

青海甜醅中乳酸菌种群构成及病原菌拮抗性菌株的分离鉴定

桓玉萍¹, 薛宇¹, 李熠¹, 周文渊¹, 杨振泉^{1,2*}

(1. 扬州大学食品科学与工程学院, 江苏扬州 225127; 2. 江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室, 江苏扬州 225127)

摘要:应用高通量测序方法对采集自青海地区的甜醅样品中的乳酸菌种群进行分析,以探索青海传统发酵食品甜醅中的乳酸菌构成并进行功能乳酸菌分离,同时以大肠杆菌、沙门氏菌、蜡样芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌4种病原菌为指示菌,对其中病原菌拮抗性菌株进行了筛选与鉴定。结果表明:青海甜醅优势乳酸菌为 *Pediococcus acidilactici*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus crustorum*、*Leuconostoc pseudomesenteroides*,以及4种未能分类的乳酸杆菌(*Lactobacillus* sp.)。抑菌试验结果显示:1株乳酸菌分离株 B29 对4种指示菌均具有高效抑制效应,胞外产物抑菌作用受蛋白酶影响最大。通过革兰氏染色镜检、扫描电镜进行细胞形态观察、生理生化特征鉴定及16S rDNA 测序鉴定,结果表明分离株 B29 为植物乳杆菌。

关键词:青海甜醅;乳酸菌;种群;病原菌拮抗性菌株

中图分类号: TS 972.123.6

文献标志码: A

文章编号: 2095-8730(2020)02-0077-06

青海甜醅是我国青海高原的民间美食小吃,醅粒和醅汁带有甘甜和醇酒的香味,广受汉族、回族、藏族、土家族人民喜爱。青海甜醅以燕麦或青稞为原料经长期自然发酵而成,^[1]目前对发酵中的微生物种群仍知之甚少,甜醅生产大多处于家庭作坊式加工阶段,存在生产工艺不稳定、保质期短等缺陷。^[2]另一方面,青海地区由于寒冷、缺氧、高海拔等地理环境,传统发酵食品在当地人群饮食结构中占据较大的比重,发酵食品中蕴藏的功能微生物可能与当地人群肠道微生态平衡密切相关,^[3]但目前青海传统发酵食品中存在的微生物资源尚未得到有效开发。

乳酸菌是一种公认的食品级微生物,乳酸菌发酵食物不仅营养和风味有所改善,其抑制腐败菌的作用也大大增强。从传统发酵食品中分离纯化乳酸菌作为发酵剂,不但有助于形成风味和色泽,^[4-7]乳酸菌代谢产生的酸性物质及多肽类物质可抑制腐败菌、致病菌生长,在改善发酵食品感官特征的同时起到防腐的作用,^[8-9]有效减少了亚硝酸盐、有机酸及其盐类等化学防腐剂的使用,

为满足人们天然绿色食品的需求提供了新的途径。另一方面,目前抗生素过度使用也导致体内外原有的微生态系统发生变化,导致新的人类和动物疾病发生。^[10]因此发掘高效、广谱的新型病原菌拮抗性乳酸菌作为食品绿色生产和动物“减抗”养殖的生态制剂,已经成为近年来国内外的研究热点。

本研究从我国青海西宁不同地点采集了传统发酵甜醅样品,对其中乳酸菌种群构成进行了分析,并从中分离筛选抑菌活性高、抑菌谱宽的病原拮抗性乳酸菌株,旨在发掘和利用新型的乳酸菌资源。

1 材料与方法

1.1 菌株、试剂与仪器

菌株大肠杆菌(*Escherichia coli* CICC 10664)、沙门氏菌(*Salmonella enteric subsp enterica* CICC 21513)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* CICC 21261)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CICC 21600):中国工业微生物菌种保藏管理中

收稿日期:2019-10-20 *通信作者

基金项目:江苏省高等学校大学生创新创业训练计划(201811117021Z)

作者简介:桓玉萍,女,扬州大学食品科学与工程学院学生,从事食品营养与卫生研究;

杨振泉,男,扬州大学食品科学与工程学院教授,博士,博导,从事食品微生物资源与利用研究。

心;PCR试剂、溶菌酶、蛋白酶、过氧化氢酶:上海生工生物工程有限公司;MRS培养基、细菌生化鉴定试剂、酵母浸出粉、胰蛋白胨、琼脂粉:广州环凯生物试剂有限公司产品;细菌16S rDNA扩增引物均由上海生工生物工程有限公司合成;其它化学试剂均为国产分析纯。

ABI2720热循环仪:美国Life Technologies公司;凝胶成像系统:法国Vilber Lourmat公司;UV-7504C分光光度计:上海欣茂仪器有限公司;Elx-800酶标仪:美国Bio-Tek公司;显微镜:日本Olympus公司;S-4800场发射扫描电镜:日本日立公司。

1.2 样品采集

课题组于2018年5月28—29日在青海省西宁市湟源县和海湖新区采集甜醅两份,样品编号分别为QHTP1和QHTP2。样品采集通过无菌操作将100g样品装入塑料瓶,低温保藏,72h内送至实验室进行分析。

1.3 乳酸菌活菌计数

无菌操作称取25g样品,加入225mL无菌生理盐水,匀浆2min,取1mL样品匀浆用无菌生理盐水进行10倍稀释。取 10^{-2} ~ 10^{-6} 连续5个稀释度的样品稀释液1mL涂布MRS平板,每个稀释度做5个平行。平板标号后于超净台自然吹干15min,置于厌氧罐中,于37℃恒温培养箱,连续培养48h。取菌落数在30~300个/平皿的MRS平板进行人工计数,取平均数表示样品中乳酸菌活菌数,以lg CFU/g表示。

1.4 乳酸菌种群构成分析

取高稀释度(10^{-2})样品涂布的MRS平板,加入3mL生理盐水,用涂布棒将菌落(菌苔)刮下,形成菌悬液,用生理盐水调节 $OD_{600\text{nm}}$ 至0.5;菌悬液总DNA提取应用试剂盒Fast DNA SPIN Kit(Qbiogene Inc.)按照说明书进行操作。以提取的总DNA样品作为模板,应用16S rRNA基因V3~V4区通用引物338F(5'-CCTACGGGAGGCAG-CAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGT-WTCTAAT-3')对16S rRNA基因V3~V4区进行PCR扩增。PCR扩增体系(总体积50.0 μ L)含有:5.0 μ L 10 \times PCR Buffer、4.0 μ L dNTPs(2.5mM)、2.0 μ L引物(10pM)、0.25 μ L Pyrobest DNA聚合酶、20ng样品DNA模板,加灭菌超纯水补足至50.0 μ L。PCR反应条件为:94℃

5min,25个循环(每个循环包括:94℃30s、48℃30s、72℃30s),最后72℃延伸10min。扩增产物用2.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。16S rRNA基因V3~V4区PCR扩增产物高通量测序、序列优化及OTU种属鉴定和菌群构成分析委托上海集美生物科技有限公司进行,测序平台为Illumina Miseq。

1.5 乳酸菌分离与鉴定

吸取250 μ L不同稀释度样品液涂布含有0.75%CaCO₃的MRS平板,放入厌氧罐,37℃的恒温培养4h,选择分离程度较好的平板挑取有溶钙圈的单菌落,在MRS平板上反复划线纯化,按文献[11]所述的方法对接触酶阴性、产酸的革兰氏阳性球菌进行耐盐性、温度、耐酸碱、动力学以及糖和氨基酸发酵试验,细菌的细胞微观形态采用扫描电镜观察,培养物进行编号后分别用甘油保种,备用。

1.6 菌株16S rDNA PCR扩增与测序鉴定

菌株DNA提取方法按试剂盒说明书进行。以细菌基因组DNA为模板,应用扩增引物8F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和15R(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'),引物进行16S rDNA的PCR扩增。PCR反应体系(50 μ L)包括:2 μ L模板(50ng/ μ L)、2 μ L dNTPs(10mmol/L)、引物8F(10pmol/ μ L)和15R(10pmol/ μ L)各2.0 μ L、5 μ L 10 \times Buffer、5 μ L MgCl₂(25mmol/L)、0.3 μ L Tag酶(5U/ μ L),最后加ddH₂O补足至50 μ L。PCR扩增程序为:94℃预变性5min;94℃变性40s,50℃退火35s,72℃延伸2.0min,35次循环;72℃延伸10min。取7.0 μ L PCR产物用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测片段大小,其余PCR产物委托上海生物工程有限公司测序,所得序列在GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库中进行在线比对,序列同源性大于99%设为相同种。

1.7 病原菌拮抗性菌株的筛选

1.7.1 指示菌悬液的制备

将食源性致病菌菌株大肠杆菌(*Escherichia coli* CICC 10664)、沙门氏菌(*Salmonella enteric subsp enterica* CICC 21513)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* CICC 21261)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CICC 21600)保藏液复苏培养后,划线接种LB平板,37℃培养24h,挑取单菌落接

种 2 mL LB 液体培养基, 37 °C 摇床培养过夜, 培养物 8 000 g 离心 5 min, 收集菌体用新鲜 LB 培养基重悬至 $OD_{600\text{ nm}} = 0.5$; 取菌悬液按 2% 接种量接种到 10 mL LB 液体培养基, 37 °C 振荡培养 8 h, 8 000 g 离心 5 min, 收集菌体用新鲜 LB 培养基 (2 ×) 重悬形成指示菌悬液, 并调整 $OD_{600\text{ nm}} = 0.1$, 4 °C 保存备用。

1.7.2 乳酸菌培养上清制备

将乳酸菌甘油保藏液以 2% 接种量接种到 5 mL MRS 培养基, 置于厌氧罐 37 °C 培养 24 h; 取 1 环培养物划线接种 MRS 平板, 置于厌氧罐 37 °C 培养 36 h; 挑取单菌落接种到 5 mL MRS 液体培养基, 置于厌氧罐 37 °C 培养 24 h; 培养物通过 8 000 g 离心 5 min, 收集菌体用新鲜 MRS 培养基重悬至 $OD_{600\text{ nm}} = 0.5$; 取菌悬液以 5% 的接种量接种 10 mL MRS 培养基, 置于厌氧罐 37 °C 培养 36 h, 培养液于 8 000 g 离心 10 min, 收集培养上清液通过 0.22 μm 过滤器除去菌体, 滤过液置于 4 °C 冰箱保存备用。

1.7.3 抑菌活性菌株的初筛

用浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液将乳酸菌培养上清的 pH 值调节到 5.5, 取 50 μL 乳酸菌培养上清 (pH 5.5) 和 50 μL 指示菌悬液加入到 96 孔聚苯乙烯培养板中, 对照孔加入 50 μL pH 5.5 的 MRS 培养基和 50 μL 指示菌悬液混合物, 37 °C 培养 6 h 后取出用酶标仪测定 $OD_{600\text{ nm}}$ 值, 每样设置 3 个平行, 取平均值用于分析, 小于对照孔 $OD_{600\text{ nm}}$ 值 50% 的菌株认为具有抑菌活性。

1.7.4 抑菌活性菌株的复筛

乳酸菌培养上清用过氧化氢酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶 37 °C 温浴 2 h 处理, 取出后用牛津杯法测定抑菌圈。在直径 9 cm 的培养皿中倾入 20 mL LB 固体培养基浇注平板, 分别吸取 4 种指示菌悬液 ($OD_{600\text{ nm}} = 0.1$) 0.1 mL 于 LB 固体培养基, 涂布均匀, 超净台内晾干 5 min; 在平板上等距离放置牛津杯, 分别加入 200 μL 乳酸菌培养清液, 等 pH 的 MRS 培养基 (乳酸调节, 作为对照), 以及过氧化氢酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶处理的乳酸菌培养上清, 置于 37 °C 恒温培养 12 h, 观察抑菌圈, 并用测量抑菌圈直径 (mm), 每个菌株做 3 个平行, 取平均值用于比较分析抑菌能力。

1.8 统计与分析

不同样品的乳酸菌计数、菌株 $OD_{600\text{ nm}}$ 值以及

抑菌圈直径试验结果取 3 次试验的平均值, 以平均值 ± 标准差表示, 菌株间差异采用 Sigmaplot 10.0 软件中的 *t* 检验进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 青海甜醅乳酸菌平板计数结果

对来自青海地区不同地点采集的两份甜醅样品进行 MRS 平板乳酸菌计数, 结果显示样品 QHTP 1 乳酸菌活菌数为 (9.28 ± 0.14) lg CFU/g, 而样品 QHTP 2 乳酸菌活菌数为 (7.53 ± 0.05) lg CFU/g。结果表明不同青海甜醅存在高浓度的活性乳酸菌, 但活菌数存在样品多样性。

2.2 青海甜醅中活性乳酸菌种群构成分析

应用高通量测序技术对不同地点采集的青海甜醅样品 QHTP 1 和 QHTP 2 进行活性乳酸菌种群构成分析, 结果如表 1 所示。在样品 QHTP 1 和 QHTP 2 分别获得了 45 593 和 43 609 个有效 reads, 通过鉴定存在 8 种 OUT, 分别代表 *Pediococcus acidilactici*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus crustorum*、*Leuconostoc pseudomesenteroides*, 以及 4 种未能分类的乳酸杆菌 (*Lactobacillus* sp.)。样品 QHTP 1 主要乳酸菌为 *Pediococcus acidilactici* (82.741%), 样品 QHTP 2 主要乳酸菌群为 *Lactobacillus plantarum* (57.711%) 和一种未能分类的乳酸杆菌 (OTU 4, 36.935%), 结果表明青海甜醅中的乳酸菌种群构成具有高度多样性。

2.3 病原菌拮抗性菌株的筛选结果

通过改良 MRS 平板分离和厌氧培养在青海甜醅中分离得到 24 株革兰氏阳性、接触酶阴性的产酸菌株 (编号如表 2 所列)。应用 96 孔培养法测定了 24 株分离株的胞外产物对大肠杆菌 CICC 10664、沙门氏菌 CICC 21513, 蜡样芽孢杆菌 CICC 21261、金黄色葡萄球菌 CICC 21600 的抑菌作用, 结果如表 2 所示。结果显示: 5 株对大肠杆菌具有抑制作用, 7 株对蜡样芽孢杆菌具有抑制作用, 14 株对金黄色葡萄球菌具有抑制作用, 8 株对沙门氏菌具有抑制作用。其中菌株 B29 胞外产物对 4 种致病菌均显示了强烈的抑制作用, 表明菌株 B29 具有广谱的病原菌拮抗性。

2.4 病原菌拮抗性菌株 B29 牛津杯平板扩散法测定结果

应用牛津杯平板扩散法测定了青海甜醅乳酸

表 1 青海甜醅样品中活性乳酸菌种群构成

OUT 种类	种属鉴定	样品菌群 OUT 测定/个		样品菌群构成/%	
		QHTP 1	QHTP 2	QHTP 1	QHTP 2
		OTU 1	<i>Lactobacillus</i> sp.	124	1
OTU 2	<i>Lactobacillus</i> sp.	2 413	15	5.292	0.034
OTU 3	<i>Lactobacillus</i> sp.	1	0	0.002	0.000
OTU 4	<i>Lactobacillus</i> sp.	3 713	16 107	8.144	36.935
OTU 5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1 604	25 167	3.518	57.711
OTU 6	<i>Lactobacillus crustorum</i>	11	2 309	0.024	5.295
OTU 7	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	3	9	0.007	0.021
OTU 8	<i>Pediococcus acidilactici</i>	37 724	1	82.741	0.002
总数		45 593	43 609	100	100

表 2 青海甜醅乳酸菌分离株胞外产物抑菌性试验结果

菌株编号	对指示菌抑菌性			
	大肠杆菌	蜡样芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌
A1	-	-	+	-
D5	-	-	-	+
D9	-	-	-	+
A10	-	+	+	-
Z14	-	-	-	+
Z18	-	-	+	-
Y37	-	-	+	-
Y38	-	-	-	+
A39	+	+	+	-
A12	-	-	-	-
Q13	-	-	-	-
Q40	-	+	-	+
Q34	-	-	+	+
Q26	-	+	+	-
Q25	-	+	+	-
A7	+	+	-	-
B15	-	-	+	+
B29	+	+	+	+
E5	+	-	+	-
F37	-	-	+	-
F1	+	-	-	-
F38	-	-	-	-
F18	-	-	+	-
F14	-	-	+	-

注：“+”具有抑菌活性(小于对照孔 OD_{600 nm} 值 50% 的菌株)。

菌分离株 B29 对大肠杆菌 CICC 10664、沙门氏菌 CICC 21513, 蜡样芽孢杆菌 CICC 21261、金黄色葡萄球菌 CICC 21600 的抑菌特征, 结果如图 1 所示。结果显示分离株 B29 胞外产物, 及其过氧化氢酶、蛋白酶处理后的产物对 4 种致病菌都能产生清晰透明的抑菌圈(图 1. A); 抑菌圈直径测定结果(图 1. B)显示 B29 胞外产物 4 种致病菌产生的抑菌圈直径为 16.06 ~ 18.41 mm, 显著高于等 pH 的 MRS 对照(10.70 ~ 12.60 mm); 过氧化氢酶处理后的抑菌圈直径为 15.72 ~ 18.15 mm; 胃蛋白酶处理后抑菌圈直径为 13.24 ~ 15.97mm; 胰蛋白酶处理后抑菌圈直径为 12.66 ~ 15.51 mm, 结果表明, 菌株 B29 抑菌作用受蛋白酶影响最大, 产生的主要抑菌物质为多肽类抗菌因子。

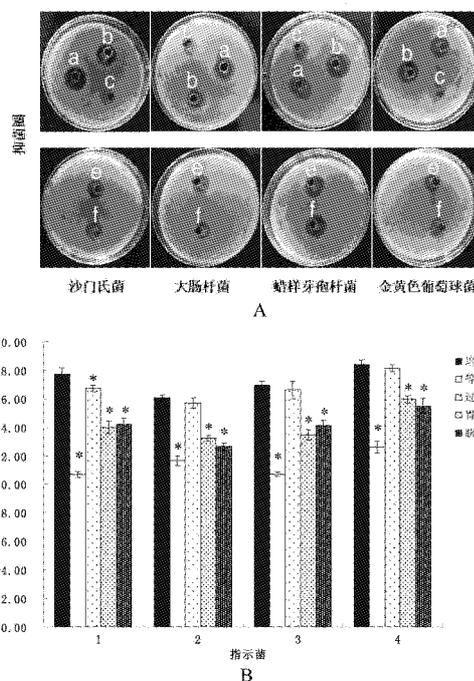


图 1 菌株 B29 胞外产物经不同处理后的抑菌效应

注:图 A 为抑菌圈形态,其中 a 为 B29 培养上清、b 为 B29 培养上清排除过氧化氢产物、c 为同 pH 值 MRS 对照、e 为 B29 培养上清胃蛋白酶消化产物、f 为 B29 培养上清胰蛋白酶消化产物;图 B 为抑菌圈直径统计图(n = 3), 指示菌 1 ~ 4 分别代表沙门氏菌 CICC 21513、大肠杆菌 CICC 10664、蜡样芽孢杆菌 CICC 21261 和金黄色葡萄球菌 CICC 21600; * 表示与培养上清相比,具有显著性差异(P < 0.01)。

2.5 病原菌拮抗性菌株 B29 的生理生化鉴定结果分析

应用革兰氏染色镜检、扫描电镜对菌株 B29

细胞形态进行观察,结果如图2所示,菌株B29为革兰氏阳性杆菌,径杆比为1:4左右。菌株B29的生理生化特征测定结果如表3所示,根据常见细菌系统鉴定手册^[11]描述,菌株B29具有典型的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)的生理生化特征。

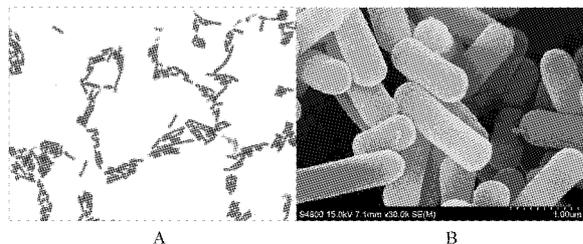


图2 病原菌拮抗性菌株 B29 的细胞形态

注:图 A 为革兰氏染色后显微图片(×400);图 B 为扫描电镜结果(×15 000)。

表3 病原菌拮抗性菌株 B29 的生理生化鉴定结果

序号	实验项目	反应	序号	实验项目	反应
1	运动性	-	12	乳糖产酸	+
2	10℃生长	+	13	蔗糖产酸	+
3	45℃生长	+	14	纤维二糖产酸	+
4	pH4.5生长	+	15	木糖产酸	+
5	pH9.6生长	-	16	阿拉伯糖产酸	+
6	10% NaCl生长	-	17	鼠李糖产酸	-
7	硝酸盐还原	-	18	棉籽糖产酸	-
8	产乳酸	+	19	麦芽糖产酸	+
9	精氨酸水解实验	-	20	甘露醇产酸	+
10	淀粉水解实验	-	21	山梨醇产酸	-
11	葡萄糖产气	-			

注:“+”表示反应呈阳性;“-”表示反应呈阴性。

2.6 病原菌拮抗性菌株 B29 的 16S rDNA 测序鉴定结果

提取菌株 B29 的基因组 DNA 并进行 16S rDNA 扩增,扩增产物和预期大小一致(1 425 bp)。将扩增产物测序结果在基因库 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中进行 Blastn 比对,结果序列同源性相似性最高的均为植物乳杆菌(最大同源性 >99%),用 MEGA4.0 构建系统进化树,从图3可见菌株 B29 均与植物乳杆菌聚于同一分支,同源性均达到了99%以上。因此,结合形态特征、生理生化反应及 16S rDNA 特征,鉴定菌株 B29 为植物乳杆菌。

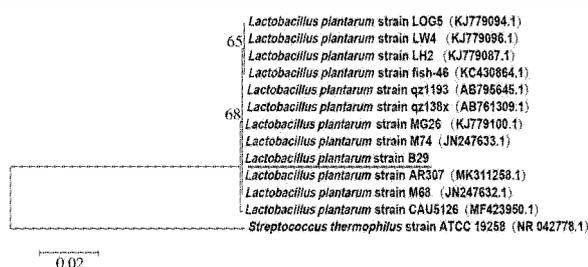


图3 菌株 B29 基于 16S rDNA 扩增序列的聚类分析结果

3 讨论

青海甜醅是我国青海高原的民间美食小吃,广受汉、回、藏、土等多族人民的喜爱。青海甜醅以燕麦或青稞为原料经甜酒曲长期自然发酵而成,具有丰富的微生物菌群。研究显示甜醅发酵过程中 pH 值显著下降,不但有利于抑制有害微生物生长,同时也有利于成品酸甜口感和风味物质的形成。^[1-2,12]然而,目前对其中菌群构成及功能特征仍然知之甚少。本研究应用 MRS 培养联合高通量测序技术对青海甜醅的活性乳酸菌构成进行了研究,结果发现:青海甜醅优势乳酸菌菌群为 *Pediococcus acidilactici*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus crustorum*、*Leuconostoc pseudomesenteroides*,以及4种未能分类的乳酸杆菌。结果为发掘新型功能乳酸菌资源以及开展甜醅工业化发酵生产、提高产品的品质和安全性提供理论依据。

近年来分离高效广谱的新型病原菌拮抗性乳酸菌成为国内外的研究热点。随着抗生素在医疗和农牧业领域的广泛使用,导致环境中细菌耐药性不断增加,产生各种超级细菌感染风险也不断增加。^[8-10]乳酸菌不仅对病原菌具有拮抗作用,而且具有促进机体健康功能,在农牧养殖业广泛应用为“无抗”或“减抗”食品生产提供了新的技术支持。不同乳酸菌产生的抑菌物质的类型和产量具有菌株依赖性,细菌素是研究最为集中的抑菌物质,然而乳酸菌细菌素普遍产量低、抑菌谱窄,对革兰氏阳性菌作用显著,但对革兰氏阴性菌抑制作用不明显。^[13]本研究对青海甜醅中的病原菌拮抗性菌株进行分离和鉴定,结果获得了一株植物乳杆菌 B29,对大肠杆菌、沙门氏菌,蜡样芽孢杆菌及金黄色葡萄球菌具有广谱高效的抑菌作用,为进一步人类保健和动物养殖中应用乳酸菌控制病原菌、减少抗生素应用提供了新型乳酸菌

菌株。对植物乳杆菌 B29 的基因组特征及其高效抑菌机制尚需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 吴寒,肖愈,李伟,等. 燕麦甜醅发酵过程中生化成分的动态变化[J]. 食品科学,2015,36(13):114-118.
- [2] 史晓萌,陈建国,党艳婷,等. 响应曲面法优化燕麦甜醅发酵工艺的研究[J]. 食品工业,2018,39(4):86-90.
- [3] 张国华,何国庆. 传统发酵食品中乳酸菌多样性及其功能特性[J]. 中国食品学报,2013,13(9):174-180.
- [4] 苏爱国. 烹调过程中兔肉酱用发酵剂的筛选及其发酵特性的初步研究[J]. 美食研究,2018,35(1):39-44.
- [5] 吴寒,李春阳,柴智,等. 乳酸菌发酵对糯性黑色元麦生化成分及体外抗氧化能力的影响[J]. 江苏农业学报,2017,33(2):438-443.
- [6] 胡丽华,苏东海,苏东民. 多菌种混合发酵对主食风味的影响[J]. 食品科技,2010,35(3):149-152.
- [7] 王娜,华蕾,周文娟,等. 乳酸菌在慕斯中的生长特性研究[J]. 美食研究,2017,34(4):60-64.
- [8] 樊星,张昊,郭慧媛,等. 乳酸菌抑菌功能的研究进展[J]. 中国乳业,2012(9):52-54.
- [9] 郝纯,常忠义,高红亮,等. 天然食品防腐剂-细菌素的研究新进展[J]. 食品科学,2004(12):193-197.
- [10] 刘丹华,张晓伟,张翀. 抗生素滥用与超级细菌[J]. 国外医药(抗生素分册),2019,40(1):1-4.
- [11] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:289-294.
- [12] 王青竹,高学军,卢志勇,等. 产芳香物质益生菌筛选及其对谷物食品发酵效果的研究[J]. 东北农业大学学报,2010,41(5):120-125.
- [13] MALIK D K, BHATIA D, KUMA A N. Lactic acid bacteria and bacteriocin: a review [J]. Journal of Pharmacy Research, 2012(5):2510-2513.

Population composition of lactic acid bacteria in Qinghai sweet fermented grains and isolation and identification of antagonistic strains of pathogenic bacteria

HUANG Yuping^{1,2}, XUE Yu¹, LI Yi¹, ZHOU Wenyuan, YANG Zhenquan^{1,2}

(1. College of Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225127, China;

2. Jiangsu Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Safety Control, Yangzhou, Jiangsu 225127, China)

Abstract: The high-throughput sequencing method was used to analyze the lactic acid bacteria (LAB) population in the sweet fermented grains collected from Qinghai to explore the composition and separation of functional LAB in Qinghai traditional fermented grains. Meanwhile, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Bacillus cereus*, and *Staphylococcus aureus* used as indicators to screen and identify the antagonistic strains of pathogenic bacteria. The results showed that the predominant LAB in Qinghai fermented grains were *Pediococcus acidilactici*, *L. plantarum*, *L. crustorum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, and four types of *Lactobacillus* sp. The results of bacteriostasis test showed that one strain of lactic acid bacteria isolate strain B29 had a high-efficiency inhibitory effect on 4 indicator bacteria, and the bacteriostatic effect of extracellular products was most affected by proteases. The isolate strain B29 was identified as *L. plantarum* using Gram staining microscopy, scanning electron microscopy, cell morphology observation, physiological and biochemical characterization, and 16S rDNA sequencing.

Key words: Qinghai sweet rice; lactic acid bacteria; population; antagonistic strains of pathogenic bacteria

(责任编辑:赵勇)