

研究报告

一株食醋污染菌 CICC 10774 的鉴定及其生长代谢特性

翟磊 程宵宵 苏姣姣 张露 刘洋 曹艳花 姚粟 程池*

(中国食品发酵工业研究院 中国工业微生物菌种保藏管理中心 北京 100015)

摘要:【目的】对食醋污染菌 CICC 10774 进行多相分类学鉴定,并对其生长特征和代谢产物进行研究。【方法】通过 16S rRNA 基因序列系统发育学分析,结合形态特征和生理生化特性确定该菌株的分类学地位。通过分光光度法测定菌株生长的最适温度和最适 pH 值,确定其最佳培养条件。采用 HPLC 测定该菌株代谢产物。【结果】多相鉴定分析表明菌株 CICC 10774 为耐酸乳杆菌(*Lactobacillus acetotolerans*),革兰氏染色呈阳性,兼性厌氧生长,具有明胶酶活性,能够利用葡萄糖、果糖、甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺、熊果苷、七叶灵、水杨苷、纤维二糖、海藻糖和龙胆二糖作为碳源底物生长。生长代谢特性研究表明,CICC 10774 的最适生长温度为 37 °C,最适 pH 值为 5.0,代谢产物主要为醋酸和乳酸,是一株典型的耐酸菌。【结论】对引起食醋污染的耐酸乳杆菌 CICC 10774 生长代谢特征进行了研究,为食醋生产企业生产过程的微生物控制提供理论基础。

关键词: 食醋,耐酸乳杆菌,多相分类学鉴定,生长代谢特性

Identification and characterization of strain CICC 10774 causing vinegar spoilage

ZHAI Lei CHENG Xiao-Xiao SU Jiao-Jiao ZHANG Lu LIU Yang CAO Yan-Hua
YAO Su CHENG Chi *

(China Center of Industrial Culture Collection, China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100015, China)

Abstract: [Objective] Strain CICC 10774 causing vinegar spoilage was identified by polyphasic taxonomy and its growth and metabolism properties were studied. [Methods] Strain CICC 10774 was identified by 16S rRNA gene sequences phylogenetic analysis combined with morphology and physiological and biochemical characteristics. The optimal temperature and pH value for growth were measured using spectrophotometric method and the metabolic products were analyzed by HPLC. [Results] Polyphasic taxonomy analyses revealed that strain CICC 10774 was identified as

Foundation item: National Infrastructure of Microbial Resources Project (No. NIMR2015-4); Scientific and Technological Development Project of China National Research Institute of Food and Fermentation Industries (No. 2015KJFZ-BS-04)

*Corresponding author: Tel: 86-10-53218306; Fax: 86-10-53218307; E-mail: cheng100027@163.com

Received: July 24, 2015; **Accepted:** October 30, 2015; **Published online** (www.cnki.net): November 06, 2015

基金项目: 国家微生物资源平台专项(No. NIMR2015-4); 中国食品发酵工业研究院科技发展基金(博士基金)项目(No. 2015KJFZ-BS-04)

*通讯作者: Tel: 86-10-53218306; Fax: 86-10-53218307; E-mail: cheng100027@163.com

收稿日期: 2015-07-24; **接受日期:** 2015-10-30; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-11-06

Lactobacillus acetotolerans. The strain was Gram-positive, facultative aerobic, positive for gelatinase activities and could use mannose, *N*-acetylglucosamine, arbutin, esculin, salicin, cellobiose, trehalose and gentiobiose as sole carbon sources for growth. The optimal growth was observed at 37 °C and pH 5.0, and major metabolic products were acetic acid and lactic acid, indicating that strain CICC 10774 was a typical acidophilic bacterium. **[Conclusion]** The growth and metabolism properties of *Lactobacillus acetotolerans* CICC 10774 causing vinegar spoilage were studied to provide a theoretical basis for the vinegar production enterprises to control microbial pollution.

Keywords: Vinegar, *Lactobacillus acetotolerans*, Polyphasic taxonomy identification, Growth metabolism

食醋在中国已经有超过三千年的食用历史, 酸味柔和, 醇香回甜, 久陈不腐, 具有调理血糖、血脂、血压、软化血管的保健功效, 成为深受人们喜爱的一种调味品。传统食醋生产主要以固态发酵为主, 通过微生物的代谢作用产生的众多酶系将富含淀粉和糖类的原料催化生成醋酸等基本风味物质, 本质上是一个微生物菌种混合发酵的复杂过程。传统食醋发酵过程中存在着复杂的微生物群落, 通过微生物的协同作用, 产生有机酸、氨基酸、酯类化合物等代谢产物, 使传统食醋具有丰富的营养成分和独特的风味^[1]。

虽然微生物在食醋酿造过程中发挥着重要作用, 但是微生物污染是亟待解决的难题。目前有关食醋酿造微生物的研究主要集中在菌种分离鉴定和群落结构分析方面^[2-4], 几乎没有有关食醋生产过程中微生物污染的研究报道。成品食醋被微生物污染后会产生异味、出现颜色变浅和醋中固形物减少等现象, 大大地降低了食醋的营养价值, 不利于人们的健康。本课题组采用 PCR-DGGE 技术结合纯培养技术^[5], 对正常醋样和污染醋样的微生物群落结构进行了比较研究, 发现了引起食醋变质的污染菌 CICC 10774。本研究采用多相分类学技术, 通过 16S rRNA 基因序列系统发育分析, 结合形态学特征和生理生化特性对菌株 CICC 10774 进行鉴定。在此基础上, 对菌株 CICC 10774 的生长代谢特征与代谢产物进行了测定分析。

1 材料与方法

1.1 实验菌株及培养条件

菌株 CICC 10774 分离于污染食醋样品, 保藏

于中国工业微生物菌种保藏管理中心。菌株 CICC 10774 使用 MRS 培养基于 37 °C 下厌氧培养。

1.2 主要试剂及设备

MRS 培养基、革兰氏染色试剂盒、生理生化鉴定管购于北京陆桥技术股份有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购于 Omega 公司; *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、DL2000 marker 购于天为时代生物有限公司; GoldView 购于北京赛百盛基因技术有限公司; 溶菌酶购于 Sigma-Aldrich 公司; 蛋白酶 K 购于 Merck 公司; API 试剂条购于生物梅里埃公司; 其它化学药品均为进口分析纯产品。

光学显微镜 Olympus BH-2 购于奥林巴斯有限公司; 紫外可见分光光度计 7200 型购于尤尼科(上海)仪器有限公司; 高效液相色谱 LC-20A 购于 Shimadzu 公司; UV 铂金级凝胶成像系统 77WL-20M 购自英国 Explorer 公司; 温度梯度 PCR 仪购于 Biometra 公司; 恒温培养箱 BHG-8082 型购于上海一恒科学仪器有限公司; 临界点干燥仪 CPD030 购于 BAL-TEC 公司; 喷金-离子溅射仪 E-1045 和扫描电镜 SU8010 购于 Hitachi 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株 CICC 10774 分子生物学鉴定: 利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 CICC 10774 基因组 DNA, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。以基因组 DNA 为模板, 利用通用引物 27F 和 1492R 对该菌株的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增^[6]。PCR 反应条件为: 94 °C 10 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物用 0.8% 琼脂糖进行检测后, 送北京诺赛基因组

研究中心有限公司进行测序。使用 ContigExpress 软件对测序结果进行分析,将分析后结果递交到 EzBioCloud 数据库进行比对分析^[7],确定菌株 CICC 10774 与已知菌株的同源关系。采用 MEGA 4 软件中的 Clustal 功能对菌株 CICC 10774 与近缘菌株的 16S rRNA 基因进行多序列比对^[8],并使用 Neighbour-Joining 法进行系统发育及分子进化分析^[9]。

1.3.2 菌株 CICC 10774 表型特征鉴定 菌株 CICC 10774 接种到 MRS 培养基上,厌氧培养 3 d,观察菌落形态特征^[10]。使用革兰氏染色试剂盒对菌株 CICC 10774 进行染色,使用光学显微镜观察菌体形态特征。使用场发射扫描电镜,对 CICC 10774 菌体进行电镜观察。具体操作:收集新鲜菌体,加入 2.5%戊二醛 4 °C 固定过夜。6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,100 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.2)漂洗 3 次。30%、50%、70%、85%、95%乙醇梯度脱水后 100%乙醇脱水 3 次,脱水后对样品进行二氧化碳临界点干燥和喷金,使用场发射扫描电镜进行观察。

根据分子生物学鉴定结果,结合伯杰氏系统学手册^[11],使用 API 50 CHL 鉴定系统和生化鉴定管对菌株 CICC 10774 进行鉴定^[12]。按照使用说明,利用 API 50 CHL 鉴定系统对 49 种碳源底物的利用能力进行测定。使用生化鉴定管对菌株 CICC 10774 的明胶液化、柠檬酸盐利用、H₂S 生成、尿素利用、硝酸盐还原、VP 试验和 MR 试验等生化特性进行鉴定。将新活化的菌株接种到鉴定管中,37 °C 厌氧培养 3 d 后,根据说明书对试验结果进行判读。利用厌氧培养罐进行菌株厌氧生长特性的测定。

1.3.3 菌株 CICC 10774 生长特性的研究:生长特性研究包括生长最适温度和 pH、热稳定性以及代谢产物分析。

生长最适温度和 pH 试验:菌株 CICC 10774 接种到 MRS 液体培养基中,厌氧培养 3 d 后作为接种

液,按照 1%接种到新鲜的 MRS 液体培养基中,分别置于 20、25、37、40 和 45 °C 培养箱中厌氧培养 7 d,每天测定培养液在 600 nm 下的吸光值。同时将接种液按照 1%接种到新鲜的不同 pH 的 MRS 液体培养基中(pH 3.0–7.0),每天测定培养液在 600 nm 下的吸光值。

热稳定性试验:菌株 CICC 10774 接种到 pH 5.0 MRS 液体培养基中,培养 3 d 后进行菌落计数。分别取 25 mL 菌液,93 °C 处理 15、30、45、60、90 和 120 s,对处理后的样品进行菌落计数。

代谢产物分析试验:菌株 CICC 10774 代谢产物使用高效液相色谱仪(岛津 LC-20A)进行测定。色谱柱为 GRACE Prevail Acid (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为 10 mmol/L KH₂PO₄ (pH 2.3)和甲醇 (95:5);流速为 0.6 mL/min;检测器为紫外检测器,检测波长 210 nm,柱温 30 °C。

2 结果与分析

2.1 分子生物学鉴定结果

菌株 CICC 10774 基因组 DNA 提取结果见图 1A,琼脂糖凝胶检测显示,提取 DNA 片段在 23 kb 附近有一条亮带,说明提取的基因组 DNA 完整性较好。利用引物 27F 和 1492R 扩增得到 16S rRNA 基因片段仅有一条带,大小在 1 500 bp 左右(图 1B),说明 16S rRNA 基因扩增成功。

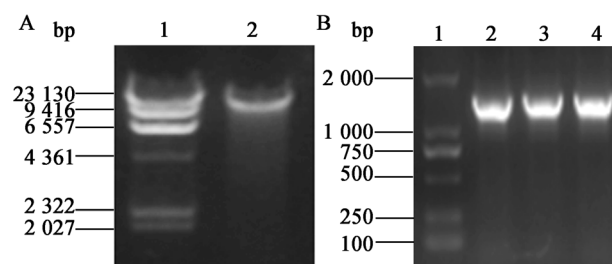


图 1 菌株 CICC 10774 基因组 DNA (A)和 16S rRNA 基因片段 PCR 扩增产物(B)电泳图

Figure 1 Electrophoresis of strain CICC 10774 genomic DNA (A) and 16S rRNA gene PCR products (B)

Note: A: 1: λ /Hind III marker; 2: Genomic DNA. B: 1: DL2000 marker; 2–4: PCR products.

将菌株 CICC 10774 的 16S rRNA 基因序列测序后递交数据库比对, 发现与其亲缘最近的是 *Lactobacillus acetotolerans* JCM 3825^T, 相似性为 100%, 与其他菌株的相似性均小于 97%。获取相关模式菌株的 16S rRNA 基因序列, 以 *Escherichia coli* KCTC 2441^T (EU014689) 为外群, 构建菌株 CICC 10774 系统发育树(图 2)。系统发育结果表明, 菌株 CICC 10774 与 *Lactobacillus acetotolerans* JCM 3825^T 聚类在一个系统发育分支, 菌株 CICC 10774 鉴定为 *Lactobacillus acetotolerans*。

2.2 表型特征鉴定结果

菌株 CICC 10774 在 MRS 琼脂培养基上 37 °C 厌氧培养 3 d, 菌落为乳白色, 圆形, 湿润, 边缘整齐, 表现为典型的乳杆菌菌落特征。显微镜下观察菌株呈杆状或者弯曲杆状, 大小为(0.5–0.6) μm×(1.0–2.0) μm, 单个, 成对或者成链排列, 革兰氏染色呈阳性。电镜照片见图 3。

API 50 CHL 鉴定系统结果表明, 菌株能够利用葡萄糖、果糖、甘露糖、*N*-乙酰葡萄糖胺、熊果苷、

七叶灵、水杨苷、纤维二糖、海藻糖和龙胆二糖作为碳源生长, 蔗糖和糖原利用较弱, 不能利用其他的碳源(表 1)。生理生化鉴定分析结果表明, 菌株 CICC 10774 兼性厌氧生长, 明胶水解为阳性, 柠檬酸盐利用、H₂S 生成、尿素利用、硝酸盐还原、VP 试验和 MR 试验为阴性(表 2)。

2.3 菌株 CICC 10774 生长代谢特性研究

菌株 CICC 10774 生长特性研究表明, 其最适生长温度为 37 °C, 厌氧培养 7 d 后 *OD*₆₀₀ 达到 2.0, 40 °C 培养 7 d 后 *OD*₆₀₀ 能达到 1.5, 然而在 20 °C 生长 7 d 后 *OD*₆₀₀ 只能达到 0.5, 仅为 37 °C 培养的 25%, 45 °C 培养几乎没有生长(图 4A), 说明温度是耐酸乳杆菌生长的关键条件, 这与夏季食醋生产过程中容易出现微生物污染一致。夏季食醋生产厂房中温度较高, 能够达到 37 °C, 甚至 40 °C, 是耐酸乳杆菌最易生长的温度, 为其大量生长繁殖提供了有利条件; 而冬季食醋生产厂房中的温度往往低于 20 °C, 在很大程度上抑制了耐酸乳杆菌的生长。

菌株 CICC 10774 生长最适 pH 为 5.0, 培养 7 d

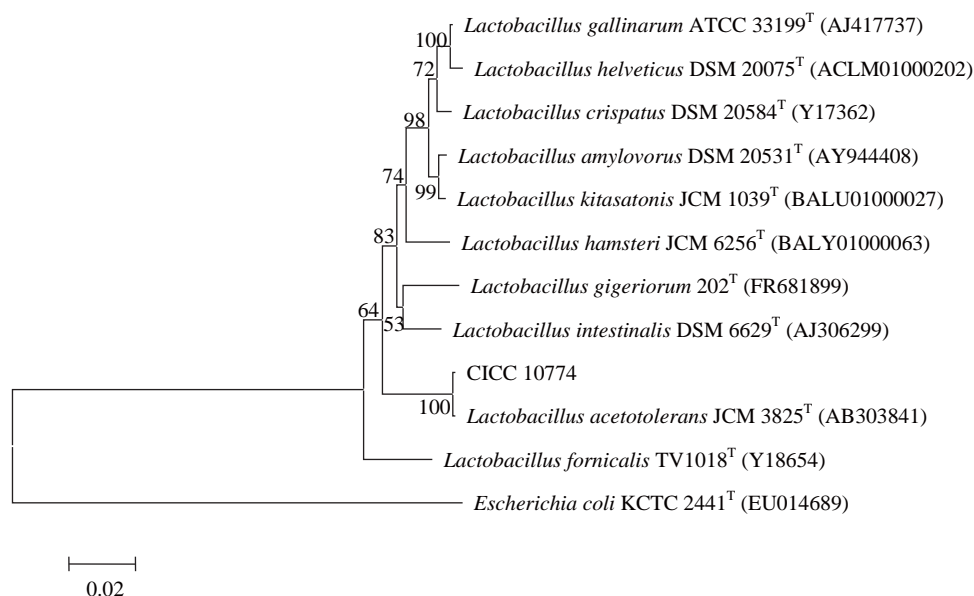


图 2 菌株 CICC 10774 16S rRNA 基因序列系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain CICC 10774 and other reference species based on 16S rRNA gene sequence

注: 图中发育树节点只显示 Bootstrap 值大于 50% 数值; ^T: 模式菌株。

Note: Bootstrap values (>50%) are shown at each branch points. ^T: The type strain.

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

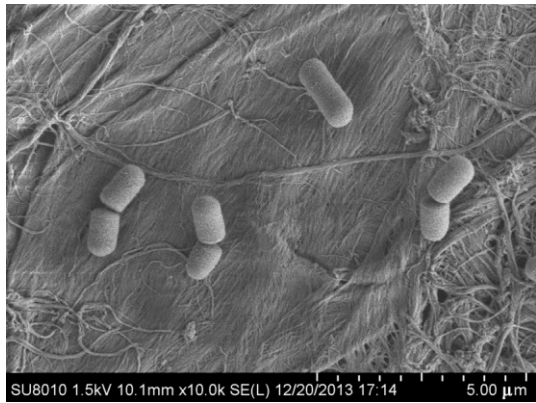


图3 菌株 CICC 10774 扫描电镜照片
Figure 3 Scanning electron microscope of strain CICC 10774

后 OD_{600} 达到 2.0, pH 6.0 条件下培养 7 d 后 OD_{600} 达到 1.5。然而当 pH 升高到 7.0 或者降到 4.0, 培养 7 d 后几乎没有生长(图 4B)。这也解释了 6°醋没有出现变质, 而 3°醋经常出现变质的原因。6°醋酸度较高不适合耐酸乳杆菌 CICC 10774 的生长, 而 3°醋的酸度较低, 该杆菌可生长繁殖。最初从醋中分离耐酸乳杆菌时采用的是 MRS 培养基(pH 6.8), 该菌生长缓慢, 通常需要 5–7 d, 容易被忽略。根据耐酸乳杆菌生长的 pH 曲线, 我们采用 pH 5.0 的 MRS 培养基进行耐酸乳杆菌的检测, 2–3 d 就能在固体平板上观察到菌落, 缩短了培养周期, 有利于在工厂里快速检测是否有污染菌, 也为下一步污染

表 1 菌株 CICC 10774 碳源利用特征 Table 1 Carbon source utilization characteristics of strain CICC 10774							
碳源 Carbon source	生长 Growth	碳源 Carbon source	生长 Growth	碳源 Carbon source	生长 Growth	碳源 Carbon source	生长 Growth
甘油 Glycerol	–	赤藓糖醇 Erythritol	–	D-阿拉伯糖 D-Arabinose	–	L-阿拉伯糖 L-Arabinose	–
D-核糖 D-Ribose	–	D-木糖 D-Xylose	–	L-木糖 L-Xylose	–	阿东醇 Adonitol	–
β-甲基-D-木糖苷 β-Methyl-D-xyloside	–	D-半乳糖 D-Galactose	–	D-葡萄糖 D-Glucose	+	D-果糖 D-Fructose	+
D-甘露糖 D-Mannose	+	L-山梨糖 L-Sorbose	–	L-鼠李糖 L-Rhamnose	–	卫矛醇 Dulcitol	–
α-甲基-D-甘露糖苷 α-Methyl-D-mannoside	–	D-甘露醇 D-Mannitol	–	D-山梨醇 D-Sorbitol	–	肌醇 Inositol	–
α-甲基-D-葡萄糖苷 α-Methyl-D-glucoside	–	N-乙酰葡萄糖胺 N-Acetylglucosamine	+	苦杏仁苷 Amygdalin	–	熊果苷 Arbutin	+
七叶灵 Esculin ferric citrate	+	水杨苷 Salicin	+	D-纤维二糖 D-Cellobiose	+	D-麦芽糖 D-Maltose	–
D-乳糖 D-Lactose	–	D-蜜二糖 D-Melibiose	–	蔗糖 Sucrose	+ ^w	D-海藻糖 D-Trehalose	+
菊糖 Inulin	–	D-松三糖 D-Melezitose	–	D-棉籽糖 D-Raffinose	–	淀粉 Starch	–
糖原 Glycogen	+ ^w	木糖醇 Xylitol	–	D-土伦糖 D-Turanose	–	D-龙胆二糖 D-Gentiobiose	+
D-来苏糖 D-Lyxose	–	D-塔格糖 D-Tagatose	–	D-岩藻糖 D-Fucose	–	L-岩藻糖 L-Fucose	–
D-阿拉伯醇 D-Arabinitol	–	L-阿拉伯醇 L-Arabinitol	–	葡萄糖酸钾 Potassium Gluconate	–	2-酮基-葡萄糖酸盐 Potassium 2-ketogluconate	–
5-酮基-葡萄糖酸盐 Potassium 5-ketogluconate	–						

Note: +: Positive; +^w: Weak; –: Negative.

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

表 2 菌株 CICC 10774 生理生化试验特征
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain CICC 10774

理化特征 Characteristics	结果 Results
MR 试验 MR test	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-
尿素利用 Urea hydrolysis	-
VP 试验 VP test	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	+
H ₂ S 产生 H ₂ S production	-
柠檬酸利用 Citrate utilization	-

Note: +: Positive; -: Negative.

菌的溯源奠定了基础。

耐热试验结果(图 5)表明, 93 °C 处理 15 s 后菌株的存活率为 8.02%, 处理 30 s 后菌株的存活率为 0.67%, 处理 45 s 后菌株的存活率下降到 0.01%。处理 60 s 以上样品中几乎就没有活菌存在。目前食醋生产企业使用的灭菌方式 93 °C 处理 30 s, 当生产过程中食醋中耐酸乳杆菌浓度达到 10⁷ CFU/mL 时,

成品醋中就会残留耐酸乳杆菌约为 7×10⁵ CFU/mL, 一旦遇到适合生长的外界环境, 非常容易大量繁殖, 引起食醋的腐败。另外, 灭菌时间越长, 食醋的风味越差, 营养价值也越低。因此, 要保持食醋风味不变的前提下增加灭菌时间, 本研究的结果建议将高温灭菌时间延长到 45 s。

将耐酸乳杆菌接种到正常醋样中进行回接试验。结果表明, 耐酸乳杆菌的接入会引起正常醋样出现产气、淡腐、臭味、颜色变浅、可溶性固形物减少以及 pH 值升高等变质现象(表 3)。同时, 将接种后的正常醋样立即进行 93 °C 处理 45 s 后进行菌落计数, 几乎没有发现耐酸乳杆菌的存在, 样品也未出现变质的现象。

使用 HPLC 方法, 对不同培养条件下(pH 4.0、5.0 和 6.0)的菌株 CICC 10774 的代谢产物进行了分析, 结果如表 4 所示, 37 °C 厌氧培养 3 d 后, 菌株 CICC 10774 的主要代谢产物为乳酸和乙酸, 并且含量随 pH 的升高而增加。代谢产物分析发现耐酸乳杆菌能够代谢产生醋酸, 并且适应高酸环境, 在醋酸发酵生产过程中发挥着关键的作用, 我们在食醋生产的醋醅中也发现了耐酸乳杆菌的存在。然而, 灌装前如果高温灭菌不彻底, 耐酸乳杆菌就会出现成品醋中, 因其能够以多种碳源为底物生长, 并且代谢产生乳酸, 就会使正常醋样出现产气、酸败、

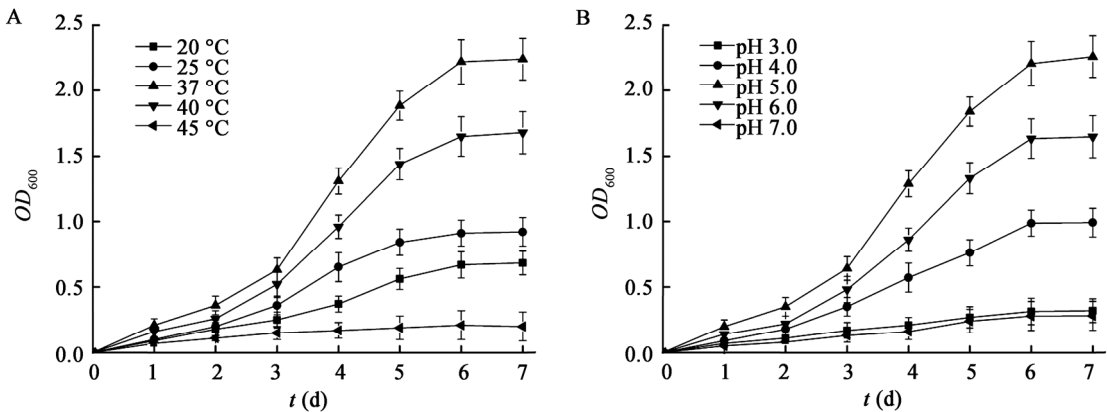


图 4 菌株 CICC 10774 的生长特性实验

Figure 4 Growth properties experiments of strain CICC 10774

Note: A: Growth temperature; B: Growth pH.

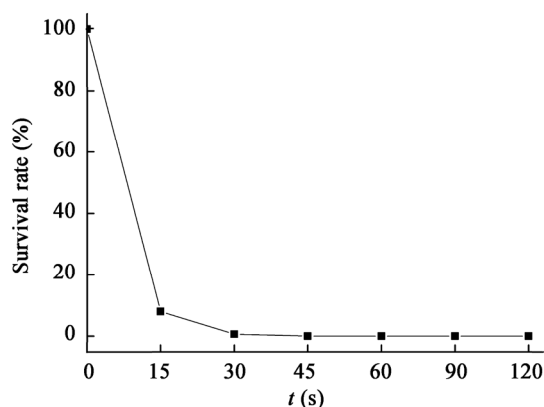


图5 菌株 CICC 10774 热稳定性试验

Figure 5 Thermostability experiments of strain CICC 10774

表3 不同醋样特征比较 Table 3 Characteristics comparisons of different vinegar samples			
特征 Characteristics	正常醋样 Normal vinegar	污染醋样 Polluted vinegar	回接醋样 Inoculated vinegar
颜色 Color	深棕色	棕红色	棕红色
气味 Odor	无异常	腐臭味	腐臭味
可溶性固形物 Soluble solid	较多	较少	较少
pH	3.09	3.19	3.22

表4 菌株 CICC 10774 代谢产物分析 Table 4 Metabolic products analysis of strain CICC 10774		
pH	乳酸 Lactic acid (g/L)	醋酸 Acetic acid (g/L)
4.0	0.533	3.452
5.0	0.710	5.818
6.0	1.100	6.412

淡腐、臭味颜色变浅、可溶性固形物减少以及 pH 值升高等变质现象,降低食醋的营养价值。

3 讨论

食醋酿造是一个微生物菌种混合发酵的复杂过程,存在着复杂的微生物群落。一方面微生物能够提供丰富的酶类和风味物质,使传统食醋具有丰

富的营养成分和独特的风味;另一方面,食醋中微生物的污染也会引起异味、变色、固形物减少等现象,大大降低了食醋的营养价值,必需加以控制。

近年来的研究主要集中在食醋发酵过程中功能微生物的分离鉴定和微生物群落结构分析,几乎没有关于食醋污染微生物的研究报道。本研究通过多相鉴定,发现引起食醋变质的污染菌为耐酸乳杆菌,并对其生理生化特征和生长代谢特性进行了分析,初步阐明了其污染食醋的原因。耐酸乳杆菌 CICC 10774 的最适生长温度与夏季常出现食醋变质的温度一致,生长的最适 pH 也与常出现变质的 3°成品醋一致。生理生化特征和代谢产物分析发现,耐酸乳杆菌能够利用多种碳源,容易分解食醋中的营养成分,同时产生的乳酸也是引起食醋酸败的原因之一。热稳定性试验结果表明,目前生产中使用的高温灭菌方式有待改进。食醋生产企业应该从生长温度、pH 等方面对生产环境进行控制,同时在不影响风味的前提下,适当增加巴氏灭菌的时间,彻底杀灭成品醋中的污染菌。本研究是有关食醋生产过程中污染菌的首次报道,为食醋生产过程中微生物控制和污染菌防治奠定了基础。

参考文献

- [1] 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(1/2): 79-87
- [2] Xu W, Zhang XJ, Xu HY, et al. Analysis of bacterial communities in aerobic solid-fermentation culture of Zhenjiang hengshui vinegar[J]. Microbiology China, 2007, 34(4): 646-649 (in Chinese)
许伟, 张晓君, 许泓瑜, 等. 镇江香醋醋酸发酵过程中细菌群落组成分析[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 646-649
- [3] Nie ZQ, Wang YN, Zheng Y, et al. The diversity and functional feature of microflora in traditional vinegar brewing process[J]. China Brewing, 2012, 31(7): 1-6 (in Chinese)
聂志强, 汪越男, 郑宇, 等. 传统食醋酿造过程中微生物群落的多样性及功能研究进展[J]. 中国酿造, 2012, 31(7): 1-6
- [4] Su JD. Microbial dynamic changes in vinegar grains during traditional vinegar brewing process[J]. Gansu Science and Technology, 2011, 27(18): 70-71 (in Chinese)
苏敬东. 传统酿醋过程中醋醅微生物时空动态变化规律研究[J]. 甘肃科技, 2011, 27(18): 70-71
- [5] Zhai L, Su JJ, Liu Y, et al. Isolation and identification of contaminant microorganisms from vinegar[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(3): 198-202 (in Chinese)

- 翟磊, 苏姣姣, 刘洋, 等. 食醋中污染菌的分离与鉴定[J]. 生物技术通报, 2016, 32(3): 198-202
- [6] Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 55(3): 541-555
- [7] Chun J, Lee JH, Jung Y, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(10): 2259-2261
- [8] Thompson JD, Higgins DG, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(22): 4673-4680
- [9] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599
- [10] Dong XZ, Cai MY. Ommon Bacteria Manual System Identification[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
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
- [11] Whiteman WB. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 3[M]. 2nd Edition. New York: Springer, 2010
- [12] Ozgun D, Vural HC. Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system[J]. Journal of Medical Genetics and Genomics, 2011, 3(3): 46-49

~~~~~  
(上接 p.1498)

## 征 稿 简 则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>