

应用 PCR-DGGE 研究冷却猪肉 贮藏过程中的优势菌

李苗云^{1,2}, 周光宏², 徐幸莲²

(1 河南农业大学 食品科学技术学院, 河南 郑州 450002;

2 南京农业大学 教育部肉品加工与质量控制重点实验室, 江苏 南京 210095)

【摘要】【目的】研究冷却猪肉贮藏过程中优势细菌的分布,为研究冷却猪肉防腐剂和延长货架期提供参考。**【方法】**分别选择3个不同企业,取宰后24 h的猪背长肌,于4℃托盘包装,分别贮藏2,4,6 d提取细菌总DNA,对细菌16S rDNA的V6~V8区段进行PCR扩增,扩增产物进行变性梯度凝胶电泳(DGGE),对DGGE图谱进行微生物多样性分析,并对主要条带进行测序分析。**【结果】**对4℃贮藏的冷却猪肉DGGE图谱上的主要条带进行测序分析,获得6种不同的细菌。热杀索丝菌(*Brochothrix thermosphacta*)(条带1)在贮藏4 d的样品中,A5没有相应条带,在贮藏6 d的样品中,A7、A8上的条带不占优势,在其他样品中均以优势菌的形式出现;气单胞菌(*Aeromonas. sp*)所对应的条带3在贮藏4和6 d的样品中都较亮,与贮藏2 d的样品相比,在贮藏4 d之前有所增加,于贮藏6 d时趋于稳定,是优势菌之一;假单胞菌(*Pseudomonas. sp*)所对应的条带4一直较亮,并呈持续增加趋势,是主要的优势菌之一;葡萄球菌(*Staphylococcus. sp*)所对应的条带5在贮藏2 d内条带不清晰,贮藏到6 d时条带清晰明亮;莫拉氏菌(*Moraxella. sp*)(条带2)和节杆菌(*Arthrobacter. sp*)(条带6)所对应的条带一直不是很亮。**【结论】**假单胞菌、热杀索丝菌、气单胞菌(*Aeromonas. sp*)是冷却猪肉贮藏过程中的优势菌;葡萄球菌一旦存在,将逐步发展成优势菌。

【关键词】 冷却猪肉;优势菌;变性梯度凝胶电泳;PCR扩增

【中图分类号】 TS251.5⁺1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)09-0185-05

Study on the dominant bacteria during the storage period on chilled pork using PCR-DGGE

LI Miao-yun^{1,2}, ZHOU Guang-hong², XU Xing-lian²

(1 College of Food Science & Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 Key Lab of Meat Processing and Quality Control, MOE Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: 【Objective】 The study explored the distribution of dominant bacteria of chilled pork during the storage period in order to provide reference for the study of antiseptic and to extend shelf life of chilled pork. 【Method】 Pork loin steaks were obtained at 24 h postmortem in three commercial meat plants. All the steaks were tray-packaged at 4℃ for further 2,4,6 days respectively. The total bacteria DNA of meat samples was extracted to amplify the V6—V8 regions of the bacterial 16S rDNA gene. PCR products were used to denature gradient gel electrophoresis (DGGE). The DGGE profiles were used to analyze the bacteria diversity and DNA in the main band on the DGGE profiles of bacteria community in chilled pork was sequenced and analyzed. 【Result】 Six types of bacteria were identified by DNA sequence and analyzed in the main band on the DGGE profiles in chilled pork stored at 4℃. The band one corresponding to *Brochothrix*

* [收稿日期] 2007-09-18

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAK02A21/7)

[作者简介] 李苗云(1976—),女,河南鄢陵人,讲师,博士,主要从事肉品安全与质量控制研究。

E-mail: miaoyunli2003@yahoo.com.cn; Tel: 0371-63558150

thermosphacta was not observed on A5 on the 4th day of storing and on A7 and A8 on the 6th day of storing were not the dominant, except that others were the dominant microorganisms. The band three corresponding to *Aeromonas*. sp was bright on the 4th and 6th day of storing. *Aeromonas*. sp increased up to day 4 and then inclined to stabilize on day 6 compared to the samples stored for 2 days. It was one of the dominant microorganisms in chilled pork. The band four corresponding to *Pseudomonas*. sp was bright all through the storage and continued to increase during storage. It was demonstrated to be one of dominant flora. The band five corresponding to *Staphylococcus*. sp was faint on the 2nd day but bright on the 6th day; The band six and two corresponding to *Moraxella*. sp and *Arthrobacter*. sp were not bright during storage. 【Conclusion】 *Pseudomonas*. sp, *Brochothrix thermosphacta* and *Aeromonas*. sp were the dominant microorganisms in chilled pork during storage. Once *Staphylococcus*. sp was observed, it would be gradually developed into the dominant microorganism in chilled pork.

Key words: chilled pork; dominant bacterium; DGGE; PCR reaction

冷却猪肉中的微生物污染是影响产品货架期和贮藏加工性能的重要因素,研究、分析、确定冷却猪肉中微生物的种类和数量,对冷却猪肉产品的开发和利用具有重要意义。目前,对冷却猪肉在贮藏中污染微生物的种类已进行了较多研究,如 Blixt 等^[1]、Borch 等^[2]、Jay 等^[3]和 Gill^[4]研究发现,在不同贮藏条件下,猪肉的优势微生物种类不同,并且在贮藏过程中起腐败作用的微生物种类由于贮藏条件和肉品种类也不同。但这些研究多是应用选择性培养基来确定微生物在肉品中的分布,而传统的分离方法不但繁杂,且不一定能真实反映微生物多样性的真正面貌,具有一定的局限性和盲目性。Muyzer 等^[5]首先提出用变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)研究微生物的群落结构,该方法避免了经典微生物技术在微生物多样性变化研究中的局限性,能更可靠、直接地全面认识微生物的组成,并能有效分析复杂微生物群落的结构。为此,本研究应用 DGGE 技术,探讨冷却猪肉贮藏不同时间时优势细菌的分布,以期为更好的研究不同微生物对冷却猪肉品质的影响奠定基础,并为冷却猪肉防腐剂的研究和延长货架期提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要仪器设备及试剂 梯度 PCR 仪(Mycycler Bio-rad, 美国)、Dcode DGGE 电泳系统(Bio-rad, 美国)、GenElute™ 细菌总 DNA 提取试剂盒(Sigma, 美国)、PCR 试剂盒(Takala, 日本)和 DNA 回收试剂盒(天为时代, 北京)等。

1.2 方法

1.2.1 猪肉样品的处理 分别取 3 个不同企业(专

卖店)宰后 24 h 的猪背长肌 100~250 g 各 3 份,于 4 ℃ 托盘包装贮藏,分别在贮藏的 2, 4, 6 d 取样。A1, A2, A3 分别为贮藏 2 d 的 3 个来源不同的样品, A4, A5, A6 分别为贮藏 4 d 的 3 个来源不同的样品, A7, A8, A9 分别为贮藏 6 d 的 3 个来源不同的样品。其中 A1、A4 和 A7 为同一家企业的样品, A2、A5 和 A8 为同一家企业的样品, A3、A6 和 A9 为同一家企业的样品。

1.2.2 细菌总 DNA 的提取 分别取贮藏肉样 25 g, 在无菌操作条件下匀浆后, 置 225 mL 生理盐水中稀释, 取 10~15 mL 稀释液, 在 12 000×g 离心 3 min, 弃上清, 应用 GenElute™ 细菌总 DNA 提取试剂盒提取细菌总 DNA。将提取的细菌总 DNA 溶于 100 μL 的 TE 缓冲液, 经 12 mg/L 琼脂糖凝胶电泳检测后, 于 -20 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 PCR 反应 对细菌 16S rDNA 的 V6~V8 区段进行 PCR 扩增。上游引物为带 GC 夹子的 U968, 下游引物为 L1401。U968-GC 夹子为: 5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC- 3'; 下游引物 L1401 为: 5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC- 3'^[6]。上述引物均由上海生物工程有限公司合成。

PCR 扩增在梯度 PCR 仪上进行。PCR 反应体系为 50 μL, 其中包括 0.25 μL 的 *Taq* DNA 聚合酶(1.25 U), 1 μL 的引物 U968-GC 和 L1401 (5 pmol), 1 μL 的 DNA 稀释液, 3 μL MgCl₂ (50 mmol/L), 5 μL PCR 缓冲液(包括 4 种 dNTP 混合物各 200 μmol/L), 补充 39.75 μL ddH₂O 至终体积为 50 μL。

PCR 扩增程序: 94 ℃ 预变性 4 min, 20 个循环

(94 °C 变性 30 s, 退火温度从 65 °C 到 55 °C, 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s), 再于恒定的退火温度下进行 10 个循环(94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s), 最终 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 12 mg/L 琼脂糖凝胶电泳检测后, -20 °C 冰箱保存备用。

1.2.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE)与 EB 染色
参照 Muyzer 等^[7-8]的方法并作改进, 对细菌 16S rDNA 的 V6~V8 区段扩增产物进行 DGGE 分析。具体方法为: 用 80 mg/L 聚丙烯酰胺凝胶(含丙酰胺、二丙酰胺、尿素、甲酰胺和甘油), 其中尿素质量浓度梯度为 400~600 mg/L, 采用 Dcode DGGE 电泳系统进行电泳, 电泳缓冲液为 40 mmol/L 的 Tris 乙醇(pH 8.0), 在 200 V 电压下预电泳 8 min, 随后在 85 V 电压下电泳 16 h。电泳结束后, 将 DGGE 胶片在 1×TAE(含 0.5 mg/L EB)中浸泡 15 min。弃去浸泡液, 再在 ddH₂O 中浸泡 20 min。

1.2.5 DNA 的回收和纯化 将 EB 染色的 DGGE 胶片置于紫外灯下, 切下不同位置的条带, 分别放入 1.5 mL 离心管中, 用 DNA 回收试剂盒进行 DNA 回收和纯化。

1.2.6 DNA 测序 以回收的 DNA 为模版进行 PCR 扩增, 细菌引物为 U968 (5'-ACG GGG GGA ACG CGA AGA ACC TTA C-3'), L1401 (5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3')。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 4 min, 30 个循环(94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s), 再于恒定的退火温度下进行 10 个循环(94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s), 最终 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 12 mg/L 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送上海生物工程有限公司测序。登录 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/), 将所得序列与数据库中的已知序列进行比对。

2 结果与讨论

2.1 细菌 16S rDNA V6~V8 可变区的 PCR 结果

以贮藏过程中的细菌总 DNA 为模版, 用 16S rDNA 的 V6~V8 可变区引物(带 GC 夹子)进行 PCR 扩增, 扩增产物经 12 mg/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 获得约 400 bp 的特异性扩增片断(图 1), 所有样品均有较亮的扩增条带, 说明本试验的 PCR 扩增条件是合适的, 可用于后续的 DGGE 电泳分析。

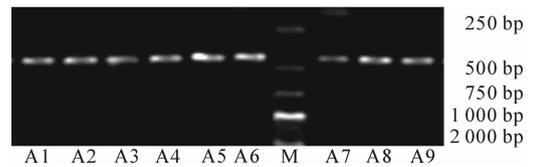


图 1 样品中细菌 16S rDNA 的 V6~V8 可变区 PCR 扩增产物电泳图

A1~A3. 贮藏 2 d 的样品; A4~A6. 贮藏 4 d 的样品; A7~A9. 贮藏 6 d 的样品; M. DNA Marker(DL2000)

Fig. 1 Representative electrophoresis photo of PCR amplification products of V6-V8 regions of sample DNA

A1-A3. Stored for 2 days; A4-A6. Stored for 4 days; A7-A9. Stored for 6 days; M. DNA Marker(DL2000)

2.2 细菌 DGGE 图谱主要条带的 DNA 序列分析

DGGE 图谱上不同条带代表不同的微生物种类^[9]。由图 2 可以看出, 条带 1 和 2 在贮藏过程中较亮, 但相同时间不同来源的样品之间存在很大差异, 一些样品中的含量很高, 而一些样品中几乎没有, 但是只要存在均以优势菌的形式出现。条带 3~6 在不同贮藏时间基本上都有存在, 是主要的条带。为此, 对条带 1~6 进行割胶回收 DNA, PCR 扩增后, 经 12 mg/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 3。

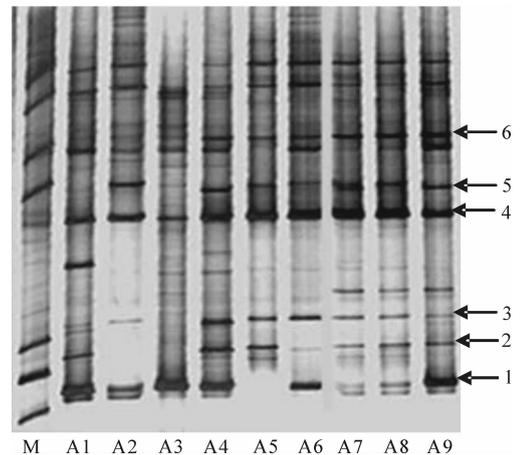


图 2 4 °C 托盘包装冷却猪肉在贮藏过程中细菌的 DGGE 图谱

M. Marker; A1~A3. 贮藏 2 d 的样品; A4~A6. 贮藏 4 d 的样品; A7~A9. 贮藏 6 d 的样品。1~6. 序列鉴定的主要条带

Fig. 2 DGGE fingerprinting of PCR products of chilled pork micro-flora stored at 4 °C by tray-packaging
M. Marker; A1-A3. Stored for 2 days; A4-A6. Stored for 4 days; A7-A9. Stored for 6 days; 1-6. Main bands for sequence identified

由图 3 可见, 条带 1~6 均能获得 400~500 bp 的特异性扩增片断, 所有样品都有较亮的扩增条带, 适合用于后续的测序分析。将条带 1~6 的 PCR 产物的测序结果与 GenBank 上的已知序列进行比对,

结果见表 1。

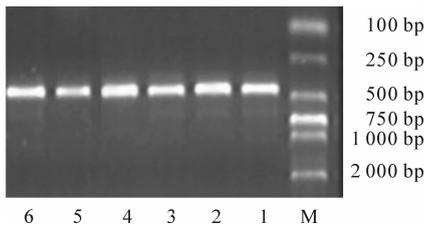


图 3 回收 DNA 的 PCR 扩增产物电泳图

1. 热杀索丝菌; 2. 莫拉氏菌; 3. 气单胞菌; 4. 假单胞菌;
5. 葡萄球菌; 6. 节杆菌; M. DNA Marker (DL2000)

Fig. 3 PCR amplification products of reclamation

DNA for identified sequence

1. *Brochothrix thermosphacta*; 2. *Moraxella. sp*; 3. *Aeromonas. sp*;
4. *Pseudomonas. sp*; 5. *Staphylococcus. sp*; 6. *Arthrobacter. sp*;
M. DNA Marker (DL2000)

2.3 冷却猪肉贮藏过程中优势菌的分析

由表 1 可知, 条带 1~6 所代表的微生物分别是热杀索丝菌 (*Brochothrix thermosphacta*)、莫拉氏菌 (*Moraxella. sp*)、气单胞菌 (*Aeromonas. sp*)、假单胞菌 (*Pseudomonas. sp*)、葡萄球菌 (*Staphylococcus. sp*) 和节杆菌 (*Arthrobacter. sp*)。

表 1 冷却猪肉贮藏过程中细菌 DGGE 图谱上条带的序列分析

Table 1 Identities of bands obtained from DGGE analysis of bacterial communities in chilled pork during storage

条带 Band	细菌 Closest relative bacterium	相似性/% Identity
1	热杀索丝菌 <i>Brochothrix thermosphacta</i>	100
2	莫拉氏菌 <i>Moraxella. sp</i>	100
3	气单胞菌 <i>Aeromonas. sp</i>	100
4	假单胞菌 <i>Pseudomonas. sp</i>	100
5	葡萄球菌 <i>Staphylococcus. sp</i>	99.0
6	节杆菌 <i>Arthrobacter. sp</i>	99.5

2.3.1 热杀索丝菌 DGGE 图谱中条带的亮度大小代表微生物的数量多少, 条带越亮微生物的数量越多^[9]。由图 2 可知, 热杀索丝菌 (*Brochothrix thermosphacta*) (条带 1) 在不同样品中呈现不同变化, 同样是贮藏 4 d 的样品, 在 A4、A6 中均有检出, 而在 A5 中完全没有相应条带; 在贮藏 6 d 的样品 A7、A8 和 A9 中, A7、A8 上不占优势。除此之外, 热杀索丝菌在其他样品中条带很亮, 均以优势菌的形式出现 (图 2 和表 1), 说明热杀索丝菌 (*Brochothrix thermosphacta*) 在冷却猪肉不同生产企业中污染的程度不同, 造成不同贮藏时间检测结果的差异性, 但其仍是冷却猪肉中存在的一种优势微生物, 这与 Olsson 等^[10] 的研究结果基本一致。Olsson

等^[10] 认为, 在贮藏 4 d 的冷却猪肉中, 热杀索丝菌 (*Brochothrix thermosphacta*) 占检出细菌总数的 44.3%, 并且与初始微生物污染情况有关。

2.3.2 莫拉氏菌 由图 2 可见, 莫拉氏菌 (*Moraxella. sp*) (条带 2) 同样是在不同样品中呈现不同的变化, 且随着贮藏时间的延长而逐渐趋于一致, 但是条带一直不是很亮, 可认为其不是优势菌。

2.3.3 气单胞菌 由图 2 可见, 气单胞菌 (*Aeromonas. sp*) (条带 3) 所对应的条带在贮藏 4 和 6 d 的样品中都较亮, 与贮藏 2 d 的样品相比, 在贮藏 4 d 之前有所增加, 于贮藏 6 d 时趋于稳定, 说明该菌适合在低温下生长, 且在贮藏过程中受到其他细菌生长的影响后仍能保持稳定, 说明其是肉品贮藏过程中的优势菌之一。在其他的有关报道中^[11] 指出, 该微生物只是偶尔在屠宰环境冷却贮藏猪肉中被发现, 与本研究结果不同, 这可能是由于不同的污染源、环境和研究时, 样品不同贮藏时间造成的差异所致。

2.3.4 假单胞菌 在很多相关的报道中, 对猪肉贮藏过程中的腐败菌进行菌相分析, 并对主要腐败菌进行初步分离和鉴定, 发现假单胞菌 (*Pseudomonas. sp*) 是主要的腐败优势菌之一^[10,12]。由图 2 可见, 在所有样品贮藏期间, 假单胞菌 (*Pseudomonas. sp*) 所对应的条带 (条带 4) 一直较亮, 并呈持续增加趋势, 说明其一直是优势菌, 这与很多报道一致^[2-3,10,13]。

2.3.5 葡萄球菌 葡萄球菌 (*Staphylococcus. sp*) 是食品中的一种病原微生物, 食品安全要求其不得在食品中检出。由图 2 可见, 葡萄球菌 (*Staphylococcus. sp*) 所对应的条带 5 在所有样品中存在, 贮藏 2 d 内条带不清晰, 说明其不是优势菌, 但随着贮藏时间的延长, 到 6 d 时条带清晰明亮, 说明其含量有所增加, 该微生物能在低温条件下逐渐生长, 因此要求冷却猪肉生产企业在生产过程中应严格卫生管理, 降低病原微生物的污染。

2.3.6 节杆菌 由图 2 可见, 节杆菌 (*Arthrobacter. sp*) 所对应的条带 6 一直不是很亮, 但在贮藏期间一直存在, 因此其也是冷藏肉品中的主要微生物之一。但由于节杆菌随贮藏时间的延长没有较大变化, 因此该菌不能作为优势菌, 现有的很多报道中也没有关于该微生物的报道^[10]。

综上所述认为, 假单胞菌 (*Pseudomonas. sp*)、热杀索丝菌 (*Brochothrix thermosphacta*) 和气单胞菌 (*Aeromonas. sp*) 是肉品贮藏过程中的优势菌。

如果肉品中有葡萄球菌存在,其在贮藏过程中会逐渐发展为优势菌。该结果与一些报道^[12,14-15]中的结果不完全一致,但是主要优势菌基本相同,主要原因是在不同来源的冷却肉中,尽管污染微生物的种类不同,但是随着贮藏时间的延长,优势微生物变化逐渐趋向一致,这主要是由于贮藏过程中适合低温生长的一些微生物得到发展,而其他微生物的生长受到抑制所致。

3 结 论

本研究首次应用 PCR-DGGE 指纹技术研究了猪肉冷却贮藏过程中的优势菌种类和分布,结果表明,不同来源的冷却猪肉菌相分布呈现不同变化,但是随着贮藏时间的延长,优势菌趋于明显。其中假单胞菌在贮藏期间一直是优势菌;热杀索丝菌在不同来源的猪肉样品中有差异,但也是优势菌之一;气单胞菌(*Aeromonas. sp*)在贮藏过程中有所增加,也是冷却猪肉中一种重要的优势菌;葡萄球菌一旦存在,将逐步发展成优势菌。

[参考文献]

- [1] Blixt Y, Borch E. Comparison of shelf life of vacuum-packed pork and beef [J]. *Meat Science*, 2002, 60: 371-378.
- [2] Borch E, Kant M M L, Blixt Y. Bacterial spoilage of meat products and cured meat [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 33: 103-120.
- [3] Jay J M, Vilai J P, Hughes M E. Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5-7 °C [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 81: 105-111.
- [4] Gill C O. Extending the storage life of raw [J]. *Meat Science*, 1996, 43(1): 99-109.
- [5] Muyzer G, de Weal E C, Uitterlinden A. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes cod-

ing for 16S rRNA [J]. *Applied of Environment Microbiology*, 1993, 59: 695-700.

- [6] Nübel U, Engelen B, Felske A. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis [J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178: 5636-5643.
- [7] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73: 127-141.
- [8] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems [J]. *Current of Opinion Microbiology*, 1999, 2: 317-322.
- [9] Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food review [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 56: 297-314.
- [10] Olsson C, Ahrné S, Pettersson B, et al. The bacterial flora of fresh and chill-stored pork: analysis by cloning and sequencing of 16S rRNA genes [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 83: 245-252.
- [11] Holley R A, Peirson M D, Lam J, et al. Microbial profiles of commercial, vacuum-packaged, fresh pork of normal or short storage life [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 97(1): 53-62.
- [12] Gill C O, Dussault F, Holley R A A, et al. Evaluation of the hygienic performances of the processes for cleaning, dressing and cooling pig carcasses at eight packing plants [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 58: 65-72.
- [13] Augustin J C, Minvielle B. Design of control charts to monitor the microbiological contamination of pork meat cuts [J]. *Food Control*, 2008, 19(1): 82-97.
- [14] Small A A, Wells-Burr B B, Buncic A S. An evaluation of selected methods for the decontamination of cattle hides prior to skinning [J]. *Meat Science*, 2005, 69: 263-268.
- [15] McEvoya J M, Sheridan J J, Blair I S, et al. Microbial contamination on beef in relation to hygiene assessment based on criteria used in EU Decision 2001/471/EC [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 92: 217-225.