

研究报告

密封泡菜母水的真菌群落动态及与理化因子的相关性

安睿^{1,2}, 邓巍^{1,2}, 李政强^{1,2}, 李静超^{1,2}, 杨晓燕^{*1,2,3}

1 大理大学东喜玛拉雅研究院, 云南 大理 671003

2 大理大学三江并流区域生物多样性保护与利用云南省创新团队, 云南 大理 671003

3 中国三江并流区域生物多样性协同创新中心, 云南 大理 671003

安睿, 邓巍, 李政强, 李静超, 杨晓燕. 密封泡菜母水的真菌群落动态及与理化因子的相关性[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1676-1689.

AN Rui, DENG Wei, LI Zhengqiang, LI Jingchao, YANG Xiaoyan. Fungal community dynamics and correlations with physicochemical factors in sealed Paocai brine[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1676-1689.

摘要: 【背景】真菌对泡菜的风味与质地发挥着重要作用, 影响泡菜及母水的储存时长。母水泡菜是我国的传统泡菜制作方法, 也是保持泡菜原有风味的核心技术。【目的】解析密闭储存泡菜母水的真菌群落动态及与理化因子的关系。【方法】采用扩增子序列变体(amplicon sequence variants, ASV)技术监测 25 °C 密闭储存 30 d 内泡菜母水中真菌群落的动态变化, 应用流动分析仪监测母水的理化因子变化。【结果】结合泡菜母水真菌群落动态及理化因子变化, 真菌群落演替在 30 d 内可划分为 3 个时期(前期为 1–5 d, 中期为 6–16 d, 后期为 18–30 d)。三个时期内共注释到真菌 10 门 39 纲 98 目 226 科 461 属。前期真菌构成复杂且持续变化, 相互作用关系密切并受 pH 和总氮(total nitrogen, TN)影响; 中期优势属发生变化且稀有属明显增多, 互作关系减弱, 并受 TN 调控; 后期稀有属持续减少, 群落结构简单, 互作较少并受硝态氮(nitrate nitrogen, NN)、磷酸盐(phosphates, P)和总磷(total phosphorus, TP)影响。【结论】25 °C 密闭储存 30 d 的泡菜母水, 其真菌群落在前、中、后 3 期的演替特点各不相同。25 °C 密闭储存的泡菜母水在一周内食用更安全, 也能有效保障发酵泡菜的风味, 冷链储存则可适当延长保存期。泡菜体系中蕴藏的丰富真菌资源值得挖掘。

关键词: 扩增子测序; 泡菜母水; 母水储存; 稀有真菌; 群落演替

资助项目: 国家自然科学基金(32371557); 大理州科技专项(202301A020023)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32371557) and the Dali Science and Technology Special Project (202301A020023).

*Corresponding author. E-mail: yangxy@eastern-himalaya.cn

Received: 2023-09-16; Accepted: 2023-12-05; Published online: 2024-01-17

Fungal community dynamics and correlations with physicochemical factors in sealed Paocai brine

AN Rui^{1,2}, DENG Wei^{1,2}, LI Zhengqiang^{1,2}, LI Jingchao^{1,2}, YANG Xiaoyan^{*1,2,3}

1 Institute of Eastern-Himalaya Biodiversity Research, Dali University, Dali 671003, Yunnan, China

2 The Provincial Innovation Team of Biodiversity Conservation and Utility of the Three Parallel Rivers Region, Dali University, Dali 671003, Yunnan, China

3 Collaborative Innovation Center for Biodiversity and Conservation in the Three Parallel Rivers Region of China, Dali 671003, Yunnan, China

Abstract: [Background] Fungi play an important role in the flavor and texture of Paocai and influence the shelf life of Paocai and its brine. Brine is the traditional method of Paocai production in China, and it is also the key for maintaining the original flavor of Paocai. **[Objective]** To analyze the dynamics of the fungal community and its relationship with physicochemical factors of Paocai brine in sealed storage. **[Methods]** The amplicon sequence variants (ASVs) were employed to monitor the dynamics of the fungal community in Paocai brine stored at 25 °C for 30 d. A flow analyzer was used to reveal the changes in physicochemical factors of the brine. **[Results]** According to the fungal community dynamics and physicochemical factor changes in the Paocai brine, the fungal community succession within 30 d can be divided into three stages (early: 1–5 d; middle: 6–16 d; late: 18–30 d). A total of 461 fungal genera belonging to 226 families, 98 orders, 39 classes of 10 phyla were annotated in the three stages. In the early stage, the fungal composition was complex and changing, and the interactions were strongly influenced by pH and total nitrogen (TN). The middle stage presented changed dominant genera and increased rare genera, and the interactions were weakened and regulated by TN. In the late stage, the number of rare genera kept decreasing, and the community structure was simple, with weak interactions which were influenced by nitrate nitrogen (NN), phosphate (P), and total phosphorus (TP). **[Conclusion]** The fungal community in the Paocai brine stored at 25 °C for 30 d varied in the early, middle, and late stages. The Paocai brine stored at 25 °C for 30 d was safe to be used within one week and could guarantee the flavor of Paocai. Moreover, cold chain storage could adequately extend the shelf life. It is worth exploring the rich fungal resources in the Paocai system.

Keywords: amplicon sequencing; Paocai brine; storage of brine; rare fungi; community succession

泡菜是我国传统特色发酵食品的典型代表之一，不仅具有助消化、解腻开胃、抗氧化和降低胆固醇等功能，而且还能发挥抗菌、净肠、抗衰老和抗癌等保健功效，因此深受广大消费者的喜爱^[1-5]。泡菜风味受食材、调味品和微生物组成的影响。自然发酵制作的泡菜，其微生物

大多来源于食材、调料与缸体等，即泡菜体系的微生物组成与泡菜制作的生境有关^[6-7]。泡菜体系中的微生物组成不同，其代谢产物会出现差异，泡菜风味也因此不同^[8-9]。为保持泡菜风味，采用母水制作泡菜是最理想的方式^[10]，这就需要了解泡菜母水中的微生物群落组成及

其在储存过程中的动态变化。细菌和真菌是泡菜微生物体系的主要组成,其群落结构在泡菜腌制过程和储存中会发生较大的变化^[11]。就母水而言,密闭储存的泡菜体系中,细菌的灭绝发生时间与 pH 的变化相吻合,细菌间的对抗或内战(即竞争)、资源的消耗等导致灭绝的发生,并推动微观生态系统的演替^[12]。细菌的群落结构会在储存期间发生持续改变,导致不同储存段间细菌群落的相似度逐渐降低,进而影响到母水品质^[13]。相较于细菌,真菌对泡菜母水品质的影响也是不容忽视的,在泡菜发酵过程中,子囊菌、担子菌,特别是酵母菌对泡菜的质地与风味发挥着重要作用^[14-16];而另一些真菌则容易使泡菜霉腐,尤其是霉腐真菌为影响泡菜及母水储存时长的重要因素^[17]。霉腐真菌大多属于好氧型真菌^[18],密闭储存泡菜母水或许能够抑制霉腐真菌的生长从而保证母水质量,但密闭储存条件下泡菜母水中的真菌群落的动态变化是未知的。同时,泡菜母水中的真菌还会受理化因子(即非生物选择压力)的影响,如果我们能够诊断出真菌群落在生产过程中变化最大的时间和位置,发酵食品生产商就可以在特定时间段优先控制非生物选择压力,以确保产品风味的一致性和可重复性,这也是母水储存需要解决的关键问题之一^[19]。此外,泡菜属于我国百姓的日常调味品,更多是民间自制。在人流越来越频繁的时代背景下,家乡的泡菜也是许多人的乡愁。因此,了解密闭、常温储存的泡菜母水中微生物群落组成动态和理化特性,也能为百姓日常储存和运输泡菜母水提供参考。

由于目前能够实现纯培养的微生物仅占到微生物总数的 1.5%^[20],同时,持续地、密集地抽样,能更好地发现泡菜体系中母水真菌群落

的动态变化规律^[21]。本实验采用高通量测序技术中的扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV)技术,解析 25 °C、密闭储存 30 d 内泡菜母水的真菌群落动态变化。应用流动分析仪与 pH 仪监测 pH、总氮(total nitrogen, TN)、总磷(total phosphorus, TP)、磷酸盐(phosphates, P)和硝态氮(nitrate nitrogen, NN)这 5 种理化因子,分析母水中环境因子与真菌群落动态变化的相互关系。研究结果将有助于提高现有泡菜母水发酵工艺及储存技术,为传统泡菜食品的现代化改造及民间母水的使用、储存和运输提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 样品

将 17.5 kg 白萝卜,17.5 kg 卷心菜,1 kg 小米辣,0.5 kg 生姜,0.5 kg 花椒,1.25 kg 冰糖,105 kg 冷开水(含有 6%食盐)装陶制泡菜坛中。室温自然发酵 7 d 后用 4 层无菌纱布滤去泡菜,混匀后获得 100 kg 泡菜母水。为使母水中微生物分布更加均匀,将母水于室温静置 24 h,静置后,将泡菜母水分装至 500 mL 含密封盖的玻璃瓶中,共获得 60 瓶泡菜母水,25 °C 下保存(图 1)。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 抽提试剂盒, Bio-Tek 公司; 琼脂糖, Biowest 公司; *FastPfu* Polymerase, TransGen 公司; AxyPrep DNA Gel Extraction Kit, Axygen 公司; 建库试剂盒, Bioo Scientific 公司; 测序试剂盒, Illumina 公司。

移液器、小型离心机、高速台式冷冻离心机, Eppendorf 公司; NanoDrop 微量分光光度计, Thermo Fisher Scientific 公司; 酶标仪, Bio-Tek 公司; 旋涡混合器, 海门其林贝尔仪器制造有限

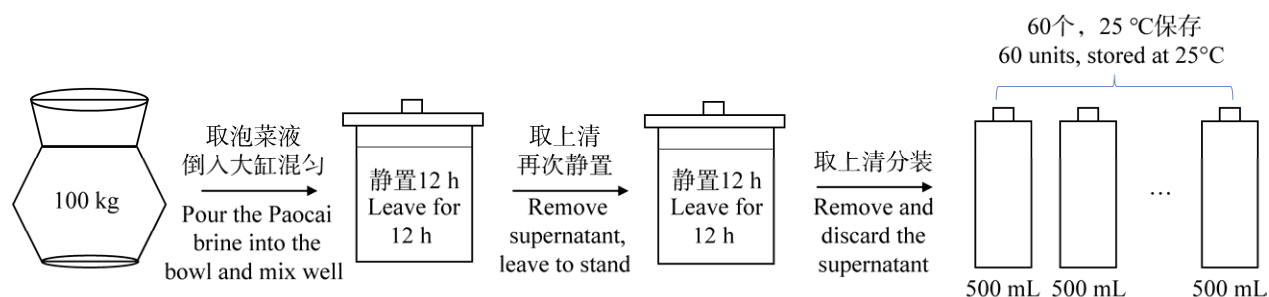


图 1 样品处理方法

Figure 1 Sample processing method.

公司;粉碎研磨仪,上海万柏生物科技有限公司;研磨仪,MP公司;微型荧光计,Promega公司;磁力架,生工生物工程(上海)股份有限公司;电泳仪,北京市六一仪器厂;PCR仪,ABI公司;测序仪,Illumina公司;pH仪,奥豪斯仪器有限公司;连续流动分析仪,Bran-Luebbe公司。

1.3 泡菜母水样品采集及其理化因子测定方法

母水置于 25 °C 下保存,从第 1–第 10 天每天一次、10–30 d 每隔 2 d 采集一次样品。每次采样时,随机从分装的瓶子中选取 3 瓶(分别用 a、b、c 表示),将母水混匀,用 50 mL 无菌针筒抽取母水,分装至 50 mL 离心管中,8 000 r/min 离心 10 min 后将上清放入新 50 mL 离心管中,用于理化因子测定;沉淀置–80 °C 保存,待所有样品(共 60 个样品)采集完毕后,使用干冰保存并立即送至深圳微科盟科技集团有限公司进行高通量测序。

取 5 mL 上清液使用 pH 仪进行 pH 值的测定,剩余上清使用连续流动分析仪进行 TN、TP、P、NN 这 4 种理化因子的测定^[22]。

1.4 微生物群落动态及与理化因素变化的相关性分析

首先,综合泡菜母水 30 d 内丰富度指数与 Shannon 指数的变化规律,将发酵过程中真菌门与属水平真菌群落构成变化进行分期分析

(前期: 1–5 d, 中期: 6–16 d, 后期: 18–30 d)。再通过冗余分析(redundancy analysis, RDA)分析 3 个时期下母水中的理化因子与真菌群落动态变化的相互关系。最后,利用微科盟生科云网站(<https://www.bioincloud.tech/>)对 3 个时期下的真菌分类属和基因功能进行网络分析,以探究密封环境下泡菜母水真菌组成的演替规律。

1.4.1 高通量测序

根据 DNA 抽提试剂盒说明书进行泡菜母水总 DNA 抽提。DNA 浓度和纯度利用 NanoDrop 微量分光光度计进行检测,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量^[23];选择稀释后的基因组 DNA 为模板,使用带 Barcode 的特异引物对 ITS1-1F 区域进行测序研究,引物选择 ITS1-1F-F (5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA-3')和 ITS1-1F-R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')^[24]。PCR 反应体系: 5×FastPfu Buffer 4 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, Forward Primer (5 μmol/L) 0.8 μL, Reverse Primer (5 μmol/L) 0.8 μL, FastPfu Polymerase 0.4 μL, BSA 0.2 μL, Template DNA 10 ng, ddH₂O 补足 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 27 个循环; 72 °C 10 min^[25]。使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物,利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 对 PCR 产物进行纯化、Tris-HCl 洗脱后,使用 2% 琼脂糖电泳检测,采

用 Illumina NovaSeq 平台进行测序。

1.4.2 生物信息学分析

采用 QIIME2^[26]进行序列的质控、修剪、去噪、拼接及去除嵌合体；使用 GREENGENES^[27]数据库得到物种的分类信息表；QIIME2 feature-table 插件剔除所有污染性的线粒体和叶绿体序列^[28]。用 QIIME2 core-diversity^[29]插件计算多样性矩阵、特征序列水平 α 多样性指数，包括丰富度指数、Shannon 指数。真菌群落 α 多样性指数箱型图使用 Origin64 绘制；门、属堆积、理化因子变化图使用 Excel 软件制作；属水平分组聚类热图、真菌功能预测及属网络分析使用微科盟生科云网站绘制；使用 R4.03 版本的 vegan、ggplot2、ggforce、ggrepel 包对真菌 RDA 进行分析并绘制结果图。

2 结果与分析

2.1 母水真菌群落组成

2.1.1 母水中真菌的 α 多样性指数变化及非度量多维标度(non-metric multidimensional scaling, NMDS)分析

经过有效序列质控、拼接和优化后，从泡菜母水中共获得真菌 10 门 39 纲 98 目 226 科 461 属，其中已知真菌序列 311 227 条，未知真菌序列有 1 147 262 条。鉴于第 22 天的样品高通量测序未取得成功，因此在后续展示中将省略第 22 天的母水真菌群落结构和理化因子变化数据。

为探究母水中真菌群落的丰富度、稳定性和聚类情况，本研究对母水中真菌的 α 多样性和 β 多样性进行分析。丰富度指数持续动态变化：1–5 d 维持了相对稳定，第 6 天迅速降低后又缓慢上升，16 d 之后迅速下降并维持一个稳定波动状态；Shannon 指数在 1–5 d 上升，第 6 天迅速下降后又持续上升并维持平稳。表明密闭

条件下泡菜母水中真菌群落会随着储藏时间发生变化(图 2)。

按照真菌丰富度的变化将发酵过程分为 3 个时期：前期为 1–5 d，中期为 6–16 d，后期为 18–30 d。

2.1.2 门水平真菌组成及其动态变化

为探究密封环境下泡菜母水真菌门组成及演替规律，本研究分析了真菌门水平组成及其动态变化。结果显示，在真菌门水平上，共检测出 10 个门：毛霉门(*Mucoromycota*)、捕虫霉亚门(*Zoopagomycota*)、油壶菌门(*Olpidiomyces*)、球囊菌门(*Glomeromycota*)、*Rozellomycota*、壶菌门(*Chytridiomycota*)、被孢霉门(*Mortierellomycota*)、担子菌门(*Basidiomycota*)、Unassigned、子囊菌门(*Ascomycota*)。从整体看，30 d 内，*Ascomycota* 始终为优势菌门，相对丰度为 41.57%–66.97%；Unassigned 相对丰度为 18.70%–31.00%；*Basidiomycota* 相对丰度为 7.84%–26.22%；其他 7 门含量较少，总占比的相对丰度为 0.01%–6.44%。结果表明，密闭条件下的泡菜母水，其中的真菌在门水平上随储藏时期发生相对丰度的变化，但始终有 4 个门占据优势地位，其中 *Basidiomycota* 与 *Mortierellomycota* 的相对丰度在 3 个时期中逐渐增加；Unassigned 相对丰度逐渐减少；*Ascomycota* 在 3 个时期内的相对丰度比较稳定(图 3)。

2.1.3 属水平真菌组成及其动态变化

为探究密封环境下泡菜母水真菌属的组成及演替规律，本研究对母水真菌属(Top 50)的组成及其动态变化进行分析。结果显示，属水平的分组聚类热图(图 4)直观展示了母水发酵 30 d 内泡菜母水真菌 Top 50 属在不同时期中的丰度。在属水平上，前期中共检出 10 个优势属(在体系中含量>1%)：节担菌属(*Wallemia*)、

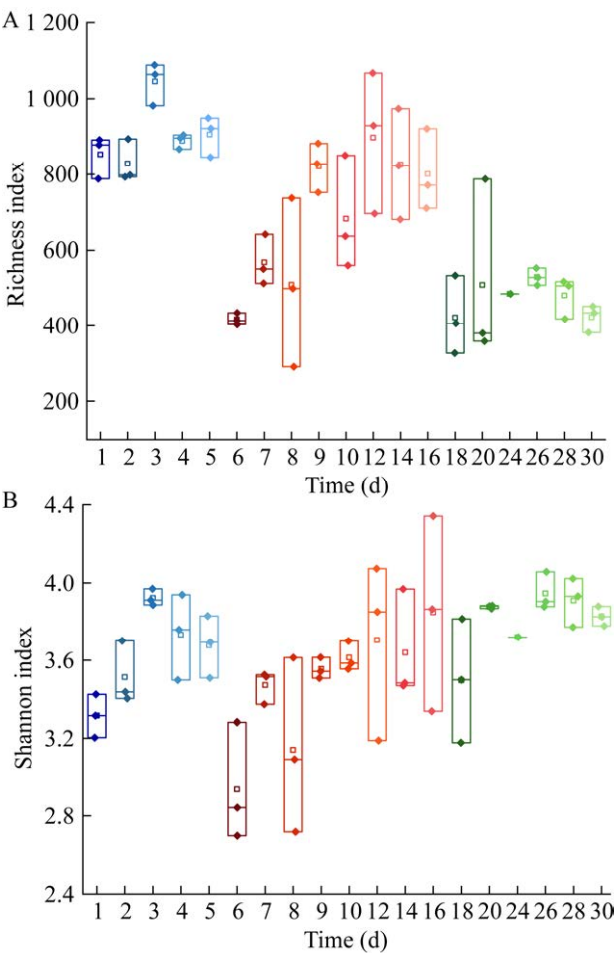


图 2 真菌群落 α 多样性指数 A: 丰富度指数. B: Shannon 指数

Figure 2 Fungal community α diversity index. A: Richness index. B: Shannon index.

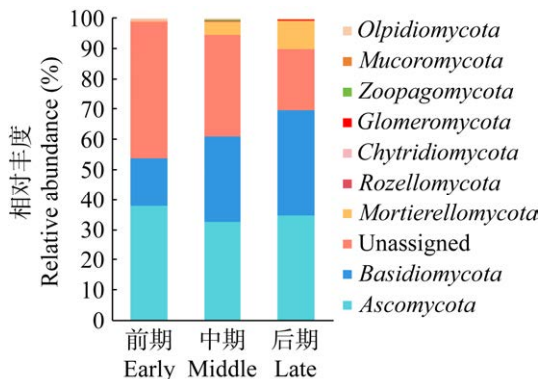


图 3 泡菜母水发酵 30 d 内门水平真菌群落变化
Figure 3 Changes in phylum level fungal communities during 30 d of Paocai brine fermentation.

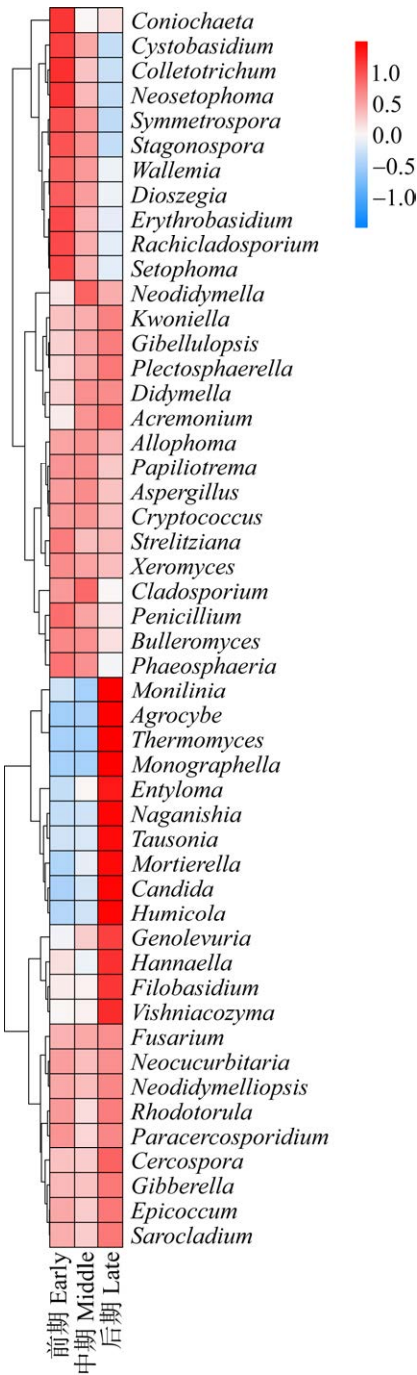


图 4 泡菜母水发酵 30 d 内真菌属水平的分组聚类热图(Top 50) 颜色越接近正红色, 属的相对丰度越高; 颜色越接近深蓝色, 属的相对丰度越低
Figure 4 Heat map of grouped clustering at genus level of fungi during 30 d of Paocai brine fermentation (Top 50). The closer the color is to positive red, the higher the relative abundance of the genus. The closer the color is to dark blue, the lower the relative abundance of the genus.

Kwoniella、*Allophoma*、*Gibellulopsis*、曲霉属(*Aspergillus*)、网孢属(*Filobasidium*)、亚隔孢壳属(*Didymella*)、镰孢属(*Fusarium*)、尾孢属(*Cercospora*)、*Neocucurbitaria*。与前期相比,中期新增优势属—假丝酵母属(*Candida*),*Neocucurbitaria*不再是优势属。后期优势属新增阿德利长西氏酵母属(*Naganishia*)、*Tausonia*、*Candida*与*Strelitziana*; *Fusarium*不再是优势属; *Candida*为中、后期共同优势属,在中期失去优势的*Neocucurbitaria*重新成为后期的优势菌属。

2.1.4 稀有属的变化

为探究密封环境下泡菜母水真菌属的组成及演替规律,本研究对母水真菌稀有属(相对丰度<0.01%)的组成及其动态变化进行分析。结果显示,1–30 d内,母水中共鉴定出364个稀有属。从整体来看,稀有属在储存过程中始终处于动态变化中。在前期检出218个稀有属;在

中期检出278个稀有属;在后期检出235个稀有属。表明稀有属的数量存在随着发酵时间的延长呈现先增加后减少的趋势(图5)。

2.2 母水理化变化及与真菌群落演替的相互关系

2.2.1 30 d内母水理化因子变化规律

为探究密封条件下泡菜母水理化因子的变化规律,本研究对泡菜母水进行NN、P、TP、TN、pH这5种理化因子的测定。结果显示,NN、P和TP这3个指标在1–9 d较平稳,从第10天开始骤增,又在第16天开始下降(图6A–6C); TN在1–6 d较稳定,从第7天开始出现波动,第8天开始增多,在第12天又开始下降(图6D); 30 d内,泡菜母水的pH在1–6 d内呈波动下降趋势,6–16 d的pH处于波动平衡状态,18–30 d的pH变化不明显,处于平稳状态(图6E),结果表明,密闭条件下储藏的泡菜母水的非生物因素也分为3个时期波动。

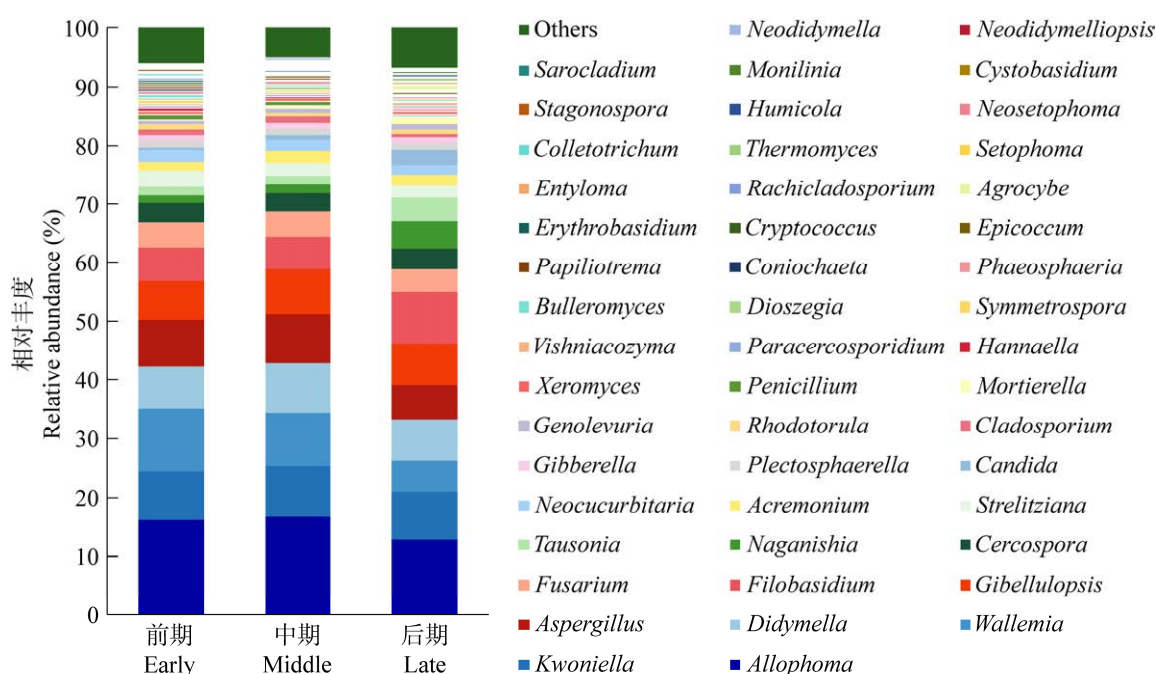


图5 泡菜母水发酵30 d内真菌稀有属组成

Figure 5 Rare genus composition of fungi during 30 d of Paocai brine fermentation.

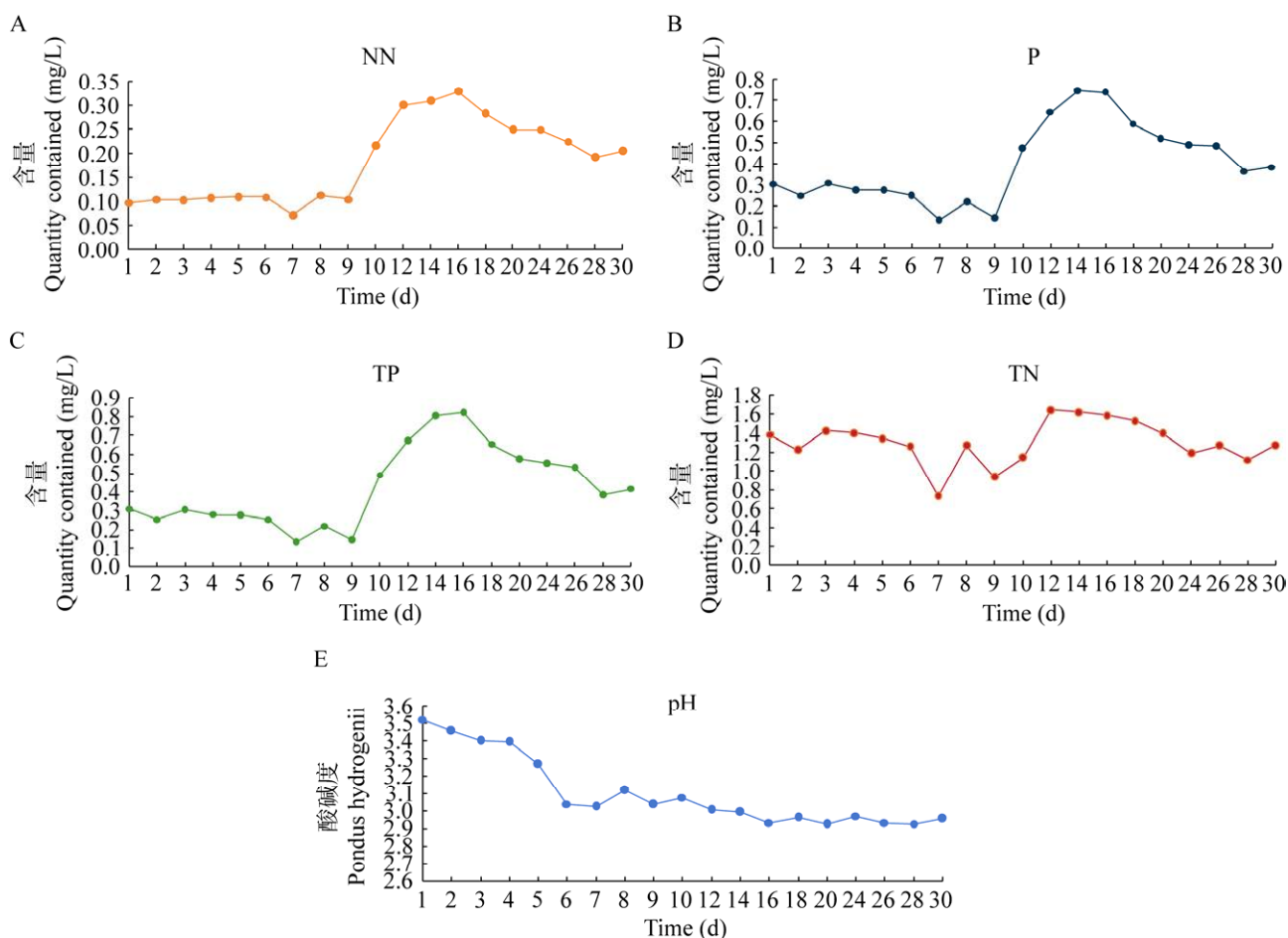


图 6 泡菜母水理化因子变化图

Figure 6 Changes of physical and chemical factors in Paocai brine.

2.2.2 母水真菌 RDA 分析

为探索母水中的理化因子与真菌群落的相关关系,本研究对母水真菌进行了 RDA 分析。结果显示:在前期,母水的 pH 主导了真菌群落结构的变化, pH、TN 与真菌群落结构变化呈正相关关系;中期内的真菌群落与 TN 呈现负相关;在后期,真菌群落结构变化又与 TP、P、NN 呈正相关,与 pH 呈负相关。结果表明,在泡菜母水贮藏过程中需要注意母水 pH 的变化,当 pH 维持稳定时,需要关注母水中的 TN、NN、P、TP 含量。

同时,以前期的真菌群落为基准测试中、

后期真菌群落变化,发现这 3 个时期对泡菜母水中真菌群落的变化进行划分具有很好的代表性($P=0.004$),可以按照分期进行后续的真菌群落分析(图 7)。

2.3 母水真菌功能预测及属网络分析

为探究 30 d 内泡菜母水真菌 Top 50 属在 3 个时期中的相关度,以及基因功能预测与丰富度之间的相关度,对母水真菌属进行网络相关性分析(图 8)。结果显示,在属水平上,泡菜母水中 Top 50 真菌属的相关性随发酵时间的延长逐渐减弱,基因功能预测与丰富度的相关性呈现先增强后减弱的趋势。这表明泡菜母水在密闭

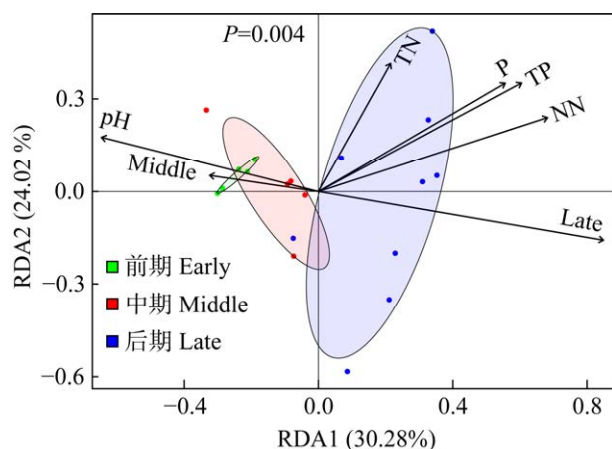
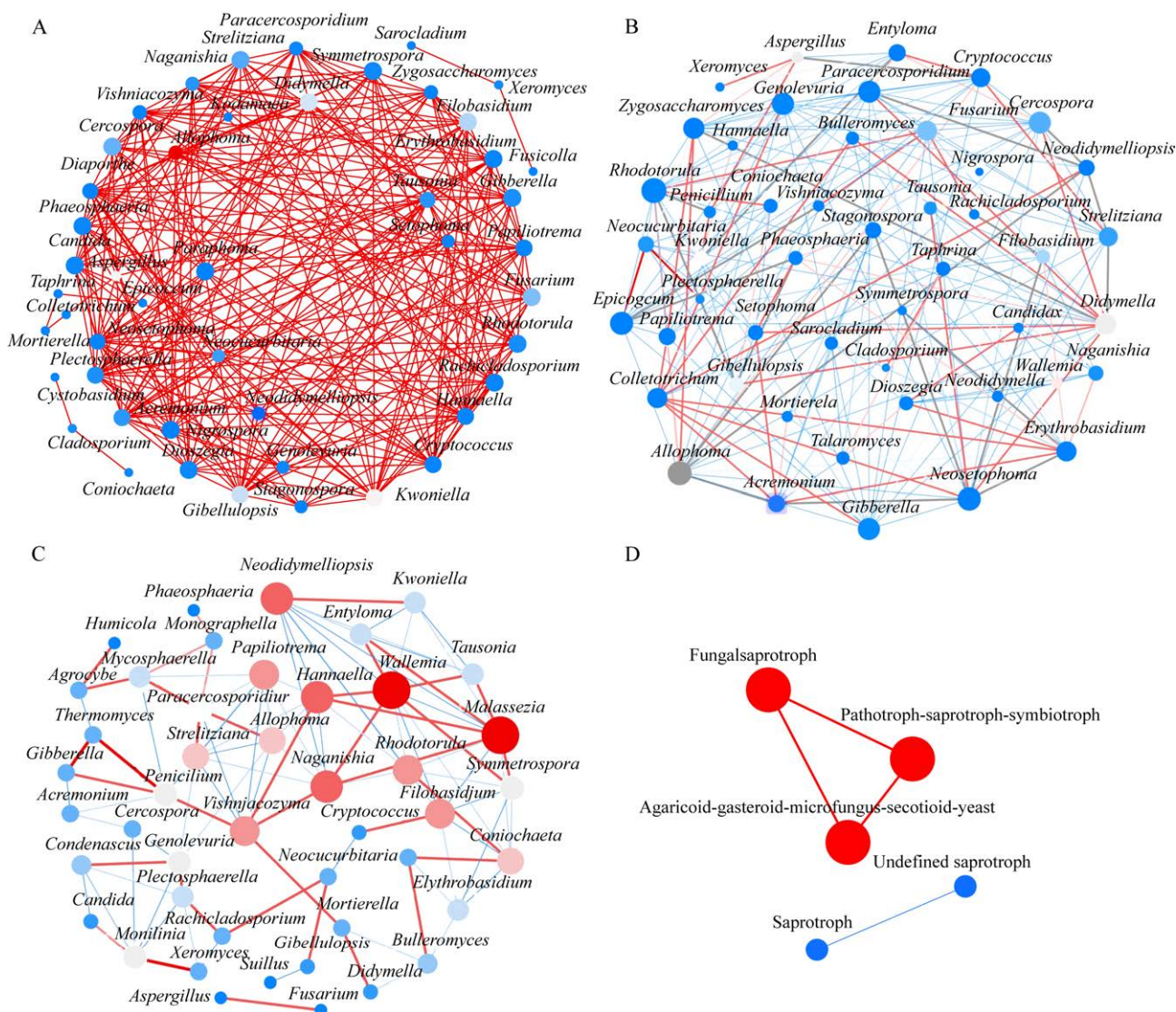


图7 泡菜母水真菌 RDA 分析

Figure 7 RDA analysis of Paocai brine fungi.



储存的 30 d 内, 群落结构持续改变并逐渐趋于简单和稳定的状态。在前期, 群落结构主要以真菌属之间复杂的互作关系维持, 但此时菌属之间的功能相关性几乎不存在; 中期, 群落中菌属的互作关系减弱, 而真菌功能的相关性大幅增加; 在后期, 真菌属的组成和功能之间的互作关系均减少。

3 讨论

本研究对密封泡菜母水在 1–30 d 内的真菌群落进行了分析, 门水平上共检测出 3 个稳定

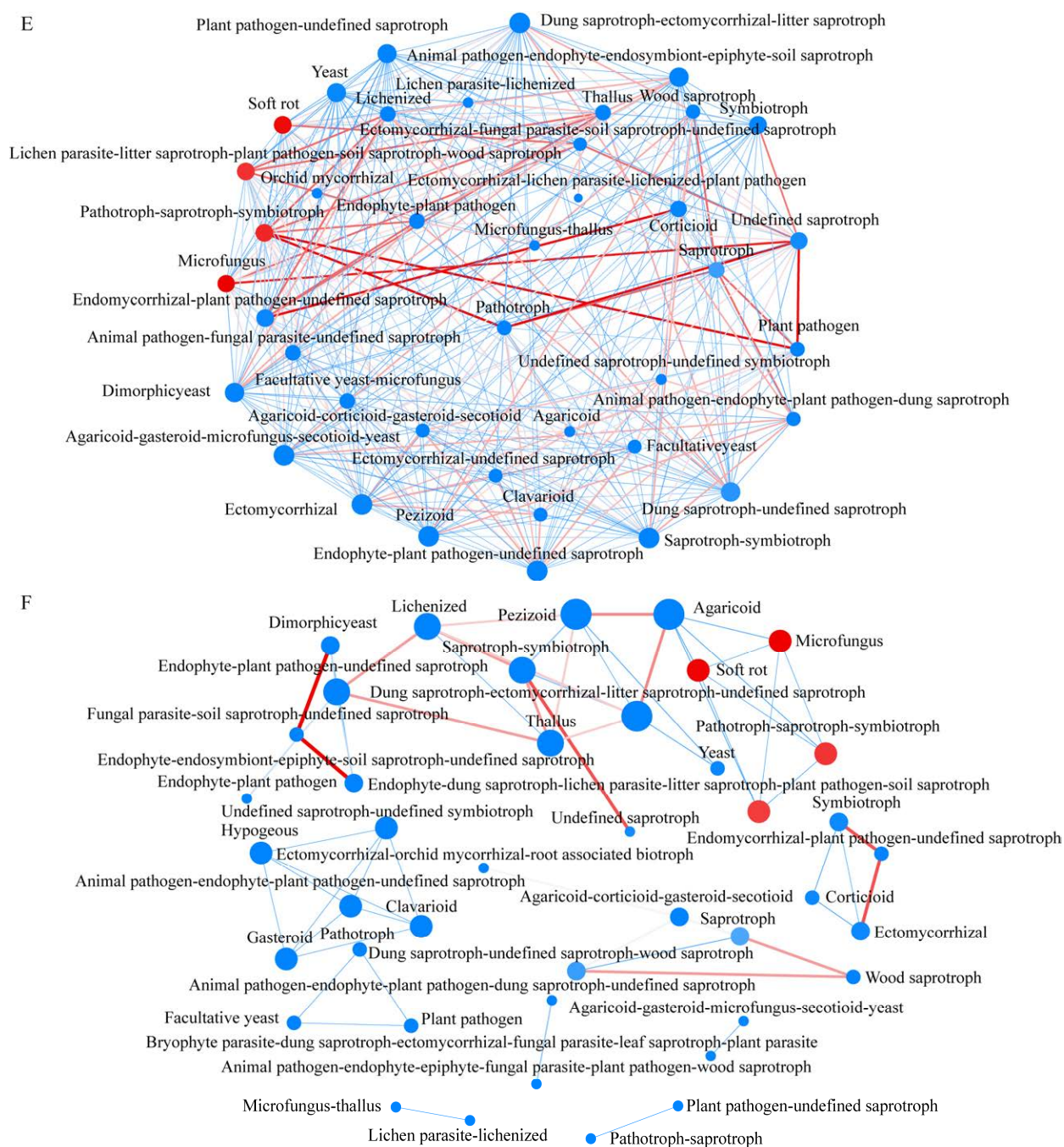


图 8 泡菜母水真菌功能预测及属网络分析(Top 50) 颜色越接近正红色, 属间的正相关性越高; 颜色越接近深蓝色, 属间的负相关性越低. A、B、C 分别对应 3 个时期内泡菜母水真菌属网络分析结果. D、E、F 分别对应 3 个时期内泡菜母水真菌基因功能预测网络分析结果

Figure 8 Function prediction and genus network analysis of fungi in mother Paocai brine (Top 50). The closer the color is to positive red, the higher the positive correlation between genera. The closer the color is to dark blue, the lower the negative correlation between genera. A, B and C correspond to the results of network analysis of genera of Paocai brine fungi in the three periods, respectively. D, E and F correspond to the results of network analysis of prediction of gene functions of Paocai brine fungi in the three periods, respectively.

优势菌门(在体系中含量>1%): *Ascomycota*、*Unassigned* 与 *Basidiomycota*; *Mortierellomycota* 在后期成为了优势菌门。属水平上, 由于母水中环境因子的持续变化, 前期的非优势属 *Candida* 在中期、后期成为优势属, *Neocucurbitaria* 则是前期、后期的优势菌属。然而, 稀有属均持续处于变化之中, 并且随着发酵时间的延长, 稀有属的多样性持续降低, 前、中期稀有属的群落构成复杂、多样性较高; 后期的稀有属多样性降低, 菌属构成较为简单。与非密封环境下储存的泡菜及母水相比, 门水平上, 共同的优势菌门都是 *Ascomycota* 与 *Basidiomycota*^[30]; 属水平上, 共同的优势属为 *Candida*^[30-33], *Fusarium* 在陕西省西安地区的传统老坛自然发酵的泡菜中出现^[32], *Tausonia* 在四川地区工业萝卜泡菜中被检出^[30], 本研究的其他优势真菌属均与非密闭环境储存的泡菜优势真菌属不同。这表明, 泡菜体系微生物群落构成确实受制作生境的影响, 但不同泡菜体系中也存在相似的发酵菌群; 同时, 密闭与非密闭环境下泡菜母水真菌群落会发生不同的变化。

对比本研究团队对同一泡菜体系中细菌群落监测结果^[13], 不难发现, 与真菌群落的动态变化相比, 在同样的理化环境下, 细菌群落发生明显变化的时间较真菌滞后 2 d, 表明真菌对环境变化更为敏感。同时, 当泡菜体系的生境不利于细菌生存时, 大量细菌进入休眠状态^[34], 但这些休眠微生物仍能够被高通量测序技术监测到, 这也是细菌体系更为稳定的原因之一。此外, 密闭储存泡菜体系中细菌群落在前 30 天内经历的 3 次大灭绝事件后都会出现一定时长的稳定期(3-5、7、22-30 d)^[12], 这也反映出微生物群落存在自我调整能力。但当大部分微生物尤其是真菌都无法继续在密闭体系中存活

时, 泡菜母水将无法继续发挥复制原有泡菜风味的功能。这就提醒我们, 确定泡菜母水的最适储存期非常有必要。

同一泡菜体系中, 细菌稀有属在母水中起到关键作用^[13,35], 而母水中真菌稀有属的变化也相对更明显, 在中、后期, 许多优势属灭绝, 稀有属的数量增加。随着储存时间延长, 环境进一步破坏, 部分稀有属灭绝, 这提示我们, 泡菜母水的最适储存期应在中、后期到来之前, 最长可延长至中期结束。在进一步对泡菜母水发酵过程中的主要菌属功能进行查询后发现, 在中期具有霉腐功能的真菌逐渐被检测出且丰富度持续增加, 其中以曲霉属(*Aspergillus*)和青霉属(*Penicillium*)为主; 后期内母水中出现大量霉腐真菌属, 虽然该功能的菌属出现不代表母水就一定会发生腐败, 但这也表明中、后期母水已经不适合用于泡菜发酵。结合泡菜母水中细菌群落动态分析及其最适保存期的结论^[13]及本研究结果可知, 25 °C 密闭条件下保存的泡菜母水, 在一周内使用能更有效保障母水的风味, 冷藏条件下可适当延长储存期。

结合理化因子、菌属群落变化与功能预测及属网络相关度分析发现, 泡菜母水在密闭储存的 30 d 内, 其真菌群落结构与环境因子相互影响, 理化因子在不同储存段都提供了不同的非生物选择压力, 发挥了真菌过滤器的作用, 而真菌群落结构反过来又可以影响环境。在群落演替前期, 真菌之间通过复杂的互作关系维持群落稳定性, 随着环境中 pH 逐渐变酸及 TN 含量的波动, 不耐酸的物种大幅消失; 适应酸性且与 TN 负相关的真菌进入群落演替中期, 同时在该时期内, NN、P、TP 和 TN 的含量均增高, 表明该时期的微生物在对环境进行“改造”, 此时, 中期群落中的菌属互作关系减弱,

主要受真菌功能调控而变化；后期环境相对稳定，真菌群落与 NN、P 和 TP 等理化因子呈现正相关关系，与 pH 和 TN 呈现负相关关系，真菌属和功能之间的互作关系均降低，并随着资源的逐渐耗尽，群落结构趋向单一。这表明在泡菜母水贮藏过程中，需要注意母水 pH 的变化，当 pH 维持稳定时，需要关注母水中 NN、P、TP 和 TN 的含量，这样能更好地在泡菜母水的使用、储存和运输过程中检测母水是否变质。

此外，母水储存过程中还出现了特殊功能的菌属，例如母水中出现具有捕食线虫能力的 *Arthrobotrys*^[36]、具备降解塑料能力的 *Neodevriesia*^[37] 及具备防治植物病原菌能力的 *Chaetomium*^[38]。这提示我们有关泡菜体系中真菌的研究不仅需要关注群落动态变化，对功能菌株的开发也是非常必要的。泡菜的功能多样性不仅与已知菌息息相关，同时也与未鉴定出的真菌有较高的相关性。本研究中，未知真菌序列有 1 147 262 条，占总序列数的 78.661%，这是由于真菌基因数据库的局限性所致，因此，加强对泡菜母水微生物的分离培养技术研究以获得更多泡菜微生物的菌种资源，不仅可支持泡菜微生物的开发和应用研究，还可为传统食品的现代化改造和食品安全提供科学的理论支撑。

4 结论

25 °C 密闭储存的泡菜母水中真菌群落分 3 个段演替并受理化条件影响，可通过监测真菌群落和理化因素的变化来了解母水环境是否发生腐败。25 °C 密闭条件下保存的泡菜母水，在一周内使用应能更安全有效地保障泡菜母水发酵制作泡菜的风味，冷链储存可适当延长使用期限。泡菜体系中蕴藏着极为丰富的真菌资源亟待开发。

REFERENCES

- [1] YI EJ, KIM AJ. Antimicrobial and antibiofilm effect of bacteriocin-producing *Pediococcus inopinatus* K35 isolated from kimchi against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Antibiotics*, 2023, 12(4): 676.
- [2] KANG SA, KIM MJ, KIM TS, JANG KH, CHO EJ, PARK KY. Antioxidant properties in functional kimchi[J]. *The FASEB Journal*, 2015, 29(S1): 922.10.
- [3] JUNG KO, PARK KY, BULLERMAN LB. Anticancer effects of leek kimchi on human cancer cells[J]. *Preventive Nutrition and Food Science*, 2002, 7(3): 250-254.
- [4] KIM B, PARK KY, KIM HY, AHN SC, CHO EJ. Anti-aging effects and mechanisms of kimchi during fermentation under stress-induced premature senescence cellular system[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2011, 20(3): 643-649.
- [5] ALAN Y, SAVCI A, KOÇPINAR EF, ERTAŞ M. Postbiotic metabolites, antioxidant and anticancer activities of probiotic *Leuconostoc pseudomesenteroides* strains in natural pickles[J]. *Archives of Microbiology*, 2022, 204(9): 571.
- [6] XIONG T, GUAN Q, SONG S, HAO M, XIE M. Dynamic changes of lactic acid bacteria flora during Chinese sauerkraut fermentation[J]. *Food Control*, 2012, 26(1): 178-181.
- [7] PARK EJ, CHUN J, CHA CJ, PARK WS, JIRON CO, BAE JW. Bacterial community analysis during fermentation of ten representative kinds of kimchi with barcoded pyrosequencing[J]. *Food Microbiology*, 2012, 30(1): 197-204.
- [8] 张其圣, 陈功, 申文熹, 唐垚, 李恒, 伍亚龙, 王勇, 汪冬冬, 张红梅. 中国泡菜乳酸菌群落结构动态变化研究进展[J]. *食品与发酵科技*, 2016, 52(6): 1-8.
ZHANG QS, CHEN G, SHEN WX, TANG Y, LI H, WU YL, WANG Y, WANG DD, ZHANG HM. Review of the diversity and dynamics of lactic acid bacteria in Chinese Paocai[J]. *Food and Fermentation Sciences & Technology*, 2016, 52(6): 1-8 (in Chinese).
- [9] 陈功, 张其圣, 李恒, 唐垚, 汪冬冬, 伍亚龙, 朱翔, 张伟, 余文华, 游敬刚. 中国泡菜发酵态相对稳定性研究及应用[J]. *食品与发酵科技*, 2020, 56(1): 54-63, 72.
CHEN G, ZHANG QS, LI H, TANG Y, WANG DD, WU YL, ZHU X, ZHANG W, YU WH, YOU JG. Research and application of the stable fermentation

- stage of Chinese Paocai[J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2020, 56(1): 54-63, 72 (in Chinese).
- [10] 李恒, 陈功, 伍亚龙, 邓维琴, 张伟, 朱翔, 王勇, 张其圣. 高通量测序方法研究传统四川泡菜母水中微生物群落的动态变化[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 131-138.
- LI H, CHEN G, WU YL, DENG WQ, ZHANG W, ZHU X, WANG Y, ZHANG QS. Analysis of microbial community dynamics of traditional Sichuan Paocai brine by high-throughput sequencing[J]. Food Science, 2018, 39(24): 131-138 (in Chinese).
- [11] 张锡茹, 关慧, 邢少华, 刘文丽, 李华敏. 泡菜微生物演替与风味物质变化的研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 294-305.
- ZHANG XR, GUAN H, XING SH, LIU WL, LI HM. Advances in research on microbial succession and flavor changes in pickles[J]. Food Science, 2021, 42(23): 294-305 (in Chinese).
- [12] DENG W, LI N, ZHANG CZ, AN R, YANG XY, XIAO W. Extinction drives a discontinuous temporal pattern of species-area relationships in a microbial microcosm system[J]. Scientific Reports, 2023, 13: 3720.
- [13] 李静超, 邓巍, 余容, 杨晓燕, 肖文. 泡菜母水中细菌群落的动态变化规律及结构解析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(20): 144-151.
- LI JC, DENG W, SHE R, YANG XY, XIAO W. Dynamic changes and structural analysis of the bacterial community in Paocai brine[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(20): 144-151 (in Chinese).
- [14] WANG DD, CHEN G, TANG Y, MING JY, HUANG RQ, LI JY, YE MZ, FAN ZY, YIN LG, ZHANG QS, ZHANG WX. Effect of non-core microbes on the key odorants of Paocai[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 172: 114211.
- [15] CHEN P, ZHAO Y, WU ZR, LIU RH, XU RX, YAN L, LI HY. Metagenomic data of fungal internal transcribed spacer from serofluid dish, a traditional Chinese fermented food[J]. Genomics Data, 2015, 7: 134-136.
- [16] GUAN QQ, ZHENG WD, HUANG T, XIAO YS, LIU ZG, PENG Z, GONG DM, XIE MY, XIONG T. Comparison of microbial communities and physiochemical characteristics of two traditionally fermented vegetables[J]. Food Research International, 2020, 128: 108755.
- [17] YU HJ, PARK SH, KIM EH, CHOI YJ, MIN SG. Effect of headspace gas composition in kimchi packaging on the quality characteristics of kimchi[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 60(10): 2695-2703.
- [18] FAN ZY, DENG WQ, LI XB, LI H, CHEN G, ZHANG QS. Effect of air exposed storage on quality deterioration and microbial succession of traditional Sichuan Paocai[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 154: 112510.
- [19] LOUW NL, LELE K, YE R, EDWARDS CB, WOLFE BE. Microbiome assembly in fermented foods[J]. Annual Review of Microbiology, 2023, 77: 381-402.
- [20] XIAO MY, HUANG T, XU YZ, PENG Z, LIU ZG, GUAN QQ, XIE MY, XIONG T. Metatranscriptomics reveals the gene functions and metabolic properties of the major microbial community during Chinese Sichuan Paocai fermentation[J]. Food Microbiology, 2021, 98: 103573.
- [21] 孙善峰, 黄晓宁, 韩北忠, 陈晶瑜. 扩增子测序分析助力传统发酵食品微生物群落研究[J]. 中国酿造, 2019, 38(5): 1-5.
- SUN SF, HUANG XN, HAN BZ, CHEN JY. Amplicon sequencing analysis enhancing the understanding on microbial diversity of traditional Chinese fermented foods[J]. China Brewing, 2019, 38(5): 1-5 (in Chinese).
- [22] 刘李蕾, 白衣恩, 祁福良, 杨晓燕, 余容. 连续流动分析法测定泡菜中总氮、硝酸盐、亚硝酸盐的样品处理[J]. 化学分析计量, 2023, 32(9): 5-9.
- LIU LL, BAI NE, QI FL, YANG XY, SHE R. Pretreatment method of sample for the determination of the total nitrogen, nitrate-nitrogen and nitrite-nitrogen in Paocai by continuous flow analytical system[J]. Chemical Analysis and Meterage, 2023, 32(9): 5-9 (in Chinese).
- [23] WARD DM, WELLER R, BATESON MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community[J]. Nature, 1990, 345(6270): 63-65.
- [24] MANTER, DK, VIVANCO, JM. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 71: 7-14.
- [25] WANG WC, ZHAI SS, XIA YY, WANG H, RUAN D, ZHOU T, ZHU YW, ZHANG HF, ZHANG MH, YE H, REN WK, YANG L. Ochratoxin A induces liver inflammation: involvement of intestinal microbiota[J]. Microbiome, 2019, 7(1): 151.

- [26] BOLDYEN E, RIDEOUT JR, DILLON MR, BOKULICH NA, ABNET CC, AL-GHALITH GA, ALEXANDER H, ALM EJ, ARUMUGAM M, ASNICAR F, BAI Y, BISANZ JE, BITTINGER K, BREJNROD A, BRISLAWN CJ, BROWN CT, CALLAHAN BJ, CARABALLO-RODRÍGUEZ AM, CHASE J, COPE EK, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37: 852-857.
- [27] BOKULICH NA, KAEHLER BD, RIDEOUT JR, DILLON M, BOLDYEN E, KNIGHT R, HUTTLEY GA, GREGORY CAPORASO J. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 90.
- [28] LANGILLE MGI, ZANEVELD J, CAPORASO JG, MCDONALD D, KNIGHTS D, REYES JA, CLEMENTE JC, BURKEPILE DE, VEGA THURBER RL, KNIGHT R, BEIKO RG, HUTTENHOWER C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814-821.
- [29] VÁZQUEZ-BAEZA Y, PIRRUNG M, GONZALEZ A, KNIGHT R. EMPeror: a tool for visualizing high-throughput microbial community data[J]. *GigaScience*, 2013, 2(1): 16.
- [30] 唐丽, 魏雯丽, 赵雅娇, 于文平, 吴正云, 曾里, 张文学. 工业萝卜泡菜发酵过程中理化特性及真菌群落多样性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(6): 25-31.
- TANG L, WEI WL, ZHAO YJ, YU WP, WU ZY, ZENG L, ZHANG WX. Physicochemical property and fungal diversity during the fermentation of industrial radish Paocai[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(6): 25-31 (in Chinese).
- [31] 邓维琴, 伍亚龙, 陈功, 李恒, 张伟, 朱翔, 王勇, 游敬刚, 张其圣. 多代发酵泡菜母水微生物多样性及其理化指标动态研究[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(8): 49-56.
- DENG WQ, WU YL, CHEN G, LI H, ZHANG W, ZHU X, WANG Y, YOU JG, ZHANG QS. Study on microbial diversity and physiochemical index of multi-generational fermented Paocai brine[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(8): 49-56 (in Chinese).
- [32] 罗青春, 裴乐乐, 梁会朋, 杨婧, 吴正云, 张文学. 规模化发酵泡菜生产中的真菌多样性[J]. *中国调味品*, 2015, 40(7): 43-46.
- LUO QC, PEI LL, LIANG HP, YANG J, WU ZY, ZHANG WX. Analysis of fungal diversity in Chinese-scale fermented Sichuan pickles[J]. *China Condiment*, 2015, 40(7): 43-46 (in Chinese).
- [33] 吕嘉彬, 晁倩文, 刘秉坤, 罗潇. 传统老坛自然发酵泡菜中真菌群落结构多样性分析[J]. *陕西科技大学学报*, 2019, 37(6): 53-59.
- LV JL, CHAO QW, LIU BK, LUO X. Diversity analysis of fungal community structure in natural fermented pickles of traditional altar[J]. *Journal of Shaanxi University of Science & Technology*, 2019, 37(6): 53-59 (in Chinese).
- [34] LU YX, DENG W, QI FL, YANG XY, XIAO W. Revived amplicon sequence variants monitoring in closed systems identifies more dormant microorganisms[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(3): 757.
- [35] 李政强, 邓巍, 安睿, 张发, 李静超, 杨晓燕. 泡菜母水细菌群落组成及潜在基因功能分析[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(24): 188-194.
- LI ZQ, DENG W, AN R, ZHANG F, LI JC, YANG XY. Analysis of Paocai brine bacterial community composition and potential functional genes[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(24): 188-194 (in Chinese).
- [36] 张克勤, 莫明和. 中国真菌志. 第三十三卷, 节丛孢及相关属[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- ZHANG KQ, MO MH. *Mycology of China*, volume 33, *Arthrotrrys* and Related Genera[M]. Beijing: Science Press, 2006 (in Chinese).
- [37] RÜTHI J, CERRI M, BRUNNER I, STIERLI B, SANDER M, FREY B. Discovery of plastic-degrading microbial strains isolated from the alpine and Arctic terrestrial plastisphere[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1178474.
- [38] 张丰. 毛壳菌 *Chaetomium* spp. 分离、筛选及生防机制初步研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2013.
- ZHANG F. Isolation, screening and preliminary study on biocontrol mechanism of *Chaetomium* spp.[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2013 (in Chinese).