

浓香型大曲中多株芽孢杆菌的分离及鉴定

王 勇, 罗惠波, 刘燕梅, 王艳丽, 叶光斌

(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:采用传统微生物分离方法从浓香型白酒大曲中筛选出 8 株优势芽孢杆菌,通过形态特征观察并结合细菌脂肪酸鉴定技术(MIDI 鉴定系统)对其进行鉴定。结果表明,从大曲中分离筛选得到 8 株芽孢杆菌分属于 5 个种,分别为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、浸麻类芽孢杆菌(*Paenibacillus macerans*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。

关键词:芽孢杆菌;浓香型白酒;大曲;MIDI 鉴定系统

中图分类号:Q815

文献标志码:A

引 言

浓香型大曲通过开放式生产,自然接种的生产方式,形成了复杂的微生物和酶系结构,为白酒生产提供丰富的糖化、发酵剂^[1]。浓香型大曲中聚集着种类繁多的微生物群落体系,在制曲过程中伴随着微生物群落的彼此消长和复杂的物质和能量代谢。芽孢杆菌在自然界中广泛存在,与其他微生物相比,具有耐酸、耐盐和耐高温等优点,在样品中具有一定稳定性^[2]。芽孢杆菌是在大曲发酵的中后期开始大量繁殖,并成为优势种群。这些芽孢杆菌一定程度上对白酒的风味和质量起到关键的作用,因此有必要对大曲中可培养芽孢杆菌属进行鉴定。

传统的微生物鉴定手段一般都是利用传统的分离纯化方法结合纯菌的形态特征观察和生理生化鉴定,并参照《伯杰细菌鉴定手册》,确定相关菌株的分类信息。近年来,基于核糖体基因测序的分子生物学方法越来越多的应用于微生物的初步鉴定。然而,对于部分芽孢杆菌属内的近似种,如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)、萎缩芽孢杆菌(*B. atrophaeus*)等,难以获得有效的区分。颜林春等对福矛

高温大曲中的芽孢杆菌进行 16SrDNA - RFLP 鉴定^[3]。喻国辉等对利用 16SrDNA 结合 *gyrA* 和 *gyrB* 基因对生防芽孢杆菌进行快速鉴定^[4]。目前基于此方法可以有效区分芽孢杆菌属近似种。但以上方法较为费时费力。

MIDI 微生物鉴定系统是一种快速、简便的微生物鉴定系统,它通过分析微生物细胞膜内的磷脂脂肪酸(PLFA)成分确定出微生物的属性。磷脂脂肪酸是生物细胞膜的组成成分之一,且胞内磷脂含量相对稳定,它具有结构多样性和微生物特异性的特点,通过对微生物磷脂脂肪酸的测定就可以确定出微生物的属性^[5]。目前这项技术对细菌种属和亚种的鉴定及多样性研究已经十分成熟^[5-9]。本文通过形态特征观察结合 MIDI 鉴定系统对芽孢杆菌进行快速鉴定,并可以通过结合其他不同的分析方法验证其分类信息的可靠性。

1 材料与方 法

1.1 实验材料及主要仪器设备

样品:浓香型成品大曲(四川泸州老窖酒厂制曲车间提供的成品大曲)。

仪器设备:BA210Digital 型数码显微镜(北京麦克奥

收稿日期:2015-03-18

基金项目:四川省教育厅重大培育项目(12ZA009);四川理工学院人才引进项目(2010XJKRL001)

作者简介:王 勇(1989-),男,山西大同人,硕士生,主要从事发酵工程方面的研究,(E-mail)xuemou66@163.com

迪有限公司),MIDI全自动微生物鉴定系统(美国MIDI公司),超净工作台(SW-CJ-2D,江苏苏净集团有限公司),KYC-100C恒温培养箱(上海福玛实验设备有限公司),MLS-3020高压蒸汽灭菌锅(北京艾飞博科技有限公司),E200正置显微镜(日本尼康公司),GC7890-5975MSD气相色谱-质谱联用仪(美国Agilent科技有限公司)。

1.2 菌种分离

将成品曲在无菌条件下混合粉碎,用四分法取样。称取10g样品于90mL无菌生理盐水中,摇床振荡10~20min后在65℃水浴锅中恒温10min,然后逐级稀释,将稀释后的 10^{-3} 和 10^{-4} 浓度菌悬液用平板法涂布于牛肉膏蛋白胨培养基中(牛肉膏3g,蛋白胨5g,氯化钠3g,琼脂18g加1L去离子水加热混合),于培养箱中37℃恒温培养1~2天。依生长情况而定选取适宜平板,挑取不同形态的单菌落用平板划线法进行分离纯化,通过镜检进行简单的分类和编号,然后接种于斜面培养基中,37℃恒温培养24h,4℃保存。

1.3 微生物的形态鉴定

对分离纯化后的菌株进行菌落形态和显微镜单菌形态观察,然后对其进行革兰氏染色、芽孢染色和荚膜染色。

菌落形态及单菌形态:利用菌落分析仪和显微镜观察。

革兰氏染色:通过革兰氏染色镜检观察菌落特征。

芽孢染色:用Sxhaeffer-Fulton法进行染色^[10]。

荚膜染色:方法是湿墨水荚膜染色法^[10]。

1.4 MIDI微生物鉴定系统对菌种的鉴定

实验方法主要参照MIDI微生物鉴定系统操作手

册。(1) 获菌:采用TSBA培养基(胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)30g,琼脂10g加1L无菌水热溶后混合。其中TSB和琼脂均购自Fisher公司)培养芽孢杆菌,按照四区划线法于37℃培养24h。用接种环挑取3~5环约40mg湿重的菌种于一个干净、灭菌、有螺旋盖的试管中,最好选用第三区的菌区。(2) 皂化:加1mL的皂化试剂,拧紧盖子,漩涡振荡5s,在100℃的沸水中加热5min,于室温冷却振荡5s,再继续水浴20min,冷却至室温。(3) 甲基化:加入甲基化试剂2mL,拧紧盖子漩涡振荡5s,80℃水浴10min,冷却到室温。(4) 萃取:加入1.25mL萃取试剂,拧紧盖子温和振荡10min,开盖吸除下层相,保存上层有机相。(5) 基本洗涤:加洗涤剂3mL,拧紧盖子温和旋转振荡5min,开盖取出约2/3体积的上层有机相于GC样品瓶中,用于气相检测。

Agilent 7890N气相色谱系统分析仪器进行检测。二阶程序温度升到170℃开始,每分钟升高5℃,至260℃止,再每分钟升高40℃,一直到310℃止,过程持续90s,汽化室温度250℃、检测器温度300℃,载气是氢气($2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)、尾巴吹气是氮气($30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$);柱前压68.95kPa,进样量加1uL,进样分流比100:1^[11-12]。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌的形态学观察

从大曲中分离获得的8个菌株分别编号为B2-1, B5-1, B5-2, B6-1, B6-2, 3-2, 5-2, 6-1。将分离的单菌进行平板划线,通过菌落形态特征观察及革兰氏染色、荚膜染色和镜检,对各单菌的生长特征和个体形态特征进行观察,结果见表1。

表1 菌落形态特征观察结果

菌株编号	形状	大小/mm	边缘	隆起形状	透明度	颜色	表面	革兰氏染色	芽孢染色	荚膜染色
B2-1	圆形	2	圆整	凸起	不透明	黄色	湿润	+	+	+
B5-1	圆形	2	圆整	凸起	不透明	黄白色	湿润	+	+	-
B5-2	圆形	2	圆整	凸起	不透明	黄白色	湿润	+	+	+
B6-1	圆形	3	圆整	不凸起	不透明	黄白色	湿润	+	+	+
B6-2	圆形	2	圆整	不凸起	不透明	黄白色	湿润	+	+	+
3-2	圆形	1	圆整	凸起	透明	微黄	干燥	+	+	+
5-2	不规则	2	缺刻	凸起	不透明	乳白色	湿润	+	+	-
6-1	不规则	3	缺刻	不凸起	半透明	微黄	干燥	+	-	+

观察发现:B2-1号菌落黄色,体积中,表面不光滑,有光泽,边缘整齐,近圆形,中间凸起;B5-1和B5-2菌落形态类似,黄白色,体积大,表面光滑,有光泽,圆形,隆起,边缘整齐;B6-1和B6-2菌落形态类似,黄白色,体积中,表面光滑,有光泽,近圆形,中间凸起,边

缘较整齐;3-2号菌落淡黄色,体积小,表面光滑,有光泽,近圆形,扁平,边缘整齐;5-2号菌落乳白色,体积中,表面粘稠不易,无光泽,不规则,扁平,边缘不整齐;6-1号淡黄色,体积中,表面光滑,有光泽,近圆形,扁平,边缘整齐;8株菌的菌落特征和镜检形态如图1所示。

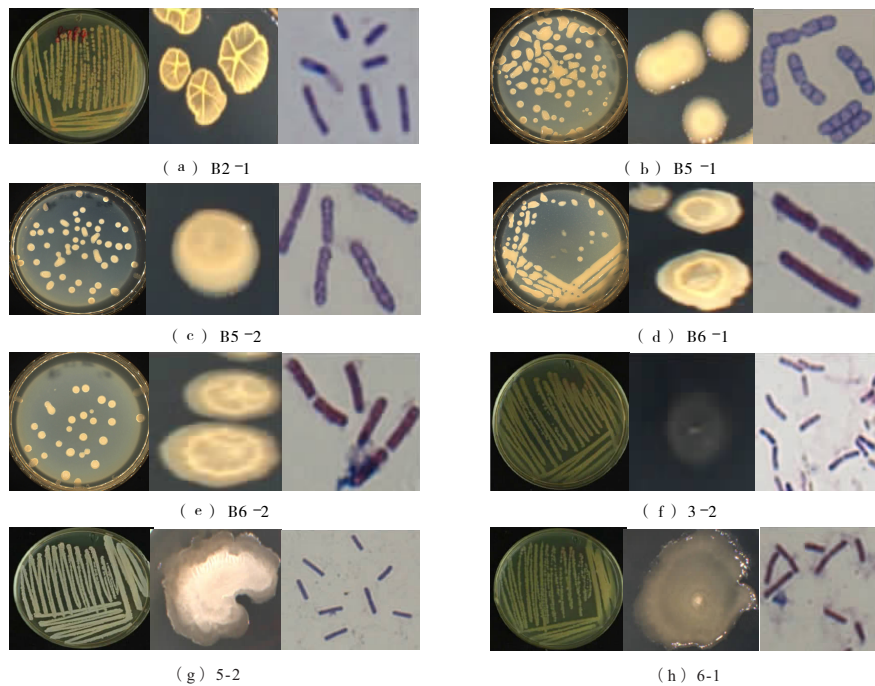


图 1 菌落形态特征及镜检图

2.2 芽孢杆菌的磷脂脂肪酸鉴定

芽孢杆菌的磷脂脂肪酸鉴定结果见表 2。分离的 8 株芽孢杆菌分属于 5 个种,鉴定结果相似性指数都大于 0.5,为典型菌种。

表 2 大曲内芽孢杆菌的 PLFA 鉴定

编号	种 名	中文种名	相似性指数
B2-1	<i>Paenibacillus macerans</i>	浸麻类芽孢杆菌	0.549
B5-1	<i>Bacillus megaterium</i>	巨大芽孢杆菌	0.714
B5-2	<i>Bacillus megaterium</i>	巨大芽孢杆菌	0.882
B6-1	<i>Bacillus megaterium</i>	巨大芽孢杆菌	0.807
B6-2	<i>Bacillus megaterium</i>	巨大芽孢杆菌	0.857
3-2	<i>Bacillus pumilus</i>	短小芽孢杆菌	0.792
5-2	<i>Bacillus atrophaeus</i>	萎缩芽孢杆菌	0.520
6-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	地衣芽孢杆菌	0.816

注:微生物自动鉴定系统的依据是对微生物鉴定相似性指数(SI)的值要求:SI > 0.500,表明匹配性高,为典型种;0.300 < SI < 0.500,表明匹配性低,为非典型种;SI < 0.300,说明数据库没有此种菌种信息,给出的是最相似的种。

MIDI 鉴定系统推荐的菌种鉴定结果要求为:供使菌株鉴定的第一选择 SI 值范围在 0.520 ~ 0.882 之间,且第一选择和第二选择 SI 差值达 0.124 以上。本次实验的 8 个菌株鉴定结果均在该置信范围内。由此以第一选择作为菌种鉴定名较为可信,表明利用 MIDI Sherlock 系统鉴定分析细菌的分类信息效果很好。

3 讨 论

传统微生物鉴定需要消耗大量工作时间和成本,过程繁琐,且对部分芽孢杆菌很难鉴定到种。本研究采用

MIDI 鉴定系统对分离获得的芽孢杆菌进行分析,较大幅度地保证了结果的准确性和客观性。实验结果表明,MIDI 鉴定系统对于鉴定芽孢杆菌具有明显的优势,对大曲中分离到的这些芽孢杆菌都能够直接鉴定到种。相似性指数均高于 0.5,匹配性较好,能可靠地反映细菌所属种类。后续工作可将以上鉴定结果与分子生物学鉴定结果加以比较,相互验证。

本研究获得的菌株分属与巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、浸麻类芽孢杆菌(*Paenibacillus macerans*)、萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),其中短小芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌均为大曲中已报到的常见菌种^[3],而萎缩芽孢杆菌常从土壤中分离得到,在农业、工业和医疗等领域有广泛应用^[9],该菌株可能来源于土壤中。

由于大曲中微生物群落结构复杂,以及微生物之间存在共生关系,还有部分芽孢杆菌未从大曲中分离培养鉴定出来。因此,这一部分可培养的微生物细菌不能代表整个大曲群落结构的完整性。需要进一步对未培养的芽孢杆菌进行研究。此外,大曲制曲过程品温和环境的变化会导致微生物群落结构发生变化,所以还需要对大曲的制曲过程芽孢杆菌的分布特性进行跟踪研究。

参 考 文 献:

[1] 王世宽,侯华,张强,等.伏曲培养过程中微生物及理

- 化指标的研究[J].酿酒科技,2009(4):39-42.
- [2] 庄名扬.红曲霉在中国白酒生产中的作用[J].酿酒,2005(5):101-102.
- [3] 颜林春,张守财,马校卫,等.福矛高温大曲中芽孢杆菌 16SrDNA-RFLP 及系统发育树鉴定[J].生物科学,2012,22(2):53-58.
- [4] 喻国辉,牛春艳,陈远凤,等.利用 16SrDNA 结合 *gyrA* 和 *gyrB* 基因对生防芽孢杆菌 R31 的快速鉴定[J].中国生物防治,2010,26(2):160-166.
- [5] 颜慧,蔡祖聪,钟文辉.磷脂脂肪酸分析方法及其在土壤微生物多样性研究中的应用[J].土壤学报,2006,43(5):851-859.
- [6] 吴愉萍,徐建明,汪海珍,等.Sherlock MIS 系统应用于土壤细菌鉴定的研究[J].土壤学报,2006,43(4):642-647.
- [7] 张国赏,吴文娟,潘仁瑞.气相色谱—质谱法检测细菌脂肪酸及其在细菌鉴定上的应用[J].合肥联合大学学报,2000,10(4):92-96.
- [8] 张晓霞,王直强,李世贵,等.脂肪酸组分分析在不动杆菌鉴定中的应用[J].生物技术通报,2009(6):151-154.
- [9] 马顶虹,龚海燕,李萌萌,等.萎缩芽孢杆菌生理生化特征与检测鉴定[J].安徽农学通报,2014,20(7):33-35.
- [10] 黄秀梨.微生物学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2006.
- [11] 王秋红,陈亮,林营志,等.福建省青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性研究[J].中国农业科学,2007,40(8):1675-1687.
- [12] 蓝江林,朱育菁,苏明星,等.水葫芦内生细菌的分离与鉴定[J].农业环境科学学报,2008,27(6):2423-2429.

Separation and Identification of *Bacillus* Spp. From Luzhou-flavor Daqu

WANG Yong, LUO Huibo, LIU Yanmei, WANG Yanli, YE Guangbin

(Key Laboratory of Liquor Making Biological Technology & Application of Sichuan Province, Zigong 643000, China)

Abstract: 8 dominant *Bacillus* in Luzhou-flavor liquor Daqu were separated out by traditional microbial separation methods. According to the morphological observation and bacterial fatty-acid identification technique (MIDI identification system), 8 dominant *Bacillus* spp. were identified. The result showed that the 8 dominant bacillus strains were categorized into 5 species (*Bacillus megaterium*, *Paenibacillus macerans*, *B. pumilus*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*).

Key words: *Bacillus*; Luzhou-flavor liquor; Daqu; MIDI identification system