

荧光定量 PCR 法定量白酒固态发酵过程中产土味素的链霉菌

路虎¹ 杜海¹ 徐岩^{1*} 杜小威² 王栋¹

(1. 江南大学 生物工程学院 酿造微生物与应用酶学研究中心 江苏 无锡 214122)

(2. 山西杏花村汾酒厂股份有限公司技术中心 山西 汾阳 032205)

摘要:【目的】荧光定量 PCR 法具有特异性高、灵敏度高等优点,在定量复杂环境中微生物数量方面得到广泛应用。本文采用荧光定量 PCR 方法对固态白酒发酵过程产土味素链霉菌进行定量分析并验证其准确性。【方法】通过优化大曲和酒醅中微生物基因组提取方法,并建立相应的大曲和酒醅两种基质条件下的荧光定量 PCR 标准曲线,并对方法的精度和准确度进行验证分析。采用荧光定量 PCR 方法对大曲和酒醅中产土味素链霉菌进行定量分析。【结果】结果表明大曲中产土味素链霉菌数量在 10^5 数量级,并且清茬曲中此类链霉菌数量最高。酒醅发酵起始阶段产土味素链霉菌数量在 10^4 数量级,而后随着发酵的不断进行,酒醅中此类链霉菌数量有所减少。【结论】荧光定量 PCR 方法能够对白酒固态发酵过程中产土味素链霉菌准确进行定量分析,对采用此方法定量其他微生物具有借鉴意义。

关键词: 土味素, 大曲, 酒醅, 荧光定量 PCR

The application of real-time PCR for quantify TDMTDL producing micobes in liquor brewing process

LU Hu¹ DU Hai¹ XU Yan^{1*} DU Xiao-Wei² WANG Dong¹

(1. Center for Brewing Science and Enzyme Technology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Shanxi Xinghuacun Fen Liquor Technology Center, Fenyang, Shanxi 032205, China)

Abstract: [Objective] The real-time PCR, with high specificity and high sensitivity, has been widely applied in quantifying microbial quantity in complex environments. We used this method to quantify TDMTDL (trans-1,10-Dimethyl-trans-9-decalol) producing micobes during the liquor brewing proecess. [Methods] Through the optimization of DNA extraction method for *Daqu* and fermented grains, we established two real time-PCR standard curves for *Daqu* and fermented grains respectively. The precision and accuracy of this method were verified. The real-time PCR method was applied to quantify the Streptomyces which produced TDMTDL in *Daqu* and fermented gains. [Results] The results showed that TDMTDL producing Streptomyces number was 10^5 orders of magnitude in *Daqu* and the number was highest in *Qingcha* among three kinds of *Daqu*. In the initial

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31000806); 江苏省产学研前瞻性联合研究项目(No. BY2010116); 中国白酒 169 计划; 国家 863 计划项目(No. 2012AA021301)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918201; ✉: yxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2013-03-25; 接受日期: 2013-04-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

stage of fermentation, the microbial number was 10^4 orders of magnitude. Along with the continuous fermentation, the number of *Streptomyces* decreased. [Conclusion] Real-time PCR could quantify earthy odor producing *Streptomyces* in liquor brewing process successfully, this work also had significance of quantify other microbes in liquor brewing process.

Keywords: TDMTDL, *Daqu*, Fermented gains, Real-time PCR

酒精饮料中尤其是清香型白酒中糠臭味是一种令人非常不愉快的气味^[1-4],严重影响清香型白酒的风味品质,是降低清香型白酒等级的主要原因。一直以来关于糠臭味物质的化学本质、在白酒酿造过程中的产生机制和机理等问题影响着清香型白酒质量的进一步提高。

2011年徐岩等^[5]通过气相色谱-嗅觉测量法(GC-O)结合气相色谱-质谱(GC-MS)技术首次发现并确定白酒中糠臭味物质的化学本质为土味素。通过追踪白酒酿造过程中土味素的产生规律,确定土味素的真正来源是大曲^[6]。采用传统微生物分离方法,从大曲中分离筛选到4株产土味素的菌株,经鉴定属于链霉菌。

由于传统白酒酿造过程是一个开放、多菌种的固态发酵过程,大曲和酒醅中含有复杂的微生物群落体系^[7-8]。在制曲和酒醅发酵过程中,微生物的群落结构也是在不断变化的^[9-10]。而且在大曲和酒醅的发酵过程中,经过微生物的代谢活动,产生酒精及丰富的风味物质,包括酯类、酸类、醇类等物质。白酒酿造基质和测定环境的复杂性决定了采用传统微生物分离计数方法很难对大曲和酒醅中微生物进行全面和准确定量。

荧光定量 PCR 方法是将普通 PCR 和光谱分析、实时检测等手段巧妙结合到一起的一项技术^[11],具有特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、自动化程度高等优点,已成为分子生物学领域的重要技术工具。荧光定量 PCR 方法是如今国际上应用较为广泛的一种定量复杂环境中微生物数量的方法^[12-15],通过特定引物的设计及对 16S rDNA 等保守序列上进行待扩增序列的选择^[16-17],定量相关微生物基因组浓度,通过所建立的标准曲线计算微生物数量。Chen 等^[18]早在 1997 年采用荧

光定量的方法研究食物中沙门氏菌数量时,其所建立标准曲线的检测限很低,检测范围很宽。Harms 等^[19]用荧光定量的方法定量城市污水处理厂污泥悬浊液中硝化细菌数量时也取得了理想的效果。

在本实验室研究的基础上,本文通过对基因组提取方法进行优化处理,随之验证荧光定量 PCR 方法在白酒酿造水平上的准确性,并进一步对白酒酿造过程中产土味素链霉菌进行定量分析。

1 材料与方法

1.1 材料和设备

SsoFast™ EvaGreen® Supermix, 购于美国 Bio-Rad 公司;溶菌酶,购于 TIANGEN 公司;苯酚、异戊醇、三氯甲烷,均为分析纯,购自上海生工;玻璃珠(0.1 mm),购于 Sigma 公司。

Millipore SAS 67120 Molsheim 超纯水仪,法国;Mini BeadBeater Biospec,美国;微量分光光度计 Nanodrop 8000,美国 Thermo Scientific;荧光定量 PCR 仪 Opticon Monitor 3,美国 Bio-Rad 公司。

产土味素链霉菌:*Streptomyces albus* (简称 QC),本实验室筛选。

1.2 取样方法

大曲取样:正常生产清茬曲、红心曲和后火曲分别是 9、10 月出房大曲,粉碎过筛备用。

酒醅取样:正常生产大茬、二茬酒醅各发酵 0、1、3、5、9、15、21、30 d。

样品-20℃冷冻保藏。

1.3 基因组提取方法

1.3.1 样品预处理:大曲和酒醅样品置于离心管中,加水涡旋清洗。10 000 r/min 离心 10 min,弃上清。重复操作 3 次。

1.3.2 微生物基因组提取:选取 4 种基因组提取方法,包括:SDS+珠磨、液氮+SDS+珠磨、溶菌

酶+SDS+珠磨、异位破碎。参照文献[7]操作。

1.4 荧光定量 PCR 方法

1.4.1 产土味素基因序列 PCR 扩增: 目前已明确编码土味素的基因为 *geoA*, 产土味素链霉菌中均含有该基因, 前人鉴定过的含有基因 *geoA* 并且产土味素链霉菌有 *Streptomyces griseus* NBRC 13350 (ID: 6214972); *Streptomyces avermitilis* MA-4680 (ID: 1210359); *Streptomyces scabiei* 87.22 (ID: 8839012)等。根据前人研究设计引物及建立荧光定量 PCR 方法, 具体方法见文献[20]。

1.4.2 荧光定量 PCR 方法标准曲线的建立: 配制不同稀释度的产土味素菌株 QC 分别添加到大曲和酒醅中, 提取基因组后用于荧光定量 PCR, 建立产土味素链霉菌在大曲和酒醅中的荧光定量 PCR 方法标准曲线。

1.4.3 定量方法验证: 将不同数量的 QC 菌株分别注入到大曲和酒醅中, 运用荧光定量 PCR 的方法定量 QC 菌株的数量, 对方法的准确性进行验证。

$$\text{准确率计算公式: 准确率(\%)} = \frac{M_1 - M_2}{M} \times 100$$

式中, M_1 : 荧光定量 PCR 方法检测到 QC 菌株数量; M_2 : 大曲或酒醅中自身 QC 菌株数量; M : 大曲或酒醅中 QC 菌株添加数量。

2 结果与分析

2.1 大曲和酒醅中微生物基因组提取方法的优化

按 1.3.2 中 4 种方法进行大曲和酒醅中 DNA 的提取, 对测得的 DNA 浓度和 OD 值(A_{260}/A_{280}) 进行比较。DNA 浓度越高, 代表提取基质中微生物基因组的效率越高, A_{260}/A_{280} 越接近 1.8 表示提取 DNA 纯度越高。然后进行荧光定量 PCR 实验, 并进行扩增效率对比。

从表 1 对比结果可知, 4 种方法得到的大曲和酒醅基因组的浓度相差较大, SDS+珠磨法得到的 DNA 浓度最高, 异位破碎法最低, 仅为 SDS+珠磨法 10%左右。其他两种方法在两者范围之间。

A_{260}/A_{280} 在 1.9–2.1 之间, 异位破碎法得到的基因组纯度最高, 次之为 SDS+珠磨法的方法。从后续荧光定量 PCR 实验表明, 4 种 DNA 提取方法均能提取到目的微生物基因组, 且扩增效率在 96%–104%之间, 效率均很高, 满足荧光定量 PCR 的要求。

综上, 对比 4 种方法, 从实验操作的复杂程度、提取到的基因组浓度及从荧光定量 PCR 的扩增效率来看, 本文后续实验采用快速且相对高效的 SDS+珠磨的方法。

表 1 基因组提取方法的优化
Table 1 Optimization of genome extraction method

样品 Samples	方法 Methods	DNA 浓度 DNA concentration (mg/L)	A_{260}/A_{280}	PCR 结果 PCR results	扩增效率 Amplification efficiency (%)
大曲 <i>Daqu</i>	SDS+珠磨	120.1±3.3	1.95±0.03	+	99.5±0.8
	液氮+SDS+珠磨	60.4±4.2	2.01±0.04	+	100.3±1.5
	溶菌酶+SDS+珠磨	56.5±4.8	1.98±0.02	+	98.8±1.3
	异位破碎	11.6±1.2	1.91±0.02	+	101.9±1.8
酒醅 Fermented grains	SDS+珠磨	86.9±3.5	1.99±0.04	+	103.4±1.2
	液氮+SDS+珠磨	53.6±2.9	2.06±0.02	+	100.1±1.2
	溶菌酶+SDS+珠磨	57.5±1.6	1.96±0.03	+	96.7±1.3
	异位破碎	10.3±1.3	1.93±0.02	+	97.8±1.6

注: +: 结果呈阳性。

Note: +: Positive results.

2.2 荧光定量 PCR 方法标准曲线

荧光定量 PCR 定量大曲和酒醅中链霉菌的标准曲线各重复 4 次, 扩增效果较好, 均可以得到较好的扩增曲线, 见图 1。从图 2 可以看出每次的 R^2 均大于 0.996, 斜率分别为 -3.06 ± 0.03 和 -3.11 ± 0.04 。对所有稀释度样品的 C_t 值进行统计分析, 由表 2 可知其标准差均小于等于 0.12, 说明此标准曲线具有良好的精确度且重复性强。本文所建立标准曲线线性范围较宽, 在 10^3-10^8 。满足定量大曲和酒醅中产土味素链霉菌的需要。

2.3 荧光定量 PCR 方法的准确性验证

按方法 1.4.3 分别在大曲和酒醅中添加不同数量级的 QC 菌株, 运用荧光定量 PCR 方法进行定量分析, 定量结果与 QC 添加量进行比较, 验证方法的准确率, 结果如表 3 所示。

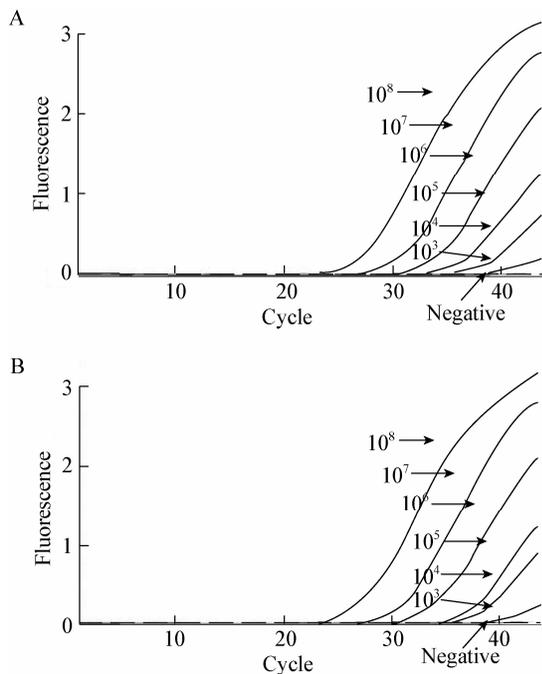


图 1 大曲和酒醅中 QC 菌株梯度稀释扩增曲线
Figure 1 QC strains gradient dilution amplification curve in Daqu and fermented grains

注: A: 大曲中 QC 菌株梯度稀释扩增曲线; B: 酒醅中 QC 菌株梯度稀释扩增曲线。

Note: A: QC strains gradient dilution amplification curve of Daqu; B: QC strains gradient dilution amplification curve of fermented grains.

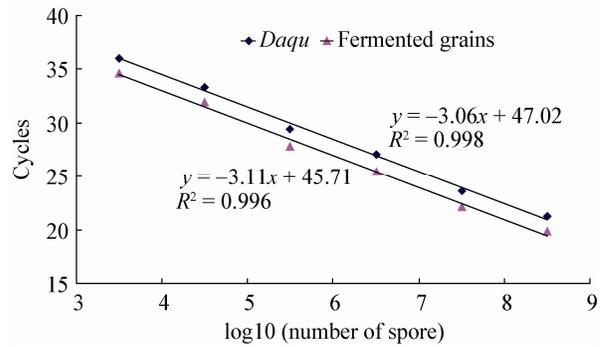


图 2 荧光定量 PCR 方法标准曲线
Figure 2 Standard curves of real-time PCR method

表 2 荧光定量 PCR 方法的精度

Table 2 Precision of real-time PCR method

样品 Samples	菌体数量 Quantity of microbes	C_t 值 C_t value	标准差 SD value
大曲 Daqu	3.2×10^8	20.8	0.10
	3.2×10^7	23.9	0.08
	3.2×10^6	27.4	0.05
	3.2×10^5	30.4	0.06
	3.2×10^4	33.2	0.08
酒醅 Fermented grains	3.2×10^3	36.1	0.11
	3.2×10^8	20.1	0.10
	3.2×10^7	22.1	0.09
	3.2×10^6	25.4	0.08
	3.2×10^5	28.5	0.08
	3.2×10^4	31.9	0.11
	3.2×10^3	35.1	0.12

分析结果表明荧光定量 PCR 方法的回收率在 82%–91%, 能够较准确的将添加到大曲和酒醅中的 QC 菌株进行定量分析。DNA 浓度和纯度从后续的荧光定量 PCR 实验的扩增效率可以看出均能达到荧光定量 PCR 的要求。

2.4 荧光定量 PCR 法定量大曲和酒醅中产土味素链霉菌

2.4.1 荧光定量 PCR 法定量大曲中产土味素链霉菌: 大曲样品为正常生产 9、10 月刚出房清茬、红心、后火曲 3 种大曲。

表 3 荧光定量 PCR 方法准确率的验证
Table 3 Validation of the accuracy of real-time PCR method

样品 Samples	QC 添加量 QC addition ($\times 10^7/g$)	DNA 浓度 DNA concentration (mg/L)	A_{260}/A_{280}	扩增效率 Amplification efficiency (%)	荧光定量数值 Real-time PCR value ($\times 10^7/g$)	准确率 Accuracy (%)
大曲 <i>Daqu</i>	24 \pm 1.2	2 319 \pm 35	1.99 \pm 0.02	97.15 \pm 0.30	21.0 \pm 1.7	87.5
	2.4 \pm 0.1	2 013 \pm 63	1.97 \pm 0.05	101.22 \pm 0.30	2.2 \pm 0.1	91.2
	0.24 \pm 0.01	1 879 \pm 72	1.94 \pm 0.03	100.65 \pm 0.20	0.21 \pm 0.02	82.5
	0	1 793 \pm 25	1.97 \pm 0.04	99.97 \pm 0.40	0.012 \pm 0.001	—
酒醅 Fermented grains	2.4 \pm 0.1	1 864 \pm 56	1.96 \pm 0.03	99.30 \pm 0.40	2.0 \pm 0.1	83.3
	0.24 \pm 0.01	1 467 \pm 73	2.02 \pm 0.04	98.50 \pm 0.20	0.21 \pm 0.02	87.2
	0.024 \pm 0.001	1 259 \pm 54	1.97 \pm 0.03	100.20 \pm 0.50	0.021 \pm 0.001	84.0
	0	984 \pm 61	2.01 \pm 0.02	97.70 \pm 0.10	0.000 83 \pm 0.000 02	—

注：—：无数值。

Note：—：No value.

对比 9、10 月出房大曲中产土味素链霉菌数量可以看出(图 3), 荧光定量 PCR 方法可以准确应用到定量大曲中产土味素链霉菌。而且标准偏差较小, 说明重复性较好。

从 3 种大曲中链霉菌数量对比可以看出, 大曲中链霉菌的数量在 10^5 数量级。进一步对比可知两个月出房大曲中均是清茬曲中链霉菌数量最高, 红心曲和后火曲相差不大, 尚不能做出准确判断。这与 3 种大曲的生产工艺密切相关。由于清茬曲在制曲过程中的用火温度相比红心曲和后

火曲要低^[21], 以及“少热多晾”的生产工艺使得清茬曲的含水量相对红心曲和后火曲要高^[22], 外界环境条件变化不是很剧烈, 这些因素较适宜链霉菌的生长。

2.4.2 荧光定量 PCR 定量酒醅中产土味素链霉菌: 酒醅为正常生产的同一班组不同发酵时间样品。

从图 4 中可以看出大茬、二茬酒醅在发酵过程中产土味素链霉菌数量的总体变化情况是相一致的。在发酵第 5 天以后菌株数量开始不断减少。分析原因是随着发酵的进行, 淀粉含量营养物质的减

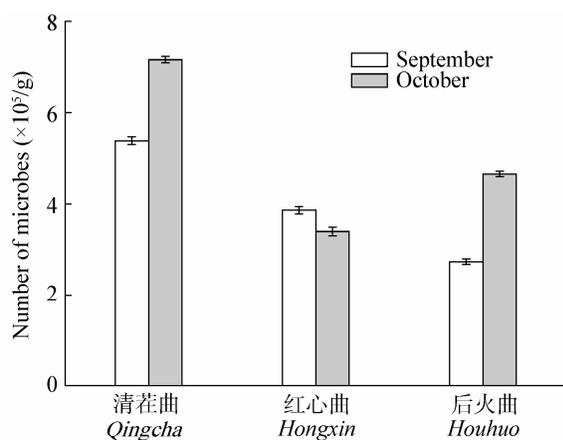


图 3 荧光定量 PCR 定量大曲中产土味素链霉菌
Figure 3 Real-time PCR quantify TDMTDL producing Streptomyces in Daqu

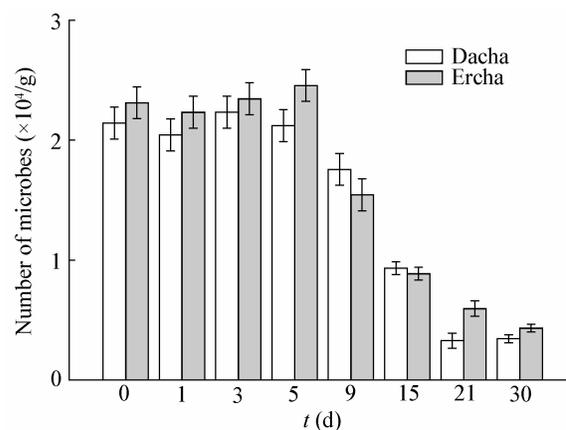


图 4 荧光定量 PCR 定量酒醅中产土味素链霉菌
Figure 4 Real-time PCR quantify TDMTDL producing Streptomyces in fermented grains

少、含氧量下降使得酒醅内部逐渐变成厌氧环境；而且发酵是一个产酸的过程，造成发酵环境呈酸性^[23]；其他微生物如酵母、细菌等的大量繁殖^[24]等环境因素不利于放线菌的生长，并对放线菌产生抑制，造成衰亡和降解。

大、二茬酒醅中链霉菌含量相差不大，二茬酒醅稍高于大茬酒醅。发酵刚开始时，链霉菌的数量在 10^4 数量级，是因为前期研究表明高粱等原料中并不含有该微生物，产土味素链霉菌主要是由大曲带入发酵过程^[6]，酒醅发酵的粮曲比为 10 : 1 左右。大、二茬酒醅采用的大曲的量是相同的，而地缸等发酵环境又是相同的，大茬酒醅蒸馏之后带入二茬酒醅的产土味素链霉菌的数量不多。所以两酒醅中产土味素链霉菌数量相差不大，二茬要稍高于大茬。

综上，清香型白酒正常生产时，大曲及入缸酒醅中产土味素链霉菌的数量分别在 10^5 和 10^4 数量级，因此，大曲和酒醅中此数量级的产土味素链霉菌不会影响白酒品质，所酿白酒正常。同时，此数量级也可成为监控清香型白酒生产的一项指标，若菌体量超标，则预示可能出现异常发酵，而使得所酿白酒带有糠臭味。

3 结论

本文首先通过对大曲和酒醅中微生物基因组的提取方法进行优化，选择操作相对简单、效率最高的 SDS+珠磨方法进行后续样品中微生物基因组的提取。运用荧光定量 PCR 方法分别建立大曲和酒醅两种基质条件下相应的荧光定量 PCR 标准曲线，并对方法的精度和准确度进行了验证分析，随后运用该方法定量大曲和酒醅发酵过程中产土味素链霉菌。结果表明所建立的方法精度和准确度较高，能够准确地对大曲和酒醅中产土味素链霉菌进行定量分析，进一步采用荧光定量 PCR 方法对大曲和酒醅中产土味素链霉菌进行定量分析。结果表明大曲中产土味素链霉菌数量在 10^5 数量级，无论是刚出房还是储存后的大曲均是清茬曲中数量最高。酒醅发酵起始阶段产土味素链霉菌数量在 10^4 数量级，随着发酵的不断进行，产土味素链霉菌数

量不断减少。

参考文献

- [1] Darriet P, Pons M, Lamy S, et al. Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(10): 4835-4838.
- [2] 路虎, 杜海, 徐岩. 中国白酒固态发酵及蒸馏过程中糠臭味物质变化规律的研究[J]. 酿酒科技, 2012(8): 29-32.
- [3] 邵长军, 李刚, 李亮. 白酒香型与香味成分探究[J]. 酿酒科技, 2005(8): 92-93.
- [4] 武敬松, 刘恒兆. 白酒不良口味的成因及解决措施[J]. 酿酒科技, 2006(2): 109.
- [5] Du H, Fan WL, Xu Y. Characterization of geosmin as source of earthy odor in different aroma type Chinese liquors[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(15): 8331-8337.
- [6] Du H, Xu Y. Determination of the microbial origin of geosmin in Chinese liquor[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(9): 2288-2292.
- [7] Wang HY, Zhang XJ, Zhao LP, et al. Analysis and comparison of the bacterial community in fermented grains during the fermentation for two different styles of Chinese liquor[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008, 35(6): 603-609.
- [8] 高亦豹, 范海燕, 徐岩. 利用 PCR-DGGE 未培养技术对中国白酒高温和中温大曲细菌群落结构的分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(7): 999-1004.
- [9] 王海燕, 唐杰, 徐岩, 等. 清香型小曲白酒中微生物组成及功能微生物的分析[J]. 酿酒科技, 2012(12): 48-52.
- [10] 王薇, 吴群, 徐岩. 清香型白酒固态酿造过程中酵母种群结构和多样性分析[J]. 微生物学通报, 2012, 39(9): 1272-1279.
- [11] Mikael KJ. The real-time polymerase chain reaction[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2006, 27(2/3): 95-125.
- [12] Hermasson A. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(2): 972-976.
- [13] Foulds. Quantification of microcystin-producing cyanobacteria and *E. coli* in water by 5'-nuclease PCR[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 93(5): 825-834.
- [14] Harms G, Layton AC, Dionisi HM, et al. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant[J]. Environmental Science and Technology, 2003, 37(2): 343-351.
- [15] Zhang T, Fang HH. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70(3): 281-289.
- [16] 欧阳松应. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用[J]. 生物化学, 2004, 24(1): 742-761.
- [17] Tyagi. Molecular beacons : probes that fluoresce upon hybridization[J]. Nature Biotechnology, 1996, 14(2): 303-308.
- [18] Chen S, Yee A, Griffiths M, et al. The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities[J].

- International Journal of Food Microbiology, 1997, 35(3): 239-250.
- [19] Harms G, Layton AC, Dionisi HM, et al. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant[J]. Environmental Science and Technology, 2002, 37(2): 343-351.
- [20] Du H, Lu H, Xu Y, et al. Community of environment *Streptomyces* related to geosmin development in Chinese liquors[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(6): 1343-1348.
- [21] 熊子书. 中国三大香型白酒的研究(三)清香型·汾酒篇[J]. 酿酒科技, 2005(7): 17-21.
- [22] 李超, 穆琳, 王建耀, 等. 汾型大曲的理化指标和微生物指标分析[J]. 中国酿造, 2009(1): 140-142.
- [23] 曹云刚, 马丽, 杜小威, 等. 汾酒酒醅发酵过程中有机酸的变化规律[J]. 食品科学, 2011, 32(7): 229-232.
- [24] 李增胜, 任润斌. 清香型白酒发酵过程中酒醅中的主要微生物[J]. 酿酒, 2005, 32(5): 33-34.

2014年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	第五届全国微生物基因组及组合生物学学术研讨会	中国微生物学会	5月	180	湖北武汉	周萍 027-87287254
2	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会暨中国畜牧兽医学会生物制品学分会学术大会	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会	5月	300	辽宁沈阳	丁家波
3	第四届全国人畜共患病学术研讨会	中国微生物学会等	5月	300	吉林长春	王旭 010-64807200
4	第五届传染病防控基础研究与应用技术论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	6月	300	山东济南	吕向征 010-85158365
5	昆虫与微生物联合转化废弃物机制及资源化利用	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	6月	120	湖北武汉	张吉斌 027-87287702-8206
6	第五届全国农业微生物研究及产业化研讨会暨第十四届全国杀虫微生物学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	7月	200	云南昆明	邹成钢 0871-5031092
7	2014年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	8月	700	黑龙江哈尔滨	杨海花 王旭 010-64807200
8	第五届中国临床微生物学大会暨微生物学与免疫学论坛	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	9月	400	四川成都	刘辉
9	病原真菌与宿主相互作用研讨会	中国微生物学会真菌学专业委员会	9月	100	江苏常州	卫风莲
10	第十二届全国土壤微生物学术讨论会暨第五届全国微生物肥料生产技术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	9月	260	广东广州	沈德龙 马鸣超 010-82108702, 82106208
11	第四届北京中关村生物应急与临床POCT技术创新论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	10月	300	北京	肖瑞峰 010 - 61271105
12	中国微生物学会微生物安全专业委员会第三届学术研讨会	中国微生物学会微生物安全专业委员会	待定	100	待定	贾晓娟
13	2014年全国微生物毒素与脓毒症学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	10月	300	浙江杭州	李会
14	第二届微生物与白酒酿造技术研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	待定	200	山东	翟磊
15	中日国际酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	11月	200	韩国济州	欧阳浩森 010-64807420
16	第十七次全国环境微生物学学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11月	500	四川成都	蒋建东 025-84396314
17	第二届中国放线菌生物学与产业化大会	中国微生物学会分子微生物学及生物工程专业委员会	11月	150	广东广州	张长生 020-89023105
18	第六届微生物资源学术暨微生物资源平台运行服务研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	11月	300	福建厦门	姜瑞波 010-82108636