

四川冬菜中细菌群落组成及多样性

董玲¹, 蒲彪^{1*}, 敖晓琳^{1,2}, 张小平², 郑有坤², 李小林²

¹四川农业大学食品学院, 雅安 625014

²四川农业大学资源环境学院, 成都 611130

摘要: 【目的】了解腌制 4 年的四川南充冬菜中细菌群落组成及多样性。【方法】通过 16S rDNA 多样性分析样品细菌落组成;采用 16S rDNA-RFLP 方法分析从样品中分离出的纯培养细菌。【结果】16S rDNA 多样性分析结果表明,样品中细菌主要属于变形杆菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes),分别占克隆文库的 87.9%、7.1%,其中包括 *Virgibacillus kekensis*, *Marinococcus albus*, *Salinicoccus* sp., *Lactobacillus halophilus* 和 *Halomonas* 等中度嗜盐菌,仅有 5% 属于放线菌门(Actinobacteria)。通过纯培养方法从冬菜中分离到 35 株细菌,16S rDNA-RFLP 分析结果表明,34 株属于厚壁菌门(Firmicutes),包括 *Virgibacillus*, *Bacillus megaterium* 和 *Gracilibacillus saliphilus* 等中度嗜盐菌,1 株属于放线菌门(Actinobacteria)。【结论】冬菜中细菌群落多样性较低,以中度嗜盐菌为主。

关键词: 冬菜,细菌多样性,中度嗜盐菌,16S rDNA

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2012)04-0519-07

冬菜有川冬菜、京冬菜、津冬菜和上海五香冬菜等之分,而四川冬菜是以叶用芥菜中的箭杆菜或乌叶菜的嫩尖为原料腌制而成的半干态腌制菜^[1]。四川冬菜以南充冬菜和资中冬尖最有名,其风味独特,食用方式多样,具有“菜味精”、“十里香”的美誉,深受广大消费者的欢迎。然而南充冬菜生产流程复杂,芥菜经晾晒、修剪、揉搓和拌料后,还需要 2 到 3 年的后熟时间^[2],相对于泡菜、榨菜等腌制菜,其存在着生产周期长、产量低、产品品质不稳定等特点。微生物对腌制菜的品质具有重要影响,目前对泡菜、酸菜中细菌群落多样性的报道较多,尚未见到川冬菜中细菌菌落多样性相关报道,因此研究川冬菜中细菌群落组成及其多样性具有重要意义。

Bae 等^[3]于 2005 年用 DNA 微阵列芯片法对韩国泡菜(Kimchi)中乳酸菌多样性进行了研究,指出魏斯氏菌、明串珠菌、乳酸杆菌在韩国泡菜发酵过程中起到关键作用;同年, Lee 等^[4]用 DGGE 技术分析韩国泡菜得出相同结论。燕平梅等^[5]于 2009 年对发酵白菜卤中乳酸菌的多样性进行了分析,免培养方法表明样品的乳酸菌多样性较培养方法丰富,2 种方法分析的结果显示植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)为发酵白菜体系中优势乳酸菌之一。本文利用 16S rRNA 基因克隆文库并结合 ARDRA 分析方法对四川南充腌制 4 年的冬菜中细菌菌群多样性进行了初步研究,同时采用 16S rDNA-RFLP 方法分析从样品中分离出的纯培养细菌,为开发利用菌

基金项目:国家自然科学基金(31171726);四川省科技厅科技支撑计划项目(2010NZ0045)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-835-2882875; E-mail: pubiao2002@yahoo.com.cn

作者简介:董玲(1986-),女,四川广安人,硕士研究生,主要从事泡菜微生物研究。E-mail: Sophia_dl@hotmail.com

收稿日期:2011-10-06;修回日期:2012-02-02

种资源,制作人工接种发酵剂提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料:取发酵坛中部腌制4年的四川南充烟山冬菜装于无菌袋中,带回实验室后立即进行分析,其余样品置于 -20°C 保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:PCR仪(BIO-RAD)、凝胶成像仪(BIO-RAD)、电泳仪(BIO-RAD)、PCR引物(英骏,上海)、凝胶回收试剂盒(生工,上海)、内切酶 *Msp* I、*Hae* III、*Bfa* I、*Alu* I (Fermentas)、pMD-19T Vector (TaKaRa)、细菌DNA提取试剂盒(TIANGEN)。

1.2 样品中微生物总DNA的提取

样品研磨后加入适量0.9%生理盐水, 37°C 150 r/min 振荡1 h,用灭菌纱布过滤,滤液于14000 \times g 离心5 min,获得菌体沉淀。DNA提取方法参见文献[6]。

1.3 PCR扩增细菌的16S rRNA基因

采用细菌通用引物(27F:5'-AGAGTTGATCM TGGCTCAG-3'; 1492R:5'-GGYTACCTTGTTACGAC TT-3')进行PCR扩增。50 μL PCR反应体系:10 \times Buffer 4 μL , MgCl_2 (2.5 mM) 4 μL , dNTP (2.5 mM) 4 μL , BSA (2.5 mg/mL) 1 μL , *Taq* DNA Polymerase (2.5 U/ μL) 1 μL ,正反向引物(10 pm/ μL)各1 μL ,DNA模板10倍稀释液1 μL ,加无菌 ddH₂O 补足50 μL 。PCR扩增条件: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min,30个循环; 72°C 7 min。PCR产物用经EB染色的1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 细菌16S rRNA基因克隆文库的构建

PCR产物经割胶纯化后与载体pMD-19T vector进行连接,连接产物导入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,进行蓝白斑筛选。用引物M13-47和M13-48对阳性克隆子进行PCR检测。20 μL PCR反应体系:10 \times Buffer 2 μL , MgCl_2 (2.5 mM) 2 μL , dNTP (2.5 mM) 2 μL , BSA (2.5 mg/mL) 1 μL , *Taq* DNA Polymerase (2.5 U/ μL) 0.5 μL ,正反向引物(10 pm/ μL)各0.2 μL ,菌体1 μL ,加无菌 ddH₂O 补足30 μL 。PCR扩增条件同1.3节。

1.5 阳性克隆子的ARDRA分型

取5 μL 菌落PCR产物分别用5 U限制性内切

酶 *Msp* I、*Hae* III 进行酶切,酶切产物经3%琼脂糖凝胶电泳,具有相同酶切谱型为同一个操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)。每一个OTU选择1-3个克隆子送上海生物工程技术有限公司进行测序。

1.6 四川南充烟山冬菜中细菌分离和鉴定

样品充分研磨后加入90 mL 0.9%生理盐水, 37°C 150 r/min 振荡1 h,用纱布过滤,滤液分别涂布于HM培养基^[7]、含有6% NaCl的营养琼脂培养基^[8]中,倒置放在 28°C 恒温培养箱培养3-5天,选取具有不同菌落形态的单菌落进行进一步纯化。

细菌基因组DNA提取试剂盒用于细菌DNA的提取。细菌16S rRNA基因扩增同1.3。PCR产物经EB染色的1%琼脂糖凝胶电泳检测后分别用 *Msp* I、*Alu* I 和 *Bfa* I 酶切,酶切产物用3%琼脂糖电泳检测获得电泳图谱。用NTSYSpc2.1软件对酶切图谱进行聚类分析,根据聚类结果选择PCR产物送上海生物工程技术有限公司进行测序。

1.7 克隆文库分析

采用Coverage C评估所构建的文库对环境微生物多样性的体现程度($C = 1 - nl / N$, nl 为仅有1个克隆的ARDRA带型, N 为总克隆数)。利用EstimateS 8.0软件(<http://viceroy.eeb.ucsb.edu/estimateS>)进行稀有度曲线的绘制。

1.8 序列及系统进化分析

用Mallard软件(www.cardiff.ac.uk/bioscience/research/biosoft/)进行序列的异常检测。相似性大于97%的序列选择1条代表序列,在GenBank中进行BLAST同源检索,大于或者等于97%的视为同种^[9]。采用Mega4.0软件包中Kimura2-Parameter Distance模型进行多序列匹配,用邻接法构建系统发育树,自展值(bootstrap)为1000。NCBI数据库中获得序列号为:JN129280-JN129290, JN684187-JN684206。

2 结果和分析

2.1 ARDRA法分析冬菜中细菌多样性

随机挑取148个克隆子进行鉴定,获得阳性克隆子140个。阳性克隆的16S rRNA基因PCR产物经 *Msp* I、*Hae* III 酶切,共得到36个OTUs。文库覆盖率为86.4%,从稀有度曲线(图1)看,OTU数随

着克隆子数的增加而增加,增幅不大,表明文库涵盖了本样品中的大部分细菌类群。

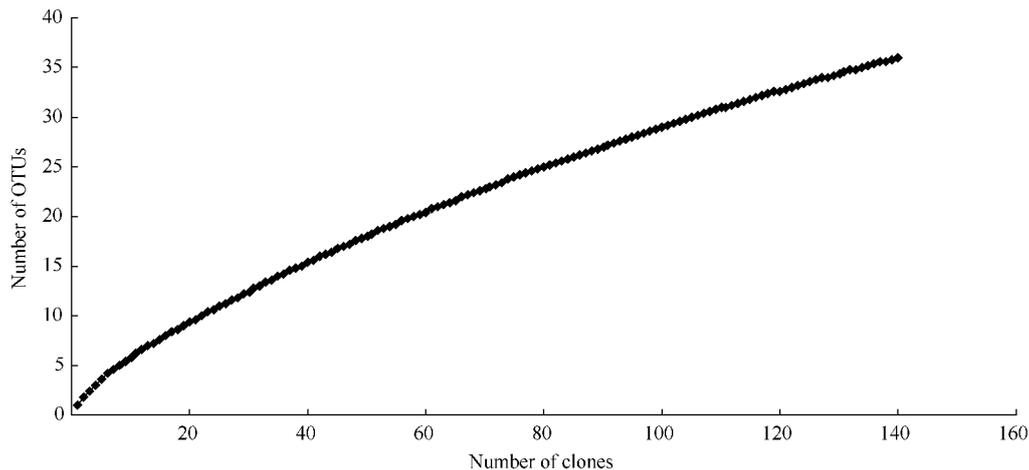


图1 冬菜细菌克隆文库稀有度曲线

Fig.1 Rarefaction curve for Dongcai bacteria 16S rDNA clone library. Clones were grouped into phylotypes based on sequence similarity of $\geq 95\%$.

去掉5条异常序列,将相似性大于97%的序列重新划分为1个OTU,共得到12个OTUs。代表序列经BLAST序列比对选取相似序列进行系统进化分析,见图2。系统进化分析结果表明克隆子分别属于3个门:变形杆菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria)。其中变形杆菌门(Proteobacteria)细菌类群为优势菌,占细菌克隆文库的87.9%,其次厚壁菌门(Firmicutes)7.1%,最少的为放线菌门(Actinobacteria)。

变形杆菌门包括24个OTUs,全部属于 γ -变形杆菌纲(γ -Proteobacteria),其中21个OTUs与免培养假单胞杆菌相似,占整个克隆文库的85.7%,克隆子H2、H117所代表的序列与Uncultured bacterium (AY958838、HM007536)相似性大于99%,H123所代表的OTU与最相似菌Uncultured bacterium (DQ279339)序列相似性仅为92%;1个OTU与Pseudomonas属相似,代表克隆子H1与海水中分离的纯培养Pseudomonas sp. LS227 (FJ937929)有95%的相似性;1个OTU与Halomonas属相似,代表克隆子H34与韩国发酵海产品中分离的Halomonas sp. JS46 (FJ796247)有98%的相似性;1个OTU与Psychrobacter属相似,代表克隆子H143与Psychrobacter sp. GMX7 (AM422129)有96%的相似性。厚壁菌门包括5个OTUs,2个OTUs属于Lactobacillus,代表克隆

H22与Lactobacillus rennini (AJ576007), Lactobacillus halophilus (AB240455)相似性均是99%;3个OTUs属于芽孢杆菌目(Bacillales),代表克隆H36与分离自盐渍土样的Salinicoccus sp. H3B24 (GU212632)相似性为97%,H51与Marinococcus albus (DQ093355)相似性为98%,H124与分离自盐碱土的Virgibacillus sp. YIM C834 (EU135676)相似性为96%。1个OTU未确定其分类地位,代表克隆H83与免培养克隆序列Uncultured Firmicutes bacterium (HQ727567)具有95%的相似性。放线菌门仅有1个OTU,其代表克隆H148与Arthrobacter agilis (NR_026198)有99%的相似性。

2.2 冬菜中细菌分离和鉴定

根据菌落形态特征的不同,用HM培养基分离了14株,营养琼脂培养基分离了21株细菌。通过限制性内切酶Msp I、Bfa I和Alu I对分离菌株的16S rRNA基因PCR产物进行酶切分型,Msp I和Bfa I分别具有9种基因型,Alu I酶切具有13种基因型,综合3种酶切结果共有17种基因型。用NTSYSpc2.1软件对酶切结果进行聚类分析,在90%相似度水平上菌株被分成10个类群,每个类群分别选取1株菌进行16S rRNA基因测序。

将所测16S rRNA基因序列提交到NCBI进行比对,从基因库中选择同源性最高的相似菌株构建

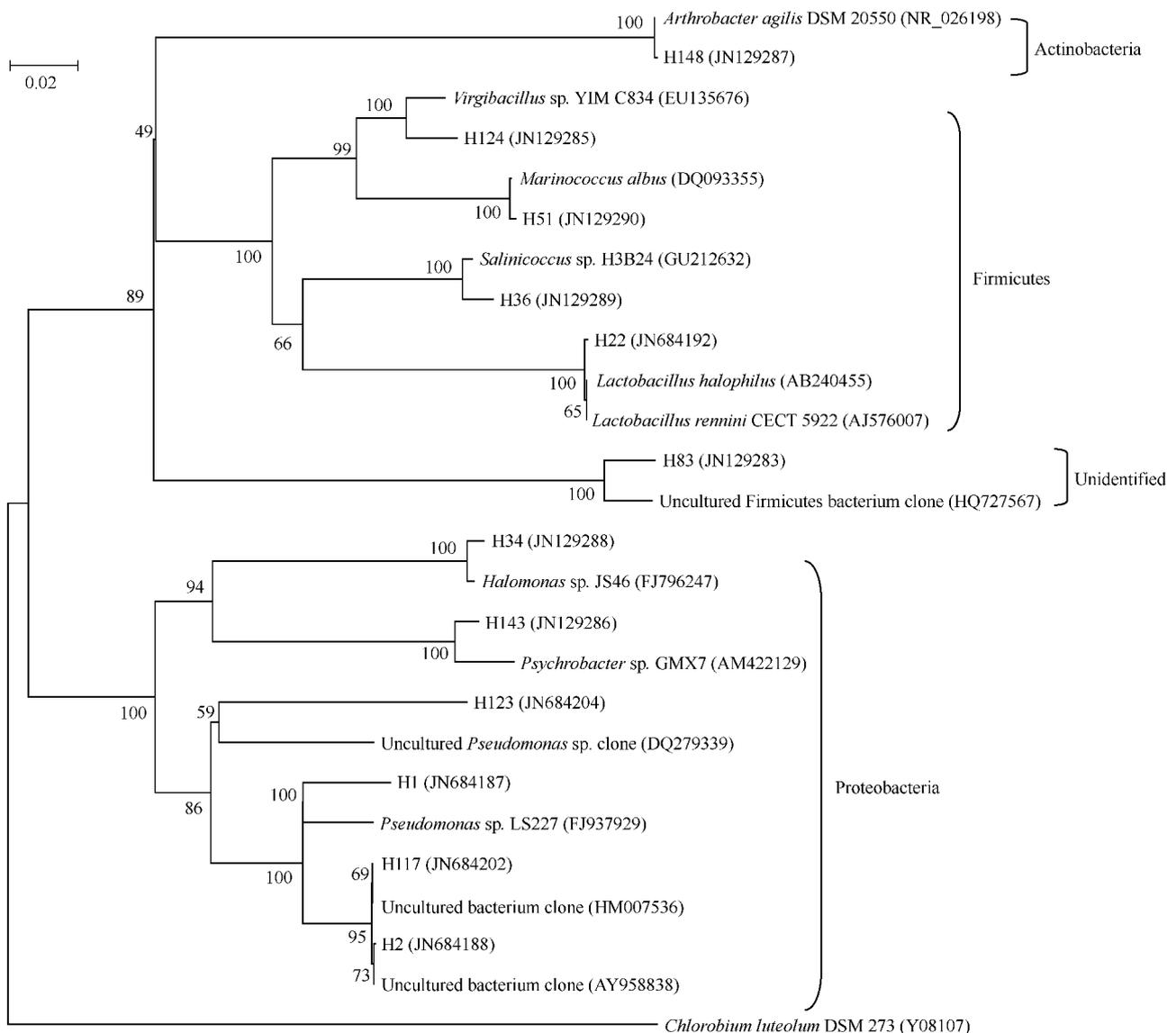


图 2 邻接法构建 16S rRNA 基因克隆文库系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene clone library of Dongcai sample. GenBank accession numbers are shown in parentheses. The tree was constructed by the Kimura2-Parameter Distance and neighbor-joining algorithms. Bootstrap values for a total of 1000 replicates are indicated above the nodes. The scale bar indicates 2% sequence divergence. The sequence of *Chlorobium luteolum* DSM 273^T (Y08107) was used as outgroup.

系统进化树(图 3),除 SC-Dong7 属于放线菌门(Actinobacteria)(占总分离菌株 2.9%)外,其余 9 株均属于厚壁菌门(Firmicutes) 4 株为 *Virgibacillus* 属(占总分离菌株 72.2%) 4 株为 *Bacillus* 属(占总分离菌株 14.3%),1 株为 *Gracilibacillus saliphilus* (占总分离菌株 11.4%)。除 SC-Dong1 与 *Virgibacillus zhanjiangensis* (FJ425904) 相似性为 96% SC-Dong4 与 *Virgibacillus pantothenicus* 相似性为 95% 其余菌株序列均与参比序列有 99% 的相似

性。

3 讨论

通过免培养法研究南充冬菜中的细菌组成,结果表明样品中细菌组成包括 *Virgibacillus kekensis*, *Marinococcus albus*, *Salinicoccus* sp., *Lactobacillus halophilus* 和 *Halomonas*。而纯培养法获得的细菌纯培养物以厚壁菌门(Firmicutes)中的 *Virgibacillus*,

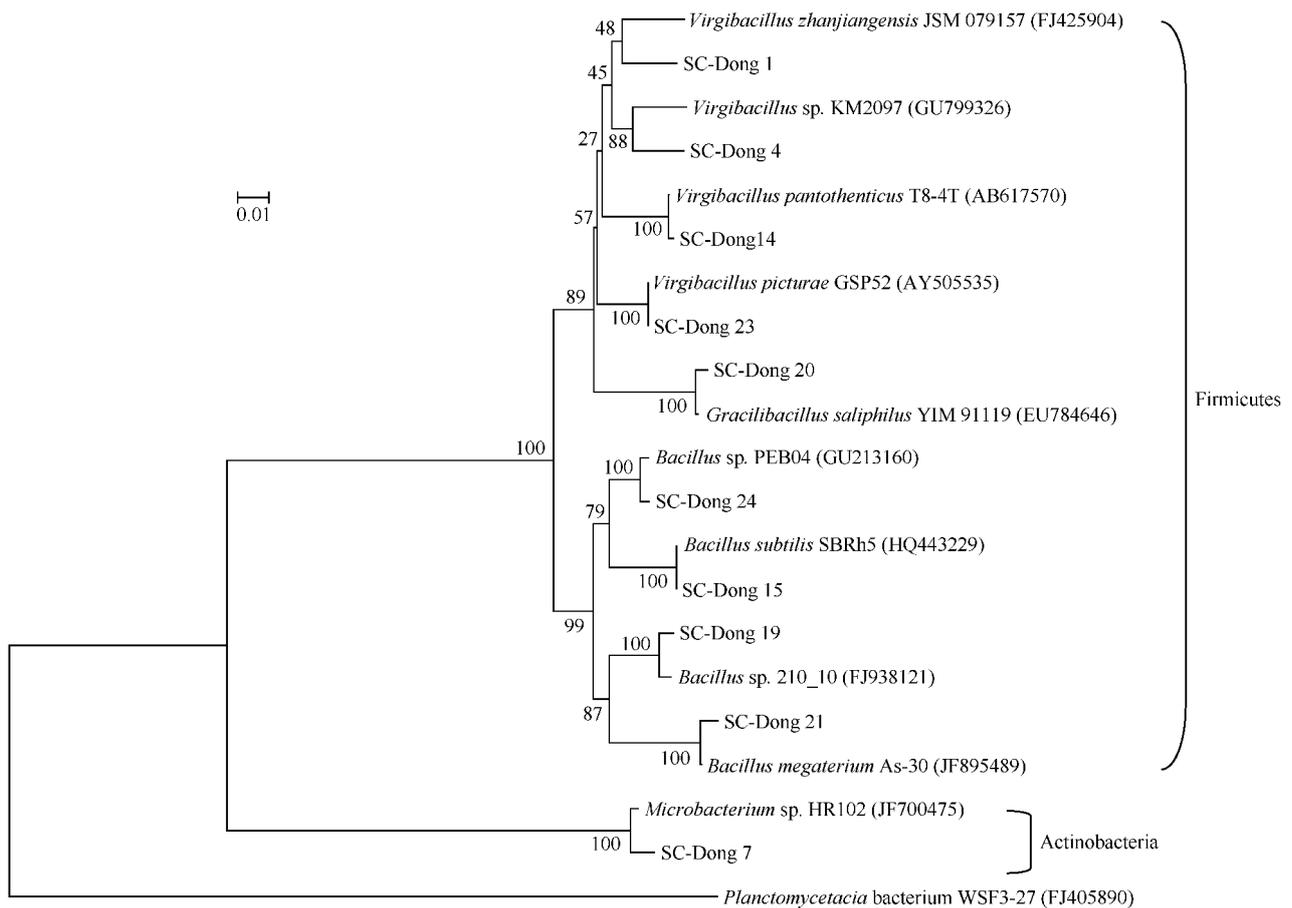


图3 邻接法构建分离菌株 16S rRNA 基因系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences derived from cultures isolated from Dongcai sample. GenBank accession numbers are shown in parentheses. The tree was constructed by the Kimura2-Parameter Distance and neighbor-joining algorithms. Bootstrap values for a total of 1000 replicates are indicated above the nodes. The scale bar indicates 1% sequence divergence. The sequence of *Planctomycetacia* bacterium WSF3-27^T (FJ405890) was used as outgroup.

Bacillus megaterium 和 *Gracilibacillus saliphilus* 为主。根据 1978 年 Kushner^[10] 的定义中度嗜盐菌为:在 3% - 15% NaCl 浓度间有最佳生长的细菌。这类细菌分布在很多属中,主要生活在海洋、盐湖、盐场及腌制品等高盐环境中。*Marinococcus*, *Salinicoccus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Halomonas* 和 *Gracilibacillus* 属中均只含有中度嗜盐菌^[11], *Bacillus* 和 *Pseudomonas* 属中的部分种也是中度嗜盐菌。纯培养和免培养方法均表明样品中存在大量中度嗜盐菌。冬菜的含盐量较高,大约为 10% - 13% 左右,在这种高盐环境下很多微生物不能生长,但是非常适合中度嗜盐菌的生长,这是长时间发酵冬菜中大量中度嗜盐菌存在的主要原因。

纯培养法和免培养法各有优缺点,只有纯培养法和免培养法相结合才能更好地反映样品中细菌群

落结构。本研究中纯培养法和免培养法均检测出枝芽孢杆菌 (*Virgibacillus*) 和放线菌。免培养法检测出四川冬菜中的优势菌为 *Pseudomonas*, 其次为 *Lactobacillus*, 但通过纯培养法没有分离到该类细菌。一方面免培养法检测出的大部分变形杆菌门类细菌属于不可培养细菌,通过免培养技术可以检测到,但是却无法分离到纯培养物,另外一方面可能是由于 HM 培养基、含有 6% NaCl 的营养琼脂培养基和培养条件不适合样品中的 *Pseudomonas* 和 *Lactobacillus* 生长。由于培养基和培养条件对微生物具有选择性和富集培养作用,培养法从样品中分离出 *Gracilibacillus saliphilus* 和 *Bacillus sp.*, 而克隆文库并未检测出该菌。

克隆序列除与免培养菌及放线菌的 16S rRNA 基因序列相似性大于 99% 外,其中与纯培养菌的相

似性在 95% - 98% 之间,这些菌株是否为新种需通过分离培养得到该纯培养物才能进行进一步鉴定。SC-Dong1 与 *Virgibacillus zhanjiangensis* 相似性为 96% ,SC-Dong4 与 *Virgibacillus pantothenicus* 相似性为 95% ,其可能为 *Virgibacillus* 属的 2 个新种。SC-Dong1 和 SC-Dong4 要鉴定到种尚需进一步的多相分类研究。

Wiander 和 Ryhänen^[12] 发现 *Leuconostoc mesenteroides* 和 *Lactobacillus Plantarum* 混合发酵卷心菜口感比自然发酵更好。Chang 等^[13] 研究表明, *Leuconostoc citreum* GJ7 作为发酵剂在改善韩国泡菜 (Kimchi) 的风味、口感,延长货架期方面具有显著作用。因此对四川冬菜中的细菌群落结构进行分析,可以为开发利用菌种资源和制作人工接种发酵剂提供参考。中度嗜盐菌广泛应用于高盐食品(发酵鱼、发酵肉、豆酱、腌制菜)生产中,促进食品风味物质的形成^[14]。 *Halobacterium salinarum* ,*Halococcus* sp. ,*Bacillus* sp. 和 *Pseudomonads* 等中度嗜盐菌被用于鱼露的生产^[15]。中度嗜盐菌 *Teragenoccus halophila* 在豆酱发酵中是优势菌^[16] ,在发酵过程中产生醋酸并抑制有害酵母菌的生长^[17]。据报道有些中度嗜盐菌还可产生丰富的胞外蛋白酶^[18]、色素、多不饱和脂肪酸、胡萝卜素^[19] 等。Essghaier 等^[20] 报道果蔬贮藏过程中,中度嗜盐菌对引起灰霉病的霉菌具有有效抑制作用。因此优化培养条件,进一步对冬菜中的微生物进行分离鉴定,对开发利用其中的微生物资源具有重要意义。

参考文献

- [1] 叶兴乾. 果品蔬菜加工工艺学. 北京: 中国农业出版社 2009.
- [2] 罗云波,蔡同. 园艺产品贮藏加工学·加工篇. 北京: 中国农业大学出版社 2001.
- [3] Bae JW ,Rhee SK ,Park JR ,Chung WH ,Nam YD ,Lee I , Kim H , Park YH. Development and evaluation of genome-probing microarrays for monitoring lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 2005 , 71(12) : 8825-8835.
- [4] Lee JS ,Heo GY ,Jun WL ,Oh YJ ,Park JA ,Park YH , Pyun YR ,Ahn JS. Analysis of Kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 2005 ,102(2) : 143-150.
- [5] 燕平梅,柴政,薛文通等. 培养和非培养法分析发酵白菜卤乳酸菌的多样性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* 2009 49(3) : 383-388.
- [6] Tsai YL ,Olson BH. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* ,1991 57(4) : 1070-1074.
- [7] Ventosa A , Quesada E , Rodriguez-Valera F , Ruiz-Berraquero F , Ramos-Cormenzana A. Numerical taxonomy of moderately halophilic gram-negative rods. *Journal of General Microbiology* ,1982 ,128(9) : 1959-1968.
- [8] Guan L ,Lee JH. Analysis of the cultivable bacterial community in jeotgal ,a Korean salted and fermented seafood and identification of its dominant bacteria. *Food Microbiology* 2010 28(1) : 101-113.
- [9] Vancanneyt M ,Neysens P ,De Wachter M ,Engelbeen K , Snauwaert C ,Cleenwerck I ,Van der Meulen R ,Hoste B , Tsakalidou E , De Vuyst L , Swings J. *Lactobacillus acidifarinae* sp. nov. and *Lactobacillus zymae* sp. nov. , from wheat sourdoughs. *International Journal System Environmental Microbiology* 2005 55(2) : 615-621.
- [10] Kushner DJ. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria // Kushner DJ. *Microbial Life in Extreme Environments*. London: Academic Press ,1978: 317-368.
- [11] 任培根,周培瑾. 中度嗜盐菌的研究进展. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* 2003 43(3) : 427-431.
- [12] Wiander B ,Ryhänen EL. Laboratory and large-scale fermentation of white cabbage into sauerkraut and sauerkraut juice by using starters in combination with mineral salt with a low NaCl content. *European Food Research and Technology* 2005 220(2) : 191-195.
- [13] Chang JY ,Chang HC. Improvements in the quality and shelf life of kimchi by fermentation with the induced bacteriocin-producing strain *Leuconostoc citreum* GJ7 as a starter. *Journal of Food Science* 2010 75(2) : 103-110.
- [14] Kivistö AT ,Karp MT. Halophilic anaerobic fermentative bacteria. *Journal of Biotechnology* 2011 ,152(4) : 114-124.
- [15] Thongthai C ,Suntinanalert P. Halophiles in Thai fish sauce (nam pla) // Rodriguez-Valera F. *General and applied aspects of halophilic microorganisms*. New York : Plenum Press ,1991 : 381-338.
- [16] Röling WFM ,Van Verseveld HW. Characterization of *Teragenoccus halophila* population in Indonesian soy mash (kecap) fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* ,1996 62(4) : 1203-1207.

- [17] Röling WFM, Prasetyo AB, Stouthamer AH, Van Verseveld HW. Physiological aspects of the growth of lactic acid bacterium *Teragenoccus halophila* during Indonesian soy mash (kecap) production. *Journal of Applied Microbiology* ,1999 86: 348-352.
- [18] Sinsuwan S, Rodtong S, Yongsawadigul J. NaCl-activated extracellular proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from Fish sauce fermentation. *Journal of Food Science* 2007 72(5): 264-269.
- [19] Asker D, Ohta Y. Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering* ,1999 88: 617-621.
- [20] Essghaier B, Fardeau ML, Cayol JL, Hajlaoui MR, Boudabous A, Jijakli H, Sadfi-Zouaoui N. Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 2009 106(3): 833-846.

Bacterial biodiversity in Dongcai , a traditional pickled mustard product in Sichuan Province , China

Ling Dong¹ , Biao Pu^{1*} , Xiaolin Ao^{1,2} , Xiaoping Zhang² , Youkun Zheng² , Xiaolin Li²

¹College of Food Science , Sichuan Agricultural University , Ya'an 625014 , China

²College of Resource and Environment , Sichuan Agricultural University , Chengdu 611130 , China

Abstract: [Objective] To investigate the bacteria community and biodiversity of four-years pickled Yanshan Dongcai. [Methods] We studied the bacterial communities of Dongcai by 16S rDNA diversity analysis and the cultured species isolated from Dongcai sample by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and 16S rRNA gene sequence analysis. [Results] The 16S rDNA diversity showed that the bacteria belonged to the phyla Proteobacteria (87.9%) and Firmicutes (7.1%) , including many moderately halophilic bacteria such as *Virgibacillus kekensis* , *Marinococcus albus* , *Salinicoccus* sp. , *Lactobacillus halophilus* and *Halomonas*. Only 5% of clone sequences belonged to the phylum Actinobacteria. Thirty-five strains were isolated from Dongcai sample , and 16S rDNA-RFLP analysis indicated that 34 isolates affiliated with the phylum Firmicutes , including *Virgibacillus* , *Bacillus megaterium* and *Gracilibacillus saliphilus* which were moderately halophilic bacteria , but only one isolate belonged to the phylum Actinobacteria. [Conclusion] The bacterial diversity is low in Dongcai , dominated by moderately halophilic bacteria.

Keywords: pickled mustard , bacterial communities , moderately halophilic bacteria , 16S rDNA

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31171726) and by the Program of Science and Technology Department of Sichuan Province (2010NZ0045)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-835-2882875; E-mail: pubiao2002@yahoo.com.cn

Received: 6 October 2011/ Revised: 2 February 2012