

冷藏条件下带蓬鲜莲优势腐败菌鉴定 及其消长规律研究

The dominant spoilage bacteria and their growth and decline law in fresh
lotus seeds stored at the cold storage

王建辉 王 秀 王发祥 李向红

WANG Jian-hui WANG Xiu WANG Fa-xiang LI Xiang-hong

俞 健 靳 娜 刘永乐

YU jian JIN Na LIU Yong-le

(长沙理工大学湖南省水生资源食品加工工程技术研究中心, 湖南 长沙 410114)

(Hunan Provincial Engineering Research Center for Food Processing of Aquatic Biotic Resources,
Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410114, China)

摘要:通过稀释平板法分离 4℃ 条件贮藏 18 d 的带蓬鲜莲腐败菌,提取筛选菌株 DNA 后进行 PCR 扩增,采用细菌 16S rDNA 菌种鉴定法对优势腐败菌进行鉴定,并分析其 4℃ 冷藏过程中的消长规律。结果表明,带蓬鲜莲 4℃ 冷藏过程中的优势腐败菌主要为分散泛菌(*Pantoea dispersa*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、巴氏葡萄球菌(*Staphylococcus pasteurii*)、成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)。且 4℃ 贮藏期间,分散泛菌、表皮葡萄球菌、巴氏葡萄球菌的变化趋势大体相同,适应期后呈增长趋势,成团泛菌变化规律不明显。

关键词:鲜莲;冷藏;优势腐败菌;分离鉴定;消长规律

Abstract: In this study, spoilage bacteria in fresh Xiang lotus seeds preserved at 4℃ temperature for 18 d were separated by dilution-plate method. Total genomic DNA was extracted from these strains and then subjected to PCR amplification. Dominant spoilage bacteria were identified using 16S rDNA sequencing for the identification and the law of their growth and declination was drawn. The results showed the four dominant spoilage bacteria in fresh Xiang lotus seeds preserved at the temperature of 4℃ were *Pantoea dispersa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, and *Pantoea ag-*

glomerans. At the storage temperature of 4℃, the growing trends of *Pantoea dispersa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri* of fresh lotus seeds were similar, which all needed an adaptive phase before their increase. The amount change of *Pantoea agglomerans* was irregular.

Keywords: Fresh Lotus; Cold storage; dominant spoilage bacteria; identification; growth and decline law

鲜莲营养丰富,味道鲜美,口感甜脆^[1],具有益心、补肾、健脾、止泻和安神等多重功效^[2-4],但常温下易软化皱缩,货架期 3~6 d,采后低温 4℃ 带蓬贮藏也仅能维持 15 d^[5]。鲜莲在采摘、运输、加工及贮藏过程中极易腐败变质,丧失其原有的鲜食风味,直接影响其感官品质及食用价值,极大限制了鲜食莲子的销售和消费者的需求。研究^[6]表明,微生物活动是引起果蔬腐败变质的主要原因之一,果蔬常见腐败菌有:沙门氏菌(*Salmonella*)、假单胞菌(*Pseudomonas spp.*)、李斯特菌(*Listeria*)、黄单胞菌(*Xanthomonas*)等^[7],对莲子危害最大的微生物主要是曲霉属和青霉属霉菌^[8]。目前国内鲜莲研究处于起步阶段,有关鲜莲优势腐败菌分离鉴定研究尚无报道。随着分子生物学的快速发展,细菌的分类鉴定从传统的表型、生理生化分类深入到各种基因型分类水平,如质粒图谱、限制性片段长度多态性分析、PCR 指纹图、16S rRNA 序列分析等技术^[9-10]。16S rDNA 序列分析技术在一定程度上克服了传统表型、生理生化指标鉴定微生物的局限性,能简便、快速准确地鉴定微生物^[11-12]。

本研究以带蓬鲜莲为研究对象,通过 16S rDNA 序列分析技术初步鉴定低温贮藏下带蓬鲜莲的主要优势腐败菌,并

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:31301564, 31201427);湖南省自然科学基金项目(编号:2015JJ2011);湖湘青年英才支持计划项目(编号:2015RS4051)

作者简介:王建辉,男,长沙理工大学教授,博士。

通讯作者:刘永乐(1962—),男,长沙理工大学教授,博士。

E-mail:LYLE19@163.com

收稿日期:2016-06-07

分析其优势菌的消长变化规律,对进一步监控和靶向抑制鲜莲品质变化以及鲜莲低温贮藏新技术的开发,提高其贮藏品质,延长货架期均具有很好的理论价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜莲蓬:由湖南省湘潭县湘莲种植基地提供;
PCA 培养基、营养琼脂培养基:广东环凯微生物科技有限公司;
Folin 酚试剂、NaCl、异戊醇:分析纯,国药集团化学有限公司;
琼脂糖:电泳级,生工生物工程上海股份有限公司;
Tris-乙酸-EDTA:电泳级,北京索莱宝生物科技有限公司;
溴化乙锭(EB)、PCR 试剂等:电泳级,美国 sigma 公司。

1.2 仪器与设备

电子分析天平:AUY120 型,日本岛津公司;
立式压力蒸汽灭菌器:DY01-13-44-00 型,上海东亚压力容器制造有限公司;
超声波清洗器:KQ-500B 型,昆山市超声仪器有限责任公司;
摇床:ZHWHY-100C 型,上海智城公司;
生化培养箱:DZX180 型,上海艾测电子科技有限公司;
显微镜:BH-2 型,日本 Olympus 公司;
PCR 仪:T100 型,美国 Thermo 公司。

1.3 方法

1.3.1 鲜莲原料处理 新鲜莲蓬在低温条件下快速运回实验室。选取成熟度一致、大小均匀、无病虫害和机械损伤的带莲鲜莲样品于 RH(相对湿度)65%~70%,温度 4℃恒温条件下贮藏。
1.3.2 优势菌落的确定 根据王建辉等^[5]的研究,带莲鲜莲货架期为 15 d,18 d 时莲蓬表面菌斑明显增多,质地明显变软,感官品质明显下降。故取贮藏 18 d 的带莲鲜莲样品,在超净环境下,于无菌的组织捣碎机中捣碎,准确称取捣碎后的莲肉样品 10.00 g 于 250 mL 无菌的锥形瓶中,注入 90 mL 无菌生理盐水,振荡 30 min。然后取 1 mL 进行 10 倍梯度稀释,在预试验的基础上,选择 3 个适合的稀释度倾注平板,平行 3 份,36℃培养 48 h 后进行菌落计数。并通过肉眼观察,记录各个稀释度的菌落特征,并将数量最多的 4~5 种菌落视为优势菌。
1.3.3 优势菌的分离纯化 挑选 1.3.2 中各优势菌于 PCA 平板上进行多次划线分离,得到单菌落后继续传代培养,对各代的单菌落进行革兰氏染色,显微镜观察细胞形态、大小等,直至尽可能得到纯的单菌落,将纯化好的菌株保存于营养琼脂斜面试管,并于 4℃低温保存备用。
1.3.4 优势腐败菌的鉴定

(1) 形态观察:将经 1.3.3 纯化后菌株接种于平板上,36℃下培养 48 h,期间结合肉眼与革兰氏染色后显微镜观察各优势菌的菌落特征、细胞形态^[13-14]以及相对比例等。

(2) 细菌 16S rDNA 菌种鉴定:经纯化的菌株采用细菌 16S rDNA 菌种鉴定方法进行鉴定^[15]。将纯化的 5 种优势腐败菌接种于 10 mL LB 培养基中,37℃振荡过夜培养,分别提取 1[#]~5[#]腐败细菌的基因组 DNA,以通用引物:16S(F) 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';16S(R) 5'-GGT-TACCTTGTTACGACTT-3'。

PCR 扩增其 16S rDNA,回收 1 500 bp 长度左右的 PCR 产物,送至上海生工股份有限公司进行 DNA 测序,将测定的序列通过 Blast 程序与 GenBank 数据库中已有的 16S rDNA 序列进行相似性比较分析,根据 16S rDNA 序列相似性构建系统发育树,判定细菌种类。

1.3.5 鲜莲贮藏过程中腐败菌的生长规律 参考 Chang Shu-chen 等^[16]的方法,并稍做修改。将于 4℃冷藏条件下 0~24 d 的鲜莲每 3 d 取样,在无菌条件下进行稀释平板计数,分别统计各优势腐败菌个数,并绘制其生长规律曲线。

2 结果与分析

2.1 腐败菌的分离和优势腐败菌的确定

通过倾注平板、培养、观察、计数,根据菌落形态特征将所有菌落大致分为 8 组,分别编号为 1[#]~8[#],将数量最多 5 种菌视为优势腐败菌,鲜莲低温贮藏条件下 5 种优势腐败菌菌落形态及相对比例见表 1。

表 1 优势腐败菌形态及组成
Table 1 The colony morphology and composition of dominant spoilage bacteria

优势腐败菌	菌落形态特征	菌株	比例/%
G ⁺	—	120	33
2 [#]	球状、不透明、乳白色	76	21
3 [#]	球状、不透明、乳黄色	26	7
5 [#]	球状、不透明、黄色	18	5
G ⁻	—	230	64
1 [#]	杆状、不透明、乳黄色	105	29
4 [#]	杆状、半透明、淡黄色	125	35

2.2 优势腐败菌的鉴定

2.2.1 优势腐败菌 16S rDNA 的扩增结果 分别提取腐败菌 1[#]~5[#]号的基因组 DNA,进行 PCR 扩增,扩增出的 PCR 产物进行 0.8%琼脂糖凝胶电泳。由图 1 可知,1[#]~5[#]号腐败细菌基因经 PCR 扩增后,扩增产物经电泳分离获得比较清晰的条带,可见 PCR 扩增产物主要位于 1 500 bp 左右,且获得的目的基因经凝胶电泳可很好地纯化分离。
2.2.2 优势腐败菌 16S rDNA 鉴定结果 通过细菌 16S rDNA 可变区的差异对菌种类别进行区分。回收 2.2.1 中的目的基因片段,并送至上海生工股份有限公司测序,将测序获得的 1[#]~5[#]腐败菌的 16S rDNA 序列与 NCBI 数据库中已有的序列进行 Blast 相似检索,从 Genbank 核苷酸数据库中挑选同源性较高的 16S rDNA 序列进行比较,利用 MAGE 5 软件构建系统发育树^[17],结果见图 2。1[#](L1)、2[#](L2)菌株分别与分散泛菌(*Pantoea dispersa*)、表皮葡萄球

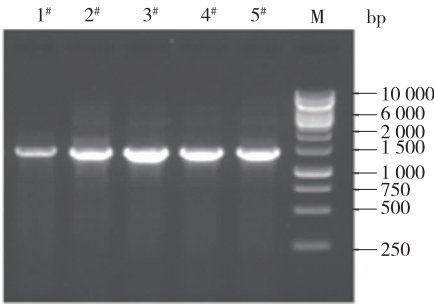


图 1 腐败细菌的扩增结果

Figure 1 The 16S rDNA PCR results of corruption bacteria

菌(*Staphylococcus epidermidis*)亲缘关系最近,验证可信度达 99%;3#(L3)和 5#(L5)菌株为同一菌属,且与巴氏葡萄球菌(*Staphylococcus pasteurii*)亲缘关系最近,验证可信度达 100%;4#(L4)菌株与成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)亲缘关系最近,验证可信度达 100%,鉴定结果见表 2。

2.3 鲜莲低温贮藏过程中优势腐败菌的消长规律

由图 3 可知,随着贮藏时间的延长,4 种优势腐败菌:分散泛菌、表皮葡萄球菌、巴氏葡萄球菌的变化趋势大体相同,呈现先降后升的趋势,贮藏第 3 天时,优势腐败菌菌落数都大幅度降低,研究现象与王满生等^[18]对草鱼低温贮藏过程中优势腐败菌前期先大幅降低的结果相似,可能是鲜莲采后

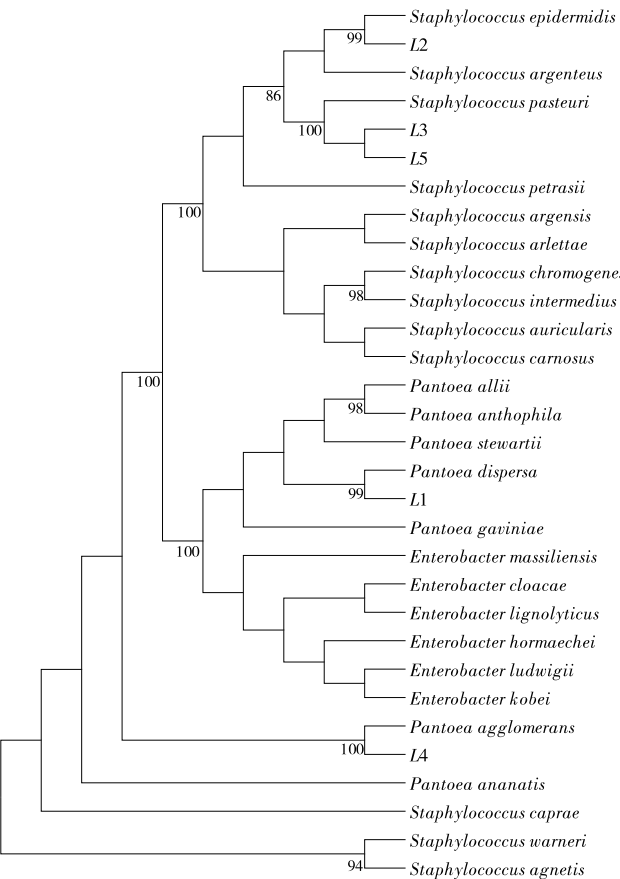
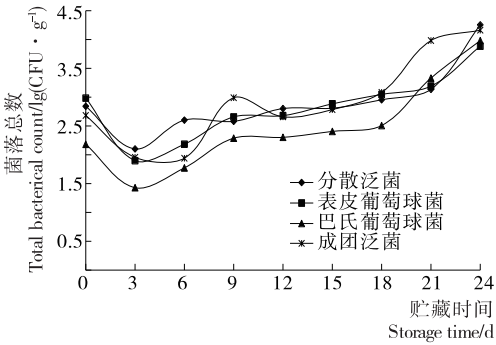


图 2 1#~5# 鲜莲腐败菌 16S rDNA 的系统发育树
Figure 2 The phylogenetic tree of 16S rDNA from corruption bacteria

表 2 优势菌株的系统鉴定结果

Table 2 The system identification results of dominant strains

编号	Blast 相似性最高菌株种群
1#	分散泛菌(<i>Pantoea dispersa</i>)
2#	表皮葡萄球菌(<i>Staphylococcus epidermidis</i>)
3# 和 5#	巴氏葡萄球菌(<i>Staphylococcus pasteurii</i>)
4#	成团泛菌(<i>Pantoea agglomerans</i>)



因 3# 和 5# 属于同一菌属,故合并统计

图 3 4 种优势腐败菌消长规律曲线

Figure 3 The grows and decline curve of four kinds of advantage bacterium

贮藏温度突然降低至冷藏 4℃,导致部分细胞生长受抑或遇冷死亡引起。其中,巴氏葡萄球菌变化最为明显,第 3 天后菌落数上升迅速,表皮葡萄球菌上升较分散泛菌变化略微明显,第 3 天时菌落数低于分散泛菌,但第 9 天其菌落数超过了分散泛菌。在贮藏期间成团泛菌菌落数变化无规律,可能是此菌本身的特点,易成片聚集,菌落数变化规律不明显。

3 结论

本研究分离鉴定得到了鲜莲 4℃贮藏过程中的 4 种优势腐败菌,即分散泛菌(*Pantoea dispersa*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、巴氏葡萄球菌(*Staphylococcus pasteurii*)和成团泛菌(*Pantoea agglomerans*);明确了其在贮藏期间的消长规律,随着贮藏时间的延长,分散泛菌、表皮葡萄球菌、巴氏葡萄球菌的生长趋势大体相同,呈现先降后升的趋势,巴氏葡萄球菌变化最为突出,第 3 天后菌落数上升迅速,表皮葡萄球菌上升较分散泛菌变化略微明显,贮藏期间成团泛菌菌落数变化无规律。当前研究分离鉴定了鲜莲 4℃贮藏过程中的优势腐败菌种类,初步掌握了其各自的消长规律,然而,对其优势腐败菌的致病能力及其致病机理尚需进一步深入探讨,对鲜莲低温贮藏新技术的开发及其产品的研发有待进一步开展集成研究。

参考文献

[1] 郑天闻,徐婷婷,范亚苇,等. 莲子多酚氧化酶的酶学性质[J]. 食品工业科技, 2014, 35(2): 162-165.
[2] BHAT R, SRIDHAR K R. Nutritional quality evaluation of electron beam-irradiated lotus (*Nelumbo nucifera*) seeds[J]. Food Chemistry, 2008, 107(1): 174-184.

(下转第 139 页)

强,浸提时间对浸提物的抗幽门螺杆菌活性也有一定的影响,高温和浸提时间过长对苦瓜抗菌活性成分都会造成破坏。

本研究还证明苦瓜在最佳浸提工艺条件下所得的苦瓜水提物对幽门螺杆菌具有抑制作用,最小抑菌浓度是 32 mg/mL,这是一个比较低的抑菌浓度。苦瓜水提物在高浓度时对幽门螺杆菌还具有杀灭作用,其杀菌浓度为 128 mg/mL。同时在 128 mg/mL 浓度条件下进行杀菌动力学研究,发现苦瓜水提物具有快速杀灭幽门螺杆菌作用,最小杀菌动力学时间为 30 min。这表明苦瓜水提物在胃中能快速杀灭幽门螺杆菌作用,因此,苦瓜水提物用于对幽门螺杆菌感染的防治具有重大的医学应用价值。

本研究只研究了苦瓜的水提物抗幽门螺杆菌作用。不同的溶剂提取所得的苦瓜浸提物活性成分存在差异,其抑菌活性也存在差异性。苦瓜用不同的溶剂提取时可以得到不同的抑菌成分,抑制幽门螺杆菌的活性会存在差异,用什么溶剂提取所得的提取物对幽门螺杆菌的抗菌活性最强有待进一步研究。

参考文献

[1] LAMB A, CHEN L F. Role of the *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in the development of gastric cancer[J]. J. Cell Biochem., 2013, 114(3): 491-497.

[2] 康利. Hp 感染与胃癌相关性的临床研究[J]. 内蒙古医学杂志, 2015, 47(9): 1 115-1 117.

[3] 田拥军, 张正茂, 刘慎沛, 等. 幽门螺杆菌对 6 种抗生素的耐药性及其机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(7):

922-925.

[4] 张绪忠, 陈清山. 苦瓜抑菌防腐作用的实验研究[J]. 预防医学情报杂志, 1996, 12(1): 17-20.

[5] 张雅静, 文良娟, 王娇, 等. 苦瓜的抑菌作用研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(18): 132-136.

[6] 何爱丽, 肖付刚, 魏珂. 苦瓜黄酮提取及抑菌性研究[J]. 农业机械, 2012, 30(10): 102-104.

[7] 姚毅. 苦瓜皂甙的提取纯化工艺及抑菌功效研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006: 48-52.

[8] 张平平, 刘金福, 王昌禄, 等. 苦瓜提取物的抑菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(4): 721-724.

[9] 何新益, 刘仲华. 苦瓜多糖的改良苯酚—硫酸法测定和提取工艺[J]. 食品与机械, 2007, 23(4): 72-75.

[10] 张元春. 苦瓜活性物质的提取及其抑菌活力的研究[D]. 南宁: 广西大学轻工学院, 2009: 24-27.

[11] BRACA A, SICILIANO T D, ARRIGO M, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil[J]. Fitoterapia, 2008, 79(2): 123-125.

[12] 王贻莲, 陈燕平, 黄伟. 苦瓜活性组分物质抑菌活性测定[J]. 植物保护, 2008, 34(2): 67-70.

[13] MAHMOOD A, RAJA G K, MAHMOOD T, et al. Isolation and characterization of antimicrobial activity conferring component(s) from seeds of bitter gourd(*Momordica charantia*)[J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2012, 6: 566-573.

[14] 张雁, 池建伟, 唐小俊, 等. 苦瓜水提物的抑菌活性及其稳定性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 121-123.

[15] 赵静, 王燕. 辣椒粕分离蛋白酶解工艺条件的优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 162-166.

(上接第 109 页)

[3] WU Jin-zhong, ZHENG Yuan-bin, CHEN Ti-qiang, et al. Evaluation of the quality of lotus seed of *Nelumbo nucifera* Gaertn from outer space mutation[J]. Food Chemistry, 2007, 105(2): 540-547.

[4] 王亮亮, 夏延斌, 任美. 湘莲的营养和保健功效及其在食品加工中的应用[J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 262-266.

[5] 王建辉, 靳娜, 刘永乐, 等. 低温处理对湘莲采后生理变化的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(18): 209-213.

[6] TOURNAS V H. Moulds in fresh and minimally processed vegetables and sprouts [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 99(1): 71-77.

[7] 范贤贤, 田密霞, 姜爱丽, 等. 鲜切果蔬表面微生物侵染途径及控制[J]. 保鲜与加工, 2009(2): 14-16.

[8] 易俊放. 莲子的贮藏技术[J]. 长江蔬菜, 1992(2): 38-39.

[9] MIGNARD S, FLANDROIS J P. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 67(3): 574-581.

[10] 杨静静, 孟镇, 钟其顶, 等. 分子生物学技术在酵母菌多相分类鉴定中的应用[J]. 中国酿造, 2011(4): 16-19.

[11] LEI Zhang-yu, ZHANG Xiao. Application of 16S rDNA sequence analysis technique in microbial detection [J]. Agricultural Science&Technology, 2014, 15(4): 520-523.

[12] PHILIPP S, HUEMER H P, IRSCHICK E U, et al. Obstacles

of multiplex real-time PCR for bacterial 16S rDNA: primer specificity and DNA decontamination of Taq polymerase [J]. Transfusion Medicine & Hemotherapy, 2010, 37(1): 21-28.

[13] KIERZKOWSKA M, MAJEWSKA A, KUTHAN R T, et al. A comparison of Api 20A vs MALDI-TOF MS for routine identification of clinically significant anaerobic bacterial strains to the species level[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 92(2): 209-212.

[14] 郭全友, 杨宪时, 许钟. 冷藏罗非鱼优势腐败菌的鉴定及其特征[J]. 食品与机械, 2009, 25(3): 87-90.

[15] SUN Shan, FAN Xin-xing, PHARMACY D O, et al. RAPD-PCR and 16S rDNA phylogenetic analysis of alkaline protease producing bacteria isolated from soil of India; Identification and detection of genetic variability [J]. Journal of Genetic Engineering & Biotechnology, 2014, 12(1): 27-35.

[16] CHANG Shu-chen, KUND H F, CHEN H C, et al. Determination of histamine and bacterial isolation in swordfish fillets (*Xiphias gladius*) implicated in a food borne poisoning[J]. Food Control, 2008, 19(1): 16-21.

[17] 韩永和, 章文贤, 庄志刚, 等. 耐盐好氧反硝化菌 A-13 菌株的分离鉴定及其反硝化特性[J]. 微生物学报, 2013, 53(1): 47-58.

[18] 王满生. 多靶栅栏技术在草鱼贮藏过程中对微生物腐败的控制研究[D]. 长沙: 长沙理工大学, 2012: 21-34.