

基于内生菌分析东北酸菜发酵菌群溯源

张庆芳, 陈文丽, 吴家明, 赵 露, 马明昊, 王晓辉*, 迟乃玉*

(大连大学生命健康学院, 辽宁省海洋微生物工程技术研究中心, 大连市海洋微生物工程重点实验室,
大连市合成生物学重点实验室, 辽宁 大连 116622)

摘 要: 为了探究东北酸菜中发酵菌群的来源, 本实验基于高通量测序与生物信息学相关技术手段对生渍和熟渍发酵初期的酸菜发酵液、白菜内生菌及平板分离培养的白菜内生菌菌群多样性展开研究。结果表明: 门水平上, 生渍和熟渍酸菜绝大部分菌和白菜内生菌相同; 属水平上, 生渍和熟渍酸菜都注释到了 *Lactococcus*、*Leuconostoc*、*Lactobacillus*、*Weissella* 4 种乳酸菌, 白菜内生菌注释到299 个菌属, 其中有6 种乳酸菌, 除了生渍和熟渍酸菜共有的4 种, 还包括 *Bifidobacterium* 和 *Tetragenococcus*, 说明白菜内生菌是乳酸菌的来源之一。熟渍酸菜相比生渍酸菜注释到的致病菌属种类和相对丰度明显降低, 发酵样本中检测到的致病菌属绝大部分属于白菜内生菌致病菌属。平板上分离鉴定到的51 种内生菌菌属中, 有3 种乳酸菌和酸菜发酵液中的乳酸菌相同。

关键词: 东北酸菜; 高通量测序; 内生菌; 菌群多样性; 菌群溯源

Tracing the Source of Fermenting Microbiota in Pickled Chinese Cabbage Based on Endophytic Bacteria Analysis

ZHANG Qingfang, CHEN Wenli, WU Jiaming, ZHAO Lu, MA Minghao, WANG Xiaohui*, CHI Naiyu*

(Dalian Key Laboratory of Marine Microbial Engineering, Dalian Key Laboratory of Synthetic Biology, Liaoning Marine Microbial Engineering and Technology Research Center, College of Life and Health, Dalian University, Dalian 116622, China)

Abstract: In order to explore the source of fermenting microorganisms in pickled Chinese cabbage, this study used high-throughput sequencing and bioinformatics techniques to investigate the diversity of microbial community in the fermented juices of raw and cooked Chinese cabbage at the early stage of fermentation and the diversity of total and culturable endophytic bacteria in Chinese cabbage. The results showed that at the phylum level, most of the bacteria in the fermented juices of raw and cooked Chinese cabbage were the same as the endophytic bacteria of Chinese cabbage. Four lactic acid bacteria genera were annotated in each of the fermented juices, namely *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, and *Weissella*, and 299 genera including 6 lactic acid bacteria genera were annotated in the endophytic bacteria. The lactic acid bacteria genera induced four ones common to both fermented juices as well as *Bifidobacterium* and *Tetragenococcus*, indicating that the endophytic bacteria were one of the sources of lactic acid bacteria in pickled Chinese cabbage. Compared with pickled raw Chinese cabbage, the number and relative abundance of pathogenic bacteria genera annotated in pickled cooked Chinese cabbage were significantly reduced, and most of the pathogenic bacteria genera detected belonged to the pathogenic endophytic bacteria genera in Chinese cabbage. Among the 51 culturable endophytic bacterial genera identified on plates, three lactic acid bacteria genera were also found in pickled Chinese cabbage.

Keywords: pickled Chinese cabbage; high-throughput sequencing; endophytic bacteria; microbial diversity; microbial traceability

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240407-051

中图分类号: TS255.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 22-0051-14

收稿日期: 2024-04-07

基金项目: “十四五”国家重点研发计划重点专项 (2022YFC2805105); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31500039)

第一作者简介: 张庆芳 (1965—) (ORCID: 0000-0003-2198-6350), 女, 教授, 博士, 研究方向为微生物资源的开发与利用。

E-mail: zqf7566@126.com

*通信作者简介: 王晓辉 (1981—) (ORCID: 0009-0002-1006-9741), 女, 副教授, 博士, 研究方向为微生物与酶工程。

E-mail: wangxiaohui@dlu.edu.cn

迟乃玉 (1965—) (ORCID: 0009-0005-9856-1141), 男, 教授, 博士, 研究方向为微生物的基础理论与应用。

E-mail: cny7566@126.com

引文格式:

张庆芳, 陈文丽, 吴家明, 等. 基于内生菌分析东北酸菜发酵菌群溯源[J]. 食品科学, 2024, 45(22): 51-64. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240407-051. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Qingfang, CHEN Wenli, WU Jiaming, et al. Tracing the source of fermenting microbiota in pickled Chinese cabbage based on endophytic bacteria analysis[J]. Food Science, 2024, 45(22): 51-64. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240407-051. <http://www.spkx.net.cn>

大白菜 (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) 又称卷心菜, 是亚洲国家种植的最具经济价值的蔬菜作物之一, 大白菜品质柔嫩、营养丰富, 可供炒食、煮食、凉拌、做馅、加工腌制等^[1], 是我国餐桌上常见的食品, 也是具有东北特色的酸菜原材料^[2]。传统东北酸菜加工是利用白菜原料和环境中微生物自发发酵而成^[3-4], 东北酸菜口味咸酸, 有开胃健食、润肠通便、杀菌抗炎、促进消化的效果, 营养价值丰富^[5]。因此, 东北酸菜相关研究越来越受到广大学者的关注, 其中乳酸菌是酸菜中的主要益生菌, 在酸菜的发酵过程中占重要地位, 乳酸菌广泛分布于自然界和生物体内, 人和动物的消化道及其他器官^[6]、青贮饲料^[7]、土壤和植物根际^[8]、自然界海洋^[9]河流等都是乳酸菌的重要来源。在酸菜腌渍过程中, 腌渍方式是影响东北酸菜整个发酵过程中菌群结构的重要因素之一, 东北酸菜的腌渍方式有生渍法和熟渍法, 熟渍法中包含烫漂工艺。烫漂是冷冻、干燥、贮藏、油炸等加工操作关键的预处理工艺。烫漂可以减少微生物负载量从而延长保质期; 消除细胞间的空气, 提高传热传质速率, 防止氧化^[10]。熟渍法中的原料经过烫漂后, 在一定程度上可以加快发酵速度。

内生菌概念是在1866年首先由Bary提出, 指在生长过程的一定阶段或全部阶段生长于健康植物组织或器官内部的微生物 (主要为真菌和细菌)^[11]。内生菌无处不在, 已经在很多植物组织中分离出来, 包括根、茎、叶等^[12], 它是一种优势菌, 可以促进植物生长, 保护其免受病原体侵害, 在不同的环境条件下, 内生菌能够比根际细菌更有效地与植物相互作用^[13]。最近的研究表明, 地球上约有30万种植物, 其中绝大多数含有内生菌^[14], 而无内生菌的植物应对病原体的能力较差, 更容易受到环境胁迫条件的影响^[15]。在以往的研究中, 内生菌的微生物群落分析仅使用传统培养的方法, 无法检测其中大多数微生物群落, 特别是无法培养的微生物群落, 而这些群落可能具有重要的生态功能^[16]。高通量测序 (next generation sequencing, NGS) 技术使微生物多样性研究获得突破性进展, 近年来在白菜内生菌领域已有应用, 采用该技术研究大白菜根系内生菌的多样性^[17]及表征大白菜叶片内生菌中的抗生素抗性基因^[18], 同时为深入研究未培养的细菌提供了可能性^[19-20]。

关于东北酸菜菌群结构的研究很多^[21-22], 但对酸菜发酵菌群来源研究报道较少。近年来, 关于植物内生菌

的相关研究大量增加, 植物内部有很多微生物, 故本研究从内生菌的角度分析酸菜中菌群的来源。利用NGS技术, 首先对生渍酸菜和白菜内生菌进行细菌菌群结构分析, 比较二者细菌菌群的相似性, 然后通过熟渍烫漂工艺, 杀灭白菜表面及环境携带的微生物, 进一步分析其细菌菌群结构与白菜内生菌的关系, 探究酸菜中菌属的来源; 通过LB培养基分离培养白菜内生菌, 进一步验证酸菜中菌属的来源。本研究将东北酸菜发酵菌群来源追溯到白菜内生菌, 进而为深入发掘优质乳酸菌、改良酸菜发酵工艺、增加酸菜产品的安全性提供理论基础; 旨在为植物生长过程中氮代谢循环与内生菌的关系、发酵菜复杂体系中的微生物多样性研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜大白菜购自大连大学南门菜市场。

亚硝酸钠、对氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺、硼砂、亚铁氰化钾、乙酸锌、氢氧化钠、酚酞、胰蛋白胨、酵母浸膏、葡萄糖、琼脂 (均为分析纯) 上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 仪器与设备

PHS-3E型pH计 上海仪电科学仪器股份有限公司;
CRY-2112恒温摇床 上海茸研仪器有限公司; DK-S16
电热恒温水浴锅 上海精宏实验设备有限公司; AL204
电子天平 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司; UV-1200
型紫外-可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;
CR21N高速冷冻离心机 日立 (中国) 有限公司。

1.3 方法

1.3.1 东北酸菜的制作工艺

工艺流程: 选取新鲜大白菜→预处理 (修整、清洗、烫漂、沥水、切分)→装瓶→注盐水→封盖→25℃发酵→获得成品。

操作要点: 1) 生渍法: 挑选新鲜大白菜清理好外层叶片, 将白菜顺着菜帮掰成若干片后, 用清水清洗干净, 沥干表面水分后将白菜切成0.5~1 cm的均匀细丝。保证不同部位的白菜细丝混匀, 选用统一规格的555 mL聚对苯二甲酸乙二醇酯材料制备的东北酸菜发酵容器若干瓶, 每瓶分装160 g混匀的白菜丝, 再注入1.5%的盐水

至满瓶,最终形成封闭发酵体系,本实验前期已探究出酸菜发酵的最适温度为25℃,故将全部酸菜放置于25℃恒温培养箱中发酵。2)熟渍法:挑选新鲜大白菜清理好外层叶片,将白菜顺着菜帮掰成若干片后,用清水清洗干净,再放入85~90℃开水中漂烫0.5 min(菜帮先入水浸烫),取出后放入冷水中漂洗,沥干表面水分后将白菜切成0.5~1 cm的均匀细丝。注意要将不同部位的白菜细丝混匀,选用统一规格的555 mL聚对苯二甲酸乙二醇酯材料制备的东北酸菜发酵容器若干瓶,每瓶分装350 g混匀的白菜丝,再注入1.5%的盐水至满瓶,最终形成封闭发酵体系,将全部酸菜放置于25℃恒温培养箱中发酵。

1.3.2 白菜内生菌分离及培养

1)白菜表面消毒:挑选新鲜的白菜,用流水清洗去掉表面泥土,将清洗干净的白菜切成适当大小于无菌环境中放入80%乙醇溶液中浸泡2 min,再放入3%有效氯的次氯酸钠溶液中浸泡5 min,最终放入80%乙醇溶液中浸泡1 min。浸泡完成后用无菌水振荡洗涤3~5次,收集最后一次洗涤的无菌水留作验证。将洗涤后的白菜在无菌条件下用灭菌后的镊子以及剪刀将其裁剪为1 cm左右的小块,收集于2 mL离心管中编号BNSZ,放置于一20℃冰箱中备用。2)表面消毒验证:将上述无菌水用移液枪吸取200 μL,涂布于LB固体培养基中,37℃培养48 h,观察是否有菌落生长,若无菌落生长则表明表面消毒干净。3)可培养内生菌的分离:将上述表面消毒干净后的植物组织放置于无菌水中,振荡3~4 h,取振荡后的液体,采用涂布平板法将其涂布于LB固体培养基中,于37℃有氧条件下培养48 h。4)菌泥制备:培养48 h后,于无菌条件下将LB固体培养基上生长的菌落均挑至LB液体培养基中,37℃条件下振荡培养48 h,后将菌液吸取至2 mL离心管中,10 000 r/min离心10 min,取沉淀。重复上述过程直至菌泥质量达到2 g。收集菌泥,编号为BNS。

1.3.3 酸菜亚硝酸盐含量的测定

每瓶酸菜代表一个独立的时间点,从0 h开始取样测量,而后每隔12 h取样一次。将瓶内酸菜与发酵液倒入烧杯中,将其全部研磨后制成匀浆,分别称取10 g酸菜匀浆作为待测样品,参照GB 5009.33—2016《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》^[23]中盐酸萘乙二胺法测定亚硝酸盐含量。

1.3.4 NGS

每瓶酸菜代表不同发酵时间点的独立发酵体系,酸菜匀浆作为研究对象。生渍与熟渍酸菜的NGS:将生渍酸菜记为S组,熟渍酸菜记为SC组。从S组和SC组中各选取12、72 h两个时间点的酸菜作为样本,S组分别标记为S1、S2;SC组分别标记为SC1、SC2。

将这4个酸菜匀浆样本进行16S NGS,按照土壤基因组DNA提取试剂盒说明书提取样本DNA,以其为模板,采用引物对338F(5'-ACTCTACGGGAGGCAGCA-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增。

白菜内生菌的NGS:按照DP812土壤基因组DNA提取试剂盒说明书进行样本DNA提取,采用335F(5'-CADACTCCTACGGGAGGC-3')与769R(5'-ATCCTGTTTGMTMCCCVCRC-3')引物进行PCR扩增,扩增产物委托北京百迈克生物科技有限公司进行建库测序。

1.3.5 物种注释与分类学分析

以SILVA为参考数据库,使用朴素贝叶斯分类器对特征序列进行分类学注释,可得到每个特征对应的物种分类信息,进而在各水平(界、门、纲、目、科、属、种)统计各样品群落组成,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。

1.4 数据分析

采用Origin Pro 2021软件对实验数据进行统计分析及图表绘制。

2 结果与分析

2.1 各样本细菌菌群的分类水平

由表1可知,S1中的细菌菌群归属于13个门中的138个属,S2中的细菌菌群归属于13个门中的112个属,在各分类水平的数量上相差不大;SC1中的细菌菌群归属于7个门中的44个属,SC2中的细菌菌群归属于8个门中的42个属,在各分类水平的数量上相差不大。由于BNS样品是从植物组织中分离出的可培养内生菌,因此在各等级物种类型数目上BNS样品均低于BNSZ样品。

表1 各样本细菌菌群的分类水平统计结果
Table 1 Statistical results of the taxonomic assignment of bacterial community in each sample

样本	数量/个					
	门	纲	目	科	属	种
S1	13	24	58	89	138	147
S2	13	22	52	77	112	118
SC1	7	12	15	28	44	46
SC2	8	13	17	27	42	44
BNSZ	19	39	88	155	299	319
BNS	7	11	21	35	51	51

2.2 基于门水平细菌菌群的结构分析

由表2可知,BNS有8个菌门,BNSZ有19个菌门,S1有13个菌门,S2有13个菌门,SC1有8个菌门,SC2有9个菌门。Verrucomicrobia在S1、S2、SC1、SC2中能注释到,但在BNSZ和BNS中未能注释到。因此,Verrucomicrobia可能来自环境(空气、水等)。Acidobacteria、Actinobacteria、Bacteroidetes、Chloroflexi、Cyanobacteria、Firmicutes、Patescibacteria、Proteobacteria在BNSZ、S1、S2、SC1、SC2中都能注释到,说明这些菌门在经过熟渍的烫漂工艺后仍存在,且BNSZ中也存在这些菌门。

因此, Acidobacteria、Actinobacteria、Bacteroidetes、Chloroflexi、Cyanobacteria、Firmicutes、Patescibacteria、Proteobacteria可能是白菜内生菌。Armatimonadetes、Cloacimonetes、Deferribacteres、Latescibacteria、Synergistetes、Tenericutes、uncultured_bacterium_k_Bacteria在BNSZ中能注释到,但在S1、S2、SC1、SC2中注释不到,说明这些菌门属于白菜内生菌,但白菜发酵环境可能不适合它们的生存。

表 2 细菌菌群门水平分布情况

Table 2	Distribution of bacterial community at the phylum level					
门	BNS	BNSZ	S1	S2	SC1	SC2
Acidobacteria	-	+	+	+	+	+
Actinobacteria	+	+	+	+	+	+
Armatimonadetes	-	+	-	-	-	-
Bacteroidetes	+	+	+	+	+	+
Chloroflexi	+	+	+	+	-	+
Cloacimonetes	-	+	-	-	-	-
Cyanobacteria	-	+	+	+	+	+
Deferribacteres	-	+	-	-	-	-
Epsilonbacteraeota	-	+	+	+	-	-
Firmicutes	+	+	+	+	+	+
Fusobacteria	+	+	+	+	-	-
Gemmatimonadetes	+	+	+	+	-	-
Latescibacteria	-	+	-	-	-	-
Nitrospirae	-	+	+	+	-	-
Patescibacteria	-	+	+	+	+	+
Proteobacteria	+	+	+	+	+	+
Synergistetes	-	+	-	-	-	-
Tenericutes	-	+	-	-	-	-
Unassigned	+	-	-	-	-	-
uncultured_bacterium_k_Bacteria	-	+	-	-	-	-
Verrucomicrobia	-	-	+	+	+	+

注: +.注释到该菌门; -.未注释到该菌门。

由图1可知, BNSZ相对丰度小的菌门(Acidobacteria、Armatimonadetes、Cloacimonetes、Cyanobacteria、Deferribacteres、Epsilonbacteraeota、Latescibacteria、Nitrospirae、Patescibacteria、Synergistetes、Tenericutes、uncultured_bacterium_k_Bacteria)在BNS上注释不到,说明这些菌门含量低或LB培养基不适合这些菌门生长,故未被检出; Epsilonbacteraeota、Fusobacteria、Gemmatimonadetes、Nitrospirae能在BNSZ、S1和S2注释到,而在SC1和SC2中未能注释到,且观察到它们在BNSZ、S1和S2中的相对丰度较低,说明烫漂首先对相对丰度较低的菌门有一定的影响,使其被杀灭; Actinobacteria、Bacteroidetes、Firmicutes、Proteobacteria是BNSZ、BNS、S1、S2、SC1、SC2共有的。生渍法发酵12 h酸菜样本和生渍法发酵72 h酸菜样本中与BNSZ相重合的菌门相对丰度总和分别为99.92%、99.91%,其中分别有0.08%、0.09%与BNSZ菌门不同; 熟渍法发酵12 h酸菜样本和熟渍法发酵72 h酸菜样本中与BNSZ相重合的菌门相对丰度总和分别为99.99%、100.00%,其中熟渍法发酵12 h酸菜样本中仅有0.01%与BNSZ菌门不同。因此,从门水平上看,生渍和熟渍酸菜中的菌群绝大部分来自白菜内生菌。

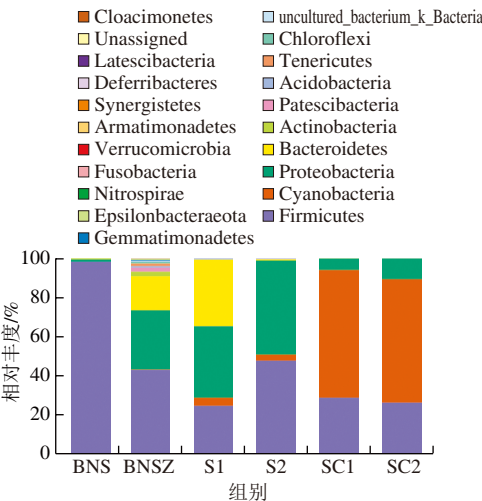


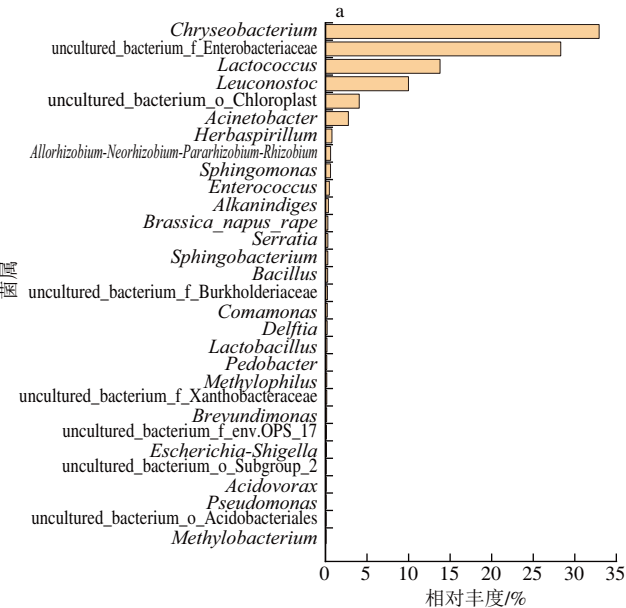
图 1 细菌菌群门水平相对丰度

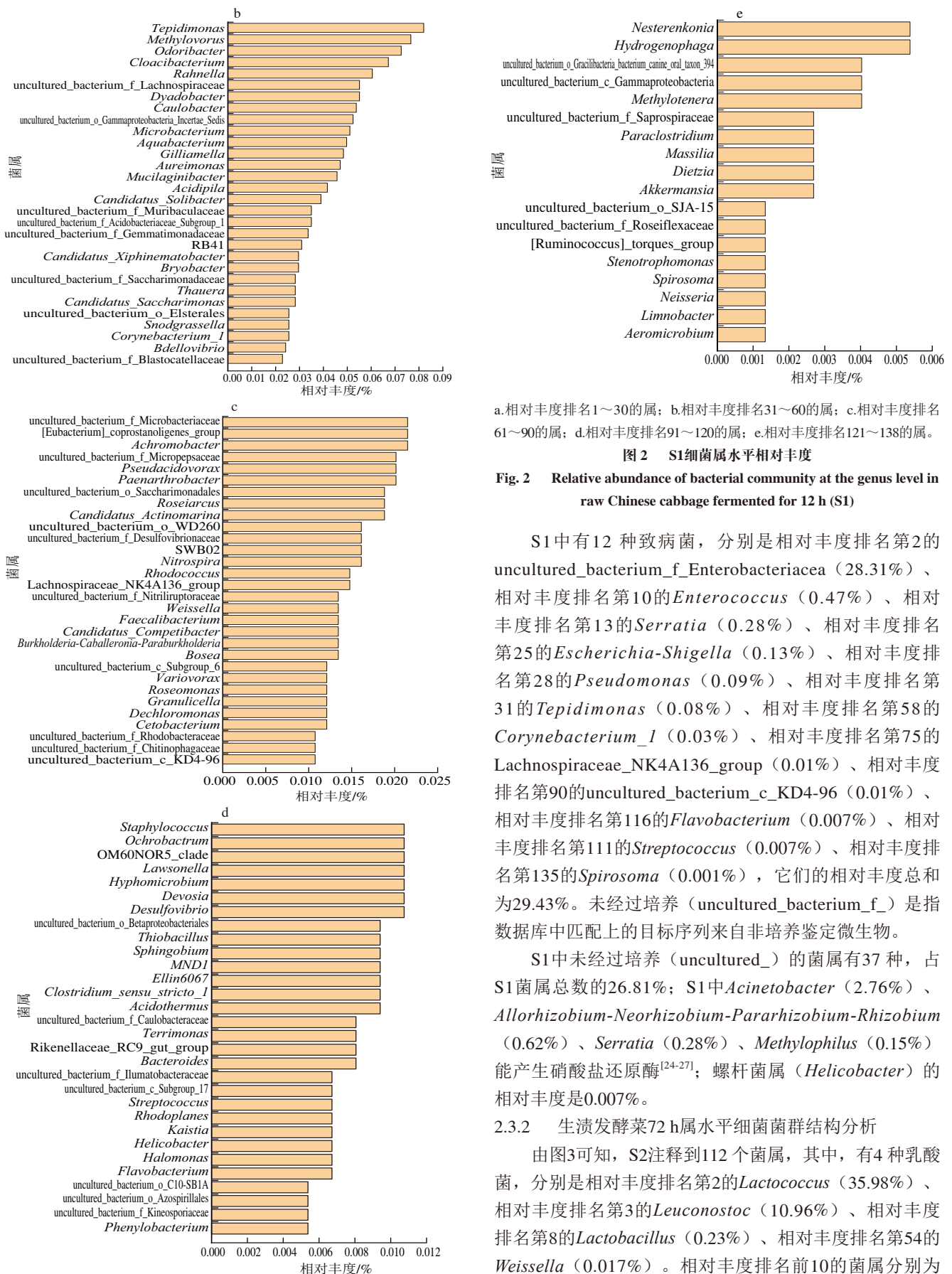
Fig. 1 Relative abundance of bacterial community at the phylum level

2.3 基于属水平发酵菜细菌菌群的结构分析

2.3.1 生渍发酵菜12 h属水平细菌菌群结构分析

由图2可知, S1注释到138个菌属, 其中, 有4种乳酸菌, 分别是相对丰度排名第3的*Lactococcus* (13.78%)、相对丰度排名第4的*Leuconostoc* (9.99%)、相对丰度排名第19的*Lactobacillus* (0.18%)、相对丰度排名第77的*Weissella* (0.013%)。相对丰度排名前10的菌属分别为*Chryseobacterium* (32.93%)、uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae (28.31%)、*Lactococcus* (13.78%)、*Leuconostoc* (9.99%)、uncultured_bacterium_o_Chloroplast (4.06%)、*Acinetobacter* (2.76%)、*Herbaspirillum* (0.78%)、*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* (0.62%)、*Sphingomonas* (0.61%)、*Enterococcus* (0.47%), 其中有两种乳酸菌。S1的乳酸菌相对丰度总和为23.96%。





a. 相对丰度排名1~30的属; b. 相对丰度排名31~60的属; c. 相对丰度排名61~90的属; d. 相对丰度排名91~120的属; e. 相对丰度排名121~138的属。

图2 S1细菌属水平相对丰度

Fig. 2 Relative abundance of bacterial community at the genus level in raw Chinese cabbage fermented for 12 h (S1)

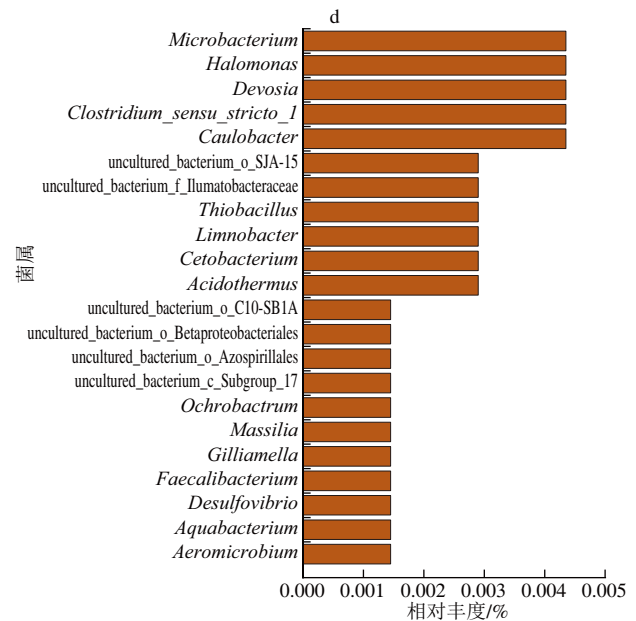
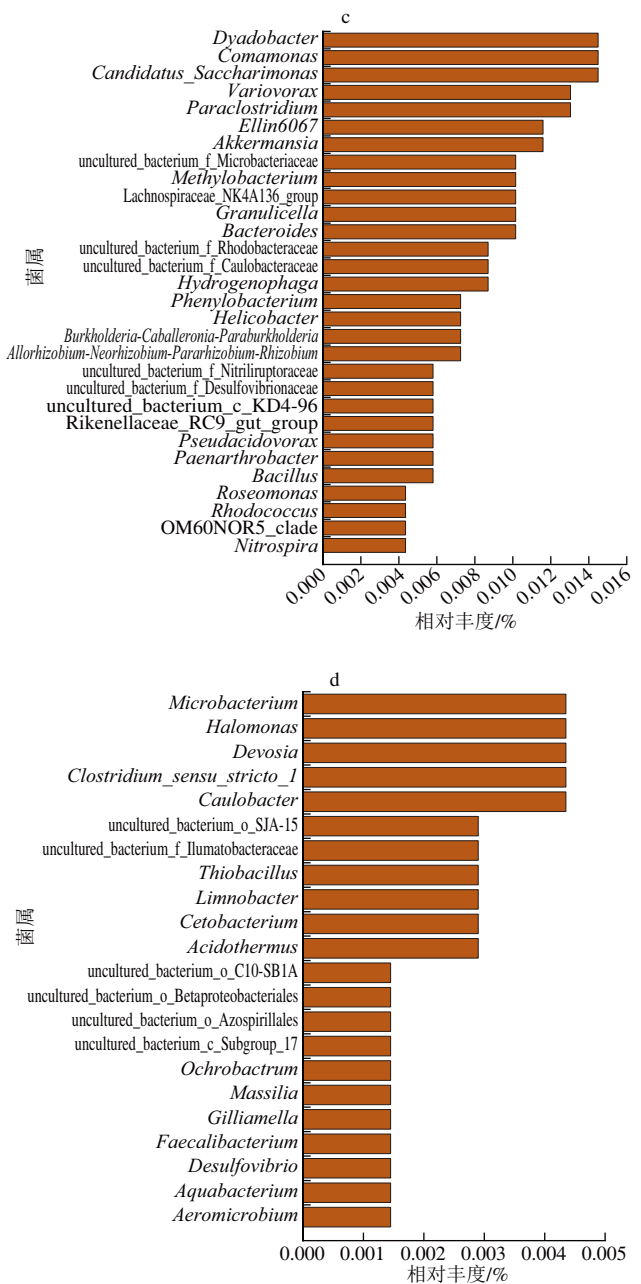
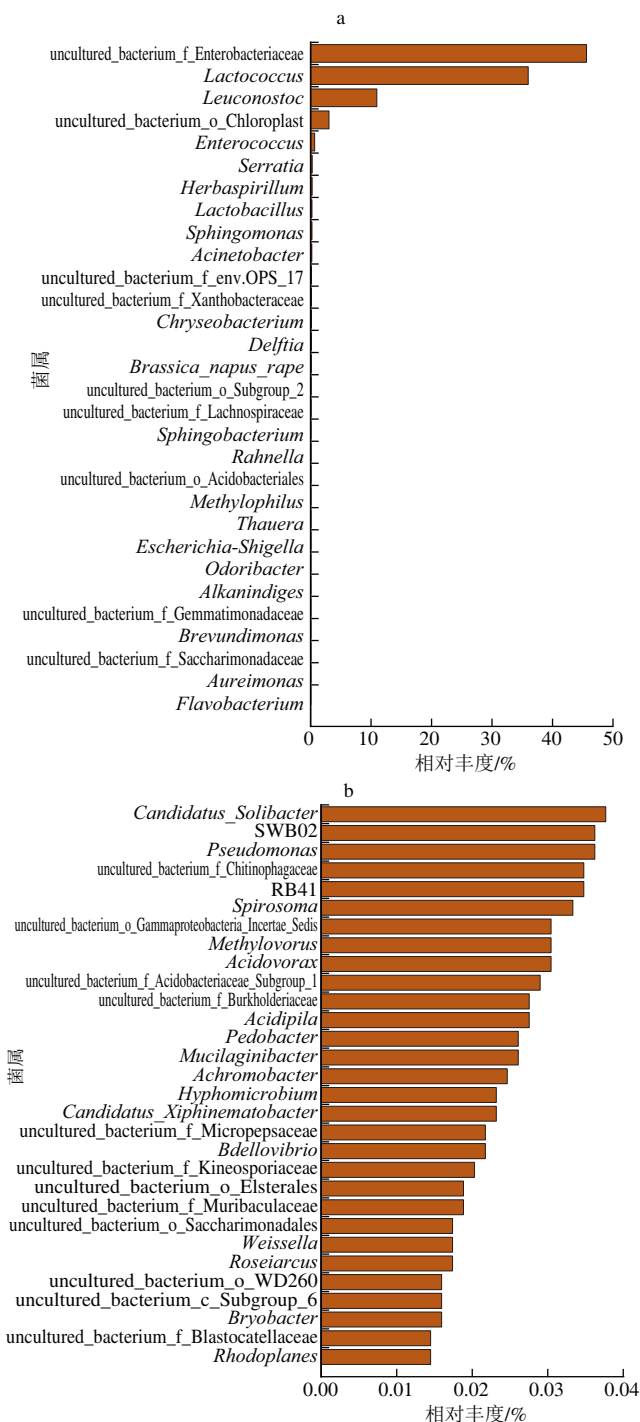
S1中有12种致病菌,分别是相对丰度排名第2的uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae (28.31%)、相对丰度排名第10的Enterococcus (0.47%)、相对丰度排名第13的Serratia (0.28%)、相对丰度排名第25的Escherichia-Shigella (0.13%)、相对丰度排名第28的Pseudomonas (0.09%)、相对丰度排名第31的Tepidimonas (0.08%)、相对丰度排名第58的Corynebacterium_1 (0.03%)、相对丰度排名第75的Lachnospiraceae_NK4A136_group (0.01%)、相对丰度排名第90的uncultured_bacterium_c_KD4-96 (0.01%)、相对丰度排名第116的Flavobacterium (0.007%)、相对丰度排名第111的Streptococcus (0.007%)、相对丰度排名第135的Spirosoma (0.001%),它们的相对丰度总和为29.43%。未经过培养(uncultured_bacterium_f_)是指数据库中匹配上的目标序列来自非培养鉴定微生物。

S1中未经过培养(uncultured_)的菌属有37种,占S1菌属总数的26.81%;S1中Acinetobacter (2.76%)、Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium (0.62%)、Serratia (0.28%)、Methylophilus (0.15%)能产生硝酸盐还原酶^[24-27];螺杆菌属(Helicobacter)的相对丰度是0.007%。

2.3.2 生渍发酵菜72 h属水平细菌菌群结构分析

由图3可知,S2注释到112个菌属,其中,有4种乳酸菌,分别是相对丰度排名第2的Lactococcus (35.98%)、相对丰度排名第3的Leuconostoc (10.96%)、相对丰度排名第8的Lactobacillus (0.23%)、相对丰度排名第54的Weissella (0.017%)。相对丰度排名前10的菌属分别为

uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae (45.62%)、*Lactococcus* (35.98%)、*Leuconostoc* (10.96%)、uncultured_bacterium_o_Chloroplast (3.04%)、*Enterococcus* (0.68%)、*Serratia* (0.27%)、*Herbaspirillum* (0.27%)、*Lactobacillus* (0.23%)、*Sphingomonas* (0.22%)、*Acinetobacter* (0.21%)，其中有3种乳酸菌，分别为相对丰度排名第2的*Lactococcus* (35.98%)；相对丰度排名第3的*Leuconostoc* (10.96%)；相对丰度排名第8的*Lactobacillus* (0.23%)。乳酸菌的相对丰度总和为47.17%。



a. 相对丰度排名1~30的属；b. 相对丰度排名31~60的属；
c. 相对丰度排名61~90的属；d. 相对丰度排名91~112的属。

图3 S2细菌属水平相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of bacterial community at the genus level in raw Chinese cabbage fermented for 72 h (S2)

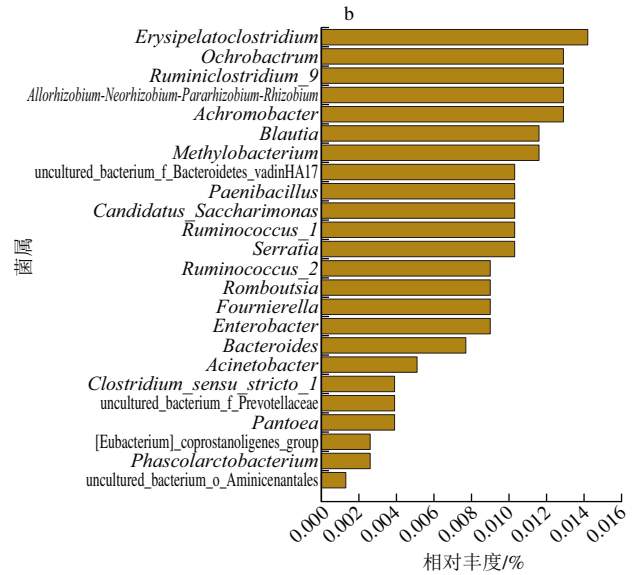
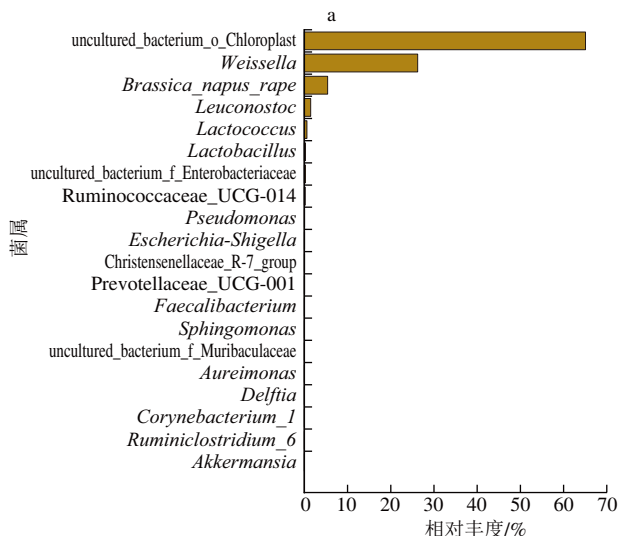
S2中有9种致病菌，分别是相对丰度排名第1的uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae (45.62%)、相对丰度排名第5的*Enterococcus* (0.68%)、相对丰度排名第6的*Serratia* (0.27%)、相对丰度排名第23的*Escherichia-Shigella* (0.05%)、相对丰度排名第33的*Pseudomonas* (0.04%)、相对丰度排名第70的Lachnospiraceae_NK4A136_group (0.01%)、相对丰度

排名第82的uncultured_bacterium_c_KD4-96 (0.06%)、相对丰度排名第30的*Flavobacterium* (0.04%)、相对丰度排名第36的*Spirosoma* (0.03%)，相比于S1，种类减少了3种，分别是*Tepidimonas*、*Corynebacterium_1*、*Streptococcus*，相对丰度总和为46.80%。

S2中未经过培养(uncultured_)的菌属有33种，占S2菌属总数的29.46%；S2中*Serratia* (0.27%)、*Acinetobacter* (0.21%)、*Methylophilus* (0.06%)、*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* (0.007%)能产生硝酸盐还原酶；螺杆菌属(*Helicobacter*)的相对丰度是0.007%。

2.3.3 熟渍发酵菜12 h属水平细菌菌群结构分析

由图4可知，SC1注释到44个菌属，其中，有4种乳酸菌，分别是相对丰度排名第2的*Weissella* (26.23%)、相对丰度排名第4的*Leuconostoc* (1.46%)、相对丰度排名第5的*Lactococcus* (0.59%)、相对丰度排名第6的*Lactobacillus* (0.26%)。这4种乳酸菌均在相对丰度排名前10的菌属中。相对丰度排名前10的菌属分别为uncultured_bacterium_o_Chloroplast (65.08%)、*Weissella* (26.23%)、*Brassica_napus_rape* (5.38%)、*Leuconostoc* (1.46%)、*Lactococcus* (0.59%)、*Lactobacillus* (0.26%)、uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae (0.24%)、*Ruminococcaceae_UCG-014* (0.21%)、*Pseudomonas* (0.06%)、*Escherichia-Shigella* (0.05%)。乳酸菌的相对丰度总和为28.54%。



a.相对丰度排名1~20的属；b.相对丰度排名21~44的属。

图4 SC1细菌属水平相对丰度

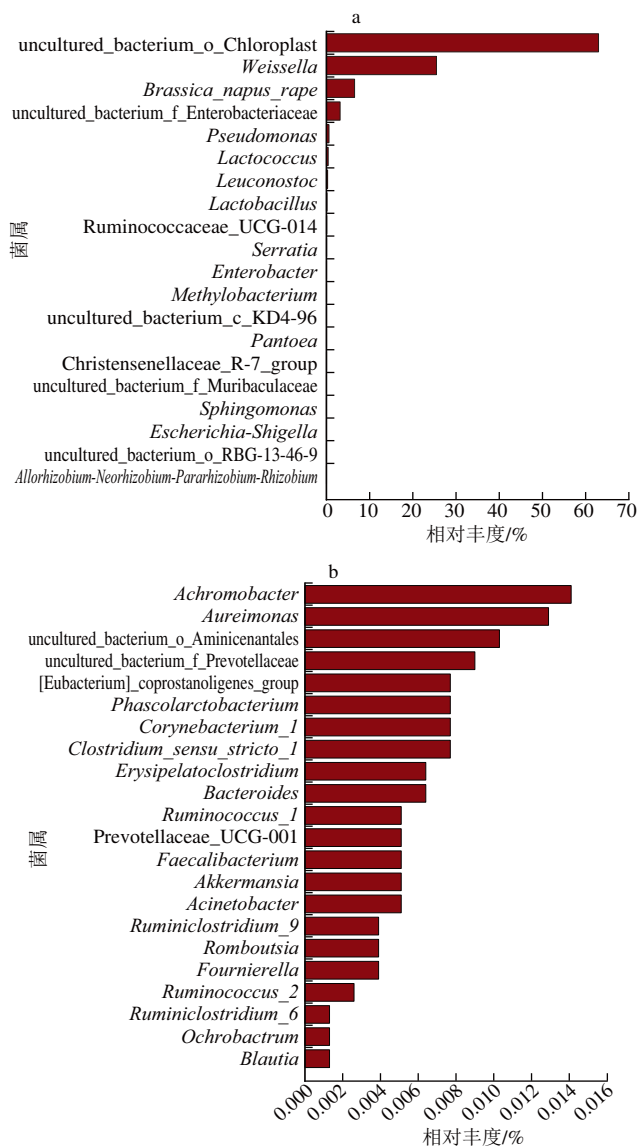
Fig. 4 Relative abundance of bacterial community at the genus level in cooked Chinese cabbage fermented for 12 h (SC1)

SC1中有4种致病菌，分别是相对丰度排名第9的*Pseudomonas* (0.06%)、相对丰度排名第32的*Serratia* (0.01%)、相对丰度排名第36的*Enterobacter* (0.009%)、相对丰度排名第10的*Escherichia-Shigella* (0.05%)，它们的相对丰度总和为0.13%。

SC1中未经过培养(uncultured_)的菌属有6种，占SC1菌属总数的13.64%；SC1中*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* (0.01%)、*Serratia* (0.01%)、*Acinetobacter* (0.05%)能产生硝酸盐还原酶。

2.3.4 熟渍发酵菜72 h属水平细菌菌群结构分析

由图5可知，SC2注释到42个菌属，其中有4种乳酸菌，分别是相对丰度排名第2的*Weissella* (25.47%)、相对丰度排名第6的*Lactococcus* (0.41%)、相对丰度排名第7的*Leuconostoc* (0.27%)、相对丰度排名第8的*Lactobacillus* (0.14%)。这4种乳酸菌均在相对丰度排名前10的菌属中。相对丰度排名前10的菌属分别为uncultured_bacterium_o_Chloroplast (62.97%)、*Weissella* (25.47%)、*Brassica_napus_rape* (6.51%)、uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae (0.32%)、*Pseudomonas* (0.59%)、*Lactococcus* (0.41%)、*Leuconostoc* (0.27%)、*Lactobacillus* (0.14%)、*Ruminococcaceae_UCG-014* (0.08%)、*Serratia* (0.06%)。乳酸菌的相对丰度总和为26.29%。



a.相对丰度排名1~20的属；b.相对丰度排名21~42的属。

图5 SC2细菌属水平相对丰度

Fig. 5 Relative abundance of bacterial community at the genus level in cooked Chinese cabbage fermented for 72 h (SC2)

SC2中有4种致病菌，分别是相对丰度排名第5的*Pseudomonas*（0.59%）、相对丰度排名第10的*Serratia*（0.06%）、相对丰度排名第11的*Enterobacter*（0.03%）、相对丰度排名第18的*Escherichia-Shigella*（0.02%），它们的相对丰度总和为0.70%。SC1和SC2中各菌属相对丰度排序变化不大，乳酸菌菌属种类未变化。

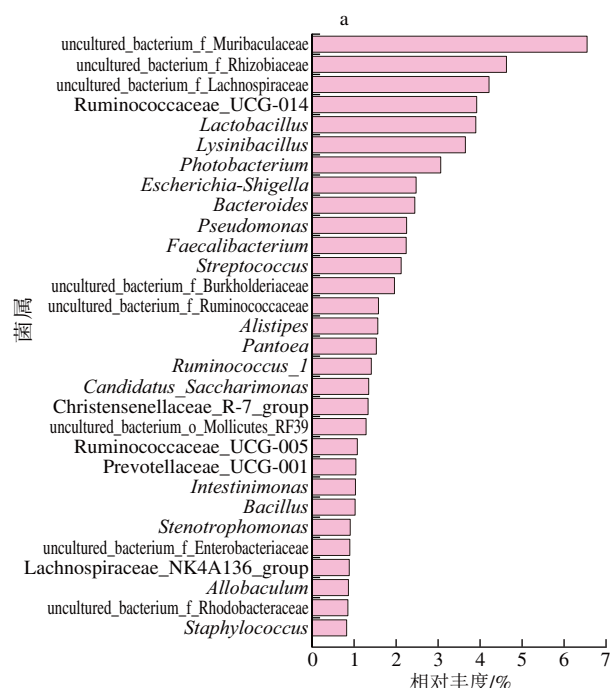
SC2中未经过培养（uncultured_）的菌属有7种，占SC2菌属总数的16.67%；SC2中*Serratia*（0.06%）、*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*（0.01%）、*Acinetobacter*（0.05%）能产生硝酸盐还原酶。

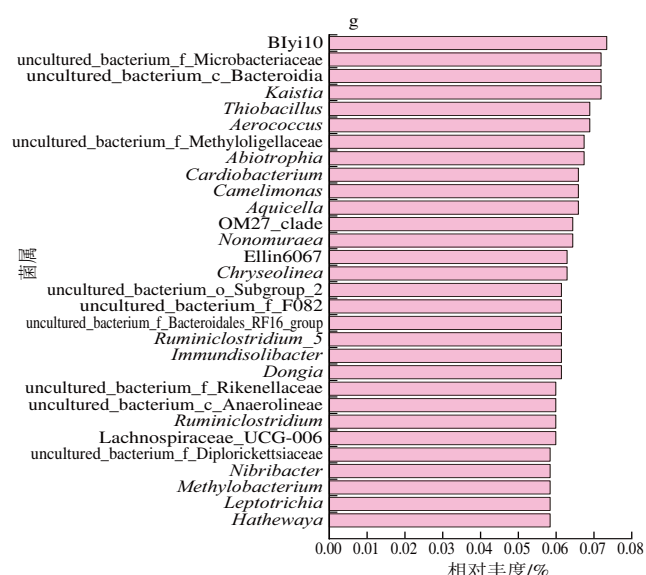
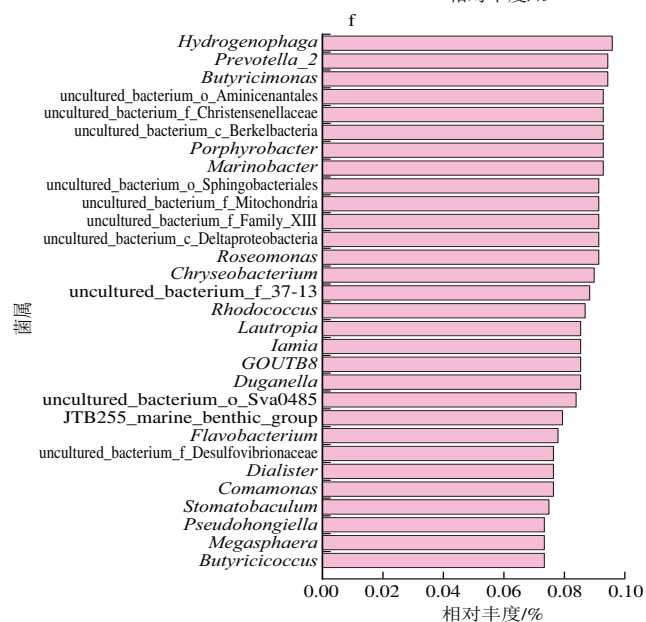
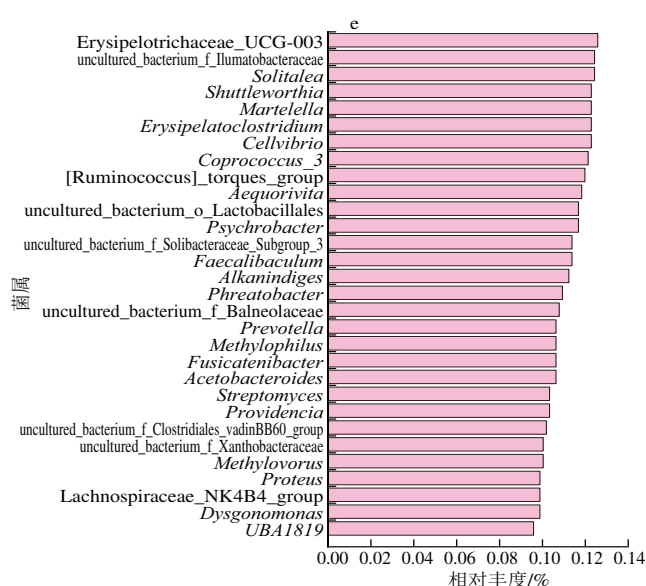
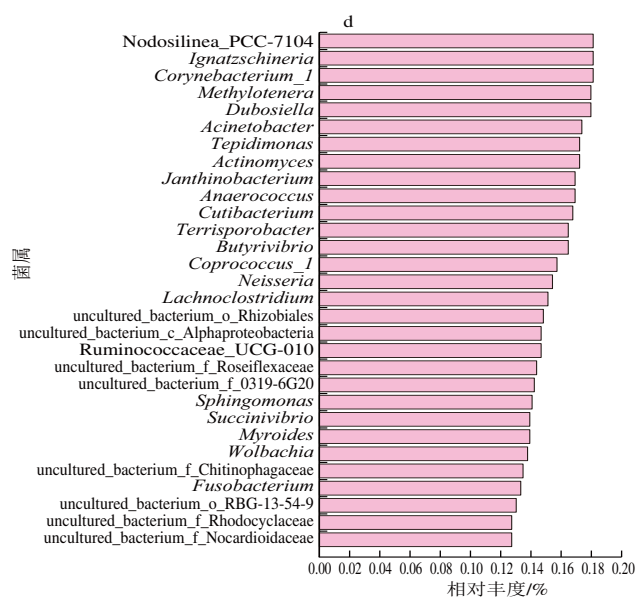
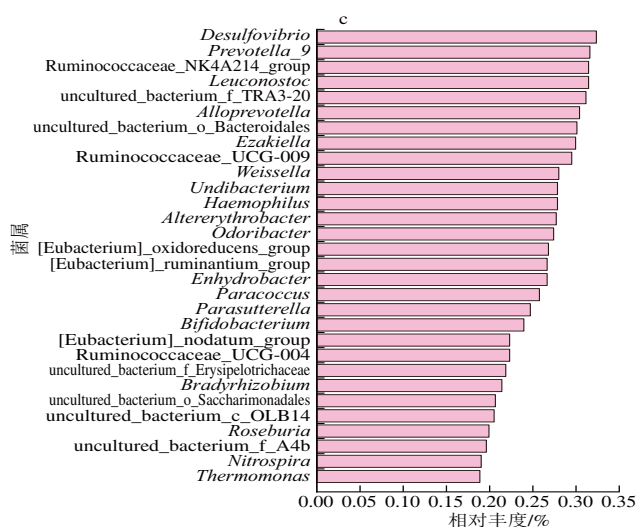
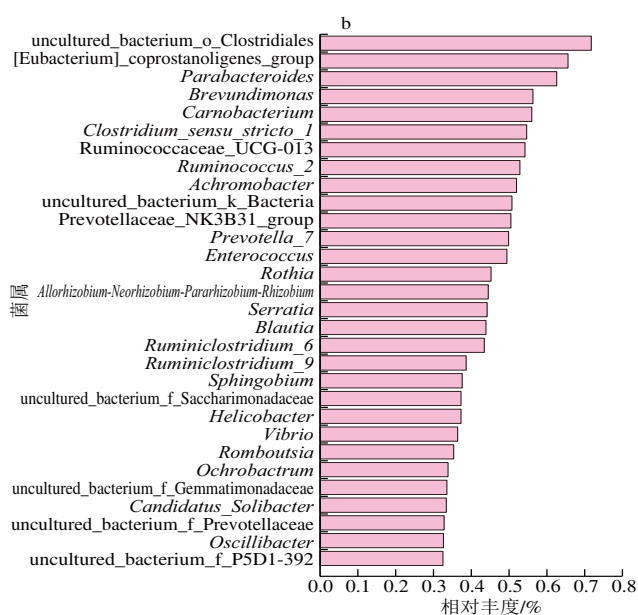
SC1相比于S1，减少了94个属；SC2相比于S2，减少了70个属。而乳酸菌菌属种类未减少，且*Lactobacillus*

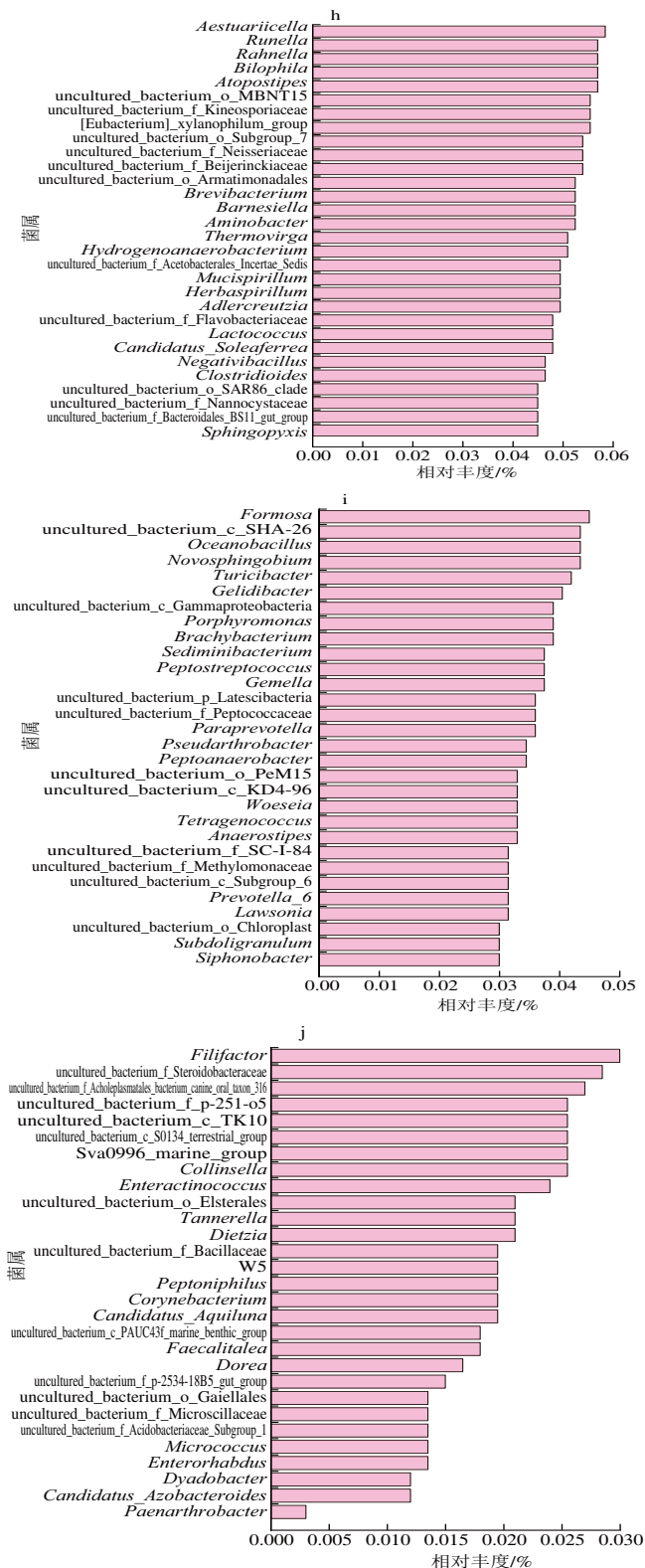
（12 h从第19名上升至第6名；72 h排名未上升）和*Weissella*（12 h从第80名上升至第2名；72 h从第54名上升至第2名）相对丰度排名上升；致病菌菌属种类大量减少，熟渍发酵酸菜中致病菌属仅有4种，而生渍发酵酸菜中致病菌属则有12种。以上结果说明了相比于生渍发酵酸菜，熟渍发酵酸菜可能会杀灭大部分环境菌，保留下来的可能是白菜内生菌。因此，之后对白菜的内生菌进行NGS分析，验证乳酸菌的来源之一是白菜内生环境；熟渍发酵酸菜致病菌种类大量减少，熟渍法发酵酸菜可能更安全。

2.4 基于属水平白菜内生菌菌群结构分析

由图6可知，BNSZ注释到299个菌属。其中，白菜内生菌中有6种乳酸菌菌属，分别是相对丰度排名第5的*Lactobacillus*（3.90%）、相对丰度排名第64的*Leuconostoc*（0.31%）、相对丰度排名第70的*Weissella*（0.28%）、相对丰度排名第80的*Bifidobacterium*（0.24%）、相对丰度排名第233的*Lactococcus*（0.05%）、相对丰度排名第261的*Tetragenococcus*（0.03%），包含了生渍发酵酸菜和熟渍发酵酸菜共有的4种。相对丰度排名前10的菌属分别为uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae（6.55%）、uncultured_bacterium_f_Rhizobiaceae（4.63%）、uncultured_bacterium_f_Lachnospiraceae（4.21%）、Ruminococcaceae_UCG-014（3.92%）、*Lactobacillus*（3.90%）、*Lysinibacillus*（3.65%）、*Photobacterium*（3.06%）、*Escherichia-Shigella*（2.48%）、*Bacteroides*（2.45%）、*Pseudomonas*（2.25%），其中有一种乳酸菌，为相对丰度排名第5的*Lactobacillus*（3.90%）。







a.相对丰度排名1~30的属; b.相对丰度排名31~60的属; c.相对丰度排名61~90的属; d.相对丰度排名91~120的属; e.相对丰度排名121~150的属; f.相对丰度排名151~180的属; g.相对丰度排名181~210的属; h.相对丰度排名211~240的属; i.相对丰度排名241~270; j.相对丰度排名271~299的属。

图6 白菜内生菌(BNSZ)属水平相对丰度

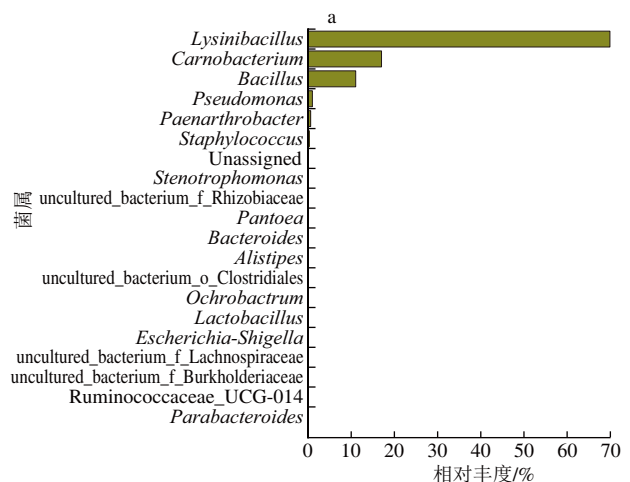
Fig. 6 Relative abundance of endophytic bacteria (BNSZ) at the genus level in Chinese cabbage

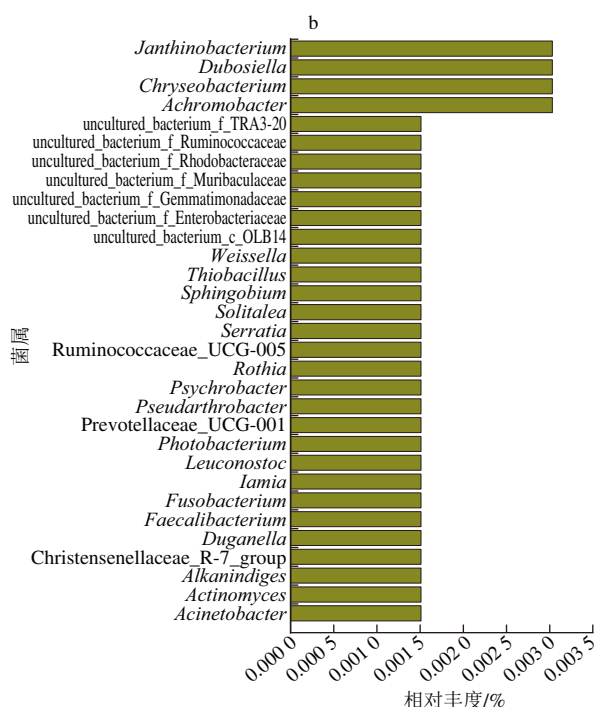
BNSZ中有19种致病菌, 分别是*Escherichia-Shigella*、*Pseudomonas*、*Intestinimonas*、uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae、*Lachnospiraceae*、NK4A136_group、*Staphylococcus*、*Enterococcus*、*Serratia*、*Acinetobacter*、uncultured_bacterium_c_Alphaproteobacteria、*Methylovorus*、*Flavobacterium*、*Tepidimonas*、*Corynebacterium_1*、uncultured_bacterium_c_KD4-96、*Streptococcus*、uncultured_bacterium_f_Flavobacteriaceae、*Peptostreptococcus*、uncultured_bacterium_f_Peptococcaceae, 它们的相对丰度总和为12.47%。

BNSZ中未经过培养(uncultured_)的菌属有86种, 占BNSZ菌属总数的28.76%; BNSZ中*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* (0.44%)、*Serratia* (0.44%)、*Acinetobacter* (0.17%)、*Methylophilus* (0.11%)能产生硝酸盐还原酶; 螺杆菌属(*Helicobacter*)的相对丰度是0.37%。

2.5 基于属水平LB培养基上分离培养的细菌菌群结构分析

由图7可知, BNS有51种菌属全部来自于白菜内生菌菌属。其中, 平板上筛出了3种乳酸菌菌属, 分别是相对丰度排名第15的*Lactobacillus* (0.005%)、相对丰度排名第43的*Leuconostoc* (0.002%)、相对丰度排名第32的*Weissella* (0.002%)。相对丰度排名前10的菌属分别为*Lysinibacillus* (69.91%)、*Carnobacterium* (17.02%)、*Bacillus* (11.03%)、*Pseudomonas* (1.00%)、*Paenarthrobacter* (0.61%)、*Staphylococcus* (0.25%)、*Unassigned* (0.03%)、*Stenotrophomonas* (0.02%)、uncultured_bacterium_f_Rhizobiaceae (0.02%)、*Pantoea* (0.008%)。





a.相对丰度排名1~20的属；b.相对丰度排名21~51的属。

图7 LB培养基分离培养的白菜内生菌(BNS)属水平相对丰度

Fig. 7 Relative abundance of culturable endophytic bacteria (BNS) at the genus level in Chinese cabbage on LB agar plates

BNS中有5种致病菌属，分别是相对丰度排名第4的*Pseudomonas*（1.00%）、相对丰度排名第6的*Staphylococcus*（0.25%）、相对丰度排名第16的*Escherichia-Shigella*（0.005%）、相对丰度排名第30的*uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae*（0.002%）、相对丰度排名第36的*Serratia*（0.002%）。

BNS中未经过培养（uncultured_）的菌属有11种，占BNS菌属总数的21.57%；BNS中*Acinetobacter*（0.002%）、*Serratia*（0.002%）能产生硝酸盐还原酶。

2.6 基于属水平的Venn图分析

利用Venn图^[28]分析属水平的菌群，可进一步找出不同样品中独立和共有的菌属。由图8可知，S1与BNSZ共有的菌属数量为75；S2与BNSZ共有的菌属数量为61；SC1与BNSZ共有的菌属数量为35；SC2与BNSZ共有的菌属数量为35。由于SC1、SC2中分别有44、42个菌属，故SC1与BNSZ共有的菌属占SC1菌属的79.55%；SC2与BNSZ共有的菌属占SC2菌属的83.33%。说明熟渍酸菜中绝大部分菌属与白菜内生菌菌属相同。

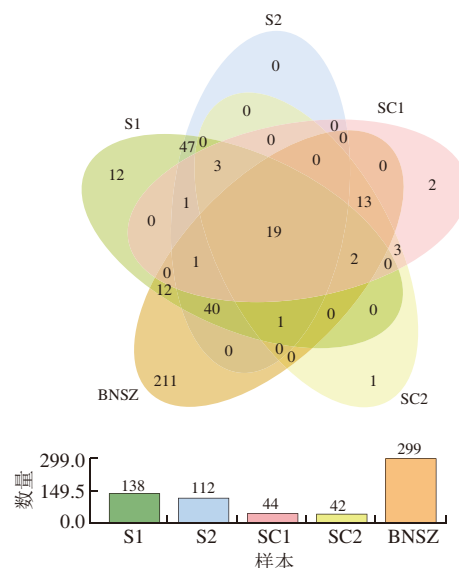


图8 BNSZ与S1、S2、SC1、SC2样本属水平的Venn图

Fig. 8 Venn diagram of genus-level comparison of bacterial community between BNSZ and samples S1, S2, SC1, and SC2

S1、S2、SC1、SC2和BNSZ共有的19种菌属，分别是*uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae*、*uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae*、*Lactococcus*、*Leuconostoc*、*Acinetobacter*、*uncultured_bacterium_o_Chloroplast*、*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*、*Sphingomonas*、*Serratia*、*Lactobacillus*、*Escherichia-Shigella*、*Pseudomonas*、*Methylobacterium*、*Achromobacter*、*Faecalibacterium*、*Weissella*、*Ochrobactrum*、*Clostridium_sensu_stricto_1*、*Bacteroides*。说明生渍和熟渍酸菜中这19种菌属可能来自于白菜内生菌。

由图9可知，S1与BNS共有的菌属数量为25；S2与BNS共有的菌属数量为22；SC1与BNS共有的菌属数量为17；SC2与BNS共有的菌属数量为17。SC1、SC2与BNS共有的菌属数量都为17，SC1、SC2中分别有44、42个菌属。故SC1与BNS共有的菌属占SC1菌属的38.64%；SC2与BNS共有的菌属占SC2菌属的40.48%。由于LB培养基上分离培养出的51种菌属全部来自于白菜内生菌菌属，则说明熟渍酸菜中有部分来自于白菜内生菌的菌属能被分离培养出。

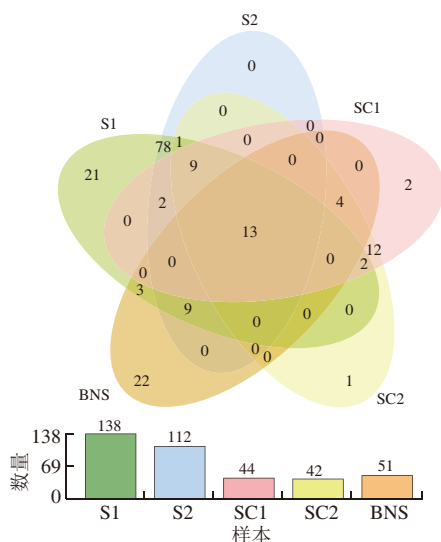


图9 BNS与S1、S2、SC1、SC2样本属水平的Venn图

Fig. 9 Venn diagram of genus-level comparison of bacterial community between BNS and samples S1, S2, SC1, and SC2

S1、S2、SC1、SC2和BNS共有13种菌属，分别是 *uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae*、*Leuconostoc*、*Acinetobacter*、*Serratia*、*Lactobacillus*、*Escherichia-Shigella*、*Pseudomonas*、*uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae*、*Achromobacter*、*Faecalibacterium*、*Weissella*、*Ochrobactrum*、*Bacteroides*。说明生渍和熟渍酸菜中这13种菌属可能来自于白菜内生菌，并且能被LB培养基分离得到。

另外，S1与S2共有的菌属数量为112；S1与SC1共有的菌属数量为26；S1与SC2共有的菌属数量为25；S2与SC1共有的菌属数量为24；S2与SC2共有的菌属数量为23；SC1与SC2共有的菌属数量为40。

3 讨论与结论

本研究以大白菜为原料，采用NGS方法对发酵初期（12 h和72 h）生渍法发酵和熟渍法发酵酸菜细菌群落来源进行研究。同时，对白菜内生菌及其在LB培养基上可分离培养的菌属进行高通量分析。

3.1 酸菜中菌的溯源

在门水平上，生渍和熟渍酸菜绝大部分菌和白菜内生菌相同，初步认为酸菜中绝大部分菌来自白菜内生菌；生渍法发酵12、72 h酸菜样本与白菜内生菌共同注释到的菌属分别是75、61种，分别占生渍法发酵12、72 h酸菜样本菌属的54.35%、54.46%；熟渍法发酵12、72 h酸菜样本与白菜内生菌共同注释到的菌属都是35种，分别占熟渍法发酵12、72 h酸菜样本菌属的79.55%、83.33%。说明生渍酸菜中有一半菌属与白菜内生菌菌属相同；熟渍酸菜中绝大部分菌属与白菜内生菌菌属相同。

3.2 酸菜乳酸菌菌属溯源

在属水平上，生渍法发酵12、72 h酸菜样本注释到的菌属分别是138、112种；熟渍法发酵12、72 h酸菜样本注释到的菌属分别是44、42种。这4个样本都注释到了 *Lactococcus*、*Leuconostoc*、*Lactobacillus*、*Weissella* 4种乳酸菌，但4种乳酸菌的相对丰度不同。生渍法发酵12、72 h酸菜样本中 *Lactococcus* 的相对丰度较高，分别是13.78%、35.98%；而熟渍法发酵12、72 h酸菜样本中 *Weissella* 相对丰度较高，分别是26.23%、25.47%。这4个样本的乳酸菌相对丰度总和分别是23.96%、47.19%、28.54%、26.29%。熟渍通过高温烫漂，使附生在叶片表面的微生物大量死亡，但其在发酵过程中仍有大量的乳酸菌，且与生渍发酵酸菜中的乳酸菌种类相同，都是 *Lactococcus*、*Leuconostoc*、*Lactobacillus*、*Weissella*。Di Cagno等^[29]研究表明，乳酸菌在植物叶表面附生的细菌群落中所占的比例相对较小，且各种乳酸菌普遍缺乏好氧的电子传递链酶系，以发酵的方式获得能量^[30]，而白菜的内生环境氧气缺乏，并富有营养，推测熟渍发酵的酸菜中的乳酸菌来自于白菜的内生菌。

白菜内生细菌共注释到299个菌属，其中注释到6种乳酸菌，除了上述生渍和熟渍发酵过程中的4种乳酸菌，还有 *Bifidobacterium*（0.24%）和 *Tetragenococcus*（0.03%），进一步说明了发酵菜中的乳酸菌来自于白菜内生菌。*Bifidobacterium*和 *Tetragenococcus* 可能不适应酸菜发酵的环境而未生长。*Bifidobacterium* 具有抑制肿瘤、抗菌和抗衰老等多种益生功能^[31]，但其在实验室规模的培养效果并不理想。Nebra等^[32]的研究表明，在培养基中添加还原剂L-半胱氨酸、丙酮酸钠和巯基乙酸钠能促进 *Bifidobacterium* 的生长。可以通过在酸菜发酵过程中添加安全的还原剂，改善发酵环境从而促进发酵过程中 *Bifidobacterium* 的生长。

LB培养基上可分离培养51种白菜内生菌菌属。其中有 *Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Weissella* 3种乳酸菌。表明白菜内生乳酸菌能被分离培养，进一步说明白菜内生乳酸菌是发酵菜中乳酸菌的来源之一。

3.3 酸菜致病菌菌属溯源

生渍法发酵12、72 h酸菜样本注释到的致病菌分别是12、9种，它们的相对丰度总和分别为29.43%、46.75%。相比于生渍法发酵12 h酸菜样本，生渍法发酵72 h酸菜样本致病菌种类减少了3种，分别是 *Tepidimonas*、*Corynebacterium_1*、*Streptococcus*。熟渍法发酵12、72 h酸菜样本都注释到了 *Pseudomonas*、*Serratia*、*Enterobacter*、*Escherichia-Shigella* 4种致病

菌,但4种致病菌的相对丰度不同。生渍法发酵12、72 h酸菜样本中uncultured_bacterium_f_Enterobacteriaceae的相对丰度较高,分别是28.31%、45.62%;而熟渍法发酵12、72 h酸菜样本中Pseudomonas的相对丰度较高,分别是0.06%、0.59%。这4个样本的致病菌相对丰度总和分别是29.43%、46.75%、0.13%、0.68%。相比于生渍法发酵12、72 h酸菜样本,熟渍法发酵12、72 h酸菜样本注释到的致病菌菌属种类和相对丰度明显降低。白菜内生菌注释到了19种致病菌,它们的相对丰度总和为12.47%。除了生渍法发酵12 h酸菜样本中的Spirosoma,其余样本中检测到的致病菌均与白菜内生菌致病菌相同。

蔬菜的叶际微生物在属水平上主要以肠杆菌属(Enterobacter)、假单胞菌属(Pseudomonas)和鞘氨醇杆菌属(Sphingobacterium)等较为常见^[33],肠杆菌属(Enterobacter)和假单胞菌属(Pseudomonas)都是常见的致病菌。而本实验通过高通量分析表明,白菜内生菌丰度前10的主要细菌中没有肠杆菌属(Enterobacter),推测部分致病菌主要附生在植物的叶片表面。对生渍和熟渍发酵过程中细菌群落分析,也能说明部分致病菌主要附生在植物的叶片表面,在生渍发酵12 h时注释到12个属的致病菌,丰度总和为29.43%。熟渍发酵12 h时注释到4个属的致病菌,丰度总和为0.13%,与生渍相比熟渍减少了8个属的致病菌,总丰度下降99.56%,这些下降的致病菌大多是附生在叶片表面的细菌。熟渍通过漂烫可杀灭附生在叶表面的致病菌,大量降低发酵过程中的致病菌,能提高酸菜的安全性。

3.4 未培养(uncultured_)的菌属

生渍法发酵12 h酸菜样本中未经过培养(uncultured_)的菌属有37种,占生渍法发酵12 h酸菜样本菌属总数的26.81%;生渍法发酵72 h酸菜样本中未经过培养(uncultured_)的菌属有33种,占生渍法发酵72 h酸菜样本菌属总数的29.46%;熟渍法发酵12 h酸菜样本中未经过培养(uncultured_)的菌属有6种,占熟渍法发酵12 h酸菜样本菌属总数的13.64%;熟渍法发酵72 h酸菜样本中未经过培养(uncultured_)的菌属有7种,占熟渍法发酵72 h酸菜样本菌属总数的16.67%;白菜内生菌中未经过培养(uncultured_)的菌属有86种,占白菜内生菌菌属总数的28.76%;LB培养基上分离培养的白菜内生菌中未经过培养(uncultured_)的菌属有11种,占BNS菌属总数的21.57%。可以看出这6个样本中均有一部分未经过培养(uncultured_)的菌属,虽然LB培养基上未经过培养(uncultured_)的菌属丰度较低,但能在LB培养基上生长,则说明这些菌能被分离培养。故之后的实验研究中可按照菌属的偏好性进行改良培养基配方,以期分离鉴定出新的微生物物种。

3.5 可产生硝酸还原酶的菌属

由图10可知,两种腌渍方法条件下亚硝酸盐的整体变化相同,均呈现先上升至峰值后逐渐下降至平稳的趋势。发酵12 h时,熟渍法发酵条件下的亚硝酸盐含量升至峰值为9.43 mg/kg;发酵48 h时,熟渍法发酵条件下的亚硝酸盐含量降至3.0 mg/kg以下,48 h后亚硝酸盐含量基本平稳。发酵24 h时,生渍法发酵条件下的亚硝酸盐含量升至峰值,为21.5 mg/kg;发酵72 h时,生渍法发酵条件下的亚硝酸盐含量降至4.21 mg/kg,此时亚硝酸盐含量已基本平稳。与生渍法相比,熟渍法发酵条件下的亚硝酸盐出现时间较早且峰值更低,在发酵后期亚硝酸盐含量更早进入平稳阶段。分析其原因为熟渍法制备酸菜时,高温处理导致白菜表面部分有害菌群死亡,生渍法发酵条件下白菜表面附着的菌群更复杂,如有能产生硝酸还原酶的菌(本研究中生渍法发酵酸菜Acinetobacter、Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium、Serratia、Methylophilus的相对丰度总和显著高于熟渍法),因此导致生渍法发酵条件下的亚硝酸盐含量更高。

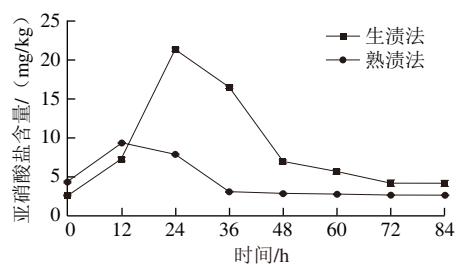


图10 不同腌渍方法东北酸菜发酵过程中亚硝酸盐含量的变化
Fig. 10 Changes of nitrite content during fermentation of pickled Chinese cabbage under different pretreatments

此外,张庆芳^[34]和魏振勇^[35]等通过添加亚硝酸盐实验发现亚硝酸盐促进了乳球菌的生长,通过进一步相关性分析发现亚硝酸盐与乳球菌的生长呈正相关。本研究中,生渍发酵24~72 h酸菜亚硝酸盐的生成量明显高于熟渍发酵酸菜。生渍法发酵酸菜72 h时,乳球菌的相对丰度达到了35.98%,占生渍法发酵酸菜72 h菌属总丰度达到1/3,而熟渍法发酵酸菜72 h时,乳球菌的相对丰度为0.41%,占比不足0.5%,说明亚硝酸盐能促进乳球菌的生长。本研究中使用LB培养基分离培养白菜内生菌,培养出了Lactobacillus、Leuconostoc、Weissella 3种乳酸菌,未培养出乳球菌属,可能与培养基中缺少亚硝酸盐和白菜内生菌中乳球菌含量较少有关;白菜内生菌中乳球菌的存在可能与植物氮代谢有关,使硝酸盐在硝酸还原酶的作用下产生亚硝酸盐,促进乳球菌的生长。本研究发现的Acinetobacter、Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium、Serratia、Methylophilus可能在白菜生长过程中将硝酸盐还原成亚硝酸盐,进而促进内生菌乳球菌的生长,导致乳球菌也能参与到植物的氮代谢循环中。

参考文献:

- [1] 范伟强,尹婧,王超楠,等. 33 个大白菜品种表型遗传多样性评价[J]. 中国瓜菜, 2021, 34(10): 32-38. DOI:10.16861/j.cnki.zggc.20210901.001.
- [2] 王晓玲,肖艳,原让花,等. 大白菜新品种新科翠玉的选育[J]. 中国瓜菜, 2021, 34(6): 88-90. DOI:10.16861/j.cnki.zggc.2021.0156.
- [3] 邹思博,赵明伟,纪超凡,等. 自然发酵东北酸菜中抗氧化乳酸菌的筛选及其益生性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(1): 42-50.
- [4] HU W Z, YANG X Z, JI Y R, et al. Effect of starter cultures mixed with different autochthonous lactic acid bacteria on microbial, metabolome and sensory properties of Chinese Northeast sauerkraut[J]. Food Research International, 2021, 148: 110605. DOI:10.1016/j.foodres.2021.110605.
- [5] 马欢欢,吕欣然,林洋,等. 传统东北酸菜自然发酵过程中乳酸菌与营养物质同步分析[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(2): 79-84. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201702014.
- [6] SCILLATO M, SPITALE A, MONGELLI G, et al. Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens[J]. MicrobiologyOpen, 2021, 10(2): e1173. DOI:10.1002/mbo3.1173.
- [7] OBERG T S, MCMAHON D J, CULUMBER M D, et al. Invited review: review of taxonomic changes in dairy-related lactobacilli[J]. Journal of Dairy Science, 2022, 105(4): 2750-2770. DOI:10.3168/jds.2021-21138.
- [8] 张书强. 乳酸菌强化植物修复重金属污染土壤的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
- [9] 蚁硕钊,李敬彬,房志家,等. 海洋源降解核苷乳酸菌的体外筛选、鉴定及其益生特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(11): 87-94. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.029647.
- [10] WANG J, YANG X H, MUJUMDAR A S, et al. Effects of various blanching methods on weight loss, enzymes inactivation, phytochemical contents, antioxidant capacity, ultrastructure and drying kinetics of red bell pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 77: 337-347. DOI:10.1016/j.lwt.2016.11.070.
- [11] 王莉衡. 植物内生菌的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(3): 5-7; 18. DOI:10.3969/j.issn.1672-5425.2011.03.002.
- [12] VERMA S K, SAHU P K, KUMAR K, et al. Endophyte roles in nutrient acquisition, root system architecture development and oxidative stress tolerance[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 131(5): 2161-2177. DOI:10.1111/jam.15111.
- [13] SANTOYO G, MORENO-HAGELSIEB G, OROZCO-MOSQUEDA M D, et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes[J]. Microbiological Research, 2016, 183: 92-99. DOI:10.1016/j.micres.2015.11.008.
- [14] SMITH S A, TANK D C, BOULANGER L A, et al. Bioactive endophytes warrant intensified exploration and conservation[J]. PLoS ONE, 2008, 3(8): e3052. DOI:10.1371/journal.pone.0003052.
- [15] TIMMUSK S, PAALME V, PAVLICEK T, et al. Bacterial distribution in the rhizosphere of wild barley under contrasting microclimates[J]. PLoS ONE, 2011, 6(3): e17968. DOI:10.1371/journal.pone.0017968.
- [16] HAN D, HA H K, HWANG C Y, et al. Bacterial communities along stratified water columns at the Chukchi Borderland in the Western Arctic Ocean[J]. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2015, 120: 52-60. DOI:10.1016/j.dsr.2.2015.01.018.
- [17] HAQUE M A, YUN H D, CHO K M. Diversity of indigenous endophytic bacteria associated with the roots of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.) cultivars and their antagonism towards pathogens[J]. Journal of Microbiology, 2016, 54(5): 353-363. DOI:10.1007/s12275-016-5641-7.
- [18] ZHANG Y, CHENG D M, XIE J, et al. Long-term field application of manure induces deep selection of antibiotic resistomes in leaf endophytes of Chinese cabbage[J]. Science of the Total Environment, 2023, 882: 163334. DOI:10.1016/j.scitotenv.2023.163334.
- [19] HU A Y, WANG H J, LI J W, et al. Archaeal community in a human-disturbed watershed in Southeast China: diversity, distribution, and responses to environmental changes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(10): 4685-4698. DOI:10.1007/s00253-016-7318-x.
- [20] FRISVAD J C, LARSEN T O. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(19): 7859-7877. DOI:10.1007/s00253-015-6839-z.
- [21] THIERRY A, MADEC M N, CHUAT V, et al. Microbial communities of a variety of 75 homemade fermented vegetables[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1323424. DOI:10.3389/fmicb.2023.1323424.
- [22] ZHOU Q, ZANG S Z, ZHAO Z N, et al. Dynamic changes of bacterial communities and nitrite character during Northeastern Chinese sauerkraut fermentation[J]. Food Science and Biotechnology, 2017, 27(1): 79-85. DOI:10.1007/s10068-017-0279-8.
- [23] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定: GB 5009.33—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [24] ZHENG X F, YANG Z Q, ZHANG H, et al. Isolation of virulent phages infecting dominant mesophilic aerobic bacteria in cucumber pickle fermentation[J]. Food Microbiology, 2020, 86: 103330. DOI:10.1016/j.fm.2019.103330.
- [25] LI X Z, KRUMHOLZ L R. Influence of nitrate on microbial reduction of pertechnetate[J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(6): 1910-1915. DOI:10.1021/es071164j.
- [26] LI S, YANG M X, WANG H, et al. Dynamic characteristics of immobilized microorganisms for remediation of nitrogen-contaminated groundwater and high-throughput sequencing analysis of the microbial community[J]. Environmental Pollution, 2020, 267: 114875. DOI:10.1016/j.envpol.2020.114875.
- [27] LIN N N, TAO Y, GAO P X, et al. Comparative genomics revealing insights into niche separation of the genus *Methylophilus*[J]. Microorganisms, 2021, 9(8): 1577. DOI:10.3390/microorganisms9081577.
- [28] BARDOU P, MARIETTE J, ESCUDIÉ F, et al. Jvenn: an interactive Venn diagram viewer[J]. BMC Bioinformatics, 2014, 15(1): 293. DOI:10.1186/1471-2105-15-293.
- [29] DI CAGNO R, CODA R, DE ANGELIS M, et al. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation[J]. Food Microbiology, 2013, 33(1): 1-10. DOI:10.1016/j.fm.2012.09.003.
- [30] 孟祥晨,杜鹏,李艾黎,等. 乳酸菌与乳品发酵剂[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [31] 韩涛,刘雅婷,张芳,等. 双歧杆菌的生理功能和检测技术的进展[J]. 福建分析测试, 2019, 28(5): 22-26. DOI:10.3969/j.issn.1009-8143.2019.05.04.
- [32] NEBRA Y, JOFRE J, BLANCH A R. The effect of reducing agents on the recovery of injured *Bifidobacterium* cells[J]. Journal of Microbiological Methods, 2002, 49(3): 247-254. DOI:10.1016/S0167-7012(01)00373-6.
- [33] 李莹,熊立瑰,黄芳芳,等. 园艺植物叶际微生物研究进展[J]. 植物生理学报, 2022, 58(10): 1829-1839. DOI:10.13592/j.cnki.ppj.300018.
- [34] 张庆芳,魏振勇,于爽,等. 亚硝酸盐对东北酸菜细菌菌群丰度及理化指标的影响[J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(3): 67-77. DOI:10.19804/j.issn1006-2513.2024.3.009.
- [35] 魏振勇,李娜,孙全敏,等. 亚硝酸盐对酸菜中菌属微生物量的影响及相关性分析[J]. 中国调味品, 2023, 48(10): 33-38; 72. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2023.10.006.