

市售冷却牛肉中主要细菌的常规分离与鉴定

李正堂 李柏林* 欧杰 赵勇

(上海海洋大学食品学院 上海 200090)

摘要: 利用常用纯培养的方法, 根据细菌的菌落形态、菌落颜色、革兰氏染色等常见特征, 从市售冷却牛肉中, 选取菌落形态差别比较明显的菌株共 32 株, 其中保鲜膜包装冷却牛肉样品共 12 株, 未包装冷却牛肉样品共 20 株; 同时选取两样品中的优势菌株各 4 株进行进一步的研究(8 株细菌编号为: S01~S08, 其中 S01~S04 为未包装冷却牛肉样品; S05~S08 为保鲜膜包装冷却牛肉样品), 通过 ARDRA(Amplified ribosomal DNA restriction analysis) 以及 16S rDNA 序列等进行分类研究, 确定该细菌的分类地位, 并结合形态、常规生理生化特性进行鉴定, 确定各细菌所属种。实验表明: S01 为假单胞菌属中的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*), S02 为希瓦氏菌属下的(*Shewanella cinzia* sp.), 而 S03 和 S05 为希瓦氏菌属下的腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*), S04 为窄食单胞菌属中的嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*), S06 为嗜冷杆菌(*Psychrobacter* sp.), S07 为葡萄球菌属中的松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus sciuri*), S08 为微杆菌属中的产左聚糖微杆菌(*Microbacterium laevaniformans*)。证明两样品的共有优势菌为希瓦氏菌属。通过对样品可培养微生物情况进行初步的调查分析, 为冷却肉加工工艺提供一定的理论基础。

关键词: 冷却牛肉, 16S rDNA, ARDRA, 分离与鉴定, 生理生化鉴定

Screening and Identification of the Primary Bacterium from the Chilled Beef on Sale

LI Zheng-Tang LI Bai-Lin* OU Jie ZHAO Yong

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

Abstract: It is used the method of pure culture, Selected 32 strains, which were obvious difference in the shape, color and so on common characteristic, From the chilled beef with no packing and cling film on sale in this research; and it was included 12 strains from the chilled beef sample packed with cling film; 20 strains from the chilled beef sample with no packing. Simultaneously selected 4 strains which were predominant in each bacterium from the two samples to conduct the further research, 8 strains serial numbers are: S01~S08, S01~S04 from the chilled beef sample with no packing; S05~S08 from the chilled beef sample packed with cling film. Through ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis) as well as 16S rDNA to clarify the bacterium's classified status. The physiological and chemical tests were done to determine the various bacteria respective genus. The experiment indicated: S01 is *Pseudomonas putida*; S02 is *Shewanella cinzia* stain; S03 and S05 are the same *Shewanella putrefaciens*; S04 is *Stenotrophomonas mal-*

基金项目: 国家科技支撑计划(No. 2007BAD52B05); 上海市重点学科建设项目(No. T1102)

* 通讯作者: Tel: 86-21-65710324; ✉: blli@shou.edu.cn

收稿日期: 2008-08-12; 接受日期: 2008-10-07

tophilia; S06 is *Psychrobacter*; S07 is *Staphylococcus sciuri*; S08 is *Microbacterium- laevaniformans*. It was proved that two samples altogether have the same predominant bacterium. It can provide certain theory basis for the chilled meat processing craft as the preliminary investigation in the cultured microorganism situation in two samples.

Keywords: Chilled beef, 16S rDNA, ARDRA, Screening and identification, Physiological and chemical Tests

随着人们生活水平的提高, 消费者对于肉类食品品质的要求也随之提高, 通常认为健康动物的内部组织是无菌的, 它对微生物的入侵有完善的防御机制。然而冷却肉的屠宰则被视为新鲜肉微生物污染的开端^[1], 在加工过程中一些嗜热性细菌未能被杀死, 同时流通环节、销售环节所造成的二次污染导致肉类中微生物的大量繁殖, 最终影响肉的品质。因此弄清冷却肉中菌群的构成具有重要的意义。国外已有不少冷却肉中腐败微生物的分析报道^[2,3], 国内对于这方面的研究也不少, 但是多集中于冷却猪肉^[4], 冷却牛肉方面, 罗欣等^[5]则报道过冷却牛肉中假单胞菌为优势菌种, 并不同程度的存在乳酸菌、酵母菌等。而这些研究又都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进行鉴定, 而未能从分子水平上揭示其遗传信息。

本研究的主要目的在于利用分子生物学与纯培养的方法, 对冷却牛肉中主要微生物基因型和表型两方面进行鉴定, 了解细菌的相关特性, 从而为肉类加工生产中储藏设备的开发, 群体感应效应的研究, 以及微生物风险评估的开发提供一定的理论依据, 最终达到对产品质量的控制, 促进其健康发展。

1 材料和方法

1.1 样品采集

2007年11月购自上海易初莲花周家嘴路店的某品牌未包装和保鲜膜冷却牛肉。

1.2 主要试剂和仪器

用于PCR扩增的全套试剂及扩增引物均购于上海生工生物工程技术有限公司, Biospin 细菌基因组 DNA 提取盒, 购于 Biospin, Eppendorf AG 22331 Hamburg PCR 仪, 相关生理生化试验所用试剂均购自于国药集团。

1.3 菌体的培养与分离纯化

样品经系列稀释后涂布在 NA 培养基上, 30°C 倒置恒温培养, 3 d 后统计数量。挑取菌落表型差异的单菌落, 纯化后的菌种转至 NA 斜面, 4°C 保存。

1.4 菌体的生理生化鉴定

参照东秀珠、蔡妙英《常见细菌系统鉴定手册》进行。

1.5 单菌落 DNA 提取及纯化

选用 Biospin 细菌基因组 DNA 提取盒直接提取单菌落 DNA。

1.6 16S rDNA 的 PCR 扩增

以提取的基因组 DNA 为模板, 选用细菌通用引物正向引物 27f: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物 1492r: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'。选用 25 μL 体系进行聚合酶链式 PCR 反应。PCR 反应条件为: 95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 1 min, 55°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 25 个循环; 72°C 延伸 10 min。选择上海生工生物工程技术有限公司 DNA 柱式抽提试剂盒进行 PCR 产物的纯化。送上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.7 ARDRA 分析

本试验选用的限制性内切酶有: *EcoR* I、*BamH* I 和 *Taq* I。

取 10 μL 的 16S rDNA 的 PCR 产物, 分别加入 1 μL 内切酶、2 μL 相应的 10×Buffer 和 10 μL 去离子水。37°C 恒温 12 h 后于 65°C 恒温 5 min 终止反应^[6]。取酶切产物 10 μL 用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测^[7]。

1.8 DNA 测序和进化树分析

获得菌株部分长度 16S rDNA(约 1400 bp)序列, 将该序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行对比分析(<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>), 获得 13 条相似性较高的序列, 使用 Bioedit 和 MEGA 3 软件, 构建系统进化树。

2 结果

2.1 细菌菌落特征

通过梯度稀释法得知未包装冷却牛肉中的细菌总数为： 4.3×10^5 CFU/g；保鲜膜包装冷却牛肉中的细菌总数为： 1.7×10^6 CFU/g。细菌总数上说明保鲜膜对细菌的生长起了一定的抑制作用。根据两样品在营养琼脂上所生长的细菌菌落表型差异的特点，共筛选出32株，其中保鲜膜包装冷却牛肉样品共12株，未包装冷却牛肉样品共20株，同时选取两样品中的优势菌株各4株进行革兰氏染色(8株细菌编号为：S01—S08，其中S01—S04为未包装冷却牛肉样品；S05—S08为保鲜膜包装冷却牛肉样品)，并详细记录其细菌基本特性(表1)。

2.2 DNA的提取和PCR扩增

将从活菌中提取的总DNA进行1%的琼脂糖凝胶电泳，在23 kb左右出现条带(如图1)，表明已获得较为完整的微生物的全部基因组的DNA。对8株

活化菌进行16S全长序列的PCR扩增，均能得到重复性好且稳定、清晰的特异条带，片段大约1500 bp左右(如图2)。

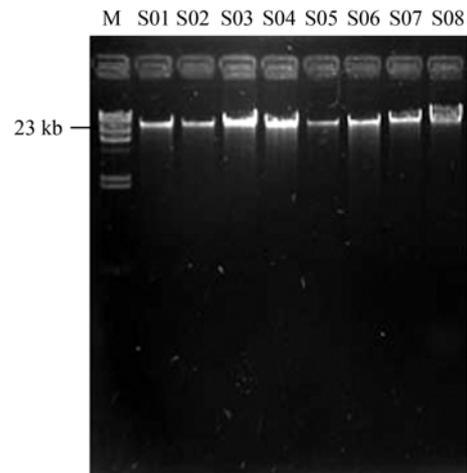


图1 菌株的总DNA电泳

Fig. 1 Electrophoresis analysis of total DNA

表1 冷却牛肉中细菌特征
Table 1 The properties of bacteria on chilled beef

菌号 Number of strain:	S01	S02	S03	S04	S05	S06	S07	S08
形状 Shape	杆菌	杆菌	杆菌	杆菌	杆菌	球菌	球菌	杆菌
革兰氏染色 Gram staining	G ⁻	G ⁺	G ⁺	G ⁺				
细菌形状 Bacterium's shape								
芽孢 Spore	无	无	无	无	无	无	无	无
菌落形态 Colony morphology	圆型	椭圆	扩展	圆型	圆型	圆型	圆型	圆型
菌落颜色 Colony color	咖啡色	浅黄	乳白色	咖啡色	白色	微黄	橙黄	金黄
菌落隆起度 Colony degree of up lift	凸起	凸起	低凹	凸起	凸起	凸起	凸起	凸起
菌落边缘形状 Colony edge shape	整齐							
菌落表面状态 Colony surface state	光滑	光滑	皱褶	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑
菌落光泽 Colony luster	有光泽	有光泽	无光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽
菌落干湿 Colony of wet and dry	湿润	湿润	干燥	湿润	奶油	湿润	奶油	奶油
菌落透明程度 Colony degree of transparency	半透明	半透明	不透明	半透明	不透明	不透明	不透明	不透明

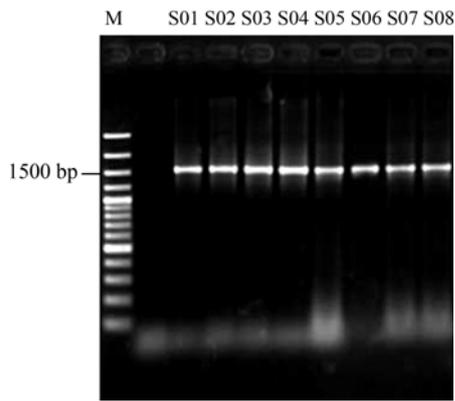


图2 菌株的16S rDNA电泳图谱
Fig. 2 PCR amplification of 16S rDNA

2.3 ARDRA 分析

ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) 的方法可在 16S rRNA 基因序列上区分细菌种 (species) 的差异^[8]; 每 1 个 16S rDNA 限制片段长度多态性类型代表了一个操作分类单位 (Operational Taxonomic Unit, OTU), 用这种方法显示的 OTU 多样性能用以估计分离物中存在的最低限度的细菌种 (species) 的数目^[8]。由图可以看出, 8 株菌的 16S rDNA 片段对 3 种内切酶均有多个切点, 并经重复实验可获得稳定的酶切图谱。各菌的 16S rDNA 片段经酶切后片段大小分布比较均匀 (图 3 和图 4), 便于比较分析。

根据酶切图谱 (图 3 和图 4) 分析可知:

EcoR I 与 *BamH* I 进行的双酶切以及 *Taq* I 酶的单酶切对 S02、S05 的 16S rDNA 片段都能酶切稳定且彻底, 两株菌所得 16S rDNA 片段酶切片段数目和位置基本一致。

(1) *Taq* I 酶的单酶切对 S01、S04、S06、S07 的

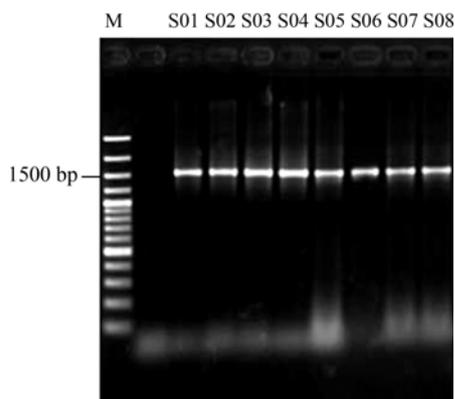


图3 *EcoR* I + *BamH* I 酶切结果
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis amplified 16S rDNA digested with *EcoR* I and *BamH* I

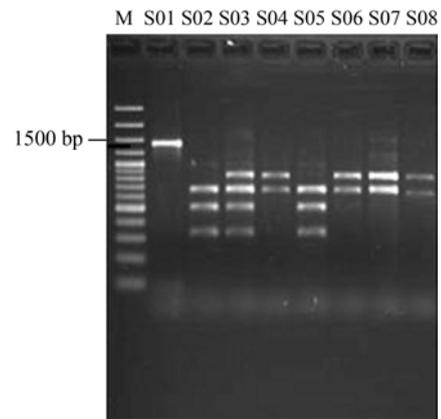


图4 *Taq* I 酶切结果
Fig. 4 Agarose gel electrophoresis amplified 16S rDNA digested with *Taq* I

16S rDNA 片段有 2 个酶切位点, 相比所选择的双酶切更彻底。

根据酶切片段图谱, 按 Nei^[9,10] 提出的菌株间同源性计算公式, 可在分子水平上计算菌株间相似性。公式如下:

$$S = 2 \times N_{AB} / (N_A + N_B) \quad (1)$$

其中 N_{AB} 表示 A 和 B 两菌株共有的片段数目, N_A 为菌株 A 所得的片段数, N_B 为菌株 B 所得的片段数。计算所得结果见表 2 和表 3。

根据同源性计算分析得出:

5 种酶对 8 种菌的 16S rDNA 片段所进行的酶切, S02、S03、S05 三株菌都能够同时保证相对较高的同源性, 证明三者存在一定的亲缘关系。

2.4 系统发育分析

将 8 株分离细菌所获得的 16S rDNA 序列提交 NCBI, 获得它们在 GenBank 数据库中的临时登录号 S01-S08 为: FJ002582-FJ002589, 通过 Blast 软件与 GenBank 中已发表的 16S rDNA 序列进行同源性比较, 选取同源性在 99% 以上的细菌构建系统发育树 (图 5), 由系统发育树可知 S01 与已报道的假单胞菌属 *Pseudomonas* (AF094730) 亲缘关系最近; S02 和 S03 希瓦氏菌属 *Shewanella* (AB300600) 亲缘关系最近, S05 则与希瓦氏菌属 *Shewanella* (AF140017) 亲缘关系最近; S04 与窄食单胞菌属 *Stenotrophomonas* (AM403589) 亲缘关系最近; S06、S07 和 S08 分别与嗜冷杆菌属 *Psychrobacter* (EU196312), 葡萄球菌属 *Staphylococcus* (AB233330), 微杆菌属 *Microbacterium* (EU714374) 亲缘关系最近。也可以看出符合所进行酶切的结果, S02、S03 和 S05 为同一种属。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

表 2 *EcoR* I + *Bam*H I 酶切相似率(%)结果
Table 2 *EcoR* I and *Bam*H I digestion similar rate (%) results

菌号 Number of strain	S01	S02	S03	S04	S05	S06	S07	S08
S01	100							
S02	0	100						
S03	0	86	100					
S04	0	40	67	100				
S05	0	100	86	40	100			
S06	0	40	67	100	40	100		
S07	0	40	67	100	40	100	100	
S08	0	40	67	100	40	100	100	100

表 3 *Taq* I 酶切相似率(%)结果
Table 3 *Taq* I digestion similar rate (%) results

菌号 Number of strain	S01	S02	S03	S04	S05	S06	S07	S08
S01	100							
S02	67	100						
S03	67	100	100					
S04	100	67	67	100				
S05	67	100	100	67	100			
S06	67	67	67	67	67	100		
S07	67	33	33	33	33	33	100	
S08	40	40	40	40	40	40	40	100

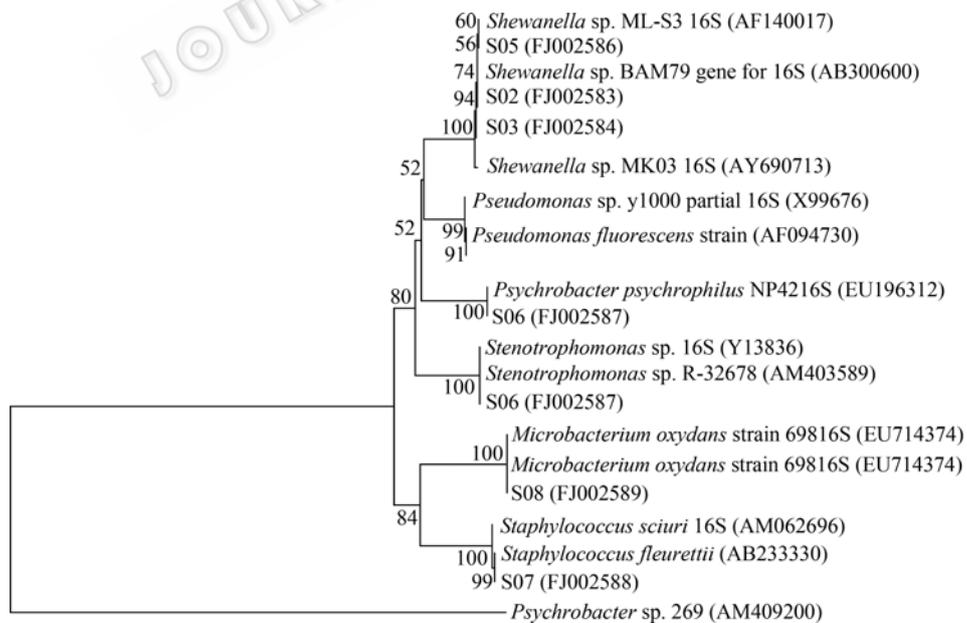


图 5 基于 16S rDNA 序列同源性的 8 株细菌系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic tree of the 8 strains based on 16S rDNA sequences

2.5 生理生化鉴定

参照 GenBank 比对的结果, 根据《常见细菌系统鉴定手册》作相应的生理生化试验(表 4), 可以得出 S01 为假单胞菌属中的恶臭假单胞菌(*P. putida*)。S02 为希瓦氏菌属下的(*S. cincia stain*), 而 S03 和 S05 为希瓦氏菌属下的腐败希瓦氏菌(*S. putrefaciens*), S04 在其窄食单胞菌属内仅有一个种为嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)。S06 为嗜冷杆菌(*Psychrobacter sp.*)。S07 为葡萄球菌属中的松鼠葡萄球菌(*S. sciuri*)。S08 为微杆菌属中的产左聚糖微杆菌(*M. laevaniformans*)。

3 讨论

实验中分离出的 8 株活菌, 主要是根据其外形

态、颜色等特征特异性差别显著的基础上, 筛选出来的, 不排除筛选出同一种属, 甚至是同一菌株, 比如 S02、S03 和 S05 都为希瓦氏菌属细菌, 但是经过生理生化鉴定之后, 发现此三株细菌非同一菌株, 本实验中 S03 和 S05 虽然鉴定为同一种菌株, 但是二者表型也并非都相同, S03 在甘露醇和柠檬酸盐实验中表现出部分阴性, 而 S05 在这两个实验中都表现为阳性。此外虽然 S02 与 S03、S05 为同一菌属下的不同种, 但是从系统发育树看来(图 5), S02 与 S03 的 16S rDNA 的序列相似性要比为同一种的 S03 和 S05 两菌株更高。所以生理生化鉴定为同一菌株的基因型的相似性不一定比同一种属的其他细菌更高。这也许与细菌存在的环境有关, 这决定了其生理生化表型的相同, 但是并没有改变其基因的结构。

表 4 细菌常见生理生化鉴定
Table 4 Identification of bacteria common physiological and biochemical

菌号 Number of strains	S01	S02	S03	S04	S05	S06	S07	S08
H ₂ O ₂ 酶实验 Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
甲基红 MR	NI	NI	NI	NI	NI	-	NI	-
甘油 Glycerin	NI	-	+	+	+	-	NI	NI
淀粉酶实验 Amylase test	-	-	+	+	+	NI	NI	NI
柠檬酸盐实验 Citrate test	NI	-	+/-	-	+	NI	NI	NI
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	+	+	-	+	-	+	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	-	+	+	-	+	NI	NI	-
凝固酶反应 Coagulase reaction	NI	NI	NI	NI	NI	NI	-	NI
O/F 实验 Oxidation / fermentation	NI	F	F	F	F	F	F	O
葡萄糖 Glucose	+	+	-	-	-	+	+	+
蔗糖 Sucrose	-	+	-	-	-	NI	+	+
果糖 Fructose	-	-	-	-	-	NI	NI	-
麦芽糖 Maltose	+	-	-	-	-	+	+	+
棉籽糖 Raffinose	NI	NI	NI	NI	NI	-	-	NI
甘露糖 Mannose	NI	NI	NI	NI	NI	-	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	+	-	+	+	+	-	+	-
甘露醇 Mannitol	-	-	+/-	-	+	-	+	-
鼠李糖 Rhamnose	NI	NI	NI	NI	NI	-	NI	-
海藻糖 Trehalose	-	-	+	+	+	-	+	+
山梨糖 Sorbinose	NI	-	-	NI	-	+	NI	NI
山梨醇 Sorbitol	-	-	-	+	-	-	NI	NI
纤维二糖 Cellobiose	-	-	+	-	+	+	+	-
木糖 Xylose	NI	-	+	+	+	-	+	-
半乳糖 Galactose	-	-	+	-	+	-	+	NI

注: +: 大多数(90%)菌株为阳性, -: 大多数(90%)菌株为阴性, +/-: 阳性多于阴性, NI: 未实验。

Note: +: Most are (90%) positive; -: Most are (90%) negative; +/-: Positive one exceed negative; NI: No test.

希瓦氏菌属通常存在于水和土壤中,活性较强,能产生 H_2S 、不良气味产物和还原 TMAO 等而导致正常肉变粘,使正常肉由鲜红色变为绿色、褐色或灰色,冷藏过程较其他低温细菌生长速率快。但是此类细菌常存在于海洋食品中,在冷却牛肉中分离出该菌种,这也许与超市销售环节中同海产品相混杂或操作员的交叉感染有关;当然也不排除食品冷藏链过程中冷藏车被污染的可能性。研究证明,假单胞菌属一直都是冷藏肉中存在的优势菌^[12],假单胞菌属在冷却肉的初始菌相中占 25%~26%,常存在于土壤和水中,广泛分布在食品中。本实验中分离出的 S01 菌株为恶臭假单胞菌,但是由于没有作其 DNA 的 G+C 含量的测定,未知它是恶臭假单胞菌下的生物变种 A 还是生物变种 B。另外,许多嗜冷菌株,是导致新鲜冷冻食品腐败的重要细菌。本实验中所分离的希瓦氏菌属此前也被归于假单胞菌属,被称为腐败交替假单胞菌,假单胞菌属(*Pseudomonas*)和希瓦氏菌属(*Shewanella*)是冷链流通中高水分蛋白食品的特定腐败菌 SSO (Specific spoilage organisms)^[3]。嗜冷杆菌的细胞膜内含有大量的不饱和脂肪酸,而且会随温度的降低而增加,从而保证了细胞膜在低温下的流动性,这样,细胞就能在低温下不断从外界环境中吸收营养物质。而兼性嗜冷菌生长的温度范围较宽,最高温度达到 30°C 时还能生活。嗜冷微生物是导致低温保藏食品腐败的根源。松鼠葡萄球菌是凝固酶阴性葡萄球菌,是人体皮肤粘膜正常菌群之一。同时乳酸杆菌属(*Lactobacillus*),葡萄球菌属(*Staphylococcus*),嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*);微杆菌属(*Microbacterium*)都有比较明显的分布^[12],而这些微生物的存在主要是与外界环境的接触导致的,如水、土壤、污物等^[1]。不同学者研究结果的差异,可能是肉品来源和所处的环境不同所致^[13]。本实验中可培养微生物的情况看来,共有的优势菌为希瓦氏菌属,葡萄球菌属、冷杆菌属、微杆菌属、假单胞菌属等都有不同的分布。

本实验应用 ARDRA 以及 16S rDNA 序列对分离的活菌,进行了初步的鉴定,根据 Blast 的结果初步得出各菌在微生物进化系统中的从属地位,同时经过对应的生理生化鉴定,确定了各细菌所属的种,这为以后的研究提供了一定的理论依据,同时也为

冷却肉类储藏设备的开发提供一定的基础数据,由于本实验有限,未能尽可能的分析出冷却肉中的其他细菌,比如其他研究者用特定培养基培养出的热索丝菌属(*Brochothrix*)和乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)等冷却肉中常见的细菌,另外由于不同的研究对于肉类中细菌的来源,也有不同的看法,本实验没有彻底排清这些细菌的来源,同时这也将是一个庞大的工程,这也为接下来的研究提供了线索。

参 考 文 献

- [1] 刘子宇,周伟,李平兰,等. 冷却猪肉中主要微生物的分离与初步鉴定. 食品卫生, 2005, 6: 17-19.
- [2] Gill CO. Extending the storage life of meats. *Meat Science*, 1996, 43(1): 99-109.
- [3] 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: 666-669.
- [4] 马俪珍,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.
- [5] 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.
- [6] 鲍大鹏,王南,陈明杰,等. 采用 ARDRA 和 RAPD 对柳松菇(*Agrocybe aegerita*)菌株遗传多样性的分析. 上海农业学报, 2001, 17(1): 18-22.
- [7] 陈敏,方序. 工业废水中降酚菌的分离及 ARDRA 多态性分析. 微生物学通报, 2005, 32(6): 12-16.
- [8] Mario V, Rudi R. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis(ARDRA). *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 93: 227-234.
- [9] William G, Weisburg, Susan M, et al. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703.
- [10] Nei M. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 74: 5267-5273.
- [11] 李苗云,周光宏,徐幸莲,等. 不同屠宰工艺(剥皮和烫毛)对猪胴体表面微生物的多样性影响及关键点的控制研究. 食品科学, 2006, 27(43): 170-173.
- [12] 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.