

文章编号: 1004-7271(2007)04-0381-08

· 综述 ·

微生物分子生态学技术及其在 食品产业中的应用前景

赵 勇, 孙晓红, 韩 丽, 潘迎捷

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘 要:综述了新兴的不依赖于培养的微生物分子生态学技术,包括两类:不基于微生物总基因组 DNA 的分析方法,主要有单碳源利用图谱法和磷脂脂肪酸图谱法;基于微生物总基因组 DNA 的分子分析方法,主要有克隆文库分析法、宏基因组文库技术、G+C 含量分析法、总 DNA 复性动力学分析法、群落水平总基因组 DNA 交互杂交法、荧光原位杂交技术、DNA 微阵列芯片技术、变性/温度梯度凝胶电泳、单链构象多态性分析、限制片段长度多态性/扩增核糖体 DNA 限制性分析、末端标记限制片段长度多态性、核糖体基因间隔区分析、随机扩增多态性 DNA 等。并提出了这套技术在食品产业中的应用前景:发现新菌种,生产新型酶制剂,优化改造新工艺,确保食品质量与安全等,为食品产业的继续开发提供新的技术支持。

关键词:微生物分子生态学;总基因组 DNA;食品产业

中图分类号:Q 938.1 **文献标识码:**A

Techniques of molecular microbial ecology and their potential applications in food industry

ZHAO Yong, SUN Xiao-hong, HAN Li, PAN Ying-jie

(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: This paper reviewed the new techniques of molecular microbial ecology, which included two kinds of methods, and one was non-based on genomic DNA, including sole carbon source utilization patterns (SCSUP) and phospholipids fatty acid patterns (PLFA); the other was based on genomic DNA, including clone library analysis, metagenomics library analysis, guanine + cytosine (G + C) content analysis, total DNA re-association, community level-DNA cross hybridization, fluorescence *in situ* hybridization (FISH), DNA micro-array, denaturing/temperature gradient gel electrophoresis (DGGE/TGGE), single-stranded conformational polymorphisms (SSCP), restriction fragment length polymorphism (RFLP)/amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), ribosomal intergenic spacer analysis (RISA), randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), and so on. Their potential applications in food industry were summarized: discovery of new strains, producing new enzymes, improving new techniques, and keeping food quality and safety. It provides new technical supports

收稿日期:2006-09-14

基金项目:上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字2005第4-2号;沪农科攻字2006第10-5号);上海市重点学科建设项目(T1102);上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金(677171401)

作者简介:赵 勇(1975-),男,湖北英山人,博士,主要从事微生物分子生态学方面的研究。

通讯作者:潘迎捷, Tel:021-65710285, E-mail:yjpan@shfu.edu.cn

for deeper development of food industry.

Key words: molecular microbial ecology; genomic DNA; food industry

如何充分开发利用丰富多样的微生物资源,为人类、为社会造福,是摆在广大微生物学家面前的一个重要课题。近年来的许多研究表明,只有不到1%的微生物是可以在实验室条件下培养的,99%的微生物在目前条件下还未能培养(uncultured)^[1]。发展不依赖于培养(culture-independent)的微生物分子生态学方法,它克服了传统培养方法的局限性,把人们的研究视野拓展到极其丰富的未培养微生物世界。微生物分子生态学理念与方法是在二十世纪八十年代中期被 Pace 及其同事提出来的^[2],其基本理论基础是:直接从环境样品中提取微生物总 DNA,以基因(组)的多样性反映物种多样性,从而可以比较全面客观地展现环境样品中微生物组成和多样性。本文对目前发展应用比较成熟的微生物分子生态学技术进行概述,并探讨了其在食品产业中的应用前景,为食品产业的继续开发提供新的技术支持。

1 微生物分子生态学技术

微生物分子生态学技术,可以分为两类:一类是不基于微生物总基因组 DNA 的分析方法;二类是基于微生物总基因组 DNA 的分子分析方法。

1.1 不基于微生物总基因组 DNA 的分析方法

1.1.1 单碳源利用图谱法(SCSUP)/群落水平的生理图谱法(CLPP)

单碳源利用图谱法(sole carbon source utilization patterns, SCSUP)/群落水平的生理图谱法(community level physiological profiling, CLPP)由美国的 BIOLOG 公司于1989年开发成功,最初应用于纯种微生物鉴定,至今已经能够鉴定包括细菌、酵母菌和霉菌在内的2000多种微生物^[3]。Biolog系统的测定原理是:微生物在利用碳源过程中产生的自由电子,与四唑盐染料发生还原显色反应,颜色的深浅可以反映微生物对碳源的利用程度^[4]。由于微生物对不同碳源的利用能力很大程度上取决于微生物的种类和固有性质,因此在一块微平板上同时测定微生物对不同单一碳源的利用能力,就可以鉴定纯种微生物或比较分析不同的微生物群落。

1.1.2 磷脂脂肪酸(PLFA)图谱法/甲基脂肪酸酯(FAME)图谱法

磷脂是构成生物膜的主要成分,约占细胞干重的5%。在细胞死亡时,细胞膜很快被降解,磷脂脂肪酸被迅速的代谢掉,因此它只存在于活细胞中,十分适合于微生物群落的动态监测^[5]。此外,脂肪酸具有属的特异性,特殊的甲基脂肪酸已经被作为微生物分类的依据。磷脂脂肪酸图谱分析法的基本流程是:首先将磷脂脂肪酸全部提取出来,然后用气相色谱或气质联用进行分析,得出 PLFA 图谱^[5]。群落的微生物结构发生变化,即可以通过图谱的变化得到快速有效的监测。

1.2 基于微生物总基因组 DNA 的分子分析方法

1.2.1 克隆文库分析法

构建一般克隆文库的方法是:首先从环境样品中提取出微生物基因组总 DNA,然后应用针对“biomarker”序列设计的通用引物对微生物基因组总 DNA 进行 PCR 扩增^[6]。PCR 产物或者应用特异的限制性内切酶消化,或者不经消化,之后与克隆载体连接,转化感受态细胞(一般是大肠杆菌),得到大量的转化子。这些转化子就组成了一个克隆文库,每个转化子都含有一个“biomarker”序列。通过对文库中各转化子的“biomarker”序列进行酶切分型或进一步序列测定,就可以知道该环境样品中的这些“biomarker”序列的种类和相对数量,从而获得物种组成的信息。

1.2.2 宏基因组文库(metagenomics library)技术

宏基因组文库的构建及基本分析策略如下:首先,从环境样品中提取高质量的微生物总基因组 DNA,然后把这些混合的基因组 DNA 大片段克隆进合适的载体,转化感受态细胞,根据不同目的采用不同策略筛选转化子^[7]。阳性克隆子的筛选,可以通过生物活性水平的筛选,化合物结构水平的筛选,

DNA 序列水平的筛选。此技术大大改变了微生物学家处理问题的方式,并重新定义了基因组这一概念,加速一些新基因新物种的发现,是研究微生物的一种新策略。

1.2.3 G + C 含量分析法

这一技术的原理是基于不同微生物的 DNA 中 G + C 含量范围从 24% 到 76% 之间变化,而类群相关的微生物其 G + C 含量变化幅度在 3% 到 5% 之间^[8]。这一方法是在很粗的水平上来分类微生物的,因为有些不同的分类类群有可能具有相同的 G + C 含量。G + C 含量分析的优点在于不受 PCR 偏差的影响,它包括所有提取出来的 DNA,而且可以进行定量,可以检测一些丰度不高的微生物成员。然而这一方法需要大量高质量的 DNA,50 μg 以上。

1.2.4 总 DNA 复性动力学分析法

DNA 复性动力学分析可以用来研究微生物群落的遗传复杂性及多样性。从环境样品中提取出总 DNA 后,进行纯化,变性,然后让它退火。复性的速率依赖于序列的相似性,DNA 组成越复杂,多样性越高,复性速率就越慢^[9]。在特定的条件下,DNA 复性到一半时所需的时间($C_0t_{1/2}$)可以作为一个多样性的指标,因为它既考虑了 DNA 复性的量,也考虑了分布。这一方法与 G + C 含量分析方法类似,也是一种粗略的估计方法,而且需要大量高质量的 DNA。

1.2.5 DNA 杂交分析法

基于 DNA 杂交的方法分析环境样品中微生物的多样性,主要包括:群落水平总基因组 DNA 交互杂交法,荧光原位杂交技术,DNA 微阵列芯片技术。

群落水平总基因组 DNA 交互杂交法(Community-level DNA cross hybridization):是根据所比较的两个微生物群落的总 DNA 交互杂交信号的强弱程度来估算这两个微生物群落的结构相似性^[10],这一方法是很粗放范围(broad-scale)的估计,只能给出待比较的群落之间的相似性和复杂性的数据,并不能精确知道群落结构组成。此技术避开了纯培养的限制性,而且不通过 PCR 扩增,可以对微生物群落之间的相似性进行快速分析。但总体来说,由于这一技术本身的局限性,并不适合于分析很复杂的微生物群落结构,这是因为随着 DNA 复杂性的增加,杂交信号受到影响就随之减弱。另外,实验操作起来,也存在一定的技术难度,它需要大量高质量高纯度的总基因组 DNA(一般需要 50 μg 以上的 DNA)。因此,这一技术在复杂微生物多样性研究方面,使用得并不广泛。

荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术:它是一种不依赖于 PCR 的分子分析技术,能同时提供微生物在形态学、数量、空间分布及其所处环境方面的信息,使人们可以对复杂环境样品中的微生物进行动态观察和鉴定^[11]。荧光原位杂交技术由原位杂交技术(In situ Hybridization, ISH)发展而来,最初使用的是放射性标记的探针,后来发展并建立了荧光标记的探针。与放射性探针相比,荧光探针具有以下优点:1、安全;2、分辨率好且不需要额外的检测步骤;3、荧光探针可以用发射不同波长的染料标记,从而在一个检测步骤中可同时处理多条目标序列。荧光原位杂交是指通过荧光标记的寡核苷酸探针特异地和互补核酸序列在完整的细胞内结合。具体过程包括以下几步:1、固定标本;2、预处理样品;3、用相应的探针进行杂交;4、洗掉未结合的探针;5、封固、成像及结果分析。

DNA 微阵列芯片技术(DNA Microarray):基因芯片是上个世纪 90 年代产生并发展的一项新的生物技术,于 1991 年首次在 Science 杂志上被提出,是融微电子学、生物学、物理学、化学、计算机科学为一体的高度交叉的技术^[12]。一般采用机械点样 DNA 微点阵技术,将多达数千万种 DNA 探针克隆通过特制的机械微点样装置分别点加于固相基片表面特定位点上,形成微点阵(Microarray),也称 DNA 芯片或生物芯片。它一次可以对大量的生物分子进行检测分析,从而解决了传统核酸印迹杂交技术复杂、自动化程度低、检测目的分子数量少、低通量等不足。根据探针类型,应用于环境微生物群落研究的 DNA 芯片主要有三种:1、功能基因芯片(Functional Gene Arrays, FGAs),主要用于检测环境中微生物群落的功能;2、系统发育的寡核苷酸芯片(Phylogenetic Oligonucleotide Arrays, POAs),主要用于微生物群落组成和结构分析;3、群落基因组芯片(Community Genome Arrays, CGAs),可以用来监测环境微生物群落中的动态变化和结构组成。

1.2.6 基于 PCR 的遗传指纹图谱分析法

基于 PCR 的遗传指纹图谱技术可以并行、快速地比较多个环境样品中微生物的组成及变化,很适于微生物群落结构时空动态变化的监测以及多个样品之间的比较。其基本流程图如图 1 所示。

变性/温度梯度凝胶电泳 (denaturing/temperature gradient gel electrophoresis, DGGE/TGGE) 技术:它发展之初是用来检测 DNA 序列中的点突变的。1993 年, Muyzer 把这一技术首次拓展应用于微生物的遗传多样性研究^[13]。PCR 正向引物的 5' 末端经常带上一个 35~40 bp 的 GC 夹子以保证扩增的 DNA 片段在变性凝胶中至少能保持部分的双链结构。由于每个 DNA 分子都拥有不同的解链结构域 (melting domain), 因此它们在凝胶中的迁移行为就表现出不同。理论上, DGGE 能分辨一个碱基差别的 DNA 序列。DGGE 是用化学变性剂 (尿素, 甲酰胺) 来制造变性梯度, TGGE 是靠温度来形成变性梯度。我们分析微生物群落的多样性是通过 DNA 条带的数量, 强度以及不同处理之间的相似性来判断的。从 DGGE/TGGE 胶上可以割下一些感兴趣的条带, 然后进行测序。或者通过 DGGE/TGGE 图谱与特异的探针进行杂交, 以提供更多关于结构和功能多样性的信息。

单链构象多态性 (Single-stranded Conformational Polymorphisms, SSCP) 技术: 它的理论基础是单链 DNA 具有序列特异性的二级结构, 序列组成上的差异 (至少 1 个碱基的差异) 也会影响这种二级结构, 这种变化又可以通过非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测得到^[14]。分析样品时, 双链 DNA 首先要变性为单链后, 再上样电泳分析, 不同的 DNA 单链由于其二级结构不同, 就会电泳到不同的位置, 从而进行分离, 得到群落结构图谱。SSCP 技术不需要 GC 夹子和灌制梯度凝胶。

限制片段长度多态性/扩增核糖体 DNA 限制性分析技术: 限制片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 以及此技术中的一种特例, 扩增核糖体 DNA 限制性分析 (amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA) 是另外一种依赖于 PCR 的技术来研究微生物的多样性。核糖体 DNA 的 PCR 扩增产物应用限制性内切酶进行消化。消化产物中包含的不同长度 DNA 片段通过琼脂糖凝胶电泳或非变性的 PAGE 电泳就能检测到^[15]。这种方法用来检测微生物群落结构的变化很有用处, 然而不能测定多样性, 或检测特定的系统发育类群。

末端限制片段长度多态性 (terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP) 技术: 它能克服 RFLP/ARDRA 技术的一些不足。其原理与 RFLP 技术基本相同, 除了有一个 PCR 引物应用了荧光染料进行标记。这样就能使得只检测标记的末端限制片段, 简化了图谱, 就可以用来分析复杂的微生物群落, 以及能提供一些多样性的信息。通过 T-RFLP 图谱, 可以计算种的丰度, 均度, 以及样品之间的相似性^[16]。这一技术能自动地分析大量的环境样品。

(自动)核糖体基因间隔区分析 (RISA/ARISA) 技术: 它的原理与 ARDRA, T-RFLP 相似, (自动)核糖体基因间隔区分析 ((automated) ribosomal intergenic spacer analysis, RISA/ARISA) 能提供微生物群落基于核糖体的指纹图谱。在 RISA/ARISA 技术中, 16S 与 23S 核糖体亚基之间的转录间隔区 (intergenic spacer, IGS) 通过 PCR 扩增, 变性, 然后在变性的条件下于聚丙烯酰胺胶中进行分离^[17]。这些 DNA 序列有的能编码 tRNA, 并且可以用来区分不同菌株以及近源种, 因为这些 IGS 序列在它们之间既存在长度的多态性, 也存在序列组成的多态性。这两种方法都能提供重复性好的关于细菌群落的指纹图谱, 但 RISA 需要大量的 DNA, 而且比较费时, 有的时候, 银染并不十分敏感, 分辨率也较低。

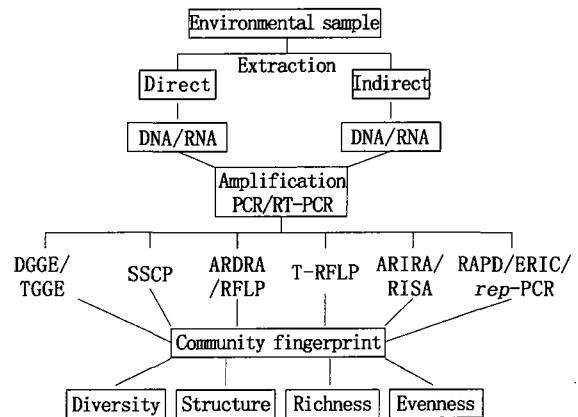


图 1 基于 PCR 的遗传指纹图谱分析法

Fig. 1 Current approaches of PCR-based genetic fingerprinting for microbial community in environmental sample

ARISA 增加了敏感性,而且快速,但仍避免不了 PCR 方法存在的缺陷。

随机扩增多态性 DNA (RAPD)/ERIC-PCR/基于高重复序列的 PCR 分析 (*rep*-PCR): 广义范围的随机 PCR 包括随机扩增多态性 DNA (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD), ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-polymerase chain reaction), 基于高重复序列的 PCR 分析 (repetitive extragenic palindromic-PCR, *rep*-PCR)。这里所谓的随机是指 PCR 引物与模板 DNA 不确定的位置匹配结合,从而扩增得到产物。RAPD 技术以检测多态 DNA 为目的,快速简便,在物种分类和亲缘关系鉴定、基因组分析等方面得到广泛应用,也可用在 DNA 水平上反应微生物群落的多样性。普通的 PCR 是利用一对特异性的引物扩增靶序列,而 RAPD 则是利用单一的长度为 8~10 个碱基的寡核苷酸序列为引物,利用其在基因组上随机配对的原则,扩增得到一系列大小不同的产物,通过琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳便可以得到由一系列条带组成的遗传指纹图谱,即基于 RAPD 的指纹图谱^[18]。RAPD 技术的缺点在于重复性和稳定性差,产生的图谱条带过于复杂,不易分析;进行分析以前,往往要筛选大量的引物,从中找到较为合适的引物,较为费时。ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) 序列,即肠杆菌基因间保守重复序列,其长度为 126 bp,在不同细菌中的分布特点和拷贝数不同。针对 ERIC 序列设计引物并进行 PCR 扩增的技术,可以用于对细菌的基因组 DNA 进行指纹图分析^[19]。ERIC-PCR 实际上是一种长引物的随机扩增多态性 DNA (Long Primer RAPD, LP-RAPD) 的技术。长引物随机 PCR 技术与普通 RAPD 技术不同之处是使用一对长度大于 16 bp 的引物,而不是普通 RAPD 那样的长度只有 8~10 个碱基的单个引物;退火温度高于 52 ℃,而不是普通 RAPD 的低于 40 ℃。正是由于这两个特点,这种 ERIC-PCR 技术与普通的 RAPD 技术相比,具有图谱稳定、重复性高,对序列差异敏感性高以及产生的图谱多态性丰富等特点。很多生物,包括原核的和真核的,其基因组中都包含高度重复短的 DNA 序列,这些短串重复序列一般有 1 到 10 个碱基长,它的重复贯穿整个基因组。依赖于进化速率,这些短串重复序列可以区分到种或者菌株的水平。基于这些序列进行 PCR 扩增的方法就叫 *rep*-PCR,它被广泛地应用于细菌的鉴定,因为它能提供整个菌株的基因组指纹图谱^[20]。

2 在食品产业中的应用前景

在食品产业领域,微生物在很大尺度上是这些生产部门创造价值的基础,常见的如面包制作,酒酿,发酵食品,奶酪、酸奶这些乳制品,等等。但在另一方面,腐败微生物的滋生、病原微生物的出现等都导致食品质量安全存在很大问题,在这个层面上,这些微生物给食品产业造成了巨大的损失。而新兴的微生物分子生态学技术在食品产业这一领域的两个方面都将有广阔的应用前景。

2.1 发现新菌种

在传统的微生物菌种筛选方法中,纯培养是基础,它的研究流程包括微生物的分离纯化、大量培养、活性检测等,直到开发利用。这一传统途径被证明是行之有效的。但是,任何传统的微生物培养技术和培养基都不能完全再现全部微生物的自然生存环境,只有极少数微生物能用现有的培养技术培养,远远低于微生物实际多样性程度。同时,随着微生物的广泛研究和深入开发利用,从环境微生物中筛选到新菌种的几率逐步下降,其原因是:一般环境中占微生物总数仅为 1% 的可培养微生物往往被重复培养和筛选,而占 99% 的未培养微生物用传统的方法无法分离。这样一个极具潜力的群体是微生物学家开拓新资源的目标。应用不依赖于培养的微生物分子生态学技术开发利用微生物资源,可以克服传统纯培养技术的不足,能探知未培养微生物,寻找新基因,发掘新菌种^[21]。最近,周剑忠等人应用 PCR-DGGE 指纹技术与分离技术相结合的方法筛选到了新的藏灵菇奶发酵过程中的优势菌,为藏灵菇纯培养发酵剂的开发提供了理论依据及丰富了菌种资源^[22]。

2.2 生产新型酶制剂

最直接的,通过宏基因组学技术,可以发现许多新功能基因及基因簇,把这些新功能基因和基因簇

进行重组表达,就可以获得很多新型的酶制剂产品^[23-25]。Gupta 等描述以 pUC18 从一个较小的土壤宏基因组文库中筛选碱性蛋白酶,在脱脂牛奶平板上分析其宏基因组 DNA 插入,筛选到一个 EDTA 敏感的、30 K_D、275 个氨基酸残基和 pI 为 8.98 的金属蛋白酶;获得的宏基因组 DNA 资源只有 40% 左右在已知公共基因库中能查找到^[26]。目前,通过宏基因组学技术发现的一些高活力新型酶制剂有:乙醇氧化还原酶,酰胺酶,淀粉酶,甘油/二醇脱水酶,4-羟基丁酸脱氢酶,脂肪酶,蛋白酶,聚乙酰胺酶,几丁质酶,L-氨基酸氧化酶,羟化酶等。这些高活力新型酶制剂在食品产业领域具有非常大的应用潜力和价值。

2.3 优化改造新工艺

目前,许多食品产业的工艺流程中很多涉及微生物参与的关键制作环节,微生物的群落结构组成以及不同部位不同阶段的消长规律,复杂过程中的复杂微生物群落代谢调控网络,对于我们来说,都还是一个“黑箱”。利用现代的微生物分子生态学技术可以方便、准确快速地对其中的微生物多样性组成进行系统地分子分析,获得有关微生物在不同环境中种类和数量分布的基础数据,在此基础上,来优化改造,甚至发展新的食品制作工艺,提高生产效率和经济效益,实现用生物技术改造传统产业的目的。

黄祖新在 2005 年提出把微生物分子生态学技术应用于大曲酒的微生物学研究,以弄清酿酒微生物在发酵过程中的真实状况,最终揭示酿酒微生物影响大曲酒香型的奥秘,从而为揭示大曲酒不同香型的成因和传统工艺改造提供依据^[27]。Lee 等应用 PCR-DGGE 技术分析了朝鲜泡菜发酵过程中微生物群落结构的变化^[28]。Randazzo 等^[29]、Florez 等^[30]都应用 PCR-DGGE 的方法分析了奶酪制作全过程中微生物的群落结构变化。Renouf 等应用 *rpoB* 基因作为分子标记结合 PCR-DGGE 技术分析了酒酿工艺过程中乳酸细菌的演变规律^[31]。Fontana 等应用 RAPD 和 PCR-DGGE 技术全程监测了阿根廷香肠发酵过程中细菌群落结构的动态变化,为改造传统制作工艺提供了宝贵的基础资料^[32]。Haruta 等应用 PCR-DGGE 技术全面分析了米醋发酵过程中细菌和真菌群落结构的动态变化^[33]。

2.4 确保食品质量与安全

食品安全是当今世界人们所关注的焦点问题之一,微生物污染食品引起的食物中毒事件时有发生。据统计,微生物病原体引起的食物中毒占总中毒人数的 54.07% 以上。由此可见,由微生物病原体引起的食物中毒是最重要的食品卫生问题,因此,国家和政府对此都很重视。传统的食源性致病菌诊断方法通常包括细菌的分离培养、染色、生化鉴定和血清学检测等步骤,操作繁琐,检验时间较长。而且,当病菌在环境中进入一种所谓 VBNC 状态即“活着但是不能培养”时,就难以检出和鉴定。现代的微生物分子生态学技术恰好可以避免传统检测方法的局限性,它快速、灵敏、特异性高,可以对病原菌进行准确溯源,从而找出关键控制点,有效控制污染源并防止病菌的继续传播,确保食品的质量与安全。

Li 等^[34]应用 PCR-DGGE 技术分析了不同保藏方式下冷却猪肉中腐败微生物的多样性,该研究结果为延长冷却猪肉的货架期及保证肉的质量安全提供了新的重要基础资料。最近,Hovda 等^[35]同样应用 DGGE 技术分析了气调保鲜条件下的养殖大比目鱼腐败微生物群落结构的演变情况。国内,杨桂梅等^[36]人利用 PCR-DGGE 技术分析了暗纹东方鲀的弧菌菌落组成,而弧菌不仅是水产动物的病原菌,也可以使人致病,严重威胁了水产品的质量安全,该研究对确保水产品质量安全有重要意义。李武等^[37]人应用 ERIC-PCR 和 PCR-DGGE 技术动态监测了市售酸奶的质量状况,结果表明该产品不同生产批次的 PCR 指纹图谱稳定性不是很好。另外,其他一些微生物分子生态学技术在食品微生物检测中也起到了非常重要的作用^[38-40]。目前,本课题组正在开展生态芯片技术在水产品质量安全检测中的应用研究,为加强我国水产品质量安全检测提供高技术支撑。

3 展望

微生物分子生态学技术克服了传统培养方法的局限性,在微生物学研究领域已掀起了一场技术革命,而且,在具体检测方法上也多种多样。但同时,我们也必须注意到,任何方法都有一定的偏差,如样品的前处理、DNA 的提取、PCR 的扩增、克隆、测序,等等,都会影响研究的结果。另外,不同的研究方

法,其分辨率和检测限也有所不同,必须根据研究目的,选择一到几种合适的分析方法。

还有,由于食品等环境样品中微生物群落组成极其复杂,目前所应用的任何方法(包括传统研究方法和现代的微生物分子生态学技术),都不能穷尽对微生物多样性的认识,但是这些新方法新技术的应用却使人们对复杂微生物的认识逐渐深入,新的微生物种类不断被发现。当前我国乃至世界食品产业正在蓬勃发展,离不开一些高技术的支撑,而把现代的生物化学以及微生物分子生态学技术与传统的研究方法结合起来,应用于食品产业领域的微生物学研究,能大大拓宽研究的深度与广度,必将为世界食品产业的发展带来深远的影响及光明的前景。

参考文献:

- [1] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiol Rev*, 1995, 59: 143 - 169.
- [2] Pace N R. New perspective on the natural microbial world; molecular microbial ecology[J]. *ASM News*, 1996, 62: 463 - 470.
- [3] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole carbon source utilization[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57: 2351 - 2359.
- [4] Garland J L. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 24: 289 - 300.
- [5] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review[J]. *Bio Fertil Soils*, 1999, 29: 111 - 129.
- [6] Zhou J Z, Xia B C, Huang H S, et al. Microbial diversity and heterogeneity in sandy subsurface soils[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 1723 - 1734.
- [7] Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68: 669 - 685.
- [8] Tiedje J M, Asuming-Brempong S, Nusslein K, et al. Opening the black box of soil microbial diversity[J]. *Applied Soil Ecology*, 1999, 13: 109 - 122.
- [9] Theron J, Cloete T E. Molecular techniques for determination microbial diversity and community structure in natural environments[J]. *Cri Rev Microbiol*, 2000, 26: 37 - 57.
- [10] Girffiths B S, Ritz K, Glover L A. Broad-scale approaches to the determination of soil microbial community structure: application of the community DNA hybridization technique[J]. *Microb Ecol*, 1996, 31: 269 - 280.
- [11] Moter A, Gobel U B. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms[J]. *J Microbiol Methods*, 2000, 41: 85 - 112.
- [12] Guschin D Y, Mobarry B K, Proudnikov D, et al. Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 2397 - 23402.
- [13] Muyzer G, Waal E C D, Uitterlinden A G. Profiling pf complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 695 - 700.
- [14] Schwieger F, Tebbe C. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation - polymorphism for 16S rRNA genebased microbial community analysis[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 4870 - 4876.
- [15] Martinez-Murcia A J, Acinas S G, Rodriguez-Valera F. Evaluation of prokaryotic diversity by restrictase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1995, 17.
- [16] Osborn A M, Moore E R B, Timmis K N. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics[J]. *Environ Microbiol*, 2000, 2: 39 - 50.
- [17] Fisher M M, Triplett E W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 4630 - 4636.
- [18] Franklin R B, Taylor D R, Mills A L. Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)[J]. *J Microbiol Methods*, 1999, 35: 225 - 235.
- [19] Hulton C S, Higgins C F, Sharp P M. ERIC sequences; a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria[J]. *Mol Microbiol*, 1991, 5: 825 - 834.
- [20] Zeze A, Hosny M, Gianinazzi-Pearson V, et al. Characterization of a highly repeated DNA sequence (SC1) from the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea* and its detection in plants[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 248 - 2443.
- [21] 叶姜瑜, 罗固源. 未培养微生物的研究与微生物分子生态学的发展[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(5): 111 - 115.
- [22] 周剑忠, 董明盛, 江汉湖. PCR-DGGE 指纹技术与分离技术结合筛选藏灵菇发酵过程的优势菌[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(8): 1632 - 1638.

- [23] Cowan D A, Arslanoglu A, Burton S G, *et al.* Metagenomics, gene discovery and the ideal biocatalyst[J]. *Biochem Soc Trans*, 2004, 32: 298 - 302.
- [24] Riesenfeld C S, Schloss P D, Handelsman J, *et al.* Metagenomics: genomic analysis of microbial communities[J]. *Annu Rev Genet*, 2004, 38: 525 - 552.
- [25] Streit W R, Schmitz R A. Metagenomics — the key to the uncultured microbes[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2004, 7: 492 - 498.
- [26] Gupta R, Beg Q K, Lorenz P. Bacterial alkaline protease: molecular approaches and industrial applications[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59: 15 - 32.
- [27] 黄祖新. 微生物分子生态学技术应用于大曲酒的微生物学研究[J]. *酿酒科技*, 2005, 131(5): 60 - 63.
- [28] Lee Jung-Sook, Heo Gun-Young, Lee Jun-Won, *et al.* Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 102: 143 - 150.
- [29] Randazzo C L, Vaughan E E, Caggia C. Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: Microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 109: 1 - 8.
- [30] Florez A B, Mayo B. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 110: 165 - 171.
- [31] Renouf V, Claisse O, Miot-Sertier C, *et al.* Lactic acid bacteria evolution during winemaking; Use of rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis[J]. *Food Microbiology*, 2006, 23: 136 - 145.
- [32] Fontana C, Cocconcelli P S, Vignolo G. Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 103: 131 - 142.
- [33] Haruta S, Ueno S, Egawa I, *et al.* Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 109: 79 - 87.
- [34] Li M Y, Zhou G H, Xu X L, *et al.* Changes of bacterial diversity and main flora in chilled pork during storage using PCR-DGGE[J]. *Food Microbiology*, 2006, 23: 607 - 611.
- [35] Hovda M B, Sivertsvik M, Lunestad B T, *et al.* Characterisation of the dominant bacterial population in modified atmosphere packaged farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) based on 16S rDNA-DGGE[J]. *Food Microbiology*, 2007, 24: 362 - 371.
- [36] 杨桂梅, 唐文乔, 李会荣, 等. 利用 PCR-DGGE 法分析暗纹东方鲀的弧菌菌落组成[J]. *上海水产大学学报*, 2006, 15(3): 257 - 263.
- [37] 李武, 赵勇, 王凌华, 等. PCR 指纹图谱技术在酸奶质量监测中的应用[J]. *乳品加工*, 2006, 4: 47 - 49.
- [38] 何宏艳. 核酸杂交技术在食品微生物检验中的应用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(6): 767 - 768.
- [39] 杜巍. 基因芯片技术在食品检测中的应用[J]. *生物技术通讯*, 2006, 17(2): 296 - 298.
- [40] 代娟, 李玉峰, 杨潇. 食品微生物快速检测技术研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(5): 110 - 112.