基于高通量测序分析连栀矾溶液发酵炮制过程中真菌菌群多样性变化

袁学刚[3]，叶 羊[1]，赵甲元[1*]，谢 洁[1]，金 艳[1]，肖宇航[1]，王战国[4]，张晓喻[1,2*]

1. 四川师范大学生命科学学院，四川 成都 610101
2. 四川师范大学食品功能及加工应用研究所，四川 成都 610101
3. 四川洲际胃肠肛门病医院，四川 成都 610000
4. 成都大学医学院（护理学院），四川 成都 610106

摘 要：目的 探究传统连栀矾溶液发酵炮制过程中真菌菌群多样性和优势菌群，为科学发酵提供理论依据。**方法** 采用 Illumina HiSeq 高通量测序技术测定不同发酵时间上下层连栀矾溶液中真菌 ITS2 区序列，应用 QIIME、Mothur 和 R 等软件整理和统计样品序列数目和操作分类单元（OTU）数量，分析样品中真菌菌群的组成、丰度、分布、alpha 多样性、beta 多样性，阐明炮制过程中真菌菌群结构、多样性及丰富度的动态变化。**结果** 4 个不同的发酵时期共获得用于分析的有效序列数为 207 068，稀疏曲线表明测序深度充分，OTUs 的数量接近于饱和，能充分展示连栀矾溶液的真菌群落结构，其主要由子囊菌门（Ascomycota，74.21%）、担子菌门（Basidiomycota，7.31%）、罗兹菌门（Rozellomycota，2.62%）、接合菌门（Zygomycota，0.66%）和球囊菌门（Glomeromycota，0.01%）组成，优势菌门为子囊菌门。通过分析 OTUs 数量、chao1 指数，ACE 指数、Shannon 指数，表明连栀矾溶液真菌菌群有较高的丰富度和多样性，并且在炮制过程中上下层总丰富度和多样性随发酵时间的增加逐渐增加，其中上层样品的丰富度、多样性逐渐增加，下层样品的丰富度、多样性先降低后增加，且上层样品的丰富度、多样性明显高于下层样品。**结论** 以高通量测序技术分析连栀矾溶液发酵炮制过程中真菌菌群结构、多样性及丰富度的动态变化可为指导其科学发酵提供参考。

关键词：连栀矾溶液；真菌；菌群多样性；Illumina HiSeq 高通量测序技术；发酵；炮制；优势菌群；ITS2；菌群多样性；菌群丰富度；子囊菌门；担子菌门；罗兹菌门；接合菌门；球囊菌门

中图分类号：R283.1 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2018)18 - 4259 - 10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.18.009

Fungal community diversity changes of Lianzhifan solution during fermentation process by high-throughput sequence technology

YUAN Xue-gang[3], YE Yang[1], ZHAO Jia-yuan[1], XIE Jie[1], JIN Yan[1], XIAO Yu-hang[1], WANG Zhan-guo[4], ZHANG Xiao-yu[1,2]

1. College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China
2. Institute of Food Function and Processing Application Research, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China
3. Intercontinental Hospital of Proctology and Gastroenterology, Chengdu 610000, China
4. College of Medicine (School of Nursing), Chengdu University, Chengdu 610106, China

Abstract: Objective To investigate the dynamic changes of fungal communitiy diversity and dominant fungal communitiy of Lianzhifan solution in the fermentation process, so as to provide a scientific basis for the scientific fermentation. **Methods** Different samples was furtherly measured by Illumina HiSeq sequencing technique for the sequence of ITS2 variable region of fungi from Lianzhifan solution. QIIME, Mothur, and R software programs were employed to sort and calculate the number of sequences and operational taxonomic units (OTUs) for each sample. The composition, abundance, distribution, alpha diversity index of species, and beta diversity were analyzed to clarify the dynamic changes of fungal communities in structure, diversity, and abundance during the

收稿日期：2018-04-25

基金项目：四川省科学技术厅项目（2017JY0345，2015SZ0039）；四川省中医药科学技术研究专项（2016Q075）；四川省教育厅重点项目（14ZA0035）

作者简介：袁学刚（1976—），男，医学硕士，副主任医师，主要从事中医药治疗肛肠科常见疾病。E-mail: 14472543@qq.com

*通信作者 张晓喻 Tel: 13060005523 E-mail: zhangxy2005@126.com

赵甲元 Tel: 15882194839 E-mail: jiangnanyu123@126.com

process of fermentation. **Results** The numbers of effective sequences for four different fermentation periods were 207 068; The rarefaction curves showed a sufficient sequencing depth, and the number of OTUs was close to saturation, which can fully display the fungal community structure of the Lianzhifan solution. The Fungi in Lianzhifan solution belonged to the following five phylums: Ascomycota (74.21%), Basidiomycota (7.31%), Rozellomycota (2.62%), Zygomycota (0.66%), and Glomeromycota (0.01%). The dominant specie was identified to the Ascomycota. Results on the number of OTUs, Chao1 index, ACE index, and Shannon index showed that Lianzhifan solution had high abundance and diversity of fungal community, and total abundance and diversity of the upper and lower layers gradually increased during the fermentation process. Among them, the abundance and diversity of the upper samples increased during the whole process, while the lower samples showed a decrease firstly and followed by a dramatically increase, despite the diversity of the upper layer was obviously higher than that of the lower layer. **Conclusion** Illumina HiSeq sequencing technique can be used to determine the dynamic changes of fungal communities in structure, diversity, and abundance during the process of fermentation, which provides a reference for the scientific fermentation.

Key words: Lianzhifan solution; fungus; communitiy diversity; Illumina HiSeq sequencing technique; fermentation; processing; dominant fungal communitiy; ITS2; diversity; abundance; Ascomycota; Basidiomycota; Rozellomycota; Zygomycota; Glomeromycota

连栀矾溶液原名黄连霉液，是我国著名中医肛肠病学专家黄济川先生的临床效验方，为成都肛肠专科医院的医院效验制剂（川药制字 Z 20080191）[1]。其由黄连、栀子、白矾制作而成，制作工艺非常独特：将中药材按配方用水煎煮，滤过药液加盖静置在阴暗潮湿处，待其表面出现豹纹式青灰色真菌，药液呈澄清的橙红色至黄棕色时方可装瓶使用。这与常见的中药炮制工艺大相径庭，该制剂具有清热凉血、解毒消肿止痛的功效[2]，常用于肛周脓肿[3]、尖锐湿疣[4]、溃疡性肠炎[5-6]等肛肠科疾病。连栀矾溶液的传统发酵过程是直接利用环境中的天然微生物进行自然发酵，发酵体系中有多种微生物共存，尤其是溶液表面的真菌生长状态是其发酵过程中的关键观察点。虽然溶液中真菌种类和数量极多，但其种群与构成在发酵过程并不是一成不变，在不同的阶段以及空间位置上会出现一定的差异，而针对其传统发酵炮制过程中真菌菌群多样性和优势菌群，以及动态变化的研究还未见报道。

目前，随着分子生物技术的迅猛发展，高通量测序技术成为基因组学研究中应用最广泛的测序技术[7-8]，相比于 Sanger 测序技术而言，具有通量高、速度快、成本低[9]等特点。目前，高通量测序技术主要包括 Illumina 公司的 Hiseq 和 Miseq 测序平台、454 公司的 GSFLX 测序平台以及 Life Technologies 公司的 Iontorrent PGM 和 Ion proton 测序平台，能一次并行对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定，使得对一个物种的转录组和基因组进行细致全面的分析成为可能，逐步进入基因组和后基因组时代，已被广泛应用于土壤[10]、酒醅[11]、水环境[12]、肠道[13]等微生物多样性及丰度的研究中，成为目前较为先进的检测技术。

本研究拟采用 Illumina HiSeq 第 2 代测序方法测定不同发酵时间上下层连栀矾溶液中真菌群落的组成与丰富度，分析在不同发酵时期及空间位置上真菌菌群结构、多样性及丰富度的动态变化，为揭示连栀矾溶液传统的发酵炮制机制提供研究基础，为科学发酵提供必要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄连（批号 470330）、栀子（批号 470401）、白矾（批号 151121）均购于成都康美药业生产有限公司，经该公司主管中药师黄华军鉴定，黄连为毛茛科黄连属植物黄连 *Coptis chinensis* Franch 的干燥根茎，栀子为茜草科栀子属植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实；核酸染料 EB（E607322）、琼脂糖（Agarose A600234），生工生物工程（上海）股份有限公司；PCR 酶（KOD-401B：TOYOBO KOD-Plus-Neo DNA Polymerase）；DNA marker（Takara 公司，DL2000）；TE 缓冲液；引物 ITS3_KYO2（5’-GATGAAGAACGYAGYRAA-3’）和 ITS4（5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’）；DNA 提取试剂盒（MO BIO PowerSoil DNA Isolation Kit）；胶回收试剂盒（Omega）；测序建库试剂盒（TruSeq DNA PCR-Free Sample Prep Kit）；上机测序试剂盒（Hiseq Rapid SBS Kit v2）。

1.2 仪器与设备

紫外分光光度计（ThermoFisher，NanoDrop 2000C）；凝胶成像仪（Bio-Rad 公司，VersaDoc^{MP} 5000）；离心机（Eppendorf 公司，5424R）；电泳仪（Bio-Rad 公司，Powerpac Basic1645050）；荧光定

量仪（Invitrogen 公司，Qubit 2.0）；凝胶萃取仪（OMEGA-Biotek 公司，Firefly NIMBUS®96）；PCR 仪（ABI 公司，Applied Biosystems GeneAmp 9700）；测序仪（Illumina 公司，Hiseq 2500）；生物分析仪（Agilent 公司，2100）。

1.3 方法

1.3.1 连栀矾溶液的制备 取黄连、栀子、白矾按组方进行煎煮，收集滤液于高 80 cm 的发酵桶中，加盖静置于室温下自然发酵，于发酵前（第 0 天，I_0）、第 4 天（4S、4X）、第 10 天（10S、10X）、第 19 天（19S、19X）进行发酵液的上下层（S、X）取样。取样时用无菌吸管吸取液面下 5 cm 处液体，分别吸取 5 个点位的液体各 20 mL，合并 100 mL 即为上层发酵液；同法，吸取离桶底 10 cm 处 5 个点位的液体各 20 mL 合并 100 mL 即为下层发酵液（图 1），分别用无菌离心管装取并置于−80 ℃的冰箱保存，待用。

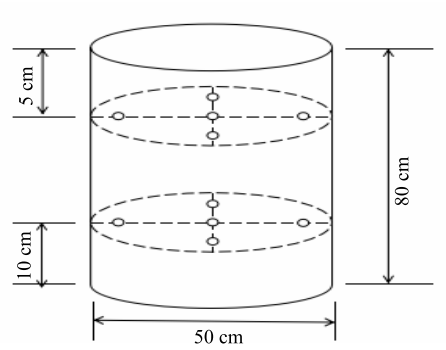

图 1 取样示意图

Fig. 1 Sampling schematic diagram

1.3.2 样品的 DNA 提取 将不同发酵天数上下层的连栀矾溶液样品于室温下解冻，取 5 mL 解冻后的样品于无菌离心管中 13 000 r/min 离心 10 min，弃上清，用所得沉淀按照 MO BIO PowerSoil DNA Isolation Kit 试剂盒说明书进行基因组 DNA 的提取。用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳对 DNA 分子大小进行判断，利用紫外分光光度计对 DNA 分子浓度和质量进行检测，并使用无菌水稀释 DNA 至 10 ng/μL。

1.3.3 ITS2 区的 PCR 扩增 以稀释后的基因组 DNA 为模板，使用带有 12 nt Barcode 的特异引物 ITS3_KYO2（5’-GATGAAGAACGYAGYRAA-3’）和 ITS4（5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’），使用高效和高保真酶（TOYOBO KOD-Plus-Neo DNA 聚合酶、1 倍反应缓冲液）按照 PCR 的条件：94 ℃预变性 1 min、94 ℃变性 20 s、50 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 30 s，共 30 个循环；72 ℃延伸 5 min 对样本的 ITS2 区域进行扩增[14]，做 3 个技术重复，全程保证扩增的效率和准确性。

1.3.4 PCR 产物的混样和纯化 PCR 反应终止于线性扩增期，PCR 结束后将同一样本的 3 个 PCR 产物混合后用 2%琼脂糖凝胶电泳检测，检测条件 5 V/cm，20 min。使用胶回收试剂盒切胶回收 300～1 000 bp 的 PCR 产物，TE 缓冲液洗脱回收目标 DNA 片段，切取目的片段并用 OMEGA-凝胶萃取仪进行提纯。参照电泳初步检测结果，将 PCR 回收产物用 Qubit 2.0 进行检测定量，之后按照每个样本的测序量要求，进行相应比例的混合。

1.3.5 文库构建与测序 利用 Illumina 公司的 TruSeq DNA PCR-Free Sample Prep Kit 试剂盒进行文库构建。首先对基因片段进行末端修复，将 DNA 5’端突出的碱基切除，3’端缺失的碱基补齐，同时在 5’端加上 1 个磷酸基团。在修复平整的 DNA 片段 3’端引入单碱基“A”，从而防止 DNA 片段的自连，同时保证 DNA 与 3’端有 1 个突出 T 碱基的测序接头相连。在连接酶的作用下，孵育含有标签的接头与 DNA 片段，使其相连。利用 2%琼脂糖凝胶电泳来对文库做最终的片段选择与纯化。构建好的文库取 1 μL，在 Agilent Bioanalyzer 2100 仪器上用 Agilent High Sensitivity DNA Kit 对文库进行质检，合格后，采用 PE250 测序方式在 Illumina Hiseq 测序仪上进行上机测序。

1.3.6 生物信息学及统计分析 测序得到的原始数据（raw data），存在一定比例的干扰数据（dirty data），为了使信息分析的结果更加准确、可靠，首先对原始数据进行筛查、处理和质量控制，得到高质量的有效数据（effective tags）[15]。双端测序得到的 PE reads 首先使用 FLASH[16]进行拼接，同时对序列质量进行质控，根据 Barcode 区分样品，去除低质量序列。使用 UPARSE 算法[17]，按照 97%的相似性水平[18]进行操作分类单位（operational taxonomic units，OTU）聚类，挑选出每个 OTU 的代表性序列，使用 Uchime[15]去除嵌合体。同时，使用 UNITE 数据库[19]进行物种分类信息的划分，去除注释信息非真菌界的 OTU。利用 MAFFT[20]对代表性序列进行多重比对，然后使用 FastTree[21]重构建进化树。通过 QIIME[22]、Mothur[23]和 R[24]等软件对 OTU 进行丰度、alpha 多样性、beta 多样性以

及物种在各个分类水平上的群落结果统计分析，得到微生物群落结构组成[25-26]。

2　结果

2.1　测序结果的质量分析

不同发酵时间上下层连栀矾溶液样品中所测得的有效序列共 207 068 条，其中高质量序列 176 938 条，占序列总数的 85.23%。长度分布在 300～500 bp，从序列长度的分布来看，与 ITS2 区序列长度吻合（表 1）。

2.2　OTU 划分和分类地位

利用 Mothur 软件计算在 97%的相似水平上每个样品的 OTU 数量，OTU 的数量可以代表样品物种的丰度[27]。结果表明，在所有样品中，OTU 数量最多可达到 350，最少为 227。且随着发酵时间的增加，上下层总 OTU 数量逐渐增加，其中上层逐渐增加，下层先降低后增加，上层明显高于下层，样品均不存在未分类 OTU（表 2）。这表明连栀矾溶液样品的菌群丰富度很高，随发酵时间的增加丰富度逐渐增加且不同发酵时间以及上下层之间的菌群丰富度差异较大。在 OTU 分析中，常用维恩图即用固定的交叉环和封闭的曲线表示多组样品的 OTU 共有和独有的情况。由韦恩分析图（图 2）可知样品 I_0、4S、4X、10S、10X 共有 OTU 为 55 个，占总 OTU 序列数的 67.03%，样品 I_0、4S、4X、19S、19X 共有 OTU 为 41 个，占总 OTU 序列数的 52.27%。

表 1　样品高质量序列统计

Table 1　High quality sequences of samples

样品名	有效序列/条	高质量序列/条	比例/%
I_0	7 244	3 574	49.34
4S	28 250	25 062	88.72
4X	10 084	7 360	72.99
10S	34 000	29 410	86.50
10X	11 400	8 848	77.61
19S	17 940	14 946	83.31
19X	98 690	87 738	88.90

2.3　alpha 多样性分析

2.3.1　稀释曲线　利用已测得 ITS 序列中已知的各种 OTU 的相对比例，模拟输入序列数目（小于总的样品序列条数）与 OTU 个数产出间的相互关系。对基于 97%相似度归类的 OTU 用 Shannon 法进行稀释曲线（rarefaction curve）的绘制（图 3）。

通过绘制稀释曲线可间接反映样本中物种的丰

表 2　各样品菌群的 OTUs 数量及 alpha 多样性指数

Table 2　OTUs number and alpha diversity index of fungal communitiy in different samples

t/d	OTU 数量		Chao1 指数		ACE 指数		Shannon 指数	
	S	X	S	X	S	X	S	X
0	270	270	339.0	339.0	365.712 158 0	365.712 158 0	3.322 628 065	3.322 628 065
4	300	234	471.0	301.0	534.583 321 2	317.768 423 2	3.616 169 221	3.314 608 243
10	333	227	559.0	288.0	634.787 225 3	293.024 082 3	4.112 146 509	3.231 618 242
19	350	276	611.0	542.0	635.094 223 0	660.401 855 6	4.563 129 724	3.745 673 301

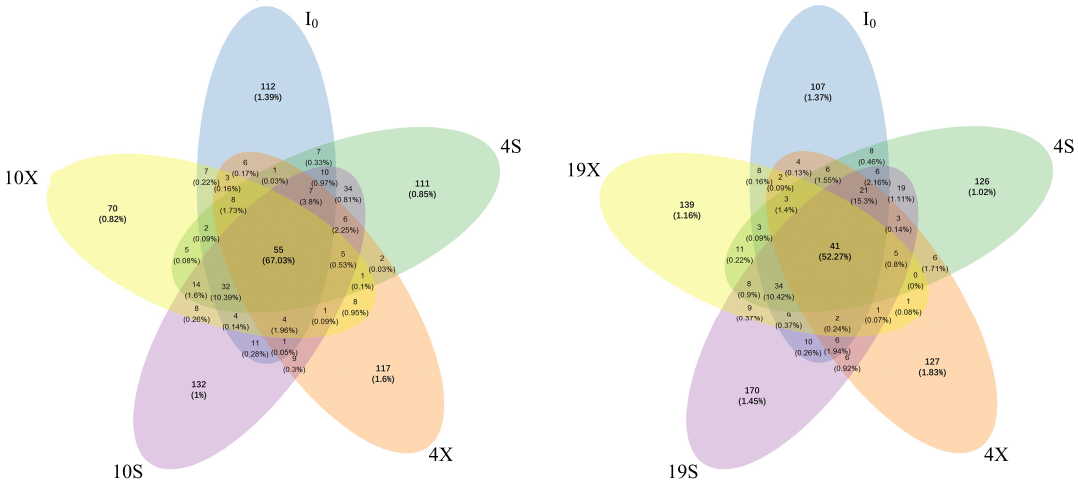

图 2　样品韦恩图

Fig. 2　Venn plot among all samples

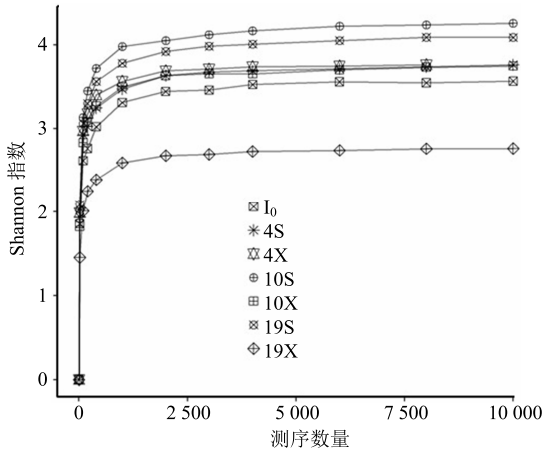

图 3 稀释曲线

Fig. 3 Rarefaction curves

富程度。当曲线趋于平缓时可认为测序深度已经基本覆盖到样品中所有的物种。如果曲线趋于平坦表明测序已趋于饱和，增加测序数据无法再找到更多的 OTU；反之表明不饱和，增加数据量可以发现更多的 OTU。从 Shannon 指数稀疏曲线来看，7 个连栀矾溶液样品的曲线数值先是直线上升后缓慢上升直至曲线趋向平坦，说明测序量足够大，能够覆盖样品中绝大多数微生物信息，再增加测序深度也无法找到更多的 OTU，连栀矾溶液样品的菌群多样性也不会发生改变。4X 的曲线明显短于其他样品组，说明测序数量足够，已达到全部覆盖。

2.3.2 alpha 多样性指数 对 OTU 丰度矩阵中的全体样品根据最低测序深度统一进行随机重抽样（使不同样本具有相等的序列数，以减少测序深度对结果的影响），使用 QIIME 软件分别对每个样品计算 Chao1、ACE、Shannon 指数（表 2）。结果表明，随着发酵时间的增加上下层总的 Chao1、ACE、Shannon 指数数值逐渐增加，表明样品总的丰富度和多样性随发酵时间的增加而逐渐增加。其中在上层样品中，Chao1 指数以及 ACE 指数均随发酵时间的增加而逐渐增加，说明连栀矾溶液上层样品的菌群丰富度随发酵时间的增加逐渐增加。在下层样品中，Chao1 和 ACE 指数均随发酵时间的增加呈现出先降低后增加的趋势，说明连栀矾溶液下层样品的菌群丰富度随发酵时间的增加先降低后增加。上层样品 Shannon 指数随发酵时间的增加逐渐增加，说明上层样品菌群的多样性逐渐增加，下层样品 Shannon 指数随发酵时间的增加呈现出先降低后增加的趋势，说明下层样品菌群的多样性先降低后增加（图 4）。

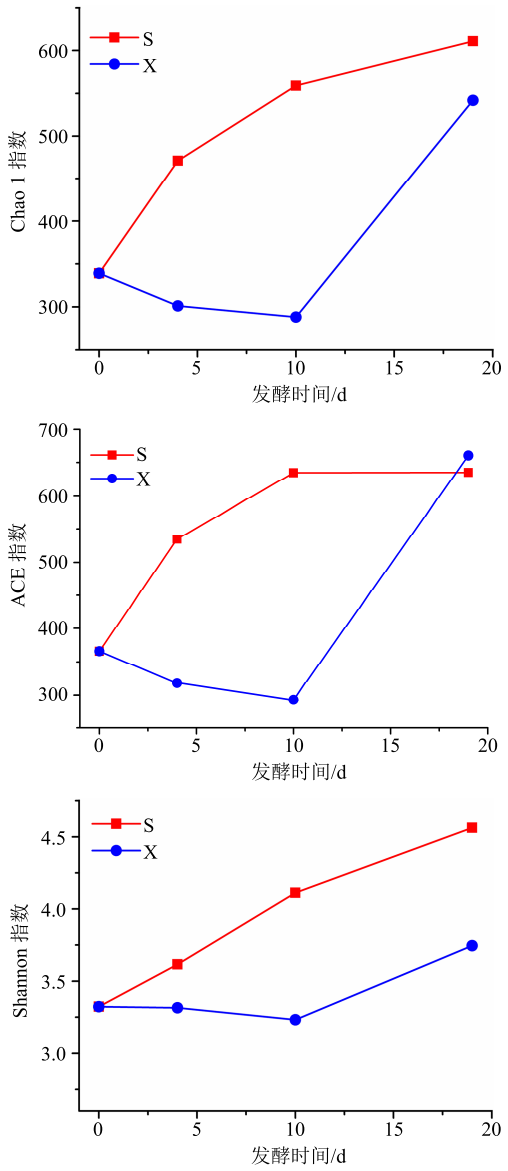

图 4 Alpha 多样性指数

Fig. 4 Alpha diversity indexes

2.4 各分类水平的分类学组成分析

2.4.1 门水平的群落分类学组成分析 采用随机重抽样的方法，对 7 个样品中各自抽出的 3 293 条有效序列进行分析，发现序列占比在 0.01%及以上的真菌菌门主要包括 5 个菌门，分别是子囊菌门（Ascomycota）、担子菌门（Basidiomycota）、罗兹菌门（Rozellomycota）、接合菌门（Zygomycota）和球囊菌门（Glomeromycota）。其中相对丰度最大的优势菌门为子囊菌门，高达 75%，其相对丰度变化在不同发酵时间上下层依次为 79.26%、71.76%、21.86%、81.90%、76.86%、89.80%、98.06%。其次担子菌门相对丰度为 7.31%，相对丰度变化依次为 10.05%、19.89%、2.07%、10.81%、6.26%、1.46%、

0.67%。由此可知，随着发酵时间的增加子囊菌门的相对丰度总体呈现出逐渐上升的趋势，担子菌门的相对丰度总体呈现出逐渐下降的趋势。其他 3 个菌门相对丰度较低，分别为罗兹菌门 2.62%、接合菌门 0.66%和球囊菌门 0.01%，其中罗兹菌门在第 4 天下层相对丰度最高，达到 14.80%（图 5）。

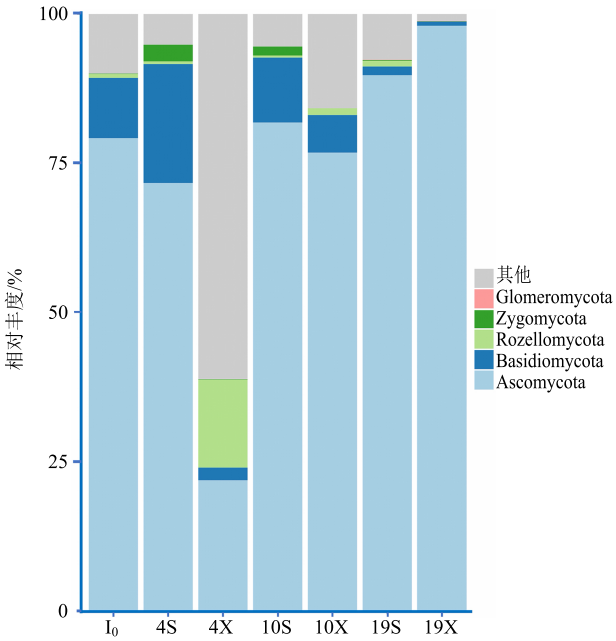

图 5　门水平的群落分类学组成和丰度分布

Fig. 5　Community taxonomic composition and abundance distribution of phylum level

2.4.2　属水平上的群落构成分析　同样采用随机重抽样的方法研究连栀矾溶液中的真菌菌属序列占比情况，发现占比在 0.58%及以上的真菌菌属主要包括 12 个属，分别是韦斯特壳属 *Westerdykella*（9.97%）、曲霉属 *Aspergillus*（5.01%）、链格孢属 *Alternaria*（2.27%）、青霉属 *Penicillium*（2.13%）、假丝酵母属 *Candida*（1.99%）、红曲霉属 *Monascus*（0.91%）、侧耳属 *Pleurotus*（0.88%）、盘菌属 *Pulvinula*（0.88%）、*Rasamsonia*（0.86%）、子囊菌属 *Archaeorhizomyces*（0.84%）、被孢霉属 *Mortierella*（0.65%）和东方伊萨酵母属 *Issatchenkia*（0.58%）。其中，韦斯特壳属为相对优势菌属，相对丰度变化在不同发酵时间上下层依次为 3.19%、22.05%、0.24%、20.10%、2.28%、18.22%、3.74%，其相对丰度在上层溶液中逐渐降低，下层溶液中逐渐增多，总体丰度变化不显著。曲霉属相对丰度变化依次为 3.10%、5.13%、1.94%、4.22%、14.79%、2.52%、3.34%，总体丰度变化趋势是先升高后降低。链格孢属相对丰度变化依次为 6.56%、1.06%、0.67%、2.55%、1.00%、2.89%、1.18%，总体丰度变化趋势是先降低后升高。青霉属相对丰度随发酵时间的增加呈现出逐渐升高的趋势且青霉属、曲霉属、侧耳属和盘菌属均在第 10 天下层中达到最大丰度，子囊菌属和被孢霉属在第 4 天上层中达到最大丰度。假丝酵母属丰度逐渐降低，东方伊萨酵母属丰度变化不显著（图 6）。使用 R 软件，对丰度前 50 位的属进行聚类分析并绘制热图，热图中每小格代表所在样品中某种菌的相对丰度，颜色越红代表相对丰度越高。在属水平上，4S 与 10S、4X 与 10X、I_0 与 19S 的高丰度种属较为相似，可分别聚为一类（图 7）。同时，使用变异系数（coefficient of variation，CV）来表征物种在样品间的波动情况[28]，这里仅在属水平上进行计算用以表示变异系数最小的 10 个和最大的 10 个属。结果表明，物种在样品间的波动最大的是弯孢属 *Curvalaria*，最小的是假丝酵母属（图 8）。

2.5　beta 多样性分析

主坐标分析（principal coordinate analysis，PcoA）法是一种非约束性的数据降维分析方法，是基于除欧氏距离以外的其他距离法，通过降维找出影响样本群落组成差异的潜在主成分，是分析 beta 多样性的一种常用方法[29]。这里主要采用了基于

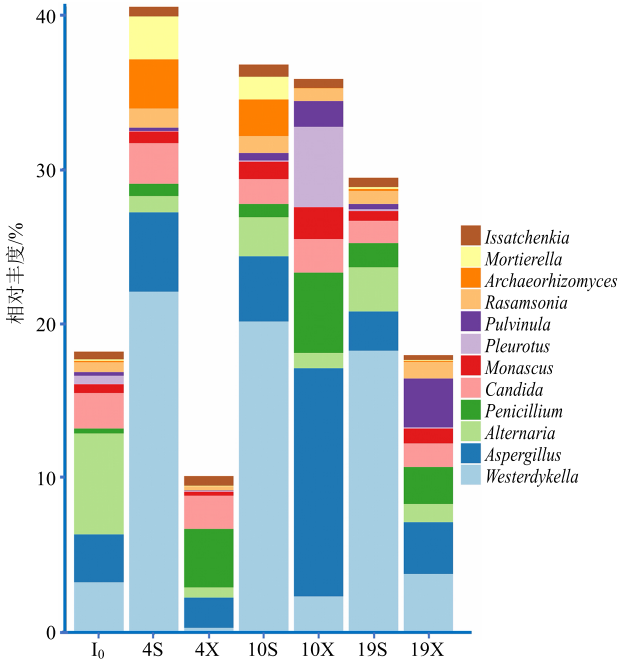

图 6　属水平的群落分类学组成和丰度分布

Fig. 6　Community taxonomic composition and abundance distribution of genus level

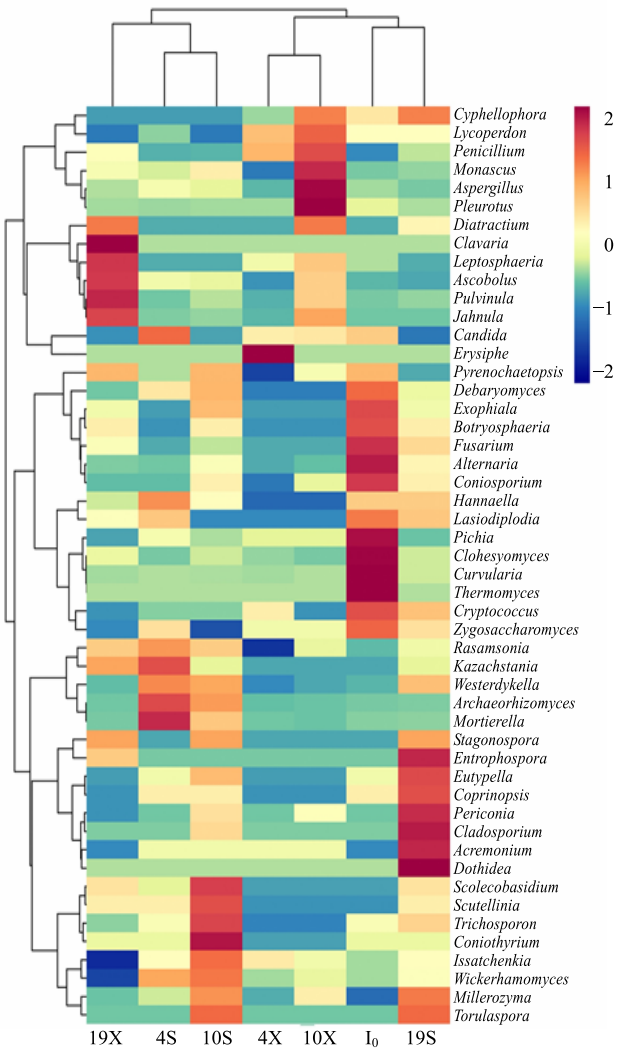

图 7 属水平上的各样品群落构成的热图

Fig. 7 Heatmap of fungus constitution in every sample at genus level

Bray-Curtis、Jaccard 距离以及 UniFrac 距离上的加权（weighted）、非加权（unweighted）的 PcoA，同时采用基于 Bray-Curtis、Jaccard 距离的方法进行样品聚类。在 7 个样品真菌群落构成的 PcoA 图中，坐标轴括号中的百分比代表了对应的主成分所能解释的原始数据中差异的比例（图 9），基于 Bray-Curtis、Jaccard 以及 UniFrac 的加权和非加权的主坐标分析其第 1 主成分和第 2 主成分的贡献率分别为 33.1%、29.4%，29.8%、24.8%，45.3%、30.8%，26.9%、21.9%。说明在 PcoA 中所选主成分均可以充分解释原始数据中的差异。通过图中样品点距离的远近，可观察个体或群体间的差异，样品点越相近说明样品间真菌群落构成越相似。由基于 Bray-Curtis（图 9-A）、Jaccard（图 9-B）以及 UniFrac 加权（图 9-C）和非加权（图 9-D）主坐标分析图可知，10S 和 19S，10X 和 19X 分别属于同一象限，说明第 10、19 天上层以及第 10、19 天下层菌群结构较为相似，第 10、19 天上下层之间菌群结构存在差异。这点在 Bray-Curtis 和 Jaccard 聚类图中（图 10）也得到印证。4X 无法与其他样品聚为一类（图 10），这表明在发酵初期下层菌群结构与上层存在显著差异，但随着发酵时间的增加差异在逐渐减小。

3 讨论

连栀矾溶液是中药煎剂经自然发酵而成，相比于一般未发酵的中药煎剂，连栀矾溶液体系中含有较多的微生物。而连栀矾溶液传统发酵过程的监控仅凭肉眼观察溶液表面真菌的生长状态及药液澄清程度，一般待其表面真菌完全覆盖药液，药液变得

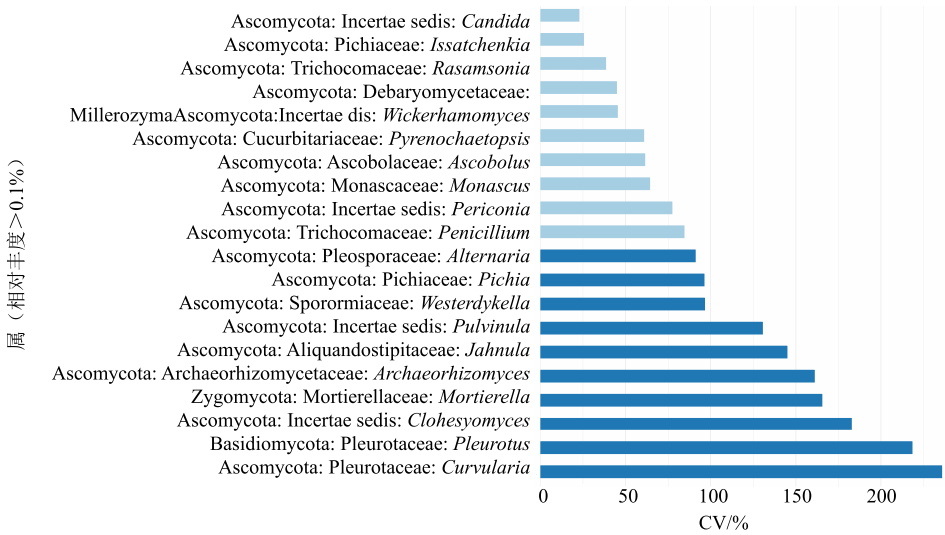

图 8 变异系数图（属）

Fig. 8 Coefficient of variation (genus)

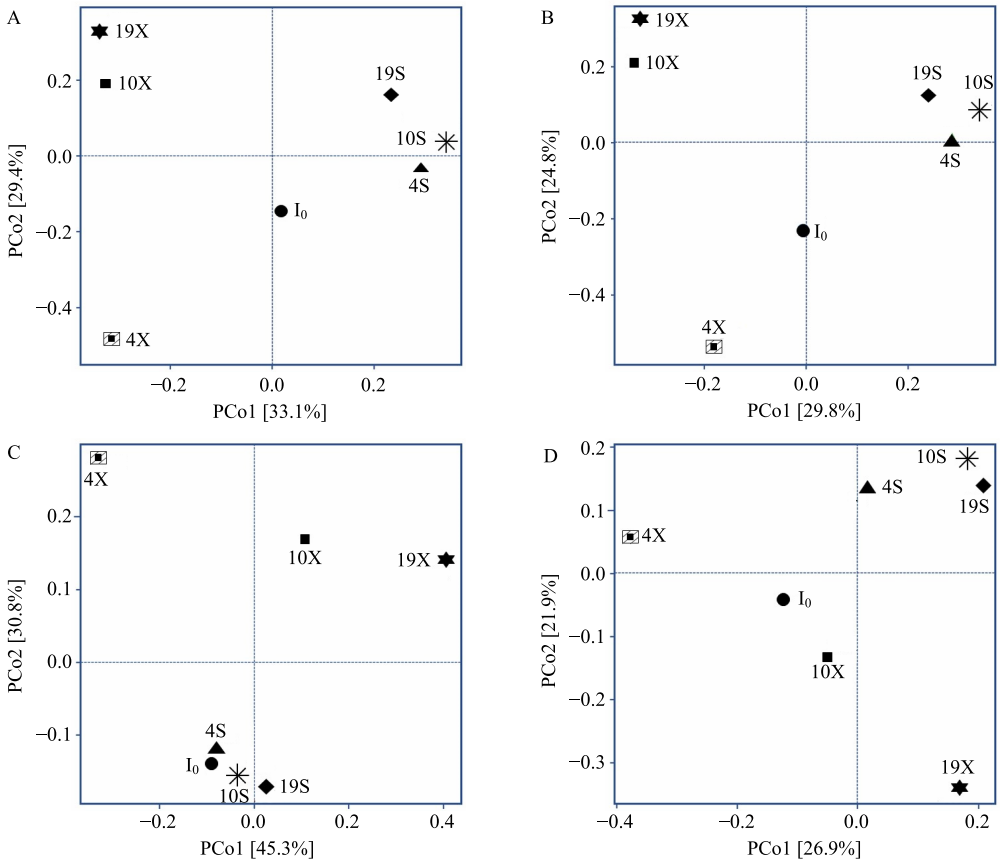

图 9　样品基于 Bray-Curtis 距离 (A)、Jaccard 距离 (B)、加权-UniFrac 距离 (C) 和非加权-UniFrac 距离 (D) 的 PcoA 图

Fig. 9　Clustering of samples principal coordinate analysis based on Bray-Curtis distance (A), Jaccard distance (B), weighted-UniFrac distance (C), and unweighted-UniFrac distance (D)

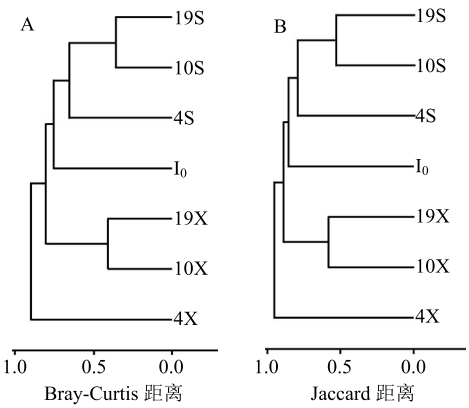

图 10　基于 Bray-Curtis 距离 (A) 和 Jaccard 距离 (B) 的聚类图

Fig. 10　Comparison of similarity clustering among samples based on Bray-Curtis distance (A) and Jaccard distance (B)

澄清明亮即可，说明传统发酵炮制终点的判断随季节气候的变化，工作人员的变动而具有很大的随意性，也就必然会存在较大的人为误差，因此也说明了对炮制工艺相关真菌菌群结构、菌群的多样性及丰富度的认识，以及发酵过程中菌群的动态变化研究的必要性。

本研究对连栀矾溶液发酵炮制过程的真菌群落多样性和丰富度进行分析与评价，共得到 207 068 个有效序列，充分展示了其发酵过程中的真菌群落结构。通过 OTU 数量、Chao1 指数，ACE 指数、Shannon 指数反映其真菌群落有着非常高的丰富度和多样性，其中在上层样品中丰富度和多样性随发酵时间的增加逐渐增加，在下层样品中先降低后增加，上下层之间存在差异，但随发酵时间的增加上下层之间的差异在逐渐减小。通过对发酵过程的现象观察发现，在发酵过程中溶液表面的真菌数量逐渐增加，且在发酵前期上下层溶液的澄清度差别不明显，到发酵后期上下层溶液的澄清度有明显差异，上层溶液澄清明亮，下层溶液较浑浊。下层溶液丰富度和多样性的趋势变化可能是因为在发酵前期下层溶液中的溶解氧被逐渐消耗使好氧菌数量减少，在发酵后期上层菌群逐渐沉降，使发酵后期上下层溶液中的菌群丰富度和多样性差异逐渐减小。

在对连栀矾溶液样品进行分类学鉴定时发现真

菌群落主要包括 5 个门，其中子囊菌门（74.21%）为优势菌门。张颖[30]研究证明，豆酱自然发酵的不同阶段优势真菌是子囊菌门，同时在李恒等[31]研究的泡菜母水中子囊菌门（99.93%）也是优势菌门，说明子囊菌门在发酵过程中起着极大的共性作用。子囊菌门下占比在 0.58%及以上的菌属有 12 个，包括韦斯特壳属、曲霉属、链格孢属、青霉属、假丝酵母属、红曲霉属、侧耳属、盘菌属、*Rasamsonia*、子囊菌属、被孢霉属和东方伊萨酵母属，其中绝对优势菌属是韦斯特壳属 *Westerdykella*（9.97%）。而在连栀矾溶液发酵过程中，溶液表面先是出现白色菌落，后随着发酵时间的增加白色菌落数量逐渐增加且颜色变为青灰色。这与韦斯特壳属“初白色，后产子囊果并覆盖一层密集的淡灰色菌丝”的生长特性相似[32]。同时，观察到的青灰色真菌中可能还包括青霉属，因为青霉属相对丰度随发酵时间的增加逐渐增加，且青霉属颜色一般呈现为绿色、黄绿色和蓝绿色[33]。

因此，结合测序结果与观察结果推测发酵液表面的青灰色真菌可能是韦斯特壳属和青霉属，后期将对这 2 个种属及占比在 2%以上的曲霉属、链格孢属进行分离纯化。

连栀矾溶液发酵体系中有着丰富的微生物资源，具有生物学多样性。本实验仅利用 Illumina HiSeq 高通量测序技术分析连栀矾溶液中真菌菌群结构、丰富度与多样性的动态变化，客观地反映出连栀矾溶液中的真菌区系。考虑到连栀矾溶液的制作属于多药材混合发酵，黄连和栀子中均含有多种活性成分，发酵过程中真菌结构、丰富度与多样性的变化势必会对连栀矾溶液中的活性成分产生影响，因此后期将对传统连栀矾溶液发酵过程中成分变化进行深入研究。

参考文献

[1] 袁学刚, 王战国, 邹 亮, 等. 连栀矾溶液促进大鼠肛周脓肿创面愈合作用研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2016, 39(1): 39-43.

[2] 余腾江. 基于大鼠感染创面模型研究“连栀矾溶液”促进肛周脓肿用药后创面愈合的作用机制 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.

[3] 王钧冬, 董文娟, 李 燕, 等. 中药熏洗剂对低位肛周脓肿术后创面修复的疗效观察 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(21): 144-145.

[4] 卿 勇, 夏登梅, 李 薇. 连栀矾溶液坐浴联合高频电刀治疗肛门尖锐湿疣临床观察 [J]. 四川中医, 2015, 33(4): 151-152.

[5] 郭永宏. 连栀矾溶液加锡类散保留灌肠治疗慢性溃疡性直肠炎的效果分析 [J]. 中国现代药物应用, 2014, 8(23): 193-194.

[6] 彭国琴, 彭昭国, 彭 旗. 连栀矾溶液联合康复新溶液保留灌肠治疗溃疡性结肠炎临床疗效观察 [J]. 四川中医, 2016, 34(1): 137-138.

[7] 邓 红, 吴纯启, 赵春雪, 等. 高通量测序和实时荧光定量 PCR 分析何首乌肝损伤与肠道微生物组的关系 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(4): 464-471.

[8] 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): 2640-2645.

[9] Stead L F, Sutton K M, Taylor G R, *et al*. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics [J]. *Cell*, 2013, 155(1): 27-38.

[10] Roesch L F, Fulthorpe R R, Riva A, *et al*. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity [J]. *Isme J*, 2007, 1(4): 283-290.

[11] 李 欣, 王彦华, 林静怡, 等. 高通量测序技术分析酱香型白酒酒醅的微生物多样性 [J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2017, 33(1): 51-59.

[12] Lin Y, Tong Z. Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2013, 97(6): 2681-2690.

[13] Fan W, Huo G, Li X, *et al*. Diversity of the intestinal microbiota in different patterns of feeding infants by Illumina high-throughput sequencing [J]. *World J Microb Biot*, 2013, 29(12): 2365-2372.

[14] Toju H, Tanabe A S, Yamamoto S, *et al*. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40863.

[15] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, *et al*. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200.

[16] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.

[17] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 996-998.

[18] Gweon H S, Oliver A, Taylor J, *et al*. PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform [J]. *Methods Ecol Evol*, 2015, 6(8): 973-980.

[19] Kõljalg U, Nilsson R H, Abarenkov K, *et al*. Towards a unified paradigm for sequence‐based identification of fungi [J]. *Mol Ecol*, 2013, 22(21): 5271-5277.

[20] Katoh K, Standley D M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(4): 772-780.

[21] Price M N, Dehal P S, Arkin A P. Fast tree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments [J]. *PLoS One*, 2012, 5(5): e9490.

[22] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al*. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nat Methods*, 2010, 7(5): 335-336.

[23] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, *et al*. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Appl Environ Microb*, 2009, 75(23): 7537-7541.

[24] Rdc T. A language and environment for statistical computing [J]. *Computing*, 2015, 1(5): 12-21.

[25] Desantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, *et al*. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB [J]. *Appl Environ Microb*, 2006, 72(7): 5069-5072.

[26] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, *et al*. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. *Appl Environ Microb*, 2007, 73(16): 5261-5267.

[27] Zhang M, Zhang M, Zhang C, *et al*. Pattern extraction of structural responses of gut microbiota to rotavirus infection via multivariate statistical analysis of clone library data [J]. *Fems Microbiol Eco*, 2009, 70(2): 21-29.

[28] Louca S, Jacques S M S, Pires A P F, *et al*. High taxonomic variability despite stable functional structure across microbial communities [J]. *Nat Ecol Evol*, 2016, 1(1): 15-26.

[29] Anderson M J, Crist T O, Chase J M, *et al*. Navigating the multiple meanings of β diversity: A roadmap for the practicing ecologist [J]. *Ecol Lett*, 2011, 14(1): 19-28.

[30] 张 颖. 豆酱自然发酵过程微生物多样性分析研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017.

[31] 李 恒, 陈 功, 伍亚龙. 高通量测序方法研究传统四川泡菜母水中微生物群落的动态变化 [J]. 食品科学, 2018, 2(1): 11-20.

[32] 梁 晨, 吕国忠. 光黑壳属和韦斯特壳属的三个中国新记录种 [J]. 菌物系统, 2002, 21(2): 285-286.

[33] 李 珍. 青霉属的分类及研究技术 [J]. 海南热带海洋学院学报, 2008, 3(S1): 81-82.