

贵州腌鱼中微生物群落的多样性研究

邹妍¹, 陈中爱², 董楠², 雷尊国², 刘嘉^{2,*}

(1. 贵州轻工职业技术学院, 贵州贵阳 550025;

2. 贵州省农业科学院食品加工研究所, 贵州贵阳 550025)

摘要:采用高通量测序技术对发酵腌鱼进行微生物群落多样性分析(采样于贵州省黔东南州6个县)。结果表明,腌鱼的微生物群落呈复杂多样性,不同样品间丰度存在较大差异性,且取样至不同地方的腌鱼乳酸含量、蛋白质含量和脂肪含量等指标呈明显差异,其中剑河县的腌鱼pH最高,天柱县的腌鱼乳酸含量最高,为剑河县的28倍。通过对腌鱼的微生物群落结构分析发现,门水平上,腌鱼的优势细菌和真菌分别为厚壁菌门(Firmicutes)和子囊菌门(Ascomycota)。属水平上,剑河县、榕江县、天柱县、从江县腌鱼的优势细菌为乳酸菌(*Lactobacillus*),锦屏县和黎平县腌鱼的优势细菌为四联球菌(*Tetragenococcus*),剑河县、锦屏县、黎平县、榕江县、从江县腌鱼的优势真菌为接合酵母(*Zygosaccharomyces*),天柱县腌鱼的优势真菌为酿酒酵母(*Kazachstania*)。由群落Heatmap可知,剑河县、锦屏县、黎平县、榕江县腌鱼的细菌及真菌的优势菌属组成最为相似。基于典范分析方法(Canonical Correspondence Analysis, CCA)分析表明,细菌及真菌属水平上,对微生物群落影响最大的环境因子为乳酸。本研究可为贵州传统发酵腌鱼产业化发展提供了理论依据。

关键词:腌鱼, 发酵, 高通量测序, 微生物多样性

Analysis of Microbial Community Diversity in Guizhou Suan Yu

ZOU Yan¹, CHEN Zhongai², DONG Nan², LEI Zunguo², LIU Jia^{2,*}

(1. Guizhou Light Industry Technical College, Guiyang 550025, China;

2. Institute of Food Processing Technology, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550025, China)

Abstract: High-throughput sequencing was used to study the microbial diversity of suan yu which were sample from six locations of southeastern Guizhou. The results showed that the microbial community of suan yu were complex and quite different among samples. The content indexes showed significant difference also in the lactic acid, protein and fat. The pH of suan yu from Jianhe was highest, the content of lactic of Tianzhu suan yu was dozens of times as much as others. Analysis of microbial community structure of suan yu showed that, the predominant bacteria and fungi of suan yu in six counties were Firmicutes and Ascomycota at the phylum level. At the genus level, *Lactobacillus* was the predominant bacteria of suan yu for Jianhe county, Rongjiang county, Tianzhu county, Congjiang county and *Tetragenococcus* was the predominant bacteria of suan yu for Jinping county and Liping county. At the genus level, the predominant fungi of suan yu in Jianhe county, Jinping county, Liping county, Rongjiang county, Congjiang county was *Zygosaccharomyces* and the predominant fungi in Tianzhu county was *Kazachstania*. The Heatmap of microbial community revealed that the dominant bacteria and fungi of suan yu in Jianhe, Jinping, Liping and Rongjiang were most similar in composition. Canonical correspondence analysis indicated that lactic acid might be the most important factor influencing the dominant bacterial and fungal community. The results of this study have provided a theoretical basis for the industrialization of traditional fermented fish in Guizhou.

Key words: suan yu; fermentation; high-throughput sequencing; microbial community diversity

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)05-0119-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020040117

引文格式: 邹妍, 陈中爱, 董楠, 等. 贵州腌鱼中微生物群落的多样性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(5): 119-125.

ZOU Yan, CHEN Zhongai, DONG Nan, et al. Analysis of Microbial Community Diversity in Guizhou Suan Yu [J].

Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(5): 119-125. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

收稿日期: 2020-04-12

作者简介: 邹妍(1989-), 女, 硕士研究生, 讲师, 研究方向: 食品加工, E-mail: 542377577@qq.com。

* 通信作者: 刘嘉(1985-), 男, 博士研究生, 副研究员, 研究方向: 食品加工, E-mail: mcgrady456@163.com。

基金项目: 现代食品加工及粮食收储运技术与装备(2018YFD0400105); 贵州省薯类产业技术创新人才基地([2016]22)。

贵州黔东南是一个少数民族聚集的地区,人们为了延长食物的贮藏期通常采用自然发酵的方式来加工鱼肉及猪肉制品,因此在长期的生产和生活实践中,形成了具有鲜明个性的“腌食文化”。苗族腌鱼是选择鲜鲤鱼整条或切块,加入一定量的盐腌制2~3 d,待鱼肉中的水分渗出,再加入熟糯米、花椒、五香粉、甜酒、生姜和大蒜等辅料,坛子外沿用水来隔绝空气,放置于阴凉避光处自然发酵而成。成品可带骨食用且风味独特^[1]。由于腌鱼依赖自然发酵,所以不同地域的产品在风味及口感等食物特性上依然存在差异,这与微生物种类组成有关。报道中,明确微生物的种类对发酵类食品的安全、风味、色泽、质构起着重要的作用。如乳酸菌在发酵过程中可加速乳酸和乙酸的形成,对发酵产品的安全及风味形成有很大贡献^[2]。葡萄球菌和酵母菌具有很强的脂肪和蛋白分解能力,对香味和滋味的形成具有重要作用^[3]。然而,有害微生物的代谢可能产生潜在的有害物质,如片球菌、克雷伯氏菌、链球菌等易形成具有致癌作用的生物胺^[4]。因此,了解发酵食品中微生物群落结构对提升发酵产品质量尤为关键。

近年来,随着分子生物学技术的发展,高通量测序方法正成为检测发酵制品微生物群落结构不可或缺的工具。基于16S rDNA基因指纹图谱的技术,如变性梯度凝胶电泳 DGGE 和温度梯度凝胶电泳 TGGE 等已广泛用于微生物群落结构的研究中,而宏基因组测序技术作为目前分析复杂样品体系微生物多样性的最好方法^[5],已在分析发酵食品,如拉丁奶酪^[6]、四川泡菜水^[7]和南疆酸奶^[8]等微生物多样性方面得到应用。目前,国内外对腌鱼制品的研究主要集中在对发酵菌微生物多样性的阐释^[9]、不同发酵剂对风味物质的影响^[10]、物理化学特性变化^[11]及发酵过程中生物胺的变化^[12]等方面,对于地域差异对腌鱼中微生物的多样性研究还未见报道。本研究将采集在贵州省黔东南州的6个县域(喜食腌鱼)农户家中自制腌鱼为样品,采用 Illumina MiSeq 高通量测序平台对细菌的16S rDNA $V_3 \sim V_4$ 区和真菌 ITS1 区进行测序,旨在了解贵州黔东南地区腌鱼的微生物群落多样性,明确各地方腌鱼的优势菌群,为腌鱼的生产与质量控制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鲤鱼 来自贵州省黔东南州6个县域农户家中自制腌鱼;DNA 抽提试剂盒(FastDNA® Spin Kit for Soil) 美国 MP Biomedicals 公司;琼脂糖(biowest agArose) 西班牙 Biowest 公司;FastPfu Polymerase 中国 TransGen 公司;AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences) 美国 Axgen 公司;测序试剂盒(MiSeq Reagent Kit v3) 美国 Illumina 公司。

STARTER 3100 pH 计 美国奥豪斯仪器(上海)有限公司;5424 R 型高速台式冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司;BioTek EL × 800 型酶标仪 美国 Biotek 公司;Quantus™ Fluorometer 微型荧光计 美国

Promega 公司;DYY-6C 型电泳仪 北京市六一仪器厂;QL-901 型旋涡混合器 中国海门其林贝尔仪器制造有限公司;ABI GeneAmp® PCR 仪 美国 ABI 公司;Illumina Miseq 测序仪 美国 Illumina 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 腌鱼制作 不同地区采用相同的腌鱼制作流程:a.预处理:鲜活的鲤鱼(统一购买)敲头宰杀,去内脏,从背部剖开,用清水清洗残余的内脏和淤血,沥干;b.腌制:将鱼整条腌制,加入鱼身重量8%~12%的食盐,鱼腹部及表皮均抹上食盐,腌制24~48 h;c.去水:将腌鱼的容器倾斜放置,以除去渗透出的水分;d.拌料:将鱼身和炒制好的大米,花椒、小茴香、大蒜、辣椒粉等调味料(统一购买)充分混匀,并在鱼肚、鱼鳃、表皮敷上部分调料,置于发酵坛中,加盖,水封坛沿;e.发酵:在避光环境中发酵50~60 d。于2018年8月13~18号装坛,并于2018年10月8~14号采样。每个采样区域收集3份腌鱼样品,分别装入无菌密封袋冷藏运输回实验室。剑河县腌鱼标记为A,锦屏县标记为B,黎平县标记为C,榕江县标记为D,天柱县标记为E,从江县标记为F。

1.2.2 理化指标的测定方法 水分含量测定:采用 GB 5009.3-2010《食品中水分的测定》方法测定,从鱼腹部上取5.0 g 鱼样,置于105℃下烘干4 h,直至恒重,水分含量以其湿重来计;pH 的测定:从鱼腹部上取10.0 g 鱼样研磨成糜,放入90 mL 蒸馏水中,以12000 r/min 的转速离心1 min,采用酸度计测定;蛋白质测定:从鱼腹部上取2.0 g 鱼样研磨成糜,采用 GB 5009.5-2016《食品中蛋白质的测定》中的凯氏定氮法,F 值取6.25 来计算其蛋白质含量;脂肪测定:从鱼腹部上取4.0 g 鱼样研磨成糜,采用 GB5009.6-2016《食品中脂肪的测定》方法测定;乳酸测定:从鱼腹部上取10.0 g 鱼样研磨成糜,采用 GB5009.157-2019《食品中有机酸的测定》方法测定。

1.2.3 DNA 抽提和 PCR 扩增 将8 g 腌鱼(鱼腹部)样品剪碎装入10 mL 试管中,保存在-80℃。将腌鱼样品送至上海美吉生物医药科技有限公司,采用美国 MP Biomedicals 公司 DNA 抽提试剂盒提取微生物群落总 DNA,提取方法按照试剂盒内说明书进行操作,随后对腌鱼样品的细菌和真菌特异区域进行 PCR 扩增。使用338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCA GCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT -3')对16S rRNA 基因 $V_3 \sim V_4$ 可变区进行 PCR 扩增,ITS1 区的引物为 ITS1F(5'-CTTGGTCATTTAG AGGAAGTAA-3')和 ITS2(5'-GCTGCGTTCTT CATCGATGC-3')^[13]。扩增程序如下:95℃预变性3 min,95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸45 s,72℃稳定延伸10 min,最后在4℃进行保存。PCR 反应体系为:5×FastPfu Buffer 4 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL,上游和下游引物(5 μmol/L)各0.8 μL, FastPfu DNA 聚合酶(2.5 U/μL)0.4 μL,BSA(0.8 μg/μL)0.2 μL,模板 DNA 10 ng,重蒸水补足至20 μL。每个样本3个重复。

1.2.4 文库构建和上机测序 PCR 产物用琼脂糖凝

表1 腌鱼的理化分析
Table 1 The chemical analysis of suan yu

项目	A	B	C	D	E	F
pH	6.36 ± 0.02 ^a	5.42 ± 0.01 ^c	5.74 ± 0.03 ^b	5.04 ± 0.02 ^d	6.34 ± 0.02 ^a	5.45 ± 0.03 ^c
水分含量(%,湿基)	49.22 ± 0.31 ^e	54.45 ± 0.70 ^b	51.65 ± 0.62 ^d	49.13 ± 0.40 ^e	58.7 ± 0.94 ^a	52.89 ± 0.37 ^c
脂肪含量(%,干基)	2.35 ± 0.00 ^d	3.98 ± 0.00 ^c	5.34 ± 0.02 ^a	4.82 ± 0.03 ^b	1.76 ± 0.01 ^e	5.17 ± 0.03 ^a
灰分(%,干基)	83.72 ± 0.00 ^a	82.83 ± 0.00 ^{ab}	79.44 ± 0.01 ^c	81.88 ± 0.00 ^b	81.23 ± 0.00 ^b	80.17 ± 0.00 ^c
蛋白质(%,干基)	12.83 ± 0.04 ^c	11.95 ± 0.02 ^c	14.61 ± 0.16 ^b	12.18 ± 0.08 ^d	16.24 ± 0.07 ^a	14.25 ± 0.13 ^b
乳酸(mg/kg)	71.35 ± 0.91 ^d	122.67 ± 1.15 ^c	71.82 ± 1.38 ^d	71.62 ± 0.74 ^d	2029.03 ± 9.05 ^a	1477.84 ± 1.44 ^b

注:同行不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

胶电泳检测,采用凝胶回收试剂盒回收,并将 PCR 产物用 DNA 荧光定量系统进行检测定量。使用 Rapid DNA-Seq Kit 进行建库。并于 Illumina 公司的 Miseq 平台进行腌鱼样品的测序,委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.3 数据处理

测序结果在美吉公司的 I-sanger 生物信息云平台上进行分析。将腌鱼样品数据采用 Usearch 软件在 97% 的相似度水平下进行 OTU (Operational taxonomic unit) 聚类分析,利用 QIIME 软件对 OTU 进行多样性指数分析。使用 Trimmomatic 软件原始测序序列进行质控,使用 FLASH 软件进行拼接。根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类并剔除嵌合体^[14]。16 S 细菌使用 Silva 数据库,ITS 真菌使用 Unite 的真菌数据库进行比对^[7]。

2 结果与分析

2.1 腌鱼的理化分析

如表 1 所示,不同腌鱼样品的 pH 为 5.04~6.36,这是由于发酵过程中微生物利用碳水化合物而生产有机酸,如乳酸、乙酸等。低 pH 通常被认为是保障发酵食品安全的一个重要因素。单玉鑫等^[15]研究不同发酵腌鱼产品的 pH 范围在 4.30~6.20。腌鱼样品 E 的乳酸含量为 2029.03 mg/kg,腌鱼样品 F 的乳酸含量为 1477.84 mg/kg,不同腌鱼样品乳酸含量的差异,可能是微生物及气候原因造成,使得发酵过程中乳酸菌的生长情况各异,从而产生不同含量的乳酸^[9]。腌鱼样品的蛋白质含量在 11.95%~16.24% 之间,脂肪含量为 1.76%~5.34%,灰分在 79.44%~83.72%。水分含量是影响发酵鱼类产品保鲜的主要因素之一,腌鱼样品水分含量均为 50% 左右,Zeng 等^[9]研究的腌鱼的水分含量约为 55%,其研究表明腌鱼样品中水分含量低可能是由于发酵前的沥水和腌制过程造成的。

2.2 细菌和真菌的多样性分析

腌鱼中微生物的多样性可以通过分析单个样本内的 α-多样性来评估微生物物种的丰富度和多样性。6 个样本的 Shannon 指数、Chao 指数、Simpson 指数、Coverage 测序深度指数统计分析结果见表 2。Shannon 指数是群落分布多样性指数,Shannon 指数越大,说明微生物多样性越高。Chao 指数是用 Chao 算法估计样本中所含 OTU 数目的指数,常用来反映样品微生物群落丰富度。Simpson 指数衡量样本多

样性情况,其数值越大,说明群落多样性越低。Coverage 指数用来反映样品微生物群落覆盖度,其数值越高则样本中序列被测出的概率越高^[16]。

由表 2 可知,对 6 个腌鱼样品的细菌群落进行测序分析,细菌及真菌的 Coverage 测序深度指数均大于 99.9%,表明测序深度能覆盖腌鱼样品中的大部分物种。从 6 个地方传统发酵腌鱼中共鉴定到 111 个细菌菌属和个 65 真菌菌属。通过计算样品的 Shannon 指数和 Chao 指数发现,A、E、F 腌鱼样品细菌的 Shannon 指数达到 1.88、1.94 和 1.94,说明 A、E 和 F 样本中细菌群落多样性相对 B、C 和 D 组较为丰富;A、B 和 F 腌鱼样品的细菌 Chao 指数相对于其他三个样品要高得多,说明 A、B 和 F 样品中细菌的物种丰度要高;样品 A、E 和 F 的细菌 Simpson 指数较小,说明 A、E 和 F 细菌的多样性丰富,这与其样品 A、E 和 F 的 Shannon 指数得出的结论具有一致性。综合 Chao 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数,可得出腌鱼样本 A 和 F 中细菌群落多样性及丰度较其他样品高,即剑河县和从江县腌鱼的细菌群落多样性及丰度较其他样品高。

B、D 和 F 腌鱼样品真菌的 Shannon 指数达到 1.43、1.56 和 1.46,说明 B、D 和 F 样本中真菌群落多样性相对 A、C 和 E 组较为丰富;C、D 和 F 腌鱼样品真菌的 Chao 指数达到 67.57、83.00 和 64.17,说明 C、D 和 F 样本中真菌群落物种丰度要高;腌鱼样品 C、D 和 F 的真菌 Simpson 指数较小,说明 C、D 和 F 样品的真菌群落结构复杂。综合 Chao 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数,可得出腌鱼样本 D 和 F 的真菌群落多样性及丰度较其他样品高,即榕江和从江的腌鱼真菌群落多样性及丰度较其他样品高。综合细菌及真菌的多样性及丰度,可知腌鱼样品 F 的多样性及丰度在所有样品中最为复杂,即从江县腌鱼的多样性及丰度最高。

2.3 微生物群落结构分析

2.3.1 腌鱼中细菌及真菌在门水平的组成 腌鱼中细菌在门水平的分布结果如图 1(A)所示,共获得 3 个门水平细菌,由厚壁菌门(Firmicutes)、蓝藻菌门(Cyanobacteria)和变形菌门(Proteobacteria)以及其他(Others)相对丰度较小的门细菌组成。其中厚壁菌门(Firmicutes)、蓝藻菌门(Cyanobacteria)和变形菌门(Proteobacteria)是 6 个地方腌鱼的主要共有的细菌门,Zang 等^[17]研究表明发酵腌鱼中门水平的细菌主要有厚壁菌门、蓝藻菌门、变形菌门、拟杆菌门

表2 细菌及真菌的多样性指数分析

Table 2 The analysis of alpha diversity estimators of bacteria and fungi

样品编号	Shannon 指数		Chao 指数		Simpson 指数		Coverage 指数(%)	
	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌
A	1.88	0.88	120.17	43.50	0.26	0.52	99.95	99.98
B	1.62	1.43	165.00	24.00	0.41	0.35	99.99	100
C	0.80	1.35	67.14	67.57	0.63	0.31	99.96	100
D	1.47	1.56	92.33	83.00	0.36	0.33	99.95	100
E	1.94	0.84	63.00	44.00	0.23	0.65	99.98	100
F	1.94	1.46	115.00	64.17	0.27	0.29	99.95	99.98

和梭杆菌门。Wang 等^[18]研究表明,在门水平上,厚壁菌门和变形菌门是鱼露发酵期间主要的菌群,该研究结果与本研究结果具有相似性。6 个地方腌鱼的厚壁菌门的相对丰度最高,均在 80% 以上,是腌鱼中的优势细菌,这可能是厚壁菌门中的乳杆菌和乳球菌大多数为厌氧细菌,能够产酸且在高酸环境下生长^[19],因而其丰度在腌鱼制品中较高。蓝藻菌门,其相对丰度在 1.43%~17.42%,分析可能来源于发酵腌鱼的原料中的植物叶绿体^[20]。变形菌门(Proteobacteria)的一部分细菌为好氧型,不能适应腌鱼发酵过程中缺氧、产酸、产醇的环境,因而丰度降低。从门的水平上讲,各地方腌鱼样品细菌的种类和丰度差别不大。

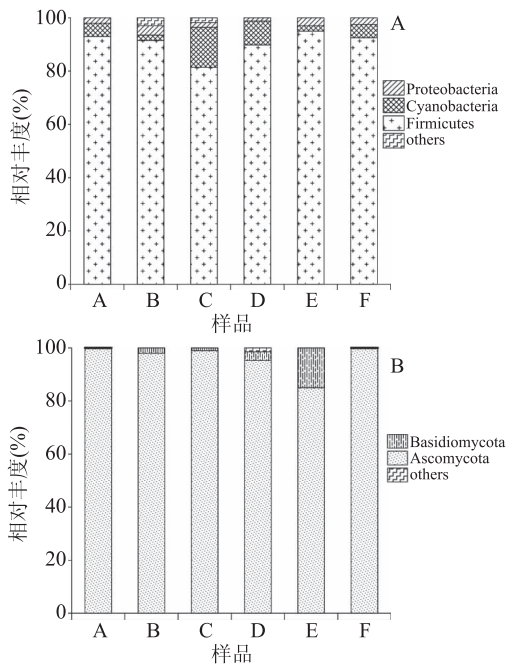


图1 腌鱼中细菌(A)和真菌(B)在门水平上的群落组成

Fig.1 Composition of bacteria(A)and fungi(B)

in suan yu at the phylum level

不同地方腌鱼所含真菌在门水平的分布结果如图 1(B)所示,在门水平上,真菌的种类多样性和丰度存在的差异较小,门水平上的优势真菌为子囊菌门(Ascomycota)。子囊菌门在各个腌鱼样品中的相对丰度均较高,均在 85% 以上。子囊菌门是腌鱼制品中的优势菌株,说明其在腌鱼发酵末期起重要作用。Zang 等^[17]研究表明,子囊菌门(Ascomycota)在添加发酵剂与未添加发酵剂的发酵鱼肉中从始至终

都占据绝对优势,是发酵腌鱼中的主要真菌群类。总体来说,腌鱼的细菌和真菌在门水平的多样性相对简单。

2.3.2 腌鱼中细菌及真菌在属水平的组成 在属水平上,不同地方的腌鱼所含细菌的种类多样性和丰度存在较大的差异。图 2(A)中列出了丰度较高的前 10 种细菌,对于样品 A、D、E 和 F 而言,乳杆菌(*Lactobacillus*)是主要的菌属,丰度分别为 76.15%、75.15%、75.18% 和 50.34%,Zeng 等^[9]发现,乳酸菌是第三批不同腌鱼样品发酵过程中的优势菌株,且数量在发酵初期逐渐增加,发酵后期保持稳定。许多报道表明乳酸菌是发酵肉制品中的主要菌群,比如意大利香肠^[21]和泰国发酵鱼 *plaasom*^[22]。乳酸菌在肉制品中可利用肉制品本身及配料中的碳水化合物后产生大量乳酸,使 pH 降低,酸度升高,从而抑制杂菌的生长^[23]。腌鱼样品 B 和 C 的优势菌是四联球菌(*Tetracoccus*),丰度分别为 61.1% 和 77.26%。四联球菌是发酵食品豆瓣酱^[24]和酱油^[25]中的主要菌群。由此可见,不同地方的腌鱼的优势细菌有差异,这可能是由于腌鱼使用的调味料、食物基质的组成不同引起的。芽孢杆菌(*Bacillus*)、肠杆菌(*Enterobacter*)、片球菌(*Pediococcus*)、乳球菌(*Lactococcus*)、肠球菌(*Enterococcus*)和其他一些未鉴定至门的真菌界微生物,它们所占比例不足 10%。据文献报道,芽孢杆菌(*Bacillus*)在酱油和非洲槐豆发酵中所产生的无机酸、氨基酸和酯类对复杂风味的形成具有重要作用^[26-27]。Cai 等^[28]研究表明,肠杆菌属和乳杆菌属可能会共同产酸,还会导致发酵制品酸味口感突出。本研究在腌鱼中发现肠球菌属,肠球菌通常用于某些食品中,以延长货架期和改善感官性能,产生细菌素抑制其他致病菌的繁殖,可作为发酵食品的发酵剂^[29]。然而,一些报道表明肠球菌中的 *asal*、*esp*、*hyl* 和 *gelE* 基因具有一定的致病性^[30]。因此,对肠球菌属的研究具有一定的争议性。另外,肠球菌的存在是否对产品的质量有影响,还需在以后的实验中加以验证。从属水平上来看,剑河县、榕江县、天柱县和从江县腌鱼优势细菌是乳酸菌(*Lactobacillus*),锦屏和黎平腌鱼的优势细菌是四联球菌(*Tetracoccus*)。

如图 2(B)所示,对于腌鱼样品 A、B、C、D 和 F 而言,接合酵母(*Zygosaccharomyces*)是主要的真菌菌属,除了样品 F 外,丰度均在 87.83% 以上。腌鱼样品 E 的优势菌株是酿酒酵母(*Kazachstania*),丰度达 79.61%。链格孢属(*Alternaria*)、威克汉姆酵母

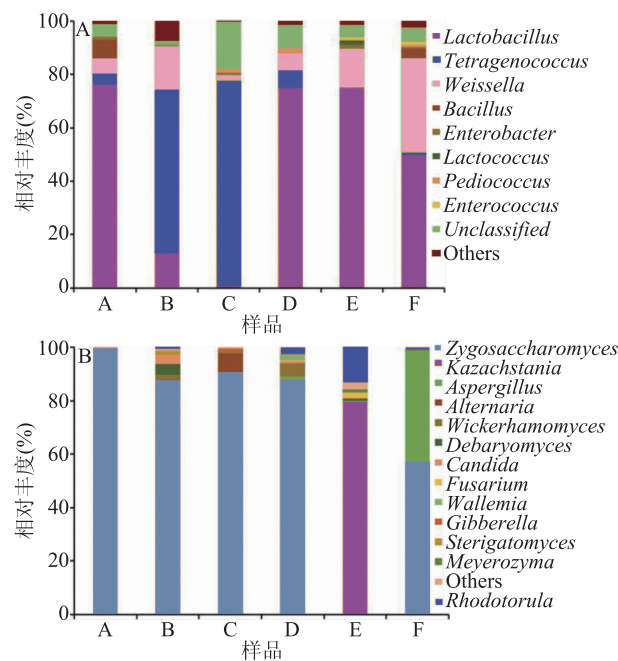


图2 腌鱼中属水平上细菌(A)及真菌(B)的群落组成
Fig.2 Composition of bacteria(A) and fungi(B)
in suan yu at the genus level

(*Wickerhamomyces*)、德巴利氏酵母 (*Debaryomyces*)、假丝酵母 (*Candida*)、镰刀菌属 (*Fusarium*)、赤霉菌属 (*Gibberella*)、梗孢酵母属 (*Sterigmatomyces*) 和季也蒙毕赤酵母 (*Meyerozyma*) 等丰度都不足 1%。酵母菌属是许多发酵食品的优势菌群,对发酵食品风味、色泽、质地有着重要的作用^[31]。余丹等^[16]研究表明,在传统甜面酱的后发酵阶段,作为丝状真菌的米曲霉因无法适应酱醪的高盐度和高水分而逐渐消亡,而接合酵母 (*Zygosaccharomyces*) 依然能存活,这表明接合酵母是一种高耐盐的酵母菌。酿酒酵母是酿酒过程主要的功能菌株,有很强的发酵能力,高产乙醇^[32]。Zang 等^[17]研究发现,假丝酵母 (*Candida*) 是发腌鱼酵三周后的优势菌株,威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces*) 是腌鱼发酵四周后的优势菌株,假丝酵母和威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces*) 是腌鱼发酵末期主要的菌群。假丝酵母通过氨基酸支链代谢途径比其他的酵母产生更多的风味物质^[33]。曲霉菌有产生水解酶进行淀粉糖化的能力,因此大多数有机酸和乙基酯的含量与其呈正相关^[34]。由此可以推断,在发酵后期酵母菌是优势菌株,且对产品品质起着至关重要的作用。从属水平上来看,剑河县、锦屏县、黎平县、榕江县和从江县的腌鱼的优势真菌为接合酵母 (*Zygosaccharomyces*),天柱县腌鱼的优势真菌为酿酒酵母 (*Kazachstania*)。综合属水平上细菌及真菌的群落组成来看,剑河县、榕江县和从江县腌鱼中的菌落组成具有相似性。

2.4 属水平群落热图分析

群落 Heatmap 可以用颜色变化来反映二维矩阵或表格中的数据信息,常将数据进行聚类,将聚类后的数据表示在 Heatmap 图上,通过颜色梯度及相似程度来反映数据的相似性。图 3A 展示了 6 个腌鱼

样品在属水平上的细菌群落 Heatmap 图,腌鱼 F 样品的细菌菌属最多,这与多样性分析指数中从江县腌鱼的细菌多样性及丰度较高的结论具有一致性。腌鱼样品 A、B、C、D 和 F 的优势菌属均为乳杆菌 (*Lactobacillus*)、魏斯氏菌 (*Weissella*)、四联球菌 (*Tetracoccus*)、蓝藻菌 (*norank_c_Cyanobacteria*),只有腌鱼样品 E 中不含有四联球菌 (*Tetracoccus*)。图 3B 是 6 个样品在属水平上的真菌群落 Heatmap 图。由图 3B 可知,腌鱼样品 A、B、C 和 D 的优势真菌组成非常相似。腌鱼样品 F 的优势真菌组成与其他组具有明显的差异性,腌鱼样品 B、C 和 E 具有自身独特的菌群。综上所述,A、B、C 和 D 腌鱼样品的细菌及真菌的优势菌属组成最为相似,即剑河县、锦屏县、黎平县和榕江县腌鱼的优势微生物最为相似,这与地理位置具有一定的相关性。

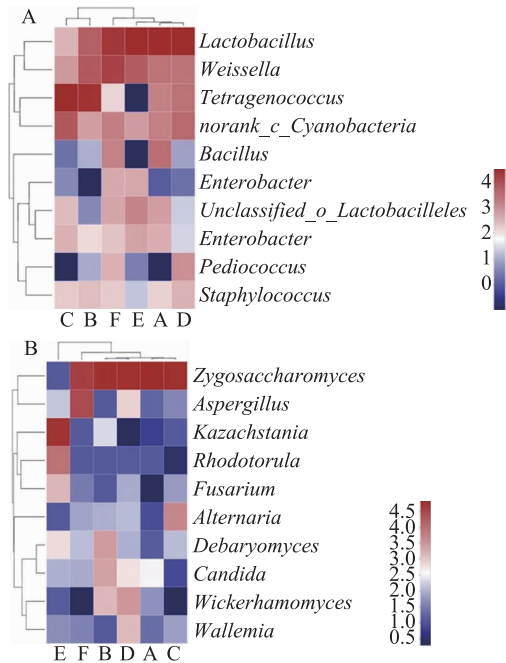


图3 腌鱼中属水平细菌(A)及真菌(B)群落的聚类分析
Fig.3 The community heatmap of bacteria(A)
and fungi(B) in suan yu at the genus level

2.5 环境因子与微生物多样性的关系

CCA 分析常用于分析微生物多样性与环境因子的关系。物种与环境因子之间的夹角代表相关性,锐角代表正相关,钝角代表负相关,直角代表无相关性,环境因子箭头的长度代表该环境因子对于物种分布的影响程度的大小,连线越长,相关性越大,反之越小。如图 4(A)所示,微生物群落结构与 4 个环境因子之间存在明显的关联性,乳酸是对腌鱼微生物群落 (属水平细菌) 影响最大的环境因子,其次是水分。魏斯氏菌 (*Weissella*)、肠球菌 (*Enterococcus*)、乳杆菌 (*Lactobacillus*) 与乳酸呈显著正相关。葡萄球菌 (*Staphylococcus*)、魏斯氏菌 (*Weissella*)、肠球菌 (*Enterococcus*)、片球菌 (*Pediococcus*) 与水分呈显著正相关;肠杆菌 (*Enterobacter*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*) 与水分呈显著负相关。乳杆菌 (*Lactobacillus*)、肠杆菌 (*Enterobacter*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*) 与蛋白质之间呈

显著正相关;芽孢杆菌 (*Bacillus*)、肠杆菌 (*Enterobacter*)与 pH 呈显著正相关。图 4(B)中,乳酸是对腌鱼微生物群落(属水平真菌)影响最大的环境因子,其次是水分。链格孢属 (*Alternaria*)、接合酵母 (*Zygosaccharomyces*)、威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces*)、假丝酵母 (*Candida*)与 4 个环境因子均呈显著负相关。红酵母 (*Rhodotorula*)、镰胞菌 (*Fusarium*)与 4 个环境因子均呈显著正相关。

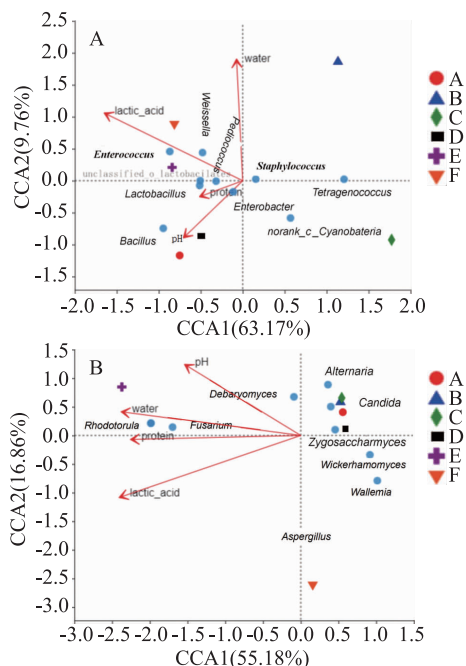


图 4 腌鱼中属水平细菌(A)及真菌(B)的多样性与环境因子的 CCA 分析

Fig.4 Canonical correspondence analysis(CCA) of bacteria(A) and fungi(B) in suan yu and environment factors at the genus level

3 结论

本文采用高通量测序技术对贵州省黔东南周 6 个县的腌鱼样品中微生物多样性进行分析,并对其优势菌群组成进行了解析。多样性分析指数表明,从江县腌鱼的微生物多样性最高。通过对微生物群落结构分析发现,门水平上,厚壁菌门 (*Firmicutes*)和子囊菌门 (*Ascomycota*)是 6 个腌鱼样品中的优势菌株,其相对丰度均在 80% 以上;属水平上,乳酸菌 (*Lactobacillus*)是剑河县、榕江县、天柱县、从江县腌鱼的优势细菌,接合酵母 (*Zygosaccharomyces*)是剑河县、锦屏县、黎平县、榕江县、从江县腌鱼的优势真菌。通过群落聚类分析可知,剑河县、锦屏县、黎平县、榕江县腌鱼的细菌及真菌的优势菌属组成最为相似,这与地理位置具有一定的相关性。CCA 分析表明,乳酸是对腌鱼微生物群落影响最大的环境因子,其次是水分。

参考文献

- [1] 杜斌,吴文能,王继明,等.侗族传统腌鱼中乳酸菌的分离鉴定与生物学特性[J].江苏农业科学,2018,46(7):185-188.
- [2] Zhao Y W, Wu Z F, Shen X Q, et al. Bacteria community

analysis by quantitative real-time PCR of fermenting wax gourd and its changes of organic acids[J].Journal of Food Processing and Preservation,2014,38(4):1653-1659.

- [3] Padilla B, Belloch C, López-Díez J J, et al. Potential impact of dairy yeasts on the typical flavour of traditional ewes' and goats' cheeses[J].International Dairy Journal,2014,35(2):122-129.

[4] Rabie M, Simon-Sarkadi L, Siliha H, et al. Changes in free amino acids and biogenic amines of Egyptian salted-fermented fish (Feseekh) during ripening and storage[J].Food Chemistry, 2009,115(2):635-638.

- [5] Sekse C, Holst-Jensen A, Dobrindt U, et al. High throughput sequencing for detection of foodborne pathogens[J].Frontiers in Microbiology,2017,8:2029.

[6] Lusk T S, Ottesen A R, White J R, et al. Characterization of microflora in Latin-style cheeses by next-generation sequencing technology[J].BMC Microbiology,2012,12:254.

- [7] 李恒,陈功,伍亚龙,等.高通量测序方法研究传统四川泡菜母水中微生物群落的动态变化[J].食品科学,2018,39(24):131-138.

[8] 玛依乐·艾海提,西热娜依·阿布力克木,努尔古丽·热合曼应用高通量测序法检测南疆传统酸奶中微生物多样性[J].食品科学,2018,39(20):126-131.

- [9] Zeng X F, Chen X H, Zhang W. Characterization of the microbial flora from suan yu, a Chinese traditional low-salt fermented fish[J].Journal of Food Processing and Preservation, 2016,40(5):1093-1103.

[10] Zeng X F, Zhang W, Zhu Q J. Effect of starter cultures on the quality of suan yu, a Chinese traditional fermented freshwater fish[J].International Journal of Food Science & Technology,2016,51(8):1774-1786.

- [11] Zeng X F, Xia W S, Jiang Q X, et al. Chemical and microbial properties of Chinese traditional low-salt fermented whole fish product Suan yu[J].Food Control,2013,30(2):590-595.

[12] Zeng X F, Xia W S, Yang F, et al. Changes of biogenic amines in Chinese low-salt fermented fish pieces (suan yu) inoculated with mixed starter cultures[J].International Journal of Food Science & Technology,2013,48(4):685-692.

- [13] Sun Z H, Liu W J, Bao Q H, et al. Investigation of bacterial and fungal diversity in tarag using high-throughput sequencing[J].Journal of Dairy Science,2014,97(10):6085-6096.

[14] Quast C, Priesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools[J].Nucleic Acids Research, 2012, 41 (D1): D590-D596.

- [15] 单玉鑫,徐文欢,李采婵,等.酸鱼产品中微生物群落结构与品质之间的关系研究[J].食品工业科技,2020,41(6):277-283.

[16] 余丹,毛嫔,宋顺,等.基于高通量测序的传统甜面酱自然发酵过程中的微生物群落结构及其动态演替[J].微生物学报,2018,45(5):1061-1072.

- [17] Zang J H, Xu Y S, Xia W S, et al. Dynamics and diversity of microbial community succession during fermentation of suan yu, a Chinese traditional fermented fish, determined by high throughput

- [illegible]