

利用16S rRNA分析传统四川发酵泡菜中的细菌多样性

田伟^{1,2}, 张琦^{1,2}, 邓珍珍^{1,2}, 刘森^{1,2}, 李明元^{1,2}, 车振明¹, 马力¹, 向文良^{1,2,*}

(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, 四川 成都 610039;

2.西华大学古法发酵(酿造)生物技术研究所, 四川 成都 610039)

摘要: 为了解传统四川发酵泡菜中的细菌多样性, 采用构建16S rRNA基因文库的方法, 对样品进行研究。结果表明: 通过16S rRNA基因序列分析, 得到129个克隆子均鉴定为乳酸菌, 分布于*Lactobacillus*和*Pediococcus*两个属, 所占比例分别为88.4%和10.1%。*L. pentosus*、*L. plantarum*和*P. damnosus*是其中的优势菌种分别占50.4%、16.3%和10.1%, *L. paralimentarius*、*L. sunkii*、*L. brevis*、*L. kisonensis*、*L. acetotolerans*、*L. namurensis*分别占7.8%、4.7%、3.1%、1.6%、0.8%和0.8%, 且*P. damnosus*、*L. paralimentarius*、*L. sunkii*、*L. kisonensis*和*L. acetotolerans*均在泡菜中发现。这些结果揭示四川泡菜中的微生物多样性, 反映其中的微生物群落结构, 展现很多未知的生物信息。

关键词: 四川泡菜; 细菌多样性; 16S rRNA基因; 克隆文库; 系统发育分析

Analysis of Bacterial Diversity in Chinese Traditional Fermented Sichuan Pickles Using 16S rRNA Genes

TIAN Wei^{1,2}, ZHANG Qi^{1,2}, DENG Zhen-zhen^{1,2}, LIU Sen^{1,2}, LI Ming-yuan^{1,2}, CHE Zhen-ming¹, MA Li¹, XIANG Wen-liang^{1,2,*}

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

Abstract: The bacterial diversity in Sichuan pickle samples was investigated by using the constructed 16S rRNA gene clone library. A total of 129 representative clones were recovered and all identified as lactic acid bacteria, which belonged to different species of the two genera *Lactobacillus* and *Pediococcus* with the proportion of 88.4% and 10.1%, respectively. The dominant species of bacteria in Sichuan pickles were *L. pentosus* (50.4%), *L. plantarum* (16.3%) and *P. damnosus* (10.1%) while other bacterial species were also observed such as *L. paralimentarius* (7.8%), *L. sunkii* (4.7%), *L. brevis* (3.1%), *L. kisonensis* (1.6%), *L. acetotolerans* (0.8%) and *L. namurensis* (0.8%). In addition, several species such as *P. damnosus*, *L. paralimentarius*, *L. sunkii*, *L. kisonensis* and *L. acetotolerans* were found in pickle for the first time. These results revealed the microbial diversity and the microbial community structure in Sichuan pickles, which contained quantities of undiscovered bioinformation.

Key words: Sichuan pickle; bacterial diversity; 16S rRNA gene; clone library; phylogenetic analysis

中图分类号: TS255.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)17-0215-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201317046

泡菜是一类以各种新鲜蔬菜为原料, 添加食盐、水和调味料, 利用蔬菜自身附着的微生物或添加人工培养的乳酸菌发酵剂, 自然发酵而成的特色风味食品。中国泡菜历史悠久, 文化深厚, 千百年来生生不息, 传承至今, 是国人引以为自豪的发酵蔬菜食品, 是源自中国本土的发酵生物技术产品^[1]。“世界泡菜看中国, 中国泡菜看四川”, 四川泡菜是我国泡菜的典型代表, 其制作历史最早可追溯到3000年前的商周时期, 有文字记载的泡

菜制作历史可以追溯到1500多年前《齐民要术》中“四川泡菜制作专述”。四川泡菜以酸鲜纯正、脆嫩芳香、回味悠久、解腻开胃而著称, 其不仅可以作为佐餐食用, 更是川菜制作必不可少的调味菜, 被誉为“川菜之骨”。

目前, 对传统泡菜中微生物的系统多样性研究, 多数是采用传统的分离、纯化、鉴定的方法。由于生态环境中可培养的微生物仅仅占到微生物总数的

收稿日期: 2012-06-21

基金项目: 成都市普通科技创新项目(11GGYB443NC-289); 成都市重点科技成果转化项目(11ZHSD037JH-253)

作者简介: 田伟(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物。E-mail: great_wei_cool@163.com

*通信作者: 向文良(1973—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为传统发酵食品微生物过程学。E-mail: biunicom@mail.edu.cn

0.1%~10%^[2], 因此, 传统的分离培养方法仅能获得较少种类的微生物纯培养不能真实全面地反映系统当中微生物的多样性。近年来, 随着微生物分子生态学技术的发展, 人们可以避开纯培养, 直接从分子水平上来研究环境样品中微生物区系组成和群落结构^[3]。付琳琳等^[4]应用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术对泡菜中的乳酸菌多样性进行了初步分析, 梁新乐等^[5]采用PCR-DGGE对传统泡菜中的微生物群落结构多样性进行了初步研究; 这些研究结果揭示了自制泡菜中微生物的多样性, 及关键功能菌乳酸菌的系统发育关系, 但是对四川泡菜中的整个菌系进行的系统多样性分析还未见报道。鉴于PCR相关技术在特殊微生态环境中微生物群落分析中已经有了广泛的应用, 本实验采用基于16S rRNA序列同源性分析的PCR克隆分析技术, 建立基因文库, 对泡菜中的微生物多样性进行探讨, 以期揭示泡菜发酵机理、风味因子的形成机制提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

泡菜液(发酵后期的窖池原液), 取自四川新繁食品有限公司。

Bacterial DNA Kit、Plasmid Mini Kit I 美国Omega公司; pGM-T克隆试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 菌体的富集

取泡菜液样品于30mL的无菌离心管中, 4℃、7000r/min离心5min, 弃上清, 沉淀加入25mL的PBS缓冲液, 在漩涡混匀器上振荡2min, 再4℃、7000r/min离心5min, 弃上清, 加少量ddH₂O洗涤, 将沉淀转移到2mL的无菌离心管中, 4℃、14000r/min离心10min, 弃上清液, 菌体-20℃保存^[6]。

1.3 宏基因组文库的提取

宏基因组DNA用Bacterial DNA Kit提取, 具体操作参照说明书。

1.4 构建16S rRNA基因文库

以提取的宏基因组DNA作为模板, 使用细菌通用引物Eu27F(5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1490R(5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')对细菌16S rRNA进行扩增。PCR反应体系(50μL)组成: 10×Buffer (Mg²⁺ free) 5μL, 引物Eu27F和1490R各1μL, dNTP(2.5mmol/L) 4μL, MgCl₂(25mmol/L) 3μL, Taq酶(2.5U/μL) 1μL, 模板DNA 2μL, 加去离子水补齐50μL。反应条件: 95℃预热5min, 95℃变性1min, 50℃退火1min, 72℃延伸2min, 反应35个周期, 然后72℃复延伸10min^[7]。产物用1.0%琼脂糖电泳检测, -20℃保存。

PCR产物经纯化后, 依据pGM-T克隆试剂盒(VT202-1)接入质粒载体pGM-T, 然后将重组质粒pGM-T转化入感受态大肠杆菌*E.coli* DH5α, 在含氨苄青霉素、X-gal和IPTG的LB平板培养基上37℃培养12~16h。挑选阳性菌落, 用Plasmid Mini Kit I提取重组质粒, *Eco*RI酶切检测, 质粒-20℃保存。

1.5 16S rRNA测序和系统发育分析

重组质粒送成都瑞信生物技术公司测序, 测得的16S rRNA序列先用软件Mallard 1.02进行嵌合体检验, 检验后无异常的序列再与GenBank数据库做相似性分析, 并通过Clustal X程序多重比对后用MEGA5.0软件中的Neighbor-Joining法进行1000次步长计算构建系统发育树^[8]。在测序基础上, 将部分代表序列登录到GenBank数据库, 获得序列号从JQ809281~JQ809316, 共35个。进而与数据库中的已知序列进行相似性比对分析, 对所获克隆子进行分子分类。

1.6 统计学分析

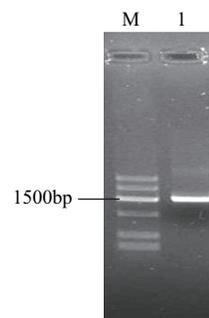
所有序列先用CLASSIFIER (RDP II, <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>)进行分类, 再用软件BioEdit进行两两比对, 相似性得分达到0.97或更高的聚为一个操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU), 得分低于0.97的则列为另一个OTU^[9]。依据上述OTU分类结果, 用软件Analytic Rarefaction 1.3计算稀释度, 以克隆子的数目为横坐标, OTU的数目为纵坐标绘制稀释度曲线; 用软件Estimates 8.2.0计算多样性指数, 用Chao1和ACE来评价文库的OTU丰富度, Shannon(*H*)和Simpson(*D*)来评价文库的OTU多样性^[10]。

$$\text{文库的覆盖率}/\% = \frac{2S_{\text{obs}}}{S_{\text{Chao1}} + S_{\text{ACE}}} \times 100$$

式中: S_{obs} 代表OTU的数目^[11]。

2 结果与分析

2.1 16S rRNA基因PCR产物



泳道M. Marker VII; 泳道1. PCR扩增产物。

图1 四川泡菜样品16S rRNA基因PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig.1 Agarose gel electrophoresis (1.0 %) of 16S rRNA gene PCR products from Sichuan Pickle sample

采用细菌通用引物Eu27F和1490R对宏基因组DNA进行扩增,电泳结果见图1,可以看出扩增片段的大小约为1500bp,符合细菌16S rRNA基因片段大小。

2.2 克隆子的分类

表1 16S rRNA基因文库中代表克隆子的系统发育分析

Table 1 Phylogenetic analysis of typical clones from the 16S rRNA gene library

| 已知菌株(登录号) | 代表克隆子(登录号) | 克隆数 | 相似性/% | 同类总克隆数 |
|--|-------------------|-----|-------|--------|
| <i>L. pentosus</i> NRIC 1837 (AB362758) | PC-B22 (JQ809307) | 44 | 99 | 65 |
| | PC-C33 (JQ809300) | 11 | 98 | |
| | PC-A62 (JQ809292) | 10 | 97 | |
| <i>L. plantarum</i> NRIC 1954 (AB362768) | PC-C26 (JQ809297) | 11 | 98 | 21 |
| | PC-A32 (JQ809304) | 10 | 97 | |
| | PC-C33 (JQ809300) | 10 | 97 | |
| <i>P. damnosus</i> DSM 20331 (AJ318414) | PC-C40 (JQ809284) | 9 | 98 | 13 |
| | PC-B2 (JQ809282) | 4 | 97 | |
| <i>L. paralimentarius</i> DSM 13238 (AJ417500) | PC-C10 (JQ809296) | 7 | 98 | 10 |
| | PC-C32 (JQ809299) | 3 | 97 | |
| | PC-B16 (JQ809293) | 3 | 99 | |
| <i>L. sunkii</i> DSM 19904 (AB366385) | PC-A27 (JQ809303) | 2 | 98 | 6 |
| | PC-B45 (JQ809309) | 1 | 97 | |
| | PC-C2 (JQ809310) | 3 | 98 | |
| <i>L. brevis</i> CGMCC1306 (HQ726794) | PC-A44 (JQ809289) | 1 | 97 | 4 |
| | PC-A36 (JQ809288) | 2 | 99 | |
| <i>L. kisonensis</i> DSM 19906 (AB366388) | PC-C55 (JQ809302) | 1 | 99 | 1 |
| <i>L. acetotolerans</i> JCM 3825 (AB303841) | PC-B50 (JQ809294) | 1 | 98 | 1 |
| <i>L. namurensis</i> LMG 23584T (AM259119) | PC-B24 (JQ809287) | 6 | <97 | 6 |
| Unclassified LAB | | | | |
| 合计 | | 129 | | 129 |

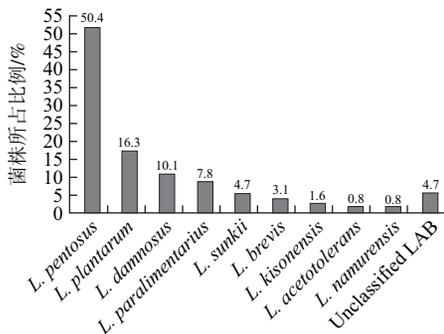


图2 四川泡菜中16S rRNA基因文库菌株分布

Fig.2 Distribution of strain based on the 16S rRNA library

实验中共得到129个阳性克隆子,并全部进行了测序,测得的16S rRNA序列经软件Mallard 1.02检测,并无异常序列发现。用CLASSIFIER (RDP II, <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>)进行分类,结果显示,所有的129个克隆子均属于硬壁菌门,乳杆菌科,其中114个克隆子(88.4%)属于*Lactobacillus*属,13个克隆子(10.1%)属于*Pediococcus*属,其余的2个克隆子(1.5%)由于其相似性较低,不能确定其种属关系。将全部序列通过GenBank数据库做同源性分析及相关信息检索,检索结果见表1和图2。Stackbrandt等^[12]认为当16S rRNA的序列同源性 $\geq 97\%$ 时可以认为是一个种。因此,129个克隆子中,65个(50.4%)经鉴定为*L. pentosus*; 21个(16.3%)为*L. plantarum*; 13个(10.1%)为*P. damnosus*; 10个(7.8%)为*L. paralimentarius*; 6个(4.7%)为*L. sunkii*; 4个(3.1%)

为*L. brevis*; 2个(1.6%)为*L. kisonensis*; 1个(<1%)为*L. acetotolerans*; 1个(<1%)为*L. namurensis*; 其余的6个(4.7%)为Unclassified LAB。

2.3 系统发育分析

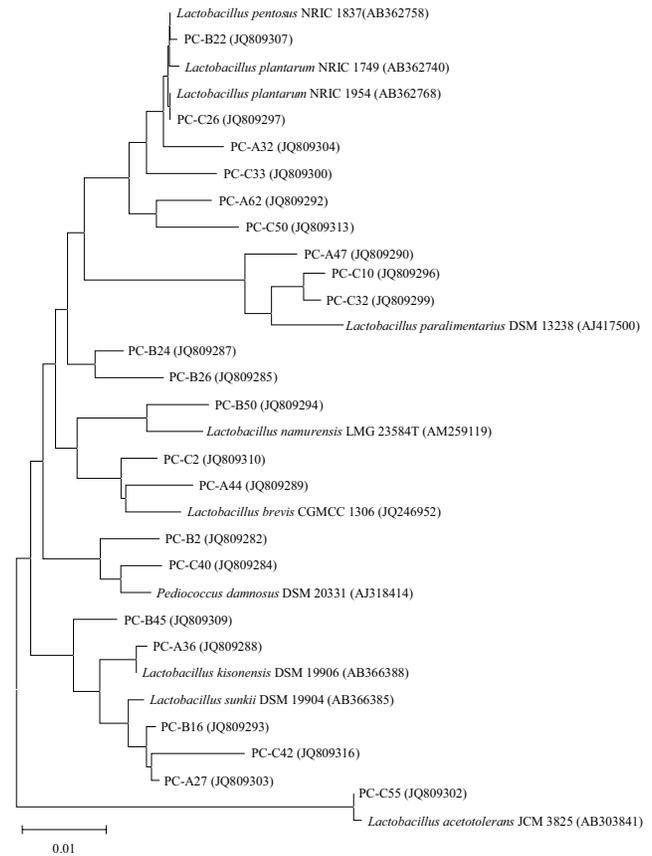


图3 基于16S rRNA基因序列构建的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on the complete 16S rRNA gene sequences

为了显示各菌株的分类学地位和系统发育关系,选取其中的代表菌株及其相似菌种,用MEGA5.0中的Neighbor-Joining法构建系统发育树,结果如图3所示,全部菌株在系统发育树中基本分成8个分支,PC-C40和PC-B2归类于*Pediococcus*属,分别与已知菌株*P. damnosus*有98%和97%的相似性。PC-B24和PC-B26归类于*Lactobacillaceae*科,但由于相似性较低,其具体分类地位有待进一步研究。其余菌株均属于*Lactobacillus*属,其中PC-B22、PC-C26、PC-A32、PC-C33、PC-A62和PC-C50与*L. pentosus*和*L. plantarum*聚为一个分支,PC-C50与*L. pentosus*的相似性为96%,其余相似性均达到97%~99%; PC-C10、PC-C32和PC-A47与*L. paralimentarius*聚为一个分支,相似度分别为98%,97%和96%; PC-B50和*L. namurensis*聚为一个分支,相似度为98%; PC-C2和PC-A44与*L. brevis*聚为一个分支,相似度分别为98%和97%; PC-B45、PC-A36、PC-B16、PC-C42和PC-A27与*L. kisonensis*和*L. sunkii*聚为一个分

支, PC-C42与*L. sunkii*的相似性为96%, 其余相似性均达到97%~99%; PC-C55和*L. acetotolerans*聚为一个分支, 相似度为99%。

2.4 基因文库评估

所得的129个克隆序列经分析, 划分为15个OTUs。经多样性分析, 16S rRNA基因文库的最大OTU丰度指数Chao1和ACE分别为47和29, OTU的多样性指数Shannon(*H*)和Simpson(*D*)分别为1.6868和0.6996, 稀释度分析表明(图4), 稀释度曲线上升幅度逐渐平缓, 表明文库逐渐趋近饱和。文库覆盖率为39.5%, 表明文库能覆盖样品中大部分的菌系, 能够真实地反映样品中细菌的多样性。

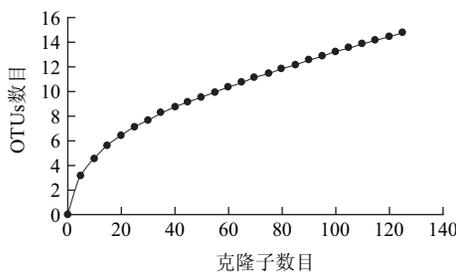


图4 16S rRNA基因文库稀释度曲线

Fig.4 Rarefaction curve generated for the 16S rRNA gene library

3 讨论

通过构建16S rRNA基因文库, 共挑选出129个克隆子, 经序列分析, 所有的克隆子均属于乳酸菌, 主要分布于*Lactobacillus*和*Pediococcus*两个属, 且*Lactobacillus*属占有绝对的数量优势。同时, 结果也表明, 在发酵成熟期的泡菜液中*L. pentosus*、*L. plantarum*和*P. damnosus*是其中的优势菌, *L. paralimentarius*、*L. sunkii*、*L. brevis*、*L. kisonensis*、*L. acetotolerans*、*L. namurensis*是其中的次优势菌。

根据以前的报道, 泡菜中的优势乳酸菌大多属于*Lactobacillus*、*Leuconostoc*和*Pediococcus*属, 其中的主要优势菌种为*L. plantarum*、*L. brevis*、*Leu. mesenteroides*和*P. pentosaceus*^[13-15]。在本研究中, 乳酸菌主要分布于*Lactobacillus*和*Pediococcus*两个属, *L. plantarum*是其中的优势菌, 这些都和以前的研究相符, 但同时, 也表现出了很多差异性。本研究中的优势菌还有*L. pentosus*和*P. damnosus*, *L. pentosus*所占比例为50.4%, 是其中最主要的乳酸菌, 尽管*L. pentosus*在以前的报道中曾出现过^[16], 但很少是作为主要优势菌; *P. damnosus*所占比例为10.1%, 目前还没有见泡菜中有这种菌的报道, Emilie等^[17]曾在葡萄酒和苹果酒中分离得到过这种能产生胞外多糖的菌。本研究中发现的*L. paralimentarius*、*L. sunkii*、*L. kisonensis*和*L. acetotolerans*在以前泡菜的报道中也未曾出现过, Koichi Watanabe等在日本的传统发酵泡菜“Sunki”中分离得到过*L. sunkii*和*L. kisonensis*^[18]; Cai Yimin等^[19]曾在酵母中分离得到*L. paralimentarius*, Entani等^[20]曾在

米醋中分离等到*L. acetotolerans*。在本研究中没有发现*Leuconostoc*属, 可能是由于*Leuconostoc*属的菌(如: *Leu. mesenteroides*)主要在发酵前期活动, 启动泡菜的乳酸发酵过程, 但随着发酵的进行, 逐渐消亡。而其他的差异可能是由于选取的实验材料和实验方法不同造成的, 分子方法能避开纯培养, 因此能探测到更多的菌系。

研究结果表明, 通过构建16S rRNA基因文库来研究四川泡菜中的微生物多样性, 不仅能够真实地反映其中微生物群落结构组成, 而且能提供很多传统纯培养方法所不能揭示的信息, 对于深入研究泡菜发酵机理、风味因子的形成机制以及指导泡菜的发酵生产具有重要的理论和实践意义。

参考文献:

- [1] 陈功, 夏有书, 张其圣, 等. 从中国泡菜看四川泡菜及泡菜坛[J]. 中国酿造, 2010(8): 5-8.
- [2] DAVID M W, ROLAND W, MARY M B. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community[J]. Nature, 1990, 345: 63-65.
- [3] 向文良, 罗海, 梁华忠, 等. 基于16S-23S rRNA ITS AFLP 对米酒发酵过程中原核微生物的演替分析[J]. 酿酒科技, 2010(2): 43-46.
- [4] 付琳琳, 曹郁生, 李海星, 等. 应用PCR-DGGE技术分析泡菜中乳酸菌的多样性[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(12): 13-15.
- [5] 梁新乐, 朱扬玲, 蒋予箭, 等. PCR-DGGE法研究泡菜中微生物群落结构的多样性[J]. 中国食品学报, 2008, 8(3): 133-137.
- [6] XIANG Wenliang, ZHANG Jie, LI Lin, et al. Screening a novel Na⁺/H⁺ antiporter gene from a metagenomic library of halophiles colonizing in the Dagong Ancient Brine Well in China[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 306(1): 22-29.
- [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] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [9] PEI Zhiheng, EDMUND J B, YANG Liying, et al. Bacterial biota in the human distal esophagus[J]. PNAS, 2004, 101(12): 4250-4255.
- [10] CHAO A, MA M C, YANG M C K. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates[J]. Biometrika, 1993, 80(1): 193-201.
- [11] HARTMANN M, WIDMER F. Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(12): 7804-7812.
- [12] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic note: a pIce for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(4): 846-849.
- [13] 鄯晋晓. 四川泡菜菌系分离、筛选及发酵剂的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [14] 王艳梅, 马丽珍. 泡菜汁中乳酸菌的分离与初步鉴定[J]. 天津农学院学报, 2007, 14(3): 5-8.
- [15] 盛海圆, 郭艳萍, 常艳, 等. 传统泡菜中乳酸菌多样性的分析[J]. 中国微生物学杂志, 2010, 22(7): 580-586.
- [16] 谈重芳, 王晶晶, 王雁萍, 等. 河南林州泡菜中微生物多样性及乳酸菌种群的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(7): 14-17.
- [17] EMILIE W, EMMANUEL G, ALINE L F. A putative glucan synthase gene dps detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 98(1): 53-62.
- [18] WATANABE K, FUJIMOTO J, TOMII Y, et al. *Lactobacillus kisonensis* sp. nov., *Lactobacillus otakiensis* sp. nov., *Lactobacillus rapi* sp. nov. and *Lactobacillus sunkii* sp. nov., heterofermentative species isolated from sunki, a traditional Japanese pickle[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(4): 754-760.
- [19] CAI Yimin, OKADA H, MORI H, et al. *Lactobacillus paralimentarius* sp. nov., isolated from sourdough[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(4): 1451-1455.
- [20] ENTANI E, MASAI H, SUZUKI K I. *Lactobacillus acetotolerans*, a new species from fermented vinegar broth[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1986, 36(4): 544-549.