

高通量测序技术分析榨菜腌制过程中表面白膜的微生物群落结构

杨吉霞¹, 曾祥平², 李凤珠¹, 贺稚非^{1*}

(¹西南大学食品科学学院 重庆 400716

²重庆市计量质量检测研究院第一分院 重庆 402260)

摘要 目的:在榨菜腌制过程中,一种常见的现象是其表面形成白膜。解析白膜的微生物群落结构,识别和防控污染微生物,提高榨菜品质的安全性。方法:分别用 PacBio SMRT 和 Illumina MiSeq 对榨菜表面白膜的细菌 16S rRNA 基因和真菌 ITS1 基因测序,分析细菌和真菌群落结构。结果:白膜中存在较多种类的细菌和真菌,鉴定细菌的属主要包括:代尔夫特菌、丛毛单胞菌、寡养单胞菌、短波单胞菌,真菌的属主要包括:曲霉、枝孢菌、德巴利酵母、青霉、威克汉姆酵母、哈萨克斯坦酵母。结论:研究结果可为榨菜中微生物的预防、控制提供参考。

关键词 高通量测序;榨菜;生物膜;微生物群落结构

文章编号 1009-7848(2022)04-0330-08 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.04.032

涪陵榨菜是世界三大腌菜之一,采用茎瘤芥(*Brassica juncea*, 俗称青菜头)作为原料,经过独特的“三腌三榨”工艺腌制而成^[1]。第 1 次腌制采用菜块质量 2%~4% 的食盐腌制约 7 d,第 2 次加入 4%~8% 的食盐腌制 20~30 d,第 3 次用 11%~16% 的食盐腌制 4~6 个月,每次腌制结束时都将榨菜起池、压榨去水^[1-2]。由于腌制过程包含多个阶段,其间有转池、压榨等操作,涉及的微生物种类繁多,容易因环境、器具等因素偶然引入微生物,故影响榨菜的腌制过程以及品质。榨菜表面形成白膜是腌制过程中比较常见的现象,一般认为是由微生物形成的生物膜,然而,目前对白膜的微生物种类构成及其对榨菜品质的影响缺少系统性研究。深入分析白膜所含有的微生物,将有助于识别并防控微生物污染,从而提高榨菜的安全性。

本课题组曾采用培养法鉴定榨菜产膜相关的微生物,主要为芽孢杆菌(*Bacillus*)属的菌种^[3]。培养法有一定的局限性,只能鉴定出在培养条件下生长的微生物种类,而某些微生物是不可培养的,因此该方法不能全面反映微生物的多样性^[4]。高通

量测序技术不需要培养,直接对样品中所有微生物的 16S rRNA 或者 ITS 基因测序,能够全面、真实地反映微生物群落中所有的种类和相对丰度,明确微生物的群落结构,目前已广泛运用于各种传统发酵食品的研究^[5]。

第三代测序平台 PacBio SMRT (单分子实时测序技术,Single molecule real time) 已较多应用于微生物多样性的研究中,它可以实现对细菌 16S rRNA 基因(1 400 bp)的全长测序,准确率达到 99%^[6-8]。目前真菌的分析主要运用 Illumina MiSeq 测序技术对 ITS 基因进行测序。本研究分别采用 PacBio SMRT 和 Illumina MiSeq 测序技术对榨菜白膜的细菌 16S rRNA 基因和真菌的 ITS 基因进行测序,解析细菌和真菌的群落结构。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验原料 用无菌操作从某农户的腌制池中采集有膜的榨菜样品 5 个,用无菌采样拭子采集白膜于无菌离心管中,编号为 M1~M5。

1.1.2 试验试剂 DNeasy mericon Food Kit 食品 DNA 提取试剂盒 Qiagen 69514,德国 Qiagen 公司;1×TE 缓冲液(B548106-0500)、50×TAE 缓冲液(B548101)、PBS 缓冲液(pH 7.3~7.5,B640435),生工生物工程(上海)股份有限公司;琼脂糖 G-10,西班牙 BLOWEST; Premix Taq、RNase-free water、DL2 000 DNA ladder marker,宝生物工程

收稿日期:2021-08-15

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(31801529);重庆市基础科学与前沿技术研究项目(cstc2017jcyjAX0249);四川省教育厅川菜发展研究中心科研项目(CC21Z30)

作者简介:杨吉霞(1978—),女,博士,副教授

通信作者:贺稚非 E-mail: 2628576386@qq.com



图 1 腌制期间表面有白膜的榨菜样品

Fig.1 The Zhaicai samples with white biofilm on the surface during the pickling process

(大连)有限公司。引物:27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、1492R(5'-GGYTTACCTGT TACGACTT-3')^[8]、ITS1F(5'-CTTGGTCATT TA GAGGAAGTAA-3')、ITS2R(5'-GCTGCGTTCT TCATCGATGC-3')^[9]。委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.1.3 仪器与设备 PowerPac Basic 基础电源、T100 梯度 PCR 仪,美国伯乐 Bio-Rad 公司;SW-CJ-2F 洁净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;G:BOX EF 型凝胶成像系统,英国 Syngene 公司;Milli-Q Biocel 超纯水机,美国密理博公司;P100+超微量分光光度计,美国 Pultton 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 宏基因组 DNA 的提取 用食品 DNA 提取试剂盒(DNeasy mericon Food Kit)提取白膜样品的宏基因组 DNA,用 P100+超微量分光光度计、1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量,贮存于-80℃备用^[8-9]。

1.2.2 PCR 扩增 用 27F 和 1492R 引物扩增细菌的 16S rRNA 基因。20 μL PCR 反应体系包括:10 μL 2×Premix Taq 缓冲液,0.5 μL 10 μmol/L 引物,10 ng DNA 模板。扩增程序为:先在 95℃预变性 3 min,然后 95℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 30 s 循环 30 次,最后 72℃ 10 min^[3,8]。真菌扩增采用引物 ITS1F 和 ITS2R,55℃ 退火,其余条件相同^[9-10]。

1.2.3 高通量测序 制备的白膜宏基因组 DNA 样品 1 份送诺禾致源公司运用 PacBio SMRT 平台对细菌 16S rRNA 基因测序,引物为 27F 和 1492R,长度为 1 400 bp^[8],同时另一份送上海美吉

生物医药公司,运用 Illumina MiSeq PE300 平台和 ITS1F、ITS2R 引物对真菌的 ITS1 区测序,长度为 300 bp^[10]。

1.2.4 数据分析 参照本实验室已建立的方法做序列数据分析^[11-12]。简述如下:使用 Trimmomatic、FLASH 软件做序列的质控、拼接,去除低质量的序列。然后将序列用 QIIME 包(定量研究微生物群落,Quantitative insights into microbial ecology, version 1.7)做生物信息分析,获得分类操作单元(Operational taxonomic units,OTUs)和物种信息,计算 α 多样性指数,用 R 语言绘图。

1.2.5 NCBI 序列号 本研究中的序列已被存入 NCBI 的 Sequence Read Archive (SRA) 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>),细菌 16S rRNA 序列的注册号为 BioProject ID PRJNA756136,真菌 ITS1 序列的注册号为 PRJNA756159。

2 结果与分析

2.1 高通量测序的基本数据和 α 多样性指数

分别用 PacBio SMRT 和 Illumina MiSeq 对细菌的 16S rRNA 基因和真菌的 ITS1 基因测序,表 1 列出了测序的基本数据和 α 多样性指数。细菌的 16S rRNA 基因测序长度达到 1 400 bp,覆盖全长。细菌的 Coverage 大于 0.99,真菌达到 1.000,说明测序深度覆盖到样品中的所有物种。由表 1 数据可知细菌的 α 多样性指数大于真菌,说明其多样性高于真菌。

图 2 为细菌和真菌的 Shannon 曲线图,随着 reads 数的增加,OTU 水平的 Shannon 指数也增加,说明获得的物种多样性信息增加,当细菌和真菌的 reads 数分别达到 871 和 12 000 之后,Shannon 指数进入了平台期,说明物种多样性信息不再增加,本研究所用的测序深度足够充分。

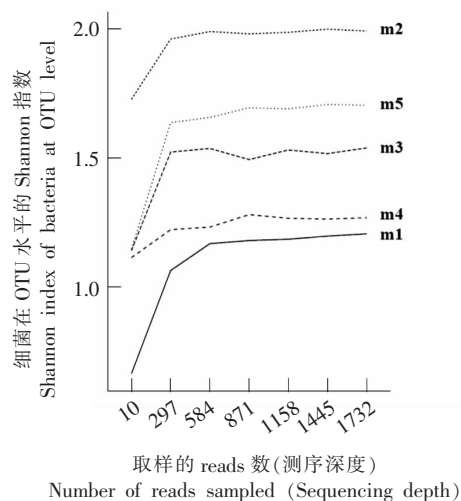
2.2 细菌和真菌的多样性统计

表 2 列出了榨菜表面白膜样品中细菌和真菌在不同分类水平下的种类数量。每个样品中细菌属的数量均大于 10,真菌属的数量大于 9,说明细菌和真菌群落中都存在比较丰富的种类多样性。

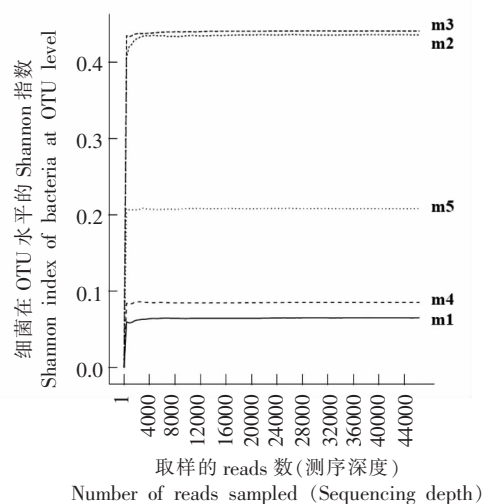
表1 榨菜表面白膜样品细菌和真菌多样性测序的基本数据和 α 多样性指数

Table 1 The general data of high throughput sequencing in the analysis of bacterial and fungal diversity in Zhacai surface white biofilm samples and their alpha diversity indices

测序种类	样品	Observed_OTUs	Clean_ reads 数	序列长度/ bp	α 多样性指数			Goods_ coverage
					Shannon	ACE	Chao1	
细菌 16S rRNA 基 因测序	M1	36	8 097	1 455	1.21	45.95	42.4	0.994
	M2	22	9 154	1 449	1.99	40.14	77.0	0.994
	M3	20	9 021	1 453	1.54	45.07	42.5	0.994
	M4	18	8 241	1 456	1.27	21.26	25.5	0.997
	M5	27	7 943	1 457	1.70	45.73	43.5	0.993
真菌 ITS1 基因测序	M1	15	52 631	279.0	0.07	15.00	15.0	1.000
	M2	18	55 370	294.1	0.44	18.00	18.0	1.000
	M3	20	55 287	281.3	0.44	21.27	21.5	1.000
	M4	14	59 964	279.2	0.09	25.20	16.5	1.000
	M5	17	70 855	279.1	0.21	17.65	18.0	1.000



(a)细菌在 OUT 水平的 Shannon 指数图



(b)真菌在 OUT 水平的 Shannon 指数图

图2 榨菜表面白膜样品细菌和真菌的 Shannon 指数图(OTU 水平)

Fig.2 The Shannon's diversity index curves (OTU level) of bacteria and fungi present in Zhacai surface white biofilm samples

表2 榨菜表面白膜样品的细菌和真菌在不同分类水平下的数量统计

Table 2 The statistical table of the distribution of bacteria and fungi at different taxonomic levels in Zhacai surface white biofilm samples

测序种类	样品	门	纲	目	科	属	种
细菌 16S rRNA 基因测序	M1	4	7	10	15	20	14
	M2	2	4	7	11	15	10
	M3	3	6	7	9	11	6
	M4	3	5	8	11	14	6
	M5	3	5	9	11	18	9
	总计	4	7	15	24	43	32

(续表 2)

测序种类	样品	门	纲	目	科	属	种
真菌 ITS1 基因测序	M1	1	4	5	6	10	11
	M2	2	6	7	9	11	13
	M3	2	7	7	8	11	13
	M4	2	5	6	7	9	12
	M5	3	7	7	8	12	14
	总计	3	9	13	19	26	32

2.3 细菌的多样性和群落结构

种类构成如表 3 所示。

榨菜表面白膜样品中的细菌在门、属水平上

表 3 榨菜表面白膜样品中的细菌在门、属水平上的种类构成

Table 3 The composition of bacteria at the level of phylum and genus in Zhacai surface white biofilm samples

分类水平	种属名称	物种的相对丰度/%				
		M1	M2	M3	M4	M5
门水平	变形菌门 <i>Proteobacteria</i>	94.65	99.37	92.75	98.73	98.56
	厚壁菌门 <i>Firmicutes</i>	4.61	0.63	7.20	0.86	1.38
	拟杆菌门 <i>Bacteroidetes</i>	0.63	0.00	0.06	0.40	0.06
	蓝细菌 <i>Cyanobacteria</i>	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00
属水平	代尔夫特菌 <i>Delftia</i>	0.00	53.83	44.27	48.93	0.00
	丛毛单胞菌 <i>Comamonas</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	69.08
	寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas</i>	1.67	19.86	0.75	1.27	12.26
	短波单胞菌 <i>Brevundimonas</i>	6.45	18.42	0.17	0.17	0.00
	己酸菌 <i>Caproiciproducens</i>	0.29	0.00	4.89	0.17	0.00
	叶杆菌属 <i>Phyllobacterium</i>	0.12	1.27	0.00	0.06	0.00
	瘤胃梭菌 <i>Ruminiclostridium</i>	1.32	0.00	0.00	0.00	0.00
	粘土弯菌 <i>Pelosinus</i>	1.09	0.00	0.00	0.00	0.12
	未鉴定的 <i>Unidentified</i>	86.07	5.64	48.6	48.07	17.5
	* 其它 <i>Others</i>	2.99	0.98	1.32	1.32	1.04

注:*. 指相对丰度小于 1% 的序列的丰度总计。

在 5 个榨菜白膜样品的细菌群落中, 最优势的门都是变形菌门, 相对丰度均大于 90%, 其次是厚壁菌门。菌膜 M1 中鉴定出的优势属(丰度大于 1%) 包括: 短波单胞菌(6.45%)、寡养单胞菌(1.67%)、瘤胃梭菌(1.32%)、粘土弯菌(1.09%)。菌膜 M2 中主要的属有: 代尔夫特菌(53.83%)、寡养单胞菌(19.86%)、短波单胞菌(18.42%)、叶杆菌属(1.27%)。菌膜 M3 中主要的属有: 代尔夫特菌(44.27%)、己酸菌(4.89%)。菌膜 M4 中主要的属有: 代尔夫特菌(48.93%)、寡养单胞菌(1.27%)。菌膜 M5 中主要的属有: 丛毛单胞菌(69.08%)、寡养单胞菌(12.26%)。

2.4 真菌的多样性和群落结构

榨菜白膜样品中的真菌在门、属水平上种类构成如表 4 所示。

5 个白膜样品的真菌群落中, 最优势的门都是子囊菌门, 其相对丰度均大于 80%, 其次是担子菌门。菌膜 M1 中最优势的属为曲霉(相对丰度为 40.00%), 其次包括枝孢菌、德巴利酵母、青霉、威克汉姆酵母、链格孢霉、毛壳菌属、埃德菌, 其丰度均为 6.67%。菌膜 M2 中最优势属为曲霉(38.89%), 其次为枝孢菌、德巴利酵母、青霉、威克汉姆酵母、哈萨克斯坦酵母、嗜盐梗孢酵母、*Leptospora*、嗜热真菌属、木霉属、毛孢子菌属, 丰

表4 榨菜表面白膜样品中的真菌在门、属水平上的种类构成

Table 4 The composition of fungi at the level of phylum and genus in Zhacai surface white biofilm samples

分类水平	种属名称	物种的相对丰度/%				
		M1	M2	M3	M4	M5
门水平	子囊菌门 Ascomycota	100.00	88.89	85.00	92.86	82.35
	担子菌门 Basidiomycota	0.00	11.11	15.00	7.14	11.76
	未鉴定的 Unclassified	0.00	0.00	0.00	0.00	5.88
属水平	曲霉 <i>Aspergillus</i>	40.00	38.89	45.00	35.71	35.29
	枝孢菌 <i>Cladosporium</i>	6.67	5.56	10.00	14.29	5.88
	德巴利酵母 <i>Debaryomyces</i>	6.67	5.56	5.00	7.14	5.88
	青霉 <i>Penicillium</i>	6.67	5.56	5.00	7.14	5.88
	威克汉姆酵母 <i>Wickerhamomyces</i>	6.67	5.56	5.00	7.14	5.88
	哈萨克斯坦酵母 <i>Kazachstania</i>	0.00	11.11	5.00	0.00	5.88
	嗜盐梗孢酵母 <i>Sterigmatomyces</i>	0.00	5.56	5.00	7.14	0.00
	链格孢霉 <i>Alternaria</i>	6.67	0.00	0.00	7.14	0.00
	白色侧齿霉 <i>Engyodontium</i>	0.00	0.00	5.00	7.14	0.00
	隐球菌属 <i>Cryptococcus</i>	0.00	0.00	5.00	0.00	5.88
	毛壳菌属 <i>Chaetomium</i>	6.67	0.00	0.00	0.00	0.00
	埃德菌 <i>Dichotomomyces</i>	6.67	0.00	0.00	0.00	0.00
	念珠菌 <i>Candida</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	5.88
	塞伯林德纳氏酵母 <i>Cyberlindnera</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	5.88
	镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	5.88
	<i>Mastigobasidium</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	5.88
	<i>Leptospora</i>	0.00	5.56	0.00	0.00	0.00
	嗜热真菌属 <i>Thermomyces</i>	0.00	5.56	0.00	0.00	0.00
	木霉属 <i>Trichoderma</i>	0.00	5.56	0.00	0.00	0.00
	毛孢子菌属 <i>Trichosporon</i>	0.00	5.56	0.00	0.00	0.00
接合酵母属 <i>Zygosaccharomyces</i>	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	
鬼伞属 <i>Coprinellus</i>	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00	
未鉴定的 Unidentified	13.34	0	0	7.14	5.88	

度均为 5.56%。菌膜 M3 中优势属为曲霉(45.00%)和枝孢菌(10.00%),德巴利酵母、青霉、威克汉姆酵母、哈萨克斯坦酵母、嗜盐梗孢酵母、白色侧齿霉、隐球菌属、接合酵母属、鬼伞属的丰度均为 5.00%。菌膜 M4 中主要的属包括:曲霉(35.71%)、枝孢菌(14.29%),以及丰度均为 7.14%的德巴利酵母、青霉、威克汉姆酵母、嗜盐梗孢酵母、链格孢霉、白色侧齿霉。菌膜 M5 中最优势属为曲霉(35.29%),其次为枝孢菌、德巴利酵母、青霉、威克汉姆酵母、哈萨克斯坦酵母、隐球菌属、念珠菌、塞伯林德纳氏酵母、镰刀菌属、*Mastigobasidium*,丰度均为 5.88%。

3 讨论

细菌生物膜的形成过程可分为 5 个阶段^[13-14]: (1)可逆黏附阶段。浮游状态的细菌细胞黏附于食品或者其它固体表面,细菌的鞭毛、菌毛、胞外聚合物有利于黏附,其作用力包括范德华力、疏水相互作用、静电力等,这种黏附是可逆的。(2)不可逆黏附阶段。细菌细胞增殖达到一定的密度,产生胞外聚合物(Extracellular polymeric substance, EPS),例如:多糖、蛋白质、核酸、脂质,将菌细胞黏附聚集形成菌落基质,启动群体感应系统,产生更多的胞外聚合物,使菌细胞黏结固定在固体表面,此黏附是不可逆的。(3)形成早期生物膜。菌细胞

生长,进一步分泌产生胞外聚合物,向周转扩散,形成早期生物膜。(4)生物膜成熟阶段。菌落聚集成成熟的生物膜。(5)生物膜脱落分散。菌细胞从生物膜上脱落,成为浮游细胞,扩散后在其它位置形成生物膜。本研究鉴定出主要的细菌属包括代尔夫特菌、丛毛单胞菌属、寡养单胞菌、短波单胞菌,都有形成菌膜的报道^[15-18]。

在真菌群落中,曲霉形成菌膜的特性已被广泛研究和报道。真菌形成菌膜的过程与细菌略有差别^[9]:曲霉能够产生分生孢子,分生孢子通过一些黏附作用(例如:疏水相互作用、静电相互作用、粗糙的表面)附着于食品或者其它固体表面,一类称为疏水蛋白的两亲性蛋白质也可以介导丝状真菌的黏附,分生孢子黏附于固体表面之后,萌发产生菌丝(Filamentous),菌丝体生长形成最初的单层菌落,真菌也能产生与细菌相似的胞外聚合物使菌落黏附在一起,形成结构复杂的成熟生物膜。

生物膜的形成可能与一些条件相关,例如:环境因素(pH值、温度、营养成分)、菌细胞密度、细菌种群特征等^[13]。微生物形成菌膜后能够增强对杀菌处理或者恶劣环境的抵抗能力,例如,野生型的鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)能够形成菌膜,与其它不能成膜的突变体相比较对次氯酸钠的耐受性增强了1000倍^[20],有机小麦粉中的肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*),形成生物膜的菌株杀菌工艺值 $D_{80\text{ }^{\circ}\text{C}, 0.45\text{ aw}}$ 显著高于不能成膜的菌株^[21]。目前对于形成榨菜白膜的微生物认识不多,它们在哪些条件下容易形成生物膜,形成生物膜之后对杀菌处理的耐受性等,有待进一步研究。

4 结论

本研究分别用PacBio SMRT和Illumina MiSeq对榨菜表面白膜样品的细菌16S rRNA基因和真菌ITS1基因测序,分析阐述了细菌和真菌群落结构。白膜样品中存在较多细菌和真菌种类,鉴定出细菌主要的属包括:代尔夫特菌、丛毛单胞菌属、寡养单胞菌、短波单胞菌,真菌主要的属包括:曲霉、枝孢菌、德巴利酵母属、青霉、威克汉姆酵母、哈萨克斯坦酵母。

参 考 文 献

- [1] 庞杰, 向珣. 涪陵榨菜的加工及生产现状[J]. 长江蔬菜, 1999(2): 42-44.
PANG J, XIANG X. The current processing and production status of Fuling Zhacai[J]. Yangtze River Vegetables, 1999(2): 42-44.
- [2] 贺云川, 周斌全, 刘德君. 涪陵榨菜传统工艺概述[J]. 食品与发酵科技, 2013, 49(4): 57-60.
HE Y C, ZHOU B Q, LIU D J. The overview of traditional Fuling Zhacai's processes [J]. Food and Fermentation Technology, 2013, 49(4): 57-60.
- [3] 杨吉霞, 张玉礼, 王学锦, 等. 榨菜腌制过程中变红或产膜现象相关微生物的分离鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(2): 40-46.
YANG J X, ZHANG Y L, WANG X J, et al. Isolation and identification of microorganisms related to the reddened or biofilm-forming phenomenon of Zhacai during the pickling process[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(2): 40-46.
- [4] 王新珍, 王凤花, 孙瑞波, 等. 高通量测序技术在微生物分子生态学研究中的应用[J]. 中国生态农业学报, 2018, 26(10): 1593-1600.
WANG X Z, WANG F H, SUN R B, et al. Application of high-throughput DNA sequencing in microbial ecology[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2018, 26(10): 1593-1600.
- [5] 夏梦雷, 杨帆, 陆锴, 等. 高通量测序技术在传统发酵食品微生物群落中的应用研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(5): 1-7.
XIA M L, YANG F, LU K, et al. Advances in the application of high-throughput sequencing technology in traditional fermented foods[J]. China Brewing, 2021, 40(5): 1-7.
- [6] ROBERTS R J, CARNEIRO M O, SCHATZ M C. The advantages of SMRT sequencing[J]. Genome Biology, 2013(14): 405.
- [7] FICHOT E B, NORMAN R S. Microbial phylogenetic profiling with the Pacific Biosciences sequencing platform[J]. Microbiome, 2013(1): 10.
- [8] YANG J X, CAO J L, XU H Y, et al. Bacterial diversity and community structure in Chongqing radish Paocai brines revealed using PacBio SMRT sequencing technology[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(9): 3234-3245.

- [9] YANG J X, LI F Z, ZHANG Y L, et al. Metagenomic analysis of microbial community succession during the pickling process of Zhacai (preserved mustard tuber) and its correlation with Zhacai biochemical indices[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(4): 1646–1658.
- [10] ADAMS R I, MILETTO M, TAYLOR J W, et al. Dispersal in microbes: Fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(7): 1262–1273.
- [11] 杨吉霞, 曾祥平, 蒲慧敏, 等. 陕西茯砖茶的微生物多样性和群落结构[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(3): 50–57.
- YANG J X, ZENG X P, PU H M, et al. Investigation of the microbial diversity and community structure in Shaanxi Fu brick tea[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(3): 50–57.
- [12] 杨吉霞, 曾祥平, 李玥梦, 等. 生花和生花泡菜盐水真菌群落结构的对比研究[J]. *食品与发酵工业*, 2022: 1–10 [2021–10–20]. DOI:10.13995/j.cnki.11–1802/ts.029302.
- YANG J X, ZENG X P, LI Y M, et al. A comparative study on the fungal community structure between pellicle and non–pellicle brines of Chongqing Paocai[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022: 1–10[2021–10–20]. DOI:10.13995/j.cnki.11–1802/ts.029302.
- [13] SHI X, ZHU X. Biofilm formation and food safety in food industries[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2009, 20(9): 407–413.
- [14] 孙孟娇, 王稳航. 肉类食品生物膜的形成机制及预防措施[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(4): 375–383.
- SUN M J, WANG W H. Formation mechanism and prevention approaches of biofilm in meat products[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(4): 375–383.
- [15] CAMARGO C H, BRUDER–NASCIMENTO A. Insight into the role of chlorhexidine in *Delfia acidovorans* biofilm formation[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(1): 749.
- [16] WU Y C, DING Y Z, COHEN Y, et al. Elevated level of the second messenger c–di–GMP in *Comamonas testosteroni* enhances biofilm formation and biofilm–based biodegradation of 3–chloroaniline[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 99(4): 1967–1976.
- [17] TRIFONOVA A, STRATEVA T. *Stenotrophomonas maltophilia* – a low–grade pathogen with numerous virulence factors[J]. *Infectious Diseases*, 2019, 51(3): 168–178.
- [18] KIM M H, KHAN M S I, LEE K W, et al. Biofilm reduction potential of micro–plasma discharged water (m–PDW) against the microbes isolated from a tofu manufacturing plant[J]. *LWT – Food Science and Technology*, 2018, 97(6): 719–724.
- [19] RAMAGE G, RAJENDRAN R, GUTIERREZ–CORREA M, et al. *Aspergillus* biofilms: Clinical and industrial significance[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 324(2): 89–97.
- [20] WHITE A, GIBSON D, KIM W, et al. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long–term survival and persistence of *Salmonella*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(9): 3219–3227.
- [21] VILLA–ROJAS R, ZHU M J, PAUL N C, et al. Biofilm forming *Salmonella* strains exhibit enhanced thermal resistance in wheat flour[J]. *Food Control*, 2017, 73: 689–695.

Analysis of the Microbial Community Structure of White Biofilm on Zhacai's Surface during Pickling Process Using High Throughput Sequencing Technology

Yang Jixia¹, Zeng Xiangping², Li Fengzhu¹, He Zhifei^{1*}

¹College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716

²Chongqing Academy of Metrology and Quality Inspection of First Branch, Chongqing 402260)

Abstract Objective: A common phenomenon in Zhacai during pickling process was the occurrence of white biofilm on Zhacai's surface. Currently, little knowledge was obtained about the microorganisms of white biofilm. This study aimed to analyze and elucidate its microbial community structure, providing reference data for identifying and controlling harmful

microorganisms and improving the safety of Zhacai. Methods: The bacterial 16S rRNA gene and fungal ITS1 gene of white biofilm samples were sequenced by PacBio SMRT and Illumina MiSeq sequencing platform respectively. Results: There were multiple genera of bacteria and fungi present in the white biofilm samples. The main genera of bacteria identified included *Delftia*, *Comamonas*, *Stenorophomonas* and *Brevundimonas*, while the main genera of fungi included *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Debaryomyces*, *Penicillium*, *Wickerhamomyces* and *Kazachstania*. Conclusions: The results of this study could provide reference for the prevention and control of microorganisms in Zhacai.

Keywords high throughput sequencing; Zhacai; biofilm; microbial community structure