

基于16S rDNA高通量测序方法比较新疆西北部地区乳品中微生物的多样性

张 敏, 张 艳, 黄丽丽, 刘忆冬, 周 红, 倪永清*
(石河子大学食品学院, 新疆 石河子 832000)

摘 要: 为更加全面地了解新疆特色乳品中微生物多样性, 比较不同动物来源的原奶和酸奶的细菌群落结构, 运用高通量测序技术, 对乳品中细菌16S rDNA V4-V5区测序, 进而对新疆克州和塔城地区牛奶、驼奶、马奶、羊奶、酸牛奶、酸驼奶和酸马奶7种乳品中细菌群落组成和多样性进行分析。研究共获得539 557条有效序列, 379个OTU。多样性分析表明, 原奶样品中细菌Shannon-Wiener指数明显高于酸奶样品。微生物群落组成分析发现, 不同乳品之间菌群组成差异较大。7种乳品中的菌群均以厚壁菌门和变形菌门为主, 但原奶样品主要以变形菌门为主, 而酸奶样品主要以厚壁菌门为主。在属水平上, 牛奶主要以假单胞菌属(*Pseudomonas*)为主, 驼奶主要以埃希菌属-志贺菌属(*Escherichia-Shigella*), 马奶主要以明串珠菌属(*Leuconostoc*)为主, 羊奶中的优势菌属为乳球菌属(*Lactococcus*), 而酸牛奶、酸驼奶和酸马奶都是以乳杆菌属(*Lactobacillus*)为优势菌属。不同动物来源的原奶和酸奶样品中的微生物多样性存在显著差异, 并且原奶中检测到的环境污染菌和致病菌(或条件致病菌)的丰度也相对较高。本研究结果将为准确评估乳品中的微生物群落对新疆地区少数民族健康的影响提供一定的数据基础。

关键词: 乳品; 微生物多样性; 高通量测序技术

Application of 16S rDNA High-Throughput Sequencing for Comparative Study of the Microbial Diversity of Dairy Products from Western and Northern Xinjiang, China

ZHANG Min, ZHANG Yan, HUANG Lili, LIU Yidong, ZHOU Hong, NI Yongqing*
(College of Food, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: This study aimed to fully demonstrate the microbial diversity in dairy products from Xinjiang, China and to compare the microbial community composition of raw and fermented milk from different animal species. The composition and structure of bacterial communities in bovine milk, camel milk, mare's milk, caprine milk, fermented cow milk, fermented camel milk and koumiss from Kizilsu Kirghiz and Tacheng regions of Xinjiang were analyzed based on high-throughput sequencing of the V4-V5 region of the 16S rDNA. A total of 539 557 effective sequences and 379 OTUs were obtained. The results showed that the Shannon-Wiener diversity index for raw milk was higher than that for fermented milk. The microbiota of raw and fermented milk were significantly different. Two bacterial phyla, Firmicutes and Proteobacteria, dominated the microbiota of all seven dairy products, and Proteobacteria dominated the microbiota of raw milk, while Firmicutes was the predominant phylum in fermented milk. At the genus level, *Pseudomonas* was dominant in cow milk, *Escherichia-Shigella* was the major bacterial population in camel milk, *Leuconostoc* was the most abundant bacteria in mare's milk, *Lactococcus* was the dominant bacteria in goat milk samples, and *Lactobacillus* dominated the microbiota of yogurt, camel yogurt and koumiss. The microbiota in raw and fermented milk from different animals were significantly different, and the abundances of environmental bacterial and pathogenic bacteria (or conditional pathogenic bacteria) in raw milk were highest. The results of this study would provide preliminary data of the microbial diversity in dairy products to assess their effect on the health of Xinjiang minorities.

Key words: dairy product; microbial diversity; high-throughput sequencing

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720005

中图分类号: Q935

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2017)20-0027-07

收稿日期: 2016-08-23

基金项目: 新疆生产建设兵团科技攻关与成果转化计划项目(2015AC003)

作者简介: 张敏(1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: 18703080975@163.com

*通信作者: 倪永清(1969—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: niyqlzu@sina.com

引文格式:

张敏, 张艳, 黄丽丽, 等. 基于16S rDNA高通量测序方法比较新疆西北部地区乳品中微生物的多样性[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 27-33. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720005. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Min, ZHANG Yan, HUANG Lili, et al. Application of 16S rDNA high-throughput sequencing for comparative study of the microbial diversity of dairy products from western and northern Xinjiang, China[J]. Food Science, 2017, 38(20): 27-33. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720005. <http://www.spkx.net.cn>

动物原奶及其衍生的各种加工乳制品含有丰富的营养物质, 千百年来成为人类喜爱的营养食品, 同时也为不同的外源微生物提供了理想的栖息生境, 形成了复杂多样的微生物组, 对乳品的品质和经济价值起着关键作用^[1-2]。虽然乳品的营养价值众所周知, 但是人们对其中的微生物成分并没有很好地描述, 因此进一步研究新疆乳制品中微生物的多样性至关重要。

我国新疆地区地域广袤、气候差异显著、生态环境复杂、少数民族众多, 这些民族畜牧养殖业历史悠久(养殖牲畜包括牛、山羊、绵羊、骆驼、马、牦牛等), 丰富的养殖业造成了多样的天然乳品(各种原奶)及其加工乳品(酸马奶、酸牛奶、酸驼奶等), 孕育了极其丰富的乳酸菌资源及遗传多样性。环境的差异和宿主动物的来源不同直接影响着原奶的微生物群落结构组成; 而原奶加工乳制品中微生物组不仅受到环境条件、来源动物的影响, 也受到乳品加工过程的影响^[3-4]。这些不同类型的乳品将以直接或者间接的方式进入食品消费链, 生存繁衍于其中的各种微生物也将被消费者摄入, 进入人体消化系统, 部分菌群将直接构成消费者的肠道微生物组。目前, 已经知道人类的饮食对其肠道菌群有着直接的影响, 而肠道微生物组对人的健康发挥着至关重要的作用^[5]。有益功能是益生菌促进食物的消化吸收、增强机体免疫力^[6], 有害作用将是病原微生物的致病性以及造成携带的抗生素抗性毒力基因的扩散^[2-3]。到目前为止, 对新疆地区少数民族经年累月消费的乳制品中微生物群落组成及结构了解极少, 因此开展乳品微生物组的研究将非常必要。

在早期的乳制品微生物研究中, 采用传统的培养和免培养技术对其微生物组成有了初步的认识^[7-8]。传统的免培养技术比如变性梯度凝胶电泳^[9-10]、温度梯度凝胶电泳、荧光原位杂交^[11]、限制性片段长度多态性^[12-13]等方法在对乳制品比如斯提尔顿奶酪^[11]、丹麦奶酪^[14]和开菲尔谷粒^[15]中微生物的组成分析的研究方面越来越成熟。虽然用这种技术, 鉴定到的微生物的种类有所增加, 但是仅仅利用这种技术去完善乳制品中微生物种类的文库

还是远远不够的。因此, 新的技术-高通量测序技术以其高读长、精度高、通量高、无偏性的自身优势被广泛应用去研究微生物的群落多样性。早期的研究基于可培养的方法对微生物进行分离鉴定, 相比之下, 高通量测序技术不仅能检测到普通的可培养物种, 而且还可以检测到那些难培养和低丰度的物种以及那些很难从样品中获取曾经存活或是难以分离的部分微生物, 它已被成功用于检测相对较少部分的发酵食品比如奶酪^[1,14]、开菲尔谷粒^[15-16]和发酵海鲜食品^[17]等。

本研究的目的是利用高通量测序方法对新疆西北地区不同动物来源的原奶和发酵酸奶中细菌群落组成和结构进行比较分析, 进而更加全面地展现新疆地区乳制品的微生物多样性, 从而准备评估乳品对新疆地区少数民族健康的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

PCR产物纯化试剂盒 德国Qiagen公司; 用于PCR扩增的全套试剂及扩增引物 TaKaRa公司; 相关生理生化实验所用试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Fresco21型高速冷冻离心机 美国Thermo公司; Tprofessional PCR仪 德国Biometral公司; Gel DOC XR凝胶成像系统、PowerPacUniversal水平电泳仪、SUBCELL GT电泳槽(20 cm×25 cm) 美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 样品采集

采集来自新疆两个地区(包括塔城、克州)不同动物来源的天然乳制品(马、骆驼、山羊、奶牛等饲养动物原奶)和加工乳品(自然发酵酸奶)。采样时间在2014年7月, 所有的样品经无菌容器密封好后放入车载冰箱运回实验室, 样品保存在-80℃超低温冰箱。样品及其采集地见表1。

表1 样品及其采集地
Table 1 Samples and their geographical origin

样品类型	样品编号	采样地点
牛奶	N1	克州阿合奇县
羊奶	N2	克州阿合奇县
酸牛奶	N3	克州阿合奇县
酸马奶	N4	克州阿合奇县
酸驼奶	N5	克州阿合奇县
酸驼奶	N6	塔城托里县
驼奶	N7	克州阿合奇县
酸驼奶	N8	克州阿合奇县
酸驼奶	N9	塔城市
酸牛奶	N10	塔城市
马奶	N11	塔城和丰县
酸马奶	N12	塔城托里县
酸马奶	N13	塔城和丰县
酸马奶	N14	塔城裕民县

1.3.2 总DNA提取

吸取5 mL的奶样品放进20 mL 2%的柠檬酸钠溶液中45 °C培养30 min; 悬浮液在Vortex mixer中搅打大约5 min, 上清液转移到干净的试管中; 8 000 r/min离心10 min后, 脂肪层用棉花棒吸走, 细胞颗粒用1 mL TE缓冲液悬浮, 并且8 000 r/min离心10 min; 上清液被移走, 剩下的大约100 μ L和颗粒混合并转移到2 mL带盖的离心管中, 加入0.3 g铅珠和150 μ L的饱和TE酚后在水平击打器上击打5 min; 加入CI溶液(氯仿-异戊醇(24:1, V/V))后, 离心管简单地旋涡振荡; 继续加入饱和TE酚和CI溶液, 直到得到一个较澄清的上层; 用2倍体积的乙醇(100%)加入清液中, 再用70%乙醇溶液洗脱, 悬浮在500 μ L TE中; DNA在3 mol/L乙酸钠(pH 5.2)和96%乙醇溶液中沉淀; 最后溶解与100 μ L TE缓冲液。

1.3.3 16S rDNA V4-V5区的PCR扩增及测序

用提取的总DNA作为模板, 以515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3')和907R(5'-CCGTCAAT TCMTTTTRAGTTT-3')为引物(引物为原来文献中报道的^[18]), 对细菌的16S rDNA V4-V5可变区进行特异性扩增。扩增体系(20 μ L)为: 5 \times Taq FastFu Buffer 4 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L, 引物各0.4 μ L(20 μ mol/mL), 模板0.5 μ L(约50 ng), 用dd H₂O补齐至20 μ L。反应程序为: 95 °C预变性2 min后, 进行30次循环(95 °C变性30 s, 55 °C复性30 s, 72 °C延伸1 min), 最后72 °C延伸5 min。每个样品PCR扩增3份, 扩增样品混合后采用QIAquick PCR purification kit纯化, 在超微量紫外分光光度计上精确定量后, 等量混合在Miseq测序平台进行测序, PCR扩增及测序工作由上海美吉公司完成。

1.4 数据分析

采用QIIME 1.8.0软件处理原始数据, 首先对V4-V5

区片段进行拼接, 其次去除引物, 接着对其进行质量控制。质控时, 去除模糊不清的序列; 去除在正逆向引物中有错误的序列; 去除碱基错配的序列。最后用usearch 7.0软件去除嵌合体序列得到干净的序列。将得到的干净序列聚类成操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU), 通过归类操作, 对所有序列在97%的相似水平下进行OTU划分, 根据OTU分类计算了样品的Chao1指数、ACE指数、Shannon-Wiener指数和样品文库的覆盖率。基于UniFrac分析, 根据主成分分析检测种族间距的差异。通过稀释曲线评价序列的丰度。

2 结果与分析

2.1 样品序列数的特点

通过细菌的16S rDNA基因V4-V5区测序, 14个样品共产生655 778个序列标签, 平均长度为469 bp。质控后, 获得539 557个序列标签, 平均长度为396 bp。质控过程中每个样品剔除了17.7%的序列标签。所有序列按97%的相似度进行OTU分类, 总共聚成379个OTU。

2.2 样品细菌群体间的多样性分析

表2 乳品样品的信息、序列丰度以及微生物多样性
Table 2 Sequence abundance and microbial diversity in the dairy products

样品	序列数	多样性指数				覆盖率/%
		OTU	Chao1指数	Shannon-Wiener指数	ACE指数	
N1(牛奶)	44 302	45	56.00	0.68	67.67	99.97
N2(羊奶)	31 742	38	71.00	1.16	134.30	99.96
N3(酸牛奶)	44 742	34	40.43	1.12	45.27	99.98
N4(酸马奶)	36 701	33	63.00	0.06	108.69	99.96
N5(酸驼奶)	41 317	40	49.43	0.95	53.67	99.97
N6(酸驼奶)	32 440	40	75.00	0.28	77.23	99.95
N7(驼奶)	39 444	109	187.00	1.37	314.83	99.86
N8(酸驼奶)	41 321	47	62.17	1.29	62.33	99.96
N9(酸驼奶)	38 055	39	65.00	0.71	90.84	99.96
N10(酸牛奶)	36 204	36	76.00	1.49	115.46	99.95
N11(马奶)	38 318	158	279.71	0.86	359.22	99.81
N12(酸马奶)	39 474	32	37.14	0.44	40.46	99.98
N13(酸马奶)	38 952	30	39.33	0.46	48.59	99.98
N14(酸马奶)	36 545	29	32.33	0.28	33.03	99.99

每个样品的Chao1指数和Shannon-Wiener指数用于评估物种丰度和多样性。由表2可知, 原奶样品中细菌Shannon-Wiener指数明显高于其他样品, 牛奶例外, 表明原奶中微生物群落种群差异性较大; 而原奶的OTU数普遍高于酸奶的OTU数, 而原奶中马奶的OTU数最多, 接下来是驼奶和牛奶, 羊奶中的OTU数最少; Chao1指数的结果与OTU的结果相似, 这是因为Chao1算法常用来估计群落中含有OTU的数目的指数, 也就是用来估计物种数, 即Chao1指数就是OTU数的一个反应指标, 进一步证明了原奶中微生物群落的种群多样性和总体丰度较高。乳品样品的覆盖率都大于99%, 说明样品文库的覆盖率

很大，样品中序列没有被测出的概率极低，即反映了本测序结果可以代表样本的真实情况。

2.3 样品细菌群落门水平分布

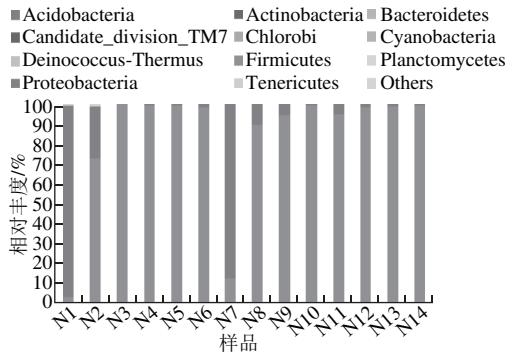


图1 门水平各样本菌群分布图

Fig. 1 Distribution of microbial communities in the dairy samples at phylum level

本研究中，乳品的12个细菌门被鉴定出，它们分别是酸杆菌亚门（Acidobacteria）、Candidate-division-TM7、奇异球菌-栖热菌门（Deinococcus-Thermus）、变形菌门（Proteobacteria）、放线菌门（Actinobacteria）、绿菌门（Chlorobi）、厚壁菌门（Firmicutes）、软壁菌门（Tenericutes）、拟杆菌门（Bacteroidetes）、蓝菌门（Cyanobacteria）、浮霉菌门（Planctomycetes）、未分类菌群（Others）。对样品信息中主要组成的12个门进行门水平菌群比例分布绘图，结果如图1所示。原奶和发酵酸奶之间微生物组成存在明显的差异，但也存在着一定的规律性，其中厚壁菌门和变形菌门是最占优势的菌群门，分别占细菌总序列的82.69%和17.20%。进一步分析表明，原奶中主要的菌群是变形菌门，而不同动物来源的原奶中变形菌门占各自样品细菌序列的比例也不尽相同，其中在牛奶和驼奶中变形菌门所占比例较大，分别为97.00%和87.96%，而变形菌门在羊奶和马奶中的比

例较小，分别为26.53%和5.03%；发酵酸奶中主要是以厚壁菌门为主，其中在酸牛奶和酸马奶中厚壁菌门占各自样品序列的比例高达98%，在酸驼奶N5和N6中也可高达98%，而厚壁菌门在酸驼奶N8和N9中所占比例不如N5和N6中的高，它们分别占89.96%和94.89%。

2.4 样品细菌群落属水平分布

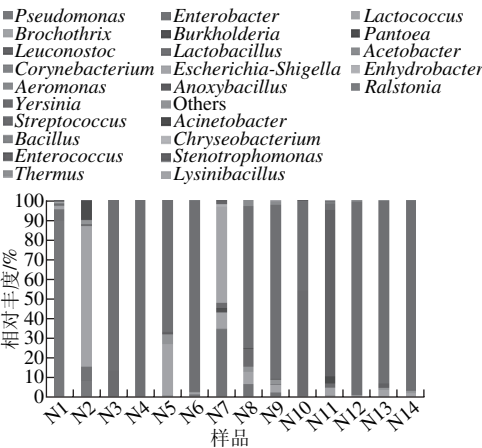


图2 属水平各样本菌群分布图

Fig. 2 Distribution of microbial communities in the dairy samples at genus level

本实验将乳品中前10种丰度最高的属信息整理成表3，发现4种原奶中的微生物菌群的主要种属相差甚大。牛奶（N1）主要以假单胞菌属（Pseudomonas）、肠杆菌属（Enterobacter）和乳球菌属（Lactococcus）等细菌种属为主；羊奶（N2）主要以乳球菌属、不动杆菌属（Acinetobacter）和假单胞菌属（Pseudomonas）等细菌种属为主；驼奶（N7）主要以埃希菌属-志贺菌属（Escherichia-Shigella）、肠杆菌属和乳球菌属为主；马奶（N11）主要以明串珠菌属（Leuconostoc）、不动杆

表3 乳品中主要微生物菌落种属组成
Fig. 3 Major bacterial genera in the dairy products

样品	丰度排名									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
N1	<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Yersinia</i>	Others	<i>Brochothrix</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Acinetobacter</i>
N2	<i>Lactococcus</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterobacter</i>	Others	<i>Yersinia</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Brochothrix</i>	<i>Streptococcus</i>
N3	<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	Others	<i>Enterobacter</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Acinetobacter</i>
N4	<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Lactococcus</i>	Others	<i>Corynebacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>
N5	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	Others	<i>Leuconostoc</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Yersinia</i>
N6	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Lactococcus</i>	Others	<i>Acetobacter</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Pantoea</i>
N7	<i>Escherichia-Shigella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Enhydrobacter</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Pantoea</i>	Others
N8	<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Acetobacter</i>	Others	<i>Aeromonas</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Escherichia-Shigella</i>
N9	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	Others	<i>Enterobacter</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Escherichia-Shigella</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Anoxybacillus</i>
N10	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Anoxybacillus</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Thermus</i>
N11	<i>Leuconostoc</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Acetobacter</i>
N12	<i>Lactobacillus</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Lactococcus</i>	Others	<i>Enterobacter</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Enhydrobacter</i>
N13	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	Others	<i>Acetobacter</i>	<i>Enhydrobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Streptococcus</i>
N14	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	Others	<i>Acetobacter</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Escherichia-Shigella</i>	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Enterobacter</i>

菌属和乳球菌属等细菌种属为主；酸牛奶主要以乳杆菌属（*Lactobacillus*）和链球菌属（*Streptococcus*）等细菌种属为主；酸驼奶主要以乳杆菌属和乳球菌属等细菌种属为主；酸马奶主要以乳杆菌属、乳球菌属和醋杆菌属（*Acetobacter*）为主。

如图2所示，各种酸奶主要以乳杆菌属（*Lactobacillus*）为主，其所占比例在不同样品个体中大小不一，酸牛奶N3中的乳杆菌属占该样品总序列的86.90%，酸牛奶N10中的乳杆菌属占45.63%，酸牛奶中乳杆菌的数量差异如此之大，这可能与采样地点有关系，N10中乳杆菌的比例相对较小，说明N10中的其他菌的种类较多，多样性较丰富，这也和Shannon-Wiener指数结果相一致；酸马奶N4、N12、N13、N14中乳杆菌分别占各自序列的比例为99.69%、98.32%、92.98%和96.53%；酸驼奶N5、N6、N8、N9中乳杆菌分别占各自序列的比例为67.08%、97.03%、72.13%和88.46%。

2.5 样品细菌群落相似性分析

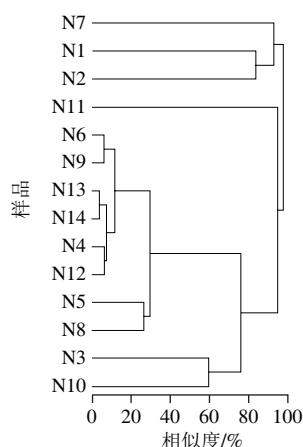


图3 细菌群落聚类分析图

Fig. 3 Clustering analysis of bacterial communities

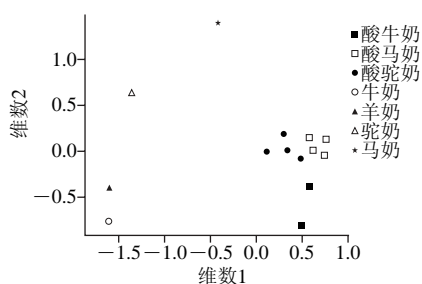


图4 细菌群落的非度量多维尺度分析

Fig. 4 Non-metric multidimensional scaling of bacterial communities

本实验将全部相似度为97%的OTUs用Primer 6.0做聚类分析14个样品之间的微生物群落相似性。如图3可知，所有样品共聚成两类。第1大类包括不同动物来源的原奶样品，马奶除外，这可能与不同的采样地点有关；第

2大类包括不同动物来源的酸奶样品。第2大类又进一步聚成两个亚组，原马奶一组，各种酸奶一组。酸奶亚组下又分成3个小分支，酸马奶一组，酸牛奶一组，酸驼奶一组。这就说明不同类型的乳品微生物群落结构相差甚远，而且微生物群落结构存在生物地理分布差异。

细菌群落间存在的可能的关系也可以通过非度量多维尺度（nonmetric multidimensional scaling, N-MDS）来分析的。N-MDS是根据样品中包含的物种信息，以点的形式反映在多维空间上，而对不同样品间的差异程度，则是通过点与点间的距离体现的，最终获得样品的空间定位图。由图4可知，N-MDS展现的结果类似，不同动物来源的原奶之间的距离较远，说明各种原奶中的微生物差异较大；而不同动物来源的酸奶之间的距离较近，说明各种酸奶中的微生物相似性较高。两份酸牛奶之间的距离并不是很近，这也有可能和采样地点有关。

3 讨论

高通量测序技术能够为环境样品中的微生物群体结构提供一个全面的描述分析，本实验通过此方法分析并比较新疆地区不同宿主动物来源的原奶和酸奶中的细菌群落结构及多样性。在两类乳品中，原奶样品展示了较高的物种丰度，然而随着样品加工过程的继续，酸奶中的多样性减少。众所周知，在发酵过程中食品生态系统环境的转变会造成原奶中微生物群落的选择，这也说明了环境因素比如说温度和相对湿度会影响乳品加工和成熟过程中微生物的群落多样性^[19-21]。

原奶中的微生物成分曾经在描述孔泰奶酪的特点中被研究过，但是并没有对不同动物来源的原奶以及原奶和发酵酸奶中的成分进行比较^[22-23]。本研究的目的是了解新疆地区不同宿主动物来源的天然原奶中的有益微生物和一些致病菌，以及对原奶和加工乳品中的成分进行比较，以准确评估特色乳品对新疆地区少数民族健康的影响。在门水平上，厚壁菌门和变形菌门是优势菌门，然而在原奶和酸奶中这两个细菌门的丰度不同，原奶中最占优势的细菌门是变形菌门，酸奶中最占优势的细菌门是厚壁菌门，这和自然发酵乳品（开菲尔谷粒^[24]、发酵海鲜食品^[13]、珍珠粟浆^[25]、自然发酵牦牛奶^[26]和手工奶酪^[11]等）的研究结果相一致。

在属水平上，4种不同动物来源的原奶中的微生物成分差异较大，而发酵酸奶中的成分近乎一致。研究结果表明乳球菌和乳杆菌是原奶和酸奶样品中主要的微生物，在乳制品的生产发酵过程中发挥了重要作用^[27-29]，而乳球菌是原奶中最丰富的属，乳杆菌是酸奶中最占优势的属。据报道，乳杆菌的酸耐受力高于链球菌和乳球菌^[30]。乳球

菌的一些种的酸耐受力较低, 所以它们大部分是分离自原奶和原奶的发酵早期^[30-31]。由于乳杆菌比乳球菌有较强的酸耐受力, 因此酸奶中乳杆菌的丰度较高而原奶中乳球菌的丰度较高, 这也正和本研究结果一致。

此外, 在本实验样品中主要的属(大于总序列的0.1%)有*Pseudomonas*、*Enterobacter*、*Leuconostoc*、*Streptococcus*、*Escherichia-Shigella*、*Acinetobacter*、*Acetobacter*、*Yersinia*、*Burkholderia*、*Enhydrobacter*、*Enterococcus*。在这些属中, *Streptococcus*、*Leuconostoc*和*Enterococcus*在Delbes等^[32]对原奶的研究中曾被报道过。*Acinetobacter*和*Enterobacter*在墨西哥的一款酒精性饮料中检测到过, 据推测这些属可能和原奶中的细菌污染有关, 并且在原奶的发酵过程中不断减少^[33]。*Enhydrobacter*、*Acinetobacter*、*Chryseobacterium*和*Bacillus*等环境细菌在以前的利用基于培养的方法和免培养的方法来检测原奶中的微生物组研究中也报道过^[1,27,32,34-35]。原奶中的微生物一般是来自不同动物的乳房, 不同的农场, 挤奶环境和与奶直接接触的挤奶工人和容器^[36]。实验发现不同动物来源的原奶中的微生物成分差异较大, 主要是其中的致病菌和环境污染菌不同, 牛奶主要以*Pseudomonas*和*Enterobacter*为主; 羊奶主要以*Acinetobacter*和*Pseudomonas*为主; 驼奶主要以*Escherichia-Shigella*和*Enterobacter*为主; 马奶主要以*Leuconostoc*和*Acinetobacter*为主。乳品中*Enterobacteria*的出现可能会造成健康风险并且反映出在对乳制品处理过程中的卫生标准较低, *Escherichia-Shigella*和*Pseudomonas*会导致腹泻^[37-41]。

4 结 论

不同动物来源的原奶和酸奶样品中的微生物多样性存在显著差异。与酸奶相比, 不同动物来源的原奶中微生物群落的种群多样性和总体丰度较高, 并且原奶中检测到的致病菌和环境污染菌的丰度也相对较高。这无疑增加了消费者对原奶安全性的担忧, 也将为研究者准确评估乳品中的微生物群落对新疆地区少数民族健康的影响提供一定的数据基础。

参考文献:

- [1] QUIGLEY L, O'SULLIVAN O, BERESFORD T P, et al. High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with Artisanal cheeses[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(16): 5717-5723. DOI:10.1128/AEM.00918-12.
- [2] QUIGLEY L, O'SULLIVAN O, STANTON C, et al. The complex microbiota of raw milk[J]. Fems Microbiology Reviews, 2013, 37(5): 664-698. DOI:10.1111/1574-6976.12030.
- [3] DEVIRGILIIS C, ZINNO P, PEROZZI G. Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 301. DOI:10.3389/fmicb.2013.00301.
- [4] CAVANAGH D, FITZGERALD G F, MCAULIFFE O. From field to fermentation: the origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment[J]. Food Microbiology, 2015, 47: 45-61. DOI:10.1016/j.fm.2014.11.001.
- [5] SOMMER F, BÄCKHED F. The gut microbiota-masters of host development and physiology[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(4): 227-238. DOI:10.1038/nrmicro2974.
- [6] KAU A L, AHERN P P, GRIFFIN N W, et al. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system[J]. Nature, 2011, 474: 327-336. DOI:10.1038/nature10213.
- [7] GIRAFFA G, NEVIANI E. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 67(1/2): 19-34. DOI:10.1016/S0168-1605(01)00445-7.
- [8] JANY J L, BARBIER G. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese[J]. Food Microbiology, 2008, 25(7): 839-848. DOI:10.1016/j.fm.2008.06.003.
- [9] MUYZER G, DE WAAL E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700.
- [10] RANDAZZO C L, TORRIANI S, AKKERMANS A L D, et al. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1882-1892. DOI:10.1128/AEM.68.4.1882-1892.2002.
- [11] ERCOLINI D, HILL P J, DODD C E R. Bacterial community structure and location in Stilton cheese[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3540-3548. DOI:10.1128/AEM.69.6.3540-3548.2003.
- [12] LIU W T, MARSH T L, CHENG H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(11): 4516-4522.
- [13] ARTEAU M, LABRIE S, ROY D. Terminal-restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese[J]. International Dairy Journal, 2010, 20(8): 545-554. DOI:10.1016/j.idairyj.2010.02.006.
- [14] MASOUD W, TAKAMIYA M, VOGENSEN F K, et al. Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing[J]. International Dairy Journal, 2011, 21(3): 142-148. DOI:10.1016/j.idairyj.2010.10.007.
- [15] LEITE A, MAYO B, RACHID C, et al. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis[J]. Food Microbiology, 2012, 31(2): 215-221. DOI:10.1016/j.fm.2012.03.011.
- [16] DOBSON A, O'SULLIVAN O, COTTER P D, et al. High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain[J]. FEMS Microbiology Letters, 2011, 320(1): 56-62. DOI:10.1111/j.1574-6968.2011.02290.x.
- [17] ROH S W, KIM K H, NAM Y D, et al. Investigation of archaeal and bacterial diversity in fermented seafood using barcoded pyrosequencing[J]. ISME Journal, 2010, 4(1): 1-16. DOI:10.1038/ismej.2009.83.

- [18] SAMUEL O A, RONALD M, MICHAEL I, et al. Postinoculation protozoan establishment and association patterns of methanogenic archaea in the ovine rumen[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(14): 4609-4618. DOI:10.1128/AEM.02687-06.
- [19] BONETTA S, BONETTA S, CARRARO E, et al. Microbial characterization of Rabiola di Roccaverano cheese using PCR-DGGE[J]. *Food Microbiology*, 2008, 25(6): 786-792. DOI:10.1016/j.fm.2008.04.013.Epub2008May7.
- [20] CARIDI A, MICARI P, FOTI F, et al. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspiomonte produced from raw and thermized milk[J]. *Food Microbiology*, 2002, 20(2): 201-209.
- [21] PSONI L, TZANETAKIS N, LITOPOULOU-TZANETAKI E. Microbial characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goats' milk[J]. *Food Microbiology*, 2003, 20(5): 575-582.
- [22] BERTHIER F, BEUVIER E, DASEN A, et al. Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers[J]. *International Dairy Journal*, 2001, 11(4/5/6/7): 293-305.
- [23] DEPOUILLY A, DUFRENE F, BEUVIER E, et al. Genotypic characterisation of the dynamics of the lactic acid bacterial population of Comté cheese[J]. *Lait*, 2004, 84: 155-167.
- [24] CHEN H C, WANG S Y, CHEN M J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods[J]. *Food Microbiology*, 2008, 25(3): 492-501. DOI:10.1016/j.fm.2008.01.003.
- [25] HUMBLLOT C, GUYOT J P. Pyrosequencing of tagged 16S rRNA gene amplicons for rapid deciphering of the microbiomes of fermented foods such as pearl millet slurries[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(13): 4354-4361. DOI:10.1128/AEM.00451-09.
- [26] LIU W J, ZHENG Y, KWOK L Y, et al. High-throughput sequencing for the detection of the bacterial and fungal diversity in Mongolian naturally fermented cow's milk in Russia[J]. *BMC Microbiology*, 2015, 15(1): 45. DOI:10.1186/s12866-015-0385-9.
- [27] ALEGRÍA Á, SZCZESNY P, MAYO B, et al. Biodiversity in Oscypek, a traditional Polish cheese, determined by culture-dependent and-independent approaches[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(6): 1890-1898. DOI:10.1128/AEM.06081-11.
- [28] WATANABE K, FUJIMOTO J, SASAMOTO M, et al. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in Airag and Tarag, traditional fermented milk products of Mongolia[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24(8): 1313-1325. DOI:10.1007/s11274-007-9604-3.
- [29] BAO Q H, YU J, LIU W J, et al. Predominant lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk products in the Sichuan Province of China[J]. *Dairy Science and Technology*, 2012, 92(3): 309-319. DOI:10.1007/s13594-012-0061-x.
- [30] ROGOSA M, MITCHELL J A, WISEMAN R F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli[J]. *Journal of Bacteriology*, 1951, 62(1): 132-133.
- [31] AN Y, ADACHI Y, OGAWA Y. Classification of lactic acid bacteria isolated from chigee and mare milk collected in Inner Mongolia[J]. *Animal Science Journal*, 2004, 75(3): 245-252. DOI:10.1111/j.1740-0929.2004.00183.x.
- [32] DELBES C, ALI-MANDJEE L, MONTEL M C. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependant and independent 16S rRNA gen-based analyses[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(6): 1882-1891. DOI:10.1128/AEM.01716-06.
- [33] ESCALANTE A, GILES-GÓMEZ M, HERNÁNDEZ G, et al. Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 124(2): 126-134. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003.
- [34] CALLON C, DUTHOIT F, DELBES C, et al. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation: molecular approaches[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007, 30(7): 547-560. DOI:10.1016/j.syapm.2007.05.004.
- [35] FEURER C, IRLINGER F, SPINLER H, et al. Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97(3): 546-556. DOI:10.1111/j.1365-2672.2004.02333.x.
- [36] OLIVER S, JAYARAO B, ALMEIDA R. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2005, 2(2): 115-129. DOI:10.1089/fpd.2005.2.115.
- [37] ARAUJO V S, PAGLIARES V A, QUEIROZ M L, et al. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92(6): 1172-1177. DOI:10.1046/j.1365-2672.2002.01656.x.
- [38] COIA J E, JOHNSTON Y, STEERS N J, et al. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 66(1/2): 63-69. DOI:10.1016/S0168-1605(00)00490-6.
- [39] DE BUYSER M L, DUFOUR B, LAFARGE M M, et al. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 67(1/2): 1-17. DOI:10.1016/S0168-1605(01)00443-3.
- [40] ALBERT M J, ALAM K, ISLAM M, et al. *Hafnia alvei*, a probable cause of diarrhea in humans[J]. *Infection and Immunity*, 1991, 59(4): 1507-1513.
- [41] ALBERT M J, FARUQUE S M, ANSARUZZAMAN M, et al. Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 1992, 37(5): 310-314. DOI:10.1099/00222615-37-5-310.