

- of increasing gadolinium anomalies [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 656: 409-420.
- [7] ROGOWSKA J, OLKOWSKA E, RATAJCZYK W, et al. Gadolinium as a new emerging contaminant of aquatic environments [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2018, 37(6): 1523-1534.
- [8] 杨大进, 李宁. 2014年国家食品污染和有害因素风险监测工作手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [9] Second workshop on reliable evaluation of low-level contamination of food [R]. Rome: WHO, 1995.
- [10] BIRKA M, WEHE C A, HACHMOLLER O, et al. Tracing gadolinium-based contrast agents from surface water to drinking water by means of speciation analysis [J]. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1440: 105-111.
- [11] SCHMIDT K, BAU M, MERSCHEL G, et al. Anthropogenic gadolinium in tap water and in tap water-based beverages from fast-food franchises in six major cities in Germany [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 687: 1401-1408.
- [12] GAILLARDET J, DUPRE B, ALLEGR C J, et al. Chemical and physical denaturation in the Amazon River basin [J]. *Chemical Geology*, 1997, 142(3-4): 141-173.
- [13] 蒋婷婷. 山东微山氟碳铈矿晶体学研究 [J]. *现代矿业*, 2019, 35(10): 142-145.
- [14] 罗建美, 季宏兵, 霍永伟. 赣南小流域水体中稀土元素的地球化学特征 [J]. *地球学报*, 2007, 28(5): 438-445.
- [15] 曹心德, 陈莹, 王晓蓉. 环境条件变化对土壤中稀土元素溶解释放的影响 [J]. *中国环境科学*, 2000, 20(6): 486-490.
- [16] NOACK C W, DZOMBAK D A, KARAMALIDIS A K. Rare earth element distributions and trends in nature waters with a focus on groundwater [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(8): 4317-4326.
- [17] 温小军. 赣南稀土矿区土壤环境特征及稀土金属地球化学行为研究[D]. 昆明: 云南大学, 2012.
- [18] 于扬, 李德先, 王登红, 等. 溶解态稀土元素在离子吸附型稀土矿区周边地表水中的分布特征及影响因素 [J]. *地学前缘*, 2017, 24(5): 172-181.
- [19] 张森, 周志荣, 郑磊, 等. 2016年北京城区生活饮用水34种元素水平 [J]. *卫生研究*, 2017, 46(5): 737-742.

## 实验技术与方法

# 市售普洱茶中真菌群落构成和物种多样性分析方法研究

王学硕, 赵琳娜, 刘娜, 王亚萍, 崔生辉  
(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

**摘要:**目的 综合应用传统分离培养、内部转录间隔区(ITS)测序和高通量基因组学测序技术,建立分析市售普洱茶中真菌群落构成和物种多样性的新方法。方法 按照 GB 4789.15—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》对普洱茶样本进行可培养真菌检测和分离纯化,对分离到的菌株进行 ITS 测序并在 NCBI 数据库中进行 Blast 分析;采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取普洱茶样本中真菌基因组 DNA,进行聚合酶链式反应(PCR)扩增和扩增子测序,并对高通量测序数据进行 OTUs 聚类,开展物种构成及多样性分析。结果 通过传统分离培养方法获得 12 株真菌,主要为曲霉和毛霉,其中黑曲霉占比最高(25.00%, 3/12)。基因组学的物种分布结果显示,普洱茶样本中的真菌物种多样性和均匀度较低,存在数量占比较高的优势物种;占比最高的为子囊菌门(74.03%),属的水平上以芽生葡萄孢酵母属为主(49.43%),曲霉属占比较低(14.04%)。结论 本研究综合应用传统分离培养、ITS 测序和高通量基因组学测序技术,构建了普洱茶中真菌群落构成和物种多样性分析的新方法,为普洱茶中微生物群落构成及其对品质 and 安全性影响的进一步研究提供了思路和参考。

**关键词:**普洱茶;真菌;物种多样性

**中图分类号:**R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2021)06-0777-06

**DOI:**10.13590/j.cjfh.2021.06.024

## Study on analysis method of fungal community composition and species diversity in Pu'er tea at retail markets

WANG Xueshuo, ZHAO Linna, LIU Na, Wang Yaping, CUI Shenghui  
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

收稿日期:2021-10-08

基金项目:科技部“食品安全关键技术研发”重点专项项目(2018YFC1603904)

作者简介:王学硕 女 助理研究员 研究方向为食品安全与微生物检测 E-mail:wangxs@nifdc.org.cn

通信作者:崔生辉 男 研究员 研究方向为食品安全与微生物检测 E-mail:cuishenghui@aliyun.com

**Abstract: Objective** Combined the traditional isolation culture, ITS sequencing and metagenomics sequencing technology to establish a new method for the analysis of fungal community composition and species diversity in Pu'er tea at retail markets. **Methods** Pu'er tea samples were collected at retail markets and tested for cultivable fungi in accordance with "National food safety standard Food microbiological examination: Counting of Molds and Yeasts" (GB 4789.15—2016), and the isolated strains were sequenced by ITS and analyzed in the NCBI database; the fungal genomic DNA from Pu'er tea samples was extracted by CTAB method, and performed PCR amplification and amplicon sequencing; high-throughput sequencing data was used to build OTUs clustering, and carried out species composition and diversity analysis. **Results** Twelve fungi were isolated and cultured from Pu'er tea samples, mainly *Aspergillus* and *Lichtheimia*, of which *Aspergillus niger* had the highest proportion (25%, 3/12). The result of species distribution based on metagenomics showed that the diversity and uniformity of fungal species in Pu'er tea samples were low, and there were relatively high number of dominant species; the highest proportion of fungi was *Ascomycota* (74.03%), and at the genus level, the fungi in Pu'er tea were dominated by *Blastobotrys* (49.43%) while *Aspergillus* accounted for a relatively low percentage (14.04%). **Conclusion** This study comprehensively applied traditional isolation culture, molecular biology and high-throughput metagenomics sequencing technology to establish a new method for the analysis of fungal community composition and species diversity in Pu'er tea at retail markets. It provided ideas and references for further research on the microbial community structure in Pu'er tea and its impacts on quality and safety.

**Key words:** Pu'er tea; fungus; species diversity

普洱茶是以地理标志保护范围内的云南大叶种晒青茶为原料,并在地理标志保护范围内采用特定工艺制成的具有独特品质特征的茶叶。按照加工工艺及品质特性,可分为生茶和熟茶两种<sup>[1]</sup>。普洱茶已有一千多年的历史,是我国重要的茶叶品种之一,因其具有独特的风味和降脂减肥、抗氧化等保健功能,受到越来越多国内外消费者的喜爱,在日本、韩国等地还被称为“健康概念茶”<sup>[2-3]</sup>。近期有研究发现熟普洱还具抗炎症的生物活性,陈年熟普洱茶[人体等效剂量 7 g/60 kg(BW/d)]对缓解和预防肠道炎症的发展具有一定功效<sup>[4]</sup>。

在普洱茶发酵过程中,大量微生物参与其中,使得茶叶产生一系列生物化学反应,形成香甜醇厚的独特风味,是普洱茶风味和品质形成的重要来源<sup>[5-6]</sup>。发酵过程中,霉菌和酵母等真菌起主要作用,霉菌类微生物也是普洱熟茶品质形成的基础<sup>[7-8]</sup>。关于普洱熟茶中微生物种类、功能及其安全性的研究已成为茶行业的研究热点。研究普洱茶中微生物的物种构成,最直接的方法是将各种细菌和真菌分离后再进一步研究。早在20世纪80年代,刘勤晋等<sup>[9]</sup>采用传统分离、形态学和生化鉴定等方法证实了细菌、酵母、霉菌和放线菌都参与了普洱茶的发酵。传统的平板培养是分离样品中真菌的经典方法,分离菌株的鉴定主要依靠形态学及生理生化检测,但对于形态多样且多变的真菌,鉴定易出现分歧,影响结果准确性。结合分子生物学手段,将分离到的纯培养物再进行测序分析的方法受培养条件、人员技术、经验的影响较小,可使鉴定结果更加准确,但也存在着样品中微生物多样性丢失的问题<sup>[10]</sup>。随着现代分子生物学

的发展,基于宏基因组学的方法因其能够更全面地反映微生物物种的组成状态,已越来越多地应用到混合菌群体系的分析中<sup>[2, 11-14]</sup>。

本文综合应用了传统分离培养、内部转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)测序和高通量基因组测序技术,建立了普洱茶中真菌群落构成研究的新方法,为普洱茶中微生物群落构成及其对品质和安全性影响的进一步研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

Bio-Rad 聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)仪、Bio-Rad 紫外凝胶成像系统购自美国伯乐公司;冷冻离心机、Nano Drop 1000 微量核酸蛋白测定仪购自美国 Thermo 公司;Tissue Lyser II 组织破碎仪购自德国凯杰公司。

采集市售预包装和散装普洱茶7份,其中熟普洱5份,生普洱1份,未标注加工工艺的普洱茶1份;十六烷基三甲基溴化铵(Hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)裂解液[20 g/L CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)、0.02 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠, pH8.0]、三氯甲烷(分析纯)、异戊醇(分析纯)、异丙醇(分析纯)、TaqDNA 聚合酶(Takara)、dNTP(Takara)、琼脂糖(Oxoid)、磷酸盐吐温缓冲液(PBST, Sigma)、马铃薯葡萄糖琼脂(PDA, BD)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 普洱茶中真菌的分离培养

按照《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》(GB 4789.15—2016),取 25 g 样

品加入 225 mL 0.85% 无菌生理盐水,10 倍梯度稀释,直至制成 1:1 000 样品匀液,分别取 1 mL 各稀释度样品匀液于 2 个无菌平皿中,倒入 20 mL 已冷却至 46 ℃ 的 PDA,并转动平皿使其混合均匀。待琼脂凝固后正置于 28 ℃ 培养箱培养 24 h,菌落长出后观察选取培养基上形态(菌丝长短、生长密度)、颜色等明显不同的菌落,纯化至 PDA 平板培养,用于菌种保存及鉴定。

### 1.2.2 分离菌株的鉴定

普洱茶样本分离纯化的菌株送北京天一辉远生物科技有限公司进行 ITS 测序,将测序结果提交到美国国家生物技术信息中心网站(National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 Blast 分析,从中挑选分值最高的作为比对结果;如得出分值均较高且相近的不同比对结果,则记录真菌所在的属。

### 1.2.3 普洱茶中真菌基因组扩增子测序分析

#### 1.2.3.1 普洱茶总基因组 DNA 提取

参考改进吕昌勇分离普洱茶微生物的方法<sup>[12]</sup>,取 10 g 普洱茶样品加入装有 100 mL 磷酸盐吐温缓冲液(PBST, pH7.4)的增菌袋中,50 ℃ 浸泡 1 h,然后置于摇床摇动 1 h(37 ℃ 100 r/min),将浸泡液用 6 层纱布过滤去除茶叶残渣。取 50 mL 过滤液 10 000×g 离心 10 min,收集沉淀,加入 20 mL PBST,涡旋震荡悬浮沉淀,50 ℃ 水浴 10 min,10 000×g 离心 10 min 收集菌体完成一次洗涤过程,重复洗涤三次。向沉淀中加入 200 μL 水,涡旋震荡悬浮菌体,加入适量钢珠,于组织破碎仪上振动 3 min(29 次/s),加入 600 μL 的 2×CTAB 提取缓冲液,65 ℃ 水浴 1 h 裂解细胞。采用 Tris 饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1, v/v)抽提,异丙醇沉淀 DNA,并用 70% 乙醇洗涤 2 次后,用 50 μL TE 缓冲液重悬 DNA 沉淀,用微量核酸蛋白分析仪检测 DNA 浓度及纯度,加入 1 μL 核糖核酸酶(Ribonuclease, RNase)(10 μg/mL)于 -20 ℃ 保存备用。

#### 1.2.3.2 PCR 扩增和扩增子测序

选用真菌通用引物 ITS4(5'-TCCTCCGCTTA TTGATATGC-3')和 ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTCGT AACAAAGG-3')<sup>[15]</sup>对样品总 DNA 的 ITS2 片段进行扩增。扩增体系为 25 μL,模板添加量为 2 μL,扩增程序为:94 ℃ 预变性 5 min,30 个循环(94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 复性 30 s,72 ℃ 延伸 1 min),72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,用凝胶成像系统观察并拍照,以判断提取效率及完整性。回收扩增后的 PCR 产物,进行文库构建,利用 IonS5™ XL 高通量测序仪对 PCR 扩增产

物进行测序分析。

### 1.2.3.3 高通量测序及数据分析

将 IonS5™ XL 下机数据导出 fastq 文件,使用 Cutadapt 软件过滤并按 barcode 拆分样本后,进行嵌合体过滤,得到可用于后续分析的有效数据(即 Clean reads),进行 OTUs(Operational Taxonomic Units)聚类、物种分类和物种多样性分析。为了研究样品的物种组成多样性,对所有样品的 Clean reads 进行聚类,以 97% 的一致性(Identity)将序列聚类成为 OTUs,然后对 OTUs 的代表序列进行物种注释。对每个样品物种分类结果,筛选最大相对丰度前 20 的种进行物种分类树统计,构建物种分类树。普洱茶样品的物种多样性通过构建稀释曲线和等级聚类曲线展示,从样品中随机抽取一定测序量的数据,统计其所代表物种数目(即 OTUs 数),以抽取的测序数据量与对应的物种数来构建稀释曲线;将样品中的 OTUs 按相对丰度由大到小排序编号并作为横坐标,OTUs 中的相对丰度为纵坐标,绘制等级聚类曲线。

## 2 结果

### 2.1 普洱茶中真菌的分离鉴定结果

#### 2.1.1 普洱茶中真菌的分离

对各普洱茶样本的梯度稀释液进行涂布、培养,平皿计数结果见表 1。3 号样品真菌含量最高(8 200 CFU/g),1、2 和 5 号样本真菌含量在 80~300 CFU/g 之间,4 号和 6 号样本未见真菌生长。根据各普洱茶样本培养平皿的菌落形态,共分离、纯化 12 株不同形态的真菌;其中 3 号样本分离到 6 株真菌,5 号样本分离到 3 株真菌,1、2、和 7 号样本各分离到 1 株真菌。

#### 2.1.2 普洱茶分离真菌的鉴定

将 12 株普洱茶分离真菌的 ITS 测序分析与 NCBI 数据库进行比对,结果显示:分离的 12 株真菌中 10 株为曲霉、2 株为毛霉,1、3 和 5 号样本分离的真菌中均含有黑曲霉(表 1)。1 号样品分离菌株为黑曲霉(*Aspergillus niger*),2 号样品分离菌株为毛霉属(*Lichtheimia* sp.),3 号样品分离菌株均为曲霉属,主要有谢瓦氏曲霉(*Aspergillus chevalieri*)、杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、聚多曲霉(*Aspergillus sydowii*)和塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis*),5 号样品分离菌株为伞状毛霉(*Lichtheimia corymbifera*)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*),7 号样品分离菌株为曲霉属(*Aspergillus* sp.)。

表 1 普洱茶样本中真菌分离鉴定结果

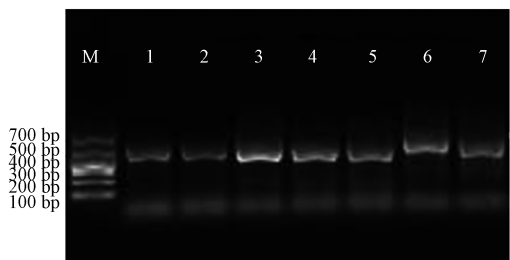
Table 1 Fungal isolation and identification results of Pu'er tea samples

样本号	样品类型	计数结果 (CFU/g)	分离菌株数	ITS 测序结果	菌株名称
1	熟普洱	90	1	<i>Aspergillus niger</i>	黑曲霉
2	熟普洱	80	1	<i>Lichtheimia</i> sp.	毛霉属
3	熟普洱	8 200	6	<i>Aspergillus chevalieri</i>	谢瓦氏曲霉
				<i>Aspergillus versicolor</i>	杂色曲霉
				<i>Aspergillus niger</i>	黑曲霉
				<i>Aspergillus sydowii</i>	聚多曲霉
				<i>Aspergillus tubingensis</i>	塔宾曲霉
				<i>Aspergillus</i> sp.	曲霉属
4	熟普洱	<10	0	/	/
5	熟普洱	300	3	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	伞状毛霉
				<i>Aspergillus fumigatus</i>	烟曲霉
				<i>Aspergillus niger</i>	黑曲霉
6	普洱	<10	0	/	/
7	生普洱	100	1	<i>Aspergillus</i> sp.	曲霉属

2.2 普洱茶中真菌基因组扩增子测序分析结果

2.2.1 普洱茶中真菌 ITS2 序列扩增

以普洱茶中微生物总基因组 DNA 为模板,使用 ITS2 片段通用引物 ITS4 和 ITS5 进行扩增,扩增后的电泳图谱如图 1 所示。PCR 扩增产物分子量约为 500~600 bp,与预期目的基因片段大小一致,扩增条带清晰明亮且无杂带。结果表明,ITS2 引物对七种普洱茶中的真菌均具有特异性的扩增。



M: DNA Marker

图 1 各普洱茶样本中真菌的 ITS2 PCR 电泳图

Figure 1 ITS2 PCR electrophoresis of fungi in various Pu'er tea samples

2.2.2 真菌物种分布情况

根据物种注释结果,选取每个样品在属水平上最大相对丰度排名前 10 的物种,生成物种相对丰度柱形累加图,见图 2。结果显示,1 号熟普洱、2 号熟普洱、4 号熟普洱以及 5 号熟普洱茶样本中真菌物种组成以芽生葡萄孢酵母属为主。3 号普洱茶样本的真菌物种组成以曲霉属为主,对数据分析发现,该曲霉属在种水平上的物种组成主要为:*Aspergillus ruber*(红曲霉) 74.78%、*Aspergillus penicillioides*(帚状曲霉) 5.71%、*Aspergillus tubingensis*(塔宾曲霉) 0.51%;6、7 号样品则以其他类真菌为主,芽生葡萄孢酵母属和曲霉属占比较低。

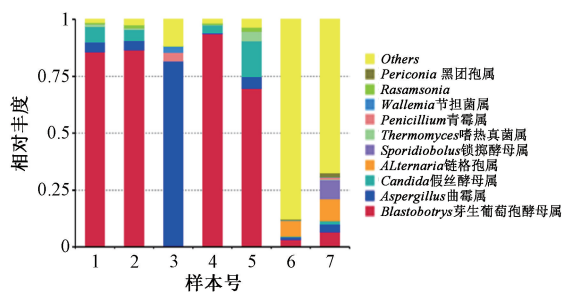


图 2 各普洱茶样本中真菌的物种相对丰度图

Figure 2 Relative abundance of fungi species in various Pu'er tea samples

2.2.3 物种分类树

根据样品物种分类结果,筛选最大相对丰度前 20 的种进行物种分类树统计,并列出该物种占总物种的比例和占特定物种(前 20 种)的比例,结果见图 3。普洱茶样本中真菌物种相对丰度前 20 的种占到了物种总数的 75.72%,主要为 Ascomycota(子囊菌门)和 Basidiomycota(担子菌门),子囊菌门在总真菌物种中占比达 74.03%。在属的水平上,以芽生葡萄孢酵母属为主(49.43%);曲霉属(14.04%)次之,主要包括红曲霉(11.33%)、帚状曲霉(1.70%)和塔宾曲霉(1.02%)。

2.2.4 物种多样性分析

稀释曲线和等级聚类曲线用于分析样品内的物种丰富度和群落多样性,用 Qiime 软件计算样品复杂度指数并绘制的稀释曲线和等级聚类曲线见图 4。结果显示,本次普洱茶样本的测序数据量合理,7 号生普洱茶样本中真菌的物种丰富度和多样性均为最高,且物种分布较均匀;6 号普洱茶样本的真菌物种丰富度和多样性居中,其他 5 种普洱茶中的物种多样性和均匀度均较低。



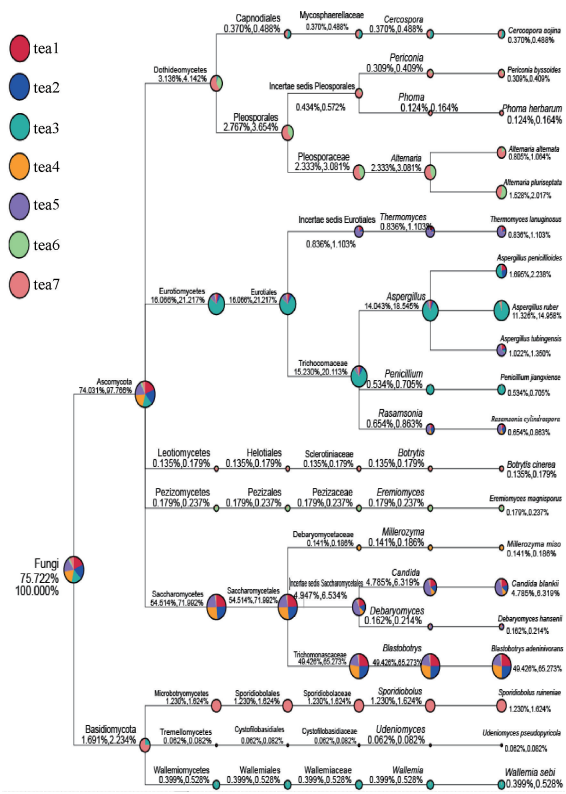
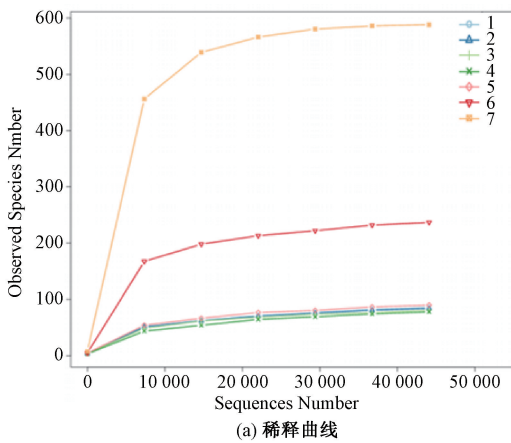
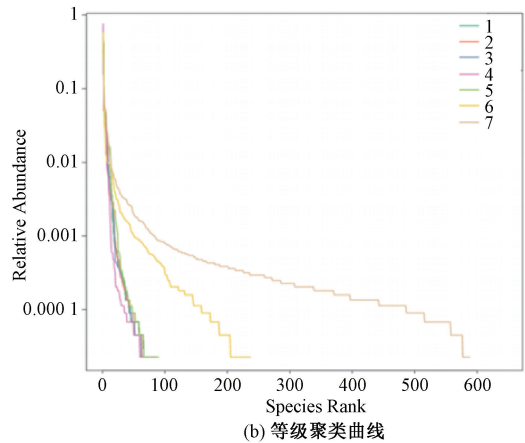


图3 普洱茶样本真菌物种分类树

Figure 3 Fungal species classification tree of Pu'er tea samples



(a) 稀释曲线



(b) 等级聚类曲线

注:(a) 稀释曲线中,横坐标为从某个样品中随机抽取的测序条数,纵坐标为基于该测序条数能构建的 OTU 数量,用来反映测序深度情况;(b) 等级聚类曲线中,横坐标为按 OTUs 丰度排序的序号,纵坐标为对应的 OTUs 的相对丰度

图4 普洱茶样本真菌多样性分析

Figure 4 Fungal diversity analysis of Pu'er tea samples

高的为子囊菌门(74.03%),在属的水平上,则以芽生葡萄孢酵母属为主(49.43%);而以往研究中自普洱茶分离且被认为是普洱茶优势霉菌的真菌物种在高通量测序数据分析结果中占比并不高,仅包含曲霉属(14.04%)和少量青霉属(0.53%),这也与吕昌勇、方欣等在宏基因组学层面对普洱茶发酵过程中的真菌群落研究结果一致<sup>[12, 20]</sup>。对比传统分离培养与高通量基因组测序分析结果,3号样本两种方法分析的结果较一致,优势菌属均为曲霉菌

### 3 讨论

近年来,“普洱茶产黄曲霉致癌说”时有传出,普洱茶中是否存在黄曲霉并被黄曲霉毒素污染引发了社会的关注和争议。黄曲霉(*Aspergillus flavus*)属曲霉属,能产生黄曲霉毒素(*Aflatoxins*)<sup>[16-17]</sup>。黄曲霉毒素对人体有明确的致癌性,已在2002年被世界卫生组织国际癌症研究机构划定为I类致癌物<sup>[18]</sup>。本文综合应用分离培养、ITS测序和高通量基因组测序技术分析市售普洱茶样本中的真菌构成,结果显示,各普洱茶样本中均未发现黄曲霉。

应用传统的分离培养方法自样本中获得12株真菌,经ITS测序并比对数据库,主要为曲霉和毛霉属;其中多份样本分离到了黑曲霉,表明曲霉尤其是黑曲霉是普洱茶可培养真菌中的优势菌种,与近年对普洱茶中可培养真菌的研究结果一致,也与工业化生产中接种黑曲霉作为普洱茶固态发酵优势菌种的加工工艺相符<sup>[19-21]</sup>。对高通量基因组测序数据进行物种多样性分析,多数普洱茶中的真菌物种多样性和均匀度均较低,存在数量占比较高的优势物种。物种分类树显示,普洱茶中真菌占比最

属;其余6份样本高通量测序分析与传统分离培养结果存在较大差异。基于高通量基因组测序分析的真菌群落和物种多样性结果与传统分离培养的结果存在统一而互补的关系,其差异有待于进一步深入研究。

由于自然界中仅有0.1%~10%的环境微生物可被纯化培养,部分数量较少或微量的菌群则在培养中消失<sup>[22]</sup>,且真菌形态特征容易受到培养条件和其他因素的影响,因此通过传统分离培养和形态学

鉴定的方法并不能够全面准确地反映普洱茶中的真菌群落分布情况。而通过传统平板培养和测序相结合,既获取了纯的培养菌株,也通过分子生物学技术进行了鉴定,进而分析确定了分离菌株的种属,在鉴定的准确性和微生物种资源保存上均有优势。随着基因测序技术的深入发展,宏基因组水平的分析可以得到更多信息,有助于我们更全面地认识普洱茶中的真菌物种组成。但基于高通量测序的微生物丰度及多样性分析在很大程度上依赖于比对选择的数据库和数据分析的算法,也可能引起结果与真实情况的偏差。本研究综合应用了传统分离培养、ITS测序和高通量基因组学测序分析技术,构建了市售普洱茶中真菌鉴定和物种多样性分析的方法,为普洱茶中微生物群落构成及其对品质 and 安全性影响的进一步深入研究提供了思路和参考。

## 参考文献

- [ 1 ] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 地理标志产品 普洱茶: GB/T 22111—2008 [ S ]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [ 2 ] 张阳. 普洱茶发酵过程中微生物群落结构动态分析 [ D ]. 天津: 天津科技大学, 2012.
- [ 3 ] 王兴华, 蒋宾, 王利妍, 等. 浅盘与传统普洱茶发酵的微生物群落和化学成分比较研究 [ J ]. 西南大学学报 ( 自然科学版 ), 2019, 41 ( 10 ): 28-36.
- [ 3 ] 王兴华, 蒋宾, 王利妍, 等. 浅盘与传统普洱茶发酵的微生物群落和化学成分比较研究 [ J ]. 西南大学学报 ( 自然科学版 ), 2019, 41 ( 10 ): 28-36.
- [ 4 ] HU S S, LI S, LIU Y, et al. Aged ripe Pu-erh tea reduced oxidative stress-mediated inflammation in dextran sulfate sodium-induced colitis mice by regulating intestinal microbes [ J ]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69 ( 36 ): 10592-10605.
- [ 5 ] 李浩, 谭英智, 陈柱涛, 等. 云南大叶种晒青毛茶提取物对产毒黄曲霉生长及产毒的影响 [ J ]. 现代食品科技, 2015, 31 ( 11 ): 101-106.
- [ 6 ] LONG P P, WEN M C, GRANATO D, et al. Untargeted and targeted metabolomics reveal the chemical characteristic of pu-erh tea ( *Camellia assamica* ) during pile-fermentation [ J ]. Food Chemistry, 2020, 311: 125895.
- [ 7 ] KIM B H, JANG J O, LEE J B, et al. Microbial diversity comparison between Korean, Japanese, and Chinese post-fermented tea ( chungtaejeon, awabancha, and puerh tea ) [ J ]. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 2020, 49 ( 4 ): 385-393.
- [ 8 ] 郝彬秀, 李颂, 田海霞, 等. 普洱熟茶的发酵微生物研究进展 [ J ]. 食品研究与开发, 2018, 39 ( 8 ): 203-206.
- [ 9 ] 刘勤晋, 周才琼, 许鸿亮. 普洱茶的渥堆作用 [ J ]. 茶叶科学, 1986, 6 ( 2 ): 55-56.
- [ 10 ] 章采东, 邱彦超, 李殿威, 等. 新采收稻谷与仓储稻谷的霉菌菌相分析 [ J ]. 粮油食品科技, 2020 ( 2 ): 103-107
- [ 11 ] 高洁. 雪莲菌菌相分析及抗癌活性研究 [ D ]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [ 12 ] 吕昌勇. 普洱茶渥堆发酵过程中微生物宏基因组学的测定与分析 [ D ]. 昆明: 昆明理工大学, 2013.
- [ 13 ] 董坤, 熊辛宇, 蓝增全. 普洱茶发酵过程中微生物类群分析 [ J ]. 现代农业科技, 2009 ( 1 ): 164-165.
- [ 14 ] 姜姝, 吕杰, 李灏. 普洱茶不同发酵时期微生物群落宏转录组学研究 [ J ]. 北京化工大学学报 ( 自然科学版 ), 2012, 39 ( 6 ): 84-89.
- [ 15 ] WHITE T J, TAYLOR J. PCR protocols - A guide to methods and applications [ J ]. 1990, 8: 335.
- [ 16 ] 沈青山, 周威, 莫海珍, 等. 黄曲霉毒素污染控制的研究进展 [ J ]. 食品科学, 2016, 37 ( 9 ): 237-243.
- [ 17 ] Torres-Pacheco I. Aflatoxin-detection, measurement and control [ M ]. Mexico: InTech, 2011.
- [ 18 ] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene [ M ]. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2002, 82: 1-556.
- [ 19 ] 李雪玲, 陈华红, 王建文, 等. 黑曲霉与顶头孢霉菌株对普洱茶品质的影响 [ J ]. 食品科技, 2020, 45 ( 1 ): 121-127.
- [ 20 ] 方欣, 骆爱国, 涂青, 等. 普洱茶 ( 熟茶 ) 发酵过程各层间真菌群落的动态变化 [ J ]. 食品科技, 2019, 44 ( 5 ): 37-42
- [ 21 ] 王桥美, 彭文书, 杨瑞娟, 等. 普洱茶发酵过程中可培养微生物的群落结构分析 [ J ]. 食品与发酵工业, 2020, 46 ( 20 ): 88-93.
- [ 22 ] AMANN R I, LUDWIG W, SCHLEIFER K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation [ J ]. Microbiological Reviews, 1995, 59 ( 1 ): 143-169.