

塔吉克斯坦地区自然发酵牛乳中乳酸菌的分离鉴定及多样性分析

刘琛^{1,2,3}, 丛琳^{1,2,3}, 刘文俊^{1,2,3}, 张和平^{1,2,3*}

(¹ 内蒙古农业大学 呼和浩特 010018)

² 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 呼和浩特 010018

³ 乳酸菌与发酵乳制品省部共建协同创新中心 呼和浩特 010018)

摘要 目的:自然发酵牛乳是塔吉克斯坦地区游牧民族日常饮食的重要组成部分,其中蕴含丰富的乳酸菌资源。目前对于该地区自然发酵牛乳中的微生物群落结构和乳酸菌多样性的研究较少。方法:采用纯培养的方法结合宏基因组测序技术对塔吉克斯坦自然发酵牛乳的微生物多样性进行研究。同时,将该地区微生物群落数据集与吉尔吉斯斯坦和摩洛哥的微生物群落数据集进行比较。结果:纯培养结果显示,从 7 份酸牛乳中共分离 92 株乳酸菌,其中的优势菌种为德氏乳杆菌;宏基因组 16S rRNA 基因测序结果显示,德氏乳杆菌相对含量高达 82%,是所有样品的优势菌种。3 个地区对比分析发现,自然发酵牛乳中微生物群落具有一定的地域差异,塔吉克斯坦和吉尔吉斯斯坦地区菌种组成上较为相似,而摩洛哥与二者差异较大。结论:获得塔吉克斯坦地区自然发酵牛乳的乳酸菌资源和多样性信息,为乳酸菌的开发利用提供了菌株,为自然发酵乳制品中乳酸菌的研究提供了基础数据。

关键词 乳酸菌; 自然发酵牛乳; 纯培养方法; 多样性

文章编号 1009-7848(2022)12-0247-10 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2022.12.025

塔吉克斯坦坐落于中亚,地处北温带(北纬 36°40′ 至 41°05′),其境内多山地高原,为典型的内陆高山国家^[1]。其国内气候温和,雨水量充足,水草肥美,良好的气候环境造就了天然牧场,农业和畜牧业的发展占据了主导地位,而居民生活多为半定居、半游牧,沿袭着古老而传统的生产、生活方式。良好的气候环境和原生态生活方式使得酸牛乳、奶疙瘩、奶皮子等传统发酵乳制品在当地人一日三餐中占重要比例^[2-3]。事实上,每个国家都有自己独特的饮食习俗以及特有的食品种类和制作方法^[4-5]。不同地区的发酵乳制品都具有悠久的历史,像是一个个“天然的菌种宝库”,成为研究不同地域饮食中微生物多样性的良好材料。

乳酸菌分类鉴定的方法分为传统纯培养生理生化分类鉴定法和非培养分子生物学鉴定法。传统纯培养方法通过生理及表型鉴定,所得研究结果准确性较低,误差较难避免,而且费时、费力。而非传统的分子生物学方法可以提取样品中微生物

宏基因组,利用菌株基因组序列之间的特异性对菌群结构、丰度、多样性进行研究。由于其可高效、快速、全面再现生境中微生物菌群等优势,因此基于宏基因组测序的方法在乳酸菌分类鉴定中广泛应用^[6-7]。通过纯培养的方法分离纯化得到样品中微生物并作鉴定,然后利用非培养的方法分析其多样性,两者相互补充,是分析微生物群落结构和多样性的科学方法。

塔吉克斯坦地理条件和气候条件独特,乳制品资源丰富。当地的游牧民族长期饮用的发酵牛乳是以新鲜牛乳为原料自然发酵而成的。其发酵过程大都不需添加商品发酵剂,而是用前 1 d 的酸乳作为“引子”^[8]。由于保持了相对原始的发酵过程,样品中乳酸菌的生物学特性和菌种的多样性得到很好地留存,这些丰富的乳酸菌资源有待于开发和利用。

本研究采用实验室纯培养方法结合 16S rRNA 基因序列分析,对塔吉克斯坦地区自然发酵牛乳中的乳酸菌进行分离纯化及鉴定,为优良菌株的筛选提供资源。应用 PacBio SMRT 测序技术揭示自然发酵牛乳中的细菌群落组成,研究该地区自然发酵牛乳中乳酸菌群落结构和多样性。

收稿日期: 2021-12-23

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金重大项目(2019ZD06);

国家现代农业产业技术体系项目

第一作者: 刘琛,女,硕士生

通信作者: 张和平 E-mail: hepingdd@vip.sina.com

1 材料与方法

1.1 样品的采集

7份自然发酵牛乳样品均采自塔吉克斯坦地区牧民家庭,编号为TJ1~TJ7。每个样品采集一式两份,均使用50 mL无酶无菌管,每个样品采集20 mL,一份加入样品保护剂(无菌的碳酸钙0.1 g和淀粉5 g),另一份加入15 mL DNA保护剂(TaKaRa),样品混匀后封紧管口,立即置于低温冰箱(4℃)中,送至实验室进行后续分析。

1.2 主要试剂及仪器

MRS和M17培养基,英国Qxoid公司;琼脂,北京康倍斯公司;TIANamp Bacteria DNA Kit(细菌基因组DNA提取试剂盒),天根生化科技有限公司;Dneasy Power Food Kit Dneasy(能量食品试剂盒),德国QIAGEN公司;KAPA HiFi Hot-Start Ready Mix PCR Kit(卡帕高通量聚合酶链式反应试剂盒),美国KAPA公司;PCR所用试剂,上海派森诺生物科技有限公司。

微量紫外分光光度计,美国Nanodrop公司;PCR仪(PTC-200型),美国Life Technologies公司;显微镜(CX33),日本OLYMPUS公司;电泳仪(DYY-12型),北京六一仪器厂;凝胶成像分析仪(CDS8000型),美国UVP公司;三代测序仪(PacBio RS II),美国Pacific Biosciences公司。

1.3 乳酸菌的分离与鉴定

将样品充分混合均匀后采用十倍梯度稀释法^[9]。吸取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 3个稀释梯度的稀释液,7个样品3个梯度各200 μ L均匀涂布于MRS和M17固体培养基(琼脂1.2 g/100 mL)上,将固体培养基平板倒置于37℃厌氧培养箱中培养24~48 h。菌落形成后,观察所有菌落的形态,如菌落颜色、大小、边缘状态等并详细记录,挑取形态特征不同的单个菌落于相应的MRS和M17固体培养基上,采用平板划线法依据实际情况进行2~3次划线纯化^[10]。当平板上出现单个菌落后,使用无菌接种环挑取菌落分别接种到MRS和M17的液体培养基中,培养条件如上文所述。对所有菌株进行过氧化氢酶活性检测,以及将菌株革兰氏染色后显微镜观察,对结果为过氧化氢阴性(无气泡产生)且革兰氏染色阳性(显微镜观察菌株呈现紫色)的菌株进行再培养,并冷冻干燥保藏,以备进

一步鉴定。

采用试剂盒法提取菌株DNA,先加入溶菌酶(质量浓度50 mg/mL)菌株进行细胞壁破壁处理,后续的裂解、漂洗、裂解等DNA提取步骤均参考细菌基因组DNA提取试剂(离心柱型)盒说明书。获得菌株的基因组DNA后,用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测,浓度、纯度均符合要求后方可进行后续试验。

使用细菌通用扩增引物,正向引物和方向引物【正向:27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'),反向:1492R(5'-ACCTTGTTACGACTT-3')】,将DNA作为扩增模板进行扩增。扩增反应体系为50 μ L的PCR反应,扩增条件是:预变性5 min(94℃);变性1 min(94℃,30个循环),退火1 min(58℃,30个循环),延伸2 min(72℃,30个循环);末端延伸10 min(72℃)^[11]。将电泳条带明亮,且无拖尾现象的PCR产物在低温条件下送往上海派森诺生物公司进行纯化和双向测序,测序得到的序列在NCBI网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上和已公布的菌株序列进行同源性比对,运用MEGA7.0软件,采用邻接法(Neighbor-Joining)构建菌株进化树。

1.4 酸牛乳中细菌宏基因组DNA的提取

使用Dneasy能量食品试剂盒,2 mL tubes(100)抽提样品宏基因组DNA,其步骤参照试剂盒说明书^[12]。用ND-1000紫外分光光度计和1.0%琼脂糖凝胶电泳检验提取DNA的浓度、纯度与完整度,将符合条件的DNA置低温冰箱(-20℃)保存备用。

1.5 细菌16S rRNA基因序列全长扩增

PCR扩增所需的试剂盒为KAPA HiFi Hot-Start Ready Mix PCR Kit,扩增反应体系(50 μ L):10 μ mol/L 16S rRNA基因序列通用引物(同上述1.3节)各1.5 μ L,DNA模板1.5 μ L,KAPA Mix 4种碱基混合液25.0 μ L,ddH₂O 20.5 μ L。扩增条件:95℃预变性3 min;98℃变性20 s(30个循环),60℃退火15 s(30个循环),72℃延伸30 s(30个循环);72℃末端延伸2 min^[13]。

1.6 PacBio SMRT 测序及数据分析

对原始的测序数据进行质量控制,采用SM-RT portal(v2.7)中RS ReadsOfinsert.1,测序时

DNA 插入片段应在 1 400~1 800 nt 之间。将满足要求的高质量序列根据每个样品的 Barcode 信息做去除 Barcode 处理,用 QIIME 平台对符合要求的高质量序列进行微生物组分析。同时,吉尔吉斯斯坦和摩洛哥的自然发酵酸牛乳数据集也做相同的处理。利用 PyNAST 软件^[14]对齐序列,通过 UCLUST 软件^[15]以 100% 的相似度划分序列,建立可操作分类单元 (Operational taxonomic units, OTU)。利用 FastTree 软件^[16]绘制基于 OTU 代表序列的系统发育进化树,对数据进行计算分析后,用 Mann-Whitney/Kruskal-Wallis 检验统计不同地区

酸牛乳菌落结构的差异性,应用 R 软件和 Origin2017 等软件对 QIIME 分析的微生物组数据进行可视化处理。

2 结果与分析

2.1 塔吉克斯坦酸牛乳中乳酸菌的分离及鉴定

从塔吉克斯坦采集的 7 份酸牛乳样品中共分离得到 93 株菌,根据过氧化氢酶阴性(观察到无氧气泡产生)和革兰氏阳性(显微镜中菌株呈紫色)的表型结果,筛选得到疑似乳酸菌 92 株。

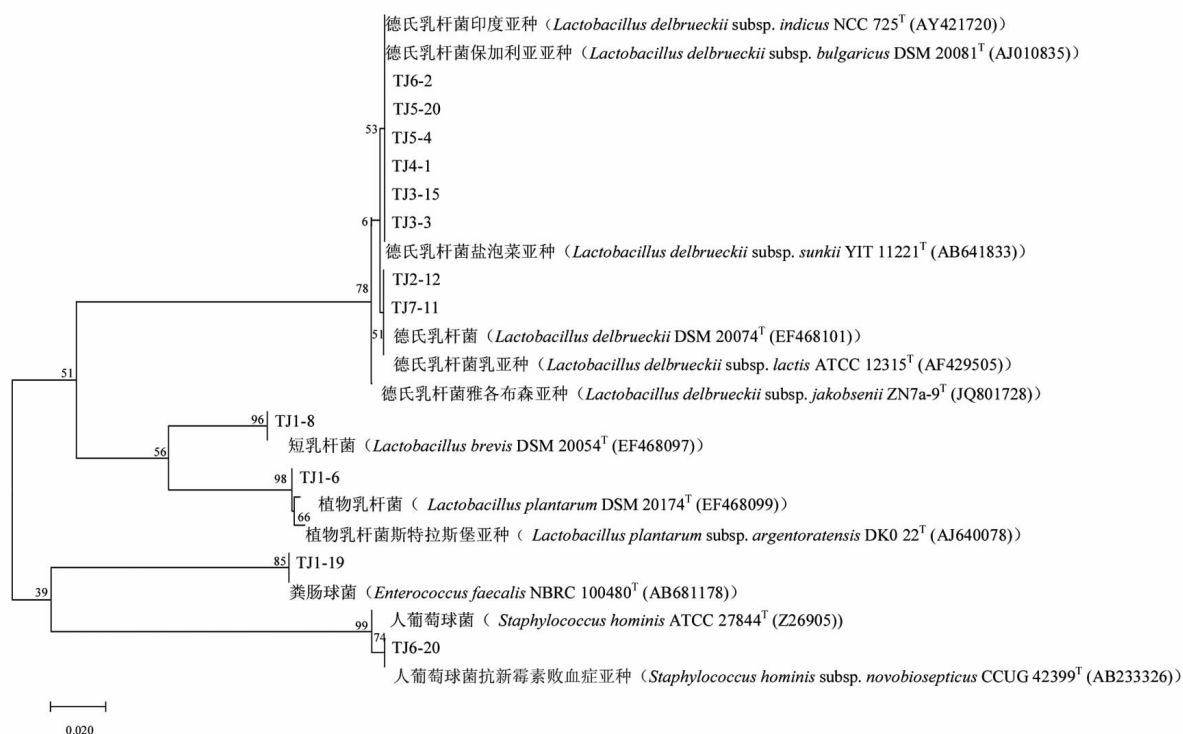


图 1 部分菌株 16S rRNA 基因序列系统进化树

Fig.1 Phylogenetic relationship of 16S rRNA gene sequences of partial isolates

通过 16S rRNA 基因测序和 BLAST 比对,从种水平上对分离株进行鉴定,确认 92 株分离菌株为乳酸菌。使用 MEGA7.0 软件将部分分离株与模式株的 16S rRNA 基因序列绘制成乳酸菌系统发育进化树(图 1)。经鉴定,93 株分离菌株;乳杆菌属有德氏乳杆菌(83 株),植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) (3 株), 短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*) (1 株), 肠球菌属有粪肠球菌(*Enterococcus*

faecium) (3 株), 耐久肠球菌(*Enterococcus duran*) (1 株) 和屎肠球菌(*Enterococcus faecalis*) (1 株), 葡萄球菌属仅 1 株人葡萄球菌 (*Staphylococcus hominis*) (1 株)。

2.2 塔吉克斯坦酸牛乳的细菌多样性

应用 PacBio SMRT 三代测序技术,对 7 份塔吉克斯坦酸牛乳样品进行测序,最后共获得 25 164 条高质量完整的基因序列,平均每个样品

高质量序列 3 595 条。经 97%的相似度划分 O-TU,对获得的 1 838 个 OTU 进行分析,平均每个样品的 OTU 数量为 262 个,其中序列最多的样品为 TJ3(5 008 个),序列最少的样品为 TJ7(915 个)。各样品具体序列数和 OTU 数量见表 1。

图 2a 中稀疏曲线表示未达到平衡仍呈上升趋势,测序深度会继续增加,同时样品中的物种数也会增加,说明随着测序深度的增加还会有新的物种被发现。图 2b 中香农曲线达到平衡,香农多样性指数达饱和,表明此深度下测序,样品中的细菌的多样性已充分展现。本研究的测序深度已满足后续分析要求。

表 1 自然发酵乳样品的测序信息
Table 1 Sequences information of naturally fermented milk samples

样品	读取次数	OTU 数量
TJ3	5 008	411
TJ6	3 640	234
TJ7	915	188
TJ5	3 381	195
TJ1	4 972	316
TJ2	4 399	250
TJ4	2 849	244

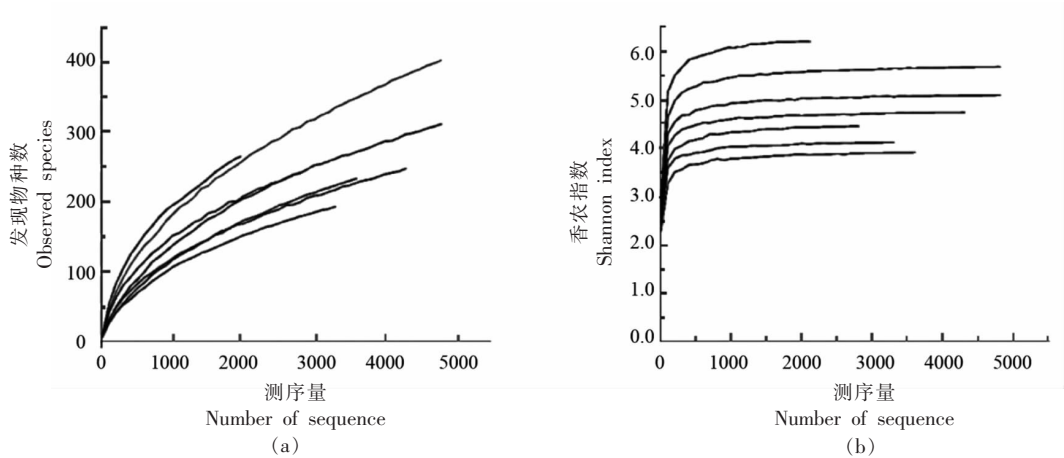


图 2 香农多样性图(a)和稀疏曲线图(b)

Fig.2 Shannon diversity index curves (a) and rarefaction curves (b)

2.3 塔吉克斯坦酸牛乳的细菌组成

利用 PacBio SMRT 技术对塔吉克斯坦地区酸牛乳样品进行测序,采用 RPD 和 Greengenes 数据库进行序列比对,结果共鉴定到 6 个细菌属和 15 个细菌种。在属水平上鉴定到的 6 个细菌属,分别是芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)。不同样品细菌属水平群落组成如图 3 所示。其中,酸牛乳样品中相对含量较高的为乳杆菌属,含量 91.7%,其次为链球菌属,含量 8.1%,其中乳球菌属极少,含量仅 0.01%。7 份所测样品中,TJ4 样品菌种丰富度高,所有 6 个菌属均检测到;乳杆菌属和链球菌属在所有样品中均可检出,其含量均在 70%以上;链球菌属仅在 TJ2 和

TJ4 样品中检出,含量未达到 1%。

在种水平上鉴定到 15 个细菌种,包含 7 个链球菌,4 个乳杆菌,耐久肠球菌等。不同样品细菌种水平群落组成如图 4 所示。德氏乳杆菌、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 和瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*) 在 7 份样品中均有检出;德氏乳杆菌相对含量高达 82%,并且在每份样品中占比均在 47%以上,是所测样品的主要细菌群落,可视其为优势菌种;嗜热链球菌相对含量为 7.36%,是含量第二高的菌种;瑞士乳杆菌的相对含量为 6.62%;莱士曼氏乳杆菌(*Lactobacillus leichmannii*)占比为 2.05%;其余 11 种菌种含量极少,小于 0.5%。不同酸牛乳样品的菌种分布及占比并不相同,TJ1 样品中德氏乳杆菌占比 47.87%,瑞士乳杆菌占比 44.87%,两者均为该样品的优势

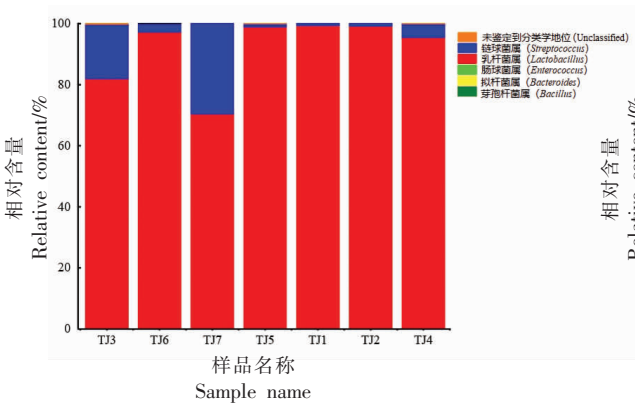


图 3 自然发酵乳在属水平上的相对丰富度和多样性
Fig.3 Relative abundances and bacterial diversity of the microbiota of naturally fermented milk at the genus levels

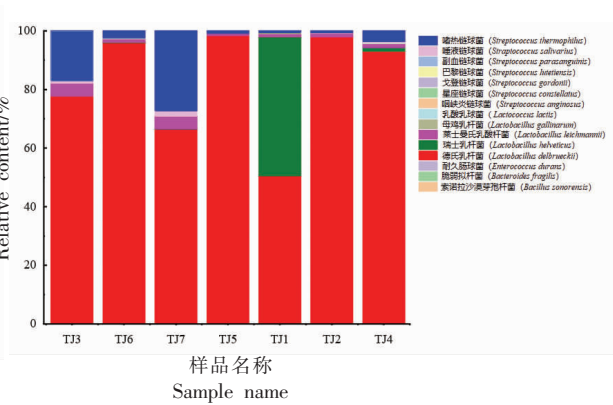


图 4 自然发酵乳在种水平上的相对丰富度和多样性
Fig.4 Relative abundances and bacterial diversity of the microbiota of naturally fermented milk at the species levels

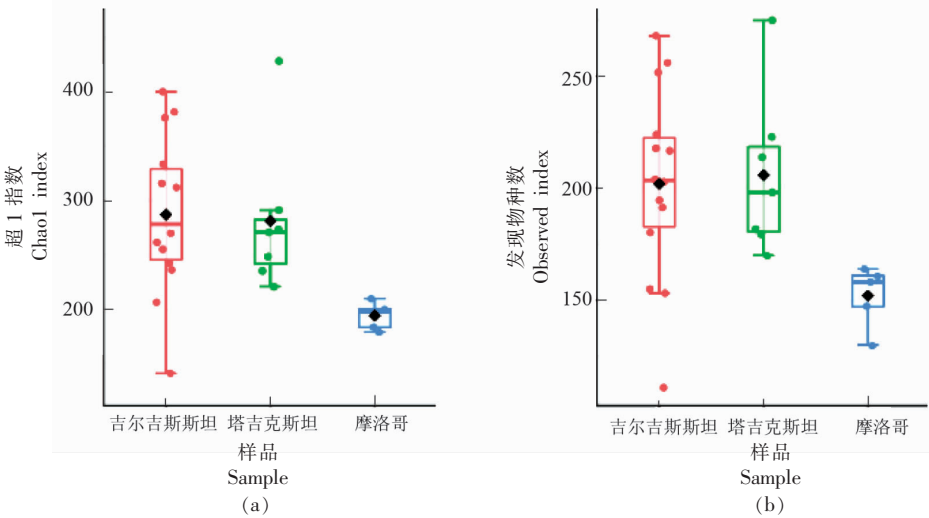
菌种。在 TJ7 样品中嗜热链球菌占比 26.88%, 是该样品中含量第二高的菌种; TJ2 在 7 份样品中菌种较为单一, 并且只有德氏乳杆菌含量最高 (97.75%)。

2.4 不同地区酸牛乳细菌多样性比较

为了比较不同地域自然发酵牛乳微生物多样性, 从公共平台上检索到摩洛哥和吉尔吉斯斯坦自然发酵牛乳的微生物多样性数据集进行比较分析。首先对 3 个地区样品中微生物的多样性和丰富度进行分析, 使用 α 多样性的 4 个指数来评估。如图 5 所示, 吉尔吉斯斯坦和塔吉克斯坦地区酸牛乳样品的 chao1 指数和发现物种数比摩洛哥地区高, 说明吉尔吉斯斯坦和塔吉克斯坦地区样品的细菌丰富度高于摩洛哥地区; 另外, 摩洛哥地区酸牛乳样品的香农指数指数和辛普森指数与其余

两地区的样品相比较高, 说明该地区酸牛乳样品的细菌多样性较高。各地区酸牛乳样品 α 多样性指数详见表 2。

利用 β 多样性对 3 个地区自然发酵牛乳样品的多样性进行分析。通过加权和非加权 UniFrac 距离的主成分分析, 显示 3 个地区微生物群落的差异。基于加权的 UniFrac 距离来分析, 可以显示物种丰度的不同, 而非加权的 UniFrac 距离考虑的是各样品序列间是否有显著的微生物群落差异^[17]。以第 1 主成分和第 2 主成分来分析 3 个地区样品微生物落群的多样性, 结果见图 5。图 5a 为 UniFrac 加权距离, 其第 1 主坐标和第 2 主坐标的贡献率分别为 64.06% 和 19.30%, 图 5b 为 UniFrac 非加权距离, 第 1 主坐标和第 2 主坐标的贡献率分别为 19.53% 和 8.75%。由图 5 可知, 摩洛



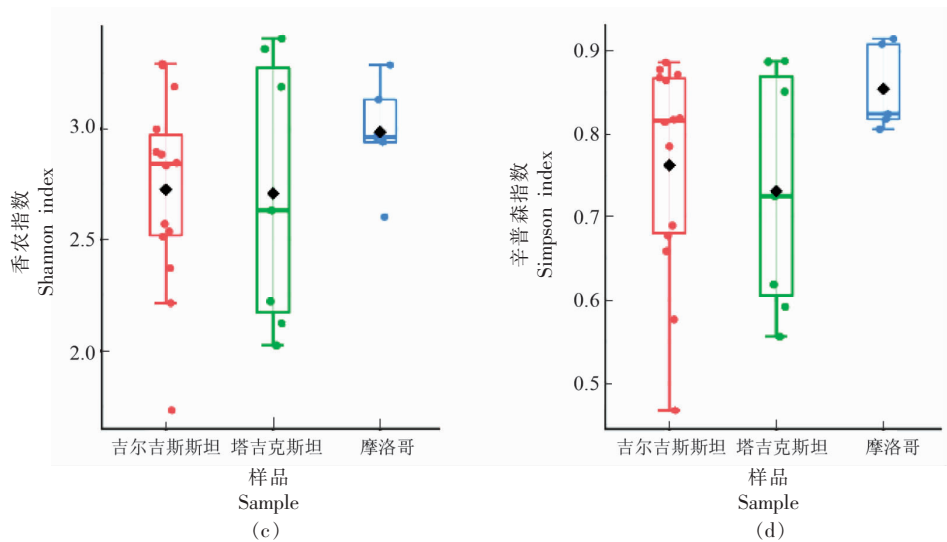


图 5 自然发酵酸牛乳样品中 α 多样性指数的箱型图
Fig.5 Boxplots of α -diversity indexes of naturally fermented milk samples

表 2 塔吉克斯坦酸牛乳序列数和 OTUs,微生物多样性和丰富度指数

Table 2 Number of sequences and OTUs, microbial diversity and richness indexes of Tajikistan naturally fermented milk						
样品	读取次数	OTU 数量	超 1 指数	香农指数	辛普森指数	发现物种数
TJ1	5 092	423	594.499	5.30398	0.901164	320.82
TJ2	4 574	322	535.600	3.44766	0.651111	246.16
TJ3	10 932	718	719.863	5.07821	0.892318	353.52
TJ4	3 996	387	722.118	4.00965	0.736366	316.5
TJ5	3 459	266	513.434	3.02652	0.560876	238.12
TJ6	4 428	374	668.595	3.24421	0.603404	283.54
TJ7	3 483	352	585.789	4.80780	0.858167	315.54
KG1	5 099	492	792.087	4.83669	0.878491	349.08
KG2	5 439	557	907.362	4.98055	0.871194	376.2
KG3	5 670	426	607.808	4.29953	0.826104	292.64
KG4	6 658	431	590.848	4.27836	0.799450	264.80
KG5	2 896	314	684.210	3.88324	0.696134	311.76
KG6	7 701	428	523.022	4.53194	0.884118	251.04
KG7	4 474	419	709.263	3.91381	0.693485	324.52
KG8	5 254	295	446.719	4.29788	0.871510	212.66
KG9	6 561	482	678.086	4.42371	0.826355	293.48
KG14	3 421	261	522.235	4.54800	0.892886	235.66
KG21	4 142	264	463.394	2.58497	0.468345	213.46
KG20	4 394	410	726.508	3.73711	0.653267	317.66
KG22	3 768	350	622.774	4.86922	0.889187	303.06
KG30	3 505	320	589.993	3.38025	0.590173	285.76
MLG7	6 868	585	937.108	5.14450	0.921099	328.60
MLG8	5 548	503	1066.90	4.99822	0.917009	319.50
MLG10	8 675	323	359.895	3.87321	0.827665	182.66
MLG13	7 400	452	563.274	4.49892	0.810704	265.74
MLG14	5 708	343	522.774	4.39674	0.822574	237.68
$\bar{x} \pm s$	5 351 \pm 1 829	403 \pm 106	640 \pm 155	4.25 \pm 0.69	0.78 \pm 0.12	286.16 \pm 47.36

哥地区样品与塔吉克斯坦和吉尔吉斯斯坦地区样品能够较好地区分,说明摩洛哥和两地区微生物组成结构存在一定差异;而塔吉克斯坦和吉尔吉斯斯坦样品呈现聚集状态,说明两地区的样品微

生物菌群结构组成相似度高。图中摩洛哥和吉尔吉斯斯坦的样品存在部分交叠的现象,说明两个地区样品的微生物结构在一定程度上存在相似性。

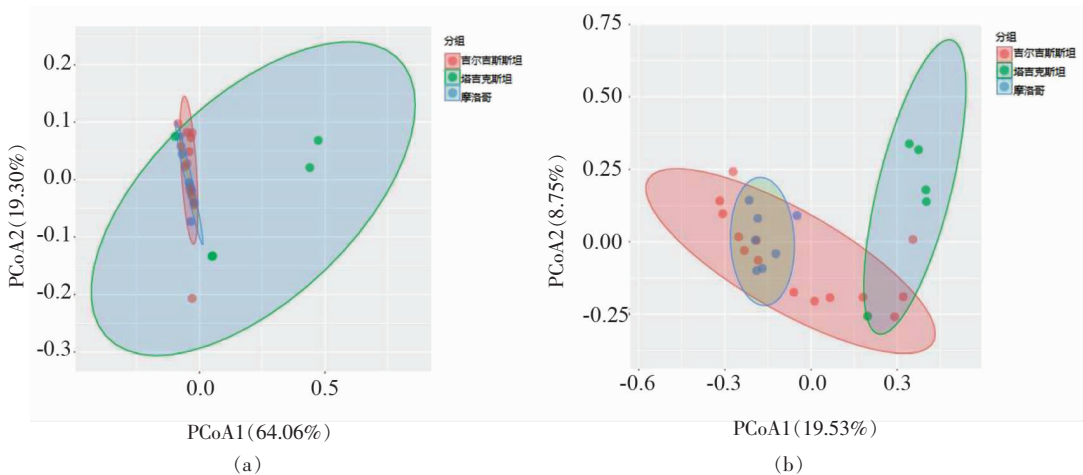


图 6 基于主成分 1 和 2 的加权(a)和未加权(b)UniFrac 主成分分析(PCoA)得分图

Fig.6 Weighted (a) and unweighted (b) UniFrac principal component analysis (PCoA) score plots based on principal components 1 and 2

进一步分析 3 个地区酸牛乳样品微生物群落结构差异。一般来说,一个菌株有一条序列,序列数量庞大难以比对,因此以序列相似度来划分 OTU,了解样品中的菌种和菌属情况^[18]。统计 3 个地区的 OTU 数,共有 10 497 个 OTU,每个地区的样品都存在特有的 OTU。从图 6 来看,3 个地区酸牛

乳样品的优势菌种组成存在差异,摩洛哥地区优势菌株为嗜热链球菌、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)和瑞士乳杆菌,其次马乳酒样乳杆菌(*Lactobacillus kefiranofaciens*)、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)也较多;而塔吉克斯坦和吉尔吉斯斯坦地区优势菌种为德氏乳杆菌和嗜热链球

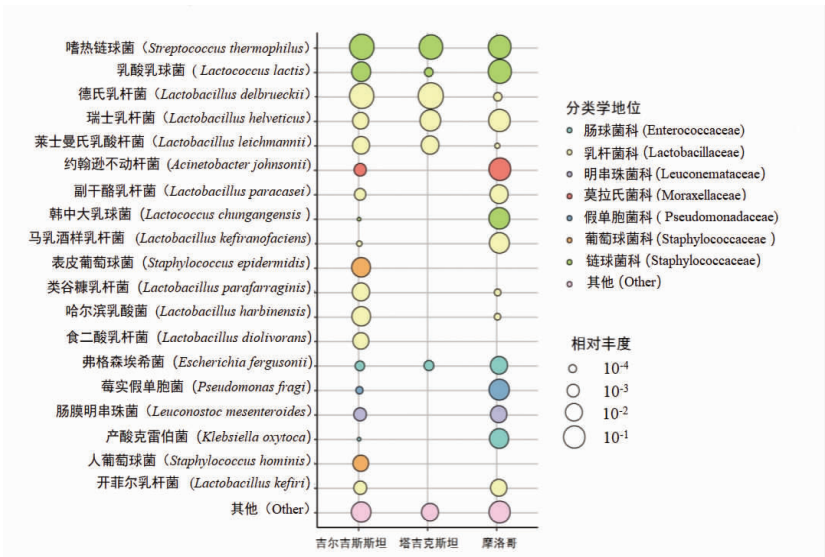


图 7 3 个地区自然发酵乳中菌种丰度气泡图

Fig.7 Bubble chart of the abundance of bacteria in natural fermented milk in three regions

菌,这两地区的菌群有细微的差别。吉尔吉斯斯坦样品中存在乳酸乳球菌、哈尔滨乳杆菌(*Lactobacillus harbinensis*)、食二酸乳杆菌(*Lactobacillus diolivorans*)、类谷糠乳杆菌(*Lactobacillus parafaraginis*)等菌株,然而丰度较小,在塔吉克斯坦样品中未检出。上述结果表明3个地区的样品虽然微生物群落的多样性差异较小,在微生物群落结构上具有相似性,但是样品优势菌种的组成不同。

3 讨论

纯培养的方法是最直接、有效地获得乳酸菌菌种资源的方法,要深入全面获取样品中微生物多样性的信息,需结合分子生物学技术,克服纯培养的局限性^[19]。本研究结合两种方法对塔吉克斯坦地区自然发酵乳中乳酸菌多样性进行分析。结果显示,德氏乳杆菌为该样品的优势菌种,两种方法检测结果一致,然而,测序结果发现存在嗜热链球菌和瑞士乳杆菌等菌株,而分离鉴定并未发现。以往研究者对酸牛乳中菌群结构的研究显示,新疆喀什地区传统酸乳中德氏乳杆菌是优势菌种,同时也可分离得到瑞士乳杆菌、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、屎肠球菌等菌种^[20]。同样,俄罗斯地区采集的自然发酵乳中,乳杆菌属是最丰富的菌属^[21],上述研究与本研究结果相近。通过测序分析,一些痕量微生物被检出,然而,受某些因素的限制,许多微生物较难分离培养。分子生物学技术虽可检测到更为丰富的微生物,但无法保留菌种资源。将二者结合起来研究微生物多样性,具有开发乳酸菌资源的优势。

不同地区酸牛乳的微生物多样性存在差异。将吉尔吉斯斯坦和摩洛哥与塔吉克斯坦地区数据对比,结果显示,3个地区的微生物菌群组成不同。吉尔吉斯斯坦和塔吉克斯坦地区群落组成差异较小,可能是两国地处中亚相邻而立,空间上地理位置接近,历史文化和饮食习惯相似。而摩洛哥位于非洲西北部地区,与两国相距较远,气候也相差甚远,因此微生物群落结构和其它两国存在差异。Sun等^[22]研究的蒙古国地区自然发酵酸牛乳中发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)和瑞士乳杆菌是优势菌种,而Liu等^[23]研究的中国内蒙古地区发酵酸牛乳中乳酸乳球菌、瑞士乳杆菌是优势菌

种。传统自然发酵乳制品具有不同的地域特色,因不同的制作工艺及地域环境,而使得其中蕴含的微生物资源差异较大。Zhong等^[24]研究表明:地理来源和样品类型塑造了天然发酵乳的微生物多样性,地理位置不仅代表着空间上的距离,也代表着温度、湿度、海拔等条件对微生物多样性的影响。综上,自然环境、气候等因素造就了丰富多样的乳酸菌资源。

4 结论

运用纯培养方法和PacBio SMRT三代测序技术对塔吉克斯坦地区自然发酵酸牛乳中微生物多样性和群落结构,特别是乳酸菌菌群组成进行综合分析。分离鉴定出92株乳酸菌,获得珍贵的乳酸菌资源。对不同地区发酵酸牛乳微生物群落组成分析发现,不同地区的自然发酵乳样品中微生物群落结构具有差异,地理位置是引起差异的一个因素。本研究结果可为具有区域特色的乳酸菌资源开发利用提供参考。

参 考 文 献

- [1] 许涛. 帕米尔高原上的古老国度——塔吉克斯坦[J]. 中国投资, 2015(9): 52-55.
XU T. The ancient country on Pamirs-Tajikistan[J]. Chinese Investment, 2015(9): 52-55.
- [2] 蒲开夫, 王雅静. 塔吉克斯坦的畜牧业[J]. 草食家畜, 2010(3): 32-33.
PU K F, WANG J Y. The animal husbandry of Tajikistan[J]. Grass-Feeding livestock, 2010(3): 32-33.
- [3] GENFORS E. Udder health in dairy cows in Tajikistan-prevalence of mastitis and bacteriological findings[J]. Sveriges Lantbruksuniversitet, 2018, 1(78): 1-40.
- [4] MELINI F, MELINI V, LUZIATELLI F, et al. Health-promoting components in fermented foods: An up-to-date systematic review [J]. Nutrients, 2019, 11(5): 1189.
- [5] 陆东林, 刘朋龙, 李新玲, 等. 传统发酵乳及其发展前景[J]. 中国乳业, 2018, 202(10): 65-71.
LU D L, LIU P L, LI X L, et al. Traditional fermented milk and its development prospect[J]. Dairy

- Industry, 2018, 202(10): 65–71.
- [6] NDOYE B, RASOLOFO E A, LAPOINTE G G, et al. A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota[J]. Dairy Science and Technology, 2011, 91(5): 495–524.
- [7] 何荣, 窦丽芳, 董玲. 分子技术在食品乳酸菌分类和鉴定中的应用[J]. 现代商贸工业, 2010, 22(16): 321–322.
- HE R, DOU L F, DONG L. Application of molecular technology in the classification and identification of food lactic acid bacteria[J]. Modern Trade Industry, 2010, 22(16): 321–322.
- [8] ZHANG H P, XU J, WANG J G, et al. A survey on chemical and microbiological composition of kurut, naturally fermented yak milk from Qinghai in China[J]. Food Control, 2008, 19(6): 578–86.
- [9] YU J, WANG W H, MENGHE B L G, et al. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia[J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(7): 3229–3241.
- [10] 呼斯楞, 刘红新, 于洁, 等. 内蒙古呼伦贝尔地区传统发酵乳中乳酸菌的多样性分析[J]. 微生物学通报, 2016, 43(5): 984–990.
- HU S L, LIU H X, YU J, et al. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented milk from Hulun Buir in Inner Mongolia[J]. Microbiology China, 2016, 43(5): 984–990.
- [11] YU J, GAO W, QIN M J, et al. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles in Sichuan, China[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2012, 58(3): 163–172.
- [12] 莫蓝馨. 内蒙古锡林郭勒盟和蒙古国巴彦洪格尔省传统发酵乳制品中细菌多样性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
- MO L X. Investigation of bacterial diversity in traditional fermented dairy products from Xiling of Inner Mongolia and Bayankhongor of Mongolia[D]. Huhehaot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.
- [13] JIN H, MO L, PAN L, et al. Using PacBio sequencing to investigate the bacterial microbiota of traditional Buryatian cottage cheese and comparison with Italian and Kazakhstan artisanal cheeses[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(8): 6885–6896.
- [14] KNIGHT R. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment[J]. Bioinformatics, 2010, 26(2): 266–267.
- [15] EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460–2461.
- [16] PRICE MORGAN N, DEHAL PARAMVIR S, ARKIN ADAM P. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix[J]. Molecular Biology and Evolution, 2009, 26(7): 1641–1650.
- [17] HAMADY M, LOZUPONE C, KNIGHT R. Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data[J]. Isme Journal, 2010, 4(1): 17–27.
- [18] 姚国强. 传统发酵乳中细菌多样性及其功能基因研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017.
- YAO G Q. Study on bacterial diversity and functional genes in traditional fermented dairy products[D]. Huhehot: Inner Mongolia Agricultural University, 2017.
- [19] 其木格苏都. 自然发酵酸马奶细菌多样性及其基因动态变化研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017.
- QIMU G S D. Dynamics of bacterial diversity and functional genes during koumiss fermentation[D]. Huhehot: Inner Mongolia Agricultural University, 2017.
- [20] 袁雪林, 杨洁, 胡敏, 等. 新疆喀什地区传统发酵酸乳中乳酸菌多样性的初步分析[J]. 食品工业科技, 2015, 36(10): 202–204, 219.
- YUAN X L, YANG J, HU M, et al. Preliminary analysis the diversity of lactic acid bacteria in traditional fermented yogurt Kashi, Xinjiang[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(10): 202–204, 219.
- [21] 刘红新. 基于宏基因组技术对俄罗斯地区自然发酵牛乳中微生物多样性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017.
- LIU H X. Microbial diversity analysis of naturally fermented cow milk in Russia based on metagenomics technology[D]. Huhehot: Inner Mongolia Agricultural University, 2017.
- [22] SUN Z H, LIU W J, ZHANG J C, et al. Identification and characterization of the dominant lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milk

- in Mongolia[J]. *Folia Microbiologica*, 2010, 55(3): 270–276.
- [23] LIU W, BAO Q, JIRI M T, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis[J]. *Microbiological Research*, 2012, 167(2): 110–115.
- [24] ZHONG Z, HOU Q, KWOK L, et al. Bacterial microbiota compositions of naturally fermented milk are shaped by both geographic origin and sample type[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(10): 7832–7841.

Isolation and Identification and Biodiversity Analysis of Lactic Acid Bacteria in Naturally Fermented Cow Milk from Tajikistan

Liu Chen^{1,2,3}, Cong Lin^{1,2,3}, Liu Wenjun^{1,2,3}, Zhang Heping^{1,2,3*}

(¹Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018

²Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Huhhot 010018

³Collaborative Innovative Center of Ministry of Education for Lactic Acid Bacteria and Fermented Dairy Products, Huhhot 010018)

Abstract Objective: Naturally fermented cow milk is an important part of the daily diet of nomadic people in Tajikistan, which contains rich resources of lactic acid bacteria. However, there are few studies on the microbial community structure and biodiversity of lactic acid bacteria in natural fermented cow milk in Tajikistan. Methods: In this study, pure culture method combined with metagenome sequencing technology was used to study the microbial diversity of naturally fermented cow milk in Tajikistan. At the same time, the microbial community data sets in Tajikistan were compared with another two regions in Kyrgyzstan and Morocco. Result: The results of isolation and identification showed that 92 strains of lactic acid bacteria were isolated from 7 naturally fermented cow milk samples, and the dominant strain was *Lactobacillus delbrueckii*. The results of sequencing showed that *Lactobacillus delbrueckii* was the dominant strain with a relative content of 82%. The comparative analysis of the three regions showed that the microbial community in naturally fermented milk had some differences. The composition of bacteria in Tajikistan and Kyrgyzstan was similar, while Morocco was quite different from them. Conclusion: Through this study, we acquired lactic acid bacteria resources and the information of diversity of naturally fermented milk in Tajikistan, provided strains for the development and utilization of lactic acid bacteria, and provided basic data for the research of lactic acid bacteria in naturally fermented dairy products.

Keywords lactic acid bacteria; naturally fermented milk; pure culture method; diversity