



研究报告

内蒙古原始森林桦树皮内生和表生乳酸菌分离鉴定及其特性

武岳^{1,2,3} 党娜^{1,2,3} 史迪^{1,2,3} 刘文俊^{*1,2,3}

1 内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010018

2 农业农村部奶制品加工重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010018

3 内蒙古自治区乳品生物技术与工程重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010018

摘要:【背景】随着乳酸菌产业的快速发展,不同环境乳酸菌群落结构的分析和菌种资源的开发利用已经成为该领域的研究热点。从不同环境、不同来源分离、保藏乳酸菌对于优良菌种的筛选和开发利用具有重要意义。【目的】阐明内蒙古原始森林桦树皮中乳酸菌的组成,并获得丰富的野生型乳酸菌资源,为优良菌株的筛选和工业化应用提供核心菌株,从原始森林桦树皮中分离、鉴定和筛选优良乳酸菌菌种,并研究其特性。【方法】通过传统纯培养方法对20份桦树皮中的内生和表生乳酸菌进行分离纯化,运用16S rRNA基因序列分析以及系统发育关系研究进行种属鉴定,并对样品中的优势菌株进行筛选,得到2株具有优良特性的菌株。【结果】16S rRNA基因序列分析结果表明,分离到的112株乳酸菌鉴定为3个属7个种,其中树皮表生分离株共53株,内生分离株为59株,包括 *Enterococcus mundtii* (27株)、*Enterococcus faecium* (16株)、*Enterococcus faecalis* (12株)、*Enterococcus durans* (1株)、*Lactococcus lactis* (37株)、*Lactococcus garvieae* (18株)、*Lactobacillus fermentum* (1株)。通过初筛和复筛比较不同乳酸菌在同一条件下的pH和产酸量,从37株 *Lactococcus lactis* 中得到2株产酸速率较高、pH较低的乳酸菌,其编号为 IMAU98457 和 IMAU98428。对菌株 IMAU98457 和 IMAU98428 进行生物学特性研究,发现其最适生长温度在 37 °C,适宜 pH 范围为 5.5–7.5,菌株在 37 °C 发酵 18 h 后菌液 OD_{600} 值分别高达 2.531 0 和 2.518 2, pH 低至 4.36 和 4.34 (总酸)。菌株 IMAU98457 和 IMAU98428 有一定的盐耐受性,当 NaCl 浓度大于 6% 时,菌株生长受到明显抑制。【结论】20 份桦树皮中分离出的 112 株乳酸菌, *Lactococcus lactis* (37 株) 为内蒙古赤峰市桦树皮样品的优势菌株,占总分离株的 33%。桦树皮表生样品与内生样品相比,内生样品较表生样品的菌株种类资源更为丰富,二者的优势菌属具有较大的差异,并从优势菌株 *Lactococcus lactis* 中筛得 2 株繁殖速度快、产酸速率较高、pH 较低的菌株 IMAU98457 和 IMAU98428。

关键词: 乳酸菌, 分离鉴定, 16S rRNA 基因序列分析, 桦树皮, 生物学特性

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31972095); Major Project of Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2019ZD06)

***Corresponding author:** Tel: 86-471-4308703; E-mail: wjliu168@163.com

Received: 07-10-2020; **Accepted:** 10-12-2020; **Published online:** 18-03-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31972095); 内蒙古自然科学基金重大项目(2019ZD06)

***通信作者:** Tel: 0471-4308703; E-mail: wjliu168@163.com

收稿日期: 2020-10-07; **接受日期:** 2020-12-10; **网络首发日期:** 2021-03-18

Isolation, identification, and characterization of endophytic and epiphytic lactic acid bacteria from bark of birch trees in primeval forest of Inner Mongolia

WU Yue^{1,2,3} DANG Na^{1,2,3} SHI Di^{1,2,3} LIU Wenjun^{*1,2,3}

1 Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education; Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China

2 Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China

3 Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China

Abstract: **[Background]** With the rapid development of the lactic acid bacteria (LAB) industry, it is becoming a research hotspot in the fermented field to analyse the community structure of LAB in different habitats and to develop and utilize bacterial resources. It is of great significance to isolate and preserve of LAB for the screening and utilization of excellent bacterial species. **[Objective]** In order to clarify the composition of LAB in the birch bark of the primitive forests of Inner Mongolia, and to obtain wild LAB strains, and to provide core strains for excellent strains screening and industrial production of LAB, we isolated and identified and screened LAB from bark of birch trees in Primeval Forest and also survey their characteristics. **[Methods]** Traditional pure culture method was used to isolate and purify the endogenous and epiphytic LAB from 20 samples of birch bark. The species identification were performed by 16S rRNA gene sequence analysis and the phylogenetic relationship study method. The dominant strains were screened, and 2 strains with excellent characteristics were obtained. **[Results]** 16S rRNA gene sequence analysis showed that the 112 isolates of LAB were identified as 3 genera and 7 species, of which 53 epiphytic isolates and 59 endophytic isolates, including *Enterococcus mundtii* (27 strains), *Enterococcus faecium* (16 strains), *Enterococcus faecalis* (12 strains), *Enterococcus durans* (1 strain), *Lactococcus lactis* (37 strains), *Lactococcus garvieae* (18 strains), *Lactobacillus fermentum* (1 strain). Among 37 strains of *Lactococcus lactis*, 2 strains IMAU98457 and IMAU98428 with higher acid production and lower pH were obtained after preliminary and re-screening by comparing the pH and lactic acid production of different LAB under the same conditions. The biological characteristics of the strains were studied and it was found that the optimum growth temperature of strains IMAU98457 and IMAU98428 was 37 °C, and the suitable pH range was 5.5–7.5. After the fermentation at 37 °C for 18 hours, the OD_{600} value of the bacterial solution was as high as 2.531 0 and 2.518 2 respectively. The pH was as low as 4.36 and 4.34 (total acid) respectively, and the strains IMAU98457 and IMAU98428 have certain salt tolerance. When the NaCl concentration is greater than 6%, the growth of the strain is significantly inhibited. **[Conclusion]** Among the 112 lactic acid bacteria isolated from 20 birch bark samples, *Lactococcus lactis* was the dominant strain of birch bark samples in Chifeng, Inner Mongolia, with a total of 37 strains, accounting for 33% of the total isolates. Compared with endophytic samples, endophytic samples had more abundant species resources than epigenetic samples, and there were great differences in dominant bacteria between endophytic samples and endophytic samples. Two strains IMAU98457 and IMAU98428 with fast propagation rate, high acid production rate and low pH were screened from the dominant strain *Lactococcus lactis*.

Keywords: lactic acid bacteria, isolation and identification, 16S rRNA gene sequence analysis, birch bark, biological characteristics

乳酸菌是一类能利用可发酵的碳水化合物生成主产物为乳酸的细菌的总称,这类细菌种类繁多,来源广泛,他们可栖居于人或动物肠道及其他器官。近年来也有大量的乳酸菌分离于人类发酵食物、动物饲料、土壤和植物。植物的内部和表面存活大量的细菌、真菌、病毒以及其他微生物^[1],已有报道在水果和蔬菜的不同部位乳酸菌的密度可到达 10^2-10^6 CFU^[2]。大量的新种菌株是从植物中分离而来,例如 *Lactobacillus herbarum* 是 2015 年从枸杞中分离出的新种^[3], *Lactobacillus sucicol* 是 2009 年从橡树中分离得到的新种^[4]。当前,大多数乳酸菌分离、鉴定的研究主要集中在一些重要农作物、水果和蔬菜上。关于森林植物微生物群落的研究很少,并且大多数研究也仅仅是关注酵母菌和放线菌等微生物,对于树皮内生和表生乳酸菌的研究更是少有报道。原始森林年代久远,没有显著的人为破坏,生物多样性独特,为微生物的生存提供了自然且稳定的环境条件^[5],可以更好地揭示微生物群落结构的多样性^[6]。桦树是桦木科桦木属类的主要森林植物之一,适应性大,分布甚广,尤喜湿润土壤,为次生林的先锋树种。白桦树是内蒙古东北地区原始森林的主要树种,其呈现白色的树皮,美观的树形以及具有丰富的资源等特点,天然桦树汁富含人体需要的多种营养物质,例如果糖、氨基酸、维生素和矿物质等^[7]。原始桦树上必然寄居着特定的微生物,研究其中的乳酸菌资源有着重要的理论意义和应用价值。大量文献表明,乳酸菌具有很高的利用价值,可以使人类肠道菌群得到改善,从而提高机体免疫力,且能抑制癌变,降低血胆固醇和血压等效用^[8]。随着乳酸菌产业的进一步发展,乳酸菌资源的开发和群落结构的分析成为研究的重点,分离、保藏乳酸菌对于优良菌种的筛选和利用具有重要意义。

本文采用实验室纯培养方法,对采集自赤峰阿鲁科旗高格斯台罕乌拉国家级自然保护区的 20 份

桦树皮,进行乳酸菌的分离和纯化并使用 16S rRNA 基因序列分析来鉴定分离株,从而了解赤峰地区桦树皮中乳酸菌的组成,并获得具有高产酸能力的菌株,研究其生理生化特征,并进行生物学特性研究,为研究内蒙古赤峰白桦树皮样品中乳酸菌的多样性提供原始数据,丰富我国的乳酸菌菌库,以期筛选优良的发酵菌提供基础知识和宝贵的乳酸菌资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

20 份桦树皮样品于 2019 年 8 月采集于赤峰阿鲁科旗高格斯台罕乌拉国家级自然保护区(E119°03'-119°39', N44°41'-45°08')。随机选取 10 棵树龄在七八年的健康桦树,在离地 1.0-1.5 m 高处,用酒精消毒过的小刀切取长 5 cm、宽 3 cm,从树干表皮和树皮内部分开取样,取样后转入无酶、无菌采样管封口。将树干表皮样品和内树皮样品分开保存,分别标记为 WSP1-WSP10 和 NSP1-NSP10。为表述 10 棵桦树各自树皮乳酸菌样品的多样性,样品 SP 表示为 WSP 和 NSP 的总称(如 SP1 表示为 WSP1 样品和 WSP2 样品的总称)。然后将所收集的树皮样品用 4 °C 便携式采样箱于 2-3 d 内带回实验,立即进行菌种分离。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;PCR 扩增和电泳检测试剂:Easy Taq DNA 聚合酶、10×Easy Taq PCR 缓冲液(Mg²⁺)、高纯度 dNTPs、5×TBE 电泳缓冲液贮液、0.8%-1.2%的琼脂糖凝胶、核酸染料 GelView,北京百泰克生物技术有限公司;λDNA/*Hind* III Marker 和 QDL2000 Quantitative DNA Marker,北京全式金生物技术有限公司。

pH 计,梅特勒-托利多仪器有限公司;恒温培养箱,上海一恒科技有限公司;光学显微镜,Olympus 公司;梯度基因扩增仪,Bio-Rad 公司;

电泳仪,北京六一生物科技有限公司;全自动高压蒸汽灭菌器, Panasonic 公司;高速冷冻离心机, Eppendorf 公司。

MRS 固体培养基和 MRS 液体培养基, Oxoid 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种的分离鉴定

(1) 样品前处理

树干表皮样品前处理:先用无菌水冲洗掉桦树皮外的颗粒杂物,用 0.85%的生理盐水再冲洗 3 次,将 3 次冲洗液混匀制成树皮表生菌原液,标记为 WSP1-WSP10。然后用石蕊牛乳培养基对菌悬液进行增菌,增菌后的样品用于平板涂布。

内树皮样品前处理:用无菌水冲洗掉桦树皮外的颗粒杂物,用 75%酒精冲洗表面,杀灭表面微生物,后用无菌水洗去酒精,将树皮充分研磨碎后用生理盐水制成混悬液,过滤后制成树皮内生菌原液,标记为 NSP1-NSP10。然后用石蕊牛乳培养基对菌悬液进行增菌,增菌后的样品用于平板涂布。

(2) 乳酸菌的计数、分离纯化及保存

采用倾注法进行乳酸菌的计数。将富集后的培养液用灭菌后的 0.85%生理盐水对其进行梯度稀释,然后分别取稀释液 1 mL 于无菌培养皿中,与 MRS 固体培养基混匀(选取稀释梯度为 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8}),于 37 °C 厌氧培养 2 d。计数结果即为每毫升样品的菌落数^[9]。选取上述稀释液涂布于含有抑菌素(放线菌素:多黏菌素=1:1)、1.5% CaCO₃的无菌 MRS 固体培养基上,在 37 °C 厌氧培养 2 d,挑取单菌落于 MRS 培养基上进行纯化,观察纯化后的菌落形态并选择不同菌落形态的单个菌落于 MRS 液体培养基中,在 37 °C 厌氧培养 1 d,传 3 代。选择过氧化氢实验为阴性和革兰氏染色实验呈阳性的纯培养物,加入含有谷氨酸钠的脱脂乳保护剂于-80 °C 进行保存,备用^[10]。

(3) 基因组 DNA 提取

将第 2 代菌株 MRS 纯培养液 8 000 r/min 离心

1 min 后收集菌体。使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取乳酸菌 DNA,用微量紫外分光光度计进行检测,并记录菌株的 DNA 浓度值和纯度值。

(4) 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

将提取的乳酸菌 DNA 浓度偏大的进行稀释(约 100 ng/ μ L),并配制 PCR 反应体系(50 μ L),进行 16S rRNA 基因扩增和测序^[11]。PCR 扩增反应是以提取菌株的基因组 DNA 稀释液为模板,引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1495R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')^[12]。

PCR 反应体系(50 μ L):上、下游引物(10 μ mol/L) 1.5 μ L,基因组 DNA 2.0 μ L, 10 \times Buffer 5.0 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4.0 μ L, DNA *rTaq* 酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 补充至 50 μ L。PCR 反应条件:94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

将 PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶进行检测。如果在 1 500 bp 处有一条清晰明亮的扩增带,而且没有拖尾和弥散,则说明 PCR 扩增是成功的^[13]。将 PCR 扩增产物送至上海美吉生物医药科技有限公司进行纯化和 DNA 测序。

(5) 相似性分析

将测序完成的 DNA 序列利用 SeqMan (DNAStar 5.01)软件进行序列拼接之后,通过 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)与 GenBank 数据库中的已知细菌的核酸序列进行相似性比对分析^[14],以相似性大于 98.65%为种的分界阈值,将待鉴定菌株与对应模式菌种的 16S rRNA 基因序列用 MEGA 6.0 软件运用邻接(Neighbour-Joining, N-J)法建立系统发育树^[15],进行系统发育关系研究。

1.2.2 菌种的生理生化特性

(1) 生理生化鉴定

参考凌代文等^[16]的实验方法对树皮内生和表生 112 株乳酸菌进行过氧化氢酶试验、甲基红试验(MR 试验)、吲哚试验、硫化氢试验等生理生化鉴定。

(2) 菌株的牛乳发酵特性研究

对树皮中内生和表生优势菌株 37 株乳酸乳球

菌进行牛乳发酵特性初筛, 在相同条件下培养(37 °C, 1 d), 比较发酵乳 pH 值和乳酸含量, 并选出 2 株具有最低 pH 值、最高乳酸含量的高产乳酸菌。

(3) 菌株最适生长温度

将菌株分别按 2% 接种量接种至 MRS 液体培养基, 放于不同温度条件下(10、20、30、37、45、55、58 °C)恒温发酵 1 d。取样测定不同温度发酵液的 OD_{600} 值, 以确定菌株的最适生长温度。

(4) 菌株对盐的耐受性

将菌株分别按 2% 的接种量接种到含有不同 NaCl 浓度(0%、2.0%、4.0%、6.0%、8.0%、10.0%)的 MRS 液体培养基, 在该菌株的最佳生长温度下发酵 1 d。取样测定不同 NaCl 浓度发酵液的 OD_{600} 值, 以确定菌株的耐盐浓度。

(5) 菌株对 pH 的耐受性

将菌株分别按 2% 的接种量接种至初始 pH 不同(2.5、3.5、4.5、5.5、6.5、7.5)的 MRS 液体培养基中, 在菌株最适生长温度下发酵 1 d, 取样测定不同 pH 发酵液的 OD_{600} 值, 以确定菌株的最适 pH。

(6) 生长曲线和菌株发酵产酸能力

将鉴定后所需菌株发酵液以 2% 接种量接种于改良的牛乳培养基中, 37 °C 静置培养, 于 0–30 h (间隔 2 h) 取样测定 OD_{600} 值以及活菌数, 以培养时间为横坐标, 相应的 OD_{600} 值为纵坐标, 绘制生长曲线。

将菌株按 2% 接种量接种到含有 11% 牛乳的液体培养基中, 在菌株最适生长温度下发酵 1 d, 每 2 h 取样 1 次, 充分摇匀测定发酵液 pH 值及乳酸含量, 30 h 后绘制菌株的产酸曲线。

2 结果与分析

2.1 菌种的分离纯化及鉴定

2.1.1 乳酸菌的计数结果及分离结果

内蒙古赤峰地区 20 份桦树皮中乳酸菌的计数结果如表 1 所示。由表 1 可以看出, 内蒙古赤峰地区 20 份桦树皮样品中乳酸菌活菌数在

表 1 赤峰地区桦树皮中乳酸菌的计数结果

Table 1 Counting results of lactic acid bacteria in birch bark in Chifeng area

样品号 Sample No.	lg (CFU/mL)	样品号 Sample No.	lg (CFU/mL)
WSP1	8.95	NSP1	8.46
WSP2	8.17	NSP2	7.57
WSP3	9.86	NSP3	9.58
WSP4	9.83	NSP4	9.42
WSP5	8.18	NSP5	7.59
WSP6	8.23	NSP6	7.67
WSP7	9.83	NSP7	9.88
WSP8	8.86	NSP8	9.28
WSP9	9.88	NSP9	9.76
WSP10	9.89	NSP10	9.66

7.57–9.89 lg (CFU/mL) 之间, 表明内蒙古赤峰地区桦树皮样品中的乳酸菌资源较丰富。根据生理生化试验(菌落形态特征、革兰氏染色和过氧化氢酶试验等)共分离到 112 株乳酸菌。

2.1.2 菌种 DNA 提取和 16S rRNA 基因扩增结果

纯 DNA 样品浓度的 $OD_{260/280}$ 值在 1.8–2.0 间, 然后进行 16S rRNA 基因扩增。通过琼脂糖凝胶电泳检测, 在 1 500 bp 左右的位置处观察到一条清晰明亮、无弥散现象的条带, 表明菌株的 16S rRNA 基因扩增产物可以满足测序的要求。

2.1.3 系统发育树的构建和乳酸菌鉴定

将测序获得的 16S rRNA 基因序列进行同源序列比对分析, 桦树皮样品中 112 株分离株鉴定为乳酸菌的 3 个属 7 个种。赤峰地区桦树皮中部分内生和表生分离株与模式株系统发育树如图 1、2 所示。

由图 1 可以看出, IMAU98428 (MW135279)、IMAU98435 (MW135283)、IMAU98399 (MW135270)、IMAU98391 (MW135267) 和 IMAU98398 (MW135269) 与模式菌株 *Lactococcus lactis* ATCC19435^T (EU091395) 聚为一类, 且一致性为 100%, 因此将其鉴定为 *Lactococcus lactis*。菌株 IMAU98408 (MW135248)、IMAU98416 (MW135254)、IMAU98411 (MW135251)、IMAU98410 (MW135250) 和 IMAU98409

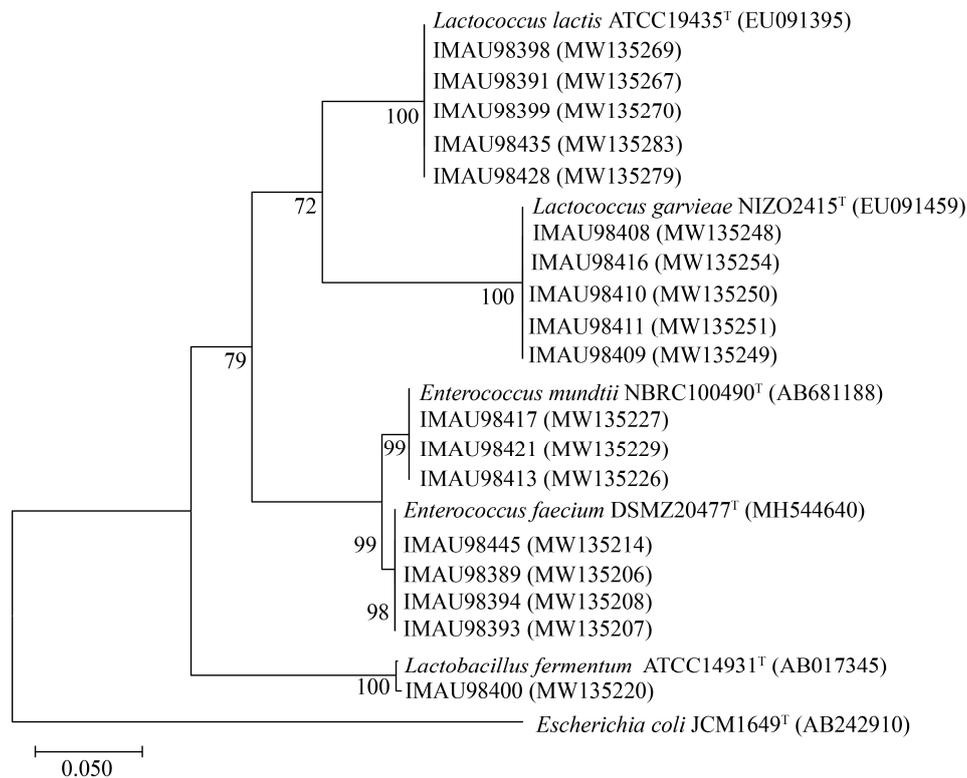


图 1 赤峰地区桦树皮内生部分菌株的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of the endophytic strains from birch bark in Chifeng area

注：分支点上的数字为 Bootstrap 值，代表分类单位被聚在一起的几率；比例尺显示水平线的长度，代表碱基替换数；括号里的序列为菌株的 GenBank 登录号

Note: The number on the branching point is the bootstrap value, which represents the probability that the taxon is clustered together; The scale bar shows the length of the horizontal line, which represents the number of base substitutions; The sequence in parentheses is the gene registration number of the strain

(MW135249) 与模式菌株 *Lactococcus garvieae* NIZO2415^T (EU091459) 聚为一类且一致性为 100%，因此将其鉴定为 *Lactococcus garvieae*。菌株 IMAU98417 (MW135227)、IMAU98421 (MW135229) 和 IMAU98413 (MW135226) 与模式菌株 *Enterococcus mundtii* NBRC100490^T (AB681188) 聚为一类且一致性为 99%，因此将其鉴定为 *Enterococcus mundtii*。菌株 IMAU98445 (MW135214)、IMAU98394 (MW135208)、IMAU98393 (MW135207) 和 IMAU98389 (MW135206) 与模式菌株 *Enterococcus faecium* DSMZ20477^T (MH544640) 聚为一类且一致性为 99%，因此将其鉴定为 *Enterococcus faecium*。菌

株 IMAU98400 (MW135220) 与模式菌株 *Lactobacillus fermentum* ATCC14931^T (AB017345) 聚为一类且一致性为 100%，因此将其鉴定为 *Lactobacillus fermentum*。

图 2 可以看出，菌株 IMAU98451 (MW135236)、IMAU98492 (MW135243)、IMAU98463 (MW135238) 和 IMAU98456 (MW135237) 与模式菌株 *Enterococcus mundtii* NBRC100490^T (AB681188) 聚为一类且相似性为 99%，因此将其鉴定为 *Enterococcus mundtii*。菌株 IMAU98461 (MW135203) 与模式菌株 *Enterococcus durans* NBRC100479^T (AB681177) 聚为一类且相似性为 100%，因此将其鉴定为

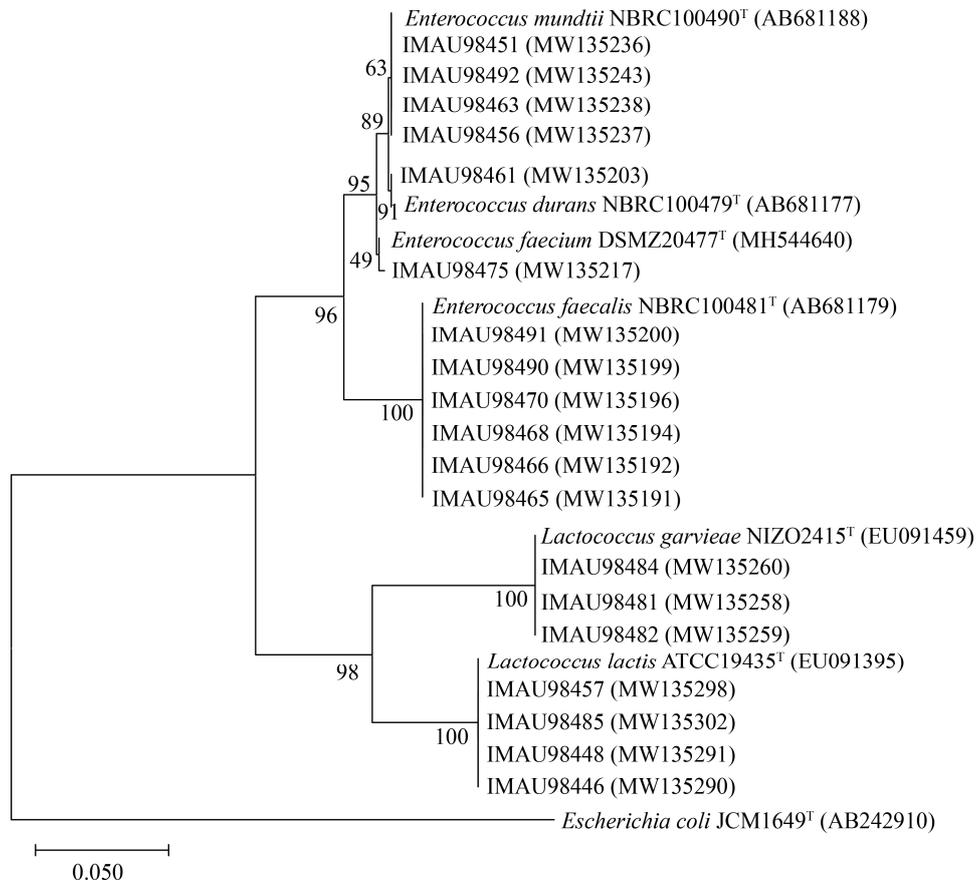


图 2 赤峰地区桦树皮表生部分菌株的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of some strains on birch bark in Chifeng area

注: 分支点上的数字为 Bootstrap 值, 代表分类单位被聚在一起的几率; 比例尺显示水平线的长度, 代表碱基替换数; 括号里的序列为菌株的基因登录号

Note: The number on the branching point is the bootstrap value, which represents the probability that the taxon is clustered together; The scale bar shows the length of the horizontal line, which represents the number of base substitutions; The sequence in parentheses is the gene registration number of the strain

Enterococcus durans。菌株 IMAU98475 (MW135217) 与模式菌株 *Enterococcus faecium* DSMZ20477^T (MH544640) 聚为一类且相似性为 99%, 因此将其鉴定为 *Enterococcus faecium*。菌株 IMAU98491 (MW135200)、IMAU98470 (MW135196)、IMAU98490 (MW135199)、IMAU98468 (MW135194)、IMAU98466 (MW135192) 和 IMAU98465 (MW135191) 与模式菌株 *Enterococcus faecalis* NBRC100481^T (AB681179) 聚为一类且相似性为 100%, 因此将其鉴定为 *Enterococcus faecalis*。菌株 IMAU98484 (MW135260)、IMAU98481 (MW135258) 和 IMAU98482

(MW135259) 与模式菌株 *Lactococcus garvieae* NIZO2415^T (EU091459) 聚为一类且相似性为 99%, 因此将其鉴定为 *Lactococcus garvieae*。菌株 IMAU98457 (MW135298)、IMAU98485 (MW135302)、IMAU98448 (MW135291) 和 IMAU98446 (MW135290) 与模式菌株 *Lactococcus lactis* ATCC19435^T (EU091395) 聚为一类且相似性为 100%, 因此将其鉴定为 *Lactococcus lactis*。

2.1.4 树皮内生与表生乳酸菌菌种对比分析

由赤峰地区桦树皮内生和表生乳酸菌菌株对比结果(图 3)可知, 自树皮内生部中分离的菌株

共 59 株, 分属于 3 个属 5 个种, 包含 *Enterococcus faecium* 11 株(分离自样品 NSP3、NSP6、NSP9), *Enterococcus mundtii* 14 株(分离自样品 NSP7、NSP8、NSP9、NSP10、NSP1、NSP2), *Lactobacillus fermentum* 1 株(分离自样品 NSP4), *Lactococcus garvieae* 9 株(分离自样品 NSP3、NSP5、NSP7), *Lactococcus lactis* 24 株(分离自样品 NSP3、NSP4、NSP9、NSP10), 其中 *Lactococcus lactis* 为桦树皮内生样品的优势菌株, 占内生总分离株的 40.7%。

自树皮表皮生中分离的菌株共 53 株, 分属于 2 个属 6 个种, *Enterococcus durans* 1 株(分离自样品 WSP9), *Enterococcus faecalis* 12 株(分离自样品 WSP3、WSP4、WSP8), *Enterococcus faecium*

5 株(分离自样品 WSP1、WSP9), *Enterococcus mundtii* 13 株(分离自样品 WSP1、WSP6、WSP8、WSP9、WSP10), *Lactococcus garvieae* 9 株(分离自样品 WSP5、WSP7), *Lactococcus lactis* 13 株(分离自样品 WSP7、WSP9、NSP10)。从本实验可得出, 桦树皮表生样品与内生样品相比, 发现样品 (WSP3、WSP4、WSP8、WSP9) 中包含 *Enterococcus faecalis* 和 *Enterococcus durans* 共 13 株且内生样品 (NSP4) 含有 *Lactobacillus fermentum* 菌株 1 株。

2.1.5 优势菌种分析

由内蒙古赤峰地区 20 份桦树皮中乳酸菌的分离鉴定结果(表 2)和乳酸菌分离株的相对含量(图 4)可知, 20 份桦树皮中分离出的 112 株乳酸菌疑似

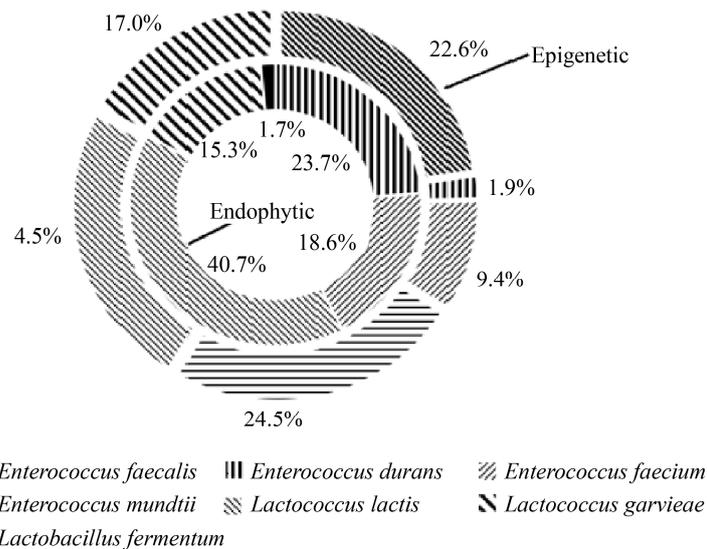


图 3 赤峰地区桦树皮内生和表生乳酸菌菌株对比结果

Figure 3 Comparison of endophytic and epiphytic lactic acid bacteria in birch bark in Chifeng area

表 2 赤峰地区桦树皮内生和表生乳酸菌菌株的分离鉴定结果

Table 2 Isolation and identification results of endophytic and epiphytic lactic acid bacteria from birch bark in Chifeng area

菌名 Name	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	SP6	SP7	SP8	SP9	SP10	总计 Total
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	2	6	0	0	0	4	0	0	12
<i>Enterococcus durans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Enterococcus faecium</i>	4	0	8	0	0	2	0	0	2	0	16
<i>Enterococcus mundtii</i>	5	2	0	0	0	2	3	8	2	5	27
<i>Lactococcus lactis</i>	0	0	3	5	0	0	1	0	13	15	37
<i>Lactococcus garvieae</i>	0	0	1	0	4	0	13	0	0	0	18
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
总计 Total	9	2	14	12	4	4	17	12	18	20	112

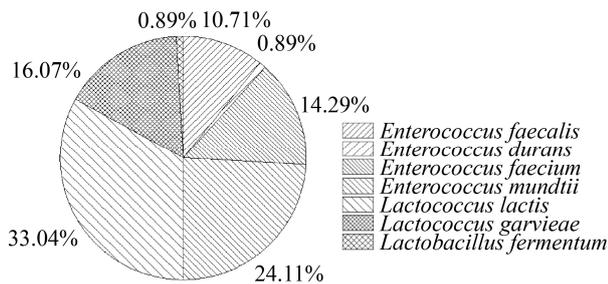


图4 乳酸菌分离株的相对含量

Figure 4 Relative content of lactic acid bacteria isolates

菌株, 经 16S rRNA 基因序列测定和相似性分析鉴定, 分属于 3 个属 7 个种。5 份样品(SP3、SP4、SP7、SP9、SP10)均分离到 *Lactococcus lactis*, 共 37 株, 占总分离株的 33%, 为 5 份内蒙古赤峰地区桦树皮的优势菌种。除了样品 SP3、SP4、SP5, 其余 7 份均分离到 *Enterococcus mundtii*, 共 27 株, 占总分离株的 24%, 为 7 份内蒙古赤峰地区桦树皮的次级优势菌种。由表 2 还可以看出, SP3、SP9 分离的菌种类别最多, 有 4 种; 其次, 从 SP4、SP7 分离的菌种有 3 种; SP2、SP5 分离的菌种类别只有 1 种且菌种数很少; SP6 分离的菌种类别有 2 种但菌种数很少, 可能是由于这三种样品采样量很少, 以后研究进行改善。综上所述, 内蒙古赤峰地区桦树皮的优势菌种为 *Lactococcus lactis*, 占总分离株的 33%。

2.2 生理生化特性

2.2.1 最适温度的确定

由图 5 可知, 当温度为 37 °C 时 OD_{600} 值最大, 此温度下, 菌株 IMAU98457 和 IMAU98428 生长得最好。在温度低于 30 °C 的情况下, OD_{600} 值随温度的升高而逐渐升高, 菌株 IMAU98457 和 IMAU98428 随温度的升高增长加快。在温度大于 37 °C 的情况下, OD_{600} 值随着温度升高而迅速下降; 随温度的升高, 菌株 IMAU98457、IMAU98428 活性降低, 从而生长受抑制, 细菌悬液浓度越低。

2.2.2 菌株对 pH 的耐受性

由图 6 中可以看出, 当 pH 为 7.5 时, OD_{600} 值最高, 此时 IMAU98457 和 IMAU98428 生长最

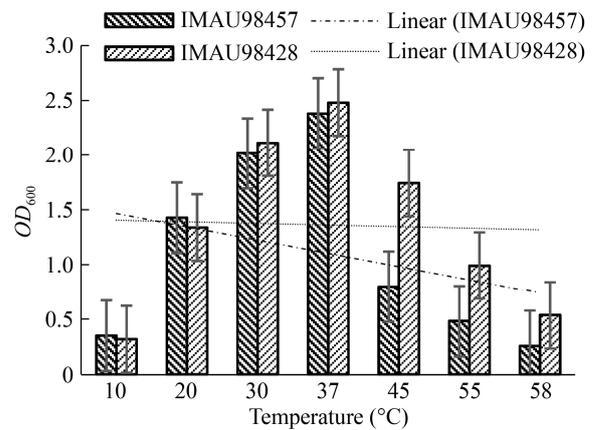


图5 菌株 IMAU98457 和 IMAU98428 的最适温度的确定

Figure 5 Determination of the optimum temperature of strains IMAU98457 and IMAU98428

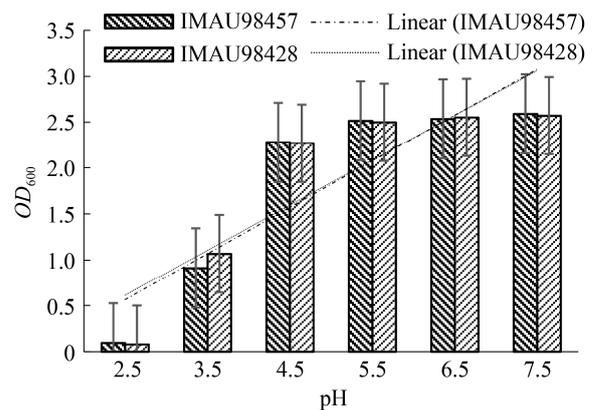


图6 菌株 IMAU98457 和 IMAU98428 的最适 pH 的确定

Figure 6 Determination of the optimal pH of strains IMAU98457 and IMAU98428

佳; 当 pH 低于 7.5 时, OD_{600} 值呈逐渐上升的趋势, 菌悬液的浓度越高; 当 pH 为 2.5 以下时, OD_{600} 值趋于 0, 此时 IMAU98457 和 IMAU98428 几乎不生长; 当 pH 超过 5.5 时, OD_{600} 值呈平缓上升趋势, 因此菌株 IMAU98457 和 IMAU98428 的适宜 pH 范围为 5.5–7.5。

2.2.3 菌株 IMAU98457 和 IMAU98428 对盐的耐受性

由图 7 可以看出, IMAU98457 和 IMAU98428 具有一定程度的耐盐性, 当液体培养基 NaCl 浓

度小于 2%，则 OD_{600} 值不会发生显著变化，表明在 NaCl 浓度小于 2% 的范围内，对菌株 IMAU98457 和 IMAU98428 的生长没有明显影响；当 NaCl 浓度高于 2% 时， OD_{600} 值呈下降趋势，此时 IMAU98457 和 IMAU98428 的生长受到一定程度的抑制，且随着 NaCl 浓度的升高而抑制菌株效果越明显；当 NaCl 浓度大于 10%， OD_{600} 值很小，表明 IMAU98457 和 IMAU98428 几乎不生长。

2.2.4 生长曲线的绘制和菌株的产酸能力测定

菌株 IMAU98457 的生长曲线见图 8，0–2 h 时， OD_{600} 值基本保持没变，该时期是菌株的生长延滞期，并且在此期间活细菌的数量几乎没有增加；2 h 后， OD_{600} 值迅速增加并开始进入对数生长期；2–14 h 为菌株的对数生长期，此期间活菌数量呈对数增加；在 14 h 后 OD_{600} 值缓慢增加并开始进入稳定期，18 h 活菌数达到最高，24 h 后， OD_{600} 值有大幅度下降趋势，菌株进入衰亡期，活菌数呈下降趋势。同时，由图 8 可知 0–2 h 时，pH 变化不大，2–14 h 时，菌株进入对数生长期后，pH 急剧下降，菌株产生乳酸的速度越快，pH 下降越快，抑制其他细菌的能力越强；20 h 时，pH 最低达到 4.36，20 h 后，pH 缓慢降低并逐渐稳定，菌株进入稳定期时，此期间 pH 较低；24 h

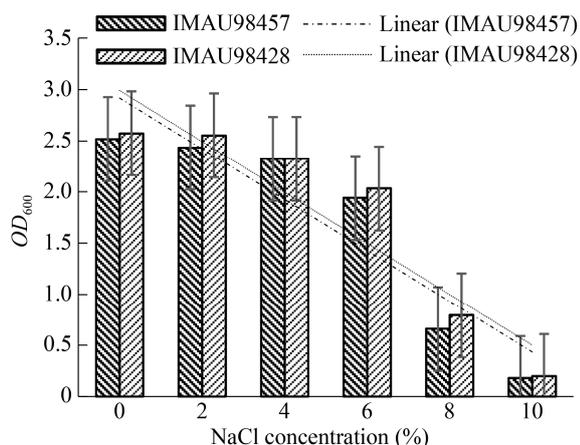


图 7 菌株 IMAU98457 和 IMAU98428 对盐的耐受性
Figure 7 Tolerance of strains IMAU98457 and IMAU98428 to sodium chloride

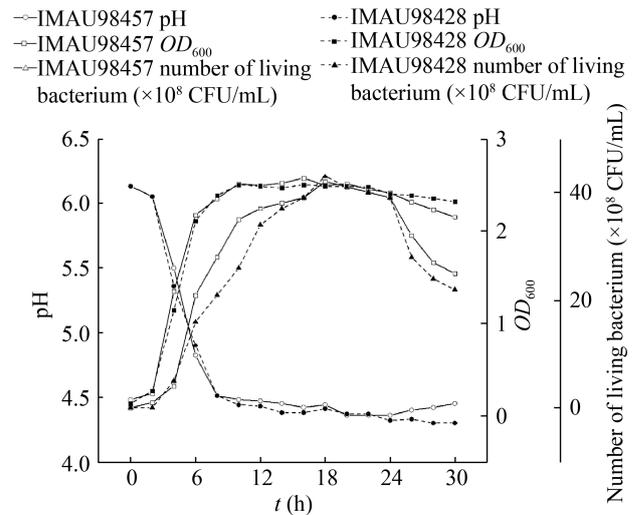


图 8 菌株 IMAU98457 和 IMAU98428 的生长曲线及产酸能力的测定

Figure 8 Determination of growth curve and acid production capacity of strain IMAU98457 and IMAU98428

后，pH 呈上升趋势，并且菌株进入衰亡期。此时期 pH 较低，24 h 后，pH 有上升趋势，菌株进入衰亡期。

菌株 IMAU98428 的生长曲线见图 8，0–2 h 时， OD_{600} 值基本没变且为菌株的生长延滞期。2 h 后， OD_{600} 值迅速上升并开始进入对数生长期；菌株的对数生长期是 2–16 h，在此期间，活细菌数呈对数增加；16 h 后 OD_{600} 值缓慢增加，开始进入菌株的稳定期，这也是活菌数最多的时期；24 h 后， OD_{600} 值显示出下降趋势，并且菌株进入衰亡期，活菌数显示出下降倾向。同时，由图 8 可知 0–2 h 时，pH 变化不大，2–16 h 时，菌株进入对数生长期后，pH 急剧下降，菌株产生乳酸速度越快，pH 下降越快，抑制其他细菌的能力越强。24 h 时，pH 达到最低 4.32，24 h 后，随着的 pH 的下降直到趋于稳定，当菌株进入稳定期时，在此期间 pH 较低，24 h 后，pH 略有上升趋势，进入衰亡期。0–6 h，菌株 IMAU98457 比 IMAU98428 乳酸菌产酸速度快；0–16 h，菌株 IMAU98457 比 IMAU98428 的 OD_{600} 值较高，因此菌株 IMAU98457 比 IMAU98428 的生长速度较快。

3 讨论

由于内生微生物存在于宿主植物的内部, 与表生微生物相比, 内生微生物与宿主植物的共生关系更为密切且相互影响。“内共生理论”中描述到, 长期共存和直接接触会导致内生微生物与宿主之间的遗传物质进行交换, 这主要是因为内生微生物吸收了宿主一部分代谢物质, 因此两者都具有相似的代谢途径^[17]。研究表明, 在马铃薯的块茎中含有大量的内生菌资源^[18], 因此本研究从内生和表生微生物 2 个方向, 对桦树皮中的乳酸菌进行分离鉴定及其生物多样性研究, 对后续的研究有一定的指导意义。结果表明, 桦树皮内生菌分属于 3 个属 5 个种, 其中 *Lactococcus lactis* 为桦树皮内生样品的优势菌株, 占内生总分离株的 21%, *Lactococcus* 菌属占内生总分离株 54%, 且含有 *Lactobacillus fermentum*。桦树皮表生菌包含 2 个属 6 个种, *Enterococcus faecalis* 和 *Enterococcus mundtii* 占桦树皮表生菌总数的 49%, *Enterococcus* 菌属为表生总分离株的优势菌属。由此可知, 内生样品较表生样品的菌株种类资源更为丰富, 且二者的优势菌属具有较大的差异, 推测造成这种原因可能是桦树皮外部受外界因素影响以及桦树皮的内部生长代谢造就的, 具体成因还需进一步研究分析。

研究表明, 植物的表生和内生菌群即使在同一片叶子上也有很大的差别, 尤其是菌种数量存在着显著差异, 尽管它们仅相隔几毫米^[19]。但研究同种菌株在同一植物内部和外部生长环境下的差异性几乎没有, 因此本实验进一步探讨了树皮中内生和表生乳酸乳球菌的差异性。通过比较 2 株乳酸乳球菌 IMAU98457 (表生菌) 和 IMAU98428 (内生菌) 在最适温度、pH 耐受性、盐耐受性、产酸能力等生理生化特性可知, IMAU98428 较 IMAU98457 更耐高温, 在温度值为 30、37、45、55 和 58 °C 下, IMAU98428 明显较 IMAU98457 的 OD_{600} 值更高, 因此生长情况更好; IMAU98428

较 IMAU98457 的盐耐受性更好, 在 NaCl 浓度为 6% 和 8% 时, IMAU98428 较 IMAU98457 的生长情况更好。从而可知表生与内生乳酸菌存在着一定的差异性, 树皮中内生乳酸乳球菌较表生乳酸乳球菌更耐高温, 而且对盐的耐受性更好。

发酵乳制品令人愉悦的味道是因为乳酸菌可以牛乳中的一些成分物质转变成了芳香类的风味物质^[20], 在发酵乳制品制作过程中, 乳酸乳球菌作为最重要的菌种, 常用于发酵乳制品的生产^[21]; 乳酸菌肽(Nisin)是由乳酸乳球菌产生的 34 个氨基酸组成的短肽, 可以有效杀死芽孢特别是对食品中的致病菌(如肉毒梭菌、李斯特菌等)有很强的抑制作用, 研究表明乳酸菌肽有很高的热稳定性^[22-23], 因此其广泛用作食品工业中的食品添加剂。因此, 本实验在桦树皮内生和表生乳酸菌分离鉴定及其生物多样性研究的基础上, 从桦树皮内生和表生样品中分得出的 37 株 *Lactococcus lactis*, 通过复筛得到 2 株繁殖速度快、产酸量较高、pH 较低的菌株 IMAU98457 和 IMAU98428。下一步的工作将对乳酸乳球菌 IMAU98457 和 IMAU98428 的发酵条件进行优化, 并探讨利用高产酸 IMAU98457 和 IMAU98428 混合制得的发酵剂, 期望在理化指标及微生物指标均符合国家标准的情况下, 具有一定商业价值。

4 结论

本研究从内蒙古赤峰地区采集的 20 份桦树皮样品中乳酸菌数为 7.57–9.89 lg (CFU/mL) 之间, 乳酸菌含量都比较高。从 20 份内生和外生桦树皮样品中分离到 112 株乳酸菌, 其中包含树皮内生菌株 59 株和表生菌株 53 株, 鉴定为 3 个属 7 个种, 包括 *Enterococcus mundtii* (27 株)、*Enterococcus faecium* (16 株)、*Enterococcus faecalis* (12 株)、*Enterococcus durans* (1 株)、*Lactococcus lactis* (37 株)、*Lactococcus garvieae* (18 株)、*Lactobacillus fermentum* (1 株)。其中 *Lactococcus lactis* 为内蒙古自治区赤峰市桦树皮样品的优势菌

株, 占总分离株的 33%。桦树皮外生样品与内生样品相比, 发现样品(WSP3、WSP4、WSP8、WSP9)中包含 *Enterococcus faecalis* 和 *Enterococcus durans* 共 18 株, 且内生样品(NSP4)含有 *Lactobacillus fermentum* 菌株 1 株。从该桦树皮样品的优势菌株 *Lactococcus lactis* 中筛得 2 株繁殖速度快、产酸量较高、pH 较低的菌株 NSP10-5 和 WSP9-10。通过生物学特性的研究, 菌株 IMAU98457 和 IMAU98428 的最适生长温度为 37 °C, pH 为 5.5–7.5 生长较好; 其在 37 °C 条件下发酵 18 h 后, 发现其活菌数量最高且 pH 值最低, 在 pH 4.5 下也能生长。另外菌株 IMAU98457 和 IMAU98428 有一定的盐耐受性, 当 NaCl 浓度大于 6% 时菌株生长受到明显抑制。表生与内生乳酸菌存在一定的差异性, 树皮中内生乳酸乳球菌较表生乳酸乳球菌更耐高温, 对盐的耐受性更好。

REFERENCES

- [1] Turner TR, James EK, Poole PS. The plant microbiome[J]. *Genome Biology*, 2013, 14(6): 1-10
- [2] Trias R, Bañeras L, Montesinos E, Badosa E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi[J]. *International Microbiology*, 2008, 11(4): 231-236
- [3] Mao YJ, Chen M, Horvath P. *Lactobacillus herbarum* sp. nov., a species related to *Lactobacillus plantarum*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(12): 4682-4688
- [4] Irisawa T, Okada S. *Lactobacillus sucicola* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from oak tree (*Quercus* sp.) Sap[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(Pt 11): 2662-2665
- [5] Aschenbrenner IA, Cernava T, Erlacher A, Berg G, Grube M. Differential sharing and distinct co-occurrence networks among spatially close bacterial microbiota of bark, mosses and lichens[J]. *Molecular Ecology*, 2017, 26(10): 2826-2838
- [6] Maignien L, DeForce EA, Chafee ME, Eren AM, Simmons SL. Ecological succession and stochastic variation in the assembly of *Arabidopsis thaliana* phyllosphere communities[J]. *mBio*, 2014, 5(1): e00682-e00613
- [7] Zhai QL, Fan GZ, Zhan YG. Research progress of biotechnology on birch[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(4): 93-98 (in Chinese)
翟俏丽, 范桂枝, 詹亚光. 桦树生物技术研究进展[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(4): 93-98
- [8] Yin SL, Du J, Xu C. Advances in the research and application of *Lactobacillus*[J]. *Food Science and Technology*, 2012, 37(9): 25-29 (in Chinese)
尹胜利, 杜鉴, 徐晨. 乳酸菌的研究现状及其应用[J]. *食品科技*, 2012, 37(9): 25-29
- [9] Bao QH, Yu J, Liu WJ, Qing MJ, Wang WH, Chen X, Wang F, Li MH, Wang HM, Lv Q, et al. Predominant lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk products in the Sichuan province of China[J]. *Dairy Science & Technology*, 2012, 92(3): 309-319
- [10] Yu J, Wang WH, Menghe BLG, Jiri MT, Wang HM, Liu WJ, Bao QH, Lu Q, Zhang JC, Wang F, et al. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia[J]. *Journal of Dairy Science*, 2011, 94(7): 3229-3241
- [11] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial Identification System Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
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
- [12] Sun ZH, Liu WJ, Gao W, Yang M, Zhang JC, Wu L, Wang JG, Menghe B, Sun TS, Zhang HP. Identification and characterization of the dominant lactic acid bacteria from kurut: the naturally fermented yak milk in Qinghai, China[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2010, 56(1): 1-10
- [13] Wu JR, Wang XR, Tang XY, Wang QQ, Wu RN, Yue XQ. Identification of lactic acid bacteria and yeast from naturally fermented soybean paste from Liaoning province[J]. *Food Science*, 2015, 36(9): 78-83 (in Chinese)
武俊瑞, 王晓蕊, 唐筱扬, 王茜茜, 乌日娜, 岳喜庆. 辽宁传统发酵豆酱中乳酸菌及酵母菌分离鉴定[J]. *食品科学*, 2015, 36(9): 78-83
- [14] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389-3402
- [15] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729
- [16] Ling DW, Dong XZ. Classification, Identification and Experimental Method of Lactic Acid Bacteria[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999 (in Chinese)
凌代文, 东秀珠. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [17] Wen CY, Wu YH, Tian XL. Recent advances and issues on the endophyte[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2004, 23(2): 86-91 (in Chinese)
文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在

- 的问题[J]. 生态学杂志, 2004, 23(2): 86-91
- [18] Qu QS, Peng WL, Zhai LM, Liu X, Lin RS. Isolation and identification of endophytic bacteria and analysis of population diversity in different potato varieties[J]. China Vegetables, 2016(6): 41-46 (in Chinese)
屈青松, 彭万里, 翟立明, 刘晓, 林榕姗. 马铃薯内生细菌的分离鉴定及种群多样性分析[J]. 中国蔬菜, 2016(6): 41-46
- [19] Santamaría J, Bayman P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*)[J]. Microbial Ecology, 2005, 50(1): 1-8
- [20] Santos MV, Ma Y, Caplan Z, Barbano DM. Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk[J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(5): 1601-1607
- [21] Klijjn N, Weerkamp AH, De Vos WM. Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(7): 2771-2774
- [22] Kong J, Zhuang XL, Ma GR. Continuous production of nisin by calcium alginate-immobilized *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sm526[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2001, 41(6): 731-735 (in Chinese)
孔健, 庄绪亮, 马桂荣. 固定化乳酸乳球菌连续生产 Nisin 的研究[J]. 微生物学报, 2001, 41(6): 731-735
- [23] Shen F, Zhang HY, Wu JX. The effect of microwave mutagenesis on production of *Lactococcus lactis* producing nisin[J]. Food Research and Development, 2006, 27(11): 26-28 (in Chinese)
申斐, 张贺迎, 武金霞. 微波诱变对乳酸乳球菌 Nisin 产量的影响[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(11): 26-28