

Establishment and Primary Application of Fluorescence Quantitative PCR for Detection of *Vibrio parahaemolyticus**

Fande Kong^{1#}, Yujuan Wu^{1,2}, Xinxin Huang³, Biaomin Huan⁴, Xiaoli Peng¹, Shufei Xu¹, Li Lin¹

¹Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen

²Biological Engineering Institute, Jimei University, Xiamen

³Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University Zhejiang, Jiaxing

⁴Animal Husbandry and Aquatic Products Bureau of Xinluo District in Longyan Prefecture, Longyan
Email: #kfd67@sina.com

Received: Dec. 27th, 2012; revised: Mar. 22nd, 2013; accepted: Apr. 5th, 2013

Copyright © 2013 Fande Kong et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Objective: The study developed a SYBR Green I real time quantitative PCR for *Vibrio parahaemolyticus* (VP). **Method:** According to genome sequences within toxR of VP published in GenBank, a pair of primers was designed by primer6.0. The reaction conditions, sensitivity and specificity of the method were optimized and evaluated. The method was also applied to clinical samples. **Result:** It was shown that the optimal primer concentration was 0.2 $\mu\text{mol/L}$. The results also demonstrated that standard curve established was shown a fine linear relationship between threshold cycle and template concentration. The correlation coefficient R^2 was 0.996, the efficiency of amplification in E was close to 100%, the dissolution curves were specific and the minimum detectable amount was 2.14 copies. This method has better specificity and reproducibility. The coincidence rate was 100% when compared the results to routine separation and assay method. **Conclusion:** A SYBR Green I fluorescent quantitative PCR for detecting toxR gene of VP was developed which could be very useful for identification and inspection of VP from fishery product in import and export.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; Fluorescence Quantitative PCR

荧光定量 PCR 技术检测副溶血弧菌方法的建立与初步应用*

孔繁德^{1#}, 吴玉娟^{1,2}, 黄新新³, 黄标敏⁴, 彭小莉¹, 徐淑菲¹, 林立¹

¹厦门出入境检验检疫局, 厦门

²集美大学生物工程学院, 厦门

³浙江清华长三角研究院, 嘉兴

⁴龙岩市新罗区畜牧水产局, 龙岩

Email: #kfd67@sina.com

收稿日期: 2012 年 12 月 27 日; 修回日期: 2013 年 3 月 22 日; 录用日期: 2013 年 4 月 5 日

摘要: 目的: 建立副溶血弧菌 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法。**方法:** 根据副溶血弧菌(VP)的 toxR 基因序列, 应用 primer6.0 设计了 1 对特异性引物, 进行了最佳引物浓度的确定, 建立了标准曲线和溶解曲线, 对所建立方法进行了特异性、灵敏度和稳定性测试, 并进行了临床样本检测。**结果:** 副溶血弧菌 SYBR Green I 荧光定量 PCR 的最佳引物浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 标准曲线循环阈值和模板浓度呈良好的线性关系, 相关系数 R^2 为 0.996, 扩增效率 E 接近 100%, 溶解曲线特异, 最低检出量为 2.14 个拷贝, 特异性和重复性较好。临床检测结果与常规细菌分离鉴定方法符合率 100%。**结论:** 建立了特异灵敏的副溶血弧菌实时荧光定量 PCR 检测方法, 对于加强进出口水产品中 VP 的检验检疫具有十分重要的意义。

*基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2010IK016), 浙江省自然科学基金(LY12C01001)。

#通讯作者。

关键词：副溶血弧菌；荧光定量 PCR

1. 引言

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, 简称 VP)是一种广泛分布于海洋和盐湖中的革兰氏阴性嗜盐性弧菌,是我国沿海地区食物中毒和夏季腹泻的重要病原菌^[1-4]。目前检测 VP 的常用方法有灵敏度低且费时费力的细菌分离培养法^[5],需要的实验步骤较多、操作周期长(一般需要 4~7 d),大大影响了现阶段进出口动物及其产品的快速验放需要,同时制约了企业开展微生物污染检测的持续性,也不利于检测机构和政府部门定期开展对该微生物的监控。检测 VP 的常用方法还有酶联免疫吸附技术^[6,7];对仪器设备实验操作要求较高的 PCR 检测技术^[8-10]和 DNA 指纹图谱技术^[11]等。

荧光定量 PCR 是近年来发展起来的分子生物学技术,具有灵敏度高、专一性强、检测速度快、可实时定量、操作简便和污染少等优点,主要包含探针法和染料法。以分子信标或 TaqMan 探针等为基础的荧光定量 PCR 已被成功地应用于检测 VP^[12-15]。但探针法对引物及探针的设计和使用要求较高。SYBR Green I 染料法利用 SYBR Green I 荧光染料与双链 DNA 分子结合发光的特性来指示扩增产物的增加,以扩增子的熔解温度(T_m)确定 PCR 反应的专一性,其优势在于:无需设计和优化荧光探针,方法适用性较好,操作更简单,且价格相对较低。目前,国内应用 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测 VP 没有报道,本文以 VP ToxR 基因为靶基因,构建快速检测 VP 的 SYBR Green I 荧光定量 PCR 技术,旨在为水生动物及其产品中快速高效检测 VP 提供一种更加简便快速和特异灵敏的技术手段。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

2.1.1. 实验菌株

VP、溶藻弧菌、霍乱弧菌、麦氏弧菌、沙门氏菌、枸橼酸杆菌等 6 个菌株均由厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心动检实验室提供。

2.1.2. 仪器和试剂

荧光定量 PCR 仪为美国 PE 公司生产的型号为 ABI 9300 的 PCR 仪;凝胶成像分析系统,为美国伯乐公司生产的 GelDoc XR 产品;3.5%碱性蛋白胨水、营养琼脂和 TCBS 琼脂为北京陆桥技术有限责任公司产品;细菌 DNA 提取试剂盒(TaKaRa Code: DV810A)和 SYBR Green I 荧光定量 PCR 反应试剂盒(SYBR[®] Premix DimerEraser[™]),购自大连宝生物工程有限公司;DNA Mark(MD101-01),购自天根生化科技(北京)有限公司。

2.1.3. 引物设计与合成

参照 GenBank 上发表的 VP 的 toxR 基因序列(AB300869.1),应用 primer2.0 设计一对特异性引物,VP PCR 扩增片段大小为 208 bp,由上海鼎安生物科技有限公司合成。引物序列如下:

VP(ToxR)F1: 5'-CGAAAGCCGTATACTCCTGATG-3'

VP(ToxR)R1: 5'-GAGTTGATAGCCTCGTTTTTGA-3'

2.2. 实验方法

2.2.1. SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测 VP 的反应体系的建立

将 VP 菌株接种到 3.5%碱性蛋白胨水中,过夜培养 18~24 h 后,用 Takara 的细菌 DNA 试剂盒提取菌体 DNA 模板溶液,进行荧光定量 PCR 扩增。反应体系为 25 μ L,具体如下:SYBR[®] Premix Ex Taq[™](2 \times) 12.5 μ L, ROX Reference Dye(50 \times)0.5 μ L, 5 μ mol/L 的上下游引物各 1 μ L, ddH₂O 8 μ L, DNA 模板 2 μ L。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 31 s,循环 40 次,在 60 $^{\circ}$ C 退火 31 s 处采集荧光信号;并在上述扩增条件后增加 60 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C 的融解曲线步骤。取 PCR 扩增产物 5 μ L 进行琼脂糖(2%)电泳检测扩增结果。

2.2.3. 最佳引物浓度的测定

对该方法的最佳引物浓度优化测定,反应体系:25 μ L

PCR 反应液组分如下:

SYBR[®] Premix Ex Taq[™](2×) 12.5 μl

ROX Reference Dye(50×) 0.5 μl

DNA 模板 2 μl

VP 上游引物 5 μmol/L 分别为 2 μl, 1.5 μl, 1 μl 和 0.5 μl, 引物终浓度分别为 0.4 μmol/L, 0.3 μmol/L, 0.2 μmol/L 和 0.1 μmol/L, 下游引物同上游引物, 剩余体积用灭菌超纯水补足。

反应条件: 采用两步法 PCR 扩增标准程序, 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 31 s, 循环 40 次, 在 60 °C 退火 31 s 处采集荧光信号; 并在上述扩增条件后增加 60 °C~95 °C 的融解曲线步骤。

2.2.4. 灵敏度检测

取 37 °C 培养 18h 的 VP 菌液, 用 0.85% 生理盐水做 10 倍梯度稀释, 稀释至 10^{-9} , 各稀释度菌液采用平板计数法计数, 具体操作参照国标法(GB/T 4789.2-2003)进行细菌计数, 然后取 1 mL VP 菌液原液, 采用 Takara 的细菌 DNA 提取试剂盒提取 VP 的 DNA, 做 10 倍梯度稀释, 稀释至 10^{-7} , 最后用优化好的荧光定量 PCR 体系进行检测, 以验证所建立的方法在检测 VP 的灵敏度效果。

2.2.5. 特异性测定

提取 VP、溶藻弧菌、霍乱弧菌、麦氏弧菌、沙门氏菌、枸橼酸杆菌等细菌的 DNA, 利用所建立的最佳反应条件分别进行荧光定量 PCR 检测, 以验证此方法对 VP 检测的特异性。

2.2.6. 稳定性测定

按照以上摸索的最优条件将该荧光定量 PCR 反应体系的试剂(除了模板)混合制成检测试剂盒, 分装 -20 °C 中冻存, 每隔一个月取出两管, 加入刚提取的 VP DNA 模板, 按照最佳反应条件进行光定量 PCR 检测, 根据扩增效果判定所建立方法的在一定时间内的稳定性。

2.2.7. 与普通 PCR 进行比较

将 VP 荧光定量 PCR 的引物用于建立 VP 普通 PCR 扩增, 扩增体系为 25 μL, 包括 2 μL VP DNA 模板, 10 × PCR Buffer 2.5 μL, 2.5 mM dNTP 1 μL, 25 mM MgCl₂ 2 μL, 20 μM 的上下游引物各 0.5 μL, 5 U/μL Taq 酶 0.5 μL, 不足体积补超纯水。具体反应条

件为 94 °C 预变性 5 min; 95 °C, 45 s, 56 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环后 72 °C 延伸 10 min。将荧光定量 PCR 反应产物, 取 5 μL 进行琼脂糖(2.5%)电泳检测扩增结果, 比较二者的灵敏度。

2.2.7. 临床应用

进口冷冻带鱼、鱿鱼和墨鱼, 活甲鱼、甲鱼蛋、螃蟹和虾等 100 份样品, 用荧光定量 PCR 技术检测, 同时与传统检测方法进行比较。

3. 结果与分析

3.1. VP 菌液浓度

经过细菌计数, 用于建立荧光定量 PCR 检测 VP 方法的 VP 菌液浓度为 1.5×10^8 cfu/ml。

3.2. 最佳引物浓度的测定

在荧光定量 PCR 反应体系中, 加入的 VP 上下游引物终浓度为 0.4 μmol/L 时反应的溶解曲线可见到有非特异性扩增(见图 1(a))和二聚体(见图 1(b)); 终浓度为 0.3 μmol/L 时也有较弱的非特异性扩增(见图 1(c))和二聚体(见图 1(d)); 终浓度为 0.2 μmol/L 时扩增曲线无非特异性扩增(见图 1(e))和无二聚体(见图 1(f)); 终浓度为 0.1 μmol/L 时虽然无非特异性扩增和无二聚体, 但检测灵敏度只到 10^{-5} cfu/ml, 即 21.4 cfu/25 μl 体系, 检测灵敏度较低(见图 1(g)和图 1(h))。确定最佳引物浓度为 0.2 μmol/L。

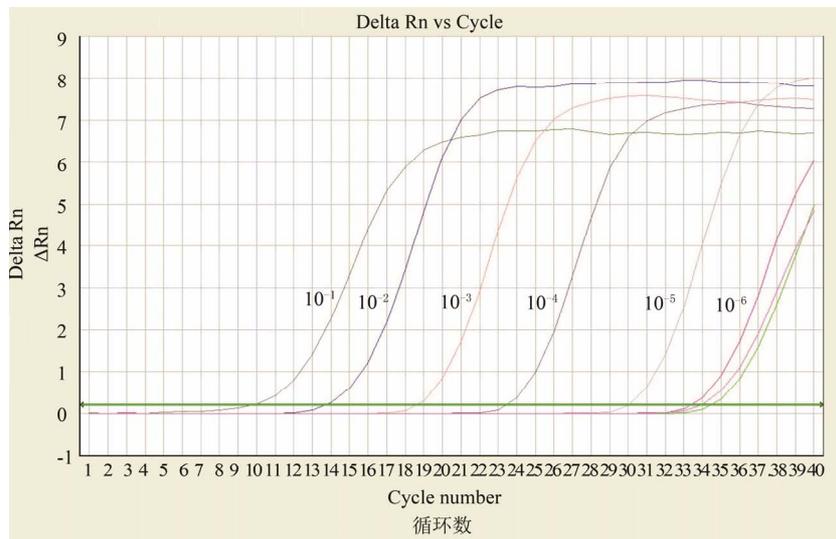
3.3. 灵敏度的测定

经检测, 建立的 VP 荧光定量 PCR 检测方法的灵敏度可达到 1.5×10^2 cfu/ml, 即 2.14 cfu/25 μl 体系, 该方法的灵敏度较高, 如图 1(e)、图 1(f)。

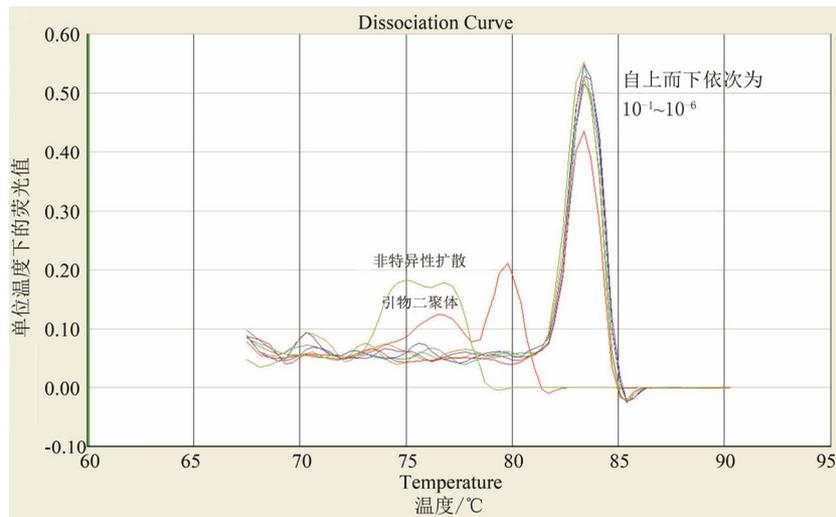
从电泳图 2 可以清晰的看出, 普通 PCR 检测 VP 的灵敏度为 1.5×10^3 cfu/ml, 即 21.4 cfu/25 μl 体系。试验证明荧光定量 PCR 的灵敏度明显比普通 PCR 高 10 倍。

3.4. VP 荧光定量 PCR 方法的标准曲线

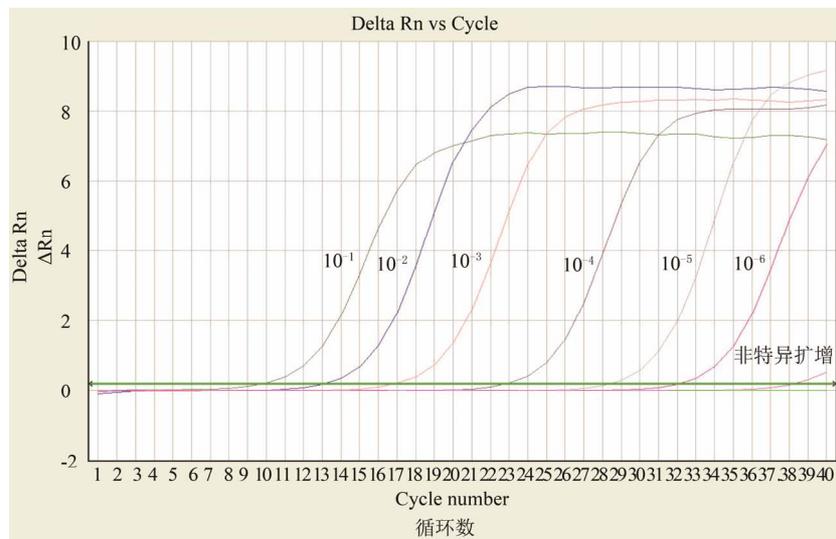
将计数好的 VP 菌液进行 10 倍梯度稀释, 稀释成 1.5×10^1 cfu/ml 到 1.5×10^{-6} cfu/ml 六个梯度, 提取细菌 DNA 用于 VP 荧光定量 PCR 扩增制作标准曲线, 以验证建立的荧光定量 PCR 方法在检测 VP 方面的质



(a)

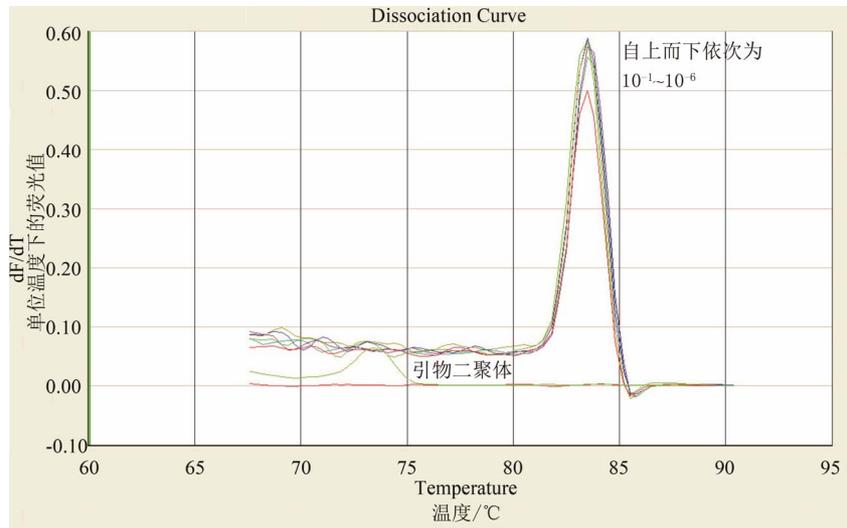


(b)

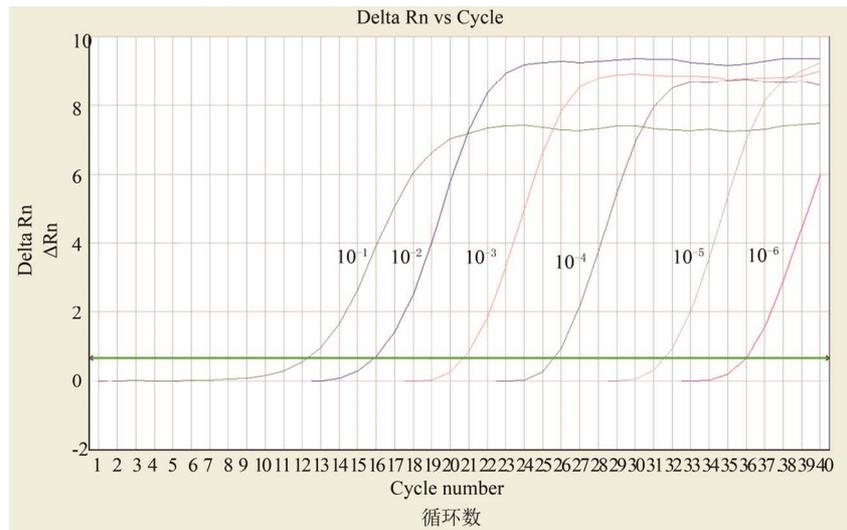


(c)

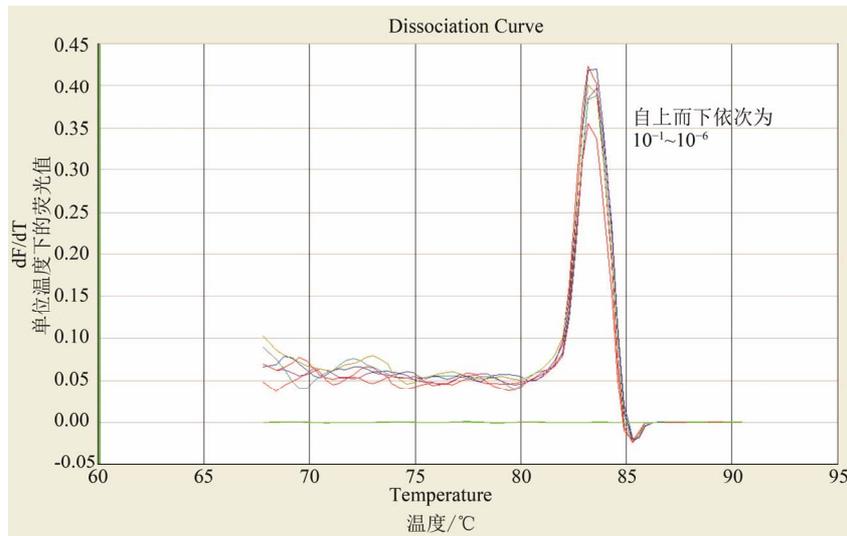
荧光定量 PCR 技术检测副溶血弧菌方法的建立与初步应用



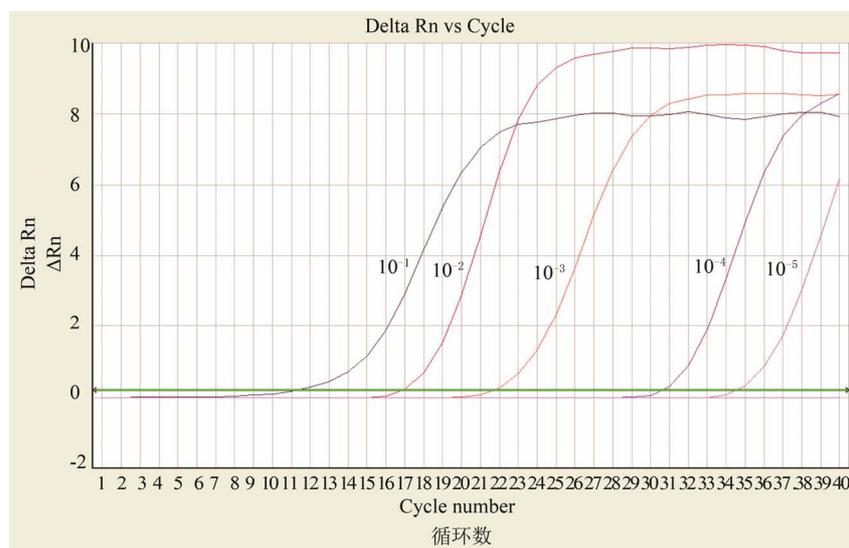
(d)



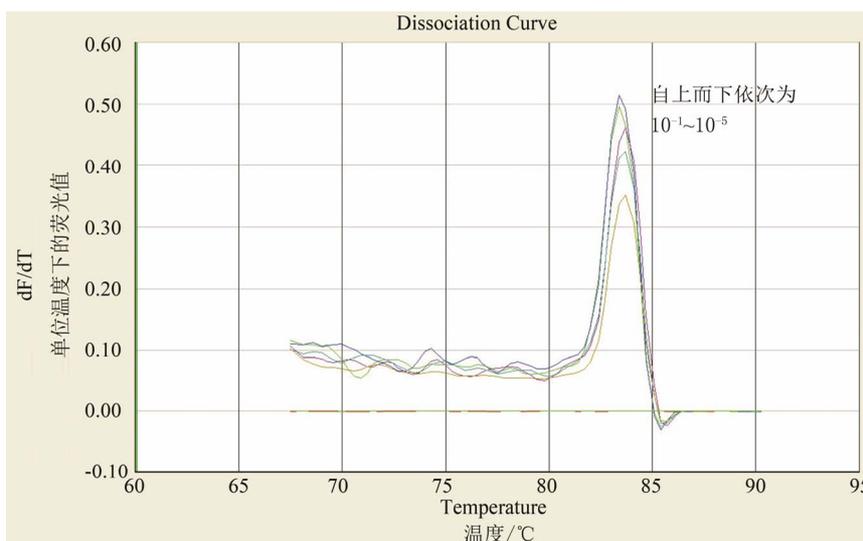
(e)



(f)



(g)



(h)

Figure 1. Optimization of various primer concentrations: (a), (c), (e), (g) are amplification plots at primer concentrations of 0.4, 0.3, 0.2 and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ respectively. (b), (d), (f), (h) are melting curves at primer concentrations of 0.4, 0.3, 0.2 and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ respectively. The amplification plots (a), (c), (e), (g) shown from left to right and the melting curves (b), (d), (f), (h) shown from up to down are the curves of decreasing concentrations of VP from 1.5×10^{-1} cfu/ml to 1.5×10^{-6} cfu/ml of the template in a serial 10-fold dilution.

图 1. 最佳引物浓度的测定: (a)、(c)、(e)和(g)为不同引物浓度下的 VP 荧光定量 PCR 扩增结果; (b)、(d)、(f)和(h)为不同引物浓度下的 VP 荧光定量 PCR 扩增的溶解曲线。图中不同扩增曲线为 VP 菌液不同稀释度(1.5×10^{-1} cfu/ml 到 1.5×10^{-6} cfu/ml)提取的 DNA 模板的扩增曲线。

量。从图 3 可以看到, 在 36 个 CT 值内进行定量 PCR 检测, 以 VP 标准菌株拷贝数的对数为 X 轴、CT 值为 Y 轴绘制标准曲线, 其相关系数 R^2 为 0.996, 具有较好的线性关系。

3.5. 特异性的测定

用 VP 引物建立的荧光定量 PCR 检测副溶血弧菌、溶藻弧菌、霍乱弧菌、麦氏弧菌、沙门氏菌、枸

橐酸杆菌, 结果显示只有副溶血细菌有扩增曲线, 其他菌没有扩增曲线, 说明该方法特异性良好(如图 4(a)和 4(b))。

3.6. 稳定性测定

检测期间将预先混合、分装好的检测试剂放置 -20°C 条件下保存 10 个月后仍能扩增出清晰的特异性扩增曲线, 说明本试剂稳定性好。



Figure 2. Sensitivity of traditional PCR: M 100 bp DNA ladder; 1 to 6 are results of decreasing concentrations of VP at 1.5×10^{-1} , 1.5×10^{-2} , 1.5×10^{-3} , 1.5×10^{-4} , 1.5×10^{-5} and 1.5×10^{-6} cfu/ml, respectively, 7 Blank control; NG Negative control
图 2. VP 普通 PCR 灵敏度检测结果: M 为 100bp DNA Marker, 图中 1~6 为 VP 模板对应的菌液浓度分别为 1.5×10^{-1} cfu/ml, 1.5×10^{-2} cfu/ml, 1.5×10^{-3} , 1.5×10^{-4} , 1.5×10^{-5} , 1.5×10^{-6} cfu/ml, 7 为空白对照, NG 为阴性对照

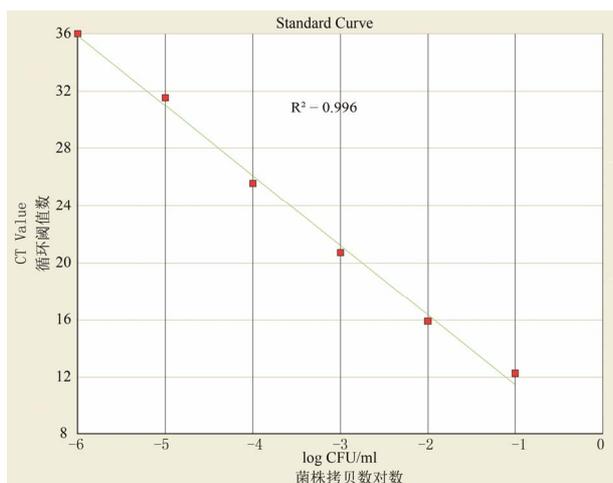
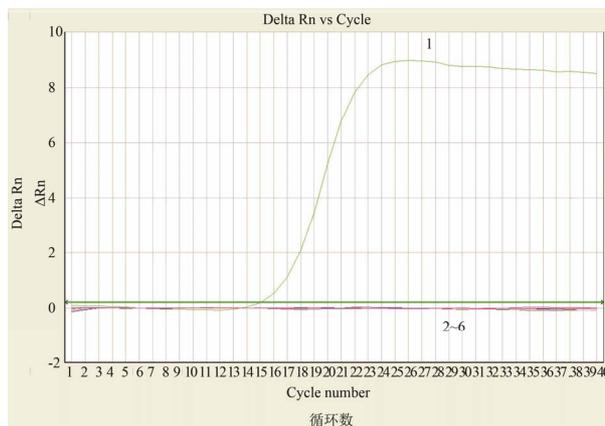


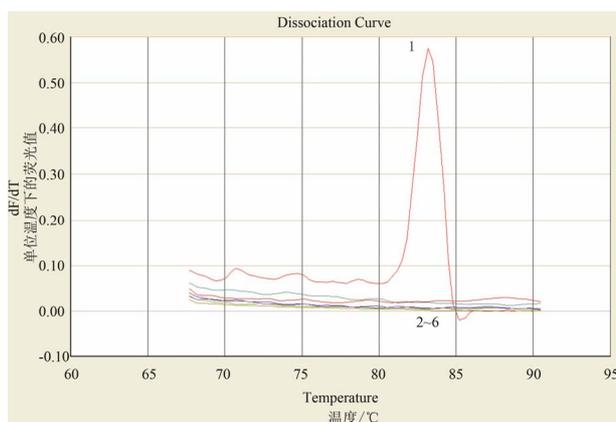
Figure 3. Standard curve for real time PCR of VP
图 3. VP 实时荧光定量 PCR 扩增的标准曲线

3.7. 临床应用

用荧光定量 PCR 同时检测进口冷冻带鱼、鱿鱼、墨鱼、活甲鱼、甲鱼蛋、螃蟹和虾等 100 份样品, 结果从进口甲鱼中检出 2 份 VP 阳性, 从进口螃蟹中检出 1 份 VP 阳性, 检测结果与常规细菌分离鉴定结果



(a)



(b)

Figure 4. Specificity for real time PCR of VP: (a) Amplification plots of VP and other control strains; (b) Melting curves of VP and other control strains. 1: *Vibrio parahaemolyticus*; 2: *Vibrio alginolyticus*; 3: *V. cholera*; 4: *Vibrio metschnikovii*; 5: *salmonella*; 6: *Citro bacter*
图 4. 特异性测定: (a)和(b)中 1 为 VP 的扩增和溶解曲线结果, 2~6 为溶藻弧菌、霍乱弧菌、麦氏弧菌、沙门氏菌、枸橼酸杆菌的扩增结果

完全吻合, 但检测时间从常规检测时间至少四天缩短为 2 天内, 大大加快了检测进程。

4. 讨论

目前报道检测副溶血弧菌的荧光 PCR 检测技术主要为 TaqMan 探针标记建立的方法, 该方法要求较高, 需要设计 TaqMan 探针, 合成成本较高, 而用 SYBR Green I 染料的方法用于建立荧光 PCR 检测副溶血弧菌未见报道, 该方法大大降低成本, 试剂通用, 它是一种结合于小沟中的双链 DNA 结合染料。与双链 DNA 结合后, 其荧光大大增强, 且其荧光强度的增加与双链 DNA 的数量成正比。这一性质使其用于扩增产物的检测非常理想。SYBR Green I 的最大吸收波长

约为 497 nm, 发射波长最大约为 520 nm。在 PCR 反应体系中, 加入过量 SYBR 荧光染料, SYBR 荧光染料特异性地掺入 DNA 双链后, 发射荧光信号, 而不掺入链中的 SYBR 染料分子不会发射任何荧光信号, 从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步。SYBR Green I 在核酸实时检测方面有很多优点, 它与所有的双链 DNA 相结合, 不必因为模板不同而特别定制, 因此通用性好, 且价格相对较低。利用荧光染料可以指示双链 DNA 熔点的性质, 通过溶点的曲线分析可以识别扩增产物和引物二聚体, 因而可以区分非特异性扩增, 同时可通过扩增温度的调整降低非特异产物的影响。此外, 由于一个 PCR 产物可以与多个分子的染料结合, 因此 SYBR Green I 的检测灵敏度很高, 而且它不要用到对人体有致癌危害的 EB。

本方法与 TaqMan 探针法相比, 其方法更加简便, 只需在 SYBR Green I 反应混合液中加入引物和待测样品就可以了, 成本相对低廉, 而且无须合成价格昂贵的探针; 与普通 PCR 相比, 更为高效、特异的检测 VP, 检测灵敏度高了 10 倍; 其扩增和检测都在同一管内完成, 不需要开盖, 不需要电泳检测 PCR 产物, 有效解决了污染问题; 可同时检测 96 个样品, 检测时间只要 2 个小时左右, 且可以直接对检测结果进行分析, 即方便又省时。因此, 本试验建立的 SYBR Green I 检测方法是一种快速、准确、简便的检测方法。

荧光定量 PCR 条件是否优化主要是通过标准曲线、扩增曲线、溶解曲线、可信度 R、扩增效率等指标来衡量, 标准曲 R 值显示实验数据满足衰减的线性程度, 即数据的线性程度。线性用来衡量重复样品数据是否一致和不同拷贝数的初始模板是否具有相同的扩增效率。一般认为反应的扩增效率在 90%~105% 之间能够达到较好的水平, 可信度 $R > 0.98$ 。本研究建立副溶血弧菌 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法扩增效率 $E = 100\%$, $R = 0.996$ 。通过溶解曲线看出反应过程中未出现非特异性扩增和明显的引物二聚体。特异性和灵敏度测试实验表明本研究所建立最低可检测出 2.14 个拷贝, 且具有很好的特异性, 将试剂预先混合-20℃ 保存稳定性非常好, 以上结果提示本研究建立了副溶血弧菌特异的荧光 PCR 检测方法,

该方法的特异性、敏感性、稳定性等技术指标均能够满足检测要求。

经试验证明本研究建立的荧光定量 PCR 方法较普通 PCR 方法能够并且本方法从制样到得出明确的检测结果只需 1.5 天, 大大缩短了检测时间, 能够满足紧急情况下的快速应急机制的要求, 也是对 VP 检测方法的进一步完善, 这对于控制和消灭 VP 和加强口岸检疫将产生重大的意义。

参考文献 (References)

- [1] K. Mullis, F. Faloona. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 1987, 155: 335-350.
- [2] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2004, 16(1): 3-9.
- [3] G. Ripabelli, M. L. Sammarco, G. M. Grasso, et al. Occurrence of vibrio and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 49(1-2): 43-48.
- [4] 林业杰, 陈亢川, 陈拱立, 胡海林. 溶藻弧菌噬菌体的分离[J]. *微生物学报*, 1993, 33(4): 285-289.
- [5] 国家标准 GB/T 4789.7-2008. 食品微生物学检验/副溶血性弧菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [6] 窦勇, 宁喜斌. 副溶血弧菌间接 ELISA 快速检测法的建立[J]. *食品工业科技*, 2007, 28(6): 205-209.
- [7] 臧红梅, 樊景凤, 王斌. 应用斑点 ELISA 技术检测副溶血弧菌[J]. *大连水产学院学报*, 2006, 21(1): 79-82.
- [8] 封幼玲, 陈太基, 王为云等. 应用 PCR 技术快速检测食品中副溶血弧菌[J]. *中国卫生检验杂志*, 1997, 7(4): 241-242.
- [9] 王华丽, 史贤明, 杨官品. 海产品中副溶血弧菌 PCR 检测方法的建立与评价[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(4): 627-628.
- [10] 张新中, 文万尧, 徐先栋等. 双重 PCR 在创伤弧菌和副溶血弧菌快速检测中的应用[J]. *现代渔业信息*, 2007, 22(9): 11-13.
- [11] T. K. Michel. Urease-positive, Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and environment in the Pacific Northwest. *Journal of Clinical Microbiology*, 1989, 27(12): 2820-2822.
- [12] 王淑娜, 周向阳, 胡兴娟等. 基于 TaqMan 探针的双重荧光定量 PCR 方法检测海产品中的副溶血弧菌[J]. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(5): 455-458.
- [13] 林强, 李宁求, 付小哲等. 牡蛎中副溶血弧菌荧光定量 PCR 检测方法的建立及其应用[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(1): 96-102.
- [14] J. L. Nordstrom, M. C. Vickery, G. M. Blackstone, et al. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(18): 5840-5847.
- [15] C. L. Lo, P. H. Leung, S. P. Yip, et al. Rapid detection of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* by a sensitive and specific duplex PCR-hybridization probes assay using LightCycler. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105(2): 575-584.