

何肖云, 饶秋华, 刘兰英, 等. 福建特色茶叶中细菌群落结构及多样性研究 [J]. 福建农业学报, 2020, 35 (1): 28–37.

HE X Y, RAO Q H, LIU L Y, et al. Microbial Community and Diversity in Specialty Teas from Fujian [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 35 (1): 28–37.

福建特色茶叶中细菌群落结构及多样性研究

何肖云, 饶秋华, 刘兰英, 傅建炜*

(福建省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所/福建省农产品质量安全重点实验室, 福建 福州 350003)

摘要:【目的】探明福建特色茶叶中的细菌群落结构特征, 以及细菌群落结构在不同种类茶叶间的分布情况。

【方法】采集福建特色茶叶大红袍、铁观音、花茶共 15 组样品, 通过 16S rRNA 高通量测序, 对不同种类茶叶中细菌的群落结构进行解析。【结果】经过高通量测序以及统计分析, 最终共获得 11 472 个 OTU, 包括 37 个门, 95 个纲, 150 个目, 207 个科, 277 个属。比较 3 种茶叶, 发现大红袍在物种丰度上要高于铁观音与花茶, 花茶的物种多样性要高于大红袍与铁观音, 且同为乌龙茶的大红袍与铁观音在细菌群落结构上更为相似。在属水平上, 10 组大红袍样本中共有的优势属为乳球菌属、双歧杆菌属及拟杆菌属, 2 组花茶样本中共有的优势属为拟杆菌属, 3 组铁观音中共有的优势菌属为乳球菌属与双歧杆菌属。其中, 丰度前 10 的优势属中有 5 个为乳酸菌。通过共现网络分析, 表明乳酸菌与其显著相关的大部分物种呈互利生长的关系。【结论】大红袍与铁观音的优势菌纲为芽孢杆菌纲和放线菌纲, 花茶的优势菌纲为梭状芽孢杆菌纲与拟杆菌纲。比较 3 种茶叶的细菌群落结构, 发现茶叶种类可能是影响细菌群落结构变化的重要因素之一, 且乳酸菌在 3 种茶叶中均为主要优势细菌。

关键词: 茶叶; 细菌群落结构; 16S rRNA; 高通量测序

中图分类号: Q 939.96

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2020) 01-0028-10

Microbial Community and Diversity in Specialty Teas from Fujian

HE Xiao-yun, RAO Qiu-hua, LIU Lan-ying, FU Jian-wei*

(*Institute of Quality Standards & Testing Technology for Agro-products, Fujian Academy of Agricultural Sciences/Fujian Key Laboratory of Agro-products Quality & Safety, Fuzhou, Fujian 350003, China*)

Abstract: 【Objective】 Diversity and distribution of the microbial communities in the specialty teas produced in Fujian were studied. 【Method】 Fifteen groups of well-known local teas in the province were collected for an analysis based on the high-throughput sequencing targeting 16S rRNA gene. 【Result】 A total of 11 472 OTUs encompassing 37 phyla, 95 classes, 150 orders, 207 families, and 277 genera were isolated from the specimens. In the 3 categories, Dahongpao had the greatest richness on species; the Huacha was the most diversified; and, as oolong teas, Dahongpao and Tieguanyin had a similar microbial structure. In 10 groups of Dahongpao samples, the dominant genera were *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, and *Bacteroides*; that in 2 groups of Huacha, *Bacteroides*; and those in 3 groups of Tieguanyin, *Lactococcus* and *Bifidobacterium*. Five of the top 10 dominant genera in the teas were lactic acid bacteria. According to the co-occurrence analysis on network, the lactic acid bacteria exhibited a synergistic growth relationship with most of the other significantly associated species. 【Conclusion】 *Bacilli* and *Actinobacteria* were the predominant bacteria found in Dahongpao and Tieguanyin, while *Clostridia* and *Bacteroidia* in Huacha. A bacterial taxonomy analysis indicated that tea category differentiated the structure of their bacterial communities. Overall, lactic acid bacteria dominantly existed in these teas produced in Fujian.

Key words: tea; microbial community structure; 16S rRNA; high throughput sequencing

收稿日期: 2019-10-29 初稿; 2020-01-09 修改稿

作者简介: 何肖云 (1989-), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 农产品质量安全过程控制研究 (E-mail: xiaoyun_he@163.com); 饶秋华 (1975-), 女, 实验师, 研究方向: 微生物检测应用研究 (E-mail: 770623579@qq.com)

* 通信作者: 傅建炜 (1974-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 生物安全与农产品质量安全 (E-mail: fjw9238@163.com)

基金项目: 福建省科技计划公益类专项 (2017R1018-1); 福建省农业科学院青年人才创新基金 (YC2018-2); 福建省财政专项——福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (STIT2017-1-12)

0 引言

【研究意义】茶叶是全球三大饮料之一，主要产自中国、印度、肯尼亚和斯里兰卡，其中中国是世界上最大的茶叶种植国和生产国，分别占全球茶叶种植面积的35%和产量的40%^[1]。作为中国传统饮品，茶叶中含有丰富的活性物质，使其具有丰富的风味和多种促进健康的功能^[2]，如降脂堆积、抗炎杀菌、抗氧化、预防动脉硬化、防癌抗癌等保功效^[3]。福建是历史悠久的茶叶产区，是茶叶种类最多的省份，也是红茶、乌龙茶、白茶、花茶的起源地^[4]。茶产业是福建省农业支柱产业之一，茶叶质量安全问题正逐渐引起研究者及消费者的重视，成为关注热点之一^[5-6]。【前人研究进展】影响茶叶质量的因素主要包括农药残留、有害重金属残留、有害微生物、非茶异物等^[7]。其中，微生物广泛分布于自然界中，在茶叶的栽培、加工、储藏过程中普遍存在且具有重要影响^[8-9]。茶叶虽然为干固态物质，且蛋白质含量较少，但是依然有许多微生物以茶叶为生长基质进行生长繁殖^[10]。有研究者利用分离培养方法对茶叶中的细菌群落进行探索，发现普洱中的优势细菌为无芽孢短杆菌、芽孢杆菌属、球菌属^[11]，康砖茶在渥堆后的优势细菌为芽孢杆菌属、葡萄球菌属、放线菌属^[12]等。近年来，越来越多的学者选择利用非培养的方式来研究茶叶中的细菌，如聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳技术(PCR-DGGE)和高通量测序技术。通过PCR-DGGE技术，Tian等^[13]表明普洱中的优势细菌为葡萄球菌属、节杆菌属、链霉菌属，刘石泉等^[14]在茯砖茶渥堆和发花过程中发现诺卡氏菌属、新鞘脂菌属、短波单胞菌属、韦龙氏假单胞菌属、突那梭菌属、克雷伯氏菌属、乳杆菌属等菌的存在。在高通量测序技术的应用后，Rui等^[15]揭示了茯砖茶中的主要细菌属为肠杆菌属和芽孢杆菌属，Li等^[16]发现黑茶堆积发酵过程中的主要细菌属为乳杆菌属和克雷伯菌属。【本研究切入点】目前关于黑茶中细菌群落的研究较多，而对于乌龙茶与花茶中细菌的研究较少，以高通量测序技术为研究手段更是未见报道。【拟解决的关键问题】本研究以大红袍、铁观音、花茶3种不同类型的茶叶样本为研究对象，利用高通量测序技术对茶样中的细菌微生物群落结构进行分析，旨在探究大红袍、铁观音及花茶中的细菌群落结构及多样性，一方面为茶叶微生物卫生安全提供参考，另一方面为细菌在茶叶储藏过程中的功能研究及后续开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

茶叶样品为2017年3—6月收集于福建南平、泉州、宁德3个地区的商品化罐装茶叶成品，按照传统技术生产加工，储藏仓库常温阴凉干燥通风，包括10份大红袍、3份铁观音及2份花茶。茶叶样品的采集地与产地一致，皆为福建省内对应茶类的主要产区，其中10份大红袍产于福建武夷山，命名为DHP01-DHP10。3份铁观音产地为福建安溪，命名为T01、T02和T03。2份福建宁德赤溪花茶，命名为H01、H02。在无菌条件下，取出成品茶叶，充分混匀后，每份样品称取5 g于无菌袋内，用于16S微生物多样性的测序分析。

1.2 DNA提取与测序

采用试剂盒OMEGA Mag-Bind Soil DNA kit (50) M5635-01提取茶叶样本基因组DNA。利用核酸定量仪(Thermo Nanodrop 2000c)对基因组DNA的浓度和纯度进行检测，基于检测结果进行PCR扩增。PCR引物分别为515F:GTGCCAGCMGCCGCGGTAA, 806R:GGACTACHVGGGTWTCTAAT。PCR反应体系50 μL : Phusion High-Fidelity PCR Master Mix 25 μL , F/R引物($1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各3 μL , DNA模板($5\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 10 μL , DMSO 3 μL , Nuclease free water 6 μL 。PCR反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸15 s, 30个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸1 min。对PCR产物进行磁珠纯化、凝胶回收、检测及精确定量后，根据qPCR获得的效率进行定量，用Illumina HiSeq PE150平台进行高通量测序(厦门融今生物科技有限公司)。

1.3 生物信息学分析

高通量测序结束后，使用QIIME V1.9.0对下机的原始数据进行质量控制^[17]。利用Vsearch V1.11.1软件^[18]，经过去重复杂、聚类及检测去除嵌合体3个步骤，得到操作分类单元OTU(相似性97%)。将聚类得到的OTU与Greengene数据库比对，对OTU进行分类分析，产生代表性序列即为确定的最终OTU。根据OTU的最终结果，使用QIIME软件计算物种的 α 多样性指数及 β 多样性指数。QLEfSe使用线性判别分析(LDA)来估计物种丰度对差异影响的大小，并确定在样本分类中存在显著差异的群落或物种^[19]。R stats包中的kruskal.test则用来验证不同组间存在显著差异的物种。

本研究中的原始数据已上传至NCBI SRA数据

库中，登录号为 SRP194065。项目登录号为 PRJNA-35400。

2 结果与分析

2.1 16S rRNA 序列及 OTUs 分析

去掉低质量的 reads 序列，完成对下机数据的质控，对有效数据进行统计。45 个样品经过序列分析后，总共获得 5 647 747 bp 的有效数据量，全部样本的序列总数范围为 98 440–147 912 bp，每组 3 个重复样本之间数据量接近。根据 16S rRNA 基因序列的相似性，将高于 97% 的序列聚类成为一个 OTU 进行统计，有 86%（4 856 937 bp）的序列注释上 OTU，参与后续统计分析。统计结果表明，共获得 11 472 个有效 OTUs，详见表 1。根据稀释曲线可知（图 1），45 个样品在测序深度达 3 000 条时，稀释曲线都趋于平缓，表明本次测序数据量合理，增加测序数据量

对寻找新 OTU 无更大意义。

2.2 细菌群落组成分析

根据 45 个样品的注释结果进行分析，总共得到 37 个门（Phylum），95 个纲（Class），150 个目（Order），207 个科（Family），277 个属（Genus）。纲水平上的群落结构如图 2 所示，芽孢杆菌纲（Bacilli）、梭状芽胞杆菌纲（Clostridia）、拟杆菌纲（Bacteroidia）、放线菌纲（Actinobacteria）、γ-变形菌纲（Gammaproteobacteria）、Chloroplast、红螺菌纲（Coriobacteriia）、α-变形菌（Alphaproteobacteria）、β-变形菌纲（Betaproteobacteria）、异常球菌纲（Deinococci）是丰度前十的细菌纲。其中芽孢杆菌纲和放线菌纲在大红袍与铁观音中丰度最高，在大红袍中平均占比为 38.72% 与 22.5%，在铁观音中平均占比分别为 33.07% 与 32.19%，而花茶中的优势菌纲是梭状芽胞杆菌纲与拟杆菌纲，平均丰度比例分别为 32.09%、24.49%。

表 1 15 组样品的测序统计结果与 Alpha 多样性指数
Table 1 Statistics on sequencing and alpha diversity indices of 15 tea sample groups

样品 Sample	OTUs 统计结果 OTUs statistics			多样性指数 Diversity index				
	样品序列数 Sample Size	OTUs 数目 OTUs No.	OTUs 序列数 OTUs Seq	香农指数 Shannon	辛普森指数 Simpson	Chao1 指数 Chao1	物种丰富度 Observed Species	覆盖度 Good's Coverage/%
DHP01	135 571	786	120 856	4.812 a	0.881 a	764.350 a	566.333 a	99.4 a
DHP02	137 093	840	120 902	4.674 a	0.869 a	826.814 a	590.667 a	99.3 a
DHP03	131 607	1 154	116 546	5.834 a	0.940 a	1 160.929 a	821.667 a	99.0 a
DHP04	135 649	868	120 950	5.921 a	0.947 a	821.182 a	642.333 a	99.4 a
DHP05	137 637	922	121 189	4.941 a	0.873 a	918.760 a	625.667 a	99.3 a
DHP06	130 334	830	115 224	5.548 a	0.936 a	786.825 a	590.667 a	99.4 a
DHP07	134 957	698	120 356	4.468 a	0.856 a	626.202 a	500.333 a	99.5 a
DHP08	114 134	804	95 325	5.621 a	0.920 a	778.539 a	624.000 a	99.4 a
DHP09	123 240	672	108 448	4.873 a	0.883 a	650.761 a	522.333 a	99.5 a
DHP10	137 220	947	122 884	5.077 a	0.895 a	910.136 a	679.333 a	99.2 a
H01	119 468	628	86 562	5.867 a	0.948 a	587.594 a	517.667 a	99.7 a
H02	117 039	513	104 593	5.366 a	0.908 a	505.416 a	437.667 a	99.8 a
T01	114 298	642	98 978	4.682 a	0.875 a	601.000 a	507.667 a	99.6 a
T02	110 810	613	89 148	4.992 a	0.913 a	614.176 a	486.000 a	99.6 a
T03	103 525	555	77 016	4.894 a	0.888 a	554.331 a	468.667 a	99.7 a

注：表中的OTUs是相似性大于97%的有效OTUs，且已经注释；不同小写字母表示不同样品间达到显著性差异（P<0.05）。
Note: OTUs are valid and annotated OTUs with similarity greater than 97%; and data with different lowercase letters indicate significant difference between samples (P<0.05).

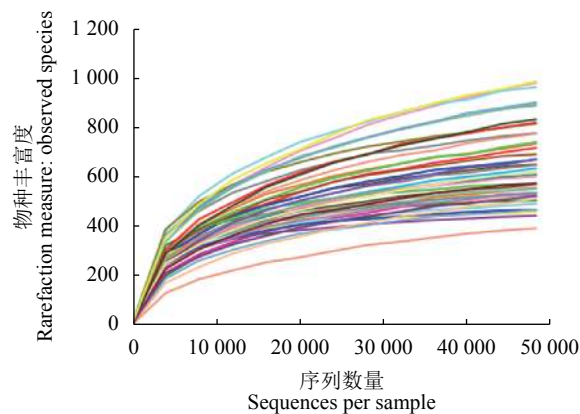


图 1 97% 相似水平下样品的稀释性变化
Fig. 1 Rarefaction curves on samples at 97% similarity level

在属水平上（图 3），15 组样品丰度前 10 的细菌属差异不大，主要包括乳球菌属 *Lactococcus*、双歧杆菌属 *Bifidobacterium*、拟杆菌属 *Bacteroides*、普氏菌属 *Prevotella*、瘤胃球菌属 *Ruminococcus*、粪杆菌属 *Faecalibacterium*、链球菌属 *Streptococcus*、肠球菌属 *Enterococcus*、糖多孢菌属 *Saccharopolyspora*、

肉杆菌属 *Carnobacterium*。

对于不同种类的茶叶样本，优势属存在差异。大红袍 DHP01-DHP10 中的优势属为乳球菌属（32%）、双歧杆菌属（25%）、拟杆菌属（20%）；花茶 H01 的优势属为拟杆菌属（28%）、普氏菌属（27%）、双歧杆菌属（18%），而花茶 H02 中的优势属为拟杆菌属（46%）、乳球菌属（14%）、粪杆菌属（13%）；铁观音 T01 与 T03 中，乳球菌属、双歧杆菌属和拟杆菌属为优势属，平均占比分别为 33%、27% 和 17%，但铁观音 T02 的优势属为糖多孢菌属（35%）、乳球菌属（27%）及双歧杆菌属（16%），拟杆菌属（8%）平均占比相对减少。二者存在较大差异。

2.3 群落多样性分析

Alpha 多样性分析通过单样本的多样性分析，可以反映样品内微生物群落的结构和多样性，包括 Chao1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数等常用的度量指标。其中，Chao1 指数与 Observed Species 指

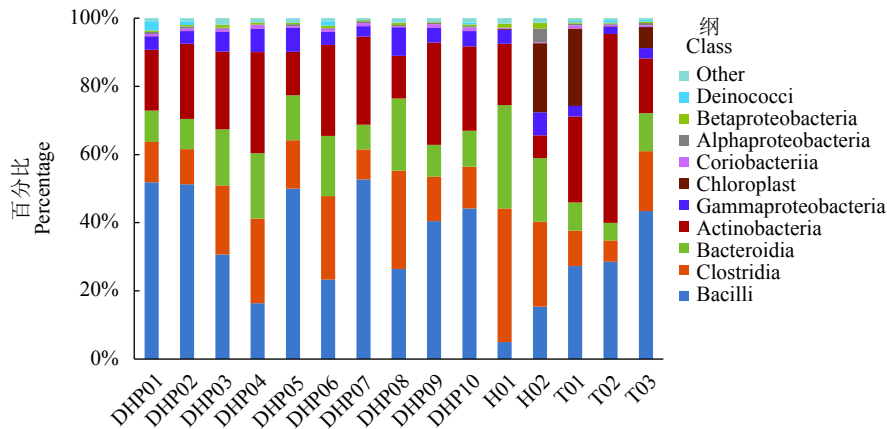


图 2 15 组样品在纲水平上的群落结构
Fig. 2 Community structure at class level in 15 tea sample groups

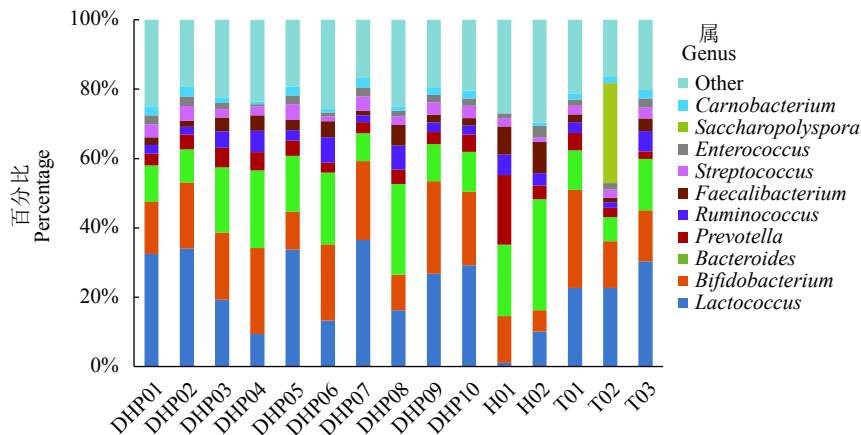


图 3 15 组样品在属水平上的群落结构
Fig. 3 Community structure at genus level in 15 tea sample groups

示着菌群群落丰富度, Shannon 指数与 Simpson 指数代表细菌群落多样性^[20]。由表 1 可知, Alpha 多样性指数虽不存在显著差异,但是在 15 组样品中,大红袍 DHP01–DHP10 细菌群落丰度平均值最高,花茶 H01、H02 与铁观音 T01–T03 的丰度平均值依次次之;在群落多样性方面,花茶 H01 与 H02 略高于大红袍 DHP01–DHP10 及铁观音 T01–T03。

Alpha 多样性是对样本内多样性进行分析, Beta 多样性比较分析则是对不同样本间微生物群落构成进行差异分析。本研究中通过非度量多维尺度分析 NMDS (Nonmetric Multidimensional Scaling) 来研究样本之间的差异, 样本之间距离越近表明群落构成差异越小^[21]。由图 4 可知, 基于群落组成的相似性程度, 同为乌龙茶的大红袍 DHP01–DHP10 与铁观音 T01–T03 之间的相似度更高; 花茶 H01、H02 与大红袍及铁观音的群落结构之间存在差异, 且花茶 H01 与 H02 之间的细菌群落也同样存在差异。

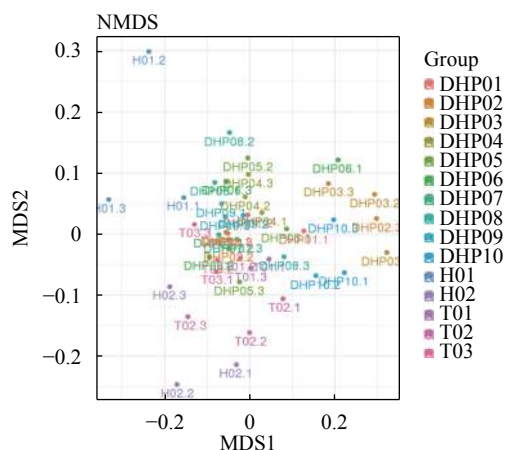


图 4 15 组样品细菌群落结构非度量多维尺度分析

Fig. 4 Nonmetric multidimensional scaling on microbial communities in 15 tea sample groups

本研究中的 Heatmap 图根据每个样品在属水平上的注释结果与丰度情况进行聚类分析, 体现样品之间的相似性以及属水平上的群落构成相似性, 如图 5 所示。在样品群落结构相似性方面, 大红袍 DHP01–DHP10 与铁观音 T01–T03 聚类成一个分支, 花茶 H01 与 H02 聚类成一个分支, 这与 NMDS 图的分析结果一致。在群落丰富度方面, 乳球菌属、双歧杆菌属、拟杆菌属表现出明显的优势性, 这与细菌群落组成分析结果一致。

2.4 LDA 差异贡献分析

为了寻找稳定的特异性物种, 作为不同种类茶

叶中的备选 Biomarker, 本研究通过 LEfSe 对 15 组茶叶样本的细菌群落进行分析, 筛选丰度有显著性差异的微生物类群^[22]。根据图 6 可知, 橙单胞菌科 Aurantimonadaceae 与慢生根瘤菌科 Bradyrhizobiaceae 在 H02 中显著富集; DHP05 与 DHP07 中的特异性微生物类群为八叠球菌属 *Sporosarcina* 和 EW055; DHP03 中具有显著差异的有 9 种微生物类群, 按显著性由高到低为 SBR1031 目、紫色杆菌属 *Janthinobacterium*、 β -变形菌纲 Betaproteobacteria、SJA_22 目、At12OctB3 纲、OC28 科、生丝微菌科 Hyphomicrobiaceae、小梨形菌属 *Pirellula* 及成对杆菌属 *Dyadobacter*; DHP02 中具有 10 种显著差异的微生物类群, 由高到低分别为硫杆菌属 *Sulfobacillus*、硫杆菌科 Sulfobacillaceae、暖绳菌科 Caldilineaceae、出芽菌属 *Gemmata*、Pedosphaerae 纲、暖绳菌目 Caldilineales、Pedosphaerales 目、Ellin6075 科、SJA_101 科、Ellin517 科。其中差异显著排前四的微生物类群为 SBR1031 目、硫杆菌属 *Sulfobacillus*、硫杆菌科 Sulfobacillaceae、紫色杆菌属 *Janthinobacterium*。

2.5 物种相关性分析

在目水平上, 根据各个物种在各个样品中的丰度以及变化情况, 对相关性最高的前 100 组关系绘制网络图, 推测不同物种之间的相互作用^[23–24], 结果见图 7。图中每个圆圈(点)代表一个物种, 连线(边)代表物种之间的相关性, 红色代表正相关, 绿色代表负相关, 呈现正相关的物种可互利共生, 负相关则为竞争关系, 线的粗细和颜色的深浅都表示其相关性的高低^[25–26]。

15 组茶叶样品中, 平均丰度排名前 3 的优势属, 同时也是大红袍 DHP01–DHP10 及铁观音 T01 与 T03 的优势属, 分别隶属于乳杆菌目 Lactobacillales、双歧杆菌目 Bifidobacteriales、拟杆菌目 Bacteroidales。其中, 乳杆菌目一共有 4 条边, 分别与浮霉菌目 Planctomycetales、C114 目、链形植物目 Streptophyta 及 JG30-KF-CM45 目相连, 皆呈互利共生关系; 双歧杆菌目共有 4 条边, 2 条边与浮霉菌目、噬纤维菌目 Cytophagales 呈正相关, 2 条边与 JG30-KF-CM45 目、Sva0725 呈负相关; 拟杆菌目分别与嗜甲基菌目 Methylophilales、Pedosphaerales 目、异常球菌目 Deinococcales、Gemmatales 目相连, 且都呈正相关。铁观音 T02 的优势属糖多孢菌属隶于放线菌目 Actinomycetales, 在共线网络图中, 放线菌目所在模块为孤立的小模块, 仅包含 4 个点、3 条边, 放线菌目与支原体目 Mycoplasmales 及红椿菌目 Coriobacteriales

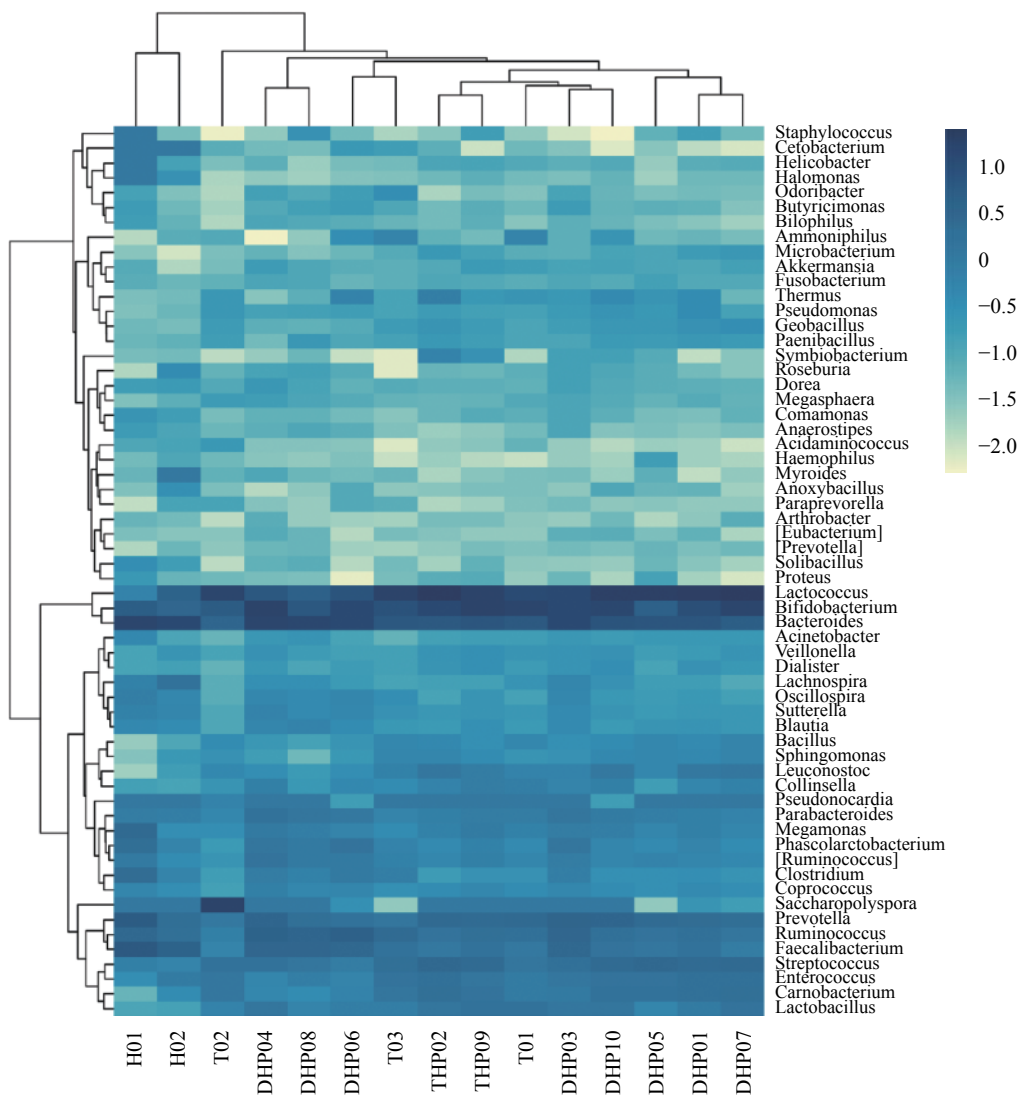


图 5 15 组样品的物种丰度聚类热分析

Fig. 5 Cluster heatmap of species abundance of microbial communities in 15 tea sample groups

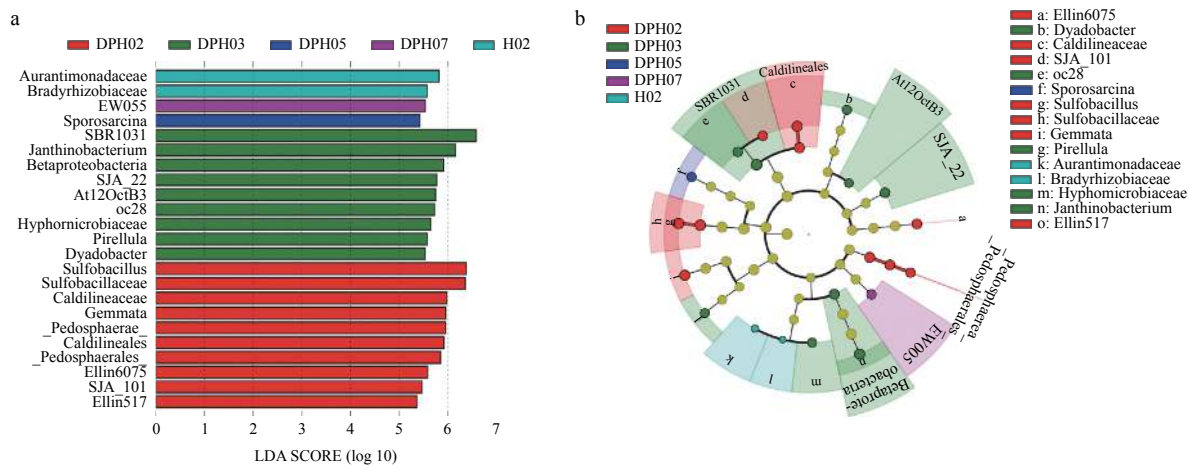


图 6 线性判别分析 (LDA)(a) 及 LEfSe 分析 (b)

Fig. 6 Linear discriminant analysis (LDA) (a) and LEfSe analysis (b)

为互利共生关系。花茶 H01 优势属中的普氏菌属与 杆菌属所在梭菌目与其他物种相关性不显著。

拟杆菌属同属于拟杆菌目，花茶 H02 优势属中的粪

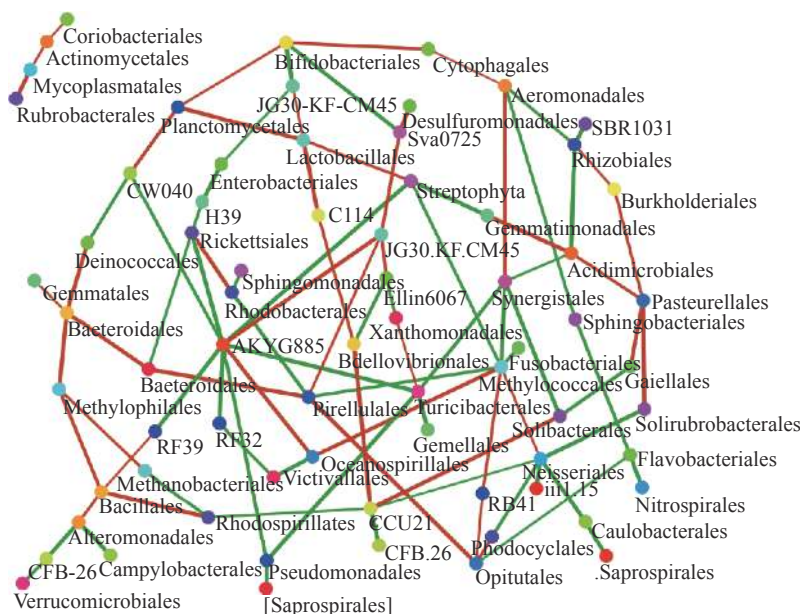


图 7 目水平上相关性前 100 物种的关联网络分析

Fig. 7 Associative network diagram of first 100 species at order level

3 讨论与结论

关于茶叶中微生物,目前绝大部分的研究对象仍集中于如普洱茶、青砖茶、六堡茶、茯砖茶等后发酵茶,或是红茶这类的全发酵茶^[27-30,9],研究学者通过纯培养、PCR-DGGE、荧光原位杂交(FISH)、高通量测序等技术挖掘其中的优势种群,如黑曲霉、烟曲霉、冠状散囊菌、阿姆斯特丹散囊菌等^[13,27-31]。对于乌龙茶、花茶中微生物种类的研究却很少。福建是茶叶大省,大红袍、铁观音、花茶不仅是福建省的特色茶叶,而且在茶叶市场中也是不可或缺的重要组成部分。因此,本研究利用高通量测序技术,对福建省内的大红袍、铁观音、花茶中的细菌群落多样性进行初步探究。

茶叶细菌群落结构差异受很多不同因素影响,如产区环境、加工工艺、储藏环境等^[29,32-33]。本研究中,大红袍与铁观音的优势菌纲同为芽孢杆菌纲和放线菌纲,而花茶中的优势菌纲为梭状芽胞杆菌纲与拟杆菌纲。另外,在 Beta 多样性分析结果中,相对于花茶,大红袍与铁观音在细菌群落组成结构上更为类似。大红袍及铁观音样品虽来自于不同的产地及采集地,但是同为乌龙茶,与花茶相比,在细菌群落结构组成上表现出一定程度的相似性,表明茶叶的种类可能是造成细菌群落结构差异的重要因素之一,这可能与乌龙茶和花茶的制作加工工艺不同相关。

有研究表明,在金花普洱茶的细菌群落中,丙型变形菌纲和芽孢杆菌纲的占比超过 2/3,是最具优

势的菌纲^[34],这两种菌纲在大红袍、铁观音及花茶中丰度较高,排列前十。在分类上都是比较小的细菌类,包含了许多在实际应用过程中非常重要的属,如丙型变形杆菌纲中的假单胞菌属、芽孢杆菌纲中的乳球菌属等。作为金花普洱茶中富含的微生物类群,假单胞菌属在本研究供试的 3 种茶叶(大红袍、铁观音、花茶)中是丰度最高的丙型变形杆菌。假单胞菌属广泛分布于土壤、水及植物体内,在茶叶的叶子及根际部分曾分离得到^[35],虽然假单胞菌属中有部分种具有致病性^[36],但也有研究报道称假单胞菌具有降解有机磷及抵抗植物贮藏过程中真菌病害等作用^[37-38]。茶叶中有机磷农药的残留是茶叶食品安全中的重要因素^[39],利用微生物降解是目前较为安全快速的一种技术手段^[40]。有研究表明,有机磷农药的残留量与贮存时间成反比^[41],因此在茶叶贮藏过程中,假单胞菌属在有机磷农药残留量减少方面的作用有待进一步研究。

芽孢杆菌纲中的乳球菌属、肠球菌属、肉杆菌属和链球菌属是 3 种茶叶丰度前十的物种,其中乳球菌属丰度最高,这与乳球菌属在茯砖茶中以及在普洱茶发酵过程的优势地位相似^[32]。乳球菌属是一类乳酸菌,作为安全的益生菌,广泛应用于食品发酵中,能够分解碳水化合物,产生以乳酸为主的风味物质,能使茶汤澄清明亮,散发淡淡茶香及乳香,这可能是因为乳球菌属的代谢产物是部分酸类、酯类等风味物质形成的基础^[42-43]。此外,3 种茶叶中的双歧杆菌属、链球菌属、肠球菌属、肉杆菌属、乳杆菌属等优势菌属与乳球菌属同样隶属于乳

酸菌,在丰度前十的物种中平均占比60%,表明乳酸菌在这3种茶叶中是主要优势菌,可能在茶叶风味上起到一定作用。

3种茶叶中的乳酸菌分别隶属于乳杆菌目与双歧杆菌目,在优势微生物类群的关联网络分析中,乳杆菌目与相关物种都呈共生关系,双歧杆菌目与关联物种中共生、竞争或拮抗关系各占一半,因此,与乳酸菌相关物种大部分有利于其生长,这与乳酸菌在丰度上的优势地位可相互印证。微生物在群落中具有相对的特定生态功能,彼此之间存在共生、竞争及拮抗等关系,通过相互的影响形成相对稳定的微生物群落^[44]。乳酸菌的乳杆菌目与双歧杆菌目在关联网络分析中,同时与浮霉菌目呈正相关关系,表明浮霉菌目的存在有利于乳杆菌目与双歧杆菌目的生长,原因可能是浮霉菌与乳酸菌在碳循环与氮循环中起协同作用,乳酸菌利用酶降解和酸降解两个阶段实现对介质中亚硝酸盐的还原^[45],浮霉菌可通过自身代谢分解亚硝酸盐释放氮气^[46-47]。氮气的适度增长可降低茶叶储藏空间内的氧气比例,营造有利于乳酸菌生长的环境。

综上,本研究对福建3种特色茶叶中细菌群落结构进行探讨,揭示了大红袍、铁观音及花茶的细菌群落结构组成,表明茶叶种类可能是造成细菌群落结构差异的重要因素之一。而且在3种茶叶细菌群落结构组成分析中,发现乳酸菌是主要优势菌,其原因可能是乳酸菌与大部分关联物种呈互利生长关系。研究结果不仅可以进一步探索在茶叶储藏过程中细菌与茶叶品质特别是呈味物质之间的关系,而且对于茶叶微生物卫生安全的研究也具有一定的参考意义。

参考文献:

- [1] ZHANG L, HO C T, ZHOU J, et al. Chemistry and Biological Activities of Processed *Camellia sinensis* Teas: A Comprehensive Review [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18 (5): 1474-1495.
- [2] WEI C, YANG H, WANG S, et al. Draft genome sequence of *Camellia sinensis* var. *sinensis* provides insights into the evolution of the tea genome and tea quality [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115 (18): E4151-E4158.
- [3] 马存强, 杨超, 周斌星, 等. 微生物对茶叶中嘌呤生物碱代谢的研究进展 [J]. *食品科学*, 2014, 35 (21): 292-296.
MA C Q, YANG C, ZHOU B X, et al. Recent progress in microbial metabolism of purine alkaloids in fermented tea [J]. *Food science*, 2014, 35 (21): 292-296. (in Chinese)
- [4] 陈林, 项丽慧, 王丽丽, 等. 乌龙茶和绿茶品种茶鲜叶儿茶素类和嘌呤碱HPLC指纹图谱特征比较 [J]. *福建农业学报*, 2018, 33 (1): 21-28.
- [5] CHEN L, XIANG L H, WANG L L, et al. HPLC Profiling of Catechins and Purine Alkaloids in Leaves of Oolong and Green Tea Cultivars [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 33 (1): 21-28. (in Chinese)
- [6] LI H L, JAYAWARDENA R S, XU W, et al. *Lasiodiplodia theobromae* and *L. pseudotheobromae* causing leaf necrosis on *Camellia sinensis* in Fujian Province, China [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2019, 41 (2): 277-284.
- [7] 姚清华, 张居德, 苏德森, 等. 福建省茶叶主产区茶叶质量安全管理与隐患点比较分析 [J]. *福建农业学报*, 2014, 29 (4): 393-397.
YAO Q H, ZHANG J D, SU D S, et al. Quality and Safety Management on Tea in Fujian [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 29 (4): 393-397. (in Chinese)
- [8] 许凌, 周卫龙, 宿迷菊. 茶叶微生物指标的现状与展望 [J]. *中国茶叶*, 2012 (7): 14-16.
XU L, ZHOU W L, SU M J. Present situation and prospect of microbial indicators of tea [J]. *China tea*, 2012 (7): 14-16. (in Chinese)
- [9] BORAH A, DAS R, MAZUMDAR R, et al. Culturable endophytic bacteria of *Camellia* species endowed with plant growth promoting characteristics [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 127 (3): 825-844.
- [10] MADHAB M, BHATTACHARYYA P N, BEGUM R, et al. Microbial distribution and contamination in black tea [J]. *Two and a Bud*, 2019, 64 (1): 26-31.
- [11] 湛滢, 李适, 刘仲华, 等. 黑茶陈化机制研究进展 [J]. *湖南农业科学*, 2016 (12): 118-122.
CHEN Y, LI S, LIU Z H, et al. Research progress on the aging mechanism of black tea [J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2016 (12): 118-122. (in Chinese)
- [12] 徐正刚, 吴良, 刘石泉, 等. 黑茶发酵过程中微生物多样性研究进展 [J]. *生物学杂志*, 2019, 36 (3): 92-95.
XU Z G, WU L, LIU S Q, et al. Review for development of microbial diversity during dark tea fermentation period [J]. *Journal of Biology*, 2019, 36 (3): 92-95. (in Chinese)
- [13] 罗红玉, 钟应富, 袁林颖, 等. 微生物在传统茶加工中的应用研究进展 [J]. *福建茶叶*, 2013, 35 (1): 13-16.
LUO H Y, ZHONG Y F, YUAN L Y, et al. Research progress on the application of microorganisms in traditional tea processing [J]. *Tea in Fujian*, 2013, 35 (1): 13-16. (in Chinese)
- [14] TIAN J, ZHU Z, WU B, et al. Bacterial and Fungal Communities in Pu'er Tea Samples of Different Ages [J]. *Journal of Food Science*, 2013, 78 (8): M1249-M1256.
- [15] 刘石泉, 胡治远, 赵运林. 基于DGGE技术的茯砖茶发花过程细菌群变化分析 [J]. *生态学报*, 2014, 34 (11): 3007-3015.
LIU S Q, HU Z Y, ZHAO Y L. Analysis of bacterial flora during the fahua fermentation process of fuzhuan brick tea production based on DGGE technology [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34 (11): 3007-3015. (in Chinese)

- [15] RUI Y, WAN P, CHEN G, et al. Analysis of bacterial and fungal communities by Illumina MiSeq platforms and characterization of *Aspergillus cristatus* in Fuzhuan brick tea [J]. *LWT*, 2019, 110: 168–174.
- [16] LI Q, CHAI S, LI Y D, et al. Biochemical components associated with microbial community shift during the pile-fermentation of primary dark tea [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1509.
- [17] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nature Methods*, 2010, 7 (5): 335–336.
- [18] ROGNES T, FLOURI T, NICHOLS B, et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics [J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2584.
- [19] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation [J]. *Genome Biology*, 2011, 12 (6): R60.
- [20] 李艳春, 林忠宁, 陆燕, 等. 茶园间作灵芝对土壤细菌多样性和群落结构的影响 [J]. 福建农业学报, 2019, 34 (6): 690–696.
- LI Y C, LIN Z N, LU Z, et al. Microbial Diversity and Community Structure in Soil under Tea Bushes-Ganoderma lucidum Intercropping [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 34 (6): 690–696. (in Chinese)
- [21] ALOTAIBI K, RAYWARD-SMITH V, IGLESIA B D L. Nonmetric multidimensional scaling: A perturbation model for privacy-preserving data clustering [J]. *Statistical Analysis & Data Mining the Asa Data Science Journal*, 2014, 7 (3): 175–193.
- [22] DHARIWAL A, CHONG J, HABIB S, et al. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45 (W1): W180–W188.
- [23] FAUST K, RAES J. Microbial interactions: from networks to models [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10 (8): 538–550.
- [24] FUHRMAN J A, CRAM J A, NEEDHAM D M. Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13 (3): 133–146.
- [25] MOLLOY S. Environmental microbiology: disentangling syntrophy [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12 (1): 7.
- [26] HIBBING M E, FUQUA C, PARSEK M R, et al. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8 (1): 15–25.
- [27] LI H, LI M, YANG X, et al. Microbial diversity and component variation in Xiaguan Tuo Tea during pile fermentation [J]. *PLoS ONE*, 2018, 13 (2): e0190318.
- [28] XU Q, SUN M, NING J, et al. The Core Role of *Bacillus subtilis* and *Aspergillus fumigatus* in Pile-Fermentation Processing of Qingzhuang Brick Tea [J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2019, 59 (3): 288–294.
- [29] XU A, WANG Y, WEN J, et al. Fungal community associated with fermentation and storage of Fuzhuan brick-tea [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 146 (1): 14–22.
- [30] MAO Y, WEI B Y, TENG J W, et al. Analyses of fungal community by Illumina MiSeq platforms and characterization of *Eurotium* species on Liupao tea, a distinctive post-fermented tea from China [J]. *Food Research International*, 2017, 99: 641–649.
- [31] ZHANG W, YANG R, FANG W, et al. Characterization of thermophilic fungal community associated with pile fermentation of Pu-erh tea [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 227: 29–33.
- [32] 赵仁亮, 胥伟, 吴丹, 等. 基于Illumina MiSeq技术分析不同地域加工的茯砖茶中微生物群落多样性 [J]. 生态学杂志, 2017, 36 (7): 1865–1876.
- ZHAO R L, XU W, WU D, et al. Microbial community diversity of Fu brick tea produced in different regions by Illumina MiSeq technology [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2017, 36 (7): 1865–1876. (in Chinese)
- [33] FU J Y, LV H P, CHEN F. Diversity and Variation of Bacterial Community Revealed by MiSeq Sequencing in Chinese Dark Teas [J]. *PLoS ONE*, 2016, 11 (9): e0162719.
- [34] 宁伟泽, 徐军. 金花普洱茶微生物组成谱的ITS和16sRNA基因文库研究 [J]. 中国茶叶, 2018, 40 (5): 63–66.
- NING W Z, XU J. Study on ITS and 16sRNA gene library of microbial composition spectrum of jinhua puer tea [J]. *China Tea*, 2018, 40 (5): 63–66. (in Chinese)
- [35] MUDAU F N, SALEHI B, SHARIFI-RAD M, et al. Understanding *Camellia sinensis* using Omics technologies along with endophytic bacteria and environmental roles on metabolism: A review [J]. *Applied Sciences (Switzerland)*, 2019, 9 (2): 281.
- [36] AZAM M W, KHAN A U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Drug Discovery Today*, 2019, 24 (1): 350–359.
- [37] SHARMA A K, PANDIT J, GAUTAM V, et al. Optimization of culture conditions for maximizing Extracellular Organophosphorus hydrolase activity in pseudomonas strains with Chlorpyrifos degradation potential [J]. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2019, SP1: 322–326.
- [38] WALLACE R L, HIRKALA D L, NELSON L M. Postharvest biological control of blue mold of apple by *Pseudomonas fluorescens* during commercial storage and potential modes of action [J]. *Postharvest Biology & Technology*, 2017, 133: 1–11.
- [39] CHEN H, HAO Z, WANG Q, et al. Occurrence and risk assessment of organophosphorus pesticide residues in Chinese tea [J]. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 2016, 22 (1): 28–38.
- [40] SHARMA A, PANDIT J, SHARMA R, et al. Biodegradation of Chlorpyrifos by *Pseudomonas Resinovorans* Strain AST2. 2 Isolated from Enriched Cultures [J]. *Current World Environment*, 2016, 11 (1): 267–278.
- [41] DONG J, BIAN Y, LIU F, et al. Storage stability improvement of organophosphorus insecticide residues on representative fruit and vegetable samples for analysis [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2019: e14048.
- [42] 王小军, 张绵松, 袁文鹏, 等. 液态发酵茶饮料菌株分离鉴定及发酵特征研究 [J]. 农产品加工(学刊), 2010 (8): 30–35.
- WANG X J, ZHANG M S, YUAN W P, et al. Isolation and

- identification and fermentation characteristic of microorganism used for liquid fermented tea drink [J]. *The Processing of Agricultural Products*, 2010 (8) : 30–35. (in Chinese)
- [43] SONG A A L, IN L L A, LIM S H E, et al. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory [J]. *Microbial cell factories*, 2017, 16 (1) : 55.
- [44] 杨浩, 杨晓妮, 张国珍, 等. 窖水中微生物降解污染物的关键细菌 [J]. 环境科学, 2018, 39 (10) : 376–387.
- YANG H, YANG X N, ZHANG G Z, et al. Key bacteria for microbial degradation of pollutants in cellar water [J]. *Environmental Science*, 2018, 39 (10) : 376–387. (in Chinese)
- [45] CHEN Y, LI Q, XIA C, et al. Effect of selenium supplements on the antioxidant activity and nitrite degradation of lactic acid bacteria [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35 (4) : 61.
- [46] YUE X, YU G, LU Y, et al. Effect of dissolved oxygen on nitrogen removal and the microbial community of the completely autotrophic nitrogen removal over nitrite process in a submerged aerated biological filter [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 254: 67–74.
- [47] XU S, LU W J, MUSTAFA M F, et al. Co-existence of anaerobic ammonium oxidation bacteria and denitrifying anaerobic methane oxidation bacteria in sewage sludge: community diversity and seasonal dynamics [J]. *Microbial Ecology*, 2017, 74 (4) : 832–840.
- (责任编辑：林海清)