

基于 16S rRNA 基因测序分析烟叶发酵过程中表面微生物的多样性

阴耕云, 肖冬, 王凯, 师建全, 朱玲超, 王明锋*

(云南中烟工业有限责任公司, 云南 昆明 650231)

摘要: 雪茄烟叶经过发酵处理才能制成风味独特的雪茄产品, 研究烟叶发酵过程中微生物的多样性对提高国产雪茄烟叶品质有重要意义。作者采集了来自云南省 8 个地区初步晾晒的雪茄烟叶和 7 种来自多米尼加共和国各地的优质雪茄烟叶, 基于 16S rRNA 基因测序技术鉴定各个样品表面微生物种类, 通过 OTU 聚类分析、Alpha 多样性分析、物种组成分析等方法进行微生物多样性分析, 获得晾晒烟叶表面的优势菌。结果显示, 云南省雪茄烟叶的优势菌属为葡萄球菌属, 其他常见菌属有假单胞菌属、无色杆菌属、棒状杆菌属、泛菌属等; 多米尼加共和国雪茄样品中微生物物种分布较中国雪茄样品更均匀, 微生物的多样性整体高于中国雪茄样品, 其优势菌属多为葡萄球菌属、棒状杆菌属、四联球菌属; 云南省临沧市雪茄烟叶优势菌属与多米尼加雪茄相似, 而且它的物种多样性和均匀度高于中国其他地区, 具有较大的发展潜力。

关键词: 雪茄烟叶; 16S rRNA; 多样性分析; 优势菌群

中图分类号: Q 938 文章编号: 1673-1689(2024)03-0102-11 DOI: 10.12441/spyswjs.20230321002

Analyzing Microbial Diversity on Tobacco Leaves Surface During Fermentation Process Based on 16S rRNA Gene Sequencing

YIN Gengyun, XIAO Dong, WANG Kai, SHI Jianquan, ZHU Lingchao, WANG Mingfeng*

(China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd., Kunming 650231, China)

Abstract: Cigar tobacco leaves can be made into cigar products with unique flavors only after fermentation treatment. It is of great significance to investigate the diversity of microorganisms in tobacco fermentation process to improve the quality of domestic cigar tobacco. In this study, preliminarily air-cured cigar tobacco leaves from eight regions of Yunnan Province and seven high-quality cigar tobacco leaves from Dominican Republic were collected. The microbial species on the surface of each sample were identified based on 16S rRNA gene sequencing technology. Microbial diversity was analyzed by OTU clustering analysis, Alpha diversity analysis, species composition analysis, and other methods to obtain the dominant bacteria on the surface of preliminarily air-cured tobacco leaves. The results showed that the dominant bacterial genus in the

收稿日期: 2023-03-21 修回日期: 2023-07-11

基金项目: 云南中烟科技项目(JB2022YL02, 2020CP01)。

作者简介: 阴耕云(1975—), 男, 硕士, 高级工程师, 主要从事卷烟产品开发研究。E-mail: gyin163@163.com

* 通信作者: 王明锋(1976—), 男, 白族, 硕士, 研究员, 主要从事卷烟调香产品开发研究。E-mail: hhwangmf@139.com

cigar tobacco leaves of Yunnan Province was prevalently identified as *Staphylococcus*, while other common genera included *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*, *Pantoea*, and so on. The distribution of microbial species in Dominican cigar samples was more uniform than that in domestic cigar samples, and the overall diversity of microbial species was higher than that of domestic cigar samples. The majority of their dominant bacteria genera were *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, and *Tetralogy*. The dominant bacteria genera of cigar leaves in Lincang City of Yunnan Province were similar to those in Dominican cigar samples, and its species diversity and uniformity were higher than those in other domestic regions in China, indicating great development potential.

Keywords: cigar tobacco leaves, 16S rRNA sequencing, diversity analysis, dominant bacteria

雪茄烟叶在全世界有着悠久的种植历史,不同地区的雪茄烟叶在风味特色上存在显著差异^[1]。香烟的烟叶是烤制的,而雪茄的烟叶是通过晾干获得的,这是雪茄具有独特的风味和香气特征的主要原因^[2-3]。雪茄烟叶从种植地采集后先晾干,再经过发酵处理,才能用于雪茄产品制作。发酵能有效抑制烟叶的刺激性气味,并促进烟叶中蛋白质、氨基酸、糖类等生物分子的转化、产生和积累特征性致香成分^[4-6]。原料叶片上的微生态构成对雪茄烟叶的发酵效果具有决定性作用,而不同气候条件对叶片表面微生态的分布有较大影响,因此不同产地的雪茄烟叶原料对发酵后的产品风味有极大影响。我国虽然烟叶产地分布广泛,但较国外优质雪茄产地的气候与土壤微生物差异较大,且我国雪茄烟叶的种植和发酵历史相对较短,国内优质雪茄烟原料匮乏,因此目前国产发酵雪茄产品尚无法达到成熟的优质商业雪茄的风味。因此对雪茄烟叶原料微生态进行分析有助于了解雪茄的后发酵过程,促进中式雪茄烟产业的持续发展和技术创新。

雪茄烟叶的发酵本质上是一个复杂的生物化学反应过程,包括微生物对烟叶成分的酶促反应和烟叶中化学物质的相互作用^[7-8]。雪茄烟叶的微生物群落及其活性对于提高烟草质量有重要的作用,对雪茄烟草中微生物群落变化的研究可阐明发酵过程中影响烟叶感官品质的机制。近些年国内外烟草微生物的研究主要集中在对烤制类烟叶的自然发酵过程的微生物群落研究^[9-10]。Giacomo 等人针对烤烟烟叶表面微生物的动态变化规律进行了研究,发现在发酵初期烟叶的优势菌为酵母菌,随着发酵时间的延长,烟叶的优势菌群逐渐转变为葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和乳酸杆菌属(*Lactobacillus*),且在发酵后期转变为芽孢杆菌属(*Bacillus*)和放线菌属

(*Actinomyces*)^[11]。目前大多数研究集中于雪茄烟草制造过程中的微生物群落,而对雪茄烟草发酵过程中微生物群落的研究则较少^[12]。

随着第二代基因组测序技术的发展,微生物群落分析的手段不断丰富。16S/18S/ITS 靶向基因测序、宏基因组测序和宏转录组测序分析技术已成为微生态研究中广泛应用的技术手段^[13-14]。细菌类微生物为烟草中的优势菌种,16S rDNA 基因存在于所有细菌的基因组中,包含 9 个高变区和 10 个保守区。16S rDNA 能够反应物种间的亲缘关系,针对该序列的鉴定是烟草中常用的细菌类微生物种属鉴定方法^[15]。因此,作者基于 16S rRNA 测序技术系统分析了云产雪茄烟叶和国外雪茄成品的微生物多样性和优势菌群,对比不同产地雪茄烟叶的微生物的差异,并进行微生物多样化分析。

1 材料与方法

1.1 烟叶原料

国内样品:收集了 30 份来自云南省不同地区如普洱、玉溪、德宏、临沧等地的 30 余份雪茄烟叶样品,品种有‘云雪 1’‘云雪 2’‘云雪 6’等,等级包括 FiB1、FiC1、BiS1、DYQT 等。

国外样品:收集了 20 份不同地区和品种的雪茄样品,有 Villa Gonzalez、Navarrete、Tamboril 等,品种包括‘CRIOLLO 98’‘PILOTO CUBANAO’‘SAN VICENTE’等,各样品基本信息汇总见表 1~2。

1.2 样品测序方法

1.2.1 采样及前处理 对国内外 50 份不同的烟叶样本采样,具体步骤为:每份烟叶样品随机抽取 3 片,每片取样 5 g,剪碎后放入灭菌的锥形瓶中,再加入 50 mL 的 0.1 mol/L 的无菌 PBS 缓冲液,于室

表 1 云南烟草材料信息表

Table 1 Information of tobacco materials from Yunnan

样品编号	产地	品种	等级或取样位置	晾晒天数/d
XP_YX6_FIB2	玉溪市新平县	云雪 6	FIB2	—
XP_YX6_FIC1	玉溪市新平县	云雪 6	FIC1	—
XP_YX6_M	玉溪市新平县	云雪 6	中部叶	—
CJ_YX36_FIC2	玉溪市澄江县	云雪 36	FIC2	—
JY_YX6_M	玉溪市元江县	云雪 6	中部叶	—
XP_T21	玉溪市新平县	云雪 39	—	21
XP_T29	玉溪市新平县	云雪 39	—	29
XP_T36	玉溪市新平县	云雪 39	—	36
XP-YX39-49d	玉溪市新平县	云雪 39	—	49
DH_YX1	德宏	云雪 1	—	—
DH_YX2	德宏	云雪 2	—	—
DH_YX2_BIL1	德宏	云雪 2	BiL1	—
LC_YX1_BIS1	临沧市	云雪 1	BiS1	—
LC_YX1_DYQT	临沧市	云雪 1	DYQT	—
LC_YX1_WRMS1	临沧市	云雪 1	WRMS1	—
LC_Y1_WRMX	临沧市	云雪 1	WRMX	—
LC_YX2_BIM1	临沧市	云雪 2	BiM1	—
LC_YX2_WRM1	临沧市	云雪 2	WRM1	—
LC_YX6_FIB1	临沧市	云雪 6	FIB1	—
LC_YX6_FIC1	临沧市	云雪 6	FIC1	—
PE_YX1	普洱市	云雪 1	—	—
PE_YX6	普洱市	云雪 6	—	—
PE_YX1_BIL1	普洱市	云雪 1	BiL1	—
PE_YX2_BIL	普洱市	云雪 2	BiL	—
NE-YX39-Z1	普洱市宁洱县	云雪 39	—	—
NE-YX39-S1	普洱市宁洱县	云雪 39	—	—
NE-YX1-Z2	普洱市宁洱县	云雪 1	—	—
LJ_T	保山市潞江镇	云雪 39	—	—
LJ_39MX	保山市潞江镇	云雪 39	—	—
LJ_TX	保山市潞江镇	云雪 1	—	—

注：—表示此参数未知。

温下以 200 r/min 振摇 30 min；用灭菌的单层纱布过滤振摇后的悬液，收集滤液；将滤液于 10 000 g 离心 30 min,离心后倒掉上清液并收集沉淀,沉淀即为烟叶表面微生物。

1.2.2 测序实验流程

1)DNA 提取及质检 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN),按说明书步骤提取 1.2.1 中得到的沉淀中的总 DNA。提取完成后对其进行检测，使用 NanoDrop2000 超微量分光光度计检测 DNA 纯度和浓度，对于纯度和浓度达标的样品,用

1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性^[16]。

2)PCR 扩增 选用 V3 和 V4 区通用引物 338F 和 806R 进行 PCR 扩增。PCR 反应试剂均购于上海生工生物工程股份有限公司，引物序列、PCR 扩增体系和程序参考 Zeng 和 Kamira 等人的方法并做适当优化^[17-18]。扩增体系为 (20 μL):5×FastPfu 缓冲液 4.0 μL,2.5 mmol/L 的 dNTPs 2.0 μL,5 μmol/L 的正向引物 0.8 μL,5 μmol/L 的反向引物 0.8 μL, FastPfu 高保真 DNA 聚合酶 0.4 μL,0.8 mg/mL 的牛血清白蛋白 0.2 μL,DNA 模板 10 ng，补加灭菌

表 2 国外雪茄成品材料信息表
Table 2 Information of cigar material abroad

样品编号	产地	品种	取样位置	发酵时间/月
C98-S	Villa Gonzalez	CRIOLLO 98	中部	3
C98-V			底部	6
C98-L			顶部	6
PC-S	Navarrete	PILOTO CUBANAO	中部	3
PC-V			底部	4
PC-L			顶部	7
SV-S	Tamboril	SAN VICENTE	中部	3
SV-V			底部	3
SV-L			顶部	4
C99-S	Villa Gonzalez	COROJO 99	中部	3
C99-V			底部	3
C99-L			顶部	4
OD-S	Mao	OLOR DOMINICANO	中部	4
OD-V			底部	5
OD-L			顶部	5
NT-S	JALAPA	NIC. JALAPA	中部	6
NT-V			底部	5
NT-L			顶部	7
H2-S	Potrero	HABANO 2020	中部	3
H2-V			底部	4

ddH₂O 至 20 μL。PCR 扩增程序为:95 ℃预变性 3 min;95 ℃变性 30 s,53 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,循环 30 次;最后 72 ℃延伸 10 min。用 2 g/dL 琼脂糖凝胶电泳验证扩增产物的目的条带相对分子质量,对符合要求的产物用 DNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN)对目的片段切胶回收。

3)文库构建 根据琼脂糖凝胶电泳检测结果,对切胶回收的扩增产物进行片段化处理和末端修复,通过 PCR 富集目的片段以达到上机浓度。采用 Promega 公司 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统对上述 PCR 产物定量检测,根据定量结果和样本测序量要求混合相应摩尔量的文库,以稳定产出各样本数据量^[19-20],最后进行 Illumina Miseq 测序。

1.3 数据分析方法

数据在美吉生物云平台 (www.majorbio.com)处理分析。主要进行 OTU (operational taxonomic units) 聚类分析和物种分类学分析。基于 OTU 聚类分析的结果,可以在 OUT 水平上进行多样性指数分析;基于物种分类学信息,可以在不同分类水平上进行群

落结构分析。基于上述结果,对参与分析的样本的群落组成信息进行统计学分析。

1.3.1 OTU 聚类分析 为了获得雪茄烟叶表面的菌种组成、数目等信息,必须对样本测序结果中序列进行归类操作。OTU 聚类分析是将基因序列按照约 97%的相似性归类为多个分类单元,一个单元对应为一个 OTU,然后根据 OTU 聚类结果进行生物信息统计分析^[21]。

1.3.2 丰度等级曲线分析 丰度等级曲线可以用来分析雪茄烟叶表面微生物的多样性,其构建方法是计算各测序样本中每个 OTU 对应的基因序列数目。将每个 OTU 所含有的序列数从大到小进行等级排序,再以等级为横坐标、OTU 序列数相对丰度为纵坐标作图^[22]。丰度等级曲线主要反映微生物的物种丰富度和群落均匀度,物种丰富度由水平方向反映,曲线在水平方向上的跨度越大表明物种丰富度越高;群落均匀度则由曲线沿横轴下降的平缓程度来反映,曲线变化越平缓则微生物群落均匀度越高,反之曲线急剧下降表明样本的微生物多样性较低,优势菌群明显^[23]。

1.3.3 Alpha 多样性分析 Alpha 多样性分析可以通过 Chao1、ACE、Shannon、Simpson、Coverage 等多个统计学分析指数反映微生物群落的多样性和丰富度。不同的分析指数对衡量微生物群落多样性的侧重点有所不同,其中 Chao1 指数和 ACE 指数主要体现样本群落的丰富度,而 Shannon 指数和 Simpson 指数则在前两者的基础上兼顾体现群落的均匀度, Coverage 指数则可以反映群落覆盖度。作者选择 Simpson 指数对个样品进行多样性分析, 值越大说明群落多样性越低^[24]。

1.3.4 物种组成分析 不同样本在各分类水平上(界、门、纲、目、科、属、种等)的物种组成情况可以由分类学分析结果获得,由此可以构建群落柱形图。群落柱形图可以直观显示出每个样本在某个分类水平上所含的优势物种情况,以及样本中含有相应水平的各物种所占的比例,即相对丰度^[25]。

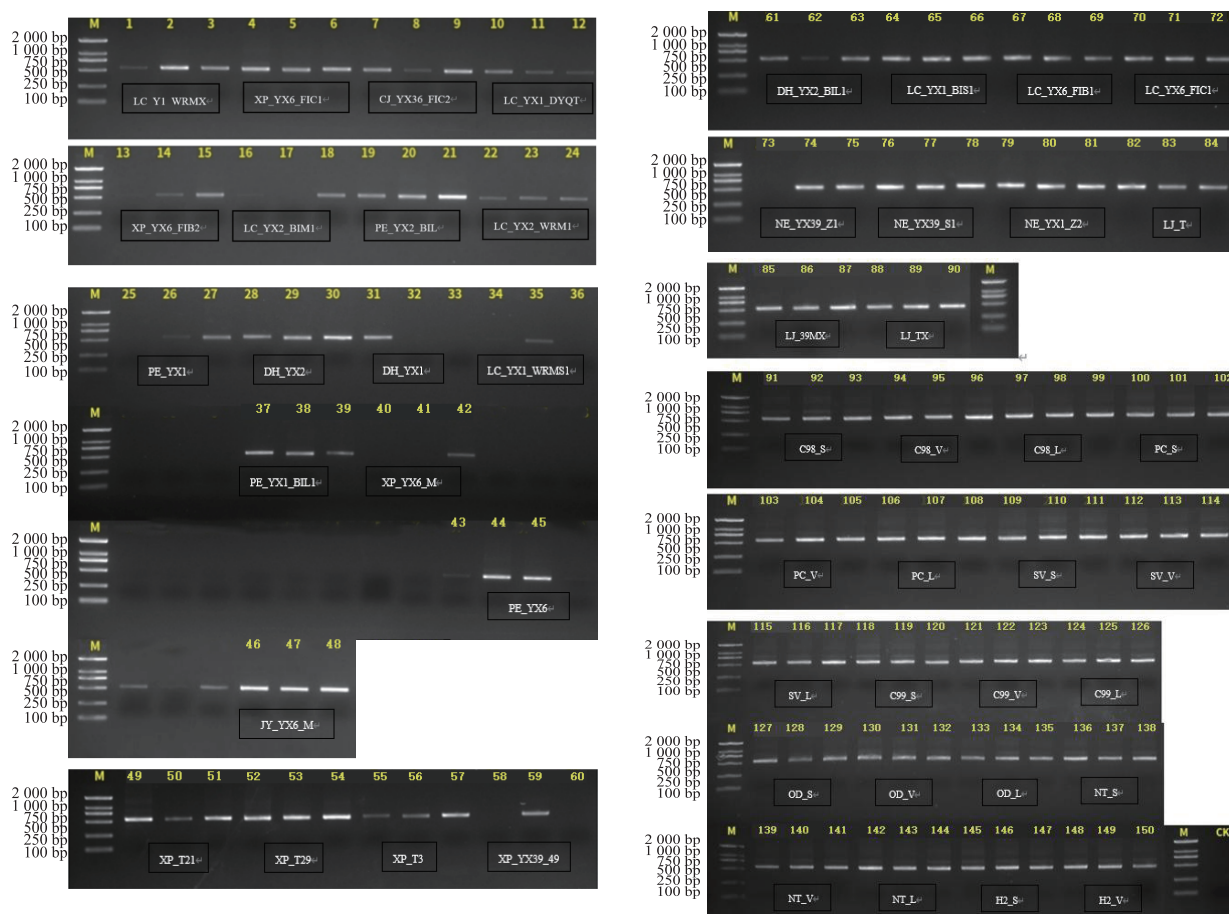
2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

选择 V3 和 V4 区通用引物 338F-806R 对烟叶中提取的 DNA 进行 16S rRNA 基因扩增,2 g/dL 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。大多数样本的目的条带相对分子质量大小正确,浓度合适,可用于进行后续实验,有少量目的条带太弱或未检测到,需重新取样提取 DNA 并扩增,直至有清晰的目的条带,最终 50 组烟叶样品(每份 3 个平行,共 150 个)的合格扩增产物用于后续的测序分析。

2.2 丰度等级曲线分析

国内外 50 个烟叶样本丰度等级曲线见图 2。当相对丰度大于 1%时,曲线均呈现骤降趋势,说明样品在整体上优势菌群比例很高且微生物多样性较低。由图 2(a)、(b)、(c)可知,临沧市的烟叶物种丰



M:DL2000 marker;1~150:样品。

图 1 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶验证结果

Fig. 1 Agarose gel verification results of PCR amplification product

富度高于其他地区,玉溪市新平县和德宏的烟叶物种丰富度较低,优势菌明显;图2(d)中多米尼加雪茄样品下降趋势较中国烟叶样本更平缓,说明其物种分布更为均匀一些。相比于国内雪茄烟叶,多米

尼加的雪茄烟叶的丰度等级曲线变化趋势相似度较高,这表明多米尼加不同地区的雪茄烟叶以及同一地区不同部位采样的烟叶的微生物丰度及均匀度相似。

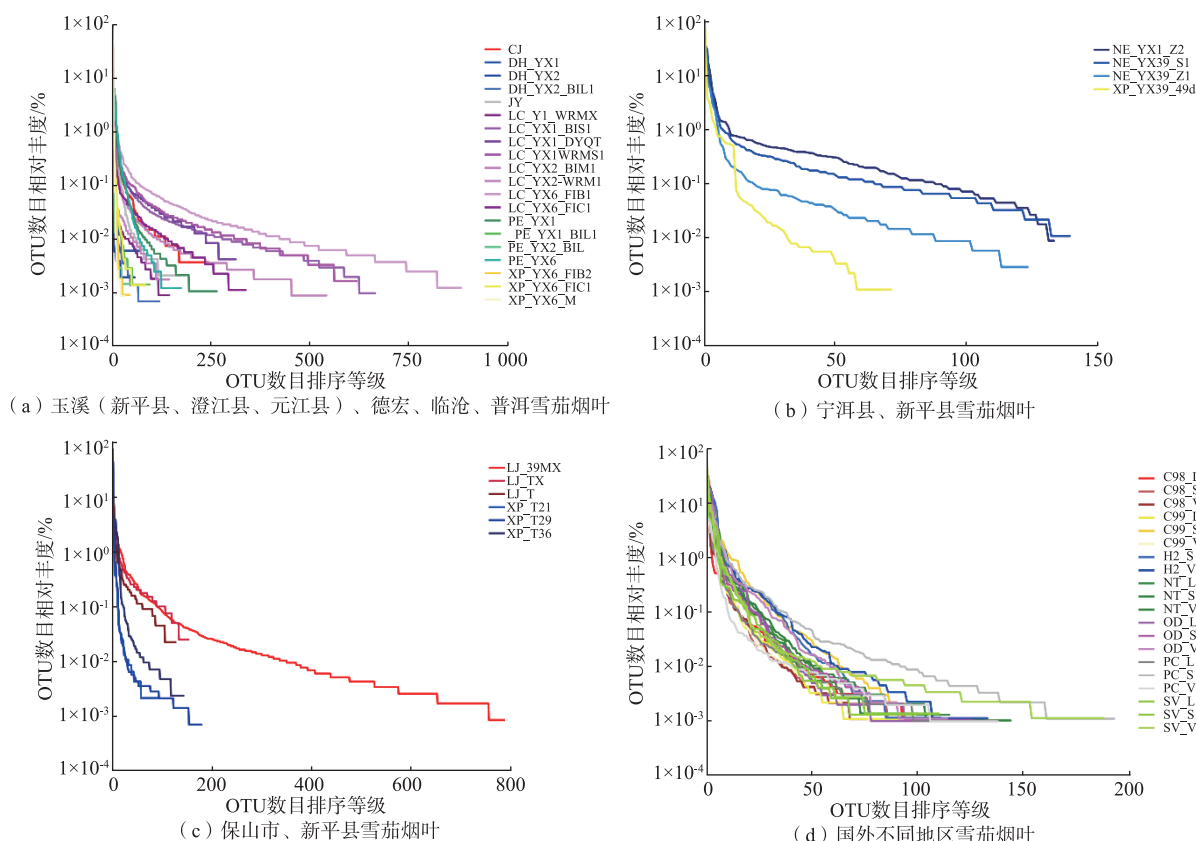


图2 国内外50个烟叶样本丰度等级曲线图

Fig. 2 Rank-Abundance curves of 50 tobacco leaf samples at home and abroad

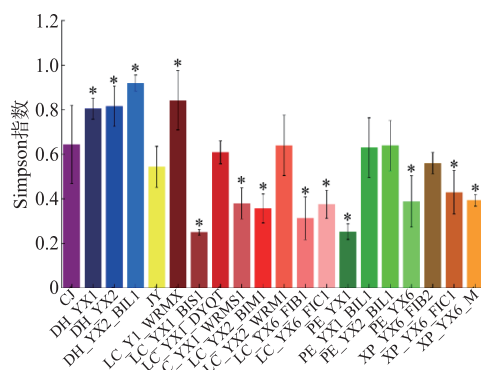
2.3 Alpha 多样性分析

相较于丰度等级曲线,Alpha多样性分析可以更细化地对比各样本基于OTU的微生物群落丰度和多样性^[26]。作者基于Simpson指数对50个国内外雪茄样品进行了Alpha多样性分析,见图3。有较多样本组内偏差较大,但从总体样本的组间差异来看,仍选择信任单因素方差检验的结果,即各样本的群落丰度存在显著性差异($P<0.05$)。图3(a)德宏市雪茄烟叶的Simpson指数最大,临沧市则普遍较低,这表明前者微生物多样性较低,后者微生物结构更丰富,均匀度较高,这与丰度等级曲线的结果一致;图3(b)、(c)新平县、宁洱县的烟叶微生物多样性与丰度等级曲线并不吻合,这说明仅用Simpson指数与丰度等级曲线不能完全表征雪茄烟叶微生物菌群的多样性^[27];图3(d)中不同地区多米

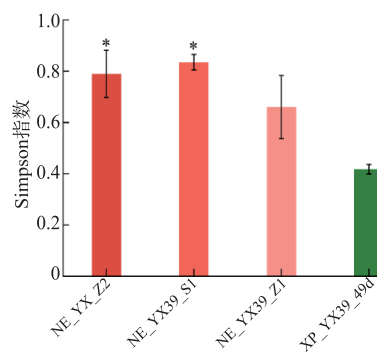
尼加烟叶的Simpson指数均值为 0.344 ± 0.166 ,中国雪茄烟叶的Simpson指数均值为 0.549 ± 0.224 ,这表明多米尼加雪茄烟叶表面的微生物多样性整体上高于中国雪茄烟叶。在图3(d)中,对于Villa Gonzalez的C98、C99品种雪茄和Navarrete的PC品种雪茄,其中部烟叶的Simpson指数显著高于底部和顶部烟叶,即中部烟叶的微生物多样性显著较高,这或许与雪茄中部烟叶会影响雪茄的柔和风味有关。

2.4 物种组成分析

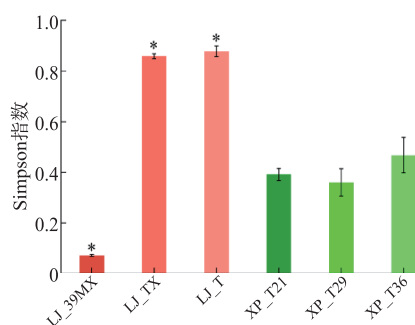
烟叶表面含有多种微生物,在以往的研究中,芽孢杆菌(*Bacillus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、肠杆菌(*Enterobacter*)、鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*)、泛菌(*Pantoea*)和甲基杆菌(*Methylobacterium*)是烟草叶片中的优势菌属^[28]。这些细菌在烟叶发酵过程中



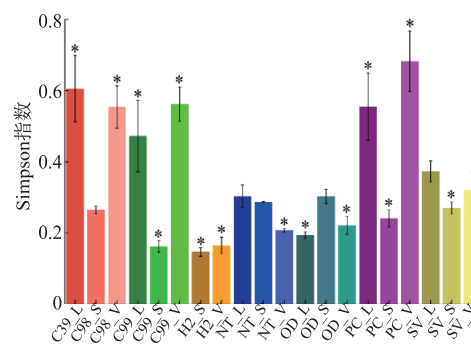
(a) 玉溪 (新平县、澄江县、元江县)、德宏、临沧、普洱雪茄烟叶



(b) 宁洱县、新平县雪茄烟叶



(c) 保山市、新平县雪茄烟叶



(d) 国外不同地区雪茄烟叶

* 表示该样本 Simpson 指数与总体指数均值存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 3 国内外 50 个样本基于 Simpson 指数的 Alpha 多样性指数图

Fig. 3 Alpha diversity graph of 50 samples at home and abroad based on Simpson index

能降解大分子有机物或者促进生物大分子的转化,产生致香物质^[29-30],如假单胞菌属可以有效降解烟叶中的尼古丁^[31];芽孢杆菌属可通过分解胡萝卜素等大分子物质产生小分子的芳香风味物质^[32]。16S rRNA 分析可以在属水平上分析各样本的优势物种及各物种的相对丰度^[33-34],群落柱形图可以直观反映这些特征,图 4~9 为不同产地的属水平群落柱形图,数据均去除叶绿体和线粒体的丰度,其中其他主要为未分类的细菌,大多为不可培养微生物。

从图 4 可以看出,玉溪市新平县‘云雪 6’(XP_YX6_FIB2、XP_YX6_FIC1、XP_YX6_M)优势菌属主要为葡萄球菌属和棒状杆菌属,尤其是葡萄球菌属,占比超过 50%,与前面 OTU 的分析结果相同,其在属水平多样性较低;新平县‘云雪 39’(XP_T21、XP_T29、XP_T36、XP-YX39-49d)的优势菌属主要为假单胞菌属,也有一定比例的泛菌属、鞘氨醇单胞菌属和甲基杆菌属,对于这一组样本,XP_T21、XP_T29 分别为烟叶晾晒 21 d 和 29 d,XP_T36、XP-YX39-49d 分别为晾晒 36 d 和 49 d,

因此由柱状图可知不同晾晒时间的样本菌属的差异。澄江县‘云雪 36’(CJ_YX36_FIC2)优势菌属为葡萄球菌属;元江县‘云雪 6’(JY_YX6_M)优势菌属为泛菌属、葡萄球菌属和假单胞菌属,丰富度和多样性均较低。

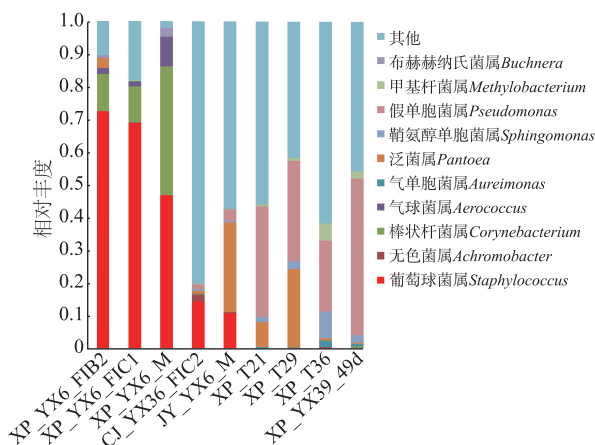


图 4 玉溪市烟叶样本菌属柱形图

Fig. 4 Column diagram of bacteria in tobacco samples from Yuxi

从图 5 可以看出,德宏雪茄烟叶的 3 个样本的优势菌属均为葡萄球菌属,而且样本多样性都很低,这与Alpha 多样性分析结果一致。

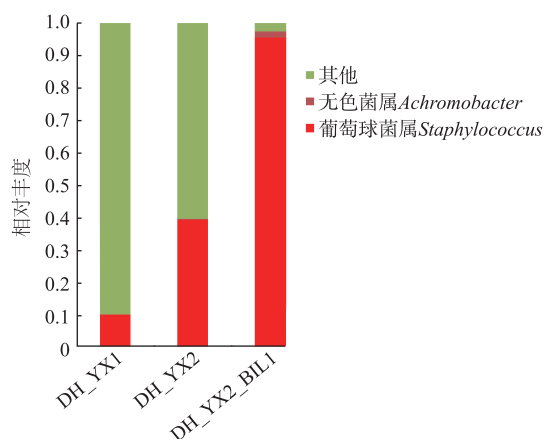


图 5 德宏市烟叶样本菌属柱形图

Fig. 5 Column diagram of bacteria in tobacco samples from Dehong

从图 6 可以看出,临沧市 3 个云雪品种的烟叶菌属的丰富度和多样性均相对较高,涉及 12 种菌属,优势菌属主要为葡萄球菌属和无色杆菌属,但其中‘云雪 2’的 BIM1 等级(LC_YX2_BIM1)最优势菌属为气球菌属,‘云雪 6’(LC_YX6_FIB1、LC_YX6_FIC1)的优势菌属为假单胞菌属。

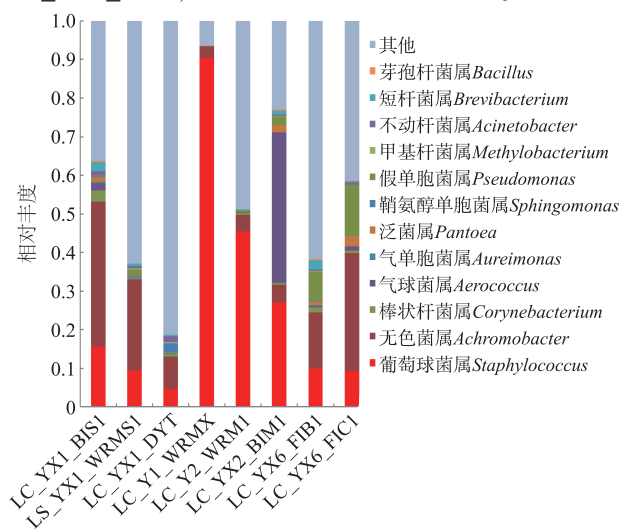


图 6 临沧市烟叶样本菌属柱形图

Fig. 6 Column diagram of bacteria in tobacco samples from Lincang

从图 7 可以看出,普洱市的 7 个样本差异较大,其中‘云雪 1’和‘云雪 6’(PE_YX1、PE_YX6)丰富度和多样性相对较高。PE_YX1 的优势菌属有葡

萄球菌属、鞘氨醇单胞菌属、无色杆菌属、假单胞菌属、甲基杆菌属;PE_YX6 的优势菌属有气单胞菌属、鞘氨醇单胞菌属、葡萄球菌属。而‘云雪 1’BIL1 等级和‘云雪 2’BIL 等级的烟叶优势菌都只有葡萄球菌属。来自宁洱县的 3 个样本丰富度和多样性低,只有少量的无色杆菌属和假单胞菌属。

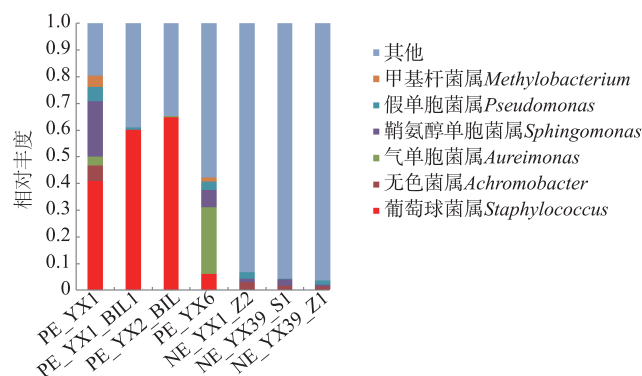


图 7 普洱市烟叶样本菌属柱形图

Fig. 7 Column diagram of bacteria in tobacco samples from Pu'er

在保山市潞江镇的 3 个样本中,‘云雪 39’中部茄芯(LJ_39MX)的菌属多样性极高,丰富度较高,与图 2(c)中的丰度等级曲线以及它的 Simpson 指数相对应,其优势菌属有布赫纳氏菌属、乳酸菌属、链霉菌属、红球菌属、短波单胞菌属,相对其他地区的优势菌属种类,该种烟叶菌属较为罕见,见图 8。而另外两种(LJ_T、LJ_TX)则丰富度和多样性很低,仅有少量无色杆菌属。

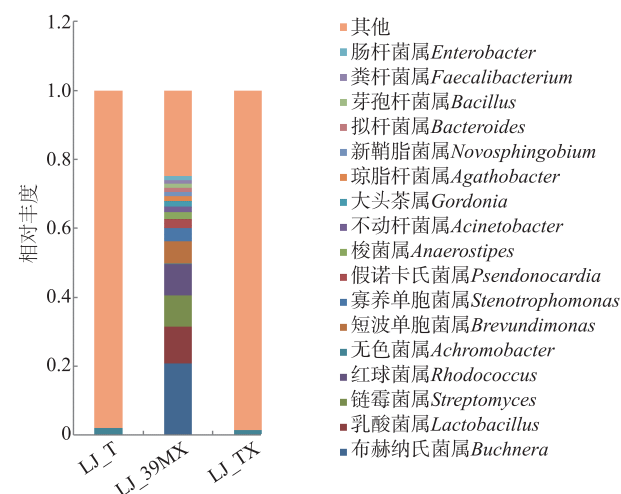


图 8 保山市烟叶样本菌属柱形图

Fig. 8 Column diagram of bacteria in tobacco samples from Baoshan

从图9可以看出,国外20个雪茄样本的微生物多样性和菌种组成均相似,而且未分类的细菌比中国雪茄少,其优势菌属较为统一,多为葡萄球菌属、棒状杆菌属、四联球菌属。不同优势菌属的丰富度在每个样本中都有差别,如来自Potrero的‘HABANO 2020’(H2-S、H2-V)中丰度最高的菌属为棒状杆菌属而不是葡萄球菌属。同一地区不同采样位置的样本菌属分布差别较大,如Villa Gonzalez产地的‘CRIOLLO 98’雪茄中部位置烟叶(C98-S)的优势菌属为四联球菌属,区别于另两种位置的样本;Navarrete产地的‘PILOTO CUBANAO’雪茄中部位置烟叶(PC-S)则在多样性上高于另外两个位置的样本,这与部分多米尼加雪茄样品中部烟叶的微生物多样性显著一致。

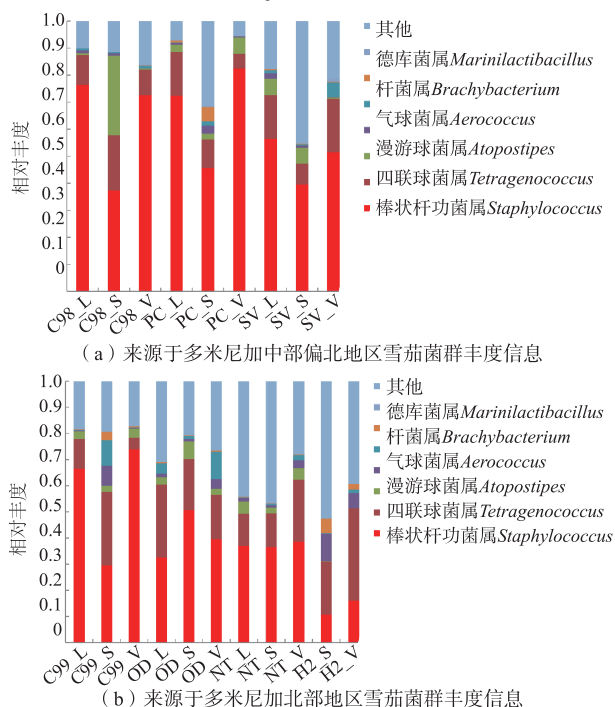


图9 国外雪茄样本菌属柱形图

Fig. 9 Column diagram of bacteria in cigar samples abroad

参考文献:

- [1] 李秀妮, 闫铁军, 吴风光, 等. 全球主要产地雪茄烟叶的风味特征初探[J]. 中国烟草学报, 2019, 25(6): 126-132.
LI X N, YAN T J, WU F G, et al. Preliminary study on flavor characteristics of global typical cigar leaves[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2019, 25(6): 126-132. (in Chinese)
- [2] YAO L, HUANG C Y, DING J Y, et al. Application of yeast in plant-derived aroma formation from cigar filler leaves[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 1093755.
- [3] ZHENG T F, ZHANG Q Y, LI P H, et al. Analysis of microbial community, volatile flavor compounds, and flavor of cigar tobacco leaves from different regions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 907270.

3 结语

研究的国内外50个雪茄样品在整体上优势菌群比例较高且微生物多样性较低。临沧市的烟叶物种丰富度高于其他地区,微生物结构更丰富,均匀度较高;玉溪市新平县和德宏州的烟叶物种丰富度较低,优势菌明显,葡萄球菌属占比较大。多米尼加雪茄样品微生物物种分布比国内雪茄样品更均匀,微生物的多样性整体高于国内雪茄样品。不同地区的多米尼加雪茄烟叶的微生物丰度及均匀度相似,部分地区雪茄中间部位烟叶的微生物多样性显著高于其顶部和底部烟叶。雪茄烟叶的微生物多样性不仅存在地区间的差异,还与雪茄品种、等级、晾晒时间、采样位置等因素有关^[35-36]。此外,还验证了结合丰度等级曲线、Simpson指数和群落柱状图可以完整地表征雪茄烟叶微生物菌群的多样性。

通过分析各个雪茄样品的优势微生物可知,除少数保山市和宁洱县的雪茄样品,云南省玉溪市、临沧市、普洱市、德宏州的雪茄样品的优势菌属大多为葡萄球菌属,除此之外,国内雪茄烟叶中的常见菌属还有假单胞菌属、无色杆菌属、棒状杆菌属、泛菌属等;在多米尼加的各优质雪茄样品中,菌种组成非常相似,其优势菌属多为葡萄球菌属、棒状杆菌属、四联球菌属。对比国内外雪茄烟叶,保山市雪茄烟叶比较特殊,3个云雪品种雪茄的优势菌属完全不同于其他地区;临沧市云雪品种雪茄烟叶的优势菌属与多米尼加雪茄最为相似,都含有葡萄球菌属和棒状杆菌属,而且此类烟叶中微生物物种多样性和均匀度较高,因此本研究中临沧市云雪雪茄的品质最接近多米尼加雪茄,具有很大的发展潜力。

- [4] ZHAO L,ZHU C J,GAO Y,et al. Nicotine degradation enhancement by *Pseudomonas stutzeri* ZCJ during aging process of tobacco leaves[J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**,2012,28(5):2077-2086.
- [5] HUANG J W,YANG J K,DUAN Y Q,et al. Bacterial diversities on unaged and aging flue-cured tobacco leaves estimated by 16S rRNA sequence analysis[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2010,88(2):553-562.
- [6] 龚俊. 烤后片烟储存过程中微生物多样性及变化动态[D]. 上海:华东师范大学,2015.
- [7] ZHAO M Q,WANG B X,LI F X,et al. Analysis of bacterial communities on aging flue-cured tobacco leaves by 16S rDNA PCR-DGGE technology[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2007,73(6):1435-1440.
- [8] 于建军,李琳,庞天河,等. 烟叶发酵研究进展[J]. 河南农业大学学报,2006,40(1):108-112.
YU J J,LI L,PANG T H,et al. Research advancement of tobacco fermentation[J]. **Journal of Henan Agricultural University**,2006,40(1):108-112. (in Chinese)
- [9] MALDONADO-ROBLEDO G,RODRIGUEZ-BUSTAMANTE E,SANCHEZ-CONTRERAS A,et al. Production of tobacco aroma from lutein, specific role of the microorganisms involved in the process[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2003,62(5/6):484-488.
- [10] ZHOU J X,YU L F,ZHANG J,et al. Characterization of the core microbiome in tobacco leaves during aging [J]. **Microbiology Open**,2020,9(3):e984.
- [11] GIACOMO M D,PAOLINO M,SILVESTRO D,et al. Microbial community structure and dynamics of dark fire-cured tobacco fermentation[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2007,73(3):825-837.
- [12] LIU F,WU Z Y,ZHANG X P,et al. Microbial community and metabolic function analysis of cigar tobacco leaves during fermentation[J]. **Microbiology Open**,2021,10(2):e1171.
- [13] 黄志强,邱景璇,李杰,等. 基于16S rRNA基因测序分析微生物群落多样性[J]. 微生物学报,2021,61(5):1044-1063.
HUANG Z Q,QU J X,LI J,et al. Exploration of microbial diversity based on 16S rRNA gene sequence analysis[J]. **Acta Microbiologica Sinica**,2021,61(5):1044-1063. (in Chinese)
- [14] ERICSSON A C,BUSI S B,AMOS-LANDGRAF J M. Characterization of the rat gut microbiota via 16S rRNA amplicon library sequencing[J]. **Methods in Molecular Biology**,2019,2018:195-212.
- [15] TYX R E,STANFILL S B,KEONG L M,et al. Characterization of bacterial communities in selected smokeless tobacco products using 16S rDNA analysis[J]. **PLoS One**,2016,11(1):e0146939.
- [16] 杜贞娜,单之初,沈赤,等. 传统绍兴黄酒酿造真菌群落与多样性发生机制[J]. 应用生态学报,2022,33(4):1118-1124.
DU Z N,SHAN Z C,SHEN C,et al. Community structure and diversity formation of fermentation fungi in traditional Shaoxing Huangjiu[J]. **Chinese Journal of Applied Ecology**,2022,33(4):1118-1124. (in Chinese)
- [17] ZENG Q C,AN S S. Identifying the biogeographic patterns of rare and abundant bacterial communities using different primer sets on the Loess Plateau[J]. **Microorganisms**,2021,9(1):139-146.
- [18] KAMIRA B. 浮床种植薄荷和组合填料(醛化丝)对水产养殖系统浮游细菌群落的影响研究[D]. 南京:南京农业大学,2019.
- [19] 何苑皋,周国英,王圣洁,等. 杉木人工林土壤真菌遗传多样性[J]. 生态学报,2014,34(10):2725-2736.
HE Y H,ZHOU G Y,WANG S J,et al. Fungal diversity in *Cunninghamia lanceolata* plantation soil[J]. **Acta Ecologica Sinica**,2014,34(10):2725-2736. (in Chinese)
- [20] LOMAN N J,MISRA R V,DALLMAN T J,et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms[J]. **Nature Biotechnology**,2012,30(5):434-439.
- [21] CARON D A,COUNTWAY P D,SAVAI P,et al. Defining DNA-based operational taxonomic units for microbial-eukaryote ecology[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2009,75(18):5797-5808.
- [22] 谢芳,谢华德,唐振华,等. 基于16S rDNA高通量测序分析水牛初乳与常乳中细菌多样性[J]. 食品工业科技,2021,42(13):125-132.
XIE F,XIE H D,TANG Z H,et al. Analysis of bacterial diversity in colostrum and normal milk of buffalo based on 16S rDNA high-throughput sequencing[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2021,42(13):125-132. (in Chinese)
- [23] 梁剑锋,李亚,王华,等. 基于高通量测序的两种香型六堡茶微生物多样性及其特征分析[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(24):9565-9573.
LIANG J F,LI Y,WANG H,et al. Analysis of microbial diversity and characteristics of 2 aroma types of Liubao tea based on

- high throughput sequencing[J]. **Journal of Food Safety & Quality**, 2021, 12(24):9565-9573. (in Chinese)
- [24] 苟萌, 胡婕, 张彤彤, 等. 基于 Illumina MiSeq 和 IonS5 XL 测序对原料乳中微生物多样性的比较分析[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(4):67-75.
- GOU M, HU J, ZHANG T T, et al. Comparative analysis of microbial community in raw milk by illumina MiSeq sequencing and IonS5 XL sequencing[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2021, 40(4):67-75. (in Chinese)
- [25] 张媛媛. 复方丹参滴丸对 NAFLD 小鼠肝脂肪变性和肠道菌群的影响[D]. 郑州: 郑州大学, 2020:21-23.
- [26] 车丽娜, 赵良忠, 周晓洁. 基于高通量测序的湘派卤牛肉细菌多样性分析[J]. 食品与机械, 2023, 39(2): 113-119.
- CHE L N, ZHAO L Z, ZHOU X J. Bacterial diversity analysis of Xiangpai brined beef based on high-throughput sequencing[J]. **Food & Machinery**, 2023,39(2):113-119.(in Chinese)
- [27] 范恩帝, 吴成, 李岭卓, 等. 酱香大曲微生物数量和细菌多样性在不同制曲条件下的差异[J]. 现代食品科技, 2023, 39(5): 62-71.
- FAN E D, WU C, LI L Z, et al. Differences in microbial count and bacterial diversity in Jiangxiang Daqu under various koji-making conditions[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2023, 39(5): 62-71.(in Chinese)
- [28] LIU T, GUO S, WU C, et al. Phyllosphere microbial community of cigar tobacco and its corresponding metabolites[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2022, 13: 1025881.
- [29] DI H, WANG R, REN X, et al. Co-composting of fresh tobacco leaves and soil: an exploration on the utilization of fresh tobacco waste in farmland[J]. **Environmental Science and Pollution Research International**, 2022, 29 (6): 8191-8204.
- [30] 石浩, 王仁才, 王芳芳, 等. 软腐猕猴桃果实真菌类病原菌的生物多样性分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(4): 126-137.
- SHI H, WANG R, WANG F, et al. Biodiversity analysis of fungal pathogens from soft-rotting kiwifruit[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2020, 36(4): 126-137.(in Chinese)
- [31] HUANG S, LIU D, CHEN M, et al. Effects of *Bacillus subtilis* subsp. on the microbial community and aroma components of flue-cured tobacco leaves based on metagenome analysis[J]. **Archives of Microbiology**, 2022, 204 (12): 726.
- [32] 李若铭. 烟草微生物应用于烟叶发酵的研究进展[J]. 科技创新导报, 2010,35(12):4.
- LI R M. The microbial fermentation applied research progress of tobacco[J]. **Science and Technology Innovation Herald**, 2010, 35(12):4.(in Chinese)
- [33] 于美娟, 杨慧, 黄绿红, 等. 传统鲐鱼固态发酵过程中细菌群落与挥发性风味物质的相关性[J]. 食品与机械, 2023, 39(3): 1-10.
- YU M J, YANG H, HUANG L H, et al. The potential correlation between bacterial community and the characteristic volatile flavour of traditional fermented fish during solid fermentation[J]. **Food & Machinery**, 2023,39(3):1-10.(in Chinese)
- [34] 白雪松, 刘鹤, 宋岩, 等. 基于 16S rRNA 技术分析当归超微粉对小鼠肠道菌群多样性的影响[J]. 现代食品科技, 2021, 37(4): 25-32.
- BAI X S, LIU H, SONG Y, et al. Analysis of the effects of angelica sinensis ultrafine powder on the diversity of intestinal flora in mice based on 16S rRNA technology[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2021, 37(4): 25-32.(in Chinese)
- [35] 王艳丽, 张会敏, 孟雅静, 等. 基于 16S rDNA V4 与 V3-V4 可变区高通量测序对浓香型白酒窖泥菌群组成的比较分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(6): 147-154.
- WANG Y L, ZHANG H M, MENG Y J, et al. Comparative analysis of strong-flavor Baijiu pit-mud microbial community using high-throughput sequencing based on 16S rDNA V4 and V3-V4 variable regions[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2020, 36(6): 147-154.(in Chinese)
- [36] 程传玲, 杨硕, 王建民, 等. 白肋烟烘焙工艺温度参数拟合优化及验证[J]. 食品与机械, 2021, 37(11): 183-187.
- CHENG C L, YANG S, WANG J M, et al. Optimization and validation of temperature parameters of burley tobacco baking process[J]. **Food & Machinery**, 2021, 37(11): 183-187.(in Chinese)