

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(1):82-91; 4 January 2013
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

新疆额尔齐斯河流域冷水鱼肠道耐低温乳酸菌的分离筛选及其遗传差异

高阳¹, 王俊钢², 顾燕玲¹, 邓梅¹, 周红^{1*}, 倪永清^{1*}

¹石河子大学食品学院, 石河子 832000

²新疆农垦科学院农产品加工研究所, 石河子 832000

摘要: 【目的】从新疆阿勒泰地区额尔齐斯河流域冷水鱼肠道中分离耐低温的乳酸菌, 挖掘乳酸菌的物种和遗传多样性, 为低温乳酸菌生物技术研发提供优良菌种。【方法】利用 MRS、Elliker 两种不同培养基从 9 种冷水鱼肠道中, 分离筛选出耐低温菌, 测定细菌最适生长温度并进行常规生理生化实验。根据 16S rRNA 基因序列初步确定耐低温菌的系统进化地位, 并采用 BOX、(GTG)₅、ERIC 三种不同的引物进行 rep-PCR, 对 16S rRNA 基因高度同源性的菌株进一步区分。【结果】分离得到 78 株耐冷菌, 最终确定有 24 株为耐低温乳酸菌, 菌株的最适生长温度在 15-24℃ 之间。系统发育分析结果表明: 24 株耐低温乳酸菌隶属于 6 个属, 其中肉杆菌属 (*Carnobacterium*) 3 株, 乳球菌属 (*Lactococcus*) 9 株, 肠球菌属 (*Enterococcus*) 7 株, 环丝菌属 (*Brochothrix*) 1 株, 魏斯氏菌属 (*Weissella*) 2 株, 链球菌属 (*Streptococcus*) 2 株。指纹图谱聚类分析树状图显示乳球菌属 (*Lactococcus*) 和肠球菌属 (*Enterococcus*) 存在种及菌株水平上的遗传差异, 前者包括 4 个种, 后者 2 个种。【结论】新疆额尔齐斯河流域冷水鱼肠道中分离的耐低温乳酸菌以球菌为主, 没分离到常见的乳杆菌, 需进一步完善分离培养的方法, 深入挖掘和研究其物种多样性和遗传多样性。

关键词: 低温乳酸菌, 系统发育, Repetitive-element PCR, 冷水鱼肠道, 新疆

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 01-0082-10

近些年来, 随着人们对微生物益生作用认识的不断提高, 越来越多的乳酸菌被广泛应用于医疗、食品加工和饲料发酵等领域。乳酸菌在自然界分布广泛, 人类及动物的肠道、奶制品及一些植物的表面都栖息着不同类型的乳酸菌, 乳酸菌的代谢产物中的短链脂肪酸 (如乳酸、醋酸等) 可以降低环境中的 pH 值和氧化还原电位, 形成不利于有害菌的生存环境^[1]。研究表明, 乳酸菌的生长是一系列复杂化学

反应的结果, 其中温度会影响菌体的生长速率、生化反应速率、扩散速度、酶系活性与稳定性以及基质的吸收与利用。不同来源、不同种类的乳酸菌生长温度范围和最适生长温度有差异。其中来源于低温环境中的乳酸菌由于相对生长温度范围较低, 被称为低温乳酸菌^[2]。目前低温乳酸菌在食品加工, 尤其是生物保鲜中显示了极具潜力的应用价值, 但是到目前为止没有得到充分的研究和开发。

基金项目: 新疆生产建设兵团博士资金专项 (2011BB009); 新疆生产建设兵团青年科技创新资金专项 (2011CB001); 石河子大学自然科学重点项目 (ZRKX20104001)

* 通信作者。Tel: +86-993-2058095; Fax: +86-993-2058093; E-mail: niyqlzu@sina.com

作者简介: 高阳 (1986-), 男, 河北承德人, 硕士研究生, 主要从事食品生物技术方向研究。E-mail: shz2011gy@163.com

收稿日期: 2012-08-30; 修回日期: 2012-10-10

自 1887 年 Foster 报道一种鱼源微生物可在 0℃ 生长后, 生存于低温环境的低温微生物开始受到关注^[3]。目前, 已经从两极、冰川、永久冻土等低温环境以及低温保存的食物中分离到众多低温微生物, 包括细菌、真菌、古细菌^[4]。对于低温环境中的乳酸菌, 国内的研究报道很少, 国外目前有关耐低温乳酸菌的报道大多来源于低温冷藏肉、鱼制品及腌制泡菜, 最近, 法国科学家报道从多种海鲜中分离了 52 株耐冷的具有乳酸菌特征的菌株^[5]。此外对韩式泡菜 (Kimchi) 制作过程中的微生物研究显示, 存在的主要微生物为 *Leuconostoc mesenteroides*, 相对于一些其它乳酸菌 (如 *Lactobacillus plantarum*), 在 5-7℃ 的低温环境中生长更为迅速、并产生更多量的乳酸, 因此使得 Kimchi 的风味维持更久^[6]。很多研究表明, 在气调厌氧条件下, 低温冷藏的肉类中的优势微生物是一些革兰氏阳性的乳酸菌, 乳酸菌的生长可以产生乳酸菌素等生物活性代谢物, 抑制使肉品腐败的革兰氏阴性菌, 从而延长冷贮肉的货架寿命期^[7-8]。

因此, 开发能够在低温环境中具有很强生长活性和比生长速率较高的耐低温乳酸菌, 是开发食品生物保鲜技术的最关键因素。本文从新疆阿勒泰地区额尔齐斯河流域广泛分布的野生冷水鱼肠道中分离筛选耐低温的乳酸菌, 并对耐低温乳酸菌的系统发育和生理多样性进行了较详细的研究, 揭示乳酸菌的物种和遗传多样性, 以为低温乳酸菌工程菌的构建和食品生物保鲜技术的应用奠定理论和实践基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 取样获得的冷水鱼包括河鲈 (*Perca fluviatilis*)、梭鲈 (*Lucioperca lucioperca*)、江鳕 (*Lota lata*)、红眼 (*Scardinius erythrophthalmus*)、银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)、高体雅罗鱼 (*Leuciscus idus*)、东方欧鳊 (*Abramis brama Orientalis*)、白斑狗鱼 (*Esox lucius*)、丁鲑 (*Tinca tinca*)。样品于 2011 年 7 月采自新疆赛阿勒泰地区, 贴上标签后置于车载冰箱内 -1℃ -4℃ 冷藏, 12 h 之内运回实验室后, 在超净台上解剖, 获取其肠道液, 于 4℃ 下保存备用。以上所有步骤均在无菌条件下进行的。

1.1.2 主要的试剂及仪器: 用于 PCR 扩增的全套试剂及扩增引物均购自 TaKaRa 公司。相关生理生

化试验所用试剂均购自于天津市巴斯夫化学试剂厂。高速冷冻离心机为 Thermo 公司 Fresco 21 型; PCR 仪为德国的 Biometra TProfessional; 凝胶成像系统为 BioRad 公司 Gel DOC XR; 水平电泳仪为美国 BioRad 公司 PowerPac Universal, 电泳槽为 BioRad SUBCELL GT (20 × 25 cm)。

1.1.3 培养基: 乳酸菌分离培养基: MRS 培养基、Elliker 培养基。以上培养基均在 121℃ 灭菌 30 min。

1.2 菌株的分离和纯化

采用稀释平板涂布法对冷水鱼肠道菌群进行分离, 将冷水鱼肠道样品用灭菌生理盐水做 10 倍梯度的稀释, 吸取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 五个稀释度悬液 0.2 mL 分别涂布于 MRS 和 Elliker 固体平板上, 每个梯度稀释液涂布 4 个平板, 分 2 组置于有氧和厌氧条件下, 10℃ 培养 5-7 d, 转接划线培养 3 次后, 对单一菌落进行革兰氏染色以及接触酶实验, 从而达到对疑似乳酸菌的初步分离筛选。将耐低温菌株的液体纯培养物离心后, 加入新鲜培养液重悬, 补充 15% 的灭菌甘油冷冻保存于 -80℃ 冰箱。

1.3 温度对乳酸菌生长的影响

菌株最适生长温度测定: 分别置于 4℃、10℃、15℃、18℃、21℃、24℃、30℃、37℃ 八个温度条件下, 培养 24 h 后 420 nm 测 OD 值。

1.4 16S rRNA 基因 PCR 扩增和系统进化分析

根据参考文献^[9]的方法提取单菌落 DNA, 应用细菌 16S rRNA 基因通用引物 (正向引物 27f: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物 1492r: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 95℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min, 30 个循环。PCR 产物纯化后, 由上海生工生物科技有限公司采用正向扩增引物直接测序。将测序结果提交到 GenBank^[10] 数据库中, 序列同源性分析利用 BLAST^[11] 在线进行。从数据库获得相关属、相关种的 16S rRNA 基因序列, 建立系统发育树。用 CLUSTAL X 1.83 软件把序列进行排列^[12], 用邻接法 neighbor-joining method^[13] 计算进化距离, 采用 p-distances 法和 Kimura-2parameter 双参数法进行, 进化树分支模式的稳定性用 MEGA v. 4.0^[14] 软件分析, 采用 Bootstrap 法, 重复次数为 1000。

1.5 菌株 rep-PCR 指纹图谱分析

指纹图谱所采用的引物及 PCR 反应条件如表 1 所示, 取 10 μL 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶、0.5 ×

TBE 电泳缓冲液、4V/cm 条件下电泳检测 4h。根据 PCR 扩增产物电泳条带的有无,在统计分析中将 3 种引物产生的所有条带转化为只含有 1 和 0 两值变量矩阵,使用 NTSYS-pc 2.01 (Applied Biostatistics,

Inc) 软件采用非加权算术平均连锁法 (UPGMA, unweighted pair group method with arithmetic mean) 进行聚类分析。

表 1 引物和 PCR 反应条件

Table 1 Primers and PCR conditions used in this study

Method	Primer	Sequence (5' - 3')	PCR conditions			Reference
			Denaturation	Annealing	Extension	
BOX-PCR	BOXA1R	GTGGTGGTGGTGGTG	94°C, 1 min	53°C, 1 min	65°C, 8 min	[15]
(GTG) ₅ -PCR	(GTG) ₅	CTACGGCAAGCGGACGCTGACG	94°C, 1 min	53°C, 1 min	65°C, 8 min	[15]
ERIC-PCR	ERIC2	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	94°C, 1 min	50°C, 1 min	65°C, 8 min	[15]

1.6 低温乳酸菌生理生化鉴定

参照东秀珠、蔡妙英^[16]《常见细菌系统鉴定手册》进行。

从九种冷水鱼的肠道中共分离纯化得到 78 株耐冷细菌,依据菌落形态、大小、颜色、液体培养特征观察,以及革兰氏染色和接触酶实验对菌株进行筛选,结果显示大多数菌株为革兰氏阳性,接触酶阴性,初步获得 24 株为疑似乳酸菌。

2 结果

2.1 低温乳酸菌的筛选

表 2 新疆额尔齐斯河冷水鱼肠道分离的耐低温乳酸菌菌株的特征

Table 2 Characteristics of of psychrotrophic lactic acid bacteria from the gastrointestinal tract of cold-water fishes from the Eerqisi river, Xinjiang

Strain.	Host	Range tempfor Growth (°C)	phylogenetic affiliations		Identity (%)	Morphological properties		
			Closest relative species			Cell shape	Gram staining	Colony description
EBY2-8	<i>Abramis brama Orientalis</i>	4 - 15 ^a - 24	<i>Carnobacterium</i> (HQ824973)		100	Rod	G ⁺	White, medium
MW-1	<i>Perca fluviatilis</i>	4 - 24 - 37	<i>Enterococcus hermanniensis</i> (GQ337028)		99	cocoid	G ⁺	White, small
EB2-5	<i>Leuciscus idus</i>	4 - 24 - 37	<i>Enterococcus hermanniensis</i> (AY396046)		99	cocoid	G ⁺	White, small
EG2-6	<i>Esox lucius</i>	4 - 15 - 24	<i>Brochothrix thermosphacta</i> (AB680248)		98	Rod	G ⁺	White, medium
MB2-5	<i>Leuciscus idus</i>	4 - 18 - 24	<i>Weissella koreensis</i> (HQ896200)		99	cocoid	G ⁺	Gray, medium
MD-2	<i>Tinca tinca</i>	4 - 24 - 37	<i>Enterococcus faecalis</i> (JQ726522)		100	cocoid	G ⁺	White, small
MB2-1	<i>Leuciscus idus</i>	4 - 24 - 37	<i>Enterococcus hermanniensis</i> (AY396046)		99	cocoid	G ⁺	Transparent, small
MB2-2	<i>Leuciscus idus</i>	4 - 24 - 37	<i>Lactococcus garvieae</i> (AB598994)		100	cocoid	G ⁺	Gray, small
EB2-8	<i>Leuciscus idus</i>	4 - 15 - 24	<i>Lactococcus garvieae</i> (AB598960)		100	cocoid	G ⁺	White, small
ED-1	<i>Tinca tinca</i>	4 - 18 - 37	<i>Enterococcus faecalis</i> (JQ726518)		100	cocoid	G ⁺	White, small
MHY3-3	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	4 - 15 - 24	<i>Lactococcus raffinolactis</i> (JN226416)		99	cocoid	G ⁺	White, small
MB2-3	<i>Leuciscus idus</i>	4 - 24 - 37	<i>Lactococcus garvieae</i> (JQ446487)		99	cocoid	G ⁺	White, small
MHY3-2	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	4 - 15 - 24	<i>Lactococcus piscium</i> (JN226415)		100	cocoid	G ⁺	White, small
MB2-4	<i>Leuciscus idus</i>	4 - 18 - 24	<i>Weissella cibaria</i> (JF831160)		99	cocoid	G ⁺	White, medium
EJ4-4	<i>Lucioperca lucioperca</i>	4 - 18 - 37	<i>Streptococcus parauberis</i> (EU081009)		99	cocoid	G ⁺	White, large
EB2-6	<i>Leuciscus idus</i>	4 - 18 - 37	<i>Carnobacterium</i> (GQ304940)		100	Rod	G ⁺	Gray, medium
MHY3-4	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	4 - 24 - 37	<i>Lactococcus garvieae</i> (JQ795856)		100	cocoid	G ⁺	White, medium
EJ3-2	<i>Lucioperca lucioperca</i>	4 - 18 - 37	<i>Lactococcus garvieae</i> (JF831157)		99	cocoid	G ⁺	White, medium
MD-3	<i>Tinca tinca</i>	4 - 24 - 37	<i>Enterococcus faecalis</i> (JQ726522)		99	cocoid	G ⁺	White, small
EHY3-4	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	4 - 18 - 37	<i>Lactococcus piscium</i> (AY762106)		99	cocoid	G ⁺	White, medium
EHY3-5	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	4 - 18 - 37	<i>Streptococcus parauberis</i> (EF204349)		99	cocoid	G ⁺	White, small
ED2-2	<i>Tinca tinca</i>	4 - 18 - 37	<i>Enterococcus faecalis</i> (JQ889271)		100	cocoid	G ⁺	White, medium
MD-1	<i>Tinca tinca</i>	4 - 15 - 24	<i>Lactococcus lactis</i> (GQ337877)		100	cocoid	G ⁺	White, small
EB2-4	<i>Leuciscus idus</i>	4 - 18 - 37	<i>Carnobacterium</i> (AB680941)		100	Rod	G ⁺	Yellow, small

Note: ^a: The optimal growth temperature.

2.2 菌株的最适生长温度

表2实验结果表明:24株乳酸菌最适生长温度在15℃-24℃,生长温度范围在4℃-37℃,属耐冷菌(psychroterants)范畴;其中8株菌,包括EBY2-8、EG2-6、MB2-5、EB2-8、MHY3-3、MHY3-2、MB2-4和MD-1最适生长温度在20℃以下,在温度达到24℃时菌株停止生长,属于专性嗜冷菌(Psychrophile)。

2.3 基于部分16S rRNA基因序列耐低温乳酸菌

菌株系统发育分析

将冷水鱼肠道中分离筛选出的耐低温乳酸菌菌株的部分16S rRNA基因序列提交NCBI,通过BLAST工具在GenBank数据库中与已发表的16S rRNA基因序列进行同源性比对,并选取同源性最高的序列构建系统发育树(图1)。由系统发育树可知24株耐低温乳酸菌隶属于*Enterococcus*、*Carnobacterium*、*Brochothrix*、*Weissella*、*Streptococcus*、*Lactococcus*六个属。*Enterococcus*包括菌株MW-1、

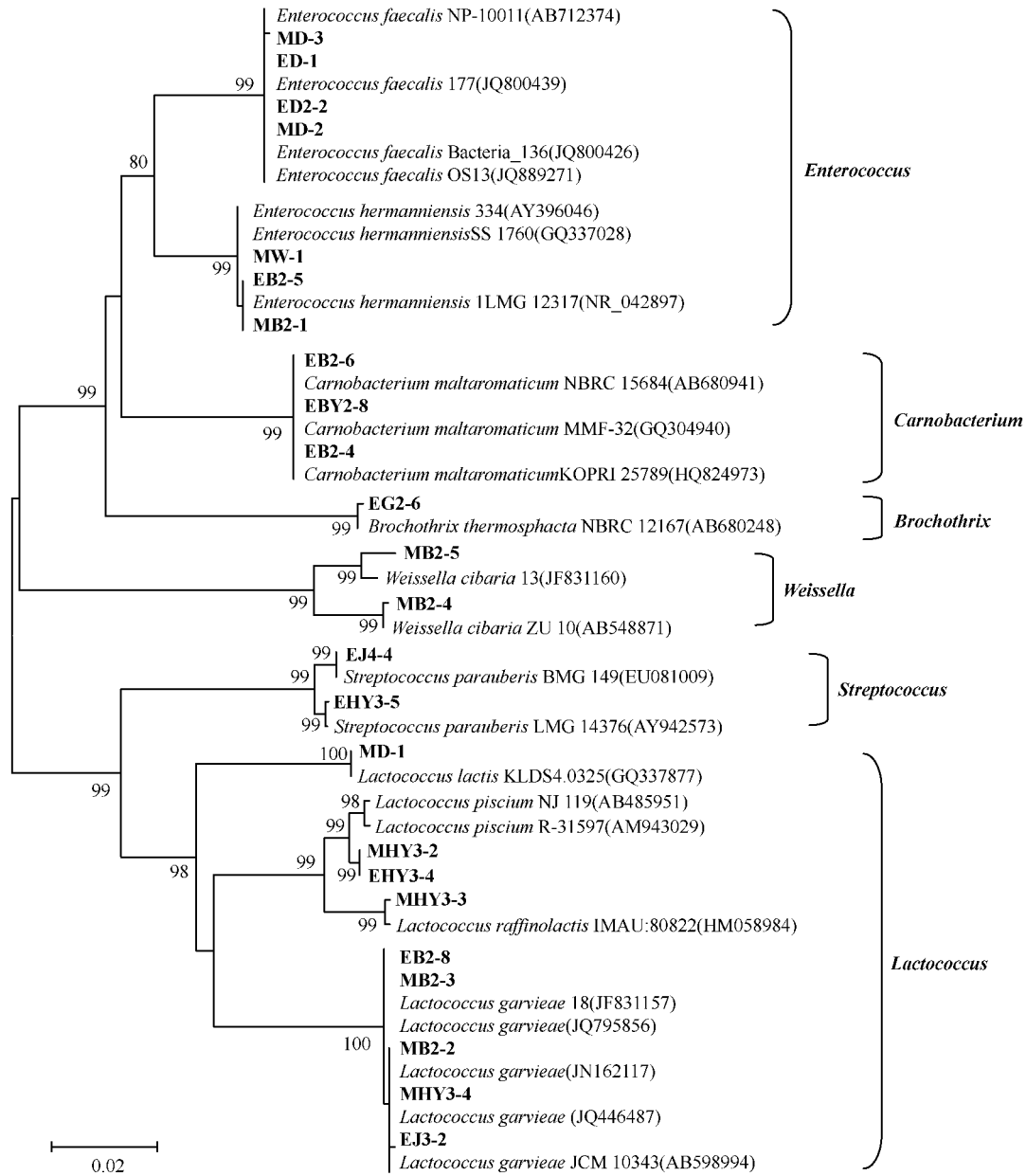


图1 基于部分16S rRNA基因序列的耐低温乳酸菌系统发育树

Fig. 1 Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships among psychrotrophic lactic acid bacteria strains 16S rRNA gene partial sequences and their closely related sequences downloaded from GenBank.

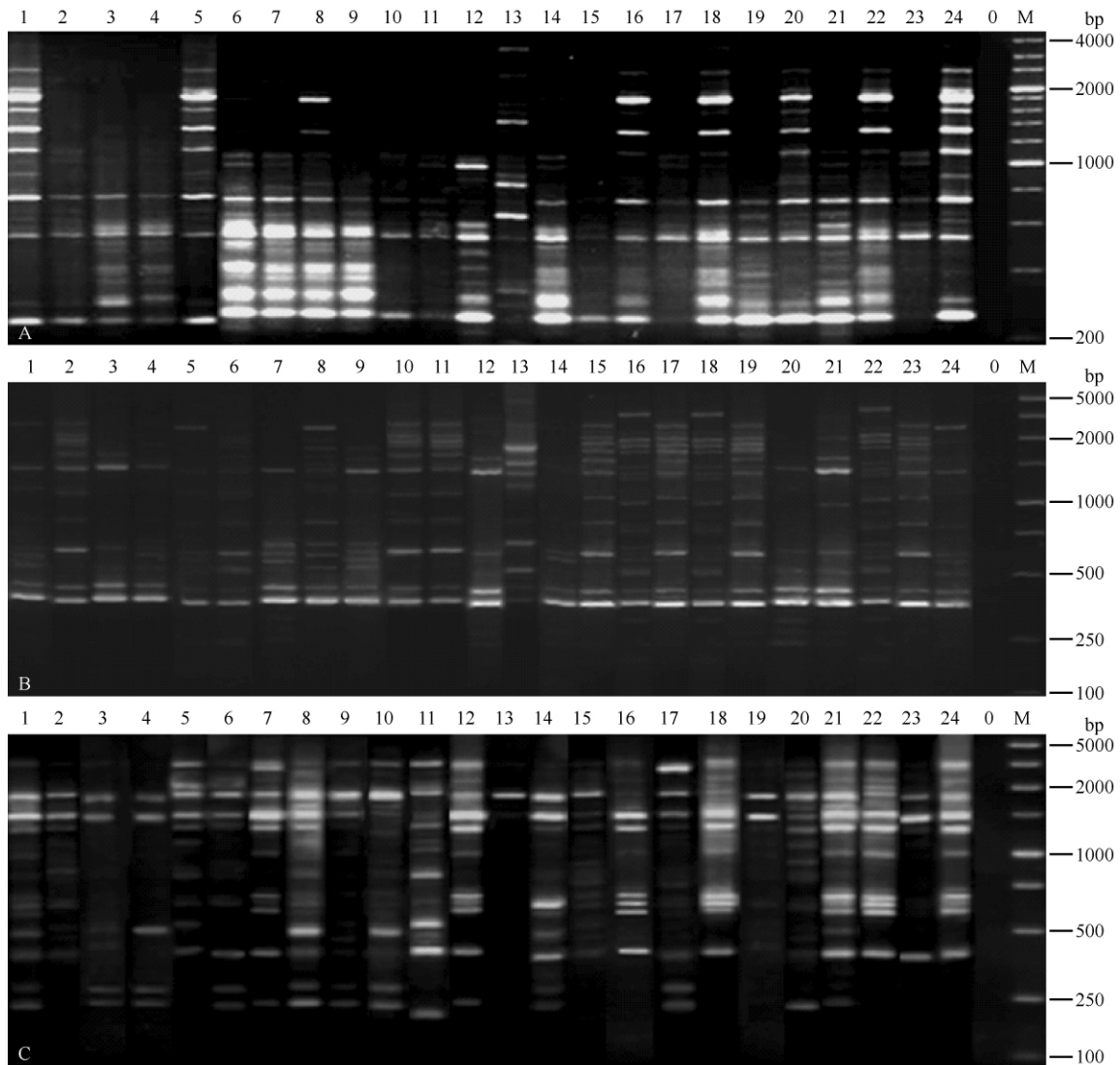


图2 耐低温乳酸菌菌株的 Rep-PCR 指纹图谱

Fig. 2 BOX-PCR (A)、ERIC2-PCR (B)、(GTG)₅-PCR (C) fingerprint patterns of psychrotrophic lactic acid bacteria strains in 2% agarose. Lanes: 1, MHY3-2; 2, MD-3; 3, MB2-4; 4, MB2-5; 5, EJ3-2; 6, EHY3-5; 7, MB2-2; 8, MHY3-3; 9, MD-1; 10, EB2-5; 11, MB2-1; 12, MB2-3; 13, EG2-6; 14, EJ4-4; 15, ED-1; 16, EB2-4; 17, MW1; 18, EB2-6; 19, MD-2; 20, EHY3-4; 21, MHY3-4; 22, EBY2-8; 23, ED2-2; 24, EB2-8; 0, blank; M, mark.

EB2-5、MB2-1 和 ED-1、MD-2、MD-3、ED2-2, 分别与已知种 *Enterococcus hermanniensis* 和 *Enterococcus faecalis* 构成一个分支, 其 16S rRNA 基因序列相似性均在 99% 以上, 说明系统发育关系非常接近。菌株 EB2-6、EB2-4、EBY2-8 隶属于 *Carnobacterium*, 与 *Carnobacterium maltaromaticum* 序列同源性最高 (相似性达到 100%), 可确定隶属于该种。菌株 EG2-6 与 *Brochothrix thermosphacta* 构成一个分支, 序列相似性达到 98%, 基本可以确定隶属于 *Brochothrix* 属。菌株 MB2-4、MB2-5 均属于 *Weissella* 属, 分别与

已知种 *Weissella cibaria*、*Weissella koreensis* 的 16S rRNA 基因序列相似性达到 99%, 需要进一步确定其种的归属。菌株 EJ4-4 和 EHY3-5 在系统发育上与 *Streptococcus parauberis* 关系最近, 构成一个分支。16S rRNA 基因序列进行同源性比对显示, 有 9 个菌株隶属于 *Lactococcus*, 而且包括 4 了个种, 其中 MD-1 和 *Lactococcus lactis* 构成一个分支, 16S rRNA 基因序列相似性达到 100%, 可确定隶属于该种; EHY3-4、MHY3-2 和 EB2-8、MB2-3、MB2-2、MHY3-4、EJ3-2 分别与已知种 *Lactococcus piscium* 和 *Lactococcus*

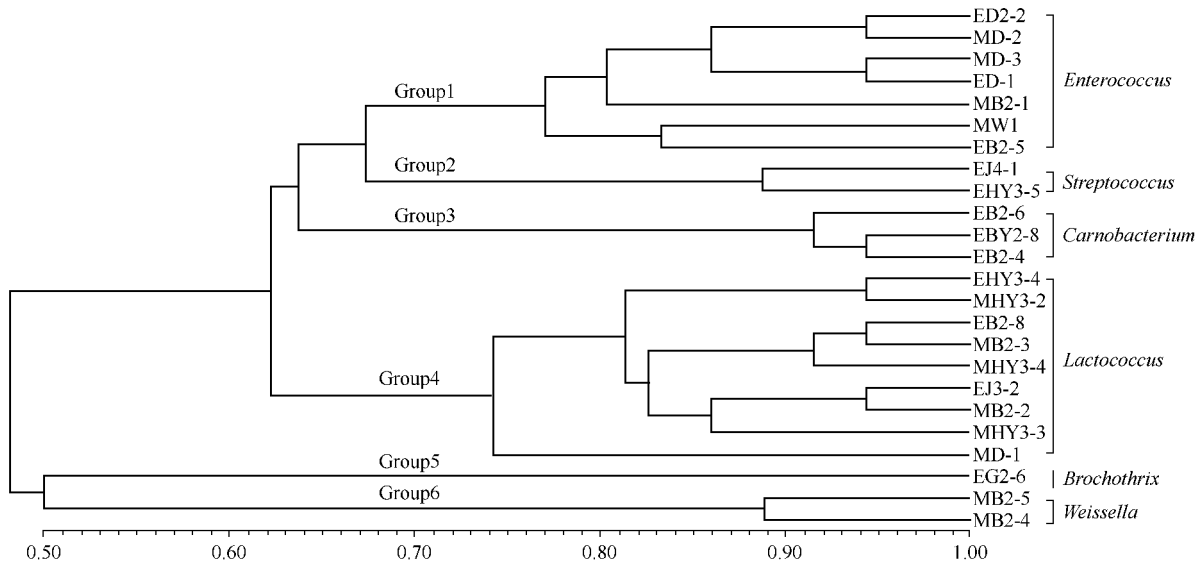


图3 三种 Rep-PCR 指纹图谱的综合聚类分析树状图

Fig. 3 The dendrogram based on the UPGMA cluster analysis of the combined BOX-PCR, ERIC2-PCR and (GTG)₅-PCR fingerprinting data.

garvieae 构成一个分支, 16S rRNA 基因序列相似性达到 99% 和 100%, 说明系统发育非常接近; 菌株 MHY3-3 和 *Lactococcus raffinolactis* 的序列同源性均为 99%。

2.4 菌株 rep-PCR 指纹聚类分析

由 BOX-PCR、ERIC-PCR、(GTG)₅-PCR 指纹图谱(图 2-A、B、C)可以清晰的看出耐低温乳酸菌指纹图谱产生的条带较多, 能够反映不同菌株在基因组水平上的差异, 其中 BOX-PCR 指纹图谱在主要集中在 200-4000 bp 范围内, 包括 3-14 个明显的亮带, 并有一些弱带; ERIC-PCR 指纹图谱在 400-5000 bp 范围内, 有 2-13 个相对较明显的条带; (GTG)₅-PCR 在 250-5000 bp 范围内特异性条带较多, 有 1-16 个条带。比较 3 种不同引物指纹图谱可以看出, 大多数的 PCR 产物条带的大小在 300-4000 bp 之间, 但是不同种的乳酸菌带谱明显不同。从总体情况而言, 虽然存在一些差异, 但 3 种引物指纹图谱综合聚类结果与系统发育分析具有很好的一致性。指纹图谱聚类分析树状图显示(图 3), 在 70% 的相似性水平上, 所有菌株可以划分为 6 个群(Group): Group1 中的所有菌株均隶属于 *Enterococcus*, 在 85% 的相似性水平上, ED2-2、MD-2、MD-3、ED-1 又构成 1 个亚群(subgroup), 属于 *Enterococcus faecalis*, 和其它 3 株隶属于 *Enterococcus hermanniensis* 的乳酸菌在种的水平上形成了显著的

差异性; Group2 由 EJ4-4、EHY3-5 组成, 隶属于 *Streptococcus*; EB2-6、EBY2-8 和 EB2-4 构成 Group3, 在系统发育上均隶属于 *Carnobacterium*; 遗传差异最大的是 *Lactococcus* 属, 其 9 株菌构成了 Group4, 在 86% 的相似性水平上, 它们可以划分成 4 个亚群, 其中 EHY3-4 和 MHY3-2 属于 *Lactococcus piscium* 亚群, MHY3-4、EJ3-2、EB2-8、MB2-2 和 MB2-3 属于 *Lactococcus garvieae* 亚群, 而 MHY3-3 和 MD-1 则分别属于 *Lactococcus raffinolactis* 和 *Lactococcus lactis* 亚群; Group5 只有一个菌株 EG2-6, 隶属于 *Brochothrix*; MB2-5 和 MB2-4 组成了 Group6, 与系统发育树结果一致, 隶属于 *Weissella* 属。

2.5 菌株典型生理生化特征

对菌株进行了 5 种常见的生理生化试验, 结果如表 3 所示: 24 株菌接触酶实验除菌株 EG2-6 外都显阴性; 在 M. R 实验中只有 ED2-2、EB2-4、EG2-6、EB2-6、EB2-8、EJ4-4 六株菌显阳性; 在 V-P 试验中显阳性的菌株占 54.2%, 其中隶属于 *Enterococcus* 的 ED2-2、MD-3、MW1、EB2-5、MB2-1、MD-2、ED-1 和隶属于 *Carnobacterium* 的 EB2-4、EB2-6、EBY2-8 均显阳性, 在 V-P 实验中很相似; 然而 ED2-2、MD-3、MB2-1、MD-2 同属于 *Enterococcus*, 但 ED2-2 在精氨酸产氨和硝酸盐还原实验中均显阳性, MD-3、MB2-1、MD-2 则完全相反; 菌株 MB2-4、MB2-5 同属于 *Weissella*, 在 M. R、V-P、接触酶、精氨酸产氨、硝酸

盐还原实验中均显阴性;菌株 EJ4-4、EHY3-5 同属于 *Streptococcus*, EJ4-4 在硝酸盐还原实验中显阴性, EHY3-5 则显阳性;菌株 MB2-3、MHY3-3、EJ3-2、EHY3-4、MHY3-2 同属于 *Lactococcus*, MB2-3、MHY3-3 在 V-P 实验中显阳性,在硝酸盐还原中显阴性,但 EJ3-2、EHY3-4、MHY3-2 在 V-P 实验中显阴性,在硝酸盐还原实验中则显阳性。

3 讨论

乳酸菌是目前世界公认安全的食品级微生物,它们产生的抗菌物质大多也是安全的,可作为天然的食品保鲜剂直接应用于食品工业,因此能够产细菌素的乳酸菌资源的挖掘和开发受到了国内外极大关注^[17]。尤其是耐低温乳酸菌其最适生长温度较低,在肉品和果蔬的低温冷藏保鲜中更具优势。国外目前有关低温乳酸菌的报道多集中于低温冷藏肉、鱼制品及泡菜中的乳酸菌,研究和应用最多的是明串珠菌 (*Leuconostoc* spp.) 和乳杆菌 (*Lactobacillus* spp.), 如 *Lactobacillus sakei*、*Lactobacillus curvatus* 和 *Leuconostoc gelidum*、*Leuconostoc carnosum* 及 *Leuconostoc mesenteroides* 等^[18]。能够产生细菌素的乳酸菌就其应用潜力来说,根据产生的不同类型细菌素,已经有广泛报道的还包括片球菌 *Pediococcus* spp.、肠球菌 *Enterococcus* spp.、乳球菌 *Lactococcus* spp.、肉食杆菌 *Carnobacterium* spp. 和链球菌 *Streptococcus* ssp. 等^[19]。最近有报道从海鲜中分离出了耐冷的 52 株乳酸菌,系统发育分析分别隶属于 *Leuconostoc gelidum*、*Lactococcus piscium*、*Lactobacillus fuchuensis*、*Carnobacterium alterfunditum*, 但只有 *Leuconostoc gelidum* 显示了细菌素抑菌特性^[5]。

本研究冷水鱼样品采自新疆阿勒泰地区的额尔齐斯河流域,实验通过 MRS、Elliker 两种不同的培养基从鱼肠道内分离乳酸菌,分离效果良好。采用传统的乳酸菌鉴定方法,结合 16S rRNA 基因序列系统发育树分析最终确定有 24 株为乳酸菌。根据 Morita^[20] 对嗜冷菌 (Psychrophile) 和耐冷菌 (Psychrotrophs) 的定义,其中有 8 株菌为嗜冷菌,16 株为耐冷菌,与分离菌株的冷水鱼生长环境水温基本一致。分离到的 24 株乳酸菌分属于 *Enterococcus*、*Lactococcus*、*Carnobacterium*、*Streptococcus*、*Weissella*、*Brochothrix*, 目前我们已经对每株菌的细菌素性质、

活性进行了检测,通过酸排除、过氧化氢酶实验、蛋白酶消化实验,发现有 10 株菌对李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、金黄葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等指示菌具有明显的抑菌性能。从系统发育来看,这 10 株产细菌素的菌株中,4 株属于 *Enterococcus* spp.、6 株属于 *Lactococcus* spp., 目前对其细菌素的研究工作正在进一步深入(相关研究结果将后续报道)。

表 3 低温乳酸菌株的生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of psychrotrophic lactic acid bacteria strains

Strain.	M. R.	V-P	Arginine		
			Produce ammonia	Catalase	Nitrate reduction
MHY3-2	-	-	-	-	+
MD-3	-	+	-	-	-
MB2-4	-	-	-	-	-
MB2-5	-	-	-	-	-
EJ3-2	-	-	-	-	+
EHY3-5	-	-	-	-	+
MB2-2	-	-	+	-	-
MHY3-3	-	+	-	-	-
MD-1	-	-	-	-	-
EB2-5	-	+	-	-	+
MB2-1	-	+	-	-	-
MB2-3	-	+	-	-	-
EG2-6	+	+	+	+	-
EJ4-4	+	-	-	-	-
ED-1	-	+	-	-	+
EB2-4	+	+	+	-	-
MW1	-	+	-	-	-
EB2-6	+	+	-	-	+
MD-2	-	+	-	-	-
EHY3-4	-	-	-	-	+
MHY3-4	-	-	-	-	-
EBY2-8	-	+	-	-	+
ED2-2	+	+	+	-	+
EB2-8	+	-	+	-	+

由于乳酸菌广泛存在于不同的生境,遗传和生理多样性极其丰富,目前根据表型特征和 16S rRNA 基因序列并不能明显区分同种属的细菌菌株,有时甚至不同属间的菌株差别也较小^[21-22]。虽然生理生化实验和全细胞蛋白电泳 (SDS-PAGE)^[23] 是目前乳酸菌鉴定中多采用的方法,但是其存在着重复性差和分辨力低等缺点。rep-PCR 针对细菌的全基因组进行扩增,理论上这种方法能够非常准确的反映细菌种群的遗传多样性,具备很高的分辨力,可以在

种、亚种以及菌株水平上区分乳酸菌。在本研究中, 7 株同属于 *Enterococcus* 的菌株、9 株 *Lactococcus* 属的菌株, 其属内 16S rRNA 基因序列与几个已知种的差异均不到 2%, 很难将菌株直接区分到种, 在 16S rRNA 基因的系统进化树上, 谱系进化分支之间的差异不明显。因此, 本研究采用 BOXAIR、ERIC2、(GTG)₅ 三种不同引物的 rep-PCR 指纹图谱聚类分析对分离筛选的乳酸菌在种和菌株水平上进行精细的鉴别。在以往的大多数实验中, rep-PCR 指纹图谱技术多采用 53 °C 的退火温度。在实际操作中, 发现引物 ERIC2 的扩增, 在退火温度为 53 °C 时, 有些菌株不能得到指纹图谱或条带较少。经过多次重复试验并结合 De Urraza 所改进的方法^[24] 将最佳退火温度确定为 50 °C (表 1), 实验结果的重复性要优于 53 °C 退火的方法。此外, De Urraza et al. (2000) 研究发现, BOXAIR-PCR 在鉴定双歧杆菌和嗜热乳酸菌方面效果较好, 但 Gevers (2001)^[25] 和 Švecet 等人 (2005)^[26] 采用不同引物的 rep-PCR 指纹图谱技术研究了乳酸菌的遗传分化, 发现 (GTG)₅-PCR 是最适合针对乳酸菌的高分辨率鉴定方法。我们的研究结果显示, 采用 BOXAIR 和 (GTG)₅ 两种引物进行 PCR 反应产生的条带较多、带谱更丰富, 对实验菌种的区分度更好, 与 De Urraza 等人的结果相似。此外, 针对分离的耐低温乳酸菌菌株, 采用三种引物的 rep-PCR 指纹的多次重复试验, 我们发现不同菌株所得到的指纹图谱的差异主要表现在 4000 bp 左右的大片段上, 尤其是初始的模板 DNA 量对于 PCR 指纹图谱有一定的影响, 但不会对最终聚类结果有大的影响。在实验的过程中为了提高指纹图谱的可重复性, 不仅要保证 DNA 的质量、浓度, 所使用的 PCR 仪和 PCR 体系等条件也要保持一致性。

尽管能够产生抗性并成为致病源的乳酸菌并不常见, 但这种情况确实存在, 因此在乳酸菌素生物保鲜技术的研发中潜在的安全性问题就必须考虑。虽然在乳酸菌细菌素的筛选上获得了一些初步成果, 但是考虑到有些乳酸菌有可能是潜在的致病菌, 一些乳酸菌产生的细菌素有可能具有抗药性^[27,28], 一旦成为致病源, 将无法利用抗生素对其进行治疗, 因此对于这些乳酸菌产业化的风险评估应该投入更多的研究力量。此外, 对于低温环境中的乳酸菌的鉴定, 过去主要集中应用传统培养, 最近许多研究者将分子生态学方法应用于低温乳酸菌的分离和鉴

定, 使得对这一领域的研究又深入了一层。因此传统分离方法与分子生态学方法的结合运用, 必将进一步加深对低温乳酸菌资源的认识和开发, 将其应用于更广阔的领域, 有着更为广泛的应用前景。

参考文献

- [1] 郭本恒. 益生菌. 北京: 化学工业出版社, 2004, 1.
- [2] Hugas M, Monfort JM. Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry*, 1997, 59 (4): 547-554.
- [3] Morita RY. Low-temperature environment in encyclopedia of microbiology. *Academic Press Inc*, 1992, (2): 625-637.
- [4] Cavicchioli R, Thomas T. Encyclopedia of microbiology, Extremophiles. 2nd ed. Diego San: *Academic Press Inc*, 2000: 317-337.
- [5] Matamoros S, Pilet MF, Gigout F, Prévost H, Leroi F. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology*, 2009, 26: 638-644.
- [6] Lee CH. Lactic acid fermented foods and their benefits in Asia. *Food Control*, 1997, 8: 259-269.
- [7] Katikou P, Ambrosiadis I, Georgantelis D, Koidis P, Georgakis SA. Effect of *Lactobacillus-protective* cultures with bacteriocin-like inhibitory substances' producing ability on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum-packaged sliced beef. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99: 1303-1313.
- [8] Castellano P, Vignolo G. Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins. *Letters Applied Microbiology*, 2006, 43: 194-199.
- [9] Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters Applied Microbiology*, 1989, 8: 151-156.
- [10] Benson DA, Boguski MS, Lipman DJ, Oullette BFF, Rapp BA, Wheellet DL. GenBank. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27: 12-17.
- [11] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215: 403-410.
- [12] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis

- tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876-4882.
- [13] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*, 1987, 4: 406-425.
- [14] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [15] Versalovic J, Schneider M, Bruijn FJ. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 1994, 5: 25-40.
- [16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 364-398.
- [17] Jennifer Cleveland, Thomas J, Michael L, Ingolf F. Nes B. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 71: 120.
- [18] Mills S, Stanton C, Hill C, Ross RP. New Developments and Applications of Bacteriocins and Peptides in Foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2011, 2: 299-329.
- [19] Chen H, Hoover DG. Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2003, 2(3): 82-100.
- [20] Morita RY. Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 1975, 39: 144-1671.
- [21] Vandamme P, Plot B, Gillis M, DeVos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiological Reviews*, 1996, 60: 407-438.
- [22] Meintanis C, Chalkou KI, Kormas KA, Lymperopoulou DS, Katsifas EA, Hatzinikolaou DG, Karagouni AD. Application of *rpoB* sequence similarity analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the differentiation of species within the genus *Geobacillus*. *Letters Applied Microbiology*, 2008, 46: 395-401.
- [23] Ouadghiri M, Vancanneyt M, Vandamme P, Naser S, Gevers D, Lefebvre K, Swings J, Amar M. Identification of Lactic Acid Bacteria in Moroccan Raw Milk and Traditionally Fermented Skimmed Milk 'lben'. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(2): 486-495.
- [24] Urraza DE PJ, Mario E, Graciela L. Antoni, DE. DNA fingerprinting of thermophilic lactic acid bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Research*, 2000, 67, 381-392.
- [25] Gevers D, Huys G, Swings J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 205: 31-36.
- [26] Švec P, Vancanneyt M, Seman M, Snauwaert C, Lefebvre K, Sedláček I, Swings J. Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 247: 59-63.
- [27] Yarmus, Mett. Shapira Cloning and expression of the genes involved in the production of and immunity against the bacteriocin lacticin RM. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1490: 279-290.
- [28] Gravesen A, Ramnath M, Rechinger KB, Andersen N, Jänsch L, Héchard Y, Hastings JW, Knøchel S. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, 2002, 148: 2361-2369.

Isolate and genetic heterogeneity of psychrotrophic lactic acid bacteria from the intestinal tract of cold-water fishes from the Eerqisi river, Xinjiang

Yang Gao¹, Jungang Wang², Yanling Gu¹, Mei Deng¹, Hong Zhou¹, Yongqing Ni^{1*}

¹ School of Food Sciences, Shihezi University, Shihezi 832000, China

² Agricultural Product Processing Research Institute, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Sciences, Shihezi 832000, China

Abstract: [Objective] The purpose of this study was to select cold-adapted lactic acid bacteria (LAB) from the intestinal tract of cold-water fishes from the Eerqisi river Alatai, Xinjiang. [Methods] By using culture medium MRS and Elliker, isolation of lactic acid bacteria (LAB) from 9 intestinal canal of cold-water fishes was carried out. Taxonomic identity and genetic diversity of strains isolated were determined by partial 16S rRNA gene sequences and rep-PCR with three different kinds of primers named BOX, (GTG)₅, ERIC. [Results] A total of 78 psychrotrophic isolates were obtained. Among them, 24 isolates had characteristics of LAB and showed the optimal growth temperature ranging from 15 to 24°C. The phylogenesis result showed that 24 strains belonged to 6 Genuses, *Carnobacterium* (3 strains), *Lactococcus* (9 strains), *Enterococcus* (7 strains), *Brochothrix* (1 strain), *Weissella* (2 strains), *Streptococcus* (2 strains). rep-PCR clustering analysis showed that *Lactococcus* and *Enterococcus* strains were from different Species. *Lactococcus* were belonged to 4 species while *Enterococcus* assigned to 2 species. [Conclusion] The phylogenetic diversity of cold-adapted LAB from the intestinal tract of cold-water fishes from the Eerqisi river in the Alatai Xinjiang was relatively abundant.

Keywords: lactic acid bacteria, phylogeny, Repetitive-element PCR, cold-water fishes, Xinjiang

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Doctor Special Fund from the Xinjiang Production and Construction Corps (2011BB009), by the Youth Scientific and Technical Innovation Special Fund from the Xinjiang Production and Construction Corps (2011CB001) and by the key Project of Science and Technique Foundation in Shihezi University (ZRKX20104001)

* Corresponding authors. Tel: +86-993-2058095; Fax: +86-993-2058093; E-mail: niyqlzu@sina.com

Received: 30 August 2012/Revised: 10 October 2012

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效! 此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。