

MiSeq 测序研究散装酱卤鸭肉贮藏期间 微生物群落多样性

谢萍¹, 徐明生¹, 尹忠平¹, 唐道邦², 徐玉娟², 戴艺¹

(1. 江西农业大学/江西省农产品加工与安全控制工程实验室, 江西南昌 330045)

(2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所/广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)

摘要: 为研究散装酱卤鸭肉贮藏过程中微生物变化规律, 揭示其腐败本质, 以期确定其特定腐败菌(Specific Spoilage Organisms, SSO)提供依据, 本文采用 MiSeq 测序分析其在 4 °C 和 25 °C 贮藏过程中微生物群落多样性。结果表明, 样品在 4 °C 和 25 °C 贮藏过程中细菌和真菌物种多样性在总体上均呈现下降趋势。样品贮藏初期优势细菌是 *Weissella* sp., *Staphylococcus* sp. 和未分类的肠杆菌科, 优势真菌是 *Debaryomyces* sp. IZ_1257 和 *Lodderomyces elongisporus*。4 °C 贮藏中后期, 肺炎嗜冷杆菌(*Psychrobacter pulmonis*) 和 *Staphylococcus* sp. 为主要优势细菌; 而 25 °C 贮藏中后期的优势细菌则为 *Weissella* sp., *Staphylococcus* sp., 溶酪大球菌(*Macroccoccus caseolyticus*) 和未分类的肠杆菌科。4 °C、25 °C 贮藏中后期样品中最主要优势真菌均为 *Debaryomyces* sp. IZ_1257。相比较于传统方法, MiSeq 测序提供的微生物多样信息更接近于样品微生态, 更能够全面解析各环境样品微生物多样性。

关键词: 二代测序; 酱卤鸭肉; 微生物多样性; 优势菌群

文章编号: 1673-9078(2015)11-120-126

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.11.020

MiSeq Sequencing to Study the Diversity of Microflora in Bulk-marinated Duck Meat during Storage

XIE Ping¹, XU Ming-sheng¹, YIN Zhong-ping¹, TANG Dao-bang², XU Yu-juan², DAI Yi¹

(1. Jiangxi Agricultural University/Engineering Laboratory for Agro-processing and Safety Control of Jiangxi, Nanchang 330045, China) (2. Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China)

Abstract: In order to study the microbial variation during the storage of bulk-marinated duck meat, reveal the nature of meat spoilage, and provide the basis to determine the specific spoilage organisms (SSO), Illumina MiSeq sequencing was used in this study to analyze the diversity of microflora in bulk-marinated duck meat during storage at 4 °C and 25 °C. Bacterial and fungal species diversity showed a downward trend in general during the storage at 4 °C and 25 °C. During the initial stage of storage, the dominant bacteria were *Weissella* sp., *Staphylococcus* sp., and unclassified *Enterobacteriaceae*, and the dominant fungi were *Debaryomyces* sp. IZ_1257 and *Lodderomyces elongisporus*. During the mid-to-late stage of storage at 4 °C, the dominant bacteria were *Psychrobacter pulmonis* and *Staphylococcus* sp.; during the mid-to-late stage of storage at 25 °C, the dominant bacteria were *Weissella* sp., *Staphylococcus* sp., *Macroccoccus caseolyticus*, and unclassified *Enterobacteriaceae*. During the mid-to-late stage of storages at 4 °C and 25 °C, the dominant fungus was *Debaryomyces* sp. IZ_1257. Compared with traditional method, the information obtained by Illumina MiSeq sequencing provides more information of the sample microecology and a comprehensive description of the diversity of microflora in various environmental samples.

Key words: next generation sequencing; marinated duck meat; microbial diversity; dominant flora

酱卤肉制品属于低温肉制品, 极大程度上保留了肉品的营养、风味, 且品种繁多、嫩度适中, 深受消费者喜爱。然而, 酱卤肉制品营养丰富、水分活度制较高, 且加工过程中其中心温度较低, 虽大部分微生物能被杀死, 但一些芽孢和耐热性微生物仍能存活, 另外在冷链不完善的地区仍存在常温销售, 这就使酱卤肉制品极易受微生物污染导致其腐败变质。值得注意的是, 并不是所有初始菌相都参与肉的腐败, 肉的腐败变质只是由少部分菌群的生长繁殖引起的, 即短

收稿日期: 2015-02-06

基金项目: 广东省农产品加工重点实验室 2013 年开放基金项目(201301)

作者简介: 谢萍(1992-), 女, 硕士, 研究方向: 天然产物与功能性食品

通讯作者: 徐明生(1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物与功能性食品

暂腐败菌/特定腐败菌 (Ephemeral/Specific Spoilage Organisms, ESO/SSO)^[1]。SSO及其腐败代谢产物可作为食品品质指标,更为重要的是,通过监控SSO的生长情况可以预测、评估食品货架期^[2]。然而不同的原料、工艺、包装和贮藏条件等会导致食品生态系统不同,SSO不同。因此,研究酱卤肉制品贮藏期间微生物多样性是非常有必要的。

目前,酱卤肉制品微生物多样性方面的研究多是采用传统培养方法,少数采用变性梯度凝胶电泳 (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)^[3]、限制性内切酶片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)^[4]和454焦磷酸测序^[5]等免培养分子生物学方法。

传统方法存在着费时、工作量大的缺点,且自然界微生物多是不可培养的,培养基对微生物有富集或衰减影响,这就可能使研究结果产生较大偏差。相比其他免培养分子生物学方法,新兴的二代测序 (next generation sequencing, NGS)能够大规模而全面地解析微生物多样性,彻底革新了微生物生态学领域^[6]。以往454测序平台以读长优势广泛应用于微生物多样性研究领域,但随着Illumina MiSeq的发展, MiSeq测序读长和质量可以通过比较每组配对的阅读框的末端片段并拼接成为单个片段的方式得到提高,这使得研究人员使用Illumina MiSeq得到和通过454焦磷酸测序得到的序列长度相似的合并序列,却可以降低测序成本同时得到更高质量的测序结果^[7]。

本研究采用MiSeq测序研究散装酱卤鸭肉4℃和25℃贮藏过程中微生物群落多样性,加深对酱卤肉制品腐败变质过程微生物区系演替的认识,这对于产品的工艺改进和质量控制有重要意义。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与设备

MiSeq PE250: 美国 Illumina; 2720 PCR: 美国 ABI; DYY-7C 电泳仪: 北京六一; GelDoc-It 310 凝胶成像系统: 美国 UVP; DW-86L628 超低温冰箱: 青岛海尔; TGL-16GB 高速台式离心机: 上海安亭; TGL-20000-CR 高速台式冷冻离心机: 上海安亭; SPX-250-II 生化培养箱: 上海跃进; QT-2 漩涡混合器: 上海琪特。

1.2 主要试剂

DNeasy Blood & Tissue Kit: 德国 Qiagen; Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC

Buffer: 美国 New England Biolabs; Tiangen Mix: 北京天根; GeneJET™ Gel Extraction Kit: 美国 Thermo Scientific; Primer 341F、806R、ITS1 和 ITS1R: 上海杰瑞; 溶壁酶: 美国 Sigma; 溶菌酶: 北京索莱宝; RNase A: 北京索莱宝。

1.3 方法

1.3.1 样品

购买当天制作的散装酱卤鸭翅膀,于冰盒中送实验室备检,分别于4℃、25℃贮藏。每个取样点设三个平行,取样时间点设计见表1。

表1 取样时间点设计

Table1 Sampling times

温度/℃	取样时间/d
4	0、3、6、9、12、15、18
25	0、0.5、1、1.5、2、2.5、3

1.3.2 DNA 提取

DNA 提取方法在参照 Nieminen 等^[8]的方法的基础上做了适当修改。移取 35 mL 稀释液于一灭菌离心管中,1300 r/min (4℃)离心 10 min。移取 25 mL 上清液于另一灭菌离心管中,8800 r/min (4℃)离心 10 min。吸弃上清,菌体沉淀于-80℃保存以备 DNA 提取。

将菌体沉淀重悬于 600 μL 山梨醇缓冲溶液 (1 mol/L 山梨醇, 100 mmol/L EDTA, 14 mmol/L β-巯基乙醇),加入 600 U 溶壁酶,30℃孵育 40 min。7500 r/min 离心 10 min,弃上清。后续操作参照 DNeasy Blood & Tissue Kit 说明书。0.6%琼脂糖凝胶电泳检测后,将3个平行样品所得 DNA 合并,-20℃保存。

1.3.3 MiSeq 测序

细菌 16S rDNA V3-V4 扩增引物为 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3')^[9]和 806R (5'-GGACTACNNGGG TATCTAAT-3')^[9]。PCR反应体系: 15 μL Phusion Master Mix (2×)、3 μL Primer (2 μM)、10 μL g DNA和2 μL dd H₂O。反应参数: 98℃预变性1 min; 98℃变性10 s, 50℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 35个循环; 72℃延伸5 min。

真菌ITS1扩增引物为ITS1F (5'-CTTGGTCATT TAGAGGAAGTAA-3')^[10]和ITS2 (5'-GCTGCGTTCT TCATCG ATGC-3')^[11]。PCR反应体系: 15 μL Tiangen Mix (2×)、3 μL Primer (2 μM)、11.7 μL g DNA和0.3 μL Mg²⁺。反应参数: 94℃预变性3 min; 94℃变性10 s, 65℃退火30 s (每个循环递减1℃), 72℃延伸50 s, 15个循环; 94℃变性10 sec, 50℃退火30 s, 72℃延伸50 s, 20个循环; 72℃延伸10 min。

2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,等浓度混样,回收纯化PCR产物(GeneJET™ Gel Extraction Kit),建库(NEB Next® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina)并于Illumina MiSeq PE250上机测序。

1.3.4 数据分析

根据Barcode将下机数据(raw data)拆分为不同样品数据,并截去Barcode序列和PCR扩增引物序列。使用FLASH(V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>)^[12]将reads拼接成Raw Tags,过滤处理^[13]Raw Tags得到高质量Clean Tags,并用QIIME(V1.7.0, <http://qiime.org/index.html>)^[14]进行质控。将经上述处理后的Tags与Gold database(http://drive5.com/uchime/uchime_download.html)进行比对(UCHIME Algorithm)^[15]检测嵌合体序列,除去嵌合体序列^[16]得到有效Tags。用Uparse(V7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>)^[17]将Effective Tags聚类(相似性≥97%)成操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs)。

物种注释:细菌,将OTUs代表序列用RDP

Classifier(Version 2.2, <http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>)^[18]与Greengene数据库(<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>)^[19]进行物种注释分析(设定阈值为0.8~1);真菌,将OTUs代表序列用QIIME中的Blast方法与Unite_INSDC数据库(Version 2014.05.13, <http://unite.ut.ee>)^[20]进行物种注释分析。

计算Chao1指数(Chao1 richness)和Shannon指数(Shannon diversity indices)以评估 α -多样性(Alpha Diversity),用稀释曲线(Rarefaction Curve)评价测序深度。

分别将主要微生物对应OTUs的代表性序列在NCBI进行Blast分析,用ClustalX 1.83进行序列比对,用Mega 6.06(Neighbour-joining法)对主要微生物进行系统发育分析。

2 结果与讨论

2.1 α -多样性分析

表2 散装酱卤鸭肉4℃(A)和25℃(B)贮藏 α -多样性(cutoff:0.03)

Table 2 α -Diversity measurement in bulk-marinated duck meat during storages at 4 °C (A) and 25 °C (B) with a cutoff value of 0.03

A				B			
样品	No. OTUs	Chao1	Shannon	样品	No. OTUs	Chao1	Shannon
细菌				细菌			
D0	78	87.75	3.34	D0	85	87.00	3.44
D3	43	48.14	2.86	D0.5	69	72.00	2.19
D6	59	83.00	2.73	D1	78	87.43	2.74
D9	40	42.00	2.65	D1.5	74	75.62	2.97
D12	39	40.20	3.13	D2	79	84.00	3.27
D15	41	45.67	2.88	D2.5	46	46.08	2.64
D18	57	66.17	3.28	D3	47	48.20	2.92
真菌				真菌			
D0	48	54.11	2.05	D0	59	69.50	2.14
D3	71	73.00	1.82	D0.5	103	116.91	1.58
D6	28	37.33	0.70	D1	55	56.88	1.42
D9	33	46.75	0.90	D1.5	87	96.05	1.01
D12	26	47.00	0.74	D2	40	45.14	1.31
D15	28	31.00	0.85	D2.5	40	45.14	1.16
D18	32	34.50	2.45	D3	41	42.00	1.55

经拼接、过滤等处理,13个样品共获得510396条细菌序列和727682条真菌序列。不同贮藏时期的样品微生物多样性指数如表2所示,贮藏前、中期散装酱卤鸭肉真菌菌群组成多样性大幅度升高后又急剧下

降,总体上细菌和真菌物种多样性均呈现下降趋势,样品稀释曲线亦展示了这一变化(见图1)。图1曲线均已达到平坦期,即测序数据量合理,测序深度已基本覆盖样品中所有微生物。

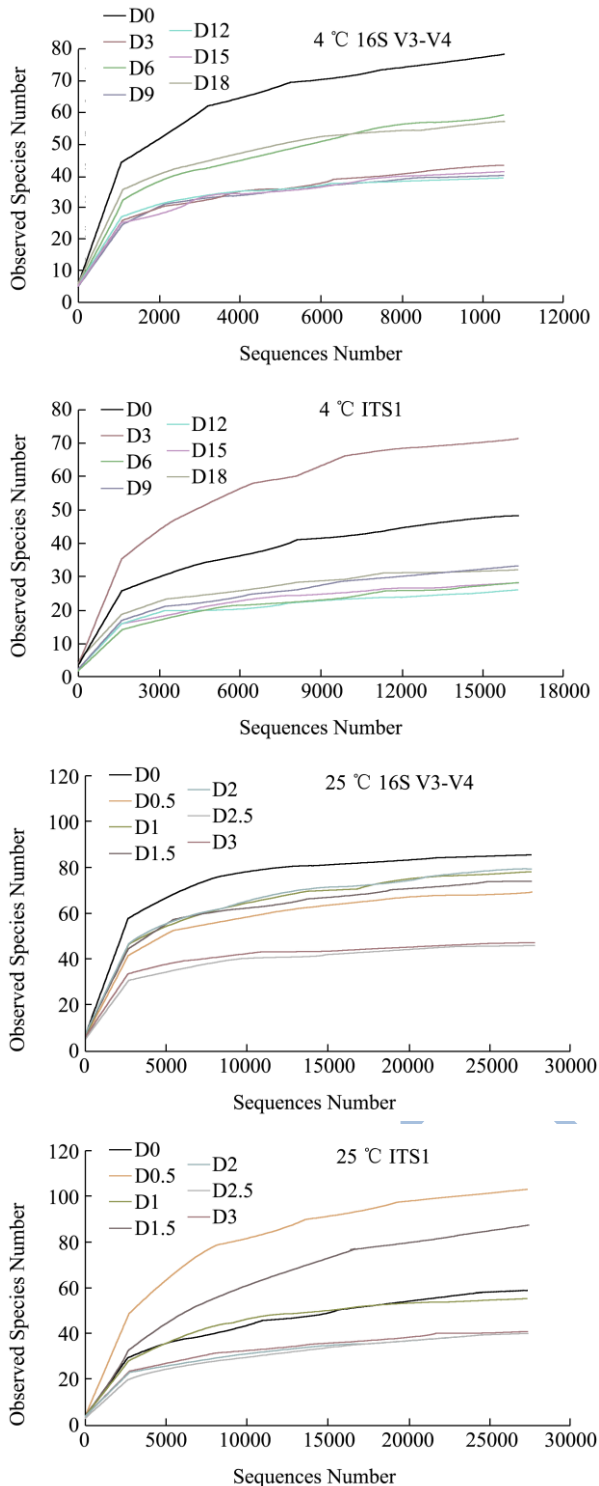


图1 稀释曲线
Fig.1 Rarefaction curve

2.2 微生物群落结构变化

图2 从属水平描述散装酱卤鸭肉贮藏期间微生物菌群结构变化。本文自定义相对丰度 $\geq 10\%$ 的菌群为优势菌群。由图2a知,样品初始菌相的优势细菌是魏斯氏菌属、肠杆菌科和葡萄球菌属。肠杆菌科一般不耐热,初始菌相中存在较高丰度的肠杆菌科(包括埃希

氏菌 (*Escherichia* sp.)、变形杆菌 (*Proteus* sp.)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcesens*)、耶尔森氏菌 (*Yersinia* sp.)、欧文氏菌 (*Erwinia* sp.)、特布尔西氏菌 (*Trabulsilla* sp.) 和未分类的肠杆菌科),且4 °C和25 °C贮藏中后期肠杆菌科亦有较明显的分布,这说明加工后产品受到二次污染。由图2a知,低温抑制了肠杆菌科的生长速率,肠杆菌科在4 °C贮藏中后期处于次要优势地位。研究表明,低温对肠杆菌科有显著抑制作用^[21]。随着贮藏时间推移,4 °C和25 °C贮藏下的微生物群落变化有较大差异,这说明贮藏温度对散装酱卤鸭肉制品中微生物群落变化影响较大,为正确解析散装酱卤肉制品腐败本质,研究不同贮藏条件下其微生物群落变化是十分有必要的。

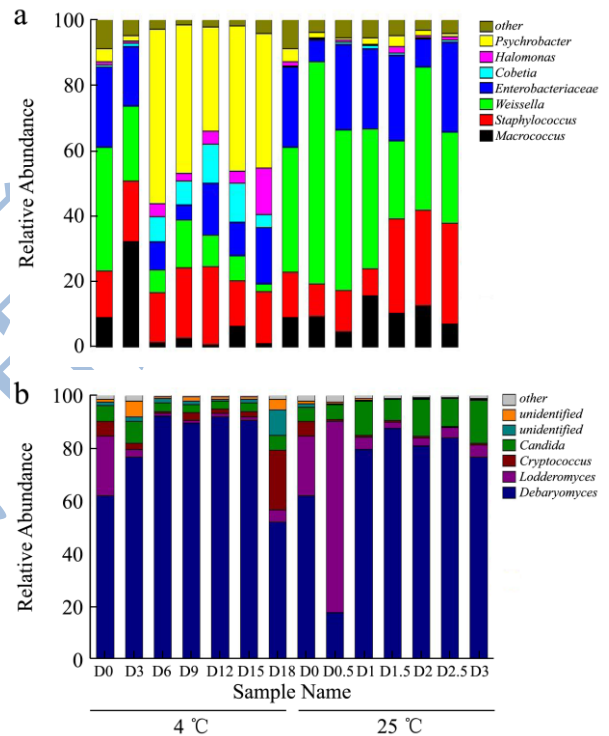


图2 基于属水平散装酱卤鸭肉中细菌(a)和真菌(b)菌群结构

Fig.2 Genus-level community structure of bacterial (a) and fungi (b) in the bulk-marinated duck meat

Note: Data refer to taxa detected at 5% or more in at least one sample; rarer taxa were grouped under the “other” label.

酱卤鸭肉4 °C贮藏中后期的优势细菌为嗜冷杆菌属、葡萄球菌属和肠杆菌科,25 °C贮藏中后期的优势细菌则为魏斯氏菌属、葡萄球菌属、肠杆菌科和巨大球菌属。对主要优势菌进行系统发育分析,如图3所示。魏斯氏菌属在25 °C贮藏过程中一直处于优势地位;而4 °C贮藏时其相对丰度在总体上呈下降趋势,贮藏中后期成为次要菌群。有研究表明,温度显著影响LAB的生长速率,当温度从7 °C下降至2 °C时,

LAB 的生长延迟 2 个 log，而当温度从 7 °C 降到 0 °C 时，LAB 的生长则延迟 4 个 log^[22]，这与 Zhang 等^[21] 的研究结果（LAB 在 4~10 °C、4 °C 和 0~4 °C 条件下生长速率为：4~10 °C>4 °C>0~4 °C）相似。25 °C 贮藏期间，*Weissella* sp. (OTU1B) 相对丰度呈“锯齿”形变化，第 0.5 d 时达到顶峰（62.33%），随后大幅度连续下降，至贮藏第 2 d 时跌至峰谷（15.65%）；4 °C 贮藏

前 6 d，*Weissella* sp. (OTU2A) 相对丰度大幅度连续直至 1.58%，小幅度上升后连续下降。由图 3 知，OUT1B、OTU2A 与从发酵食品中分离出的 *Weissella cibaria* strain AT22 (KP137384.1) 有着 100% 的相似度，OUT8B、OTU7A 则从意大利香肠分离的 *Weissella viridescens* strain PS48 (KJ580423.1) 有着极高的相似度。

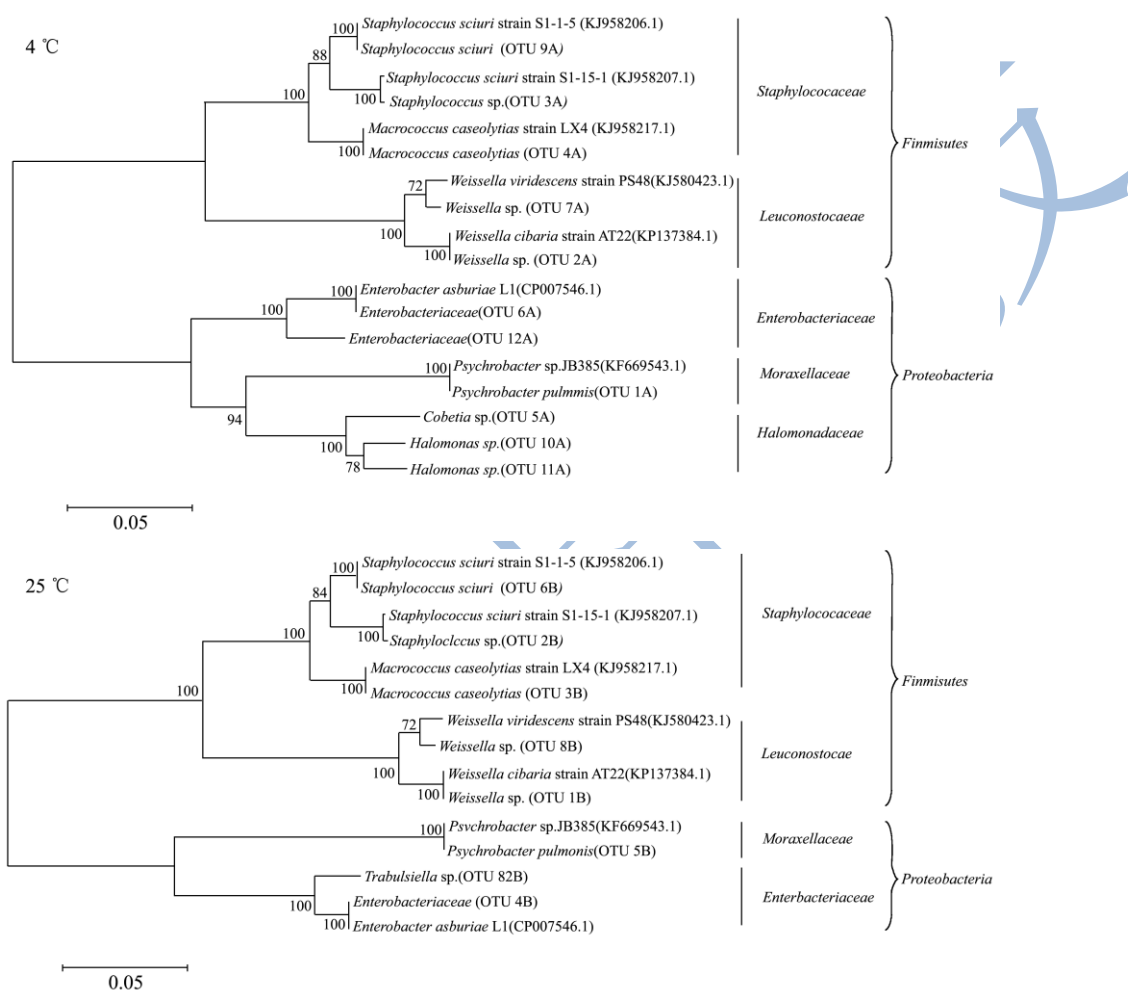


图 3 系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree

注：a: 4 °C；b: 25 °C。

嗜冷杆菌属，典型的耐盐、耐寒性的严格好氧菌，最适生长 pH 值 6.0~8.0，而当 pH<5.5 或 pH>9.0 时不生长^[23]。样品中的嗜冷杆菌属主要为 *P.pulmonis*，其在 25 °C 贮藏过程中只占很小一部分（≤3.35%），这与嗜冷菌的生长温度有很大的关系；而 4 °C 贮藏 3 d 后肺炎嗜冷杆菌（OUT 1A）快速生长繁殖，贮藏第 6 d 时其相对丰度达 51.64%，之后其相对丰度小幅度连续下降后又小幅度上升（≥30.75%），这与 Zhang 等^[21] 的研究结果不同。经系统发育分析，OUT 1A、OUT 5B 与 *Psychrobacter* sp. JB385 (KF669543.1) 均有着 100% 的相似度。

葡萄球菌属(包括 *Staphylococcus* sp. 和松鼠葡萄球菌 (*Staphylococcus sciuri*) 在 4 °C、25 °C 贮藏中一直处于优势地位，这与刘芳等^[3] 报道的腐生葡萄球菌 (*Staphylococcus scrophyticus*) 是盐水鸭 4 °C 贮藏的优势菌有差异。*Staphylococcus* sp. 是样品中主要的葡萄球菌属，25 °C 贮藏前 1.5 d 其相对丰度以较小幅度波动，贮藏 1.5 d 后相对丰度大幅度上升，第 2 d 时相对丰度达 26.24%，成为最主要优势细菌，随后其相对丰度趋于稳定；而 4 °C 贮藏时其相对丰度变化趋势总体上呈“梯形”，贮藏第 12 d 时相对丰度最大（22.44%）。葡萄球菌属在某种程度上是一把双刃剑，一方面肉糖葡

葡萄球菌 (*Staphylococcus carnosus*)、木糖葡萄球菌属 (*Staphylococcus xylosus*)、*Staphylococcus condimentii*、马胃葡萄球菌 (*Staphylococcus equorum*)、鱼发酵葡萄球菌 (*Staphylococcus piscifermentans*) 和 *Staphylococcus succinus* 等凝固酶阴性葡萄球菌 (coagulase-negative staphylococci, CoNS) 在食品加工中起着重要作用, 如 *S. carnosus* 和 *S. xylosus* 应用于肉制品发酵; 另一方面, CoNS 有潜在致病性, 威胁人类健康^[24]。

M. caseolyticus 是从样品中检测出的唯一巨大球菌属菌种。25 °C 贮藏 1 d 之前 *M. caseolyticus* (OUT 3B) 为次要菌群, 贮藏 1 d 后快速生长成为优势细菌; 而 4 °C 贮藏过程中, *M. caseolyticus* (OUT 4A) 相对丰度急剧上升后急剧下降, 贮藏第 3 d 时 *M. caseolyticus* 是最主要优势细菌 (32.41%), 随后便一直处于次要地位。

另外, 亦在样品中检测出了盐单胞菌科 (*Halomonadaceae*) 中的 *Halomonas* spp.、*Cobetia* sp. 和 *Haererehalobacter* sp.。盐单胞菌科在 4 °C 贮藏中后期快速生长, 其相对丰度在 9.65%~18.38% 间波动, 这与刘芳^[3]等的研究结果相似; 而 25 °C 贮藏时盐单胞菌科的相对丰度一直处于较低水平 (<2%)。而在肉及肉制品腐败变质中扮演重要角色的假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、索丝菌属 (*Brochothrix*)、肉食杆菌属 (*Carnobacterium*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和莫拉克氏菌属 (*Moraxella*) 在 4 °C 和 25 °C 贮藏过程中均处于较低水平 (<2%)。

丁雯^[4]通过 PCR-RFLP 研究罐装泡椒凤爪 20 °C 贮藏期间细菌菌相变化, 发现假单胞菌属、魏斯氏菌属和乳杆菌属是初始菌相中的优势细菌, 随着贮藏时间推移, 样品中优势细菌依次为魏斯氏菌属、假单胞菌属和葡萄球菌属。肖香^[5]通过细菌纯培养结合 454 焦磷酸测序的方法确定真空包装水晶肴肉 4 °C 贮藏过程中的优势细菌为 *Vibrio rumoiensis*、乳杆菌 (*Lactobacillus sakei*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、中间耶尔森氏菌 (*Yersinia intermedia*) 和水栖嗜冷杆菌 (*Psychrobacter glacincola*), 并在贮藏 30 天的样品中检测出了两种较低丰度 (<0.1%) 致病菌小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 和 *Psychrobacter sanguinis*。不同学者关于酱卤肉制品微生物多样性研究结果不尽相同, 这是原料、工艺、包装和贮藏等条件不同所致。

目前, 大部分肉及肉制品微生物生态研究仅针对细菌多样性。一般地, 肉及肉制品的腐败变质多是由

细菌的生长繁殖所引起的, 但在某些条件下贮藏的肉及肉制品中亦可检出高污染水平的真菌^[25]。为正确解析散装酱卤鸭肉贮藏中微生物群落多样性, 本文亦对样品真菌多样性进行分析。由图 2B 知, 散装酱卤鸭肉初始菌相中的优势真菌为德巴利氏酵母属 (62.21%, 包括 *Debaryomyces* sp. IZ_1257 和 *Debaryomyces* spp.) 和娄德酵母属 (22.55%, 包括 *L. elongisporus*)。 *Debaryomyces* sp. IZ_1257 在 4 °C 贮藏过程中一直处于绝对优势地位, 其相对丰度在贮藏末期较大幅度下降至 37.59%, 与此同时维多利亚隐球酵母 (*Cryptococcus victoriae*) 则快速生长成为优势真菌, 相对丰度从 1.93% 大幅度上升至 21.61%。25 °C 贮藏前中期, *L. elongisporus* 相对丰度急剧上升后急剧下降, *Debaryomyces* sp. IZ_1257 的变化趋势则与之相反; 25 °C 贮藏中后期 *Debaryomyces* sp. IZ_1257 便一直处于压倒性优势地位。

此外, 在样品中检测出了不可培养微生物, 如 uncultured soil fungus、uncultured *Myrmecridium* 和 uncultured *Eurotium*, 这是传统方法远远不可及的, 即相比较于传统方法 MiSeq 测序提供的微生物多样信息更接近于样品微生态, 更能够全面解析各环境样品微生物多样性。但 MiSeq 的局限性亦不可忽视。第一, 高通量测序产生海量数据, 这极大限制了非生物信息专业学者应用该方法研究微生物多样性; 第二, 有学者认为, 单独应用现代分子生物学方法, 并不能够确定所分析的核酸物质是来源于活菌还是已经死亡的微生物^[26]。因此为确定酱卤鸭肉制品 SSO 从而有效建立该产品的货架期预测模型, 有必要结合其他辅助手段 (如选择性培养基培养计数) 分析酱卤鸭肉制品贮藏期间菌群结构变化。

目前尚未确定样品中 *P. pulmonis*、*S. sciuri*、*S. marcescens* 和 *Alternaria alternata* 等条件致病菌的来源, 这需要更进一步的研究, 以期在可能的食品安全问题发生前就能够采取各种预防性措施, 规避、减小和消除危害。

3 结论

3.1 贮藏温度对散装酱卤鸭肉制品中微生物群落变化影响较大, 为正确解析散装酱卤肉制品腐败本质, 研究不同贮藏条件下其微生物群落变化是十分有必要的。本研究采用 MiSeq 测序技术解析散装酱卤鸭肉贮藏过程中微生物群落多样性。研究结果表明, 样品在 4 °C 和 25 °C 贮藏过程中细菌和真菌物种多样性在总体上均呈现下降趋势。样品贮藏初期优势细菌是 *Weissella* sp.、*Staphylococcus* sp.、和未分类的肠杆菌

科, 优势真菌是 *Debaryomyces* sp. IZ_1257 和 *L.elongisporus*。4℃ 贮藏中后期, *P.pulmonis* 和 *Staphylococcus* sp.为主要优势细菌; 而 25℃ 贮藏中后期的优势细菌则为 *Weissella* sp.、*Staphylococcus* sp.、*M.caseolyticus* 和未分类的肠杆菌科。4℃、25℃ 贮藏中后期样品中最主要优势真菌均为 *Debaryomyces* sp. IZ_1257。相比较于传统方法, MiSeq 测序提供的微生物多样信息更接近于样品微生态, 更能够全面解析各环境样品微生物多样性。

3.2 本研究丰富了我们对于酱卤肉制品中微生物多样性的认识, 有助于全面解析酱卤鸭肉制品的腐败机制, 为确定该产品 SSO 及其来源、优化加工工艺提供支持。

参考文献

- [1] De Filippis F, La Stora A, Villani F, et al. Exploring the sources of bacterial spoilers in beefsteaks by culture-independent high-throughput sequencing [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e70222
- [2] Huis in't Veld JH. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview [J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 33(1): 1-18
- [3] 刘芳,王道营,徐为民.应用 PCR-DGGE 指纹图谱技术分析盐水鸭贮藏过程中的细菌多样性[J].南京农业大学学报,2011,34(2):135-138
LIU Fang, WANG Dao-ying, XU Wei-min, et al. Bacterial diversity in water-boiled salted duck during storage analyzed by PCR-DGGE [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2011, 34(2): 135-138
- [4] 丁雯.禽肉制品菌相结构分析与优势腐败菌 PJ-9 的 GFP 分子标记-以泡椒凤爪为例[D].南京:南京农业大学,2013
DING Wen. Microflora structural analysis of the poultry products and GFP labeling of the dominant spoilage bacteria PJ-9-Illustrated by the case of chicken feet with pickled peppers [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013
- [5] 肖香.肴肉微生物多样性与特定腐败菌控制机制研究[D].镇江:江苏大学,2013
XIAO Xiang. Bacterial diversity and the inhibitory mechanism of antibacterial plant extracts against specific spoilage organism in yao meat [D]. Zhengjiang: Jiangsu University, 2013
- [6] Połka J, Rebecchi A, Pisacane V, et al. Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons [J]. Food Microbiology, 2015, 46(0): 342-356
- [7] Nelson MC, Morrison H, Benjamino J, et al. Analysis, optimization and verification of Illumina-generated 16S rRNA gene amplicon surveys [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94249
- [8] Nieminen TT, Koskinen K, Laine P, et al. Comparison of microbial communities in marinated and unmarinated broiler meat by metagenomics [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 157(2): 142-149
- [9] Yu Y, Lee C, Kim J, et al. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 89(6): 670-679
- [10] Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts [J]. Molecular Ecology, 1993, 2(2): 113-118
- [11] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [J]. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications 1990: 315-322
- [12] Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963
- [13] Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing [J]. Nature Methods, 2013, 10(1): 57-59
- [14] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336
- [15] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection [J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194-2200
- [16] Haas BJ, Gevers D, Earl AM, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons [J]. Genome Research, 2011, 21(3): 494-504
- [17] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998
- [18] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, et al. Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267
- [19] DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench

- compatible with ARB [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(7): 5069-5072
- [20] Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi [J]. Molecular Ecology, 2013, 22(21): 5271-5277
- [21] Zhang QQ, Han YQ, Cao JX, et al. The spoilage of air-packaged broiler meat during storage at normal and fluctuating storage temperatures [J]. Poultry science, 2012, 91(1): 208-214
- [22] Borch E, Kant-Muermans M-L, Blixt Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products [J]. In: International Journal of Food Microbiology. 1996: 103-120
- [23] Bowman J. The genus psychrobacter [J]. In: The Prokaryotes: Springer New York, 2006: 920-930
- [24] Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A, Nalepa B, et al. Coagulase-negative *staphylococci* (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin-Phenotypic and genotypic antibiotic resistance [J]. Food Microbiology, 2015, 46(0): 222-226
- [25] Dorn-In S, Hädzel CS, Janke T, et al. PCR-SSCP-based reconstruction of the original fungal flora of heat-processed meat products [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 162(1): 71-81
- [26] 梁荣蓉. 生鲜鸡肉调理制品菌群结构分析和货架期预测模型的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2010
- LIANG Rong-rong. Bacterial community and shelf-life predictive model of freshly prepared chicken products [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2010