



# 窖泥优势拟杆菌纲微生物 *Petrimonas sulfuriphila* 的分离及其功能解析

郑慧珍<sup>1</sup>, 王慧琳<sup>1</sup>, 高江婧<sup>1</sup>, 任聪<sup>1,2\*</sup>, 范文来<sup>1,2\*</sup>, 徐岩<sup>1,2</sup>

1 江南大学生物工程学院酿造微生物学与应用酶学研究室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

郑慧珍, 王慧琳, 高江婧, 任聪, 范文来, 徐岩. 窖泥优势拟杆菌纲微生物 *Petrimonas sulfuriphila* 的分离及其功能解析. 微生物学报, 2022, 62(9): 3373–3386.

Zheng Huizhen, Wang Huilin, Gao Jiangjing, Ren Cong, Fan Wenlai, Xu Yan. Isolation and functional analysis of the dominant *Bacteroidia* species *Petrimonas sulfuriphila* in pit mud. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3373–3386.

**摘要:**【目的】筛选窖泥中尚未被纯培养的高丰度拟杆菌纲微生物, 并在纯培养菌株层面和共培养层面探究其生理代谢特征及生态学功能。【方法】采用传代培养提高窖泥拟杆菌纲微生物的相对丰度, 在此基础上进行筛菌实验, 并通过发酵实验解析主体拟杆菌的代谢特征及其与主体己酸菌的相互作用关系。【结果】成功筛选到 *Petrimonas sulfuriphila* LBM11005, 该菌的主要代谢产物为乙酸和丙酸, 且葡萄糖能促进该菌的生长。无论是否存在底物竞争效应, *P. sulfuriphila* LBM11005 均能与窖泥主体己酸菌 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 在代谢物水平上发生相互作用, 表现为后者可以利用前者的代谢产物丙酸进行碳链延伸, 产生新的奇数碳脂肪酸——戊酸和庚酸。【结论】探明了窖泥主体拟杆菌纲微生物 *P. sulfuriphila* LBM11005 的基本生理代谢特征, 且该菌与主体己酸菌相互作用, 贡献于更长碳链奇数碳脂肪酸的合成。

**关键词:** 浓香型白酒; 窖泥; 拟杆菌; 丙酸

基金项目: 国家自然科学基金(32172177)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32172177)

\*Corresponding authors. E-mail: REN Cong, congren@jiangnan.edu.cn; FAN Wenlai, wenlaifan@jiangnan.edu.cn

Received: 27 November 2021; Revised: 19 February 2022; Published online: 8 March 2022

# Isolation and functional analysis of the dominant *Bacteroidia* species *Petrimonas sulfuriphila* in pit mud

ZHENG Huizhen<sup>1</sup>, WANG Huilin<sup>1</sup>, GAO Jiangjing<sup>1</sup>, REN Cong<sup>1,2\*</sup>, FAN Wenlai<sup>1,2\*</sup>, XU Yan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Brewing Microbiology and Applied Enzymology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** [Objective] To isolate abundant uncultured *Bacteroidia* species from pit mud and analyze its physiological metabolism and ecological functions in the cases of pure culture and co-culture. [Methods] The relative abundance of *Bacteroidia* species was improved by subculture. Pure *Bacteroidia* species were isolated with the agar dilution method, and the metabolic characteristics of the dominant *Bacteroidia* species and the interaction with the dominant caproate-producing bacteria were explored based on fermentation test. [Results] *Petrimonas sulfuriphila* LBM11005 was screened out. Acetate and propionate were the main metabolites of this strain, and glucose promoted its growth. The metabolites of LBM11005 interacted with those of *Caproicibacterium* sp. LBM19010, the dominant caproate-producing species in pit mud, regardless of substrate competition. To be specific, LBM19010 utilized propionate, the metabolite of LBM11005, for chain extension to produce odd-numbered carbon fatty acids of pentanoate and heptanoate. [Conclusion] This study reveals the fundamental physiological and metabolic characteristics of *P. sulfuriphila* LBM11005, one of the dominant *Bacteroidia* species in pit mud. This strain interacts with the dominant caproate-producing bacterium to contribute to the synthesis of longer odd-numbered carbon fatty acids.

**Keywords:** strong aroma-type Chinese spirit; pit mud; *Bacteroidia*; propionate

窖泥是用于浓香型、酱香型、凤香型和芝麻香型等 8 种香型白酒生产的重要厌氧菌种子库,是我国特有厌氧微生物资源宝库<sup>[1-3]</sup>。尤其对于浓香型白酒而言,窖泥的质量是决定其最终品质的关键因素。而窖泥微生物的多样性、复杂的代谢特征以及物种间的相互作用又是影响窖泥质量的关键所在<sup>[4]</sup>。研究表明,窖泥微生物能产生复杂多样的代谢产物,形成包括丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸和辛酸等短中链脂肪酸<sup>[5-6]</sup>。此外,窖泥中以己酸菌为代表的微生物在发酵过程中不断迁移到酒醅中,其代谢活动提高了酒醅的 pH 值,强化大曲的酯化能力,改善酒醅的风味特征<sup>[6]</sup>。

目前对于窖泥微生物的研究主要包括基于免培养方法的菌群结构分析和基于可培养方法

的菌株筛选。菌群结构研究结果表明,窖泥中的微生物种类繁多,包括 85 个纲的 225 个属,其中的细菌主要包括梭菌纲(*Clostridia*)和拟杆菌纲(*Bacteroidia*),古菌主要包括甲烷杆菌纲(*Methanobacteria*)和甲烷微菌纲(*Methanomicrobia*)<sup>[7-8]</sup>。拟杆菌纲微生物是窖泥中仅次于梭菌纲微生物的第二高丰度细菌类型,在优质窖泥中的相对丰度要显著高于退化窖泥<sup>[7,9]</sup>。扩增子测序和宏基因组测序结果表明,优势拟杆菌纲微生物主要包括 *Petrimonas* 属(5.99%–16.69%)和 *Proteiniphilum* 属(2.80%–3.90%)<sup>[10-12]</sup>。其次,利用宏基因组学对窖泥中的微生物进行分类和功能多样性分析发现,以梭菌纲为代表的厚壁菌门、以甲烷杆菌属为代表的广古菌门和以拟杆菌纲为代表的拟杆菌门

是浓香型白酒窖泥中的 3 类功能微生物群<sup>[10]</sup>。受制于严格厌氧菌菌株筛选的困难性及缺少有效的纯培养化技术, 目前对于窖泥微生物纯培养的菌株研究多集中于产丁酸、己酸等具有典型风味贡献性或其他非优势微生物<sup>[13-15]</sup>, 而对窖泥主体拟杆菌纲微生物的纯培养菌株则鲜有研究, 尚不明确其在窖泥微生物生态系统中的作用, 也不清楚拟杆菌纲微生物在窖泥中的风味贡献。

获得良好的富集体系, 寻找难培养微生物的生长因素, 提高目标菌在菌群培养体系中的相对丰度, 是实现难培养微生物纯培养化的重要前提<sup>[16]</sup>。此外, 对培养基营养水平的选择也至关重要。多数人工培养基的营养丰富, 含有多种可被微生物降解利用的物质, 但在自然条件下, 许多微生物都处在寡营养的环境中, 培养基质的富营养化条件可能会让这些微生物产生自身代谢毒害甚至使其死亡<sup>[17]</sup>。由于浓香型白酒发酵周期较长(40-180 d), 发酵过程的大部分时间内窖泥中速效碳源如葡萄糖含量较低, 速效氮源含量也有限, 因此窖泥属于寡营养生境<sup>[5-6]</sup>。我们前期的研究表明, 通过寡培养技术可以富集到与原始窖泥菌群更为接近的微生物结构, 并成功富集得到拟杆菌纲微生物下的多个属, 包括 *Petrimonas*、*Proteiniphilum*、*Prevotellaceae*、*Rikenellaceae*、*Anaerocella* 等<sup>[2]</sup>。基于针对窖泥微生物富集的寡培养技术, 本研究旨在优化窖泥拟杆菌富集培养方法, 并从富集菌群中筛选出未培养的主体拟杆菌, 在此基础上剖析纯培养菌株的基本生理代谢特征, 探索窖泥主体拟杆菌物种与主体己酸菌物种的相互作用关系及这种相互作用关系的酿造功能, 以解析窖泥重要微生物的生态学功能。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 窖泥

本研究中所用的窖泥分别取自四川省和安

徽省某浓香型白酒酒厂窖池。

#### 1.1.2 主要试剂

乙酸、丙酸、丁酸、叔戊酸、戊酸、己酸、庚酸、乳酸(Sigma-Aldrich 试剂公司); DNA 提取试剂盒 PowerSoil DNA(Qiagen 公司)。其余常规化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

#### 1.1.3 主要仪器

NanoDrop 8000 蛋白核酸测定分光光度计、厌氧培养箱(Thermo Fisher Scientific 公司); 气相色谱仪 Agilent 7890B、高效液相色谱仪 Agilent 1260 (Agilent 公司); pH 计(Mettler Toled 公司); 紫外分光光度计 A380 (翱艺仪器(上海)有限公司); 有机酸柱 Aminex HPX-87H (Bio-Rad 公司); 气相色谱柱 CP-WAX 57 CB (Agilent 公司)。

#### 1.1.4 菌株

本研究所用的拟杆菌 *P. sulfuriphila* LBM11005 分离自窖泥, 窖泥主体己酸菌 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 由本实验室提供。

#### 1.1.5 MCI 培养基

用于窖泥的传代培养及筛菌实验, 培养基组成在 Lu 等<sup>[2]</sup>研究的基础上, 添加 1% 2-溴乙基磺酸钠。固体培养基添加终浓度为 20 g/L 的琼脂。

#### 1.1.6 PY 培养基

参照 Holdeman 等<sup>[18]</sup>所述方法进行配制。

#### 1.1.7 MGF 培养基(1 L)

酵母粉 10 g, 蛋白胨 10 g, NH<sub>4</sub>Cl 0.5 g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.5 g, CaCl<sub>2</sub> 0.2 g, 金属元素母液 500 μL, 磷酸盐母液 5 mL, GYTS 母液 5 mL, 微量元素母液 350 μL, 0.1%刃天青 400 μL, 7% NaHCO<sub>3</sub> 溶液(过膜除菌) 25 mL, 2.5%半胱氨酸溶液(过膜除菌) 5 mL, 维生素溶液 A (过膜除菌) 100 μL, 维生素溶液 B (过膜除菌) 100 μL。灭菌前将除 NaHCO<sub>3</sub> 溶液、半胱氨酸溶液、维生

素溶液 A 以及维生素溶液 B 以外的培养基成分混合, 调节 pH 至  $7.4 \pm 0.2$ ,  $121^\circ\text{C}$  灭菌 20 min。灭菌后将剩余溶液按比例添加至培养基内。其中, 金属元素母液成分为(1 L):  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.03 g,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.3 g,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01 g,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.02 g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.03 g,  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.5 g。磷酸盐母液成分为(1 L):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  6 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5 g。GYTS 母液成分为(1 L):  $\text{NaCl}$  5 g,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  4 g,  $\text{CaCl}_2$  0.75 g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{KCl}$  5 g。葡萄糖添加组实验中在上述 MGF 培养基中额外添加终浓度为 20 g/L 的葡萄糖。

### 1.1.8 MGF-Z 培养基

在 MGF 基础上添加 1.5 g/L  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 碳源为终浓度 20 g/L 的葡萄糖或终浓度 10 g/L 的乳酸。

### 1.2 DNA 提取及扩增子测序

参照 PowerSoil DNA 提取试剂盒操作步骤对传代样本的总 DNA 进行提取。对原核生物 16S rRNA 基因的 V4 区选取引物 515FmodF (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3')和 806RmodR (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') 进行扩增<sup>[19]</sup>。扩增产物由上海美吉生物技术有限公司完成测序, 测序平台为 Illumina MiSeq。数据分析通过美吉生物技术有限公司的 i-sanger 云平台完成。测序原始数据已上传至国家微生物科学数据中心, 项目编号为 NMDC10017951, 对应原始数据编号为 NMDC40014381-NMDC40014390。

### 1.3 菌株筛选分离及鉴定

利用无菌生理盐水将上述获得的窖泥传代培养液进行梯度稀释( $10^{-1}$ - $10^{-7}$ ), 并取 100  $\mu\text{L}$  梯度稀释的菌液涂布于 MCI 固体培养基上, 于

$37^\circ\text{C}$  厌氧箱中培养 5-10 d。待菌落长出后, 挑取单菌落于 MCI 液体培养基中培养 3-5 d。随后利用细菌 16S rRNA 基因的通用引物(27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')对培养后的菌液进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系为: 27F 0.5  $\mu\text{L}$ , 1492R 0.5  $\mu\text{L}$ , PrimerStar Max Primer (TaKaRa) 12.5  $\mu\text{L}$ , 无菌水 10.5  $\mu\text{L}$ , 菌液 1  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为: 预变性  $98^\circ\text{C}$  2 min; 变性  $98^\circ\text{C}$  10 s, 退火  $55^\circ\text{C}$  30 s, 延伸  $72^\circ\text{C}$  1 min, 30 个循环;  $72^\circ\text{C}$  10 min。得到的 PCR 产物送至无锡天霖测序公司测序。将测序结果提交至 GenBank 进行在线 BLAST 比对分析, 得到物种鉴定结果。对于目标菌株进行平板划线纯化, 进一步获得纯培养菌株。

### 1.4 发酵实验

#### 1.4.1 窖泥菌群富集发酵

将窖泥样品以 5% (W/V) 的比例在厌氧条件下进行接种,  $37^\circ\text{C}$  培养 4 d 后, 将富集培养物接种到新鲜的 MCI 培养基中进行传代培养, 同时取传代终点样, 离心后将菌体冻存于  $-80^\circ\text{C}$ , 供后续 DNA 测序分析。

#### 1.4.2 纯培养菌株发酵

将获得的纯培养菌株 *P. sulfuriphila* LBM11005 在 PY 培养基中培养到对数期后, 按 10% (V/V) 的比例接种到 MGF 培养基中, 设置对照组及添加 20 g/L 葡萄糖的实验组, 每组设置 3 个平行。在发酵第 0、8、12、16、24、36、48、72、96、120 h 时取样并冻存, 以进行后续发酵指标分析。

#### 1.4.3 共培养发酵实验

将 *P. sulfuriphila* LBM11005 在 PY 培养基中培养, 将 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 在相应碳源的 MGF-Z 培养基中培养。待 2 株单菌生长到对数期后, 测定种子液的  $OD_{600}$  值。按

照  $OD_{600}$  值的比例将 2 株菌接种到共培养培养基 MGF-Z 中, 并设置纯培养菌株发酵的对照组, 每组设置 3 个平行。在发酵第 0、8、12、16、24、36、48、72、96、120 h 时取样并冻存, 以进行后续发酵指标分析。

## 1.5 发酵指标测定

### 1.5.1 生长与 pH 测定

发酵结束后, 利用紫外分光光度计测定发酵液在 600 nm 处的吸光值, 以表征发酵体系的生长情况; 利用 pH 计测定发酵上清液的 pH 值。

### 1.5.2 底物利用测定

采用高效液相色谱仪(安捷伦 1260 Infinity II)对发酵体系的葡萄糖和乳酸进行分析。取 300  $\mu$ L 发酵上清液, 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后, 在色谱柱为 Aminex HPX-87H (Bio-Rad 公司)、流动相为 5 mmol/L 稀硫酸溶液、流速为 0.6 mL/min、柱温为 60  $^{\circ}$ C、检测器为示差检测器的条件下, 检测葡萄糖和乳酸的含量。

### 1.5.3 短中链脂肪酸测定

向 200  $\mu$ L 发酵上清液中加入 50  $\mu$ L 内标(12.5 g/L 叔戊酸, 含 5% 体积比的浓盐酸, pH 2.5), 混匀离心后取 200  $\mu$ L 上清液利用气相色谱仪(Agilent 7890B)进行分析。色谱柱为 CP-WAX 57 CB (Agilent 公司), 程序升温条件为: 初始温度 60  $^{\circ}$ C, 保持 0.5 min, 以 20  $^{\circ}$ C/min 升到 180  $^{\circ}$ C, 保持 5.5 min。分流比为 30:1, 进样口温度为 220  $^{\circ}$ C, 氢火焰离子检测器温度为 220  $^{\circ}$ C。

## 2 结果与分析

### 2.1 寡营养传代提高窖泥中优势拟杆菌纲微生物的相对丰度

本实验室前期的研究表明, 相较于营养丰富的培养基, 寡营养条件能有效富集到窖泥中的主体拟杆菌纲微生物, 且其相对丰度在

富集前中期大于后期<sup>[2]</sup>。因此, 为了进一步提高窖泥优势拟杆菌纲微生物的相对丰度, 以提高筛选的成功性, 对窖泥富集体系每 4 d 进行一次传代培养, 并对传代过程中的菌群结构变化进行了分析(图 1)。

扩增子测序结果表明, 不同来源窖泥在原始窖泥组成及传代过程中的微生物组成变化存在一定的趋异性, 但是总体上纲水平的优势微生物基本相同, 包括厚壁菌门(*Firmicutes*)中的梭菌纲(*Clostridia*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)中的拟杆菌纲(*Bacteroidia*)(图 1A)。在原始窖泥中, 梭菌纲和拟杆菌纲的相对丰度分别为 21.51%–23.17%、17.10%–29.21%, 经过传代培养后, 其相对丰度最高可分别达 68.72% 和 52.40%。同时, 2 个主体微生物在传代进程中的相对丰度也在不断变化。其中, 拟杆菌的相对丰度在原代(F1)和第二代(F2)培养中表现出迅速积累趋势, 相对丰度分别为 39.24%–52.40% 和 20.69%–37.59%, 而后逐渐降低至 39.20% 和 34.27%。因此, 传代培养能同时提高窖泥中 2 大主体微生物的相对丰度, 而合适的传代次数则有利于进一步富集窖泥中的拟杆菌纲微生物。此外, 原隶属于窖泥优势微生物的 *Methanosarcinia* 在传代过程中相对丰度显著下降直至检测线以下, 可能是由于产甲烷微生物生长缓慢, 而短期的传代培养优先选择了原始样本中相对丰度高且生长较快的微生物。

通过富集培养共获得 41 个属, 主要分布于梭菌纲(*Clostridia*)和拟杆菌纲(*Bacteroidia*)中(图 1B)。在 2 个地区样本传代过程中共有的优势微生物属包括 *Petrimonas*、*Proteiniphilum*、*Anaerocella*、*Terrisporobacter* 和 *Fermentimonas*, 表明大部分的拟杆菌纲微生物得到成功富集。

以在任一窖泥中相对丰度大于 1% 的标准界定为优势微生物, 进一步分析窖泥优势拟杆菌纲

微生物在传代进程中的相对丰度变化, 结果如表 1 所示。其中, 隶属于拟杆菌目(*Bacteroidales*) 下的 *Petrimonas* 和 *Proteiniphilum* 是传代样本中的重要拟杆菌纲微生物, 其相对丰度在低次数传代中显著增高, 最大可分别是原始窖泥样

本的 2.31 倍和 2.84 倍, 而随着传代次数的增多, 其相对丰度有所下降, 变化趋势与纲水平变化一致, 表明这 2 个属相对丰度的动态变化是引起拟杆菌纲微生物相对丰度变化的主要因素。

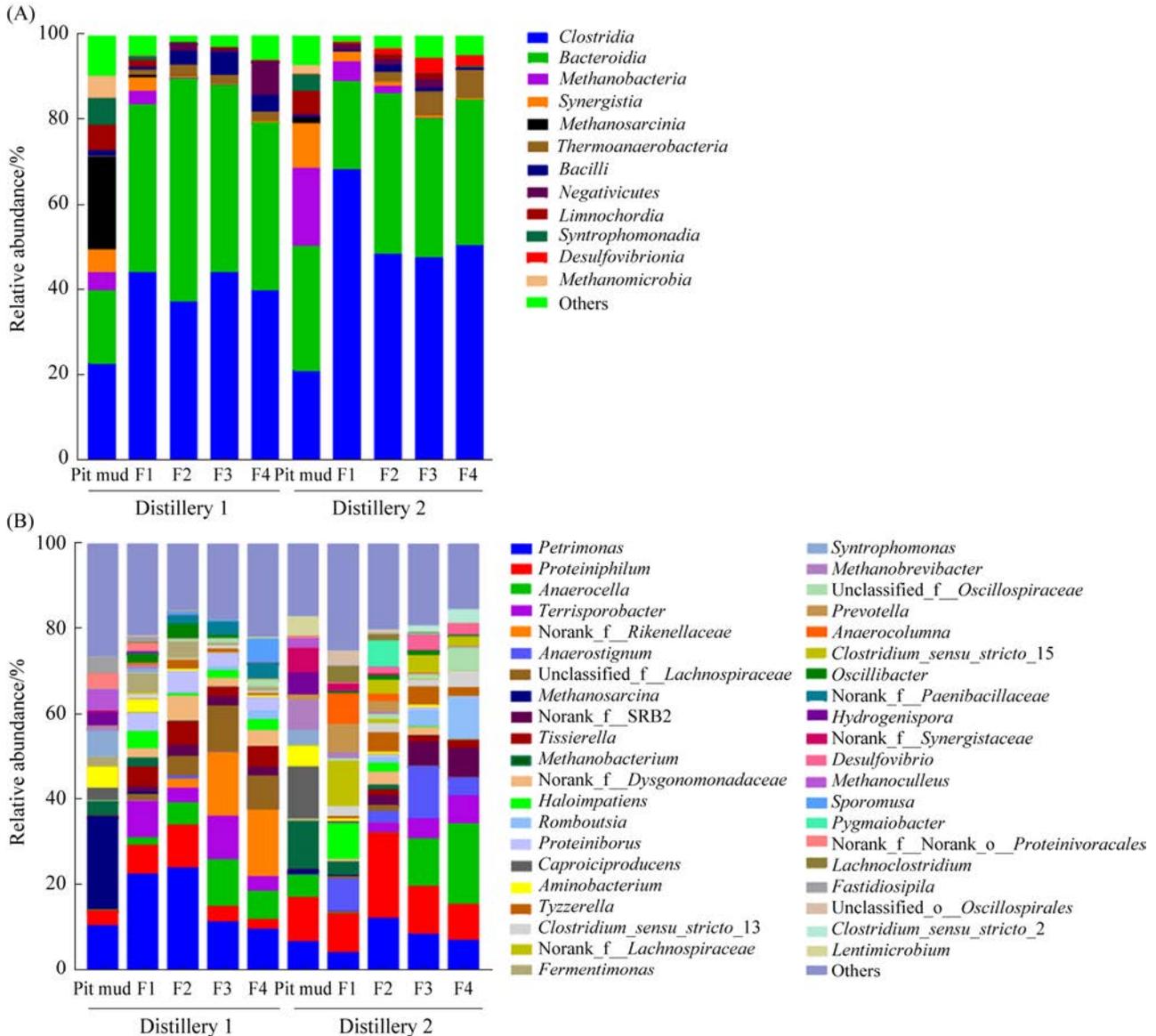


图 1 窖泥微生物传代过程中的菌群结构动态变化

Figure 1 The changes of microbial structures during the successive transfers of the enrichment cultures (populations with relative abundance <3% were merged into others). A: class level; B: genus level. F1, F2, F3 and F4 indicated the successive culturing passages.

表 1 传代过程中优势拟杆菌纲微生物相对丰度的变化

Table 1 The relative abundance of dominant *Bacteroidia* species during the successive transfers of the enrichment cultures

Family genus	Distillery 1/%					Distillery 2/%				
	Pit mud	F1	F2	F3	F4	Pit mud	F1	F2	F3	F4
<i>Bacteroidales</i>	17.09	39.24	52.39	43.74	38.94	24.72	20.63	37.59	32.66	34.27
<i>Dysgonomonadaceae</i>	16.15	35.68	43.57	17.62	16.64	17.31	14.05	35.07	21.43	15.45
<i>Petrimonas</i>	10.37	22.33	23.99	11.29	9.61	6.60	4.04	12.03	8.53	7.02
<i>Proteiniphilum</i>	3.49	6.84	9.90	3.56	2.18	10.32	9.32	20.01	10.99	8.30
<i>Fermentimonas</i>	2.22	4.39	3.85	0.66	1.03	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
<i>Rikenellaceae</i>	0.17	1.84	7.37	25.77	22.13	5.32	0.22	0.05	11.09	18.79
<i>Anaerocella</i>	0.13	1.72	5.20	10.86	6.57	5.22	0.21	0.04	11.0%	18.78
<i>Prevotellaceae</i>	ND	ND	ND	ND	ND	1.10	6.34	2.48	0.13	0.03
<i>Prevotella</i>	ND	ND	ND	ND	ND	1.10	6.34	2.48	0.13	0.03
<i>Sphingobacteriales</i>	0.02	ND	0.01	0.04	0.26	4.49	0.06	ND	ND	ND
<i>Lentimicrobiaceae</i>	0.02	ND	0.01	0.04	0.26	4.49	0.06	ND	ND	ND
<i>Lentimicrobium</i>	0.02	ND	0.01	0.04	0.26	4.49	0.06	ND	ND	ND

ND: not detected.

综上, 通过寡营养培养手段对窖泥进行短期传代培养, 成功提高了体系中优势拟杆菌纲微生物的相对丰度, 为纯培养菌株的筛选奠定了基础。

### 2.2 纯培养 *P. sulfuriphila* 菌株的筛选及其代谢特征分析

经上述传代培养后, 窖泥富集体系内拟杆

菌纲微生物的相对丰度显著提高。进一步通过稀释涂布方法, 对所获得的窖泥传代体系进行筛菌。总计对挑取的 89 个单菌落进行寡营养液体培养及 PCR 扩增与测序鉴定, 结果如表 2 所示。

结果表明, 所筛的菌株主要隶属于窖泥两大高丰度细菌类型——梭菌纲和拟杆菌纲, 与扩增子测序结果相符合, 表明传代富集结合寡

表 2 基于 16S rRNA 基因序列的菌株生物鉴定比对结果

Table 2 BLAST results based on the 16S rRNA gene sequences of isolated strains

Closest type species	Phylum	Class	Occurrence number	Frequency of occurrence/%
<i>Terrisporobacter petrolearius</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	29	32.60
<i>Haloimpatiens lingqiaonensis</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	15	16.90
<i>Massilibacterium senegalense</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	9	10.10
<i>Petrimonas sulfuriphila</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	7	7.90
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	6	6.70
<i>Alkalibaculum bacchi</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	6	6.70
<i>Paraclostridium bifermentans</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	5	5.60
<i>Terrisporobacter glycolicus</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	3	3.40
<i>Proteiniphilum acetatigenes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	2	2.20
<i>Romboutsia lituseburensis</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	2	2.20
<i>Clostridium cochlearium</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	1	1.10
<i>Clostridium kluyveri</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	1	1.10
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	1	1.10
<i>Weissella confusa</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	1	1.10
<i>Anaerotignum lactatifermentans</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	1	1.10

营养筛菌是从窖泥中获得优势微生物的可行方法。进一步通过平板划线纯化,成功获得一株 *Petrimonas* 属纯培养微生物,经 16S rRNA 基因测序,被鉴定为 *P. sulfuriphila* (序列一致性为 99.56%),菌株编号为 LBM11005。

*P. sulfuriphila* LBM11005 筛选自未添加葡萄糖的培养基,表明该菌可能利用酵母粉、蛋白胨进行生长。但考虑到 *Petrimonas* 属微生物,如 *Petrimonas mucosa*,具有一定的单糖和二糖利用能力,包括葡萄糖、半乳糖和乳糖等<sup>[20]</sup>。而白酒发酵前期大量存在的可溶性糖为葡萄糖。因此,我们对分离到的 *P. sulfuriphila* LBM11005 菌株在葡萄糖存在和不存在条件下的生理代谢特征进行了测试,所得结果如图 2 所示。

结果表明, *P. sulfuriphila* LBM11005 在添加葡萄糖的培养基中能更快地进入稳定期

(24 h),无葡萄糖的对照组则需培养更长的时间才能进入稳定期(36 h),且在加葡萄糖的培养基中获得的生物量约是对照组的 2 倍(图 2A)。在葡萄糖的培养基中,pH 降低程度较对照组更为显著,发酵末期的 pH 可降低至 5.5 以下,与初始 pH 相比降低约 2 个 pH 值。该条件下的 pH 变化趋势与生长过程同步,表现为在生长到达平台期后 pH 值也基本稳定不变(图 2B)。通过高效液相色谱对发酵液的葡萄糖含量进行检测,表明该菌具有利用葡萄糖的能力,且在生长对数期利用速度较快(图 2C),推测葡萄糖利用是菌株获得更优生长的重要原因。*P. sulfuriphila* LBM11005 的主要发酵产物为乙酸(图 2D)和丙酸(图 2E)。在葡萄糖培养条件下,丙酸产量可达 1.46 g/L,高于对照组的 0.88 g/L;乙酸产量可达 0.88 g/L,高于对照组的 0.66 g/L。

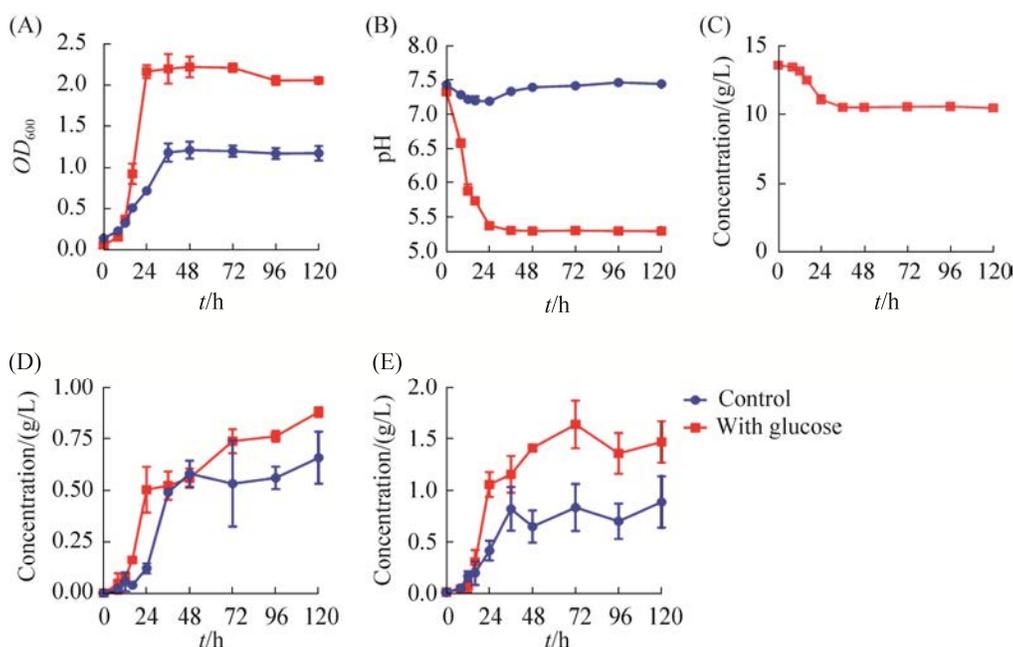


图 2 *P. sulfuriphila* LBM11005 纯培养菌株的生长、底物利用与主要代谢产物

Figure 2 Growth, substrate utilization and main metabolites of *P. sulfuriphila* LBM11005. A: growth; B: pH; C: substrate utilization; D: acetate; E: propionate. Data are reported as the mean $\pm$ SD of the results from three biological replicates.

### 2.3 *P. sulfuriphila* LBM11005 与窖泥主体己酸菌 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 共培养产戊酸和庚酸

上述 *P. sulfuriphila* LBM11005 菌株的纯培养代谢特征分析表明, 该菌株能产生奇数碳的丙酸, 那么该菌是否能与窖泥主体己酸菌共代谢, 在丙酸基础上进行 C2 单元的碳链延伸, 从而生成更长碳链的奇数碳脂肪酸? 为了探究该相互作用是否存在, 我们对产丙酸菌 *P. sulfuriphila* LBM11005 与本实验室前期筛菌获得的窖泥短中链脂肪酸产

生菌 *Caproicibacterium* sp. LBM19010<sup>[21]</sup> 的双菌相互作用关系采用共培养方式进行探索。结合在窖泥原始生境中先后存在葡萄糖(初始发酵阶段)和乳酸(发酵后期阶段)的实际情况, 共培养分别采用葡萄糖或乳酸作为发酵底物。

#### 2.3.1 葡萄糖条件下共培养菌群的生长与代谢特征

*P. sulfuriphila* LBM11005 与窖泥主体己酸菌 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 在葡萄糖条件下的共培养实验结果如图 3 所示。

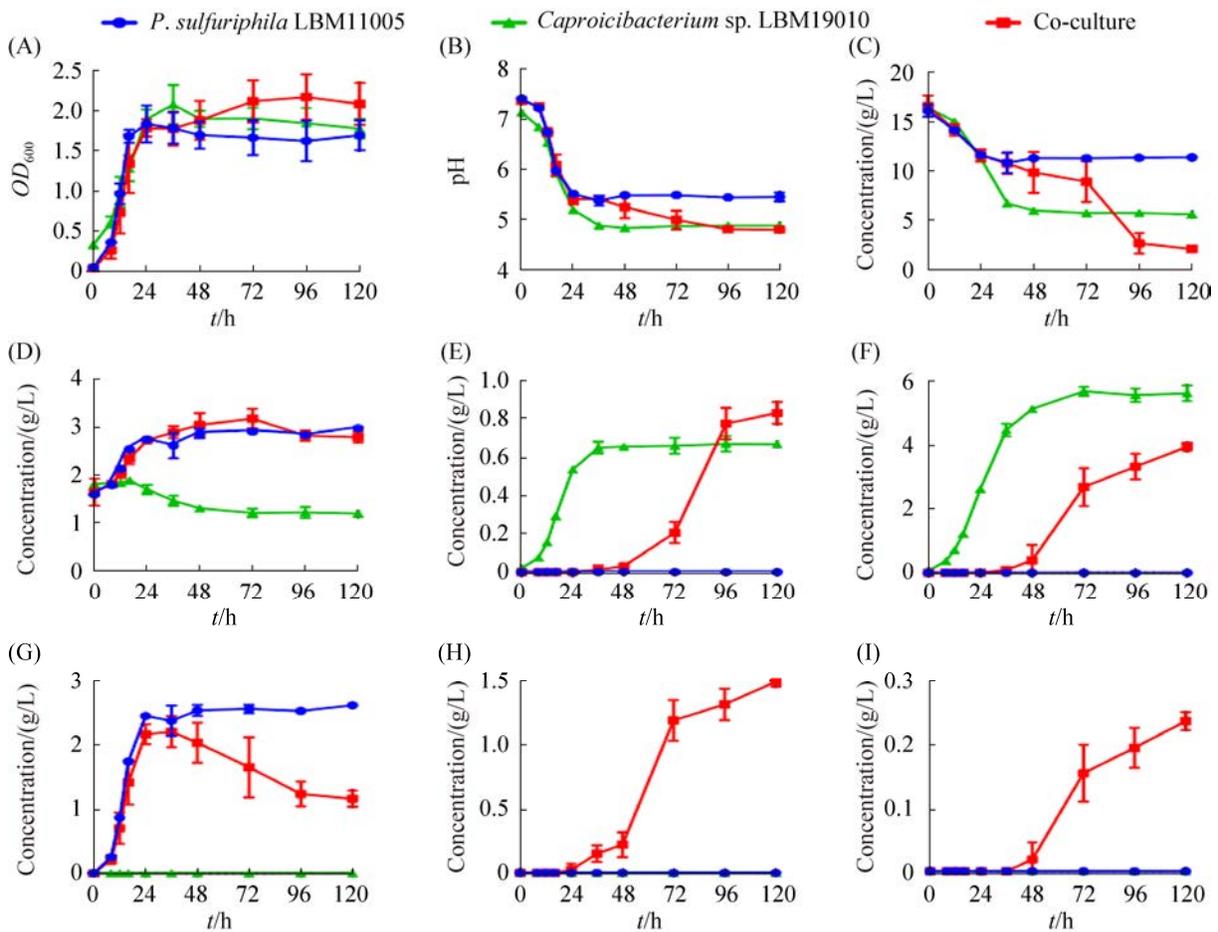


图 3 葡萄糖碳源条件下 *P. sulfuriphila* LBM11005 与 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 共培养发酵特征  
Figure 3 The fermentation characteristics for the co-culture of *P. sulfuriphila* LBM11005 and *Caproicibacterium* sp. LBM19010 supplemented with glucose. A: growth; B: pH; C: substrate utilization; D: acetate; E: butyrate; F: caproate; G: propionate; H: pentanoate; I: heptanoate. Data are reported as the mean±SD of the results from three biological replicates.

由图 3A 可知, *P. sulfuriphila* LBM11005 和 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 在葡萄糖培养条件下具有相似的生长趋势, 共培养菌群表现生长与 2 株菌分别单独培养时的生长趋势类似, 但在达到稳定期后出现了较为微弱的二次生长。对于发酵体系的 pH 而言, 共培养体系和 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 单培养组的 pH 低于 *P. sulfuriphila* LBM11005 单培养组, 且共培养体系的 pH 在 36–96 h 内再次有下降的趋势(图 3B)。在共培养体系中, 葡萄糖的消耗在中后期要快于单培养组, 尤其是在 72 h 后, 葡萄糖有显著的消耗(图 3C)。结合代谢产物丁酸和己酸的变化(图 3E–F), 判断出现该现象是由 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 开始快速生长引起的。就代谢产物乙酸而言, 不同于 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 单培养组先增后减的变化, 共培养组和 *P. sulfuriphila* LBM11005 单培养组中的乙酸呈逐渐积累趋势(图 3D), 表明共培养体系的乙酸净积累主要由 *P. sulfuriphila* LBM11005 贡献。相比于纯培养菌株, 在共培养实验组中的丙酸呈现先增后减的趋势(图 3G), 且在丙酸含量下降的同时观察到新的奇数碳脂肪酸——戊酸(最高累积产量为 1.44 g/L)和庚酸(最高累积产量为 0.22 g/L)的产生(图 3H–I)。

结合生长和产物的变化, 在以葡萄糖为发酵底物的共培养体系内 2 株单菌表现为交替生长, 即前期以 *P. sulfuriphila* LBM11005 生长为主, 表现为乙酸和丙酸的积累; 大约 48 h 后, *Caproicibacterium* sp. LBM19010 开始快速生长, 表现为丁酸、戊酸、己酸和庚酸的快速积累, 其中戊酸与庚酸合成的前体酸为丙酸。

### 2.3.2 乳酸条件下共培养菌群的生长与代谢特征

乳酸是窖泥体系中含有最高且长期存在的有机酸碳源<sup>[22]</sup>。因此, 我们进一步进行了不添加葡萄糖但添加乳酸的共培养实验, 获得的生

长、乳酸利用和代谢物产生情况见图 4。

如图 4A 所示, *P. sulfuriphila* LBM11005 单培养组和 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 单培养组所能达到的最大生物量基本一致 ( $OD_{600} \approx 1.0$ ), 而共培养菌群的生物量则要显著高于单培养组 ( $OD_{600} \approx 2.0$ )。对于体系的 pH 变化而言, *P. sulfuriphila* LBM11005 单培养组 pH 值变化不大, 最大降低幅度为 0.23。共培养组与 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 单培养组类似, 均为升 pH 发酵, 发酵终点 pH 值较初始 pH 值可分别增加 0.69 和 0.71 (图 4B)。底物测定结果表明, *P. sulfuriphila* LBM11005 不具有乳酸利用能力, 由 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 消耗培养基中的乳酸(图 4C)。因此, 2 株菌在共培养条件下不存在乳酸底物的竞争效应。结合短中链脂肪酸代谢产物进行分析(图 4D–I), 在共培养体系中, 乙酸在培养前 12–16 h 时有少量积累趋势, 随后呈现先下降后上升的趋势, 且后续开始上升的时间(36 h)与丙酸开始快速积累的时间一致, 表明此时 *P. sulfuriphila* LBM11005 开始快速生长。此外, 戊酸(最高累积产量为 0.30 g/L)和庚酸(最高累积产量为 0.061 g/L)分别在培养 16 h 及 24 h 后开始产生, 对应了己酸菌快速生长的时间段。因此, 由于不存在底物竞争效应且 *P. sulfuriphila* LBM11005 通过缓慢生长方式进行生长, 共培养体系内丙酸、丁酸、戊酸、己酸和庚酸基本表现出同步积累趋势, 表明 2 株菌可以在添加乳酸的共培养体系中共生。共培养前期(0–48 h)主要以 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 生长为主, 表现为乙酸净利用和丁酸、己酸的快速积累; *P. sulfuriphila* LBM11005 在整个生长周期产丙酸, 并被 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 利用, 由后者经反向  $\beta$ -氧化途径进行碳链延伸, 产生戊酸和庚酸。

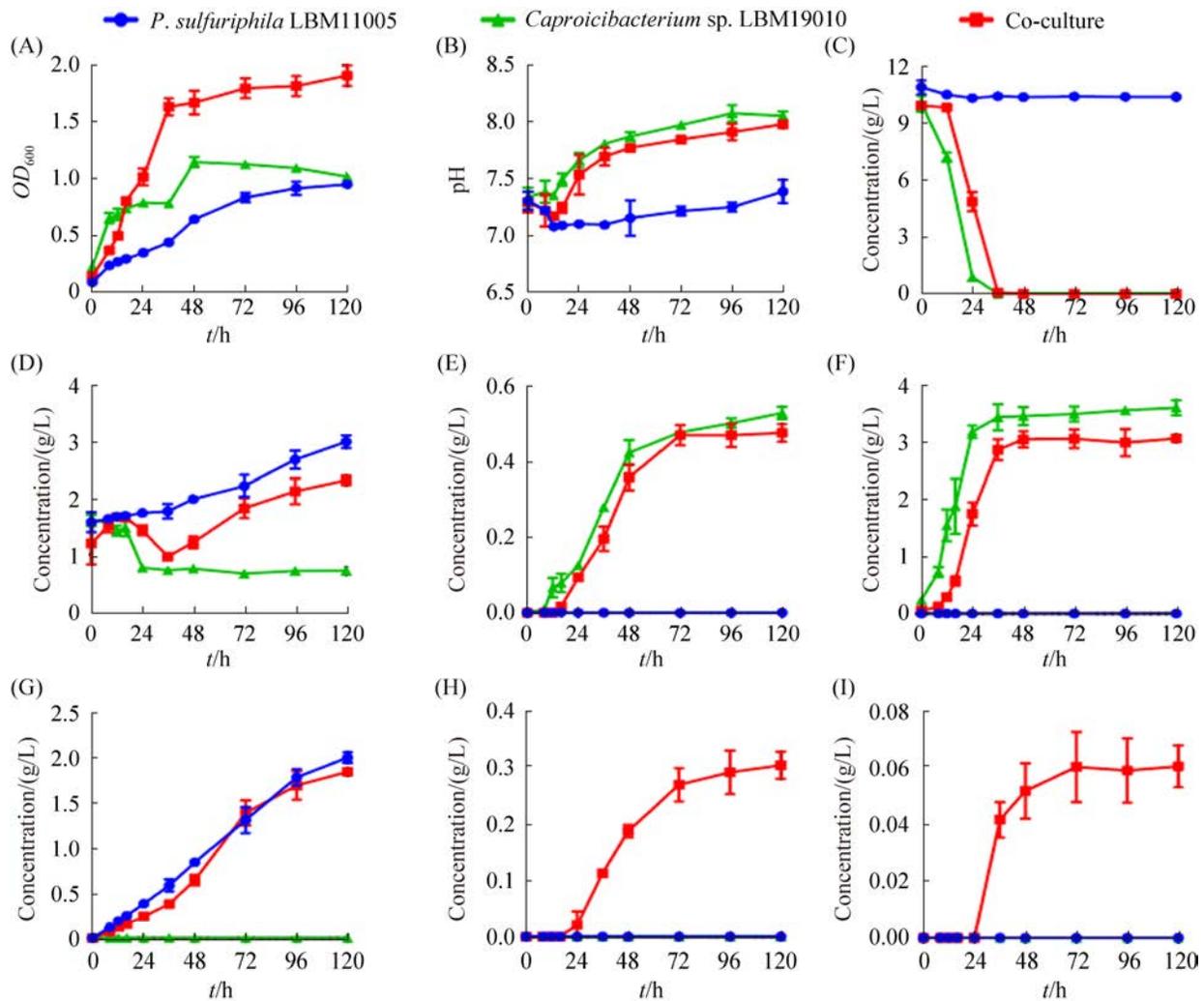


图4 乳酸碳源条件下 *P. sulfuriphila* LBM11005 与 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 共培养发酵特征  
 Figure 4 The fermentation characteristics for the co-culture of *P. sulfuriphila* LBM11005 and *Caproicibacterium* sp. LBM19010 supplemented with lactate. A: growth; B: pH. C: substrate utilization; D: acetate; E: butyrate; F: caproate; G: propionate; H: pentanoate; I: heptanoate. Data are reported as the mean $\pm$ SD of the results from three biological replicates.

上述葡萄糖条件和乳酸条件的共培养结果表明, 无论是否存在底物竞争效应, *Caproicibacterium* sp. LBM19010 均可以利用 *P. sulfuriphila* LBM11005 产生的丙酸进行碳链延伸, 产生新的奇数碳脂肪酸。其中, 2 株菌在以乳酸为碳源条件下的升 pH 发酵及共生长现象, 反映出 2 株主体窖泥微生物在窖泥实际体系中可能具有类似的生长与代谢特征。

### 3 讨论

浓香型白酒酿造窖泥在长期发酵过程中富集出了大量的土壤稀有菌, 是我国特有的传统发酵食品微生物资源宝库<sup>[23-24]</sup>。免培养技术和纯培养分离技术的结合已成为目前研究窖泥微生物的重要方法<sup>[13,21]</sup>。但不可否认的是, 窖泥中仍有大量的高丰度微生物未获得纯培养菌

株，限制了对窖泥微生物生态系统稳态维持机制的深度解析。本研究基于寡培养传代技术，成功富集并提高了窖泥中拟杆菌纲微生物的相对丰度，并在此基础上开展纯培养菌株筛选，成功分离到 *P. sulfuriphila* LBM11005 菌株，这也是从窖泥体系中首次分离得到的高丰度拟杆菌纲微生物的纯培养菌株。*P. sulfuriphila* LBM11005 的发酵分析表明，该菌能够在无葡萄糖条件下良好生长且 pH 值维持相对稳定。进一步结合窖泥低葡萄糖水平、近中性 pH 值的实际情况，推测该生理代谢特性可能是其成为窖泥主要优势微生物的重要原因之一。进一步代谢产物的分析表明，该菌具有合成丙酸和乙酸的能力，推测其是窖泥中的重要丙酸产生微生物。

之前的研究表明，在不同窖泥中广泛分布着以 *Caproicibacterium* sp. 为代表的己酸菌<sup>[21]</sup>和以 *Petrimonas* 为代表的拟杆菌<sup>[11]</sup>，这表明这 2 种微生物在窖泥中可能是共存的。但该共存是否存在某种相互联系或产生何种生态学功能还未可知。由于窖泥体系微生物复杂多样，在原位体系中探究 2 个主体微生物的相互作用存在困难。本研究基于 2 种微生物纯培养菌株的共培养分析表明，当存在葡萄糖时，2 种微生物存在一定的底物竞争效应；而当不存在葡萄糖，仅以乳酸作为 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 的碳源时，*P. sulfuriphila* LBM11005 利用培养基中添加的氮源物质缓慢生长，2 种均表现出更好的共存效应。如图 5 所示，由 *P. sulfuriphila*

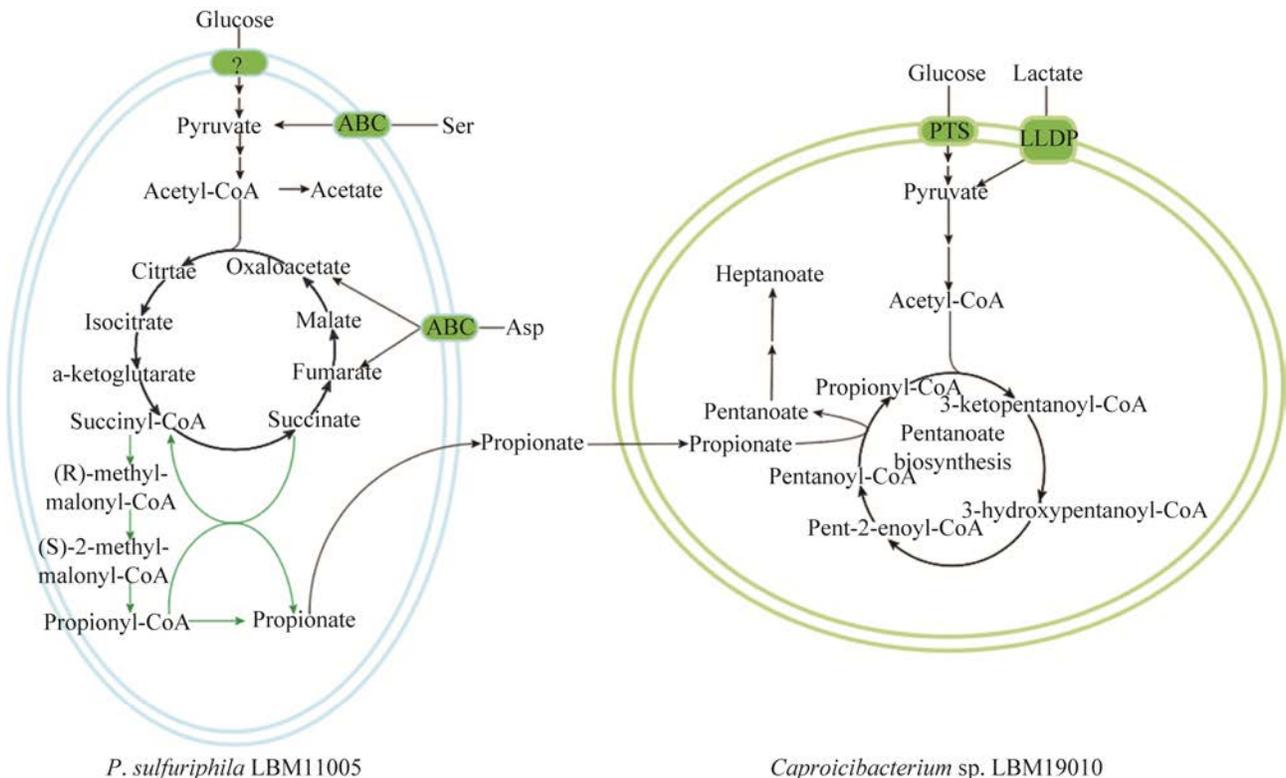


图 5 *P. sulfuriphila* LBM11005 与 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 在代谢物水平上相互作用模型  
Figure 5 The model of metabolic substrate interaction in *P. sulfuriphila* LBM11005 (left) and *Caproicibacterium* sp. LBM19010 (right). “?” in the figure indicates that the glucose transport system of *P. sulfuriphila* LBM11005 was unknown.

LBM11005 经三羧酸循环及丙酸合成途径生成的丙酸, 进入 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 细胞后被用作奇数碳脂肪酸合成的底物, 经反向  $\beta$  氧化进一步进行碳链的延长, 最终合成奇数碳脂肪酸——戊酸和庚酸。虽然奇数碳短中链脂肪酸(主要为丙酸、戊酸和庚酸)的含量显著低于偶数碳脂肪酸(主要为乙酸、丁酸和己酸)的含量, 但其同样也是浓香型白酒风格形成的重要风味化合物<sup>[6,25]</sup>。

本研究对拟杆菌纲微生物 *P. sulfuriphila* LBM11005 与主体己酸菌 *Caproicibacterium* sp. LBM19010 的代谢物互作进行了初步的探索, 2 种窖泥主体微生物是否还存在更复杂的相互作用关系仍然需要更为深入的探究。此外, 本研究表明窖泥微生物除可以通过丰富营养培养基获得主体己酸菌外, 其他类型的微生物如拟杆菌纲下的多个种属微生物, 可以通过寡营养培养方式获得纯培养菌株, 为后续实现更多窖泥未培养微生物的可培养化奠定了重要基础。

## 参考文献

- [1] Ding XF, Wu CD, Huang J, Zhou RQ. Interphase microbial community characteristics in the fermentation cellar of Chinese Luzhou-flavor liquor determined by PLFA and DGGE profiles. *Food Research International*, 2015, 72: 16–24.
- [2] Lu MM, Zhou WC, Ji F, Wu JF, Nie Y, Ren C, Xu Y. Profiling prokaryotic community in pit mud of Chinese strong-aroma type liquor by using oligotrophic culturing. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 337: 108951.
- [3] 胡晓龙, 王康丽, 余苗, 田瑞杰, 范海报, 孙继祥, 张军, 杨旭, 马歌丽, 魏涛. 浓香型窖泥原核微生物群落多样性及其在窖池中的空间异质性. *食品与发酵工业*, 2020, 46(11): 77–84.  
Hu XL, Wang KL, Yu M, Tian RJ, Fan HB, Sun JX, Zhang J, Yang X, Ma GL, Wei T. Biodiversity and spatial heterogeneity of prokaryote community in strong-flavor baijiu fermentation pit muds. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(11): 77–84. (in Chinese)
- [4] Chai LJ, Qian W, Zhong XZ, Zhang XJ, Lu ZM, Zhang SY, Wang ST, Shen CH, Shi JS, Xu ZH. Mining the factors driving the evolution of the pit mud microbiome under the impact of long-term production of strong-flavor baijiu. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(17): e0088521.
- [5] Zhang YY, Zhu XY, Li XZ, Tao Y, Jia J, He XH. The process-related dynamics of microbial community during a simulated fermentation of Chinese strong-flavored liquor. *BMC Microbiology*, 2017, 17(1): 196.
- [6] Gao JJ, Liu GY, Li AJ, Liang CC, Ren C, Xu Y. Domination of pit mud microbes in the formation of diverse flavour compounds during Chinese strong aroma-type baijiu fermentation. *LWT- Food Science and Technology*, 2021, 137: 110442.
- [7] Hu XL, Du H, Ren C, Xu Y. Illuminating anaerobic microbial community and cooccurrence patterns across a quality gradient in Chinese liquor fermentation pit muds. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(8): 2506–2515.
- [8] Zou W, Zhao CQ, Luo HB. Diversity and function of microbial community in Chinese strong-flavor baijiu ecosystem: a review. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 671.
- [9] 辜杨, 项兴本, 王少磊, 曹荣升, 任聪, 范文来, 徐岩. 基于窖泥微生物相对定量与绝对定量联用的窖泥老熟特征分析. *微生物学报*, 2021, 61(11): 3444–3457.  
Gu Y, Xiang XB, Wang SL, Cao RS, Ren C, Fan WL, Xu Y. Profiling the community structure of pit clay during aging process with the combination of relative and absolute quantitative approaches. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(11): 3444–3457. (in Chinese)
- [10] Fu JX, Chen L, Yang SZ, Li YZ, Jin L, He XP, He L, Ao XL, Liu SL, Liu AP, Yang Y, Ma BC, Cui XW, Chen SJ, Zou LK. Metagenome and analysis of metabolic potential of the microbial community in pit mud used for Chinese strong-flavor liquor production. *Food Research International*, 2021, 143: 110294.
- [11] Tao Y, Li JB, Rui JP, Xu ZC, Zhou Y, Hu XH, Wang X, Liu MH, Li DP, Li XZ. Prokaryotic communities in pit mud from different-aged cellars used for the production of Chinese strong-flavored liquor. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(7): 2254–2260.

- [12] 胡晓龙, 王康丽, 余苗, 牛广杰, 孟书剑, 马安银, 李红, 樊建辉, 何培新. 基于高通量测序的浓香型窖泥原核微生物群落的窖池空间分布. *中国酿造*, 2020, 39(6): 167–172.  
Hu XL, Wang KL, Yu M, Niu GJ, Meng SJ, Ma AY, Li H, Fan JH, He PX. Spatial distribution of prokaryotic microbial community of strong-flavor pit mud based on high-throughput sequencing. *China Brewing*, 2020, 39(6): 167–172. (in Chinese)
- [13] Liu CL, Huang D, Zhang WX. Combining culture-dependent and culture-independent molecular methods for the isolation and purification of a potentially novel anaerobic species from pit mud in a Chinese liquor distillery. *Journal of the Institute of Brewing*, 2016, 122(4): 754–762.
- [14] Chai LJ, Lu ZM, Zhang XJ, Ma J, Xu PX, Qian W, Xiao C, Wang ST, Shen CH, Shi JS, Xu ZH. Zooming in on butyrate-producing clostridial consortia in the fermented grains of baijiu via gene sequence-guided microbial isolation. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1397.
- [15] Gu Y, Zhu XJ, Lin F, Shen CH, Li Y, Ao L, Fan WL, Ren C, Xu Y. *Caproicbacterium amylolyticum* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Oscillospiraceae* isolated from pit clay used for making Chinese strong aroma-type liquor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2021, 71(4): 004789.
- [16] Mu DS, Liang QY, Wang XM, Lu DC, Shi MJ, Chen GJ, Du ZJ. Metatranscriptomic and comparative genomic insights into resuscitation mechanisms during enrichment culturing. *Microbiome*, 2018, 6(1): 230.
- [17] Koch AL. Oligotrophs versus copiotrophs. *BioEssays*, 2001, 23(7): 657–661.
- [18] Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC. *Anaerobe Laboratory Manual*. 4th edn. Blacksburg: VA: Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977.
- [19] Walters W, Hyde ER, Berg-Lyons D, Ackermann G, Humphrey G, Parada A, Gilbert JA, Jansson JK, Caporaso JG, Fuhrman JA, Apprill A, Knight R. Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4–5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. *mSystems*, 2015, 1(1): e00009-15.
- [20] Hahnke S, Langer T, Koeck DE, Klocke M. Description of *Proteiniphilum saccharofermentans* sp. nov., *Petrimonas mucosa* sp. nov. and *Fermentimonas caenicola* gen. nov., sp. nov., isolated from mesophilic laboratory-scale biogas reactors, and emended description of the genus *Proteiniphilum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(3): 1466–1475.
- [21] Wang HL, Gu Y, Zhou WC, Zhao D, Qiao ZW, Zheng J, Gao JJ, Chen X, Ren C, Xu Y. Adaptability of a caproate-producing bacterium contributes to its dominance in an anaerobic fermentation system. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(20): e0120321.
- [22] 张会敏, 王艳丽, 孟雅静, 王银辉, 李安军, 王志强, 张治洲, 邢新会. 浓香型白酒发酵新老窖泥理化因子和原核微生物群落结构差异分析. *食品科学*, 2020, 41(6): 207–214.  
Zhang HM, Wang YL, Meng YJ, Wang YH, Li AJ, Wang ZQ, Zhang ZZ, Xing XH. Differences in physicochemical properties and prokaryotic microbial communities between young and old pit mud from Chinese strong-flavor baijiu brewing. *Food Science*, 2020, 41(6): 207–214. (in Chinese)
- [23] Tao Y, Wang X, Li XZ, Wei N, Jin H, Xu ZC, Tang QL, Zhu XY. The functional potential and active populations of the pit mud microbiome for the production of Chinese strong-flavour liquor. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(6): 1603–1615.
- [24] 任聪, 杜海, 徐岩. 中国传统发酵食品微生物组研究进展. *微生物学报*, 2017, 57(6): 885–898.  
Ren C, Du H, Xu Y. Advances in microbiome study of traditional Chinese fermented foods. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(6): 885–898. (in Chinese)
- [25] Fan WL, Xu Y, Qian M. Current practice and future trends of aroma and flavor research in Chinese baijiu. *ACS Symposium Series*, Washington, DC: American Chemical Society, 2019: 145–175.

(本文责编 张晓丽)