

应用特异 PCR 快速鉴定微生物肥料中 4 种乳酸菌

杨小红* 曹凤明 关大伟 冯瑞华 陈慧君 李俊 沈德龙 马鸣超

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 农业部微生物肥料和食用菌菌种质量监督检验测试中心
北京 100081)

摘 要:【目的】植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*)、嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)和德氏乳杆菌(*L. delbrueckii*)是微生物肥料生产中常用的乳酸菌, 它们表型特征相似, 若采用传统方法鉴定则费时费力, 为准确、快速地鉴定这些种, 建立种特异 PCR 方法。【方法】利用 NCBI 中 Primer-BLAST (引物设计和特异性检验工具), 以 GenBank 数据库中上述菌种的 *recA* 和 *gyrB* 为靶基因, 设计和筛选种特异性引物从而建立相应特异 PCR 鉴定方法。【结果】经过乳杆菌属(*Lactobacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、片球菌属(*Pediococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*) 7 个属 24 个种共 40 株标准菌株的实验验证, 4 个目标种分别扩增出唯一的产物, 而其他种均无目的扩增产物。采用建立的 4 种特异 PCR 方法对产品中分离的 16 株乳杆菌进行鉴定, 结果与 16S rDNA 序列分析、Biolog 鉴定结果一致。【结论】建立的特异 PCR 鉴定方法均具有较高的种内通用性和种间特异性, 可快速、准确的用于微生物制剂中植物乳杆菌、德氏乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、嗜酸乳杆菌的检测和鉴定, 具有较好的应用前景。

关键词: 特异 PCR, 特异引物, 乳酸菌, 鉴定, 微生物肥料

Rapid identification of four lactic acid bacteria using specific PCR in microbial fertilizers

YANG Xiao-Hong* CAO Feng-Ming GUAN Da-Wei FENG Rui-Hua CHEN Hui-Jun
LI Jun SHEN De-Long MA Ming-Chao

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Center for Quality Supervision and Test of Microbial Fertilizers and Mushroom Spawn, Ministry of Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: [Objective] *Lactobacillus plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* and *L. delbrueckii*, which were widely used in microbial fertilizers, were indistinguishable from each other just by phenotypic characteristics. Rapid identification of the lactic acid bacteria by specific PCR was necessary for detection and ecological evaluation of microbial fertilizers. [Methods] In this study, based on *recA* and *gyrB* genes, four pairs of species-specific primers were designed, and the corresponding specific PCR methods were established. [Results] Forty reference strains belonging

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 31200388); 中央级公益性科研院所专项资金资助项目(No. IARRP-2013-1, IARRP-2014-19)

*通讯作者: Tel: 86-10-82108675; ✉: yangxh200599@sina.com

收稿日期: 2013-05-14; 接受日期: 2013-07-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

to seven genera, such as *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* and *Pseudomonas*, were tested. The results showed that, the target single band was consistently amplified from only the 4 strains of lactic acid bacteria. Meanwhile, sixteen strains of lactic acid bacteria from microbial fertilizer products were identified by this specific PCR, the results were consistent with that of 16S rDNA sequence analysis and Biolog. **[Conclusion]** The methods of specific PCR were species-specific and effective, and could be used in the rapid identification of *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* and *L. delbrueckii*. The results will provide technical supports for the detection and ecological evaluation of microbial fertilizer.

Keywords: Specific PCR, Species-specific primers, Lactic acid bacteria, Identification, Microbial fertilizers

乳酸菌(Lactic acid bacteria)是指能发酵糖类且主要产物为乳酸的一类无芽孢、革兰氏染色阳性细菌的总称。具有维持肠道内菌群平衡, 提高机体免疫力, 促进营养物质吸收等多种重要的生理功能, 与机体的健康息息相关^[1]。广泛用于制造酸奶、乳酪、泡菜、植物蛋白饮料、肉制品加工及医用益生菌制剂的生产, 是食品和药品行业中的重要菌种^[2-3]。近年来, 乳酸菌更多的功能被人们开发, 应用领域不断拓展, 以乳酸菌为主要菌或组成菌制成的微生物制剂应用于秸秆腐熟, 饲料青贮, 水体净化、除臭, 土壤改良等方面, 取得很好的效果^[4-8]。在微生物肥料行业, 以乳酸菌(主要是乳杆菌)作为有效菌的产品越来越多, 准确的识别和鉴定微生物制剂中的各种菌是产品质量判定的重要依据, 而选择一种快速而准确的鉴定方法对于每天要进行大量检测工作的质检机构尤为重要。

乳杆菌属的许多种其菌体、菌落形态特征相似难辨, 生理生化特性也存在许多相似之处^[9]。传统的生理生化试验耗时费力, Biolog 快速鉴定系统、脂肪酸分析等测定繁琐、成本高, 这些方法不能满足微生物肥料检测中的快速、准确的需要。至今, 已有许多分子鉴定技术和分类方法被用于乳酸菌的分类和鉴定^[10-11]。其中, 特异(引物) PCR 技术以其简单、快速、准确及成本低等优点备受检验、检疫部门青睐, 已在临床诊断、流行病学调查、食品检测、土壤微生物等领域广为应用^[12-16]。

笔者以微生物肥料中常见的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、德氏乳杆菌(*L.*

delbrueckii)、鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*)和嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)为材料, 用 NCBI 中 Primer-BLAST (引物设计和特异性检验工具)设计种特异性引物, 而后通过优化 PCR 反应的退火温度、引物浓度、 Mg^{2+} 等关键因子, 建立 4 种菌的快速鉴定特异 PCR 方法, 应用于微生物肥料产品检测过程中的菌种识别与鉴定, 以提高质检效率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 31 株乳杆菌属参考菌株及 9 株非乳杆菌属参考菌株的编号及来源见表 1; 乳杆菌属、片球菌属和乳球菌属菌株采用 MRS 琼脂^[17]平板划线, 厌氧培养, 分离与纯化; 胶冻样类芽孢杆菌采用硅酸盐细菌培养基^[17], 其他菌株采用营养琼脂^[17]平板划线、分离与纯化。16 株生产菌株根据菌落、菌体特征及生化试验从微生物肥料产品中分离筛选得到, 采用 MRS 琼脂平板划线分离与纯化。

1.1.2 主要试剂和仪器: *Taq* DNA 聚合酶和 dNTPs 购自天根生物技术公司(北京); DNA marker 购自宝生物工程(大连)有限公司。C1000 型 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; 3K15 型低温冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; 细胞破碎仪, 美国 Biospec 公司; 核酸电泳仪, 北京市六一仪器厂; 凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 模板的制备: 乳酸菌接种于 MRS 琼脂培养基, 37 °C 厌氧培养 16–24 h, 胶冻

表 1 实验用参考菌株		
Table 1 List of reference strains used in this study		
菌种 Species	菌株编号 Number of strains	
植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	CGMCC1.2437 ^T , CGMCC1.2158, CGMCC1.555, ACCC10533, ACCC10644	
嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	CGMCC1.1878 ^T , CGMCC1.2686, CGMCC1.1854, CICC6075, CGMCC1.2467	
德氏乳杆菌保加利亚亚种 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CGMCC1.1863, CGMCC1.1482, CGMCC1.1480	
德氏乳杆菌乳亚种 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CGMCC1.2625 ^T , CGMCC1.2142	
德氏乳杆菌德氏亚种 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	CGMCC1.2624 ^T	
鼠李糖乳杆菌 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ACCC10534 ^T , CGMCC1.104, CGMCC1.552, CGMCC1.26	
布氏乳杆菌 <i>Lactobacillus buchneri</i>	CGMCC1.13	
干酪乳杆菌干酪亚种 <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	CGMCC1.2435	
鼠乳杆菌 <i>Lactobacillus murinus</i>	CGMCC1.2626 ^T	
动物乳杆菌 <i>Lactobacillus animalis</i>	CGMCC1.2623	
清酒乳杆菌 <i>Lactobacillus sake</i>	CGMCC1.6	
瑞士乳杆菌 <i>Lactobacillus helveticus</i>	ACCC10532 ^T	
发酵乳杆菌 <i>Lactobacillus fermentum</i>	CGMCC1.1880 ^T	
玉米乳杆菌 <i>Lactobacillus zeae</i>	CICC20290	
戊糖乳杆菌 <i>Lactobacillus pentosus</i>	CICC20301	
高加索酸奶乳杆菌 <i>Lactobacillus kefir</i>	CICC6080	
类植物乳杆菌 <i>Lactobacillus paraplantarum</i>	CICC22192	
戊糖片球菌 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	CGMCC1.2695	
乳酸乳球菌乳亚种 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	CGMCC1.2829	
恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i>	CGMCC1.1839	
侧孢短芽孢杆菌 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	CGMCC1.2012 ^T	
巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	CCTCCAB92075 ^T	
地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	CCTCCAB92069 ^T	
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	CCTCCAB92068 ^T	
多粘类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus polymyxa</i>	CCTCCAB92076 ^T	
胶冻样类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	VKPM B-7519 ^T	

样类芽孢杆菌接种于硅酸盐细菌培养基 ,其他菌株接种于营养琼脂, 30 °C 培养 16–24 h ,用无菌水收集培养物 , 参照 Bead-beater 法^[18]并作一定改进快速提取各菌株的基因组 DNA。

1.2.2 种特异性 PCR 引物设计: 通过分析比较 GenBank 数据库中上述菌种及其相近种的 16S rRNA、*gyrB*、*recA*、*hsp60*、16S-23S ITS、*lacZ* 等基因序列的差异 ,确定植物乳杆菌和德氏乳杆菌引物设计的靶基因为 *recA* (重组蛋白基因) ,鼠李糖乳

杆菌和嗜酸乳杆菌为 *gyrB* (促旋酶基因)。利用 NCBI 中 Primer-BLAST (引物设计和特异性检验工具)设计引物并同时在 GenBank 数据库中进行引物特异性验证 , 最终筛选出上述特异性引物各 1 对 , 分别为 planF/planR (植物乳杆菌特异引物)、aciF/aciR (嗜酸乳杆菌特异引物)、delF/delR (德氏乳杆菌特异引物)和 rhaF/rhaR (鼠李糖乳杆菌特异引物)。表 2 为各引物序列 , 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 2 4 种乳杆菌的特异 PCR 引物 Table 2 Specific PCR primers of four <i>Lactobacillus</i> species				
菌种 Species	引物序列 Primer sequences (5'→3')	基因 Genes	注册号 GenBank accession No.	PCR 产物大小 PCR products (bp)
<i>L. plantarum</i>	planF: GTTGACTCGGTGGCGGCCTT	<i>recA</i>	AJ292255.1	100
	planR: GGAGCGCTTGATGACATCAGCCG			
<i>L. acidophilus</i>	aciF: AGTTGGTACGGTGCCGCTTGA	<i>gyrB</i>	EU647686.1	397
	aciR: TCCAGCTTCGTGCATCCCACC			
<i>L. delbrueckii</i>	delF: GCGGATGGGCGAGAAGGTCG	<i>recA</i>	NC008054.1	182
	delR: CGCCCCGCTTCTGCACTTCA			
<i>L. rhamnosus</i>	rhaF: GACGCAGCCGGTTGACCCAA	<i>gyrB</i>	NC013199.1	376
	rhaR: GGCGGCAGTTGCCCCAGAAT			

1.2.3 特异 PCR 反应体系及程序: 以参考菌株的基因组 DNA 为模板, 利用设计好的特异性引物进行 PCR 扩增。PCR 反应总体系为 20 μ L, 包括 10 \times PCR Buffer (不含 Mg^{2+}) 2.0 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 1.6 μ L, dNTP mixture (各 2.5 mmol/L) 1.6 μ L, 引物 F (20 μ mol/L)、引物 R (20 μ mol/L)各 0.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.2 μ L, 模板 DNA 50 ng, 加无菌重蒸水补足至 20 μ L。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 60 s, 67 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 PCR 特异性验证实验: 用 4 对引物分别对 40 株参考菌株进行扩增, 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 特异 PCR 产物测序: 对菌株 *L. plantarum* CGMCC1.2437^T, *L. rhamnosus* ACCC10534^T, *L. acidophilus* CGMCC1.1878^T, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* CGMCC1.2624^T的 PCR 产物进行测序, 由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.2.6 生产菌株的检测: 采用 Biolog 方法和 16S rDNA 序列分析方法对 16 株从微生物肥料产品中分离的乳杆菌进行鉴定, 然后分别用 4 对引物采用特异 PCR 方法对其进行鉴定, 检验本实验建立的特异 PCR 方法与其他方法鉴定结果是否一致。

1.2.7 16S rDNA 序列分析方法: 以生产菌株基因组 DNA 为模板, 采用通用引物 27F 和 1492R^[19]

进行 16S rDNA 扩增, PCR 产物经纯化后测序, 所测 16S rDNA 序列经校对、拼接后与 GenBank 数据库中相关种属的序列进行 BLAST 比较。反应体系 (50 μ L): 10 \times PCR buffer 5.0 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 4 μ L, dNTP mixture (各 2.5 mmol/L) 5 μ L, 引物 27F 和 1492R (10 μ mol/L)各 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, 模板 DNA 100 ng, 加无菌重蒸水补足至 50 μ L。扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 93 $^{\circ}$ C 60 s, 50 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 70 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

2 结果与分析

2.1 乳杆菌 PCR 方法的特异性检测

使用 4 对特异引物分别对 31 株乳杆菌属参考菌株(表 1)进行 PCR 扩增, 结果显示, 所有目标菌株中 1 株嗜酸乳杆菌 CGMCC1.2467 除外, 均产生唯一目的条带, 非目标菌株均没有扩增出目的条带。图 1A、B、C、D 显示的是各个目标种所有菌株及非目标种代表菌株的 PCR 结果。将嗜酸乳杆菌 CGMCC1.2467 基因进行 16S rDNA 扩增, 测序后与 GenBank 数据库和 RDP 数据库中相关种属的序列进行比较, 结果均显示与鼠李糖乳杆菌的序列一致性最高, 达到 100%; 采用 Biolog 对该菌进行鉴定, 结果也是鼠李糖乳杆菌。利用鼠李糖乳杆菌特异引物对该菌进行特异 PCR, 扩增结果为阳性(图 1D)。

使用 4 对特异引物分别对 9 株非乳杆菌属参考菌株(表 1)进行 PCR 扩增, 且分别以一株目标菌株

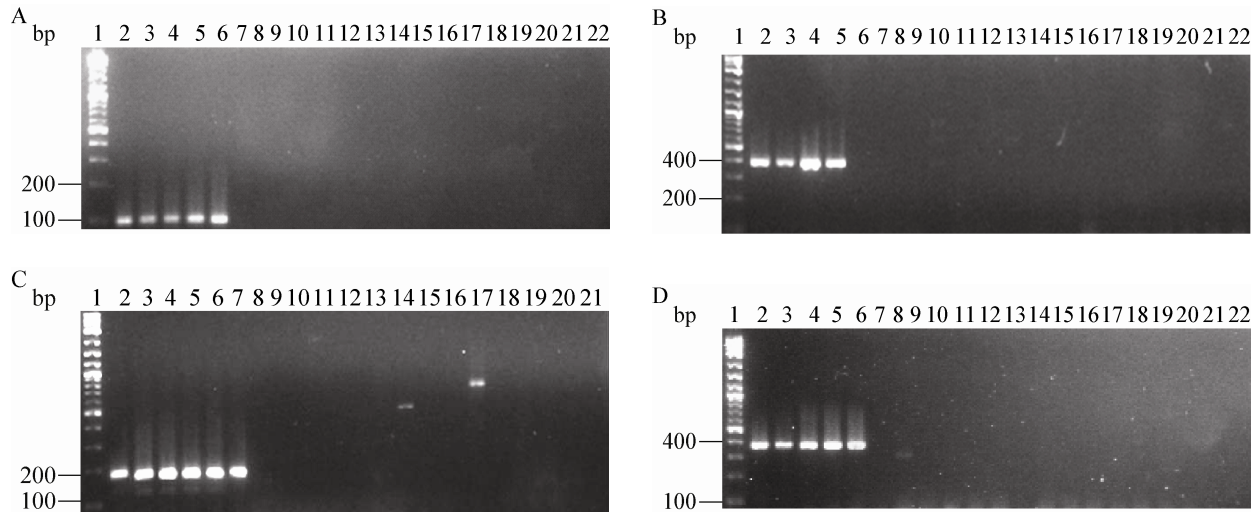


图 1 4 对特异引物对乳杆菌属菌株 DNA 模板的 PCR 扩增结果

Figure 1 PCR amplification with 4 pairs of specific primers for *Lactobacillus* strains

注：A-D：planF/planR，aciF/aciR，delF/delR，rhaF/rhaR。1：DNA marker。A：2-6：植物乳杆菌 1.2437，1.2158，1.555，10533，10644；7：鼠李糖乳杆菌 10534；8：嗜酸乳杆菌 1.1878；9：德氏乳杆菌保加利亚亚种 1.1480；10：德氏乳杆菌乳亚种 1.2625；11：德氏乳杆菌德氏亚种 1.2624。B：2-6：嗜酸乳杆菌 1.1878，1.2686，1.1854，6075，1.2467；7：植物乳杆菌 1.2437；8：鼠李糖乳杆菌 10534；9：德氏乳杆菌保加利亚亚种 1.1480；10：德氏乳杆菌乳亚种 1.2625；11：德氏乳杆菌德氏亚种 1.2624。C：2-4：德氏乳杆菌保加利亚亚种 1.1863，1.1482，1.1480；5-6：德氏乳杆菌乳亚种 1.2625，1.2142；7：德氏乳杆菌德氏亚种 1.2624；8：植物乳杆菌 1.2437；9：鼠李糖乳杆菌 10534；10：嗜酸乳杆菌 1.1878。D：2-5：鼠李糖乳杆菌 10534，1.104，1.552，1.26；6-7：嗜酸乳杆菌 1.2467，1.1878；8：德氏乳杆菌保加利亚亚种 1.1480；9：德氏乳杆菌乳亚种 1.2625；10：德氏乳杆菌德氏亚种 1.2624；11：植物乳杆菌 1.2437。A：12-22，B：12-22，C：11-21，D：12-22：布氏乳杆菌 1.13；干酪乳杆菌干酪亚种 1.2435；鼠乳杆菌 1.2626；动物乳杆菌 1.2623；清酒乳杆菌 1.6；瑞士乳杆菌 10532；发酵乳杆菌 1.1880；玉米乳杆菌 20290；戊糖乳杆菌 20301；高加索酸乳杆菌 6080；类植物乳杆菌 22192。

Note: A-D: planF/planR, aciF/aciR, delF/delR, rhaF/rhaR. 1: DNA marker. A: 2-6: *L. plantarum* 1.2437, 1.2158, 1.555, 10533, 10644; 7: *L. rhamnosus* 10534; 8: *L. acidophilus* 1.1878; 9: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 1.1480; 10: *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 1.2625; 11: *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* 1.2624. B: 2-6: *L. acidophilus* 1.1878, 1.2686, 1.1854, 6075, 1.2467; 7: *L. plantarum* 1.2437; 8: *L. rhamnosus* 10534; 9: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 1.1480; 10: *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 1.2625; 11: *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* 1.2624. C: 2-4: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 1.1863, 1.1482, 1.1480; 5-6: *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 1.2625, 1.2142; 7: *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* 1.2624; 8: *L. plantarum* 1.2437; 9: *L. rhamnosus* 10534; 10: *L. acidophilus* 1.1878. D: 2-5: *L. rhamnosus* 10534, 1.104, 1.552, 1.26; 6-7: *L. acidophilus* 1.2467, 1.1878; 8: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 1.1480; 9: *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 1.2625; 10: *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* 1.2624; 11: *L. plantarum* 1.2437. A: 12-22, B: 12-22, C: 11-21, D: 12-22: *L. buchneri* 1.13; *L. casei* subsp. *casei* 1.2435; *L. murinus* 1.2626; *L. animalis* 1.2623; *L. sake* 1.6; *L. helveticus* 10532; *L. fermentum* 1.1880; *L. zeae* 20290; *L. pentosus* 20301; *L. kefir* 6080; *L. paraplantarum* 22192.

为阳性对照。结果除阳性对照出现目标条带外，其余均没有目的扩增产物，图略。

以上结果表明，建立的 4 种特异 PCR 鉴定方法均具有较高的种内通用性和种间特异性。

2.2 PCR 产物序列分析

对模式菌株 *L. plantarum* 1.2437^T、*L. rhamnosus* 10534^T、*L. acidophilus* 1.1878^T 和 *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* 1.2624^T 的特异 PCR 产

物进行测序，结果通过 GenBank 中 BLAST 比对，与数据库中的同一区段核酸序列的一致性均达到 99% 或 100%，结果说明各特异性引物具有很强的忠实性、特异性和保守性。

2.3 生产菌株的检测

16 株生产菌株的 4 次特异 PCR 结果、16S rDNA 序列在 GenBank 和 RDP 两个数据库中的综合分析结果和 Biolog 鉴定结果见表 3。其中 11 株

表 3 样品中乳杆菌的特异 PCR、16S rDNA 序列分析和 Biolog 鉴定结果
Table 3 The identification results of *Lactobacillus* stains using specific PCR method, 16S rDNA sequence analysis and Biolog

菌株 Strain	特异 PCR 扩增结果 The amplifications of specific PCR				16S rDNA 序列分析结果 The result of 16S rDNA sequence analysis	Biolog 鉴定结果 The result of Biolog
	植物乳杆菌	鼠李糖乳杆菌	德氏乳杆菌	嗜酸乳杆菌		
	<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. acidophilus</i>		
L-01	—	—	—	+	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
L-02	—	—	—	+	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
L-03	—	+	—	—	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
L-04	—	+	—	—	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
L-05	—	+	—	—	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
L-06	—	+	—	—	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
L-07	+	—	—	—	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
L-08	+	—	—	—	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
L-09	+	—	—	—	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
L-10	+	—	—	—	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
L-11	+	—	—	—	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
L-12	—	—	—	—	<i>L. buchneri</i>	<i>L. buchneri</i>
L-13	—	—	—	—	<i>L. parabuchneri</i> / <i>L. buchneri</i>	<i>L. parabuchneri</i>
L-14	—	—	—	—	<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i>
L-15	—	—	—	—	<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i>
L-16	—	—	—	—	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> / <i>L. casei</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>

菌产生了唯一扩增条带,根据片段大小分属于嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和植物乳杆菌,其 16S rDNA 序列分析结果和 Biolog 鉴定结果均与其一致;另外 5 株菌无扩增产物,序列分析和 Biolog 鉴定的结果显示是布氏乳杆菌、类布氏乳杆菌、干酪乳杆菌和类干酪乳杆菌。以上结果表明特异 PCR 方法可用于微生物肥料中这 4 种菌的快速检测鉴定,并且乳杆菌属其它种的特异 PCR 方法还有待建立。

另外,因 L-13 和 L-16 的 16S rDNA 序列分别与 2 种菌的序列一致性达到 99%以上,不能确定到某个种,故表中给出 2 个菌名,这也证实了 16S rDNA 序列分析不适合乳杆菌相近种的鉴定。

3 讨论

16S rDNA 序列同源性分析作为细菌系统发育和亲缘关系的研究已被普遍接受和广泛应用,并且已作为细菌分类鉴定的有力佐证。但是乳杆菌属内许多种的 16S rRNA 基因序列具有较高同

源性,利用该方法无法准确鉴定到种^[20],本实验 2 株生产菌株的 16S rDNA 序列分析结果也证实了这一观点。研究表明, *gyrB*、*recA*、*rpoD*、*hsp60* 等基因序列更适合细菌的系统发育分析,用作引物设计的靶基因,较 16S rDNA 序列更好地区分相似种^[21-23]。笔者以 *gyrB*、*recA* 为靶基因设计了 4 种乳杆菌的特异性引物,经乳杆菌属多个种、目标种的相近种以及微生物肥料产品中非乳杆菌属代表种的验证实验,证明建立的 PCR 鉴定方法具有很高的特异性,能够准确鉴定植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、德氏乳杆菌和嗜酸乳杆菌。对 16 株从产品中分离的乳杆菌进行鉴定,其 16S rDNA 序列分析结果、Biolog 鉴定结果与特异 PCR 结果均一致,说明本文所建立的特异 PCR 鉴定方法具有良好的可靠性和准确性,为微生物肥料检测过程中菌种的识别鉴定提供了简便、快捷的手段,具有很好的推广应用前景。

乳杆菌属菌株具有很高的同源性,一些菌株因没有更深入研究有可能被定错种名,本文采用的参考菌株嗜酸乳杆菌 CGMCC1.2467 即是如此,其 16S rDNA 序列分析结果、Biolog 鉴定结果以及本实验建立的特异 PCR 鉴定结果均表明 CGMCC1.2467 为鼠李糖乳杆菌。由此看来,特异 PCR 技术不仅可以用于未知菌株的鉴定,也可以用于更正一些菌株的分类错误。

致谢:感谢农业部微生物肥料和食用菌菌种质量监督检验测试中心所有同事给予本工作的大力支持与帮助。

参考文献

- [1] 李军训, 罗学刚, 高洁, 等. 益生菌的分类、生理功能与有效性评价研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(6): 49-55.
- [2] 康明丽. 乳酸菌及其在食品工业中的应用[J]. 河北工业科技, 2008, 25(6): 391-393.
- [3] 吴斌, 史亦丽. 临床常用微生态制剂的组成分析与合理用药[J]. 临床药物治疗杂志, 2010, 8(5): 21-25.
- [4] 马静静, 王小芬, 高丽娟, 等. 秸秆发酵中乳酸菌复合系 SFC-2对杂菌的抑制作用[J]. 微生物学报, 2008, 48(7): 879-886.
- [5] 文娅, 赵国柱, 周传斌, 等. 生态工程领域微生物菌剂研究进展[J]. 生态学报, 2011, 31(20): 6287-6294.
- [6] 李梦寒, 陈芝兰, 南志强. 乳酸菌青贮添加剂的研究进展[J]. 西藏科技, 2008(11): 65-67.
- [7] Chen JH, Wang ML, Zhou ZH, et al. Isolation of effective microorganisms and the odor elimination tests[J]. Chia-Nan Annual Bulletin, 2009, 35(35): 191-198.
- [8] Oh CK, Oh MC, Kim SH. The depletion of sodium nitrite by lactic acid bacteria isolated from Kimchi[J]. Journal of Medicinal Food, 2004, 7(1): 38-44.
- [9] 东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 289-294.
- [10] 王芳, 包秋华, 徐海燕, 等. 干酪乳杆菌群和植物乳杆菌群的分子鉴定技术和分类方法的研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2010(5): 241-245.
- [11] Ben Amor K, Vaughan EE, de Vos WM. Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria[J]. The Journal of Nutrition, 2007, 137: 741-747.
- [12] 程琳琳, 王芳, 金莉莉, 等. 环保微生物菌剂常用5种芽孢杆菌的 PCR 鉴定[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(4): 36-40.
- [13] 曹凤明, 沈德龙, 李俊, 等. 应用多重 PCR 鉴定微生物肥料常用芽孢杆菌[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 651-656.
- [14] 杨小敏, 方瑶, 顾江, 等. 特异引物 PCR 鉴定类鼻疽伯克霍尔德菌方法的建立和优化[J]. 第三军医大学学报, 2011, 14(33): 1427-1431.
- [15] Torriani S, Zapparoli G, Dellaglio F. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(10): 4351-4356.
- [16] Lesnikova I, Lidang M, Hamilton-Dutoit S, et al. Rapid, sensitive, type specific PCR detection of the E7 region of human papillomavirus type 16 and 18 from paraffin embedded sections of cervical carcinoma[J]. Infectious Agents and Cancer, 2010, 5: 2.
- [17] 中华人民共和国农业部. NY/T 1114-2006. 微生物肥料实验用培养基技术条件[S]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [18] 张晶, 张晓君, 张梦晖, 等. 土壤微生物在不同纤维素富集条件下的多样性[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(4): 1449-1453.
- [19] Moreno C, Romero J, Romilio T, et al. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*[J]. Microbiology, 2002, 148(4): 1233-1239.
- [20] 马凯, 李春玲, 程池. *Lactobacillus* 的系统发育分析及分群[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(2): 27-35.
- [21] 郝云婕, 韩素贞. *gyrB* 基因在细菌系统发育分析中的应用[J]. 生物技术通报, 2008(2): 39-41.
- [22] Torriani S, Felis G, Dellaglio F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene derived primers[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(8): 3450-3454.
- [23] Yamamoto S, Harayama S. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48(Pt3): 813-819.