基于 16S rRNA 基因 V3-V4 区高通量测序分析东北自然发酵酸菜中细菌群落结构

李欣蔚，丛敏，武俊瑞，岳喜庆，乌日娜
（沈阳农业大学食品学院，辽宁沈阳 110161）

摘要：为探究东北自然发酵酸菜中细菌群落结构，本试验采用 454 FLX+平台对东北地区传统自然发酵的 16 份酸菜汁样品中细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区进行测序。通过 454 焦磷酸测序，共得到 302327 条有效序列。计算 Chao 1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数，对样品菌群的 Alpha 多样性进行评价，发现松原和大庆样品的细菌群落具有较高的丰富度。Beta 多样性分析发现黑龙江、吉林和辽宁省份样品中存在交叠细菌物种，但含量极低。Heatmap 图显示各省份的优势菌属各不相同。样品群落结构分析表明大庆、黑河和松原样品中乳杆菌含量超过 50%，黑河样品中乳杆菌含量高达 69.6%。KEGG 统计结果表明高纬度地区存在着一定数量的耐寒细菌。此外，本试验首次在发酵食品中发现污蝇解壳杆菌属细菌（wohlfahrtiimonas），显示出高通量测序技术相对传统纯培养技术的优势。

关键字：454 焦磷酸测序；16S rRNA；酸菜；细菌；群落结构
文章篇号：1673-9078(2017)2-69-75 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.2.011

Analysis of the Bacterial Community Structure in Naturally Fermented Cabbage of Northeast China by High-throughput Sequencing

LI Xin-wei, CONG Min, WU Jun-rui, YUE Xi-qing, WU Ri-na
(Shenyang Agriculture University College of Food Science, Shenyang 110161, China)

Abstract: In order to reveal the microbial community structure in naturally fermented cabbage from Northeast China, the 454 FLX+pyrosequencing platform was used to carry out sequencing of V3-V4 regions of the 16S rRNA gene in the microbiota of the cabbage. A total of 302327 valid sequences were analyzed by 454 pyrosequencing in 16 samples. The Chao1 index, Shannon index, and Simpson index were used to evaluate the alpha diversity of the samples, and the results showed that the microbiota in samples from Songyuan and Daqing had a relatively high abundance. Beta diversity analysis found common bacterial species among the samples from Heilongjiang Province, Jilin Province, and Liaoning Province, although their content was extremely low. In addition, heatmap analysis revealed that dominant bacterial genera were significantly different among the samples from these three provinces. Analysis of the microbial community structure indicated that the content of *Lactobacillus* strains in the samples from Daqing, Heihe, and Songyuan was greater than 50%; the content in the sample from Heihe reached up to 69.6%. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses showed that there were a certain number of cold-resistant bacteria in the high latitude areas. Furthermore, *Wohlfahrtiimonas* spp. were reported for the first time in the fermented food, which showed the advantages of high-throughput sequencing compared with the conventional culture technique.

Key words: 454 pyrosequencing, 16S rRNA; fermented cabbage; bacterium; community structure

酸菜，作为一种大众化蔬菜腌渍品在我国东北地区历史悠久，酸菜是将新鲜白菜用盐水在密闭容器中泡制一段时间后形成的发酵蔬菜制品。由于东北三省独特的地理位置、气候条件以及民族文化传统，使得该地区传统自然发酵的酸菜酸味浓郁、口味醇厚，其口味与香气优越于其他地区发酵的酸菜，而使得酸菜拥有此类特点的根本原因在于其微生物群落的丰富性。近年来，我国与韩国及日本等国际上已实现规模化发酵蔬菜生产的国家相比，缺乏对自然发酵蔬菜微生物区系动态深入系统的解析，从而限制了发酵蔬菜生产规模的扩大化[1,2]。因此，对东北地区传统自然发酵酸菜中的微生物资源探究成为学术界研究的热点问题。

在传统发酵食品的研究中，通常采用富集纯分离培养鉴定的方法对其中微生物群落结构进行研究，该

收稿日期：2015-12-16
基金项目：国家自然科学基金资助项目（31370502）
作者简介：李欣蔚（1987-），女，博士，研究方向：食品科学与工程
通讯作者：岳喜庆（1966-），男，博士，教授，研究方向：动物性食品、食品发酵研究

方法仅能得到微生物群落中极少数信息而不能真正反映出全部的微生物群落信息[3]。这种传统的分离、纯化和鉴定方法，不仅繁杂耗时，而且受培养条件和主观因素影响较大，不能反映出酸菜内细菌的多样性的真实情况，结果准确性及可靠性差。近几年来随着分子生物学技术的发展，有研究表明，采用 16S rDNA 结合变形梯度凝胶电泳（denaturing gradient gel electrophoresis，DGGE）技术成功鉴定出发酵白菜中的优势菌群。武俊瑞[4]等利用 PCR-DGGE 技术对 5 份东北自然发酵酸菜中的乳酸菌进行研究，结果表明 5 份传统发酵酸菜样品共鉴定出了 9 个乳酸菌种，其中植物乳杆菌、短乳杆菌、清酒乳杆菌和弯曲乳杆菌是酸菜样品的优势菌群。Yang 等从东北酸菜中分离到产粘液多糖的 L. rhamnosu。然而该方法易受到基因拷贝数的影响，因此当样品细菌的拷贝数较低时会缺乏灵敏度，且操作复杂周期长成本高。高通量测序技术无需构建克隆且通量高，其中 454 测序技术序列读长最长[5]，使得全面高效认识发酵食品中微生物群落信息成为可能[6~8]。2009 年，Humblot[9]首次应用多样本平行焦磷酸测序技术研究了发酵食品中微生物群落信息，并验证了此方法在发酵食品中微生物群落结构和动态变化研究中的可行性。Dobson[10]等年利用焦磷酸测序技术研究爱尔兰开菲尔中微生物多样性，样品中测序到厚壁菌门、拟杆菌门、变性菌门和放线菌门的序列，其中厚壁菌门序列占样品总序列的 92%，是爱尔兰开菲尔中优势菌门。

基于以上原因，本试验采用 454 FLX+平台进行测序。在 97%的相似水平下对所测得序列进行 OUT 聚类和生物信息学分析。以期揭示东北地区传统自然发酵酸菜中优势菌群的组成，以及不同纬度省份间酸菜中微生物群落差异情况，为探明菌群多样性的进化规律奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

于 2015 年 2 月进行样品采集。按照东三省自北向南路线以及地理位置和气候特点采集黑河（HH）、呼伦贝尔（HLBE）、齐齐哈尔（QQHE）、大庆（DQ）、佳木斯（JMS）、白城（BC）、松原（SY）、牡丹江（MDJ）、长春（CC）、公主岭（GZHL）、延边（YB）、阜新（FX）、鞍山（AS）、朝阳（CY）、丹东（DD）和大连（DL）16 个地点的自然发酵酸菜汁样品共 16 份。

1.2 DNA 的提取纯化和扩增

样品中加入 5 mL PBS 缓冲液，涡旋震荡 30 s，然后 350 g 离心 5 min，收集上清液，12000 g 离心 5 min 后，弃上清液，在沉淀中加入 800 μL TE 缓冲液回溶，采用 FastPrep 结合 CTAB 法进行总 DNA 的快速提取。以提取的总 DNA 为模板，采用 16S rDNA V3-V4 区引物：520F：(5’-CCTACGGGNGGCWGCAG-3’)，802R：(5’-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3’)进行 PCR 扩增，扩增反应体系（50 μL）包括：50 ng 基因组 DNA 模板；2 μL dNTP（2.5 mmol/L，TakaRa）；两条引物终浓度均为 0.4 mol/L、2 μL；0.5 μL DNA Taq 聚合酶（1.5 U，TaKaRa）；5 μL 10×PCR Buffer。反应参数：94 ℃预变性 5 min，35 个循环，包括 94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 45 s，72 ℃延伸 40 s，最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 反应的产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 序列生物信息学分析

采用 454 FLX+平台进行测序。使用 QIIME（v1.4.0）程序对测得序列进行生物信息学分析[11]，包括进行质量控制，去除前后引物和条形码得到有效序列，然后用 Uparse 软件对有效数据在 97%水平上进行操作分类单元（Operational taxonomic unit，OTU）聚类。在 QIIME 中调用 BLAST 的方法与序列数据库 Greengene （ Release 13.8 ， http://greengenes.secondgenome.com/）进行比对，获得每个 OUT 代表序列的分类学信息。计算 Chao1[12]指数、Shannon 指数和 Simpson 指数对样品菌群的多样性进行评价。采用 Shannon 指数曲线和稀疏曲线（Rarefaction curve）评价当前的测序量是否代表原始群落的多样性。对各样品菌群之间进行基于 UniFrac 距离的加权（Weighted）和非加权（Unweighted）的主坐标分析（PCoA），利用软件 PICRUSTs 进行功能基因的预测和相关统计分析。

2 结果与分析

2.1 丰度和多样性分析

通过 454 焦磷酸测序，16 份样品总共得到 302327 条有效序列，经过过滤和去除嵌合体之后得到 158015 条优质序列。其中样品 DQ 获得最多的序列为 49706 条，样品 CY 获得序列最少为 9158 条。而对所有样品的优质序列的序列长度进行统计，结果表明序列长度多集中于 430~450 bp,。然后将所得优质序列在相似度 97%的水平进行 OTU 归类，将所得 OTU 分别分类到门、纲、目、科、属及种的数量进行统计。

2.2 Alpha 多样性分析

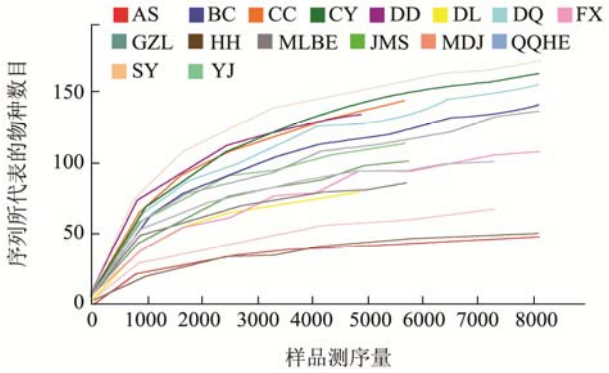


图 1 样品的细菌稀疏曲线图

Fig.1 Rarefaction analysis of the pyrosequencing reads in samples

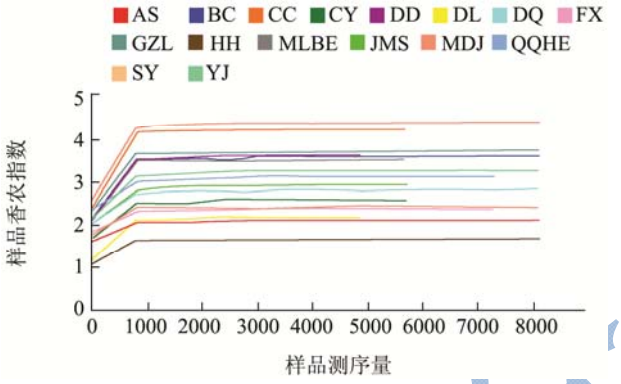


图 2 样品的细菌香农指数图

Fig.2 Plot of Shannon diversity index of the bacteria in samples

从图 1 可知，在当前的测序量下每个样品的细菌稀疏曲线（rarefaction curve）接近平台期，表明当前的测序量能够很好的反映出样品中细菌群落结构和多样性。但是香农多样性曲线已经饱和，如图 2，说明尽管增加测序量样品微生物的多样性已经不再随之发生变化了。样品 SY 的 Shannon 指数最高，如图 2，说明 SY 样品中细菌群落多样性最高。样品 SY 的 Simpson 指数最低，表示其细菌群落多样性最高，与 Shannon 指数的结果一致。

由图 3 可以看出，Chao 1 指数和 ACE 指数具有相同趋势，样品 DQ 的 Chao 1 指数和 ACE 指数最高分别为 234.2 和 230，而样品 HH 的 Chao 1 指数和 ACE 指数最低分别为 58.9 和 56.2，而来自黑河的样品中群落的丰富度最低。而 Shannon 值最高的 SY 样品除了具有较高的群落多样性以外，也具有较高的群落丰富度，其 Chao 1 指数和 ACE 指数分别为 190.8 和 184.1。

由图 5 可以看出，来自大庆的样品 DQ 具有较高的物种丰富度，其微生物群落间的物种组成也较为均匀。

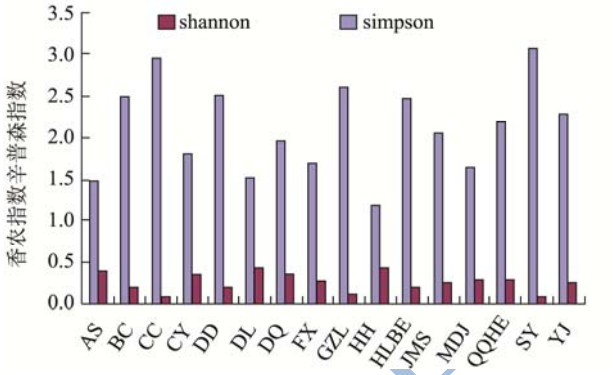


图 3 样品间多样性指数比较

Fig.3 Comparative analysis of community diversity index in samples

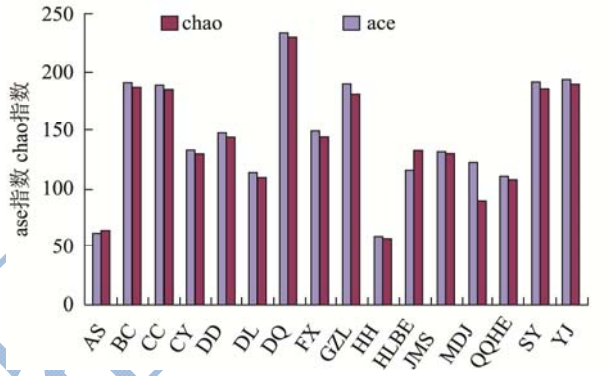


图 4 样品间丰富度比较

Fig.4 Comparative analysis of community richness in samples

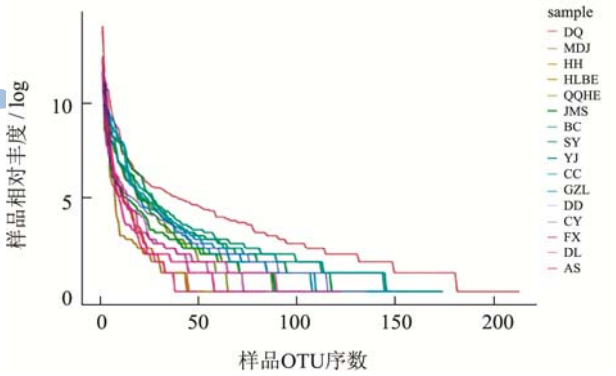


图 5 丰富度分布曲线

Fig.5 Rank abundance curve

2.3 Beta 多样性分析

本研究利用样品之间物种的进化信息以及物种的丰度信息进行 Unifrac[13]分析，得到样品差异的距离矩阵。对得到的样品 Group1 黑龙江，Group2 吉林，Group3 辽宁之间的距离矩阵信息进行 PCoA 分析。由图 6 和图 7 可知，基于 UniFrac 的加权和非加权的主坐标分析其第一主成分和第二主成分的贡献率分别为 15.21%和 12.2%、68.63%和 10.34%。由基于 UniFrac 的加权主坐标分析图（图 6）可知，黑龙江省份样品的分布与吉林、辽宁省份的样品距离较远，不存在交

叠现象。然而，基于 UniFrac 的非加权主坐标分析图（图 7）可知，黑龙江省份样品分布存在于吉林和辽宁省份样品交叠的趋势。这种现象说明，有些分类操作单元（OTU）在黑龙江、吉林和辽宁省份样品中均存在，但是其含量不同，并且含量低。

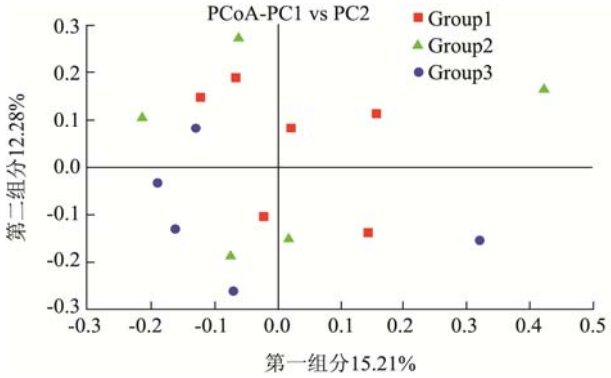


图 6 黑龙江、吉林和辽宁样品间细菌菌群结构 Unifrac 非加权主坐标分析分布图

Fig.6 Unweighted UniFrac analysis of Heilongjiang, Jilin, and Liaoning samples

注：Group1 表示黑龙江；Group2 表示吉林；Group3 表示辽宁。

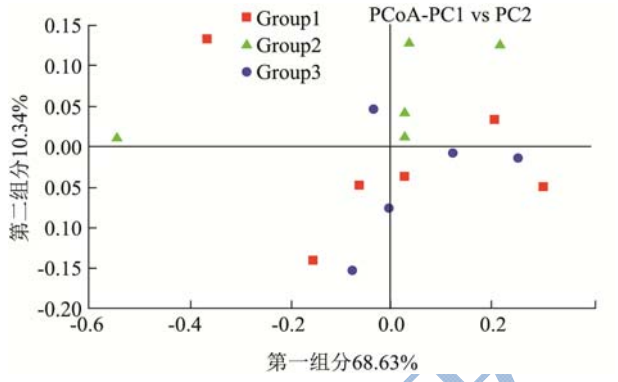


图 7 黑龙江、吉林和辽宁样品间细菌菌群结构 Unifrac 加权主坐标分析分布图

Fig.7 Weighted UniFrac analysis of Heilongjiang, Jilin, and Liaoning samples

注：Group1 表示黑龙江；Group2 表示吉林；Group3 表示辽宁。

2.4 聚类分析

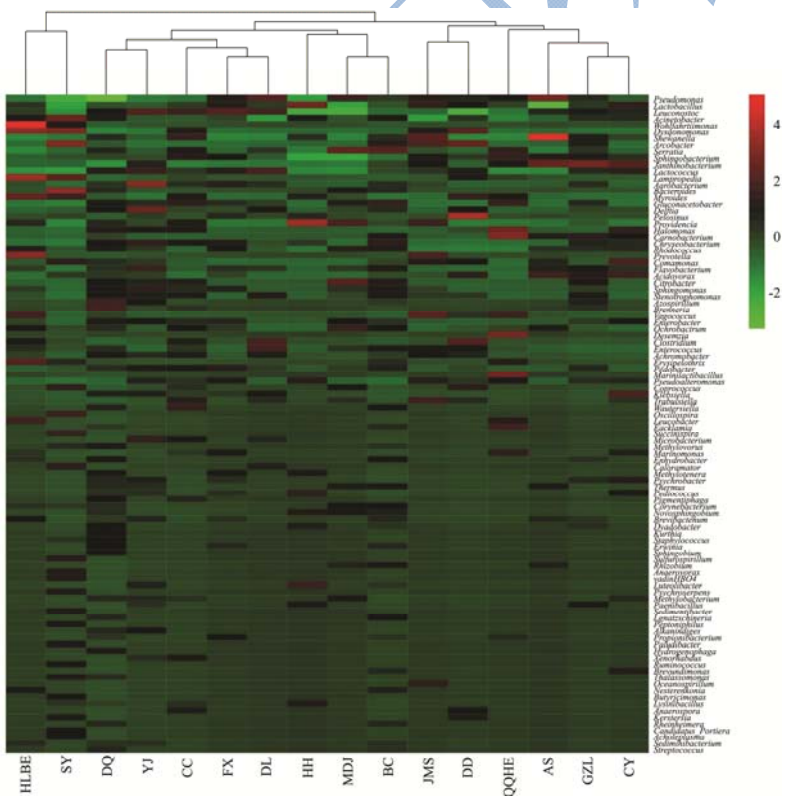


图 8 聚类分析的热图

Fig.8 Heatmap of sample clustering

Heatmap 图中一个色块代表一个样品的一个属的丰度，纵向是样品的聚类情况，反映多个样品在属水平上群落组成的相似性，同时通过颜色梯度及相似程度来反映多个样品在分类水平上群落组成的相似性和差异性。Heatmap 中如图 8，各个样品中优势菌属均各不相同，同时各样品中群落的组成也各不相同且差异较大。将样品以省份为单位进行划分可见，各省份间优势菌属没有交叠。

2.5 群落结构分析

2.5.1 细菌在门的水平进行分类及比较

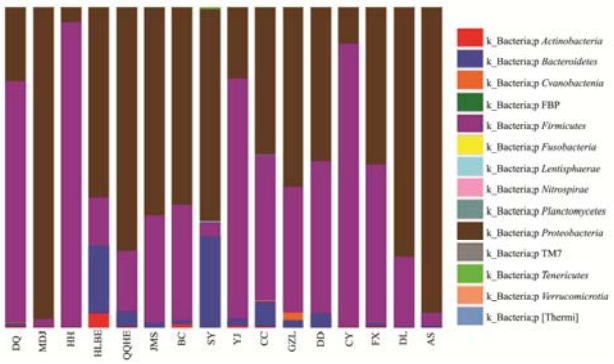


图 9 样品中不同细菌所占比例（基于门的分类水平）

Fig.9 Proportions of different bacteria in the samples (based on phylum-level classification)

采用 RDP 和 BLAST 同源性序列比对聚类相结合的方法[14]，将测得序列鉴定为放线菌门（*Actinobacteria*）、拟杆菌门（*Bacteroidetes*）、蓝藻菌门（*Cyanobacteria*）、厚壁菌门（*Firmicutes*）、梭杆菌门（*Fusobacteria*）、黏胶球形菌门（*Lentisphaerae*）、硝化螺旋菌门（*Nitrospirae*）、浮霉菌门（*Planctomycetes*）、变形菌门（*Proteobacteria*）、无壁菌门（*Tenericutes*）和疣微菌门（*Verrucomicrobia*）共 11 个菌门。其中厚壁菌门（*Firmicutes*）细菌在黑河（HH）样品中的含量最高，为 95.3%；在鞍山（AS）样品中的含量最少，为 4.1%。变形菌门（*Proteobacteria*）细菌在牡丹江（MDJ）样品中国的含量最高，为 97.5%，在黑河（HH）样品中的含量最少，仅为 4.5%。拟杆菌门（*Bacteroidetes*）细菌仅存在于松原（SY）和呼伦贝尔（HLBE）样品中，含量分别为 28.6%和 21%，在其余样品中的含量为 0.1%（HH）到 7.9%（CC）不等，而放线菌门（*Actinobacteria*）细菌仅存在于呼伦贝尔（HLBE）样品中，含量为 4.5%，在其余样品中的含量为 0.1%（AS）到 0.9%（BC）不等。因此认为，厚壁菌门（*Firmicutes*）、变性菌门（*Proteobacteria*）、拟杆菌门（*Bacteroidetes*）和放线菌门（*Actinobacteria*）为所有样品中的优势菌门。

2.5.2 细菌在属的水平进行比较及分类

所有样品中，DQ 的优势菌属为乳杆菌属（*Lactobacillus*）58.2%；MDJ 的优势菌属为肠杆儿菌属（*Enterobacteriaceae*）49.0%；HH 的优势菌属为乳杆菌属（*Lactobacillus*）69.5%；HLBE 的优势菌属为污蝇解壳杆菌（*Wohlfahrtiimonas*）40.1%；QQHE 的优势菌属为假单胞菌（*Pseudomonas*）61.5%；JMS 的优势菌属为乳杆菌属（*Lactobacillus*）31.2%；BC 的优势菌属为假单胞菌（*Pseudomonas*）39.6%；SY 的优势菌属为不动杆儿菌属（*Acinetobacter*）29.1%；YJ 的优势菌属为乳杆菌属（*Lactobacillus*）49.6%；CC 的优势菌属为明串珠菌属（*Leuconostoc*）15.8%；GZL 的优势菌属为假单胞菌（pseudomonas）39.7%；DD 的优势菌属为乳杆菌属（*Lactobacillus*）32%；CY 的优势菌属为乳杆菌属（*Lactobacillus*）59.1%；FX 的优势菌属为假单胞菌（*Pseudomonas*）46.5%；DJ 的优势菌属为假单胞菌（*Pseudomonas*）69.6；AS 的优势菌属为假单胞菌（*Pseudomonas*）77.7%。由此可见，在所有省份传统自然发酵的的 16 个样品中，发酵完成后其优势菌属可确定为乳杆菌属（*Lactobacillus*）、假单胞菌（*Pseudomonas*）和明串珠菌属（*Leuconostoc*）。

2.6 功能基因 KEGG 统计

将来自各个城市的样品按照省份进行汇总，Group1：黑龙江省，包括黑河（HH）、齐齐哈尔（QQHE）、大庆（DQ）、佳木斯（JMS）、牡丹江（MDJ）；Group2：吉林省，包括白城（BC）、松原（SY）、长春（CC）、公主岭（GZHL）、延边（YB）；Group3：辽宁省，包括阜新（FX）、鞍山（AS）、朝阳（CY）、丹东（DD）、大连（DL）。基于宏基因组物种丰度信息以及物种的基因组数据库信息，根据 OTU 水平的丰度信息，利用软件 PICRUSt[15]进行功能基因的 KEGG 预测，以及比较样品中功能基因的差异，见图 10。结果表明，有关细胞移动，细胞对环境信息处理，遗传信息的传递，人类疾病，新陈代谢的基因在数量上呈现 Group1>Group2>Group3 的趋势。而这其中，有关细胞膜转运、信号蛋白分子交互作用、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、酶促反应、多糖的合成与代谢、核酸代谢的基因在数量上，Group1 显著高于 Group2 和 Group3。表明在高纬度高寒地区（Group1），仍有大量细菌进行着活跃的代谢活动，表明其菌群中有大量耐寒微生物的存在。而在低纬度地区（Group3），随着温度的升高，耐寒微生物由于不适应环境变化休眠或者死亡，以至于相对应的代谢活动停止。

3 讨论

Marcus J. Claesson[16]对 16S rRNA 基因 9 个可变区域进行了全面分析。分析能够比对到属的水平上的比例及准确率，结果表明：V1 和 V9 区域是效果最差的，其次是 V7 和 V8 区域，V3、V4 和 V5 区域相对较好。同时通过对这些区域进行串联设计引物，对 V1/V2、V2/V3、V3/V4、V5/V6 和 V7/V8 这 6 个串联区域进行比较，发现 V3/V4 和 V4/V5 这两个串联区域的准确性是最高的，考虑到分类效率（Classification Efficiencies，CE），V3/V4 区域相对其他区域存在着显

著的扩增偏好性[17]。而通过比较不同的可变区域的测序结果的物种注释准确性及序列能够注释到属水平比例上的差别，发现在 16S rRNA 基因的读长和测序质量上，454 平台都要明显优于 Illumina 的双端测序[18]。因此本试验采用 454 FLX+平台对样品的宏基因组进行高通量分析。

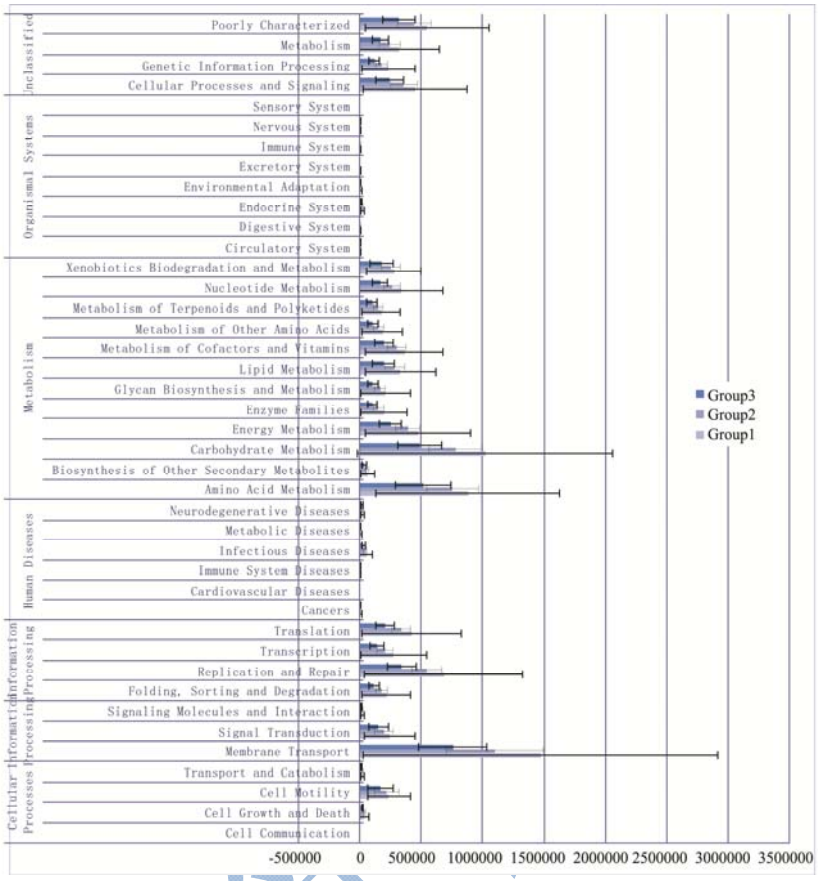


图 10 功能基因 KEGG 统计

Fig.10 KEGG analysis of functional genes

酸菜自然发酵过程中，乳杆菌属（*Lactobacillus*）、明串珠菌属（*Leuconostoc*）和乳球菌属（*Lactococcus*）等菌属在糖酵解途径和异型乳酸发酵过程中祈祷重要作用[19]。乌日娜[20]通过 PCR-DGGE 技术分析酸菜发酵过程中微生物群落动态变化发现，乳酸杆菌属是东北自然发酵酸菜发酵液中的主要菌属，这与本试验研究结果一致。而来自大庆、黑河和松原的样品中乳杆菌含量超过 50%，来自黑河的样品中乳杆菌含量高达 69.6%。而明串珠菌属（*Leuconostoc*）是仅次于乳杆菌的第二优势菌群。此外，还发现了片球菌，乳酸乳球菌，Hammesii 乳杆菌和 Odoratitofui 乳杆菌。这与武俊瑞[21]等人的研究结果一致。可见在高纬度地区的传统自然发酵酸菜中，乳酸菌菌群所占比例较大。而其中污蝇解壳杆菌（*Wohlfahrtiimonas*）为 2011 年新现临床条件病原菌，在中国相关报道较少[22]，在发酵食品的微生物菌群的研究中属首次发现，为公认的致病菌，易导致大规模腹泻的爆发。本次实验中的 48 份样品，来自呼伦贝尔和松原的污蝇解壳杆菌（*Wohlfahrtiimonas*）的含量最高，分别为 40.5%和 0.2%，说明生物污染的传播范围已经蔓延到内陆城市。

alpha 多样性分析结果表明，松原（SY）样品的 Shannon 指数和 Simpson 指数多样性指数最高。结合 Heatmap 的结果显示，其中乳球菌属（*Lactococcus*）、不动杆儿菌属（*Acinetobacter*）、卟啉单胞菌属（*Dysgonomonas*）和拟杆菌属（*Bacteroides*）的丰度最高。在发酵中起重要作用的菌属有：乳杆菌属（*Lactobacillus*）、明串珠菌属（*Leuconostoc*）和乳球菌属（*Lactococcus*）。乳杆菌属（*Lactobacillus*）在黑河（HH）样品中的丰度最高，而明串珠菌属（*Leuconostoc*）在延吉 YJ、长春 CC、阜新 FX 和大连 DL 样品中的丰度最高。在发酵过程中，主导发酵的主体是微生物，根据发酵条件的不同，微生物的组成也不尽相同。而根据 Beta 多样性分析的结果，有些分类操作单元（OTU）在黑龙江、吉林和辽宁省份样品中均存在，但是其含量是不同的，并且含量低，导致这种结果的原因可能是样品所在地的自然环境，包括土壤水质以及发酵条件包括发酵主体的差异性。

通过功能基因的 KEGG 统计，表明在东北地区传统自然发酵酸菜的菌群中有大量耐寒微生物的存在，并且携带大量有关代谢功能的基因。并且与低纬度省份相比，在高纬度省份的样品中，微生物的代谢活动较为活跃，这提示了在高纬度地区存在着一定数量的耐寒微生物。

4 结论

alpha 多样性分析结果显示来自大庆的样品中的细菌群落具有较高的丰富度。通过 Beta 多样性分析发现在黑龙江、吉林和辽宁省份样品中存在交叠物种，但含量极低。Heatmap 图显示各省份间优势菌属具有显著区别。对样品进行基于群落结构的分析，表明来自大庆、黑河和松原的样品中乳杆菌含量超过 50%，来自黑河的样品中乳杆菌含量高达 69.6%。通过使用统计学的分析方法观测样品在不同分类水平上的群落结构，将测得序列序列鉴定为放线菌门（*Actinobacteria*）、拟杆菌门（*Bacteroidetes*）、蓝藻菌门（*Cyanobacteria*）、厚壁菌门（*Firmicutes*）、梭杆菌门（*Fusobacteria*）、黏胶球形菌门（*Lentisphaerae*）、硝化螺旋菌门（*Nitrospirae*）、浮霉菌门（*Planctomycetes*）、变形菌门（*Proteobacteria*）、无壁菌门（*Tenericutes*）和疣微菌门（*Verrucomicrobia*），共 11 个菌门。KEGG 统计结果显示出高纬度地区存在着一定数量的耐寒微生物。

参考文献

[1] Iacumin L, Cecchini F, Manzano M. Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culturein dependent methods [J]. Food Microbiology, 2009, 8(2): 126-129

[2] 梁新乐,朱扬玲,蒋予箭,等. PCR-DGGE 法研究泡菜中微生物群落结构的多样性[J].中国食品学报,2008,8(3):133-139 LIANG Xin-le, ZHU Yang-ling, JIANG Yu-jian, et al. Diversity of bacterial communities of pickle by PCR- DGGE [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2008,8(3):133-139

[3] Yuan-yuan Qu, Li Wei. Microbial cultivation independent technology principle and application [M]. Beijing: Science Press, 2010

[4] Jun-rui Wu, Xi-qing Yue, Pu Shi, et.al. Diversity of lactic acid bacteria involved in Suan-Cai using PCR-DGGE [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 2(33): 127-130

[5] Yu L, Nicolaisen M, Larsen J, et.al. Organic fertilization alters the community composition of root associated fungi in *Pisum sativum* [J]. Soil Biol. Biochem., 2013, 58(8): 36-41

[6] Navarro-Noya Y E, Gómez-Acata S, Montoya-Ciriaco N, et.al. Relative impacts of tillage, residue management and croprotation on soil bacterial communities in a semiarid agroecosystem [J]. Soil Biol. Biochem., 2013, 65(23): 86-95

[7] Sul W J, Asuming-Brempong S, Wang Q, et al. Tropical agricultural land management influences on soil microbial communities through its effect on soil organic carbon [J]. Soil Biol. Biochem., 2013, 65(5): 33-38

[8] Poulsen P H B, Al-Soud W A, Bergmark L, et.al. Effects of fertilization with urban and agricultural organic wastes in a field trial-prokaryotic diversity investigated by pyrosequencing [J]. Soil Biol. Biochem., 2013, 57(3): 784-793

[9] Williams T, Christele H, Jean Pierre G. Genetic screening of functional propertities of *Lactic acid bacteria* in a fermented pearl millet slurry and in the metagenome of fermented starchy foods [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(24): 8722-8734

[10] Bulent K, Aland W D. An Introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2011, 51(3): 248-260

[11] Mark B, Jenna M, Tom C, et al. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data [J]. Soil Biol. Biochem., 2005, 360(1462): 1935-1943

[12] Bokulich N A, Subramanian S, Faith J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from illumina amplicon sequencing [J]. Nature Methods, 2013, 10(1): 57-59

[13] Pitta D W, Pinchak E, Dowd S E, et al. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets [J]. Microbial Ecology, 2010, 59(3): 511-522

[14] Oberauner L, Zachow C, Lackner S, et al. The ignored diversity: complex bacteria communities in intensive care units revealed by 16S pyrosequencing [J]. Science Reports, 2013, 3(3): 4422-4427

[15] Koljalg U, Nilsson R H, Abarenkov K, T. et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi [J]. Molecular Ecology, 2013, 22(21): 5271-5277

[16] M J Claesson, Q Wang, O O'Sullivian, et al. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tendem variable 16S rRNA gene regions [J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(22): 985-989

[17] Zhongkui Xia. The comparative analysis and discussion of 16S rRNA sequencing data based on 454 and ion torrent platform [D]. Beijing: University of Electronic Science and Technology of China, 2014

[18] Abdel-Rahman M A. Tashiro Y. Sonomoto K. Latic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Oveview and limits [J]. Joural Biotechnol, 2011, 156(4): 286-301

[19] Rina Wu, Meiling Yu, Ling-shuai Meng. PCR-DGGE analysis of the microbial diversity in naturally fermented Suan-cai from northeast China [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(10): 8-35

[20] Jun-rui Wu, Xi-qing Yue, Pu Shi. Diversity of lactic acid bacteria involved in Suan-cai using PCR-DGGE [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33(2): 127-130

[21] Tuo Chen, Xiao-mei Cao, Jun Qi. A new fly medium pathogen isolation and molecular identification system development [J]. Chinese Journal of Public Health, 2013, 9(29): 1389-1391

[22] Mc Donald P, Henderson N, Heron S. The biochemistry of silage [M]. Marlow: Chalcombe Publications, 1991

现代食品科技