

清香型大曲细菌群落结构的比较分析

Comparative analysis of bacterial community structure of Chinese Fen-Daquis

叶光斌^{1,2} 王彩虹¹ 王毅³ 甄攀⁴ 王勇¹ 罗惠波^{1,2}

YE Guang-bin^{1,2} WANG Cai-hong¹ WANG Yi³ ZHEN Pan⁴ WANG Yong¹ LUO Hui-bo^{1,2}

(1. 四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000; 2. 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 自贡 643000;

3. 五粮液集团质量检测中心, 四川 宜宾 644000; 4. 山西杏花村汾酒厂股份有限公司, 山西 汾阳 032200)

(1. College of Bioengineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong, Sichuan 643000, China;

2. Liquor Making Bio-Technology & Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong,

Sichuan 643000, China; 3. Quality Inspection Center of Wuliangye Group, Yibin, Sichuan 644000, China;

4. Shanxi Xinghuacun Fen Wine Factory Co., Ltd., Fenyang, Shanxi 032200, China)

摘要:通过构建细菌 16S rRNA 基因文库、RFLP 指纹图谱分析、测序和系统发育学分析, 分别对汾酒清茬曲、后火曲和红心曲的细菌群落结构进行比较。结果表明, 清香型 3 种大曲细菌均分属于芽孢杆菌纲、放线菌纲及变形菌纲, 但具体种属组成存在一定差异, 其中清茬曲的优势细菌菌群为乳杆菌属和葡萄球菌属(占全部克隆子的比例分别为 37.78%, 22.22%); 后火曲的优势细菌菌群为乳杆菌属、葡萄球菌属、芽孢杆菌属、魏斯氏菌属(占全部克隆子的比例分别为 35%, 16.67%, 16.67%, 13.33%); 红心曲的优势细菌菌群为乳杆菌属、芽孢杆菌属、高温放线菌属(占全部克隆子的比例分别为 26.67%, 28.89%, 17.78%)。

关键词:清香型大曲; 清茬曲; 后火曲; 红心曲; 16S rRNA 基因文库; 细菌群落结构

Abstract: The bacterial community structure of three types Fen-Daquis (Qingcha Daqu, Houhuo Daqu and Hongxin Daqu) were studied through construction of bacteria 16S rRNA gene clone library, sequencing and phylogenetic analyses. The results showed that the bacteria communities of three types Fen-Daquis were both distributed in Bacilli, Actinobacteridae, Gammaproteobacteria. But there are some specific differences in detail composition of the bacterial species among the three types Fen-Daquis. *Lactobacillus* and *Staphylococcus* were the dominant bacteria in Qingcha Daqu (the ratio to total clones were 37.78% and 22.22% separately); *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* and *Weissella* were the dominant bacteria in Houhuo Daqu (the ratio to total clones were 35%, 16.67%, 16.67%, 13.33% separately); *Lactobacillus*, *Staphylococcus* and *Thermoactinomyces* were the dominant bacteria in Hongxin Daqu (the ratio to total clones were 26.67%, 28.89%, 17.78% separately).

13.33% separately); *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Thermoactinomyces* were the dominant bacteria in Hongxin Daqu (the ratio to total clones were 26.67%, 28.89%, 17.78% separately).

Keywords: Fen-Daqui; Qingcha-Qu; Houhuo-Qu; Hongxin-Qu; 16S rRNA gene library; bacterial community structure

清香型大曲是中国大曲清香型白酒的生产用曲, 主要包括清茬曲、红心曲和后火曲 3 种大曲。这 3 种大曲在生产上使用的原材料相同, 生产流程也基本相似, 可简单概括为: 卧曲→上霉期→晾霉期→潮火期→干火期→后火期→养曲→出房验收→贮曲。所不同的是在培曲过程中, 各曲种对培曲温度的要求各不相同(见表 1)。不同的制曲温度及生产工艺, 使得不同大曲内的微生物生长和发酵特征各具特色, 其产生的不同代谢产物对白酒风味形成也有所差异^[1]。清香型白酒生产中将清茬曲、红心曲和后火曲按照 4:3:3 的比例混合后使用^[2]。采用不同工艺生产的 3 种大曲共同发酵, 相辅相成, 便形成了清香型白酒(大曲清香)独特的风格。因此, 认识清香型大曲内不同曲种间微生物群落结构与差异, 对于研究清香型白酒发酵具有十分重要的意义。

原核细胞核糖体小亚基 16S rRNA 基因, 长约 1.5 kb 左右, 大小适中, 既含有高度保守的基因片段又具有种间变异的核酸片段, 非常适合于进行序列测定和菌属间的分析比较, 是理想的基因鉴定靶序列^[3]。张守印等^[4]对 16S rDNA 克隆文库用于细菌群落分析的可靠性进行了研究, 结果表明, 16S rRNA 基因序列分析可以反映菌群中各种细菌的丰度, 是一种较好的分析细菌菌群的方法。目前, 16S rRNA 基因克隆文库技术也已被广泛应用于发酵食品^[5,6]、城市污水^[7]、土壤^[8]等各类复杂环境中细菌微生态的研究。

本研究拟以汾酒清香型大曲—清茬曲、后火曲、红心曲

基金项目: 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室项目(编号: NJ2010-05, NJ2011-05); 四川理工学院校级人才引进项目(编号: 2010XJKRL001)

作者简介: 叶光斌(1980—), 男, 四川理工学院副教授, 博士。

E-mail: guangbin1980@126.com

通讯作者: 罗惠波

收稿日期: 2014-11-29

为研究对象,通过提取大曲微生物总 DNA、PCR 扩增及构建细菌 16S rRNA 基因文库,对其细菌群落组成进行了比较研究,确定了 3 种大曲的优势菌群,为进一步解析清香型大曲功能微生物、筛选优良酿造微生物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大曲样品:采集自山西杏花村汾酒集团有限责任公司,全部为成品曲(见表 1)。每个大曲样品取 3 个平行,按“四分法”^[9]将不同类型大曲分别粉碎混合,用无菌封口袋分装后,置于-80℃保藏备用。

引物:由上海英俊生物技术有限公司合成;
Taq 酶、pMD19-T 载体和 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞、限制性内切酶 *Msp*I 和 *Hha*I:大连宝生物有限公司;
PCR 仪: BIO-RAD Thermal Cycle 型,美国 BIO-RAD 公司;
离心机: Eppendorf Centrifuge 5418 型,美国 Eppendorf 公司。

表 1 试验所用大曲样品信息表[†]

名称	类型(制曲最高品温)	所产白酒香型
汾酒清茬曲	中温曲(45~46℃)	清香型
汾酒后火曲	中温曲(46~48℃)	清香型
汾酒红心曲	中温曲(最高可达 50℃)	清香型

[†] 来源山西杏花村。

1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 的提取及 PCR 扩增 DNA 提取参照文献^[10]。引物 Eub27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')和 Eub1492r (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3')用于扩增细菌 16S rDNA^[11,12],为了防止 PCR 偏差,每个样品做 3 个重复。具体的 PCR 扩增体系及 PCR 扩增程序同叶光斌等的方法^[10,12]。

1.2.2 细菌 16S rRNA 基因克隆文库的构建 将纯化后的 PCR 产物与 pMD-19T 载体 16℃过夜连接,通过热激法(42℃热激 90 s)将连接产物转化到感受态细胞 *E. coli* DH5α(感受态细胞的效价约 10⁸个/μg)中。

1.2.3 阳性克隆子的筛选及 RFLP 分析 菌落 PCR 筛选阳性克隆子。引物 RV-M(5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3')和 M13-47(5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3')用于菌落 PCR 扩增。PCR 扩增体系及 PCR 扩增程序同叶光斌等的方法^[10,12],利用 *Msp*I 和 *Hha*I 双酶切阳性克隆子菌落 PCR 产物的酶切图谱,确定不同谱型,统计每一谱型出现的频率及数目,并将不同谱型的克隆子送到上海杰李生物技术有限公司进行 DNA 测序。

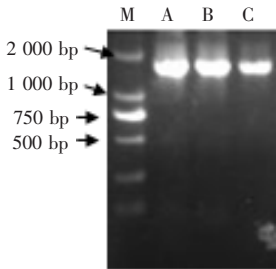
1.2.4 数据分析 将 16S rDNA 序列相似性≥97%的序列

定义为同一 OTU (operational taxonomic units,运算分类单位)^[10,12]。根据测序结果和 RFLP 统计分析结果,统计各文库内 OTU 数目及每个 OTU 在个克隆文库的分布比例。将每个 OTU 的代表克隆子序列与 NCBI 数据库进行比对,找出与克隆子序列同源性最高的序列,用于构建系统发育树和确定其分类地位。Seaview4 软件对齐序列,Mega 4 软件构建系统发育树。文库的评估方法参考叶光斌等的方法^[10,12]。共有 32 个克隆子的 16S rRNA 基因序列上传至 NCBI GenBank 数据库,GenBank 序列号为 KF984353-KF984384。

2 结果与分析

2.1 细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

不同大曲细菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖电泳图谱见图 1。由图 1 可知,3 种大曲样品的细菌 16S rDNA PCR 扩增效果都很好,均得到了一条较亮的 1 500 bp 左右的目的条带。

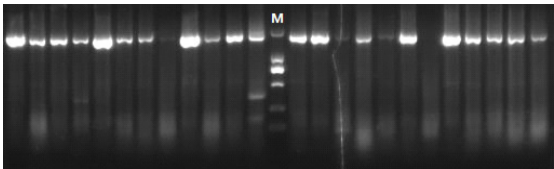


M. DNA Marker(DM2000) A. 清茬曲 B. 后火曲 C. 红心曲

图 1 细菌 16S rRNA 基因 PCR 产物的电泳图谱
Figure 1 The electrophoresis diagram of PCR products of bacterial 16S rRNA gene

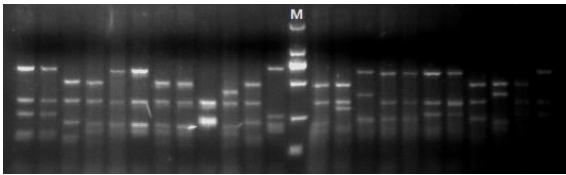
2.2 阳性克隆子检测及 RFLP 分析

部分菌落 PCR 产物电泳图谱见图 2。菌落 PCR 产物为单条带,且片段长度在 1 600 bp 左右的均可视为阳性克隆子。清茬曲、后火曲和红心曲细菌 16S rRNA 基因文库内分别有 45, 60 和 45 个阳性克隆子用于后续的 RFLP 分析。将各文库的阳性克隆子菌落 PCR 产物通过 *Msp*I 和 *Hha*I 双酶切后,进行 RFLP 分析,部分 RFLP 电泳图谱见图 3。不同大曲样品根据 RFLP 分析结果,挑选不同谱型的 32 个代表克隆子进行测序,并与 NCBI GenBank 数据库比对(见表 3)。



M. DNA Marker(DM2000)

图 2 部分克隆子菌落 PCR 产物电泳图谱
Figure 2 The electrophoretogram of colony PCR products of partial colonies



M. DNA Marker(DM2000)

图 3 部分阳性克隆子菌落 PCR 产物双酶切产物电泳图谱(*Msp*I 和 *Hha*I 双酶切)

Figure 3 The electrophoretogram of double enzyme digested products from PCR products of partial positive colonies (Digested with *Msp*I and *Hha*I)

2.3 细菌 16S rRNA 基因文库的评估

3 种大曲细菌 16S rRNA 基因文库的统计结果见表 2。从文库覆盖率上看,在 64%~72%,均未达到饱和;Shannon 指数和 Simpson 指数显示 3 种清香型大曲内细菌群落多样性丰富;且从物种多样性上看,后火曲>清茬曲>红心曲。Buzas-Gibson 均一度指数的分析结果表明,红心曲>后火曲>清茬曲。尽管以上 3 个文库均未达到饱和,但该文库能在一定程度上反映各样品内的主要细菌类群的多样性及丰

度差异。

2.4 清香型大曲细菌群落结构

清茬曲、后火曲、红心曲的细菌 16S rRNA 基因文库内代表克隆子在文库中的分布及 NCBI 数据库比对信息见表 3。由表 3 可知:克隆子与对应序列间的相似度均达到 98%以上。代表克隆子参与构建的系统发育树见图 4。由图 4 可知,所有清香型大曲内细菌群落主要分布于芽孢杆菌纲、放线菌纲及变形菌纲。芽孢杆菌纲内克隆子主要分布于乳杆菌目(*Lactobacillales*)和芽孢杆菌目(*Bacillales*)。其中乳杆菌目内克隆子种类最多,共有 11 个 OTUs,主要分布于乳杆菌属(*Lactobacillus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、乳球菌属(*Lactococcus*);芽孢杆菌目内克隆子包含有 5 个 OTUs,分别为芽孢杆菌属(*Bacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)。放线菌纲内克隆子主要分布于放线菌目(*Actinomycetales*)内的链霉菌属(*Streptomyces*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、考克氏菌属(*Kocuria*)及 *Brachybacterium* 属。变形杆菌纲内克隆子主要分布于不动杆菌属(*Acinetobacter*)和泛菌属(*Pantoea*)。

表 2 不同清香型大曲细菌 16S rRNA 基因文库的统计分析[†]

Table 2 The statistical analysis of bacterial 16S rRNA gene libraries of different Fen-Daquis

文库来源	克隆子数目	OUT 数目	文库覆盖率/%	Shannon-Wiener 指数	Simpson 指数	Buzas-Gibson 均一度指数
清茬曲	45	16	64.44	2.51	0.90	0.78
后火曲	60	19	68.33	2.71	0.92	0.79
红心曲	45	13	71.11	2.39	0.89	0.84

[†] 通常 Shannon-Wiener 指数数值越大,表明文库中克隆子多样性越丰富;Simpson 指数越接近 1,表明文库中克隆子多样性越丰富;Buza-Gibson 均一度指数越接近 1,表明文库中克隆子分布越均匀^[10,12,13]。

从克隆子分布表和系统发育树可以看出:乳杆菌属、葡萄球菌属、芽孢杆菌属、魏斯氏菌属、明串珠菌属在 3 个大曲中同时存在;高温放线菌属只存在于制曲品温较高的后火曲和红心曲中;乳球菌属和短杆菌属只存在于清茬曲和后火曲中;泛菌属只存在于清茬曲和红心曲中;考克氏菌属和短杆菌属是清茬曲的特有菌群;链霉菌属和不动杆菌属是后火曲的特有菌群。其中,清茬曲的优势菌群为乳杆菌属(占全部克隆子的比例为 37.78%,7 OTUs)和葡萄球菌属(22.22%,1 OTU);后火曲的优势菌群为乳杆菌属(占全部克隆子的比例为 35%,8 OTUs)、葡萄球菌属(16.67%,2 OTUs)、芽孢杆菌属(16.67%,2 OTUs)、魏斯氏菌属(13.33%,1 OTU);红心曲的优势菌群为乳杆菌属(占全部克隆子的比例为 26.67%,6 OTUs)、芽孢杆菌属(28.89%,2 OTUs)、高温放线菌属(17.78%,1 OTU)。总体而言,清香型 3 种曲的细菌群落结构存在一定的差异,后火曲分别与清茬曲和红心曲比

较相似,而清茬曲和红心曲间群落相似性较低。

据周恒刚^[14]、胡承等^[15]报道,制曲品温在 30℃左右较适合微生物的生长,而随着温度的上升微生物的活菌数也呈倍下降,大多数不耐高温的细菌逐渐死亡。汾酒 3 种大曲微生物群落的差异与大曲生产过程中温度的控制密切相关。

红心曲制曲温度最高,因此耐高温的芽孢杆菌和高温放线菌与不耐高温的细菌相比具有较大的竞争优势,在文库中占了较高的比例,但细菌群落多样性较其它两种曲低;后火曲的制曲温度较清茬曲的高,因此后火曲中芽孢杆菌所占的比例明显高于清茬曲,后火曲中也有较低含量的高温放线菌分布;而清茬曲制曲温度最低,未检测到高温放线菌的存在。不同的制曲温度使得微生物的生长和发酵特征也各具特色,其产生的不同代谢产物对白酒风味形成也有所差异,汾酒采用不同工艺生产的 3 种大曲共同发酵,三者相辅相成,便形成了汾酒独特的风格。

表 3 不同清香型大曲细菌 16S rRNA 基因文库内代表克隆子的分布及比对信息[†]

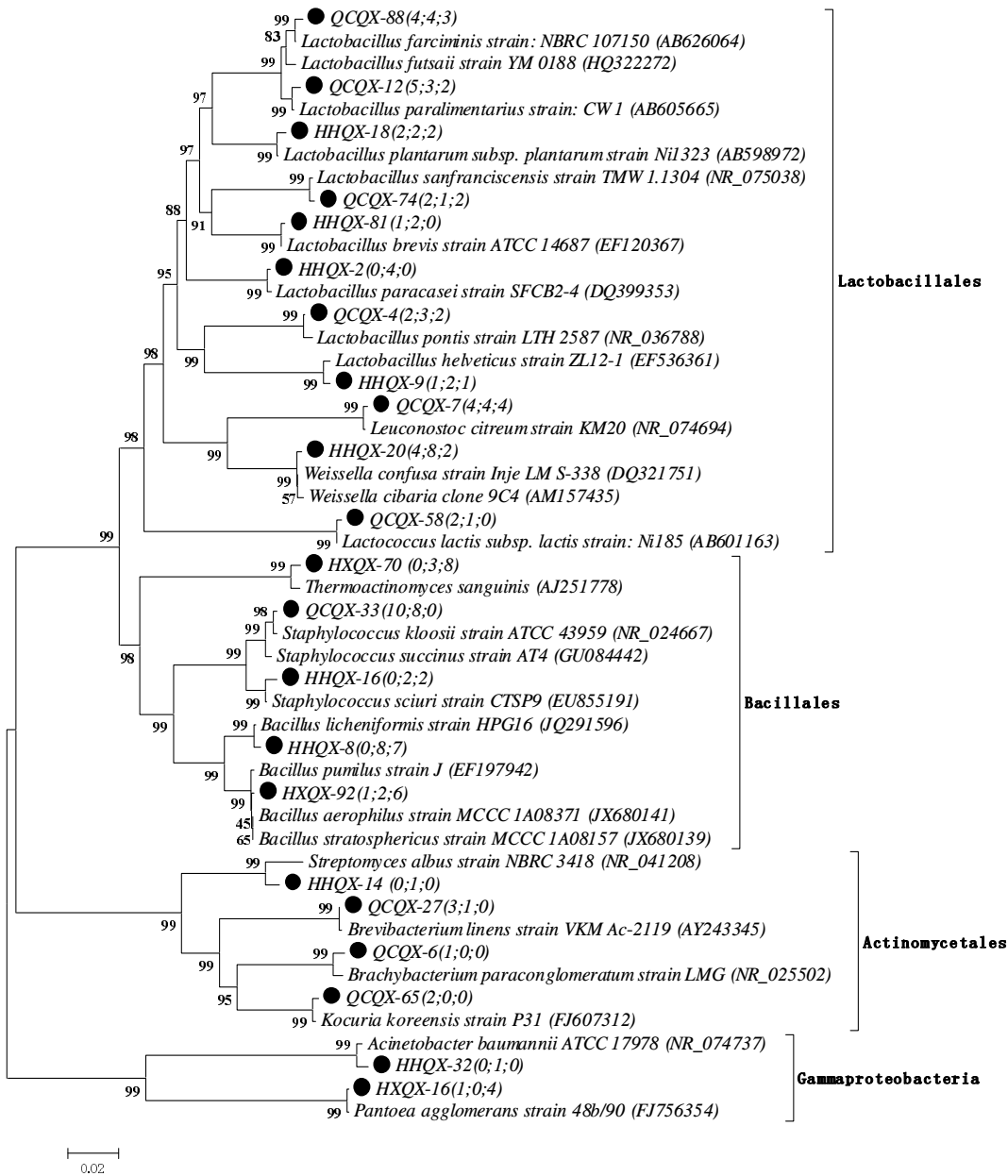
Table 3 Blast and distribute information of represental clones from 16S rRNA gene libraries of different Fen-Daquis

代表克隆子编号	清茬曲分布比例/%	后火曲分布比例/%	红心曲分布比例/%	近似序列号	相似率/%	分类信息
QCQX-12	11.11	5.00	4.44	AB605665	99	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>
QCQX-88	8.90	6.67	6.67	HQ322272	99	<i>Lactobacillus sp.</i>
HHQX-18	4.44	3.33	4.44	AB598972	99	<i>Lactobacillus sp.</i>
QCQX-4	4.44	5.00	4.44	NR_036788	99	<i>Lactobacillus pontis</i>
QCQX-74	4.44	1.67	4.44	NR_075038	99	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
HHQX-81	2.22	3.33	0.00	EF120367	99	<i>Lactobacillus brevis</i>
HHQX-9	2.22	3.33	2.22	EF536361	99	<i>Lactobacillus helveticus</i>
HHQX-2	0.00	6.67	0.00	DQ399353	99	<i>Lactobacillus paracasei</i>
QCQX-7	8.90	6.67	8.90	NR_074694	99	<i>Leuconostoc citreum</i>
HHQX-20	8.90	13.33	4.44	DQ321751	99	<i>Weissella sp.</i>
QCQX-58	4.44	1.67	0.00	AB601163	99	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
HXQX-70	0.00	5.00	17.78	AJ251778	99	<i>Thermoactinomyces sanguinis</i>
QCQX-33	22.22	13.33	0.00	NR_024667	99	<i>Staphylococcus sp.</i>
HHQX-16	0.00	3.33	4.44	EU855191	99	<i>Staphylococcus sciuri</i>
HHQX-8	0.00	13.33	15.56	JQ291596	99	<i>Bacillus licheniformis</i>
HXQX-92	2.22	3.33	13.33	JX680141	99	<i>Bacillus sp.</i>
HHQX-14	0.00	1.67	0.00	NR_041208	98	<i>Streptomyces albus</i>
QCQX-27	6.67	1.67	0.00	AY243345	99	<i>Brevibacterium linens</i>
QCQX-6	2.22	0.00	0.00	NR_025502	99	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>
QCQX-65	4.44	0.00	0.00	FJ607312	99	<i>Kocuria koreensis</i>
HHQX-32	0.00	1.67	0.00	NR_074737	99	<i>Acinetobacter baumannii</i>
HXQX-16	2.22	0.00	8.90	FJ756354	99	<i>Pantoea sp.</i>

[†] “QCQX”、“HHQX”、“HXQX”分别代表清茬曲、后火曲、红心曲细菌 16S rDNA 文库克隆子。

潘勤春等^[16]通过 PCR—DGGE 技术对汾酒大曲细菌群落结构进行了分析,结果表明制曲品温最低的清茬曲多样性最丰富,制曲品温最高的红心曲群落组成最简单,后火曲居中,且清茬曲和红心曲间群落组成差异较大,测序结果表明,清香型大曲内细菌主要为芽孢杆菌属、肠杆菌属、乳酸菌属、不动杆菌属、土壤球菌属,且芽孢杆菌属和肠杆菌属为优势类群。高亦豹^[17]运用 PCR—DGGE 技术对不同工艺大曲(包括汾酒清茬曲、后火曲、红心曲)的微生物群落结构进行了研究,结果表明清香型大曲中乳酸菌多样性较丰富,包括 *Lactobacillu. helveticus*、*L. panis*、*L. pontis*、*L. fermentum*、*Weissella cibaria*;地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌为大曲中的优势菌;而 *Thermoactinomyces sanguinis* 仅存在于酱香型大曲中。Zhang 等^[18]通过 454 测序技术研究汾酒 3 种清香型大曲内细菌群落组成,结果表明 3 种大曲内细菌种群

主要分布于厚壁菌门和放线菌门,厚壁菌门是优势种群,分别占清茬曲、后火曲和红心曲的 72.2%,98.6%,81.4%;乳酸菌种类丰富,主要包括 *Weissella cibaria*、*Leuconostoc citreum*、*Lactobacillus sakei*、*L. pontis*、*L. paralimentarius* 和 *L. mindensis*;清茬曲内优势科为链霉菌科和明串珠菌科;后火曲内优势菌为芽孢杆菌;红心曲内优势菌为高温放线菌科和链霉菌科。但未见 γ -变形杆菌的报道。本试验对汾酒大曲的研究中也发现乳酸菌的多样性非常丰富,芽孢杆菌是红心曲和后火曲的优势菌群,这一结论与潘勤春^[16]、高亦豹^[17]、Zhang^[18]等的结论较一致;不同的是在具体的属种组成比例上存在差异,且本研究得到的细菌多样性更丰富。此外本研究在清香型大曲的后火曲和红心曲内均检测到了较高比例的高温放线菌(*Thermoactinomyces sanguinis*)。导致以上差异的原因可能是由于试验方法或试验样品的不同导致的。



系统发育树采用 Mega 4 软件的 Maximum Composite Likelihood 模型,邻接法 (neighbor joining) 自举 1 000 次构建而成;图中带有“●”标记的为本研究获得的代表克隆子序列,括号内的数值分别表示该克隆子在清茬曲、后火曲、红心曲细菌 16S rRNA 基因文库中的数目。

图 4 清香型大曲细菌克隆子 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of bacterial 16S rRNA gene of Fen-Daques

3 结论

通过细菌 16S rRNA 基因文库法和 RFLP 指纹技术系统研究了清香型大曲清茬曲、后火曲和红心曲内细菌群落结构差异。研究表明,制曲温度对于清香型 3 种大曲内细菌多样性具有显著影响,制曲温度较低的清茬曲和后火曲的细菌多样性要明显高于制曲温度较高的红心曲。3 种大曲的细菌多样性丰富,均分布于芽孢杆菌纲、放线菌纲及变形菌纲,但在具体种属组成上存在明显差异;其中清茬曲的优势细菌群为乳杆菌属和葡萄球菌属;后火曲的优势细菌群为乳杆菌属、葡萄球菌属、芽孢杆菌属、魏斯氏菌属;红心曲的优

势细菌群为乳杆菌属、芽孢杆菌属、高温放线菌属。

此外,本试验在进行测序序列与 NCBI 数据库比对过程中发现,部分克隆子的测序序列与 NCBI 数据库中多个同属不同种菌株的序列相似度都达到 98% 以上,如代表克隆子 HHQX-20,与魏斯氏菌属的 *Weissella confusa*、*W. cibaria* 的相似度均为 99%;HXQX-92 与芽孢杆菌属的 *Bacillus aerophilus*、*B. stratosphericus*、*B. pumilus* 相似度均达到 98% 以上;QCQX-88 与乳杆菌属的 *L. farciminis*、*L. futsaii*、*L. crustorum* 的相似度均达到 98% 以上。而在群落多样性分析时,由于只将序列相似度 $\geq 97\%$ 计为同一种 OTU

(下转第 73 页)

莲藕中各金属的单项污染指数表明其受到 Cr 和 Sn 的污染较为严重,同时还受到 As 的轻度污染;综合污染指数大于 3,表明莲藕受到的污染最为严重,属于重度污染。这可能跟莲藕的生长环境有关,三峡库区万州段化工厂较多,且莲藕生长在池塘底泥中,由于底泥对重金属等污染物具有一定的累积和富集作用,可能使莲藕比其他蔬菜具有更高的污染风险^[9]。

3 结论和讨论

(1) 三峡库区市售部分根茎类蔬菜中存在重金属 As、Sn 和 Cr 含量超标现象,其超标率分别为 27. 08%,12. 50%,8. 33%,最大超标倍数分别为 3. 27,16. 00,12. 42。单项污染指数表明,As 对胡萝卜、Cr 对胡萝卜和白萝卜的污染均处于警戒级,尚在可控范围之内;As 对白萝卜和莲藕有轻度污染;而 Cr 和 Sn 对莲藕的污染较为严重。综合污染指数表明,采集的 6 种根茎蔬菜中,土豆、红薯、胡萝卜和莴笋未受污染;白萝卜受到轻度污染;而莲藕受到了重金属的重度污染。

(2) 本研究结果表明三峡库区腹地部分市售蔬菜重金属含量超标,存在安全隐患,但由于采样范围局限,研究结果无法对三峡库区种植蔬菜重金属污染情况以及居民食用蔬菜的安全性进行系统评价。进一步研究需考查库区不同地域种植蔬菜的重金属含量水平,同时检测相应地域土壤以及水样的重金属污染情况,发现不同地域土壤、水质与蔬菜之间重金属污染的相关性,从而为库区居民安全食用蔬菜提供参考,保障人体健康。

参考文献

1 赖亚兰. 重庆三峡库区高效生态农业可持续发展模式与机制研究

(上接第 15 页)

类型,因此可能会低估了清香型大曲的细菌多样性。后期的研究将结合高通量测序技术,以进一步确定以上大曲内的细菌群落组成信息,并有目的的针对清香型大曲的主要细菌类群进行分离、纯化和发酵机理的相关研究,以弄清其在清香型白酒固态发酵中的具体作用。

参考文献

1 赵景龙. 浅谈清香型酒三种大曲的差异性[J]. 酿酒, 2000(5): 43~44.
2 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2013.
3 都立辉, 刘芳. 16S rRNA 基因在细菌菌种鉴定中的应用[J]. 乳业科学与技术, 2006(5): 207~209.
4 张守印, 郭学青, 李振军, 等. 16S rRNA 基因克隆文库用于菌群分析的效能研究和评论[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(16): 1 549~1 552.
5 胡佳, 邓斌, 张学文. 浓香型白酒曲药中细菌组成及系统学分析[J]. 酿酒科技, 2007(5): 17~19.
6 陈希, 沈锡权, 翁佩芳, 等. 应用 16S rDNA 克隆文库法分析雪菜低盐腌制过程微生物群落的多样性[J]. 中国食品学报, 2012, 12(7): 205~210.
7 窦娜莎, 王琳. 16S rDNA 克隆文库法分析 Biostyr 曝气生物滤

[D]. 重庆:西南大学, 2001.
2 刘元. 三峡库区蔬菜生产存在的问题及对策[J]. 现代经济信息, 2009(18):10~12.
3 Luo Chun-ling, Liu Chuan-ping, Wang Yan, et al. Heavy metal contamination in soils and vegetables near an e-waste processing site, south China [J]. Journal of Hazardous Materials, 2011(186): 481~490.
4 Akan J C, Abdulrahman F I, Ogugbuaja V O, et al. Heavy metals and anion levels in some samples of vegetable grown within the vicinity of challawa industrial area, kano state, nigeria[J]. American Journal of Applied Sciences, 2009, 6(3): 534~542.
5 Huang Biao, Shi Xue-zheng, Yu Dong-sheng, et al. Environmental assessment of small-scale vegetable farming systems in peri-urban areas of the yangtze river delta region, China[J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2006(112): 391~402.
6 Zhu Fang-kun, Fan Wen-xiu, Wang Xue-jing, et al. Health risk assessment of eight heavy metals in nine varieties of edible vegetables oils consumed in China[J]. Food and Chemical Toxicology, 2011(49): 3 081~3 085.
7 Fang Shi-bo, Hu Hao, Sun Wan-chun, et al. Spatial variations of heavy metals in the soils of vegetable-growing land along urban-rural gradient of Nanjing, China[J]. Int. J. Environ. Res. Public Health, 2011(8): 1 805~1 816.
8 王素燕, 朱凡, 梁小翠. 长沙市 4 种蔬菜中 As 和 Hg 的污染分析与评价[J]. 食品与机械, 2013, 29(4):166~170.
9 胡文勇, 马陶武, 易浪波, 等. 受污藕塘中莲藕对重金属的生物富集特征[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(3):229~231.

池处理城市污水的细菌多样性研究[J]. 环境科学学报, 2011, 31(10):2 117~2 124.
8 黄晟, 陈旸, 潘雪莲, 等. 甘肃西峰黄土中细菌 16S rDNA 文库的构建与组成初步分析[J]. 高校地质学报, 2012, 18(4): 765~772.
9 吴谋成. 食品分析与感官评定[M]. 北京:中国农业出版社, 2002.
10 叶光斌, 董瑞丽, 王彩虹, 等. 基于免培养法的中高温大曲细菌群落结构研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 333~336.
11 Delong E F. Archaea in coastal marine environments[J]. Proc. Natl Acad Sci. USA, 1992, 89(12): 5 685~5 689.
12 叶光斌, 罗惠波, 杨晓东, 等. 基于免培养法研究泸州地区浓香型白酒窖泥原核微生物群落结构[J]. 食品科学, 2013, 34(17): 176~181.
13 叶光斌, 王风平, 肖湘. 东太平洋中国多金属结核区锰结核样品中微生物群落结构的研究[J]. 台湾海峡, 2010, 29(2): 218~227.
14 周恒刚. 制曲热能[J]. 酿酒科技, 2004(5): 35~37.
15 胡承, 郭捷锋, 沈才洪, 等. 浓香型(泸型)大曲的研究及其应用[J]. 酿酒科技, 2004(1): 33~36.
16 潘勤春, 孟镇, 钟其顶, 等. 汾酒大曲细菌群落结构的 PCR—DGGE 分析[J]. 酿酒科技, 2011(6): 95~99.
17 高亦豹. PCR—DGGE 研究中国白酒大曲中微生物群落结构 [D]. 无锡: 江南大学, 2010.
18 Zhang X, Zhao J, Du X. Barcoded pyrosequencing analysis of the bacterial community of Daqu for light-flavour Chinese liquor [J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 58(6): 549~555.