

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

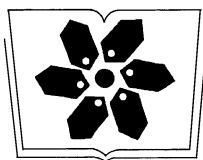
Acta Ecologica Sinica



第32卷 第8期 Vol.32 No.8 **2012**

中国生态学学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 32 卷 第 8 期

2012 年 4 月 (半月刊)

目次

东北地区 5 种阔叶树苗木对火烧的生理响应	王 荣, 胡海清	(2303)
梭梭木虱发生规律及其影响因素	李粉莲, 吴雪海, 王佩玲, 等	(2311)
基于遥感降尺度估算中国森林生物量的空间分布	刘双娜, 周 涛, 舒 阳, 等	(2320)
流域景观格局与河流水质的多变量相关分析	赵 鹏, 夏北成, 秦建桥, 等	(2331)
内蒙古达赉湖地区赤狐生境选择及生境景观特征分析	张洪海, 李成涛, 窦华山, 等	(2342)
雅鲁藏布江流域底栖动物多样性及生态评价	徐梦珍, 王兆印, 潘保柱, 等	(2351)
用组合模型综合比较的方法分析气候变化对朱鹮潜在生境的影响	翟天庆, 李欣海	(2361)
2010 年牧区 2 代草地螟成虫迁飞的虫源分析	张 丽, 张云慧, 曾 娟, 等	(2371)
基于细胞色素 b 基因的中国岩羊不同地理种群遗传差异分析	李楠楠, 刘振生, 王正寰, 等	(2381)
喀斯特峰丛洼地不同退耕还林还草模式的土壤微生物特性	鹿士杨, 彭晚霞, 宋同清, 等	(2390)
永定河沿河沙地杨树人工林生态系统呼吸特征	方显瑞, 张志强, 查同刚, 等	(2400)
基于湿地植物光谱的水体总氮估测	刘 克, 赵文吉, 郭逍宇, 等	(2410)
背瘤丽蚌 F 型线粒体基因组全序列分析	陈 玲, 汪桂玲, 李家乐	(2420)
流域“源-汇”景观格局变化及其对磷污染负荷的影响——以天津于桥水库流域为例	李崇巍, 胡 婕, 王 飒, 等	(2430)
线虫群落对抚顺煤矸石山周边土壤可溶性盐污染的响应	张伟东, 吕 莹, 肖 莹, 等	(2439)
地上竞争对林下红松生物量分配的影响	汪金松, 范秀华, 范 娟, 等	(2447)
湿地松和马尾松人工林土壤甲烷代谢微生物群落的结构特征	王 芸, 郑 华, 陈法霖, 等	(2458)
马尾松和杉木树干韧皮部水溶性糖 $\delta^{13}\text{C}$ 值对气象因子的响应	卢钰茜, 王振兴, 郑怀舟, 等	(2466)
沙坡头人工植被演替过程的土壤呼吸特征	高艳红, 刘立超, 贾荣亮, 等	(2474)
豫西刺槐能源林的热值动态	谭晓红, 刘诗琦, 马履一, 等	(2483)
铁皮石斛种子的室内共生萌发	吴慧凤, 宋希强, 刘红霞	(2491)
红光与远红光比值对温室切花菊形态指标、叶面积及干物质分配的影响	杨再强, 张继波, 李永秀, 等	(2498)
扑草净对远志幼苗根系活力及氧化胁迫的影响	温银元, 郭平毅, 尹美强, 等	(2506)
地表臭氧浓度增加和 UV-B 辐射增强及其复合处理对大豆光合特性的影响	郑有飞, 徐卫民, 吴荣军, 等	(2515)
AMF 对喀斯特土壤枯落物分解和对宿主植物的养分传递	何跃军, 钟章成, 董 鸣	(2525)
传统豆酱发酵过程中细菌多样性动态	葛菁萍, 柴洋洋, 陈 丽, 等	(2532)
定位施肥对紫色菜园地磷素状况的影响	孙倩倩, 王正银, 赵 欢, 等	(2539)
基于生态需水保障的农业生态补偿标准	庞爱萍, 孙 涛	(2550)
保障粮食安全造成的生态价值损失评估模型及应用	芦蔚叶, 姜志德, 张应龙, 等	(2561)
专论与综述		
疏浚泥用于滨海湿地生态工程现状及在我国应用潜力	黄华梅, 高 杨, 王银霞, 等	(2571)
问题讨论		
厌氧氨氧化菌群体感应系统研究	丁 爽, 郑 平, 张 萌, 等	(2581)
基于形态结构特征的洞庭湖湖泊健康评价	帅 红, 李景保, 夏北成, 等	(2588)
研究简报		
黄土高原不同树种枯落叶混合分解效应	刘增文, 杜良贞, 张晓曦, 等	(2596)
不同经营类型毛竹林土壤活性有机碳的差异	马少杰, 李正才, 王 斌, 等	(2603)
干旱对辣椒光合作用及相关生理特性的影响	欧立军, 陈 波, 邹学校	(2612)
硅和干旱胁迫对水稻叶片光合特性和矿质养分吸收的影响	陈 伟, 蔡昆争, 陈基宁	(2620)



封面图说: 红树林粗大的气生根——红树林是热带、亚热带海湾及河口泥滩上特有的常绿灌木或乔木群落。由于海水环境条件特殊,红树林植物具有一系列特殊的生态和生理特征。其中之一就是气根,红树从根部长出许多指状的气生根露出海滩地面,以便在退潮时甚至潮水淹没时用以通气,故称呼吸根。在中国,红树林主要分布在海南、广西、广东和福建省沿海,它一般分布于高潮线与低潮线之间的潮间带,往往潮差越大,红树的呼吸根就长得越高越粗大。

彩图提供: 陈建伟教授 北京林业大学 E-mail: cites.chen@163.com

DOI: 10.5846/stxb201103110295

葛菁萍, 柴洋洋, 陈丽, 平文祥. 传统豆酱发酵过程中细菌多样性动态. 生态学报, 2012, 32(8): 2532-2538.

Ge J P, Chai Y Y, Chen L, Ping W X. The dynamics of bacteria community diversity during the fermentation process of traditional soybean paste. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(8): 2532-2538.

传统豆酱发酵过程中细菌多样性动态

葛菁萍^{1,2,*}, 柴洋洋^{1,2}, 陈 丽^{1,2}, 平文祥^{1,2}

(1. 黑龙江大学 生命科学学院, 哈尔滨 150080; 2. 黑龙江省微生物学重点实验室, 哈尔滨 150080)

摘要: 细菌在豆酱发酵过程中起到非常重要的作用, 并与豆酱的风味和质量密切相关, 因此研究豆酱中细菌的多样性具有重要意义。以自然发酵的豆酱样品为研究对象, 采用细菌 16S rDNA 的部分可变区的 PCR-DGGE 技术对自然发酵豆酱样品的细菌群落组成和优势菌群进行研究。结果表明, 传统豆酱发酵过程细菌群体中既有原始种群的减少和增长, 也有次级种群的增多和演变。在整个发酵过程中, 初期和末期以不可培养细菌为主, 初期细菌群体快速演替, 细菌种群多样性指数在发酵 42 d 和 56 d 达到两次高峰。

关键词: 变性梯度凝胶电泳 (DGGE); 16S rDNA; 豆酱发酵; 细菌种群演替

The dynamics of bacteria community diversity during the fermentation process of traditional soybean paste

GE Jingping^{1,2,*}, CHAI Yangyang^{1,2}, CHEN Li^{1,2}, PING Wenxiang^{1,2}

1 College of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China

2 Key Laboratory of Microbiology, Harbin 150080, China

Abstract: Soybean paste, soy sauce, preserved bean curd and lobster sauce are the four traditional fermentation foods in China. Microorganisms, especially bacterial varieties play an active role during the process of soybean paste fermentation.

The bacteria are closely related to the flavor and quality of the soybean paste. In the fermentation of traditional soybean paste, monitoring different stages of the fermentation process and the dynamics of bacteria diversity, as well as controlling the bacteria succession will provide a theoretical basis for strain selection and improvement of the process for industrial production. At present, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) is widely accepted as a molecular biology tool for studying complex microbial community and behavior. In this study, we used the natural fermented soybean paste as material, extracted bacteria genomic DNA, amplified the V3 region of 16SrRNA genes by PCR, and analyzed the dynamics of bacteria community structure and the dominant population during the fermentation of soybean paste using DGGE.

Our results showed that the V3 region of 16SrDNA of the complex microbial community in the fermentation of traditional soybean paste were around 230 bp, containing 19 different gel bands. Sequencing of the DGGE bands revealed the 19 microorganisms, which are *Aeromonas*, *Weissella viridescens*, *Staphylococcus xylosus*, *Lactobacillus brevis*, *Aeromonas media*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Leuconostoc lactis*, *Listeria grayi*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus succinu*, *Bacillus firmus*, *Tetragenococcus halophilus* and six unculturable bacteria. This result clearly reflects the diversity of the bacteria in the fermentation process. Through monitoring the abundance value and degree of dominance during the fermentation process, we found the growth of some initial populations and depression of other initial populations, in addition to the

基金项目: 黑龙江省科技攻关重大项目 (GA07B401-6); 科技创新人才研究专项资金项目优秀学科带头人 (RC2010XK002028); 黑龙江大学高层次人才 (创新团队) 支持计划 (Hdd2010-17)

收稿日期: 2011-03-11; 修订日期: 2011-09-28

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: gejingping@126.com

growth and evolution of some subpopulations. The application of PCR-DGGE method in the detection of bacteria diversity has led to valuable information. In addition, the succession of bacteria population displayed the following pattern in the fermentation process based on the Shannon-Weiner index, i. e. , the variation of the bacteria population showed “low-high-low” pattern, while the dominant bacteria population showed a succession pattern from D8 (Uncultured *Staphylococcus* sp. , Accession Number FJ542940. 1) to D18 (Uncultured bacterium, Accession Number EU873643. 1) and then to D6 (*Staphylococcus saprophyticus*, Accession Number EU855228. 1). At the initial and final stages of the fermentation process, unculturable bacteria population were dominant population, the succession speed was rapid at the initial stage of fermentation. The diversity index of the bacteria population reached peak values at 42 d and 56 d in the fermentation, which were 3.77 and 3.65, respectively. These results have provided important knowledge towards understanding the dynamic changes of bacteria populations in the soybean paste fermentation.

Key Words: denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); 16SrDNA; soybean paste fermentation; bacteria population succession

豆酱是营养丰富的食用调味品,其发酵过程需要多种微生物协同作用。监测传统豆酱发酵不同阶段微生物的多样性和菌群动态,掌握菌相的演替规律,是对发酵菌株进行系统选育,优化改良和实现工业化生产豆酱的理论依据。利用变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)方法进行微生物多样性的快速监测已经成为现代微生物生态学研究的重要手段^[1],已广泛应用于食品微生物的分离和鉴定、食品发酵过程中微生物群落动态监测等方面^[2-5]。

目前,国内外尚未见 DGGE 监测传统豆酱发酵过程微生物群落的动态的报道。本文从传统豆酱发酵不同阶段采集酱样,提取混合菌群的细菌基因组 DNA,以 PCR 扩增 16SrRNA 基因的 V3 区域,用 DGGE 技术分离和鉴定 PCR 扩增产物,从而获得传统豆酱发酵不同阶段微生物群落多样性的信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料

样品采集于齐齐哈尔市拜泉县。分两阶段采集(酱醅发酵阶段和稀态发酵阶段)。酱醅发酵阶段取外部(酱醅表层 3 cm)和内部(酱醅中心部位)各 100 g 放入灭菌后的塑料瓶中,取回后立即放入 4 ℃ 冰箱保藏。从酱醅制作的第 1 天起采集样品,每隔 7 d 取样 1 次,整个酱醅发酵周期约为 80 d,共采集 12 次。然后进入稀态发酵阶段,此阶段取发酵酱样品 200 g 左右放入灭菌后的塑料瓶中。取回后立即放入 4 ℃ 冰箱保藏。稀态发酵阶段每隔 14 d 取样 1 次,整个稀态发酵周期约为 60 d,共采集 5 次。

1.2 实验方法

1.2.1 样品预处理

称取 6 g 湿重样品,用 30 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 7.0)悬浮,加入玻璃珠,以振荡器充分振荡 5 min,200 r/min 离心 5 min,收集上清;沉淀重复洗涤 3 次。最后收取的上清液 7000 r/min 高速离心 5 min,弃上清,收集沉淀,获得菌体。

1.2.2 细菌基因组 DNA 的提取和纯化

利用北京全式金生物技术有限公司基因组提取试剂盒提取预处理样品中的细菌基因组。并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 基因组 DNA 的 PCR 扩增

采用细菌通用引物对扩增总基因组 16S rDNA V3 区,其引物序列分别为^[6]: F338GC:5'-CGCCC GCCGC GCGCG GCGGG CGGGG GCACG GGGGG ACTCC TACGG GAGGC AGCAG-3'; R518: 5'-ATTAC CGCGG CTGCT GG-3'。50 μL PCR 反应体系为:50 ng 模板、5 pmol 正反引物、50 μmol/L dNTP、5 μL 10×PCR buffer (MgCl₂)、2.5U *ExTaq* DNA 聚合酶,无菌纯水补齐到 50 μL。反应程序为:95 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性

30s, 55℃退火 1 min, 72℃延伸 40 s, 35 个循环, 72℃延伸 7 min。PCR 反应的产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析

采用 DGGE-2401 电泳系统进行样品分析。胶浓度为 6.5% 的丙稀酰胺 (丙稀酰胺: 双丙稀酰胺 = 37.5:1), 变性剂范围为 40%—70% (5.7 mol/L 的尿素和 32% 的去离子甲酰胺的混合物), 60℃、150 V 条件下电泳 9 h, 银染法染色, DGGE 指纹图谱用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件分析。回收 DGGE 条带并测序。测序结果提交至 GenBank 核酸序列数据库, 在 GenBank 中进行同源序列比对, 并对 DGGE 指纹图谱进行生态学分析。评估微生物多样性和种群相对数量。

2 结果与分析

2.1 豆酱发酵样品中细菌总基因组 DNA 扩增

以不同发酵时期细菌总基因组 DNA 为模板, 采用大多数细菌和古细菌的 16S rRNA 基因 V₃ 区通用引物 (F338GC 和 R518) 进行扩增, 在引物 F338 的 5' 端添加 GC 夹提高扩增片断的分离效果。豆酱不同发酵时期的细菌总 DNA 经 PCR 扩增后获得了不同发酵时期细菌的 16SrRNA 基因 V3 区的目的片断 (图 1), 以发酵 0 d 的豆酱样品作为对照, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 得到的 DNA 片断约 230 bp。

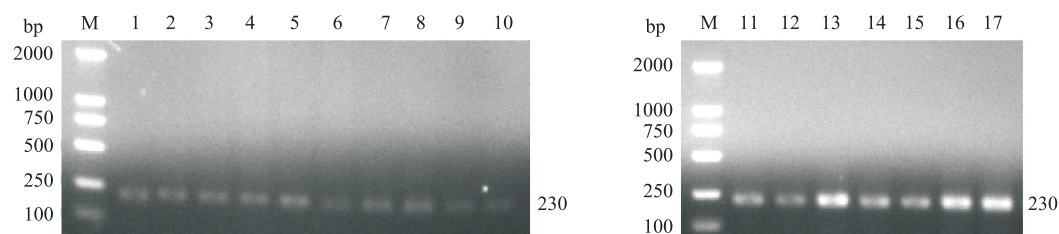


图 1 PCR 扩增各个采样时期样品中细菌 16S rDNA 的 V3 区产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis graph of the amplified 16S rDNA fragments from soybean paste samples

M. DL2000 Marker; 1: 0d; 2: 7d; 3: 14d; 4: 21d; 5: 28d; 6: 35d; 7: 42d; 8: 49d; 9: 56d; 10: 63d; 11: 70d; 12: 77d; 13: 84d; 14: 98d; 15: 112d; 16: 126d; 17: 140d

2.2 DGGE 条带测序分析

通过 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件对豆酱发酵不同时段 17 个样品中细菌 16S rDNA V3 区的 DGGE 指纹图谱进行泳道分析, 共得到 19 种条带 (图 2), 回收条带进行测序, 结果表明 (表 1), 序列测出的片段长度大都在

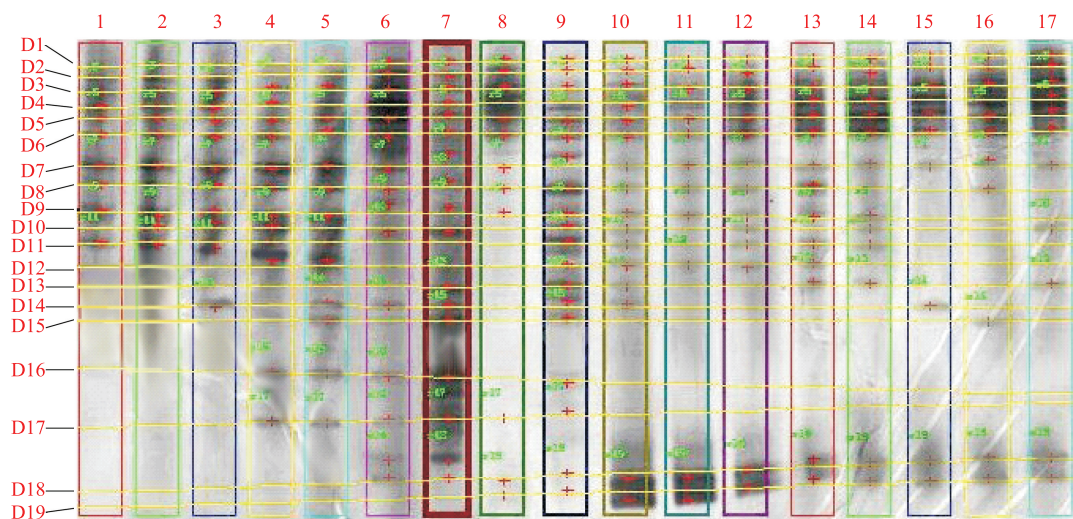


图 2 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 图谱

Fig. 2 DGGE profile of the amplified 16S rDNA fragments from soybean paste samples

240 bp 左右,且测得的结果与数据库中已知菌种均具有较高的相似性,除 D18 相似性为 94%,D16 相似性为 95% 外,其余各个条带的相似性均在 97% 以上。DGGE 条带比对结果显示,D1 是一株气单胞菌属 (*Aeromonas*) 的细菌,它与同属的已知菌的相似性为 100%;D2 为绿色魏斯氏菌 (*Weissella viridescens*),相似性为 100%;D3 为木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosus*),相似性为 99%;D4 为短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*),相似性为 100%;D5 为中间气单胞菌 (*Aeromonas media*),相似性为 99%;D6 为腐生性葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*),相似性为 100%;D7 为乳明串珠菌 (*Leuconostoc lactis*),相似性为 99%;D8,D12,D14,D16,D18,D19 为不可培养的细菌;D9 为一株格雷(氏)李斯特(氏)菌 (*Listeria grayi*),相似性为 100%;D10 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*),相似性为 99%;D11 为一株葡萄球菌 (*Staphylococcus succinu*),相似性为 100%;D13 为一株坚硬芽孢杆菌 (*Bacillus firmus*),相似性为 97%;D15 和 D17 为嗜盐四链球菌 (*Tetragenococcus Halophilus*),相似性分别为 100% 和 99%。

表 1 19 条序列的 BLAST 结果

Table 1 BLAST results of the sequenced 19 sequences

条带号 Band name	序列长度 Sequence size (bp)	NCBI 数据库中最相似菌种 The strains which have the highest identity from NCBI	相似性/% Similarity	登录号 Accession Number
D1	238	<i>Aeromonas</i> sp.	100	FJ464580.1
D2	241	<i>Weissella viridescens</i>	100	EU621989.1
D3	235	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99	FJ155342.1
D4	215	<i>Lactobacillus brevis</i> .	100	FJ532366.1
D5	244	<i>Aeromonas media</i> .	99	FJ464580.1
D6	243	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99	EU855228.1
D7	243	<i>Leuconostoc lactis</i>	99	FJ215667.1
D8	250	Uncultured <i>Staphylococcus</i> sp.	100	FJ542940.1
D9	243	<i>Listeria grayi</i>	100	EU545979.1
D10	242	<i>Bacillus subtilis</i>	99	FJ609728.1
D11	232	<i>Staphylococcus succinus</i>	100	FJ155339.1
D12	237	Uncultured <i>bacterium</i>	100	FJ557205.1
D13	244	<i>Bacillus firmus</i>	97	EU368002.1
D14	244	Uncultured <i>Oceanobacillus</i> sp.	97	EU862162.1
D15	241	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	100	EU689054.1
D16	244	Uncultured <i>Bacillaceae</i> bacterium	95	EU862155.1
D17	237	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	99	EU689058.1
D18	245	Uncultured <i>bacterium</i>	94	EU873643.1
D19	216	Uncultured <i>Clostridium</i> sp.	100	AY883100.1

2.3 对 DGGE 图谱的生态学分析

2.3.1 DGGE 图谱的丰度

在 DGGE 图谱中分析微生物多样性的时候,一个样品的丰度代表这个样品所分离的条带数量,在一定程度上,丰度反映了群落中优势微生物的多样性。通过 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件对豆酱发酵不同时间段的 17 个样品中细菌 16S rDNA V3 区的 DGGE 指纹图谱进行泳道分析,各个泳道的丰度如图 3 所示。

在固体发酵阶段(样品 1—12),样品丰度呈现规律性的变化,由初期的(样品 1,2)丰度值 9(即条带数量为 9 条)升高到 17(样品 9),然后又下降。说明在该阶段,细菌菌群种类出现了变化。在液体发酵阶段(样品 13—17)初期(样品 13)的丰度值为 14(即条带数量为 14 条),之后(样品 14,15,16,17)丰度值一直维持在 11 左右。

从豆酱固体发酵整个过程来看,细菌多样性迅速上升,优势菌群增加,群落演替迅速;主发酵期(样品 7、

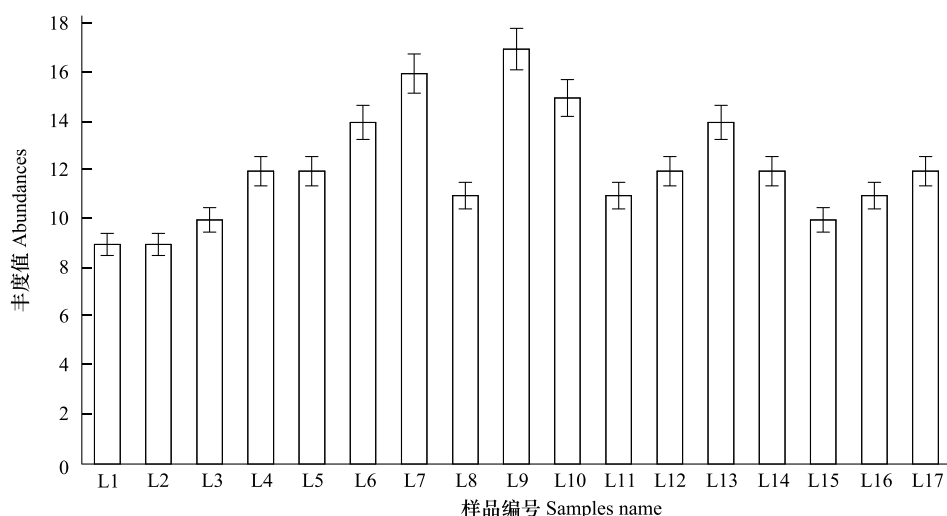


图3 豆酱发酵过程中17个样品的丰度值

Fig. 3 Richness value (Rs) of bacterial community from soybean paste samples in 17 periods

8、9)过程的细菌多样性变化不大。在豆酱固体发酵阶段从主发酵期进入到发酵末期,细菌多样性下降,优势菌群减少,群落演替迅速。由固体发酵进入液体发酵期时,细菌多样性迅速上升,优势菌群有所增加,群落演替迅速;整个液体发酵阶段主发酵期的细菌多样性变化不大,群落结构变化比较稳定;在豆酱液体发酵阶段从主发酵期进入到发酵末期,细菌多样性下降,优势菌群减少,群落演替非常缓慢。

在豆酱的整个发酵阶段既存在原有种属消亡,也有新种属的增长。细菌群落经历了明显的演替过程,群落结构和优势种群数量具有时序动态性。

2.3.2 细菌 DGGE 图谱条带的吸光度与优势度

DGGE 指纹图谱中条带颜色的深浅与生态系统各条带所代表的种群数量相关。相同位置的条带颜色越深,则对应种群在该生态系统中的数量越多;相同位置的条带颜色越浅,则对应种群在该生态系统中的数量越少。

优势度是指某一条带的峰面积占该样品总体峰面积的百分数,与该条带的吸光度及其峰面积成正比。优势度反映的是物种种群数量的变化情况。一个样品中不同条带的优势度值不同,在不同样品中同一水平位置处条带的优势度值也不同。应用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件对 17 个样品中各个条带吸光度与优势度进行统计分析,结果表明(表 2),在豆酱发酵过程中,细菌优势菌群呈现交替变化的情况。

在固体发酵初期,D4,D8,D10(D4 为短乳杆菌,D8 为不可培养的细菌,D10 为枯草芽孢杆菌)数量相对来说较多;进入固体发酵的主发酵期,D5、D6(D5 为中间气单胞菌,D6 为腐生性葡萄菌)的菌群数量较多,而固体发酵初期占优势的菌种菌群数量下降;在固体发酵末期,D5、D6 菌种数量所占的比例有所下降,D18,D19(D18,D19 为不可培养的细菌)菌群数量有所上升。在液体发酵期间的主发酵期,D4、D5、D7(D7 为乳明串珠菌)数量相对来说较多;而进入液体发酵末期,D4 所占的比例有所下降,D7 菌群数量有所上升,D6 成为最终优势菌群。

某一条带的优势度强,说明该条带与同一泳道中其他条带相比菌群数量要多;某一条带的优势度低,则说明该条带与同一泳道中其他条带相比菌群数量要少。在豆酱发酵的固体发酵阶段和液体发酵阶段,随着时间的变化,豆酱中的优势菌也随之变化。优势度与吸光度都是衡量种群间数量的单位,但是优势度值除了与条带颜色深浅有关,还与峰面积有关,所以优势度值与吸光度值并不完全一致,吸光度值大的条带不一定是该样品中的最优势的条带。

表 2 17 个样品的吸光度与优势度

Table 2 The absorbance and the degree of dominance of bacterial community from soybean paste samples in 17 periods				
样品 Samples	最高吸光度/% The maximum absorbance	最低吸光度/% The minimum absorbance	最高优势度/% The highest dominance	最低优势度/% The lowest dominance
1	D8,12.60	D6,9.75	D8,24.73	D6,0.03
2	D8,14.32	D3,11.39	D11,18.22	D4,5.22
3	D8,12.10	D14,6.51	D8,18.37	D6,5.61
4	D8,12.12	D17,4.78	D12,15.79	D16,0.90
5	D8,11.45	D16,5.25	D12,16.49	D14,1.34
6	D5,13.56	D16,3.99	D3,24.38	D19,0.14
7	D17,9.38	D1,4.84	D17,14.80	D8,1.79
8	D5,14.93	D17,4.81	D3,26.01	D17,0.82
9	D11,8.45	D19,3.30	D8,15.26	D19,0.31
10	D18,12.15	D12,4.62	D19,18.78	D9,0.96
11	D18,16.36	D9,6.86	D18,28.85	D1,1.24
12	D18,12.10	D9,5.03	D18,19.42	D11,0.32
13	D4,10.89	D14,4.90	D5,20.44	D7,2.11
14	D7,15.99	D10,4.62	D7,33.72	D11,1.09
15	D5,16.58	D18,6.02	D6,45.01	D18,1.07
16	D6,15.17	D15,4.71	D8,21.52	D15,0.37
17	D6,12.83	D13,4.06	D6,15.38	D10,0.44

2.3.3 细菌 DGGE 图谱条带的多样性指数

多样性指数综合表示环境中的生物多样性情况。多样性指数的高低反映优势菌群种类的多少,种群数量的多寡和种群个体分配均匀度的高低情况。不同时间豆酱发酵样品中细菌的多样性指数如表 3。

由表 3 中可见,固体发酵阶段的发酵初期的多样性指数为 3.06,在固体发酵阶段的整个主发酵期中,多样性指数一直维持在 3.3—3.7 之间,在发酵开始 42 d 和 56 d 时,多样性指数出现两个高峰,分别为 3.77 和 3.65,在发酵 70 d 时多样性指数回到 2.90,在固体发酵阶段的发酵末期,多样性指数又升为 3.10,说明有新的菌种大量产生。液体发酵阶段的主发酵期多样性指数为 3.28,在发酵 98 d 时多样性指数回到 2.52 和 2.29,在固体发酵阶段的发酵末期,多样性指数一直维持在 3.0—3.1 之间,说明有新的菌种大量产生。

表 3 豆酱发酵 17 个不同时期的样品的 Shannon-Weiner 指数

Table 3 Shannon-Weiner indexes of soybean paste samples in 17 periods samples			
泳道编号 Lane number	Shannon-Weiner 指数 Shannon-Weiner indexe	泳道编号 Lane number	Shannon-Weiner 指数 Shannon-Weiner indexe
1	2.81	10	3.33
2	3.06	11	2.90
3	3.17	12	3.10
4	3.34	13	3.28
5	3.35	14	2.52
6	3.18	15	2.29
7	3.77	16	3.01
8	3.01	17	3.13
9	3.65		

3 讨论

豆酱发酵过程依赖于多菌种的交互作用和共同作用,研究认为,在豆酱发酵过程的制曲阶段、液体发酵初期和液体发酵末期,涉及的主要微生物为霉菌、酵母菌和乳酸菌^[7]。随着研究的不断深入,人们迫切希望知道,在整个的豆酱生产过程中,细菌究竟是怎样的变化过程?究竟有哪些细菌参与到这个过程?他们都扮演着什么角色?由于传统形态培养具有一定的困难性和局限性,得到的分析结果误差较大^[8-10],在一定程度上会改变微生物群落原有的结构,因此,近几年来,人们开始尝试使用 PCR-DGGE 技术研究发酵食品的微生物

群落组成和动态变化。

本文即是采用 PCR-DGGE 技术,对我国东北地区传统豆酱中细菌的菌群结构及动态变化过程进行了分析,结果显示,在固体发酵初期、固体主发酵时期和液体发酵时期,共可检测到气单胞菌属,绿色魏斯氏菌,木糖葡萄球菌,短乳杆菌,中间气单胞菌,腐生性葡萄球菌,乳明串珠菌,格雷(氏)李斯特(氏)菌,枯草芽孢杆菌,葡萄球菌,坚硬芽孢杆菌,嗜盐四链球菌和 6 种不可培养的细菌。这充分体现出豆酱发酵过程中细菌的多样性。同时,该结果也较利用传统分离方法得到的细菌菌群结构组成更加丰富;贡汉坤^[7]利用传统方法共分离出 3 种细菌,分别是片球菌 765 (*Pediococcus* spp.)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* 710),芽孢杆菌(*Bacillus*),本研究也利用传统分离方法进行了细菌分离,分离出 6 种乳酸菌(数据未给出)。由此可以看出,利用 PCR-DGGE 方法进行豆酱发酵过程中细菌多样性检测,可以使人们获得更加有价值的信息。

另外,传统豆酱中细菌多样性与样品来源有较大关系。比较高秀芝^[11]利用 PCR-DGGE 技术对天源酱园豆酱细菌多样性的检测结果可以看出,二者分离出了一些共同菌群,如绿色魏斯氏菌,芽孢杆菌、乳酸菌,但是本文对细菌种类信息的获得更加丰富,除这些共同种群外,还分离出了另外 7 类细菌。

豆酱发酵过程中细菌种群出现了一定演替规律:从 Shannon-Weiner 指数看,细菌菌群多样性呈现出低-高-低的变化规律,同时,优势菌群也出现规律的演替变化,即 D8→D18→D6。占优势的细菌是一些不可培养的微生物,这是之前研究中所没有发现的问题。

References:

- [1] Zhou J Z, Dong M S, Jiang H H. Screen of dominating microbial species isolated from Tibetan kefir using an integrated approach of PCR-DGGE and culture-dependent methods. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(8): 1632-1638.
- [2] Ampe F, Ben Omar N, Moizan C, Wachter C, Guyot J P. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(12): 5464-5473.
- [3] Ercolini D, Hill P J, Dodd C E R. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3540-3548.
- [4] Lee J S, Heo G Y, Lee J W, Oh Y J, Park J A, Park Y H, Pyun Y R, Ahn J S. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 102(2): 143-150.
- [5] Wu G F. Investigation of Gastrointestinal Microbial Flora in Piglets with Different Ages by PCR-DGGE [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2009.
- [6] Borneman J, Hartin R J. PCR primer that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied And Environmental. Microbiology*, 2000, 60(10): 4356-4360.
- [7] Gong H K, Yao H Q. The microbiology analysis of spontaneously fermentation for traditional salted and fermented soybean paste. *China Condiment*, 2003, (10): 9-12.
- [8] Chen X Q, Yin H W. Progress on analytical methods used in microbial community diversity. *Shanghai Environmental Sciences*, 2003, 22(3): 213-222.
- [9] Zhang J E, Cai Y F, Gao A X, Zhu L X. Review on laboratory methods for soil microbial diversity. *Soils*, 2004, 36(4): 346-350.
- [10] Jiao X D, Wu F Z. Progress of the methods for studying soil microbial diversity. *Chinese Journal of Soil Science*, 2004, 35(6): 789-792.
- [11] Gao X Z, Wang X F, Liu H, Tong Q G, Wang X D, Zhang Q Z, Cui Z J. Microbial diversity of Tianyuan Jiangyuan soybean paste during fermentation as analyzed by PCR-DGGE. *Food Science*, 2011, 32(1): 112-114.

参考文献:

- [1] 周剑忠,董明盛,江汉湖. PCR-DGGE 指纹技术与分离技术结合筛选藏灵菇奶发酵过程的优势菌. *中国农业科学*, 2006, 39(8): 1632-1638.
- [5] 吴高峰. 应用 PCR-DGGE 技术对不同日龄仔猪肠道菌群分布规律的研究 [D]. 郑州:河南农业大学, 2009.
- [7] 贡汉坤,姚海清. 传统酱类自然发酵的微生物学分析. *中国调味品*, 2003, (10): 9-12.
- [8] 陈晓倩,殷浩文. 微生物群落多样性分析方法的进展. *上海环境科学*, 2003, 22(3): 213-222.
- [9] 章家恩,蔡燕飞,高爱霞,朱丽霞. 土壤微生物多样性实验研究方法概述. *土壤*, 2004, 36(4): 346-350.
- [10] 焦晓丹,吴凤芝. 土壤微生物多样性研究方法的进展. *土壤通报*, 2004, 35(6): 789-792.
- [11] 高秀芝,王小芬,刘慧,仝其根,王晓东,张启增,崔宗均. PCR-DGGE 分析天源酱园豆酱发酵过程中微生物多样性. *食品科学*, 2011, 32(1): 112-114.

CONTENTS

Physiological responses of five deciduous broad-leaved tree seedlings in the Northeast Area of China to burning	WANG Rong, HU Haiqing (2303)
The occurrence regularity of psyllid in <i>Haloxylon</i> spp and its influencing factors	LI Fenlian, WU Xuehai, WANG Peiling, et al (2311)
The estimating of the spatial distribution of forest biomass in China based on remote sensing and downscaling techniques	LIU Shuangna, ZHOU Tao, SHU Yang, et al (2320)
Multivariate correlation analysis between landscape pattern and water quality	ZHAO Peng, XIA Beicheng, QIN Jianqiao, et al (2331)
Red fox habitat selection and landscape feature analysis in the Dalai Lake Natural Reserve in Inner Mongolia	ZHANG Honghai, LI Chengtao, DOU Huashan, et al (2342)
Research on assemblage characteristics of macroinvertebrates in the Yalu Tsangpo River Basin	XU Mengzhen, WANG Zhaoyin, PAN Baozhu, et al (2351)
Climate change induced potential range shift of the crested ibis based on ensemble models	ZHAI Tianqing, LI Xinhai (2361)
Analysis of the sources of second generation meadow moth populations that immigrated into Chinese pastoral areas in 2010	ZHANG Li, ZHANG Yunhui, ZENG Juan, et al (2371)
Genetic diversity based on cytochrome <i>b</i> gene analysis of different geographic populations of blue sheep in China	LI Nannan, LIU Zhensheng, WANG Zhenghuan, et al (2381)
Soil microbial properties under different grain-for-green patterns in depressions between karst hills	LU Shiyang, PENG Wanxia, SONG Tongqing, et al (2390)
Ecosystem and soil respiration of a poplar plantation on a sandy floodplain in Northern China	FANG Xianrui, ZHANG Zhiqiang, ZHA Tonggang, et al (2400)
Estimating total nitrogen content in water body based on reflectance from wetland vegetation	LIU Ke, ZHAO Wenji, GUO Xiaoyu, et al (2410)
Analysis on complete F type of mitochondrial genome in <i>Lamprotula lei</i>	CHEN Ling, WANG Guiling, LI Jiale (2420)
The source-sink landscape pattern change and its effect on phosphorus pollution in Yuqiao watershed	LI Chongwei, HU Jie, WANG Sa, et al (2430)
Responses of soil nematode communities to soluble salt contamination around Gangue hill in Fushun	ZHANG Weidong, LV Ying, XIAO Ying, et al (2439)
Effect of aboveground competition on biomass partitioning of understory Korean pine (<i>Pinus koraiensis</i>)	WANG Jinsong, FAN Xiuhua, FAN Juan, et al (2447)
Research of methane metabolic microbial community in soils of slash pine plantation and Masson pine plantation	WANG Yun, ZHENG Hua, CHEN Falin, et al (2458)
$\delta^{13}\text{C}$ values of stem phloem water soluble sugars of <i>Pinus massoniana</i> and <i>Cunninghamia lanceolata</i> response to meteorological factors	LU Yuxi, WANG Zhenxing, ZHENG Huaizhou, et al (2466)
Soil respiration patterns during restoration of vegetation in the Shapotou area, Northern China	GAO Yanhong, LIU Lichao, JIA Rongliang, et al (2474)
Dynamics of caloric value of <i>Robinia pseudoacacia</i> L. energy forest in the west of Henan Province	TAN Xiaohong, LIU Shiqi, MA Luyi, et al (2483)
<i>Ex-situ</i> symbiotic seed germination of <i>Dendrobium catenatum</i>	WU Huifeng, SONG Xiqiang, LIU Hongxia (2491)
Effects of red/far red ratio on morphological index, leaf area and dry matter partitioning of cut chrysanthemum flower	YANG Zaiqiang, ZHANG Jibo, LI Yongxiu, et al (2498)
Effect of prometryne on root activity and oxidative stress of <i>Polygala tenuifolia</i> Willd. seedling roots	WEN Yinyuan, GUO Pingyi, YIN Meiqiang, et al (2506)
Combined effects of elevated O_3 concentration and UV-B radiation on photosynthetic characteristics of soybean	ZHENG Youfei, XU Weimin, WU Rongjun, et al (2515)
Nutrients transfer for host plant and litter decomposition by AMF in Karst soil	HE Yuejun, ZHONG Zhangcheng, DONG Ming (2525)
The dynamics of bacteria community diversity during the fermentation process of traditional soybean paste	GE Jingping, CHAI Yangyang, CHEN Li, et al (2532)
Effect of site-specific fertilization on soil phosphorus in purple garden soil	SUN Qianqian, WANG Zhengyin, ZHAO Huan, et al (2539)
A method of determining standards for ecological compensation in agricultural areas, giving priority to environmental flows in water allocation	PANG Aiping, SUN Tao (2550)
The loss of ecosystem services value caused by food security assessment model and its application	LU Weiye, JIANG Zhide, ZHANG Yinglong, et al (2561)
Review and Monograph	
Review of the current situation of coastal ecological engineering using dredged marine sediments and prospects for potential application in China	HUANG Huamei, GAO Yang, WANG Yinxia, et al (2571)
Discussion	
Quorum sensing in anaerobic ammonium oxidation bacteria	DING Shuang, ZHENG Ping, ZHANG Meng, et al (2581)
Health evaluation of Dongting Lake based on morphological characters	SHUAI Hong, LI Jingbao, XIA Beicheng, et al (2588)
Scientific Note	
Effects of mix-leaf litter decomposition of different trees in the Loess Plateau	LIU Zengwen, DU Liangzhen, ZHANG Xiaoxi, et al (2596)
Changes in soil active organic carbon under different management types of bamboo stands	MA Shaojie, LI Zhengcai, WANG Bin, et al (2603)
Effects of drought stress on photosynthesis and associated physiological characters of pepper	OU Lijun, CHEN Bo, ZOU Xuexiao (2612)
Effects of silicon application and drought stress on photosynthetic traits and mineral nutrient absorption of rice leaves	CHEN Wei, CAI Kunzheng, CHEN Jining (2620)

《生态学报》2012 年征订启事

《生态学报》是中国生态学学会主办的自然科学高级学术期刊,创刊于 1981 年。主要报道生态学研究原始创新性科研成果,特别欢迎能反映现代生态学发展方向的优秀综述性文章;研究简报;生态学新理论、新方法、新技术介绍;新书评介和学术、科研动态及开放实验室介绍等。

《生态学报》为半月刊,大 16 开本,280 页,国内定价 70 元/册,全年定价 1680 元。

国内邮发代号:82-7 国外邮发代号:M670 标准刊号:ISSN 1000-0933 CN 11-2031/Q

全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系购买。欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆等订阅。

通讯地址:100085 北京海淀区双清路 18 号 电 话:(010)62941099; 62843362

E-mail: shengtaixuebao@rcees.ac.cn 网 址: www.ecologica.cn

编辑部主任 孔红梅 执行编辑 刘天星 段 靖

生 态 学 报

(SHENGTAI XUEBAO)

(半月刊 1981 年 3 月创刊)

第 32 卷 第 8 期 (2012 年 4 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA

(Semimonthly, Started in 1981)

Vol. 32 No. 8 2012

编 辑	《生态学报》编辑部 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085 电话:(010)62941099 www.ecologica.cn shengtaixuebao@rcees.ac.cn	Edited by	Editorial board of ACTA ECOLOGICA SINICA Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China Tel:(010)62941099 www.ecologica.cn Shengtaixuebao@rcees.ac.cn
主 编	冯宗炜	Editor-in-chief	FENG Zong-Wei
主 管	中国科学技术协会	Supervised by	China Association for Science and Technology
主 办	中国生态学学会 中国科学院生态环境研究中心 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085	Sponsored by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
出 版	科 学 出 版 社 地址:北京东黄城根北街 16 号 邮政编码:1000717	Published by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷	北京北林印刷厂	Printed by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
发 行	科 学 出 版 社 地址:东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717 电话:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net	Distributed by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net
订 购	全国各地邮局	Domestic	All Local Post Offices in China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址:北京 399 信箱 邮政编码:100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China
广告经营 许 可 证	京海工商广字第 8013 号		



ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 70.00 元