

# 窖泥细菌群落结构演替及其与环境因子的相关性

陶 勇<sup>1,3</sup>, 徐占成<sup>2</sup>, 李东迅<sup>1</sup>, 刘孟华<sup>2</sup>, 樊科权<sup>2</sup>, 姚 开<sup>3</sup>

(1.中国科学院成都生物研究所,四川 成都 610041;2.四川剑南春(集团)股份有限公司,四川 绵竹 618200;  
3.四川大学食品与轻纺学院,四川 成都 610065)

**摘要:** 利用 PCR-DGGE 系统研究了剑南春不同窖龄(2~50 年)窖泥的微生物群落结构、种群演替趋势及其与环境因子的相关性。结果表明 2 年窖龄窖泥的细菌丰度和多样性指数与 5 年样品相似,而 10 年窖龄窖泥的细菌丰度和多样性指数则明显增加,之后的 10 年基本持平,但 50 年时又显著下降。相同窖龄的窖泥样品中,中层的物种丰度和多样性指数均高于上层和下层,特别是在 2~5 年样品中这一趋势更加明显。DGGE 和序列分析显示,窖泥中优势种群均分布在厚壁菌门(Phylum Firmicutes)的杆菌纲(Class Bacill)和梭菌纲(Class Clostrida),其中耐酸乳杆菌(*Lactobacillus acetotolerans*)、芽孢菌(*Bacillus fordii*)、未培养的瘤胃菌(uncultured *Ruminococcaceae* bacterium)和梭菌(uncultured *Clostridia* bacterium)为窖泥样品中的主要优势种群。典型对应分析显示,窖泥微生物群落结构与环境因子具有显著的相关性,其中有效磷、氨氮、pH 对微生物群落结构的影响较大,其次是腐殖质,而水分含量的影响较小。

**关键词:** 微生物; 窖泥; 细菌; 群落结构; 环境因子; 变性梯度凝胶电泳

中图分类号:Q93-3;TS262.31;TS261.1;Q938 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2011)09-0042-05

## Succession of Bacterial Community in Pit Mud and Its Correlations with Environmental Factors

TAO Yong<sup>1,3</sup>, XU Zhancheng<sup>2</sup>, LI Dongxun<sup>1</sup>, Liu Menghua<sup>2</sup>, Fan Kequan<sup>2</sup> and Yao Kai<sup>3</sup>

(1. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Science, Chengdu, Sichuan 610041; 2. Sichuan Jiannanchun Group Co.Ltd. Mianzhu, Sichuan 618200; 3. Textile & Food Science Department of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

**Abstract:** Bacterial community succession in pit mud of different age (from 2 years to 50 years) in Jiannanchun Group and its correlations with environmental factors were systematically studied by PCR-DGGE methods. The results were as follows: bacterial abundance and bacterial diversity index displayed high similarity between 2-year-old and 5-year-old pit mud samples, however, they increased obviously in 10-year-old pit mud samples and then kept stable in 20-year-old pit mud samples, and then dramatically declined in 50-year-old pit mud samples; for pit mud of the same age, bacterial abundance and bacterial diversity index in medium layer were higher than that in the upper or lower layer, especially for pit mud samples of 2~5 years; DGGE profile and sequences analysis indicated that the dominant bacterial populations in pit mud samples were mainly distributed in Class Bacill and Clostrida of Phylum Firmicutes. The predominant bacteria included *Lactobacillus acetotolerans*, *Bacillus fordii*, uncultured *Ruminococcaceae* bacterium, and uncultured *Clostridia* bacterium; CCA results revealed that there was significant correlations between environmental factors and bacterial community in pit mud. Among all environmental factors, available phosphorous, ammonia nitrogen and pH had stronger influence on bacterial community structure in pit mud, then followed by humics and moisture content the least.

**Key words:** microbe; Pit mud; bacteria; community structure; environmental factor; DGGE

浓香型白酒的生产是以窖泥微生物、大曲微生物、糟醅微生物等复杂的物质能量代谢过程为前提,其中窖泥微生物的作用使得浓香型白酒产生浓郁的窖香<sup>[1]</sup>。生产经验表明,窖池窖龄与酿酒质量关系极为密切,只有老窖才能出好酒。如以泸州特曲为代表的浓香型白酒,有些专家认为,50 年以上的老窖才能生产特头曲,20 年左右的

窖池只能生产二曲、三曲酒<sup>[2]</sup>,由此可见,老窖池对于浓香型白酒生产及品质的重要性。窖泥微生物区系极为复杂,它是经过长期的驯化和演替而逐渐形成的。前人利用传统方法对窖池微生物区系的解析<sup>[3]</sup>、纯种分离及作用机理<sup>[4-8]</sup>等方面做了大量研究工作,为大曲白酒的发展做出了重大贡献。但研究表明,通常环境中可培养的细菌仅

收稿日期:2011-05-20

作者简介:陶勇(1972-),男,博士后,副研究员,主要从事环境微生物学研究。

通讯作者:徐占成,中国白酒杰出贡献著名科学家、享受国务院政府津贴专家,主要从事白酒酿造与酒质评定工作,所主持的项目 2 次获中国食品工业协会科技进步一等奖。

占细菌总数的 0.1%~10%<sup>[9-10]</sup>,大量的细菌不能培养或现阶段难于培养,因此,采用传统的分离培养方法研究窖泥微生物区系有一定的局限性。

近年来,有些学者尝试借助于现代分子生物学技术研究窖泥微生物群落,如罗惠波等采用 PCR-SSCP 技术研究窖池微生物群落<sup>[11-12]</sup>,邓依等采用 16S-23S rRNA ITS-AFLP 指纹图谱分析窖泥原核微生物多样性<sup>[13]</sup>,陕小虎等对利用 PCR-DGGE 技术研究窖泥微生物的电泳条件进行了优化和探讨<sup>[1]</sup>。3 种方法比较,DGGE 除了可较好地反映样品的微生物群落结构外,还可对优势条带切胶回收,并进行序列测定和分析,从而可以进一步了解优势菌种的种属分类。总体来说,利用现代分子生物学方法系统研究窖泥微生物群落结构与演替趋势,以及与环境因子的相关性研究相对较少。本研究以剑南春不同窖龄的窖泥为研究对象,采用 PCR-DGGE 技术对不同窖龄窖泥的微生物群落结构和变化趋势进行系统研究,并利用典型对应分析(CCA)探讨了微生物群落结构与环境因子的相关性,为全面了解窖泥微生物区系分布及主要功能微生物,进而为老窖环境的人工模拟及条件控制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

窖泥样品取自四川剑南春股份有限公司各生产车间,窖龄分别为 2 年、5 年、10 年、20 年以及 50 年,取样按窖池自上而下,分上(距池口约 40 cm)、中、下层(距池底约 40 cm),每层多点取样混匀,所得窖泥样品一部分用于测定水分、pH 值及矿物质元素等指标,剩余部分用于窖泥原基因提取。

### 1.2 理化指标检测

窖泥理化指标(水分含量、pH、氨态氮、有效磷及腐殖质等)的测定,参照《酿酒分析与检测》<sup>[14]</sup>所述方法分析测定。

### 1.3 基因组 DNA 提取<sup>[15]</sup>

取 5 g 样品于 50 mL 离心管中,加入 13.5 mL DNA 提取 Buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM sodium EDTA, 100 mM sodium phosphate, 1.5 M NaCl, 1% CTAB) 和 10  $\mu$ L 蛋白酶 K (100 mg/mL),于 37  $^{\circ}$ C、225 r/min、30 min;加入 20% SDS 1.5 mL,60  $^{\circ}$ C 孵育 1 h (每隔 20 min 轻轻颠倒离心管)室温离心 10 min、6000 g,收集上清液。向泥土沉淀中加入 4.5 mL DAN 提取 Buffer 和 0.5 mL 20% SDS,漩涡混匀 10 s 于 65  $^{\circ}$ C、5 min,室温离心 10 min、6000 g,收集上清液(重复 2 次),混合所有上清液,加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1),室温离心 5 min、16000 g 收集水相,加入 0.6 倍体积的异丙醇沉淀,室温放置 1 h,

室温离心 20 min、16000 g,弃上清液,加入冰冷的 70% 的乙醇,室温离心 20 min、16000 g,弃上清液,于室温干燥,加入 500  $\mu$ L 无菌水溶解 DNA,-20  $^{\circ}$ C 保存。

### 1.4 PCR-DGGE

PCR 扩增引物选用 16S rDNA V3 区通用引物 GC-338F (5'-C GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGG GGG CCT ACG GGA GGC AGC AG-3',下划线表示 GC 夹)和 518R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')<sup>[16]</sup>。PCR 反应体系(50  $\mu$ L)的组成:10 $\times$ Taq buffer ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 5  $\mu$ L,MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 5  $\mu$ L,10 mM dNTP mix 1  $\mu$ L,双向引物 (10  $\mu$ M) 2  $\mu$ L,Taq DNA 聚合酶(MBI Fermentas)1.25 U,无菌去离子水补足至 50  $\mu$ L。PCR 扩增程序:94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94  $^{\circ}$ C 变性 45 s,65  $^{\circ}$ C 退火 35 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s,33 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

对上述 PCR 扩增产物进行变性梯度凝胶电泳分析(Bio-rad Dcode Universal Detection Mutation system)。聚丙烯酰胺凝胶(1.5 mm 厚,16 cm $\times$ 16 cm)浓度为 8%,变性范围选用 30%~60%。电泳条件为 60  $^{\circ}$ C、80 V、6 h。凝胶通过溴化乙锭染色 15 min 后,在凝胶成像系统(Syngene G;Box HR Gel Documentation)中照相,并对优势条带进行回收。

### 1.5 DGGE 图谱分析

利用 Quantity One 软件(Bio-Rad)对 DGGE 图谱上的条带进行数字化,采用非加权配对算数平均法(UPGMA)聚类对细菌群落进行聚类分析,研究各细菌群落的相似性。细菌丰度用 DGGE 图谱中条带的个数来表示。优势度:用某一特定条带的峰面积占样品总体峰面积的百分数来表示。

采用 Shannon-Weaver 指数 H 对细菌群落的多样性进行分析。Shannon-Weaver 指数  $H = -\sum P_i \ln P_i$  式中  $P_i = n_i/N$ 。在本研究中, $P_i$  代表某一泳道的第  $i$  个条带(Band)的光密度的百分含量。

### 1.6 种群结构与环境因子相关性分析<sup>[17]</sup>

使用 Quantity one(美国 Bio-Rad)软件对 DGGE 电泳图谱进行量化处理,以二进制的格式输出。运用生物统计学软件 Canoco for windows (Version4.5)对 DGGE 图谱量化后的数据进行典型对应分析(CCA),研究各个水样中微生物多样性与其理化指标的相关性。分析过程中去除了相对含量小于 1%和只出现过 1 次的条带,水样的理化指标进行了标准化处理<sup>[18]</sup>。

### 1.7 优势种群系统发育地位分析

从 DGGE 凝胶切下可见条带,捣碎后于 50  $\mu$ L 无菌双蒸水中于 4  $^{\circ}$ C 浸泡过夜。以溶出的 DNA 作模板,用 338 F/518 R 引物对其进行 PCR 扩增(条件同前),产物

经纯化后,连接到 pEASY-T1 载体(北京全式金生物试剂公司)并转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,挑取阳性克隆,用 M13 引物进行质粒 PCR 检测后,送上海生工测序。测序结果在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 中进行比对,下载数据库中最接近的已知序列,利用 ClustalX-MEGA 4 软件进行序列同源性分析,并构建系统发育进化树(NJ 算法,Bootstrap 1000 次)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PCR-DGGE 电泳结果与聚类分析

DGGE 结果显示,共有 28 个不同条带,每个泳道均出现数量不等的较清晰条带(6-23),表明各样品 16S rRNA 的 PCR 产物通过 DGGE 实现了较好的分离(图 1)。表 1 为不同窖泥样品中的细菌的丰度结果。从表 1 可以看出,2 年、5 年窖泥细菌丰度相近,平均为 14.7,而 10 年窖泥细菌丰度明显增加,平均为 21.7,20 年窖泥的细菌丰度则与 10 年窖泥基本持平,平均为 20.7,但是 50 年窖泥细菌丰度则明显减少,平均只有 7.7。同窖龄不同层次细菌丰度比较,2~20 年窖泥呈中层>上层>下层,而 50 年窖泥呈中层>下层>上层的趋势。DGGE 电泳图显示,条带 B3、B7、B19 和 B28 在各样品中均有检出,尽管其优势度各有不同,但总体而言是主要的优势种群。B13 条带只在 2~5 年窖泥样品中检出,而在 10~50 年窖泥样品中少有检出,表明该种群在长期生产与驯化过程中,逐渐被淘汰。B15 条带则只在 10~20 年窖泥样品中检出,而在其他样品中未检出(除 2 年窖泥中层样品)。B16 和 B23 条带在 2~20 年窖泥样品中,随着窖龄的增加,其优势度逐渐增加,但在 50 年窖泥样品中却显著减少。

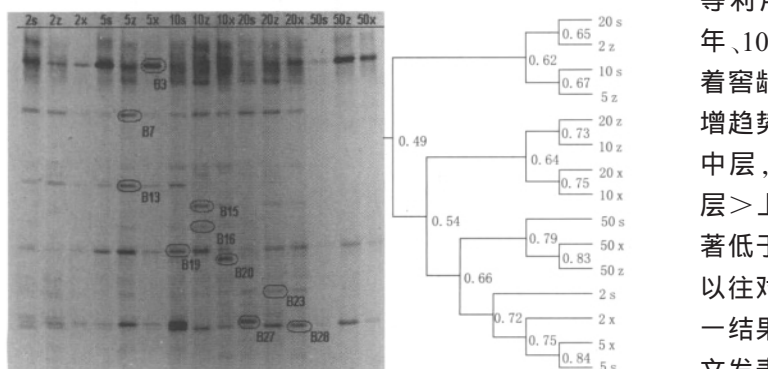


图 1 DGGE 与聚类分析

2~50 分别代表窖泥样品的窖龄,s、z 和 x 分别代表取样的上层、中层和下层。

表 1 不同窖泥样品中的细菌丰度

窖层	窖龄(年)				
	2	5	10	20	50
上层	14	15	21	23	6
中层	18	17	23	20	9
下层	11	13	21	19	8
平均	14.3	15.0	21.7	20.7	7.7

聚类分析结果显示,不同窖龄的样品共聚为 4 个簇,其中 2~5 年窖泥的上、下层样品聚为一簇,相似性指数为 0.72~0.84;10~20 年窖泥的中、下层样品聚为一簇,相似性指数为 0.64~0.75;50 年窖泥样品单独聚为一簇,相似性指数 0.79~0.83。令人奇怪的是,2~5 年窖泥中层样品与 10~20 年上层样品聚为一簇,相似性指数 0.62~0.67。总体来说,2~5 年窖泥样品与 50 年样品相似度较高(0.66),而与 10~20 年样品相似度较低(0.54),其中的原因与机理还有待于进一步研究。

### 2.2 多样性指数分析

Shannon-Wiener 指数(H 值)是分析样品中物种多样性中最常见的指数。不同窖龄窖泥细菌群落多样性指数变化规律结果见图 2。

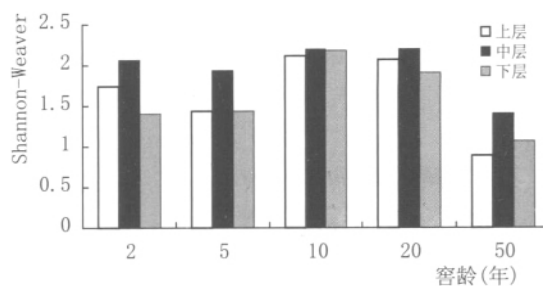


图 2 不同窖龄窖泥细菌群落多样性指数变化规律

从图 2 可知,不同窖龄窖泥样品中细菌的多样性指数在 0.88~2.2 之间,随着窖龄的增加,多样性指数总体上呈先增加后降低的趋势,同一窖龄样品中,中层多样性均高于上、下层,这一趋势在 2 年、5 年和 50 年窖泥样品中尤其明显,而在 10~20 年窖泥样品中,不同层次的多样性较均衡,中层多样性仅略高于上层、下层。罗惠波<sup>[11]</sup>等利用 PCR-SSCP 技术研究某酒厂不同窖龄窖泥(20 年、100 年、200 年、300 年)中细菌的多样性结果显示,随着窖龄的增加,相同位置样品的多样性指数总体上呈递增趋势,其中 20 年窖泥样品中多样性指数上层>下层>中层,而在本研究中,20 年窖龄样品中多样性指数中层>上层>下层。此外,50 年窖泥样品的多样性指数显著低于 10~20 年窖泥样品,甚至低于 2~5 年样品,这与以往对于老窖微生物种群多样性的认识有所不同,但这一结果与课题组采用高通量测序所得的结果相类似(另文发表),其内在机制还有待于进一步研究。

### 2.3 优势种群的序列分析

测序及系统进化树显示(图 3),窖泥中优势种群主要分布厚壁菌门(Phylum Firmicutes)的杆菌纲(Class Bacill)和梭菌纲(Class Clostrida)2 个纲中。B3 和 B7 归为一簇,属杆菌纲,其中 B3 为耐酸乳杆菌(*Lactobacillus acetotolerans* (T) DSM 20749; M58801),序列相似性 100%。乳酸菌是固态法白酒生产的重要微生物,绝大多数都是厌氧菌或兼性厌氧菌,革兰氏阳性。在固态法

白酒发酵过程,乳酸菌具有促进美拉德反应、促进酿酒发酵、维护与保持酿酒微生态环境等作用<sup>[19]</sup>,由它代谢产生的乳酸与酵母发酵生成的酒精生成乳酸乙酯,乳酸乙酯含量的多少在一定程度上决定浓香型大曲酒的质量<sup>[4]</sup>,B7与1株芽孢菌(*Bacillus fordistii*; MGA1-2; HM057850)有99.5%相似性,研究表明,芽孢菌也是产生乳酸的重要菌类<sup>[20]</sup>;B13、B15、B16、B19和B23归为一簇,属梭菌纲。其中,B13与RDP数据库中已有序列相似较低,与之最接近的是一株未培养的互营共养单胞菌(*uncultured Pelospora sp.*; 47IIISN; EU887777),相似性仅93%,而B15则与互营共养单胞菌47IIISN和与1株互营共养单胞模式菌(*Syntrophomonas sapovorans* (T); AF022249)具有较高的序列相似性,分别为98.9%和97.9%。互营共养单胞菌多为厌氧有机酸降解菌,并产氢或产乙酸<sup>[21]</sup>;B16与1株毛螺菌科Lachnospiraceae属细菌(*uncultured bacterium*; A3C6; EU885019)较分类相近,相似性98.8%,目前还未见该属细菌在窖泥中的报道与研究。

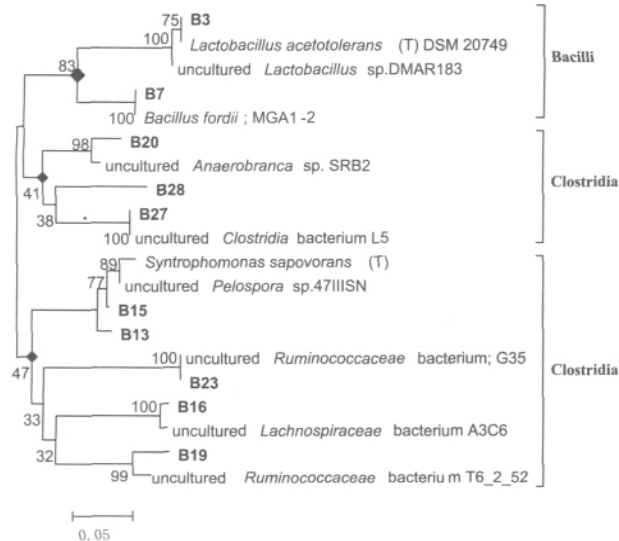


图3 系统进化树

B19与B23均为未培养瘤胃菌,分别与RDP数据库中已知菌株瘤胃菌T6\_2\_16 (*uncultured bacterium*; T6\_2\_16; EU828406)和G35\_D8\_L\_B\_F07 (*uncultured bacterium*; G35\_D8\_L\_B\_F07; EF559144)有95.7%和100%的相似性。关于瘤胃菌在酿酒中的作用还未见报道。瘤胃菌绝大部分属厌氧菌,可分解纤维素、果胶等,产生甲酸、乙酸等,其次还分解淀粉和糖类,所产生的产物可能作为合成酯类的底物,但详细的机理还有待于进一步研究。B20、B27与B28归为一簇,属梭菌纲,但其分类上相对其他梭菌纲细菌来说,更接近杆菌纲。其中,B20与未培养的梭菌SRB2 (*uncultured Anaerobranca sp.*; SRB2; DQ069229)有较高的相似性(98.9%),而B27和B28则分别与另一株未培养的梭菌L5 (*uncultured*

*Clostridia bacterium*; L5; EU887985)有高达100%、99.4%的相似性,但B20与B27和B28之间的相似性较低(87.6%),表明,可能是为不同的属。梭菌早在20世纪80年代就被认为是酿酒生产中重要的功能菌,如泸型梭菌(*Clostridium Lushun*)<sup>[22]</sup>、耳涡形梭菌<sup>[8]</sup>等均为重要的产己酸菌,关于其窖内发酵机理及生态学作用前人已做了大量研究,部分成果已应用于生产。总体来说,结合DGGE电泳图可知,耐酸乳杆菌(B3)、芽孢菌(B7)、瘤胃菌(B19)和梭菌(B28)为剑南春窖泥中的主要优势种群。

## 2.4 环境因子与窖泥细菌群落的相关性分析

不同窖龄窖泥样品中理化指标及矿质元素含量分析结果见表2。

表2 不同窖龄窖泥样品的理化指标

NO.	pH	水分含量 (%)	氨氮 (mg/kg)	腐殖质 (%)	有效磷 (mg/kg)
2 s	4.4	47.4	2226.4	24.2	508.7
2 z	4.5	46.5	1381.1	27.7	378.3
2 x	4.0	45.8	1593.7	26.1	349.2
5 s	3.8	40.4	1387.9	24.8	517.9
5 z	3.8	44.3	2489.0	23.4	609.0
5 x	3.7	42.1	1560.1	25.0	287.4
10 s	5.8	41.6	3824.6	18.3	832.7
10 z	5.4	47.5	4014.9	22.3	774.2
10 x	5.1	45.6	3987.8	21.4	916.4
20 s	5.4	42.4	4098.0	18.9	942.6
20 z	5.2	49.0	5159.8	23.8	928.8
20 x	4.8	47.4	2949.4	24.3	1007.4
50 s	5.0	36.0	2058.9	12.3	946.0
50 z	4.7	41.7	3132.9	15.3	652.0
50 x	4.8	45.9	2363.2	18.2	552.6

运用典型对应分析(CCA),将DGGE图谱的数字化结果和窖泥理化指标结合在一起分析,结果见表3。理化指标为水分含量、pH、氨氮、有效磷、腐殖质等5项指标。Monte Carlo permutation test显示5个环境因子与第一排序轴(p:0.01)和全部排序轴(p:0.004)均有显著的相关性。

表3 典型对应分析结果

项目	AX1	AX2	AX3	AX4
特征值	0.142	0.089	0.062	0.032
种-环境相关系数	0.966	0.902	0.898	0.68
种累积百分比变化率	20	32.5	41.2	45.7
种-环境累积百分比变化率	40.4	65.6	83.2	92.3

表3显示,第1和第2排序轴解释了样本中32.5%的变异,前4个排序轴合并解释了45.7%的样本总变异。第1和第2排序轴的种-环境相关系数分别为0.966和0.902,这说明,窖泥中细菌群落结构与环境因子间存在较强的关联,并且前2个排序轴反映种-环境累积百分比变化率达就高到65.6%,这充分解释环境与种的相关性。

图4是由AX1和AX2轴生成的二维排序图。如图4所示,pH( $r=-0.65$ )、水分含量( $r=-0.49$ )、有效磷( $r=-0.80$ )、氨氮( $r=-0.73$ )、腐殖质( $r=-0.01$ )均与第1排序轴负相关,其中关联较高的环境变量为有效磷、氨氮和pH,而与第2排序轴关联较高的环境变量主要是腐殖质( $r=-0.56$ )和有效磷( $r=0.24$ )。从排序图结果可知,有效磷、氨氮、pH、水分含量、腐殖质与10年和20年窖龄窖泥微生物群落结构呈正相关,而与2年、5年和50年窖泥群落结构呈负相关;腐殖质与2年和5年样品呈正相关,而和10~50年样品呈负相关。因此,本文所选环境变量对窖泥微生物分布的影响,依次为有效磷、氨氮、pH、腐殖质和水分含量。

### 3 结论

3.1 DGGE 结果显示,不同窖龄窖泥样品细菌丰度不同,10~20年窖泥样品中细菌丰度最高,然后是2~5年的窖泥样品,而50年窖泥样品的细菌丰度最低。多样性指数也显示了相似的趋势。此外,细菌丰度和多样性指数分析均显示同一窖龄样品中,中层多样性要高于上层、下层。

3.2 16S rRNA 序列分析表明,窖泥中优势种群主要分布在厚壁菌门的杆菌纲和梭菌纲,其中耐酸乳杆菌、芽孢菌、未培养的瘤胃菌和梭菌为窖泥样品中的优势种群,但其优势度在不同窖龄样品中有所不同。互营共养单胞菌和毛螺菌科的 *Lachnospiraceae* 细菌在2~5年窖龄窖泥样品和10~20年窖泥中有不同程度分布,但在50年窖泥中显著减少。

3.3 典型对应分析显示,窖泥微生物群落结构与演替环境因子具有显著的相关性,其中有效磷、氨氮、pH对微生物群落结构的影响最大,其次是腐殖质,水分含量影响最小。

### 参考文献:

- [1] 陕小虎,敖宗华,周健,等.浓香型白酒窖泥原核微生物 DGGE 电泳条件的优化[J].酿酒科技,2011(1):37-40.
- [2] 傅金泉.中国酿酒微生物研究与应用[M].北京:中国轻工业出版社,2008.
- [3] 胡承,应鸿,许德富,等.窖泥微生物群落的研究及其应用[J].酿酒科技,2005(3):34-38.
- [4] 王葳,赵辉,陈凤阁.浓香型白酒窖泥中乳酸菌的分离与初步鉴定[J].酿酒科技,2006(4):29-31.
- [5] 徐军,谭崇尧.枝江老窖泥中己酸菌的分离纯化及培养条件的研究[J].酿酒科技,2010(5):42-43.
- [6] 熊俐,胡洋,刘俊,等.窖泥己酸菌的分离培养与诱变选育[J].四川理工学院学报:自然科学版,2010,23(3):324-327.
- [7] 姚万春,唐玉明,任道群,等.优良窖泥功能菌的筛选及其生物学特性的初步研究[J].酿酒科技,2010(11):33-35.
- [8] 徐占成,王加辉.窖泥己酸菌新菌种——耳涡形梭菌的发现与

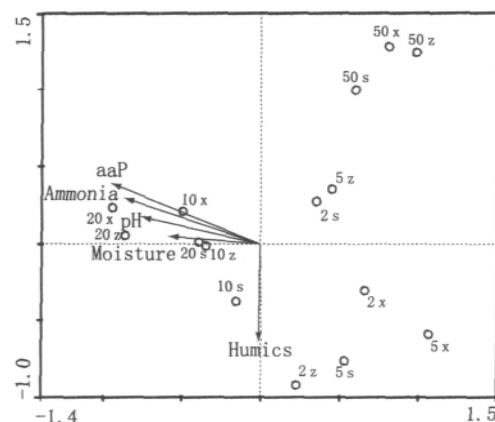


图4 典型对应分析图

其形态及生理特性研究[J].酿酒,2005(5):1-3.

- [9] Rudolfi. Amann, Wolfgang Ludwig, and Karl-Heinz Schleifer. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J].Microbio-10 gical Reviews. 1995,58:143-169.
- [10] 张洪波,王晓谊,齐鸿雁.微生物学研究方法进展[J].生态学报,2003,23(5):988-995.
- [11] 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.
- [12] 罗惠波,甄攀,黄治国.窖泥微生物群落 SSCP 分析条件优化的研究[J].四川理工学院学报:自然科学版,2010,23(6):695-698.
- [13] 邓依,唐云容,张文学.16S-23S rRNA ITS-AFLP 指纹图谱分析在白窖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.
- [14] 王福荣.酿酒分析与检测[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [15] Zhou, J., M. A. Brunns, and J. M. Tiedje. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Appl. Environ. Microbiol. 1996, 62:316-322.
- [16] CE, Demir E, Coyne KJ, et al. A bacterium that inhibits the growth of *Pfiesteria piscicida* and other dinoflagellates [J]. Harmful Algae, 2005, 4(2):221-234.
- [17] Jan L,Petr S.Multivariate analysis of ecological data CANOCOTM. Cambridge University Press.2003.
- [18] Yannarell AC, Triplett EW. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(1):227-239.
- [19] 谢玉球,钟雨,谢旭.乳酸菌在固态法白酒生产中的地位与作用[J].酿酒科技,2008(11):83-86.
- [20] 朱文森,肖敏,刘复今.固态发酵白酒生产中芽孢杆菌属细菌产乳酸特性及降乳研究[J].食品与发酵工业,1996(4):38-41.
- [21] 操先华.互营降解有机酸的微生物资源和分子生态学研究[D].硕士学位论文,中国科学院微生物研究所,2002.
- [22] 吴衍庸.沪型梭菌己酸发酵应用的理论与实践[J].酿酒科技,2007(11):131-133.