

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

叶光斌^{1,2}, 罗惠波^{1,2}, 杨晓东¹, 李丹宇¹, 王毅¹, 倪斌³

(1.四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000; 2.酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 自贡 643000;

3.泸州老窖股份有限公司, 四川 泸州 646000)

摘要: 通过构建细菌和古菌的16S rRNA基因克隆文库、测序及系统发育树分析, 确定浓香型白酒成熟窖泥中细菌和古菌的群落组成。结果表明: 窖泥中的细菌多样性丰富, 多达34个OTUs。主要分布于14科以及2个科级分类地位未知的梭菌纲和拟杆菌纲类群内, 且大多属于严格厌氧细菌。其中梭菌纲为窖泥内细菌群落的绝对优势种群(克隆子数比例为68.2%), 除此之外还存在一定比例的芽孢杆菌纲(21.6%)、拟杆菌门(8.0%)、柔膜菌门(1.1%)和Synergistetes门(1.1%)的分布。古菌的群落组成较为简单, 仅4个OTUs, 主要分布于甲烷囊菌属、甲烷八叠球菌属、甲烷杆菌属和*Methanomassiliicoccus*内, 克隆子数的比例分别为58.8%、29.4%、5.9%和5.9%。

关键词: 浓香型白酒; 窖泥; 免培养法; 细菌; 古菌; 16S rRNA基因; 克隆文库

Community Structure of Prokaryotes in Pit Mud of Lu-Flavor Liquor from Luzhou Prefecture Based on Culture-independent Approach

YE Guang-bin^{1,2}, LUO Hui-bo^{1,2}, YANG Xiao-dong¹, LI Dan-yu¹, WANG Yi¹, NI Bin³

(1. College of Bioengineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong 643000, China;

2. Liquor-making Biological Technology and Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong 643000, China;

3. Luzhou Laojiao Co. Ltd., Luzhou 646000, China)

Abstract: The community compositions of bacteria and archaea in mature pit mud of Lu-flavor liquor were detected through establishing 16S rRNA gene clone library of bacteria and archaea, sequencing and analyzing phylogenetic tree. Data analysis showed that the biodiversity of bacteria in pit mud was quite rich, reaching 34 OTUs, which were mainly distributed in 14 families and 2 unidentified families of *Clostridia* and *Bacteroidia*. And also, most of them were restricted anaerobes. Among them, *Clostridia* strains were absolutely dominant in the bacterial community of pit mud, and its ratio of clone number was 68.2%. In addition, there was appropriate distribution for *Bacilli* (21.6%), *Bacteroidetes* (8.0%), *Tenericutes* (1.1%) and *Synergistetes* (1.1%). Archaeal community composition was quite simple, and only 4 OTUs were detected and mainly distributed in *Methanoculleus*, *Methanosarcina*, *Methanobacterium* and *Methanomassiliicoccus* with clone distribution ratios of 58.8%, 29.4%, 5.9% and 5.9%, respectively.

Key words: Lu-flavor liquor; pit mud; culture-independent approach; bacteria; archaea; 16S rRNA gene; clone library
中图分类号: Q938.1 文献标志码: A 文章编号: 1002-6630(2013)17-0176-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201317038

所谓“千年窖, 万年糟”, 窖泥在浓香型白酒发酵过程中具有重要的作用, 它们是窖泥功能菌生长繁殖的载体, 也是浓香型白酒呈香呈味物质生成的主要场所。因此研究浓香型白酒窖泥微生物的菌群组成和动态变化, 对于进一步分离和开发应用窖泥微生物资源、弄清窖泥微生物与白酒发酵之间的关系具有重要的意义。目

前, 大多数学者主要还是采用传统的微生物培养结合分子生物学手段, 从可培养的角度对针对不同窖龄、不同地域的窖泥中可培养微生物的数量、群落组成及动态变化进行了较为系统的研究^[1-2], 并且分离、鉴定很多以前未报道的窖泥微生物^[3-6]。

然而, 由于窖泥中可分离培养的微生物仅占窖泥微

收稿日期: 2012-08-07

基金项目: 泸州老窖奖学金项目(091jzk06); 四川理工学院人才引进项目(2010XJKRL001); 四川省教育厅重大培育项目(09ZZ015); 四川省教育厅重点项目(12ZA099)

作者简介: 叶光斌(1980—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为白酒微生物生态学。E-mail: guangbin1980@126.com

生物的极少数,因此采用传统分离培养方法难以全面的反映窖泥生态系统的微生物的群落组成及演替规律。近年来,随着微生物生态学的发展,分子生物学技术越来越多的应用于窖泥微生物群落结构和动态变化规律的研究。罗惠波^[7]、黄治国^[8]等通过PCR-SSCP结合聚类分析技术比较泸州老窖不同窖龄的窖泥中的细菌和古菌的群落差异。Deng Bo^[9]、陶勇^[10]、施思^[11]等通过PCR-DGGE结合聚类分析技术分别比较了泸州老窖、剑南春、水井坊不同窖龄窖泥中的细菌群落差异。邓依等^[12]通过细菌rDNA ITS-AFLP结合聚类分析技术比较了多粮发酵新老窖池间的细菌群落差异。唐云容等^[13]通过PCR-DGGE技术对习酒单粮和多粮发酵窖泥中细菌和古菌的群落结构进行比较研究并对部分条带进行测序分析。总体而言,目前对于窖泥微生物生态学的研究主要还是集中在不同类型窖泥间的聚类比较,缺乏对窖泥微生物具体群落组成的系统报道和比较研究。王涛等^[14]最近结合传统培养手段和细菌16S rRNA基因文库法对宜宾地区多家白酒企业成熟窖泥进行了较为系统的研究,报道了很多新的窖泥微生物。

泸州老窖是浓香型白酒的典型代表,对于泸州老窖窖泥微生物的系统研究有利于正确认识浓香型白酒的发酵机理,为进一步分离、开发和应用窖泥微生物资源提供前期科学调查信息。本研究通过16S rRNA基因克隆文库技术,结合测序和系统发育树分析,较为系统研究泸州老窖成熟窖泥中原核微生物的群落结构。

1 材料与方法

1.1 样品采集与DNA提取

窖泥样品采集自泸州老窖100年左右窖龄窖池(泉记作坊、清末)的底部,采用左上、左下、右上、右下以及中部5点取样混合后提取总DNA。DNA提取采用改良的Zhou等^[15]的DNA提取方法提取窖泥DNA。简要的提取步骤如下:1)无菌条件下称取1~1.5g窖泥置于灭菌的5mL离心管内,加入1.35mL DNA抽提缓冲液(100mmol/L Tris-HCl、100mmol/L EDTA-Na、100mmol/L磷酸钠缓冲液、1.5mol/L NaCl、1% CTAB,调至pH 8.0)重悬,放置于37℃摇床中225r/min水平振荡30min;2)加入300μL 10% SDS在65℃温浴15min,之后将离心管置于-80℃超低温冰箱放置15min,再将离心管转移到65℃水浴锅放置15min,如此重复3次,以促进细胞破裂;3)4℃、6000×g离心10min,上清转移到新的5mL离心管中;4)加等体积酚-氯仿-异丙醇(25:24:1, V/V),剧烈振荡5min,静置10min后,13000×g离心20min;5)将上层水相移入新的离心管,加入0.6倍体积异丙醇,于室温沉淀1h;6)室温,13000×g离心20min,弃上清;7)用枪

吸除残余的异丙醇液体,加入1000μL 70%乙醇,并转移至2mL离心管内,静置10min,4℃、13000r/min离心15min;8)重复以上1次;9)弃上清,用枪吸除残余的乙醇液体,置于超净台吹风10min,除尽乙醇,直到不能闻到乙醇气味。10)加入50~100μL无菌水,放置到65℃水浴锅水浴1h,促进DNA的溶解。粗提的窖泥DNA通过PCR产物纯化试剂盒(Omega公司)纯化,纯化后的窖泥DNA PCR扩增效果良好。

1.2 细菌16S rRNA基因克隆文库的构建与测序

引物对Eub27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') / Eub1492r (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3') 和Arch21F (5'-TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA-3') / Arch958R (5'-YCC GGC GTT GAM TCC AAT T-3')分别用于细菌和古菌16S rRNA基因的扩增^[16]。PCR扩增条件为:94℃变性4min,接下来30个循环,分别是94℃变性45s,55℃退火45s,72℃延伸60s,最后一个循环72℃延伸10min。为了防止PCR偏差,混合3次重复的PCR产物,通过胶回收柱(Omega公司)回收纯化,纯化后的PCR产物连接到pMD-18T载体 (TaKaRa公司)上,再转化到大肠杆菌DH5α化学感受态细胞内,涂布于LA平板(加有100ng/mL氨苄青霉素的LB培养基);37℃培养16h后,用灭菌的牙签随机挑选克隆子划线于新的LA平板上。再通过菌落PCR确定阳性克隆子,引物对UP I (5'-GGA AAC AGC TAA GAC CAT G-3')/UP II (5'-TTG GGT AAC GCC AGG GT-3')用于菌落PCR扩增,扩增程序同上。分别随机挑取88个细菌阳性克隆子和34个古菌阳性克隆子送往上海杰李生物技术有限公司进行测序,将测序结果通过DNAMAN软件进行比对,统计相同或相似序列的数目。

1.3 克隆文库的统计分析及系统发育树的构建

通过Bellerophon软件在线去除嵌合体序列(<http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>)。对于16S rRNA基因序列,采用序列相似性大于等于97%,定义为同一OTU (operational taxonomic units, 运算的分类单位)^[17]。每个OTU选取1个代表克隆子序列与NCBI(美国国立生物信息中心)数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)和Eztaxon-e数据库(<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)进行比对,查找近似微生物或环境克隆子分类信息和序列信息。选取各OTU代表克隆子及网上数据库比对的近似序列构建系统发育树,通过Clustal X (Version 1.87)软件对齐序列,再通过Mega 4软件构建系统发育树。用于建树的34个细菌克隆子和4个古菌克隆子的16S rRNA基因序列已上传至NCBI的GenBank数据库,GenBank序列号为JX456418~JX456455。

采用文库覆盖率法、Shannon-Wiener指数法、Simpson指数法、Buzas-Gibson均一度指数法和稀释曲

线法(Rarefraction Curve)对所建文库进行评估^[18], 其中Shannon-Wiener多样性指数、Simpson多样性指数和Buzas-Gibson均一度指数和稀释曲线通过PAST软件(<http://folk.uio.no/ohammer/past/>)计算获得^[18]。稀释曲线通过软件SigmaPlot11.0软件绘制。

2 结果与分析

2.1 克隆文库的评估

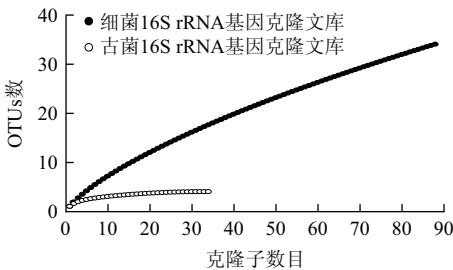


图1 窖泥细菌和古菌16S rRNA 基因克隆文库的稀释曲线

Fig.1 Dilution curves of bacterial and archaeal 16S rRNA gene clone library of pit mud

表1 窖泥细菌和古菌16S rRNA基因克隆文库物种多样性和丰富度评估
Table 1 Evaluation of biodiversity and bio-richness in bacterial and archaeal 16S rRNA gene clone library of pit mud

文库类型	文库覆盖率/%	Shannon-Wiener指数	Simpson指数(1-D)	Buzas-Gibson均一度指数
细菌16S rRNA基因	61.4	2.83	0.88	0.50
古菌16S rRNA基因	88.2	1.00	0.56	0.68

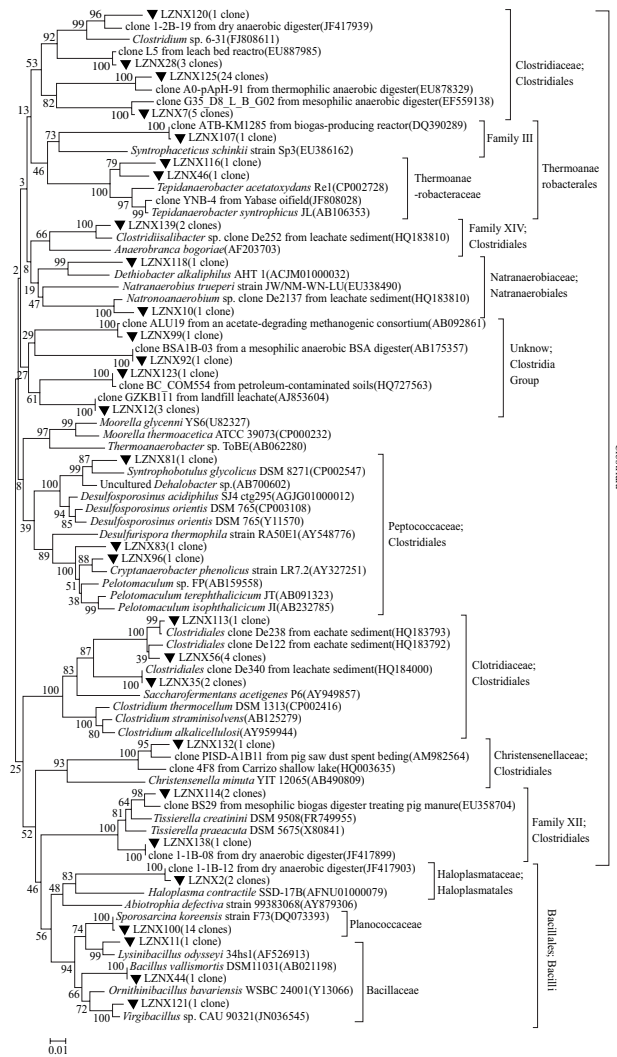
细菌16S rRNA基因克隆文库的测序结果表明, 细菌各克隆子序列间差异较大, 物种多样性丰富, 在所分析的88个阳性克隆子中, 同源性小于97%的克隆子达到34类(即34个OTUs)。古菌16S rRNA基因克隆文库的测序结果表明窖泥内古菌群落较为单一, 在所分析的34个阳性克隆子中, 同源性小于97%的克隆子仅有4类(即4个OTUs)。从图1稀释曲线可以看出, 细菌16S rRNA基因克隆文库未达到饱和, 而古菌16S rRNA基因克隆文库已趋于饱和。这与细菌和古菌的文库覆盖率(分别为61.4%和88.2%)的分析结果较为一致(表1), 说明所建的克隆文库能够覆盖窖泥中大多数的细菌和古菌类群。一般Shannon-Wiener指数越高, 则表示文库所含克隆子多样性越高; Simpson指数(1-D)越接近1, 则表示文库所含克隆子多样性越高; Buzas-Gibson均一度指数越接近1, 则表示文库中克隆子分布越平均^[18]。从表1的Shannon-Wiener多样性指数, Simpson多样性指数的分析可以看出窖泥内细菌群落物种多样性远高于古菌群落, 表明窖泥内细菌微生物多样性丰富。Buzas-Gibson均一度指数的分析表明窖泥内细菌和古菌群落分布均不均一。尽管本实验未能完整获得窖泥内细菌微生物所有的种群组成的信

息, 事实上环境样品16S rRNA基因克隆文库很难达到饱和^[19-21], 本数据基本反映了窖泥内主要细菌和古菌的群落组成, 具有重要的参考价值。

2.2 细菌群落结构的分析

分别选择细菌16S rRNA基因文库内的代表克隆子序列与数据库进行比对。比对结果表明克隆子与数据库内参比序列间相似度较高, 达到93%~100%, 它们大多数与土壤、堆肥、厌氧生物反应器等环境中的不可培养微生物或可培养微生物相关, 但未见白酒窖泥来源的相关序列。由于分析的序列较多, 本实验对细菌16S rRNA基因文库内的厚壁菌门和非厚壁菌门克隆子分别构建了系统发育树(图2、3)。通过分析系统发育树, 可以很直观的看出窖泥内细菌群落主要分布于4门5纲7目14科以及2个科级分类地位未知的梭菌纲和拟杆菌纲类群内。厚壁菌门(Firmicutes)为窖泥细菌群落的主要类群, 克隆子分布比例达89.8%, 物种丰富度达28 OTUs; 主要分布于梭菌纲(Clostridia)的梭菌目、Negativicutes目、嗜热厌氧菌目(Thermoanaerobacterales)和科级分类地位未知的梭菌纲以及芽孢杆菌纲(Bacilli)内, 梭菌纲和芽孢杆菌纲克隆子的分布比例分别占68.2%和21.6%。拟杆菌门(Bacteroidetes)占8% (4 OTUs), 主要分布于拟杆菌目及科级分类地位未知的拟杆菌纲内。柔膜菌门(Tenericutes)和Synergistetes门分布极少, 各自仅有1有克隆子的分布, 分别占1.1%。

文库内共有16个类型的克隆子与可培养微生物同源性较高, 序列相似度达到93%~99%。在厚壁菌门系统发育树内, 其中芽孢杆菌纲内的克隆子除了LZNX2外, 其余克隆子LZNX44、LZNX100、LZNX121和LZNX11均与可培养微生物近似(达97%~99%), 它们分别与芽孢杆菌属(*Bacillus*)、芽孢八叠球菌属(*Sporosarcina*)、枝芽孢杆菌属(*Virgibacillus*)和*Lysinibacillus*属的可培养微生物近似。它们均为好氧微生物, 且大多能够产生孢子, 具有较强的抗逆性。梭菌纲内的克隆子大多与环境来源的克隆子相关, 难以确定其可能的生态学功能; 但有8类克隆子与可培养微生物具有较近的亲缘关系。其中LZNX120与*Clostridium* sp. 6-31; LZNX46、LZNX116和*Tepidanaerobacter syntrophicus* JL(T)、*Tepidanaerobacter acetatoxydans* Re1; LZNX118与*Dethiobacter alkaliphilus* AHT 1(T); LZNX81与*Syntrophobotulus glycolicus* DSM 8271(T); LZNX83、LZNX96与*Pelotomaculum isophthalicicum* JI(T)、*Cryptanaerobacter phenolicus* LR7.2(T); LZNX114、LZNX138与*Tissierella creatinini* DSM 9508(T)等可培养微生物相关。在非厚壁菌门系统发育树内, 可以看出克隆子LZNX57、LZNX16和LZNX129分别与*Paludibacter propionigenes* WB4(T)、*Proteiniphilum acetatigenes* TB107(T)、*Aminobacterium mobile* ILE-3(T)等可培养微生物相关。



系统发育树采用Mega 4软件的邻接法(Neighbor-Joining)构建获得, 图中带有“▼”标记的为本次研究获得的克隆子序列。图3、4同。

图2 基于厚壁菌门克隆子序列构建的细菌16S rRNA基因系统发育树
Fig.2 Phylogenetic tree of bacterial 16S rRNA genes based on the sequences of *Firmicutes* clones

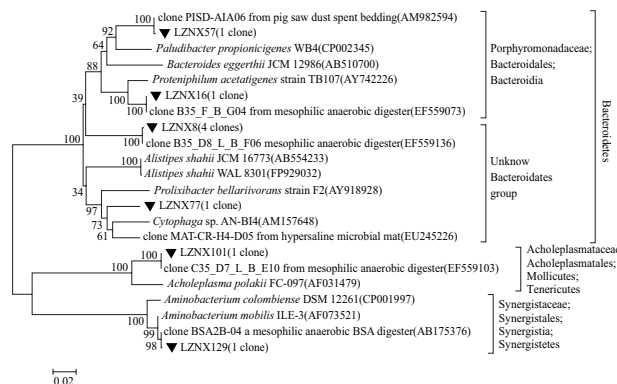


图3 基于其他菌门克隆子序列构建的细菌16S rRNA基因系统发育树
Fig.3 Phylogenetic tree of bacterial 16S rRNA genes based on the sequences of other bacterial phylum clones

通过分析以上可培养微生物的特性, 发现它们

全部为严格厌氧菌, 表明在窖泥内存在较为丰富的严格厌氧的微生物类群。其中梭菌属是最早报道的产己酸细菌, 该菌不仅产己酸, 在厌氧条件下还能产丁酸、乙酸等小分子有机酸^[14]; 此外, 有报道^[22-25]表明*Tepidanaerobacter* sp.、*Syntrophobotulus* sp.、*Pelotomaculum* sp.、*Aminobacterium* sp.等与甲烷菌存在共生关系。*Tepidanaerobacter syntrophicus* JL(T)能够利用葡萄糖、木糖、果糖、甘露糖、蔗糖、淀粉、果胶等大分子碳水化合物, 纯培养下不能利用乳酸、乙酸、丁酸、乙醇、丙醇、丁醇、甘油等小分子碳水化合物; 但是当存在利用氢的产甲烷古菌时, 能够利用乙醇、甘油和乳酸^[22]。表明该类微生物可能在白酒发酵过程中发挥重要的功能, 既可以利用糟醅内的淀粉、葡萄糖等大分子碳水化合物也可以利用乙醇、乳酸等生成次生代谢产物。*Syntrophobotulus glycolicus* DSM 8271(T)能够利用来自化能自养菌产生的乙醛酸作为底物, 将其分解成二氧化碳、氢气和乙醇酸。当其与甲烷菌或同型产乙酸细菌如*Methanospirillum hungatei*或*Acetobacterium woodii*共培养时, 只产生二氧化碳和氢气^[23]。*Aminobacterium mobile* ILE-3(T)是一株氨基酸降解菌, 它在与*Methanobacterium formicicum*共培养条件下, 能够降解部分氨基酸和丙酮酸, 但不能利用琥珀酸、乳酸、乙醇、葡萄糖、蔗糖等有机酸和糖^[25]。除此之外, 窖泥内的严格厌氧菌还包括*Paludibacter propionigenes*和*Proteiniphilum acetatigenes*; *Paludibacter propionigenes* WB4(T)是一株化能自养菌, 能够分解葡萄糖成2分子的丙酸和1分子的乙酸, 并产生少量琥珀酸, 不能利用乙醇作为碳源^[26]。*Proteiniphilum acetatigenes* TB107(T)是一株蛋白质降解菌, 在酵母膏-蛋白胨培养基的主要发酵产物为乙酸和丙酸^[27]。以上这些微生物的存在可能正是浓香型白酒香味物质的来源与基础。

王涛等^[14]通过传统培养结合免培养法对于宜宾地区窖泥中的细菌类群做了较为系统的研究, 与其研究结果相同的是: 本实验均报道了浓香型白酒窖泥内的主要优势种群是梭菌纲、芽孢杆菌纲和拟杆菌门。所不同的是本研究中还发现了柔膜菌门和Synergistetes门在泸州老窖窖泥内的少量分布; 此外在芽孢杆菌纲的分布上, 除了芽孢杆菌属和*Lysinibacillus*外, 还发现了枝芽孢杆菌的存在, 并且发现在泸州老窖窖泥内存在较高比例的芽孢八叠球菌的存在。并未发现王涛等^[14]所报道的放线菌、变形杆菌、异常球菌纲和浮霉菌门的分布。此外本研究也未发现目前已报道的可培养的窖泥微生物类群如丝状菌属如查氏生丝微菌(*Hyphomicrobium zavarziaii*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*), 如玉米乳杆菌(*L. zeae*)、戊糖乳杆菌(*L. pentosus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、片球菌属(乳酸片球菌、酒窖片球菌和耐乙醇片球菌)和放线菌

等的存在^[3-4,14]。造成以上差异的原因可能在于：一是由于所分析的样品不同所导致微生物群落组成存在差异；另一可能是由于所建文库未分析足够多的克隆子，导致相关类群的缺失。

2.3 古菌群落结构的分析

分别选取古菌16S rRNA基因文库内4个代表克隆子序列与NCBI GenBank和EzTaxon数据库中的序列进行比对。由图4比对结果表明克隆子序列与参比序列间相似度较高，分别为96%~99%，且它们全部与可培养甲烷菌相关。同时可以很直观的看出窖泥内古菌群落全部分布于广古菌门(Euryarchaeota)甲烷微菌纲(Methanomicrobia)甲烷微菌目(Methanomicrobiales)下的4个科内(甲烷八叠球菌科(Methanosarcinaceae)、甲烷微菌科(Methanomicrobiaceae)和甲烷杆菌科(Methanobacteriaceae)以及甲烷微菌目内1个科级分类地位未知的科。克隆子LZNG8和LZNG7为主要的古菌类群，分别占克隆子数的58.8%和29.4%；而LZNG27和LZNG25含量较少，克隆子比例均为5.9%。其中克隆子LZNG8与甲烷囊菌属的*Methanoculleus palmolei* DSM 4273(T)同源性最高，达到99%。LZNG7与甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)内的多株可培养菌株相关，序列相似度分别为95%~98%。LZNG27与甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)相关，序列相似度为96%。LZNG25与*Methanomassiliicoccus luminyensis* B10相关，序列相似度为96%。表明窖泥内主要的古菌类群为甲烷囊菌和甲烷八叠球菌。

甲烷菌在自然界分布广泛，大多分布于含氧量极低或无氧的环境，如海底沉积物、河湖淤泥、沼泽地、水稻田、人和动物的肠道、反刍动物瘤胃等。它们严格厌氧，能够利用氢气和二氧化碳生成甲烷，如果需要降解有机化合物如脂肪酸、芳香族化合物、醇类时，通常需要与各种不同营养型的细菌共生才能完成^[22]。本研究也发现存在很多与甲烷菌共生的细菌类群如*Tepidanaerobacter* sp.、*Syntrophobotulus* sp.、*Pelotomaculum* sp.、*Aminobacterium* sp.等的存在。Joulia等^[28]在对土壤内甲烷菌数量的研究表明，当以甲醇或乙酸作为唯一底物时，球状菌(*Methanosarcina*-like)为主要甲烷菌类群；当以甲醇或氢气作为唯一底物时，杆状菌为主要甲烷菌类群。而窖泥环境由于存在一定量的甲醇、乙酸，因此本研究也证实了这一观点，古菌的分布结果表明*Methanosarcina*具有较高比例的分布，而*Methanobacterium*分布较少。此外，甲烷菌在利用其他非二氧化碳底物时，代谢较为复杂。例如*Methanoculleus palmolei* DSM 4273(T)能在氢气、二氧化碳培养基；甲酸、2-丙醇和二氧化碳培养基；2-丁醇、二氧化碳培养基以及环戊酸、二氧化碳培养基上生长。但是在乙酸、甲醇、乙醇、1-丙醇、2-戊醇、2,3-丁醇、二甲胺、乳酸存

在时，不产甲烷^[29]。*Methanobacterium congolense* C(T)在二氧化碳和氢气作为唯一底物时既可以生长也可以产甲烷；但是在以二氧化碳和其他底物如2-丙醇、2-丁醇、环戊醇时，该菌产甲烷但不生长^[30]。*Methanomassiliicoccus luminyensis* B10只有在甲醇或氢作为唯一底物时产甲烷。而在甲酸、乙酸、三甲胺、2-丁醇、2-丙醇、环戊醇、2-戊醇、乙醇、1-丙醇或2,3-丁二醇等底物条件下，不产甲烷^[31]。窖泥环境存在大量的白酒发酵的次生代谢产物，如甲醇、乙醇、乙酸、1-丙醇、丁醇等，因此甲烷菌与相关细菌在窖池内如何相互协作利用白酒窖池内的酸、醇、酯、蛋白质等有机物质，以及其是否产甲烷等情况，有待更进一步的研究。

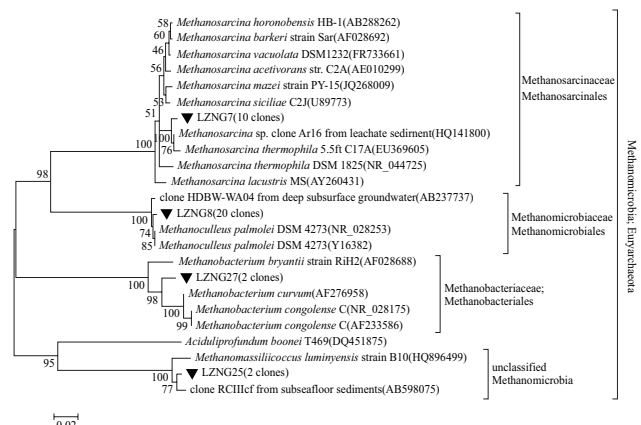


图4 基于古菌克隆子构建的古菌16S rRNA基因系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of archaeal 16S rRNA genes based on the sequences of archaeal clones

3 结论与讨论

通过分别构建细菌和古菌16S rRNA基因克隆文库、测序和系统发育树分析，较为系统的研究了泸州老窖成熟窖泥的原核微生物群落结构，研究结果表明：窖泥内细菌种群丰富，其中梭菌纲为窖泥内细菌群落的绝对优势种群，除此之外还存在一定比例的芽孢杆菌纲、拟杆菌门、柔膜菌门和Synergistetes的分布。古菌的群落组成较为简单，主要分布于甲烷杆菌属、甲烷八叠球菌属、甲烷囊菌属和*Methanomassiliicoccus*属内，其中甲烷囊菌和甲烷八叠球菌为优势种群。此外首次报道了在泸州老窖窖泥内可能存在与甲烷菌共生的严格厌氧的梭菌纲类群的存在。

后期的工作应集中在如下几点：1)针对本研究报道的微生物类群，设计相关培养基，进行分离、培养、代谢性质的研究，确定其在白酒固态发酵过程中的作用；2)通过窖泥间隙水中甲烷含量的检测以及FISH等技术进一步验证窖泥内是否存在甲烷以及甲烷菌和其他细菌

是否存在共生关系; 3)有必要将不同地区、不同窖龄窖泥微生物进行比较研究, 确定其地区差异以及窖泥老熟过程中菌群动态变化规律; 4)窖池作为一个封闭循环体系, 大曲、糟醅、窖泥内的微生物在白酒发酵过程必然存在一定的群落演替, 有必要通过比较研究确定不同微生物在曲、醅、泥的分布规律以及相互作用关系。

参考文献:

- [1] 汪江波, 万联, 李莉, 等. 稻花香窖泥微生物群落变化研究[J]. 酿酒科技, 2010(11): 36-39.
- [2] 易彬, 任道群, 唐玉明, 等. 不同窖龄窖泥微生态变化研究[J]. 酿酒科技, 2011(6): 32-34.
- [3] 王岩, 吴衍庸. 浓香型酒窖中生丝微菌的分离与特性[J]. 微生物学通报, 1991, 18(2): 75-78.
- [4] 刘莉萌, 张斌, 东秀珠. 浓香型白酒窖池中片球菌的分离与鉴定[J]. 酿酒科技, 2007(2): 22-25.
- [5] 王儒鲜, 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.
- [6] 张霞, 武志芳, 张胜潮, 等. 贵州浓香型白酒窖池可培养细菌系统发育分析[J]. 酿酒科技, 2010(12): 23-27.
- [7] 罗惠波, 甄攀, 黄治国. 浓香型白酒窖池细菌群落[J]. 微生物学通报, 2010, 37(11): 1621-1627.
- [8] 黄治国, 甄攀, 罗惠波. 浓香型白酒窖池古菌群落研究[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2010, 32(12): 91-96.
- [9] DENG Bo, SHEN Caihong, SHAN Xiaohu, 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.
- [10] 陶勇, 徐占成, 李东迅, 等. 窖泥细菌群落结构演替及其与环境因子的相关性[J]. 酿酒科技, 2011(9): 42-46.
- [11] 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.
- [12] 邓依, 唐云容, 张文学. 16S-23S rRNA ITS-AFLP指纹图谱分析在白酒窖泥原核微生物多样性分析中的应用[J]. 酿酒科技, 2010(3): 46-48.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] ZHOU J Z, BRUNS M A, TIEDJE J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 316-322.
- [16] DELONG E F. Archaea in coastal marine environments[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(12): 5685-5689.
- [17] McCaig A E, Glover L A, Prosser J I. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65: 1721-1730.
- [18] 叶光斌, 王风平, 肖湘. 东太平洋中国多金属结核区锰结核样品中微生物群落结构的研究[J]. 台湾海峡, 2010, 29(2): 218-227.
- [19] HEIJIS S K, HAESSE R, WIELEN P, et al. Use of 16S rRNA gene based clone libraries to assess microbial communities potentially involved in anaerobic methane oxidation in a mediterranean cold seep[J]. Microbial Ecology, 2007, 53(3): 384-398.
- [20] MARTINEZ R J, MILLS H J, STORY S, et al. Prokaryotic diversity and metabolically active microbial populations in sediments from an active mud volcano in the Gulf of Mexico[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(10): 1783-1796.
- [21] MILLS H J, MARTINEZ R J, STORY S, et al. Characterization of microbial community structure in Gulf of Mexico gas hydrates: comparative analysis of DNA- and RNA-derived clone libraries[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(6): 3235-3247.
- [22] SEKIGUCHI Y, IMACHI H, SUSILORUKMI A, et al. *Tepidanaerobacter syntrophicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, moderately thermophilic, syntrophic alcohol- and lactate-degrading bacterium isolated from thermophilic digested sludges[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56: 1621-1629.
- [23] HAN C, MWIRICHIA R, CHERTKOV O, et al. Complete genome sequence of *Syntrophobacterium glycolicus* type strain (FIGlyR)[J]. Standards in Genomic Sciences, 2011, 4(3): 371-380.
- [24] QIU Y L, SEKIGUCHI Y, HANADA S, et al. *Pelotomaculum terephthalicum* sp. nov. and *Pelotomaculum isophthalicum* sp. nov.: two anaerobic bacteria that degrade phthalate isomers in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens[J]. Archives of Microbiology, 2006, 185(3): 172-182.
- [25] BAENA S, FARDEAU M L, 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 (Pt1): 259-264.
- [26] GRONOW S, MUNK C, LAPIDUS A, et al. Complete genome sequence of *Paludibacter propionigenes* type strain (WB4)[J]. Standards in Genomic Sciences, 2011, 4(1): 36-44.
- [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(Pt 6): 2257-2261.
- [28] JOULIAN C, OLLIVIER B, PATE B K C, et al. Phenotypic and phylogenetic characterization of dominant culturable methanogens isolated from ricefield soils[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1998, 25(2): 135-145.
- [29] ZELLNER G, MESSNER P, WINTER J, et al. *Methanoculleus palmolei* sp. nov., an irregularly coccoid methanogen from an anaerobic digester treating wastewater of a palm oil plant in north-Sumatra, Indonesia[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1998, 8 (Pt 4): 1111-1117.
- [30] CUZIN N, OUATTARA A S, LABAT M, et al. *Methanobacterium congolense* sp. nov., from a methanogenic fermentation of cassava peel[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(Pt 2): 489-493.
- [31] DRIDI B, FARDEAU M L, OLLIVIER B, et al. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(Pt 8): 1902-1907.