

浓香型白酒窖泥中一株细菌的分离鉴定

郑若欣,冯治平,宗绪岩,卫春会,黄治国,赵斌

(酿酒生物技术及应用四川省重点实验室,四川 自贡 643000)

摘要:为了探讨 Biolog 微生物自动鉴定系统在窖泥微生物鉴定中的应用,试验从泸州老窖浓香型白酒发酵窖池窖泥中分离纯化得到 1 株细菌。经菌落特征观察和镜检后,由 Biolog 微生物自动鉴定系统鉴定为 *Bacillus cereus/thuringiensis* B(蜡状芽孢杆菌/苏云金芽孢杆菌 B)。

关键词:窖泥;细菌;Biolog 鉴定

中图分类号:Q939.1

文献标识码:A

窖池是生产浓香型大曲白酒的重要前提条件,好酒必产于优质的窖池,而好的窖池则依赖于优质的窖泥。优质窖泥中生长着种类繁多、功能各异、有益于酿酒的微生物菌群落,如球菌类、梭菌类、杆菌类,以及其它已知和未知的酿酒功能菌群类,其中,代谢己酸的梭状芽孢杆菌是产生浓香型大曲白酒的主体香—己酸乙酯的重要产香菌群类,及产其它各种呈味物质—有机酸的细菌菌群类等^[1]。因此研究窖泥中的微生物特别是微生物的分离鉴定对改善浓香型白酒发酵环境、促进新窖池的老熟,提高白酒的质量有重要的指导意义。

试验从泸州老窖窖泥中分离出 1 株细菌,纯化培养,利用 Biolog 微生物自动鉴定系统对分离到的菌株进行鉴定,为进一步研究提供较为准确的支撑资料。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

窖壁泥样品采自泸州老窖股份有限公司白酒生产窖池(乾隆年间开始使用的天成生作坊、窖龄 300 年左右)。于窖底中心取样,迅速置于冰盒运回,4℃保藏。

1.2 主要试剂

蛋白胨,牛肉膏(北京奥博星生物技术有限公司),葡萄糖、琼脂粉、95%乙醇(成都科龙公司),BUG 培养基、巯基乙酸钠等(美国 Biolog 公司)。

1.3 主要仪器与设备

Biolog 微生物自动鉴定系统、浊度仪、电动移液器(美国 Biolog 公司),显微成像系统(日本 NIKON 公司),MJ-250 恒温培养箱(上海和羽良公司)。

1.4 培养基的配制

称取牛肉膏 2.5 g,蛋白胨 5 g,琼脂粉 12 g,NaCl 2.5 g 于 1000 mL 的锥形瓶,加入 500 mL 的蒸馏水^[2],加热溶解,塞紧棉塞,牛皮纸包扎。121℃高压湿热灭菌 15 min,冷却至 45~50℃时在超净工作台上倒平板备用。

1.5 分离纯化

在无菌条件下,取 0.5 g 窖泥,加入 50 mL 无菌水,充分摇匀,自然沉淀后取上清液,得到 10⁻² 稀释样,然后依次制成 10⁻³~10⁻⁷ 稀释样。吸取 10⁻⁵~10⁻⁷ 菌悬液各 0.5 mL,均匀涂布于牛肉膏蛋白胨培养基平皿,28℃培养 48 h 后,根据菌种的生长状况,选取适当平皿,挑取单菌落,转接于另一平皿,依照此法转接 2~3 次,进行分离纯化,根据菌落特征及革兰氏染色镜检确认为细菌后,挑取单菌落移入斜面,培养后备用。

1.6 富积培养

挑取斜面上的菌落,在滴加了巯基乙酸钠的 BUG 培养基平板上进行十字划线接种,37℃下恒温培养 12 h。

收稿日期:2012-05-05

基金项目:四川省科技厅应用基础项目(07JY029-026);四川理工学院引进人才项目(2007-18)

作者简介:郑若欣(1987-),女,四川巴中人,硕士生,主要从事发酵工程方面的研究,(E-mail)miemei8724@yahoo.cn

1.7 Biolog 鉴定

在无茵条件下,用灭菌棉签从 BUG 培养基平板上挑取十字接种外周的菌落,接种于 GN/GP-IF 接种液中,使其浊度调整为 28%,用移液器接种到 GP2 Micro-Plate 上,28℃ 培养 4~6 h、16~24 h、48 h 后分别用 Biolog 自动微生物鉴定系统进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 窖泥细菌的分离纯化及镜检结果

本试验从泸州老窖窖泥样品中成功分离得到 1 株菌 A1,具有细菌菌落的形态特征:湿润、较光滑、较透明、较粘稠、易挑取、质地均匀等。对分离到的菌株进行革兰氏染色镜检后发现:A1 菌为革兰氏阳性菌,杆状,有芽孢,没有杂菌的存在(图 1),已经达到了较纯的程度,可用于 Biolog 的鉴定。

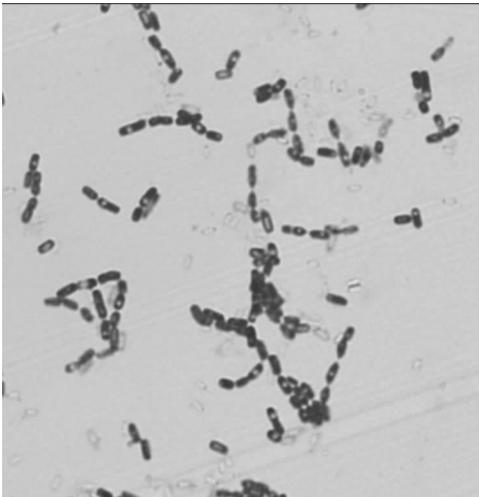


图 1 A1 镜检结果($\times 100$)

2.2 Biolog 鉴定结果

由 BUG 培养基十字划线富集培养结果可以看出,菌种生长十分旺盛,没有杂菌存在,基本达到 Biolog 鉴定中的微平板接种所需要的纯度以及所需要的微生物的量。对其进行 Biolog 鉴定,结果发现:菌株 A1 鉴定板培养 4~6 h 的鉴定结果显示“NO ID”,给出的最大可能结果为 *Bacillus cereus/thuringiensis* B(蜡状芽孢杆菌/苏云金芽孢杆菌 B),其 SIM 值为 0.728;DIST 值为 4.11(图 2)。培养 16~24 h 的鉴定结果显示“SPECIES ID”,表示已经鉴定出了可能性相当大的菌种,系统给出的最大可能结果是 *Bacillus cereus/thuringiensis* B(蜡状芽孢杆菌/苏云金芽孢杆菌 B),其 PROB 值为 100%,SIM 值为 0.641;DIST 值为 5.48(图 3)。

Biolog 系统鉴定结果主要有 3 个参数:可能性(PROB),相似性(SIM)和位距(DIST)。其中 SIM 值和

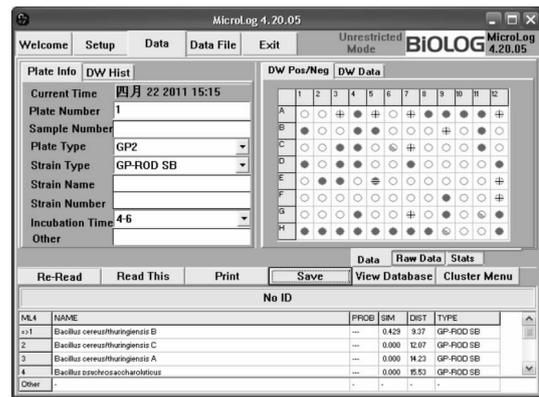


图 2 A1 菌 4~6 h 鉴定结果

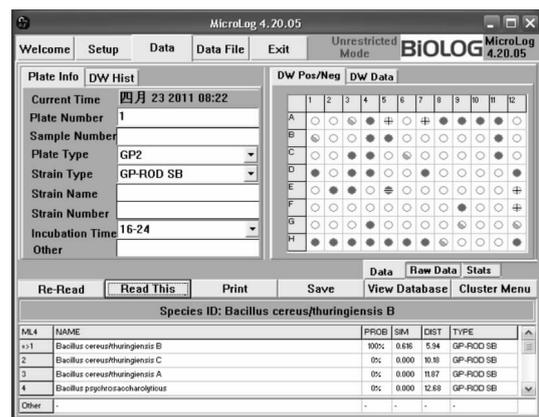


图 3 A1 菌 16~24 h 鉴定结果

DIST 值是两个重要的参数,DIST 值表示测试结果与数据库相应数据条的位距,SIM 值表示测试结果与数据库相应数据条的相似程度。Biolog 系统规定:芽孢杆菌在获得良好鉴定结果时,培养 16~24 h,SIM 值应 ≥ 0.50 。系统给出的鉴定结果为种名,SIM 值越接近 1.00,表明鉴定结果的可靠性越高;当 SIM 值小于 0.5,但鉴定结果中属名相同的结果的 SIM 值之和大于 0.5 时,自动给出的鉴定结果为属名^[3]。因此根据结果可以认为细菌 A1 为蜡状芽孢杆菌/苏云金芽孢杆菌 B。

3 结束语

试验对从泸州老窖窖泥中分离出的 1 株细菌进行形态学分析并进行 Biolog 鉴定。由镜检和 Biolog 的鉴定结果可知为 *Bacillus cereus/thuringiensis* B(蜡状芽孢杆菌/苏云金芽孢杆菌 B)。

蜡状芽孢杆菌/苏云金芽孢杆菌 B 同属蜡状芽孢杆菌属,两种菌染色体体外遗传物质可以出现高度重组,DNA 水平也具有较高的同源性,只有个别碱基有差异^[4]。因此 Biolog 系统利用生化方法不能进行区分,可以运用 REP-PCR 指纹法即细菌基因组重复序列 PCR 技术进行分析^[5-6]。

目前 Biolog 微生物鉴定系统可用于细菌,真菌及微生物群落研究等方面,在临床\食品行业都得到了应用。但是 Biolog 微生物鉴定系统也存在自身的局限性,如数据库覆盖面小,更新慢,菌种高等。因此针对本试验的结果将 Biolog 系统与各种分子方法联用^[7],并选取相关的数据分析模式对结果进行有效的处理分析将会得到更为准确有效的结果。同时也使得 Biolog 系统鉴定方法应用范围不断扩大,为基础研究和工业生产提供更为可靠简捷的研究手段。

参考文献:

- [1] 胡永和.窖池对浓香型白酒生产的重要性[J].酿酒科技,2006(4):58-59.
- [2] 杨文博.微生物学实验[M].北京:化学工业出版社,2004.
- [3] 罗惠波,黄治国.Biolog 微生物鉴定系统在大曲微生物多样性研究中的应用初探[J].中国酿造,2009,4(3):92-94.
- [4] 宋树生.苏云金芽孢杆菌与蜡状芽孢杆菌亲缘关系研究[J].中国公共卫生,2007(3):321-323.
- [5] 周贤轩,杨波.几种分子生物学方法在菌种鉴定中的应用[J].生物技术,2004(12):35-38.
- [6] 罗惠波,李浩,黄治国,等.浓香型大曲微生物群落结构的 PCR-SSCP 分析条件优化[J].四川理工学院学报:自然科学版,2009,22(4):72-75.
- [7] 刘鹏. Biolog 系统和 16SrDNA 序列分析方法在植物病原细菌鉴定中的应用[J].植物检疫,2006(2):87-86.

Isolation and Identification of a Bacterial Strain From Pit Mud of Luzhou-flavor Liquors

ZHENG Ruo-xin, FENG Zhi-ping, ZONG Xu-yan, WEI Chun-hui, HUNG Zhi-guo, ZHAO Bin
(Liquor-making Biotechnology & Application Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong 643000, China)

Abstract: For the purpose of application of Biolog automated microbes identification system in microorganism of pit mud, the test separated and a strain of bacteria from pit mud of Luzhou-flavor Liquors in Luzhou Laojiao fermentation pit is obtained. After colony characteristics and microscopic examination observed, the results show that aerobic bacteria is *Bacillus cereus* or *thuringiensis* B by the biolog automated microbes identification system.

Key words: pit mud; bacteria; Biolog identification