

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.03.026

基于高通量测序对四川怀远特色发酵食品 微生物群落结构分析

刘筱雪, 袁文娟, 丁涛, 熊粟粟, 张杰, 白林含
(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 为了研究四川怀远特色传统发酵食品的微生物多样性, 利用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序平台, 对当地豆腐帘子和冻糕的微生物群落结构进行了系统分析。结果表明, 豆腐帘子的菌群主要隶属于变形菌门(Proteobacteria)和担子菌门(Basidiomycota), 检测出 40 个细菌属和 21 个真菌属, 主要优势微生物是 *Acinetobacter* 和 *Trichosporon*。冻糕的菌群主要隶属于厚壁菌门(Firmicutes)和子囊菌门(Ascomycota), 检测出 36 个细菌属和 23 个真菌属, 主要优势微生物是 *Lactobacillus* 和 *Kazachstania*。

关键词: 高通量测序; 传统发酵食品; 微生物群落结构; 多样性

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2019)03-0537-07

Analysis of microbial community structure of HuaiYuan, Sichuan special fermented food based on high-throughput sequencing technology

LIU Xiao-Xue, YUAN Wen-Juan, DING Tao, XIONG Su-Li, ZHANG Jie, BAI Lin-Han
(Key Laboratory of Biological Resource and Ecological Environment of Chinese Education Ministry,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In order to study the microbial diversity of special traditional fermented food in HuaiYuan, Sichuan, Illumina HiSeq 2500 high-throughput sequencing platform was used to systematically analyze the microbial community structure of local tofu curtain and rice cake. The results showed that the microflora of tofu curtain was mainly affiliated to Proteobacteria and Basidiomycota, in which 40 bacterial genera and 21 fungal genera were detected, and the dominant microorganisms were *Acinetobacter* and *Trichosporon*. The microflora of rice cake was mainly affiliated to Firmicutes and Ascomycota, in which 36 bacterial genera and 23 fungal genera were detected, and the dominant microorganisms were *Lactobacillus* and *Kazachstania*.

Keywords: High-throughput sequencing technology; Traditional fermented food; Microbial community structure; Diversity

1 引言

发酵食品是经过微生物相互作用得到的具有

独特的风味及较高的营养保健功能的食品, 不仅深受广大人民群众喜爱, 还在当今食品工业生产中占有重要地位, 有着巨大的潜在市场。国外已实现

收稿日期: 2018-04-24

基金项目: 国家国际科技合作专项(2015DFR31060)

作者简介: 刘筱雪(1993-), 女, 四川宜宾人, 硕士研究生, 专业方向为微生物生物技术。E-mail: liuzhuyouxue@163.com.

通讯作者: 白林含。E-mail: bailinhan@scu.edu.cn.

直投式菌种发酵的现代化生产工艺,不仅可以保证食品生产过程中的安全管理,而且发酵产品质量稳定,生产效率高。

我国发酵食品虽然种类繁多,但加工企业大多是小企业或者民间作坊,且主要采用开放式自然发酵过程.其微生物体系比较复杂,没有进行系统的研究对微生物的特性就不了解,难以设定工艺参数和制定工艺流程.发酵机理不明确,对实现工业化大生产就缺乏有力的科学依据.此外,不同地区的微生物体系差异巨大,限制了其现代化发展.张其圣及其研究团队通过对泡菜中优势微生物的系统分析实现了泡菜的“稳态发酵”,说明通过现代微生物生物技术可以改进传统发酵技术^[1].目前,我国对泡菜、酱油、豆腐乳等常见传统发酵食品微生物群落结构的研究较多,但对特色发酵食品的研究还较少^[2].

由于四川怀远的传统发酵食品极具地域特色,本文基于 Illumina HiSeq 2500 高通量测序平台,对四川怀远豆腐帘子和冻糕的微生物群落结构进行系统分析,旨在揭示当地特色发酵食品的微生物体系特点,为传统发酵食品微生物多样性的研究提供理论基础。

2 材料与方法

2.1 材料

样品采自四川省崇州市怀远镇,豆腐帘子为发酵成品,米糕为发酵米浆,所有样品随机取三份,装入无菌器皿,立即进行后续实验。

2.2 方法

2.2.1 样品 DNA 提取及 PCR 扩增 用 OMEGA Stool DNA Kit 进行样品总基因组 DNA 提取.细菌以 16S rDNA 的 V3-V4 区为目标 DNA 序列,用通用引物 338F/806R 进行扩增.真菌以 18S rDNA 与 5.8S rDNA 之间的内源转录间隔 ITS1 区为目标 DNA 序列,用通用引物 ITS1/ITS2 进行扩增.PCR 扩增结束后,用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行产物验证。

2.2.2 高通量建库测序 将上述 PCR 扩增产物送至北京百迈克生物科技有限公司,进行产物纯化和均一化,利用双末端测序(Paired-End)的方法,构建成小片段测序文库,建好的文库先进行文库质检,质检合格的文库用 Illumina HiSeq 2500 进行测序.高通量测序得到的原始图像数据文件,经碱基识别(Base Calling)分析转化为原始测序序列(Sequenced Reads)。

2.2.3 高通量测序数据预处理 使用 FLASH v 1.2.7 软件,通过 overlap 对每个样品测序得到的双端序列(PE reads)进行拼接,得到的拼接序列即原始 Tags 数据(Raw Tags).使用 Trimmomatic v 0.33 软件,对拼接得到的 Raw Tags 进行过滤,得到高质量的 Tags 数据(Clean Tags).使用 UCHIME v 4.2 软件,鉴定并去除嵌合体序列,得到最终有效数据(Effective Tags)。

2.2.4 高通量测序数据分析 使用 QIIME(version 1.8.0)软件中的 UCLUST 对 Tags 在 97% 的相似度水平下进行聚类,获得分类操作单元(Operational Taxonomic Units, OTU).细菌和真菌分别基于 Silva 和 UNITE 参考数据库进行比对,得到每个 OTU 对应的物种分类信息.使用 Mothur(version v. 1.30)软件,对样品 Alpha 多样性指数进行评估.利用 QIIME 软件生成不同分类水平上的物种丰度表,再利用 R 语言工具绘制成样品各分类学水平下的群落结构图。

3 结果与分析

3.1 样品 OTU 聚类分析

由表 1 可知,本次高通量测序结果充分反映了豆腐帘子和冻糕的微生物多样性.总体来说豆腐帘子和冻糕中的细菌数量和种类多于真菌,表明细菌在这些传统发酵食品中发挥着重要的作用.所有样品的 OTU 覆盖率都达 99% 以上,说明本次实验所建立的文库可以比较真实有效地反映样本环境微生物的多样性,具有一定研究意义和实用价值。

表 1 样品 OTU 聚类和多样性指数

Tab. 1 OTU clustering and diversity index of sample

样品编号 ID	测序结果		多样性指数			
	Effective Tags	OTUs	ACE	Chao 1	Shannon	Coverage (%)
S-B	58875	190	201.79	205.00	2.26	99.96
S-F	63733	45	59.85	60.00	0.99	99.98
R-B	58045	167	171.46	173.88	2.99	99.98
R-F	64644	69	71.18	71.00	0.66	99.99

注: S-B 和 S-F 分别是豆腐帘子细菌和真菌数据; R-B 和 R-F 分别是冻糕细菌和真菌数据

3.2 样品 OTU 物种统计

将 OTU 的代表序列分别于与微生物参考数据库 Silva/UNITE 进行比对, 可得到每个 OTU

对应的物种分类信息, 进而在各分类水平上统计样品群落组成, 详见表 2.

表 2 样品各等级 OTU 物种统计表

Tab. 2 Statistical tables of OTU species in each grade

样品编号 Sample ID	界 Kindom	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species
S-B	1	6	9	17	29	40	11
S-F	1	4	9	12	15	21	16
R-B	1	6	9	17	26	36	10
R-F	1	4	9	14	17	23	18

由表 2 可以发现, 聚类分析到种水平的数据比属水平少, 尤其是细菌种属表现明显, 这可能是由于 16S rDNA 对于亲缘关系较近的种属无法进一步分类造成的. 细菌编码核糖体 RNA 的核酸序列保守区(16S rDNA)和真菌内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer, ITS)中既有保守区又有可变区, 保守序列区域反映了生物物种间的亲缘关系, 而高变序列区域则能体现物种间的差异. 因此, 基于 16S rDNA 和 ITS 的分类方法是目前普遍认同的鉴定细菌和真菌的标准方法.

然而, 16S rDNA 具有高度保守性, 对亲缘关系较近的种属分辨率不高. 对于亲缘关系较近的物种在种的水平上的划分则需借助其他辅助手段, 例如 H Kasai^[3]利用 *gyr B* 基因辨别相近的分枝杆菌种属. 由此可知, 基于 16S rDNA 和 ITS 的高通量测序法基本可以在属及以上水平准确划分微生物

类群.

3.3 样品微生物在门水平的组成

基于 OTU 聚类结果, 对样品在各分类水平上进行分类学分析. 在门的水平上, 从图 1 可知, 豆腐帘子的细菌群(图 1 S-B)主要隶属于变形菌门(Proteobacteria, 66.56%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 25.05%)以及厚壁菌门(Firmicutes, 6.54%), 真菌群(图 1 S-F)主要隶属于担子菌门(Basidiomycota, 51.05%)、被孢霉亚门(Mortierellomycota, 43.05%)以及子囊菌门(Ascomycota, 5.50%). 冻糕的细菌群(图 1 R-B)主要隶属于厚壁菌门(Firmicutes, 74.05%)、变形菌门(Proteobacteria, 16.34%)以及蓝细菌门(Cyanobacteria, 9.56%), 真菌群(图 1 R-F)主要隶属于子囊菌门(Ascomycota, 88.02%).

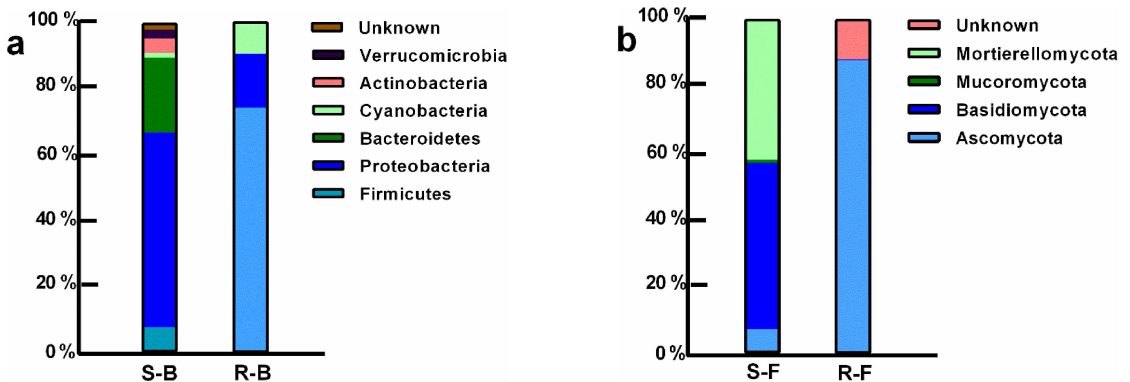


图 1 样品中细菌(a)和真菌(b)在门水平分布图

Unknown 代表未得到分类学注释的物种

Fig. 1 Bacteria (a) and Fungus (b) species distribution map of sample in the phylum level

Unknown represents a species that has not been annotated

3.4 样品微生物在属水平的分布

3.4.1 豆腐帘子微生物群落结构分析 在属的水平上进行系统分析, 从豆腐帘子中检测出 40 个细菌属(图 2 S-B)和 21 个真菌属(图 2 S-F). 其中主

要优势细菌属包括不动杆菌属(*Acinetobacter*, 32.41%)、寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*, 28.38%)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*, 15.49%)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*,

10.21%)和乳杆菌属(*Lactobacillus*, 4.23%)等。乳酸菌具有优化发酵豆制品品质的作用^[4]。然而, *Acinetobacter* 和 *Chryseobacterium* 普遍存在于土壤、水源、临床和食品中, 临床上的部分种群被认为是条件致病菌, 具有潜在的致病性, 而从食品中分离出的相关种群被认为与特定食物的腐败有潜在关系, 但具体的机理还不清楚^[5,6]。所以, 这些菌属在豆腐帘子的发酵过程起着怎样的作用目前还不清楚。Min K R^[7] 和 Mā, Retrā^[8] 报道了 *Acinetobacter* 和 *Sphingobacterium* 在生物膜形成中的协同聚集作用。这种聚集作用不仅可以增强细胞与细胞之间信息交流、相互代谢作用和附着能力, 还可以使细菌间相互保护, 免受外界侵害^[9]。因此, *Acinetobacter* 和 *Sphingobacterium* 等菌属可能与维持豆腐帘子菌群的稳定性有关。豆腐帘子中主要优势真菌属包括丝孢酵母属(*Trichosporon*, 50.80%)和毛霉属(*Actinomucor*, 42.85%)。 *Trichosporon* 是一种酵母样真菌, 其与 *Actinomucor* 都具有丰富的蛋白酶和脂肪酶酶系, 可以充分利用食物原料, 参与促进发酵豆制品形成特有的质构与风味^[10,11]。

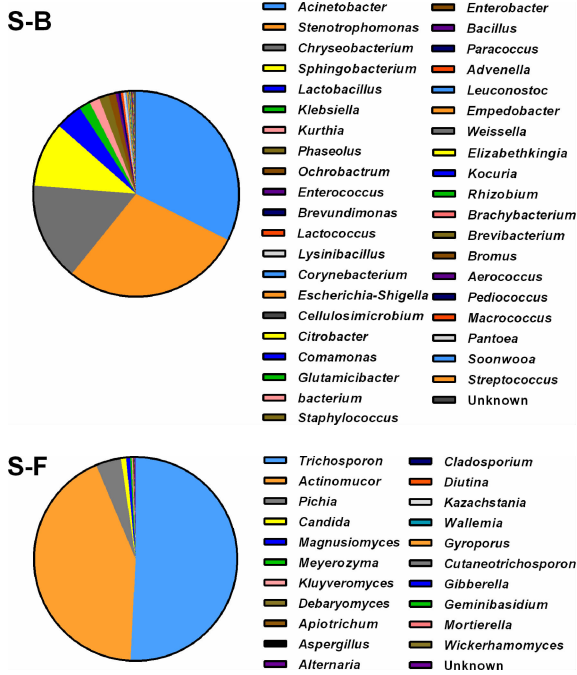


图 2 豆腐帘子中细菌(S-B)和真菌(S-F)在属水平分布图

Unknown 代表未得到分类学注释的物种

Fig. 2 Bacteria (S-B) and Fungus (S-F) species distribution map of tofu curtain in the genus level

Unknown represents a species that has not been annotated

3.4.2 冻糕微生物群落结构分析 在属的水平上进行系统分析, 从冻糕发酵米浆中检测出 36 个细菌属(图 3 R-B)和 23 个真菌属(图 3 R-F)。主要优势细菌群是乳酸菌, 包括乳杆菌属(*Lactobacillus*, 39.50%)、魏斯氏菌属(*Weissella*, 13.35%)、明串珠菌属(*Leuconostoc*, 9.86%)、乳球菌属(*Lactococcus*, 7.18%)以及链球菌属(*Streptococcus*, 2.13%)5 个属, 共占比 72.02%。其中, 乳杆菌属(*Lactobacillus*)是主要优势细菌属。乳酸菌发酵产生乳酸, 形成酸性发酵环境, 较低的 pH 值可抑制其他杂菌的生长, 同时还可以产细菌素杀死有害细菌。一些乳酸菌还具有高淀粉酶活力, 可以降解淀粉, 为不具淀粉酶活力的其他菌种提供能源物质, 对大米制品的流变性有一定影响^[12]。 *Weissella* 是由 Collins 等人于 1993 年提出的新菌属, 属于乳杆菌目(*Lactobacillales*), 明串珠菌科(*Leuconostocaceae*), 也是乳酸菌的重要一员。近年来, 魏斯氏菌在微生物学、医药学及发酵、工业、食品加工等方面的应用开始受到研究者的关注, 特别是其发酵产葡聚糖的特性及提高免疫力等益生功能是研究热点^[13]。

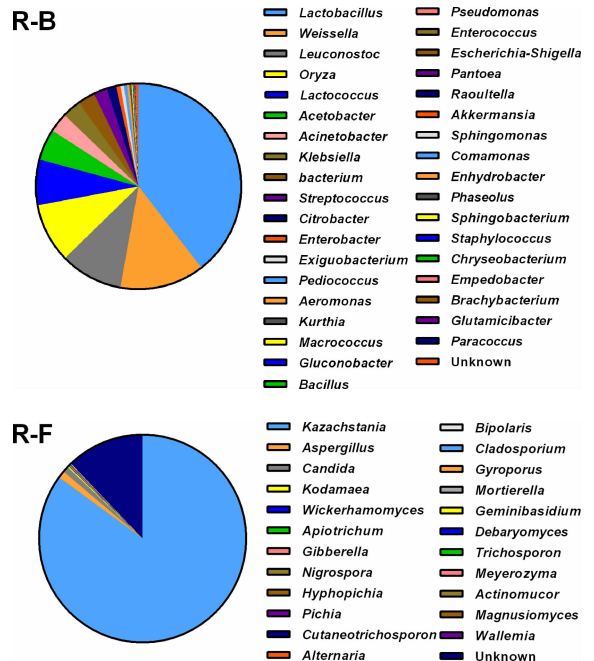


图 3 样品中细菌(R-B)和真菌(R-F)在属水平分布图

Unknown 代表未得到分类学注释的物种

Fig. 3 Bacteria (R-B) and Fungus (R-F) species distribution map of tofu curtain in the genus level

Unknown represents a species that has not been annotated

冻糕的主要优势真菌群是酵母菌, 包括哈萨克斯坦酵母属 (*Kazachstania*, 85.04%)、假丝酵母属 (*Candida*, 0.93%)、柯达酵母属 (*Kodamaea*, 0.2%) 等在内的 11 个属, 共占比 86.48%。其中, 哈萨克斯坦酵母属 (*Kazachstania*) 是主要优势真菌属。 *Kazachstania* 和 *Candida* 是发酵过程中常见的酵母属, 被广泛用于食品生产, 如面包烘焙等^[14]。酵母菌是发酵食品形成特殊风味的重要微生物, 除了产生乙醇和二氧化碳, 还可以产生一些具有特别风味的代谢产物, 如有机酸、高级醇、氨基酸以及酯类化合物。一些酵母菌株还可以产生维生素、酚类物质等有益物质, 具有益生功能。此外, 有些菌株还可以抑制真菌或霉菌毒素的产生, 保障食品的安全^[15]。Van Kerrebroeck S 等人^[16] 研究发现, 低 pH 值会影响微生物群落动力学和代谢动力学, 而在低 pH 值环境下 *Kazachstania* 在酵母属中占主导地位。

本研究发现冻糕中的优势菌群主要是乳酸菌和酵母菌, 与前人通过分离培养法报道的发酵米制品中微生物群落结构基本一致^[2], 然而本研究更为全面的分析了各菌属的比例分布, 为发酵米糕的现代化生产提供了理论基础。

3.5 样品 OTU-Venn 图

由图 4 可知, 豆腐帘子和冻糕中共有包括 *Acinetobacter*, *Lactobacillus* 在内的 28 个细菌属以及包括 *Trichosporon*, *Actinomucor*, *Kazachstania* 在内的 19 个真菌属是共有菌群。这些共有的微生物是否与当地特有的微生物体系有关, 还需进一步研究。

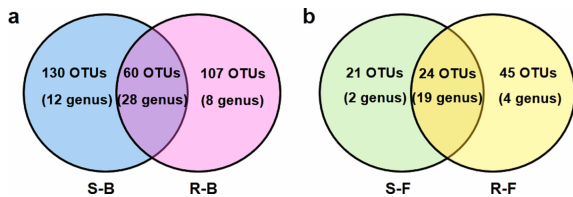


图 4 样品中细菌(a)和真菌(b)OTU-Venn 图
Fig. 4 OTU-Venn of bacteria (a) and fungus (b) species in sample

豆腐帘子特有的菌群, 包括寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*, 28.38%)、苍白杆菌属 (*Ochrobactrum*, 1.16%)、纤维微杆菌属 (*Cellulosimicrobium*, 0.12%) 和根瘤菌属 (*Rhizobium*, 0.02%) 等, 以及 2 个真菌属, 克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*, 0.16%) 和 *Diutina* 属 (0.01%)。

研究表明^[17,18], *Stenotrophomonas*, *Ochrobactrum*, *Cellulosimicrobium*, *Rhizobium* 等菌属与豆科植物的内生菌、固氮菌或根际微生物有关。 *Kluyveromyces* 可产单萜类化合物, 不产内毒素, 具有良好的蛋白酶分泌功能, 因此, 其可能参与分解利用豆腐帘子中的蛋白质^[19]。 *Diutina* 是近几年从 *Candida* 中分离出的新菌属, 对其研究较少。

冻糕特有的菌群, 包括醋杆菌属 (*Acetobacter*, 5.42%)、微杆菌属 (*Exiguobacterium*, 0.61%)、葡糖醋杆菌属 (*Gluconobacter*, 0.10%) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*, 0.06%) 等, 以及 4 个真菌属, 包括柯达酵母属 (*Kodamaea*, 0.20%)、黑孢霉属 (*Nigrospora*, 0.06%)、生丝毕氏酵母属 (*Hyphopichia*, 0.06%) 和平脐蠕孢属 (*Bipolaris*, 0.03%)。其中, 醋酸菌是发酵米制品中常见的微生物, 而 *Exiguobacterium* 和 *Pseudomonas* 等菌属则与水稻内生菌或水生环境有关^[20]。 *Bipolaris* 是水稻褐斑病的主要病原菌之一^[21]。

综上所述, 豆腐帘子和冻糕共同的菌群可能是怀远当地特有的微生物体系, 与当地的发酵食品独具地域特色密切相关。豆腐帘子和冻糕间微生物体系的差异性, 体现了发酵豆制品和米制品的区别, 是微生物对不同底物原料的选择性和适应性的结果。因此说明, 自然发酵食品微生物的多样性, 不仅与地理环境有关, 还与食物原材料有紧密联系。对不同发酵食品的微生物群落结构的分析, 不仅可以为传统发酵食品的工业化生产起指导作用, 还可以对食品原料进行追踪和质量监测。

4 讨论

通过对发酵食品微生物群落结构的分析, 可以了解微生物种群的分布, 进而分清各菌系在发酵过程中的主次作用。过去多是依靠 PCR-DGGE 技术对微生物群落多样性进行定性或半定量分析, 然而 DGGE 技术对于群落中相对丰度低于 1% 的非优势物种检测效果甚微, 难以真实的反应物种丰度和群落结构特征。近几年, 高通量测序技术发展迅速, 其测序结果可以包含大多数弱势种群, 可更为全面的反映微生物多样性的真实水平, 被广泛应用于微生物群落结构研究^[22]。

本次高通量测序全面分析了豆腐帘子和冻糕中的主要优势菌群, 同时还检测出许多低含量物种 (比例低于 1% 的可鉴定序列所对应的物种)。分析样品低含量物种的检出比 (低含量物种检出数占总

检出物种数)发现,对豆腐帘子中细菌和真菌低含量物种的检出比分别是78.95%和85.71%,冻糕分别是70.59%和91.3%。由此说明,高通量测序法可以更为全面的反映了微生物多样性的真实水平,是全面分析微生物多样性的有效工具。此外,分析豆腐帘子和冻糕细菌群落时分别检测出菜豆属(*Phaseolus*, 1.50%)和稻属(*Oryza*, 9.32%),这可能与植物性原材料中细胞器污染有关。Gurdeep Rastogi^[23]指出采用细菌通用引物可能会扩增出植物叶绿体或线粒体的基因,需要设计针对细菌的特异性引物,才能更准确的分析植物材料中的细菌丰度。因此,对检测植物性材料中细菌丰度要求较高时,需注意细菌引物的选择。

本次测序首次分析了四川怀远独有的豆腐帘子微生物群落结构,结果发现 *Acinetobacter* 和 *Chryseobacterium* 等被认为是冷冻食品腐败菌群的菌属在豆腐帘子中占主导地位。说明这些菌属可能在豆制品的发酵过程中起着特殊作用,这为食品微生物的研究中提供了新方向。而 *Acinetobacter* 和 *Sphingobacterium* 等菌属的协同凝聚作用可以维持豆腐帘子菌群的稳定性,这可能也是豆腐帘子独产于怀远,而在其他地方难产或易腐败的原因。

怀远冻糕中乳酸菌和酵母菌种类丰富,与其独具一格的风味相关。可以通过与其他地区米糕的微生物群落结构和风味的对比研究,进一步研究各种群对风味的贡献,为传统发酵食品的规范生产和安全管理提供理论依据,并为挖掘具有应用价值的微生物资源奠定基础。

参考文献:

- [1] 余文华, 张其圣, 陈功, 等. 直投式菌剂发酵泡菜的动力学研究 [J]. 食品与发酵科技, 2010, 46: 12.
- [2] 阳盈盈. 自然发酵米发糕微生物分析及其优势菌的应用 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.
- [3] Kasai H, Ezaki T, Harayama S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38: 301.
- [4] 陈浩, 何国庆. 乳酸菌对发酵豆豉品质的影响 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8: 4516.
- [5] Kämpfer P. *Acinetobacter* [J]. Encyclopedia Food Microbiol, 2014, 4: 11.
- [6] Miemann A, Hugo C J, Jooste P J. The potential of *chryseobacterium* species to produce biogenic amines [J]. J Food Saf, 2011, 31: 6.
- [7] Min K R, Rickard A H. Coaggregation by the freshwater bacterium *Sphingomonas natatoria* alters dual-species biofilm formation [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75: 3987.
- [8] Moretro T, Sharifzadeh S, Langsrud S, et al. Coaggregation between *Rhodococcus* and *Acinetobacter* strains isolated from the food industry [J]. Can J Microbiol, 2015, 61: 503.
- [9] Katharioslanwermeier S, Xi C, Jakubovics N S, et al. Mini-review: microbial coaggregation: ubiquity and implications for biofilm development [J]. Biofouling, 2014, 30: 1235.
- [10] Colombo A L, Padovan A C, Chaves G M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and *Trichosporonosis* [J]. Clin Microbiol Rev, 2011, 24: 682.
- [11] Zhao D, Lu F, Gu S, et al. Physicochemical characteristics, protein hydrolysis, and textural properties of surimi during fermentation with *Actinomyces elegans* [J]. Int J Food Prop, 2016, 20: 538.
- [12] 杨超. 自然发酵过程中阴米淀粉的特性及发酵菌株的初步筛选 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [13] Fusco V, Quero G M, Cho G S, et al. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential [J]. Front Microbiol, 2015, 6: 155.
- [14] Zhou N, Schifferdecker A J, Gamero A, et al. *Kazachstania gamospora* and *Wickerhamomyces subpelliculosus*: two alternative baker's yeasts in the modern bakery [J]. Int J Food Microbiol, 2017, 250: 45.
- [15] De V L, Harth H, Van K S, et al. Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities [J]. Int J Food Microbiol, 2016, 239: 26.
- [16] Van K S, Bastos F C, Harth H, et al. A low pH does not determine the community dynamics of spontaneously developed backslotted liquid wheat sourdoughs but does influence their metabolite kinetics [J]. Int J Food Microbiol, 2016, 239: 54.
- [17] Assumpção L D C, Lacava P T, Dias A C F, et al. Diversity and biotechnological potential of endophytic bacterial community of soybean seeds [J]. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2009, 44: 503.
- [18] Egamberdieva D, Jabborova D, Berg G. Synergistic interactions between *Bradyrhizobium japonicum*, and the endophyte *Stenotrophomonas rhizophila*, and their effects on growth, and nodulation of soybean under salt stress [J]. Plant Soil, 2016, 405: 35.

- [19] 王玉海,张慧斌,杨慧敏,等. 乳酸克鲁维酵母的发酵优势及在食品酶制剂领域中的应用 [J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33: 121.
- [20] Hardoim P R, Hardoim C C P, Overbeek L S V, *et al.* Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages [J]. *Plos One*, 2012, 7: 30438.
- [21] Dallagnol L J, Rodrigues F A, Martins S C V, *et al.* Alterations on rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae* [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2011, 40: 360.
- [22] 张瀚能,张金羽,刘茂柯,等. 川楝内生放线菌多样性及群落结构研究 [J]. 四川大学学报:自然科学版, 2016, 53: 1391.
- [23] Rastogi G, Tech J J, Coaker G L, *et al.* A PCR-based toolbox for the culture-independent quantification of total bacterial abundances in plant environments [J]. *J Microbiol Methods*, 2010, 83: 127.

引用本文格式:

中文: 刘筱雪,袁文娟,丁涛,熊粟粟,张杰,白林含. 基于高通量测序对四川怀远特色发酵食品微生物群落结构分析 [J]. 四川大学学报:自然科学版, 2019, 56: 537.

英文: Liu X X, Yuan W J, Ding T, Xiong S L, Zhang J, Bai L H. Analysis of microbial community structure of HuaiYuan, SiChuan special fermented food based on high-throughput sequencing technology [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2019, 56: 537.