物群落结构随着青菜腌制过程的变化而发生变化,微生物的种类和数量与青菜的腐败过程存在着一定的相关性。

表2 青菜不同发酵时期盐卤样品中细菌群落Baroni-Urbani & Buser相似性系数

Table 2 Similarity coefficient of Baroni-Urbani and Buser based on the bacterial community of three brine samples

相关性系数	P1	P2	P3
P1	1.000 0	0.513 1	0.406 4
P2		1.000 0	0.816 8
P3			1.000 0

3 讨论

蔬菜腌制是全球最普遍和大众化的食品加工和贮藏方式之一,腌制的蔬菜以其爽滑脆嫩的品质广受消费者的欢迎。然而,随着人们对食品安全越来越重视,食品腐败尤其是由微生物引起的食品腐败成为食品行业的一个亟待解决的重要问题^[4]。目前,国内有关食品腐败机制的研究多停留在对腐败现象表面认识的研究,而忽略了对蔬菜腌制过程中腐败微生物的菌群结构及演替这一关键因素的研究,因此,基于腐败表象认识基础上进行的防腐技术研究也表现出一定的局限性。本实验利用16S rRNA技术分析腐败过程中微生物多样性及其演替关系,结果显示,在腌制青菜腐败表层微生物主要为致病性微生物,常见于海水和海产品,且微生物菌群结构与青菜腌制过程相关。本研究为从根本上认识和解决青菜腌制过程中的微生物腐败现象提供科学借鉴。

翁佩芳^[10]、李文斌^[11]等对泡菜中微生物的研究表明,泡菜中功能微生物菌群是由乳杆菌属、明串珠菌属、魏斯氏菌属和希腊魏斯氏菌属构成,并且起主导作用的为植物乳杆菌。而在本实验青菜腌制过程中,腐败表层卤水中存在较多的为致病性的*Vibrio*属。在前期,腐败表层卤水中微生物主要为*Vibrio*、*Shewanella*、*Pseudomonas*、*Pantoea*、*Phyllobacterium*、*Oceanobacillus*和*Geobacillus*属细菌,这些细菌多数来源于青菜的表面和环境。*V. penaeicida*为该时期的优势菌,该菌是一种能够引起河虾弧菌病93综合征的主要菌种之一^[12-13]。同时被检测到的*Pseudoalteromonas*、

Shewanella、*Pseudomonas*属细菌能够产生多种胞外酶,与具有淀粉水解能力的*Vibrio*属细菌一起在降解蔬菜中的纤维素、果胶、淀粉、蛋白质、几丁质方面发挥作用^[5,14-16],其中*Pseudomonas*和*Shewanella*也是腐败海产品样品中的主要菌^[17]。这些菌在蔬菜腌制过程中能够引起蔬菜质构发生变化,同时为腐败中后期其他菌群的生长和繁殖提供条件,因此它们是引起蔬菜腐败变质的主要菌。

本实验青菜腌制至22 d,由于受到腌制环境因素的限制,嗜盐菌和乳酸杆菌的数量有所上升,*Pseudoalteromonas*、*Shewanella*、*Pseudomonas*、*Pantoea*、*Oceanobacillus*和*Geobacillus*等属细菌数量下降甚至低于检测限,而*V. penaeicida*依然是优势菌,同时也检测出前期末检测到的*V. parahaemolyticus*。*V. parahaemolyticus*不仅能引起河虾的弧菌病,还是一海水和海产品中常见的导致O3:K6血清型流行病的致病菌,具有较强的致病能力及食源性传染,尤其是在亚洲、北美等地,因此受到各国的重视^[18-19]。此外,*V. parahaemolyticus*、*V. penaeicida*与腌制60 d检测到的*V. litoralis*均具有将卤水中的NO₃⁻还原为NO₂⁻的能力,增加了泡菜中亚硝酸盐的含量,因此*Vibrio*属细菌的大量存在可能是导致腌制蔬菜中亚硝酸盐含量超标的主要原因之一。随着腌制时间的延长,至腌制60 d,*V. parahaemolyticus*逐渐成为优势菌;同时乳酸菌*L. sakei*和嗜盐菌*C. marina*、*H. halodenitrificans*的数量明显增加。*L. sakei*是肉及海产品中常见的一种菌,由于其产酸、细菌素等特性在抑制腐败、致病性微生物和增香等方面发挥作用,可以用作肉制品发酵用曲和用于食品保藏延长货架期^[20-21],该菌可能在减少腌制过程中*Vibrio*属和其他腐败性微生物数量起到关键作用。嗜盐菌*C. marina*和*H. halodenitrificans*数量增加与其腌制池中的高盐环境的适应性有关,但是其在蔬菜腐败及蔬菜腌制过程中的作用有待进一步研究。

本实验通过对青菜中腐败微生物群落结构的分析探明影响腌制青菜安全性的生物学因素,结果表明:青菜腌制过程中腐败表层微生物主要为具有致病性和亚硝酸盐产生能力的*Vibrio*属及*Pseudomonas*、*Shewanella*、*Pseudoalteromonas*等属腐败性微生物,并且微生物群落结构与腌制过程表现出相关性。该研究结果为控制青菜腌制过程中腐败微生物的生长、提高食品质量安全具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 吴祖芳,赵永威,翁佩. 蔬菜腌制及其乳酸菌技术的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(7): 678-686.
- [2] 王金菊,崔宝宁,张治洲. 泡菜风味形成的原理[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(12): 163-166.

- [3] 陈飞平. 微生物发酵对蔬菜腌制品品质的影响[J]. 中国食物与营养, 2009 (9): 28-30.
- [4] 钟少枢, 吴克刚, 柴向华, 等. 七种单离食用香料对食品腐败菌抑菌活性的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(4): 68-71.
- [5] 席宇, 朱大恒, 刘红涛, 等. 假交替单胞菌及其胞外生物活性物质研究进展[J]. 微生物学通报, 2005, 32(3): 108-112.
- [6] 陈功. 中国泡菜加工技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011: 111-115.
- [7] XIANG Wenliang, LIANG Huazhong, LIU Sen, et al. Isolation and performance evaluation of halotolerant phosphate solubilizing bacteria from the rhizospheric soils of historic Dagong Brine Well in China[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(11): 2629-2637.
- [8] FOOTE M. Rarefaction analysis of morphological and taxonomic diversity[J]. Paleobiology, 1992, 18(1): 1-16.
- [9] DEVEREUX R, HE S H, DOYLE C L, et al. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(7): 3609-3619.
- [10] 翁佩芳, 陈希, 沈锡全, 等. 榨菜低盐腌制细菌群落多样性的分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(2): 338-345.
- [11] 李文斌, 宋敏丽, 唐中伟, 等. 自然发酵泡菜微生物群落变化的研究[J]. 中国食物与营养, 2008(11): 22-24.
- [12] GOARANT C, MERIEN F. Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonian shrimp, by real-time PCR using SYBR Green I chemistry[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 67(1): 27-35.
- [13] SAULNIER D, AVARRE J C, MOULLAC G L, et al. Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonia[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2000, 49(2): 109-115.
- [14] 孙菽蔚, 岳海东, 肖天. 一株海洋几丁质酶产生菌的筛选及其产酶条件的初步研究[J]. 海洋科学, 2007, 31(5): 10-16.
- [15] 张书文, 刘鹭, 李红娟, 等. 荧光假单胞菌胞外蛋白酶的纯化及特性研究[J]. 食品科学, 2012, 33(9): 206-210.
- [16] 侯进慧, 陈宏伟, 曹泽虹, 等. 鲫鱼肠道细菌菌群初步分析[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 178-181.
- [17] PARLAPANI F F, MEZITI A, KORMAS K A, et al. Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis[J]. Food Microbiology, 2013, 33(1): 85-89.
- [18] SU Yicheng, LIU Chengchu. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety[J]. Food Microbiology, 2007, 24(6): 549-558.
- [19] KUDO Y H, SAITO S, OHTSUKA K, et al. Characteristics of a sharp decrease in *Vibrio parahaemolyticus* infections and seafood contamination in Japan[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 157(1): 95-101.
- [20] JONES R J, ZAGOREC M, BRIGHTWELL G, et al. Inhibition by *Lactobacillus sakei* of other species in the flora of vacuum packaged raw meats during prolonged storage[J]. Food Microbiology, 2009, 26(8): 876-881.
- [21] MCLEOD A, NYQUIST O L, SNIPEN L, et al. Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2008, 31(5): 393-403.