

# 普洱茶发酵过程中不同层间细菌群落结构研究

王 辉<sup>1</sup>, 任 丽<sup>1</sup>, 李亚莉<sup>1</sup>, 骆爱国<sup>1</sup>, 肖 伟<sup>2</sup>, 崔晓龙<sup>2</sup>, 周红杰<sup>1\*</sup>

(1. 云南农业大学普洱茶学院, 昆明 650201; 2. 云南大学微生物研究所, 昆明 650201;

3. 云南下关沱茶集团股份有限公司, 大理 676700; 4. 云南南涧凤凰沱茶厂, 南涧 675700)

**摘 要:** **目的** 揭示普洱茶发酵过程中不同层间细菌群落结构及优势细菌。**方法** 实验样品为大理南涧无量山系晒青毛茶原料及发酵阶段茶样与出堆茶样。通过运用 16S rDNA 技术对普洱茶发酵过程中不同层间的细菌群落结构及优势细菌进行研究。**结果** 普洱茶发酵过程中细菌多样性丰富, 茶堆的上、中、下 3 层主要细菌群落结构组成相似, 包含欧文氏菌属、无色杆菌属、芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、鞘氨醇杆菌属、短杆菌属、葡萄球菌属等 7 个菌属。其中欧文氏菌属、鞘氨醇杆菌属在整个发酵过程中不同层间所占比例都相对较高。检测的 7 个主要菌属在发酵 14、28、42 d 不同时期各层间所占比例变化较大。**结论** 普洱茶发酵过程中不同层间细菌群落结构及优势菌存在明显差异。

**关键词:** 普洱茶; 细菌群落结构; 16S rDNA; 不同层间

## Research on bacterial community structure between different layers of Pu'erh tea fermentation

WANG Hui<sup>1</sup>, REN Li<sup>1</sup>, LI Ya-Li<sup>1</sup>, LUO Ai-Guo<sup>1</sup>, XIAO Wei<sup>2</sup>, CUI Xiao-Long<sup>2</sup>, ZHOU Hong-Jie<sup>1\*</sup>

(1. College of Pu'erh Tea, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China; 2. Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650201, China; 3. Yunnan Xiaguan Tuocha Co., Ltd., Dali 676700, China; 4. Yunnan Nanjian Phoenix Tuocha Plant, Nanjian 675700, China)

**ABSTRACT: Objective** To reveal the bacteria community structure among different layers and the dominant bacteria colony in the process of Pu'erh tea fermentation. **Methods** The experimental samples were Sun-dried green tea materials in Dali Nanjian Wuliang Mountain and tea samples during fermentation stages and out of piles. The bacteria community structure among different layers and the dominant bacteria colony in the process of Pu'erh tea fermentation were studied by the technology of 16S rDNA. **Results** The bacterial diversity was rich in the process of Pu'erh tea fermentation, and the main bacteria community structure in the 3 layers, including upper, middle and lower layers, was similar. There were 7 kinds of bacterial genus, such as *Erwinia*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Sphingobium*, *Brevibacterium*, and *Staphylococcus*, etc. The proportion of *Erwinia* and *Sphingobium* was relatively high among different layers in the fermentation process. The proportions of the 7 main species of microorganism among each layer were greatly changed at different periods of the 14, 28, and 42 d of fermentation. **Conclusion** There are obvious differences between the bacteria community structure among different layers and the dominant bacteria colony in the process of Pu'erh tea fermentation.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260197, 31480215)

**Fund:** Supported by the National Natural Science Foundation of China (31260197, 31480215)

\*通讯作者: 周红杰, 教授, 云南农业大学, 主要研究方向为云南普洱茶和茶叶综合利用及民族茶文化。E-mail: 1051195348@qq.com

\*Corresponding author: ZHOU Hong-Jie, Professor, College of Pu'erh Tea, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China. E-mail: 1051195348@qq.com

**KEY WORDS:** Pu'erh tea; bacterial community structure; 16S rDNA; the different layers

## 1 引言

普洱茶是晒青毛茶经后续加工制得的茶品,其品质形成的关键工序是固态发酵,实质是微生物参与的酶促与湿热的综合作用<sup>[1]</sup>。前人已运用传统微生物研究方法就普洱茶发酵过程中微生物的种类及动态变化进行了广泛研究<sup>[2]</sup>,但传统的微生物研究方法局限很大。随着分子生物学技术的高速发展,新的微生物研究方法如 16S rDNA 技术,因其片段长度适中、信息量较大、易于分析、且既含有保守序列又含可变序列,同时 NCBI 中收录的序列量大,能够快速准确鉴定细菌菌属,已被运用到微生物的研究中。

杨晓苹等<sup>[3]</sup>以少量茶叶发酵制备的普洱茶样品为研究对象,采用 PCR-DGGE 技术分析微生物群落结构。结果表明,茶叶堆表和堆芯的微生物群落结构差异小;发酵过程中,细菌在二翻时迅速增加,群落结构产生显著变化;而后不同种类的数量随着发酵时间的推进规律地增加或减少,最后趋于稳定。姜姝等<sup>[4]</sup>运用宏基因组学技术研究普洱茶不同发酵时期微生物群落结构,结果表明:适应渥堆发酵环境变化的微生物对普洱茶发酵过程起到了决定性的作用。吕昌勇等<sup>[5]</sup>基于宏基因组高通量测序技术对普洱茶渥堆发酵过程中微生物多样性分析得出普洱茶渥堆发酵的群落组成由 76.26%细菌、6.35%真核生物、0.05%古菌、0.17%病毒和 7.16%的分类未定条带构成。

普洱茶发酵过程中不同层间其温湿度、含氧量等影响微生物生长的环境因素差异较大,导致发酵过程中上、中、下不同层间微生物差异较大。前人对普洱茶发酵过程中微生物的研究,一般是以发酵阶段的混合样为材料,未对不同层间微生物的动态变化进行系统地研究,不能准确地反映发酵过程中的微生物群落及动态变化。本文基于此,运用 16S rDNA 技术对普洱茶发酵过程中不同层间细菌变化进行研究<sup>[6]</sup>,探究普洱茶发酵过程中不同层间细菌的群落变化,揭示普洱茶发酵过程中不同层间细菌的群落变化。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

实验茶样为云南南涧凤凰沱茶厂晒青原料(大理

南涧无量山系晒青毛茶原料)、发酵阶段茶样及出堆样。发酵周期 45 d。取样器具灭菌,分别取上层(距表面 10 cm)、中层(距表面 40 cm)、下层(距地面 10 cm)茶样,每层从茶堆四角、四边各中点及堆的中心取样后混合。分别取原料;14 d 上、中、下三层样;28 d 上、中、下三层样;42 d 上、中、下三层样,共计 10 个样品,于 4 ℃保存,或 20 ℃长期保存备用。

### 2.2 DNA 提取

CTAB 法提取普洱茶发酵过程中细菌的总 DNA<sup>[7]</sup>。

### 2.3 文库的构建、测序及分析

以检测合格 DNA 为样本,通过引物 Eub515f/Eub806R 对细菌总基因进行扩增,扩增条件:95 ℃变性 2 min,95 ℃变性 20 s,50 ℃退火 20 s,72 ℃延伸 45 s,35 个循环,72 ℃延伸 10 min。根据扩增的细菌基因区域特点,基于 illumina Miseq 技术测序平台进行双末端测序<sup>[8]</sup>。

数据进行过滤<sup>[9]</sup>、拼接<sup>[10]</sup>、统计,根据 93%相似性将序列聚类成为 OTUs (operational taxonomic units)<sup>[11]</sup>,获得普洱茶发酵过程中细菌多样性信息。

## 3 结果与分析

### 3.1 普洱茶发酵过程中的温度变化

普洱茶发酵过程中运用温湿度器对环境温度和湿度进行测定,结果见表 1。由表 1 可看出,整个发酵过程中,环境的温湿度变化不大,基本保持一致。

表 1 发酵阶段环境温湿度变化  
Table 1 The change of temperature and moisture of fermentation stage

	原料	14 d	28 d	42 d
环境温度/℃	24	27	25	27
环境湿度/%	70	66	69	68

普洱茶发酵过程中通过对取样点茶堆的温度测定,取各层间不同点温度的平均值,得到发酵过程中不同层间温度的变化。结果见表 2,由表 2 可知,发酵过程中,同一时期,不同层间的温度差异较大,同一层间随着发酵的进行温度变化也较大,呈现先增高后降低的变化趋势。

表 2 固态发酵堆温的变化  
Table 2 The change of the reactor temperature of solid-state fermentation

	原料	14 d	28 d	42 d
上层/℃		45	48	40
中层/℃	27	54	58	53
下层/℃		47	50	44

3.2 原料细菌群落结构及优势细菌

通过表 3 分析, 原料细菌群落及优势细菌的测序水平精确到属类, 结果表明: (1)原料中细菌群落结构丰富, 欧文氏菌属所占比例为 63.38%、无色杆菌属为 7.09%、芽孢杆菌属为 14.48%、类芽孢杆菌属为 3.21%、葡萄球菌属为 3.59%、鞘氨醇杆菌属为 5.07%。(2)原料中以欧文氏菌属为绝对的优势菌属, 芽孢杆菌属次之, 主要优势菌: 欧文氏菌属>芽孢杆菌属>无色杆菌属>鞘氨醇杆菌属>葡萄球菌属>类芽孢杆菌属。

3.3 14 d 阶段样细菌群落结构及优势菌

分析表 4, 14 d 上层样细菌群落及优势细菌的测序水平精确到属类, 结果表明: (1)14 d 上层样检测出

的主要菌属有: 芽孢杆菌属、欧文氏菌属、类芽孢杆菌属、葡萄球菌属、无色杆菌属, 所占比例分别为 68.35%、11.75%、8.30%、4.08%、4.19%; (2)芽孢杆菌属为 14 d 上层样的主要优势菌属, 欧文氏菌属次之, 主要菌属: 芽孢杆菌属>欧文氏菌属>类芽孢杆菌属>无色杆菌属>葡萄球菌属。

分析表 5, 14 d 中层样细菌群落及优势细菌的测序水平精确到属类, 结果表明: (1)14 d 中层样共检测出的主要菌属有: 欧文氏菌属、盐单胞菌属、*Kaistobacter* 属、葡萄球菌属, 所占比例分别为 37.89%、28.46%、24.21%、2.99%; (2)欧文氏菌属、盐单胞菌属、*Kaistobacter* 属共同为 14 d 上层样的主要优势菌属, 主要菌属: 欧文氏菌属>盐单胞菌属>*Kaistobacter* 属>葡萄球菌属。

分析表 6, 14 d 下层样细菌群落及优势细菌的测序水平精确到属类, 结果表明: (1)14 d 下层样共检测出的主要菌属有: 芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、欧文氏菌属、无色杆菌属、葡萄球菌属、嗜碱菌属, 所占比例分别为 56.55%、13.57%、8.90%、8.44%、5.02%、5.03%; (2)芽孢杆菌属为 14 d 下层样的主要优势菌属, 类芽孢杆菌属次之, 主要菌属: 芽孢杆菌属>类芽孢杆菌属>欧文氏菌属>无色杆菌属>嗜碱菌属>葡萄球菌属。

表 3 原料中细菌群落结构及优势细菌  
Table 3 The structure of bacteria community in raw material and the dominant bacteria colony

主要门类	主要纲类	主要目类	主要科类	主要属类
变形菌门(72.02%)	$\gamma$ -变形菌纲(64.89%)	肠杆菌目(63.38%)	肠杆菌科(63.38%)	欧文氏菌属(63.38%)
	$\beta$ -变形菌纲(7.09%)	伯克氏菌目(7.09%)	产碱菌科(7.09%)	无色杆菌属(7.09%)
			芽孢杆菌科(14.48%)	芽孢杆菌属(14.48%)
厚壁菌门(21.74%)	芽孢杆菌纲(21.28%)	芽孢杆菌目(21.28%)	类芽孢杆菌科(3.21%)	类芽孢杆菌属(3.21%)
			葡萄球菌科(3.59%)	葡萄球菌属(3.59%)
拟杆菌门(5.07%)	鞘脂杆菌纲(5.07%)	鞘脂杆菌目(5.07%)	鞘氨醇杆菌科(5.07%)	鞘氨醇杆菌属(5.07%)

表 4 14 d 上层样细菌群落结构及优势细菌  
Table 4 The structure of bacteria community in 14 d upper layer sample and the dominant bacteria colony

主要门类	主要纲类	主要目类	主要科类	主要属类
厚壁菌门(81.37%)	芽孢杆菌纲(80.72%)	芽孢杆菌目(80.72%)	芽孢杆菌科(68.35%)	芽孢杆菌属(68.35%)
			类芽孢杆菌科(8.30%)	类芽孢杆菌属(8.30%)
			葡萄球菌科(4.08%)	葡萄球菌属(4.08%)
变形菌门(16.40%)	$\gamma$ -变形菌纲(12.20%)	肠杆菌目(11.75%)	肠杆菌科(11.75%)	欧文氏菌属(11.75%)
	$\beta$ -变形菌纲(4.19%)	伯克氏菌目(4.19%)	产碱菌科(4.19%)	无色杆菌属(4.19%)

表 5 14 d 中层样细菌群落结构及优势菌

Table 5 The structure of bacteria community in 14 d middle layer sample and the dominant bacteria colony

主要门类	主要纲类	主要目类	主要科类	主要属类
厚壁菌门(8.81%)	芽孢杆菌纲(8.81%)	芽孢杆菌目(8.81%)	葡萄球菌科(2.99%)	葡萄球菌(2.99%)
变形菌门(90.88%)	$\alpha$ -变形菌纲(24.21%)	鞘脂单胞菌目(24.21%)	鞘脂单胞菌科(24.21%)	<i>Kaistobacter</i> 属(24.21%)
	$\gamma$ -变形菌纲(66.35%)	肠杆菌目(37.89%)	肠杆菌科(37.89%)	欧文氏菌属(37.89%)
		海洋螺菌目(28.46%)	盐单胞菌科(28.46%)	盐单胞菌属(28.46%)

表 6 14 d 下层样细菌群落结构及优势菌

Table 6 The structure of bacteria community in 14 d lower layer sample and the dominant bacteria colony

主要门类	主要纲类	主要目类	主要科类	主要属类
厚壁菌门(80.16%)	芽孢杆菌纲(75.13%)	芽孢杆菌目(75.13%)	芽孢杆菌科(56.55%)	芽孢杆菌属(56.55%)
			类芽孢杆菌科(13.57%)	类芽孢杆菌属(13.57%)
			葡萄球菌科(5.02%)	葡萄球菌属(5.02%)
	梭菌纲(5.03%)	梭菌目(5.03%)	梭菌科(5.03%)	嗜碱菌属(5.03%)
变形菌门(17.93%)	$\beta$ -变形菌纲(8.44%)	伯克氏菌目(8.44%)	产碱菌科(8.44%)	无色杆菌属(8.44%)
	$\gamma$ -变形菌纲(9.45%)	肠杆菌目(8.90%)	肠杆菌科(8.90%)	欧文氏菌属(8.90%)

3.4 28 d 阶段样细菌群落结构及优势菌

分析表 7, 28 d 上层样细菌群落及优势细菌的测序水平精确到属类, 结果表明: (1)28 d 上层样共检测出的主要菌属有: 欧文氏菌属、鞘氨醇杆菌属、芽孢杆菌属、无色杆菌属、葡萄球菌属, 所占比例分别为 46.49%、25.06%、7.90%、7.89%、6.00%; (2)欧文氏菌属为 28 d 上层样的主要优势菌属, 鞘氨醇杆菌属次之, 主要菌属: 欧文氏菌属>鞘氨醇杆菌属>芽孢杆菌属>无色杆菌属>葡萄球菌属。

分析表 8, 28 d 中层样细菌群落及优势细菌的测序水平精确到属类, 结果表明: (1)28 d 中层样共检测出的主要菌属有: 鞘氨醇杆菌属、葡萄球菌属、欧文氏菌属、芽孢杆菌属、短状杆菌属、无色杆菌属, 所占比例分别为 26.04%、21.40%、16.48%、15.12%、9.08%、6.03%; (2)鞘氨醇杆菌属为 28 d 中层样的主要优势菌属, 葡萄球菌属次之, 主要菌属: 鞘氨醇杆菌属>葡萄球菌属>欧文氏菌属>芽孢杆菌属>短状杆菌属>无色杆菌属。

分析表 9, 28 d 下层样细菌群落及优势细菌的测序水平精确到属类, 结果表明: (1)28 d 下层样共检测出的主要菌属有: 鞘氨醇杆菌属、欧文氏菌属、芽孢杆菌属、无色杆菌属、类芽孢杆菌属、葡萄球菌属, 所占比例分别为 51.31%、16.93%、9.48%、8.48%、5.32%、5.13%;

(2)鞘氨醇杆菌属为 28 d 下层样的主要优势菌属, 欧文氏菌属次之, 主要菌属: 鞘氨醇杆菌属>欧文氏菌属>芽孢杆菌属>无色杆菌属>类芽孢杆菌属>葡萄球菌属。

3.5 42 d 阶段样细菌群落结构及优势菌

分析表 10, 42 d 上层样细菌群落及优势细菌的测序水平精确到属类, 结果表明: (1)42 d 上层样共检测出的主要菌属有: 欧文氏菌属、鞘氨醇杆菌属、葡萄球菌属、芽孢杆菌属、短状杆菌属、无色杆菌属, 所占比例分别为 35.24%、20.17%、13.17%、10.63%、10.64%、6.03%; (2)欧文氏菌属为 42 d 上层样的主要优势菌属, 鞘氨醇杆菌属次之, 主要菌属: 欧文氏菌属>鞘氨醇杆菌属>葡萄球菌属>芽孢杆菌属>短状杆菌属>无色杆菌属。

分析表 11, 42 d 中层样细菌群落及优势细菌的测序水平精确到属类, 结果表明: (1)42 d 中层样共检测出的主要菌属有: 鞘氨醇杆菌属、欧文氏菌属、芽孢杆菌属、葡萄球菌属、无色杆菌属、类芽孢杆菌属, 所占比例分别为 46.29%、25.41%、11.58%、5.95%、4.87%、6.03%; (2)鞘氨醇杆菌属为 42 d 中层样的主要优势菌属, 欧文氏菌属次之, 主要菌属: 鞘氨醇杆菌属>欧文氏菌属>芽孢杆菌属>葡萄球菌属>无色杆菌属>类芽孢杆菌属。

表 7 28 d 上层样细菌群落结构及优势菌

Table 7 The structure of bacteria community in 28 d upper layer sample and the dominant bacteria colony

主要门类	主要纲类	主要目类	主要科类	主要属类
厚壁菌门(16.39%)	芽孢杆菌纲 (15.93%)	芽孢杆菌目(15.93%)	芽孢杆菌科 (7.90%)	芽孢杆菌属(7.90%)
			葡萄球菌科(6.00%)	葡萄球菌属(6.00%)
变形菌门(56.20%)	$\beta$ -变形菌纲(7.89%)	伯克氏菌目(7.89%)	产碱菌科(7.89%)	无色杆菌属(7.89%)
	$\gamma$ -变形菌纲(48.07%)	肠杆菌目(46.49%)	肠杆菌科(46.49%)	欧文氏菌属(46.49%)
拟杆菌门(25.06%)	鞘脂杆菌纲(25.06%)	鞘脂杆菌目(25.06%)	鞘脂杆菌科(25.06%)	鞘氨醇杆菌属(25.06%)

表 8 28 d 中层样细菌群落结构及优势菌

Table 8 The structure of bacteria community in 28 d middle layer sample and the dominant bacteria colony

主要门类	主要纲类	主要目类	主要科类	主要属类
厚壁菌门(40.14%)	芽孢杆菌纲 (39.48%)	芽孢杆菌目(39.48%)	芽孢杆菌科 (15.12%)	芽孢杆菌属(15.12%)
			葡萄球菌科(21.40%)	葡萄球菌属(21.40%)
变形菌门(24.73%)	$\beta$ -变形菌纲(6.03%)	伯克氏菌目(6.03%)	产碱菌科(6.03%)	无色杆菌属(6.03%)
	$\gamma$ -变形菌纲(18.67%)	肠杆菌目(16.48%)	肠杆菌科(16.48%)	欧文氏菌属(16.48%)
拟杆菌门(26.04%)	鞘脂杆菌纲(26.04%)	鞘脂杆菌目(26.04%)	鞘脂杆菌科(26.04%)	鞘氨醇杆菌属(26.04%)
放线菌门(9.08%)	放线菌纲(9.08%)	放线菌目(9.08%)	皮杆菌科(9.08%)	短状杆菌属(9.08%)

表 9 28 d 下层样细菌群落结构及优势菌

Table 9 The structure of bacteria community in 28 d lower layer sample and the dominant bacteria colony

主要门类	主要纲类	主要目类	主要科类	主要属类
厚壁菌门(20.97%)	芽孢杆菌纲 (19.94%)	芽孢杆菌目(19.94%)	芽孢杆菌科 (9.48%)	芽孢杆菌属(9.48%)
			类芽孢杆菌科(5.32%)	类芽孢杆菌属(5.32%)
			葡萄球菌科(5.13%)	葡萄球菌属(5.13%)
变形菌门(26.18%)	$\beta$ -变形菌纲(8.48%)	伯克氏菌目(8.48%)	产碱菌科(8.48%)	无色杆菌属(8.48%)
	$\gamma$ -变形菌纲(17.66%)	肠杆菌目(16.93%)	肠杆菌科(16.93%)	欧文氏菌属(16.93%)
拟杆菌门(51.31%)	鞘脂杆菌纲(51.31%)	鞘脂杆菌目(51.31%)	鞘脂杆菌科(51.31%)	鞘氨醇杆菌属(51.31%)

表 10 42 d 上层样细菌群落结构及优势菌

Table 10 The structure of bacteria community in 42 d upper layer sample and the dominant bacteria colony

主要门类	主要纲类	主要目类	主要科类	主要属类
厚壁菌门(26.83%)	芽孢杆菌纲 (26.27%)	芽孢杆菌目(26.27%)	芽孢杆菌科 (10.63%)	芽孢杆菌属(10.63%)
			葡萄球菌科(13.17%)	葡萄球菌属(13.17%)
变形菌门(42.36%)	$\beta$ -变形菌纲(6.03%)	伯克氏菌目(6.03%)	产碱菌科(6.03%)	无色杆菌属(6.03%)
	$\gamma$ -变形菌纲(36.28%)	肠杆菌目(35.24%)	肠杆菌科(35.24%)	欧文氏菌属(35.24%)
拟杆菌门(20.17%)	鞘脂杆菌纲(20.17%)	鞘脂杆菌目(20.17%)	鞘脂杆菌科(20.17%)	鞘氨醇杆菌属(20.17%)
放线菌门(10.64%)	放线菌纲(10.64%)	放线菌目(10.64%)	皮杆菌科(10.64%)	短状杆菌属(10.64%)

表 11 42 d 中层样细菌群落结构及优势菌

Table 11 The structure of bacteria community in 42 d middle layer sample and the dominant bacteria colony

主要门类	主要纲类	主要目类	主要科类	主要属类
厚壁菌门(21.32%)	芽孢杆菌纲 (20.34%)	芽孢杆菌目(20.34%)	芽孢杆菌科 (11.58%)	芽孢杆菌属(11.58%)
			类芽孢杆菌科(2.82%)	类芽孢杆菌属(2.82%)
变形菌门(31.47%)	$\beta$ -变形菌纲(4.87%)	伯克氏菌目(4.87%)	葡萄球菌科(5.95%)	葡萄球菌属(5.95%)
			产碱菌科(4.87%)	无色杆菌属(4.87%)
			肠杆菌科(25.41%)	欧文氏菌属(25.41%)
拟杆菌门(46.29%)	鞘脂杆菌纲(46.29%)	鞘脂杆菌目(46.29%)	鞘脂杆菌科(46.29%)	鞘氨醇杆菌属(46.29%)

表 12 42 d 下层样细菌群落结构及优势菌

Table 12 The structure of bacteria community in 42 d lower layer sample and the dominant bacteria colony

主要门类	主要纲类	主要目类	主要科类	主要属类
厚壁菌门(39.07%)	芽孢杆菌纲 (38.49%)	芽孢杆菌目(38.49%)	芽孢杆菌科 (14.18%)	芽孢杆菌属(14.18%)
			类芽孢杆菌科(2.71%)	类芽孢杆菌属(2.71%)
变形菌门(38.66%)	$\beta$ -变形菌纲(4.26%)	伯克氏菌目(4.26%)	葡萄球菌科(21.60%)	葡萄球菌属(21.60%)
			产碱菌科(4.26%)	无色杆菌属(4.26%)
			肠杆菌科(36.11%)	欧文氏菌属(33.61%)
拟杆菌门(14.31%)	鞘脂杆菌纲(14.31%)	鞘脂杆菌目(14.31%)	鞘脂杆菌科(14.31%)	鞘氨醇杆菌属(14.31%)
放线菌门(7.97%)	放线菌纲(7.97%)	放线菌目(7.97%)	皮杆菌科(7.97%)	短状杆菌属(7.97%)

分析表 12, 42 d 下层样细菌群落及优势细菌的测序水平精确到属类, 结果表明: (1)42 d 下层样共检测出的主要菌属有: 欧文氏菌属、葡萄球菌属、鞘氨醇杆菌属、芽孢杆菌属、短状杆菌属、无色杆菌属、类芽孢杆菌属, 所占比例分别为 33.61%、21.60%、14.31%、14.18%、7.97%、4.26%、2.71%; (2)欧文氏菌属为 42 d 下层样的主要优势菌属, 葡萄球菌属次之, 主要菌属: 欧文氏菌属>葡萄球菌属>鞘氨醇杆菌属>芽孢杆菌属>短状杆菌属>无色杆菌属>类芽孢杆菌属。

4 讨 论

4.1 温、湿度对微生物的影响

温、湿度对普洱茶发酵过程中微生物的生长代谢有重要影响。实验结果表明, 普洱茶发酵过程中不同层间温、湿度差异较大, 本文研究取样基于此点, 分别选取了 14 d、28 d、42 d 的上、中、下层的茶样进行普洱茶发酵过程中细菌多样性研究, 通过测定, 不同层间细菌群落结构及优势菌存在较大差异, 通过不同层间的细菌多样性研究更能反映出普洱茶发酵

过程中细菌群落结构及优势菌种。

4.2 16S rDNA 技术

前人<sup>[12,13]</sup>在研究普洱茶发酵过程中的细菌时, 多采用传统方法与生物学方法相结合, 由于传统的分离、纯化方法会使大量生物信息丢失, 因此本文基于 16S rDNA 技术对普洱茶发酵过程中细菌群落结构及优势菌研究, 16S rDNA 技术是对细菌的总 DNA 进行研究, 具有全面性, 避免了传统分离、纯化造成的生物信息丢失, 是细菌群落结构分析最常用的技术。细菌的 16S rDNA 有多个高度保守区段, 根据保守区设计细菌的通用引物, 根据细菌引物的特异性, 扩增出细菌的 16SrDNA 片段, 同时根据细菌的 16S rDNA 可变区的差异性用来区分不同的细菌种属。本文基于 16S rDNA 技术对普洱茶发酵过程中不同层间细菌群落结构研究, 可以准确测定出普洱茶发酵过程中细菌的群落结构及优势菌。

4.3 普洱茶发酵过程中的细菌群落结构变化

本研究基于普洱茶发酵过程中不同层间温、湿度

差异较大,选取 14 d、28 d、42 d 的上、中、下层的茶样进行普洱茶发酵过程中细菌多样性研究,结果表明:主要细菌群落结构为欧文氏菌属、无色杆菌属、芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、鞘氨醇杆菌属、短杆菌属、葡萄球菌属,明确了各优势菌种在不同发酵时期不同层间所占比例情况,同时检测出的各类主要菌属可产生丰富的多酚氧化酶、过氧化物酶等,可将茶多酚氧化为苯醌类物质,苯醌类物质进一步缩合成深红色的多聚体,形成普洱茶特殊品质成分<sup>[14]</sup>。这些微生物的存在,有利于普洱茶品质的提高及发酵时间的缩短。对比 2013 年姚静、陈迪<sup>[15]</sup>等对普洱茶发酵过程中细菌分离、纯化、鉴定及李晨晨、吕杰<sup>[16]</sup>等对普洱茶渥堆发酵过程中嗜热细菌的分离和鉴定的研究结果,本实验结果充分反映了普洱茶发酵过程中不同层间由于温、湿度的差异,导致在发酵过程中细菌群落及优势菌所占比例存在的很大差距。这是前人在对普洱茶发酵过程中细菌的研究中没有提及到的。本实验更深入全面地揭示了普洱茶发酵过程中不同层间主要细菌的群落结构及优势细菌占比情况。

## 5 结 论

(1)普洱茶发酵过程中细菌多样性丰富,主要包含欧文氏菌属、无色杆菌属、芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、鞘氨醇杆菌属、短杆菌属、葡萄球菌属等 7 个菌属。其中欧文氏菌属、鞘氨醇杆菌属在整个发酵过程中不同层间所占比例都相对较高,不同发酵时期、不同层间的优势菌属存在变化,各主要菌属所占比例也发生变化。

(2)本文运用 16SrDNA 技术对普洱茶发酵过程中不同层间细菌群落结构进行研究,测定结果显示:通过 16SrDNA 技术对不同层间的细菌多样性研究能充分反映出普洱茶发酵过程中细菌群落结构及优势菌种;在发酵过程中,同一发酵时期不同层间细菌群落结构及优势菌存在较大差异,同层间随着发酵的进行细菌群落结构及优势菌也存在较大差异。

(3)通过对发酵过程中不同层间温度的测定及 16SrDNA 技术对普洱茶发酵过程中不同层间细菌群落结构及优势菌的研究,结果显示:随着发酵的进行,不同层间温度都呈现先升高后下降的趋势,同时期比较上、中、下三层温度,中层>上层>下层。同时期

不同层间细菌群落结构及优势菌存在较大差异,表明温度对普洱茶发酵过程中细菌群落结构及优势菌影响较大。

## 参考文献

- [1] 陈宗道. 微生物与普洱茶发酵[J]. 茶叶科技, 1981,10(4): 4-7.  
Cheng ZD. Microbial and Pu'er tea fermentation [J]. J Tea Technol, 1981, 10(4): 4-7.
- [2] 周红杰, 李家华, 赵龙飞. 等. 渥堆过程中主要微生物对云南普洱茶品质形成的研究[J]. 茶叶科学 2004, 24(3): 212-218.  
Zhou HJ, Li JH, Zhao LF, *et al.* Study on main microbes on quality formation of Yunnan Pu'er tea during pile-fermentation process [J]. J Tea Sci, 2004, 24(3): 212-218.
- [3] 杨晓苹, 罗剑飞, 刘昕. 等. 普洱茶固态发酵过程中微生物群落结构及变化[J]. 食品科学, 2013, 134(19): 142-147.  
Yang XP, Luo JF, Liu X, *et al.* Microbial community structure and change during solid fermentation of Pu'erh tea [J]. Food Sci, 2013, 134(19): 142-147.
- [4] 姜姝, 吕杰, 李灏. 普洱茶不同发酵时期微生物群落宏转录组学研究[J]. 北京化工大学学报, 2012, 39(6): 84-89.  
Jiang S, Lv J, Li H. Comparative metatranscriptomic analysis of microbial communities at two different stages during the pile-fermentation of Pu'er tea [J]. J Beijing Univ Chem Technol, 2012, 39(6): 84-89.
- [5] 吕昌勇. 普洱茶渥堆发酵过程中微生物宏基因组学的测定与分析[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2013.  
Lv CY. Microbial metagenomic study of Puer tea during pile-fermentation [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2013.
- [6] 赵蓉, 胡永峰, 金奇. 宏基因组学及其在医学微生物学领域的应用[J]. 病毒学报, 2009, 25(3): 231-234.  
Zhao R, Hu YF, Jin Q. Metagenomics and its application in the field of medical microbiology [J]. Chin J Virol, 2009, 25(3): 231-234.
- [7] 宋琳玲, 曾光明, 陈耀宁. 等. 固态发酵过程中微生物总 DNA 提取方法比较[J]. 环境科学学报, 2008, 11(22): 2200-2205.  
Song LL, Zeng GM, Chen YN, *et al.* Comparison of methods for totalmicrobial DNA extraction from solid-state fermentation [J]. Acta Sci Circum, 2008, 11(22): 2200-2205.
- [8] 刘万飞, 王西亮, 赵宇慧. 等. 基于第二代测序技术的细菌基因组与转录组研究策略简介[J]. 微生物学通报, 2011, 11(30): 1705-1714.  
Liu WF, Wang XL, Zhao YH, *et al.* The brief introduction of research strategies for bacterial genome and transcriptome based

- on the next-generation sequencing technologies [J]. Microbiol China, 2011, 11(30): 1705–1714.
- [9] Caporaso JG. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nat Meth, 2010, 7(5): 335–336.
- [10] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957–2963.
- [11] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460–2461.
- [12] 雷正瑜. 16SrDNA 序列分析技术在微生物分类鉴定中的应用 [J]. 湖北生态工程职业技术学院学报, 2006, 4(1): 4–7.
- Lei ZY. Application of 16S rDNA-sequential analysis in classification and determination of micro-organism [J]. J Hubei Ecol Eng Coll, 2006, 4(1): 4–7.
- [13] 陈秀燕, 陈松, 郑华, 等. 普洱生茶优势菌种分离纯化及其对普洱茶品质影响初探[J]. 现代食品科技, 2009, 25(6): 604–607.
- Chen XY, Chen S, Zheng H, *et al.* Purification of predominant microbes from Pu'er tea and their effects on the quality of Pu'er tea [J]. Mod Food Sci Technol, 2009, 25(6): 604–607.
- [14] Faezi GM, Tayeri A. Isolation and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase-producing *Bacillus* strainer from fully fermented tea (*Camellia sinensis*) [J]. World J Microbial Biotechnol, 2007, 24(3):1327–1332.
- [15] 姚静, 陈迪, 郑晓燕, 等. 普洱茶渥堆发酵过程中细菌种群的分离与分子鉴定[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(6): 2667–2668, 2671.
- Yao J, Chen D, Zheng XY, *et al.* Isolation and molecular identification of the bacterial colonization during the pile fermentation process of Pu'erh tea [J]. J Anhui Agric Sci, 2013, 41(6): 2667–2668, 2671.
- [16] 李晨晨, 吕杰, 盛军, 等. 普洱茶渥堆发酵过程中嗜热细菌的分离和鉴定[J]. 北京化工大学学报, 2012, 39(2): 74–78.
- Li CC, Lv Ji, Sheng J, *et al.* Isolation and identification of thermophilic bacteria during the pile-fermentation of Pu'er tea [J]. J Beijing Univ Chem Technol, 2012, 39(2): 74–78.
- (责任编辑: 杨翠娜)

### 作者简介



王 辉, 云南农业大学, 在读硕士研究生, 主要研究方向为普洱茶加工及微生物研究。

E-mail: 499575741@QQ.com

周红杰, 教授, 主要研究方向为云南普洱茶和茶叶综合利用及民族茶文化。

E-mail: 1051195348@qq.com