

冰鲜鸭优势腐败菌的鉴定

赵文红^{1,2}, 林慧珍¹, 陈海光¹, 张静子¹, 韩珍¹

(1. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东广州 510225) (2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 结合传统的细菌分离培养法与现代分子生物技术方法 16S rDNA 菌群分析法对冰鲜鸭中优势腐败菌进行鉴定。传统分离培养检测到了 17 株优势腐败菌, 16S rDNA 菌群分析表明, 冰鲜鸭中假单胞菌占绝对优势, 达到 54%; 气单胞菌、肠杆菌是仅次于假单胞菌的第二个类群, 都分别占 15%; 乳酸菌、节杆菌、紫色杆菌以及一株未鉴定的属都分别占 4%。

关键词: 冰鲜鸭; 腐败菌; 传统分离培养; 16SrDNA 菌群分析法

文章编号: 1673-9078(2012)7-728-732

Identification of Spoilage Bacteria in Chilled Duck

ZHAO Wen-hong^{1,2}, LIN Hui-zhen¹, CHEN Hai-guang¹, ZHANG Jing-zi¹, HAN Zhen¹

(1. College of Light Industry and Food, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

(2. College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Advantage spoilage bacteria were identified in chilled duck by traditional bacteria isolation method and 16S rDNA flora analysis. 17 advantage spoilage bacteria had been detected in chilled duck by traditional bacteria isolation method. 16S rDNA flora analysis showed that dominant spoilage bacteria in chilled ducks was of *Pseudomonas*, being of 54%. Strains of *Aeromonas* and *Enterobacter* were the second groups accounted for 15%. The content of a strains of *Lactobacillus*, *Arthrobacter* or *Bacillus*, as well as an unidentified strains, was accounted for 4%.

Key words: chilled duck; spoilage bacteria; traditional bacteria isolation methods; 16S rDNA flora analysis

冰鲜鸭具有鲜鸭肉的外观且质地柔软、滋味鲜美, 既有冷冻肉的安全、货架期长且汁液流失少、营养价值高, 便于各类深加工, 因而具有潜在的市场优势。然而尽管处于低温的冷藏环境中, 腐败微生物的生长与繁殖仍然影响着冰鲜肉的品质与货架期。目前, 在对冷却肉的腐败微生物研究多集中于通过纯培养的方法, 利用选择性培养基进行筛选, 然后进行特殊生理生化实验对冷却猪肉^[1], 冷却羊肉^[2], 冷却牛肉^[3]进行鉴定方面。通过现代分子生物学技术对冷却肉中腐败微生物进行研究的有李正堂等^[4]应用 16S rDNA 技术对肉中单菌落的 DNA 进行序列分析, 江芸等^[5]采用 PCR-变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术对冷却猪肉微生物进行研究, Olsson 等^[6]应用 16S rRNA 基因全序列克隆和测序研究于 4 °C 贮藏的猪肉。宁初光^[7]采用电导率法测定食品细菌总数, 彭喜春^[8]等采用生化鉴定法分离鉴定海产品中筛选的溶藻弧菌的种属和致病因子。而结合传统分离培养与 16S rDNA 菌群分析对冰鲜鸭腐败微生物进行鉴定的报道尚未见到。文章主要

目的在于利用分子生物学与纯培养的方法, 对冰鲜鸭肉中主要微生物基因型和表型两方面进行鉴定, 能够进一步全面的了解冰鲜鸭肉中腐败菌的菌群结构, 为以后的加工保鲜技术提供理论支撑。

1 材料

1.1 原料

冰鲜鸭肉(本试验用的是番鸭): 将刚宰杀的鸭腿肉立即装入保鲜袋中, 于 1 h 之内送达实验室。到达实验室后, 立即用烧开的水清洗表面的污物及血迹, 无菌分装, 于 4 °C 冰箱冷藏, 随机取样进行微生物分析。

1.2 菌种与试剂

菌株: *E. coli* DH5 α 为本实验室保存。

载体: pMD18-T Vector 购自 TaKaRa 公司。

工具酶: 限制性核酸内切酶, T4 DNA Ligase, rTaq DNA Polymerase, Ex Taq DNA Polymerase 购于 TaKaRa 公司。

引物: Eubac27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'), Eubac1492R: (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') 上海生物工程公司合成。

RNase A, 蛋白酶 K: Fermentas 产品。

收稿日期: 2012-04-05

基金项目: 教育部产学研项目(2009B090300422); 2009 年粤港关键领域重点突破项目(2009A020700005); 广州市重大民生攻关项目(2011YZ-00016)

作者简介: 赵文红, 女, 教授, 从事食品研究与开发

BamHI、HindIII: 购自Promega公司。

溶菌酶: Sigma公司产品。

其他试剂: 柱式DNA胶回收试剂盒购自北京天根公司; Tryptone、Yeast Extract、Agarose II、Agar A、购自BBI公司。

1.3 培养基

精氨酸水解酶培养基、葡萄糖氧化发酵培养基(O/F培养基)、营养琼脂培养基、LB培养基、动力-硝酸盐培养基均由广东环凯微生物科技有限公司提供。

1.4 仪器与设备

PCR 扩增仪(Mastercycler), Eppendorf 公司; 凝胶成像分析系统(UVP 7300), 美国思博明科学器材公司; -70 °C超低温冰箱, 海尔公司; SW-CJ 医用型洁净工作台, 苏州净化有限公司; 普通光学显微镜, 上海精密仪器有限公司。

2 试验方法

2.1 传统分离培养初步鉴定

2.1.1 菌落的分离与纯化

在无菌环境下用消毒后的剪刀随机抽取鸭腿肉10 g, 放在无菌培养皿盖中切碎, 置于装有90 mL无菌生理盐水的三角瓶中, 振荡后放在摇床中, 最大速度振荡10 min后取出。取1 mL上清液, 加倍递增稀释至5个合适的梯度, 每个稀释度做3个重复。重复3次此操作, 采用平板倾注法30 °C下培养48 h。然后从菌落总数平板上挑取典型生长菌落。最后在营养琼脂平板上进行划线培养2~3次, 得到纯化的单菌落, 用于菌种的初步鉴定。

2.1.2 腐败菌的初步鉴定

2.1.2.1 菌落形态观察

在显微镜下观察已分离纯化的单个菌落的大小、颜色、形状、隆起度、边缘结构、表面光滑或粗糙、光泽度、透明度和质地等。

2.1.2.2 菌体形态观察

挑取生长良好的典型单一菌落, 进行革兰氏染色观察菌体的形状和菌体间的排列方式, 并进行显微照相。

2.1.2.3 生理生化试验

根据Brown MH(1982)推荐的肉品中微生物鉴定图谱, 进行氧化酶、接触酶、葡萄糖氧化发酵, 精氨酸双水解酶, 硝酸盐还原, O/129以及动力实验。具体实验方法参照《常见细菌系统鉴定手册》。根据菌落形态、菌体形态和生理生化试验, 最终将腐败菌初步鉴定到科和属^[9]。

2.2 16S-DNA 序列测定

2.2.1 腐败菌总 DNA 的提取

取变质鸭肉 25 g 放入盛有 100 mL 生理盐水的三角瓶中, 轻摇 5 min。将上清液用快速滤纸抽滤, 取 20 mL 滤液 12000 r/min 冷冻离心 5 min, 直至形成致密的沉淀。向沉淀中加入 567 μ L 含有 20 mg/mL 溶菌酶的 TE 缓冲液, 反复吹打使之重新悬浮, 加入 30 μ L 10% SDS 和 15 μ L 的蛋白酶 K, 混匀, 于 37 °C 温育 1 h。加入 100 μ L 5 mol/L NaCl, 充分混匀, 再加入 80 μ L CTAB/NaCl 溶液, 混匀后再 65 °C 温育 10 min。加入等体积 24:1 的氯仿/异戊醇, 充分混匀, 离心 4~5 min, 将上清转入新的试管中。加入等体积的酚/氯仿/异戊醇混匀, 离心 4~5 min, 将上清转入一只新管中, 加入 0.6~0.8 倍体积的异丙醇, 轻轻混合直到 DNA 沉淀下来, 沉淀可稍加离心。沉淀用 1 mL 的 70% 乙醇洗涤后, 离心弃乙醇。将沉淀在超净工作台中吹 10 min, 加入 100 μ L 预热至 60 °C TE 缓冲液。

2.2.2 16S rDNA 基因的 PCR 扩增

PCR 反应系统: 1.0 μ L 总 DNA, 正反向引物 (10 pmol/ μ L) 各 1.0 μ L, 2.0 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 1.0 μ L dNTP (2.5 mmol/L), 0.2 μ L rTaq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L), 13.8 μ L D.D.W, 20 μ L 总体积。

细菌 16S rDNA 扩增反应条件:

以总 DNA 为模板, 以 Eubac27F 和 Eubac1492R 为引物, 进行 PCR 扩增。扩增程序如下:

95 °C	3 min	} 循环 30 次
94 °C	1 min	
55 °C	1 min	
72 °C	1.5 min	
72 °C	10 min	
4 °C	holding	

2.2.3 琼脂糖凝胶上 DNA 片段的回收

采用北京天根生物科技公司的 Universal DNA Purification Kit, 方法步骤参见其说明书。

2.2.4 连接反应

根据连接酶说明书进行, 在 0.5 mL 离心管中加入: pMD18T vector (0.5 μ L), DNA (2.5 μ L), Solution I (5 μ L), DDW(补至 10 μ L) 在 16 °C 连接过夜。

2.2.5 化学感受态细胞的制备

挑取 E.coli DH5 α 单菌落至 100 mL LB 液体培养基中, 37 °C 200 r/min 摇动培养; 培养 5~6 h, OD 600 nm 介于 0.2~0.3; 转移菌液至 250 mL 离心管, 4 °C 下 4000 r/min 离心 5 min, 去上清; 加入 30 mL 冰预冷的 0.1 mol/L MgSO₄, 重悬菌体, 冰浴 15 min; 4 °C 下

4000 r/min 离心 5 min, 去上清; 加入 10 mL 冰预冷的 0.1 mol/L CaCl₂/ 15% 甘油, 重悬菌体; 分装成每管 200 μL, 于 -70 °C 超低温保藏。

2.2.6 质粒转化

取一管 E.coli DH5α 感受态细胞, 加入适量连接产物混匀, 冰浴 30 min; 42 °C 热激 90 s, 迅速转至冰浴中, 冷却 2 min; 直接加入 400 μL LB 液体培养基于 EP 管中, 150 r/min, 37 °C 培养 90 min; 取适量转化菌液涂布于含 100 μg/mL Amp LB 固体培养基上; 倒平板, 培养 18~24 h。

2.2.7 质粒提取

采用大连 TaKaRa 生物工程技术服务公司的细菌质粒提试剂盒, 提取步骤参见试剂盒说明书。

2.2.8 核酸内切酶酶切反应

选择适当比例的限制性内切酶和 DNA, 反应体系一般为 20 μL。根据内切酶的说明书进行酶切反应。酶切 3 h。

2.2.9 菌群鉴定和结构分析

提取鸭肉中腐败菌群总 DNA, 用 16S 引物进行 PCR 扩增, 将获得的片段连接到 18T-Vector 载体上, 转化至大肠杆菌 DH5α。将转化菌液送至上海生物工程公司进行测序, 获得 16S rDNA 序列。将获得的序列进行 BLAST 比对, 用 CLUSTALX 软件进行相似序列比较分析, 用 TREECONW 进行系统进化树的构建, 从而获得菌群结构和功能的信息。

2.2.10 主要分析软件

DNAMAN (Version 5.1; Lynnon Biosoft): DNA 序列的分析, 同源性比较, 序列拼接采用; 系统发育树分析用 CLUSTAL X 1.8 和 treeconw 软件

3 结果与分析

3.1 常规分离初步鉴定结果

从细菌总数平板上挑取 17 株菌落形态特征典型的菌进行分离纯化, 革兰氏染色镜检, 其中 10 株为革兰氏阴性菌, 7 株革兰氏阳性菌。具体的菌落形态及生理生化结果见下表。

根据表 1、2 的结果, 结合 Brown 推荐的肉品中微生物鉴定图谱以及《常见细菌系统鉴定手册》, 初步鉴定结果为: 1 号为节杆菌属, 2、3 号为肠杆菌科, 4、5、10 号为葡萄球菌, 6、9、14、15 号为气单胞菌, 7、8 号为不动杆菌属, 11 号为库特氏菌, 12 号为乳酸菌, 13 号为假单胞菌属, 16 号为热死环丝菌, 17 号为交替假单胞菌。实验结果表明气单胞菌在分离出的腐败菌中占了比较大的比例。

3.2 菌群总 DNA 的提取

表 1 菌落特征以及菌株形态

Table 1 Characteristics of bacterial colony and shape of strains

菌种编号	菌落形态	菌落颜色	细菌形态	革兰氏染色
1	圆形, 边缘整齐, 微隆, 湿润	奶白	短杆	G+
2	三角形, 低凹	浅土黄	短杆	G-
3	杆状, 低凹	浅土黄	细杆	G-
4	圆形, 直径 5mm, 隆起, 湿润	奶白	球状	G+
5	星形, 低凹	浅土黄	球状	G+
6	梭状, 低凹	浅黄	短杆	G-
7	圆形, 隆起, 湿润光泽	金黄	细杆	G-
8	椭圆, 低凹	奶白	杆状	G-
9	圆形, 微隆, 湿润	灰白	短杆	G-
10	圆形, 边缘整齐, 乳头状乳白, 不透明		球状	G+
11	不规则	半透明	杆状	G+
12	圆形	半透明	卵圆	G+
13	圆形, 低凹, 直径 4~5mm	半透明	杆状	G-
14	同心圆, 外圆不规则, 扁平	半透明	短杆	G-
15	椭圆, 低凹	浅黄	短杆	G-
16	圆形, 隆起, 湿润	奶白	杆状	G+
17	梭状, 低凹	土黄	杆状	G-

表 2 生理生化试验结果

Table 2 Results of physiological and biochemical tests

菌种编号	接触酶	氧化酶	O/F	精氨酸双水解酶	动力情况	硝酸盐还原	O/129
1	阳性	阴性	F	NT	阴性	阴性	NT
2	阳性	阴性	F	NT	NT	NT	NT
3	阳性	阴性	F	NT	NT	NT	NT
4	阳性	阴性	F	NT	NT	NT	NT
5	阳性	阴性	F	NT	NT	NT	NT
6	阳性	阳性	F	阳性	阳性	阳性	不敏感
7	阳性	阴性	不产酸	NT	NT	NT	NT
8	阳性	阴性	不产酸	NT	NT	NT	NT
9	阳性	阳性	F	阳性	阳性	阳性	不敏感
10	阳性	阴性	F	NT	NT	NT	NT
11	阳性	阴性	不产酸	NT	阳性	阴性	NT
12	阴性	阴性	NT	NT	NT	NT	NT
13	阳性	阳性	O	阳性	阳性	阳性	NT
14	阳性	阳性	F	阳性	阳性	阳性	不敏感
15	阳性	阳性	F	阳性	阳性	阳性	不敏感
16	阳性	阳性	NT	NT	阴性	阴性	NT
17	阳性	阳性	不产酸	阴性	阳性	阴性	NT

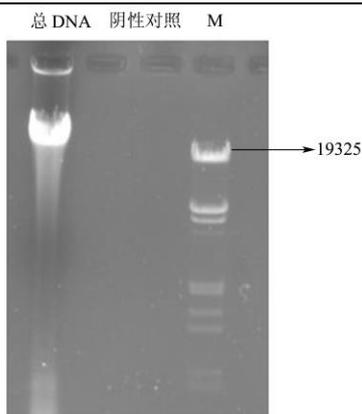


图 1 总 DNA

Fig.1 Electroforesis of genomic DNA

提取菌群总 DNA，琼脂糖电泳如图 1 所示，片段大小为 2 万左右，条带很清晰。

3.3 16S rDNA 保守序列的扩增

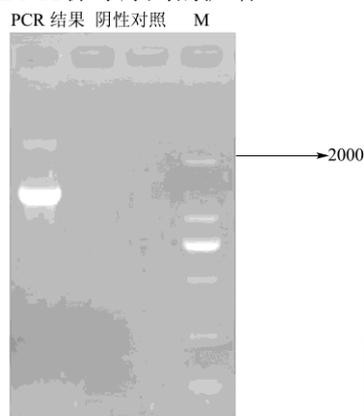


图 2 PCR 扩增 16S rDNA 基因

Fig.2 PCR amplification of 16S rDNA

回收总 DNA，PCR 扩增获得 16S rDNA 保守序列。琼脂糖电泳结果如图 2 所示：片段大小为 1500 左右，条带亦很清晰。

回收该条带连接到 PMD-18T 载体上，转化到 E.coli 感受态细胞中，转化后涂固体 LB 培养基平板，通过蓝白斑筛选即可获得阳性克隆子。阳性克隆子通过酶切验证后送出测序。

3.4 系统进化树及菌群结构

根据 16S rDNA 基因序列相似性比对结果，选取最相似序列构建系统发育树，系统发育树采用邻接法构建。如图 3 所示。

YR 样品来自冷藏 12 d 左右的腐败变质冰鲜鸭，细菌 16S rDNA 序列系统发育分析见图 3。细菌克隆子库中的大多数序列分别属于 6 个已知的菌属和一个未知类群：假单胞菌、气单胞菌、乳酸菌、肠杆菌、节杆菌、紫色杆菌，YR-5 属于未知的类群。

在变质冰鲜鸭样品的微生物群落中，菌落结构分布如图 4 所示。结果表明，共测序得到 26 个克隆子。

样品中假单胞菌占绝对优势，达到 54%，共有 14 个克隆子。气单胞菌、肠杆菌是仅次于假单胞菌的第二个类群，占 15%，都分别有 4 个克隆子。而乳酸菌类群有 1 条序列，节杆菌有 1 条序列，紫色杆菌有 1 条序列，YR-3 属紫色杆菌的未知种，可能为新菌。还有一个克隆子测序结果为不确定的菌属。

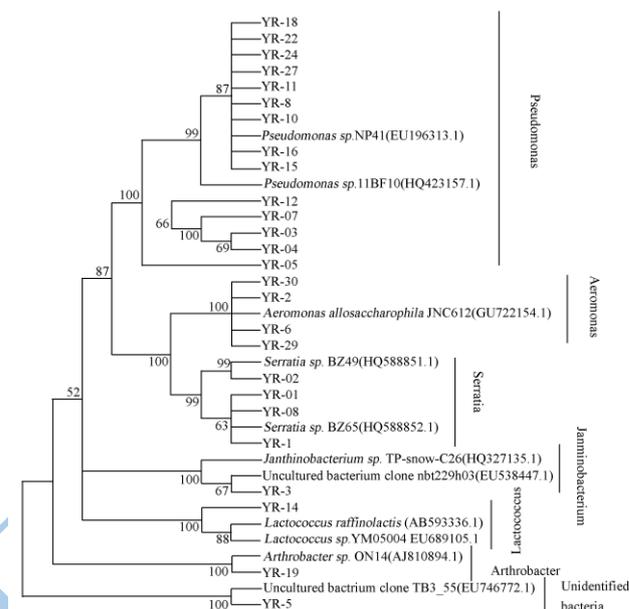


图 3 基于 16S rDNA 序列的腐败冰鲜鸭 YR 样品的细菌多样性系统发育树

Fig.3 Phylogenetic relationships of the bacterial clones derived from spoiled chilling duck meat. The clones from this study is indicated by YR-xx (YR=bacterial clone, xx=clone number)

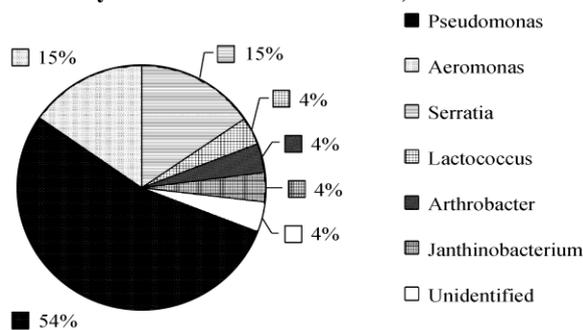


图 4 腐败冰鲜鸭中基于细菌 16S rDNA 克隆子文库的菌落结构

Fig.4 Phylogenetic community structures based on bacterial 16S rDNA clone libraries of domains Bacteria from spoiled chilling duck

4 结论

4.1 实验结果表明，不同分析的方法，如使用传统分离培养法和分子生物学法对冰鲜鸭腐败菌进行分离与鉴定，得到的结果有不同之处。传统分离培养的实验结果表明：初步鉴定主要为气单胞菌 4 株；葡萄球菌 3 株；肠杆菌和不动杆菌各 2 株；节杆菌、库特式菌、

乳酸菌、假单胞菌、热死环丝菌和交替单胞菌各 1 株。16S rDNA 菌群分析腐败冰鲜鸭的菌落结构显示：腐败冰鲜鸭中鉴定出假单胞菌属、气单胞菌属、乳酸菌属、肠杆菌属、节杆菌属、紫色杆菌属，还有检测到属于未知类群的克隆子。样品中假单胞菌占绝对优势，达到 54%。气单胞菌、肠杆菌中的沙雷氏菌是仅次于假单胞菌的第二个类群，都分别占 15%。乳酸菌、节杆菌、紫色杆菌以及一株未鉴定的属都分别占了 4%。

4.2 传统分离培养鉴定出来的细菌菌属与应用 16S rDNA 菌群分析的鉴定结果都表明冰鲜鸭的腐败微生物包括：假单胞菌、气单胞菌、乳酸菌、肠杆菌、节杆菌。二者不一致的地方有，传统方法初步鉴定出了热死环丝菌和葡萄球菌，而在 16S rDNA 菌群分析中没有鉴别出来，以及 16S rDNA 菌群分析法鉴定出了紫色杆菌而传统方法没有。分析不一致结果的原因：传统方法较为繁琐，如果想要得到较为准确的鉴定结果，需要做的鉴定试验比较多，且存在人为操作误差，因此只是得到了初步的鉴定结果。而 16S rDNA 菌群分析法也有它的局限性，可鉴定出菌群类型有限，并且由于检测的费用控制，挑选测序的克隆子数量有限，检测结果只能大概表示主要的优势菌群结构，不排除有漏检的可能性。综合两者的试验结果才可得到一个较为准确全面的判断。

参考文献

- [1] 马丽珍,南庆贤,戴瑞彤,等.冷却猪肉中腐败菌的分离、初步鉴定与初始菌相分析.天津农学院学报,2005,12(3):39-43
- [2] 于见亮,李开雄,蒲菊霜,等.冷却羊肉中腐败菌的分离、初步鉴定与初始菌相分析[J].肉类工业,2007,11:27-29
- [3] 罗欣,朱燕,Nisin 在牛肉冷却肉保鲜中的应用研究[J].食品科学,2000,21(3):53-57
- [4] 李正堂,李柏林,欧杰,等.市售冷却牛肉中主要细菌的常规分离与鉴定[J].微生物学通报,2009,36(2):198-204
- [5] 江芸,高峰,徐幸莲,等.冷却猪肉不同前处理对细菌 DNA 的提取及 PCR-DGGE 的影响[J].食品科学,2010,31(6):258-262
- [6] OLSSON C, AHRNE S, PETTERSSON B, et al. The bacterial flora offresh and chill-stored pork: analysis by cloning and sequencing of 16SrRNA genes [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 83(3): 245-252
- [7] 宁初光,杨洋,吴小勇.电导率法快速检测食品细菌总数的研究[J].现代食品科技,2012,28(2):237-240
- [8] 彭喜春,张宁,冉艳红,等.海产品中溶藻弧菌的筛选及其致病因子的研究[J].现代食品科技,2008,24(4):312-315
- [9] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001