

基于 PCR-DGGE 和高通量测序分析白云边酒窖泥细菌群落结构与多样性

黄莹娜¹ 熊小毛² 胡远亮³ 梁运祥¹ 赵述森^{1*}

(1. 华中农业大学生命科学技术学院 农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070)

(2. 湖北白云边酒业股份有限公司 湖北 松滋 434200)

(3. 湖北师范大学生命科学学院 湖北 黄石 435002)

摘要:【目的】探索白云边酒不同窖龄窖泥细菌群落结构及其多样性,分析窖泥细菌群落特征对兼香型白酒风格形成的影响。【方法】分别提取 2 年和 23 年窖泥样品总 DNA,采用 PCR-DGGE、基因克隆以及高通量测序技术,研究窖泥细菌的分布情况。【结果】白云边窖泥细菌归属于变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria) 4 个菌门。2、23 年窖泥共同的优势菌属($\geq 1.0\%$)包括棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、香味菌属(*Myroides*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、梭菌属(*Clostridium*)、醋杆菌属(*Acetobacter*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)。2 年窖泥特有优势菌属为 *Dysgonomonas*、*Fluviicola*、变形杆菌属(*Proteus*)和 *Wohlfahrtiimonas*,而 23 年窖泥特有优势菌属为葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、*Hazenella*、魏斯氏菌属(*Weissella*)、葡糖醋杆菌属(*Gluconacetobacter*)和摩根氏菌属(*Morganella*)。【结论】2 年窖泥细菌群落多样性高于 23 年窖泥。比较了白云边两种窖龄窖泥主要细菌组成情况,为研究微生物对白云边酒浓酱兼香型独特风味形成的影响提供依据。

关键词: PCR-DGGE, 高通量测序, 窖泥, 16S rRNA 基因, 细菌群落

Foundation item: The Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2014JC004); Natural Science Foundation of Hubei Province (No. 2015CFC797)

***Corresponding author:** Tel: 86-27-87281040; E-mail: shumiaozhao@mail.hzau.edu.cn

Received: January 21, 2016; **Accepted:** May 30, 2016; **Published online** (www.cnki.net): October 09, 2016

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(No. 2014JC004); 湖北省自然科学基金(No. 2015CFC797)

***通讯作者:** Tel: 86-27-87281040; E-mail: shumiaozhao@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2016-01-21; **接受日期:** 2016-05-30; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-10-09

Bacterial community and diversity in pit mud of Baiyunbian liquor analyzed by PCR-DGGE and high-throughput sequencing

HUANG Ying-Na¹ XIONG Xiao-Mao² HU Yuan-Liang³ LIANG Yun-Xiang¹
ZHAO Shu-Miao^{1*}

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

(2. Baiyunbian Company Limited of Hubei Province, Songzi, Hubei 434200, China)

(3. College of Life Science Hubei Normal University, Huangshi, Hubei 435002, China)

Abstract: [Objective] To study bacterial community and diversity in pit mud with different-aged cellars used to produce Baiyunbian liquor. [Methods] Total DNA of microbes in pit mud (2 and 23 year) were extracted, then PCR-DGGE and high-throughput sequencing technology were used to analyze bacterial communities. [Results] Bacteria in the pit mud fell into 4 phyla: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Actinobacteria, with dominant genera ($\geq 1.0\%$) including *Corynebacterium*, *Myroides*, *Sphingobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, and *Acinetobacter*. Furthermore, *Dysgonomonas*, *Fluviicola*, *Proteus* and *Wohlfahrtiimonas* were present in 2-year uniquely, whereas *Staphylococcus*, *Hazenella*, *Weissella*, *Gluconacetobacter* and *Morganella* were especially predominant in 23-year pit mud. [Conclusion] Bacterial diversity in pit mud of 2-year was higher than in that of 23-year.

Keywords: PCR-DGGE, High-throughput sequencing, Pit mud, 16S rRNA gene, Bacterial community

白云边酒作为兼香型白酒的典型代表,创造性结合酱香型白酒高温制曲、高温堆积和浓香型白酒混蒸续渣、泥窖发酵工艺,酒体风味兼具酱香型白酒的幽雅细腻和浓香型白酒的绵甜甘冽,酱浓协调,别具风格^[1]。白云边酒采用泥底砖窖发酵,窖泥细菌的代谢产物为酒体风味物质的形成提供了重要前体。研究窖泥细菌群落结构组成,探究不同窖龄窖泥的细菌群落结构差异,对揭示参与形成白酒浓酱兼香型风味的功能菌,指导白酒生产,具有重要意义。

近年来,已陆续有研究人员利用 PCR-DGGE^[2-5]和基因克隆^[6]等分子生物学技术对白酒酒醅和窖泥的微生物群落结构进行了深入研究。DGGE 和基因克隆技术简单高效,但检测限低,具有较大局限性,更适合反映窖泥细菌群落的优势种群,尚不能全面系统地揭示窖泥细菌群落结构和多样性^[7]。高通量测序能产出大量数据,对样品基因进行细致分析,是解析复杂环境中微生物物种组成和相对丰度的重要工具^[8-9],已被广泛应用于土壤^[10-11]、湿地^[12]、海洋^[13]和沼气^[14-15]等样品微生物群落研究。运用高

通量测序技术解析窖泥细菌群落结构也陆续见报。本研究结合 PCR-DGGE、基因克隆和高通量测序技术,系统研究 2 年和 23 年窖泥细菌群落结构和多样性,以期在分子水平上为揭示白云边酒浓酱兼香型风味形成机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 窖泥: 样品采集自白云边 2 年新窖(望月酿造基地)和 23 年老窖(老厂区),采用 5 点取样法,取池底对角线上的 4 个顶点及中部交叉点,共 5 个点的窖泥各 100 g,混合均匀后于 -20°C 保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: *Taq* DNA 聚合酶,北京全式金生物技术有限公司;TEMED,上海生工生物工程技术服务有限公司;去离子甲酰胺,德国 APPLICHEM 公司;MagExtractor (PCR & Gel Clean Up)试剂盒,东洋纺(上海)生物科技有限公司;Gel Extraction Kit,美国 OMEGA 公司;pMD18-T 载体,日本 TaKaRa 公司。40%甲叉双丙烯酰胺、Mycycle PCR 仪、DCode DGGE 电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;

ST 16R 高速冷冻离心机、ND-2000 超微量分光光度计, 美国 Thermo 公司。

1.1.3 引物: 16S rRNA 基因 V3 区引物 P2 (5'-AT TACCGCGGCTGCTGG-3')、P3 (5'-CCTACGGGA GGCAGCAG-3')和 GC-P3 (GC 序列为 5'-CGCCCG CCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGACGGG GGG-3'), 由上海英俊生物技术公司合成。

1.2 方法

1.2.1 窖泥总 DNA 提取及纯化: 用 CTAB 法提取 2 年和 23 年窖泥中微生物基因组 DNA, -20 °C 保存。

1.2.2 16S rRNA 基因 V3 区 PCR 扩增: PCR 反应体系(50.0 μ L): 5 U/ μ L *Taq* 酶 0.5 μ L, 10 \times Buffer 5.0 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 4.0 μ L, 10 μ mol/L P2/GC-P3 引物各 1.0 μ L, 100 ng/ μ L 模板 DNA 1.0 μ L, 灭菌双蒸水 37.5 μ L。PCR 条件 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, MagExtractor (PCR & Gel Clean Up)试剂盒纯化后, 用超微量分光光度计测定 DNA 浓度。

1.2.3 PCR 产物 DGGE 检测: 采用浓度为 8%聚丙烯酰胺凝胶, 变性梯度 46%–54% (100%变性剂为 7 mol/L 尿素和 40%去离子甲酰胺), PCR 纯化产物上样量 400 ng, 凝胶于 60 °C、0.5 \times TAE 电泳液中 20 V 电泳 10 min 后, 80 V 电泳 828 min, 银染, 拍照。最后采用 Quantity One 分析软件完成 Match 匹配, 读取图谱上条带的光密度值 Trace Int, 输入 Bio-Dap 软件计算多样性指数。

1.2.4 DGGE 主条带基因克隆测序: 用无菌手术刀片将可见条带切胶回收, 胶条用灭菌去离子水清洗后, 捣碎于 25 μ L 灭菌去离子水中, 4 °C 静置 16 h 取 3 μ L 上清液, 用 P2/P3 引物进行 PCR 扩增, 扩增程序同 1.2.2, 35 个循环。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶条带用 Gel Extraction Kit 回收。取 4.5 μ L 回收产物连接到 pMD18-T 载体, 转入 100 μ L 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 于 900 μ L LB 液体培养基中 37 °C 复苏培养 1 h, 5 000 r/min 离心 1 min 后去掉 900 μ L 上清, 余下液体混匀后涂布于

加有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基, 37 °C 培养 12 h, 用灭菌的牙签随机挑选克隆子, 用 P2/P3 引物做菌落 PCR, 阳性克隆子由铂尚生物技术(上海)有限公司测序, 测序结果通过 NCBI GenBank 数据库比对。

1.2.5 窖泥总 DNA 高通量测序: 窖泥总 DNA 通过 MagExtractor (PCR & Gel Clean Up)试剂盒纯化后, 由上海锐翌生物科技有限公司, 通过 Illumina 平台 (MiSeq)进行高通量测序。

1.2.6 OTU 聚类分析: 通过 QIIME 平台去除原始序列中的低质量序列, 根据标签序列分来自不同样品的序列, 利用 Usearch 软件在 0.97 相似度下进行聚类, 对聚类后的序列进行嵌合体过滤后, 得到用于物种分类的 OTU (Operational taxonomic units)^[16]。

1.2.7 物种注释和丰度分析: 使用 QIIME 软件从 OTU 中分别提取一条 Tag 序列作为代表序列, 使用 RDP 方法, 与已知物种 16S 数据库(GreenGenes, <http://greengenes.lbl.gov>)比对, 对每个 OTU 进行物种分类、归类后, 根据每个 OTU 中序列的条数, 得到 OTU 丰度表, 并进行后续分析^[17]。

1.2.8 Alpha 多样性分析: 利用 QIIME 软件计算样品的 Alpha 多样性值, 做出相应的稀释曲线^[18]。

2 结果与分析

2.1 细菌 DGGE 图谱分析及主条带基因克隆测序

采用 CTAB 法提取窖泥微生物基因组 DNA, 大小约 23 kb。利用引物 P2/GC-P3 对 2、23 年窖泥总 DNA 进行 16S rRNA 基因 V3 区 PCR 扩增, 扩增得到大小为 250 bp 的目的片段, 用该产物进行 DGGE 电泳分析, 结果显示 2 年和 23 年窖泥的条带分布情况存在较大差异(图 1)。

图谱经过 Quantity One 和 Bio-Dap 软件分析, 计算多样性指数, 结果表明: 2 年窖泥物种丰度高于 23 年窖泥, 分别为 32、28; 2 年窖泥的 Shannon's 多样性指数 H' 为 3.40, 高于 23 年窖泥的 H' (3.29); 2 年窖泥的 Simpson's 多样性指数

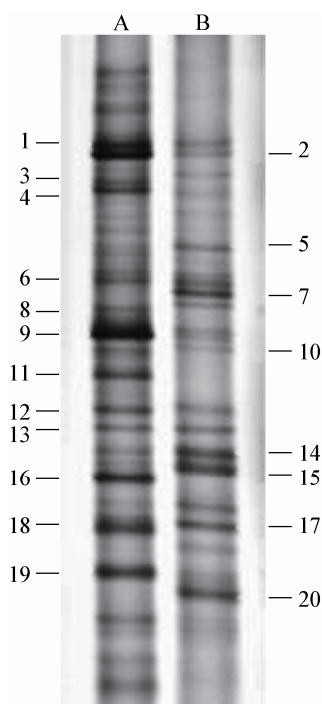


图1 窖泥细菌 16S rRNA 基因 V3 区 DGGE 图谱

Figure 1 DGGE of V3 regions of the bacterial 16S rRNA genes from pit mud samples

注：A：2 年窖泥；B：23 年窖泥。

Note: A: Pit mud at 2 years; B: Pit mud at 23 years.

(1/D)高于 23 年窖泥,分别为 28.149、25.786,这一结果与 H' 一致。对于优势度指数 Berger-Parker index (d),2 年窖泥与 23 年窖泥相差不大,分别是 0.060、0.055。这些结果表明,2 年窖泥的细菌群落结构多样性高于 23 年窖泥(表 1)。

将 DGGE 胶图的 20 条主条带切胶回收,各条带阳性克隆子测序比对结果显示:2 年窖泥细菌优

势菌群为香味菌属(*Myroides* sp.)、黄杆菌属(*Flavobacterium* sp.)、乳杆菌属(*Lactobacillus* sp.)、醋杆菌属(*Acetobacter* sp.)、豪氏变形杆菌(*Proteus hauseri*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium* sp.)、梭菌属(*Clostridium* sp.)和不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.),23 年窖泥中细菌优势菌群包括假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas* sp.)、酪丁酸梭菌(*Clostridium tyrobutyricum*)、豪氏变形杆菌(*Proteus hauseri*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、摩根氏菌属(*Morganella* sp.)和普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*),其中豪氏变形杆菌(*Proteus hauseri*)和鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium* sp.)为二者共有优势菌属;在 2、23 年窖泥中丰度相差较大的为 1、2、4、9、14、17 号条带对应菌群,即香味菌属(*Myroides* sp.)、黄杆菌属(*Flavobacterium* sp.)、乳杆菌属(*Lactobacillus* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)和普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*);3、11、19 号条带对应的不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)和醋杆菌属(*Acetobacter* sp.)只在 2 年窖泥中检出,而 5、7、15 号条带对应的假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas* sp.)、酪丁酸梭菌(*Clostridium tyrobutyricum*)和摩根氏菌属(*Morganella* sp.)只在 23 年窖泥中检出(表 2)。

2.2 高通量测序分析窖泥细菌多样性

数据统计如表 3 所示,分别从 2、23 年窖泥样品中读取 14 212、19 698 条序列,最终被利用上的有效序列数分别为 9 356 和 11 945,序列平均长度为 419 bp,OTU 的数量分别是 136 和 112,Chao 1 指数分别为 135.71 和 114.28,测序深度指数 Coverage 分别为 95.6%和 96.4%,Chao 1 和 Coverage 指数表明测序深度已基本覆盖到样品中所有物种,能反映样品中绝大多数细菌的多样性。另外,样品 Shannon 指数(5.29、4.86)和 PD whole tree 指数(8.32、6.36)均表现为 2 年窖泥高于 23 年窖泥,说明相比 23 年窖泥,2 年窖泥细菌群落有更高的物种均匀度和群落多样性,此结果与 DGGE 检测一致。

表 1 窖泥细菌 16S rRNA 基因 V3 区 DGGE 图谱多样性指数

Table 1 Diversity index in DGGE profiles of V3 regions of the bacterial 16S rRNA genes

Index	2-year	23-year
Species richness (S)	32	28
Shannon's index (H')	3.40	3.29
Simpson's index ($1/D$)	28.149	25.786
Berger-Parker index (d)	0.060	0.055

表 2 DGGE 主条带 NCBI BLAST 比对结果
Table 2 NCBI BLAST of the main bands from DGGE

条带编号 Band No.	相似菌属 Closest genera	中文名称 Chinese name	相似度 Similarity (%)	序列登录号 Accession No.
1	<i>Myroides</i> sp.	香味菌属	100	KP789061.1
2	<i>Flavobacterium</i> sp.	黄杆菌属	100	HQ446525.1
3	<i>Acinetobacter</i> sp.	不动杆菌属	100	AB860302.1
4	<i>Myroides</i> sp.	香味菌属	100	KF506840.1
5	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	假交替单胞菌属	94	JX287300.1
6	<i>Nitrospina</i> sp.	硝化刺菌属	90	JX645704.1
7	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	酪丁酸梭菌	100	KF611979.1
8	<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	耐乳酸杆菌	99	NR_044699.2
9	<i>Lactobacillus</i> sp.	乳杆菌属	100	KP012266.1
10	<i>Corynebacterium</i> sp.	棒状杆菌属	99	KF502438.1
11	<i>Acetobacter</i> sp.	醋杆菌属	100	KM005161.1
12	<i>Proteus hauseri</i>	豪氏变形杆菌	100	KM406467.1
13	<i>Sphingobacterium</i> sp.	鞘氨醇杆菌属	100	HQ663897.1
14	<i>Bacillus</i> sp.	芽孢杆菌属	100	HM566888.1
15	<i>Morganella</i> sp.	摩根氏菌属	100	KJ831422.1
16	<i>Myroides</i> sp.	香味菌属	99	KC906253.2
17	<i>Proteus vulgaris</i>	普通变形杆菌	100	KT794006.1
18	<i>Clostridium</i> sp.	梭菌属	98	DQ196622.2
19	<i>Acinetobacter</i> sp.	不动杆菌属	100	KJ831540.1
20	<i>Bacillus</i> sp.	芽孢杆菌属	99	KC589184.1

表 3 窖泥样品扩增子高通量测序数据统计
Table 3 Data statistics of amplicon sequencing of pit mud samples

Sample name	Amplicon type	Clean read	Average length	Mapped reads	OTUs	Chao 1	Shannon	PD whole tree	Coverage (%)
2-year	16S	14 212	419	9 356	136	135.71	5.29	8.32	95.6
23-year	16S	19 698	419	11 945	112	114.28	4.86	6.36	96.4

注：Clean read：质控后，样品中总的高质量数 Tag 数量；Average length：高质量 Tag 平均长度；Mapped reads：最终被利用上的序列数；OTUs：每个样品的 OTU 数量。

Note: Clean read: The number of reads after quality control; Average length: The average length of clean reads; Mapped reads: The number of reads be used to clustering analysis; OTUs: The number of OTU in sample.

2.3 高通量测序分析窖泥细菌群落结构组成

在门水平上，窖泥细菌由变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria)组成。其中，变形菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)在 2 年和 23 年窖泥中丰度相差不大，分别为 39.2%、

41.1%和 26.8%、26.7%，拟杆菌门(Bacteroidetes，32.2%、20.5%)较多存在于 2 年窖泥，而放线菌门(Actinobacteria，1.8%、11.8%)在 23 年窖泥中丰度更高(图 2A)。

科水平上统计结果如图 2B 所示，2、23 年窖泥中丰度前 10 的细菌分别占总体的 78.9%、81.8%。

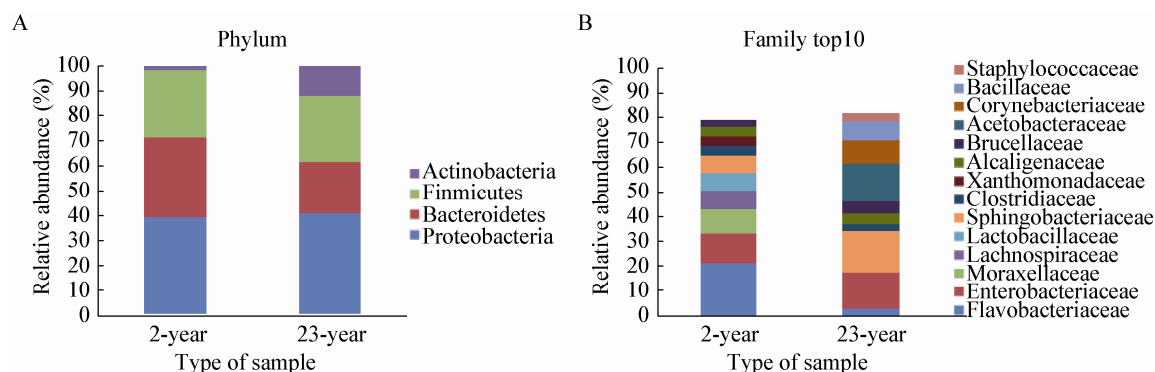


图2 不同窖泥样品门(A)、科(B)水平细菌丰度比例

Figure 2 Relative abundance of bacterial 16S rRNA genes from pit mud samples at the phylum level (A) and family level (B) identified with a modified 16S rRNA gene database

两种窖泥共有优势菌科为黄杆菌科(Flavobacteriaceae, 21.3%、3.0%)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae, 12.1%、14.7%)、鞘脂杆菌科(Sphingobacteriaceae, 6.9%、16.9%)、梭菌科(Clostridiaceae, 4.2%、2.4%)、产碱杆菌科(Alcaligenaceae, 3.4%、4.4%)和布鲁氏菌科(Brucellaceae, 2.8%、4.7%)。在2年窖泥中占优势而在23年窖泥中丰度偏低的细菌菌科为莫拉氏菌科(Moraxellaceae)、毛螺菌科(Lachnospiraceae)、乳杆菌科(Lactobacillaceae)和黄单胞菌科(Xanthomonadaceae);在23年窖泥中占优势而在2年窖泥中丰度偏低的细菌菌科为棒状杆菌科(Corynebacteriaceae)、芽孢杆菌科(Bacillaceae)和葡萄球菌科(Staphylococcaceae)(表4)。

属水平检测结果如表5所示,2年窖泥优势菌属为香味菌属(*Myroides*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、梭菌属(*Clostridium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、*Wohlfahrtiimonas*和变形杆菌属(*Proteus*)等,菌属相对丰度大于1%的占总体74.1%;23年窖泥优势菌属为鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、醋杆菌属(*Acetobacter*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、摩根氏菌属(*Morganella*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、梭菌属(*Clostridium*)、葡萄球菌属

(*Staphylococcus*)等,菌属相对丰度大于1%的占总体87.0%。其中,2年窖泥特有优势菌属为*Dysgonomonas*、*Fluviicola*、变形杆菌属(*Proteus*)和*Wohlfahrtiimonas*,23年窖泥特有优势菌属为葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、*Hazenella*、魏斯氏菌属

表4 窖泥中主要细菌菌科的相对丰度(≥2.5%)
Table 4 Relative abundance (%) of 14 major families (≥2.5%) from each pit mud sample

Taxon name	2-year (%)	23-year (%)
Flavobacteriaceae	21.3	3.0
Enterobacteriaceae	12.1	14.7
Moraxellaceae	9.7	1.0
Lachnospiraceae	7.6	1.6
Lactobacillaceae	7.1	1.8
Sphingobacteriaceae	6.9	16.9
Clostridiaceae	4.2	2.4
Xanthomonadaceae	3.8	0.0
Alcaligenaceae	3.4	4.4
Brucellaceae	2.8	4.7
Acetobacteraceae	2.5	15.3
Corynebacteriaceae	1.4	9.6
Bacillaceae	0.6	7.7
Staphylococcaceae	0.0	3.1

表 5 窖泥中主要细菌菌属的相对丰度(≥1%)
Table 5 Relative abundance (%) of 25 major genera (≥1%) from each pit mud sample

Taxon name	2-year (%)	23-year (%)
<i>Corynebacterium</i>	1.4	9.6
<i>Dysgonomonas</i>	2.1	0.0
<i>Fluviicola</i>	1.0	0.0
<i>Myroides</i>	19.8	2.0
<i>Sphingobacterium</i>	6.4	16.7
<i>Bacillus</i>	0.6	7.7
<i>Oceanobacillus</i>	0.2	1.2
<i>Staphylococcus</i>	0.0	3.1
<i>Hazenella</i>	0.0	1.2
<i>Lactobacillus</i>	7.1	1.6
<i>Weissella</i>	0.0	2.3
<i>Clostridium</i>	9.2	3.4
<i>Ochrobactrum</i>	0.9	4.2
<i>Acetobacter</i>	2.5	13.0
<i>Gluconacetobacter</i>	0.0	2.2
<i>Advenella</i>	0.1	1.7
<i>Alcaligenes</i>	2.7	2.0
<i>Comamonas</i>	1.2	0.2
<i>Enterobacter</i>	3.9	2.4
<i>Morganella</i>	0.1	8.9
<i>Proteus</i>	3.5	0.0
<i>Providencia</i>	0.4	1.6
<i>Serratia</i>	0.3	1.2
<i>Acinetobacter</i>	9.7	1.0
<i>Wohlfahrtiimonas</i>	3.6	0.0

(*Weissella*)、葡糖醋杆菌属(*Gluconacetobacter*)和摩根氏菌属(*Morganella*)。两种窖泥共有优势菌属(≥1.0%)为棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、香味菌属(*Myroides*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、梭菌属(*Clostridium*)、醋杆菌属(*Acetobacter*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)。属水平物种中有 20 种为 2 年窖泥特有, 9 种为 23 年窖泥特有, 二者共有的为 55 种(图 3)。两种窖泥菌属检出情况与 DGGE 结果基本一致。

2.4 高通量测序分析窖泥细菌群落波动情况

相对丰度在 2 年和 23 年窖泥间波动较大的菌属为香味菌属(*Myroides* , 19.8%、2.0%)、鞘氨醇杆

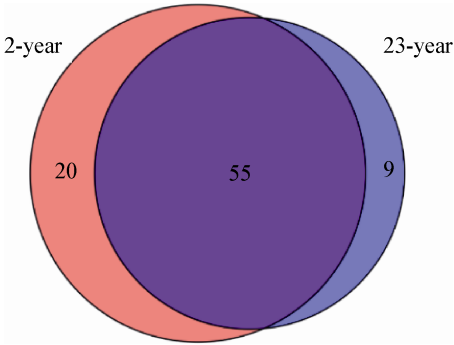


图 3 不同窖泥样品细菌属水平 Venn 图
Figure 3 Venn diagram of bacteria from different pit mud samples

菌属(*Sphingobacterium* , 6.4%、16.7%)、醋杆菌属(*Acetobacter* , 2.5%、13.0%)、不动杆菌属(*Acinetobacter* , 9.7%、1.0%)、棒状杆菌属(*Corynebacterium* , 1.4%、9.6%)、梭菌属(*Clostridium* ,9.2%、3.4%)、摩根氏菌属(*Morganella* , 0.1%、8.9%)、芽孢杆菌属(*Bacillus* , 0.6%、7.7%)、乳杆菌属(*Lactobacillus* , 7.1%、1.6%)和苍白杆菌属(*Ochrobactrum* , 0.9%、4.2%) (图 4)。此结果也与 DGGE 结果基本一致。

3 结论与讨论

经 DGGE、克隆文库和高通量测序分析, 得出棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、香味菌属(*Myroides*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、梭菌属(*Clostridium*)、醋杆菌

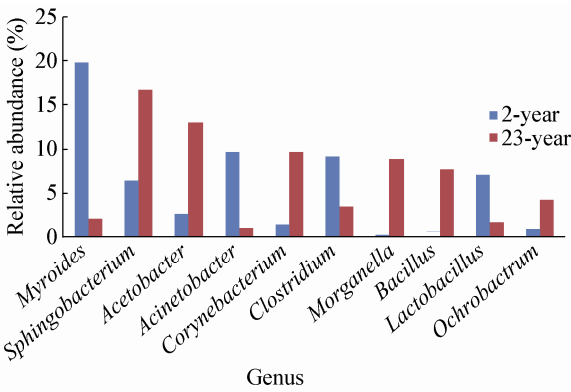


图 4 窖泥样品间丰度波动前 10 的细菌菌属
Figure 4 Top 10 fluctuations in the composition of bacteria between the pit mud samples

属(*Acetobacter*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)为白云边窖泥绝对优势菌属。此外,发现白云边2年窖泥的细菌群落多样性高于23年窖泥,与陶勇等^[7]报道窖泥微生物多样性在1–25年间随窖龄增加而升高,在25年以后保持相对稳定有所不同。究其原因,可能是白云边2年窖泥还保留部分原土壤的细菌菌群,而经过23年驯化的窖泥,在细菌菌群动态更替过程中,选择了更适应窖池酿酒环境的功能菌群,导致23年窖泥相对驯化成熟的细菌群落多样性相较2年窖泥反而偏低。

研究发现部分菌属相对丰度在2、23年窖泥中差异较大,其中鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、醋杆菌属(*Acetobacter*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、摩根氏菌属(*Morganella*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)在2种窖泥中均有检出,但在23年窖泥中的相对丰度高于2年窖泥,葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、*Hazenella*、魏斯氏菌属(*Weissella*)和葡糖醋杆菌属(*Gluconacetobacter*)为23年窖泥特有,在2年窖泥中未检出,推测这些菌属在白云边窖泥老熟过程中发挥了积极作用。此外,醋杆菌属(*Acetobacter*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)和葡糖醋杆菌属(*Gluconacetobacter*)作为产酸菌,可产生乙酸和葡糖酸,酸类物质在白酒中的比例对口感影响较大,据此推测它们和白云边酒香味形成有关。

在浓香型白酒窖泥研究中,叶光斌等^[6]、王明跃等^[19]、Guo等^[20]研究发现拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)为优势菌门;陶勇等^[7,21]利用焦磷酸测序在浓香型白酒窖泥中检测到乳杆菌属(*Lactobacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、梭菌属(*Clostridium*)和理研菌属(*Petrimonas*)为优势菌属;施思等^[2]、Ding等^[22]通过DGGE检测发现梭菌属(*Clostridium*)是浓香型白酒窖泥的优势菌属;Liang等^[23]证明浓香型白酒窖泥优势菌门包括厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)和互养菌门(Synergistetes),梭菌属

(*Clostridium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)为优势菌属。在酱香型窖泥研究中,王莉等^[24]证明梭菌科(Clostridiaceae)、瘤胃菌科(Ruminococcaceae)和热厌氧杆菌科(Thermoanaerobacteriaceae)为优势菌科;黄治国等^[25]、张倩等^[26]均认为芽孢杆菌属(*Bacillus*)在酱香型白酒酿造中起重要作用。与前人研究结果相比,本研究在浓酱兼香型白酒窖泥中检出的优势菌门——变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria),均为浓香型白酒窖泥优势菌门;部分优势菌属——乳杆菌属(*Lactobacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和梭菌属(*Clostridium*),在浓香型和酱香型白酒窖泥中均有检出,这3个菌属在3种香型白酒窖泥中均占优势,因此推测乳杆菌属(*Lactobacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和梭菌属(*Clostridium*)是白酒酿造的重要菌属。综合分析以上结果,浓酱兼香型白酒窖泥兼具部分浓香型和酱香型白酒窖泥的优势菌群,另有部分浓、酱香型白酒窖泥优势菌群在浓酱兼香型白酒窖泥中未发现,除因为不同酒厂窖泥菌群必然存在一定差异外,表明白云边酒浓酱兼香型独特酒香不是依靠两种香型白酒窖泥的功能菌简单累加混合发酵形成,应有特定菌群参与影响浓、酱两种香型风味物质融合及浓酱兼香型独特风味物质形成。棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、香味菌属(*Myroides*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、醋杆菌属(*Acetobacter*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)在浓香型和酱香型白酒窖泥中鲜有报道,它们作为白云边窖泥特有优势菌属,可能对白云边酒独特浓酱兼香型酒香形成有重要贡献。

在窖泥细菌群落结构研究中,DGGE与高通量测序检测结果基本一致。两种检测方法各有优势,DGGE检测结果显示直观、操作方便,但DGGE无法检测基因组中DNA含量少于1.5%的种群^[12],所以它反映的是样品中的优势菌群,部分低丰度菌种未能检出,而高通量测序能提供更多关于低丰度细菌类群

的信息, 能更全面系统地反映窖泥细菌群落组成。

本研究对白云边两种窖龄窖泥的细菌群落组成进行探究和比较, 揭示了可能在白云边酒酿造中起关键作用的菌群, 在分子水平上为研究白云边酒浓酱兼香型独特风味形成机理提供依据。今后可通过纯培养从窖泥中获得相关菌株, 研究其生理特性, 以期揭示白云边窖泥的具体功能菌, 进一步为白云边酒生产和酒质改善提供理论依据。

参考文献

- [1] Xiong XM. Summary of the production techniques of Maotai-Luzhou-flavor Baiyubian liquor[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2007(9): 35-38 (in Chinese)
熊小毛. 浓酱兼香型白云边酒生产工艺技术总结[J]. 酿酒科技, 2007(9): 35-38
- [2] Shi S, Wang HY, Zhang WX, et al. Analysis of microbial communities characteristics in different pit mud of Luzhou-flavor liquor[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2011(5): 38-41 (in Chinese)
施思, 王海英, 张文学, 等. 浓香型白酒不同窖泥的微生物群落特征分析[J]. 酿酒科技, 2011(5): 38-41
- [3] Deng B, Shen CH, Shan XH, et al. PCR-DGGE analysis on microbial communities in pit mud of cellars used for different periods of time[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2012, 118(1): 120-126
- [4] Tang YR, Zhong FD, Zhang WX. Analysis of the diversity and system development of bacterial flora in Luzhou-flavor Xijiu pit mud[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2011(12): 24-28 (in Chinese)
唐云容, 钟方达, 张文学. 浓香习酒窖泥微生物菌群多样性及系统发育分析[J]. 酿酒科技, 2011(12): 24-28
- [5] Hu XL, Wang HY, Wu Q, et al. Development, validation and application of specific primers for analyzing the *Clostridial* diversity in dark fermentation pit mud by PCR-DGGE[J]. Bioresource Technology, 2014, 163(7): 40-47
- [6] Ye GB, Luo HB, Yang XD, et al. Community structure of prokaryotes in pit mud of Lu-flavor liquor from Luzhou prefecture based on culture-independent approach[J]. Food Science, 2013, 34(17): 177-181 (in Chinese)
叶光斌, 罗惠波, 杨晓东, 等. 基于免培养法研究泸州地区浓香型白酒窖泥原核微生物群落结构[J]. 食品科学, 2013, 34(17): 177-181
- [7] Tao Y, Rui JP, Li JB, et al. Microbial community compositions and diversity in pit mud of Chinese Luzhou-flavor liquor[J]. CIESC Journal, 2014, 65(5): 1800-1806 (in Chinese)
陶勇, 芮俊鹏, 李家宝, 等. 浓香型白酒窖泥中细菌和古菌的组成与多样性[J]. 化工学报, 2014, 65(5): 1800-1806
- [8] Nam YD, Lee SY, Lim SI. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 115(1/2): 36-42
- [9] Zhao M, Zhang DL, Su XQ, et al. An integrated Metagenomics/Metaproteomics investigation of the microbial communities and enzymes in solid-state fermentation of Pu-erh tea[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 10117
- [10] Lauber CL, Hamady M, Knight R, et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(15): 5111-5120
- [11] Ferrenberg S, O'Neill SP, Knelman JE, et al. Changes in assembly processes in soil bacterial communities following a wildfire disturbance[J]. The ISME Journal, 2013, 7(6): 1102-1111
- [12] Serkebaeva YM, Kim Y, Liesack W, et al. Pyrosequencing-based assessment of the bacteria diversity in surface and subsurface peat layers of a northern wetland, with focus on poorly studied phyla and candidate divisions[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63994
- [13] Huber JA, Mark Welch DB, Morrison HG, et al. Microbial population structures in the deep marine biosphere[J]. Science, 2007, 318(5847): 97-100
- [14] Rui JP, Li JJ, Li JB, et al. Prokaryotic community structures in biogas plants with swine manure[J]. CIESC Journal, 2014, 65(5): 1869-1874 (in Chinese)
芮俊鹏, 李吉进, 李家宝, 等. 猪粪原料沼气工程系统中的原核微生物群落结构[J]. 化工学报, 2014, 65(5): 1869-1874
- [15] Stolze Y, Zakrzewski M, Maus I, et al. Comparative metagenomics of biogas-producing microbial communities from production-scale biogas plants operating under wet or dry fermentation conditions[J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8: 14
- [16] Edgar RC. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998
- [17] McDonald D, Price MN, Goodrich J, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea[J]. The ISME Journal, 2012, 6(3): 610-618
- [18] Kemp PF, Aller JY. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(2): 161-177
- [19] Wang MY, Zhang WX. Analysis of microbial community structure in pit mud from two Chinese Luzhou-flavor liquor producing areas[J]. Microbiology China, 2014, 41(8): 1498-1506 (in Chinese)
王明跃, 张文学. 浓香型白酒两个产区窖泥微生物群落结构分析[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1498-1506
- [20] Guo MY, Huo DQ, Chai R, et al. Metagenomics of ancient fermentation pits used for the production of Chinese Strong-aroma liquor[J]. Genome Announcements, 2014, 2(5): e01045-14
- [21] Tao Y, Li JB, Rui JP, et al. Prokaryotic communities in pit mud from different-aged cellars used for the production of Chinese strong-flavored liquor[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(7): 2254-2260
- [22] Ding XF, Wu CD, Zhang LQ, et al. Characterization of eubacterial and archaeal community diversity in the pit mud of Chinese Luzhou-flavor liquor by nested PCR-DGGE[J]. World Journal Microbiology Biotechnology, 2014, 30(2): 605-612
- [23] Liang HP, Li WF, Luo QC, et al. Analysis of the bacterial community in aged and aging pit mud of Chinese Luzhou-flavour liquor by combined PCR-DGGE and quantitative PCR assay[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 95(13): 2729-2735
- [24] Wang L, Wang YY, Wang HY, et al. Microbial composition of bottom pit mud in Jiangxiang Baijiu (liquor) pit[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2015(1): 12-15 (in Chinese)
王莉, 王亚玉, 王和玉, 等. 酱香型白酒窖底泥微生物组成分析[J]. 酿酒科技, 2015(1): 12-15
- [25] Huang ZG, Deng J, Wei CH, et al. Separation and identification of bacteria strains from fermented grains of Jiang-xiang liquor[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2014(6): 27-29 (in Chinese)
黄治国, 邓杰, 卫春会, 等. 酱香型白酒酒醅细菌的分离鉴定[J]. 酿酒科技, 2014(6): 27-29
- [26] Zhang Q, Zhao H, Zhang MY, et al. Separation of bacteria strains related to producing Jiangxiang-flavor and its roles in the accumulation of fermented grains[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2014(7): 54-56 (in Chinese)
张倩, 赵华, 张美艳, 等. 与产酱香有关细菌的分离及在酒醅堆积中的作用[J]. 酿酒科技, 2014(7): 54-56