

浓香型白酒两个产区窖泥微生物群落结构分析

王明跃^{1*} 张文学²

(1. 阜阳职业技术学院 安徽 阜阳 236031)

(2. 四川大学 轻纺与食品学院 四川 成都 610065)

摘要:【目的】探索浓香型白酒两个典型产区窖泥微生物群落结构和多样性,分析窖泥微生物群落地域特征及对白酒风格形成的影响。【方法】分别提取四川和安徽两个产区窖泥样品总DNA,应用PCR-ARDRA和16S rRNA基因克隆测序技术对两个产区窖泥细菌和古菌进行研究。【结果】两个浓香型白酒产区窖泥细菌丰富,包括:厚壁菌门(Firmicute)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、互养菌门(Synergistetes)、Armatimonadetes类群和未分类细菌(Unclassified bacteria)。两个产区窖泥绝对优势种群均为厚壁菌门中梭菌纲(Clostridia)细菌,在四川产区窖泥中检出较多的互营单胞菌属(*Synthrophomonas*)和紫单胞菌属(*Petrimonas*)。古菌的群落组成较为简单,主要是甲烷囊菌属(*Methanoculleus*)、甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)、甲烷鬃菌属(*Methanosaeta*)和甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)4个产甲烷古菌类群,四川产区窖泥优势古菌为甲烷囊菌和甲烷八叠球菌,安徽产区则为甲烷八叠球菌属和甲烷鬃菌。【结论】四川和安徽两个产区窖泥微生物的16S rRNA基因克隆文库系统地反映了两地区微生物群落的相似性和差异性,对揭示浓香型白酒两个产区的酒体风格差异形成有一定的参考价值。

关键词: 浓香型白酒, 窖泥, 16S rRNA 基因序列, 克隆文库, 群落结构

Analysis of microbial community structure in pit mud from two Chinese *Luzhou-flavor* liquor producing areas

WANG Ming-Yue^{1*} ZHANG Wen-Xue²

(1. Fuyang Vocational and Technical College, Fuyang, Anhui 236031, China)

(2. College of Light Industry, Textile and Food Engineering, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

Abstract: [Objective] To explore the microbial community structures and diversity in pit mud from two typical Chinese *Luzhou-flavor* liquor producing areas, and to investigate the regional characteristic of microbial community and the effects on the formation of the liquor style. [Methods] Total DNAs were extracted from pit mud from Sichuan and Anhui liquor producing areas, respectively. Bacteria and Archaea were analyzed by PCR-ARDRA and 16S rRNA gene clone sequencing. [Results] The bacteria in pit mud from two *Luzhou-flavor* liquor producing areas were rich, including Firmicutes, Bacteroidetes, Chloroflexi, Synergistetes, Armatimonadetes and

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 31071585); 安徽省高校省级自然科学基金项目(No. KJ2012B140)

*通讯作者: ✉: wmy9039@163.com

收稿日期: 2013-10-09; 接受日期: 2013-12-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-12-11

Unclassified bacteria. The predominant bacteria from both areas were clostridia in Firmicute. More *Synthrophomonas* and *Petrimonas* were detected in pit mud from Sichuan liquor producing area. Archaea composition was relatively simple. *Methanoculleus*, *Methanosarcina*, *Methanosaeta* and *Methanobacterium* were the major methane-producing archaeal group. The predominant archaea in Sichuan liquor producing area were *Methanoculleus* and *Methanosarcina*; while the predominant archaea in Anhui liquor producing area were *Methanosarcina* and *Methanosaeta*. **[Conclusion]** The 16S rRNA gene clone libraries not only systematically reflect the similarities and differences of microbial community between Sichuan and Anhui liquor producing areas, but also is valuable for revealing the formation of differences in liquor body style between two Chinese *Luzhou-flavor* producing areas.

Keywords: Chinese *Luzhou-flavor* liquor, Pit mud, 16S rRNA gene sequences, Clone libraries, Community structure

白酒是中国特有的一种蒸馏酒,多种微生物混合固态发酵及独特的生产工艺形成了白酒的各种香型和风格,在“清、浓、酱”三大主流香型基础上,逐步演变形成了目前业内公认的12种香型白酒。其中,浓香型白酒以其“窖香浓郁、绵柔甘冽、香味协调”的酒体风格,深受广大消费者喜爱,产量约占全国白酒的70%^[1],在我国白酒行业中占据主导地位。由于地理环境(空气、土壤、气候)的差异,加之原料、大曲及生产工艺等因素影响,浓香型白酒形成了两大主要风格,一个是长江上游流域的“浓郁型”风格;另一个是黄淮流域的“淡雅型”风格^[1]。其中,四川和安徽分别是浓香型白酒两种风格的典型产区,前者拥有五粮液、泸州老窖、剑南春、水井坊、沱牌舍得等国家名酒;后者则拥有古井贡、口子窖、金种子、迎驾、高炉家等多家年销售十亿元以上的白酒企业。白酒营销界素有“西不入川、东不入皖”的战略布局规则,折射出两个产区在浓香型白酒界的地位。

浓香型白酒与其他香型白酒的最大区别是采用泥窖发酵,窖泥对于浓香型白酒独特“窖香”的形成有着不可替代的作用。粮糟在固态发酵过程中,营养物质不断渗入窖泥,通过窖泥微生物的代谢,产生了以己酸乙酯为主体的复合香气。因此,窖泥微生物群落结构对浓香型白酒质量和风格的形成起决定性作用。

窖泥中的微生物经过长期高酸度、高水分、缺

氧等极端环境的驯化,形成了与生产环境相互依存的特殊窖池微生物区系。研究表明,四川产区泸州老窖、五粮液、水井坊等企业的窖泥微生物大多数为不可培养或难以培养的厌氧原核微生物^[2-4],而对黄淮流域产区窖泥微生物的研究报道很少,对于两个产区的微生物结构共性和差异性分析始终停留在经验推测层面,缺乏详细的种群信息及系统比较。本文通过构建四川和安徽白酒两个典型产区窖泥细菌和古菌的16S rRNA基因克隆文库,解析浓香型白酒窖泥微生物种群信息、系统发育、群落构成及代谢特征,对揭示浓香型白酒两个典型产区的酒体风格差异形成有着重要的理论意义和实践价值。

1 材料与方法

1.1 样品采集

窖泥样品取自四川西部J酒厂(编号SC-J)和安徽北部Z酒厂(编号AH-Z),所取样品均为20年左右的成熟窖底泥,五点取样,混匀,备用。

1.2 实验方法

1.2.1 窖泥样品处理及总DNA提取:首先将窖泥样品反复冻融^[5],使其中的微生物细胞裂解,4℃、12 000 r/min离心10 min,收集上清液,使用试剂盒DNA特异性吸附柱,提取纯化窖泥样品总DNA,用于PCR扩增。

1.2.2 16S rRNA基因全序列片段的扩增:分别用Eubac27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、Eubac1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')和

1Af (5'-TCYGKTTGATCCYGSCRGAG-3')、1100r (5'-TGGGTCTCGCTCGTTG-3')引物对窖泥样品细菌和古菌进行 16S rRNA 基因全长扩增^[6-7], PCR 反应体系组成和细菌的 PCR 反应程序参照文献[7]。古菌的 PCR 反应程序: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 30 s, 72 °C 2 min, 共循环 10 次; 94 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 2.5 min, 共循环 25 次; 72 °C 10 min。

1.2.3 文库构建、酶切分型和序列测定:将纯化后的 PCR 产物与 pUCm-T 载体连接, 转化至大肠杆菌 DH5 α 。通过蓝白斑筛选和菌液 PCR 验证, 确定阳性克隆子, 并用 *Msp* I 和 *Hinf* I 双酶法消化阳性克隆子 PCR 产物。酶切图谱相同的归于同一个分类操作单位(Operational taxonomic unit, OTU)^[8], 每个 OTU 类型选取 1-2 个克隆序列, 由上海生工生物工程有限公司进行双向测序。

1.2.4 16S rRNA 基因系统发育分析:克隆序列通过 Greengenes 网站在线检测, 去除嵌合体(Chimera), 结合 Ribosomal database project 11 数据库中的分类信息, 在 GenBank 数据库中选择相似序列。利用 ClustalX 1.83 软件进行多重序列比对分析, 应用 MEGA 4.0 软件, 选择邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树, Bootstrap 检验, 自展系数为 1 000。

1.2.5 数据统计分析:用库容 Coverage (C)评估克隆文库的覆盖率, 通过文献[9]的方法计算。用 Shannon-Wiener index (H)、Pielou index (J)、

Berger-Parker index (D)和 Sorensen similarity index 等参数描述克隆文库中序列的多样性、均匀度、优势度, 利用生态学软件(Biodap)统计分析。

2 结果与分析

2.1 两个产区窖泥样品克隆文库评估与分析

从 SC-J、AH-Z 样品中随机挑选一定数目的阳性克隆子序列进行测序, 比对分析, 去除无效序列, 并将相似性大于 97%的归为同一个 OTU。其中, 细菌阳性克隆子均挑选 96 个, SC-J、AH-Z 样品的有效序列分别为 87、83 个, OTUs 数分别为 22、21; 古菌阳性克隆子均挑选 48 个, SC-J、AH-Z 样品的有效序列分别为 37、35 个, OTUs 数分别为 3、4。

窖泥样品克隆文库分析见表 1, 两个产区窖泥细菌克隆文库库容均超过 50%, 基本能反映细菌的群落结构特征。古菌 16S rRNA 基因克隆文库库容均达到饱和, 说明窖泥中古菌种类少、结构简单。两个产区窖泥细菌 Sorensen 相似系数为 0.186, 相似性较低, 比较而言, SC-J 样品细菌 Shannon-Wiener 多样性指数、Pielou 均匀度指数较 AH-Z 样品高, 而 Berger-Parker 优势度指数则低, 说明 SC-J 样品细菌群落结构更趋合理, 稳定性更好。两个产区古菌 Sorensen 相似系数为 0.571, 相似性较高, 与细菌群落结构不同, Pielou 均匀度指数表明 AH-Z 样品古菌群落结构更趋合理, 稳定性更好。

表 1 浓香型白酒两个产区窖泥微生物 16S rRNA 基因克隆文库分析
Table 1 Analysis of 16S rRNA gene clone libraries in the pit mud from two Chinese Luzhou-flavor liquor producing areas

样品 Sample	库容大小 Coverage (C, %)	多样性指数 Shannon-Wiener index (H)	均匀度指数 Pielou index (J)	优势度指数 Berger-Parker index (D)	相似系数 Sorensen similarity index
SC-J bacteria	63.6	2.74	0.886	0.149	0.186
AH-Z bacteria	61.9	2.67	0.877	0.157	
SC-J archaea	100	0.99	0.887	0.486	0.571
AH-Z archaea	100	1.23	0.901	0.400	

2.2 两个产区窖泥细菌系统发育多样性分析

将测得的细菌 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中序列比对分析,结果表明,大多数克隆序列与环境中的未培养细菌序列相似,预示着窖泥中存在大量未被认识的细菌资源;部分克隆序列与可培养微生物具有相似性(91%–100%),据此,可以推测相应细菌类群的部分代谢特性,了解其生态功能。

两个产区的细菌类群共涵盖了 6 个细菌门:厚壁菌门(Firmicute)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、互养菌门(Synergistetes)、Armatimonadetes 类群和未分类细菌(Unclassified bacteria)。其中,厚壁菌门(Firmicute)细菌在两个产区窖泥中均为绝对优势细菌类群,在 SC-J 中的比例为 86.1%,AH-Z 为 81.9%。通过厚壁菌门细菌系统发育树(图 1),很直观地看出克隆序列形成了 3 个簇,分别为梭菌纲(Clostridia)、芽孢杆菌纲(Bacilli)和柔膜菌纲(Mollicutes)。

梭菌纲(Clostridia)克隆子数最多,主要分布在瘤胃菌科(Ruminococcaceae)、梭菌科(Clostridiaceae)、互养单胞菌科(Syntrophomonadaceae)、热厌氧杆菌科(Thermoanaerobacteraceae)类群内。在瘤胃菌科细菌类群中,AH-ZB28 类似于热纤维梭菌 *Clostridium thermocellum* (93%),可发酵纤维素生成乙醇、乙酸、 H_2 、 CO_2 和乳酸^[10-11]。梭菌科细菌类群中,AH-ZB6 类似于乙二醇梭菌 *Clostridium glycolicum* (99%),可利用丁酸、丙酸,产生乙酸、乙醇和 H_2 ^[12-13]; SC-JB28 类似于 *Anaerovorax odorimutans* NorPut (94%),能发酵腐胺产生乙酸、丁酸、 H_2 和氨^[14]; AH-ZB82 和 SC-JB11 均类似于 Uncultured *Caloramator* sp. b10-407, *Caloramator* sp.可产生乙酸^[15]; SC-JB18 和 AH-ZB38 类似于 Uncultured *Sedimentibacter* sp. De3232, *Sedimentibacter* sp.则可与产氢产乙酸菌形成互营共培养体,利用乙酸和氢气^[16]。互营单胞菌科

Syntrophomonadaceae 类群仅在四川产区窖泥中检出, SC-JB3 类似于互营共养单胞菌 *Syntrophomonas curvata* GB8-1 (96%), SC-JB12 类似于 *Syntrophomonas sapovorans* (97%), SC-JB63 类似于互营热菌属 *Syntrophothermus lipocalidus* DSM 12680 (92%),它们常和产甲烷菌共生,降解长链脂肪酸产生氢气、乙酸、丙酸^[17-19]; SC-JB16 类似于 *Syntrophaceticus schinkii* Sp3 (95%),能够氧化降解乙酸^[20]。

安徽产区窖泥中 AH-ZB23 和 AH-ZB19 两个克隆子属于柔膜菌纲(Mollicutes),它们与来自美国白橡树河河口沉积物的柔膜菌纲的细菌 *Haloplasmatales bacterium* 4B (KC164515)序列相似,可以还原硝酸盐和亚硝酸盐^[21]。

芽孢杆菌纲(Bacilli)中克隆序列主要属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*), SC-JB1 与湖底沉积物中的 *Bacillus* sp. WJ21 相似(99%), AH-ZB88 类似于 *Bacillus* sp. KSM-P358 (99%)。 *Bacillus* sp.可产生纤维素酶、果胶酶和己酸^[22-23],在浓香型白酒主体香味成分己酸乙酯的形成中起重要作用。SC-JB90 类似于 *Lactobacillus acetotolerans* (99%),该菌在四川多家酿酒企业窖泥中被检出, AH-ZB30 类似于同型腐酒乳杆菌 *Lactobacillus homohiochii* NBRC (99%)。 *Lactobacillus* 产生乳酸,耐受高浓度乙酸和乙醇^[24-25],乳酸和乳酸乙酯是窖泥中重要的风味物质,但乳酸含量过多,会导致窖泥形成乳酸亚铁、乳酸钙等结晶,引起窖泥老化。

非厚壁菌门细菌的系统发育如图 2 所示,拟杆菌门(Bacteroidetes)含有 4 个 OTUs。SC-JB25 相似于一株紫单胞菌 *Petrimonas sulfuriphila* BN3 (99%),是四川地区窖泥优势菌,能够将 S 还原成 H_2S ^[26], H_2S 与 Fe^{3+} 反应可生成难溶性的 FeS ,减少乳酸亚铁的积累和结晶,延缓窖泥老化。SC-JB4 类似于 *Proteiniphilum acetatigenes* TB107 (99%),能够将丙酮酸转化成乙酸和 CO_2 ,不产生 H_2S ^[27]。

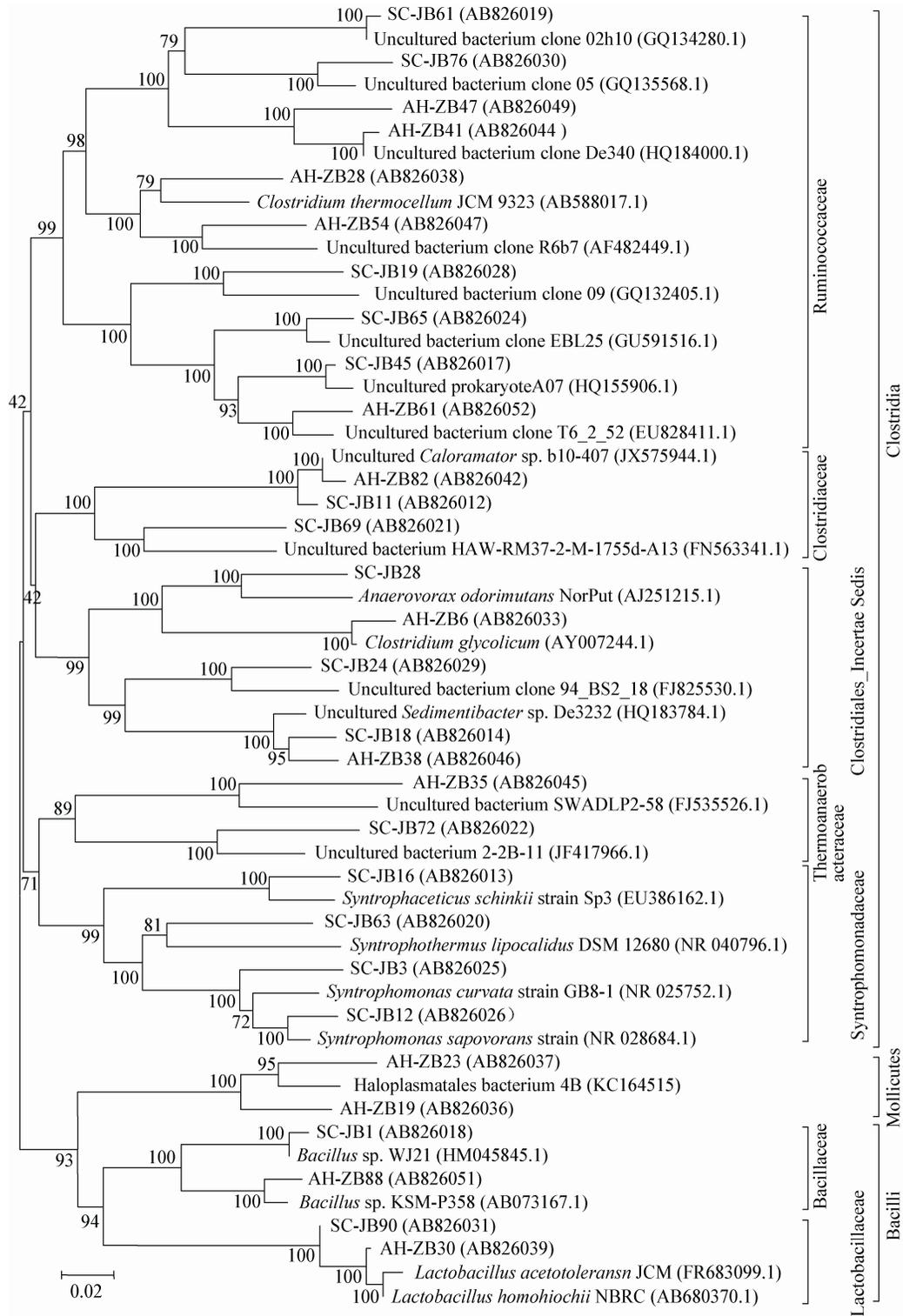


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的窖泥厚壁菌门细菌系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of Firmicute clone libraries from the pit mud

注：分支点处的数值为自展值，括号内的序号为序列的 GenBank 登录号；标尺代表进化距离单位。

Note: Bootstrap values are shown on the branch nodes and the GenBank accession numbers of the sequences are shown in the parentheses. The scale bar line represents estimated evolutionary distance units.

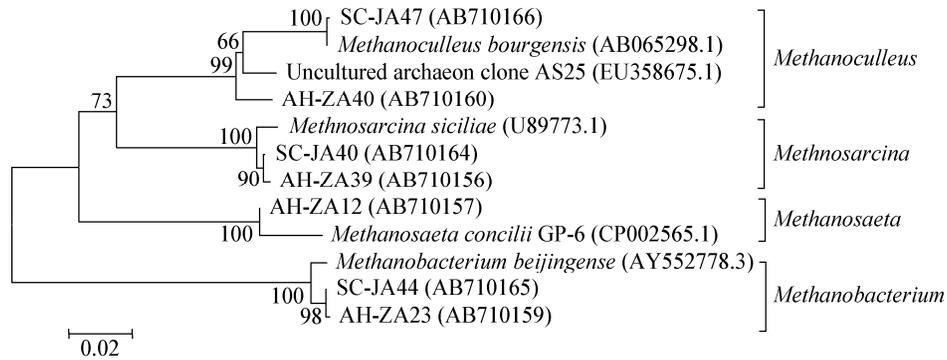


图3 基于16S rRNA基因序列构建的窖泥古菌克隆系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of archaeal clone libraries from the pit mud

注：分支点处的数值为自展值，括号内的序号为序列的 GenBank 登录号，标尺代表进化距离单位。

Note: Bootstrap values are shown on the branch nodes and the GenBank accession numbers of the sequences are shown in the parentheses. The scale bar line represents estimated evolutionary distance units.

甲烷袋状菌属(*Methanoculleus*)、甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)、甲烷鬃菌属(*Methanosaeta*)和甲烷杆菌属(*Methanobacterium*) 4个产甲烷古菌类群。

甲烷袋状菌属(*Methanoculleus*)在两个产区窖泥样品中均检出，SC-JA47和AH-ZA40相似性为92%，属于*Methanoculleus*中不同种。SC-JA47与一株模式菌*Methanoculleus bourgensis*_DSM 6216相似性为99%，属于SC-J样品第二大优势菌，所占比例为36%，该菌能够利用 H_2/CO_2 和甲酸作为底物产生甲烷^[32]，是氢营养型产甲烷菌。AH-ZA40与Uncultured archaeon clone AS25的相似性97%，进化距离差异较大，据此推测AH-ZA40是*Methanoculleus*中一个新种。

SC-JA40和AH-ZA39属于*Methanosarcina*类群，两者相似性为99%，属于同一个种。它们均相似于*Methanosarcina siciliae* (98%)，利用乙酸、甲醇、甲胺、二甲硫醚等底物产生甲烷，是乙酸营养型产甲烷菌^[33]。SC-JA40是SC-J样品第一优势古菌，占比例为52.6%，AH-ZA39是AH-Z样品第二优势古菌，比例为34.8%。

*Methanosaeta*类群仅在AH-Z样品中检出，且为第一优势菌，所占比例为47.8%。AH-ZA12克隆序列相似于*Methanosaeta concilii* GP-6 (99%)，属于乙酸营养型产甲烷菌，在高浓度乙酸基质中，

菌体可聚集成团状物^[34]。

AH-ZA23和SC-JA44在系统发育树上聚为一簇，均相似于*Methanobacterium beijingense*，相似度均为98%，只在 H_2+CO_2 或甲酸盐基质中生长^[35]，在两个产区窖泥中分布很少。

3 讨论

通过分别构建SC-J、AH-Z两个样品窖泥细菌和古菌的16S rRNA基因克隆文库，可以系统地比较两个不同产区窖泥微生物群落结构，两个窖泥样品中细菌的Shannon-Wiener多样性指数均明显大于古菌。SC-J和AH-Z样品中微生物的Shannon-Wiener多样性指数比较接近，说明两个产区窖泥微生物的丰度未表现出明显的差异，而两个产区微生物Sorenson相似系数较低，则表明两个产区窖泥微生物种类存在着地域差异。因此，仅用Shannon-Wiener多样性指数来表征窖泥的质量存在不足，还需结合窖泥功能微生物及特征微生物的组成和多样性进行综合评价。

厚壁菌门中梭菌纲细菌为两个产区窖泥绝对优势种群，主要是产氢产酸细菌种属，常与产甲烷菌共生。如，互营共养单胞菌属(*Syntrophomonas*)、喜热菌属(*Caloramator*)、梭菌属(*Clostridium*)，它们厌氧消化过程中会产生乙酸和 H_2 ，有的还产生

丙酸、丁酸、己酸等有机酸类,对浓香型白酒以己酸乙酯、丁酸乙酯为主体的复合香气形成起主导作用。本研究获得的窖泥古菌克隆文库全部为产甲烷古菌,甲烷囊菌和甲烷八叠球菌在两个产区均有较多分布。本研究结果支持 Fierer N.等^[36]的研究结论,即相似的生境具有相似的微生物群落。由于地域差异,部分种属在各自窖泥微生物群落中所占比例有所不同,且两个产区均有独特的优势微生物类群。SC-J 窖泥中检出较多的互营单胞菌属(*Synthrophomonas*),而在 AH-Z 未检出,互营单胞菌属在四川其它地区窖泥中比例也较高^[37]。由于互营单胞菌属和产甲烷菌共生,并产生乙酸,据此推测其对川酒“浓郁”风格的形成有重要的贡献。此外,四川地区窖泥中含有较多的紫单胞菌属 *Petrimonas sulfuriphila* BN3,在延缓窖泥老化中起重要作用,可能与四川产区气候湿润,糟醅发酵周期长、黄水多有一定的关系。甲烷鬃菌属(*Methanosaeta*)只在安徽产区窖泥中检出,且为第一优势菌,该菌在安徽地区低温沼气池为绝对优势菌,而在黑龙江地区则没有检出^[38],这可能与安徽地区的土壤、气候有一定的关系。综合分析,两个产区窖泥微生物群落结构、生态功能大体是相似的,由于气候、土壤及生产工艺方面的差异,微生物群落结构也存在一定区域异质性。

两个产区窖泥克隆序列大多与来自厌氧颗粒污泥、沼气池、水体沉积物等生境中微生物序列相似。另外,优质窖泥在色泽、质感等方面类似颗粒污泥,用手指碾压优质的老熟窖泥,能明显感觉到如同碎蛋黄般的颗粒存在。李宗义等采用扫描电子显微镜观察发现,啤酒废水成熟的厌氧颗粒污泥为黑灰色,呈规则的椭圆形或球形,有较清晰的层次性^[39]。郭晓磊等认为厌氧颗粒污泥的本质是由产甲烷菌、产乙酸菌和水解发酵菌等多种互营共生微生物形成的复杂菌群聚集体,表面为水解发酵菌和产酸菌,内层多为产甲烷菌,相互之间存在氢和乙酸的传递^[40]。据此推测,在密闭的窖池发酵体系中,随着糟醅中营养物质不断渗入窖泥,厌氧菌占

据特定区域快速生长,逐步形成稳定的互营共生微生物聚集体,从而促进窖泥的不断老熟,提高优质酒产率。

参 考 文 献

- [1] 谢玉球, 谢旭. 浓香型白酒“淡雅”与“浓郁”流派的差异分析[J]. 酿酒科技, 2007(9): 112-114.
- [2] 吴冬梅, 何翠容, 牛美灿, 等. 荧光原位杂交(FISH)技术研究窖泥微生物群落[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(4): 15-19.
- [3] 王涛, 田时平, 赵东, 等. 宜宾浓香型白酒窖泥中细菌的系统发育多样性[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(10): 11-18.
- [4] 王明跃, 张文学, 王海英, 等. 不同窖龄窖泥古菌的系统发育多样性分析[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(6): 1043-1048.
- [5] 施思, 胡承, 张文学. 一株放线菌产棕色素初探及其16S rDNA 序列分析[J]. 食品工业科技, 2010, 31(10): 239-240.
- [6] Cadillo-Quiroz H, Bräue S, Yashiro E, et al. Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(8): 1428-1440.
- [7] 施思, 张文学, 邓宇, 等. 用 DGGE 技术构建白酒酿造微生物指纹图谱的初步研究[J]. 中国酿造, 2010(1): 118-120.
- [8] 夏北成, Zhou J, Tiedje JM. 土壤细菌类克隆群落及其结构的生态学特征[J]. 生态学报, 2001, 21(4): 574-578.
- [9] Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters[J]. Biometrika, 1953, 40: 237-264.
- [10] 闻志强, 姜薇, 林东强, 等. 产纤维素体菌厌氧降解纤维素制乙醇的研究进展[J]. 微生物学通报, 2010, 37(5): 732-737.
- [11] 范力敏, 季萍, 陈晓湘, 等. 转化纤维素资源生成酒精的研究[J]. 环境科学学报, 1990, 10(3): 356-358.
- [12] Küsel K, Karnholz A, Trinkwalter T, et al. Physiological ecology of *Clostridium glycolicum* RD-1, an aerotolerant acetogen isolated from sea grass roots[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(10): 4734-4741.
- [13] 习彦花, 程辉彩, 张丽萍, 等. 产氢产乙酸菌 ZR-1的分离鉴定及产酸特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(2): 181-186.
- [14] Matthies C, Evers S, Ludwig W, et al. *Anaerovorax odorimutans* gen. nov., sp. nov., a putrescine-fermenting, strictly anaerobic bacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(4): 1591-1594.
- [15] 杨春蕾, 孙中远, 王佳, 等. 通过强化产乙酸菌途径实现瘤胃甲烷减排[J]. 动物营养学报, 2012, 24(5): 796-803.
- [16] 李建政, 孙倩, 刘枫, 等. 一种产氢产乙酸菌互营共生

- 养体的筛选及其群落结构解析[J]. 科技导报, 2009, 27(16): 78-82.
- [17] Zhang C, Liu X, Dong X. *Syntrophomonas curvata* sp. nov., an anaerobe that degrades fatty acids in co-culture with methanogens[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(3): 969-973.
- [18] Roy F, Samain E, Dubourguier HC, et al. *Syntrophomonas sapovorans* sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long chain fatty acids[J]. Archives of Microbiology, 1986, 145(2): 142-147.
- [19] Sekiguchi Y, Kamagata Y, Nakamura K, et al. *Syntrophothermus lipocalidus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, syntrophic, fatty-acid-oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(2): 771-779.
- [20] Westerholm M, Roos S, Schnürer A. *Syntrophaceticus schinkii* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter[J]. FEMS Microbiol Letters, 2010, 309(1): 100-104.
- [21] Antunes A, Rainey FA, Wanner G, et al. A new lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a brine-filled deep of the Red Sea[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(10): 3580-3587.
- [22] 赵辉, 敬颜, 王葳, 等. 浓香型白酒窖泥中高产己酸兼性厌氧细菌的分离鉴定[J]. 食品科学, 2012, 33(5): 177-182
- [23] Kobayashi T, Sawada K, Sumitomo N, et al. Bifunctional pectinolytic enzyme with separate pectate lyase and pectin methyltransferase domains from an alkaliphilic *Bacillus*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003, 19(3): 269-277.
- [24] Entani E, Masai H, Suzuki KI. *Lactobacillus acetotolerans*, a new species from fermented vinegar broth[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1986, 36(4): 544-549.
- [25] Gold RS, Meagher MM, Hutkins R, et al. Ethanol tolerance and carbohydrate metabolism in lactobacilli[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1992, 10(1): 45-54.
- [26] Grabowski A, Tindall BJ, Bardin V, et al. *Petrimonas sulfuriphila* gen. nov., sp. nov., a mesophilic fermentative bacterium isolated from a biodegraded oil reservoir[J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2005, 55(3): 1113-1121.
- [27] Chen S, Dong X. *Proteiniphilum acetatigenes* gen. nov., sp. nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(6): 2257-2261.
- [28] Yamada T, Imachi H, Ohashi A, et al. *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(10): 2299-2306.
- [29] 全哲学. 追寻被“遗漏”的微生物[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 34-43.
- [30] Baena S, Fardeau ML, Labat M, et al. *Aminobacterium mobile* sp. nov., a new anaerobic amino-acid-degrading bacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(1): 259-264.
- [31] 刘冬英, 刘奕, 门学慧, 等. 浮霉菌门严格厌氧产氢细菌的分离及其生理特性[J]. 微生物学报, 2012, 52(8): 994-1001.
- [32] Asakawa S, Nagaoka K. *Methanoculleus bourgensis*, *Methanoculleus olentangyi* and *Methanoculleus oldenburgensis* are subjective synonyms[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(5): 1551-1552.
- [33] Elberson MA, Sowers KR. Isolation of an acetoclastic strain of *Methanosarcina siciliae* from marine canyon sediments and emendation of the species description for *Methanosarcina siciliae*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, 47(4): 1258-1261.
- [34] Schmidt JE, Ahring BK. Immobilization patterns and dynamics of acetate-utilizing methanogens immobilized in sterile granular sludge in upflow anaerobic sludge blanket reactors[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(3): 1050-1054.
- [35] 王儒铎, 张良, 刘来雁, 等. 泸州古酿酒窖池中两株产甲烷杆菌比较研究[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(6): 840-844.
- [36] Fierer N, Jackson RB. The diversity and biogeography of soil bacterial communities[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(3): 626-631.
- [37] 王明跃, 张文学, 王海英, 等. 不同窖龄窖泥细菌的系统发育多样性分析[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 177-181.
- [38] 王彦伟, 徐凤花, 阮志勇, 等. 用 DGGE 和 Real-Time PCR 对低温沼气池中产甲烷古菌群落的研究[J]. 中国沼气, 2012, 30(1): 8-12.
- [39] 李宗义, 王海磊, 程彦伟, 等. 成熟厌氧颗粒污泥的结构及其特征[J]. 微生物学通报, 2003, 30(3): 56-59.
- [40] 郭晓磊, 胡勇有, 高孔荣. 厌氧颗粒污泥及其形成机理[J]. 给水排水, 2000, 26(1): 33-38.