

基于 16S rDNA V4 与 V3-V4 可变区高通量测序对浓香型白酒窖泥菌群组成的比较分析

王艳丽, 张会敏, 孟雅静, 周庆伍, 梁金辉, 袁志强, 刘国英, 何宏魁, 李安军
(安徽省固态发酵工程技术研究中心, 安徽亳州 236820)

摘要: 本研究分别对新老窖泥样本的 16S rDNA V4 和 V3-V4 区进行 Illumina 高通量测序, 比较了测序的群落多样性参数、NMDS 聚类与优势门/属的相对丰度。V4 区的 OTUs 数目 (264~639) 显著低于 V3-V4 区 (459~1123); V4 区的 Shannon 指数在新、老池壁泥中 (2.47、5.02) 显著低于 V3-V4 区 (3.33、6.46), 而在新 (4.98 vs 5.98)、老 (5.64 vs 5.39) 池底泥样本中无显著差异 ($p>0.05$); V4 区的 Chao1 指数在新池底泥 (2455 vs 1358)、新池壁泥 (1326 vs 504) 和老池底泥 (3475 vs 1260) 中显著高于 V3-V4 区, 在老池壁泥中无显著差异 (1915 vs 1312) ($p>0.05$)。两个可变区的测序对 NMDS 聚类规律无影响。热图聚类结果显示, 两个可变区的优势门/属的相对丰度很接近, V4 区在属水平上更容易区分老窖池的池底泥。与 V3-V4 区相比, V4 区更利于区分池壁泥与池底泥, 且可以检测出甲烷菌的含量, 更有利于窖泥菌群组成分析。本研究为 16S rDNA 高通量测序中 V3-V4 区与 V4 区的选择提供一定参考。

关键词: Illumina 高通量测序; 窖泥菌群; V4 区; V3-V4 区

文章编号: 1673-9078(2020)06-147-154

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.1130

Comparative Analysis of Strong-flavor Baijiu Pit-mud Microbial Community Using High-throughput Sequencing Based on 16S rDNA V4 and V3-V4 Variable Regions

WANG Yan-li, ZHANG Hui-min, MENG Ya-jing, ZHOU Qing-wu, LIANG Jin-hui, YUAN Zhi-qiang, LIU Guo-ying, HE Hong-kui, LI An-jun

(The Center for Solid-state Fermentation Engineering of Anhui Province, Bozhou, 236820)

Abstract: In this study, Illumina high-throughput sequencing of 16S rDNA V4/V3-V4 variable regions of old and young pit-mud (PM) samples were performed. The diversity indices, NMDS clustering results, and the relative abundance of dominant phyla/genera of two variable regions were compared. The number of OTUs in V4 (264~639) were significantly lower than that of V3-V4 (459~1123). The Shannon indices of V4 in the young (2.47) and old (5.02) Wall-PM (WPM) samples were significantly lower than those of V3-V4 (3.33 and 6.46, respectively). Insignificant difference ($p>0.05$) was found between the young (4.98 vs 5.98) and old (5.64 vs 5.39) bottom-PM (BPM) samples. The Chao1 indices of V4 in the young BPM (2455 vs 1358), young WPM (1326 vs 504) and old BPM (3475 vs 1260) were significantly higher than those of V3-V4, with insignificant difference ($p>0.05$) in the old WPM samples (1915 vs 1312). The sequencing of the two variable regions had no effect on the NMDS clustering results. The heat-map clustering results showed that the relative abundance of the dominant phyla/genera for two variable regions were pretty similar, while it was easier for the V4 variable region to distinguish old BPM samples at the genus level. Compare with the V3-V4 region, the V4 variable region was more conducive to distinguishing between WPM and BPM and detecting the content of

引文格式:

王艳丽,张会敏,孟雅静,等.基于 16S rDNA V4 与 V3-V4 可变区高通量测序对浓香型白酒窖泥菌群组成的比较分析[J].现代食品科技,2020,36(6):147-154

WANG Yan-li, ZHANG Hui-min, MENG Ya-jing, et al. Comparative analysis of strong-flavor Baijiu pit-mud microbial community using high-throughput sequencing based on 16S rDNA V4 and V3-V4 variable regions [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 147-154

收稿日期: 2019-11-20

作者简介: 王艳丽 (1989-), 女, 硕士, 研究方向: 发酵微生物及其应用

通讯作者: 李安军 (1970-), 男, 高级工程师, 研究方向: 酿酒生产工艺技术、科研开发、质量管理工

methanogen, which allows efficient analysis of the PM microbial composition. This study provided a good reference for the selection of V3-V4 and V4 regions during high-throughput sequencing of 16S rDNA.

Key words: illumina high-throughput sequencing; Pit-mud microbial community; V4 variable; V3-V4 variable

窖泥是浓香型白酒发酵的基础,窖泥中丰富的微生物对浓香型白酒品质的形成具有非常重要的作用^[1]。其中浓香型白酒典型风格特征的“窖香味”也是由窖泥原核菌群代谢产生的^[2]。目前对原核菌群的分析方法很多,自21世纪以来,PCR-DGGE、PCR-SSCP等^[3,4]技术应用于窖泥原核菌群结构的研究,由于较低的分辨率,仅有少数优势菌被检测出来^[5]。磷脂脂肪酸(PLFA)等生物标记法也广泛应用于窖泥微生物研究,但菌株间PLFA相互干扰致使无法获得相对准确的菌群组成信息^[6]。现基于16S rDNA高通量测序分析在研究复杂环境微生物群落组成和相对丰度过程中具有广泛应用^[7,8]。

由于16S rDNA序列在可变区不同区域的保守度不一样,因此,扩增区域的选择会直接影响菌群多样性的分析结果^[9]。目前通过对窖泥样本16S rDNA不同可变区进行高通量测序分析窖泥原核菌群的研究很多,任聪等^[10]和张应刚等^[11]通过16S rDNA的V3-V4区分析了浓香型白酒不同窖龄窖池窖泥中丰度最高的菌属。张会敏^[12]通过16S rDNA的V4区解析了新老窖池窖泥的原核菌群组成差异。Cai等人^[13]研究发现,测序深度对低丰度细菌的鉴定影响很大。Noha Youssef等人^[14]指出可变区V4序列对微生物丰度及种属鉴定结果与全长16S rDNA序列分析结果更相似。Peiffer等人^[15]研究了引物对土壤微生物群落多样性的影响,发现V3-V4可变区可检出更多的门。因此,16S rDNA V3-V4与V4可变区对窖泥菌群测序结果的影响值得探讨。

本文基于Illumina MiSeq测序平台探究测序区域(V4区和V3-V4区)对新老窖池窖泥原核菌群组成分析结果的影响。本研究选取新窖池(窖龄5年)和老窖池(窖龄≥50年)窖泥作为研究对象,分别对池底泥和池壁泥宏基因组的16S rDNA V4与V3-V4可变区进行Illumina高通量测序,旨在为基于16S rDNA高通量测序中V3-V4与V4可变区的选择提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

窖泥样本,采自安徽知名浓香型白酒企业;Omega D5625土壤DNA提取试剂盒,Omega bio-tek公司;

T-vector质粒(B522211),上海生工生物工程股份有限公司。

1.2 仪器与设备

高速冷冻离心机,德国赛多利斯公司;DYY-4C电泳仪,北京六一生物科技有限公司;MN-913超微量核酸检测仪,美国MaestroGen公司;PCR仪,美国Thermo公司;MiSeq-PE-250高通量测序仪,美国Illumina公司。

1.3 方法

1.3.1 窖泥样本采集

取新窖池(窖龄5年)与老窖池(窖龄≥50年)的池底泥和池壁泥各6个。池底泥分别选取池底中心点、中心点与角点连线中间点以及角点的池底窖泥(2cm深度),混匀作为一个池底泥样本;池壁泥取四面池壁的中心点即黄水最高水位线覆盖处,混匀作为一个池壁泥样本。六个老窖池池底泥样本标记:BA1~BA6;6个老窖池池壁泥样本标记:WA1~WA6;6个新窖池池底泥样本标记:BC1~BC6;6个新窖池池壁泥样本标记:WC1~WC6。置于无菌袋中,于-80℃冷冻保存,待用。

1.3.2 DNA提取与Illumina高通量测序

窖泥DNA的提取:采用Omega D5625土壤DNA提取试剂盒。并通过0.8%琼脂糖凝胶电泳检测DNA提取质量,同时采用MaestroNano超微量分光光度计检测DNA的提取效果。然后,送至上海派森诺生物科技股份有限公司进行高通量测序,16S rDNA V4区和V3-V4区,V4区扩增引物参考^[16],V3-V4区扩增引物为338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),扩增体系与扩增程序参考^[16]。PCR产物纯化采用AXYGEN公司的AP-GX-50凝胶回收试剂盒。参照电泳初步定量结果,将PCR扩增回收产物进行荧光定量,仪器Microplate reader(BioTek, FLx800),试剂Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit,采用Illumina公司的TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit制备测序文库。确定DNA文库合格(Agilent 2100 Bioanalyzer),Illumina Miseq双向测序(MiSeq Reagent Kit V3)。

1.3.3 数据处理与统计学分析

运用 QIIME (v1.8.0) 软件识别疑问序列, 要求序列长度 ≥ 150 bp, 去除低质量原始测序数据, 且不允许存在模糊碱基 N 之外, 还将剔除: (1) 5'端引物错配碱基数 >1 的序列; (2) 含有连续相同碱基数 >8 的序列。并调用 USEARCH 检查并剔除嵌合体序列。随后, 利用 FLASH (v 1.2.7) 软件, 对通过质量初筛的双端序列根据重叠碱基进行配对连接。调用 UCLUST, 对前述获得的优质序列按 97% 的序列相似度进行归并和 OTU 划分, 并选取 OTU 中丰度最高的序列作为代表序列。采用 Greengenes 数据库 (Release 13.8) 注释代表序列, 作为代表 OTU 的注释结果。去除丰度值低于全体样本测序总量 0.001% (十万分之

一) 的 OTU, 并根据获得的 OTU 丰度矩阵, 使用 Qiime 软件 (v 1.8.0) 计算各样本的 Coverage、Shannon、Chao1 等参数, 使用 R 软件对 Unweightedd 的 UniFrac 距离矩阵进行 NMDS 分析 (R 3.3.2), 并对丰度靠前的门、属进行聚类分析并绘制热图。差异显著性分析通过 SPSS (24.0) 方差分析 (ANOVA) 实现。

2 结果与讨论

2.1 V4 区与 V3-V4 区测序窖泥原核微生物群落的 α 多样性

表 1 4 组窖泥样本的原核微生物群落丰度和多样性参数

Table 1 The prokaryotic community richness and diversity indices of 4 groups of PM samples (means \pm standard deviation, n=6)

样本	优质序列数目		Coverage/%		OTUs 数目	
	V4	V3-V4	V4	V3-V4	V4	V3-V4
BA	40600 \pm 2965	43882 \pm 7430.07	97.70 \pm 0.73	99.28 \pm 0.56	639 \pm 114.0 ^A	1122.7 \pm 120.3 ^C
BC	42306 \pm 5184	45306.17 \pm 7862.74	98.45 \pm 0.40	99.41 \pm 0.41	499.8 \pm 56.5 ^A	1292.7 \pm 284.8 ^C
WA	47216 \pm 2508	43471 \pm 2879.63	98.97 \pm 0.42	99.23 \pm 0.41	420.2 \pm 89.6 ^A	1164 \pm 168.8 ^C
WC	41658 \pm 7390	41744.17 \pm 4196.06	99.10 \pm 0.18	99.74 \pm 0.15	263.5 \pm 25.5 ^A	459.2 \pm 70.8 ^C

注: 右上角标注不连续大写英文字母的两者之间具有显著差异 ($p < 0.05$, 方差分析)。

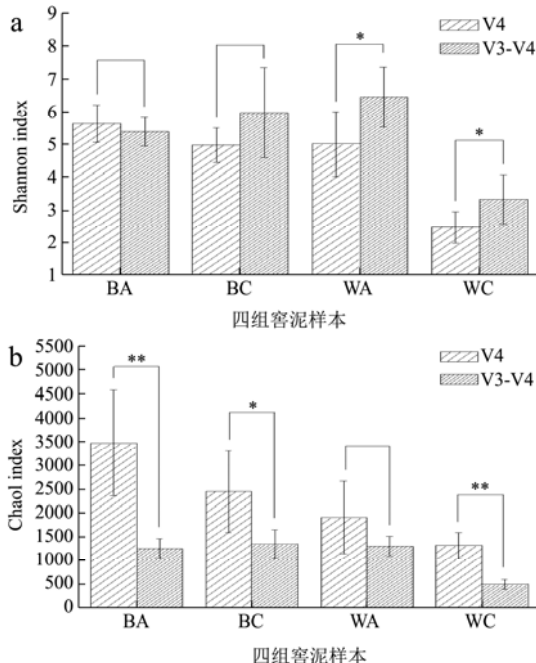


图 1 四组窖泥样本中原核微生物群落 Shannon 指数和 Chao1 指数

Fig.1 The prokaryotic community Shannon and chao1 index of 4 groups of PM samples

注: 图中*表示有显著差异 ($p < 0.05$, 方差分析), **表示极显著差异 ($p < 0.01$, 方差分析)。

分别对 16S rDNA V4 区和 V3-V4 区进行高通量

测序。V4 区测序共得到 1,030,663 条优质序列, 长度为 207 bp; V3-V4 区测序共得到 1,046,486 条优质序列, 长度为 405 bp。对两组数据同时进行抽平, 得到 25,774~28,145 条序列/样本。对抽平后的数据进行详细的分析结果如表 1 所示。V4 区与 V3-V4 区的测序覆盖率 (Coverage) 分别为 98.56% 和 99.42%, 说明对两个可变区的测序数足够, 可以代表窖泥原核菌群组成。且两组测序数据显示, 两者序列的注释度 (门、纲、目、科、属) 均大于 99.9%, 说明对 16S rDNA V4 区与 V3-V4 区的测序可实现对窖泥中大量未培养菌的系统分类。对两组数据进行 97% 相似度聚类, V4 区序列得到平均 456 个 OTU (238~805) / 样本; V3-V4 区序列得到平均 1010 个 OTU (459~1292) / 样本。说明含有两个可变区的 V3-V4 区序列, 其长度更长, 序列中的可变位点更多, 所以在相同的 97% 相似度下进行聚类, 其得到的 OTUs 数目更多。对 V4 区的 OTUs 数目分析可知, 同一部位老窖池窖泥中的 OTUs 数目显著多于新窖池窖泥, 相同窖龄池底窖泥中的 OTUs 数目显著多于池壁窖泥。与 Tao 等人的^[17]研究结果基本一致。而对 V3-V4 区的测序结果只显示出新池壁泥样本的 OTU 数目远远小于其余三者, 其它规律不明显。

两组测序数据所显示的微生物群落多样性

Shannon 指数和丰度 Chao1 指数如图 1 所示。两个可变区测序序列的 Shannon 指数相比,新池底泥(4.98 vs 5.98)、老池底泥(5.64 vs 5.39)不具有显著差异,而新池壁泥(2.47 vs 3.33)、老池壁泥(5.02 vs 6.46)具有显著差异($p < 0.05$, ANOVA)。四组窖泥相比,新窖池壁泥的 Shannon 指数(2.47/3.33)显著低于其余三者($p < 0.05$, ANOVA, 图中未标注)。两个可变区测序序列的 Chao1 指数相比, V4 区检测的 Chao1 指数在新窖池壁泥(1326 vs 504)、老窖池壁泥(1916 vs 504)、新窖池底泥(2455 vs 1358)和老窖池底泥(3475 vs 1260)中均不同程度的高于 V3-V4 区,其中两组池底泥和新窖池壁泥具有显著差异($p < 0.05$, ANOVA),而老窖池壁泥不具有显著差异($p > 0.05$, ANOVA)。四组窖泥相比,老窖泥的 Chao1 指数略大于新窖泥,而老窖池壁泥更接近于老窖泥。两个可变区的测序结果相比,均发现新窖池壁泥的多样性 Shannon 指数(2.47 vs 3.33)和丰度 Chao1 指数(1326 vs 504)最低。这与王春艳等人^[18]通过 V3-V4 区检测浓香型窖泥细菌群落结构分析发现新窖池壁泥 Shannon 指数(2.54)最低结果一致。

两个可变区测得的 OTUs 数目和 Shannon 指数与 Chao1 指数上表现了相反的趋势。OTUs 数目是 V4 区测序结果显著低于 V3-V4 区, Shannon 指数除了老窖池底泥, V4 区测序结果均低于 V3-V4 区,与刘明艳等人^[19]研究 16S rRNA 基因 V4 和 V3-V4 分析油藏细菌菌群发现与 V4 区测序相比 V3-V4 区测序获得的菌群 α 多样性指数 OTUs 数目(340 vs 145)和 Shannon 指数(3.15 vs 2.53)均有所降低,与本研究结果结论相反。而 Chao1 指数是 V4 区的测序结果均高于 V3-V4 区。说明两可变区测序获得的菌群 α 多样性各参数变化不一致。

2.2 窖泥原核群落 NMDS 分析

基于 unweighted unifrac 的距离矩阵分别对 24 个窖泥样本的 V4 区和 V3-V4 区原核菌群进行 Nonmetric Multidimensional Scaling (NMDS) 聚类分析,如图 2 所示。NMDS 图中,窖泥样本之间的距离在一定程度上代表了窖泥菌群之间的差异度,距离越近越相似,距离越远差异越大。两个可变区的聚类结果类似,四组窖泥样本中,老窖池的池底泥与新窖池的池壁泥两组窖泥样本聚类最集中,而老窖池的池壁泥与新窖池的池底泥聚类相对更分散。说明很可能两组窖泥正趋于老熟过程中,组内样本彼此之间的老熟程度差异比较大导致组内聚类分散度比较高,而窖龄大于 50 年的老窖池的池底泥处于相对稳定的老熟状态,窖龄为 5

年的新窖池的池壁泥则恰恰相反。Wang 等^[20]和陶勇等^[21]研究都证实老窖池窖泥微生物群落结构经过 25~50 年的驯化而趋于老熟稳定。

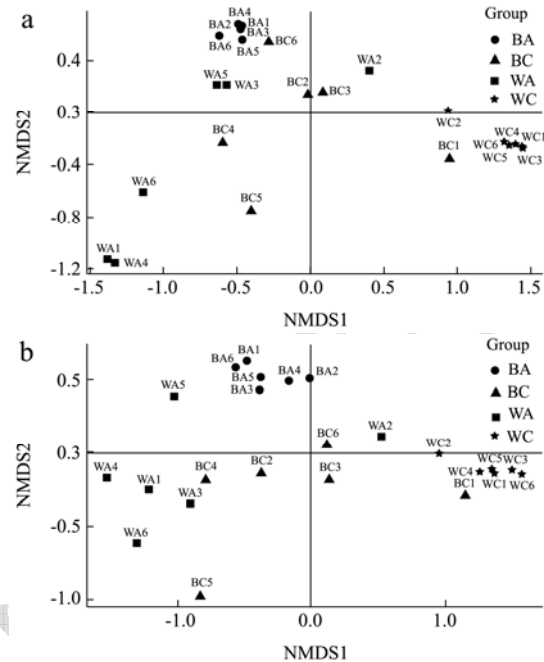


图 2 新/老窖泥样本菌群 unweighted unifrac distance 聚类图

Fig.2 Cluster analysis of the OTU composition of old/young of PM based on unweighted unifrac distance

注: a: V4 区; b: V3-V4 区。

分析四组窖泥的聚类分布结果很可能与其所在的理化环境有关。窖泥菌群与其理化环境是相互适应相互影响的。随着窖泥的老熟,老窖池的池底泥已经普遍形成了比较统一的厌氧环境^[22],所以相同窖龄的老窖池的池底泥的理化环境差异不大。同理窖龄很短的新窖池的池壁泥所处的理化环境普遍受酿酒环境中黄水的影响很小,制作窖泥的粘土的理化性质差异不大,所以导致其菌群组成很相似。而老窖池的池壁泥与新窖池的池底泥不同程度得处于老熟过程中,即其菌群组成为新窖池的池壁泥与老窖池的池底泥菌群组成的中间状态。

2.3 窖泥原核群落门、属水平比较热图分析

分别对 V4 区和 V3-V4 区的高通量测序序列进行注释后分析,定义各样本中相对丰度大于 0.1%的为优势门,大于 1%的为优势属。由于 V3-V4 区通用引物下游引物 806R 与 Hu 等人^[23]研究窖泥厌氧菌下游引物相同,且在其窖泥中扩增出一定量的古菌,因此受上游引物 338F 细菌偏好性影响,导致无法扩增出古菌。V4 区测序可以涵盖古菌,所以两个可变区的检测结果在古菌的相对丰度显示明显差异,即 V3-V4

区检测不出古菌，而 V4 区可以检测出古菌。古菌中的甲烷菌是浓香型白酒老窖泥的标志菌^[24]。

对通过 V4 区与 V3-V4 区测序分别得到的共有优势门（10 个）的比较热图分析，如图 3 所示。其中，通过 V4 区中检测得到的广古菌门的含量依次为：老窖池池壁泥（16.34%）、新窖池池壁泥（0.05%）、老窖池池底泥（4.99%）和新窖池池底泥（4.60%）。由于通过 V3-V4 区没有检测到广古菌门，所以两者没有可比性，将 V4 区中广古菌门的相对丰度归为 Others，不单列。通过对两个可变区测序分别得到的优势属（20 个）的比较热图分析结果，如图 4 所示。其中，通过 V4 区检测得到的甲烷菌的种类有：*Methanobrevibacter*、*Methanoculleus* 和 *Methanobacterium*。上述三种甲烷菌的总相对丰度依次为：老窖池池壁泥（15.90%）、新窖池池壁泥（0.05%）、老窖池池底泥（4.66%）和新窖池池底泥（4.59%）。同上，将 V4 区检测结果中甲烷菌的相对丰度归为 Others，不单列。采用不同颜色标注样本中优势门与优势属相对丰度的高低，颜色越红，相对丰度越高；颜色越蓝，相对丰度越低。

图 3 中，热图上方给出了各窖泥样本在门水平上的差异聚类分析，分为两大部分，新窖泥（左侧）和老窖泥（右侧）。四个新/老窖泥测序结果中，不同可变区的同一个样本的测序结果聚类在一起。表明采取 V4/V3-V4 不同可变区测序并没有改变同一个窖泥样本更接近的事实。

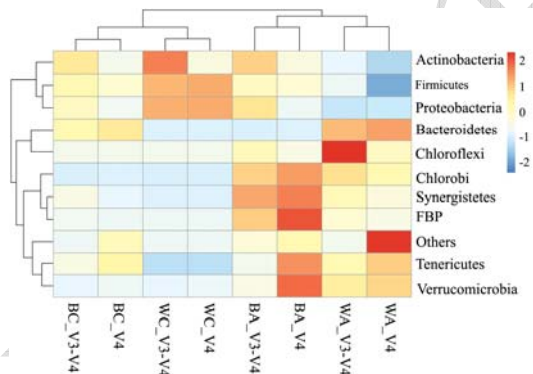


图 3 结合聚类分析的门水平群落组成热图

Fig.3 The heat map of phyla level community composition combined with cluster analysis

热图左侧给出了各优势门在不同样本中的组成聚类差异分析。分为上下两大部分。第一部分为最上面的 Firmicutes（厚壁菌门）、Actinobacteria（放线菌门）和 Proteobacteria（变形菌门），在新窖泥中相对丰度偏高。其中 Firmicutes（厚壁菌门）、Proteobacteria（变形菌门）在新窖池壁泥中 V4 区测得相对丰度（94.31%、3.84%）与 V3-V4 区测得相对丰度（92.98%、

3.77%）结果相当，而 Actinobacteria（放线菌门）在 V3-V4 区测序的新窖池壁泥中相对丰度（2.33%）偏高；第二部分为最下面的 Bacteroidetes（拟杆菌门）、Synergistetes（互养菌门）、Chloroflexi、Tenericutes、FBP、Chlorobi、Verrucomicrobia 在老窖泥中相对丰度偏高，其中 Synergistetes（互养菌门）、Chlorobi、Tenericutes、FBP 和 Verrucomicrobia 在 V4 区测序的老窖池底泥中相对丰度（12.68%、0.47%、1.31%、0.67% 和 0.30%）偏高，Chloroflexi 在 V3-V4 区测序的老窖池壁泥中相对丰度（1.79%）比较高。与陶勇等人^[23]通过 V4-V5 区可变区测序发现窖泥中的较优势的细菌类群依次为厚壁菌门（Firmicutes，占总序列的 66.8%）、拟杆菌门（Bacteroidetes，16.0%）、螺旋体门（Spirochaetes，2.2%）、放线菌门（Actinobacteria，1.8%）和绿弯菌门（Chloroflexi，1.0%）结果基本一致。说明在门的水平上 V3-V4 区与 V4 区测序得到的结果差异不大。

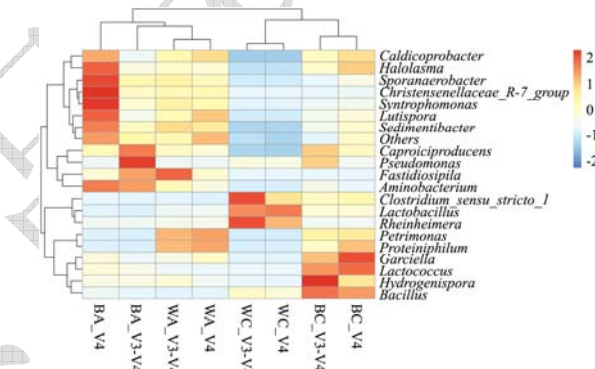


图 4 结合聚类分析的属水平群落组成热图

Fig.4 The heat map of genus level community composition combined with cluster analysis

图 4 中，热图上方给出了各窖泥样本在属水平上的差异聚类分析，分为两大部分，老窖泥（左侧）与新窖泥（右侧）。右侧分支，四个新窖泥测序结果中，不同可变区的同一个样本的测序结果聚类在一起。表明采取 V3-V4/V4 不同可变区测序并没有改变同一个新窖泥样本更接近的事实。左侧分支中，两个老窖池池壁泥的不同可变区的测序结果聚类在一起。而不同可变区的两个老窖池池底泥的测序结果相比，V3-V4 区的测序结果与老窖池池壁泥更接近。说明 V4 区的测序结果对区分老窖池池壁泥与池底泥的差异性更有利。

从左侧各优势属在不同样本中的组成聚类差异分析结果可知，两个老窖池池底泥的测序结果差异主要表现在 *Caldicoprobacter*、*Haloplasma*、*Sporanaerobacter*、*Syntrophomonas*、*Christensenellaceae_R-7_group*、*Lutispora*、*Sedimentibacter* 和 *Caproiciproducens*、

Fastidiosipila、*Pseudomonas* 上,前者通过 V4 区的高通量测序得到的相对丰度较大,后者通过 V3-V4 区测序得到的相对丰度较大。其余各属在不同可变区的测序结果之间差异不显著。可知,在属的水平上 V3-V4/V4 可变区对老窖池的池底泥的测序结果影响比较大。这可能是受 V3-V4 引物偏好性的影响,导致 V3-V4 区中测序的各类菌属的相对丰度与老窖池池壁泥中属的相对丰度更接近。而使在属的水平上 V3-V4/V4 可变区对老窖池的池底泥的测序结果差异显著。

两个可变区的测序结果均显示 *Caproiciproducens*、*Caldicoprobacter*、*Haloplasma*、*Sporanaerobacter*、*Lutispora*、*Christensenellaceae*、*R-7_group*、*Syntrophomonas*、*Sedimentibacter*、*Fastidiosipila*、*Pseudomonas* 和 *Aminobacterium* 在老窖泥中相对丰度比较高,特别是老窖池的池底泥中以 V3-V4 区测序结果为例, *Caproiciproducens*、*Aminobacterium*、*Fastidiosipila* 和 *Pseudomonas* 相对丰度依次为 43.63%、10.48%、6.91% 和 2.96%。其中 *Syntrophomonas* 代谢产生乙酸和 H_2 , 与甲烷菌相互共生^[25]。*Caproiciproducens* 代谢产氢气、二氧化碳、乙醇、乙酸、丁酸和己酸^[26], *Fastidiosipila* 可以利用糖类产乙酸和丁酸^[27], 是合成浓香型白酒主体香味物质的重要前提物质。*Aminobacterium* 是氨基积累菌属具有降解乳酸的功能^[28]。它们在窖泥老熟过程中发挥了积极作用,与陶勇等^[21]人研究结论一致。*Lactobacillus* (乳酸菌属)、*Bacillus* (芽孢杆菌属)、*Hydrogenispora* (氢胞菌属)、*Clostridium_sensu_stricto_1* (梭菌属)、*Petrimonas* (单胞菌属)、*Proteiniphilum*、*Lactococcus*、*Garciella* 和 *Rheinheimera* 在新窖泥中比较高。以 V3-V4 区测得的新窖池壁泥为例, 乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 相对丰度为 81.86% 是绝对优势种群。陶勇等人^[21]研究发现在 1 年窖龄的新窖泥中乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 为绝对优势种群, 占 62.3%。袁玉菊等人^[29]的研究也发现 *Lactobacillus* 与 *Bacillus* 等菌属在新窖泥中丰度最高为主要优势菌属, 与本研究结果一致。Zheng 等人^[30]研究也发现窖泥中 *Lactobacillus* 的含量会随着泸州老窖窖龄的增长而显著降低。而过量的乳酸与窖泥中的钙、铁等离子结合形成过多的乳酸钙和乳酸亚铁, 造成窖泥钙化板结。因此窖泥中乳酸和乳酸菌的含量应适量。结合本文研究结果, 可以发现, 新窖泥中乳酸菌含量相对偏多, 不利于窖泥菌群的多样性和丰度提升, 与图 1 中的结论基本一致。

3 结论

本研究分别对新/老窖池池底泥和池壁泥样本的 16S rDNA V4 区和 V3-V4 区进行高通量测序, 并对窖泥菌群的 α 多样性参数、NMDS 聚类情况、优势菌门/属的相对丰度进行了比较分析。

(1) 通过 V4 区测序得到的 OTUs 数目 (264~639) 显著低于通过 V3-V4 区 (459~1123) 的检测结果; 而 V4 区得到的 Chao1 指数在新池底泥 (2455 vs 1358)、新池壁泥 (1326 vs 504) 和老池底泥 (3475 vs 1260) 中显著高于 V3-V4 区, 而在老窖池池壁泥中 V3-V4 区的 Chao1 指数无显著差异 (1915 vs 1312) ($p>0.05$); V4 区的 Shannon 指数在新、老池壁泥中 (2.47 vs 5.02) 显著低于 V3-V4 区 (3.33 vs 6.46), 而在新 (4.98 vs 5.98)、老 (5.64 vs 5.39) 池底泥样本中无显著差异 ($p>0.05$)。群落 α 多样性参数 OTUs 数目、Shannon 指数和 Chao1 指数在新窖池池壁泥中最低; 新/老窖泥相比, 新窖泥在 V4 区的 OTUs 数目、Shannon 指数和 Chao1 指数均不同程度的低于老窖泥。

(2) 两个可变区测序结果的 NMDS 聚类规律一致, 均是老窖池池底泥与新窖池池壁泥的组内聚类更集中, 老窖池池壁泥和新窖池池底泥的组内聚类更分散, 说明两个可变区的测序对聚类结果无影响。

(3) V4 区测序可以检测出广古菌门 (如甲烷菌) 的含量, 而 V3-V4 区检测不出。

(4) 在门的水平上 V4/V3-V4 可变区测序得到的结果相似; 在属的水平上, 老窖池池底泥 V3-V4 区的测序结果与老窖池池壁泥的 V4/V3-V4 区的测序结果更接近。说明 V4 区的测序结果对区分老窖池池壁泥与池底泥的差异性更有利。

综上, 两个可变区测得得优势菌门/属相对丰度差异很小, V4 区更有利于区分池壁泥与池底泥, 且 V4 区可以检测出窖泥中甲烷菌的含量, 所以通过 V4 区测序更有利于窖泥菌群的综合分析。

参考文献

- [1] 张志伟. 浓香型白酒窖泥微生物的研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2018
ZHANG Zhi-wei. Study on pit microorganism of Luzhou flavor liquor [D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2018
- [2] ZHANG Yan-yan, ZHU Xiao-yu, LI Xiang-zhen, et al. The process-related dynamics of microbial community during a simulated fermentation of Chinese strong-flavored liquor [J].

- BMC Microbiology, 2017, 17(1): 196
- [3] ZHENG Jia, LIANG Ru, ZHANG Li-qiang, et al. Characterization of microbial communities in strong aromatic liquor fermentation pit muds of different ages assessed by combined DGGE and PLFA analyses [J]. Food Research International, 2013, 54(1): 660-666
- [4] ZHENG Jia, WU Chong-de, HUANG Jun, et al. Spatial distribution of bacterial communities and related biochemical properties in Luzhou-flavor liquor-fermented grains [J]. Journal of Food Science, 2014, 79(12): 2491-2498
- [5] 刘驰,李家宝,芮俊鹏,等.16S rRNA 基因在微生物生态学中的应用[J].生态学报,2015,35(9):2769-2788
LIU Chi, LI Jia-Bao, RUI Jun-Peng, et al. The applications of the 16S rRNA gene in microbial ecology: current situation and problems [J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(9): 2769-2788
- [6] 刘琨毅,卢中明,郑佳,等.浓香型白酒窖泥微生物群落 PLFA 指纹图谱方法[J].应用与环境生物学报,2012,18(5):831-837
LIU Kun-yi, LU Zhong-ming, ZHENG Jia, et al. PLFA fingerprint method for assessing microbial communities of strong aromatic liquor pit mud [J]. Applied and Environmental Biology, 2012, 18(5): 831-837
- [7] Young-DoNam, So-YoungLee, Seong-IlLim. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 155(1-2): 36-42
- [8] ZHAO Ming, ZHANG Dong-lian, SU Xiao-qin, 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
- [9] Anna Engelbrektson, Victor Kunin, Kelly C Wrighton, et al. Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness [J]. The ISME Journal, 2010, 4(5): 642
- [10] 任聪,辜杨,杜海,等.基于新老窖泥的微生物菌群结构判定浓香型白酒生产中的主体己酸菌[J].食品与发酵工业,2018, 44(12):8-14
REN Cong, GU Yang, DU Hai, et al. Predicting dominant caproate-producing microbes by comparing the microbiotas between new- and aged-pit muds [J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(12): 8-14
- [11] 张应刚,邓宇.基于高通量测序的不同窖龄窖泥微生物结构与多样性分析[J].中国沼气,2019,37(3):3-8
ZHANG Ying-gang, DENG Yu. Microbial structure and diversity of cellar mud at different winery cellar age based on high-throughput sequencing [J]. China Biogas, 2019, 37(3): 3-8
- [12] 张会敏.古井贡酒微生物群落结构及其与主要风味物质的关联研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2017
ZHANG Hui-min. Study on Gujingtribute microbial community structure and its association with liquor flavor [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2017
- [13] CAI Lin, YE Lin, TONG Amy-hin-yan, et al. Biased diversity metrics revealed by bacterial 16S pyrotags derived from different primer sets [J]. PloS One, 2013, 8(1): e53649
- [14] Noha Youssef, Cody S. Sheik, Lee R. Krumholz, et al. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(16): 5227-5236
- [15] Jason A. Peiffer, Aymé Spor, Omry Koren, et al. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(16): 6548-6553
- [16] 张会敏,孟雅静,王艳丽,等.新老窖池黄水的差异性及静置培养对其影响分析[J].食品科学,2020,41(1):215-222
ZHANG Hui-min, MENG Ya-jing, WANG Yan-li, et al. The difference of huangshui from old and young mud pits and the effect of static culture on it [J]. Food Science, 2020, 41(1): 215-222
- [17] TAO Yong, LI Jia-bao, RUI Jun-peng, et al. Prokaryotic communities in pit mud from different-aged cellars used for the production of Chinese strong-flavored liquor [J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(7): 2254-2260
- [18] 王春艳,宋建阳,吕慧鑫,等.基于高通量测序的宋河浓香型白酒不同窖龄窖泥细菌群落结构分析[J].中国酿造,2019, 8(9):163-166
WANG Chun-yan, SONG Jian-yang, LV Hui-xin, et al. Analysis of bacterial community structure in strong-flavor Baijiu pit mud with different cellar ages from Songhe distillery based on high-throughput sequencing [J]. China Brewing, 2019, 8(9): 163-166
- [19] 刘明艳,马嘉晗,李瑜,等.16S rRNA 基因高变区 V4 和 V3-V4 及测序深度对油藏细菌菌群分析的影响[J/OL].微生物学报,1-12[2020-02-25]
LIU Ming-yan, MA Jia-han, LI Yu, et al. Influence of 16S rRNA gene V4 and V3-V4 sequencing and sequencing depth on unraveling bacterial communities inhabiting oil reservoirs

- [J]. Microbiology China, 1-12[2020-02-25]
- [20] WANG Ming-yue, ZHANG Wen-xue, WANG Hai-ying, et al. Analysis of bacterial phylogenetic diversity of pit muds with different cellar ages [J]. Food Science, 2013, 34: 177-181
- [21] 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): 1800-1807
TAO Yong, RUI Jun-peng, LI Jia-bao, et al. Microbial community compositions and diversity in pit mud of Chinese Luzhou-flavor liquor [J]. Chemical Industry and Engineering, 2014, 65(5): 1800-1807
- [22] 赵东, 郑佳, 彭志云, 等. 高通量测序技术解析五粮液窖泥原核微生物群落结构[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(9): 1-8
ZHAO Dong, ZHENG Jia, PENG Zhi-yun, et al. Prokaryotic microbial community in Wuliangye pit mud using NextSeq high-throughput sequencing technology [J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(9): 1-8
- [23] HU Xiao-long, DU Hai, REN Cong, et al. Illuminating anaerobic microbial community and cooccurrence patterns across a quality gradient in Chinese liquor fermentation pit muds [J]. Appl Environ Microbiol, 2016, 82(8): 2506-2515
- [24] 杜礼泉. 窖泥及窖泥功能菌液微生物群落的研究进展与发展趋势[J]. 中国酿造, 2018, 37(10): 6-9
DU Li-quan. Research progress and development trend of microbial community in pit mud and its functional strain liquid [J]. China Brewing, 2018, 37(10): 6-9
- [25] ZHANG Chun-yan, LIU Xiao-li, DONG Xiu-zhu. *Syntrophomonas curvata* sp. nov., an anaerobe that degrades fatty acids in co-culture with methanogens [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2004, 54(3): 969-973
- [26] Byung-Chun Kim, Byoung Seung Jeon, Seil Kim, Hyunook Kim, et al. *Caproiciproducens galactitolivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium capable of producing caproic acid from galactitol, isolated from a wastewater treatment plant [J]. International Journal of Systematic, 2015, 65(12): 4902-4908
- [27] 王晓华, 李蕾, 何琴, 等. 驯化对餐厨垃圾厌氧消化系统微生物群落结构的影响[J]. 环境科学学报, 2016, 36(12): 4421-4427
WANG Xiao-hua, LI Lei, HE Qin, et al. Influence of inoculum acclimation on microbial community structure in anaerobic digesters treating food waste [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2016, 36(12): 4421-4427
- [28] LIU Chao-lan, HUANG Dan, LIU Lai-yan, et al. *Clostridium swelfunianum* sp. nov., a novel anaerobic bacterium isolated from the pit mud of Chinese Luzhou-flavor liquor production [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2014, 106(4): 817-825
- [29] 袁玉菊, 张倩颖, 曾丽云, 等. 不同性状窖泥的细菌群落结构与酸酯含量分析[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(1): 44-48
YUAN Yu-ju, ZHANG Qian-ying, ZENG Li-yun, et al. Analysis of bacterial community and acid, ester contents in pit mud with different characteristics [J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(1): 44-48
- [30] ZHENG Qi, LIN Bai-rong, WANG Yi-bin, et al. Proteomic and high-throughput analysis of protein expression and microbial diversity of microbes from 30-and 300-year pit muds of Chinese Luzhou-flavor liquor [J]. Food Research International, 2015, 75: 305-314

(上接第 242 页)

- [12] 张静, 马培勇, 邢献军, 等. 基于热重分析的糯米等温干燥动力学[J]. 过程工程学报, 2017, 17(6): 1233-1238
ZHANG Jing, MA Pei-yong, XING Xian-jun, et al. Isothermal drying kinetics of paddy based on thermogravimetric analysis [J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2017, 17(6): 1233-1238
- [13] 李升升, 靳义超. 加热介质和时间对牦牛肉品质的影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(10): 174-178
LI Sheng-sheng, JIN Yi-chao. Quality changes of yak meat under different heat medium and time [J]. Food & Machinery, 2017, 33(10): 174-178
- [14] 黄彩燕, 孙宝忠, 韩玲, 等. 不同贮藏温度市售热鲜肉新鲜度变化研究[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(4): 1106-1113
HUANG Cai-yan, SUN Bao-zhong, HAN Ling, et al. Study on freshness changes of retailed hot fresh beef at different storage temperature [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(4): 1106-1113
- [15] 马纪兵, 张丽, 王妍, 等. 风干牦牛肉加工过程中水分状态变化及质构相关性分析[J]. 农业工程学报, 2018, 34(7): 294-300
MA Ji-bing, ZHANG Li, WANG Yan, et al. Analysis on correlation between change of moisture status and texture during processing of air-dried yak meat [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2018, 34(7): 294-300