

培养和非培养法分析冷藏鸡肉胴体中的 细菌多样性

杨虎¹ 向文良² 张弛¹ 孙焯琨¹ 王璐³ 黄敏⁴ 孙群^{1*}

- (1. 四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室 四川 成都 610064)
(2. 西华大学生物工程学院 四川 成都 610039)
(3. 四川师范大学生命科学学院 四川 成都 610068)
(4. 四川省原子能研究院 四川 成都 610066)

摘要: 运用纯培养和非培养法对冷藏鸡肉胴体上细菌多样性进行了对比研究。采用培养法从鸡肉胴体中初步分离到 45 株细菌菌株, 16S rDNA-ARDRA 分析得到 9 株代表性细菌, 其 16S rDNA 序列系统发育分析表明, 这些菌株隶属于 *Bacillus* sp.、*Shigella* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Citrobacter* sp.、*Klebsiella* sp. 和 *Escherichia* sp. 6 个属。16S rDNA-ARDRA 联合 PAGE 和 16S rDNA 全序列分析的非培养法结果表明, 冷藏鸡肉中细菌主要属于 *Acinetobacter* sp.、*Bacillus* sp.、*Acidovorax* sp.、*Brochothrix thermosphacta*、*Lactococcus garvieae* 和 *Leuconostoc lactis* 等 16 个属。非培养法揭示的细菌多样性比培养法丰富, 但二者结合使用能让肉品中微生物多样性得到更全面的展示。

关键词: 冷藏鸡肉, 细菌, 多样性, 16S rDNA-ARDRA

Bacterial Diversity in Chilled Chicken by 16S rDNA-ARDRA and Culture Dependent Approach

YANG Hu¹ XIANG Wen-Liang² ZHANG Chi¹ SUN Ye-Kun¹ WANG Lu³
HUANG Min⁴ SUN Qun^{1*}

- (1. Key Laboratory of Bio-resource and Bio-environment, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)
(2. College of Bioengineering, Xihua University, Chengdu, Sichuan 610039, China)
(3. College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu, Sichuan 610068, China)
(4. Sichuan Institute of Atomic Energy, Chengdu, Sichuan 610066, China)

Abstract: Bacterial diversity of chilled chicken was investigated by culture independent and dependent approach. A total of 45 colonies were recovered from the plate culture of chilled chicken based on morphological characteristics and further identified as 6 genera, including *Bacillus* sp., *Shigella* sp., *Pseudomonas* sp., *Citrobacter* sp., *Klebsiella* sp. and *Escherichia* sp., according to their 16S rDNA sequences. Direct 16S rDNA-ARDRA coupled with sequences analysis of DNA extracted from chilled

meat showed that the bacteria could be assigned to 16 genera of *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Acidovorax* sp., *Brochothrix thermosphacta*, *Lactococcus garvieae* and *Leuconostoc lactis* etc. Compared to culture dependent method, culture independent approach disclosed a more diversified bacterial community in chilled chicken, but culture dependent one was still a necessary supplement by showing unique species when molecular analysis was used to investigate microbial diversity.

Keywords: Chilled chicken, Bacteria, Diversity, 16S rDNA-ARDRA

鸡肉由于富含蛋白质、不饱和脂肪酸、口感细腻、脂肪含量低等优点越来越受到消费者的青睐,冷藏鸡肉又是新鲜鸡肉生产加工的必然趋势。然而肉类在加工、运输和储藏过程中极易受到微生物及储藏条件的影响而腐败变质,因此全面分析鸡肉中微生物群落结构具有极大的经济和社会价值。

近年来,以 PCR 技术介导的非培养分子标记方法正逐步应用于食品微生物,尤其是肉品微生物群落结构和遗传多样性的分析。国外已有不少关于冷藏肉微生物区系和主要致腐菌的研究^[1-2],国内这方面的研究多集中于冷藏牛肉、猪肉及各种水产品(鱼、虾、贝等),李苗云等^[3]运用 PCR-DGGE 技术研究发现冷藏猪肉中主要微生物菌群是假单胞菌、热杀索丝菌和乳酸菌;罗欣等^[4]则报道冷藏牛肉中假单胞菌为优势菌种,并不同程度存在乳酸菌和酵母菌等;李柏林等^[5]认为市售冷却牛肉中主要优势细菌为希瓦氏菌属;阿依夏木·克尤木等^[6]运用传统培养方法从海产品中获多种副溶血性弧菌等;也有研究在冷藏水产品中发现各种气单胞菌^[7]。但有关冷藏鸡肉中微生物群落的研究甚少,尤其是从分子水平上揭示其微生物区系的研究还未见报道。

本文利用培养法和非培养法比较研究冷藏鸡肉胴体中微生物群落区系,将为肉类生产、加工、储藏、运输中相关设备的开发和群体效应的研究提供一定的理论参考。

1 材料与方 法

1.1 鸡肉样品

于成都近郊某肉类厂无菌操作采取冷藏(-20°C) 60 d 的鸡肉,标记后迅速送回实验室,置于-20°C 冰箱中保存备用。

1.2 冷藏鸡肉中细菌的分离和鉴定

无菌条件下,室温解冻后称取 25 g 鸡肉,浸于 225 mL 0.1%灭菌蛋白胨水中,于摇床上 180 r/min 振摇 30 min,制成 1:10 菌悬液,10 倍递增稀释 4-5

个梯度。取 1 mL 菌悬液涂布在 PCA 平板上 30°C 培养 48-72 h,根据菌落形态(颜色、大小等)挑取代表性菌落并划线纯化。分离菌株的鉴定采用 1.6 和 1.7。

1.3 宏基因组 DNA 提取

室温解冻后称取 25 g 鸡肉,浸于 225 mL 0.1% 灭菌蛋白胨水中,于摇床上 180 r/min 振摇 30 min,制成 1:10 细菌悬液。采用改良的 CTAB 法^[8]提取宏基因组 DNA。

1.4 16S rDNA 扩增

以纯化的基因组 DNA 为模板,选用细菌 16S rDNA 通用引物 Eu27F (5'-GAGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3')和 1492R (5'-CTACGGCTACCTG TTACGA-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 50 μ L: 10 \times buffer 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, Taq DNA 聚合酶 1 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, ddH₂O 30 μ L, 模板 DNA 5 μ L。PCR 反应程序: 94°C 5 min; 94°C 60 s, 50°C 60 s, 72°C 90 s, 30 个循环; 72°C 10 min。扩增产物用 1%琼脂糖电泳检测并用胶回收试剂盒纯化。

1.5 16S rDNA 文库构建

纯化的 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接,转入感受态细胞 *Escherichia coli* DH5 α , 在含有氨苄青霉素的抗性平板上培养、挑取阳性克隆。用 M13F 和 M13R 引物进行菌落 PCR 扩增反应,并用琼脂糖电泳检测阳性克隆。

1.6 扩增 rDNA 限制性分析(ARDRA)

从文库中挑取 71 个阳性克隆,通过菌落 PCR 获得 16S rDNA 片段,用 *Afa* I 和 *Msp* I 对 16S rDNA 进行同步双酶切。酶切体系 20 μ L: *Afa* I 和 *Msp* I 各 1 μ L, 10 \times T buffer 2 μ L, 8 μ L PCR 产物, 2 μ L 0.1% BSA, 6 μ L ddH₂O。37°C 酶切 4 h 后加 2 μ L 10 \times Loading buffer 终止反应。酶切产物用 5%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测并将得到的电泳图谱用 NTSYS-PC2.10e 软件进行 UPGMA 聚类分析。文库中细菌群落的丰富度指数(d_{Ma})、Shannon-Wiener 指

数(H')、Simpson 指数(D)、均匀度指数(E)按下式计算^[9-10]:

$$H' = -\sum_{i=1}^s P_i \ln P_i, P_i = \frac{n_i}{N}$$

$$D = 1 - \sum_{i=1}^s P_i^2$$

$$d_{Ma} = \frac{S-1}{\ln N}$$

$$E = \frac{H'}{\ln S}$$

公式中: S 为 16S rDNA 的 ARDRA 总类型数; P_i 为第 i 种 ARDRA 条带类型出现的频率; N 为克隆总数。

1.7 16S rDNA 全序列分析

选取代表性克隆子送至上海英骏生物技术有限公司测序。将测序获得的 16S rDNA 序列提交 GenBank 进行 BLAST 相似序列检索, 用 ClustalX

1.83 软件进行比对; 再用 MEGA 4.1 软件包构建进化树。利用其中的 Kimura-2-Parameter Distance 模型计算进化距离, 用 Neighbor-joining 法构建系统发育树。经重复计算 1000 次, 进行 Bootstrap 值分析。

2 结果与分析

2.1 培养法分析冷藏鸡肉中细菌多样性

从冷藏鸡肉中分离的 45 株细菌通过 *Afa* I 和 *Msp* I 双酶切共分成 9 个 OTUs (数据未显示)。将代表这 9 个类群的菌株 CH-2、CH-3、CH-7、CH-8、CH-12、CH-15、CH-17、CH-18、CH-29 的 16S rDNA 测序并构建系统发育树(图 1)。分离的细菌隶属 *Escherichia* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Citrobacter* sp.、*Klebsiella* sp.、*Shigella* sp. 和 *Bacillus* sp. 6 个属。CH-2、CH-3、CH-7 等 9 个菌株分别与其相应的标准菌株相似性均在 99% 或更高。

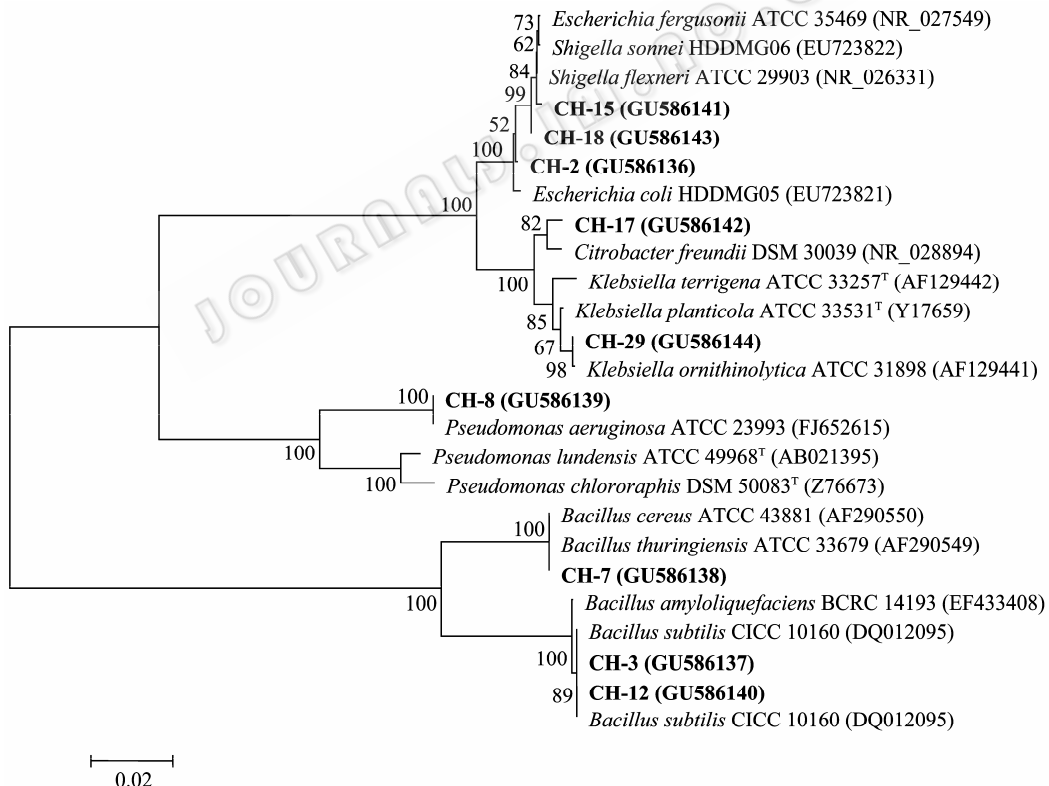


图 1 基于 16S rDNA 序列同源性的 9 株细菌系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the 9 strains based on 16S rDNA sequences

Note: The tree was evaluated by bootstrap analysis of the neighbor-joining method based on 1000 replications. Sequences from the study are in boldface type. The numbers in parentheses are accession numbers of sequences in GenBank. Value of 1000 bootstrap resamplings that supported the branching orders in each analysis is shown above or near the relevant nodes. Bar: 0.02 sequence divergence.

2.2 ARDRA 分析

利用氨苄青霉素和蓝白斑双重筛选系统构建鸡肉中细菌 16S rDNA 文库。从文库中随机挑取部分克隆子进行菌落 PCR 以检测目的片段的插入情况。结果表明：文库中克隆子的扩增片段大小在 1500 bp 左右(数据未显示)。文库 16S rDNA 扩增子的 *Afa* I 和 *Msp* I 同步双酶切片段大小主要在 100 bp 和 800 bp 之间，每个扩增子的酶切位点主要有 4-8 个不等(图 2)。

群落物种多样性是丰富度、多样性、均匀度等多个方面的综合度量，进行多样性分析需将各个多样性测度指标进行全面考虑。文库细菌群落丰富度指数、香-威指数、辛普森指数、均匀度指数分别为 16.19、4.15、0.98、0.98。

2.3 基于 16S rDNA 指纹图谱聚类分析

根据 PAGE 指纹图谱，分别构建 0/1 矩阵，对阳性克隆子进行 UPGMA 聚类分析，其聚类图如图 3 所示(文库中相同的克隆子没有重复分析)。从聚类图可以看出，文库明显的分为 2 个大类，它们之间的相似性指数为 0.80。

2.4 非培养法中克隆子的 16S rDNA 全序列分析

根据电泳、聚类图选取 19 个阳性克隆子用于 16S rDNA 全序列分析。16S rDNA 序列分析不能很准确地鉴定到种，但序列相似性在 95% 或更高时能准确鉴定到属。除文库中第 27、58 号克隆子外，其他克隆子序列相似性均大于 97% (表 1)。阳性克隆子在 95% 相似性水平上被鉴定为 *Acinetobacter* sp.、*Bacillus* sp.、*Brochothrix thermosphacta*、*Lactococcus garvieae* 和 *Leuconostoc lactis* 等 16 个属。

表 1 文库中部分阳性克隆子的 16S rDNA 序列分析
Table 1 16S rDNA sequence analysis of partial positive clones from library

Clone No.	Accession No.	Closest relatives (Accession No.)	Similarity (%)
4	GQ464372	<i>Methylophilus methylotrophus</i> (L15475)	98
10	GQ464373	<i>Methylostrum kenyense</i> (EU006088)	98
11	GQ464374	<i>Rahnella</i> sp. (U88435)	99
13	GQ464375	<i>Acidovorax</i> sp. (AM084010)	99
24	GQ464376	<i>Methylophilus leisingeri</i> (AB193725)	98
25	GQ464377	<i>Xanthomonas</i> sp. (FJ600362)	99
27	GQ464378	<i>Acinetobacter xiamenensis</i> (EF030545)	96
28	GQ464379	<i>Bacillus</i> sp. (DQ337594)	99
32	GQ464380	<i>Leuconostoc lactis</i> (AJ970316)	99
37	GQ464381	Uncultured <i>proteobacterium</i> (EU029471)	99
40	GQ464382	<i>Acinetobacter</i> sp. (EF468657)	99
49	GQ464383	<i>Psychrobacter</i> sp. (FJ463826)	99
50	GQ464384	<i>Methylobacillus flagellatus</i> (DQ287787)	97
55	GQ464385	<i>Halobacillus blutaparonsis</i> (DQ058358)	98
58	GQ464386	<i>Rheinheimera texasensis</i> (AY701891)	96
68	GQ464387	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (AB099655)	99
72	GQ464388	<i>Brochothrix thermosphacta</i> (M58798)	99
73	GQ464389	<i>Lactococcus garvieae</i> (AY699289)	99
82	GQ464390	Halophilic bacterium (EU124358)	99

29 28 27 26 25 24 23 22 20 19 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 3 1 M bp

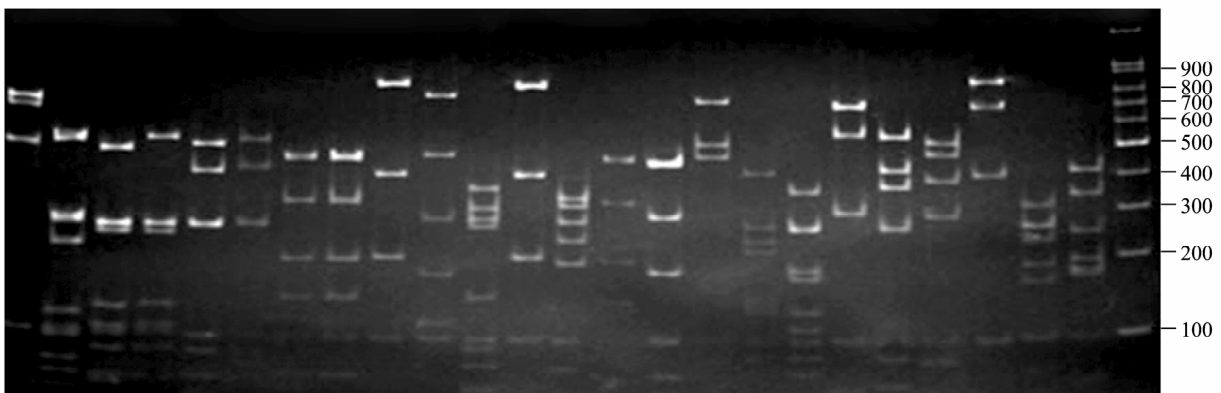


图 2 文库中部分克隆子酶切的 PAGE 指纹图谱

Fig. 2 PAGE fingerprint profiles of enzyme digestion of some clones from library

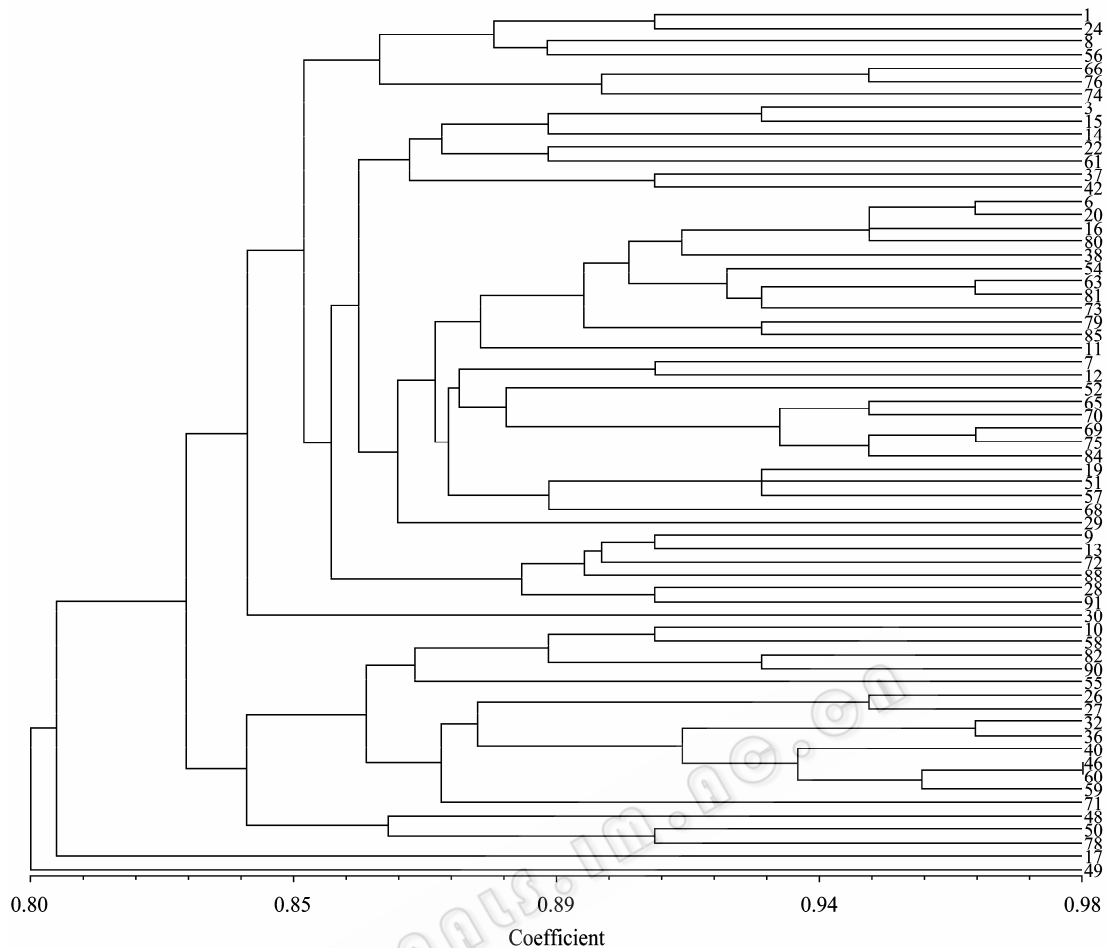


图3 文库中部分阳性克隆的16S rDNA-PCR指纹图谱的NTSYS聚类图

Fig. 3 NTSYS dendrogram based on 16S rDNA-PCR patterns of partial positive clones of library

3 讨论

由于富含营养,多种腐败、致病微生物适宜在肉及肉制品上生长繁殖而表现出很高的多样性。研究表明,*Brochothrix thermosphacta*、Lactic acid bacteria、*Pseudomonas* sp.、*Bacillus* sp.、*Carnobacterium* sp.、*Acinetobacter* sp.和 Enterobacteriaceae 的某些属种等能在新鲜或冷藏肉制品中生长繁殖而导致肉制品腐败变质^[11-12]。非培养法结果显示,*Acinetobacter* sp.、*Bacillus* sp.、*Psychrobacter* sp.、*Leuconostoc lactis*、*Brochothrix thermosphacta* 和 *Lactococcus garvieae* 存在于冷藏鸡肉中,这与前人研究是一致的。本研究中检测到其他属的细菌如 *Xanthomonas* sp.和 *Rahnella* sp.等在肉制品未曾发现或报道很少,这可能是由于冷藏肉品细菌初始污染、运输、储藏过程中污染不同所致。

运用国内外检测标准中常用的 PCA 培养基分离出 45 株细菌,经鉴定为 *Shigella* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Citrobacter* sp.、*Klebsiella* sp.和 *Escherichia* sp. 等不同的属。*Shigella* sp.、*Escherichia* sp.、*Citrobacter* sp.、*Escherichia* sp.等属于肠杆菌科,这类微生物经常在肉品中检出。Patsias^[13]、Linton^[14]等人利用选择性培养基(VRBGA、SSTAC、CFCA)从鸡肉中分离出 Enterobacteriaceae、*Brochothrix thermosphacta* 和 *Pseudomonas* sp.等细菌。本文分离的菌株主要根据其菌落形态、大小、颜色等显著差别筛选,不完全排除筛选出同一属,甚至同一种,如 CH-3、CH-7 和 CH-12 通过 16S rDNA 全序列分析鉴定为 *Bacillus* sp.,通过表型和 ARDRA 图谱分析发现存在差异。这可能与细菌存在的环境有关,或者他们在其他基因水平(16S-23S/ISR、*gyrA*、*gyrB* gene)已经出现分化。

培养法和非培养法检测同一种冷藏鸡肉样品, 得到不完全一致的结果。可能因为本文选用的 PCA 培养基只能满足对营养要求简单的极少数细菌的生长, 对营养要求复杂、培养基偏好性、生长极其缓慢、VBNC^[15]的细菌来说很难成功富集。此外, 本实验的培养条件(37°C, 48-72 h, 非厌氧)、微生物竞争、噬菌体影响和微生物亚致死损伤程度等限制, 势必忽略厌氧、嗜冷、难培养菌等微生物。

在我室同时进行的利用近自然培养法检测鸡肉中污染细菌的研究中, *Enterococcus faecalis*、*Rothia mucllaginosa* 等细菌被检出(数据待发表)。实验结果的差异表明, 非培养法和培养法应结合起来才能全面反映鸡肉中的微生物区系。

参 考 文 献

- [1] Gill CO. Extending the storage life of meats. *Meat Science*, 1996, **43**(1): 99-109.
- [2] Gill CO, Badoni M, Jones T. Hygienic effects of trimming and washing operations in a beef carcass dressing process. *Journal of Food Protection*, 1996, **59**(66): 666-669.
- [3] Li MY, Zhou GH, Xu XL, *et al.* Changes of bacterial diversity and main flora in chilled pork during storage using PCR-DGGE. *Food Microbiology*, 2006, **23**(7): 607-611.
- [4] 罗欣, 朱燕. 乳酸钠在牛肉冷却肉保鲜中的应用研究. *食品与发酵工业*, 2000, **26**(3): 1-5.
- [5] 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. *微生物学通报*, 2009, **36**(2): 198-204.
- [6] 阿依夏木·克尤木, 骆海朋, 王迪. 北京市市售海产品中副溶血性弧菌的监测. *首都公共卫生*, 2007, **8**(4): 181-182.
- [7] 张建群, 张怡明, 罗学辉, 等. 贝(甲)壳类海产品中气单胞菌的生化鉴定与药敏结果. *中国卫生检验杂志*, 2003, **12**(13): 743-744.
- [8] 程志学, 陈清华, 于远, 等. 适合 AFLP 分析用的节瓜基因组 DNA 提取方法的研究. *分子植物育种*, 2009, **7**(2): 420-424.
- [9] Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA, *et al.* Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, **43**(1): 1-11.
- [10] Pielou EC. Indices of diversity and evenness//*Ecological Diversity*. Pielou EC. Ed. New York: John Wiley & Sons, 1975: 5-18.
- [11] Borch E, Kant-Muermans ML, Blixt Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, **33**(1): 103-120.
- [12] Jay JM, Vilai JP, Hughes ME. Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5°C-7°C. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, **81**(2): 105-111.
- [13] Patsias A, Chouliara I, Badeka A, *et al.* Shelf-life of a chilled precooked chicken product stored in air and under modified atmospheres: microbiological, chemical, sensory attributes. *Food Microbiology*, 2006, **23**(5): 423-429.
- [14] Linton M, McClements MJ, Patterson MF. Changes in the microbiological quality of vacuum-packaged, minced chicken treated with high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2004, **5**(2): 151-159.
- [15] Rowan NJ. Viable but nonculturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 2004, **15**(9): 462-467.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名变更通知

《微生物学通报》目前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名, 造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱, 这大大影响了本刊在国际上的传播, 也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论, 以及主办单位批准, 本刊英文刊名自 2010 年起变更为“Microbiology China”, 请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。

《微生物学通报》编辑部

2009-12-25