

基于高通量测序的浓香型白酒窖池古菌群落 结构分析

邓杰, 卫春会, 罗惠波, 黄治国, 祝云飞, 王艳丽, 李觅, 万世旅

(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: 本试验利用罗氏 GS junior 高通量测序平台分析了 30 年窖龄的浓香型白酒窖池窖泥古菌群落结构, 结果发现: 3 口窖池样品共获得 8706 条有效序列, 282 个 OTUs 分类; 样品中古菌的 Shannon 曲线值在 4~5 之间就趋于稳定, Chao 曲线的值随着序列数的增加而增长。窖泥中古菌类群主要集中在 *Euryarchaeota* (广古菌门) 下的 *Thermoplasmata class* (热原体纲) 中的 *Thermoplasmataceae* (热原体科), *Methanobacteria class* (甲烷杆菌纲) 中的 *Methanobacteriaceae* (甲烷杆菌科), *Methanococci class* (甲烷球菌纲) 中的 *Methanomicrobiaceae* (甲烷微菌科)、*Methanocorpusculaceae* (甲烷八叠球菌科) 和 *Methanosarcinaceae* (甲烷粒菌科); *Saccharococcus sp.* 和 WCHD3-02 也有检测到。其中 *Thermoplasmataceae* 和 *Methanobacteriaceae* 占绝对优势, 分别为 39% 和 27%, 其它菌类 *Methanomicrobiaceae* 占 9%、*Methanosarcinaceae* 占 7% 和 *Methanocorpusculaceae* 占 4%、*Saccharococcus sp.* (糖球菌属) 占 1% 和 WCHD3-02 占 1%, unclassified 序列占 12%; 对甲烷菌类进行深入分析, 发现了 *Methanoculleus marisnigri strain*、*Methanoculleus bourgensis strain*、*Methanosarcina siciliae strain*、*Methanobacterium*、*Methanocorpusculum* 和 *Methanomicrobia* 等种属的菌种。

关键词: 浓香型窖泥; 古菌群落; 高通量测序; 甲烷菌

文章编号: 1673-9078(2015)8-205-210

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.033

High-throughput Sequencing of the Archaeal Community in Cellar Pit Mud used in Luzhou Flavor Liquor Production

DENG Jie, WEI Chun-hui, LUO Hui-bo, HUANG Zhi-guo, ZHU Yun-fei, WANG Yan-li, LI Mi, WAN Shi-lv
(Sichuan University of Science & Engineering, Liquor Making Bio-Technology & Application of Key Laboratory of
Sichuan Province, Zigong 643000, China)

Abstract: The structure of the archaeal community in pit mud from 30-year-old cellars that is used for the production of Luzhou flavor liquor was analyzed by a Roche GS junior high-throughput sequencing platform. A total of 8,706 valid sequences and 282 operational taxonomic units (OTUs) were obtained from samples in three cellars. The Shannon curves of archaea were stable in the range from 4 to 5 and the value of Chao curves increased with increasing sequence number. The predominant archaeal groups were of the phylum Euryarchaeota: *Thermoplasmataceae* of class Thermoplasmata, *Methanobacteriaceae* of class Methanobacteria, as well as *Methanomicrobiaceae*, *Methanocorpusculaceae*, and *Methanosarcinaceae* of class Methanococci. *Saccharococcus sp.* and WCHD3-02 were also detected. Among these, the dominant archaea groups were *Thermoplasmataceae* and *Methanobacteriaceae*, accounting for 39% and 27%, respectively; *Methanomicrobiaceae*, *Methanosarcinaceae*, *Methanocorpusculaceae*, *Saccharococcus sp.*, WCHD3-02, and unclassified sequences accounted for 9%, 7%, 4%, 1%, 1%, and 12%, respectively. Further study on methanogens showed the presence of *Methanoculleus marisnigri*, *Methanoculleus bourgensis*, *Methanosarcina siciliae*, *Methanobacterium*, *Methanocorpusculum* and *Methanomicrobia*.

Key words: pit mud of Luzhou-flavor liquor; archaeal community; high-throughput sequencing; methanogens

收稿日期: 2014-09-12

项目基金: 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放基金课题 (NJ2013-08); 四川理工学院人才引进项目 (2014RC28); 固态酿造关键技术研究四川省院士 (专家) 工作站开放基金项目 (GY2014-02)

作者简介: 邓杰 (1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程

通讯作者: 黄治国 (1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为发酵工程

浓香型白酒的发酵是以窖池为载体，酒醅为原料，在大量窖内微生物的作用下，经过一个周期的发酵产生具有风味独特的白酒^[1]。在这个过程中作为载体的窖池起到了非常重要的作用，窖池的优劣直接决定了白酒的品质和产量。“老窖出好酒”已成为共识，随着窖龄的增长，窖池中的窖泥微生物不断驯化形成了特有的优势菌群，这样的窖池所产白酒风味物质越多。老窖泥中栖息着大量的古菌，根据前人的研究表明，在窖泥古菌中有大量的产甲烷古菌，很多甲烷菌能和己酸菌类互营共生^[2]，这些将有利于提高己酸乙酯含量，增加浓香型白酒主要香味成分，提高优质酒的得率，所以研究窖泥中古菌的群落结构将对提高浓香型白酒品质有重要作用。

上世纪 80 年代成都微生物所利用传统方法研究布氏甲烷杆菌利用己酸梭菌代谢产生的 H₂ 结合 CO₂ 生产甲烷，解除己酸菌的代谢抑制作用^[2]，它们之间存在互营共生关系——种间氢转移，这种传统方法只能研究个别能够分离培养的菌，但对于大部分古菌到目前为止都无法进行纯培养。近几年研究者们开始利用分子生物学的方法对窖池微生物进行研究，黄治国等^[3]利用变性梯度凝胶电泳技术(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)、吴冬梅等^[4]利用 FISH 技术(Fluorescence in Situ Hybridization)和叶光斌等^[5]运用基因文库技术对窖泥微生物群落进行研究，但这些技术研究被检查微生物群落比例，也不能对样品中微生物群落进行较为完备的测序研究，同时工作量大、灵敏度不高。现在高通量测序技术已经运用于各种分子生物学领域^[6]，在人体微生物、水中生物、热泉微生物^[7-8]等多个领域都有应用。这项技术在土壤中微生物群落研究也有重要的运用，例如对土壤中氨氧化和亚硝化菌群和极地土壤微生物群落的研究^[9-10]。这种技术对微生物群落结构的研究有其明显的先进性和优势，读长长、实时检测、检测菌种比例等。本试验运用高通量测序技术对四川绵阳丰谷酒业有限责任公司 30 年窖龄浓香型白酒窖池窖泥中的古菌群落进行研究，建立一套高通量测序技术分析窖泥古菌群落的方法，利用 QIIME 软件能够准确、完整的解析浓香型白酒窖泥中古菌的群落结构。这将为解析浓香型不同地域不同窖龄窖泥中优势微生物和特征微生物提供指导，同时为建立白酒窖池微生物信息数据库和丰富土壤微生物多样性有重要作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

窖泥样品采自四川绵阳丰谷酒业有限责任公司丰谷镇生产基地 3 口 30 年窖池的窖泥，于窖壁上层（距窖口 50 cm）、下层（距窖底 50 cm）和窖底（窖池底部）分别取样，迅速置于冰盒运回，-20 °C 保藏。

1.2 试验试剂与仪器

TaqDNA polymerase、dNTPs、DL2000TM DNA Marker，宝生物工程(大连)有限公司；蛋白酶 K，Merck；溶菌酶，Sigma；琼脂糖、丙烯酰胺、N，N'-亚甲基双丙烯酰胺、去离子甲酰胺均购自 Solarbio；引物由上海英潍捷基生物技术公司合成；QIAquick Gel Extraction Kit 和 Quant-iT PicoGreen 定量试剂盒，上海柏丝特生物科技有限公司；MIBIO UltraClean SoilDNA Isolation Kit，购自深圳安必胜科技有限公司。

水平电泳仪，美国 Bio-rad Mini-subcell；凝胶成像分析系统，美国 Bio-rad ChemiDoc XRS+；PCR 仪，美国 Bio-rad C1000 Touch；高速冷冻离心机，美国 Thermo X1R；核酸蛋白微量检测仪，美国 MD SpectraMax Drop；可调式混匀仪，美国 SCILOGEX MX-S；高通量测序平台，美国 Roche GS junior。

1.3 总 DNA 的提取及 PCR 扩增

按窖池窖泥干重等质量称取三层样品，然后混合成 3 个样品，采用 MIBIO UltraClean SoilDNA Isolation Kit^[11]试剂盒提取窖泥中微生物总宏基因组，然后用核酸蛋白仪检测 DNA 的浓度和纯度，置于 -20 °C 备用。

选用通用引物 109F-518R^[12]，可以扩增出 410 bp 左右的片段。PCR 反应体系为 25 μL，体系包括 2.5 μL 10×Buffer，2 μL 25 mmol/L dNTP，2 uL MgCl₂，正反向引物 10 μM 各 0.5 uL，0.5 μL 5 U/μL EX Taq DNA 聚合酶，DNA 模板用量为 1 μL（原液 DNA 稀释 20 倍），16 μL ddH₂O。PCR 反应程序为：Touch Down PCR，94 °C 4 min；94 °C 15 s，56 °C 30 s，68 °C 80 s；72 °C 10 min。PCR 结束后取 3 μL PCR 扩增产物加入 0.8 μL 10×loading buffer 混匀，取 3 μL DL2000TM DNA Marker 做对照。于 1% 琼脂糖凝胶上 140 V 电泳 25 min，EB 染色，在凝胶成像系统中观察并拍照保存。

1.4 PCR 产物纯化及定量

采用 QIAquick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行切胶回收，然后按照 PCR 产物的检测方法检测。

采用 Quant-iT PicoGreen 定量试剂盒^[13]对胶回收之后的 PCR 产物进行定量, 首先按照试剂盒上的方法制作标准曲线, 1.56 ng/Well-100.00 ng/Well 平均分配 8 个梯度, 然后加入 96 孔黑色的荧光板, 在余下的 88 个加入 99 μ L 的 1 \times TE 缓冲液, 然后选择适当位置加入 1.0 μ L 纯化后的扩增 DNA 样本, 用酶标仪测定每个样本的吸光度, 同时将定量好的样品按照相同比例混合。

1.5 高通量测序

将定好量的 DNA 文库样本进行扩增子浓度计算, 然后设计制定 emPCR 体系, emPCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 4.5 min, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 共 50 个循环; 10 $^{\circ}$ C 保存。扩增完成后经过处理检测 emPCR 扩增结果。计算 DNA 文库需要的体积, 稀释扩增子, 然后将稀释之后的扩增子上 GS Junior 测序仪进行测序。

1.6 QIIME 软件数据分析

QIIME 软件是进行微生物群落分析的软件^[14], 已经用于分析和解释真菌、病毒、细菌和古细菌群落核酸数据, 利用该软件对样品数据进行质检和群落结构分析, 同时挑选出 OUT 中有代表性序列。对挑选的序列利用软件对测序数据进行总体分析后再利用 Greengenes 数据库进行 16S rRNA 基因序列的比对, 确定序列对应微生物的分类学地位。

2 试验结果与分析

2.1 样品文库的获得及定量

提取 3 个窖泥样品总 DNA, 然后对细菌 16S rRNA V6-V8 区基因的扩增, 最后再对 PCR 扩增结果进行胶回收, 混合获得样品文库 (如图 1、2)



图 1 30 年窖龄窖泥总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total extracted DNA in pit mud from 30-year-old cellars

对于样品文库采用 Quant-iT PicoGreen 定量试剂盒对样品 PCR 产物进行定量, 将回收的 3 个古菌 PCR 产物混合后进行定量。结果为 15.51 ng/100 μ L。根据取样定量均一性, 由计算可知 3 个古菌 PCR 产物胶回收混合样取 3.22 μ L 进行 emPCR。

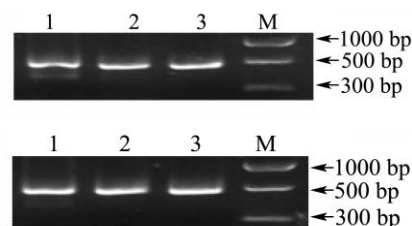


图 2 30 年窖龄窖泥古菌 PCR 扩增结果 (上图) 和胶回收结果 (下图)

Fig.2 PCR amplification and gel extraction of archaea in pit mud from 30-year-old cellars

注: M: Marker; 1: 30 年 1 号样; 2: 30 年 2 号样; 3: 30 年 3 号样。

2.2 古菌群落的 OUT 分类

3 个样品古菌 PCR 混合测序, 根据 barcode 标签序列筛选出有效序列, 并对处理后的有效序列进行数据及长度分布统计, 古菌共获得 8706 条有效序列。根据 97% 水平下 OTU 的丰度, 对有效序列利用 QIIME 软件处理划分操作分类单元, 共获得 282 个 OTUs 分类 (图 3), 使用 Rarefaction curve 对样品多样性进行评估, 得到样品稀释曲线 (图 4), Shannon 曲线和 Chao 曲线可以看出, 古菌的 Shannon 曲线值在 3~4 之间就趋于稳定, 而 Chao 曲线的值随着序列数的增加在不断的增长, 说明古菌群落的丰度相对较低, 而综合这个曲线的趋势说明还可以继续取样进一步的进行研究, 以发现更多的古菌菌种。

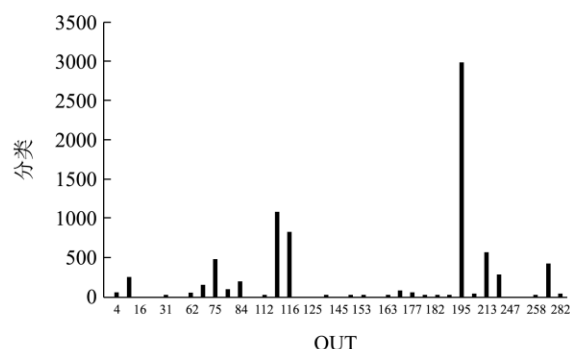


图 3 古菌 OTU 分类

Fig.3 OTU classification of archaea

2.3 古菌群类组成

利用 QIIME 软件对测序数据进行分析, 发现 30 年窖龄窖泥中古菌菌落主要是 *Euryarchaeota* (广古菌门) 下 *Thermoplasmata class* (热原体纲)、*Methanobacteria class* (甲烷杆菌纲) 和 *Methanococci class* (甲烷球菌纲), 主要优势古菌类为

Thermoplasmataceae (热原体科) 占 39% (110 个 OTUs) 和 *Methanobacteriaceae* (甲烷杆菌科) 占 27% (76 个 OTUs), 其它古菌类 *Methanobacteriaceae* (甲烷微菌科)、*Methanocorpusculaceae* (甲烷八叠球菌科) 和 *Methanosarcinaceae* (甲烷粒菌科) 分别占 9% (25 个 OTUs)、7% (20 个 OTUs) 和 4% (11 个 OTUs), *Saccharococcus* sp. 占 1% (3 个 OTUs) 和 uncultured archaeon WCHD3-02 占 1% (3 个 OTUs), Unclassified 序列类占 12% (110 个 OTUs)。各个科类选取具有代表性的 OTU 的序列, 利用 Mega 4.0 软件, 采用邻接法 (Neighbor-Joining) 建构系统发育树 (图 5), 表示出各个科类菌群的关系。

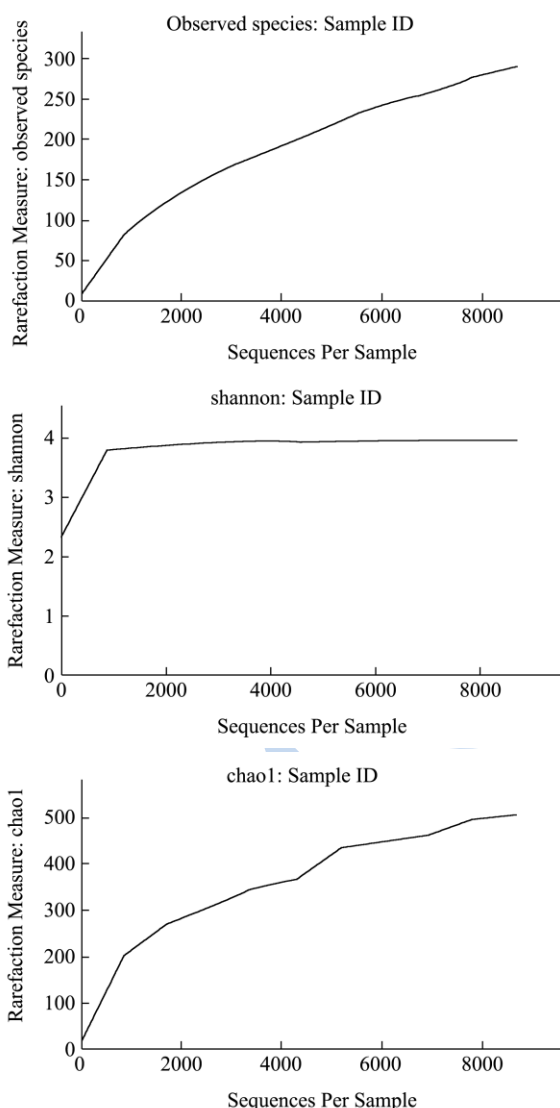


图 4 稀释性曲线、Shannon 指数、Chao 指数

Fig.4 Rarefaction curve (left), Shannon index (middle), and Chao Index (right)

2.4 甲烷群类组成

将试验测得的 8706 条有效碱基序列, 利用

QIIME 软件将碱基序列分为 282 个 OTUs, 得到 47% 的菌类为甲烷菌群, *Methanobacteriaceae* (甲烷杆菌科, 占 27%, 有 76 个 OTUs)、*Methanobacteriaceae* (甲烷微菌科, 占 9%, 有 25 个 OTUs)、*Methanocorpusculaceae* (甲烷八叠球菌科, 占 7%, 20 个 OTUs) 和 *Methanosarcinaceae* (甲烷粒菌科, 占 4%, 有 11 个 OTUs), 在甲烷菌群的 132 个 OTUs 中挑选序列, 主要挑选 4 个科中有代表性的序列, 对于 *Thermoplasmataceae* (热原体科, 占 39%, 有 110 个 OTUs) 是实验中检测到的最优势菌群, 分类较为复杂, 要在以后的论文中独立阐述, 而后再利用 Greengenes 数据库进行 16S rRNA 基因序列的比对, 选取具有代表性的序列, 再利用 Mega 4.0 软件, 采用邻接法 (Neighbor-Joining) 建构系统发育树 (图 6)。

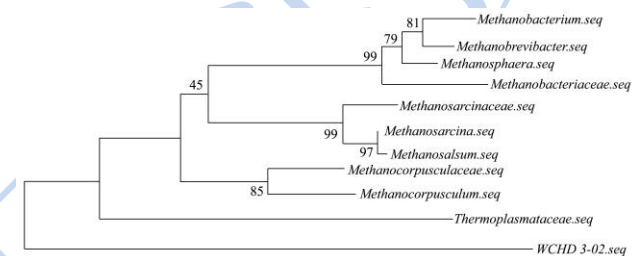


图 5 30 年窖泥古菌的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of the archaea in 30-year-old pit mud

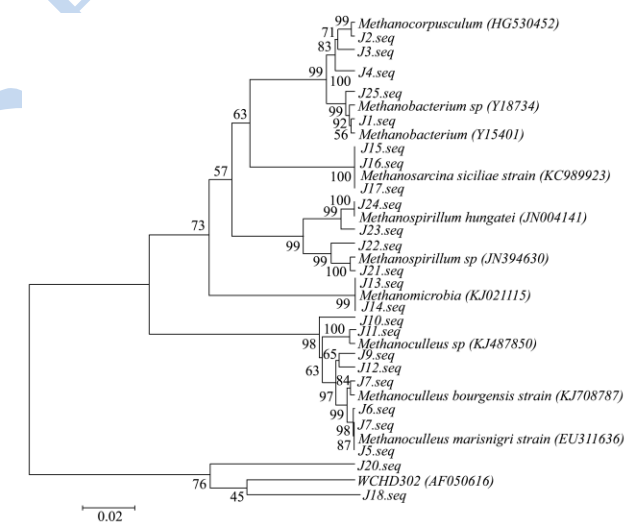


图 6 30 年窖泥中甲烷菌的系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree of the methanogens in pit mud of 30-year-old cellars

注: J1~J25 号菌均为对各个类群比对结果选择的具有代表性的菌。

由图 6 可以看出甲烷菌类种类较多, 其中分别为: *Methanoculleus* (甲烷袋状菌属)、*Methanosarcina siciliae* strain (八叠球菌属)、*Methanobacterium* (甲烷杆菌属)、*Methanocorpusculum* (甲烷粒菌属)、

Methanomicrobiaceae(甲烷微菌属)和*Saccharococcus* sp 等菌属的菌种。*Methanosarcina barkeri strain* (巴氏甲烷八叠球菌), *Methanoculleus marisnigri* (黑海甲烷袋状菌)、*Methanoculleus bourgensis strain* (布雷斯甲烷袋状菌)和*Methanospirillum hungatei* 等菌都有检出, 部分菌在以前研究窖泥的文献报道过, 如*Methanosarcina barkeri strain* 和*Methanobacterium* 在不同窖龄窖泥中有检出^[2], 在此比对的过程中 WCHD3-02 类的比对结果较差, 可信度较低。

3 结论

3.1 30 年窖龄窖泥属于较为老熟的窖泥, 老窖池中古菌群落研究较多的是甲烷菌, 检测到的主要的两种甲烷菌类 *Methanobacteriaceae* (甲烷杆菌科) 和 *Methanomicrobiaceae* (甲烷微菌科), 特别是 *Methanocorpusculum* 和 *Methanobacterium* 等为氢营养型产甲烷菌, 它们能够消耗己酸和乙酸代谢的 H_2 和 CO_2 , 解除己酸菌代谢的反馈抑制作用^[4]。其它种类的甲烷菌在有关窖泥的古菌中研究中均有报道^[2-4], 在窖泥中都显示出不同的生理功能, 具有重要作用; 在窖泥中发现 *Saccharococcus* sp (糖球菌属), 兼性厌氧, 具有产乳酸的功能, 嗜热, 适合于在发酵过程中利用葡萄糖产酸; 同时首次在窖泥中发现 WCHD3-02 菌, 并确定其占有量在 1% 左右。利用高通量测序对 30 年窖泥古菌群落结构研究, 虽然样品比较单一, 但数据显示检测出的菌种数据比利用 PCR-DGGE、PCR-SSCP 和基因文库等方法更全面^[3-4], 同时发现了一些在窖泥中以前未报道或很少见的古菌类, 如 *Saccharococcus* sp (糖球菌属) 和 WCHD3-02 菌类, 同时该研究还得出各类优势菌的含量, 根据数据显示也能比较客观的反映 30 年窖龄窖泥古菌的群落结构。说明通过高通量测序对窖泥古菌群落研究对功能菌的发现和筛选有指导意义, 同时能够更加完整的检测窖泥中的古菌群落。

3.2 在试验中古菌引物设计在 410 bp 左右, 随着高通量测序技术的发展, 对于罗氏 GS Junior+测序平台可以达到 800 bp 左右的长度, 提高测序通量, 测序数据对不同窖龄窖泥中微生物的区分度将扩大, 能够更好的了解窖泥中微生物的类群, 同时能够更加深入的比较不同窖龄窖泥和不同地域窖泥之间微生物的差异性。同时采集更多不同窖龄和不同地域的窖泥样品对其进行分析, 建立较为完善的窖内微生物信息数据库, 为白酒生产和提高白酒质量提供基础研究数据。

3.3 本实验得到 30 年窖龄窖泥中主要优势古菌菌落

是 *Euryarchaeota* (广古菌门) 下 *Thermoplasmataceae* (热原体科) 和 *Methanobacteriaceae* (甲烷杆菌科), 其它古菌类 *Methanobacteriaceae* (甲烷微菌科)、*Methanocorpusculaceae* (甲烷八叠球菌科)、*Methanosarcinaceae* (甲烷粒菌科)、*Saccharococcus* sp 和 WCHD3-02 也有发现, 通过以上分析可以说明利用高通量测序能对窖泥中古菌群落结构进行解析; 对甲烷菌类进行分析, 发现主要分布于 *Methanobacteria class* (甲烷杆菌纲) 中的 *Methanobacteriaceae* (甲烷杆菌科), *Methanococci class* (甲烷球菌纲) 中的 *Methanomicrobiaceae* (甲烷微菌科)、*Methanocorpusculaceae* (甲烷八叠球菌科) 和 *Methanosarcinaceae* (甲烷粒菌科), 分布于 *Methanosarcina siciliae strain* (八叠球菌属)、*Methanobacterium* (甲烷杆菌属) 等 6 个菌属中, 这说明利用高通量测序能对窖泥中重要的功能菌能够进行准确的分析。

参考文献

- [1] 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, 2010, 32(12): 91-96
HUANG Zhi-guo, ZHEN Pan, LUO Hui-bo, et al. Community structure of archaeal in the mud pit [J]. Journal of Southwest University (Nature science edition), 2012, 32(12): 91-96
- [2] 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
WANG Ming-yao, ZHANG Wen-Xue, WANG Hai-ying, et al. Phylogenetic diversity analysis of archaeal in the pit mud with different cellar age [J]. Chin. J. Appl. Environ. Biol., 2012, 18(6): 1043-1048
- [3] 黄治国, 赵斌, 卫春会, 等. 浓香型白酒窖泥古菌群落结构研究及其系统发育学分析[J]. 现代食品科技, 2014, 3: 28-32
HUANG Zhi-guo, ZHAO-bin, WEI Chun-hui, et al. Community structure and phylogenetic diversity analysis of archaeal in the mud pit [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 3: 28-32
- [4] 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, 1: 1-12
YE Guang-bin, LUO Hui-bo, YANG Xiao-dong, et al., Community structure of prokaryotes in pit mud of lu-flavor liquor from luzhou prefecture based on

- culture-independent approach, *Food Science*, 2013, 1: 1-12
- [5] 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
WU Dong-mei, HE Cui-rong, NIU Mei-can, et al. Study on the microbial community in pit mud by fluorescence in situ hybridization [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2012, 38(4): 15-19
- [6] Maccallum, et al. ALLPATHS 2: small genomes assembled accurately and with high continuity from short paired reads [J]. *Genome Biol.*, 2009, 10(10): R103
- [7] Yang F, Zeng X, Ning K, et al. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations [J]. *The ISME Journal*, 2011
- [8] 李晓然.基于核糖体 RNA 高通量测序分析微生物群落结构[D].复旦大学,2011
LI Xiao-ran. Using ribosomal RNA pyrosequencing to explore the microbial community structure [D]. Fudan University, 2011
- [9] Zhang L, Offre PR, He J, et al. Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 107(40): 17240-17245
- [10] Lehtovirta-Morley LE, Stoecker K, Vilcinskas A, Prosser JI, et al. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(38): 15892-15897
- [11] Xia W, Zhang C, Zeng X, et al. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil [J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(7): 1226-1236
- [12] 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
WANG Yan-wei, XU Feng-hua, RAN Zhi-yong, et al. Study on the methanogenic archaea communities in low temperature biogas digester by real-time PCR and DGGE methods [J]. *China Biogas*, 2012, 30(1): 8-12
- [13] Acosta-Martinez V, Dowd SE, Sun Y, et al. Pyrosequencing analysis for characterization of soil bacterial populations as affected by an integrated livestock-cotton production system [J]. *Applied Soil Ecology*, 2010, 45(1): 13-25
- [14] Chun-Lan Xu, Rui Sun, Xiang-Jin Qiao, et al. Protective effect of glutamine on intestinal injury and bacterial community in rats exposed to hypobaric hypoxia environment [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 16: 4662-4674