

# 基于高通量测序技术分析不同窖龄窖泥真菌群落多样性与空间异质性

任海伟<sup>1,2</sup>, 李志娟<sup>1,2</sup>, 刘美琪<sup>1</sup>, 蔡早宁<sup>1,2</sup>, 孙一帆<sup>1,2</sup>, 郭晓鹏<sup>1</sup>, 范文广<sup>1</sup>, 张丙云<sup>1,\*</sup>, 李彦涛<sup>3</sup>, 尉军强<sup>3</sup>  
(1.兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050; 2.西北低碳城镇支撑技术省部共建协同创新中心, 甘肃 兰州 730050; 3.甘肃金徽酒股份有限公司, 甘肃 陇南 742308)

**摘要:** 利用Illumina NovaSeq高通量测序、冗余分析和FUNGuild等方法对甘肃金徽酒10 a和50 a窖龄窖池及其不同空间位置窖泥的真菌群落结构、真菌菌群与理化因子之间的关系以及真菌功能预测等进行研究。结果表明, 随着窖池深度的增加, 10 a窖池窖泥的多样性和丰富度呈现降低趋势, 50 a窖池窖泥的多样性整体呈现升高趋势, 而丰富度则呈现先降低后升高趋势, 其中10 a窖池窖壁上层的多样性和丰富度均显著高于其他位置 ( $P < 0.05$ ), 而50 a窖池窖底层的多样性和丰富度均显著高于其他位置 ( $P < 0.05$ )。10 a窖池窖壁层的多样性和丰富度显著高于50 a窖池 ( $P < 0.05$ ), 而50 a窖底层的多样性和丰富度明显高于10 a窖池 ( $P < 0.05$ )。所有窖泥样品共检测到21个真菌门和520个真菌属, 其中子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、被孢霉门(Mortierellomycota)和罗兹菌门(Rozellomycota) 4个优势真菌门以及曲霉属(*Aspergillus*)和哈萨克斯坦酵母属(*Kazachstania*)等多数优势真菌属的相对丰度随窖池窖龄和空间位置的变化差异显著 ( $P < 0.05$ )。镰刀霉属(*Fusarium*)、*Aspergillus*、*Kazachstania*和红曲霉属(*Monascus*)与水分、腐殖质、 $K^+$ 和 $Ca^{2+}$ 含量呈正相关, 枝孢菌属(*Cladosporium*)、维希尼克氏酵母属(*Vishniacozyma*)与pH值呈正相关。窖泥真菌营养类型主要有腐生营养型和病理-腐生-共生营养型等7种, 功能类群包括4个单一功能群和7个混合功能群。通过系统分析不同窖龄窖池和空间位置的窖泥真菌群落多样性, 为明确甘肃金徽酒窖泥的真菌群落结构及空间分布规律奠定了理论基础。

**关键词:** 窖泥; 高通量测序; 真菌群落; 冗余分析; 功能预测

## High-throughput Sequencing Analysis of Diversity and Spatial Heterogeneity of Fungal Community in Pit Muds of Different Ages for Baijiu Production

REN Haiwei<sup>1,2</sup>, LI Zhijuan<sup>1,2</sup>, LIU Meiqi<sup>1</sup>, CAI Zaoning<sup>1,2</sup>, SUN Yifan<sup>1,2</sup>, GUO Xiaopeng<sup>1</sup>,

FAN Wenguang<sup>1</sup>, ZHANG Bingyun<sup>1,\*</sup>, LI Yantao<sup>3</sup>, WEI Junqiang<sup>3</sup>

(1. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China; 2. China Northwest Collaborative Innovation Center of Low-carbon Urbanization Technologies of Gansu and MOE, Lanzhou 730050, China; 3. Gansu Jinhui Liquor Co. Ltd., Longnan 742308, China)

**Abstract:** The fungal community structure, the relationship between fungal flora and physicochemical factors, and the prediction of fungal function in pit muds from different spatial positions of 10- and 50-year-old cellars at Jinhui liquor Co. Ltd. were studied by using Illumina NovaSeq high-throughput sequencing, redundancy analysis and Fungi Functional Guild (FUNGuild). The results showed that the fungal diversity and richness of the 10-year-old pit mud decreased with increasing depth; the fungal diversity of the 50-year-old pit mud showed an overall increasing trend, while the fungal richness initially decrease and then increased. Moreover, for the 10-year-old pit, the fungal diversity and richness of the upper layer of the pit wall were significantly higher than those of the other positions ( $P < 0.05$ ), while for the 50-year-old cellar, the fungal diversity and richness of the bottom layer were significantly higher than those of the other locations

收稿日期: 2023-03-29

基金项目: 甘肃省知识产权计划项目(20ZSCQ039; 21ZSCQ073); 兰州理工大学红柳杰出青年人才支持计划项目(JQ2020); 兰州理工大学红柳一流学科计划项目(0807J1)

第一作者简介: 任海伟(1983—)(ORCID: 0000-0001-6745-8727), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物。

E-mail: rhw52571119@163.com

\*通信作者简介: 张丙云(1968—)(ORCID: 0000-0001-5480-984X), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为食品科学。

E-mail: zhangby@lut.edu.cn

( $P < 0.05$ ). The fungal diversity and richness were significantly higher in the wall of the 10-year-old cellar than the 50-year-old cellar ( $P < 0.05$ ), but were significantly higher in the bottom of the 50-year-old cellar than the 10-year-old cellar ( $P < 0.05$ ). A total of 21 fungal phyla and 520 genera were detected in all pit mud samples, the relative abundance of four dominant phyla (Ascomycota, Basidiomycota, Mortierellomycota and Rozellomycota) and most dominant genera such as *Aspergillus* and *Kazachstania* showed significant changes among pit ages and spatial locations ( $P < 0.05$ ). *Fusarium*, *Aspergillus*, *Saccharomyces* and *Monascus* were positively correlated with the contents of water, humus,  $K^+$  and  $Ca^{2+}$ , while *Cladosporium* and *Vishniacozyma* were positively correlated with pH. Seven nutritional modes of fungi were observed, mainly including saprophytic and pathological-saprophytic-symbiotic nutritional modes, and four single and seven mixed functional groups were determined. This study provides a theoretical basis for clarifying the structure and spatial distribution of fungal community in Jinhui Baijiu pit mud.

**Keywords:** pit mud; high-throughput sequencing; fungal community; redundancy analysis; function prediction

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230329-297

中图分类号: TQ325

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 02-0178-10

引文格式:

任海伟, 李志娟, 刘美琪, 等. 基于高通量测序技术分析不同窖龄窖泥真菌群落多样性与空间异质性[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 178-187. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230329-297. <http://www.spkx.net.cn>

REN Haiwei, LI Zhijuan, LIU Meiqi, et al. High-throughput sequencing analysis of diversity and spatial heterogeneity of fungal community in pit muds of different ages for Baijiu production[J]. Food Science, 2024, 45(2): 178-187. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230329-297. <http://www.spkx.net.cn>

中国白酒作为世界著名的六大蒸馏酒之一, 酿造历史可追溯上千年, 特有的口感和香味深受消费者喜爱<sup>[1]</sup>。中国白酒因酿造工艺、制曲技术、地理环境等差异最终形成浓香型、酱香型、清香型和米香型等12种香型<sup>[2]</sup>, 其中浓香型白酒因其独特的发酵酿造过程和“窖香浓郁、绵柔甘冽、香味协调”的酒体风格成为中国白酒的典型代表, 市场份额超过70%。浓香型白酒以谷物(高粱、小麦、玉米、大米等)为原料经发酵、蒸馏、陈酿、勾兑而成, 主要香气成分包括乙酸乙酯、乳酸乙酯、己酸乙酯等, 其品质受到地理环境、酿酒原料、生产工艺、制曲技术和窖泥质量等因素的影响<sup>[3-4]</sup>。窖泥是一种富含微生物、高含水量、高腐殖质和低含氧量的特殊性土壤, 是浓香型白酒发酵酿造的重要场所, 其质量优劣在很大程度上取决于其微生物群落组成及物种多样性。窖泥中所含的细菌、古菌和真菌等微生物菌群构成了一个不断演变的复合生态体系, 期间不断进行着各类复杂的酿酒生化反应, 产酒的同时也形成了丰富而独特的酒体风味物质<sup>[5-6]</sup>。正所谓“窖泥产香”, 很多学者对不同地区白酒窖泥微生物研究发现, 窖泥微生物主要以细菌和古菌为主, 如梭菌(*Clostridium*)是浓香型白酒生产中最重要功能菌, 在厌氧条件下能将有机物转化为有机酸, 并通过酶催化或非酶催化与醇反应生成丁酸乙酯和己酸乙酯<sup>[7]</sup>; 产甲烷菌常与己酸菌共栖互营生长, 并通过种间“氢转移”作用提高己酸乙酯含量<sup>[8]</sup>。这些细菌和古菌相互作用维持着窖泥微生态环境的稳定<sup>[9-10]</sup>。目前, 窖泥微生物群落的研究主要集中在原核

菌群<sup>[11]</sup>, 而有关真菌群落的研究相对较少, 主要是由于真菌大多数为好氧型, 而窖泥的特征之一是低含氧量, 不利于真菌生存。但也有研究表明, 窖泥真菌群落在白酒酿造过程中也发挥着重要作用, 主要负责淀粉降解、酒精发酵和芳香化合物的产生<sup>[12-13]</sup>。因此, 有关窖泥真菌群落的研究对明晰白酒风味物质形成和品质保证具有重要意义。

目前, 研究窖泥真菌多样性的方法主要集中在可培养菌的分离筛选、磷酸脂肪酸生物标记和变性梯度凝胶电泳技术<sup>[14-15]</sup>。高通量测序技术通常被用于分析窖泥原核菌群<sup>[5,10,16]</sup>, 而对真菌群落研究较少。王春艳等<sup>[17]</sup>研究发现宋河浓香型白酒新老窖泥的优势真菌属组成不同, 老窖池的真菌物种丰富度高于新窖池, 但新老窖泥的绝对优势真菌门均为子囊菌门(Ascomycota)。Liu Maoke等<sup>[6]</sup>从泸州老窖窖泥(5 a和100 a)中鉴定到属于4个门的111个真菌属, 其中主要是Ascomycota, 且窖泥样品中优势真菌属的组成具有明显差异, 100 a窖龄窖泥的真菌群落相对稳定。孟雅静等<sup>[18]</sup>发现新窖池窖泥真菌丰富度高于老窖池, 而新老窖池窖壁泥的真菌多样性和丰富度高于窖底泥, 新老窖池窖壁泥的真菌组成接近且比窖底泥更丰富。Cai Weichao等<sup>[19]</sup>从27个新疆浓香型白酒窖泥样品中鉴定出138个真菌属, 隶属10个真菌门, 其中复膜孢酵母属(*Saccharomycopsis*)、曲霉属(*Aspergillus*)和*Apiotrichum*是其核心真菌群落, *Aspergillus*和*Apiotrichum*是维持窖泥真菌群落结构稳定的枢纽。综上所述, 不同地区白酒企业的窖泥真菌群落多

样性差异较为明显, 针对特定酿酒企业开展窖泥真菌研究尤为必要。

金徽酒产于长江上游、西秦岭南麓的“西部酒乡”甘肃陇南徽县境内, 其生态酿酒环境独特, 于2012年入选为国家地理标志保护产品。历史传承形成的低温入窖、长周期低温发酵、缓火蒸馏、低温陈酿、低温过滤等酿造工艺造就了金徽酒“只有窖香、没有泥味”的独特品质<sup>[20]</sup>。为详细了解甘肃金徽酒股份有限公司不同窖龄窖池窖泥的真菌群落多样性与空间异质性, 以该公司10 a和50 a窖龄窖泥为研究对象, 采用Illumina NovaSeq高通量测序技术分析窖泥真菌群落多样性, 基于冗余分析(redundancy analysis, RDA)探究影响窖泥真菌群落分布的理化因素, 利用FUNGuild功能预测揭示不同窖龄窖池和空间位置窖泥真菌营养类型和功能类群, 以期对窖泥驯化、窖泥功能菌筛选和酿酒品质提升奠定理论基础。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料与试剂

白酒窖泥取自甘肃金徽酒股份有限公司10 a和50 a窖龄的发酵窖池(长×宽×高=3 m×2 m×1.9 m)。取样方法如图1所示, 每个窖龄窖池分别从窖壁上层、窖壁中层、窖壁下层和窖底层进行无菌取样。在窖壁上层4面中心点取样混合, 作为窖壁上层样品(UWPM10和UWPM50); 在窖壁中层4面中心点取样混合, 作为窖壁中层样品(MWPM10和MWPM50); 在窖壁下层4面中心点取样混合, 作为窖壁下层样品(DWPM10和DWPM50); 窖底层采用五点法(池底4个对称角和中心点), 取样混合, 作为窖底层样品(BPM10和BPM50), 合计8个代表样品, 每个样品3个平行。将每份窖泥样本分为2份, 密封在无菌取样袋中, 分别置于-20℃冰箱(理化指标分析)和-80℃冰箱(高通量测序)。

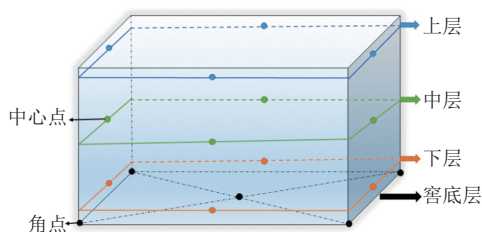


图1 窖泥的取样位置

Fig. 1 Sampling locations of pit mud

盐酸、硝酸、高氯酸、氢氟酸 成都市科隆化学品有限公司; 氯化钾、氯化钙、硼酸 天津市百世化工有限公司; 重铬酸钾(优级纯) 天津市科密欧化学试剂有限公司; 所有试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

紫外分光光度计 北京莱伯泰科仪器股份有限公司; TGL-20M高速冷冻离心机 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; PB-10 pH计 德国Sartorius公司; MP200A精密电子天平 上海良丰仪器仪表有限公司; 101-1电热鼓风干燥箱 北京中兴伟业仪器有限公司; DF-1集热式恒温磁力搅拌锅 金坛市中大仪器厂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 窖泥理化指标测定

含水量和pH值测定分别采用烘干法和电位法<sup>[21]</sup>,  $\text{Ca}^{2+}$ 含量测定参照NY/T 296—1995《土壤全量钙、镁、钠的测定》标准,  $\text{K}^{+}$ 含量测定参照NYT 87—1988《土壤全钾测定法》标准, 腐殖质含量测试采用重铬酸钾氧化法<sup>[22]</sup>。

#### 1.3.2 窖泥基因组提取及Illumina NovaSeq测序

依据Omega DNA试剂盒(D5625)说明书提取窖泥基因组DNA, 送深圳微科盟科技集团进行Illumina NovaSeq高通量测序。转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)扩增引物对为ITS1-1F-F(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和ITS1-1F-R(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'), 扩增区域为ITS1-1F区。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增体系: 5×PCR缓冲液4 μL, 2 μL 2.5 mmol/L脱氧核糖核苷酸三磷酸, 0.8 μL 5 μmol/μL正向引物, 0.8 μL 5 μmol/μL反向引物, 0.4 μL 5 U/μL DNA聚合酶, 10 ng DNA模板, 用双蒸水补充体积至20 μL<sup>[19]</sup>。PCR条件: 95℃预变性3 min; 95℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸45 s, 30个循环。PCR扩增产物经纯化后构建克隆文库, 并进行Illumina NovaSeq双向测序。

#### 1.4 数据处理与分析

将测序后的下机数据处理得到有效序列, 采用QIIME软件进行生物信息学分析, 根据序列相似度, 将其归为多个可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。采用RDP classifier贝叶斯算法对97%相似水平的OTU代表序列进行分类学分析, 并在各分类水平下统计每个样品的群落组成。窖泥理化因子数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并用SPSS 20.0软件进行单因素方差分析其显著性。 $\alpha$ 多样性指数和门属水平优势物种相对丰度显著水平利用SPSS 20.0软件进行分析,  $\beta$ 多样性显著水平采用ANOSIM检验方法分析, 并通过Origin 2021软件绘制 $\alpha$ 多样性指数柱形图(Shannon指数和Chao1指数)和优势门属物种显著性图, 同时绘制样品之间的层级聚类树。使用微科盟云平台绘制主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)图、门属水平优势物种相对丰度图、线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA) Effect Size (LEfSe)多级物种层级树图和LDA判别柱形图、绝对优势真菌属与理化指标之间的RDA图以及相对丰度位于前30真菌属之间的同现网络图。高通量测序结果采用

FUNGuild v1.0软件分析真菌功能分类, 将获得OTU上传到FUNGuild分析平台进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同窖龄窖池和空间位置窖泥的理化指标

研究表明, 窖泥理化性质可以影响白酒酿造过程中微生物群落结构的形成<sup>[23]</sup>, 在一定程度上也可以反映窖泥质量, 是评价窖泥质量的重要指标。刘梅等<sup>[24]</sup>认为质量越好的窖泥, pH值更接近于7。如表1所示, 10 a窖龄窖泥的pH值介于3.50~3.90之间, 而50 a窖龄窖泥的pH值明显升高, 尤其窖壁上层和窖底泥层的pH值更接近7, 说明50 a窖龄窖泥质量整体上优于10 a窖泥, 这可能是因为10 a窖泥中的乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 明显高于50 a窖泥, 而*Lactobacillus*的富集可以导致其代谢物乳酸的积累, 进而造成窖泥pH值的下降<sup>[25]</sup>, 因此窖泥的pH值可以作为初步判定窖泥质量优劣的依据。由表1还可看出, 随着窖池深度的增加, 10 a窖龄窖泥的水分、腐殖质、Ca<sup>2+</sup>含量总体呈现升高的变化趋势, 窖底泥明显高于窖壁泥 ( $P < 0.05$ ); 而50 a窖龄窖泥的水分、腐殖质、Ca<sup>2+</sup>含量呈现先升高后降低趋势, 窖壁泥明显高于窖底泥 ( $P < 0.05$ )。另一方面, 随着窖池窖龄的增加, 水分、腐殖质、Ca<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>含量明显降低, 而pH值则显著升高 ( $P < 0.05$ ), 这与张会敏等<sup>[5]</sup>报道的老窖泥pH值高于新窖泥、新窖泥Ca<sup>2+</sup>含量高于老窖泥结果一致, 也说明了不同窖龄和空间位置的窖泥与空气接触频次、与黄水接触程度、持水性和微生物组成等因素密切相关<sup>[5]</sup>。与此同时, 腐殖质含量的高低也是判断窖泥质量优劣的重要指标之一, 其含量高低直接影响浓香型白酒质量<sup>[26]</sup>。总之, 不同窖龄窖池和空间位置窖泥的理化性质存在一定差异, 理化性质的差异也进一步反映了在白酒酿造过程中需要因时因势不断改善酿酒工艺或优化物质配比, 从而保障窖泥微生物菌群处于高效稳定动态平衡状态。

表1 金徽酒窖泥的常见理化指标

Table 1 Common physicochemical indexes of Jinhui Baijiu pit mud

样品	水分质量分数/%	pH	腐殖质质量分数/%	K <sup>+</sup> 质量分数/%	Ca <sup>2+</sup> 质量分数/%
UWPM10	72.11±3.85 <sup>Ba</sup>	3.68±0.01 <sup>Bb</sup>	7.52±0.22 <sup>Ba</sup>	49.57±1.18 <sup>Ba</sup>	122.78±5.85 <sup>Ba</sup>
MWPM10	72.19±1.28 <sup>Ba</sup>	3.66±0.01 <sup>Bb</sup>	8.41±0.25 <sup>Ca</sup>	28.21±0.22 <sup>Ba</sup>	95.40±4.51 <sup>Ca</sup>
DWPM10	83.36±2.68 <sup>Aa</sup>	3.58±0.13 <sup>Bb</sup>	9.51±0.30 <sup>Ba</sup>	50.27±2.06 <sup>Ca</sup>	170.93±7.37 <sup>Aa</sup>
BPM10	85.98±5.22 <sup>Aa</sup>	3.83±0.04 <sup>Ab</sup>	10.96±0.09 <sup>Aa</sup>	42.73±1.60 <sup>Aa</sup>	180.72±8.27 <sup>Aa</sup>
UWPM50	57.63±7.07 <sup>Bb</sup>	6.20±0.31 <sup>Aa</sup>	4.91±0.25 <sup>Bb</sup>	19.13±0.34 <sup>Ab</sup>	45.72±0.60 <sup>Bb</sup>
MWPM50	66.06±6.53 <sup>Ab</sup>	4.51±0.12 <sup>Ba</sup>	5.82±0.67 <sup>Bb</sup>	21.17±0.73 <sup>Bb</sup>	54.93±1.77 <sup>Bb</sup>
DWPM50	75.42±1.30 <sup>Ab</sup>	5.96±0.08 <sup>Aa</sup>	7.49±0.48 <sup>Ab</sup>	36.38±1.51 <sup>Ab</sup>	80.38±3.97 <sup>Ab</sup>
BPM50	41.22±1.35 <sup>Bb</sup>	6.22±0.15 <sup>Aa</sup>	3.75±0.39 <sup>Bb</sup>	21.41±0.07 <sup>Bb</sup>	36.80±0.38 <sup>Bb</sup>

注: 同列不同大写字母表示同一窖龄不同位置差异显著 ( $P < 0.05$ ); 不同小写字母表示同一位置不同窖龄差异显著 ( $P < 0.05$ )。

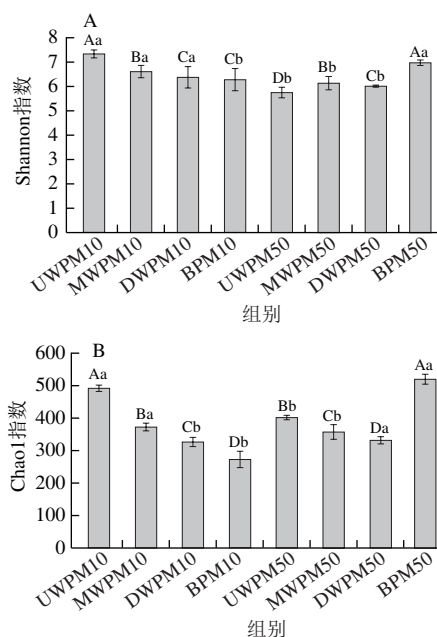
### 2.2 高通量测序数据合理性分析

通过Illumina NovaSeq平台对窖泥真菌群落进行测序分析, 测序数据经过barcode拆分后获得1 286 316 条平均

长度为181~237 bp的有效真菌序列。获得所有样品的全部原始序列后, 对其进行质量控制、去噪、拼接, 并且去嵌合体, 形成OTU。按照97%的默认值对优化真菌序列进行分组, 共获得8 415 个OTU, 各窖泥样本的OTU数量分布介于255~505。每个样本的覆盖率均大于99%, 说明测序数目足够, 测序序列可以代表窖泥真菌群落组成。

### 2.3 金徽酒窖泥真菌群落的α多样性分析

Shannon指数表示物种的多样性, Chao1指数表示物种的丰富度, 其中Chao1指数对稀有物种更敏感<sup>[27]</sup>。如图2所示, 从空间位置看, 10 a窖池窖泥的多样性和丰富度随窖池深度的增加呈现降低趋势, 窖壁上层的多样性和丰富度显著高于其他位置 ( $P < 0.05$ ), 这可能是因为窖壁上层窖泥与空气接触程度较大, 氧气含量越高, 有利于好氧型真菌生存, 这与孟雅静等<sup>[18]</sup>报道结果一致。50 a窖池窖泥的多样性随着窖池深度的增加整体呈现升高趋势, 丰富度则呈现先降低后升高的趋势, 窖底层多样性和丰富度均显著高于其他位置 ( $P < 0.05$ ), 因为50 a窖池窖底泥的理化环境有利于真菌菌群生存。另一方面, 10 a窖池窖壁层的真菌多样性和丰富度显著高于50 a窖泥 ( $P < 0.05$ ), 而50 a窖底泥的真菌多样性和丰富度均显著高于10 a窖泥 ( $P < 0.05$ ), 这是因为随着窖池窖龄的增加会产生黄水下沉, 窖壁泥暴露在空气中使其水分流失, 真菌生存条件变差, 进而导致真菌多样性和丰富度下降。另一方面, 窖底泥长期处于黄水环境, 黄水中真菌进入窖底泥并富集, 促使其多样性和丰富度提高<sup>[28]</sup>。



A. Shannon指数; B. Chao1指数。不同大写字母表示同一窖龄不同位置差异显著 ( $P < 0.05$ ); 不同小写字母表示同一位置不同窖龄差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图2 不同窖龄窖池和空间位置窖泥中真菌群落的α多样性  
Fig. 2 α-Diversity of fungal community in pit muds of different ages and at spatial locations

## 2.4 金徽酒窖泥真菌群落的 $\beta$ 多样性分析

为进一步分析窖泥真菌群落的相似性,对真菌群落进行PCoA和非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)层级聚类分析。由图3a可知,PCoA横纵坐标之和为24.34%,说明真菌群落结构复杂,2个PCo难以在很大程度上对其进行解释,与Cai Weichao等<sup>[19]</sup>的研究结果基本一致。从空间位置看,50 a窖泥MWPM50和DWPM50样品距离较近,UWPM50和BPM50样品距离较近,表明50 a窖池窖壁中层和下层窖泥的真菌群落组成相似,50 a窖壁上层和窖底泥的真菌组成相似,而10 a窖池不同位置窖泥样品距离较远,未出现聚类,表明10 a窖龄窖池不同位置窖泥的真菌群落组成有明显差异。从窖龄角度看,不同窖龄同一位置窖泥样品距离较远,说明其群落组成差异显著。由图3b可知,所有窖泥样品共分为3簇,其中样品UWPM50和BPM50分别单独聚为一簇,其他窖泥样品聚为另一簇,表明在长期发酵过程中,窖池窖泥真菌群落存在明显的空间异质性,其中样品UWPM50和BPM50的真菌群落变化程度快于其他位置窖泥。PCoA和UPGMA聚类的结果基本一致,说明窖龄和空间位置对真菌群落组成的相似性和差异性有一定影响。

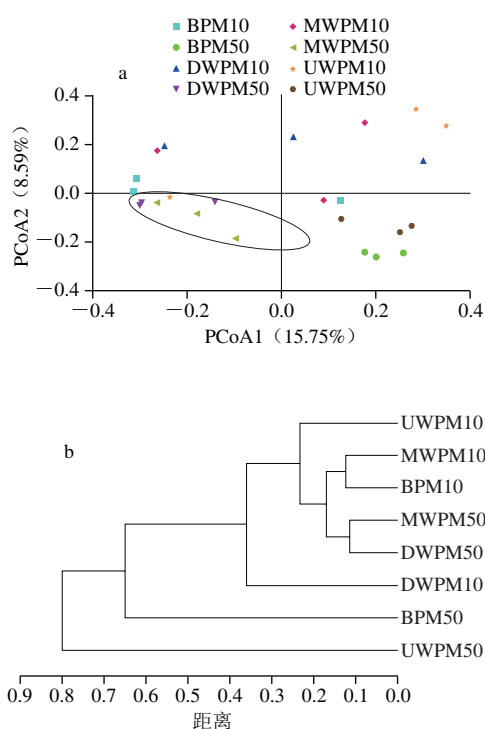


图3 不同窖龄窖池和空间位置窖泥真菌群落的PCoA分析(a)和UPGMA聚类分析(b)

Fig. 3 PCoA analysis (a) and UPGMA cluster analysis (b) of fungal communities in pit muds of different ages and at spatial locations

## 2.5 基于门水平的窖泥真菌群落结构分析

基于OTU注释共得到21个真菌门,平均相对丰度超过0.1%的有8个,其中Ascomycota(62.12%)、Basidiomycota(17.18%)、Mortierellomycota(1.32%)和Rozellomycota(1.01%)是金徽窖泥的优势真菌门(平均相对丰度 $\geq 1\%$ ),此外还含有较低丰度的球囊菌门(Glomeromycota, 0.13%)。另外,Ascomycota和Basidiomycota在10 a和50 a窖池不同位置窖泥中均占绝对优势,是窖泥的绝对优势真菌门,与Cai Weichao等<sup>[19]</sup>研究结果一致。

如图4所示,从空间位置看,10 a和50 a窖泥Ascomycota相对丰度随着窖池深度的增加均呈现先升高后降低趋势,窖壁下层Ascomycota相对丰度极显著高于其他位置( $P < 0.01$ )。类似地,10 a窖泥Basidiomycota和Mortierellomycota相对丰度随着窖池深度的增加呈现先降低后升高趋势,Rozellomycota相对丰度则呈现显著降低趋势,其中窖壁上层Mortierellomycota和Rozellomycota相对丰度显著高于其他位置。50 a窖池窖泥Basidiomycota和Mortierellomycota相对丰度随窖池深度增加整体呈现升高趋势,其中窖壁中层Basidiomycota和Rozellomycota相对丰度显著高于其他位置,窖底层Mortierellomycota相对丰度也显著高于其他位置。有研究表明,Ascomycota不仅是浓香型白酒窖泥中的优势真菌门,同时也是酱香型白酒生产中的主要真菌菌群<sup>[29-30]</sup>。

从窖池窖龄看,窖壁上层和上层Ascomycota相对丰度随着窖龄的增加而呈现升高趋势,且50 a显著高于10 a,而窖壁下层和窖底泥Ascomycota相对丰度则呈现显著降低趋势,且10 a显著高于50 a,这与王春艳等<sup>[17]</sup>研究结果稍有差异。另一方面,窖壁上层、窖壁中层和窖底泥Basidiomycota相对丰度随着窖龄的增加呈现显著降低趋势,窖壁下层Basidiomycota相对丰度则呈现显著升高趋势。再者,窖壁上层Mortierellomycota相对丰度随着窖龄的增加呈现显著降低趋势,窖底泥Mortierellomycota相对丰度则呈现显著升高趋势( $P < 0.01$ ),但其他位置Mortierellomycota相对丰度差异不显著( $P > 0.05$ )。窖壁中层和窖底层Rozellomycota相对丰度随着窖龄的增加均呈现显著升高趋势( $P < 0.01$ )。

总体而言,不同窖龄和空间位置窖泥的优势真菌门相对丰度差异显著,这与孟静雅等<sup>[18]</sup>研究结果有所差异,表明不同窖池窖龄和空间位置窖泥的理化环境在一定程度上均能够影响优势真菌门的结构分布和演替规律。

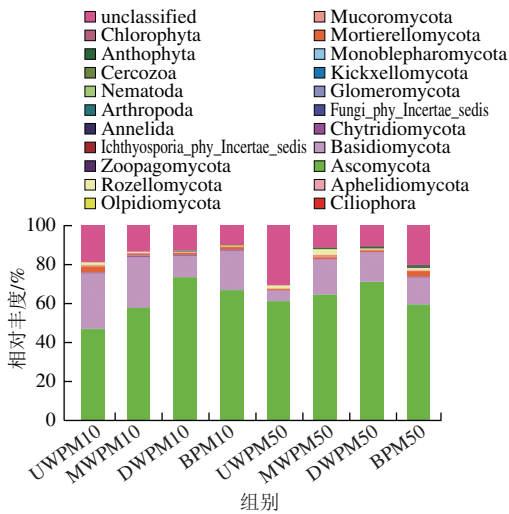


图4 不同窖龄窖池和空间位置窖泥真菌的门类水平相对丰度  
Fig. 4 Relative abundance of fungal phyla in pit muds of different ages and at spatial locations

2.6 基于属水平的窖泥真菌群落结构分析

金徽酒窖泥在属水平上共鉴定出520个真菌属，其中14个属为优势真菌属（所有样品的平均相对丰度 $\geq 1\%$ ），其余未知真菌属和非优势真菌属归为others。14个优势真菌属分别为枝孢菌属（*Cladosporium*）、*Aspergillus*、红曲霉属（*Monascus*）、嗜热真菌属（*Thermomyces*）、假散囊菌属（*Pseudeurotium*）、德克酵母属（*Dekkera*）、毕赤酵母属（*Pichia*）、哈萨克斯坦酵母属（*Kazachstania*）、枝顶孢霉属（*Acremonium*）、镰刀霉属（*Fusarium*）、被孢霉属（*Mortierella*）、维希尼克氏酵母属（*Vishniacozyma*）、*Archaeorhizomyces*、*Neocosmospora*，占总丰度的79.24%。窖泥中的绝对优势真菌属（每个样品的相对丰度 $\geq 1\%$ ）包括*Aspergillus*、*Monascus*、*Kazachstania*、*Fusarium*，但不同窖龄窖泥的绝对优势真菌属有所差异。10 a窖池窖泥中的绝对优势真菌属分别为*Cladosporium*、*Monascus*、*Fusarium*、*Aspergillus*、*Kazachstania*，50 a窖池窖泥中的绝对优势真菌属为*Aspergillus*和*Kazachstania*。

从图5空间位置角度分析可知，10 a窖池窖泥*Aspergillus*相对丰度随窖池深度的增加呈现先降低后升高趋势，且窖底层显著高于其他位置，而*Kazachstania*相对丰度变化趋势与之相反，且窖壁下层显著高于其他位置。50 a窖池窖泥*Aspergillus*和*Kazachstania*相对丰度随着窖池深度的增加呈现先升高后降低趋势，且二者在窖壁下层相对丰度均显著高于其他位置。就窖泥

窖龄而言，除窖壁下层外，其他位置*Aspergillus*相对丰度均随窖池窖龄的增加呈现显著降低趋势。窖壁上层*Kazachstania*相对丰度则随着窖龄的增加呈现升高趋势，而其他位置*Kazachstania*相对丰度则呈现显著降低趋势（ $P < 0.01$ ）。原因可能是在白酒酿造过程中开窖和封窖等操作会使其营养成分和含氧量不断改变，进而使微生物群落结构发生演替<sup>[31]</sup>。据报道*Aspergillus*能够产生淀粉酶和蛋白酶等，是白酒酿造过程中淀粉等大分子物质分解的主要动力之一<sup>[31]</sup>。*Kazachstania*等酵母类真菌在大曲样品中的相对丰度较高，在白酒发酵过程中对乙醇、有机酸和多类酯等物质的产生具有重要作用<sup>[32]</sup>。

另外，10 a窖龄窖池不同位置*Acremonium*、不同窖龄窖壁上层*Fusarium*和*Neocosmospora*、不同窖底层*Pichia*和*Mortierella*，以及窖壁底层*Cladosporium*相对丰度差异均不显著（ $P > 0.05$ ），但*Aspergillus*和*Kazachstania*等大多数优势真菌属的相对丰度差异显著，说明窖池窖龄和空间位置会影响窖泥真菌群落的分布。另外，未分类真菌属相对丰度范围为40.06%~87.41%，表明窖泥真菌群落结构复杂，包含多种在现有数据库中无法识别或未被识别的物种。孟雅静等<sup>[18]</sup>研究发现安徽某酒企的新老窖泥真菌组成差异并不明显，但甘肃金徽酒不同窖龄和不同位置窖泥的绝对优势真菌属均存在明显差异，这与肖琴等<sup>[33]</sup>研究结果一致。

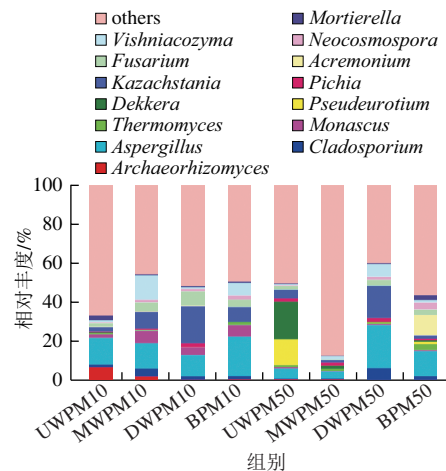


图5 不同窖龄窖池和空间位置窖泥真菌属水平相对丰度  
Fig. 5 Relative abundance of fungal genera in pit muds of different ages and at spatial locations

进一步比较不同地区浓香型白酒窖泥真菌群落组成（表2），发现不同地区白酒窖泥的优势真菌门和优势真菌属组成确有差异，这可能与酿酒企业所在地理区域、水文土壤、气候条件以及窖池理化性质有关。

表2 不同地区浓香型白酒窖泥的优势真菌门和优势真菌属比较

Table 2 Comparison of dominant fungal phyla and genera in Luzhou-flavor Baijiu pit muds from different regions

地点	测试方法	窖泥样品	优势真菌门	优势真菌属	文献
四川泸州	Illumina MiSeq 高通量测序	5 a窖泥样品为N1、N2、N3和N4, 100 a的窖泥样品称为O1、O2、O3和O4 (每种窖龄选择4个窖)	Ascomycota Chytridiomycota Zygomycota Basidiomycota	<i>Rhizopus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Phoma</i> , <i>Trichosporon</i> , <i>Candida</i> 等19个优势真菌属	Liu Maoko等 <sup>[6]</sup>
新疆石河子	Illumina MiSeq 高通量测序	Upper1-9、middle1-9、lower1-9 (9个窖, 每个窖取上、中、下3个深度的样品)	Ascomycota Basidiomycota Mortierellomycota	<i>Saccharomycopsis</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Mortierella</i> , <i>Byssosclamyces</i> 等15个优势真菌属	Cai Weichao等 <sup>[10]</sup>
安徽	Illumina MiSeq 高通量测序	6个老窖池的池底泥标注为BPM-01~BPM-06; 6个新窖池的池底泥标注为BPM-y1~BPM-y6	Ascomycota Basidiomycota Zygomycota	<i>Candida</i> , <i>Pichia</i> , <i>Hypophichia</i> , <i>Malassezia</i> , <i>Thermoascus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Thermoascus</i> 等18个优势真菌属	孟雅静等 <sup>[18]</sup>
河南宋河	Illumina MiSeq 高通量测序	W1 (6 a窖壁泥), Y1 (16 a窖壁泥); W2 (6 a窖底泥), Y2 (16 a窖底泥)	Ascomycota Mucoromycota Basidiomycota Mortierellomycota	<i>Penicillium</i> , <i>Byssosclamyces</i> , <i>Mortierella</i> , <i>Thermomyces</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Rhizomucor</i> , <i>Gamsia</i> 等15个优势真菌属	王春艳等 <sup>[17]</sup>
四川宜宾	Illumina MiSeq 高通量测序	5 a窖泥样品为S5、Z5、D5; 10 a窖泥样品为S10、Z10、D10; 20 a窖泥样品为S20、Z20、D20; (S指上层、Z指中层、D指下层)	Ascomycota Basidiomycota Rozellomycota	unclassified_f_Dipodascaceae, unclassified_f_Aspergillaceae, <i>Apiotrichum</i> , <i>Thermomyces</i> 等15个优势真菌属	肖琴等 <sup>[21]</sup>

2.7 不同窖龄窖池和空间位置窖泥的差异真菌分析

为进一步分析窖泥真菌菌群的差异性, 利用LEfSe分析窖泥样品之间的差异真菌。LDA柱状图显示窖泥中有显著差异的真菌, 柱的长度代表差异真菌影响值大小, 其阈值分数为3.00。由图6可知, 在属水平上, 所有窖泥样品共检测出25种差异真菌, 其中, 10 a窖泥含有6种差异真菌, 窖壁上层差异真菌为黏头霉属(*Myxocephala*)、假散囊菌属(*Pseudeurotium*)和*Bifiguratus*, 窖壁中层无差异真菌, 窖壁下层差异真菌为*Cephalotheca*和*Parasarocladium*, 窖底层差异真菌为枝瑚菌属(*Ramaria*)。50 a窖泥中共含有19种差异真菌, 窖壁上层差异真菌为假散囊菌属(*Pseudeurotium*), 窖壁中层差异真菌为节菱孢属(*Arthrimum*)、丝膜菌属(*Cortinari*)和球腔菌属(*Phaeosphaeria*), 窖壁下层差异真菌为扇盘衣属(*Thysanothecium*), 窖底层差异真菌为拟青霉属(*Simplicillium*)、栓菌属(*Trametes*)、链孢霉属(*Neurospora*)、珊瑚菌属(*Clavaria*)、柄孢壳属(*Zopfiella*)、梭链孢属(*Fusidium*)、褐球菌属(*Phaeococcomyces*)、裂褶菌属(*Schizophyllum*)、*Saccharomycopsis*、木拉克酵母属(*Mrakia*)、*Sagenomella*、*Ophiosphaerella*、*Genolevuria*, 说明不同窖龄窖池和空间位置窖泥的差异物种数目和种类不同。另外, 在25个差异真菌中有3个差异真菌的LDA值 $\geq 4$ , 如科水平的假散囊菌科(*Pseudeurotiaceae*)、肉座菌科(*Hypocreales*)以及属水平的假散囊菌属(*Pseudeurotium*), 说明它们是对不同窖龄窖池和空间位置窖泥差异贡献最大的真菌群落。通过对窖泥差异真菌的分析, 发现差异真菌均是样品中相对丰度较低的一类物种, 但也是白酒酿造过程中发挥重要作用的微生物类群。

- a
- a: g\_ *Pseudocoleophoma*
- b: f\_ *Dictyosporiaceae*
- c: g\_ *Ophiosphaerella*
- d: g\_ *Phaeosphaeria*
- e: g\_ *Phaeomycoentrospora*
- f: g\_ *Sagenomella*
- g: g\_ *Thysanothecium*
- h: f\_ *Cladoniaceae*
- i: o\_ *Lecanorales*
- j: c\_ *Lecanoromycetes*
- k: g\_ *Pseudeurotium*
- l: f\_ *Pseudeurotiaceae*
- m: g\_ *Cheilymenia*
- n: g\_ *Saccharomyces*
- o: g\_ *Simplicillium*
- p: f\_ *Cordycipitaceae*
- q: g\_ *Myxocephala*
- r: f\_ *Hypocreales\_fam\_Incertae\_sedis*
- s: g\_ *Parasarocladium*
- t: f\_ *Sarocladiaceae*
- u: g\_ *Cephalotheca*
- v: g\_ *Zopfiella*
- w: g\_ *Neurospora*
- x: f\_ *Sordariaceae*
- y: g\_ *Arthrimum*
- z: f\_ *Apiosporaceae*
- a0: g\_ *Fusidium*
- a1: g\_ *Cortinari*
- a2: f\_ *Cortinariaceae*
- a3: g\_ *Schizophyllum*
- a4: f\_ *Schizophyllaceae*
- a5: g\_ *Clavulina*
- a6: o\_ *Geastrales*
- a7: g\_ *Mrakia*
- a8: f\_ *Gomphaceae*
- a9: o\_ *Gomphales*
- b0: g\_ *Trametes*
- b1: f\_ *Polyporaceae*
- b2: g\_ *Mrakia*
- b3: g\_ *Genolevuria*
- b4: g\_ *Bifiguratus*
- b5: f\_ *Mucoromycotina\_fam\_Incertae\_sedis*
- b6: o\_ *Mucoromycotina\_ord\_Incertae\_sedis*
- b7: c\_ *Mucoromycotina\_cls\_Incertae\_sedis*

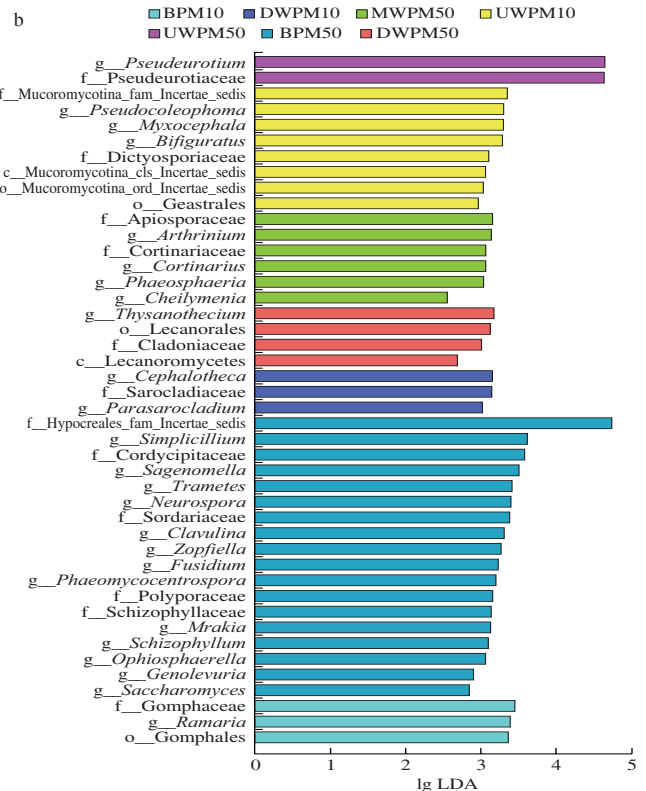
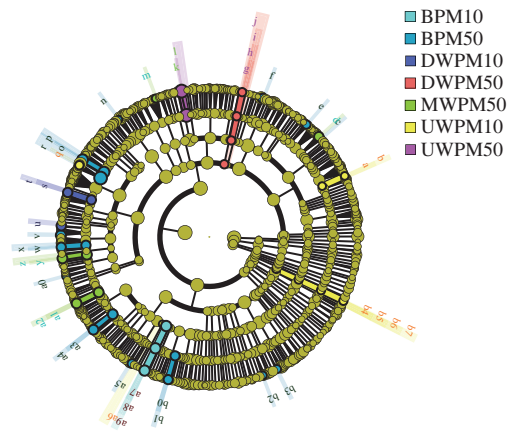


图6 真菌LEfSe多级物种层级树图(a)和LDA柱形图(b)  
Fig. 6 Fungal LEfSe multi-level species hierarchical tree diagram (a) and LDA score plot (b)

2.8 金徽酒窖泥理化指标与真菌菌群之间的RDA

研究表明，窖池窖泥理化指标的差异可能是影响窖泥微生物生长代谢或功能的因素，也是影响微生物群落 $\alpha$ 及 $\beta$ 多样性的重要因素<sup>[34]</sup>。利用RDA探究窖泥理化指标与绝对优势真菌属之间的相关性（图7），箭头长度代表相关性，中心点和窖泥真菌之间的连线与箭头的夹角，锐角表示真菌属与相应的理化因子呈正相关，钝角表示呈负相关<sup>[5]</sup>。

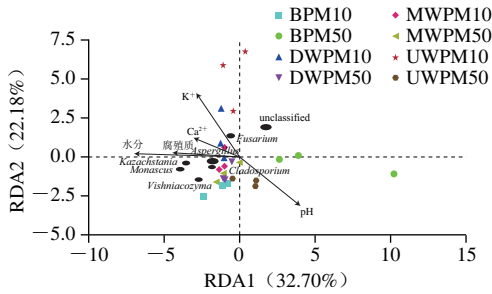


图7 绝对优势真菌属与理化指标之间的关系

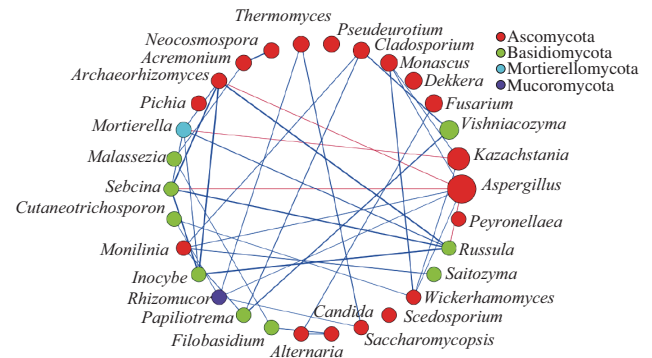
Fig. 7 Relationship between absolute dominant fungal genera and physicochemical indicators

金徽窖泥的绝对优势真菌属与窖泥理化指标之间的关系如图7所示，其2个主成分的总解释度为54.88%，按照RDA1和RDA2的划分，水分含量、腐殖质、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 集中在同一区域，pH值单独占据一个区域，在同一区域的理化因子变化趋势基本一致，而pH值则与其他理化因子变化趋势不同，这与表1分析结果一致。由图7还可看出，10 a窖龄的窖泥样品与水分、腐殖质、 $\text{K}^+$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ 含量呈正相关关系，且10 a窖池窖泥中存在较多的 $\text{Ca}^{2+}$ ，这与张会敏等<sup>[5]</sup>报道的“新窖泥中 $\text{Ca}^{2+}$ 高于老窖泥”结果一致，然而50 a窖泥样品与pH值呈正相关。*Fusarium*、*Kazachstania*、*Aspergillus*、*Monascus*与水分、腐殖质、 $\text{K}^+$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ 含量呈正相关，与pH值呈负相关，而*Cladosporium*和*Vishniacozyma*与pH值呈正相关，与水分、腐殖质、 $\text{K}^+$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ 含量呈负相关。研究表明，*Aspergillus*和*Monascus*等真菌可以产生液化酶（最适pH 6.0）和纤维素酶（最适pH 7.5）等多种功能酶系<sup>[35]</sup>，低pH值会抑制这些微生物的生长，从而影响白酒风味物质的形成和白酒品质。由此可见，这些理化指标对窖泥真菌群落的分布影响较大，窖泥真菌群落的结构组成与理化指标密切相关。

2.9 金徽酒窖泥的物种相互作用网络分析

枢纽指与一定数量的其他微生物相关联，是整个环境中影响微生物相关网络的重要因素<sup>[27]</sup>。对金徽窖泥的真菌群落进行网络分析以探索相对丰度位于前30的真菌属之间的相互作用关系。图8中有30个节点、38条边，所有节点分别隶属于Ascomycota（19节）、

Basidiomycota（9节）、毛霉菌门（Mucoromycota）（1节）和Mortierellomycota（1节）4个真菌门。窖泥中真菌群落同现网络的中心（边数 $\geq 5$ 的真菌属）为曲霉属（*Aspergillus*）、红菇属（*Russula*）、蜡壳耳属（*Sebina*）、被孢霉属（*Mortierella*）、*Archaeorhizomyces*。*Aspergillus*与*Monascus*、*Monilinia*、*Rhizomucor*、*Wickerhamomyces*呈正相关，与*Archaeorhizomyces*、*Sebina*、*Russula*呈负相关；*Russula*与*Archaeorhizomyces*、*Mortierella*、*Sebina*、*Inocybe*呈正相关，与*Aspergillus*呈负相关；*Sebina*与*Inocybe*、*Russula*、*Mortierella*、*Archaeorhizomyces*呈正相关，与*Aspergillus*呈负相关；*Mortierella*与*Sebina*、*Inocybe*、*Russula*、*Archaeorhizomyces*呈正相关，与*Kazachstania*呈负相关；*Archaeorhizomyces*与*Mortierella*、*Sebina*、*Inocybe*、*Russula*呈正相关，与*Aspergillus*呈负相关。从图8还可以看出，*Aspergillus*和*Kazachstania*相对丰度显著高于其他真菌属，这与图6结果一致。同时，在同现网络中发现了*Scedosporium*、*Pseudeurotium*、*Dekkera*和*Peyronellaea* 4个独立的模块，主要是由于能连接这4个模块的节点或枢纽含量极少或消失，节点或枢纽种类和含量的减少导致微生物菌群网络碎片化<sup>[36-37]</sup>，这与Cai Weichao等<sup>[19]</sup>报道的同现网络中没有发现独立的模块，所有真菌属都连接在同一个模块内的研究结果不同。其中*Pseudeurotium*是影响微生物菌群网络的重要真菌属之一，与图6中*Pseudeurotium*是LDA值 $\geq 4$ 的差异真菌，是对不同窖龄窖池和空间位置窖泥差异贡献最大的真菌群落研究结果一致。总之，通过同现网络分析，金徽酒窖泥的真菌群落之间形成相互影响的网络结构，核心真菌属之间直接或间接影响彼此生长和代谢，进而影响酿造环境中微生物体系平衡。



蓝色线条代表正相关，红色线条代表负相关，线条的粗细代表相关性的强弱，节点的大小与其连接的群落数目呈正相关。

图8 真菌群落间的同现网络

Fig. 8 Co-occurrence network among fungal communities

2.10 金徽酒窖泥真菌FUNGuild功能预测

根据FUNGuild功能预测对不同窖龄窖池和空间位置



窖泥真菌群落进行分类分析,从而了解和预测窖泥真菌群落功能。FUNGuild依据真菌的营养方式将真菌分为3大类:病理营养型、共生营养型和腐生营养型。基于这3大营养方式,进一步细分为若干个功能分组:动物病原菌、丛枝菌根真菌、外生菌根真菌、杜鹃花类菌根真菌、叶内生真菌、地衣寄生真菌、地衣共生真菌、菌寄生真菌、植物病原菌、未定义根内生真菌、未定义腐生真菌和木质腐生真菌等。

本实验FUNGuild功能预测置信水平选用highly probable、probable和possible,以保证预测的准确性。图9a结果显示,金徽酒窖泥的真菌主要预测得到病理营养型、病理-腐生营养型、病理-腐生-共生营养型、病理-共生营养型、腐生营养型、腐生-共生营养型、共生营养型共7个不同的营养类型,其中腐生营养型和病理-腐生-共生营养型占比较高,分别为23.63%~61.87%和13.93%~34.13%。不同窖泥样品真菌的主要营养类型不同,样品DWPM10、DWPM50、BPM50的真菌以病理-腐生-共生营养型为主,样品UWPM10的真菌则以共生营养型为主,其他样品的真菌则以腐生营养型为主。从图9b可以看出,不同窖泥样品真菌的主要生态功能群也存在差异,样品UWPM10真菌功能类群主要是未定义的腐生菌(20.55%)和外生菌(15.88%),其中未定义腐生菌在属水平上包括*Pseudeurotium*、*Monascus*、*Wickerhamomyces*等,外生菌在属水平上包括*Inocybe*和*Russula*等。样品MWPM10和DWPM10真菌功能类群中未定义的腐生菌相对丰度分别高达33.20%和30.64%,是样品MWPM10和DWPM10中最主要的功能类群,在门水平上主要有Ascomycota、Basidiomycota、Mucoromycota;样品MWPM10和DWPM10中,动物病原-内生-寄生性真菌-地衣寄生虫-植物病原-木质腐生菌类群也是主要功能类群,相对丰度分别达4.61%和4.46%,其在属水平上包括*Nectria*和*Penicillifer*等。样品BPM10和DWPM50真菌功能类群主要是未定义的腐生菌和植物病原菌,其中植物病原菌在样品BPM10和DWPM50相对丰度分别达11.85%和13.40%。样品UWPM50和MWPM50主要的功能类群为未定义的腐生菌(相对丰度分别为56.72%、22.71%)和内生植物病原菌(相对丰度分别为9.79%、22.49%),内生植物病原菌在属水平上的主要真菌属为*Thermomyces*等。样品BPM50中除最主要的功能类群未定义的腐生菌外,动物病原-内生-寄生性真菌-植物病原-木质腐生菌也是主要的功能类群,相对丰度为17.79%,在属水平上的真菌属包括*Acremonium*和*Sodiomyces*。总之,金徽酒窖泥的真菌群落主要有7种营养类型和11个功能类群,但不同样品的真菌营养类型和功能类群因其窖龄和空间位置不同而存在差异。

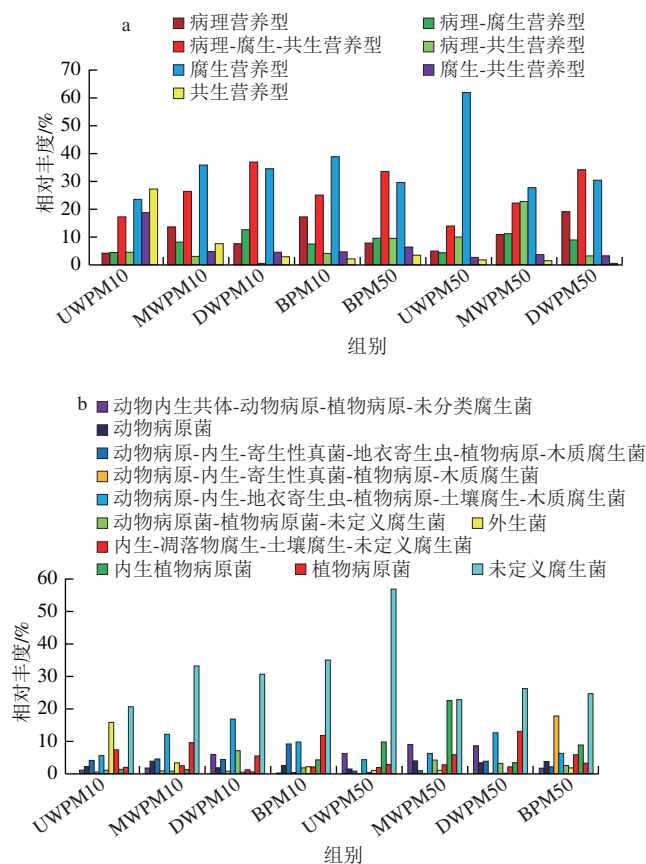


图9 不同窖龄窖池和空间位置窖泥真菌的营养模式(a)和功能类群(b)  
Fig. 9 Nutritional patterns (a) and functional groups (b) of fungi in pits of different ages and at spatial locations

### 3 结论

在所有金徽酒窖泥样本中,Ascomycota、Basidiomycota、Rozellomycota、Mortierellomycota是窖泥的优势真菌门,Aspergillus、Monascus、Kazachstania等14个属为优势真菌属;同时在属水平上检测到25种差异真菌,且不同窖龄窖池和空间位置窖泥的差异真菌组成存在明显差异。尽管不同窖龄窖池和空间位置窖泥的真菌多样性和丰富度变化趋势不同,但总体而言50 a窖龄窖泥更趋于稳定。RDA结果表明金徽窖泥的pH值、水分、腐殖质、 $K^+$ 和 $Ca^{2+}$ 等理化特性对真菌群落的分布影响较大,尤其是区分不同窖龄的窖泥样品。通过网络分析发现金徽窖泥中真菌群落同生网络的中心为Aspergillus、Russula、Sebina、Mortierella、Archaeorhizomyces,并且发现4个独立的模块,表明枢纽是影响整个环境微生物菌群网络的重要因素。FUNGuild功能预测结果表明金徽窖泥的真菌群落有7个营养类型和11个生态功能类群,且不同窖泥样品真菌的营养类型和生态功能类群存在差异。总之,通过研究不同窖龄窖泥真菌群落结构多样性与空间异质性,发现不同窖龄窖池窖泥的优势真菌属存

在较大差异,也证实了窖池中窖泥真菌群落具有明显的空间异质性,对进一步探索不同空间位置窖泥真菌群落对窖泥老化和酒体风味物质形成的具体贡献有积极作用。

#### 参考文献:

- [1] 刘森, 李林光, 李可, 等. 中国浓香型白酒窖池窖泥中原核微生物群落的空间异质性[J]. 食品科学, 2013, 34(21): 221-226. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201321045.
- [2] 翟磊, 刘瑞娜, 张京涛, 等. 浓香型白酒窖池中细菌群落结构的研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(13): 78-84. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.033887.
- [3] ZHANG M Z, WU X F, MU D D, et al. Profiling the effects of physicochemical indexes on the microbial diversity and its aroma substances in pit mud[J]. Letters in Applied Microbiology, 2020, 71(6): 667-678. DOI:10.1111/lam.13380.
- [4] 张竞一, 柴丽娟, 高涛, 等. 不同季节浓香型白酒基酒风味物质差异分析[J]. 食品科学, 2023, 44(12): 164-171. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220826-320.
- [5] 张会敏, 王艳丽, 孟雅静, 等. 浓香型白酒新、老窖池池壁泥与池底泥原核菌群结构分析[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 180-187. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190723-307.
- [6] LIU M K, TANG Y M, ZHAO K, et al. Determination of the fungal community of pit mud in fermentation cellars for Chinese strong flavor liquor, using DGGE and Illumina MiSeq sequencing[J]. Food Research International, 2017, 91: 80-87. DOI:10.1016/j.foodres.2016.11.037.
- [7] 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. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2011.10.038.
- [8] 吴衍庸, 薛堂荣, 陈昭蓉, 等. 五粮液老窖厌氧菌群的分布及其作用的研究[J]. 微生物学报, 1991, 31(4): 299-307. DOI:10.13343/j.cnki.wsx.1991.04.007.
- [9] 熊亚, 陈强, 唐玉明, 等. 泸州老窖不同窖龄窖泥中乳酸菌多样性 PCR-DGGE分析[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(6): 1020-1024. DOI:10.3724/SP.J.1145.2013.01020.
- [10] 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(7): 176-181. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201317038.
- [11] 李芳莉. 浓香型白酒窖泥微生物群落结构分析及其对原酒风味物质的影响[D]. 郑州: 郑州轻工业学院, 2017: 14-18.
- [12] ZHANG L Q, WU C D, DING X F, et al. Characterisation of microbial communities in Chinese liquor fermentation starters *Daqu* using nested PCR-DGGE[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(12): 3055-3063. DOI:10.1007/s11274-014-1732-y.
- [13] ZHENG X W, YAN Z, ROBERT N M J, et al. Microbiota dynamics related to environmental conditions during the fermentative production of Fen-*Daqu*, a Chinese industrial fermentation starter[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 182/183: 57-62. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.008.
- [14] LIU M K, TANG Y M, GUO X J, et al. Deep sequencing reveals high bacterial diversity and phylogenetic novelty in pit mud from Luzhou Laojiao cellars for Chinese strong-flavor Baijiu[J]. Food Research International, 2017, 102: 68-76. DOI:10.1016/j.foodres.2017.09.075.
- [15] DING X F, WU C D, HUANG J, et al. Interphase microbial community characteristics in the fermentation cellar of Chinese Luzhou-flavor liquor determined by PLFA and DGGE profiles[J]. Food Research International, 2015, 72: 16-24. DOI:10.1016/j.foodres.2015.03.018.
- [16] 胡晓龙, 余苗, 曹振华, 等. 基于高通量测序的窖泥原核微生物群落多样性在退化窖池中的空间异质性[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 86-93. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200101-004.
- [17] 王春艳, 付博辰, 郭书贤, 等. 宋河浓香型白酒不同窖龄窖壁泥与窖底泥真菌菌群结构分析[J]. 中国酿造, 2021, 40(2): 88-91. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2021.02.017.
- [18] 孟雅静, 张会敏, 王艳丽, 等. 浓香型白酒窖泥的真核菌群结构分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(5): 96-105. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.014.
- [19] CAI W C, XUE Y A, TANG F X, et al. The depth-depended fungal diversity and non-depth-depended aroma profiles of pit mud for strong-flavor Baijiu[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 12: 789845. DOI:10.3389/fmicb.2021.789845.
- [20] 任海伟, 孙一帆, 王希, 等. 不同窖龄及位置浓香型白酒窖泥中细菌群落结构的差异性分析[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(9): 103-111. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.032026.
- [21] 吴浪涛, 丁文骏, 谢专, 等. 不同时期窖泥理化因子、风味物质和细菌组成的相关性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1030-1047. DOI:10.13344/j.microbiol.china.210775.
- [22] 李祖明, 张洪远, 王于广, 等. 酱香型窖泥理化指标的研究[J]. 食品科学, 2011, 36(9): 79-82; 87. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2011.0.9.044.
- [23] CHAI L J, QIAN W, ZHONG X Z, et al. Mining the factors driving the evolution of the pit mud microbiome under the impact of long-term production of strong-flavor Baijiu[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(17): e0088521. DOI:10.1128/AEM.00885-21.
- [24] 刘梅, 邓杰, 谢军, 等. 基于微生物群落结构相关的窖泥品质理化指标的筛选[J]. 食品科学, 2018, 39(19): 44-50. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201819008.
- [25] TAO Y, LI J B, RUI J P, 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. DOI:10.1128/AEM.04070-13.
- [26] 赵荣寿, 卓毓崇, 邓林, 等. 不同腐殖质含量窖泥在浓香白酒的应用研究[J]. 食品与发酵科技, 2021, 57(1): 79-82.
- [27] GONG Y, MA N, TANG H. Analysis of microbial community diversity in pit mud of Wuliangye Luzhou flavor Baijiu based on high-throughput sequencing[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2022, 68(11): 674-686. DOI:10.1139/CJM-2022-0125.
- [28] DENG B, SHEN C H, SHAN X H, et al. PCR-DGGE analysis on microbial communities in pit mud of cellars used for different periods of time[J]. Institute of Brewing & Distilling, 2012, 118: 120-126. DOI:10.1002/jib.2.
- [29] ZHANG W X, QIAO Z W, TANG Y Q, et al. Analysis of the fungal community in Zaopei during the production of Chinese Luzhou flavour liquor[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2012, 113(1): 21-27. DOI:10.1002/j.2050-0416.2007.tb00251.x.
- [30] WU Q, CHEN L Q, XU Y. Yeast community associated with the solid state fermentation of traditional Chinese Maotai-flavor liquor[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166(2): 323-330. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.003.
- [31] 张应刚, 许涛, 郑蕾, 等. 窖泥群落结构及功能微生物研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(11): 4327-4343. DOI:10.13344/j.microbiol.china.210154.
- [32] 周森, 王成, 朱绍宾, 等. 基于高通量测序技术分析浓香型白酒大曲真菌菌群多样性[J]. 中国酿造, 2021, 40(11): 55-59. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2021.11.010.
- [33] 肖琴, 何平, 周瑞平, 等. 不同窖龄及不同位置浓香型白酒窖泥的微生物群落多样性与理化因子的比较分析[J]. 食品科学, 2023, 44(20): 165-174. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221018-173.
- [34] HU X L, DU H, REN C, et al. Illuminating anaerobic microbial community and cooccurrence patterns across a quality gradient in Chinese liquor fermentation pit muds[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(8): 2506-2515. DOI:10.1128/AEM.03409-15.
- [35] 孙剑秋, 刘雯雯, 臧威, 等. 酱香型白酒酒醅中霉菌群落组成与功能酶活性[J]. 中国食品学报, 2013, 13(8): 239-247. DOI:10.16429/j.1009-7848.2013.08.026.
- [36] PEURA S, BERTILSSON S, JONES R I, et al. Resistant microbial cooccurrence patterns inferred by network topology[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2015, 81(6): 2090-2097. DOI:10.1128/AEM.03660-14.
- [37] FAUST K, RAES J. Microbial interactions: from networks to models[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(8): 538-550. DOI:10.1038/nrmicro2832.