

文章编号:2095-6002(2013)04-0032-05

引用格式:郑瑞生,陈凉凉,肖熙. 熟制鲍鱼残留细菌的分离及 16S rDNA 鉴定. 食品科学技术学报,2013,31(4):32-36.

ZHENG Rui-sheng, CHEN Liang-liang, XIAO Xi. Separation and 16S rDNA Identification of Main Residual Bacteria from Baked Abalone. Journal of Food Science and Technology, 2013,31(4):32-36.

熟制鲍鱼残留细菌的分离及 16S rDNA 鉴定

郑瑞生^{1,2}, 陈凉凉¹, 肖熙²

(1. 泉州师范学院 化学与生命科学学院, 福建 泉州 362002;

2. 福建农林大学 食品科学学院, 福建 福州 350002)

摘要:为控制熟制鲍鱼残留的细菌污染,采用平板划线分离技术对烘制加工后鲍鱼中残留的主要菌群进行分离,并通过菌落形态观察、革兰氏染色分析和 16S rDNA 序列比对等方法对其进行鉴定. 结果表明,残留在烘制加工后鲍鱼的主要菌群有希瓦氏菌属、不动杆菌属、库特氏杆菌属、海洋类香菌、蜡样芽孢杆菌、肠杆菌属、彭氏变形杆菌等.

关键词:烘制鲍鱼; 残留细菌; 16S rDNA; 鉴定

中图分类号: TS251.54

文献标志码: A

鲍鱼营养丰富,味道鲜美,具有润肺、滋肾补虚等功效,深受广大消费者喜爱. 但是对于鲜鲍的烹饪并非人人都会,而将其加工成方便、快捷、安全的即食鲍鱼既可以丰富鲍鱼的产品品种,又可以满足现代都市人的需求. 但由于鲍鱼加工过程受热不均,杀菌不够彻底,容易导致烘制后的鲍鱼发生黑变、流汁、恶臭等现象,造成产品的腐败变质,缩短产品的保质期. 有研究认为大多数情况下食品中只有部分微生物参与腐败过程^[1]. 针对这种情况,在 20 世纪 90 年代中期 Dalggaard 明确提出了特定腐败菌(specific spoilage organism, SSO)的概念^[2-3]. 在刚加工完产品的微生物菌群中特定腐败菌数量少,但这些特定腐败菌在贮藏过程中生长较其他微生物快,并且腐败活性增强^[4]. 因此,研究熟制鲍鱼产品中残留的特定腐败菌,对于有针对性的采取控制措施,防止其发生腐败变质,保证产品的质量安全具有十分重要的意义. 食品中微生物的分离鉴定通常依赖于各种各样的表型观察. 但由于有些表型不典型可能会导致错误的结果^[5]. 目前出现了许多基于分

子生物学技术的快速而直接的检测微生物的方法,其中细菌的序列分析是目前较好的新方法之一,16S rDNA 分子大小适中,有足够的遗传信息用于分类研究,因此在许多细菌分离鉴定上被广泛使用^[6-7].

本文采用平板划线分离方法,对烘制后的鲍鱼中残留的主要细菌菌群进行分离,并通过菌落形态观察、革兰氏染色分析和 16S rDNA 序列比对的方法对其进行鉴定. 从而为烘制鲍鱼加工过程中残留腐败菌的控制,延长产品货架期提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 实验原料

鲍鱼购于福州市水产品批发市场,重量在 50 g 左右的鲜活鲍鱼,加冰条件下运送至实验室. 将鲜活鲍鱼进行开壳、取肉,洗净后选择鲍体饱满、大小一致、外膜透明、有鲍鱼固有气味的鲍鱼,沥水,放入超低温冰箱中进行单体快速冻结. 选取冻结后鲍鱼进行解冻、清洗、沥干,用铝盘盛后放入 100 ℃烘箱中进行烘制 5 min,冷却装入无菌三角瓶中,并于

收稿日期: 2013-03-04

基金项目: 福建省大学生创新创业训练计划项目(2012CXSY 省 08);福建省教育厅科技项目(JA11220);泉州市优秀人才培养专项资助项目(10A19);泉州市科技计划重点项目(2010N13).

作者简介: 郑瑞生,男,讲师,博士研究生,主要从事食品加工及微生物控制方面的研究.

24 h内分析该加工后的鲍鱼残留菌情况。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 主要试剂

蛋白胨、牛肉膏、琼脂粉、葡萄糖、氯化钠、普通营养琼脂,均购于国药集团;酵母提取物,上海生物工程有限公;革兰氏染色试剂盒,购于青岛高科园海博生物技术有限公;d NTPs(4种脱氧核苷三磷酸)、10倍浓度的聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)缓冲液(Mg^{2+} Plus)、Taq DNA聚合酶、DL 2000 DNA Marker均购于TaKaRa生物工程有限公;Universal DNA Purification Kit,天根生化(北京)科技有限公;Agarose 1-H,BBI生物科技有限公;Agar A,波士顿生物技术(BBI)有限公。溶菌酶(Lysozyme)(酶活 $>22\,800\text{ U/mg}$)和蛋白酶K(Proteinase K)(酶活为 30 U/mg)均购于BBI生物科技有限公。

100 mmol/L Tris-HCl母液是取三羟甲基氨基甲烷(Tris(Hydroxymethyl)aminomethane, Tris) 12.1 g,溶于去离子水中,再用100 mmol/L盐酸调整pH值至8.0,定容至1 L,高压121℃灭菌30 min后备用。

100 mmol/L EDTA母液是取乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)29.2 g,溶于去离子水中,再用100 mmol/L氢氧化钠调整pH值至8.0,定容至1 L,高压121℃灭菌30 min后备用。

TE溶液是取100 mL Tris-HCl母液和10 mL EDTA母液用去离子水定容至1 L,高压121℃灭菌30 min后备用。

DNA提取缓冲液由100 mmol/L Tris-HCl母液(pH值8.0),100 mmol/L EDTA母液(pH值8.0),100 mmol/L磷酸钠,1.5 mol/L NaCl,质量浓度为1%的十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, HTAB)组成,高压121℃灭菌30 min后备用。

1.2.2 主要仪器设备

AL-204型电子天平,特勒-托利多仪器(上海)有限公;电热干燥箱,上海实验仪器总厂;CT-2000型高压灭菌锅,天津市超拓科贸有限公;SW-CJ-1FB型超净工作台,苏净集团安泰公;GSP-9160MBE型隔水式恒温培养箱,海博迅实业有限公医疗设备厂;HZQ-F型全温振荡培养箱,哈尔滨市东联电子技术开发有限公;电动匀浆机,国华科技有限公;Olympus BX51型光学显微镜;AG22331型PCR扩增仪,德国Eppendorf Hamburg

公司;Tanon2500R型凝胶成像系统,Tanon科技上海有限公;紫外反射透射仪,上海精科实业有限公;SDC-6型恒温水浴锅,波新芝生物科技股份有限公司;D-YY-12型电脑三恒多用电泳仪,北京六一仪器厂;Lx-100型手掌型离心机,江苏海门市麒麟医用仪器厂;UB-7型酸度计,ENVER INSTRUMENT公;微量移液器(10,100,200,1 000 μL),德国Eppendorf Hamburg公;GL-20G-H型冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;H1650-W型台式高速离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公;ND-1000型核酸测定仪,美国Nano Drop公。

2 实验方法

2.1 主要残留菌的分离纯化与初步鉴定

取熟制后的鲍鱼10 g,放入灭菌后的生理盐水100 mL中,于20℃条件下进行振荡摇匀,至肉汤明显混浊,取1 mL肉汤,用10倍递增法进一步制成 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} 和 1×10^{-5} 等体积分数的稀释液,取100 μL 稀释体积分数为 1×10^{-3} , 1×10^{-4} 和 1×10^{-5} 的稀释液涂布营养琼脂平板(含0.5%葡萄糖)进行培养,挑取菌落数在30~300个左右的平板,对典型的单菌落反复进行划线分离、纯化。共筛选出52株,将分离纯化后的单菌落放置于35℃培养箱中(该温度条件下有利于嗜中温性海洋细菌生长,同时可防止温度过高导致培养基水分散失较多,边缘发生干裂),培养24 h后进行菌落观察,包括菌落的大小、形态、颜色、隆起度、边缘结构、表面形态、光泽度、透明度及质地等。同时挑取长势好的单一菌落,对其进行革兰氏染色及芽孢染色,并在显微镜下观察。

2.2 鲍鱼残留细菌的总DNA提取及PCR扩增

2.2.1 鲍鱼残留细菌总DNA的提取

挑取经分离纯化后的菌样数环,置于20 mL灭菌后的营养肉汤中(含0.5%葡萄糖),于35℃条件下进行振荡扩大培养24 h,至菌液明显混浊(说明微生物大量生长)。取上述菌液1 mL,12 000 r/min室温离心5 min,弃上清得菌体沉淀,再加入1 mL TE溶液,充分震荡使菌体悬浮,加入200 μL 溶菌酶(10 mg/L)37℃水浴30 min,再加入3 mL DNA提取缓冲液和20 μL 蛋白酶K(20 mg/mL),混匀后于65℃下水浴1 h,期间每20 min中放入-80℃超低温冰箱冻融10 min,重复3次。

冻融完毕后,加入等体积的 Tris 饱和酚-氯仿-异戊醇混合溶液($V(\text{Tris 饱和酚}):V(\text{氯仿}):V(\text{异戊醇})=25:24:1$),轻轻混匀,常温 12 000 r/min 离心 10 min,小心吸取上层溶液于另一离心管中,溶液再用等体积的氯仿-异戊醇混合溶液($V(\text{氯仿}):V(\text{异戊醇})=24:1$)抽提一次,之后加入 0.6 倍体积的预冷的异丙醇,4 ℃ 静置沉淀 1 h 后,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀用 1 mL 70% 的乙醇(含 0.1 mol/L 醋酸钠)重复洗涤 2~3 次,沉淀于超净台下吹干,以去除残留的乙醇。最后沉淀溶解于 50 μL 的 TE 中。

1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 DNA 完整性,并进行 DNA 浓度的测定。

2.2.2 PCR 扩增

以 2.2.1 提取的 DNA 作为模板,进行 PCR 扩增。

1) 反应引物:引物 1(27F):5'-AGAGTTGATC-CTGGCTCAG-3';引物 2(1492R):5'-GGTTACCTT-GTTACGACTT-3'。

2) 反应体系(50 μL):25 μL 的反应体系中含有 10 倍 PCR 缓冲液(Mg^{2+} Plus)2.5 μL 、dNTP(2.5 mmol/L)2.0 μL 、适度稀释的模板 DNA(约 10 ng)1 μL 、Taq 酶(2.5 U/ μL)0.4 μL 、引物 1 和引物 2 各 0.5 μL (10 pmol/L)、重蒸水 18.1 μL 。

3) 反应条件:PCR 扩增条件为 94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 45 s,55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 90 s,35 个循环后,72 ℃ 延伸 10 min。

2.2.3 PCR 产物测序

PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定后回

收纯化,由上海生工生物工程有限公司进行测序。将拼接后的测序结果输入 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast,利用 BLAST 软件,将测定得到的基因序列与 Genbank 数据库进行序列比对分析,进行同源相似性比较。

3 结果与讨论

3.1 残留细菌分离及染色结果

从熟制鲍鱼中挑取具有典型菌落形态特征的残留菌 52 株。根据菌落形态、革兰氏染色,及芽孢染色结果对其进行初步分类,其中典型的主要残留细菌有 7 株,其编号及菌落形态、革兰氏染色结果、形态特征描述分别见图 1、图 2 及表 1。

3.2 16S rDNA 基因同源性分析结果

3.2.1 PCR 扩增产物

分别提取 7 株菌的基因组 DNA 后,利用 PCR 扩增其 16S rDNA 基因片段,取 PCR 产物 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳分析,如图 3。各样品都在 1 500 bp 处出现明显条带,说明供试菌株的 16S rDNA 基因扩增成功。

3.2.2 PCR 产物测序及菌株鉴定

测定残留细菌的 16S rDNA 全序列,分析其同源性,明确各种菌的种属类别。将获得的有效序列提交到 NCBI,通过 Blast 程序与 GenBank 数据库中已知序列进行相似性比对(<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。PCR 产物经纯化后,进行核苷酸序列分析,结果见表 2。

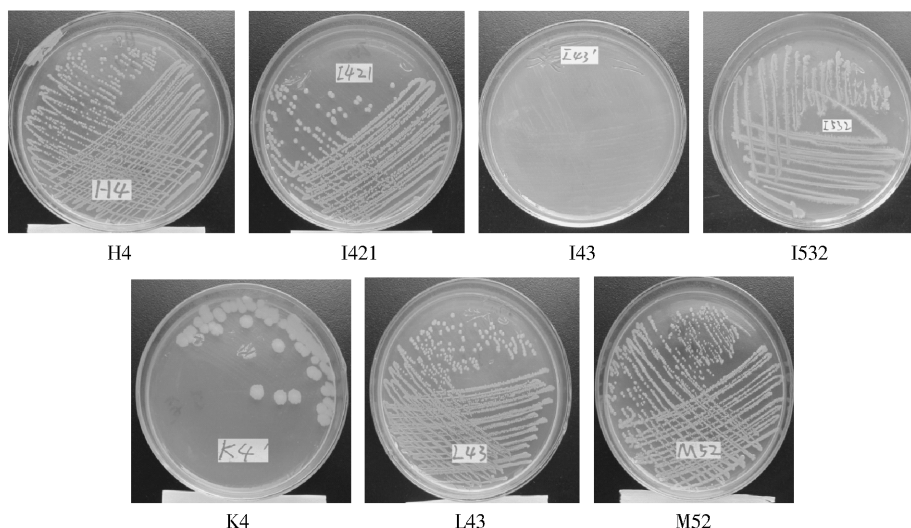


图 1 主要残留菌平板菌落特征

Fig. 1 Characteristics of main residual bacteria colonies

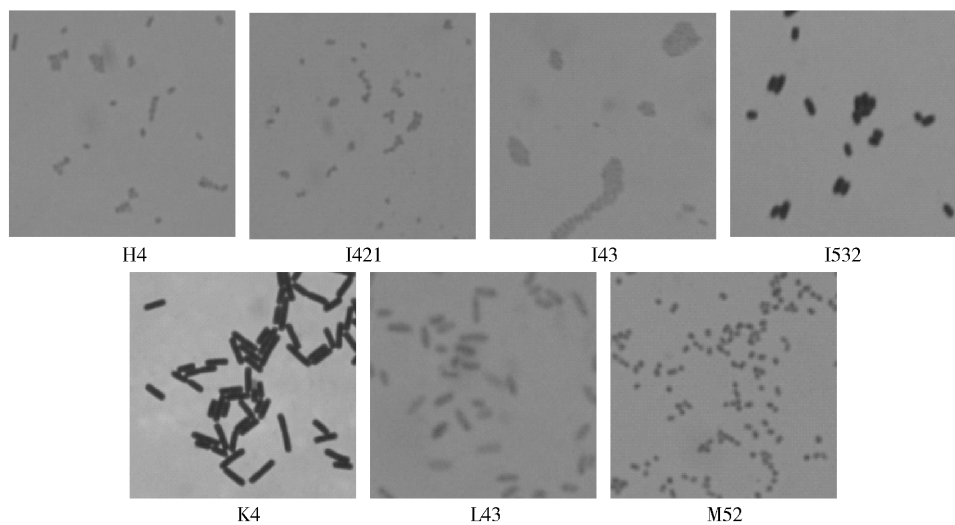


图 2 主要残留菌革兰氏染色

Fig. 2 Gram staining of main residual bacteria

表 1 主要残留菌的形态特征

Tab. 1 Morphological characteristics of main residual bacteria

菌株编号	革兰氏染色	细菌形状	有无芽孢	菌落形态	菌落颜色	菌落大小	表面光泽	表面形状	边缘形状	隆起程度	透明程度	菌落质地
H4	G -	球菌	无	圆形	白色	小	无	光滑	整齐	低凸	不透明	湿润
I421	G -	杆菌	无	圆形	淡黄	中等	有	光滑	整齐	低凸	半透明	油性
I43	G -	杆菌	无	圆形	黄色	小	有	膜状	整齐	不隆	透明	膜状
I532	G +	棒状杆菌	无	鸟羽状	棕黄	大	有	颗粒	缺刻	低凸	不透明	油性
K4	G +	粗杆菌	有	圆形	淡黄	大	无	颗粒	缺刻	扁平	不透明	黏稠
L43	G -	杆菌	无	圆形	白色	中等	有	光滑	整齐	低凸	半透明	油性
M52	G -	球菌	无	圆形	淡黄	较小	有	光滑	整齐	低凸	不透明	油性

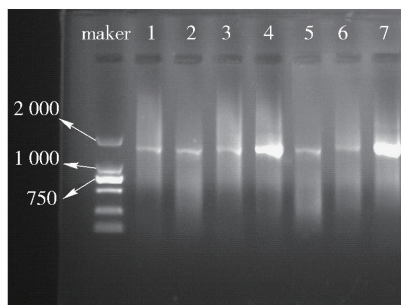
表 2 主要残留菌的鉴定结果

Tab. 2 Identification results of main residual bacteria

序号	编号	菌株名称	中文名	登录号	碱基长度 bp	相似度/%	所占比例/%
1	I43	<i>Shewanella</i> sp.	希瓦氏菌属	JQ716233. 1	1 413	99	21. 15
2	M52	<i>Acinetobacter</i> sp.	不动杆菌属	FR773879. 1	1 402	99	21. 15
3	I532	<i>Kurthia</i> sp.	库特氏杆菌属	JQ398850. 1	977	98	17. 31
4	H4	<i>Myroides pelagicus</i>	海洋类香菌	AB681811. 1	1 407	99	17. 31
5	K4	<i>Bacillus cereus</i>	蜡样芽孢杆菌	JN859045. 1	1 425	99	9. 62
6	I421	<i>Enterobacter</i> sp.	肠杆菌属	JF799886. 1	1 374	99	9. 62
7	I43	<i>Proteus penneri</i>	彭氏变形杆菌	JN092595. 1	1 420	99	3. 85

由表 2 可知,分离到的细菌序列与 Genbank 中最接近细菌的同源性达到 99%,最终确定这些细菌分别为:希瓦氏菌属(*Shewanella* sp.)、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)、库特氏杆菌属(*Kurthia* sp.)、海洋类香菌(*Myroides pelagicus*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)、彭氏变形杆

菌(*Proteus penneri*)等,各自在残留细菌中所占比例分别为 21. 15% (11 株)、21. 15% (11 株)、17. 31% (9 株)、17. 31% (9 株)、9. 62% (5 株)、9. 62% (5 株)、3. 85% (2 株)。由此可见,希瓦氏菌属、不动杆菌属是烘制鲍鱼中主要的残留细菌。



注:Marker 表示 2000 DNA maker;泳道 1~7 分别表示 H4、I421、I43、I532、K4、I43、M52

图 3 主要残留菌的 16S rDNA 的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 3 Electrophoretic graph of 16S rDNA amplified from main residual bacteria

4 结 论

本研究从烘制鲍鱼中分离出的残留细菌,经过菌落形态观察、革兰氏染色以及 16S rDNA 序列分析后,鉴定其分别为希瓦氏菌属(*Shewanella sp.*)、不动杆菌属(*Acinetobacter sp.*)、库特氏杆菌属(*Kurthia sp.*)、海洋类香菌(*Myroides pelagicus*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、肠杆菌属(*Enterobacter sp.*)、彭氏变形杆菌(*Proteus penneri*)等,其在残留的细菌中所占比例分别为 21.15%, 21.15%, 17.31%, 17.31%, 9.62%, 9.62%, 3.85%。其中希瓦氏菌属、不动杆菌属、蜡样芽孢杆菌、肠杆菌属及彭氏变形杆菌为常见的腐败菌,而库特氏杆菌属、海

洋类香菌较为少见。希瓦氏菌属、不动杆菌属又是烘制鲍鱼中主要的残留细菌。

参考文献:

- [1] Gram L, Trolle G, Huss H H. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 °C) and high (20 °C) temperatures[J]. International Journal of Food Microbiology, 1987, 4(1):65-72.
- [2] Dalgaard P. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish[J]. International Journal of Food Microbiology, 1995, 26:319-333.
- [3] Dalgaard P. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish[J]. International Journal of Food Microbiology, 1995, 26:305-317.
- [4] 刘梦茵,刘芳,诸永志,等. 草鸡煲中腐败菌的分离鉴定[J]. 食品科学, 2001, 32(9):156-158.
- [5] 孙化露,陈冰,李树纯,等. 7 种鸭源细菌的分离与 16S rDNA 测序鉴定[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(17):3681-3684.
- [6] Teng Lee-Jene, Hsueh Po-Ren, Huang Yu-Hsuan. Identification of bacteroides thetaiotaomicron on the basis of an unexpected specific amplicon of universal 16S ribosomal DNA PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(4):1727-1729.
- [7] Norman K F, Simon W, Nicholas A S, et al. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family legionellaceae[J]. Journal of General Microbiology, 1991, 137:1215-1220.

Separation and 16S rDNA Identification of Main Residual Bacteria from Baked Abalone

ZHENG Rui-sheng^{1,2}, CHEN Liang-liang¹, XIAO Xi²

(1. College of Chemistry and Life Sciences, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362002, China;

2. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In order to control the main residual bacterial population of baked abalone, the streak plate separating technology was used to isolate the primary residual bacterial floras. And the main bacteria were identified according to the colony morphology observation, gram staining, and 16S rDNA sequence alignment. The result indicated that the primary residual bacteria in baked abalone were *Shewanella sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Kurthia sp.*, *Myroides pelagicus*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter sp.*, *Proteus penner*, and so on.

Key words: baked abalone; residual bacteria; 16S rDNA; identification

(责任编辑:李 宁)