文章编号: 1673-1689(2010)03-0426-06

新鲜哈密瓜汁中可培养细菌的分离鉴定及系统发育分析

姜海荣, 倪永清, 宋丽军, 尹琳琳, 江 英, 陈计峦*
(新疆石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832003)

摘 要: 采用稀释平板法从新鲜哈密瓜汁中分离出 48 株可培养细菌, 通过传统的形态特征鉴定, 将其归为 10 个类群。利用细菌通用引物 PCR 扩增 10 个类群代表菌株的 16S rRNA 基因, 并进行序列测定。将获得的序列通过 Blast 在 GenBank 数据库中搜索相关菌株的同源性序列, 采用 Clustal1.81 软件比对, 用 Mega 4.1 软件构建系统发育树。系统发育分析结合表型特征研究表明, 新鲜哈密瓜汁中可培养细菌以芽孢杆菌属为优势微生物类群, 主要为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*, 其次为地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis*、苏云金芽孢杆菌 *Bacillus mojavensis*。此外还有铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*、洋葱伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia cepacia* strain、鲍曼不动杆菌 *Acinetobacter baumannii*, 以及肠球菌属 *Enterococcus* sp、克雷伯氏菌属 *Klebsiella* sp 的菌株。

关键词: 新鲜哈密瓜汁; 可培养细菌; 16S rDNA; 序列分析; 系统发育分析
中图分类号: TQ 920.1 文献标识码: A

Identification and Phylogenesis Analysis of Cultivable Microorganism Isolated from Fresh Hami-Melon Juice

JIANG Hai-rong, NI Yong-qing, SONG Li-jun, YIN Lin-lin,
JIANG Ying, CHEN Ji-luan*
(College of Food Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: Forty-eight strains were isolated from the fresh hami melon juice using the dilution plate method. Those isolated strains divided into ten groups according to the morphological features. Then the 16S rDNA sequences were performed by employing the universal prime bacterial for polymerase chain reaction (PCR) amplification. The alignment search was performed with BLAST and GenBank databases, then compared this sequences using the software of Clastal1.81, the phylogenetic tree was built using Mega 4.1 software. From the phylogenetic tree, it could be concluded that *Bacillus subtilis* is the main cultivated bacteria in the fresh hami melon juice and the following is *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mojavensis*, *Pseudomonas aeruginosa* strain RE7, *Burkholderia cepacia* strain ATCC 21809, *Acinetobacter baumannii*, and *Enterococcus* sp, *Klebsiella* sp.

收稿日期: 2009-09-07
基金项目: 教育部重点项目(207137); 兵团博士基金项目(2007jc11); 国际科技合作项目(2009DFA32160)。
* 通信作者: 陈计峦(1973-), 女, 新疆石河子人, 工学博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事农产品加工与贮藏方面的研究。Email: chenjiluan@163.com。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Key words: fresh hami melon juice, cultivate bacteria, 16S rDNA, sequence analysis, phylogenetic

新疆哈密瓜风味独特、富含多种营养物质,其果汁为金黄色,处于均匀的混合状态,是一种很有市场潜力的果汁。但哈密瓜是热敏性瓜果,采用传统的高温杀菌,将使哈密瓜汁产生不良的蒸煮味,且失去大量营养物质,因此对于热敏性的果蔬汁多采用非热力杀菌模式。研究表明[1],引起果汁腐败变质的因素很多,如微生物、酶类等,但是引起新鲜果汁腐败变质的主要因素是微生物污染。

为了选择合适的杀菌方式,更有效地控制哈密瓜汁中微生物,就必须首先了解哈密瓜汁中的常见微生物的种类、特性和数量分布状况,然后才能有针对性地选择适宜的杀菌方法和杀菌工艺。因此对新鲜哈密瓜汁中的微生物种类进行分离和鉴定,对如何控制新鲜哈密瓜汁中微生物具有非常重要的意义。

果汁中的微生物菌群相对复杂,按照传统的以形态学和生理生化指标为基础的细菌检测和分类方法较为繁琐。目前随着分子生物学的发展,采用 16S rRNA 基因鉴定未知菌更加方便、快捷、高效。因此 16S rRNA 已经成为细菌系统分类研究中最常用也是最有效的分子指标,被广泛地应用于各种微生物的遗传特性和分子差异的研究[2]。作者在研究新鲜哈密瓜汁中的可培养细菌基本生长特性的基础上,采用细菌通用引物对分离菌株的 16S rRNA 基因进行扩增和快速鉴定,以确定哈密瓜汁中微生物类群的多样性,为哈密瓜汁的有效杀菌和贮藏提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试菌种及仪器设备

1.1.1　材料　新疆哈密瓜,品种为伽师瓜 86-1,产于新疆喀什市,其新鲜哈密瓜汁 pH 值为 6.55。

1.1.2　菌种　分离自新鲜哈密瓜汁中的可培养细菌。

1.1.3　仪器设备　SW-CJ-100 型超净工作台,苏净集团安泰公司制造;DNP-9272 型电热恒温培养箱:上海精宏实验设备有限公司制造;SPX-250B-2 型生化培养箱:上海博远实业有限公司制造;TG-512 型 PCR 仪:Barloworld 公司制造;Gel Dox™ XR 170-8170 型凝胶成像系统:Bio-RAD 公司制造。

1.2　培养基

1.2.1　LB 固体培养基:　胰蛋白胨 10 g,酵母膏 5 g,氯化钠 10 g,琼脂 17 g,调 pH 7.0,定容至 1 000 mL,121 ℃高压灭菌 20 min。

1.2.2　营养肉汤培养基(NA)　蛋白胨 10 g,牛肉膏 3 g,氯化钠 5 g,琼脂 17 g,调 pH 7.2,定容至 1 000 mL,121 ℃高压灭菌 20 min。

1.2.3　营养琼脂肉汤培养基(NB)　蛋白胨 10 g,牛肉膏 3 g,氯化钠 5 g,调 pH 7.2,定容至 1 000 mL,121 ℃高压灭菌 20 min。

1.3　细菌的分离、纯化及保存

100 个哈密瓜随机分为 5 组,每组随机选取一个,瓜体表面经过酒精消毒,去皮去瓤,在无菌超净台将哈密瓜切成 1 cm 小块放入无菌培养皿,再用无菌玻板捣碎,静置 10 min,吸取 1 mL 新鲜瓜汁接入 9 mL 无菌生理盐水,即得 10^{-1} 浓度菌悬液,依次类推,分别制取 10^{-2}、10^{-3} 浓度菌悬液。稀释平板法分离哈密瓜汁中可培养细菌。

取菌落数在 30~300 个之间而且菌落之间分离生长较好的平皿,无菌操作挑选不同形态和颜色的菌落,在 NA 培养基上进行平板划线分离,将此平皿置 37 ℃恒温箱内培养 2~4 d,挑取的菌落经 3~5 次的平板划线分离后,如果菌落形态、颜色较一致,则进行革兰氏染色后镜检,经过分离得到的单菌落进行涂片和简单结晶紫染色,在 1 000 倍光学显微镜下观察观察其形态和纯度[3],不纯的菌落用平板稀释法进行纯化,分离纯化后在 4~6 ℃下保存。另一份纯化后的单菌落接入营养肉汤培养培养基,37 ℃摇床培养后加入体积分数 15% 的甘油,于 -80 ℃超低温冰箱中保存。

1.4　革兰氏染色和镜检

取菌种培养物常规涂片,用结晶紫进行染色,再用碘液媒染,然后用乙醇脱色,最后用番红复染。在显微镜下观察个体形态特征,如果发现还有杂菌,则继续进行平板划线分离,直至镜检个体形态特征一致。镜检中细胞保留蓝紫色的细菌为革兰氏阳性菌,细胞为红色的细菌为革兰氏阴性。

1.5　芽孢检测

分离出的菌株分别编号为 s-5-2, B-1, s-4, s-5-1, A-1, AAM-1, AAM-2, S-2, s-3, B-2,接种到 NA 平板上,30 ℃培养 3~7 d,显微镜观察是否有芽孢形成。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1.6 生长温度范围和 **pH** 值范围的测定

分离的菌株编号为 s-5-2, B-1, s-4, s-5-1, A-1, AAM-1, AAM-2, S-2, s-3, B-2。

1.6.1 生长温度范围 为准确测定温度范围[4], 采用下面两个步骤:

1) 粗测: 首先将以上编号的菌悬液以涂布法涂布在 pH 为 7.0 的 NA 培养基平板上, 将平板分别在温度为 20、30、40、50、60、70 ℃条件下恒温培养 48 h 后观察菌落生成情况, 初步确定各菌生长温度范围。

2) 精测: 确定大致范围, 再将以上编号的菌悬液以涂布法涂布在 pH 为 7.2 的 NA 培养基平板上, 使其温度值在粗测的范围内精确到 0.1, 将平板分别在不同的温度下恒温培养 48 h, 观察菌落生成情况, 最终确定各菌生长温度范围。

1.6.2 不同菌生长 pH 值范围的确定

1) 粗测: 分别采用 1% 的稀硫酸, 1% 的氢氧化钠溶液来调整 NA 培养基的 pH 值, 使其 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, 将不同编号菌悬液以涂布法分别涂布在不同 pH 值的 NA 培养基上, 37 ℃下培养 48 h 后观察菌落生成情况, 初步确定耐热菌的生长 pH 值范围。

2) 精测: 经初步确定, 将耐热菌菌悬液以涂布法分别涂布在不同 pH 值的 NA 培养基上, 使其 pH 值在粗测的范围内精确到 0.1, 37 ℃下培养 48 h 后观察菌落生成情况, 最终确定不同菌的生长 pH 值范围。

1.7 细菌菌株的 **16S rDNA** 鉴定

1.7.1 细菌培养及染色体 DNA 制备 接种单菌落于 5 mL LB 培养基中, 37 ℃培养过夜。然后取 1 mL 培养液接入 100 mL LB 培养基中, 37 ℃、220 r/min培养 24 h, 5 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 加入无菌水离心洗涤, 弃上清液, 再加入 10 mL TE 离心洗涤, 弃上清液, 加入 10 mL TE 溶解菌体, 混匀于 -20 ℃保存备用。

取 0.5 mL 菌悬液加入 30 μL SDS 混匀, 加入 10 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K, 10 μL 溶菌酶, 37 ℃混匀温育 1 h。加入 100 μL、5 mol/L NaCl, 再加入 80 μL CTAB/NaCl 溶液混匀, 65 ℃温育 10 min, 加入等体积 $V_{酚}$: $V_{氯仿}$: $V_{异戊醇}$ 为 25: 24: 1, 混匀于 12 000 r/min 离心 5 min, 保留上清液, 上清液中加入等体积 $V_{酚}$: $V_{氯仿}$: $V_{异戊醇}$ 为 25: 24: 1 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 保留上清液, 上清液中加入氯仿/异戊醇, 12 000 r/min 离心 5 min, 保留上清液。上清液中加入无水乙醇和醋酸钠, 轻轻混合直到 DNA 沉淀下来, 冷藏过夜, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集沉淀, 用 70% 乙醇离心洗涤沉淀, 用 1 mLTE 溶解 DNA, 加入 20 μg/mL RnaseA 于 4 ℃保存。

DNA 电泳检测: 用 1 g/dL 琼脂糖凝胶(含核酸染液), 每孔点样 6 μL(5 μL 样品+ 1 μL loading butter), 电泳为 100 V/h。

1.7.2 16S rDNA 基因的 PCR 扩增和产物纯化 目前根据大肠杆菌的基因组序列设计出了多对用于 16S rDNA 序列扩增的引物。作者选择引物为 27f 5-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3 对应于 *E. coli* 16S rDNA 的 8~27 位和 1492r 5-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3, 对应于 *E. coli* 16S rDNA 的 1 525~1 542 位进行扩增, 该对引物能够扩增出近乎全长的 16S rDNA 序列, 长度约为 1 500 bp。

50 μL16S rDNA-PCR 的反应体系: 16S rDNA-PCR 的反应体系: 10× 的 Taq Buffer 5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 4 μL, 2.5 UTaq 酶 0.2 μL, 0.4 μmol/L的引物 1 μL, 模板约 500 ng/μL, 2 mmol/L $MgCl_2$ 4 μL, 使用超纯水将反应体系补至 50 μL。

热循环参数设置为: 95 ℃预变性 4 min, 94 ℃变性 1 min, 55 ℃复性 1 min, 72 ℃延伸 2 min, 30 个循环; 72 ℃延伸 7 min。取 3~5 μL 扩增产物于 1 g/dL 的琼脂糖凝胶上电泳, 利用凝胶成像系统成像。

1.7.3 PCR 产物的测序及结果分析 PCR 产物通过切胶纯化, 样品送至上海生工公司双向测序, 将拼接后的测序结果输入http://www.ncbi.nlm.nih.gov/, 通过互联网, 将测得的基因序列, 通过 Blast 程序与 GenBank 数据库中相似性较高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列进行同源性分析。

序列的比较及系统发育分析采用 Clustalx1.81 软件与 GenBank 基因序列作最大同源性比较分析, 并利用 Mega 4.1 软件以 N-J 法(neighbor-joining)作系统树, 并构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 **16S** 的 **rDNA-PCR** 产物纯化电泳检测

PCR 产物纯化, 经电泳后利用小源凝胶成像系统成像, 见图 1。与 Maker 条带比较, 可知目标扩增产物的片段长度大约为 1 500 bp。图 1 标号为 1~10, 分别为 s-5-2、B-1、s-4、s-5-1、A-1、AAM-1、AAM-2、S-2、s-3、B-2 的 16S rDNA-PCR 产物纯化电泳图。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

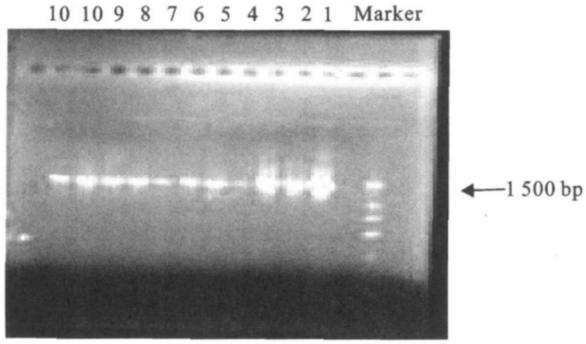


图 1　不同分离自新鲜哈密瓜汁中菌株 16SrDNA-PCR 产物纯化电泳图谱

Fig. 1　Diagram of Agarose gel electrophoresis of strains isolated from freah Hami-melon juice by 16S rDNA-PCR

2.2　形态特征、基本生长特征及序列分析

不同编号菌株的形态特征、基本生长特征及序列分析结果见表 1。

根据与 Genebank 中已有的核酸序列比较结果,除 s-3 和 B-2 菌株外,其余 8 株菌与数据库中同一种的细菌同源性均大于 99%。一般认为,16S rDNA 序列同源性小于 98%,可以认为属于不同的种,同源性小于 93 % ~ 95%,可以认为属于不同属[5]。因此 s-5-2、s-4、B-1 可以确定为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*, AAM-1 可以确定为铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* strain, AAM-2 可以确定为洋葱伯克霍尔德氏力 *Burkholderia cepacia*, S-2 可以确定为鲍曼不动杆菌 *Acinetobacter baumannii* strain, A-1 可以确定为苏云氏芽孢杆菌 *Bacillus mojavensis* strain, s-5-1 可以确定为地衣芽孢杆菌 *Bacillus lichenif ormis* strain, s-3 和 B-2 分别可以确定为肠球菌属 *Enterococcus* 和克雷伯氏菌属 *Klebsiella*。其中 s-3 与粪肠球菌同源性高达 97%,有可能与其是一个种。B-2 可能属于克雷伯氏菌属的某个新种。

表 1　哈密瓜汁中可培养菌株的生长特性及其系统发育归属

Tab. 1　The growth characteristics of the isolated strains from Hami-melon juice and their phylogenetic attribution

菌株	形态特征	基本生长特征				系统发育	菌株登录号
		生长温度/℃	pH 值	最适生长温度/℃	最适 pH 值		
s-5-2	杆状有芽胞(+)	25~56	4.8~8.7	35.5~39.2	6.9~7.3	*Bacillus subtilisgenef or* (99%)	FJ9071840
B-1	杆状有芽胞(+)	25~55	4.7~8.5	35.4~38.9	6.8~7.2	*Bacillus subtilis* strain CICC10028(100%)	FJ907187
s-4	杆状有芽胞(+)	25~60	5.1~8.9	36.1~39.5	6.8~7.5	*Bacillus subtilis*(99%)	FJ907191
s-5-1	杆状有芽胞(+)	25~55	4.8~8.5	35.9~39.1	6.9~7.3	*Bacillus lichenif ormis* strain RT7P1(99%) *Bacillus amyloliquef aciens* strain NBRC14141(99%)	FJ907196
A-1	杆状有芽胞(+)	25~55	5.1~8.5	35.2~38.0	6.5~7.3	*Bacillus moj avensis* strain BCRC 17531 (99%)	FJ907188
AAM-1	细杆状(+)	24~45	5.6~8.4	34.0~38.2	6.7~7.2	*Pseudomonas aeruginosa* strain RE7 (99%)	FJ907193
AAM-2	细杆状(+)	25~43	5.5~8.2	35.0~38.0	6.7~7.3	*Burkholderia cepacia* strain ATCC 21809(99%) *Burkholderia* sp(99%)	FJ907190
S-2	短杆状(+)	25~51	5.1~8.2	36.5~38.1	6.5~7.2	*Acinetobacter baumannii* strain (99%)	FJ907197
s-3	球状(-)	25~50	5.0~8.6	35.6~39.0	6.4~7.2	*Enterococcusf aecalis* strain XR7 (97%)	FJ907185
B-2	杆状(+)	26~48	4.9~8.0	34.5~38.4	6.8~7.3	*Klebsiella p neumoniae* strain K30 (95%) *Klebsiella sp* (95%)	FJ907195

+ 表示革兰氏染色紫色,- 表示革兰氏染色红色

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2 3 16S rDNA 序列的系统发育分析

将各代表菌株和应用 Blast 检索到的与之有较高同源性菌株的 16S rDNA 序列利用 Clustalx1. 81 软件与 GenBank 基因序列作最大同源性比较分析，并利用 Mega 4. 1 软件以 N-J 法(neighbor-joining)作系统树，并构建系统发育树，确定菌株的分类地位。在图 2 中，A-1、s-5-1、s-5-2、B-1、s-4 亲缘关系非常近，与 s-3 较近，基本属于同一属的范围内，而与 AAM-1，AAM-2，S-2，B-2 亲缘关系非常远。

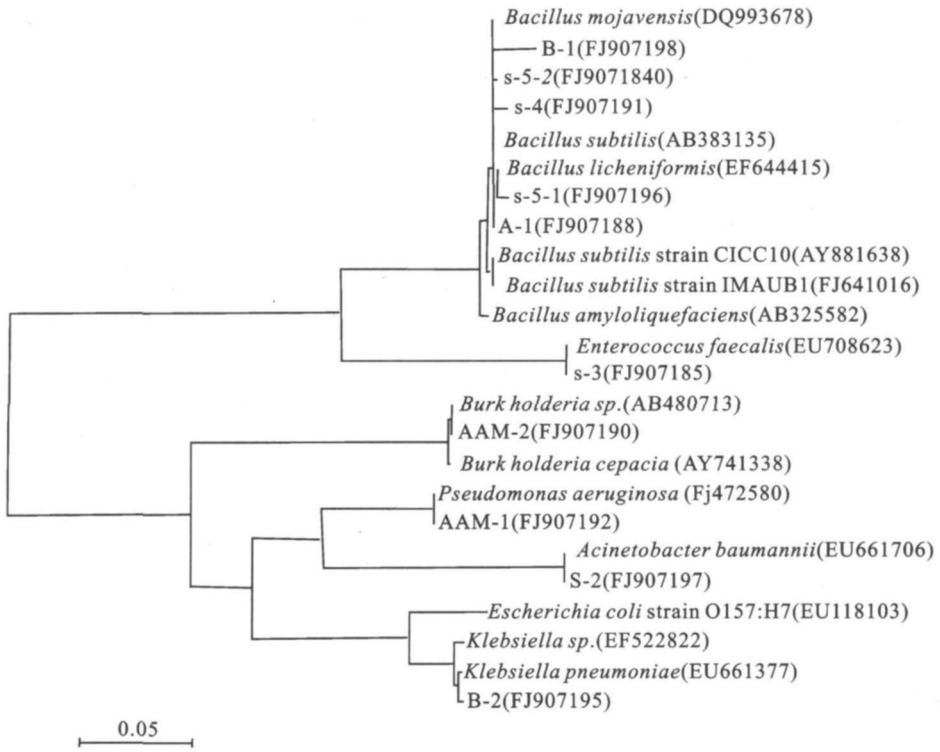


图 2 新鲜哈密瓜汁中分离菌株序列系统发育分析(NJ)

Fig. 2 Neighbor-joing tree constructed showing the phylogenetic relationships among 16SrRNA gene sequences of isolated from Hami-melon juice The scale bar represent 0 05 substitution

3 讨 论

基于当今分子生物学技术迅速的发展，越来越多的研究者开始使用 16S rDNA 序列分析方法[6]。作者采用传统方法将所有分离到的菌株作初步的形态观察和生理学检测，将分离到的 48 株菌分为 10 个类群，应用 16S rDNA 作为分子指标，扩增出未知菌的 16S rDNA，纯化测序，测序结果在 Genbank 中用 Blast 比对分析发现，从哈密瓜汁分离的不同菌株，大部分与已知菌都有很高的同源性，且能达到鉴定种的水平，很少可能有新种。

作者从新鲜哈密瓜汁中分离的 48 株可培养细菌，其中分离芽胞菌比例最大，占分离菌株的 60%，为哈密瓜汁中主要的菌群。芽孢杆菌属如枯草芽孢杆菌是革兰氏阳性细菌，在缺氧或不利条件下形成芽胞，是食品中常见的一种污染菌，在传统的发酵制品中污染几率更大[7]。一般而言，耐热的细菌同样耐压，枯草芽胞杆菌比嗜热脂肪芽胞杆菌(*Bacillus stearothemophilus*)更耐压[8-9]。陈世琼等[10]人对苹果汁中酸耐热菌的分离鉴定为苹果汁的非热力杀菌技术提供了研究方向。

由于芽胞菌为哈密瓜汁中主要的菌群，在选择哈密瓜汁杀菌方式时，应考虑该菌群的杀灭程度对果汁品质本身可能造成的影响，因此该研究可为后续研究超高压处理哈密瓜汁的杀菌工艺提供更为可靠的依据。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献(References):

[1] ZHANG X, SUN A D, GE Y Q, et al. Concentrated fruit juice and its post-turbidity[J]. **Food Sci Technol,** 1997, 5: 28-30.

[2] 龙雯,陈存社. 16S rRNA 测序在细菌鉴定中的应用[J]. 北京工商大学学报, 2006, 24(5): 10-12.
LONG Xia, Chen Cun-she. 16S rRNA sequence employed in identification of bacteria[J]. **Journal of Beijing Technology and Business University (Natural Science Edition),** 2006, 24(5): 10-12 (in Chinese).

[3] 闫旭,马忠良,阮文权. 一株硫化物氧化细菌的分离、鉴定和脱硫效果初步验证[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(5): 113-116.
YAN Xu, MA Zhong-liang, RU AN Wen-quan. Screening, identification and sulfur removal ability validating of a suifide-oxidizing strain[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2008, 27(5): 113-116. (in Chinese).

[4] 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.

[5] 曾润颖,赵晶. 深海细菌的分子鉴定分类[J]微生物学通报, 2002, 29(6): 12-15.
ZENG Run-ying, ZHAO Jing. Molecular identification and classification of deep sea *Psychrophilic* bacteria from East-Paeitic sediment[J]. **Bulletin of Microbiology,** 2002, 29(6): 12-15. (in Chinese)

[6] Delong E F, Wickham G S, Pace N R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells[J]. **Science,** 1982, 243: 1360-1363.

[7] 曾庆梅. 超高压灭活枯草芽抱杆菌(AS 1.140)的参数优化[J]. 农业工程学报, 2005, 21(4): 158-162.
ZENG Qing-mei. Optimization of ultra-high pressure proceessing parameters on surviors of *Bacillus subtilis* AS1.140[J]. **Journal of Agriculture and Engineering,** 2005, 21(4): 158-162 (in Chinese)

[8] Nakayama A, Yano Y, Kobayashi S, et al. Comparison of pressure resistances of spores of six *Bacillus* strairns with their heat resistances[J]. **Appl Enviro Micro Biro,** 1996, 62: 3897-3900.

[9] Sojka B, Ludwig H. Effect of pressure changes on the inactivation of *Bacillus subtillus* spores[J]. **Pharm Ind,** 1997, 59: 436-438.

[10] 陈世琼,陈文峰,胡小松, 16S rDNA PCR-RFLP 法快速鉴定分离自浓缩苹果汁生产线的脂环酸芽孢杆菌[J]. 中国食品学报, 2006, 6(2): 99-102.
CHEN Shi-qiong, CHEN Wen-feng, HU Xia-song. Isolation and characterization of thermo-acidophilic endospore-forming bacteria from the concentrated apple juice-processing environment[J]. **Journal of China Food,** 2006, 6(2): 99-102. (in Chinese).

(责任编辑:李春丽)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net