

# 冷冻鸡肉中耐冷菌的分布及对优势菌的控制

张宇翔<sup>1</sup>, 魏建平<sup>1</sup>, 宋子涵<sup>1</sup>, 牛晨<sup>2</sup>, 袁亚宏<sup>1</sup>, 岳田利<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

(2. 西北大学食品科学与工程学院, 陕西西安 710000)

**摘要:** 本项目以市售的冷冻鸡腿、冷冻鸡翅和冷冻鸡爪为研究对象, 评价冷冻鸡肉的微生物污染, 分析其中耐冷细菌分布的多样性。结果表明, 冷冻鸡爪的微生物污染最严重, 可达  $10^5$  CFU/g。从三种鸡肉样品中共分离得到 100 株耐冷细菌, 其中假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 占 49%, 嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter* sp.) 和沙雷氏菌属 (*Serratia* sp.) 分别占 13% 和 12%。在假单胞菌属中, 莓实假单胞菌 (*Pseudomonas fragi*) 达到了 61%。对冷冻鸡爪中分离得到的 30 株细菌, 通过构建系统发育树, 确定分类地位。进一步选择了一株莓实假单胞菌 (*P. fragi* 30-1), 研究其生长特性, 并对其进行抑菌试验。结果证明 *P. fragi* 30-1 具有较强的耐冷性, 最大能耐受 2.5% NaCl, 适宜在 pH 6~8 的环境中生长。氯霉素、罗红霉素以及茶多酚对 *P. fragi* 30-1 均有较好的抑菌作用, 最小抑菌浓度 (MIC) 分别为 0.31 mg/mL, 0.62 mg/mL 和 0.62 mg/mL。本研究为了解冷冻鸡肉的安全性提供基础, 也为 *P. fragi* 的污染控制提供方向。

**关键词:** 冷冻食品; 微生物污染; 莓实假单胞菌 (*P. fragi*); 生长特性; 抗菌性能

文章篇号: 1673-9078(2020)03-140-149

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.3.019

## Distribution of Cold-resistant Bacteria in Frozen Chicken and the Control of Dominant Bacteria

ZHANG Yu-xiang<sup>1</sup>, WEI Jian-ping<sup>1</sup>, SONG Zi-han<sup>1</sup>, NIU Chen<sup>2</sup>, YUAN Ya-hong<sup>1</sup>, YUE Tian-li<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

(2. College of Food Science and Technology, Northwest University, Xi'an 710000, China)

**Abstract:** This project used commercially available frozen chicken leg, frozen chicken wing and frozen chicken feet as the research objects to evaluate the microbial contamination in frozen chicken meat and analyze the diversity of cold-resistant bacteria distribution. The results showed that the microbial contamination of frozen chicken feet was the most serious (up to  $10^5$  CFU/g). A total of 100 cold-tolerant bacteria were isolated from three types of chicken meat samples, of which *Pseudomonas* accounted for 49%, *Psychrobacter* and *Serratia* accounted for 13% and 12%, respectively. In the genus *Pseudomonas*, sixty-one percent of *Pseudomonas* were identified as *Pseudomonas fragi*. A phylogenetic tree was built for the 30 strains isolated from frozen chicken feet to estimate their phylogenetic positions. A *P. fragi* 30-1 strain was further selected to study its growth characteristics and subjected to the antibacterial test. The results showed that *P. fragi* 30-1 had strong cold resistance, could withstand a maximum of 2.5% NaCl, and is suitable for growth in a pH 6~8 environment. Chloramphenicol, roxithromycin, and tea polyphenols had good antibacterial activities against *P. fragi* 30-1, and the minimum inhibitory concentrations (MICs) were 0.31 mg/mL, 0.62 mg/mL and 0.62 mg/mL, respectively. This study provided a basis for understanding the safety of frozen chicken and also insights into the control of *P. fragi* contamination.

**Key words:** frozen food; microbial contamination; *Pseudomonas fragi*; growth characteristics; antibacterial properties

引文格式:

张宇翔, 魏建平, 宋子涵, 等. 冷冻鸡肉中耐冷菌的分布及对优势菌的控制[J]. 现代食品科技, 2020, 36(3): 140-149

ZHANG Yu-xiang, WEI Jian-ping, SONG Zi-han, et al. Distribution of cold-resistant bacteria in frozen chicken and the control of dominant bacteria [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(3): 140-149

收稿日期: 2019-08-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31671866)

作者简介: 张宇翔 (1992-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食品安全控制

通讯作者: 岳田利 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术及

食品安全控制

随着人们生活节奏的加快和消费观念的逐步改变, 冷冻食品由于其方便快捷的优势逐渐打开了市场。冷冻操作在很大程度上限制了食品中腐败微生物的繁殖, 保障了食品的安全。然而, 冷冻食品也并非绝对的安全。在储存过程中, 不可避免的温度波动是造成

食品微生物污染和品质下降的主要原因<sup>[1]</sup>。有些微生物也可以耐受极端低温<sup>[2]</sup>，在冷冻环境下依然能够存活，它们在低温下的生长繁殖会导致冷冻食品的腐败变质。

除了人们熟知的有毒有害物质以及致病菌等危害因子之外<sup>[3]</sup>，腐败变质也被认为是食品安全的重要因素<sup>[3,4]</sup>。假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 是导致食品腐败变质的优势种群<sup>[5-9]</sup>。由于假单胞菌能耐受低温环境，在冷藏食品或冷冻食品中，假单胞菌的优势就更加明显<sup>[5,6]</sup>。尤其是莓实假单胞菌 (*Pseudomonas fragi*)，它是造成低温食品腐败变质的主要微生物<sup>[5,6,10,11]</sup>。

冷冻鸡肉可以最大限度的保存原有品质，并且兼具营养美味，食用方便的特点，受到广大消费者的追捧。因此，冷冻鸡肉的安全性已经成为关乎公众健康的大问题。据报道，在冷藏禽肉中的特定腐败菌是假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)、肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 以及热杀索丝菌 (*Brochothrix thermosphacta*) 等<sup>[3,12,13]</sup>。它们在食品中的附着繁殖会促进黏液和异味的产生，使食物质地受损，导致食品品质下降和消费者接受度降低<sup>[5,14]</sup>。这不仅对消费者构成潜在威胁，同时也造成经济损失，资源浪费。

因此，本试验选择冷冻鸡腿、冷冻鸡翅和冷冻鸡爪三种样品，希望能够对冷冻鸡肉中的微生物污染进行系统的解析。针对冷冻鸡肉中最优势的莓实假单胞菌 (*P. fragi*)，进一步研究它的生长特性，并寻找有效的抗菌剂对其进行抑制。本研究旨在为冷冻鸡肉的安全性提供理论基础，并为有效控制冷冻鸡肉中的微生物污染提供思路和理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

#### 1.1.1 试验材料

冷冻鸡腿、冷冻鸡翅和冷冻鸡爪，均购买自陕西杨凌某超市。所有样品均在货架期初期采集。采用“五点取样法”进行取样，每点取样 0.2 kg，五点的样品经过混合和合并，得到的 1 kg 作为该食品的一份样本。采样人员均需佩戴无菌手套及口罩，迅速地样品保存至无菌袋中，并放入低温采样箱。

#### 1.1.2 培养基

平板计数琼脂 (plate count agar, PCA)，用于总需氧和兼性厌氧菌落的计数，购自北京陆桥有限公司。

假单胞菌选择性培养基 (*Pseudomonas* CFC selective agar, CFC)，用于选择性的分离培养假单胞菌，购自青岛海博公司。使用时，每升需要加入 5 mL

的假单胞菌 CFC 选择性培养基添加剂。

肠道菌计数琼脂 (violet red bile dextrose agar, VRBDA)，用于肠道菌计数和鉴别，购自北京奥博星有限公司。

营养肉汤 (nutrient broth, NB)，用于细菌的培养增殖：10 g 蛋白胨，3 g 牛肉膏，5 g NaCl，1 L 蒸馏水，调节 pH 7.0 左右。

营养琼脂 (nutrient agar, NA)，在 NB 培养基中，加入 20 g 琼脂。

#### 1.1.3 试剂

壳聚糖 (90%)、氯霉素 (≥99%)，购自北京索莱宝科技有限公司；罗红霉素 (≥940 U/mg)，购自上海源叶生物科技有限公司；茶多酚 (HPLC, >95%)，购自西安沃尔森生物技术有限公司；甲醇，乙酸均为分析纯，购自天津科密欧化学试剂有限公司。

## 1.2 仪器与设备

AUY220 型电子天平，日本岛津公司；FE28 型 pH 计，梅特勒-托利多国际有限公司；WGI-230B 型电热鼓风干燥箱，天津泰斯特仪器有限公司；YXQ-LS-70A 型立式压力蒸汽灭菌锅，上海博讯有限公司；ZXSD-A1160 型生化培养箱，上海智诚仪器公司；YT-CJ-2ND 型超净工作台，北京亚泰科隆仪器有限公司；HC-3018R 型高速冷冻离心机，安徽中科中佳科学仪器有限公司；DNA Engine 型 PCR 仪，美国伯乐公司；JY600C 型电泳仪，北京君意公司；游标卡尺，杭州西湖量具刀具厂；iMark 型酶标仪，美国伯乐公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 样品预处理

样品采集后，用低温采样箱迅速运输到实验室。于无菌操作台将样品迅速切成小块，充分混匀，快速的放入无菌样品盒中，每个样品保存两份，一份用于耐冷菌的分离鉴定；另一份则作为留样以备复检。

### 1.3.2 分离鉴定

#### 1.3.2.1 耐冷菌分离与计数

在超净工作台中，称取 10 g 样品于 90 mL 的无菌生理盐水中，在 4 °C 静置洗脱 1 h。取出后，迅速将洗脱液摇匀，进行一系列的十倍梯度稀释。各取 100 μL 适当稀释度的稀释液，均匀涂布于 PCA、CFC、VRBDA 培养基上，每个稀释度做三个平行。将培养皿放置在 4 °C 静置培养 10 d。

为了衡量不同样品的污染程度，待菌落长出后，对菌落总数在 30~300 的平板进行计数，将结果进行

统计分析。之后,随机挑取不同形态的菌落,于 NA 上进行三区法划线纯化,于 4 °C 倒置培养。按照此方法反复划线培养,直至得到形态单一的菌落。将单菌落继续接种到 NA 平板上检查生长状态,确认菌落得到纯化后,挑取单菌落于 NB 培养基中,在 4 °C 进行增殖培养。待菌株生长至对数期中后期,吸取 0.5 mL 菌液于 1 mL 甘油和培养基 (3:7) 的混合液中进行保藏。冻存管保存于 -80 °C,待用。

### 1.3.2.2 分子鉴定

取活化培养后的分离株纯培养物,按照 Biospin 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (杭州博日科技有限公司) 说明书手册进行模板 DNA 提取。

选择通用引物上游引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和下游引物 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。引物由华大基因有限公司合成。

PCR 反应体系: 总体积 50  $\mu$ L, 包括 2  $\mu$ L 模板 DNA, 2  $\mu$ L 上游引物, 2  $\mu$ L 下游引物, 25  $\mu$ L Premix Taq, 19  $\mu$ L 灭菌蒸馏水。

PCR 反应程序: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 45 s, 50 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 °C 再延伸 10 min<sup>[15]</sup>。

用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增的 DNA 片段。将 PCR 扩增产物送至深圳华大基因公司进行测序。测序获得的序列与 GenBank 数据库中的序列进行 Blast 比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。采用 MEGA 7.0 构建系统发育树, 确定分离株的系统发育学地位。

### 1.3.3 莓实假单胞菌的生长特性

在优势菌属中,挑选一株莓实假单胞菌,对其生长特性进行研究。菌株采用 NB 培养基进行活化增殖培养。保持初始菌液的浓度为 10<sup>6</sup> CFU/mL, 接种量 1%。在测试菌株对盐浓度的耐受性时,选择 9 个 NaCl 浓度,即 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、

4.0%、5.0%、6.0% (W/V), 控制 pH=7, 温度为 15 °C。在测试菌株的 pH 耐受性时,选择 8 个 pH 梯度,即 pH 为 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 控制 0.5% (W/V) 盐浓度,温度为 15 °C。在测试菌株对温度的耐受性时,选择 6 个温度梯度,即 4、15、20、28、37、42 °C, 控制 0.5% (W/V) 盐浓度, pH=7。在培养 24 h, 36 h, 48 h 后,用酶标仪测定菌液在 600 nm 处的吸光度。

### 1.3.4 体外抑菌评价

选择氯霉素、罗红霉素、茶多酚、壳聚糖等 4 种物质考察对莓实假单胞菌的体外抑菌效果。壳聚糖用 2% (V/V) 乙酸溶解。罗红霉素、氯霉素、茶多酚用甲醇溶解。同时设置甲醇、2% 乙酸和 NB 培养基作为对照组。选择 10 mg/mL、5 mg/mL、2.50 mg/mL、1.25 mg/mL、0.62 mg/mL 和 0.31 mg/mL 等浓度进行试验。

采用双层平板打孔法进行抑菌试验。先用 2% 的琼脂作为平板的下层,待其凝固后,小心地放置牛津杯,然后将混有菌液 (10<sup>6</sup> CFU/mL, 接种量为 1%) 的含 1.0% 琼脂的上层 NA 培养基轻轻倒入,等待凝固。最后将牛津杯轻轻拔出,即形成孔。在孔中加入 100  $\mu$ L 抑菌物质,并将平板置于 25 °C 培养 48 h。根据有无抑菌圈以及抑菌圈直径大小 (mm) 来确定抑菌效果。能够产生抑菌圈的最低浓度,即为该物质的最小抑菌浓度 (MIC)。抑菌圈直径越大,则表明抑菌效果越好。

## 1.4 数据处理

所有的试验均重复 3 次。用 SPSS 22.0 软件进行数据分析,用 Duncan 多重比较法进行显著性检验 ( $p < 0.05$ )。用 Origin 软件作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 冷冻鸡肉中的微生物污染

表 1 冷冻鸡肉的微生物污染程度 / (CFU/g)

Table 1 The microbiological contamination of frozen chicken samples

样品编号	样品名称	分离株个数	培养基类型		
			PCA	CFC	VRBDA
23 号	冷冻鸡腿	22 株	4.25×10 <sup>4</sup>	8.05×10 <sup>2</sup>	6.04×10 <sup>2</sup>
27 号	冷冻鸡翅	48 株	1.86×10 <sup>5</sup>	2.46×10 <sup>4</sup>	2.03×10 <sup>4</sup>
30 号	冷冻鸡爪	30 株	2.77×10 <sup>5</sup>	2.83×10 <sup>5</sup>	2.21×10 <sup>5</sup>

平板上的菌落数可以反映出样品里的微生物污染程度。表 1 为冷冻鸡腿、冷冻鸡翅和冷冻鸡爪在 PCA、CFC 和 VRBDA 上的菌落计数结果。通过比较可知,冷冻鸡爪中的样品污染最为严重,在三种培养基上的菌落总数均达到了 10<sup>5</sup> CFU/g。这可能是由于鸡爪和

土壤接触较多,在皮肤缝隙中极易存留微生物,不容易清洗干净引起的。而冷冻鸡翅的污染程度也较为严重,菌落数持续在 10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup> CFU/g 之间。冷冻鸡腿样品的污染较轻,其在 CFC 和 VRBDA 平板上的菌落数仅为 10<sup>2</sup> CFU/g。另外,整体上看,PCA 平板上的污

染程度高于 CFC 和 VRBDA。

## 2.2 冷冻鸡肉中的耐冷菌分布

在三种平板上挑选不同形态的菌落进行分离纯化,经 16S rRNA 鉴定后,可以得出:从冷冻鸡腿、冷冻鸡翅和冷冻鸡爪中分离鉴定到的耐冷细菌分别有 22 株、48 株以及 30 株(如表 2~4 所示)。对冷冻鸡肉中分离到的 100 株耐冷细菌进行整体分析。图 1a 统计了分离株在属水平上的分布情况。假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 以绝对的优势占据了第一位 (49%), 其次为嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter* sp.) 和沙雷氏菌属 (*Serratia* sp.), 它们分别占到了 13% 和 12%。另外还分离到少量金黄杆菌属 (*Chryseobacterium* sp.)、肉食杆菌属 (*Carnobacterium* sp.)、不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.)、拉恩氏菌属 (*Rahnella* sp.)、丛毛单胞菌属 (*Comamonas* sp.)、索丝菌属 (*Brochothrix* sp.) 以及节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.) 等。

进一步对优势菌属进行分析,由图 1b 可知:超过 61% 的假单胞菌被鉴定为莓实假单胞菌 (*P. fragi*), 其

次还有较多的荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*)。这两种假单胞菌在腐败食品中分布较广,它们也是鸡肉中的主要腐败微生物<sup>[3,7]</sup>,对鸡肉品质和货架期起决定性作用<sup>[7]</sup>。莓实假单胞菌在低温下能够产生胞外脂肪酶和蛋白酶<sup>[11,16,17]</sup>,有着很强的致腐能力,对肉品的安全性造成了极大的威胁<sup>[11]</sup>。嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter* sp.) 也是冷链食品中的主要污染菌,它广泛存在于畜产品和水产品中<sup>[18]</sup>。本试验所分离到的嗜冷杆菌(图 1c),有部分是近海生嗜冷杆菌 (*Psychrobacter maritimus*),还有 1 株嗜冷嗜冷杆菌 (*Psychrobacter psychrophilus*),多数嗜冷杆菌未被鉴定到种。至于沙雷氏菌属,由图 1d 可知,变形斑沙雷菌 (*Serratia proteamaculans*) 和液化沙雷氏菌 (*Serratia liquefaciens*) 居多。沙雷氏菌属是肠杆菌科的一种,它们广泛分布于土壤、水、植物、昆虫和人类中<sup>[19]</sup>。肠杆菌科的细菌大多来源于动物体内以及动物在屠宰前后所接触的环境,这些肠道菌可以扩散到工作环境中,甚至可以存活至终端产品,从而造成食品污染<sup>[20]</sup>。但是这种动物源微生物群并不像核心微生物群那么普遍,也不如核心微生物群丰富<sup>[20]</sup>。

表 2 冷冻鸡腿中的分离菌株

Table 2 The isolates in frozen chicken leg

培养基类别	分离株	比对结果	同源率	参考菌株编号	参考菌株登录号
PCA	23-1	<i>Psychrobacter</i> sp.	100%	<i>Psychrobacter</i> sp. TMB2-15	JX949972.1
PCA	23-2	<i>Psychrobacter maritimus</i>	99%	<i>Psychrobacter maritimus</i> CX-93	MH368410.1
PCA	23-3	<i>Psychrobacter</i> sp.	100%	<i>Psychrobacter</i> sp. AsK2	MK560045.1
PCA	23-4	<i>Psychrobacter</i> sp.	100%	<i>Psychrobacter</i> sp. TP-Snow-C67	KC986997.1
PCA	23-5	<i>Psychrobacter</i> sp.	99%	<i>Psychrobacter</i> sp. M3-2	KP058411.1
PCA	23-6	<i>Psychrobacter maritimus</i>	99%	<i>Psychrobacter maritimus</i> JB 102	KJ939482.1
PCA	23-7	<i>Psychrobacter</i> sp.	100%	<i>Psychrobacter</i> sp. NU01	LC184493.1
PCA	23-8	<i>Psychrobacter maritimus</i>	99%	<i>Psychrobacter maritimus</i> M1-13	KP058402.1
PCA	23-9	<i>Psychrobacter maritimus</i>	100%	<i>Psychrobacter maritimus</i> CX-93	MH368410.1
PCA	23-10	<i>Psychrobacter maritimus</i>	100%	<i>Psychrobacter maritimus</i> JB 102	KJ939482.1
PCA	23-11	<i>Psychrobacter</i> sp.	100%	<i>Psychrobacter</i> sp. MA01	LC184277.1
PCA	23-12	<i>Psychrobacter</i> sp.	100%	<i>Psychrobacter</i> sp. M4-12	KP058425.1
PCA	23-13	<i>Pseudomonas trivialis</i>	100%	<i>Pseudomonas trivialis</i> B24	JN377670.1
PCA	23-14	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	100%	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> M-6	KT722995.1
PCA	23-15	<i>Psychrobacter psychrophilus</i>	100%	<i>Psychrobacter psychrophilus</i> NP42	EU196312.1
PCA	23-16	<i>Carnobacterium divergens</i>	99%	<i>Carnobacterium divergens</i> MF 109	AY543016.1
PCA	23-17	<i>Carnobacterium divergens</i>	100%	<i>Carnobacterium divergens</i> JCM 5816	LC145556.1
CFC	23-21	<i>Buttiauxella agrestis</i>	99%	<i>Buttiauxella agrestis</i> L40	KU179368.1
CFC	23-23	<i>Pseudomonas fragi</i>	99%	<i>Pseudomonas fragi</i> F25	KT767873.1
CFC	23-24	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PE3	KJ127239.1
VRBDA	23-25	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	<i>Pseudomonas</i> sp. CSC23	KX289494.1
VRBDA	23-26	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> KOPRI 25934	HQ825057.1

表3 冷冻鸡翅中的分离菌株

Table 3 The isolates in frozen chicken wing

培养基类别	分离株	比对结果	同源率	参考菌株编号	参考菌株登录号
PCA	27-1	<i>Chryseobacterium</i> sp.	95%	<i>Chryseobacterium</i> sp. Leaf404	MK095757.1
PCA	27-2	<i>Sphingobacterium</i> sp.	99%	<i>Sphingobacterium</i> sp. RCB287	KT260499.1
PCA	27-3	<i>Mycetocola lacteus</i>	99%	<i>Mycetocola lacteus</i> CM-10	NR_024679.1
PCA	27-4	<i>Chryseobacterium hominis</i>	100%	<i>Chryseobacterium hominis</i> F5649	JX100820.1
PCA	27-5	<i>Chryseobacterium</i> sp.	99%	<i>Chryseobacterium</i> sp. WW-RP1	KJ958496.1
PCA	27-7	<i>Serratia liquefaciens</i>	99%	<i>Serratia liquefaciens</i> ZMT-1	KU999993.1
PCA	27-8	<i>Serratia</i> sp.	99%	<i>Serratia</i> sp. TV91May	KJ482883.1
PCA	27-9	<i>Arthrobacter pascens</i>	98%	<i>Arthrobacter pascens</i> pp3e	GQ360068.1
PCA	27-11	<i>Arthrobacter pascens</i>	98%	<i>Arthrobacter pascens</i> pp3e	GQ360068.1
PCA	27-12	<i>Pseudomonas lurida</i>	100%	<i>Pseudomonas lurida</i> A10	KT767650.1
PCA	27-13	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	100%	<i>Acinetobacter johnsonii</i> W1109-B23	JQ815206.1
PCA	27-14	<i>Sphingomonas</i> sp.	100%	<i>Sphingomonas</i> sp. PDD-57b-28	KR922123.1
PCA	27-15	<i>Chryseobacterium ureilyticum</i>	99%	<i>Chryseobacterium ureilyticum</i> CQ-4	MN216257.1
PCA	27-16	<i>Serratia proteamaculans</i>	99%	<i>Serratia proteamaculans</i> P2-2	KT215491.1
PCA	27-18	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	98%	<i>Acinetobacter guillouiae</i> phen 8	KM658327.1
PCA	27-19	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Cr2	KX589061.1
PCA	27-20	<i>Epilithonimonas</i> sp.	100%	<i>Epilithonimonas</i> sp. NSG16	KC884003.1
PCA	27-21	<i>Pseudomonas fragi</i>	99%	<i>Pseudomonas fragi</i> NBRC 101046	AB681348.1
PCA	27-22	<i>Pseudoclavibacter</i> sp.	99%	<i>Pseudoclavibacter</i> sp. HP10L	KM187382.1
PCA	27-23	<i>Serratia proteamaculans</i>	100%	<i>Serratia proteamaculans</i> KB49	JF327473.1
PCA	27-24	<i>Comamonas koreensis</i>	100%	<i>Comamonas koreensis</i> M0412	KF924214.1
PCA	27-25	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 24bKB2	KT825767.1
PCA	27-26	<i>Serratia proteamaculans</i>	100%	<i>Serratia proteamaculans</i> B99	KJ781963.1
PCA	27-28	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> CIFTRT177	KF379759.1
PCA	27-29	<i>Serratia</i> sp.	99%	<i>Serratia</i> sp. KB17	JF327451.1
CFC	27-30	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	99%	<i>Pseudomonas psychrophila</i> F17	KT767864.1
CFC	27-31	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Cr2	KX589061.1
CFC	27-32	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DN-S01	KU899097.1
CFC	27-33	<i>Serratia liquefaciens</i>	100%	<i>Serratia liquefaciens</i> ZMT-1	KU999993.1
CFC	27-34	<i>Serratia</i> sp.	99%	<i>Serratia</i> sp. R36	KU057031.1
CFC	27-35	<i>Pseudomonas orientalis</i>	100%	<i>Pseudomonas orientalis</i> KOPRI 25906	HQ825051.1
CFC	27-36	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DN-S01	KU899097.1
VRBDA	27-37	<i>Pseudomonas cedrina</i>	100%	<i>Pseudomonas cedrina</i> G25	KT767922.1
VRBDA	27-38	<i>Serratia grimesii</i>	99%	<i>Serratia grimesii</i> DSM 30063	NR_025340.1
VRBDA	27-40	<i>Comamonas koreensis</i>	100%	<i>Comamonas koreensis</i> M0412	KF924214.1
VRBDA	27-41	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	99%	<i>Acinetobacter guillouiae</i> V8	KF749283.1
VRBDA	27-42	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DN-S01	KU899097.1
VRBDA	27-43	<i>Serratia proteamaculans</i>	100%	<i>Serratia proteamaculans</i> B99	KJ781963.1
VRBDA	27-44	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	99%	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> B0sh53	MK737124.1
VRBDA	27-45	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	100%	<i>Pseudomonas azotoformans</i> ChDrAdgB60	KU143978.1
VRBDA	27-46	<i>Pseudomonas marginalis</i>	100%	<i>Pseudomonas marginalis</i> D3	KT767833.1

转下页

接上页

VRBDA	27-48	<i>Serratia liquefaciens</i>	99%	<i>Serratia liquefaciens</i> V4	HQ335001.1
VRBDA	27-49	<i>Rahnella aquatilis</i>	100%	<i>Rahnella aquatilis</i> 5-2	JX867757.1
VRBDA	27-50	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> F38	KT767885.1
VRBDA	27-51	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> F38	KT767885.1
VRBDA	27-52	<i>Serratia proteamaculans</i>	99%	<i>Serratia proteamaculans</i> B99	KJ781963.1
VRBDA	27-53	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5451	AB685660.1
VRBDA	27-54	<i>Rahnella aquatilis</i>	99%	<i>Rahnella aquatilis</i> PW89	JF494811.1

表 4 冷冻鸡爪中的分离菌株

Table 4 The isolates in frozen chicken feet

培养基类别	分离株	比对结果	同源率	参考菌株编号	参考菌株登录号
PCA	30-1	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5420	AB685632.1
PCA	30-2	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> MC16	KT443784.1
PCA	30-3	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	<i>Pseudomonas</i> sp. L10.10	KX714290.2
PCA	30-4	<i>Pseudomonas fragi</i>	99%	<i>Pseudomonas fragi</i> MC16	KT443784.1
PCA	30-6	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5420	AB685632.1
PCA	30-7	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	100%	<i>Brochothrix thermosphacta</i> B13	KT767854.1
PCA	30-8	<i>Pseudomonas fragi</i>	99%	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5425	AB685636.1
PCA	30-9	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5420	AB685632.1
PCA	30-10	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> ICE258	KX588591.1
PCA	30-11	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> MC16	KT443784.1
PCA	30-12	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	<i>Pseudomonas</i> sp. CIFTRT176	KF379758.1
PCA	30-13	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> MC16	KT443784.1
PCA	30-14	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> MC16	KT443784.1
PCA	30-15	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5420	AB685632.1
CFC	30-16	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%	<i>Pseudomonas</i> sp. A4R1.12	KX714292.1
CFC	30-17	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%	<i>Pseudomonas</i> sp. 2-18	KX378924.1
CFC	30-18	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5420	AB685632.1
CFC	30-19	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	100%	<i>Brochothrix thermosphacta</i> KSN1	KC346293.1
CFC	30-20	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> T1	KJ909019.1
CFC	30-21	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5420	AB685632.1
CFC	30-22	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> F25	KT767873.1
CFC	30-23	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5437	AB685648.1
VRBDA	30-24	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5420	AB685632.1
VRBDA	30-25	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5420	AB685632.1
VRBDA	30-26	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5420	AB685632.1
VRBDA	30-27	<i>Pseudomonas fragi</i>	99%	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5420	AB685632.1
VRBDA	30-28	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> MC16	KT443784.1
VRBDA	30-29	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5420	AB685632.1
VRBDA	30-30	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> JCM 5420	AB685632.1
VRBDA	30-31	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	<i>Pseudomonas fragi</i> T1	KJ909019.1

在已鉴定的 100 株细菌中, 来源于 PCA、CFC 和 VRBDA 平板的分别为 56 株、18 株和 26 株。由堆积百分比柱形图 2a 可知, PCA 平板上分出的菌株种类最丰富。假单胞菌、嗜冷杆菌和沙雷氏菌占到了较大

的比重。而 CFC 平板上含有 78% 的假单胞菌, 这是由假单胞菌属的优势性和 CFC 培养基的选择性共同造成的。VRBDA 平板上虽然仍然是假单胞菌占据优势, 但是依然分离到了一些肠杆菌科的细菌, 如沙雷氏菌,

拉恩氏菌等。

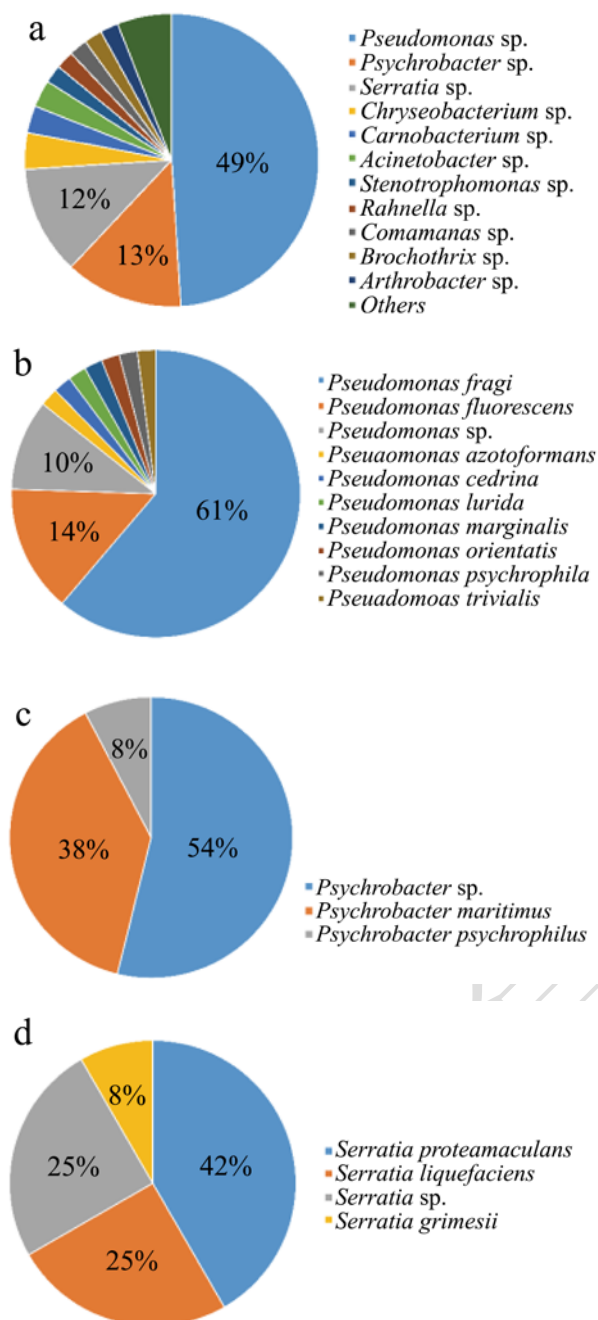


图 1 冷冻鸡肉中分离株的分布

Fig.1 The distribution of isolates in frozen chicken samples

注：a：整体种属分布；b：假单胞菌属分布；c：嗜冷杆菌属分布；d：沙雷氏菌属分布。

如图 2b，三种冷冻鸡肉样品都有各自的优势菌属。在鸡翅样品中，假单胞菌(33%)和沙雷氏菌(25%)含量较多。除此之外，还含有多种其他菌属。冷冻鸡翅中的耐冷细菌种类更丰富，物种多样性更明显。而在鸡腿样品中，分离到大量的嗜冷杆菌(59%)，还有部分假单胞菌(23%)。在鸡爪样品中，只分离出假单胞菌(93%)和热杀索丝菌。结合表 4，我们发现，鸡爪样品中的假单胞菌几乎都属于莓实假单胞菌(*P.*

*fragi*)。而由表 1 可知，冷冻鸡爪的微生物污染最严重，因此我们可以断定莓实假单胞菌的大量繁殖造成了鸡爪在低温下的污染。这一结论与之前的研究报道较相似。在之前的报道中<sup>[8]</sup>，研究者对鸡肉样品(包括整鸡肉和鸡胸肉)中的耐冷菌进行分析，得出从所有鸡肉样品中共分离得到 118 株耐冷细菌，其中假单胞菌属为优势细菌属，占到 58.48%；进一步对鸡胸肉和整鸡肉分别进行分析，可知除了假单胞菌属，沙雷氏菌属和不动杆菌属还分别在鸡胸肉和整鸡肉中占据优势。

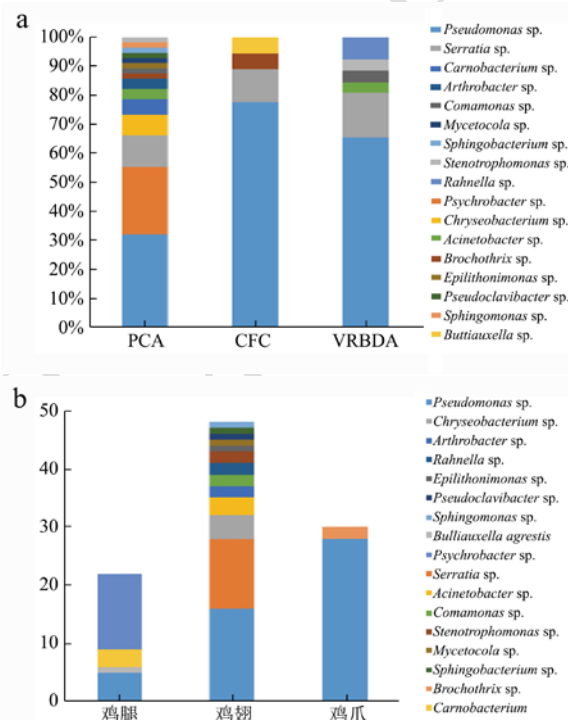


图 2 (a) 不同培养基上的菌株分布；(b) 不同样品中的菌株分布情况

Fig.2 (a) Distribution of isolates on three media; (b) Distribution of isolates of different sample

### 2.3 *Pseudomonas. fragi* 30-1 的系统发育分析及生长特性

经过系统的分析可知，假单胞菌属，尤其是莓实假单胞菌是冷冻鸡肉低温下微生物污染的重要来源。而冷冻鸡爪是污染最严重的样品。因此，从冷冻鸡爪的分离菌株中选择了一株比率为 100% 的莓实假单胞菌 30-1 (*P. fragi* 30-1)，对其进行进一步的研究。

运用邻近法 (Neighbor-Joining Tree) 构建系统发育树，将冷冻鸡爪的分离菌株与参比菌株按亲缘关系进行排列，分析分离菌株的系统发育地位。由图 3 可知，热杀索丝菌 (*Brochothrix thermosphacta*) 优先聚为一类，除 30-16 之外，其余的假单胞菌属



(*Pseudomonas*) 也聚在了一起, 说明同属的菌株之间的亲缘关系非常接近。

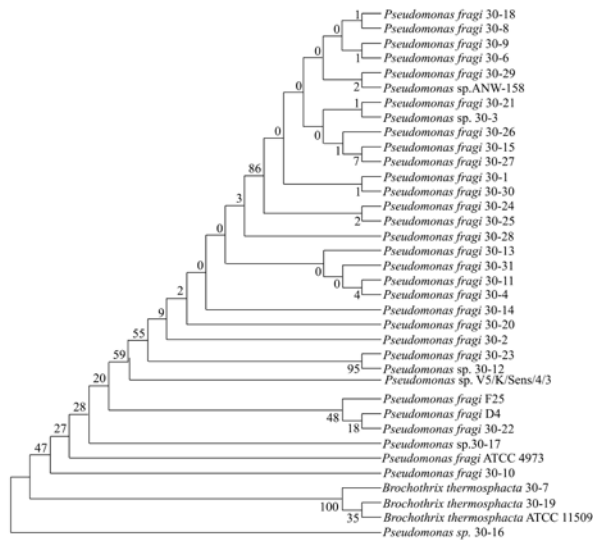


图3 冷冻鸡爪中耐冷菌 16S rRNA 序列系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of 16S rRNA sequences of cold resistant bacteria from frozen chicken feet

图4显示了 *P. fragi* 30-1 在不同条件下的生长情况。从图4a和图4b均可以看出, *P. fragi* 30-1 在生长24 h后, OD值还处于较低水平, 而培养36 h和48 h后的OD值则达到1.0左右, 生长基本稳定。这说明在15 °C, 该菌株生长36 h之后可以达到稳定期。由图4a可得, *P. fragi* 30-1 可以耐受一定的盐浓度, 在NaCl浓度大于2.5% (W/V) 时, 高盐提供的渗透压对菌株的生长产生了明显的抑制作用。pH也是影响菌株生长的重要因素。在pH<4时, 菌株生长完全停滞(图4b)。pH 6~8的中性环境为 *P. fragi* 30-1 生长的最适宜范围。之前的报道也显示了被假单胞菌污染的食品的pH在6~8之间<sup>[16]</sup>, 这与本研究相一致。而在温度敏感性的试验中(图4c), 我们看到37 °C时, 该菌株的生长明显被抑制; 42 °C下, 菌株完全不生长。在15 °C~28 °C范围内, 菌株生长最快, 这也是最适合该菌生长的温度条件。在4 °C的低温环境中, *P. fragi* 30-1 生长良好, 只是与适宜温度相比, 产生了生长的迟滞期<sup>[18]</sup>, 在本研究中表现为24 h时的低OD值。

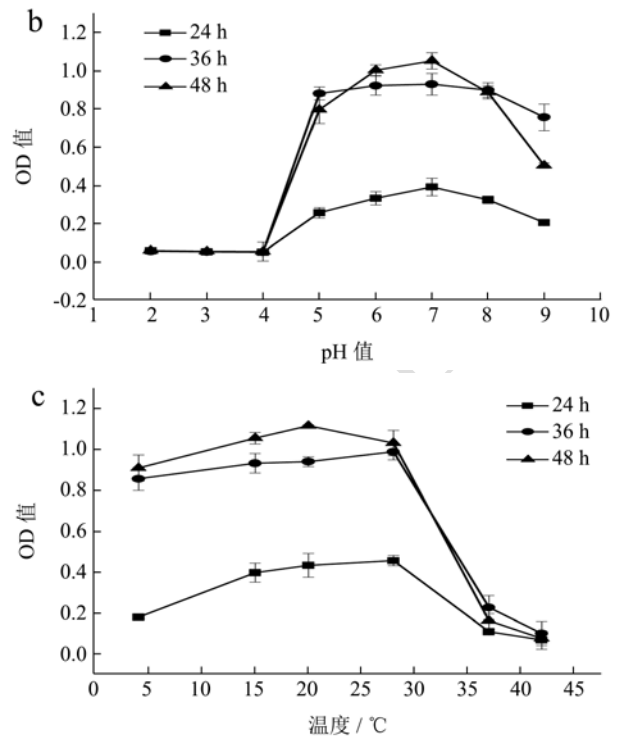
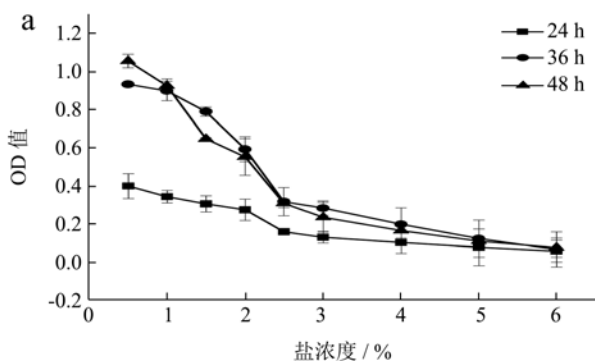


图4 莓实假单胞菌 30-1 的生长特性

Fig.4 The growth characteristics of *P. fragi* 30-1

## 2.4 体外抑菌评价

以莓实假单胞菌 30-1 (*P. fragi* 30-1) 作为代表, 用4种物质对其进行体外抑菌。从照片中能很明显的看到透明抑菌圈的存在(图5)。

如图6可以明显的看出, 氯霉素、罗红霉素和茶多酚的抑菌效果呈现出高度的浓度依赖性(甲醇溶剂没有抑菌作用, 未显示)。氯霉素对 *P. fragi* 30-1 的抑菌效果最好, 其最小抑菌浓度(MIC)为0.31 mg/mL。而罗红霉素和茶多酚对 *P. fragi* 30-1 的MIC均为0.62 mg/mL。氯霉素和罗红霉素都属于抗生素类药物, 它们对细菌有很强的杀灭能力。然而长期使用抗生素会使细菌的抗性越来越强, 导致耐药菌株的产生<sup>[21,22]</sup>。茶多酚可以有效的抑杀细菌, 对细菌细胞膜造成损伤<sup>[23]</sup>。本研究中, 茶多酚产生的抑菌效果与罗红霉素相同, 因此它有望成为一种很有潜力的抗菌剂。壳聚糖是一种天然无毒、广谱抗菌的高分子材料, 具有良好的生物降解性和生物相容性, 已广泛应用于医药和食品领域<sup>[24,25]</sup>。壳聚糖也被报道对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌都有很好的抑菌效果<sup>[26]</sup>。如图6, 2%乙酸呈现出较强的抑菌能力, 壳聚糖产生的透明圈与对照组的2%乙酸无异, 并且不受浓度的影响。我们推测这种抑菌圈的产生主要是由乙酸溶剂对 *P. fragi* 30-1 的抑制作用引起的。乙酸被报道具有抑菌潜力, 可以抑制多重耐药的沙门氏菌<sup>[27]</sup>。结合2.3部分, *P. fragi* 30-1



在低 pH 下不生长, 因此极有可能是乙酸提供的酸性环境, 抑制了 *P. fragi* 30-1 的生长繁殖。

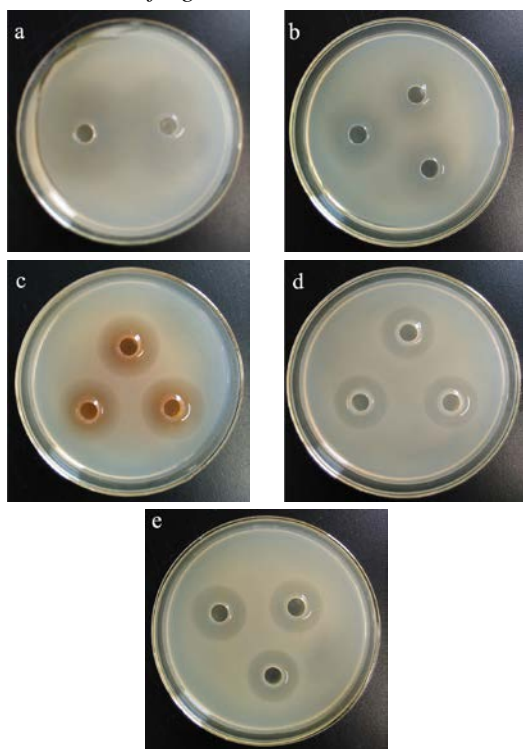


图5 不同抑菌物质对莓实假单胞菌 30-1 的抑菌圈结果 (10 mg/mL)

Fig.5 Photos of inhibition zones of different antibacterial agents on *P. fragi* 30-1 (10 mg/mL)

注: a: 氯霉素; b: 罗红霉素; c: 茶多酚; d: 壳聚糖;

e: 2%乙酸

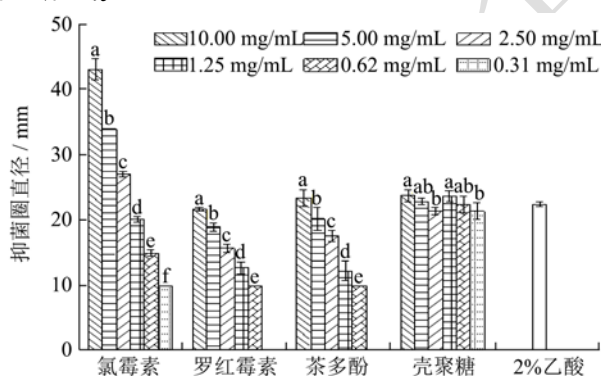


图6 抑菌物质对莓实假单胞菌 30-1 的抑菌效果 ( $p < 0.05$ )

Fig.6 Bacteriostatic effects of antibacterial agents on *P. fragi* 30-1 ( $p < 0.05$ )

### 3 结论

3.1 本研究评价了冷冻鸡肉中的微生物污染程度, 系统分析不同鸡肉样品中耐冷细菌的多样性。同时对优势污染菌 (莓实假单胞菌) 进行体外抑菌研究表明冷冻鸡腿、冷冻鸡翅和冷冻鸡爪中都存在着微生物污染。不同的鸡肉样品中的微生物污染状况不同, 其中冷冻

鸡爪的污染最严重。

3.2 在冷冻鸡肉中共分离出 100 株耐冷细菌。假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)、嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter* sp.) 和沙雷氏菌属 (*Serratia* sp.) 为冷冻鸡肉中微生物污染的主要来源, 尤其是莓实假单胞菌 (*P. fragi*), 更是引起污染的优势菌种。

3.3 莓实假单胞菌 30-1 (*P. fragi* 30-1) 可以耐受一定的盐浓度, 适宜在中性环境中生存, 并且具有很好的耐冷性。

3.4 由体外抑菌试验可得, 氯霉素对 *P. fragi* 30-1 的最小抑菌浓度 (MIC) 为 0.31 mg/mL, 罗红霉素和茶多酚对 *P. fragi* 30-1 的 MIC 均为 0.62 mg/mL。2% 乙酸对 *P. fragi* 30-1 也有很好的抑制作用。

### 参考文献

- [1] Lin H, Shavezipur M, Yousef A, et al. Prediction of growth of *Pseudomonas fluorescens* in milk during storage under fluctuating temperature [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(3): 1822-1830
- [2] Russell N J, Harrison P, Johnston I A, et al. Cold adaptation of microorganisms: discussion [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 1990, 326(1237): 595-611
- [3] Wang G, Wang H, Han Y, et al. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken in vitro and in situ [J]. Food Microbiology, 2017, 63: 139-146
- [4] Nowak A, Rygala A, Oltuzak-Walczak E, et al. The prevalence and some metabolic traits of *Brochothrix thermosphacta* in meat and meat products packaged in different ways [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(6): 1304-1310
- [5] Wang G, Ma F, Zeng L, et al. Modified atmosphere packaging decreased *Pseudomonas fragi* cell metabolism and extracellular proteolytic activities on meat [J]. Food Microbiology, 2018, 76: 443-449
- [6] Sundheim G, Sletten A, Dainty R H. Identification of pseudomonads from fresh and chill-stored chicken carcasses [J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 39(3): 185-194
- [7] Morales P A, Aguirre J S, Troncoso M R, et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas* spp. present in spoiled poultry fillets sold in retail settings [J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 73: 609-614
- [8] Lee H S, Kwon M, Heo S, et al. Characterization of the biodiversity of the spoilage microbiota in chicken meat using

- next generation sequencing and culture dependent approach [J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2017, 37(4): 535-541
- [9] Franzetti L, Scarpellini M. Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods [J]. Annals of Microbiology, 2007, 57(1): 39-47
- [10] Schuepp C, Kermasha S, Michalski M, et al. Production, partial purification and characterisation of lipases from *Pseudomonas fragi* CRDA 037 [J]. Process Biochemistry, 1997, 32(3): 225-232
- [11] Ercolini D, Casaburi A, Nasi A, et al. Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 142(1-2): 120-131
- [12] Meredith H, Valdramidis V, Rotabakk B T, et al. Effect of different modified atmospheric packaging (MAP) gaseous combinations on *Campylobacter* and the shelf-life of chilled poultry fillets [J]. Food Microbiology, 2014, 44: 196-203
- [13] Chaillou S, Chaulot-Talmon A, Caekebeke H, et al. Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage [J]. The ISME Journal, 2015, 9(5): 1105-1118
- [14] Rawat S. Food Spoilage: Microorganisms and their prevention [J]. Asian Journal of Plant Science and Research, 2015, 4(5): 47-56
- [15] Zhang J, Yue T, Yuan Y. *Alicyclobacillus* contamination in the production line of kiwi products in China [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e67704
- [16] Braun P, Sutherland J P. Predictive modelling of growth and enzyme production and activity by a cocktail of *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens* and *Acinetobacter* sp. [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 86(3): 271-282
- [17] Zhang Y, Wei J, Yuan Y, et al. Bactericidal effect of cold plasma on microbiota of commercial fish balls [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2019, 52: 394-405
- [18] Zhang Y, Wei J, Yuan Y, et al. Diversity and characterization of spoilage-associated psychrotrophs in food in cold chain [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 290: 86-95
- [19] Jung B K, Khan A R, Hong S, et al. Quorum sensing activity of the plant growth-promoting rhizobacterium *Serratia glossinae* GS2 isolated from the sesame (*Sesamum indicum* L.) rhizosphere [J]. Annals of Microbiology, 2017, 67(9): 623-632
- [20] Nychas G E, Skandamis P N, Tassou C C, et al. Meat spoilage during distribution [J]. Meat Science, 2008, 78(1-2): 77-89
- [21] Zhang J, Sun Y, Wang Y, et al. Non-antibiotic agent ginsenoside 20(S)-Rh2 enhanced the antibacterial effects of ciprofloxacin *in vitro* and *in vivo* as a potential NorA inhibitor [J]. European Journal of Pharmacology, 2014, 740: 277-284
- [22] Chen H, Ye Z, Sun L, et al. Synthesis of chitosan-based micelles for pH responsive drug release and antibacterial application [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 189: 65-71
- [23] Yi S, Zhu J, Fu L, et al. Tea polyphenols inhibit *Pseudomonas aeruginosa* through damage to the cell membrane [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 144(1): 111-117
- [24] Liu Y, Jiang Y, Zhu J, et al. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation of sulfonated chitosan against *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 206: 412-419
- [25] Escárcega-Galaz A A, Sánchez-Machado D I, López-Cervantes J, et al. Mechanical, structural and physical aspects of chitosan-based films as antimicrobial dressings [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 116: 472-481
- [26] No H K, Park N Y, Lee S H, et al. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 74(1-2): 65-72
- [27] Gutiérrez Alcántara E J, Rangel Vargas E, Gómez Aldapa C A, et al. Antibacterial effect of roselle extracts (*Hibiscus sabdariffa*), sodium hypochlorite and acetic acid against multidrug - resistant *Salmonella* strains isolated from tomatoes [J]. Letters in Applied Microbiology, 2016, 62(2): 177-184