

浓香型白酒窖池细菌群落

罗惠波* 甄攀 黄治国

(四川理工学院酿酒生物技术及应用四川省重点实验室 四川 自贡 643000)

摘要: 利用 PCR-SSCP 技术研究了不同窖龄浓香型白酒窖池细菌群落的变化规律, 结果发现: (1) 所有窖泥样品均出现 9-22 条较清晰的条带, 其中均表现出较高优势度的条带 7 条, 但各样品优势条带的变化规律不同; (2) 所有窖泥样品平均生物多样性指数都在 1.93-2.82 之间, 随着窖龄的增加, 相同位置样品的多样性指数总体上呈递增趋势; (3) 同一窖池不同位置样品的 PCR-SSCP 图谱相似性指数较高, 在 0.63-1.00 之间, 不同窖龄窖池的 SSCP 图谱相似性指数较低, 在 0.34-0.76 之间。

关键词: 白酒窖池, 细菌, PCR-SSCP, 16S rDNA, 微生物群落

Research on Bacterial Community in Luzhou-flavor Liquors Pit

LUO Hui-Bo* ZHEN Pan HUANG Zhi-Guo

(Liquor-making Biotechnology & Application Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong, Sichuan 643000, China)

Abstract: The changing laws of bacteria community in different pit ages of luzhou-flavor liquor pit were analyzed using PCR-SSCP technique. The results were as follows: bands from No. 9 to No. 22 were showed clearly in all pit mud samples, which included 7 bands with higher dominant degree. But the changing laws of dominant degree among bands were different. Besides, the mean diversity index of all samples kept between 1.93 and 2.82. With the increasing pit age, the diversity index of samples from the same spots generally showed increasing trend. The similarity index of PCR-SSCP pattern of samples from different spots in the same pit was higher, between 0.63 and 1.00. While the similarity index of samples from different pit ages was lower, between 0.34 and 0.76.

Keywords: Liquor pit, Bacteria, PCR-SSCP, 16S rDNA, Microflora

浓香型大曲酒生产中, 常有“千年老窖万年糟”的说法, 老窖出好酒, 窖泥连续使用时间越长, 所产酒质就越好。窖池是生产浓香型大曲酒的基础, 因此, 探讨不同窖龄窖池微生物群落特性及其变化

规律对浓香型白酒生产有着重要的指导意义。有学者采用平板培养的方式, 从窖泥中分离出短杆菌属、链球菌属、葡萄球菌属、乳酸杆菌属、丁酸杆菌属、芽孢杆菌属、芽孢梭菌属、微球菌属、甲烷

基金项目: 四川省科技厅应用基础项目(No. 2006J13-006, 07JY029-026); 泸州老窖科研奖学金项目(No. 08ljzk15); 四川理工学院引进人才项目(No. 2007-18)

* 通讯作者: Tel: 86-813-5506666; 信箱: sgxlbh@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-05-12; 接受日期: 2010-08-24

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

杆菌属等多种微生物类群^[1]。但 Amann 等^[2]针对环境样品采用平板培养的方式与超滤收集的微生物 SSCP 异源双链图谱进行比较,发现能够通过培养基分离培养的微生物小于环境中总微生物含量的 10%。如果使用常规的分离培养研究窖池微生物,不但费时费力,而且会遗漏很多微生物种类。

随着分子生物学技术的发展,PCR 相关技术在特殊微生态环境的微生物群落分析中已经有了广泛的应用^[3],因此本试验利用 PCR-SSCP 技术分析浓香型白酒窖池细菌群落结构及其变化规律,为中国白酒风味因子的形成机理研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

窖泥样品采自泸州老窖股份有限公司白酒生产窖池,包括 20 年左右(上世纪 80 年代窖池)、100 年左右(泉记作坊、清末)、200 年左右(桂花作坊、清嘉庆年间)、300 年左右(天成生作坊、清乾隆年间)。于窖壁上层(距窖口 50 cm)、下层(距窖底 50 cm)和窖底(窖池底部中央)分别取样,迅速置于冰盒运回, -20°C 保藏。

1.2 主要试剂和仪器

E.Z.N.A.TM Soil DNA Kit 购自美国 Omega 公司; *Taq* DNA polymerase 购自大连宝生物工程有限公司。梯度 PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.3 引物设计与合成

16S rDNA 基因引物序列选用 ER10 和 ER11 扩增 16S rDNA 基因 V2 高变区。引物 ER10 (对应 *E. coli* 16S rRNA 的 103-119)的序列: 5'-GGCGG ACGGGT GAGTAA-3', 引物 ER11 (对应 *E. coli* 16S rRNA 的 314-357)的序列: 5'-ACTGCTGCCT CCCGTAG-3', 可以扩增出 255 bp 的片段^[4], 引物由上海英俊生物技术公司合成。

1.4 窖泥微生物总 DNA 提取

称取 0.5 g 样品,采用 E.Z.N.A.™ Soil DNA Kit 提取微生物总 DNA,具体步骤见说明书。然后用核酸蛋白仪检测样品 DNA 的浓度和纯度。

1.5 PCR 扩增

PCR 反应体系为 50 μL: 1.0 μL *Taq* 酶(5 U/μL), 5.0 μL 10× buffer, 3.0 μL MgCl₂ (25 mmol/L), 2.0 μL dNTPs mixture (各 2.5 mmol/L), 引物(10 μmol/L)各 1.5 μL, 5.0 μL 模板 DNA (100 ng/L), 31.0 μL 灭菌双

蒸水。PCR 扩增程序: 95°C 5 min; 94°C 50 s, 55°C 40 s, 72°C 50 s, 35 个循环; 72°C 5 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色后用凝胶成像系统照相。

1.6 SSCP 分析

在 10 μL PCR 产物中加入 10 μL 变性缓冲液(95%甲酰胺, 0.03%二甲苯青, 0.05%溴酚蓝, EDTA 20 mmol/L), 100°C 变性 10 min 后, 立即冰浴 10 min; 变性产物用非变性聚丙烯酰胺凝胶(交联度为 29:1) 200 V 电泳 8 h, 银染后拍照。

1.7 数据分析

研究群落多样性的方法很多,本研究主要用丰度(*S*)、优势度、样品间相似性指数(*C_s*)和 Shannon-Wiener 指数(*H*)来表示。所得图像通过 BIO-1D 软件分析,将 SSCP 图谱转变为波峰图,每个波峰代表 1 个条带,即 1 个种,峰下面积代表该条带的亮度,即相对数量^[5]。具体过程如下:

(1) 丰度(*S*): 用 SSCP 图谱中条带的个数来表示。

(2) 优势度: 用某一特定条带的峰面积占样品总体峰面积的百分数来表示。

(3) Shannon-Wiener 多样性指数^[6]: 反映群落种类与均匀度的混合参数,即种类数目多,可增加多样性;同样,种类之间个体分配的均匀性增加也会使多样性提高。

$$H = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

注: *H* 为 Shannon-Wiener 多样性指标值; *p_i* 为第 *i* 个物种所占的百分比,即是第 *i* 种的个体数与个体总数的比例; *S* 为样品中含有多少种不同的物种的数量,即该样品总 SSCP 条带数。

(4) 相似性用索伦森配对相似性系数(Sorenson pairwise similarity coefficient)^[8]来计算:

$$C_s = 2j / (a + b)$$

注: *C_s* 为索伦森配对相似性系数; *a* 为某一样品的 PCR-SSCP 图谱的条带数目; *b* 为另一样品的 PCR-SSCP 图谱的条带数目; *j* 为两个泳道所共有条带的数目。

2 结果与分析

2.1 细菌 PCR 扩增产物

各样品窖泥微生物总 DNA 光吸收比值

OD_{260}/OD_{280} 均在 1.60–1.90 之间。用引物 ER10 和 ER11 扩增窖池细菌 16S rDNA, 得到 255 bp 左右片段(图 1)。

2.2 细菌 16S rDNA PCR-SSCP 图谱

本试验对窖池细菌 16S rDNA 进行了 PCR-SSCP 分析, 结果发现: 每个泳道均出现 9–22

条较清晰的条带(图 2), 表明各样品的 16S rDNA 的 PCR 产物通过 SSCP 得到了较好的分离。不同样品的电泳图谱, 主要条带的位置大致相同, 表明不同窖龄的样品菌群结构具有较高的相似性, 它们是存在于窖泥中的主要优势菌群, 同时部分条带并不在所有泳道中存在, 具有多态性。

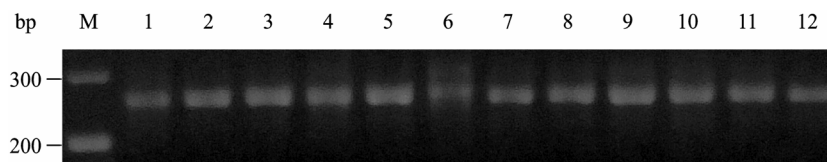


图 1 窖池细菌 16S rDNA PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of 16S rDNA fragments of bacteria in the pit

注: M: DL500™ DNA marker; 1: 20 年窖壁上层; 2: 20 年窖壁下层; 3: 20 年窖底; 4: 100 年窖壁上层; 5: 100 年窖壁下层; 6: 100 年窖底; 7: 200 年窖壁上层; 8: 200 年窖壁下层; 9: 200 年窖底; 10: 300 年窖壁上层; 11: 300 年窖壁下层; 12: 300 年窖底。

Note: M: DL500™ DNA marker; 1: Upper layer of pit wall with 20 years; 2: Under layer of pit wall with 20 years; 3: Bottom of pit with 20 years; 4: Upper layer of pit wall with 100 years; 5: Under layer of pit wall with 100 years; 6: Bottom of pit with 100 years; 7: Upper layer of pit wall with 200 years; 8: Under layer of pit wall with 200 years; 9: Bottom of pit with 200 years; 10: Upper layer of pit wall with 300 years; 11: Under layer of pit wall with 300 years; 12: Bottom of pit with 300 years.

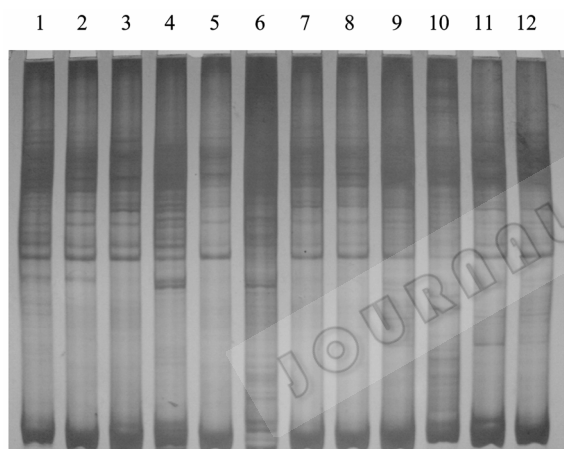


图 2 窖池细菌群落 SSCP 图谱

Fig. 2 SSCP pattern of bacteria community in the pit

注: 1: 20 年窖壁上层; 2: 20 年窖壁下层; 3: 20 年窖底; 4: 100 年窖壁上层; 5: 100 年窖壁下层; 6: 100 年窖底; 7: 200 年窖壁上层; 8: 200 年窖壁下层; 9: 200 年窖底; 10: 300 年窖壁上层; 11: 300 年窖壁下层; 12: 300 年窖底。

Note: 1: Upper layer of pit wall with 20 years; 2: Under layer of pit wall with 20 years; 3: Bottom of pit with 20 years; 4: Upper layer of pit wall with 100 years; 5: Under layer of pit wall with 100 years; 6: Bottom of pit with 100 years; 7: Upper layer of pit wall with 200 years; 8: Under layer of pit wall with 200 years; 9: Bottom of pit with 200 years; 10: Upper layer of pit wall with 300 years; 11: Under layer of pit wall with 300 years; 12: Bottom of pit with 300 years.

2.3 窖泥细菌 SSCP 图谱丰度变化规律

本试验分析了窖池细菌 16S rDNA PCR-SSCP 图谱的丰度变化规律, 结果发现: 不同样品间的丰度差异较大(表 1)。第 8、9、10、11、12、18、19

号条带在所有样品中均有检出, 且优势度较高, 表明其代表的微生物类群可能是不同窖龄窖池所共有的优势微生物类群。第 16 和 24 号条带, 只在 20 年窖龄的个别样品中检出。第 13、17、36、38、40 号条带, 只在 100 年左右窖龄的个别样品中检出。第 3、29、30、34 号条带, 只在 200 年窖龄的个别样品中检出。第 1、2、4、5、23、26、28、33、35、37、39、41 号条带, 只在 300 年窖龄的个别样品中检出。而第 6、7、14、15、20、21、22、25、27、31、32、42、43 号条带, 只在个别样品中检出。

2.4 窖池细菌 SSCP 图谱条带优势度变化规律

本试验分析了窖池细菌 16S rDNA PCR-SSCP 图谱优势度的变化规律, 结果发现: 不同样品相同位置处条带的优势度变化较大(表 1)。第 8、9、10、11、12、18、19 号条带在所有样品中均有检出, 每个条带的优势度变化规律均不同, 反映出不同窖龄窖池微生物量的差异。对于窖壁上层样品, 随着窖龄的增加, 第 8、10、18 号条带优势度呈递减趋势, 第 11、12 号条带优势度呈先增加后减少的趋势, 第 9 号条带优势度呈先减少后增加的趋势, 第 19 号条带优势度在 15%左右波动(图 3A)。对于窖壁下层样品, 随着窖龄的增加, 第 8、12、18 号条带优势度几乎为同一水平, 第 10、11、19 号条带优势度呈先增加后减少的趋势, 第 9 号条带优势度在 20%处波动(图 3B)。对于窖底样品, 随着窖龄的增加, 第 8、12、

表1 窖池细菌 SSCP 条带的丰度及优势度
Table 1 Abundance and dominance of SSCP bands of bacteria in the pit

样品 Sample	20年 20 years			100年 100 years			200年 200 years			300年 300 years		
	上层 Upper layer	下层 Under layer	窖底 Bottom	上层 Upper layer	下层 Under layer	窖底 Bottom	上层 Upper layer	下层 Under layer	窖底 Bottom	上层 Upper layer	下层 Under layer	窖底 Bottom
丰度 Abundance	14	9	9	13	10	19	14	14	17	22	16	16
1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3.14	/	/
2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3.10	/	/
3	/	/	/	/	/	/	4.84	3.74	4.60	/	/	/
4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3.19	/
5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2.80	/	/
6	4.28	/	/	/	/	/	6.10	4.72	/	/	/	/
7	4.02	/	5.81	/	/	/	/	/	/	/	/	5.32
8	6.33	7.29	7.61	5.44	6.07	6.80	6.67	6.35	7.00	3.77	6.46	6.89
9	15.03	20.48	12.82	12.49	23.53	14.26	12.57	14.42	14.60	17.21	20.22	19.92
10	18.79	23.30	21.06	15.34	15.45	15.58	15.95	16.97	15.14	13.74	16.21	16.34
11	11.38	12.49	12.99	13.63	13.02	9.86	11.26	12.12	8.89	5.84	6.45	7.90
12	3.12	3.48	7.87	8.29	5.06	3.89	7.71	6.95	5.47	2.68	5.95	5.37
13	/	/	/	3.54	/	3.26	/	/	/	/	/	/
14	3.56	3.55	3.52	/	5.21	/	4.91	4.35	3.01	2.65	3.11	3.17
15	/	/	/	2.64	/	/	/	/	2.82	2.55	2.99	2.98
16	3.71	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
17	/	/	/	1.87	/	6.24	/	/	/	/	/	/
18	7.05	3.63	6.92	5.23	4.03	6.42	5.12	4.07	4.50	2.94	6.70	6.19
19	14.82	21.65	21.38	13.11	24.73	3.72	17.58	16.86	12.99	11.23	17.50	17.37
20	6.19	4.14	/	/	/	/	1.83	2.53	3.97	/	1.97	2.13
21	/	/	/	15.89	/	10.17	/	/	/	2.53	1.88	2.21
22	/	/	/	/	/	0.67	/	/	1.47	/	/	/
23	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3.59	/	/
24	0.90	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
25	/	/	/	/	1.86	0.55	2.64	3.12	4.12	/	/	/
26	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3.85	1.17	1.01
27	0.78	/	/	/	/	0.69	/	/	/	/	/	/
28	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1.07	1.00
29	/	/	/	/	/	/	/	/	3.84	/	/	/
30	/	/	/	/	/	/	2.05	2.72	2.74	/	/	/
31	/	/	/	/	/	/	0.77	1.08	/	2.92	/	/
32	/	/	/	/	/	0.25	/	/	2.42	/	/	/
33	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	4.31	1.46
34	/	/	/	/	/	/	/	/	2.41	/	/	/
35	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2.59	/	/
36	/	/	/	1.44	/	1.33	/	/	/	/	/	/
37	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3.80	0.80	0.75
38	/	/	/	1.06	1.04	2.58	/	/	/	/	/	/
39	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2.56	/	/
40	/	/	/	/	/	5.33	/	/	/	/	/	/
41	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2.28	/	/
42	/	/	/	/	/	2.83	/	/	/	2.11	/	/
43	/	/	/	/	/	5.57	/	/	/	2.12	/	/

注: /: 未检出。

Note: /: No detected.

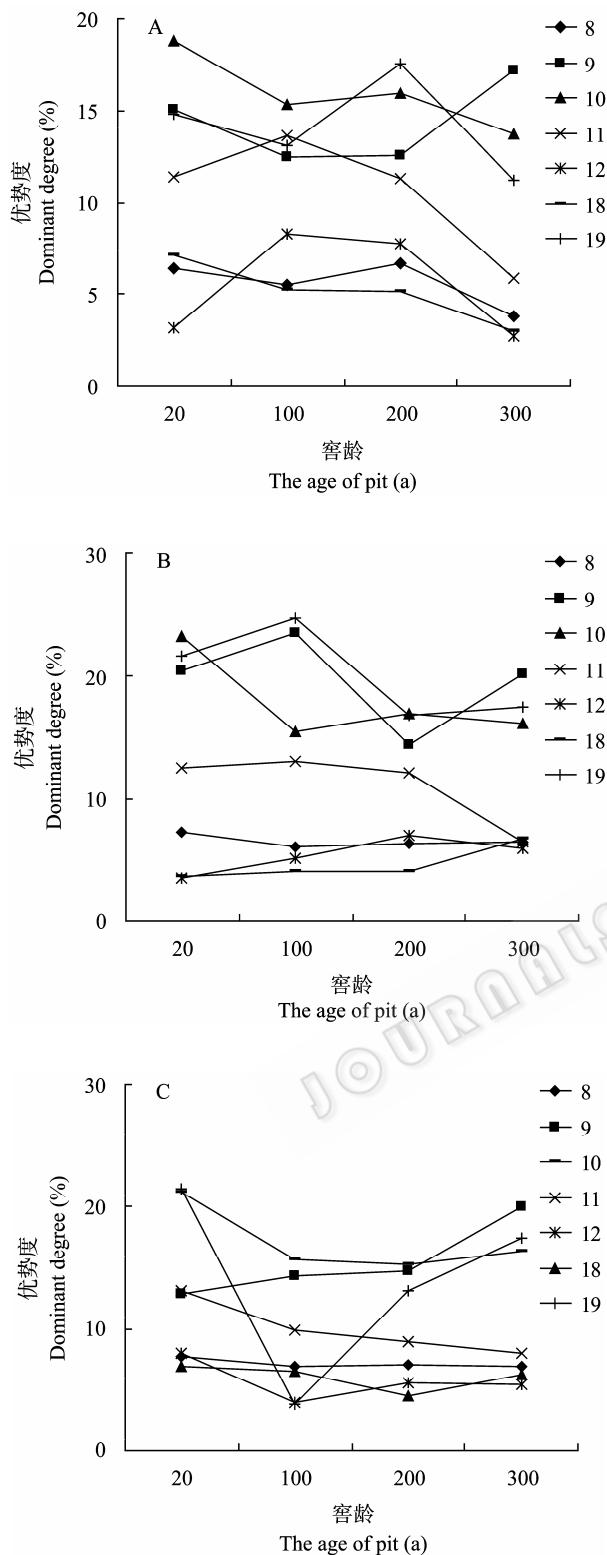


图 3 不同窖龄窖池细菌群落优势度的变化规律
Fig. 3 Changing laws of dominant degree of bacteria community in the pit with different ages
 注: A: 窖壁上层; B: 窖壁下层; C: 窖底。
 Note: A: Upper layer of pit wall; B: Under layer of pit wall; C: Bottom of pit.

18 号条带优势度几乎为同一水平, 变化幅度很小, 第 10、11 号条带优势度呈递减趋势, 第 9 号条带优势度呈递增趋势, 第 19 号条带优势度变化幅度最大, 呈先减少后增加的趋势(图 3C)。

2.5 窖池细菌 SSCP 图谱多样性指数变化规律

本试验分析了窖池细菌 16S rDNA PCR-SSCP 图谱的生物多样性指数, 结果发现: 生物多样性指数都在 1.93-2.82 之间(图 4), 随着窖龄的增加, 相同位置样品的多样性指数总体上呈递增趋势, 只有 300 年窖龄窖底多样性指数有微小的下降。而同一窖龄中不同位置的多样性指数变化规律不同, 20 年窖龄窖池不同位置样品多样性指数随着窖池位置的下降而先下降再增加, 窖壁上层多样性指数最大。100 年窖龄窖池不同位置样品多样性指数随着窖池位置的下降而先下降后增加, 窖底多样性指数最大。200 年窖龄窖内不同位置样品多样性指数随着窖池位置的下降而递增, 窖底多样性指数最大。300 年窖龄窖内不同位置样品多样性指数随着窖池位置的下降而递减, 窖壁上层多样性指数最大。

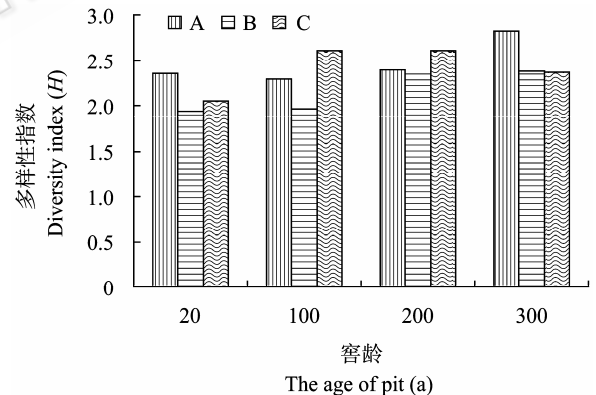


图 4 窖池细菌群落多样性指数变化规律
Fig. 4 Changing laws of diversity index of bacteria community in the pit
 注: A: 窖壁上层; B: 窖壁下层; C: 窖底。
 Note: A: Upper layer of pit wall; B: Under layer of pit wall; C: Bottom of pit.

2.6 窖池细菌 SSCP 图谱相似性指数变化规律

本试验分析了不同窖龄窖泥细菌 16S rDNA PCR-SSCP 图谱的相似性指数, 结果发现: 同一窖池不同位置样品的 SSCP 图谱相似性指数较高, 在 0.63-1.00 之间, 不同窖龄窖池的 SSCP 图谱相似性指数较低, 在 0.34-0.76 之间(图 5)。其中, 200 年

窖壁上层和下层样品间的相似性指数为100%，而100年窖底和300年窖壁上层样品间的相似性指数仅有34%。

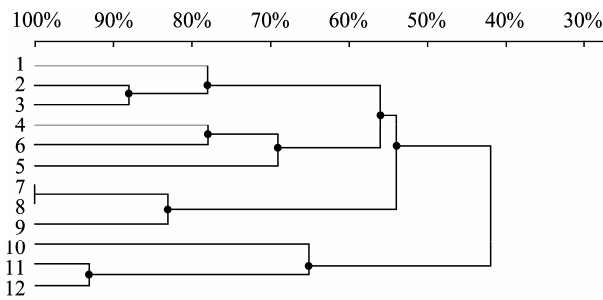


图5 窖池细菌群落相似性指数树状图

Fig. 5 Dendrogram of homology coefficient of bacteria community in the pit

3 讨论

3.1 窖池细菌 SSCP 图谱丰度

胡承等^[7]采用传统的培养方式，窖泥微生物群落是由厌氧异养菌、甲烷菌、己酸菌、乳酸菌、硫酸盐还原菌和硝酸盐还原菌等多种微生物组成的微生物共生群落系统，在该微生物群落中随窖池层次分布顺序的不同和窖泥的化学生态的不同，菌类菌种呈现明显的区别。

本试验分析了窖池细菌 SSCP 图谱丰度，研究表明：不同窖龄窖池样品的谱带数量有较大的差异，优势条带数目在9–22条之间，这其中既有所有样品的共有条带，也有部分样品的共有条带，也有个别样品的特异条带，并且随着窖龄的增加，样品条带的丰度呈增加的趋势。

3.2 窖池细菌 SSCP 图谱条带优势度

条带的优势度反映的是该条带的量在整个样品中所占的比例大小。对具有代表性的优势条带的优势度分析，可在一定程度上代表窖泥老熟过程中细菌菌群变化情况，对主体条带之间优势度的变化规律的比较，可在一定程度上反映出优势菌群之间的种群关系。

赵焱^[8]在对 ABR 系统微生物群落更迭规律的 SSCP 解析中，发现微生物群落中复杂的互惠共生和种间竞争的生态关系。本试验在对 SSCP 图谱的优势度分析中，发现在不同窖龄相同位置的 SSCP 图谱中，共检出第8、9、10、11、12、18、19号7条条带，且相对于其他条带而言，优势度和变化程

度均较大，说明在窖泥老熟过程中，这7条条带所代表的细菌菌群为相对优势的菌群，可能在窖泥微生物生态系统中起重要的作用。因此在窖泥微生物群落更迭过程中，对这7个菌群的研究显得尤为重要。研究菌群数量的变化情况，进而可以在一定程度上反映各个菌群之间的生态关系。

3.3 窖池细菌群落多样性

Shannon-Wiener 指数(H 值)是目前对 SSCP 指纹图谱讨论中最常见的指数。本试验研究表明：不同窖池样品的 H 值为 1.93–2.82，变化幅度较大，说明在窖泥老熟过程中细菌种群结构变化较大。不同窖龄中相同位置的多样性指数，随着窖龄的增加，均呈现递增趋势。说明随着窖龄的增加，窖泥细菌的生物多样性指数呈现递增的趋势。这可能是由于长时间的连续生产、人工开窖和封窖、发酵过程中与酒醅微生物的交换等因素，使窖泥微生物多样性指数增加。

3.4 窖池细菌群落相似性

相似性指数主要反映的是各样品条带数量之间的相似性关系，它只是一个最基本的多样性分析指数。谢冰等^[9]采用 PCR-SSCP 技术对芦苇人工湿地底泥微生物群落结构进行相似性分析，发现季节变化和水质变化对微生物群落结构有较大影响。赵阳国等^[10]采用 SSCP 技术分析不同废水处理系统中微生物群落结构，发现同一废水处理系统中微生物群落的相似性最大。

本试验通过窖池细菌群落相似性分析，发现同一口窖池各样品间的相似性系数较高，不同窖龄间窖池样品细菌群落的相似性系数较低，说明随着窖龄的增加，窖池细菌群落变化较大。

参 考 文 献

- [1] 周恒刚. 关于窖泥微生物(上). 酿酒科技, 1987(1): 2–6.
- [2] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Identification of uncultured bacteria: a challenging task for molecular taxonomists. *ASM News*, 1994(60): 360–365.
- [3] 张洪勋, 晓谊, 齐鸿雁. 微生物学研究方法进展. 生态学报, 2003, 23(5): 988–995.
- [4] 米文秀, 谢冰, 徐亚同. PCR-SSCP 技术用于脱臭微生物群落结构的研究. 环境科学, 2008, 29(7): 1992–1997.
- [5] Gillan DC, Speksnijder AG, Zwart G. Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca,

