

基于 PCR-DGGE 与高通量测序技术的恩施地区腊鱼细菌多样性评价

王玉荣¹, 廖华², 赵慧君¹, 张振东¹, 郭壮^{1,3}

(1. 湖北文理学院食品科学技术学院, 湖北襄阳 441053)

(2. 恩施市农业局, 湖北恩施 445000) (3. 恩施市公共检验检测中心, 湖北恩施 445000)

摘要: 作为我国传统的发酵食品, 腊鱼因具有独特的滋味和口感而深受人们青睐。以 16 s rDNA 基因为靶, 采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 与 MiSeq 高通量测序技术相结合的方法对采集自恩施地区腊鱼样品的细菌多样性进行了研究。PCR-DGGE 结果表明, 腊鱼样品中的细菌以 *Psychrobacter* 和 *Lactobacillus* 为主。MiSeq 高通量测序结果表明, 腊鱼中的优势细菌门主要为变形菌门 (Proteobacteria)、硬壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和放线菌门 (Actinobacteria), 其平均相对含量分别为 61.29%、30.21%、5.34% 和 1.74%。腊鱼中的优势细菌主要为 *Psychrobacter*、*Brochothrix*、*Pseudomonas*、*Staphylococcus*、*Acinetobacter*、*Vibrio*、*Pseudoalteromonas* 和 *Chryseobacterium*, 其平均相对含量为 35.70%、19.74%、7.13%、7.12%、4.19%、3.90%、3.09% 和 1.98%。在分类操作单元 (Operational taxonomic units, OTU) 水平上, 发现了 64 个核心 OTU, 累计平均相对含量高达 62.67%。由此可见, 恩施地区腊鱼中的优势细菌主要由隶属于 Proteobacteria 的 *Psychrobacter* 及隶属于 Firmicutes 的 *Brochothrix* 构成, 且不同样品共有大量的核心细菌菌群。

关键词: 恩施; 腊鱼; 细菌; 变性梯度凝胶电泳; 高通量测序技术

文章编号: 1673-9078(2018)11-208-213

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.11.031

Evaluation of the Bacterial Diversity in Cured Fish Samples Collected from Enshi by PCR-DGGE and MiSeq High-throughput Sequencing

WANG Yu-rong¹, LIAO Hua², ZHAO Hui-jun¹, ZHANG Zhen-dong¹, GUO Zhuang^{1,3}

(1. School of Food Science and Technology Hu Bei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, China) (2. Enshi Agricultural Bureau, Enshi 445000, China) (3. Enshi Public inspection and Testing Center, Enshi 445000, China)

Abstract: Cured fish is a kind of Chinese traditional food which is popular for its unique taste and flavor. The bacterial diversity of cured fish samples collected from Enshi was studied by 16s rDNA gene-based PCR-DGGE and MiSeq high-throughput sequencing. The result of PCR-DGGE indicated that the domain bacteria in cured fish samples were belong to *Psychrobacter* and *Lactobacillus*. The result of MiSeq high-throughput sequencing indicated that Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, and Actinobacteria constituted more than 1.0% of total sequences at the phylum level, with the relative abundance of 61.29%, 30.21%, 5.34%, and 1.74%, respectively. Meanwhile, *Psychrobacter*, *Brochothrix*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, and *Chryseobacterium* constituted more than 1.0% of total sequences at the genus level, with the relative abundance of 35.70%, 19.74%, 7.13%, 7.12%, 4.19%, 3.90%, 3.09%, and 1.98%, respectively. At the OTU level, 64 OTUs were found with the cumulative average relative was 62.67% of total qualified sequences. Thus, the main dominant bacteria in cured fish samples were composed of *Psychrobacter* belonging to Proteobacteria and *Brochothrix* belonging to Firmicutes, and all samples shared a large number of core bacterial microbiome.

Key words: Enshi; cured fish; bacteria; denatured gradient gel electrophoresis; high-throughput sequencing

恩施土家苗族自治州地处湖北省西南部, 紧邻湘、渝, 由大巴山、巫山、齐岳山和武陵山等山脉环绕而

收稿日期: 2018-08-05

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31501455)

作者简介: 王玉荣 (1993-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 郭壮 (1984-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术

成, 境内地势复杂, 河谷深切, 河流较多且生活着汉族、土家族和苗族等 27 个民族, 少数民族文化多姿多彩, 传统发酵食品制作技艺更是不胜枚举^[1,2]。该地生产的腊鱼主要以境内野生草鱼或是农家自养鲜鱼为原料进行腌制, 又因恩施自治州属亚热带季风性山地湿润气候, 环境较为潮湿, 当地人将腌制后的腊鱼用松

枳枝进行烟熏，该方法不仅可以延长腊鱼保质期还能有效改善成品风味。

传统发酵食品中微生物的构成不仅影响了产品的风味品质，同时其含有的一些条件致病菌亦可能存在一定安全隐患，因而对传统发酵食品的微生物多样性进行解析则显得尤为重要。国内研究人员对腊鱼中微生物进行了多项研究，且大多采用纯培养的手段并从中检测出多种微生物，如酵母菌^[3,4]、乳酸菌^[5-7]、葡萄球菌^[8]和微球菌^[9]等。由于纯培养技术的局限性，一些非纯培养的手段逐渐被应用到腊鱼微生物研究中，吴燕燕采用 MiSeq 测序技术研究了腌干鱼在不同加工阶段的细菌多样性，发现拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和变性菌门 (Proteobacteria) 为腌干鱼加工过程主要微生物^[10]；钱茜茜采用宏基因组技术对不同加工阶段腌干鱼中细菌多样性进行了研究，发现整个加工体系主要微生物亦为 Bacteroidetes、Firmicutes 和 Proteobacteria^[11]。然而目前有关恩施地区产腊鱼微生物多样性的研究尚未见报道。

鉴于恩施特殊的地理环境与当地腊肠制作工艺的开放性与特殊性，本研究采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 与 MiSeq 高通量测序技术相结合的方法对该地生产的腊鱼样品中细菌多样性进

行了全面解析，以期为提高恩施地区腊鱼品质的稳定性和安全性提供一定数据支撑。

1 材料与方法

1.1 主要材料与设备

主要试剂：尿素、聚丙烯酰胺、N,N-亚甲基二丙烯酰胺、过硫酸铵、冰醋酸、甲醛、硝酸银、乙醇和十六烷基三甲基溴化铵购于国药集团化学试剂有限公司；QIAGEN DNeasymericon Food Kit 提取试剂盒，购于德国 QIAGEN 公司；10×PCR Buffer、dNTPs Mix、DNA 聚合酶、pMD18-T vector 和 SolutionI，宝生物工程 (大连) 有限公司；Loading buffer、DL2000 和 DL15000 DNA Marker，宝日医生物技术 (北京) 有限公司；2×PCR mix，购于南京诺唯赞生物科技有限公司；Axygen 清洁试剂盒，购于北京科博汇智生物科技发展有限公司；大肠杆菌 Top10 感受态细胞，本实验室制备。引物 338F/806R (正向引物中加入 7 个核苷酸标签)、ALL-GC-V₃F/ALL-V₃R、ALL-V₃F/ALL-V₃R 和 M13F (-47) /M13R (-48) 购于武汉天一辉远生物科技有限公司合成。各引物序列如表 1 所示。

表 1 引物名称和序列信息

Table 1 Primer name and sequence information

引物名称	序列 (5'-3')	参考文献
338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCA	[12]
806R	GGACTACHVGGGT	
ALL-GC-V ₃ F	CGCCCGGGCGCGCCCGGGCGGCCCGGGGCACCGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG	[13]
ALL-V ₃ R	ATTACCGCGGCTGCTGG	
ALL-V ₃ F	CCTACGGGAGGCAGCAG	
M13F (-47)	CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC	[14]
M13R (-48)	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	

主要设备：HBM-400B 拍击式无菌均质器，天津市恒奥科技发展有限公司；5810R 台式高速冷冻离心机，德国 Eppendorf 公司；ND-2000C 微量紫外分光光度计，美国 Nano Drop 公司；DYY-12 电泳仪，北京六一仪器厂；Veriti™ 96 孔梯度 PCR 扩增仪，美国 AB 公司；DCode™ System，美国 Bio-Rad 公司；UVPCDS8000 凝胶成像分析系统，美国 BIO-RAD 公司；MiSeq PE300 高通量测序平台，美国 Illumina 公司；R920 机架式服务器，美国 DELL 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品采集

从湖北省恩施市舞阳坝菜市场 (109.47 °N, 30.3 °E) 采集 5 个腊鱼样品分别置于无菌采样袋中低温运回实验室。只有符合下列条件的样品才可纳入采集的范围：(1) 腊鱼由草鱼制作；(2) 腊鱼无肉眼可见杂质、寄生虫和虫卵；(3) 腊鱼无病变、霉变和腐败等腐败变质现象；(4) 腊鱼的制作地点需在恩施市范围内。

1.2.2 样品前处理及宏基因组 DNA 提取

取 25 g 切碎的腊鱼加入 225 mL 无菌生理盐水后置于拍击器中拍击 3 min，取出置于冷冻离心机中 300 r/min 离心 10 min 保留上清液，上清液以 10000 r/min 离心 10 min 以便收集菌体，然后使用商业试剂盒提取

腊鱼样品微生物宏基因组 DNA。

1.2.3 基因组 DNA 检测

使用 1%的琼脂糖凝胶电泳以 DL15000 Maker 为参照查看是否扩增出清晰明亮大小合适的目的条带。然后以无菌超纯水为参照,取 1 μL 提取 DNA 置于微量紫外分光光度计检测口检测其 $\text{OD}_{260/280}$ 是否在 1.8~2.0 之间并确定各样品 DNA 浓度。用无菌超纯水将检测合格的样品宏基因组 DNA 浓度统一稀释至 30 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 备用。

1.2.4 细菌 DGGE 指纹图谱分析

细菌 PCR 扩增时使用引物对为 ALL-GC-V₃F/ALL-V₃R, 扩增体系中各试剂添加量及循环条件参照文献 15 中的方法略做改动: 细菌 PCR 扩增体系为 50 μL , 模板量为 1 μL , 退火温度 (T_m) 为 55 $^{\circ}\text{C}$ 。扩增结束后使用 1.2.2 中的方法检测扩增效果。在检测合格的体系中加入 6 μL Loading buffer 混匀置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。DGGE 凝胶中变性剂范围为 35%~52%, 待电泳槽中缓冲溶液的温度升至 60 $^{\circ}\text{C}$ 时在每个胶孔中加入 10 μL 混有 Loading buffer 的 PCR 产物, 先 120 V 电泳 76 min 使样品穿过上层胶后 80 V 维持 13 h 然后采用银染法染色。取优势条带回收溶液 2 μL 为模板进行 PCR 扩增, PCR 扩增体系为 25 μL : 正反向引物 ALL-V₃F/ALL-V₃R 各 0.5 μL , 2 \times PCR mix 12.5 μL , 剩余体积用无菌超纯水补齐。扩增循环条件及检测方法同上。参照杨春丽的方法将清洁后的扩增产物连接 PMD18-T 载体^[16], 并采用热激法^[17]将连接产物导入大肠杆菌 Top10 中, 挑选阳性克隆送去测序。

1.2.5 细菌 MiSeq 高通量测序分析

首先对细菌 16s rDNA 进行 PCR 扩增, 扩增方法参照文献 18 中所描述的进行操作。扩增合格的 DNA 使用干冰寄至上海美吉生物医药科技有限公司进行 MiSeq 高通量测序。参照蔡宏宇^[19]的方法对返回的序列进行质量控制并根据核苷酸标签 (barcode) 区分序列来源。然后利用 QIIME (v1.7.0) 分析平台^[20]对序列进行生物信息学分析: 采用 UCLUST 法^[21]划分分类操作单元 (Operational taxonomic units, OTU), 使用 RDP (Ribosomal Database Project)^[22]和 Greengenes^[23]数据库对 OTU 中各代表性序列进行同源性比对确定其微生物分类地位, 使用超 1 (Chao1) 指数和香浓 (Shannon) 指数分析腊鱼样品中细菌多样性。

1.2.6 多元统计学分析

使用 BioEdit 7.0.9 和 Mega7.0 处理 DGGE 序列并绘制系统发育树, 使用 OriginPro 2017 软件绘制图形。

2 结果与讨论

2.1 细菌 DGGE 指纹图谱分析

PCR-DGGE 技术可有效区分长度相同但碱基存在差异的序列从而直观反映样品中微生物多样性及各样品中微生物差异^[24]。本研究首先采用 PCR-DGGE 技术对恩施腊鱼样品中细菌多样性进行研究, 分析结果如图 1 所示。

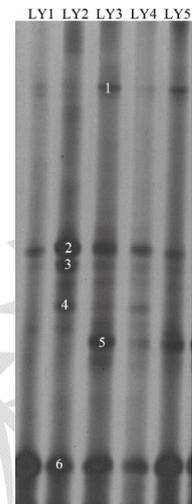


图 1 细菌 DGGE 指纹图谱

Fig.1 The DGGE fingerprint of bacteria

注: 条带 1~条带 6 分别对应 ALY1~ALY6。

由图 1 可知, 在 DGGE 指纹图谱中 5 个样品呈现出明亮不一的条带, 其中条带 ALY2 和条带 ALY6 为所有样品中共有条带且条带较明亮, 说明 ALY2 和 ALY6 为样品中共有细菌且含量较高; 条带 ALY1、ALY3、ALY4 和 ALY5 为某些样品中特有条带, 且在不同样品中条带亮度不同, 说明各样品中都含独特细菌且同种细菌在不同样品间含量存在差异。值得一提的是, 样品 LY1 中条带数量和亮度明显低于其他样品, 说明该样品中细菌丰度和多样性均不及其他样品。本研究进一步将 6 条轮廓清晰的优势条带回收后扩增的序列与数据库进行比对, 结果如图 2 所示。

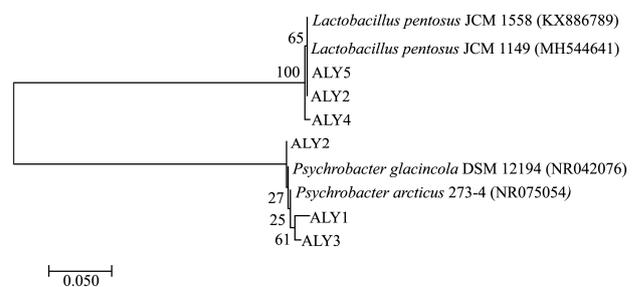


图 2 优势条带序列系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of dominant band sequences

由图 2 可知, 条带 ALY1、ALY2 和 ALY3 与北极冷杆菌 (*Psychrobacterarcticus*) 和水栖冷杆菌 (*Psychrobacterglacincola*) 形成一个聚类, 而 ALY4、

ALY5 和 ALY6 与植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 和戊糖乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus*) 形成一个聚类。由此可见, 虽然利用 PCR-DGGE 技术无法将各条带鉴定到种水平, 究其原因可能与引物扩增区域较短有关, 但不难发现腊鱼样品中的微生物以嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*) 和乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 为主。曾令彬采用传统微生物学手段对腊鱼加工中微生物进行分离鉴定, 发现其优势微生物菌群为乳酸菌、微球菌、葡萄球菌和酵母菌^[9], 其研究结论与本研究存在一定的差异性, 这可能是由于原料种类、地域以及传统微生物学手段的限制等因素造成的。值得一提的是, 王建建研究发现野生银鲴消化道内主要菌群为嗜冷菌属 (*Psychrobacter*), 而养殖银鲴消化道主要菌群为不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[25]。此外, 杨红玲研究发现石斑鱼肠道原籍 *Psychrobacter* sp. SE6 能抑制多种常见病原菌的生长, 且能显著提高石斑鱼饵料利用率并增加其免疫力^[26]。由此可见, 恩施地区腊鱼样品中的嗜冷杆菌属可能主要来源于原料本身。

2.2 细菌 MiSeq 高通量测序分析

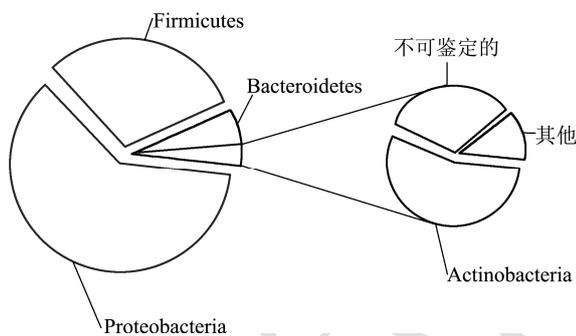


图3 细菌门水平平均相对含量饼图

Fig.3 The pie chart of average relative content of bacterial phyla

相对于基于纯培养的传统微生物手段以及 DGGE 指纹图谱技术, 以 Illumina MiSeq 为代表的第二代高通量测序技术可检测到样品中低丰度的菌群, 从而能够更加真实准确的反映样本生物多样性^[27]。本研究采用 MiSeq 高通量测序技术从 5 个样品中共检测到 84721 条合格序列, 采用 α 多样性对序列进行分析时发现在测序深度为 29910 条序列时 LY1、LY2、LY3、LY4 和 LY5 的 Chao1 指数分别为 574、1085、1149、843 和 1096, Shannon 指数分别为 2.65、4.35、6.62、5.76 和 4.86, 说明 LY1 中的细菌总数和丰富度最低而 LY3 中的最高, 这与 DGGE 分析结果相同。在 97% 的相似度下可将质检合格的序列划分至 6733 个 OTU 中, 从每个 OTU 中挑选代表性序列与数据库比对后

发现, 所有样品共检测出 18 个细菌门, 将相对含量大于 1.0% 的定义为优势菌门, 各优势菌门分析结果如图 3 所示。

由图 3 可知, 腊鱼样品中优势细菌门主要为变形菌门 (Proteobacteria)、硬壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和放线菌门 (Actinobacteria), 其平均相对含量分别为 61.29%、30.21%、5.34% 和 1.74%。值得一提的是 LY4 中 Firmicutes 的相对含量高达 80.20%, LY2 中 Firmicutes 的相对含量仅为 6.14%, LY1 和 LY3 中 Proteobacteria 和 Firmicutes 的相对含量较为相近。吴燕燕^[10]和钱茜茜^[11]的研究均表明腌干鱼加工过程中主要微生物为 Bacteroidetes、Firmicute 和 Proteobacteria, 其研究结果与本研究相同。

本研究进一步从属水平上分析细菌多样性, 发现从 LY1、LY2、LY3、LY4 和 LY5 中检测到的细菌属数量分别为 27 个、227 个、133 个、136 个和 53 个, 仅有 3.93% 的序列不能鉴定到属水平。所有细菌属中平均相对含量大于 0.1% 的有 32 个, 大于 1.0% 的有 8 个, 现将平均相对含量大于 1.0% 的细菌属定义为优势菌属, 则各优势菌属分析结果如图 4 所示。

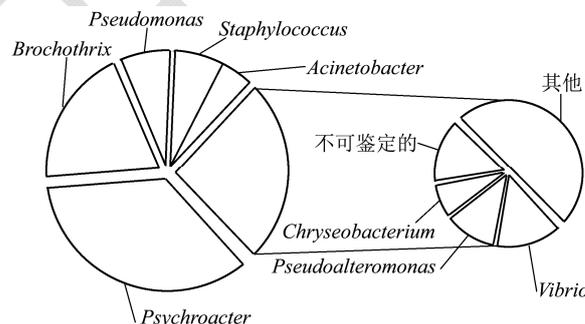


图4 优势细菌属平均相对含量饼图

Fig.4 The pie chart of average relative content of dominant bacteria genus

由图 4 可知, 恩施腊鱼中的优势细菌属及其平均相对含量分别为嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*, 35.70%)、环丝菌属 (*Brochothrix*, 19.74%)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*, 7.13%)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*, 7.12%)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*, 4.19%)、弧菌属 (*Vibrio*, 3.90%)、假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*, 3.09%) 和金黄杆菌属 (*Chryseobacterium*, 1.98%), 这些优势细菌属的累积平均相对含量高达 82.84%, 但 *Pseudomonas*、*Acinetobacter*、*Vibrio* 和 *Chryseobacterium* 在 LY1 中没有检出, *Chryseobacterium* 在 LY5 中亦没有检出。作为兼性厌氧的革兰氏阳性杆菌, 环丝菌属 (*Brochothrix*) 细菌可以在低氧和 4 °C 生长繁殖, 是冷却猪肉中主要的一种污染菌^[28]。本研究采集腊鱼样

品中亦含有 7.12% 的葡萄球菌 (*Staphylococcus*), 该菌广泛的分布于自然环境且多数为非致病菌, 但作为人类化脓感染中最常见的病原菌, 隶属于该属的金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 可在加工、贮藏和运输过程中对食品造成污染^[29]。值得一提的是, 高通量测序技术亦检测出样品中含有 *Lactobacillus* (平均相对含量为 0.83%) 而 DGGE 技术未检测出 *Brochothrix*、*Pseudomonas* 和 *Staphylococcus* 等优势菌属以及其他相对含量更低的细菌属, 这可能是由于 DGGE 扩增引物、变性剂范围以及该技术的检测限较低等因素引起的。本研究进一步对 OTU 在各样品中出现次数进行了统计, 结果如图 5 所示。

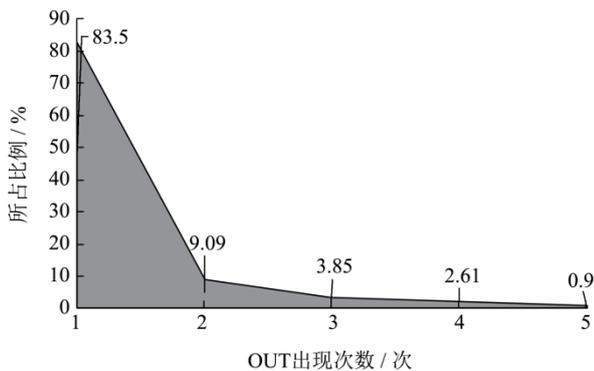


图 5 OTU 出现次数统计

Fig.5 Distribution of OTU as a function of their prevalence

由图 5 可知, 只出现 1 次的 OTU 有 5622 个, 占 OTU 总数的 83.50%, 其所包含的序列有 19170 条, 占总序列数的 9.43%; 在 5 个样品中均存在的 OTU 有 64 个, 仅占 OTU 总数的 0.90%, 但其所包含的序列有 127335 条, 占总序列数的 62.67%, 这说明 5 个腊鱼样本中含有大量共有细菌菌群。本研究将出现次数为 5 次且平均相对含量大于 1.0% 的 OTU 定义为核心优势 OTU, 其分析结果如图 6 所示。

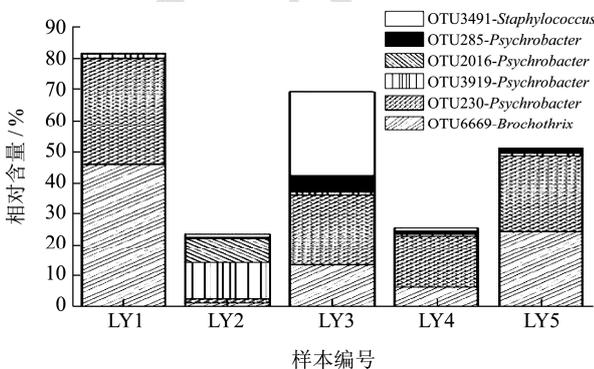


图 6 核心优势菌 OTU 含量分布

Fig.6 The bar chart of core OTUs

由图 6 可知, 样品中核心优势 OTU 及其平均相对含量分别为 OTU230(19.65%)、OTU6669(18.27%)、OTU3491 (5.84%)、OTU3919 (3.06%)、OTU2016

(1.71%) 和 OTU285 (1.59%), 其中 OTU230、OTU3919、OTU2016 和 OTU285 隶属于 *Psychrobacter*, OTU6669 隶属于 *Brochothrix*, OTU3491 隶属于 *Staphylococcus*, 说明 *Psychrobacter*、*Brochothrix* 和 *Staphylococcus* 为恩施腊鱼样品中核心优势细菌属。由图 6 亦可知, LY1 中 OTU6669 (*Brochothrix*) 和 LY3 中 OTU34919 (*Staphylococcus*) 的相对含量明显高于其他样品, 而 LY2 和 LY4 中核心优势 OTU 的累积平均相对含量要低于 LY1、LY3 和 LY5, 说明核心优势 OTU 在各样品中的相对含量存在差异。

3 结论

采用 PCR-DGGE 和 MiSeq 高通量测序技术相结合的方法对恩施地区腊鱼细菌多样性进行了解析, 结果发现恩施地区腊鱼中的优势细菌主要由隶属于 Proteobacteria 的 *Psychrobacter* 及隶属于 Firmicutes 的 *Brochothrix* 构成, 两者的相对含量占到了细菌总数的 55.44%。虽然不同腊鱼样品中含有较为独特的细菌种群, 但其含有 62.67% 的核心细菌类群, 且核心细菌类群主隶属于 *Psychrobacter*、*Brochothrix* 和 *Staphylococcus*。通过本研究的开展, 对恩施地区腊鱼品质的稳定性和安全性的提升提供了一定数据支撑。

参考文献

- [1] 汪川义,赵采玲,罗菊英.恩施州气象站雾日变化趋势及原因分析[J].长江流域资源与环境,2017,26(3):454-459
WANG Chuan-wei, ZHAO Cai-ling, LUO Ju-ying, Analysis of the foggy trend and causes of the weather station in Enshi prefecture [J]. Resources and Environment of the Yangtze River Basin, 2017, 26(3): 454-459
- [2] 罗菊英,闫永才,李灿,等.恩施自治州气候资源分析及旅游适宜性区划[J].长江流域资源与环境,2013,22(Z1):39-45
LUO Ju-ying, YAN Yong-cai, LI Can, et al. Analysis of climate resources and tourism suitability zoning in Enshiautonomous prefecture [J]. Resources and Environment in the Yangtze Basin, 2013, 22(Z1): 39-45
- [3] 刘英丽,李文采,张慧娟,等.传统发酵食品产香酵母菌的筛选及其发酵产香特性研究[J].中国食品学报,2015,15(4):63-70
LIU Ying-li, LI Wen-cai, ZHANG Hui-juan, et. Study on the screening of flavoring yeast from traditional fermented foods and its fermentation characteristics [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(4): 63-70
- [4] 梁慧,马海霞,李来好.腊鱼产香酵母菌的筛选及其发酵产香特性初步研究[J].食品工业科技,2011,32(12):213-217

- LIANG Hui, MA Hai-xia, LI Lai-hao. Screening of flavoring yeast from larvae and preliminary study on its fermentation characteristics [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(12): 213-217
- [5] 杜斌,吴文能,王继玥,等.侗族传统腌鱼中乳酸菌的分离鉴定与生物学特性[J].江苏农业科学,2018,46(7):185-188
- DU Bin, WU Wen-neng, WANG Ji-zhen, et al. Isolation, identification and biological characteristics of *Lactic acid* bacteria in traditional Chinese salted fish [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(7): 185-188
- [6] Nie X, Lin S, Meng X. Identification of two selected lactic acid bacteria strains isolated from dry-cured fish and their behaviors in fermented fish sausage [J]. Journal of Fisheries Sciences, 2016, 10(1): 47-52
- [7] 谢静,熊善柏,曾令彬,等.腊鱼加工中的乳酸菌及其特性[J].食品与发酵工业,2009,35(6):32-36
- XIE Jing, XIONG Shan-bai, ZENG Ling-bin, et al. Lactic acid bacteria and their characteristics in processing of bacon [J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(6): 32-36
- [8] 杜斌,吴文能,王继玥,等.侗族传统腌鱼中葡萄球菌的分离鉴定与生物学特性[J].贵州农业科学,2017,45(4):116-119
- DU Bin, WU Wen-neng, WANG Ji-zhen, et al. Isolation, identification and biological characteristics of *Staphylococcus* in traditional salted fish of Yi nationality [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2017, 45(4): 116-119
- [9] 曾令彬,熊善柏,王莉.腊鱼加工过程中微生物及理化特性的变化[J].食品科学,2009,30(3):54-57
- ZENG Ling-bin, XIONG Shan-bai, WANG Li. Changes of microorganisms and physicochemical properties during processing of brass fish [J]. Food Science, 2009, 30(3): 54-57
- [10] 吴燕燕,钱茜茜,李来好,等.基于 Illumina MiSeq 技术分析腌干鱼加工过程中微生物群落多样性[J].食品科学,2017,38(12):1-8
- WU Yan-yan, QIAN Wei, LI Lai-hao, et al. Analysis of microbial community diversity during processing of pickled dried fish based on Illumina MiSeq technology [J]. Food Science, 2017, 38(12): 1-8
- [11] 钱茜茜.腌干鱼加工过程微生物群落多样性分析及产胺菌的控制技术研究[D].上海:上海海洋大学,2016
- QIAN Wei. Analysis of microbial community diversity during processing of pickled dried fish and control technology of amine producing bacteria [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016
- [12] 沈馨,尚雪娇,董蕴,等.基于 MiSeq 高通量测序技术对 3 个孝感凤窝酒曲细菌多样性的评价[J].中国微生态学杂志, 2018,30(5):525-544
- SHEN Xin, SHANG Xue-jiao, DONG Yun, et al. Evaluation of bacterial diversity of three Xiaogan Fengwokoji based on MiSeq high-throughput sequencing technology [J]. Chinese Journal of Microecology, 2018, 30(5): 525-544
- [13] Vanhoutte T, De P V, De B E, et al. Molecular monitoring of the fecal microbiota of healthy human subjects during administration of Lactulose and *Saccharomyces Boulardii*. [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2006, 72(9): 5990-5997
- [14] Oka K, Asari M, Omura T, et al. Genotyping of 38 insertion/deletion polymorphisms for human identification using universal fluorescent PCR [J]. Molecular and Cellular Probes, 2014, 28(1): 13-18
- [15] 夏围围,贾仲君.高通量测序和 DGGE 分析土壤微生物群落的技术评价[J].微生物学报,2014,54(12):1489-1499
- XIA Wei-wei, JIA Zhong-jun. Technical evaluation of soil microbial community by high-throughput sequencing and DGGE [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(12): 1489-1499
- [16] 杨春雨,王莲萍,王博,等.白桦 4 个 Dof 基因的克隆及序列分析[J].分子植物育种,2018,16(3):1-6
- YANG Chun-yu, WANG Lian-ping, WANG Bo, et al. Cloning and sequence analysis of four Dof genes in *Betula Platyphylla* [J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(3): 1-6
- [17] 魏春红,门淑珍,李毅.现代分子生物学实验技术[M].北京:高等教育出版社,2012
- WEI Chun-hong, MEN Shu-zhen, LI Yi. Modern molecular biology experimental techniques [M]. Beijing: Higher Education Press, 2012
- [18] 王玉荣,孙永坤,代凯文,等.基于单分子实时测序技术的 3 个当阳广椒样品细菌多样性研究[J].食品工业科技,2018, 40(2):108-112
- WANG Yu-rong, SUN Yong-kun, DAI Kai-wen, et al. Bacterial diversity of three Dangyang guangjiao samples based on single molecule real-time sequencing technology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 40(2): 108-112
- [19] 蔡宏宇,王艳,沈馨,等.常规食用调味面制品对青年志愿者肠道菌群多样性影响[J].食品工业科技,2017,39(21):289-294
- CAI Hong-yu, WANG Yan, SHEN Xin, et al. Effects of conventional edible seasoning products on intestinal flora diversity of young volunteers [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 39(21): 289-294

-
- [20] Caporaso J, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows integration and analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336
- [21] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461
- [22] Cole J R, Chai B, Farris R J, et al. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(1): 169-172
- [23] Desantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 5069-5072
- [24] Garofalo C, Bancalari E, Milanović V, et al. Study of the bacterial diversity of foods: PCR-DGGE versus LH-PCR [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 242(10): 24-36
- [25] 王 Jian-jian. 银鲳肠道菌群结构分析及潜在有益菌的筛选[D]. 上海海洋大学, 2015
WANG Jian-jian. Structural analysis of intestinal microflora of silver pomfret and screening of potential bacteria [D]. Shanghai Ocean University, 2015
- [26] 杨红玲, 马如龙, 孙云章. 石斑鱼肠道原籍嗜冷杆菌 (*Psychrobacter* sp.)SE6 作为益生菌的体内外评价[J]. *海洋学报(中文版)*, 2012, 34(2): 129-135
YANG Hong-ling, MA Ru-long, SUN Yun-zhang, et al. Assessment of *Psychrobacter* sp. SE6 from the gut of grouper (*Epinephelus coioides*) as a novel probiont *in vitro* and *vivo* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2012, 34(2): 129-135
- [27] 米其利, 李雪梅, 管莹, 等. 高通量测序在食品微生物生态学研究中的应用[J]. *食品科学*, 2016, 37(23): 302-308
MI Che-lin, LI Xue-mei, GUAN Ying, et al. Application of high-throughput sequencing in food microbial ecology research [J]. *Food Science*, 2016, 37(23): 302-308
- [28] Patange A, Boehm D, Bueno-Ferrer C, et al. Controlling *Brochothrix thermosphacta* as a spoilage risk using in-package atmospheric cold plasma [J]. *Food Microbiology*, 2017, 66(9): 48-54
- [29] Tong S Y C, Davis J S, Eichenberger E, et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(3): 603-661