

Isolation Identification of a *Virgibacillus* sp. from Dried Cuttlefish and Its Growth Characteristics

Jing Fu¹, Pan Chen¹, Maohua Chen¹, Aiqing Xu^{1,2*}

¹School of Life Science, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan Hunan

²Key Laboratory of Ecological Remediation and Safe Utilization of Heavy Metal-Polluted Soils, College of Hunan Province, Xiangtan Hunan

Email: *xuaiqing003@163.com

Received: Jan. 4th, 2019; accepted: Jan. 16th, 2019; published: Jan. 23rd, 2019

Abstract

This paper is aimed to investigate the microflora of the white plaque existing at the surface of dried cuttlefish, and to isolate salt-tolerated microbial resources. The commercially available dried cuttlefish with white plaque were sampled, and a salt-tolerated bacterium, strain NYJ2, was isolated and purified on the Beef-extract-peptone Plate containing 5% of NaCl. The morphological characteristics of the colonies and cells, and several biochemical and physiological characteristics of the strain were detected, and partial sequence of the 16S rDNA was sequenced and phylogenetic analysis was performed. The results showed that a *Virgibacillus* sp. NYJ2 was isolated and identified from the white plaque, and it can grow in Beef-extract-peptone broth containing 0.5%~15% of NaCl, and optimum at 1%~10% of NaCl, belonging to moderately halophilic bacteria. Its growth occurs at pH 5~pH 8, 10°C~46°C and the optimum temperature ranges from 25°C to 42°C. Low-temperature below 10°C, or 0.05% of Nisin could be used to inhibit the growth and reproduction of the strain NYJ2.

Keywords

Dried Cuttlefish, Moderately Halophilic Bacterium, *Virgibacillus*, Growth Characteristics

一株墨鱼干源枝芽胞杆菌的分离鉴定与生长特性

伏靖¹, 陈盼¹, 陈茂华¹, 许爱清^{1,2*}

¹湖南科技大学生命科学学院, 湖南 湘潭

*通讯作者。

²重金属污染土壤生态修复与安全利用湖南省普通高等学校重点实验室, 湖南 湘潭
Email: xuaiqing003@163.com

收稿日期: 2019年1月4日; 录用日期: 2019年1月16日; 发布日期: 2019年1月23日

摘要

旨在了解海产品墨鱼干表面白斑的微生物区系, 并从中分离耐盐的微生物资源。以市售表面带白斑的墨鱼干为样品, 利用含5% NaCl牛肉膏蛋白胨平板分离纯化出一株耐盐细菌NYJ2, 检测了菌株的菌落和细胞形态特征、部分生理生化特性, 进行16S rDNA部分序列测序和系统发育分析。结果表明从白斑分离出一种枝芽胞杆菌, 在含0.5%~15% NaCl的牛肉膏蛋白胨培养液中可生长, 最适1%~10% NaCl, 是中度嗜盐菌; 生长酸碱度范围是pH 5~8; 生长温度范围是10℃~46℃, 最适25℃~42℃; 可利用10℃以下低温, 或者用0.05%乳酸链球菌素抑制菌株NYJ2的生长繁殖。

关键词

墨鱼干, 中度嗜盐菌, 枝芽胞杆菌, 生长特性

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

墨鱼干是新鲜墨鱼经过剖割、除内脏、洗涤、出晒、整形、焗蒸发花和包装等工序制成的墨鱼制品。在超市销售的袋装或散装墨鱼干表面都常见有白色斑块。通常认为白斑形成是焗蒸发花工序的结果, 它使七成干的鱼肉内部水分向外扩张, 体内甜菜碱等氮素化合物析出干燥而成白粉状附着物[1]。令人感兴趣的是白斑的形态与微生物菌群形成的生物膜非常相似, 因而在开展大学生创新开放实验时, 对市售墨鱼干白斑中的耐盐细菌进行了分离鉴定研究。曾经从墨鱼干产品的表面白斑中分离到中度耐盐细菌——栖盐菌属细菌(*Salinicola* sp. NYJ01) [2]。本研究从表面白斑中分离纯化出另一株中度耐盐菌株 NYJ2, 检测了该菌株的细胞形态学、部分生理生化指标, 并进行了 16S rDNA 测序和系统发育分析, 以及生长繁殖抑制性试验。研究结果有助于人们了解墨鱼干产品表面菌群的分布情况, 为墨鱼干产品的质量控制在提供参考。

2. 材料与方法

2.1. 材料与仪器

实验采样: 市售袋装墨鱼干, 表面有白斑; 牛肉膏蛋白胨培养基(含 5% NaCl): 牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 50 g、去离子水 1000 mL, pH 7.2~7.4, 115℃灭菌 30 min。

磁珠法细菌基因组 DNA 抽提试剂盒, Taq DNA 多聚酶(含 Taq DNA Polymerase、10× PCR Buffer 和 MgCl₂), 细菌通用引物 27F 和 1492R, dNTPs Mixture Solution: 生工生物工程(上海)股份有限公司; 稳压稳流电泳仪(SCR-600A, 中国上海康华生化仪器制造厂); PCR 扩增仪(Eppendorf AG 22331 Hamburg,

德国 Eppendorf AG 公司); 倒置荧光显微镜(Leica DMi8, 德国 Leica 公司)。

2.2. 试验方法

2.2.1. 耐盐菌的分离纯化

取袋装的墨鱼干一片, 用无菌手术刀刮取表面白斑碎屑约 1 g, 转接到牛肉膏蛋白胨培养液(含 5% NaCl)中, 于 25℃恒温振荡箱中 150 r/min 培养 24 h, 富集培养耐盐细菌; 适度稀释菌悬液, 涂布于牛肉膏蛋白胨培养基平板(5% NaCl), 28℃恒温箱中倒置培养 48 h; 继续用接种环挑取单菌落划线分离纯化, 得到耐盐细菌 NYJ2。

2.2.2. 菌株 NYJ2 的形态学检测

挑取牛肉膏蛋白胨培养液(含 5% NaCl)中 NYJ2 培养物制作细菌涂片, 石炭酸复红染料染色后, 使用倒置荧光显微镜观察菌体细胞形态。

2.2.3. 耐盐度测定试验

用牛肉膏蛋白胨培养液(含 5% NaCl)中 25℃恒温 150 r/min 振荡培养 24 h 的 NYJ2 培养物, 按 1%接种量(V/V)接种于 100 ml 含 NaCl 浓度(W/V)为 0%、0.5%、1%、2%、3%、5%、8%、10%、12%、15%、20%、25%、30%和 32%的牛肉膏蛋白胨培养液, 25℃恒温 150 r/min 振荡培养 24~72 h, 观察培养物的浊度以衡量菌体细胞的生长状况, 评判菌体细胞的生长耐盐性。

2.2.4. 生长温度范围试验

用牛肉膏蛋白胨培养液(含 5% NaCl)中 25℃恒温 150 r/min 振荡培养 24 h 的 NYJ2 培养物, 按 1%接种量(V/V)接种于 100 ml 牛肉膏蛋白胨培养液(含 5% NaCl)中, 分别在 10℃、25℃、37℃、42℃、46℃和 55℃恒温 150 r/min 振荡培养 24~72 h, 观察培养物的浊度以衡量菌体细胞的生长状况, 评判菌体细胞的生长温度适应性。

2.2.5. 生长 pH 范围试验

用 NaOH(或 HCl)试剂调整牛肉膏蛋白胨液体培养液(含 5% NaCl)的 pH 值。将新鲜 NYJ2 培养物按 1%接种量(V/V)接种于 100 ml pH 值为 4、5、6、7、8、9 的牛肉膏蛋白胨培养液中, 25℃恒温 150 r/min 振荡培养 24~72 h, 观察培养物的浊度以衡量菌体细胞的生长状况, 评判菌体细胞的生长 pH 适应性。

2.2.6. 16S rDNA 序列分析

移取菌株 NYJ2 的牛肉膏蛋白胨培养液(含 5% NaCl)培养物, 离心(10,000×g, 10 min)收集菌体细胞。用磁珠法细菌 DNA 抽提试剂盒提取基因组 DNA, 以 1.0%琼脂糖电泳检测所提取的基因组 DNA 质量。以合适的 PCR 反应体系和反应条件[2], 用通用引物 27F 和 1429R 扩增得到菌株 16S rDNA 的 PCR 产物, 经琼脂糖电泳检测质量后, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司双向测序。测定的 16S rDNA 序列拼接后, 在 GenBank 中用 blastN 程序搜索比对相似序列。并将序列提交到 GenBank 中。

利用 LPSN 数据库检索枝芽胞杆菌属(*Virgibacillus*)和芽胞杆菌属(*Bacillus*)的菌种名和模式菌株, 查找到部分菌株的 16S rDNA 序列在 Genbank 中的登录号, 用于菌株 NYJ2 的系统发育分析。选择建树用枝芽胞杆菌的特征是: 1) 分离自中国的盐湖海洋等自然环境; 2) 分离自传统发酵食品基质; 或 3) 在含 0%~20%的 NaCl 盐度下能生长的耐盐菌。分析菌株 NYJ2 的系统发育地位时, 首先运用 ClustalW 1.8.3 程序将所选模式菌株与待测菌株 NYJ2 的 16S rDNA 序列进行多序列比对; 其次运用分子进化遗传分析软件 MEGA 7.0.26 构建 N-J 系统发育树。系统发育树的可靠性检测的自举值设定为 1000 次, 以枯草芽胞杆菌做外群。

2.2.7. 对食品防腐添加剂抗性试验

参照国家标准[3]规定在水产或肉制品中容许使用的防腐添加剂的种类及其最大容许剂量,防腐添加剂选用食品级的山梨酸钠、苯甲酸钠、脱氢乙酸钠、双乙酸钠、焦亚硫酸钠和乳酸链球菌素。在100 ml牛肉膏蛋白胨培养液(含5% NaCl)中分别添加前述食品防腐添加剂至最大溶剂容许量和对倍稀释剂量,移取牛肉膏蛋白胨培养液(含5% NaCl)培养的NYJ2的新鲜培养物,按1%接种量(V/V)接种后,25℃恒温150 r/min 振荡培养24~72 h,观察培养物的浊度以衡量菌体细胞的生长状况,检测防腐添加剂对菌株NYJ2最小抑制浓度。

3. 结果与讨论

3.1. 结果分析

3.1.1. 菌株的形态

从墨鱼干样品中分离纯化到耐盐菌株NYJ2,它在牛肉膏蛋白胨培养基(5% NaCl)平板上,28℃培养48 h生长形成的菌落呈乳白色、隆起、边缘整齐。在牛肉膏蛋白胨培养液(5% NaCl)中28℃恒温振荡培养48 h,在室温下静置半小时可见培养液底部出现絮凝状物。显微镜镜检细菌涂片观察到菌体细胞呈杆状或短杆状。

3.1.2. 菌株NYJ2的生长条件

耐盐度测定结果是菌株NYJ2在含0.5%~15% NaCl的牛肉膏蛋白胨培养液均可生长繁殖,其中1%~10% NaCl生长良好。在无NaCl和高于15% NaCl的牛肉膏蛋白胨培养液中未见生长。表明菌株NYJ2是一种中度嗜盐菌。

生长温度范围试验结果是菌株NYJ2在10℃、25℃、37℃、42℃、46℃试验点下可生长繁殖,其中25℃~42℃生长最好,55℃未见生长。

生长pH范围试验结果是菌株NYJ2在pH 5~8范围内均可生长繁殖,而在pH 4和pH 9时未见生长。

3.1.3. 16S rDNA 序列分析

提取NYJ2的基因组DNA后,进行16S rDNA部分序列PCR扩增,PCR产物测序得1490 bp核苷酸片段,在Genbank中提交的登录号是KT149393。序列在Genbank中进行BLAST搜索比对,结果表明它与枝芽胞杆菌属(*Virgibacillus*)和芽胞杆菌属(*Bacillus*)中的部分菌株的16S rRNA基因序列的一致性高达98%。选择枝芽胞杆菌属中的一些模式菌株与待测菌株NYJ2的16S rRNA基因序列构建系统发育树(见图1),菌株NYJ2与枝芽胞杆菌属的模式株盐脱氮枝芽胞杆菌(*Virgibacillus halodenitrificans*)聚类在同一分枝,表明两者之间的亲缘关系最近。因此,鉴定NYJ2是一种枝芽胞杆菌,暂定名为*Virgibacillus* sp. NYJ2。

3.1.4. 食品防腐添加剂抗性试验

试验结果见表1。在最大容许剂量下,山梨酸钠(0.1%)、苯甲酸钠(0.1%)、双乙酸钠(0.1%)、脱氢乙酸钠(0.05%)和焦亚硫酸钠(0.01%)都不能抑制菌株NYJ2生长繁殖。只有0.05%的乳酸链球菌素有抑制该菌生长繁殖的效果。

3.2. 讨论

本研究表明枝芽胞杆菌与墨鱼干表面白斑的形成有一定关系,它对产品安全性或品质影响应引人关注。根据文献资料[4]整理得到枝芽胞杆菌属的一些模式菌株的生物学特性见表2,表明枝芽胞杆菌属菌株所分离的环境主要是含高盐环境:如盐田、盐湖或者高盐食品环境。枝芽胞杆菌属菌种能在含盐(NaCl等)浓度范围较宽的培养基中,是一类典型的耐盐细菌(嗜盐细菌)。由此可见,枝芽胞杆菌适应生长在水

活度较低的基质上, 墨鱼干无疑是该菌的良好生长基质。

研究人员对枝芽胞杆菌属在食品中的生态分布持乐观的评价。枝芽胞杆菌属能够促进食品发酵的进程以及改善发酵食品的风味, 如韩国的发酵酱(Jeotgal) [5]和中国四川的川冬菜[6]的发酵生产, 还作为发酵剂缩短鱼露[7]的发酵时间。该属细菌还能产生有激酶活性的盐诱导性肽[8]; 以及各种酶系, 甚至有抗微生物物质[9]; 还合成相容性溶质四氢甲基嘧啶羧酸(Ectoine) [10], 它可作为渗透压调节因子, 在生物医药中有应用前景[11]。或许枝芽胞杆菌能用做发酵剂用于墨鱼干的罨蒸发花工序, 而有益于产品的风味和品质。如果人们对墨鱼干制品中的枝芽胞杆菌菌斑有所介意, 可利用 0.05%的乳酸链球菌素来抑制菌株 NYJ2 的生长繁殖。

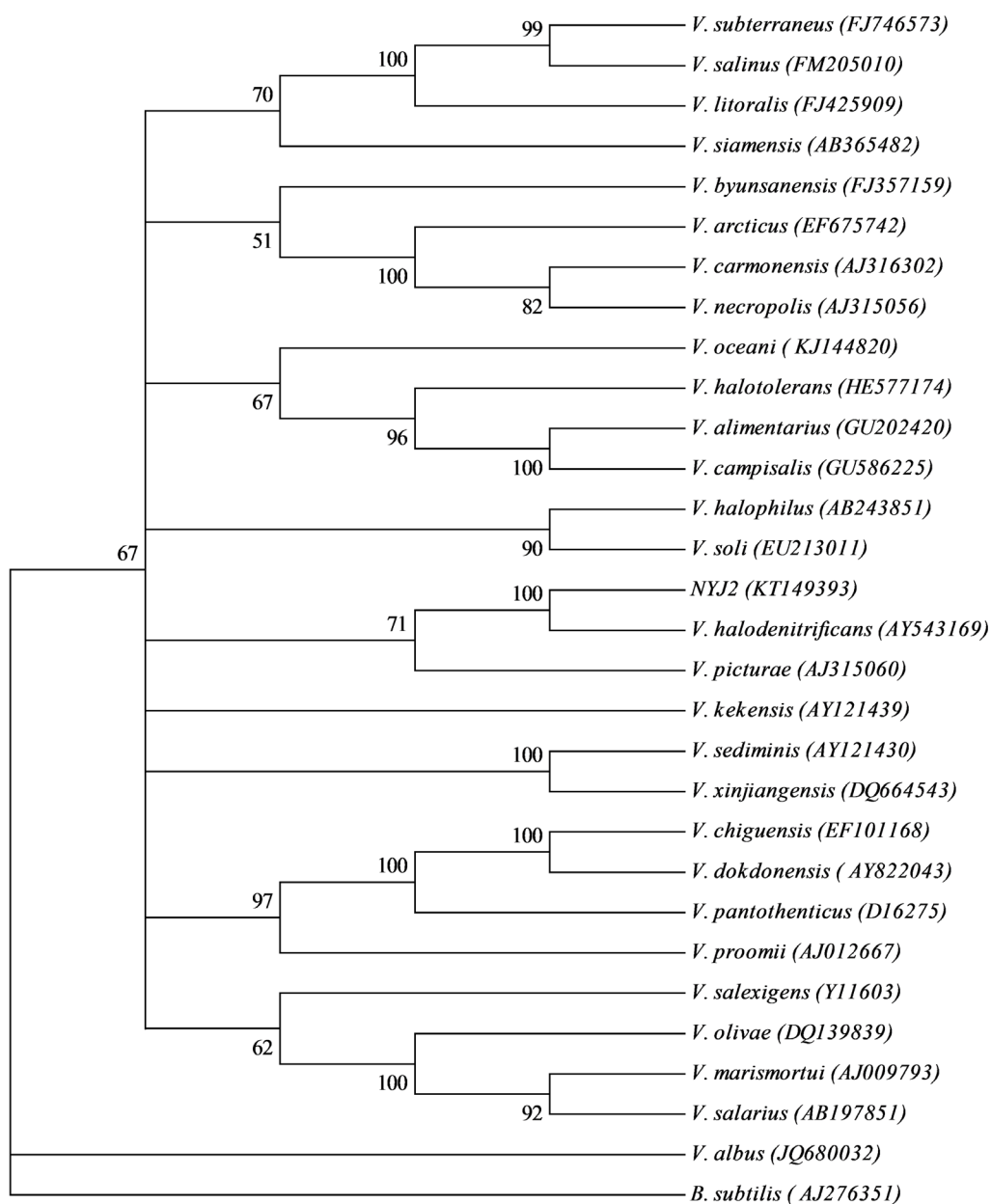


Figure 1. Neighbor-joining phylogenetic consensus tree based on the 16S rRNA gene partial sequences

图 1. 基于 16S rRNA 基因构建的 N-J 系统发育树

Table 1. The effects of food additive preservative on growth and reproduction of the strain NYJ2
表 1. 食品防腐添加剂对菌株 NYJ2 生长繁殖的影响

食品防腐添加剂	添加量(%)	生长状况	食品防腐添加剂	添加量(%)	生长状况	
山梨酸钠	0.1	+	双乙酸钠	0.1	+	
	0.05	+		0.05	+	
	0.025	+		0.025	+	
	0.0125	++		0.0125	++	
苯甲酸钠	0.1	+	脱氢乙酸钠	0.05	+	
	0.05	+		0.025	+	
	0.025	+		焦亚硫酸钠	0.01	+
	0.0125	++			0.0005	++
乳酸链球菌素	0.05	-				

注：“-”表示培养液澄清，无菌生长；“+”表示培养液微浑浊菌已生长；“++”表示培养液浑浊，菌明显生长。

Table 2. The contrast of growth characteristics of several type strains belonging to the genus *Virgibacillus* and the strain NYJ2
表 2. 菌株 NYJ2 与枝芽胞杆菌属部分模式菌株的生长特性的比较

序号	名称	耐盐度(%)	生长温度(°C)	生长酸碱度	分离环境
1	<i>V. halodenitrificans</i>	2~23 (3~7)	10~45 (35~40)	5.8~9.6 (ND)	法国盐田
2	<i>V. byunsanensis</i>	0~20 (8)	4~40 (ND)	6.0~ND (7.0~8.0)	韩国盐田
3	<i>V. campisalis</i>	0.5~20 (4~5)	15~40 (37)	6.0~9.0 (7.5~8.0)	韩国盐田
4	<i>V. koreensis</i>	0~20 (5~10)	10~45 (25)	5.5~9.0 (7.0)	韩国盐田
5	<i>V. halophilus</i>	0~18 (ND)	5~45 (ND)	5.0~10.0 (ND)	日本挂川(Kakegawa)野外土样
6	<i>V. sediminis</i>	1~20 (5~10)	10~55 (35~40)	6.0~10.5 (7.5~8.0)	柯柯盐湖沉积物(中国西北)
7	<i>V. kekensis</i>	0~25 (10)	10~50 (37)	6.0~10.0 (7.0)	柯柯盐湖水(中国西北)
8	<i>V. albus</i>	1~17 (5~10)	15~45 (25~30)	4.0~9.0 (7.0)	中国罗布泊盐湖土样
9	<i>V. xinjiangensis</i>	0~20 (5~7)	8~52 (32~35)	6.5~9.5 (7.5~8.0)	中国新疆盐湖
10	<i>V. subterraneus</i>	0~25 (9)	10~50 (30)	6.0~9.0 (7.5)	柴达木盆地盐碱土样(中国)
11	<i>V. salinus</i>	3~20 (10)	15~40 (37)	6.0~10.0 (7.5)	锡林浩特附近盐湖沉积物(中国内蒙古)
12	<i>V. zhanjiangensis</i>	1~15 (4~7)	10~45 (30)	6.0~10.0 (6.5)	涠洲岛潮滩海水(中国南海)
13	<i>V. litoralis</i>	2~25 (5~10)	10~45 (30)	6.0~10.0 (8.0)	涠洲岛盐渍土(中国南海)
14	<i>V. chiguensis</i>	0~30 (5~10)	15~50 (40)	5.0~9.0 (7.5)	台南七股地区废弃盐场
15	<i>V. soli</i>	3~20 (10)	15~40 (37)	6.0~10.0 (7.5)	台湾阳明山土样

Continued

16	<i>V. halotolerans</i>	0.5~16.5 (3~5)	8~35 (27~30)	6.5~8.5 (7.0~8.0)	德国牛奶制品
17	<i>V. alimentarius</i>	0~30 (9~10)	4~40 (37)	7.0~11.0 (10.0)	韩国高盐发酵斑鳃(gizzard shad)食品
18	<i>V. siamensis</i>	1~20 (5~10)	10~55 (35~40)	6.0~10.5 (7.5~8.0)	泰国发酵鱼(Pla-Ra)
19	<i>Virgibacillus</i> sp. NYJ2	0.5~15 (1~10)	10~46 (25~42)	5~8	墨鱼干

4. 结论

从市售墨鱼干表面白斑分离纯化出一株耐盐细菌 NYJ2。通过细胞形态特征、部分生理生化特性、16S rDNA 测序和系统发育分析表明它是一种枝芽胞杆菌(*Virgibacillus* sp. NYJ2)，是一种中度嗜盐菌，在含 0.5%~15% NaCl 的牛肉膏蛋白胨培养液中可生长，最适 1%~10% NaCl；生长酸碱度范围是 pH 5~8；生长温度范围是 10℃~46℃，最适 25℃~42℃；可利用 10℃ 以下低温，或者用 0.05% 乳酸链球菌素抑制其生长繁殖。

基金项目

湖南省教育厅资助科研项目(16B095)；湖南科技大学大学生科研创新计划项目(SYZ2015081, SYZ2018065)。

参考文献

- [1] 罗涛. 墨鱼干加工工艺[J]. 农村百事通, 2018(23): 40-41.
- [2] 许爱清, 周士镛, 冯杏杏, 等. 一株墨鱼干源中度嗜盐菌的系统发育分析与生长特性[J]. 食品工业科技, 2013, 34(21): 175-180.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准食品添加剂使用标准 GB 2760-2011 [S]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [4] Sanchez-Porro, C., de la Haba, R.R. and Ventosa, A. (2014) 36 The Genus *Virgibacillus*. In: DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E. and Thompson, F., Eds., *The Prokaryotes, Firmicutes and Tenericutes*, 4th Edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [5] Guan, L, Cho, K.H. and Lee, J.H. (2011) Analysis of the Cultivable Bacterial Community in Jeotgal, a Korean Salted and Fermented Seafood, and Identification of Its Dominant Bacteria. *Food Microbiology*, **28**, 101-113. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.09.001>
- [6] 董玲, 蒲彪, 敖晓琳, 等. 四川冬菜中细菌群落组成及多样性[J]. 微生物学报, 2012, 52(4): 519-525.
- [7] Sinsuwan, S., Rodtong, S. and Yongsawatdigul, J. (2012) Hydrolytic Activity of *Virgibacillus* sp. SK37, a Starter Culture of Fish Sauce Fermentation, and Its Cell-Bound Proteinases. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **28**, 2651-2659. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1075-5>
- [8] Rafiee, M.R., Sokhansanj, A., Yoosefi, M., et al. (2007) Identification of Salt-Inducible Peptide with Putative Kinase Activity in Halophilic Bacterium *Virgibacillus halodenitrificans*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **104**, 178-181. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.178>
- [9] Santos, O.C., Pontes, P.V., Santos, J.F., et al. (2010) Isolation, Characterization and Phylogeny of Sponge-Associated Bacteria with Antimicrobial Activities from Brazil. *Research in Microbiology*, **161**, 604-612. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.013>
- [10] Kuhlmann, A.U., Hoffmann, T., Bursy, J., et al. (2011) Ectoine and Hydroxyectoine as Protectants against Osmotic and Cold Stress: Uptake through the SigB-Controlled Betaine-Choline-Carnitine Transporter-Type Carrier EctT from *Virgibacillus pantothenicus*. *Journal of Bacteriology*, **193**, 4699-4708. <https://doi.org/10.1128/JB.05270-11>
- [11] 朱道辰, 刘杏荣. 相容性溶质四氢嘧啶及其羟基化衍生物的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(2): 95-101.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2166-613X，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：hjfn@s@hanspub.org