

基于高通量测序的液态奶中微生物多样性研究

屠大伟¹, 张清平², 刘美艳³, 张巨凤³, 翁盈秋³

1. 重庆工商大学 环境与资源学院, 重庆 400067

2. 重庆市天友乳业股份有限公司, 重庆 400015

3. 重庆万标检测技术有限公司, 重庆 400714

摘要:目的 为探究不同液态奶样品中微生物的菌群组成和其多样性。方法 采用高通量测序技术对液态奶中细菌 16S rRNA 的 V₃-V₄ 区进行测序, 研究了四组液态奶样品在门水平和属水平的菌群结构。结果 四组样品中共有分类操作单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU) 数目为 119 个, 独有的 OTU 数分别占 15.0%、6.85%、8.86% 和 12.35%。在门水平, 厚壁菌门和变形菌门是四组液态奶的共有菌门, 其中 4 组样品中厚壁菌门的相对丰度分别为 38.9%、73.8%、20.9%、29.6%, 变形菌门的相对丰度分别为 46.9%、10.0%、28.0%、17.2%; 在属水平, 4 组液态奶中的优势菌属分别是芽孢杆菌属、短波单胞菌属; 芽孢杆菌属; *Cloacibacterium* 和寡养单胞菌属; 芽孢杆菌属、微杆菌属和异常球菌属。结论 四组样品在门水平的菌群组成基本相似。属水平上, 液态奶中含有的不动杆菌属、芽孢杆菌属和克雷伯氏菌属属于嗜冷菌, 这些菌属可以导致液态奶发生腐败变质等现象。这为今后探索液态奶中腐败菌防治措施提供重要依据。

关键词:高通量测序技术; 液态奶; 微生物多样性

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A doi: 10.16055/j.issn.1672-058X.2023.0001.003

Microbial Diversity in Liquid Milk Based on High Throughput Sequencing

TU Dawei¹, ZHANG Qingping², LIU Meiyan³, ZHANG Jufeng³, WENG Yingqiu³

1. School of Environment and Resources, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China

2. Chongqing Tianyou Dairy Co., Ltd., Chongqing 400015, China

3. Chongqing Wanbiao Testing Technology Co., Ltd., Chongqing 400714, China

Abstract: **Objective** This study aimed to explore the composition and diversity of microbial flora in different liquid milk samples. **Methods** High-throughput sequencing technology was used to sequence the V₃-V₄ region of bacterial 16S rRNA in liquid milk, and the bacterial community structure of four groups of liquid milk samples at the phylum and genus levels was studied. **Results** There were 119 Operational Taxonomic Units (OTUs) in the four groups of samples, and the unique OTUs accounted for 15.0%, 6.85%, 8.86%, and 12.35%, respectively. At the phylum level, Firmicutes and Proteobacteria were the common phyla of the four groups of liquid milk. The relative abundances of Firmicutes in the four groups of samples were 38.9%, 73.8%, 20.9%, and 29.6%, respectively. The relative abundances of Proteobacteria were 46.9%, 10.0%, 28.0%, and 17.2%, respectively. At the genus level, the dominant bacterial genera of Sample 1 were *Bacillus* and *Brevundimonas*, the dominant bacterial genus of Sample 2 was *Bacillus*, the dominant bacterial genera of Sample 3 were *Cloacibacterium* and *Stenotrophomonas*, and the dominant bacterial genera of Sample 4 were *Bacillus*, *Microbacterium* and *Deinococcus*. **Conclusion** It can be seen from the phylum level that the composition of bacteria in

收稿日期: 2021-03-05 修回日期: 2021-05-18 文章编号: 1672-058X(2023)01-0015-07

基金项目: 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项重点研发项目 (CSTC2017SHMS-ZDYFX0047)。

作者简介: 屠大伟 (1977—), 男, 正高级工程师, 博士研究生, 主要从事食品安全与检测教学及科研工作。

引用格式: 屠大伟, 张清平, 刘美艳, 等. 基于高通量测序的液态奶中微生物多样性研究[J]. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2023, 40(1): 15—21.

TU Dawei, ZHANG Qingping, LIU Meiyan, et al. Microbial diversity in liquid milk based on high throughput sequencing[J]. Journal of Chongqing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2023, 40(1): 15—21.

the four groups of samples was basically similar. Meanwhile, at the genus level, *Acinetobacter*, *Bacillus* and *Klebsiella* contained in liquid milk belong to psychrophilic bacteria, which can cause spoilage and deterioration of liquid milk. This research provides an important basis for exploring the prevention and control measures of spoilage bacteria in liquid milk in the future.

Keywords: high-throughput sequencing technology; liquid milk; microbial diversity

1 引言

牛乳因其营养丰富且易被人体吸收而成为人民日常生活中重要的营养来源。牛乳中含有丰富的营养物质,但在挤奶、原料乳的预处理、贮存以及运输等过程中处理不当会导致奶源中有害微生物的生长和繁殖,从而造成牛乳中营养物质的破坏,影响原料乳的品质以及食源性疾病的传播^[1]。

目前,常用于研究乳制品中微生物多样性的方法主要有常规细菌鉴定技术、免疫学检测技术、基因检测技术和全基因组测序技术^[2]等,传统的检测方法存在操作复杂,检测灵敏度低的现象^[3]。与传统方法相比,高通量测序技术可以高效、准确、全面地分析出不同被测样品的微生物菌落组成结构,同时可以分析一些不可培养且丰度低的微生物^[4]。基于此,本文采用高通量测序技术。目前,16S rDNA 测序技术已成为研究微生物菌群结构及其多样性的重要方式^[4-8]。张敏^[33]等采用 16S rDNA 高通量测序方法比较了新疆西北部地区乳制品中微生物的多样性,通过对新疆 2 个地区的 7 种乳制品进行高通量测序分析发现,7 种乳制品在门水平的优势菌门是厚壁菌门和变形菌门,而酸奶和原奶中的丰度不同,属水平上的差异较大。同时还发现不同动物来源的原奶和酸奶的微生物多样性也存在着显著的差异。姚宇秀^[3]等采用 16S rDNA 高通量测序技术对原料乳及其采集过程中的相关设备以及奶牛的不同部位进行样本的分析,结果发现,输入管路外侧和盛装原料乳的空贮罐中有金黄色葡萄球菌的存在。布仁其其格^[9]等通过 16S rRNA 基因序列对酸奶奶传统发酵过程中细菌群落结构演替变化,结果表明,在发酵初期细菌多样性最高,且在 72 h 时细菌丰度最高,门水平的优势菌门为厚壁菌门和变形菌门,属水平的优势细菌属为乳杆菌属。

本研究的目的是利用高通量测序方法对重庆地区的不同液态奶的细菌菌群结构和组成进行分析比较,以期探索液态奶中的腐败菌,实现对液态奶中有害菌的防治,从而实现提高液态奶的品质。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

液态奶,重庆市天友乳业股份有限公司的 4 个牧场无菌生理盐水,北京陆桥技术股份有限公司;植物基因组

DNA 提取试剂盒(TSP101-200),TSINGKE;通用引物 16S, TSINGKE; I-5TM 2 × High-Fidelity Master Mix (TP001), TSINGKE;高纯度低电渗琼脂糖(TSJ001),TSINGKE;DNA 凝胶回收试剂盒(GE0101-200),TSINGKE;DL2000 DNA Marker(TSJ011-500),TSINGKE。

VITEK2 COMPACT 全自动细菌鉴定及药敏分析系统,法国生物梅里埃公司;XH-B 旋涡混合器,常州翔天实验仪器厂;BSC-1100A2-X 生物安全柜,济南鑫贝西生物技术有限公司;DK-98-IIA 恒温水浴锅,北京市泰和润仪器有限公司;DW-86W50 超低温冰柜,浙江捷盛制冷科技有限公司;PD100A 高压灭菌锅,致微(厦门)仪器有限公司;DHP-9272 电热恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;高通量测序仪 Illumina Hiseq 2500,美国因美纳公司;离心机 Legend Micro17,赛默飞世尔;电泳槽 JYDF,北京君意东方电泳设备有限公司;PCR 仪 2720 thermal cycler,美国应用生物系统公司;电泳仪 JY300C,北京君意东方电泳设备有限公司;水浴锅 DFD-700,北京中兴伟业;凝胶成像仪 JY04S-3C,北京君意东方电泳设备有限公司;板式离心机 L550,cence 湘仪。

2.2 方法

2.2.1 样品采集

采集来自天友乳业重庆周边 4 个不同牧场的原料乳(Sample 1、Sample 2、Sample 3、Sample 4)。所有的样品经无菌容器密封好后放入车载冰箱运回实验室,样品保存在-80℃超低温冰箱,待试验。

2.2.2 DNA 的提取、扩增和测序

取 40 mL 原料乳样本,6 000 r/min 下 4℃离心 20 min,用灭菌脱脂棉去掉乳脂层,弃去上清液,加入无菌生理盐水至 10 mL,10 000 r/min 高速冷冻离心 10 min,用 1 mL 蔗糖缓冲液冲洗两次,后悬浮 400 μL 蔗糖缓冲液及 2U 变溶菌素和 800 μg 溶菌酶,37℃培养 1 h。选用 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')和 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')对细菌 16S rRNA V₃-V₄ 区进行 PCR 扩增。

PCR 反应体系为:12.5 μL I-5TM 2×High-Fidelity Master Mix,1 μL 10 mmol/L Primer A,1 μL 10 mmol/L Primer B,加入模板 DNA,补 ddH₂O 至 25 μL。用琼脂糖凝胶电泳检测,利用凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物。

PCR 扩增程序为:98℃预变性 2 min;循环数(25~35 次)×(95℃变性 10 s,45~68℃退火 10~15 s,72℃

延伸 5~15 s);72 ℃ 终延伸 1~5 min;4 ℃ 冷却。

使用 Illumina Hiseq 2500 测序,由北京擎科生物科技有限公司重庆分公司完成。

2.3 数据处理

基于 Illumina Hiseq 2500 测序平台,使用 Flash 软件对每个样品的 PE Reads 进行拼接,得到的序列即为原始序列,再通过 Trimmomatic 软件对原始序列进行优化处理,得到较高质量的优化序列,最后通过 UCHIME 软件鉴定并去除嵌合体序列,得到最终的有效序列。

3 结果与分析

3.1 测序数据统计及结果分析

为了获得准确、高质量的生物信息分析结果,通过测序获得的原始数据需要进行优化处理^[10]。如表 1 所示。

表 1 样品测序数据统计					
Table 1 Sample sequencing data statistics					
样品	PE Reads /条	原始序列 数/条	优化序列 数/条	有效序列 数/条	平均序列 长度/bp
1	48 045	47 311	45 778	42 712	426
2	80 148	78 788	76 050	71 218	427
3	49 563	48 529	46 806	39 679	421
4	69 425	67 948	65 184	58 651	423
合计	24 7181	242 576	233 818	212 260	1 697

从表 1 中可以看出,4 个样品总计测得原始序列条数为 242 576 条,将低质量的序列过滤后得到的优化序列数总计 233 818 条,再将上述序列进行冗余处理,最终得到的有效序列数为 212 260 条。

图 1 为有效序列的长度分布图,从图 1 中可以看出,大部分的序列均分布在 400~450 bp 之间,且 430~440 bp 之间的序列最多。从序列长度的分布可以看出,与 16S rDNA V3-V4 区序列长度大致吻合^[11]。

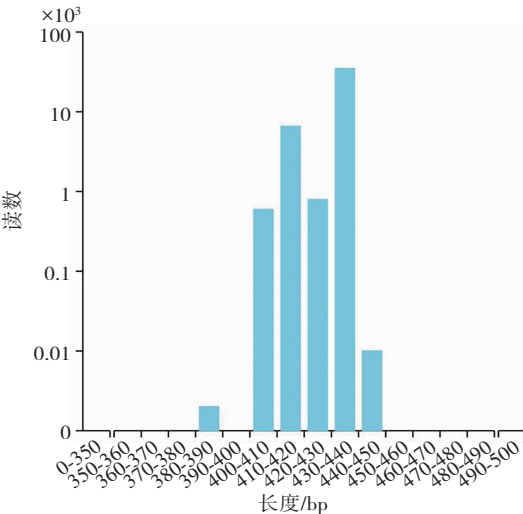
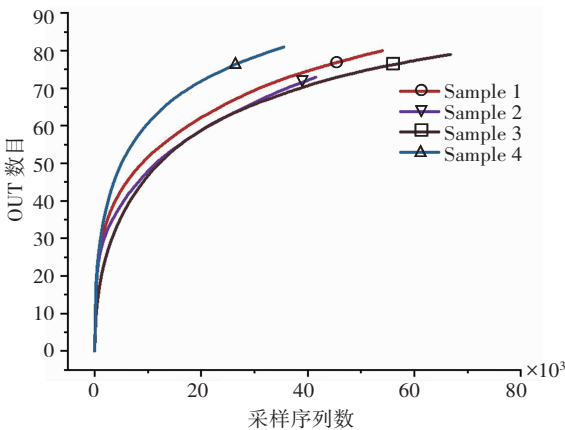


图 1 有效序列长度分布

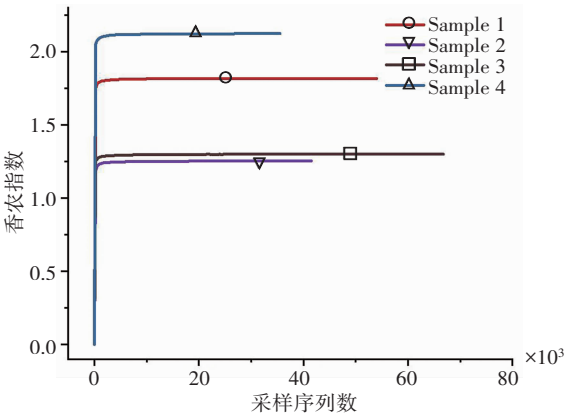
Fig. 1 Distribution of effective sequence length
从样本中随机抽取一定数量的序列后,对获得的

序列所代表的物种数目进行统计,以物种数目和序列数构建的一条曲线为样品的稀释曲线^[12]。稀释曲线可以验证测序数据量是否可以反映样品中的物种多样性,并间接反映样品的测序深度和物种的丰富度^[12-13]。若在一定范围内,随着序列数的增加,曲线表现出急剧上升的趋势则反映样本中仍有大量物种被发现;当稀释曲线趋于平缓则表示样本量足够充分^[14]。图 2(a)是样品中稀释曲线图,从该图中可以看出,随着样本序列数的增加,每个样品中 OTU 数目增加,当 OTU 数目到达一定数量后,曲线趋于平缓,这表明实验中所得序列数基本可以反映出每组样品中的菌群结构。同时,可以看出 Sample 4 中 OTU 数目最多,Sample 1 次之,Sample 2 和 Sample 3 中 OTU 数目相对较少。

香农指数曲线可以体现出各样品在不同测序数量时样本中微生物多样性的指数,随着样本序列数的增加,曲线呈上升趋势^[30];当曲线趋于平坦时,说明测序数据量足够大,OTU 种类不会在随着序列量的增长而增长^[31]。图 2(b)是样品中香农指数曲线,从该图中可以看出,随着测序样本数量的增加曲线趋于平缓,这说明本研究的测序深度是可以满足分析要求^[15]。



(a) 样品稀释曲线



(b) 样品香农指数曲线

图 2 样品的稀释曲线和香农指数曲线
Fig. 2 Dilution curve and Shannon index curve of samples

3.2 样品 OTU 统计分析

一般情况下,将相似性高于 97% 的不同 16S rDNA 序列定义为一个 OTU,每一个 OTU 通常被视为一个微生物物种^[32]。图 3 展示了不同样品的 OTU 数。从图 3 中可以看出,各样品的 OTU 数相差不大,均在 70~85 个之间,Sample 1~Sample 4 各样品中 OTU 个数分别为 80,73,79,81;四个样本中总共的 OTU 数目为 119 个。

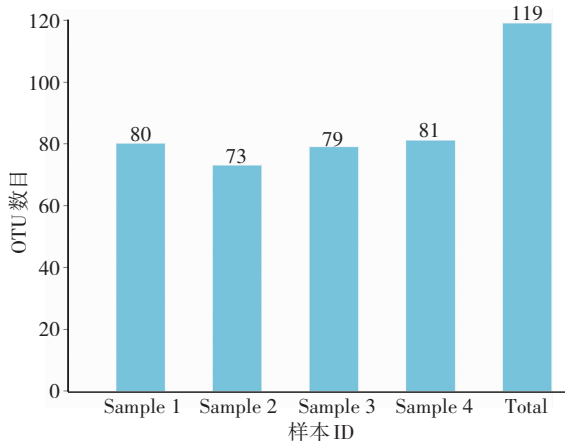


图 3 样品中 OTU 数目的分布图

Fig. 3 Distribution of the number of OTUs in different samples

Venn 图体现了不同样品之间微生物群落的相似性和差异性^[4],如图 4 所示。从图 4 中可以看出,4 个样品中共有 OTU 数目为 43 个,每个样品特有的 OTU 个数分别为:12,5,7,10,分别占各样本中 OTU 数量的 15%、6.85%、8.86% 和 12.35%;Sample 1 与 Sample 2、Sample 1 与 Sample 3、Sample 2 与 Sample 4、Sample 3 与 Sample 4 样品之间共有,且其余样品不具有的 OTU 数目较少,分别为 2,3,2,3。因此,可以看出各样品之间微生物群落没有显著的差异性。

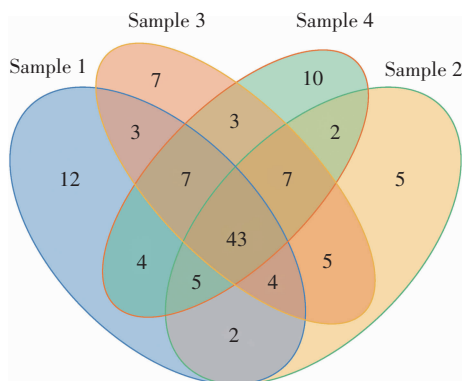


图 4 样品中 OTU 数目的 Venn 图

Fig. 4 Venn diagram of the number of OTUs in different samples

3.3 样品间 α 多样性的分析

α 多样性分析体现了单个样品内部物种的丰富度和多样性^[16],通常可以通过 ACE 指数、Chao1 指数、

Simpson 指数以及 Shannon 指数等反映^[17,18]。其中,ACE 指数和 Chao1 指数用来反映微生物群落的丰富度^[18],ACE 指数和 Chao1 指数越大表示样品中微生物群落的丰富度越大^[32];Shannon 指数和 Simpson 指数都是用来反映微生物群落的多样性^[30],微生物群落的多样性与 Shannon 指数呈正相关,与 Simpson 指数呈负相关^[31]。

对不同样本在 97% 一致性阈值下的 α 多样性指数进行统计和分析^[4,19-20],结果见表 2。从表 2 中可以看出,所有样品的覆盖率 (Coverage) 均大于 0.99,说明本次研究所建立的数据库可信度较高,数据的真实性较好,能够有效地反映样品中微生物菌群的多样性。Sample 2 样品中 ACE 指数和 Chao1 指数最高,表明该样品中菌群的丰富度较高;而 Sample 3 中 ACE 指数和 Chao1 指数最低,说明该样品中菌群的丰富度较低。同时,Sample 4 样品中其 Simpson 指数最小,Shannon 指数最大说明该样品中菌群的多样性最大;Sample 1 次之,Sample 2 样品中菌群的多样性最低。

表 2 样品间 α 多样性指数统计

Table 2 Statistics of α diversity index among samples

样品编号	OTU	ACE	Chao1	Simpson	Shannon	Coverage
1	80	107.907 0	89.066 7	0.230 7	1.818 1	0.999 7
2	73	113.814 7	101.875 0	0.529 4	1.254 1	0.999 5
3	79	89.990 7	87.750 0	0.351 8	1.300 6	0.999 8
4	81	92.578 5	90.545 5	0.165 4	2.123 9	0.999 6

3.4 液态奶样品间基于门水平的菌群结构分析

图 5 是液态奶各样品中基于门水平的菌群结构分布比例图。从图中可以看出,液态奶样品中的 10 个细菌门被鉴定出,分别是异常球菌-栖热菌门 (*Deinococcus-Thermus*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、硝化螺旋菌门 (*Nitrospirae*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、蓝藻细菌门 (*Cyanobacteria*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、放线细菌门 (*Actinobacteria*)、*Patescibacteria*、绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 和 *Epsilonbacteraeota*。从图 5 中可以看出各样品之间的优势菌门基本相同,但相对丰度差异较大。Sample 1 中的主要菌群是厚壁菌门、变形菌门和拟杆菌门分别占 38.9%、46.9% 和 14.0%;Sample 2 中的主要菌群是厚壁菌门、变形菌门和放线细菌门分别占 73.8%、10.0% 和 13.1%;Sample 3 中的主要菌群是厚壁菌门、变形菌门和拟杆菌门分别占 20.9%、28.0% 和 50.1%;Sample 4 中的主要菌群是放线细菌门、厚壁菌门和异常球菌-栖热菌门分别占 30.0%、29.6% 和 22.8%。

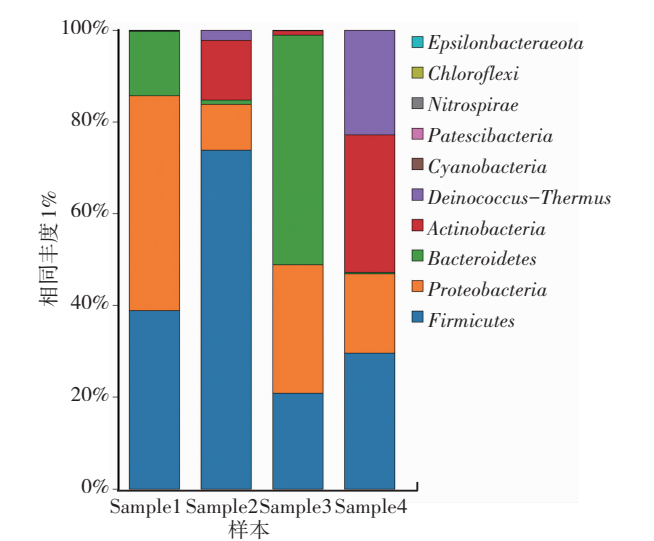


图 5 基于门水平各样品的菌群结构分析
Fig. 5 Analysis of flora structure of each sample based on phylum level

由此可见,每组液态奶中门水平的菌群结构差异性不大,厚壁菌门和变形菌门是四组液态奶的共有菌门,这与张敏等^[33]的研究中乳制品的菌群结论相同。

物种丰度聚类热图分析是通过颜色变化与相似程度来反应二维矩阵或表格中的数据信息,并呈现出群落物种的组成信息,表明了液态奶不同样品间不同细菌门的相对丰度及细菌组成的差异性和样品间的相似性^[10]。采用物种丰度聚类热图分析液态奶样品中含量前 10 个菌门和 4 个样品之间的交互关系,见图 6。

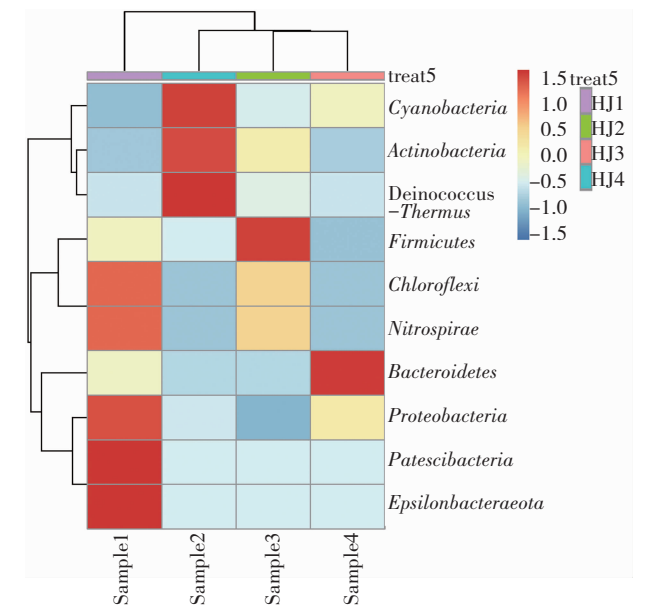


图 6 基于门水平各样品的物种丰度聚类热图
Fig. 6 Species abundance clustering heatmap for each sample at phylum level

从图 6 中可知,不同样品间门水平具有一定的丰度,且各样品的菌群组成具有一定的差异性和相似性。同时,根据丰度聚类热图可以看出样品间门水平的聚

类关系,即 4 组样品均聚在一起,说明四组样品间的丰度相似,其中 Sample 2 和 Sample 4 的相似度较高些,Sample 1 与其余三组在门水平上的相似度较低。

3.5 液态奶样品间基于属水平的菌群结构分析

图 7 是液态奶各样品中基于属水平的聚类树柱状图。从图中可以看出,液态奶中的 10 个菌属信息被鉴定出,分别是 *Olivibacter*、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、异常球菌属(*Deinococcus*)以及短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、*Cloacibacterium*、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和其他未分类菌。

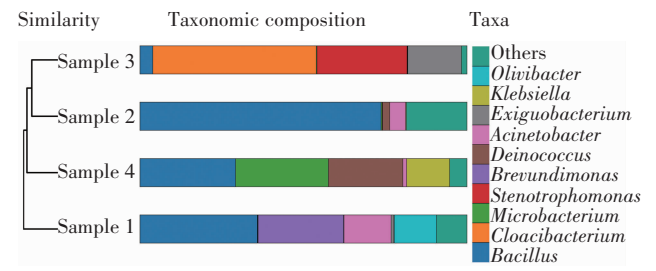


图 7 基于属水平各样品的聚类树柱状图
Fig. 7 Cluster tree histogram of each sample based on genus level

各样品在属水平上优势菌属分别是:Sample 1 中的优势菌属是厚壁菌门的芽孢杆菌属(占 35.9%)及变形菌门的短波单胞菌属(占 26.2%);Sample 2 中的优势菌属是厚壁菌门的芽孢杆菌属(占 73.7%);Sample 3 中的优势均属是拟杆菌门的 *Cloacibacterium*(占 49.9%)、变形菌门的寡养单胞菌属(占 27.6%);Sample 4 中的优势菌属是厚壁菌门的芽孢杆菌属(占 29.2%)和微杆菌属(占 28.3%)、异常球菌-栖热菌门的异常球菌属(占 22.8%)。从图 7 中可以看出,Sample 1 和 Sample 4 的细菌群落均匀性相对较高,Sample 2 的细菌群落组成高度集中在芽孢杆菌属中。

根据已有的研究报道表明,不动杆菌属、芽孢杆菌属及克雷伯氏菌属属于嗜冷菌^[21-24]。嗜冷菌在低温存储过程中,其依旧能够繁殖并能够产生影响原料乳品质的腐败酶:蛋白酶和脂肪酶等,破坏原料乳中的营养物质,影响原料乳的品质^[21, 25-28]。研究表明:生鲜乳本身不存在大量的嗜冷菌,其主要来源于生产环节的污染,导致原料乳在运送过程中出现大量嗜冷菌繁殖从而导致原料乳的品质遭到破坏^[22, 29]。

4 结论

本实验通过 16S rRNA 基因的高通量测序技术对来自 4 个牧场液态奶的细菌群落结构进行研究。通过对比发现,在门水平上,4 组液态奶的菌群结构基本相似,但相对丰度差异较大,4 组液态奶的优势菌门主要

是厚壁菌门和变形菌门。在属水平上,4组液态奶的优势菌属和相对丰度都不相同,存在显著差异。同时,还发现属水平上芽孢杆菌属、不动杆菌属属于嗜冷菌,在液态奶的贮存中容易分解其中的蛋白质、脂肪或碳水化合物,从而导致液态奶出现腐败变质等现象。这为后续对探索液态奶中腐败菌的来源及防控提供了有力的研究依据。

参考文献(References):

- [1] 刘潇忆,张彧,陈历俊,等. 原料乳中微生物检测技术的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2013(2): 169—174.
LIU Xiao-yi, ZHANG Yu, CHEN Li-jun, et al. Research progress on microbial detection technology in raw milk[J]. China Food Additives, 2013(2): 169—174.
- [2] 包秀慧. 牛乳源致病菌检测技术的发展及其对乳品安全的意义[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(7): 854—858.
BAO Xiu-hui. Development of detection technology for pathogenic bacteria from bovine milk and its significance to dairy safety[J]. Chinese Journal of Pathogen Biology, 2020, 15(7): 854—858.
- [3] 姚宇秀,陈媛,郭佩佩,等. Illumina MiSeq 高通量测序技术研究原料乳及环境中细菌多样性和致病菌的分布情况[J]. 中国食品学报, 2019, 19(1): 249—254.
YAO Yu-xiu, CHEN Yuan, GUO Pei-pe, et al. Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology to study the bacterial diversity and the distribution of pathogenic bacteria in raw milk and the environment[J]. Chinese Journal of Food Science, 2019, 19(1): 249—254.
- [4] 赵睿,邵长春,高世功,等. 高通量测序分析不同腌腊肉制品细菌多样性[J]. 食品科学, 2020, 41(20): 90—96.
ZHAO Rui, SHAO Chang-chun, GAO Shi-gong, et al. High-throughput sequencing analysis of bacterial diversity in different cured meat products[J]. Food Science, 2020, 41(20): 90—96.
- [5] CAPORASO J G, LAUBER C L, WALTERS W A, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(S1): 4516—4522.
- [6] YOUSSEF N, SHEIK C S, KRUMHOLZ L R, et al. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2009, 75(16): 5227.
- [7] BELLA J M D, BAO Y, GLOOR G B, et al. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 95(3): 401—414.
- [8] XIAOHUA P, FUGUANG X, XUEMEI N, et al. Illumina sequencing approach to characterize thiamine metabolism related bacteria and the impacts of thiamine supplementation on ruminal microbiota in dairy cows fed high-grain diets[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 01818.
- [9] 布仁其其格,高雅罕,任秀娟,等. 不同发酵时期酸马奶细菌群落结构[J]. 食品科学, 2016, 37(11): 108—113.
BU Renqiqige, GAO Ya-han, REN Xiu-juan, et al. The bacterial community structure of kefir during different fermentation periods[J]. Food Science, 2016, 37(11): 108—113.
- [10] 关统伟,向慧平,王鹏昊,等. 基于高通量测序的郫县豆瓣不同发酵期细菌群落结构及其动态演替[J]. 食品科学, 2018, 39(4): 106—111.
GUAN Tong-wei, XIANG Hui-ping, WANG Peng-hao, et al. Bacterial community structure and its dynamic succession in different fermentation stages of Pixian Douban based on high-throughput sequencing[J]. Food Science, 2018, 39(4): 106—111.
- [11] 刘蓬蓬,陈江宁,孟莉,等. 基于 Illumina MiSeq 高通量测序分析黄芪内生细菌多样性[J]. 中草药, 2018, 49(11): 6.
LIU Peng-peng, CHEN Jiang-ning, MENG Li, et al. Analysis of endophytic bacterial diversity in Astragalus based on Illumina MiSeq high-throughput sequencing[J]. Chinese Herbal Medicine, 2018, 49(11): 6.
- [12] WANG Y, SHENG H F, HE Y, et al. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags. [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2012, 78(23): 8264.
- [13] 贾丽艳,荆旭,田宇敏,等. 传统清香型白酒发酵过程中细菌群落结构及其动态演替[J]. 中国食品学报, 2020, 20(2): 196—204.
JIA Li-yan, JING Xu, TIAN Yu-min, et al. Bacterial community structure and its dynamic succession during the fermentation of traditional fragrant liquor[J]. Chinese Journal of Food Science, 2020, 20(2): 196—204.
- [14] LUNDBERG D S, YOURSTONE S, MIECZKOWSKI P, et al. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 999.
- [15] 沈馨,王艳,代凯文,等. 基于 Miseq 高通量测序技术的辣椒酱核心细菌类群研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(10): 159—165.
SHEN Xin, WANG Yan, DAI Kai-wen, et al. Research on the core bacterial group of chili sauce based on Miseq high-throughput sequencing technology[J]. Food Research and Development, 2018, 39(10): 159—165.
- [16] 韩国强,孙协平,吴鹏飞,等. 基于高通量测序分析复配小曲白酒发酵过程中微生物群落结构及多样性[J]. 食品科学, 2021(18): 80—85.
HAN Guo-qiang, SUN Xie-ping, WU Peng-fei, et al. High throughput sequencing-based analysis of microbial community structure and diversity during baijiu fermentation with mixed-

- strain xiaoqu[J]. Food Science, 2021(18): 80—85.
- [17] 贾丽艳, 荆旭, 田宇敏, 等. 传统清香型白酒发酵过程中细菌群落结构及其动态演替[J]. 中国食品学报, 2020, 20(2): 9.
- JIA Li-yan, JING Xu, TIAN Yu-min, et al. Bacterial community structure and its dynamic succession during the fermentation of traditional fragrant liquor[J]. Chinese Journal of Food Science, 2020, 20(2): 9.
- [18] 王馨蕊, 史巧, 刘毕琴, 等. 诺邓火腿加工过程中细菌群落的动态变化[J]. 食品工业科技, 2021(2): 83—89.
- WANG Xin-rui, SHI Qiao, LIU Bi-qin, et al. Bacterial dynamics during the processing of Nuodeng dry-cured ham [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021(2): 83—89.
- [19] 彭玉娇, 崔学宇, 覃礼蒙, 等. 不同地区沙田柚果园土壤细菌群落结构和多样性分析[J]. 四川农业大学学报, 2020, 38(6): 9.
- PENG Yu-jiao, CUI Xue-yu, QIN Li-meng, et al. Analysis on soil bacterial community and diversity of shatian pomelo orchards in different regions[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2020, 38(6): 9.
- [20] LIB, ZHANG X, GUO F, et al. Characterization of tetracycline resistant bacterial community in saline activated sludge using batch stress incubation with high-throughput sequencing analysis[J]. Water Research, 2013, 47(13): 4207—4216.
- [21] 张树飞, 薛玉玲, 崔玥, 等. 牛乳中嗜冷菌及其耐热酶研究进展[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(11): 5.
- ZHANG Shu-fei, XUE Yu-ling, CUI Yue, et al. The research progress of psychrotrophic bacteria and heat-resistant enzymes in milk[J]. China Dairy Industry, 2020, 48(11): 5.
- [22] 韩秋红, 李琴, 李凯锋. 嗜冷菌对乳制品加工及贮存的影响和控制措施[J]. 现代食品, 2018(1): 73—75.
- HAN Qiu-hong, LI Qin, LI Kai-feng. The influence of psychrotrophic bacteria on the processing and storage of dairy products and its control measures[J]. Modern Food, 2018(1): 73—75.
- [23] 马乙茹. 嗜冷菌导致乳制品腐败的相关探究[J]. 食品安全导刊, 2018, 12(12): 140.
- MA Yi-ru. Psychrophilic bacteria cause dairy product spoilage related research[J]. Food Safety Guide, 2018, 12(12): 140.
- [24] 谢芳, 彭开屏, 梁辛, 等. 高通量测序技术在生乳微生物多样性中的研究进展[J]. 轻工科技, 2022, 36(6): 14—17.
- XIE Fang, PENG Kai-ping, LIANG Xin, et al. Research progress of high-throughput sequencing technology in milk-producing microbial diversity[J]. Light Industry Science and Technology, 2022, 36(6): 14—17.
- [25] BAGLINIERE F, TANGUY G, SALGADO R L, et al. Ser2 from serratia liquefaciens L53: a new heat stable protease able to destabilize UHT milk during its storage[J]. Food Chemistry, 2017, 229: 104—110.
- [26] LI NAN, WANG YUEZHU, YOU CHUNPING, et al. Variation in raw milk microbiota throughout 12 months and the impact of weather conditions[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 2371.
- [27] CAPODIFOGGIO E, VIDAL A M C, LIMA J A S, et al. Lipolytic and proteolytic activity of pseudomonas spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk[J]. Journal of Dairy science, 2016, 99(7): 5214—5223.
- [28] XIN L, MENG Z, ZHANG L, et al. The diversity and proteolytic properties of psychrotrophic bacteria in raw cows' milk from North China - ScienceDirect[J]. International Dairy Journal, 2017, 66: 34—41.
- [29] 李建洲, 赵艳坤, 王富兰, 等. 新疆乌昌地区与喀什地区规模化牛场嗜冷菌分离鉴定及污染源分析[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(5): 1498—1505.
- LI Jian-zhou, ZHAO Yan-kun, WANG Fu-lan, et al. Isolation, identification and pollution source analysis of psychrophilic bacteria on large-scale cattle farms in Wuchang and Kashgar, Xinjiang[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2020, 47(5): 1498—1505.
- [30] 秦宇蒙, 周笑犁, 管庆林, 等. 基于高通量测序分析番茄自然发酵过程中的真菌多样性[J]. 福建农业学报, 2021, 36(9): 1110—1118.
- QIN Yu-meng, ZHAOU Xiao-li, GUAN Qing-lin, et al. Fungal diversity in natural tomato fermentation as shown by high-throughput sequencing[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2021, 36(9): 1110—1118.
- [31] YAO D, XU L, WANG C Y. Diversity of the microbial community and antioxidant activity during fermentation of red raspberry enzymes [J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(1): 99—110.
- [32] 陈申习, 宿智新, 张磊, 等. 基于高通量测序的清香型和酱香型酒曲真菌群落特征研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 49—53.
- CHEN Shen-xi, SU Zhi-xin, ZHANG Lei, et al. Fungal community characteristics of light-flavor and sauce-flavor Jiuqu based on high throughput sequencing[J]. China Brewing, 2021, 40(7): 49—53.
- [33] 张敏, 张艳, 黄丽丽, 等. 基于16S rDNA高通量测序方法比较新疆西北部地区乳品中微生物的多样性[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 27—33.
- ZHANG Min, ZHANG Yan, HUANG Li-li, et al. Application of 16S rDNA high-throughput sequencing for comparative study of the microbial diversity of dairy products from western and northern Xinjiang, China[J]. Food Science, 2017, 38(20): 27—33.