

# 内蒙古阿拉善驼乳制品中乳酸菌分离鉴定及微生物多样性研究

苏茜, 孙洁, 杜萍, 赵洁, 于洁, 陈永福\*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部奶制品加工重点实验室  
内蒙古自治区乳品生物技术与工程重点实验室 呼和浩特 010018)

**摘要** 内蒙古传统乳制品是乳酸菌的优质培养基,为保藏内蒙古阿拉善地区驼乳制品中的乳酸菌资源,并研究其中微生物多样性,本研究分别采用纯培养方法与宏基因组测序技术进行分析。宏基因组分析表明:阿拉善地区鲜驼乳微生物多样性明显高于酸驼乳,18份样品中共鉴定到157个种。鲜驼乳的优势菌种为乳酸乳球菌(13.22%)和桂林不动杆菌(10.65%);酸驼乳的优势菌种为瑞士乳杆菌(72.66%)、马乳酒样乳杆菌(8.32%)和乳酸乳球菌(4.28%)。纯培养进一步从鲜驼乳和酸驼乳中分离到121株乳酸菌,鉴定为4个属的14个种,其中鲜驼乳的优势菌株为乳酸乳球菌(62.00%),酸驼乳的优势菌株为瑞士乳杆菌(40.00%)、马乳酒样乳杆菌(19.00%),与宏基因组测序结果一致。宏基因组测序联合纯培养法可有效实现驼乳样品微生物多样性分析与乳酸菌资源挖掘,为驼乳的工业化生产与乳酸菌资源利用提供理论依据。

**关键词** 驼乳; 乳酸菌; 微生物多样性; 宏基因组

文章编号 1009-7848(2024)06-0392-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.06.034

阿拉善盟地处内蒙古西部地区,境内有三大沙漠,动物资源匮乏,双峰驼是阿拉善盟的主要牲畜。牧民的主要经济来源为双峰驼所产的骆驼乳及驼乳制品。驼乳具有很高的营养价值及与母乳相似的营养成分,富含低糖、维生素C、低胆固醇以及高矿物质等营养素<sup>[1]</sup>。同时,驼乳还富含具有抗癌、抗糖尿病和抗菌特性的保护性蛋白质<sup>[2]</sup>。另外,发酵驼乳中还含有丰富的乳酸菌资源,目前关于阿拉善地区驼乳制品的微生物组成研究较少<sup>[3-4]</sup>。当地原生态的生活方式以及独特的自然条件下蕴含着丰富的微生物,具有一定的地域性。研究阿拉善地区驼乳制品中的微生物有较大的应用价值和理论意义。

驼乳及驼乳制品中存在丰富的细菌多样性,尤其是乳酸菌。乳酸菌在传统发酵乳制品的发酵风味、质地和香气的形成中发挥着重要作用<sup>[5]</sup>。如Kadri等<sup>[6]</sup>发现摩洛哥鲜驼乳中乳酸乳杆菌为优势菌种。柳青等<sup>[7]</sup>发现摩洛哥自然发酵驼乳中乳球菌属(31.87%)为优势菌属,主要菌种为乳酸乳球菌

(22.95%)。努尔古丽·热合曼<sup>[8]</sup>发现新疆酸驼乳中清酒乳酸杆菌和瑞士乳杆菌为优势菌种。Zhao等<sup>[9]</sup>发现内蒙古阿拉善地区鲜驼乳中副干酪乳酪杆菌和意大利肠球菌为优势菌种。

纯培养方法操作简单,能够将样品中的微生物很好地分离。然而,纯培养方法存在着局限性和难度,只能获得少量可培养的细菌群落<sup>[10]</sup>。目前能够得到纯培养的微生物只占微生物总数的一小部分,未培养或难培养的微生物在微生物中仍占据大多数<sup>[11]</sup>。宏基因组学研究无需对环境微生物进行分离培养,而是通过直接分析环境中微生物的DNA来获知微生物群落的遗传、功能与生态特性<sup>[12]</sup>。联合纯培养方法和宏基因组方法是目前分析微生物多样性,并进行菌种保藏最适宜的方法<sup>[13]</sup>。

本研究选取阿拉善右旗、额济纳旗和左旗的鲜驼乳和酸驼乳为试验对象,采用传统分离鉴定和宏基因组学相结合的方法,对阿拉善驼乳制品总的微生物多样性进行研究,解析鲜驼乳与酸驼乳之间的菌群差异,并使用纯培养技术挖掘驼乳制品中的乳酸菌资源,以求为驼乳的工业化生产与乳酸菌资源利用提供理论依据。

## 1 材料及方法

### 1.1 材料及试剂

2021年9月从内蒙古阿拉善地区采集了18

收稿日期: 2023-06-28

基金项目: 内蒙古自治区科技计划项目(2020GG0101); 内蒙古自治区高等学校创新团队发展计划项目(NMGIRT2220)

第一作者: 苏茜,女,硕士生

通信作者: 陈永福 E-mail: nmgyfchen@126.com

份样品,样品信息如表 1 所示。本试验采用直接采样法进行采集。每个样品采集两份,其中一份加入 DNA 保护剂用于宏基因组测序分析,两份样品均置于液氮罐中保存,后转运回实验室于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温保藏。

MRS 培养基、M17 培养基,英格兰 OXOID 公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,北京天根生物技术有限公司;微生物宏基因组 DNA 提取试剂盒,美国 OMEGA 公司。

### 1.2 仪器与设备

ZHJH-1214B 垂直流超净工作台,上海智城分析仪器制造有限公司;CH20BIMF200 光学显微镜,北京昊成铭泰科技有限公司;WhitleyA35 厌氧工作站,华粤行仪器有限公司;CDS8000 凝胶成像仪,美国 UVP 公司;DYY-60 电泳仪,北京六一仪器厂。

表 1 样品信息表

Table 1 Sample information sheet

样品编号	样品名称	采样地点
AXT1	鲜驼乳	阿拉善右旗
AXT2	鲜驼乳	阿拉善左旗
AXT3	鲜驼乳	阿拉善右旗
E4	鲜驼乳	阿拉善额济纳旗
AST1	酸驼乳	阿拉善右旗
AST2	酸驼乳	阿拉善右旗
AST3	酸驼乳	阿拉善右旗
AST4	酸驼乳	阿拉善左旗
AST5	酸驼乳	阿拉善右旗
AST7	酸驼乳	阿拉善右旗
AST8	酸驼乳	阿拉善右旗
EJ1	酸驼乳	阿拉善额济纳旗
EJ4	酸驼乳	阿拉善额济纳旗
EJ6	酸驼乳	阿拉善右旗
EJ7	酸驼乳	阿拉善额济纳旗
EJ8	酸驼乳	阿拉善额济纳旗
EJ10	酸驼乳	阿拉善额济纳旗
E1	酸驼乳	阿拉善额济纳旗

### 1.3 宏基因组测序

样品送于诺和测序公司进行测序。首先使用试剂盒提取基因组 DNA, Qubit<sup>®</sup>dsDNA 试剂盒对基因组 DNA 进行质控,当 OD 值在 1.8~2.0 之间,

DNA 含量大于  $1\text{ }\mu\text{g}$  时视为 DNA 质量合格。随后将合格的 DNA 进行 PCR 扩增、纯化及定量。最后进行构建文库和上机测序。

利用 xshell 软件在 Linux 操作系统内通过 MetaPhlan2、HManN2 和 ChocoPhlan 泛基因组数据库进行物种注释和功能注释,随后进行生物信息学分析。通过 Rstudio 和 Origin 2021 版本计算  $\alpha$  多样性和  $\beta$  多样性,对样品菌群结构及丰度进行评价。

### 1.4 乳酸菌分离鉴定

1.4.1 乳酸菌分离 乳酸菌分离采用的方法为平板涂布法,将 18 份样品进行梯度稀释,吸取稀释液  $200\text{ }\mu\text{L}$  涂布于 MRS 和 M17 固体培养基上。挑取单个菌落在相应的固体培养基上进行划线纯化。纯化后的菌株接种到相应的液体培养基中培养至第 3 代,进行革兰氏染色及保存。

1.4.2 乳酸菌鉴定 使用 TIANamp 细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行分离株基因组 DNA 的提取,DNA 扩增采用的引物为:27F (5'-A-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'),1492R (5'-AC-CTTGTTACGACTT-3')。稀释后的 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 扩增使用  $50\text{ }\mu\text{L}$  体系:正、反向引物各  $1.5\text{ }\mu\text{L}$ 、模板 DNA  $2\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\times\text{PCR Buffer}$  (含  $\text{Mg}^{2+}$  离子)  $5\text{ }\mu\text{L}$ 、Taq DNA 聚合酶  $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 $\text{ddH}_2\text{O}$   $35.5\text{ }\mu\text{L}$ 。扩增条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $5\text{ min}$ ,  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $1\text{ min}$ ,  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火  $1\text{ min}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $2\text{ min}$ , 30 个循环,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  末端延伸  $10\text{ min}$ 。扩增完毕后,在凝胶成像仪上进行检测,满足测序要求的扩增物在低温 ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 条件下送往上海美吉生物医药科技有限公司进行测序。

测序获得的序列进行整理和拼接,拼接好的序列利用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行搜索,分离株的 16S rDNA 基因序列与数据库中已上传的 16S rDNA 序列进行同源性比对,同源性大于 99% 的则视为同一菌种。

## 2 结果与分析

### 2.1 鲜驼乳和酸驼乳中乳酸菌多样性分析

2.1.1 乳酸菌多样性分析 基于乳酸菌种水平对鲜驼乳和酸驼乳进行  $\alpha$  多样性分析, S 指数和 J 指数反映样品中微生物群落的丰富度, 香浓指数

(Shannon)以及辛普森指数(Simpson)反映样品中微生物群落多样性。香农指数大说明微生物多样性高,由图1可知,鲜驼乳多样性高于酸驼乳,且鲜驼乳样本中E4(额济纳旗)的细菌多样性最低,

酸驼乳样本中AST5的细菌多样性最高。香农指数和辛普森指数( $P<0.05$ ),可以看出酸驼乳和鲜驼乳之间存在微生物多样性差异。

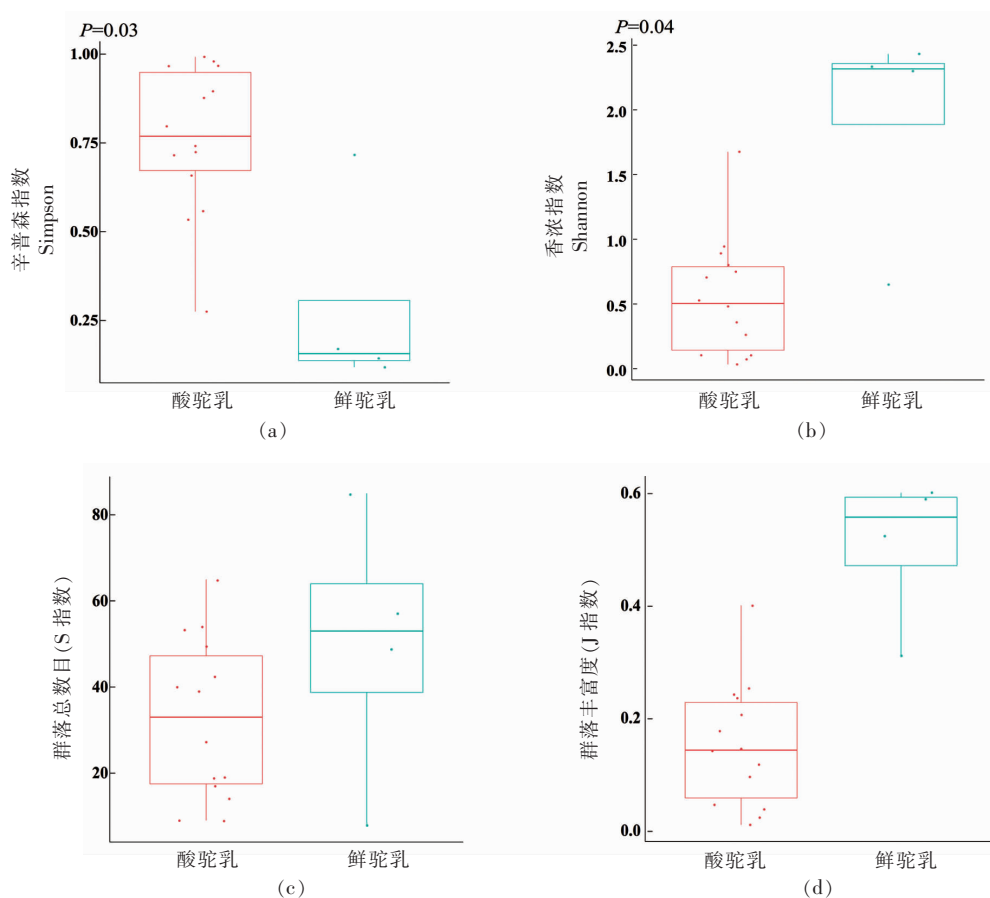


图1 不同组样品 $\alpha$ 多样性指数

Fig.1  $\alpha$ -diversity index of different groups of samples

基于Bray-curtis距离做PCoA分析,统计种水平上鲜驼乳、酸驼乳的乳酸菌菌群结构差异。如图2所示,第一主成分(PC1)和第二主成分(PC2)的贡献率分别为45.84%和14.72%,可代表大部分的变量信息。鲜驼乳和酸驼乳能够被明显区分( $P<0.005$ ),其中采自阿拉善右旗的AST2样品和采自阿拉善左旗的AST4样品与鲜驼乳样品较近。

2.1.2 乳酸菌菌群结构分析 对样品进行物种组成分析,如图3所示。18份乳制品共注释到78个菌属,选丰度前20个菌种做堆积图分析物种组成。驼乳的优势菌属为乳杆菌属(*Lactobacillus*, 86.34%),乳球菌属(*Lactococcus*, 4.18%)和明串珠

菌属(*Leuconostoc*, 2.92%)。鲜驼乳的优势菌属为乳球菌属(*Lactococcus*, 12.19%),不动杆菌属(*Acinetobacter*, 25.68%),柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*, 16.28%),假单胞菌属(*Pseudomonas*, 10.68%)和克雷伯氏菌属(*Klebsiella*, 9.11%),来自额济纳旗的E4样品的优势菌属为考克氏菌属(*Kocuria*, 91.72%)。

在种水平上,共鉴定到157个种,选丰度前20个菌种做堆积图分析物种组成。多数酸驼乳的优势菌种为瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*, 72.66%)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, 4.28%)、马乳酒样乳杆菌(*Lactobacillus kefirifaciens*, 8.32%)。而采自阿拉善右旗的AST2样品的优势

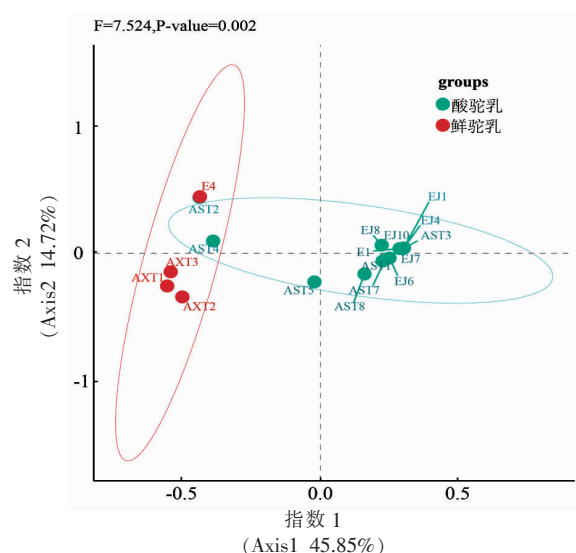


图 2 基于 Bray-curtis 距离计算样品  $\beta$  多样性指数  
Fig.2  $\beta$ -Diversity index of samples based on Bray-Curtis distance

菌种为德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*, 84.93%), 嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*, 14.08%), AST4 样品的优势菌种为马乳酒样乳杆菌 (*Lactobacillus kefiranofaciens*, 84.14%); 鲜驼乳的优势菌种为乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*, 13.22%), 桂林不动杆菌 (*Acinetobacter guillouiae*, 10.65%), 约翰逊不动杆菌 (*Acinetobacter johnsonii*, 8.49%) 和肠膜明串珠菌

(*Leuconostoc mesenteroides*, 4.21%); E4 样品的优势菌种为嗜根考克氏菌 (*Kocuria rhizophila*, 84.12%), 嗜根考克氏菌是从植物的根际分离到的微生物, 属于放线菌门 (*Actinobacteria*) 中的微球菌科 (*Micrococcaceae*)<sup>[14]</sup>。嗜根考克氏菌分布与自然环境中, 包括发酵食物、根际、哺乳动物皮肤、土壤和淡水等<sup>[15]</sup>。因此, 本试验认为 E4 样品可能被污染。

从以上分析结果可以看出鲜驼乳的物种多样性优于酸驼乳物种多样性, 与  $\alpha$  多样性分析结果一致。鲜驼乳中除了检测到一些常见的乳酸菌外, 还检测到解没食子酸链球菌<sup>[16]</sup> (*Streptococcus galloyticus*)、弗氏柠檬酸杆菌<sup>[17]</sup> (*Citrobacter freundii*) 等一些易引起各类炎症反应的菌及条件致病菌, 这可能是由于生驼乳未经杀菌这一过程导致的。酸驼乳中的菌种组成则较简单, 由于酸驼乳在发酵过程中首先将生乳煮沸杀菌, 冷却后再接种少量发酵乳作为发酵剂进行发酵; 其次在发酵过程中乳酸菌和其他微生物之间存在着相互作用如拮抗、协同等作用<sup>[18-19]</sup>, 乳酸菌可以通过竞争营养物质、产生抗菌素、产生有机酸等途径抑制其它微生物的生长<sup>[20]</sup>。这可能是酸驼乳微生物多样性低于鲜驼乳的原因。

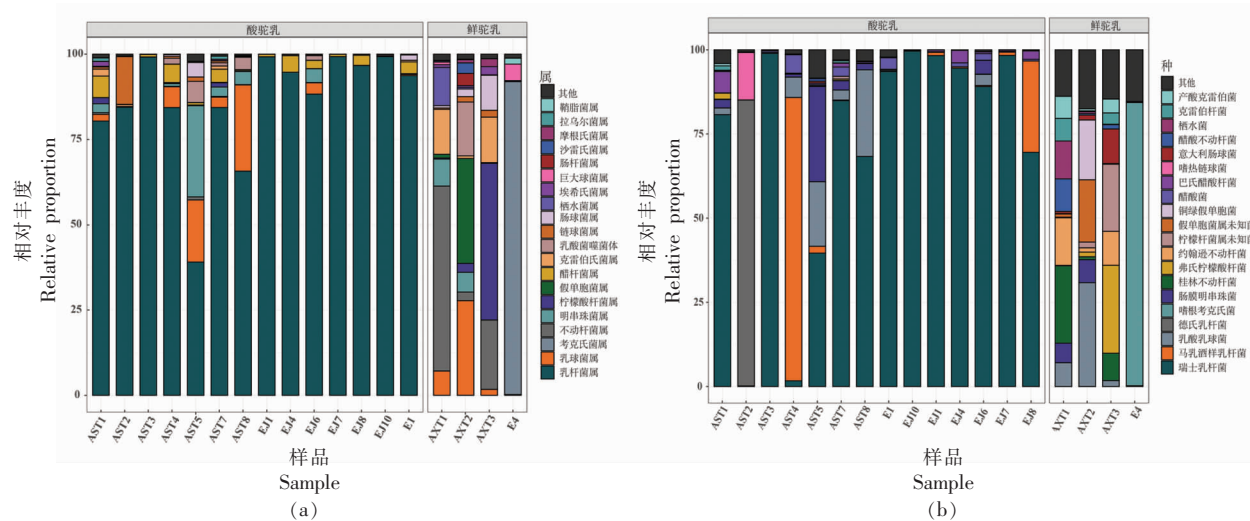


图 3 属 (a) 和种 (b) 水平下的细菌群落组成  
Fig.3 Composition of bacterial community at genus (a) and species (b) levels



2.1.3 差异菌种分析 鲜驼乳、酸驼乳中的差异菌种见图4。

通过 Linear Discriminant Analysis Effect Size (LEfSe)分析(图4所示),发现鲜驼乳和酸驼乳间存在28种差异菌种。其中桂林不动杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、约翰逊不动杆菌、脆假单胞菌、意大利肠球菌等显著富集在鲜驼乳中。生乳在挤出后立即冷藏并一直保持在加工前,是世界各国的普遍做法,然而生乳冷藏有利于嗜冷菌的繁殖,而嗜冷菌主要由假单胞菌(*Pseudomonas*)、不动杆菌(*Acinetobacter*)和乳球菌(*Lactococcus*)等属组成<sup>[21-22]</sup>。假肠模明串珠菌、巴氏醋杆菌和瑞士乳杆菌在酸驼乳中显著富集。Zhao等<sup>[9]</sup>发现在鲜驼乳中的优势细菌属(平均相对丰度>1%),包括假单胞菌属(29.92%)、栖热菌属(14.10%)、链球菌属(10.04%)、不动杆菌属(7.45%)、乳酸杆菌(3.67%)、莫拉菌(1.96%)、乳球菌(1.71%)、纳西杆菌(1.49%)、明串珠菌(1.43%)、类芽孢杆菌(1.21%)、丙酸杆菌(1.05%)和奈瑟氏球菌(1.04%)。张哲等<sup>[23]</sup>在内蒙古传统发酵驼乳中发现,其优势菌种有8个(平均相对丰度>1%),包括乳酸乳球菌(3.34%)、嗜热链球菌(27.01%)、德氏乳杆菌(15.88%)、开菲尔乳杆菌(4.59%)、瑞士乳杆菌(36.67%)、肠膜明串珠菌(2.52%)及两个未鉴定的菌株。可以看出Zhao和张哲等的研究结果显示鲜驼乳和酸驼乳的菌种组成存在差异性,与本研究结果相似。

2.1.4 菌种相关性分析 由于乳中存在的内在微生物交互调节乳品的微生物群结构,因此在检测到的相对丰度前20个核心菌群进行 Spearman 相关性分析(图5)。多数微生物类群之间呈正相关关系,表明物种之间相互促进生长,如嗜热链球菌和德氏乳杆菌呈显著正相关( $r=0.99; P<0.05$ ),嗜热链球菌产生的甲酸、叶酸、 $\text{CO}_2$ 等促进德氏乳杆菌的生长,且嗜热链球菌产生的乳酸可降低牛乳的pH值,从而达到德氏乳杆菌生长的最适pH值<sup>[24]</sup>。乳酸乳球菌与肠膜明串珠菌,假单胞菌属呈显著正相关( $r=0.53, 0.67, 0.68; P<0.05$ )。桂林不动杆菌与皮特不动杆菌,别雷斯不动杆菌,气囊水栖菌( $r=0.96, 0.93, 0.91; P<0.05$ ),约翰逊不动杆菌与皮特不动杆菌,别雷斯不动杆菌,气囊水栖菌,桂林

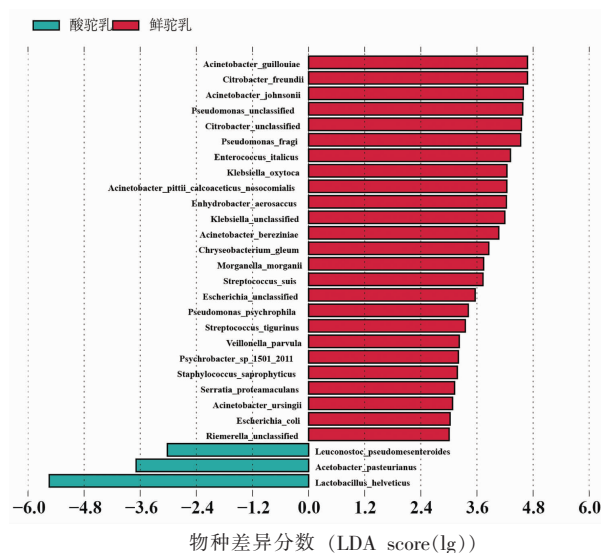


图4 鲜驼乳、酸驼乳中的差异菌种分析

Fig.4 Analysis of differential bacteria in fresh camel milk and fermented camel milk

不动杆菌,产酸克雷伯氏菌呈显著正相关( $r=0.83, 0.76, 0.74, 0.95, 0.99; P<0.05$ )。研究结果表明在鲜驼乳发酵成酸驼乳的过程中,多种菌株发酵互相协同,更有利于酸驼乳风味的形成。

驼乳中少数微生物之间呈负相关,如瑞士乳杆菌与约翰逊不动杆菌呈显著负相关( $r=-0.49; P<0.05$ ),这是由于瑞士乳杆菌可能会产生抑制生物膜形成的表面活性物质,进而可能抑制约翰逊不动杆菌的生长<sup>[25]</sup>。

## 2.2 乳酸菌的分离鉴定

2.2.1 乳酸菌分离 采用传统培养法根据形态结构特征从阿拉善鲜驼乳和酸驼乳中共分离出疑似乳酸菌121株菌。经分离纯化后,通过革兰氏染色和显微镜观察,如图6,染色结果均为阳性,符合乳酸菌特征,将121株菌暂定为乳酸菌。

2.2.2 DNA提取和PCR扩增结果 通过试剂盒提取乳酸菌分离株基因组DNA,将提取到的DNA做PCR扩增,用琼脂凝胶电泳仪进行检测。从图7可观察到PCR扩增成功,满足测序要求。将PCR产物低温条件下送于上海美吉生物科技有限公司测序。

2.2.3 乳酸菌鉴定结果 鲜驼乳、酸驼乳分别分离到29,92株细菌。获得的16S rDNA序列在NCBI中进行同源性比对,121株菌共鉴定为4个

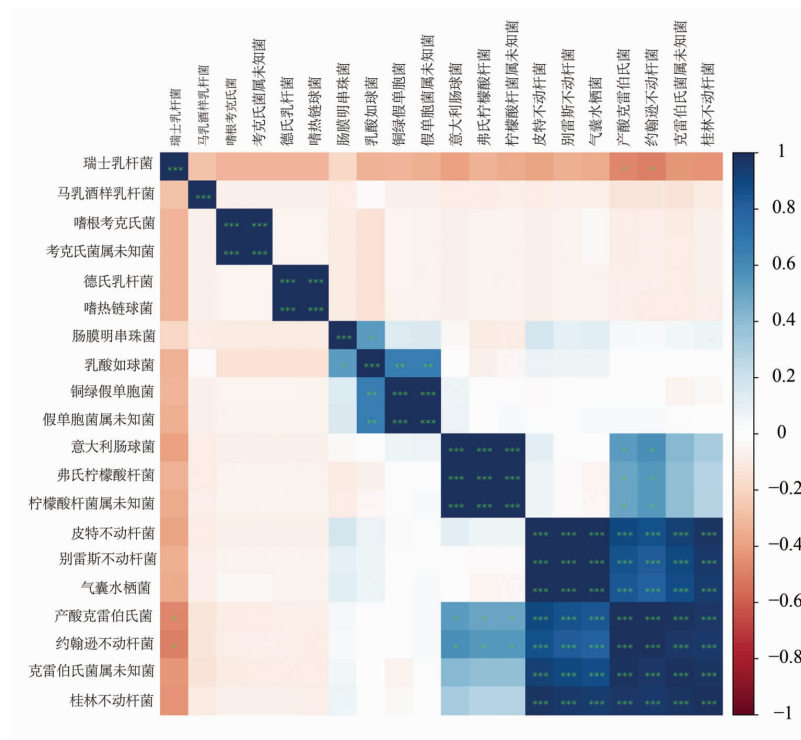


图 5 鲜驼乳和酸驼乳样品中乳酸菌菌种相关性热图

Fig.5 Correlation heat map of lactic acid bacteria in fresh camel milk and yoghurt milk samples

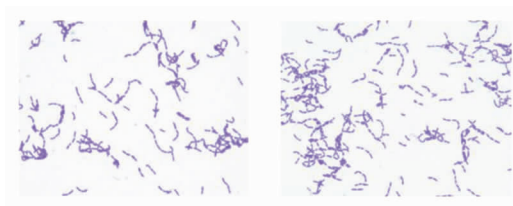


图 6 革兰氏染色显微镜图

Fig.6 Gram staining micrograph

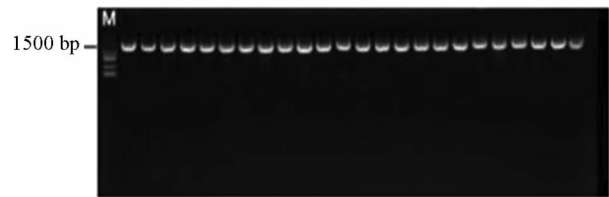


图 7 随机抽取部分分离菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.7 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified 16S rRNA genes from randomly selected isolates

属的 14 个种。以序列相似性大于等于 99%为同种标准归类，下载与测序序列同源性最高的模式菌株并利用 Mega7.0 软件构建系统发育树。其中酸驼乳中 92 株乳酸菌分离株鉴定为 2 株嗜热链球菌、9 株耐久肠球菌、37 株瑞士乳杆菌、4 株德氏乳杆菌、18 株马乳酒样乳杆菌、1 株粪肠球菌、4 株副干酪乳杆菌、2 株屎肠球菌、2 株植物乳植物杆菌、11 株开菲尔乳杆菌、2 株短乳杆菌。鲜驼乳中 29 株乳酸菌分离株鉴定为 2 株植物乳植物杆菌、1 株粪肠球菌、1 株马乳酒样乳杆菌、1 株副干酪乳杆菌、18 株乳酸乳球菌、3 株意大利肠球菌、2

株假肠膜明串珠菌、1 株瑞士乳杆菌。由此可知，酸驼乳的优势菌种为瑞士乳杆菌，鲜驼乳的优势菌种为乳酸乳球菌，与上述分析一致。

利用宏基因组测序技术及纯培养方法对 18 份鲜驼乳和酸驼乳中获得的主要乳酸菌种属含量进行比较分析，如表 2 所示，在属水平上，宏基因组测序和纯培养分离出的优势菌属为乳杆菌属，相对百分比含量分别为 67.73%和 68.61%，纯培养技术和宏基因组测序技术检测出的乳杆菌属相对百分比含量差异不大；在种水平上，宏基因组测序和纯培养分离出的优势菌种为瑞士乳杆菌，占比

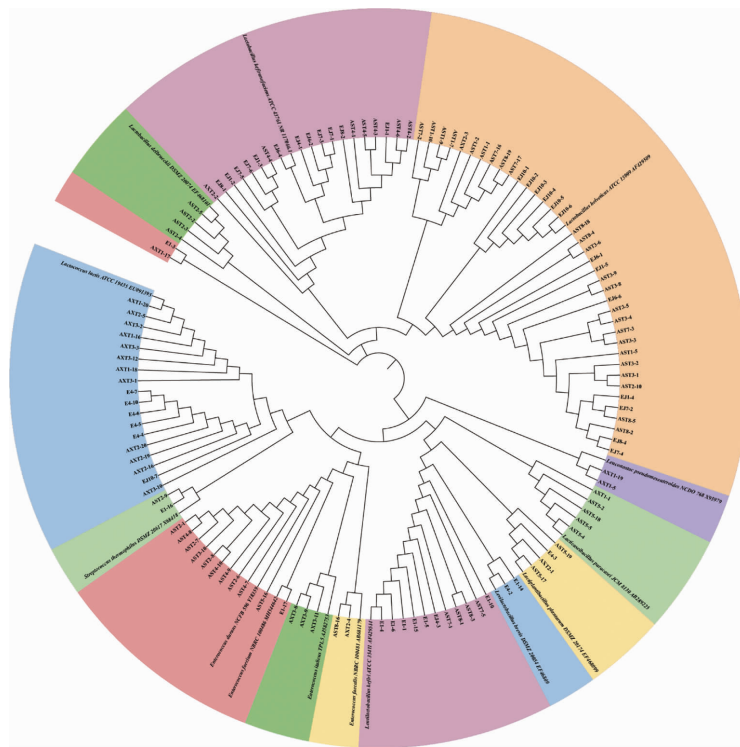


图 8 阿拉善地区乳酸菌分离株 16sRNA 基因序列的系统发育树

Fig.8 Phylogenetic tree of 16sRNA gene sequence of lactic acid bacteria isolated from Alxa area

分别为 56.52%和 31.40%。宏基因组测序鉴定到 26 种乳酸菌种, 纯培养法共鉴定到 14 种乳酸菌种, 少于宏基因组检测结果, 可能是由于部分菌种已处于衰亡期或难于培养导致的。联合纯培养技

术和宏基因组技术方法分离出的菌株可以看出, 乳杆菌属和肠球菌属具有菌种多样性, 而乳球菌属、明串珠菌属和链球菌属菌种比较单一。

表 2 鲜驼乳和酸驼乳中不同方法获得的主要乳酸菌种、属含量比较

Table 2 Comparison of the content of main lactic acid bacteria obtained by different methods in fresh camel milk and sour camel milk

乳酸菌属	相对含量/%		乳酸菌种	相对含量/%	
	纯培养	宏基因组测序		纯培养	宏基因组测序
乳杆菌属	68.61	67.73	瑞士乳杆菌	31.40	56.52
			德氏乳杆菌	3.31	4.72
			马乳酒样乳杆菌	15.70	6.48
			副干酪乳酪杆菌	4.13	0.0099
			植物乳杆菌	3.31	0.0009
			开菲尔乳杆菌	9.11	—
			食淀粉乳杆菌	—	0.0005
			罗伊氏粘液乳杆菌	—	0.0001
			希氏乳杆菌	—	0.0001
			布氏乳杆菌	—	0.0003
			短乳杆菌	1.65	0.001
乳球菌属	14.88	5.71	乳酸乳球菌	14.88	5.53
			棉子糖乳球菌	—	0.13
			格氏乳球菌	—	0.050

(续表2)

乳酸菌属	相对含量/%		乳酸菌种	相对含量/%	
	纯培养	宏基因组测序		纯培养	宏基因组测序
明串珠菌属	1.65	3.21	肠膜明串珠菌	—	2.94
			假肠膜明串珠菌	1.65	0.15
			乳明串珠菌	—	0.12
肠球菌属	13.22	1.15	耐久肠球菌	7.44	0.14
			屎肠球菌	1.65	0.054
			粪肠球菌	1.65	0.156
			意大利肠球菌	2.48	0.75
			鸪鸡肠球菌	—	0.042
			金黄色肠球菌	—	0.0025
			病臭肠球菌	—	0.0043
链球菌属	1.65	1.20	嗜热链球菌	1.65	0.79
			副乳房链球菌	—	0.17
			猪链球菌	—	0.24

### 3 结论

本试验对阿拉善地区的鲜驼乳和酸驼乳进行乳酸菌分离鉴定和微生物多样性研究。18份样品中共鉴定到157个种,121株乳酸菌实现菌株保藏。宏基因组测序联合纯培养方法均表明鲜驼乳微生物多样性明显高于酸驼乳。鲜驼乳的优势菌种为乳酸乳球菌,酸驼乳的优势菌种为瑞士乳杆菌和马乳酒样乳杆菌。宏基因组测序联合纯培养法有效实现了驼乳样品微生物多样性分析与乳酸菌资源挖掘,为驼乳的工业化生产与乳酸菌资源利用提供理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] YADAV A K, KUMAR R, PRIYADARSHINI L, et al. Composition and medicinal properties of camel milk: A review[J]. *Journal of Dairying, Foods & Home Ences*, 2015, 34(2): 83.
- [2] HO T M, ZOU Z, BANSAL N. Camel milk: A review of its nutritional value, heat stability, and potential food products[J]. *Food Res Int*, 2022, 153: 110870.
- [3] 卓娜, 伊丽, 浩斯娜, 等. 基于16S rRNA基因序列分析法比较苏尼特双峰驼和阿拉善双峰驼自然发酵酸驼乳的微生物多样性[J]. *微生物学报*, 2019, 59(10): 1948–1959.
- [4] FAHAD S, 徐鸿洋, 智超, 等. 阿拉善双峰驼酸驼乳中乳酸菌的分离鉴定及耐酸和耐盐研究[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(18): 189–194.
- [5] LI H, GAO J X, CHENG J W, et al. Lactic acid bacteria isolated from Kazakh traditional fermented milk products affect the fermentation characteristics and sensory qualities of yogurt[J]. *Food Sci Nutr*, 2022, 10(5): 1451–1460.
- [6] KADRI Z, SPITAELS F, CNOCKAERT M, et al. The bacterial diversity of raw Moroccan camel milk[J]. *Int J Food Microbiol*, 2021, 341: 109050.
- [7] 柳青, 史迪, 刘文俊, 等. 摩洛哥自然发酵驼乳中乳酸菌分离鉴定及特性研究[J]. *食品科学技术学报*, 2022, 40(4): 85–95, 137.
- [8] 努尔古丽·热合曼. 新疆酸驼乳中微生物种群结构的分子解析及优势菌群的分离与鉴定[D]. 南京: 南京

study of the microbial diversity of traditional fermented bactrian camel milk from Alxa bactrian camel and Sonid bactrian camel[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(10): 1948–1959.

[4] FAHAD S, 徐鸿洋, 智超, 等. 阿拉善双峰驼酸驼乳中乳酸菌的分离鉴定及耐酸和耐盐研究[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(18): 189–194.

FAHAD S, XU H Y, ZHI C, et al. Separation, identification, acid-resistene and halotolerant characterization lactic acid bacteria from shubat of Alashan bactrian camel[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(18): 189–194.

[5] LI H, GAO J X, CHENG J W, et al. Lactic acid bacteria isolated from Kazakh traditional fermented milk products affect the fermentation characteristics and sensory qualities of yogurt[J]. *Food Sci Nutr*, 2022, 10(5): 1451–1460.

[6] KADRI Z, SPITAELS F, CNOCKAERT M, et al. The bacterial diversity of raw Moroccan camel milk[J]. *Int J Food Microbiol*, 2021, 341: 109050.

[7] 柳青, 史迪, 刘文俊, 等. 摩洛哥自然发酵驼乳中乳酸菌分离鉴定及特性研究[J]. *食品科学技术学报*, 2022, 40(4): 85–95, 137.

LIU Q, SHI D, LIU W J, et al. Isolation, identification and characterization of lactic acid bacteria in naturally fermented camel milk from Morocco[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2022, 40(4): 85–95, 137.

[8] 努尔古丽·热合曼. 新疆酸驼乳中微生物种群结构的分子解析及优势菌群的分离与鉴定[D]. 南京: 南京



- 农业大学, 2013.
- NURGUL R. Molecular analysis the microbial structure of shubat in Xinjiang and isolation the predominant species in it[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.
- [9] ZHAO J, FAN H, KWOK L Y, et al. Analyses of physicochemical properties, bacterial microbiota, and lactic acid bacteria of fresh camel milk collected in Inner Mongolia[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 103(1): 106–116.
- [10] FIRASAT H. 基于纯培养和免培养技术研究不同来源沙漠样品原核生物多样性[D]. 昆明: 云南大学, 2017.
- FIRASAT H. Cultivation-dependent and independent approach to study bacterial diversity of four different deserts[D]. Kunming: Yunnan University, 2017.
- [11] 王稼璇, 郝淑月, 任清. 中国传统发酵食品发酵系统中的未培养微生物研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(11): 306–314.
- WANG J X, HAO S Y, REN Q. Advances in the study of uncultured microorganisms in the fermentation system of Chinese traditional fermented food[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(11): 306–314.
- [12] 彭玺, 冯凯, 厉舒祯, 等. 宏基因组学技术与微生物群落多样性分析方法[J]. *科技导报*, 2022, 40(3): 99–111.
- PENG X, FENG K, LI S Z, et al. Analytical methods for metagenomic technology and microbial community diversity[J]. *Science and Technology Review*, 2022, 40(3): 99–111.
- [13] 华雨桐. 非培养与培养方法对高海拔藏族皮肤细菌的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2018.
- HUA Y T. A study on uncultured and cultured methods to explore skin bacteria of tibetansnat high altitude[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2018.
- [14] KOVÁCS G, BURGHARDT J, PRADELLA S, et al. *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov, isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *Int J Syst Bacteriol*. 1999 Jan; 49 Pt 1: 167–173.
- [15] TAKARADA H, SEKINE M, KOSUGI H, et al. Complete genome sequence of the soil actinomycete *Kocuria rhizophila*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(12): 4139–4146.
- [16] 朱聪智, 黄洁, 贾小强. 解没食子酸链球菌感染研究进展[J]. *中国临床研究*, 2016, 29(5): 713–715.
- ZHU C Z, HUANG J, JIA X Q. Research progress of *Streptococcus gallolyticus* infection [J]. *Chinese Journal of Clinical Research*, 2016, 29(5): 713–715.
- [17] 石征宇, 易弋, 黄德生, 等. 一株弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及致病性研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(2): 479–485.
- SHI Z Y, YI Y, HUANG D S, et al. Isolation, identification and pathogenicity of a strain of *Citrobacter freundii*[J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2018, 45(2): 479–485.
- [18] 姚尚杰, 金焱, 周荣清, 等. 传统发酵食品中微生物间相互作用及应用[J]. *生物产业技术*, 2019(4): 48–54.
- YAO S J, JIN Y, ZHOU R Q, et al. Interaction and its application of microorganisms in traditional fermented food[J]. *Biotechnology and Business*, 2019(4): 48–54.
- [19] 赵皓静, 王晓丹, 邱树毅, 等. 液质发酵食品中微生物群落及与乳酸菌间相互作用研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(3): 960–973.
- ZHAO H J, WANG X D, QIU S Y, et al. Microbial community and interaction between lactic acid bacteria and microorganisms in liquid fermented food: a review [J]. *Microbiology China*, 2021, 48(3): 960–973.
- [20] LAY C L, COTON E, LE B G, et al. Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and *Propionibacteria*[J]. *Int J Food Microbiol*, 2016, 239: 79–85.
- [21] A LIANG X, A ZHAO X M, A ZHANG L W, et al. The diversity and proteolytic properties of psychrotrophic bacteriainraw cows' milk from North China-ScienceDirect[J]. *International Dairy Journal*, 2017, 66: 34–41.
- [22] 杜兵耀. 生乳中微生物风险关键点分析及假单胞菌特征研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2022.
- DU B Y. Analysis of risk key points of microorganism in raw milk and characteristics of *Pseudomonas* [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2022.
- [23] 张哲, 刘小鸣, 陈卫. 内蒙古传统发酵驼乳中乳酸菌和酵母菌的分离鉴定及其生物多样性分析[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(7): 230–238.
- ZHANG Z, LIU X M, CHEN W. Isolation and identification of lactic acid bacteria and biodiversity

- analysis of traditional fermented camel milk in Inner Mongolia [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(7): 230–238.
- [24] 王丹, 刘文俊, 孟和毕力格, 等. 嗜热链球菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种在酸奶发酵中互作关系的研究进展[C]. 第十届乳酸菌与健康国际研讨会论文集. 2015: 79–80.
- WANG D, LIU W J, MENGHE B L G. Interactions between *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in yogurt fermentation review [C]. The 10<sup>th</sup> International Symposium on Lactic acid bacteria and health. 2015: 79–80.
- [25] JIANG X P, YAN X, GU S S, et al. *Lactobacillus helveticus* biosurfactants of for biodiversity inhibit the biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and cell invasion [J]. *Future Microbiol*, 2019, 14(13): 1133–1146.

### Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria and Microbial Diversity in Camel Dairy Products from Alxa Region, Inner Mongolia

Su Qian, Sun Jie, Du Ping, Zhao Jie, Yu Jie, Chen Yongfu\*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

**Abstract** Inner Mongolia traditional dairy products are high quality medium for lactic acid bacteria. In order to preserve lactic acid bacteria resources in camel dairy products in Alxa region of Inner Mongolia and study the microbial diversity, the pure culture method and metagenomic sequencing technology were respectively used to evaluate and preserve. Metagenomic results showed that the microbial diversity of fresh camel milk was significantly higher than that of sour camel milk, and 157 species were identified from 18 samples. *Lactococcus lactis* (13.22%) and *Acinetobacter guillouiae* (10.65%) were the dominant species. The dominant species were *Lactobacillus helveticus* (72.66%), *Lactobacillus kefirifaciens* (8.32%) and *Lactococcus lactis* (4.28%). A total of 121 strains of *Lactobacillus* were further isolated from the samples by pure culture and identified as 14 species of 4 genera, in which the dominant species of fresh camel milk is *Lactococcus lactis* (62.00%). The dominant species were the *Lactobacillus helveticus* (40.00%) and the *Lactobacillus kefirifaciens* (19.00%), which were consistent with the metagenomic results. The combination of metagenomic sequencing and pure culture method effectively realized the microbial diversity analysis and *Lactobacillus* resource mining of camel milk samples, providing a theoretical basis for the industrial production of camel milk and the utilization of lactobacillus resources.

**Keywords** camel milk; lactic acid bacteria; microbial diversity; metagenomic