

# 基于高通量测序的大黄鱼 表面微生物群落组成及变化分析

毛俊龙, 祁雪儿, 张宾, 水珊珊

(浙江海洋大学食品与医药学院, 浙江省海产品健康危害因素关键技术研究重点实验室, 浙江舟山 316022)

**摘要:** 为了探究茶黄素对低温贮藏大黄鱼表面附着的微生物组成的影响情况, 本实验以空白处理和 0.3 mol/L Vc 溶液浸泡处理为对照, 采用 0.3 mol/L 茶黄素对冷藏和冻藏大黄鱼分别进行浸泡处理, 通过对大黄鱼表面附着微生物提取及高通量测序分析, 获得不同处理样品中微生物组成及变化情况。结果表明, 大黄鱼样本中有效序列范围为 22879~55910 条, Operational taxonomic unit (OTU) 范围为 28~49, 其中以采用 Vc 浸泡处理后冻藏大黄鱼 OTU 数最低。实验组的 Chao1 值、Shannon 指数和 Simpson 指数与空白处理组相比均有明显变化, 其中 Shannon 指数分别下降 17.80% 和 13.79%, Simpson 指数分别上升 50.80% 和 71.72%, 表明茶黄素对大黄鱼表面菌落多样性和丰富度具有显著影响。经过茶黄素处理后, 大黄鱼表面菌落分布发生了变化, 冷藏条件下的大黄鱼表面的类香味菌属、嗜冷杆菌属、黄杆菌属的相对丰度占比从 20.55%、11.02%、7.38% 均下降到 1% 以下, 冻藏条件下的不动杆菌属等菌属生长受到抑制。以上结果说明, 茶黄素具有较好的抗氧化性, 对脂肪含量较高的大黄鱼表面微生物菌落组成有一定的影响, 可以抑制部分菌属生长, 延长大黄鱼贮藏时间。研究结果可为大黄鱼品质保障、复合生物保鲜剂的开发等提供基础参考。

**关键词:** 大黄鱼; 高通量测序; 微生物

文章编号: 1673-9078(2020)12-27-35

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.12.0565

## Analysis Microbial Community on the Surface of Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*) Based on High-throughput Sequencing

MAO Jun-long, QI Xue-er, ZHANG Bin, SHUI Shan-shan

(Key Laboratory of Health Risk Factors for Seafood of Zhejiang Province, College of Food and Medicine, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

**Abstract:** To investigate the effect of theaflavin on the microbial composition on the surface of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in low-temperature storage, microbial composition and changes in different samples were obtained by microbial extraction and high-throughput sequencing analysis after soaking the refrigerated and frozen yellow croaker with 0.3 mol/L theaflavin and 0.3 mol/L Vc solution. The results showed that the effective sequence range was 22879~55910, and the operational taxonomic unit (OTU) range was 28~49 in large yellow croaker. The number of OTUs in the frozen large yellow croaker after Vc soaking was the lowest. The Chao1 value, Shannon index, and Simpson index of refrigerated and frozen large yellow croaker treated with theaflavin were significantly changed compared with the blank group, among that Shannon index decreased by 17.80% and 13.79%, Simpson index increased by 50.80% and 71.72% respectively, indicating that theaflavin had a significant effect on the colony diversity and richness of bacteria on the surface of large yellow croaker. The surface colony distribution of the large yellow croaker was changed, the relative abundance of *Myroides*, *Psychrobacter* and *Flavobacterium* on the surface of refrigerated large yellow croaker treated with theaflavin decreased from 20.55%, 11.02% and 7.38% to less than 1%, and the growth of *Acinetobacter* was

引文格式:

毛俊龙, 祁雪儿, 张宾, 等. 基于高通量测序的大黄鱼表面微生物群落组成及变化分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(12): 27-35

MAO Jun-long, QI Xue-er, ZHANG Bin, et al. Analysis microbial community on the surface of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) based on high-throughput sequencing [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 27-35

收稿日期: 2020-06-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31871871); 浙江省自然科学基金项目 (LY18G200008)

作者简介: 毛俊龙 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工及贮藏

通讯作者: 水珊珊 (1989-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品分子营养

inhibited by theaflavin treatment. Taken together, theaflavin had a good antioxidative effect on the microbial composition on the surface of large yellow croaker with high-fat content, which could inhibit bacteria growth and prolong the storage time of large yellow croaker. The research provides a basic reference for the quality assurance of large yellow croaker and the development of compound biological preservative.

**Key words:** large yellow croaker; high-throughput sequencing; microbial

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 是中国海水养殖产量最高和最具出口优势的水产品之一, 其肉质细嫩, 蛋白质含量高, 胆固醇含量低, 含有丰富的无机盐及微量元素, 具有延缓衰老, 提高机体免疫力, 治疗贫血等多重功效<sup>[1,2]</sup>。大黄鱼肌肉的水分含量高达 74%, 适合腐败菌生长<sup>[3]</sup>, 易生成胺、硫化物、醛、酮、酯、有机酸等, 影响气味和味道, 导致新鲜鱼肉的腐败, 影响消费者对食品感官, 导致这些不良影响的细菌就是该鱼肉的特定腐败菌 (Specific spoilage organism, SSO)<sup>[4-7]</sup>。对于大黄鱼等不易贮藏的水产品的保藏, 国内外主要采用低温保藏技术<sup>[8,9]</sup>, 但是一般的冰温和冷藏保鲜不能大幅度延长水产品的货架期, 且大黄鱼经过冻藏后易出现口感降低、营养价值损失的问题<sup>[10,11]</sup>。所以, 寻求一种适于大黄鱼的贮藏前处理方式对促进养殖、加工及贮运等产业极为重要<sup>[12]</sup>。目前, 绝大多数水产品的贮藏通过添加生物保鲜剂等手段来进行保鲜。生物保鲜剂是指从动植物、微生物中提取的天然的或利用生物工程技术改造获得的对人体安全的保鲜剂<sup>[13]</sup>, 因其具有安全、无毒、高效等优点, 使得成为水产品加工企业用来延长产品保质期的手段之一, 常见的生物保鲜剂有茶多酚、壳聚糖、乳酸链球菌素、乳酸菌等<sup>[14]</sup>。茶黄素是一种新型的食品添加剂, 它不仅具有抗氧化性, 还拥有许多对人体有利的活性物质<sup>[15,16]</sup>, 将其添加于食品当中, 不仅保护了食品原有的营养价值, 还赋予食品新的营养价值, 如抗炎、调节神经功能等<sup>[17,18]</sup>。目前, 研究发现茶黄素可作为有效控制虾黑变的天然抗氧化剂<sup>[19]</sup>, 但是, 关于茶黄素应用于大黄鱼的保鲜的研究尚未报道。因此认定茶黄素用来保鲜大黄鱼是合理可行的。

近年来, 宏基因组学技术迅速发展, 其避开了传统微生物的分离培养方法, 直接从测试样品中提取总 DNA 进行分析<sup>[20]</sup>。相比于传统的实时定量荧光聚合酶链式反应、变性梯度凝胶电泳及末端限制性片段长度多态性分析技术, 高通量测序技术能更完整地反映样品中微生物的群落特征, 可以同时实现对几百万 DNA 分子的测序, 更全面地鉴定样品中微生物单一基因和全基因组<sup>[21,22]</sup>。随着现代测序技术快速发展, 高通量测序技术已成功应用于多个学科领域, 如植物多样性, 海洋和肠道环境、发酵食品、人类健康与疾病等多个方面<sup>[23]</sup>。本研究基于高通量测序技术, 研究茶

黄素对大黄鱼保鲜过程中微生物组成差异情况, 旨在为大黄鱼保鲜中菌群组成及茶黄素保鲜技术提供基础信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

养殖新鲜大黄鱼, 购于浙江省舟山市东河市场; 茶黄素, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; L-抗坏血酸, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 琼脂糖, AXYGEN 公司; DKY-II 型恒温调速回转式摇床, 倍辉北京产品部; ABI GeneAmp®9700 型 PCR 仪, 美国 ABI 公司; QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统, 美国 Promega 公司; Nanodrop2000 超微量分光光度计, 美国 Thermo Scientific 公司; TransGen AP221-02 TransStartFastPfu DNA Polymerase, 北京全式金生物技术有限公司; TruSeq™ DNA Sample Prep Kit 等测序用试剂, 美国 Illumina 公司; AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒, 美国 AXYGEN 公司; SW-CJ-1F 型超净工作台, 苏州净化设备有限公司; TG16-WS 型台式高速离心机, 安徽中佳科学仪器有限公司。

### 1.2 试验分组与处理

取同一批次养殖的新鲜大黄鱼六组, 采取三种不同的处理方式, 其中两组在 4 °C 条件下完全浸没于 0.3 g/L 茶黄素溶液 30 min 后用纱布轻拭去表面水分, 两组在 4 °C 条件下完全浸没于 0.3 g/L L-抗坏血酸 (Vc) 溶液中 30 min 后用纱布轻拭去表面水分, 剩下两组不做任何处理, 处理完后, 分别用封口袋包装进行后续分组。取三种不同的处理方式的样品各一组, 贮藏于 4 °C 冰箱中 24 h 后, 切取大黄鱼表皮; 剩下三组样品冻藏于 -18 °C 冰箱中 30 d 后, 流水快速解冻, 切取大黄鱼表皮。

### 1.3 微生物提取与分析

#### 1.3.1 大黄鱼表面微生物提取<sup>[24]</sup>

将以上各组大黄鱼表皮样品进行研磨粉碎后, 取 10 g 鱼皮粉末置于无菌锥形瓶中, 加入 9 倍体积的无菌生理盐水, 在培养摇床中以 300 r/min 提取 60 min (室温), 然后采用无菌纱布过滤并用无菌水淋洗后,



在 12000 r/min 条件下离心 10 min, 将离心获得菌体沉淀物用于后续微生物菌落分析。

1.3.2 大黄鱼表面微生物群落分析

1.3.2.1 DNA 抽提

参照基因组 DNA 提取试剂盒说明, 提取大黄鱼表面微生物中总基因组 DNA, 使用超微量分光光度计检测提取的 DNA 纯度和浓度, 并利用 1%琼脂糖凝胶电泳, 5 V/cm 电压, 检测抽提的基因组 DNA 的完整性。

表 1 PCR 扩增的引物信息

Table 1 Primer information for PCR amplification

| 测序类型 | 引物名称 | 引物序列                      | 扩增区域  | 长度     |
|------|------|---------------------------|-------|--------|
| 微生物  | 515F | 5'-GTGNCAGCMGCCGCGGTAA-3' | V3~V5 | 750 bp |
|      | 907R | 5'-CCGTCAATTCCT-3'        |       |        |

PCR 采用 25  $\mu$ L 反应体系: 5 $\times$ FastPfu Buffer 5  $\mu$ L; 2.5 m MdNTPs 2.5  $\mu$ L; Forward Primer (5  $\mu$ M) 1  $\mu$ L; Reverse Primer (5  $\mu$ M) 1  $\mu$ L; FastPfu Polymerase 0.5  $\mu$ L; BSA 0.25  $\mu$ L; Template DNA 10 ng; 添加双蒸馏水补充至 25  $\mu$ L。PCR 反应参数: 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 27 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 降至 10  $^{\circ}$ C。

1.3.2.3 荧光定量

将 PCR 产物用 QuantiFluor<sup>TM</sup>-ST 蓝色荧光定量系统进行检测定量, 之后按照每个样品的测序量要求, 进行相应比例的混合。

1.3.2.4 Illumina PE250 文库构建与测序

进行 Illumina Miseq 2x 300 bp 高通量测序及生物信息学分析, 由微基生物科技(上海)有限公司协助完成。

1.3.3 大黄鱼表面微生物信息分析

采用 MiSeq 测序平台进行数据分析。首先按照 barcode 和引物序列进行拆分, 去除 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列, 得到每个样品的有效序列; 根据 overlap 关系, 采用 FLASH 对拆分好数据中每个样品的 reads 进行拼接, 同时对序列质量进行质控和过滤,

1.3.2.2 PCR 扩增

按指定测序区域, 合成带有 barcode 的特异引物, 进行 PCR 扩增。针对 16S rRNA 基因 V3~V5 区合成特异引物, 利用 515F (5'-GTGNCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 907R (5'-CCGTCAATTCCT-3') 引物进行 PCR 扩增。每组样品平行三次, 将同一样品的 PCR 产物混合后用 2%琼脂糖凝胶电泳检测, 再使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物, 并用 2%琼脂糖电泳检测经 Tris-HCl 洗脱的产物。

拼接好的优质序列为原始 Tags 数据 (Raw Tags)<sup>[25]</sup>; 根据 Qiime<sup>[26]</sup>的 Tags 步骤, 将 Raw Tags 从 $\leq 3$  连续低质量值碱基数达到设定长度的第一个低质量碱基位点截断; Tags 经过截取后得到 Tags 数据集, 进一步过滤掉其中连续高质量碱基长度小于 Tags 长度 75%的 Tags; 经处理后得到的 Tags 序列与数据库 (Gold database) 进行比对 (UCHIME Algorithm)<sup>[27]</sup>检测嵌合体序列, 并最终去除其中的嵌合体序列<sup>[28]</sup>, 得到最终的有效数据 (Effective Tags)。生物多样性和群落分析, 采用 Uparse 软件 (v7.0.1001)<sup>[29]</sup>将序列按照序列相似性为 97%的阈值进行 OTUs 操作分类单元聚类。基于 OTU 聚类分析结果, 进行多种多样性指数分析, 以及对测序深度进行检测。

1.3.4 数据处理

使用 Qiime 软件计算 Observed-species、Chao1、Shannon、Simpson、ACE、Goods-coverage, 使用 R 语言工具绘制稀释曲线和 Shannon-Wiener 曲线。基于分类学信息, 在各个分类水平上进行群落结构统计分析<sup>[30]</sup>, 使用 R 语言工具绘制各分类级别样本柱状图、PCoA 图。在上述分析基础上, 最后进行一系列群落结构和系统发育等深入的统计学和可视化分析。

表 2 各组样品有效序列与 OTU 数量统计

Table 2 Observed valid sequence and OTU numbers in different groups

| 组别     | 优化有效序列 | 碱基数量     | 平均长度/bp | OTU 数量 |
|--------|--------|----------|---------|--------|
| 蒸馏水组冷藏 | 57054  | 21404026 | 375.15  | 49     |
| Vc 组冷藏 | 49662  | 18669688 | 375.94  | 41     |
| 茶黄素组冷藏 | 55910  | 21016043 | 375.89  | 43     |
| 蒸馏水组冻藏 | 39102  | 14719878 | 376.45  | 36     |
| Vc 组冻藏 | 22879  | 8607617  | 376.22  | 28     |
| 茶黄素组冻藏 | 47885  | 18011112 | 376.13  | 34     |

表 3 各组样品的多样性指数分析

Table 3 Diversity of bacterial community in different groups

| 组别     | OTU 数量 | ACE 指数 | Chao1 指数 | Shannon 指数 | Simpson 指数 | Coverage 指数 |
|--------|--------|--------|----------|------------|------------|-------------|
| 蒸馏水组冷藏 | 49     | 50     | 49       | 2.64       | 0.1004     | 0.999963    |
| Vc 组冷藏 | 41     | 44     | 43       | 1.98       | 0.2262     | 0.999892    |
| 茶黄素组冷藏 | 43     | 46     | 44       | 2.17       | 0.1514     | 0.999899    |
| 蒸馏水组冻藏 | 36     | 37     | 36       | 2.18       | 0.1531     | 0.999904    |
| Vc 组冻藏 | 28     | 29     | 28       | 1.66       | 0.3349     | 0.999946    |
| 茶黄素组冻藏 | 34     | 36     | 35       | 1.88       | 0.2629     | 0.999921    |

2 结果与分析

2.1 样品测序数据分析

采用 Illumina 高通量测序，获得不同样本原始序列数据后，再经序列优化及统计，得到各实验组有效序列范围为 22879~57054 条，平均长度范围为 375.15~376.45 bp。对样品序列进行聚类分析，在 97% 相似水平下的 OTU 生物信息统计发现，各组样品 OTU 数量范围为 28~49。在冷藏处理条件下，空白组的 OTU 数量最高，为 49，茶黄素处理的样品的 OTU 数量为 43，Vc 处理的样品的 OTU 数量为 41。说明在冷藏条件下茶黄素有明显的抑菌作用。这可能因为茶黄素是一类具有苯骞卓酚酮结构的物质，其苯骞卓酚酮环上的羟基起到抗菌活性的作用<sup>[31]</sup>。在冻藏处理条件下，空白组的 OTU 数量为 36，Vc 处理的样品的 OTU 数量为 28，茶黄素处理的 OTU 数量为 34。说明在冻藏条件下茶黄素有一定的抑菌作用。茶黄素带负电荷，嗜冷微生物含有丰富的负电脂多糖<sup>[32]</sup>，因此影响茶黄素破坏阴性菌的活性，这可能是冻藏条件下较冷藏条件下效果不太显著的原因。

2.2 样品多样性指数分析

单样本多样性分析（Alpha 多样性）反映微生物群落的丰度和多样性，各组样品中 Alpha 多样性指数如表 2 所示。其中，Chao1 指数和 ACE 指数主要用于表征样本中的菌群丰度（Community richness），Chao1 指数越大，表示物种种类越多，ACE 值越大，样本的真实物种种类越多；Shannon 和 Simpson 指数主要用于表征样品中菌群多样性（Community diversity）；Coverage 是指各样本中低丰度 OTU 的覆盖率，其数值越高，则样本中序列被测出的概率越高，直接反映测序结果是否代表样本中微生物的真实情况<sup>[33,34]</sup>。由表 3 结果可知，各组样本的测序覆盖率（Coverage）均在 0.99 以上，说明测序对样本中细菌的覆盖率高、测序深度适合，可满足各组样品中细菌多样性分析的

需要<sup>[35]</sup>。

在冷藏条件下，茶黄素处理的样品相对于空白组样品，其 Ace、Chao1 和 Shannon 指数值较低，而 Simpson 指数较高。同样的，在冻藏条件下，大黄鱼的菌群丰富度和多样性明显下降，其中，相对于空白组，茶黄素处理的样品的 Ace、Chao1 和 Shannon 指数值较低，Simpson 指数较高，表明茶黄素处理能降低菌群丰度和多样性。在不同温度储藏条件下，经 Vc 处理的大黄鱼样品的 Ace、Chao1 和 Shannon 指数值均最低，Simpson 指数最高。结果可能是因为茶黄素发挥抑菌作用，通过与细菌膜相互作用并引起不可逆的损伤乃至改变病原菌细胞膜性质<sup>[36]</sup>。

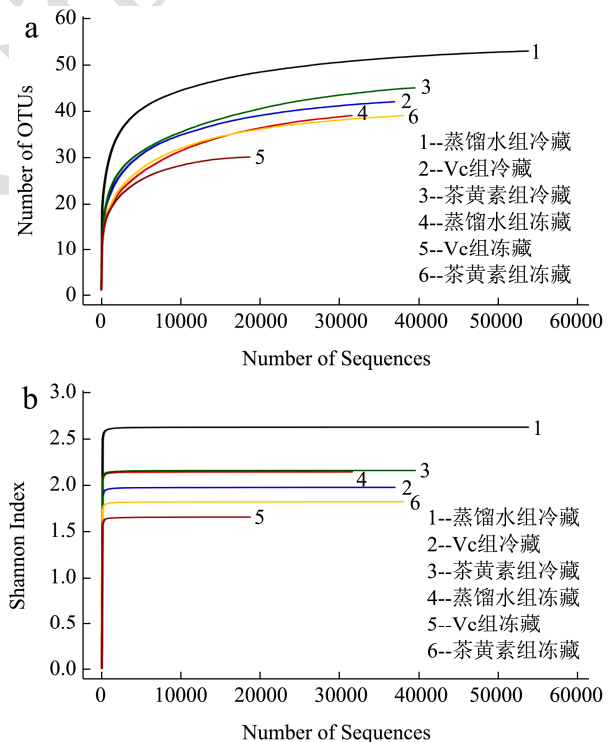


图 1 稀释曲线 (a) 和 Shannon-Wiener 曲线 (b) 分析  
Fig.1 Results of the rarefaction curves (a) and Shannon-Wiener curves (b)

各组样品的群落稀释曲线和 Shannon-Wiener 曲线如图 1 所示。由图 1 可知，六组样品中菌落 Observed OTU 数目和 Shannon 指数随着测序深度增加逐渐上升

并趋于平缓。进一步说明本次测序结果能够较全面地反映样品所包含的菌落多样性信息。

## 2.3 样品中物种组成分析

### 2.3.1 属分类水平上的物种注释及分析

根据六种不同处理的大黄鱼表面菌群的物种注释结果,选取了大黄鱼表面菌群在属水平上丰度大于1%的物种的分布情况,如图2所示。

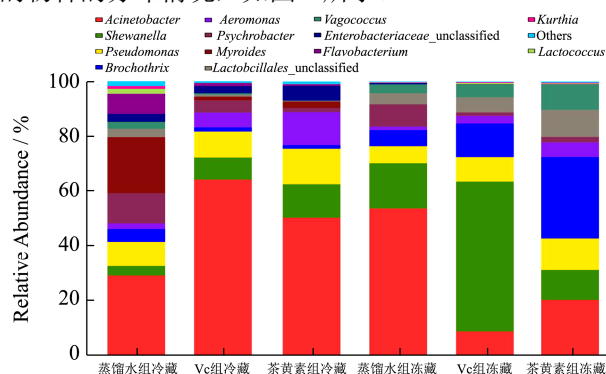


图2 不同样品微生物物种组成(属水平)

Fig.2 Bacterial community composition at genus level in different groups

在冷藏条件下,大黄鱼表面分布的微生物主要是不动杆菌属(*Acinetobacter*)、类香味菌属(*Myroides*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、环丝菌属(*Brochothrix*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、乳杆菌目(*Lactobacillales\_unclassified*)、肠杆菌科(*Enterobacteriaceae\_unclassified*)、漫游球菌属(*Vagococcus*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、库特氏菌属(*Kurthia*)等。其中,蒸馏水冷藏组中优势微生物(具有最适生活度、繁殖最快、数量最多的微生物种群)有不动杆菌属(*Acinetobacter*)、类香味菌属(*Myroides*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)。经过茶黄素和Vc溶液浸泡处理后,大黄鱼表皮的菌属数量和种类有明显的下降,说明茶黄素有一定的抑菌作用。表皮中类香味菌属、嗜冷杆菌属、黄杆菌属的相对丰度有明显的下降,这可能是因为这三类菌属受环境的影响较大。同时,处理后样品的优势微生物发生了改变,Vc冷藏组主要有不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、茶黄素冷藏组主要有不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)。以上结果进一步证明茶黄素对大黄鱼表面中腐败菌的生长有较好的抑制作用,进而能延长大黄鱼的货架期。

在冻藏条件下,大黄鱼表面分布的微生物主要是不动杆菌属(*Acinetobacter*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、环丝菌属(*Brochothrix*)、乳杆菌目(*Lactobacillales\_unclassified*)、漫游球菌属(*Vagococcus*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)。其中,蒸馏水冷藏组中优势微生物有不动杆菌属(*Acinetobacter*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)。样品经过茶黄素和Vc溶液浸泡处理后,其表皮的菌属数量和种类有明显的下降。其中,不动杆菌属相对丰度下降最为明显,不动杆菌属的相对丰度显著下降,可能与其低温耐受性相对较弱有关<sup>[37]</sup>,茶黄素本身具有广谱的抑菌作用<sup>[38]</sup>,在温度更低的条件下,其作用发挥更加明显。不动杆菌属菌群含量可显著影响水产品腐败程度,其相对丰度增加可加速水产品的腐败<sup>[39]</sup>。因此,茶黄素在冻藏条件下能够更好地抑制不动杆菌属的生长,延缓大黄鱼的腐败。嗜冷杆菌属为典型的耐寒性细菌类,其喜好低温环境,在南极磷虾、鲑鱼和大黄鱼等多种水产品中均有大量检出,并可随冷藏时间的延长而含量逐渐上升<sup>[40]</sup>。通过茶黄素的作用下,大黄鱼表面的嗜冷杆菌属相对丰度有显著下降,这可能是因为嗜冷杆菌属于革兰氏阴性菌,茶黄素中苯骞卓酚酮环上的羟基发挥了一定的作用<sup>[31]</sup>,从而抑制其生长。同时,实验组处理后样品的优势微生物也发生了改变,Vc冻藏组主要有不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、环丝菌属(*Brochothrix*);茶黄素冻藏组主要有环丝菌属(*Brochothrix*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)。从结果可知,在冻藏条件下,茶黄素和Vc的抗菌作用更加明显,说明冻藏条件下茶黄素可以作为控制大黄鱼鱼皮表面微生物的生长的添加剂,从而保证大黄鱼品质。

### 2.3.2 优势物种群落分析

选取同一温度贮藏的样品中丰度最高的一些物种(属水平)绘制柱状图并显示该物种对应的门水平分类信息,其中,同一颜色物种表示来源于同一门类。

在冷藏条件下,大黄鱼表面的微生物有不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、类香味菌属(*Myroides*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)。优势微生物主要是变形菌门(*Proteobacteria*),占82.14%,还有占少数的拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)。说明冷藏条件下大黄鱼保鲜

主要控制变形菌门 (*Proteobacteria*) 生长的抑制, 茶黄素的作用主要是针对变形菌门中的微生物, 以达到抑菌、延缓大黄鱼变质的作用。

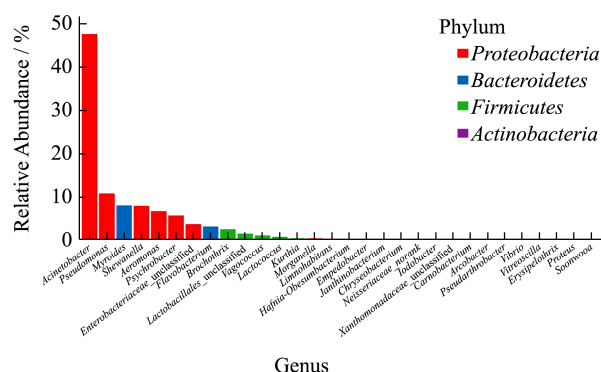


图3 冷藏条件下大黄鱼表面的优势菌种

Fig.3 Dominant species on the surface of *Larimichthys crocea* under refrigerated conditions

在冻藏条件下, 大黄鱼表面的微生物主要是不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、环丝菌属 (*Brochothrix*)、漫游球菌属 (*Vagococcus*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)。其中, 优势微生物主要是变形菌门 (*proteobacteria*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidetes*), 分别占 69.74% 和 29.44%。经过茶黄素处理后, 大多数的微生物丰度呈现下降趋势, 说明茶黄素对变形菌门 (*proteobacteria*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 的微生物抑制生长有显著的作用。茶黄素的冻藏处理对大黄鱼表面菌群的种类影响较不大, 对其丰度有较大的影响。

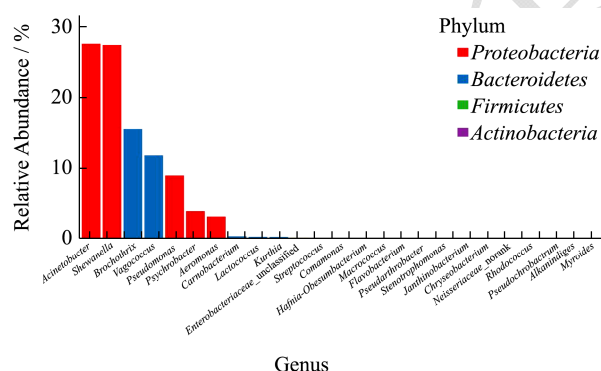


图4 冻藏条件下大黄鱼表面的优势菌种

Fig.4 Dominant species on the surface of *Larimichthys crocea* under frozen storage conditions

## 2.4 样品间的 $\beta$ 多样性分析

主成分分析, 即 PCoA 分析 (Principal Component Analysis), 是一种对数据进行简化分析的技术, 这种方法可以有效的找出数据中最主要的元素和结构, 去除噪音和冗余, 将原有的复杂数据降维, 揭示隐藏在复杂数据背后的简单结构。其优点是简单且无参数限

制。通过分析不同样本 OTU (97%相似性) 组成可以反映样本间的差异和距离, PCoA 运用方差分解, 将多组数据的差异反映在二维坐标图上, 坐标轴取能够最大反映方差值的两个特。不同样本可能表现出分散和聚集的分布情况, 样本组成越相似, 其反映在 PCoA 图中的距离越近<sup>[41]</sup>。

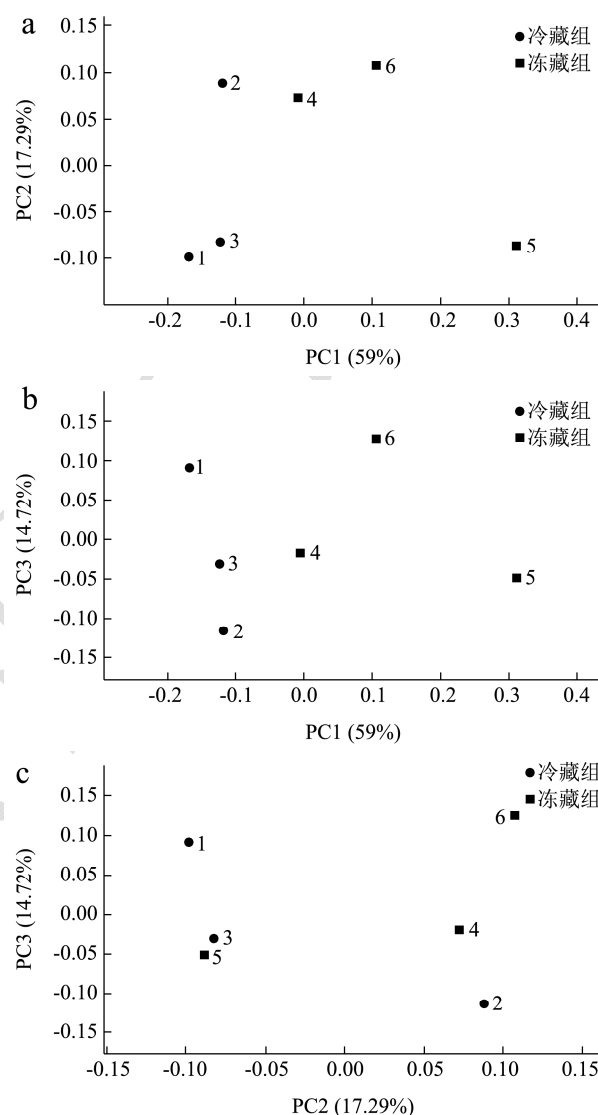


图5 不同样品 PCoA 分析

Fig.5 Principal component analysis (PCoA) for different group

注: PC1-2, PC1-3 和 PC2-3 分别是用前三个主要成分, 两两组合作图。图中 1 为蒸馏水组冷藏, 2 为 Vc 组冷藏, 3 为茶黄素组冷藏, 4 为蒸馏水组冻藏, 5 为 Vc 组冻藏, 6 为茶黄素组冻藏。

通过 PCoA 主坐标分析可以研究数据的相似性与差异性, 图 5 为不同样本大黄鱼表面的菌群属水平的 PCoA 主坐标分析结果。由图 5 可知, PC1 为第一主成分, 其对总菌群代表性的贡献率为 59.00%; PC2 为第二主成分, 其对总菌群代表性的贡献率为 17.29%; PC3 为第三主成分, 其对总菌群代表性的贡献率为



14.72%。对于主成分 PC1-2 分析,可以发现,冷藏条件下的三组样品间的距离较为相近,在冻藏条件下的三组样品的距离较远,说明冻藏条件使得添加的茶黄素和 Vc 的抗菌作用更加明显。因此在不同贮藏的温度下,茶黄素的抗菌效果程度不同,冻藏条件有利于提升茶黄素对大黄鱼的保鲜作用。对于主成分 PC1-3、PC2-3 分析,整体来看,以上几组样品在该主成分水平上,各组样品均存在着较大距离,表明贮藏环境温度及添加的保鲜物质等,均对大黄鱼表面菌群组成产生较大的影响。

## 2.5 样品差异分析

LEfSe 分析可以分析组间菌群差异,找出各组间具有显著丰度差异的微生物种类,有助于开发 Biomaker 等研究<sup>[42]</sup>。图 6 为 LEfSe 分析得出的进化分支图,由内至外辐射的圆圈代表了由界(单个圆圈)

至属(或种)的分类级别(不同的分类水平下圆圈的层数不同,下图为 order 水平下进化图,所以有 4 层)。在不同分类级别上的每一个小圆圈代表该水平下的一个分类,小圆圈直径大小与相对丰度大小呈正比。无显著差异的物种统一着色为黄色,差异物种 Biomarker 跟随组进行着色,紫色节点表示在空白对照组中起到重要作用的微生物类群,红色节点表示在 Vc 实验组中起到重要作用的微生物类群,绿色节点表示在茶黄素实验组中起到重要作用的微生物类群,图中英文字母表示的物种名称在右侧图例中进行展示。从结果中可以发现,通过茶黄素处理的大黄鱼表面存在显著丰度差异的是疣微菌科(*Ruminococcaceae*)和普雷沃氏菌科(*Prevotellaceae*),因此后续在研发复合添加剂的时候,可以考虑茶黄素与能够有效抑制疣微菌科和普雷沃氏菌科的物质结合,增强抗菌作用,达到更好的保鲜效果。

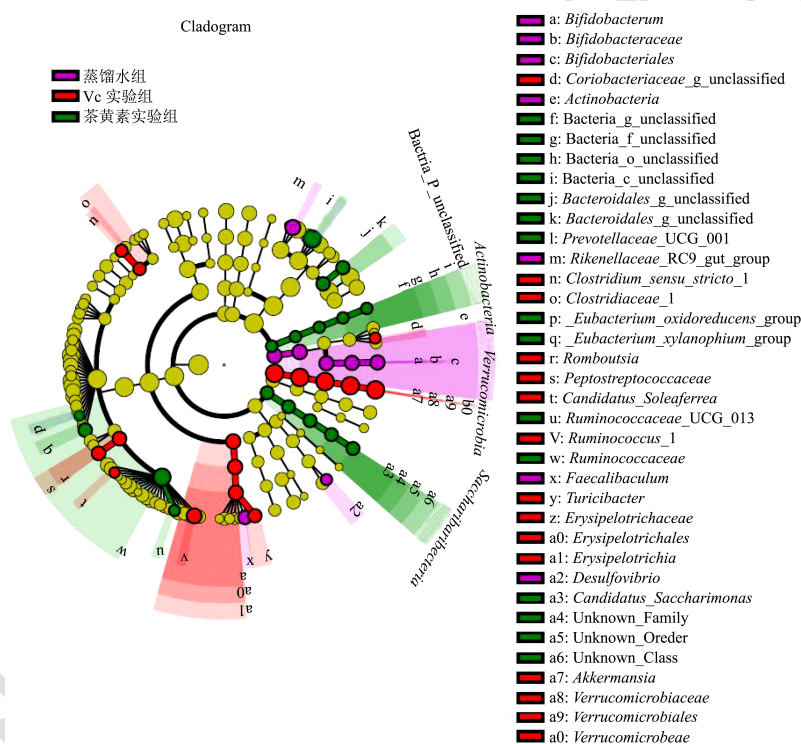


图 6 冻藏条件下三组处理样品的分支进化图

Fig.6 Bifurcation evolution diagram of three groups under freeze storage condition

## 3 结论

高通量测序可详细地反映大黄鱼表面附着的微生物种类及其丰度信息。本研究以大黄鱼样品为研究对象,通过添加茶黄素,与空白对照组和 Vc 处理对照组比较,将微生物菌群组成进行对比分析。结果显示,相比空白对照组,经过茶黄素处理的样品的 OTU 数量,ACE 指数,Chao1 指数,Shannon 指数均明显下降, Simpson 指数变大,说明茶黄素对大黄鱼表面菌

落多样性和丰富度具有显著影响,能有效延长大黄鱼的贮藏时间。在冷藏条件下,茶黄素处理后的大黄鱼表面的优势微生物主要有不动杆菌属、假单胞菌、希瓦氏菌属,此时,茶黄素的作用主要是针对变形菌门中部分的微生物;在冻藏条件下,茶黄素处理后的大黄鱼表面的优势微生物主要有环丝菌属、不动杆菌属、假单胞菌、希瓦氏菌属,此时,茶黄素对变形菌门的微生物抑制生长有显著的作用,对拟杆菌门的微生物抑制生长有一定作用,且对菌群种类影响较不大,对

其丰度有较多影响。通过主成分分析发现, 各组样品均存在着较大距离, 贮藏环境温度及添加的保鲜物质对大黄鱼表面菌群组成有产生较大的影响。通过 LEfSe 分析发现, 有效抑制疣微菌科和普雷沃氏菌科的物质能与茶黄素协同作用, 研究开发复合生物保鲜剂。此次研究结果可提供一定的大黄鱼品质保障、复合生物保鲜剂的开发的基础参考。

## 参考文献

- [1] Sampels Sabine. The effects of storage and preservation technologies on the quality of fish products: a review [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2015, 39(6): 1206-1215
- [2] 杨华, 陆森超, 刘丽君, 等. 超高压处理对养殖大黄鱼保鲜效果的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(24): 331-336  
YANG Hua, LU Sen-chao, LIU Li-jun, et al. Effect of high hydrostatic pressure (HHP) treatment on quality preservation of cultured large yellow croakers (*Pseudosciaena crocea*) during storage at 4 °C [J]. Food Science, 2014, 35(24): 331-336
- [3] 汪金林. 茶多酚对冷藏养殖大黄鱼品质影响的研究[D]. 浙江: 浙江工商大学, 2013  
WANG Jin-lin. Effect of tea polyphenol on quality of cultured large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) during refrigerated storage [D]. Zhejiang: Zhejiang Gongshang University, 2013
- [4] WU Tian-tian, WU Chun-hua, FANG Zhong-xiang, et al. Effect of chitosan microcapsules loaded with nisin on the preservation of small yellow croaker [J]. Food Control, 2017, 79: 317-324
- [5] ZHU Jun-li, ZHAO Ai-fei, FENG Li-fang, et al. Quorum sensing signals affect spoilage of refrigerated large yellow croaker by *Shewanella baltica* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 217: 146-155
- [6] 雷丽萍, 朱跃骅, 张剑, 等. 茶多酚对冰藏大黄鱼品质及微生物的影响[J]. 茶叶科学, 2017, 37(5): 523-531  
LEI Li-ping, ZHU Yue-hua, ZHANG Jian, et al. Effects of tea polyphenols on quality and microorganisms of *Pseudosciaena crocea* during iced storage [J]. Journal of Tea Science, 2017, 37(5): 523-531
- [7] JIA Shi-liang, HUANG Zhan, LEI Yu-tian, et al. Application of illumina-miSeq high throughput sequencing and culture-dependent techniques for the identification of microbiota of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) treated by tea polyphenols [J]. Food Microbiology, 2018, 76: 52-61
- [8] Bonilla Franklin, Chouljenko Alexander, Reyes Vondel. Impact of chitosan application technique on refrigerated catfish fillet quality [J]. LWT-food Science and Technology, 2018, 90: 277-282
- [9] WU Tian-tian, WU Chun-hua, FANG Zhong-xiang, et al. Effect of chitosan microcapsules loaded with nisin on the preservation of small yellow croaker [J]. Food Control, 2017, 79: 317-324
- [10] 夏松养. 水产食品加工学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 84-95  
XIA Song-yang. Aquatic Food Processing Science [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008: 84-95
- [11] 戴志远, 张志广, 王宏海, 等. 不同介质低温速冻对养殖大黄鱼冻藏生化指标的影响[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(11): 160-163  
DAI Zhi-yuan, ZHANG Zhi-guang, WANG Hong-hai, et al. Effects of different medium low temperature quick freezing on biochemical indexes of frozen storage of cultured rhubarb fish [J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(11): 160-163
- [12] 杨文鸽, 薛长湖, 徐大伦, 等. 大黄鱼冰藏期间 ATP 关联物含量变化及其鲜度评价[J]. 农业工程学报, 2007, 23(6): 217-222  
YANG Wen-ge, XUE Chang-hu, XU Da-lun, et al. Changes of ATP-related compounds contents and freshness evaluation of *Pseudosciaena crocea* meat during iced storage [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2007, 23(6): 217-222
- [13] 蒋慧亮, 李学英, 杨宪时, 等. 生物保鲜剂对鱼类腐败菌抑菌效果比较及抑菌机理研究[J]. 食品科学, 2012, 33(23): 31-35  
JIANG Hui-liang, LI Xue-ying, YANG Xian-shi, et al. Comparative antibacterial effects and mechanisms of biological preservatives against fish spoilage organisms [J]. Food Science, 2012, 33(23): 31-35
- [14] 老莹, 胡文忠, 冯可, 等. 天然抑菌剂的抑菌机理及其在果蔬保鲜中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(9): 288-293  
LAO Ying, HU Wen-zhong, FENG Ke, et al. Application of natural antimicrobial agents on fruits and vegetables preservation and its mechanism [J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(9): 288-293
- [15] 刘伟, 周洁, 龚正礼. 茶黄素的功能活性研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 386-391  
LIU Wei, ZHOU Jie, GONG Zheng-li. Research progress in functional activity of theaflavins [J]. Food Science, 2013, 34(11): 386-391
- [16] Arent Shawn M, Senso Meghan, Golem Devon L, et al. The

- effects of theaflavin-enriched black tea extract on muscle soreness, oxidative stress, inflammation, and endocrine responses to acute anaerobic interval training: a randomized, double-blind, crossover study [J]. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2010, 7(11): 1186-1195
- [17] WANG Hong-xin, SUN Jun-tao, LYU Wen-ping, et al. Research progress on preparation, analysis, separation and function of theaflavins [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2011, 30(1): 12-19
- [18] LUO Xiao-yu, Takahara Terumi, HOU Jian-gang, et al. Theaflavin attenuates ischemia-reperfusion injury in a mouse fatty liver model [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 417(1): 287-293
- [19] 龚志华,刘昆言,刘林峰,等.红茶加工过程中茶黄素组分的动态变化[J].*茶叶通讯*,2016,43(2):19-23
- GONG Zhi-hua, LIU Kun-yan, LIU Lin-feng, et al. The dynamic mechanism of theaflavin components in black tea processing [J]. *Journal of Tea Communication*, 2016, 43(2): 19-23
- [20] 王兴春,杨致荣,王敏,等.高通量测序技术及其应用[J].*中国生物工程杂志*,2012,32(1):109-114
- WANG Xing-chun, YANG Zhi-rong, WANG Min, et al. High-throughput sequencing technology and its application [J]. *China Biotechnology*, 2012, 32(1): 109-114
- [21] 曹荣,刘淇,赵玲,等.基于高通量测序的牡蛎冷藏过程中微生物群落分析[J].*农业工程学报*,2016,32(20):275-280
- CAO Rong, LIU Qi, ZHAO Ling, et al. Microbial flora analysis of oyster during refrigerated storage by high throughput sequencing technology [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2016, 32(20): 275-280
- [22] 赵金丽,魏婉莹,沈春蕾,等.基于高通量测序的紫贻贝中微生物群落分析[J].*现代食品科技*,2019,35(2):253-258,278
- ZHAO Jin-li, WEI Wan-ying, SHEN Chun-lei, et al. Microbial community analysis of mussel (*Mytilus edulis*) based on high-throughput sequencing [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(2): 253-258, 278
- [23] Di Bella Julia M, Bao Yige, Gloor Gregory B, et al. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 95(3): 401-414
- [24] HU Dong-xu, PAN Lu-qing, ZHAO Qun, et al. Transcriptomic response to low salinity stress in gills of the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Marine Genomics*, 2015, 24: 297-304
- [25] Magoč Tanja, Salzberg Steven L. Flash: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27: 2957-2963
- [26] Caporaso J Gregory, Kuczynski Justin, Stombaugh Jesse, et al. Qiime allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nature Methods*, 2010, 7: 335-336
- [27] YANG Jing-peng, WANG Jing, YANG Kun, et al. Antibacterial activity of selenium-enriched lactic acid bacteria against common food-borne pathogens *in vitro* [J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(3): 1930-1942
- [28] Eshaghi Morteza, Bibalan Meysam, Hasannejad, Rohani Mahd, et al. *Bifidobacterium* obtained from mother's milk and their infant stool; a comparative genotyping and antibacterial analysis [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 111: 94-98
- [29] Edgar Robert C. UparPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nature Methods*, 2013, 10: 996-998
- [30] LU Xiao-Ming, LU Peng-zhen. Characterization of bacterial communities in sediments receiving various waster effluents with high-throughput sequencing analysis [J]. *Microbial Ecology*, 2014, 67(3): 612-623
- [31] Ohba Mai, Oka Tomoichiro, Ando Takayuki, et al. Antiviral effect of theaflavins against caliciviruses [J]. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 2017, 70(4): 443-447
- [32] 杨贤强,王岳飞,陈留记.茶多酚化学[M].上海:上海科学技术出版社,2003
- YANG Xian-qiang, WANG Yue-fei, CHEN Liu-ji. *Chemistry of Tea Polyphenols* [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2003
- [33] Preidis Geoffrey A, Ajami Nadim J, Wong Matthew C, et al. Composition and function of the undernourished neonatal mouse intestinal microbiome [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2015, 26(10): 1050-1057
- [34] 杨俊花,赵志辉,郭文博,等.应用 Illumina-MiSeq 高通量测序技术分析脱氧雪腐镰刀菌烯醇对小鼠肠道菌群的影响[J].*动物营养学报*,2017,29(1):158-167
- YANG Jun-hua, ZHAO Zhi-hui, GUO Wen-bo, et al. Effects of deoxynivalenol on intestinal microbiota of mice analyzed by illumina-MiSeq high-throughput sequencing technology [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, 29(1): 158-167