

DOI: 10.5846/stxb201710161857

周家喜, 喻理飞, 张健, 张晓敏, 胡大鸣, 欧明毅, 邹晓. 烟叶陈化过程中细菌群落演替特征研究. 生态学报, 2018, 38(21): - .

Zhou J X, Yu L F, Zhang J, Zhang X M, Hu D M, Ou M Y, Zou X. Study on the characteristics of bacterial community succession in tobacco aging. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(21): - .

烟叶陈化过程中细菌群落演替特征研究

周家喜¹, 喻理飞¹, 张 健¹, 张晓敏², 胡大鸣², 欧明毅², 邹 晓^{1,*}

¹ 贵州大学生命科学学院 生态系, 贵阳 550025

² 贵州中烟工业有限责任公司, 贵阳 550001

摘要:以储存在贵阳库(GY)、坛厂库(TC)及紫云库(ZY)的云南保山 C3F 烟叶为研究对象, 对不同陈化时间(0、6、12、18、24 个月)的烟叶样品提取微生物总 DNA, 利用 Illumina HiSeq 平台对细菌的 16S rRNA V4 区进行高通量测序, 并结合主要化学成分分析, 以期揭示烟叶陈化过程中细菌群落演替规律及其与烟叶化学成分间的作用关系。研究表明, 烟叶细菌群落以假单胞菌属、鞘氨醇单胞菌属、寡养单胞菌属、芽孢杆菌属为优势属; 随陈化时间的增加, 细菌优势群落呈现出变形菌门和厚壁菌门间消长变化的趋势, 陈化后期芽孢杆菌(厚壁菌门)优势度明显增强; 烟叶陈化过程中, 细菌优势功能群变化与化学成分逐级降解间呈显著的相关关系, 主要表现为由降解糖类菌群向降解淀粉类菌群, 再向降解纤维素类菌群变化的趋势; 其中, 影响菌群演替的关键因素是水溶性总糖和纤维素。本研究揭示了在烟叶陈化过程中存在显著的细菌群落演替特征, 加深了对烟叶陈化机制的理解, 为微生物调控烟叶陈化过程提供了科学依据。

关键词:高通量分析; 群落结构; 演替规律; 化学组分

Study on the characteristics of bacterial community succession in tobacco aging

ZHOU Jiaxi¹, YU Lifei¹, ZHANG Jian¹, ZHANG Xiaomin², HU Daming², OU Mingyi², ZOU Xiao^{1,*}

¹ Department of Ecology, College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China

² Guizhou Tobacco Industry Limited Liability Company, Guiyang 550001, China

Abstract: In this study, we investigated the relationship between the community succession and chemical composition of the bacteria isolated from tobacco. The tobacco sample C3F (2013) obtained from Baoshan City, Yunnan Province, was stored in Guiyang (GY), Tanchang (TC), and Ziyun (ZY) storerooms. The 16S rRNA genes of the bacteria isolated from the samples aged 0, 6, 12, 18, and 24 months were sequenced using the Illumina HiSeq2500 high-throughput sequencing platform. The results showed that the *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, and *Bacillus* genera were dominant in the bacterial community. With an increase in aging time, a growth-decline trend was observed between Proteobacteria and Firmicutes in the dominant bacterial communities, and the genus *Bacillus* was significantly dominant in the later successional stage. In the process of tobacco aging, a significant correlation was found between the dominant functional groups of bacteria and the progressive decomposition of their chemical components. The dynamics of the dominant functional groups of bacteria changed from carbohydrate-like to starch-like and then to cellulose-like. The water-soluble sugar and cellulose were the key factors involved in succession. This study revealed a significant characteristic of the bacterial community succession during aging in tobacco, thereby elucidating the mechanism of tobacco aging and providing a scientific basis for using microbes to control tobacco aging.

基金项目:贵州中烟工业有限责任公司科技项目[黔烟工计(2015)8号]; 贵州省生物学一流学科建设项目(GNYL[2017]009)

收稿日期:2017-10-16; **网络出版日期:**2018-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xzou@gzu.edu.cn

Key Words: high-throughput analysis; community structure; succession principles; chemical composition

烟叶陈化是指在人工可控的仓储环境下烟叶与微生物及环境相互作用的发酵过程,在此过程中,仓储环境因子(温度、湿度等)、烟叶化学组分(总糖、蛋白质、淀粉、生物酶等)含量、烟叶水分及酸碱度等与烟叶表面微生物彼此联系、互相促进、互相制约共同构成了烟叶陈化的特定生态系统,并在物质流、能量流和基因流“三流运转”规律的交互作用下构成了烟叶微生态的动态发展和特定阶段的动态平衡^[1]。环境信息的传递和烟叶化学物质的改变直接或间接的影响着烟叶微生物的种类和数量及代谢产物的产生与积累,并最终决定着物质和能量的走向^[2-3],因此,研究仓储生态因子和烟叶化学成分的改变对烟叶微生物群落结构和功能的影响具有重要意义。随着烟叶陈化的不断进行,微生物群落的消长演替又会引起烟叶组分微环境的变化^[4],如蛋白质、淀粉、糖类、纤维素等大分子物质降解^[5-6]及紫罗兰酮、大马酮、糠醛等小分子物质产生^[7-8]。环境因子变化也会作用于微生物,并导致群落结构及代谢产物的成分和比例发生变化,最终形成产品特有的生态风味^[9],所以,研究微生物群落动态变化对了解烟叶陈化生态系统的运行很有必要。

烟叶陈化过程中占优势的微生物群落以细菌类为主^[10],但是目前 90%—99% 的微生物处于不可培养状态^[11],因此本研究依托二代测序的技术优势^[12]对样品中微生物菌群进行分析,同时结合分析陈化过程中烟叶化学组分的变化,揭示细菌群落变化过程与烟叶化学组分之间作用规律,加深对烟叶陈化机制的理解。

1 材料与方法

1.1 材料

样品:分别陈化了 0、6、12、18、24 个月的云南保山 C3F 烟叶样品(产地:云南保山地区;品种:云 87;等级:C3F);采集地:贵阳库(GY)、坛厂库(TC)、紫云库(ZY);采集方式:除去烟箱表层烟叶,按五点式收集烟叶样品,500g,存于-20℃冰箱中,各库样品同一时间内采集;采集时间:2014 年 7 月、2015 年 1 月、2015 年 7 月、2016 年 1 月、2016 年 7 月;编号:GY-0、TC-0、ZY-0、GY-6、TC-6、ZY-6、GY-12、TC-12、ZY-12、GY-18、TC-18、ZY-18、GY-24、TC-24、ZY-24。

1.2 方法

1.2.1 烟叶微生物收集与总 DNA 提取

参照 Zhao 等^[13]和 Su 等^[14]的网膜法收集烟叶总微生物。称取 60g 烟叶样品,剪碎,平均分成 3 份,分别置于三个装有 200mL pH=7.0 磷酸缓冲溶液(PBS)的三角瓶中,27℃、200r/min 震荡培养 1h;用已灭菌的双层纱布过滤培养物,收集滤液;6000r/min 室温离心 30min,收集沉淀;加入 20mL PBS 缓冲液,重新制成菌悬液,6000r/min 离心,收集沉淀,最后将相同样品的沉淀物汇集到一起,即为烟叶总微生物。参照 OMEGA 公司 E.Z.N.A.® SoIL DNA Kit 试剂盒说明方法提取微生物总 DNA。提取的总 DNA 送北京诺和致源科技股份有限公司进行高通量测序。

1.2.2 PCR 扩增及高通量测序

选取 16S rRNA 基因 V4 片段进行 PCR 扩增,扩增产物使用 HiSeq2500 PE250 进行上机测序。选用引物:515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。反应体系(30μL):Phusion Master Mix(2×) 15μL;Primer1(2μM) 1.5μL;Primer2(2μmol/L) 1.5μL;DNA 模板(1ng/μL) 10μL;H₂O 2μL。反应程序:98℃ 预变性 1min;98℃ 10s,50℃ 30s,72℃ 5min,共 30 个循环;72℃ 延伸 5min。

1.2.3 化学物质检测

参照李永忠等^[15]方法进行烟叶常规化学物质检测,每个样品设置 3 个重复。有机碳采用高温外热重铬酸钾氧化容量法;全氮采用 H₂SO₄-H₂O₂消化-蒸馏法;全磷采用 H₂SO₄-H₂O₂消化-钼黄比色法;全钾采用 H₂SO₄-H₂O₂消化-火焰分光光度法;水溶性总糖采用 80%酒精浸提-蒽酮比色法;烟碱采用碱蒸馏-紫外分光光度法;淀粉采用稀酸水解-蒽酮比色法;蛋白质采用凯氏定氮法;粗纤维采用酸碱洗涤-重量法;石油醚浸提物采

用石油醚浸提-重量法。

1.2.4 数据处理

①序列处理及 OTU 注释:根据 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列从下机数据中拆分出各样品数据,截去 Barcode 和引物序列后使用 FLASH^[16] 对每个样品的 Reads 进行拼接,得到原始 Tags 数据;参照 Qiime^[17] 的 Tags 质量控制流程,经过 Tags 截取、过滤及嵌合体去除等处理后得到高质量的有效 Tags 数据。利用 Uparse 软件,以 97%的一致性将序列聚类为 OTUs (Operational Taxonomic Units),选取 OTUs 的代表性序列用 Mothur 方法与 SSU rRNA 数据库对 OTUs 进行物种注释,并在 OTU 水平上进行 α 多样性分析。

②细菌群落动态变化分析:通过韦恩图分析陈化不同时间的样品 OTUs 分布差异;根据所有样品在属水平的物种注释及丰度信息,选取丰度排名前 35 的类群,从物种和样品两个层面进行聚类,绘制成热图,分析不同陈化时间样品优势细菌类群变化情况;通过 LEfSe 系统分析不同陈化时间的样品间显著差异的物种。

③细菌群落变化与化学成分关系分析:结合不同陈化时间优势细菌及关键类群,利用 SPSS19.0、CANOCO5 等统计学软件对细菌群落与各化学指标进行相关性分析和冗余分析(RDA)。

2 结果与分析

2.1 高通量测序结果

Shannon-Winner 指数曲线可反映各样本的物种多样性随测序量的变化情况^[18]。如图 1 所示,随着样品序列数的增加,Shannon-Winner 指数曲线越趋向平坦,表明本试验测序的数据深度能较全面地反应测序样品中微生物信息。

样品 DNA 高通量测序结果如表 1 所示,经拼接、优化、过滤后得到 1191887 条有效序列,每个样品得 67940—86235 条;以 97%的一致性将序列聚类,平均得到 1099 个 OTU。对不同样品的 α 多样性指数进行对比分析发现,样品细菌丰富度的 Chao1 指数和 ACE 指数分别在 510.34—3528.94 和 520.33—2226.74 之间。反映菌群多样性的 Shannon 和 Simpson 值分别达到 3.47—6.59 和 0.70—0.96。其中,样品 GY-0 细菌最丰富,多样性最大,Shannon 指数达 6.59,样品 ZY-18 多样性最低,Shannon 指数为 3.47;样品 GY-24 和 TC-0 均匀性最好,Simpson 指数均达到 0.97,ZY-18 均匀性最差,Simpson 指数为 0.70。所有样品 Coverage 指数均达到 0.98 以上,表明本次研究所测得的数据足够反应烟叶细菌群落的多样性。

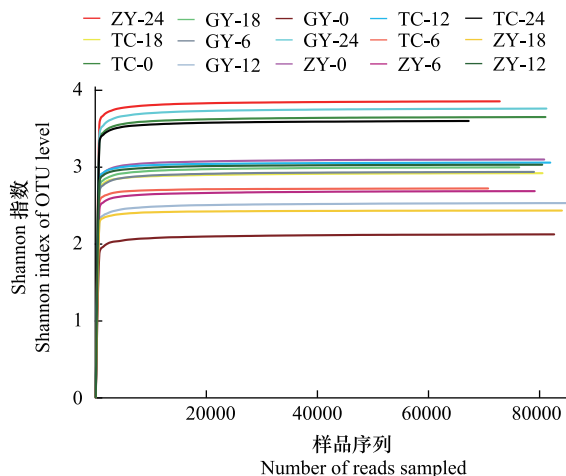


图 1 Shannon-Winner 指数曲线

Fig.1 The Shannon-Winner curves

GY: 贵阳库; TC: 坛厂库; ZY: 紫云库; 0、6、12、18、24: 陈化时间, 0 个月、6 个月、12 个月、18 个月、24 个月

表 1 样品测序结果及 α 多样性指数信息

Table 1 Statistics of sequencing date and alpha diversity index

样品 Sample name	原始序列 Raw sequence	有效序列 Effective sequence	OUT 数 OUT number	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	Chao1 指数 Chao1 index	ACE 指数 ACE index	覆盖度 Coverage
GY-0	86234	83502	1279	6.59	0.96	3528.94	2226.74	0.98
GY-6	83103	79603	1260	4.25	0.77	1311.99	1359.71	0.99
GY-12	89661	86235	1307	3.55	0.66	1074.56	1152.04	0.99
GY-18	79868	76799	1188	5.05	0.88	1422.12	1558.57	0.98
GY-24	86043	82206	1409	6.53	0.97	1360.11	1405.71	0.99

续表

样品 Sample name	原始序列 Raw sequence	有效序列 Effective sequence	OUT 数 OUT number	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	Chao1 指数 Chao1 index	ACE 指数 ACE index	覆盖度 Coverage
TC-0	85814	82030	1395	6.27	0.97	1264.86	1320.29	0.99
TC-6	73782	70909	567	4.05	0.80	510.34	520.33	1.00
TC-12	85259	81963	754	4.53	0.87	784.00	817.03	0.99
TC-18	84139	81051	1027	4.56	0.88	943.40	1008.22	0.99
TC-24	71288	67940	1235	5.62	0.94	1521.42	1606.41	0.98
ZY-0	85144	81542	1209	5.08	0.87	1281.80	1315.23	0.99
ZY-6	82780	79671	1053	3.74	0.78	1148.17	1196.56	0.99
ZY-12	83721	80573	998	4.43	0.86	922.20	1010.75	0.99
ZY-18	88401	84081	570	3.47	0.70	561.24	570.33	1.00
ZY-24	76999	73782	1234	6.07	0.96	1147.04	1217.56	0.99

GY: 贵阳库; TC: 坛厂库; ZY: 紫云库; 0、6、12、18、24: 陈化时间, 0 个月、6 个月、12 个月、18 个月、24 个月

2.2 细菌群落组成

烟叶细菌种类丰富, 分属于 493 个属, 每个样品相对丰度大于 1.0% 的类群组成, 如图 2 所示 (< 1.0% 的归于 Others)。假单胞菌属、鞘氨醇单胞菌属、寡养单胞菌属、芽孢杆菌属为主要优势类群, 其中, 假单胞菌属占主导优势, 占 17.8%—44.3%, 其次是鞘氨醇单胞菌属, 占 8.0%—23.6%。

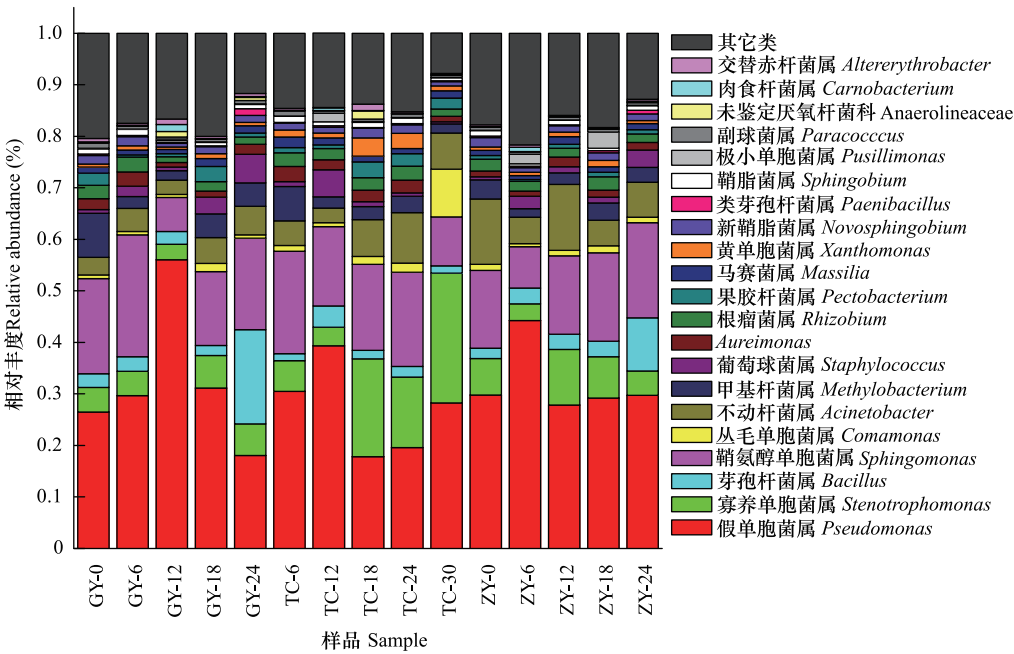


图 2 属水平上相对丰度柱状图
Fig.2 Histogram of relative abundance at the genus level

2.3 不同陈化时间烟叶细菌群落动态演替分析

2.3.1 OTU 变化分析

在 OTU 水平上绘制韦恩图, 如图 3 所示。贵阳库(图 3A)样品有 313 个共有 OTUs, 陈化 0、6、12、18、24 个月时分别有 267、110、90、120、159 个特有 OTUs。坛厂库(图 3B)样品有 170 个共有 OTUs, 陈化 0、6、12、18、24 个月时分别有 249、82、126、115、262 个特有 OTUs。紫云库(图 3C)样品有 176 个共有 OTUs, 陈化 0、6、12、18、24 个月时分别有 192、97、140、41、264 个特有 OTUs。共有的 OTUs 表明这些细菌类群的作用在烟叶陈化过程

中贯穿于陈化的始终,是烟叶陈化的主要细菌类群;不同陈化阶段特有 OTUs 表明烟叶陈化过程中功能细菌群落与陈化进程密切相关,演替现象明显。

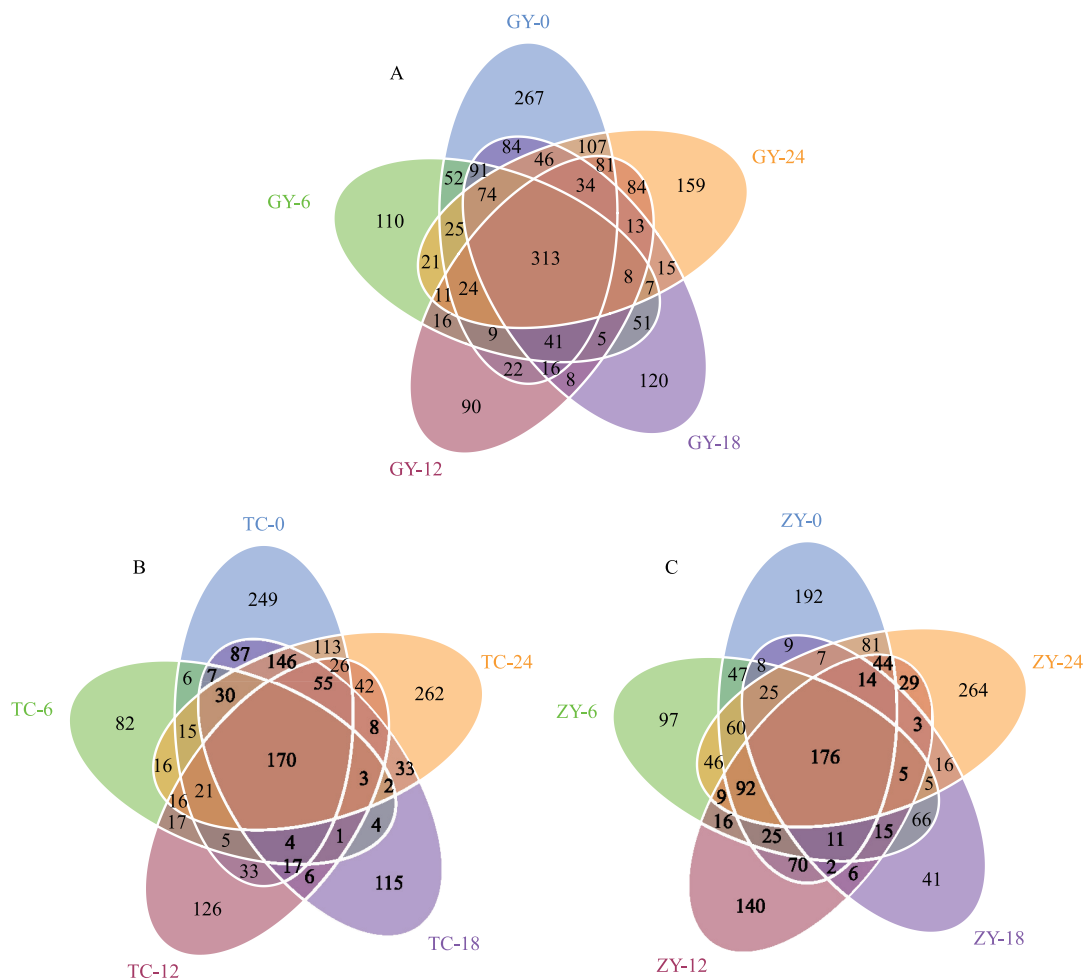


图 3 不同陈化时间样品 OTUs 韦恩图

Fig.3 Analysis of OTUs from samples of different aging time via Venn diagram

图 A: 贵阳库样品 OTUs; 图 B: 坛厂库样品 OTUs; 图 C: 紫云库样品 OTUs

2.3.2 优势细菌类群变化分析

针对陈化不同时间对所有样品进行组合分析,发现烟叶细菌群落结构随陈化时间的延长发生了较大变化(图 4)。陈化开始时拟杆菌门的 *Spingobacterium*, 变形菌门的 *Steroidobacter*、*Aquicella*、*Legionella*、*Pseudoxanthomonas*、*Methylobacterium* 及厚壁菌门的 *Romboutsia* 等类群占优势。6 个月时变形菌门的 *Pusillimonas* 和 *Vulgatibacter* 占优势。12 个月时绿弯菌门的 *unidentified_Anaerolineaceae* 占优势。18 个月时,所有类群的丰度都相对较低,变形菌门的 *Pusillimonas* 占优势。24 个月时,变形菌门的 *Stenotrophomonas* 和 *Comamonas*,厚壁菌门的 *Solibacillus*、*Bacillus*、*Staphylococcus*、*Paenibacillus* 及放线菌门的 *Kocuria* 等类群优势明显。

整体来看,随着烟叶陈化时间的增加,细菌优势类群种类先减少后增加,其中变形菌类逐渐减少,厚壁菌类和放线菌类逐渐增加,这种变化与李晓强研究结果相似^[19]。

2.3.3 关键细菌类群变化分析

通过 LEfSe 分析(LDA 值默认为 4)发现,在烟叶陈化 0、12、24 个月时样品之间具有显著差异的细菌类群,结果如图 5 所示。陈化开始时 *Methylobacterium* 差异显著,起重要作用。陈化 12 个月时 *Enterobacteriaceae*

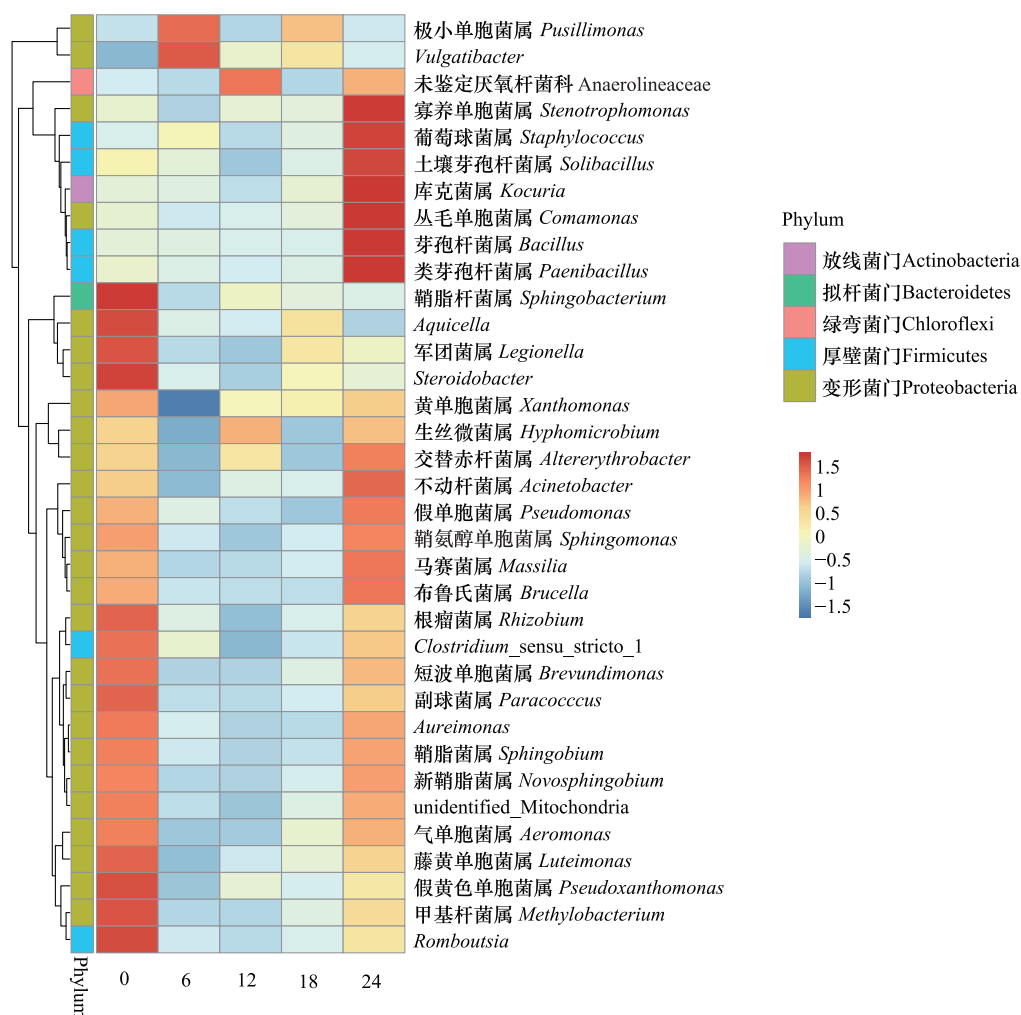


图4 不同陈化时间样品物种丰度聚类热图

Fig.4 Heatmap of species abundance for samples of different aging time

起重要作用。陈化 24 个月时 *Bacillus*、*Sphingomonas*、*Comamonas*、*Pseudomonas* 差异明显, 发挥重要作用。LEfSe 分析表明随烟叶陈化时间延长, 关键优势菌群发生一系列演变, 先是由 *Methylobacterium* 向 Enterobacteriaceae 演变, 随后向 *Bacillus*、*Sphingomonas*、*Comamonas*、*Pseudomonas* 变化。其中, *Methylobacterium*、*Sphingomonas*、*Comamonas*、*Pseudomonas*、Enterobacteriaceae 均属于变形菌门类群, *Bacillus* 属于厚壁菌门类群, 因此, 随陈化时间延长, 厚壁菌门优势逐渐增加, 芽孢杆菌优势度后期明显增强。

2.4 细菌群落演替与烟叶化学成分的关系

RDA 分析结果中, 轴 1 和轴 2 累积变量分别为 50.70% 和 73.24%, 化学物质变化对细菌群落演替整体解释量为 78.90%。据图 6 和表 2 可知, 水溶性总糖对细菌群落动态影响最大, 其次是纤维素。陈化开始时 (I), 水溶性总糖贡献最大, 与 *Pusillimonas* 显著负相关, 相关系数为 -0.546, 与 *Steroidobacter*、*Romboutsia*、*Clostridium_sensu_stricto_1*、*Legionella* 显著正相关, 相关系数分别为 0.613、0.613、0.656、0.517。陈化 12 个月时 (II), 淀粉、石油醚浸提物及总氮、总磷等影响最大, 石油醚浸提物与 *Xanthomonas* 呈显著负相关, 相关系数为 -0.541, 与 *Pusillimonas*、*Vulgatibacter* 呈显著正相关, 相关系数为 0.579、0.524; 总磷与 *Xanthomonas* 呈显著负相关, 相关系数为 -0.528。陈化 24 个月时 (III), 纤维素作用最明显, 与 *Staphylococcus*、*Aureimonas*、*Massilia* 呈显著正相关, 相关系数为 0.562、0.539、0.528。随着时间的延长, 细菌群落发生了由降解糖类向降解淀粉类菌群变化, 再向降解纤维素类菌群变化的演替现象, 这与化合物的逐级降解相关。

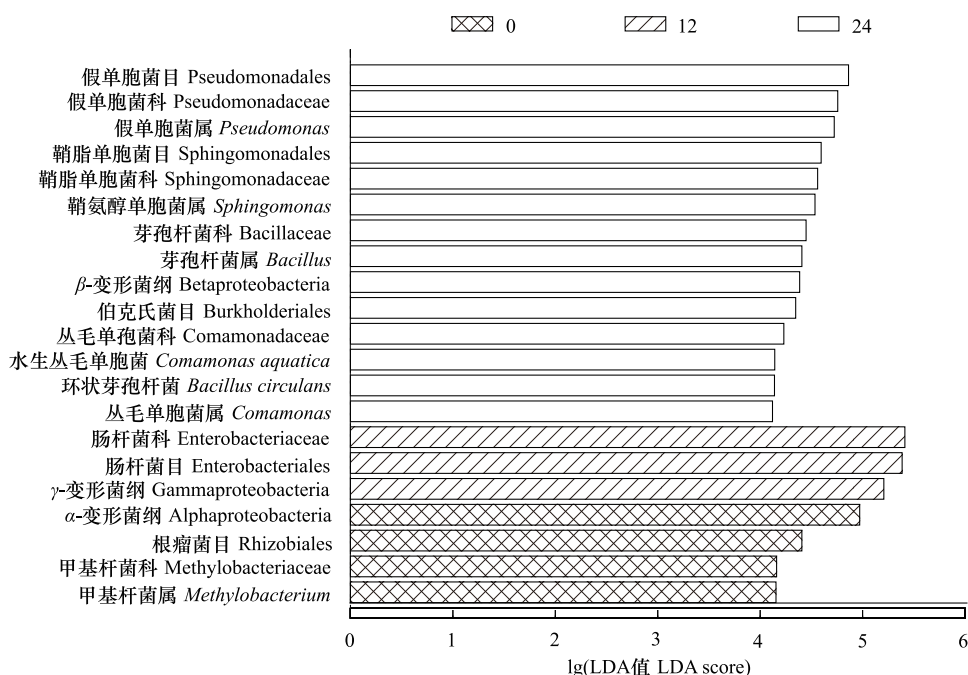


图5 不同陈化时间物种 LDA 值分布柱状图

Fig.5 The LDA score distribution histogram of LEfSe analysis in different aging time

3 讨论

烟叶陈化是在环境可控的人工仓储设施内进行的自然发酵过程。在此过程中烟叶不仅为复杂的微生物体系提供了栖息地和营养物质,还为微生物活动提供多样的生态位,以维持陈化生态系统的正常运行;反之,微生物在满足自身生长繁殖的同时,分泌各种生物酶分解有机大分子物质,促进烟叶的陈化进程。本研究发发现烟叶表面细菌物种丰富,以假单胞菌属、鞘氨醇单胞菌属、寡养单胞菌属、芽孢杆菌属等为优势类群,这与前人研究结果相似^[20-21]。近年来发现许多假单胞菌菌株能高效降解烟叶尼古丁^[22];部分芽孢杆菌能分泌蛋白酶、淀粉酶等多种生物酶,促进烟叶大分子物质降解^[6];鞘氨醇单胞菌是降解芳香化合物的新型生物资源^[23],对烟叶芳香类化合物的降解具有广泛应用前景。因此,烟叶陈化是多种微生物协同作用的结果,微生物是陈化的主要驱动因子。

烟叶陈化是一个微型动态过程,早期研究表明随陈化时间的延长,烟叶表面细菌数量、种类及多样性后期明显呈下降趋势^[24-25],但对于具体菌群的变化还不明确。本研究结果表明,随陈化时间的增加,细菌群落消长演替,优势细菌类群不断变化,由变形菌门向厚壁菌门演变,芽孢杆菌后期作用显著。目前对于烟叶陈化过程中微生物群落变化主要有两种解释:第一种观点认为是陈化环境条件决定了烟叶上微生物的丰度和种类及其演化过程。Di Giacomo 等研究人员认为,环境温度和 pH 是促进微生物动态演替的主要动力之一^[4]。浦绍占等在研究云南玉溪红塔区和元江县两仓库中不同自然陈化时期的红大品种烤烟表面微生物种群结构时,发现不同时期、不同地点陈化烟叶表面细菌的优势种群不尽相同^[3]。Chopyk 等比较了在室温、冰箱、人的口袋三种不同储存条件下五种不同品牌香烟制品细菌群落组成及动态变化,发现香烟品种对烟叶细菌群落影响不大,而储存条件对烟叶微生物丰度及动态变化影响较大^[26]。这主要是由于不同的储存地或储存方式中环境温度、湿度、pH 及其他生态因子的不同而导致烟叶表面微生物群落结构的差异。第二种观点认为是由于化学成分的改变而引起烟叶微生物群落的改变。叶建斌等曾推测在原烟进入陈化阶段后,由于培养成分的改变,适者生存,不适者淘汰,从而形成了新的微生物群落结构^[27],但他们没有对该推测进行验证。本研究发现(表 2)在烟叶陈化开始时,水溶性总糖的影响较大,与优势菌群甲基杆菌类呈正相关关系;12 个月时,淀粉、

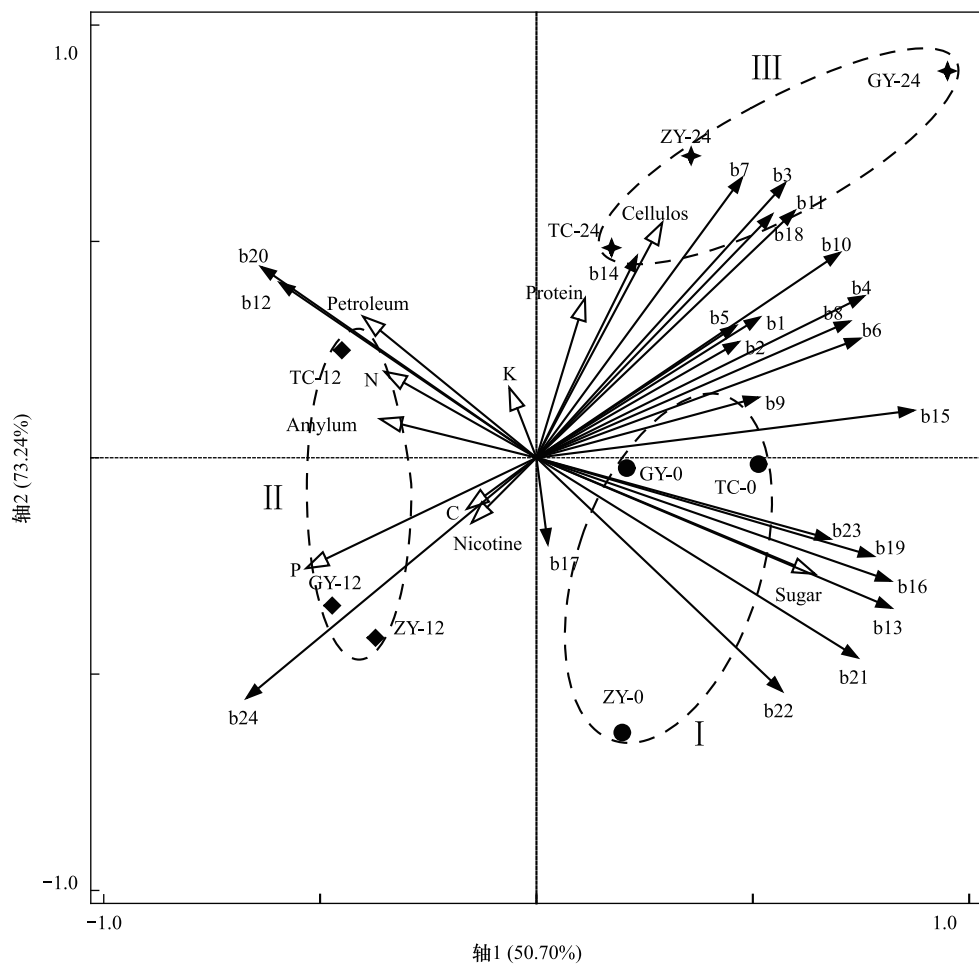


图 6 优势细菌群落与化学物质 RDA 分析

Fig.6 Redundancy analysis based on bacterial community and chemical substance

b1-b24:假单胞菌属 *Pseudomonas*、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*、丛毛单胞菌属 *Comamonas*、甲基杆菌属 *Methylobacterium*、葡萄球菌属 *Staphylococcus*、*Aureimonas*、黄单胞菌属 *Xanthomonas*、马赛菌属 *Massilia*、类芽孢杆菌属 *Paenibacillus*、极小单胞菌属 *Pusillimonas*、*Steroidobacter*、unidentified_ *Anaerolineaceae*、土壤芽孢杆菌属 *Solibacillus*、*Romboutsia*、鞘脂杆菌属 *Sphingobacterium*、库克菌属 *Kocuria*、*Clostridium _ sensu _ stricto _ 1*、*Vulgatibacter*、军团菌属 *Legionella*、*Aquicella*、假黄色单胞菌属 *Pseudoxanthomonas*、肠杆菌科 *Enterobacteriaceae*

表 2 细菌群落变化与烟叶化学成分相关性分析

Table 2 Relationship between bacteria community and chemical substance in tobacco leaves

细菌群落 Bacterial community	有机碳 Organic carbon	氮 Nitrogen	磷 Phosphorus	钾 Potassium	水溶性糖 Water-soluble sugar	淀粉 Amylum	石油醚浸提物 Petroleum ether extract	纤维素 Cellulose	烟碱 Nicotine	蛋白质 Protein
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	0.067	-0.292	-0.326	0.140	0.349	-0.285	-0.060	0.373	-0.071	-0.076
寡养单胞菌属 <i>Stenotrophomonas</i>	-0.323	-0.342	-0.382	0.351	-0.104	-0.210	0.009	0.051	-0.242	0.064
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	-0.143	-0.138	-0.363	-0.197	0.166	0.011	0.069	0.501	-0.052	0.274
鞘氨醇单胞菌属 <i>Sphingomonas</i>	-0.057	0.021	-0.360	0.142	0.327	-0.182	-0.168	0.506	-0.109	0.358
丛毛单胞菌属 <i>Comamonas</i>	-0.274	-0.398	-0.329	0.311	-0.096	-0.176	0.051	0.008	-0.218	-0.057

续表

细菌群落 Bacterial community	有机碳 Organic carbon	氮 Nitrogen	磷 Phosphorus	钾 Potassium	水溶性糖 Water-soluble sugar	淀粉 Amylum	石油醚浸提物 Petroleum ether extract	纤维素 Cellulose	烟碱 Nicotine	蛋白质 Protein
甲基杆菌属 <i>Methylobacterium</i>	0.001	0.098	-0.099	0.140	0.382	-0.249	-0.077	0.323	0.013	0.273
葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	-0.088	-0.052	-0.416	-0.173	0.204	-0.087	0.031	0.562 *	-0.145	0.377
<i>Aureimonas</i>	0.051	0.237	-0.330	0.413	0.311	-0.365	-0.314	0.539 *	-0.173	0.499
黄单胞菌属 <i>Xanthomonas</i>	-0.272	0.348	-0.528 *	0.686 **	0.105	-0.418	-0.541 *	0.213	-0.248	0.429
马赛菌属 <i>Massilia</i>	-0.107	0.005	-0.453	0.371	0.239	-0.332	-0.167	0.528 *	-0.046	0.375
类芽孢杆菌属 <i>Paenibacillus</i>	-0.160	-0.148	-0.358	-0.165	0.179	0.008	0.066	0.487	-0.023	0.241
极小单胞菌属 <i>Pusillimonas</i>	0.133	0.299	0.489	0.033	-0.546 *	0.500	0.579 *	-0.272	0.205	-0.053
<i>Steroidobacter</i>	0.016	-0.196	-0.027	-0.091	0.613 *	-0.316	-0.224	-0.020	-0.073	-0.067
unidentified _Anaerolineaceae	-0.048	0.094	-0.246	0.076	0.100	-0.244	-0.028	0.427	-0.180	0.255
土壤芽孢杆菌属 <i>Solibacillus</i>	-0.046	-0.235	-0.254	-0.110	0.272	-0.149	0.004	0.393	-0.102	0.312
<i>Romboutsia</i>	0.100	-0.245	-0.110	-0.108	0.613 *	-0.214	-0.172	0.018	0.021	-0.067
鞘脂杆菌属 <i>Sphingobacterium</i>	0.235	-0.087	0.222	-0.182	0.088	0.118	0.110	-0.207	0.380	-0.003
库克菌属 <i>Kocuria</i>	-0.240	-0.146	-0.437	-0.329	0.198	0.170	0.010	0.466	0.005	0.050
<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	0.182	-0.314	-0.172	-0.196	0.656 **	-0.117	-0.127	-0.137	0.014	-0.188
<i>Vulgatibacter</i>	0.214	0.352	0.415	0.072	-0.482	0.329	0.524 *	-0.136	0.074	0.052
军团菌属 <i>Legionella</i>	-0.129	-0.225	-0.080	-0.066	0.517 *	-0.348	-0.260	-0.085	-0.163	-0.017
<i>Aquicella</i>	-0.025	-0.050	0.101	-0.127	0.438	-0.247	-0.135	-0.073	-0.015	0.032
假黄色单胞菌属 <i>Pseudoxanthomonas</i>	0.021	0.085	-0.234	0.275	0.455	-0.348	-0.457	0.250	-0.019	0.043
肠杆菌科 Enterobacteriaceae	0.152	0.214	0.415	-0.083	-0.320	0.212	0.038	-0.420	0.138	-0.191

* 在 0.05 水平相关性显著, ** 在 0.05 水平上相关性极显著

石油醚浸提物及总磷、总氮等的影响较大,与肠杆菌类呈正相关关系;24 个月时,纤维素是影响的主要因素,与芽孢杆菌类、鞘氨醇单胞菌类、丛毛单胞菌类、假单胞菌类等优势菌群呈正相关关系。本研究还发现细菌间的衔接与烟叶有机质的逐级降解相关联(图 6),前期主要是以能降解糖类和淀粉的微生物为主,后期主要是以能降解纤维素和木质素的微生物为主。这充分证实了化学成分的改变是微生物群落演替变化的主要动力之一。

在烟叶陈化生态系统中,陈化是在微生物的驱动下进行的,而烟叶的陈化伴随着微生物的演替,微生物的演替受陈化环境和化学成分的共同驱动。通过对烟叶微生物群落组成、群落演替分析,可以确定最优的微生物群落组成,对微生物群落变化与化学成分关系分析,有助于烟叶陈化进程的人工调控。

参考文献(References):

- [1] 唐由凯. 论微生态系统及系统分析. 中国微生态学杂志, 2000, 12(2): 116-118.
- [2] 汪长国, 李宁, 寇明钰, 冯广林, 杨文敏, 吴艳, 刘林, 戴亚, 张燕. 复烤烟叶异地醇化过程中生物活性的变化. 中国农业大学学报,

- 2013, 18(2): 105-109.
- [3] 浦绍占, 马永凯, 刘敏, 宋鹏飞, 王毅, 苏杨, 季秀玲, 魏云林. 玉溪地区自然陈化烟叶表面可培养细菌多样性研究. 中国微生态学杂志, 2016, 28(8): 920-925.
- [4] Di Giacomo M, Paolino M, Silvestro D, Vigliotta G, Imperi F, Visca P, Alifano P, Parente D. Microbial community structure and dynamics of dark fire-cured tobacco fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(3): 825-837.
- [5] Vigliotta G, Di Giacomo M, Carata E, Massardo D R, Tredici S M, Silvestro D, Paolino M, Pontieri P, Del Giudice L, Parente D, Alifano P. Nitrite metabolism in *Debaryomyces hansenii* TOB-Y7, a yeast strain involved in tobacco fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(3): 633-645.
- [6] 李浩宇, 崔尹贍, 季秀玲, 魏云林, 余会喜, 马永凯, 王毅, 苏杨, 唐兴宏. 醇化烟叶产蛋白酶菌株的分离鉴定及其对烟叶内在品质影响. 中国微生态学杂志, 2015, 27(12): 1376-1380.
- [7] Maldonado-Robledo G, Rodríguez-Bustamante E, Sanchez-Contreras A, Rodríguez-Sanoja R, Sanchez S. Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 62(5/6): 484-488.
- [8] 贾蓓蕾, 魏涛, 黄申, 贾春晓, 杨靖, 张改红, 白冰, 毛多斌. α -胡萝卜素降解产香菌株的分离、鉴定及发酵条件优化. 食品与发酵工业, 2015, 41(1): 34-39.
- [9] 向文良, 张文学, 胡承, 王忠彦, 汤月琴, 木田建次, 重松亨. 中国浓香型白酒窖池中原核微生物的特性及系统发育分析. 四川大学学报: 工程科学版, 2005, 37(1): 39-42.
- [10] Morin A, Porter A, Joly J, Ratavicius A. Evolution of tobacco-specific nitrosamines and microbial populations during flue-curing of tobacco under direct and indirect heating. *Beiträge Zur Tabakforschung International/Contributions to Tobacco Research*, 2004, 21(1): 40-46.
- [11] Su C, Lei L P, Duan Y Q, Zhang K Q, Yang J K. Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(3): 993-1003.
- [12] 龚俊, 刘玉配, 李媛媛. 烟叶表面微生物类群两种检测方法的比较研究. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2016, (3): 92-101.
- [13] Zhao M Q, Wang B X, Li F X, Qiu L Y, Li F F, Wang S M, Cui J K. Analysis of bacterial communities on aging flue-cured tobacco leaves by 16S rDNA PCR-DGGE technology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 73(6): 1435-1440.
- [14] Su C, Gu W, Zhe W, Zhang K Q, Duan Y Q, Yang J K. Diversity and phylogeny of bacteria on Zimbabwe tobacco leaves estimated by 16S rRNA sequence analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(5): 1033-1044.
- [15] 李永忠, 丁金玲. 烟草化学成分分析实验指导书[D]. 昆明: 云南农业大学烟草学院, 2007.
- [16] Mago T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [17] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman F D, Costello E K, Fierer N, Peña A G, Goodrich J K, Gordon J I, Huttley G A, Kelley S T, Knights D, Koenig J E, Ley R E, Lozupone C A, McDonald D, Muegge B D, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky J R, Turnbaugh P J, Walters W A, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [18] 毛伟华, 吴三玲, 张旭. 土壤微生物 16S rDNA 的 Ion Torrent PGM 高通量检测方法构建与应用. 浙江农业学报, 2015, 27(12): 2165-2170.
- [19] 李晓强. 陈化烤烟烟叶表面优势菌株的定量检测与诱变增效研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2008.
- [20] 张晓娟. 雪茄外包皮烟人工发酵工艺及叶表微生物区系研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2006.
- [21] 陈小敏, 林影, 梁书利. 烟叶表面微生物群落结构鉴定及其产酶分析. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(7): 1760-1766.
- [22] Gurusamy R, Sakthivel N. Current status on biochemistry and molecular biology of microbial degradation of nicotine. *The Scientific World Journal*, 2013, 2013: 125385.
- [23] 苟敏, 曲媛媛, 杨桦, 周集体, 李昂, 关晓燕, 艾芳芳. 鞘氨醇单胞菌: 降解芳香化合物的新型微生物资源. 应用与环境生物学报, 2008, 14(2): 276-282.
- [24] 杨金奎, 段焰青, 陈春梅, 李庆华, 黄静文, 张克勤. 醇化烟叶表面可培养微生物的鉴定和系统发育分析. 烟草科技, 2008, (11): 51-55.
- [25] 伍雪莹, 梁书利, 韩双艳, 陈小敏, 林影. 不同陈化期烤烟叶表细菌的多样性及发育分析. 广东农业科学, 2014, 41(18): 28-33, 38-38.
- [26] Chopyk J, Chattopadhyay S, Kulkarni P, Smyth E M, Hittle L E, Paulson J N, Pop M, Buehler S S, Clark P I, Mongodin E F, Sapkota A R. Temporal variations in cigarette tobacco bacterial community composition and tobacco-specific nitrosamine content are influenced by brand and storage conditions. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 358.
- [27] 叶建斌, 闫记, 刘向真, 杨宗灿, 申洪涛, 刘茂林, 杨雪鹏, 王根发, 彭玉富, 卢昶彤. 原烟复烤前后细菌种群变化研究. 河南农业科学, 2017, 46(1): 154-159.