

变性梯度凝胶电泳技术在食品微生物多样性研究中的应用前景

杨向莹^{1,5*}, 许美玲², 张锡全^{1,5}, 张捷^{1,5*}, 张岩³, 张帆⁴, 王静⁶, 王小晋⁷,
陈伟², 董丽君², 杨娟², 陈广全^{1,5}

(1. 北京出入境检验检疫局, 北京 100026; 2. 临沂出入境检验检疫局, 临沂 276034; 3. 河北省食品检验研究院, 石家庄 050091; 4. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100123; 5. 出入境食品安全检测北京市重点实验室, 北京 100026; 6. 威海出入境检验检疫局, 威海 264205; 7. 淮安出入境检验检疫局, 淮安 223001)

摘要: 变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)可以克服传统微生物检测方法的弊端, 不依赖于微生物的分离培养, 是微生物分子多样性研究的热点技术之一。DGGE技术具有可靠性强、重复性好、易操作、可同时分析多个样品等优点, 结合聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR), 被广泛地应用在微生物群落组成及其遗传信息、多样性及不同种群动态比较分析等方面。本文介绍了DGGE技术的基本原理、操作过程、优缺点, 并概述了其在食品微生物多样性分析中的应用, 分析了该技术在水产品、酒类、发酵食品、肉制品等领域应用现状。通过分析目前在食品微生物多样性分析中的优点和不足, 提出发展方向, 最后对DGGE技术在食源性致病菌溯源应用前景进行评述, 以期为我国食品安全食源性致病菌快速溯源技术的发展提供文献支持。

关键词: 变性梯度凝胶电泳; 食品微生物多样性; 溯源; 食源性致病菌

Application prospect of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique in the diversity of food microbiology

YANG Xiang-Ying^{1,5*}, XU Mei-Ling², ZHANG Xi-Quan^{1,5}, ZHANG Jie^{1,5*}, ZHANG Yang³, ZHANG Fan⁴,
WANG Jing⁶, WANG Xiao-Jin⁷, CHEN Wei², DONG Li-Jun², YANG Juan², CHEN Guang-Quan^{1,5}

(1. Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China; 2. Linyi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Linyi 100026, China; 3. Hebei Provincial Institute for Food and Drug Control, Shijiazhuang 050091, China; 4. Chinese Academy of Inspection & Quarantine, Beijing 100123, China; 5. Beijing Entry-Exit Food Safety Testing Laboratory, Beijing 100026, China; 6. Weihai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Weihai 264205, China; 7. Huai'an Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Huai'an 223001, China)

ABSTRACT: It is difficult to cultivate all microbiology by using traditional methods. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) can avoid the disadvantages of traditional methods, and has many advantages, such as

基金项目: 国家质检总局科技项目(2014IK127)、国家质检总局公益性行业科研专项(201410049)

Fund: Supported by General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine Program (2014IK127), General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine Special Public Welfare Industry Scientific Research Funds (201410049)

*通讯作者: 杨向莹, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全分析和检测。E-mail: 2616yang@163.com

张捷, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检测及食品安全检测评估。E-mail: zhangjie@bjciq.gov.cn

*Corresponding author: YANG Xiang-Ying, Senior Engineer, Beijing Enter-Exit Inspection and Quarantine Bureau, NO.6 Tianshuiyuan Street, Chaoyang District, Beijing 10026, China. E-mail: 2616yang@163.com

ZHANG Jie, Senior Engineer, Beijing Enter-Exit Inspection and Quarantine Bureau, NO.6 Tianshuiyuan Street, Chaoyang District, Beijing 10026, China. E-mail: zhangjie@bjciq.gov.cn

a high reliability, repeatability, and convenience. As one of the most important technique in microbial community structure analysis, DGGE has been widely used in different fields of molecular ecology researches. The basic principle, advantages and disadvantages of DGGE and its application in the diversity of food microbiology were mainly summarized in this paper. The development direction of PCR-DGGE technique in food tracing technologies was given after the advantages and disadvantages were analyzed, and the application prospect in tracing technologies was reviewed for food origin pathogenic bacteria, which could promote the rapid tracing technologies for original pathogenic of food safety in our country.

KEY WORDS: denaturing gradient gel electrophoresis; diversity of food microbiology; tracing; food origin pathogenic

1 引言

微生物多样性是指生命体在遗传、种类和生态系统层次上的变化。与其他生物类群相比,其多样性有很多独特之处。如生长繁殖速度多样、营养代谢类型多样、生活方式多样、基因组大小和数目多样、DNA序列结构多样、遗传背景多样、遗传物质化学组成多样等^[1]。

变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)技术是研究微生物群落组成及亲缘关系的主要分子生物学检测技术之一,是研究微生物群落组成分析的重要技术^[2,3], DGGE技术不依赖于培养过程,缩短了样品分析时间,能显示环境样品中不可培养微生物的遗传信息,在土壤、海洋群落等领域得到广泛的应用^[4-8]。虽然DGGE技术已被广泛地应用于微生物分子生态研究的各个领域,但是DGGE技术可以应用的潜在领域还有很多,随着研究的不断深入,大量的应用领域将被逐步开发出来。在食品微生物多样性研究也逐渐在采用这种研究方法^[9]。

2 DGGE技术

1979年, Fischer和Leman首次提出了应用于检测DNA点突变的新技术,即DGGE技术^[10]。这项技术主要利用具有化学变性剂梯度的聚丙烯酰胺凝胶电泳对DNA进行电泳,其主要是由于聚丙烯酰胺凝胶具有将PCR扩增产物区分。DGGE技术的分辨率高于琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳,检测的基因序列可以达到一个碱基的差异。Muyzer等^[11,12]首次将该技术应用于分子微生物学研究领域,在后续的应用中逐渐证实了DGGE技术在揭示自然界微生物区系的遗传多样性和种群差异方面的优越性。

2.1 DGGE技术原理

PCR对DNA片段的16S rRNA或18S rRNA中具有保守性、可变性和分子量适中的基因序列进行扩增,得到的扩增产物DNA片段长度相同而序列不同。由于不同DNA片段的解链和梯度变性胶的特性不同,因此可以分

离DNA片段。在含有线性递增的变性剂(尿素和甲酰胺组成)的聚丙烯酰胺凝胶中电泳时,双链DNA分子解链的速度和程度与其碱基序列的区域由解链温度较低的碱基组成。由于DNA序列中G、C、A、T4种碱基组成和排列的差异,使得双链DNA分子具有不同的解链温度(T_m),低 T_m 值DNA分子在低浓度变性剂作用下解链,高 T_m 值DNA分子在高浓度变性剂作用下变性。相同碱基对的双链DNA分子如果碱基对组成不同,所需要的变性剂浓度不同。当某一个双链DNA分子泳动到DNA变性所需的浓度时,开始解链,解链程度越大,所遇到的迁移阻力越大,DNA分子的电泳迁移率降低,产生的迁移阻力与电场力相平衡时,该DNA分子即可停留在这一变性剂浓度梯度的凝胶中,故不同片段的DNA分子可以形成相互分开的条带图谱^[13,14]。

2.2 操作过程

对扩增特定的DNA区域产物进行梯度凝胶电泳,利用DGGE技术研究微生物群落结构,达到反映微生物群落的结构组成的目的,其操作一般是结合PCR技术进行。进行PCR时,选择的真菌和细菌片段是不同的,真菌DNA片段选择28S rDNA^[15]或26S rDNA进行扩增^[16],而细菌DNA片段选择16S rDNA片段进行扩增^[17]。16S rDNA是16S rRNA的基因,由保守区和可变区组成,保守区序列基本恒定,不同的细菌可变区序列不同,通过对不同细菌的可变区进行扩增,即可得到大小相同、序列不同的DNA扩增产物。HAN等^[18]研究证明,通过RNA反转录得到DNA,结合PCR-DGGE技术可以很好的反应食品中微生物活菌的菌群状态。

采用PCR-DGGE技术对食品微生物多样性检测主要包括下列步骤:1)样品采集,对样品中DNA/RNA进行富集提取、纯化;2)对所提取的DNA/RNA进行PCR扩增;3)设置实验条件,优化DGGE参数;4)按照标准程序制备DGGE凝胶,点样,进行DGGE电泳;5)对结果进行图谱分析,根据分析结果,进行条带序列分析^[19]。

2.3 特点

传统微生物检测方法以微生物生长为前提,步骤繁

琐、时间长、工作量大、检出率及灵敏度不高,且容易出现假阴性。许多研究已经证实,通过传统分离方法鉴定的微生物仅占环境微生物总数的0.1%~10%^[20]。用传统的方法培养和鉴定不能代表样品中微生物的真实情况。与传统的富集培养、选择性分离、菌落计数等方法相比较,DGGE技术可以鉴定出无法利用传统方法分离出来的菌株,更可以快捷地分析大量样本,评估群落里特异的分类群^[21],快速、准确地鉴定出微生物个体,并对微生物种群动态性、重要基因定位、表达和调控的评价进行分析^[22]。

PCR-DGGE方法基于选择对大多数细菌16S rRNA基因都能有效扩增的引物对样本中提取微生物基因组DNA进行特异性PCR扩增,对扩增产物运用DGGE技术进行分离和鉴定,从而得到食品微生物多样性的信息。PCR-DGGE方法不需要培养,检测极限低,检测速度快、经济、结果准确可靠,可同时检测多种微生物,可与其他方法结合,是研究细菌群落结构最常用的分子生物学方法之一。

目前,尽管DGGE技术已经被广泛应用于各种生态系统的微生物群落分析^[23,24],但是仍然没有统一的DGGE凝胶的分析方法和DGGE凝胶有效条带选取的统一标准^[2,25-27]。DGGE凝胶的分析方法主要采用凝胶条带的0/1矩阵、峰值矩阵及亮度矩阵等方式对凝胶图谱进行分析。DGGE凝胶分析时有效条带的确定方法可能对实验结果,尤其是对微生物群落的 α -多样性分析造成影响。

同其他的分子生物学方法一样,PCR-DGGE也有不足,需要进一步的完善。首先,DGGE方法不能对样品中所有的DNA片段进行分析^[28],对微生物群落中数量上小于1%的优势种群的分析缺少准确性^[28]。其次,DGGE方法仅能分离较小的片段,这限制了系统发育分析比较和探针设计序列的信息量^[29],再次,对DGGE实验条件选择要求较高,若选择不当,则不同序列的DNA片段可能发生共迁移现象,同一条DGGE条带可能包含不同种类的DNA片段,从而导致低估样品中微生物多样性^[30]。

3 PCR-DGGE技术研究食品微生物多样性研究中的应用

DGGE技术作为一种能够监测样品中微生物群落多样性的手段,被世界各地的微生物实验室广泛应用,目前是食品微生物多样性研究的重要方法之一。聚类分析(UPGMA)类群的划分显示出不同来源样品中微生物组成之间的相似性和亲缘关系。样品电泳图谱的条带数目的多少可以反映不同样品之间的群落相似性,通过计算群落相似性系数可以得到微生物群落之间差异的信息^[19]。采用PCR-DGGE技术能揭示微生物群落结构的真实状态,为食品溯源提供依据。目前,在水产品、酒类、发酵食品、肉制品等领域得到广泛应用。

倪加加等^[27]评估并建立了一种重复性高、样本间相似

性最稳定的DGGE凝胶分析方法。通过研究草鱼消化道细菌群落PCR-DGGE分析图谱,分析时去掉泳道背景的影响,比较DGGE凝胶的条带0/1矩阵、峰值矩阵和亮度矩阵在有效条带阈值分别设定为不同值时分析结果的差距,确定了不同DGGE谱带信息提取方法对分析结果的影响。

王世宽^[31]等对浓香型大曲微生物群落PCR-DGGE分析条件进行了优化,研究结果表明,细菌DGGE电泳最佳变性剂浓度梯度为35%~55%;真菌DGGE电泳最佳变性剂浓度为30%~50%,真菌DGGE电泳最佳变性剂浓度梯度为30%~50%。对优化后的PCR-DGGE技术对不同时期曲药微生物群落进行了研究,并获得了丰富的微生物多样性信息。

张先琴^[32]等以四川家庭制作泡菜为研究对象,PCR-DGGE指纹图谱技术分析样品中微生物群落结构,对典型条带进行系列分析,并构建系统发育进化树,并对细菌种类和真菌种类分别进行了研究和比较。

DGGE技术在发酵肉制品中得到广泛应用。Fontana等^[33,34]对不同发酵香肠的研究得出相同的结果。通过对不同天数的发酵香肠中提取的细菌16S rRNA基因的V3区域进行PCR-DGGE研究,发现在0d及发酵的5d和14d,均包括植物乳杆菌、弯曲乳杆菌,在0d时,微生物种类还包括乳酸片球菌、清酒乳杆菌,在5d和14d,优势菌群多了腐生葡萄球菌(*Staphylococci saprophyticus*)种类。谢科等^[35]采用传统培养方法结合聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)指纹技术对广式腊肠中微生物种群结构进行研究,分析广式腊肠发酵过程中的优势微生物群落。在传统分离培养中得到纯菌株,DGGE指纹图谱显示光是拉长混合菌群中3条条带无对应的纯菌株而纯菌株中有1株在混合菌群的图谱上没有相应的条带。传统分离法与PCR-DGGE技术结合能够更有效、更全面地分析广式腊肠中微生物群落结构及优势菌。

采用PCR-DGGE还可用于食品不同状态的菌相研究。翁丽华^[36]等应用传统微生物培养和PCR-DGGE方法研究热鲜肉分别在5、15、25、30℃贮藏过程中的菌相变化。将热鲜肉贮藏于一定温度,每隔适当时间取出,测定菌落总数,并提取细菌DNA,进行PCR-DGGE分析。细菌计数结果表明,热鲜肉贮藏于不同温度时,菌落总数的最小腐败量7.2(1g(cfu/g))分别在约14d、75h、19h和16h出现。PCR-DGGE结果表明,热鲜肉在不同温度下贮藏时,贮藏末期优势腐败菌并不一致。在贮藏过程中主要优势腐败菌有巨大球菌属、克雷伯氏菌属、假单胞菌属、柠檬酸细菌属、不动杆菌属和埃希氏菌属。

4 PCR-DGGE在我国食品微生物溯源中的应用前景

传统微生物检测方法主要是依赖于富集培养、选择性

分离、菌落计数和生化鉴定等方法, 检测步骤繁琐、时间长、工作量大、检出率及灵敏度不高, 且容易出现假阴性。PCR-DGGE 方法是从食品样品中提取微生物基因组 DNA 后, 选择对样本中都能有效扩增的引物进行特异性 PCR 扩增, 对扩增产物运用 DGGE 技术进行微生物群落结构分析, 从而得到食品微生物多样性的信息。

与传统方法相比较, DGGE 技术最大的优势在于鉴别不可培养的细菌, 在基因水平上具有简单、快速及准确性和重复性好的优点, 为自然界中多种微生态系统菌群多样性和动态分析提供了重要理论依据^[37,38]。研究表明, PCR-DGGE 方法在揭示自然界微生物区系的遗传多样性和菌群差异方面具有独特的优越性^[39]。

尽管 PCR-DGGE 技术在微生物群落结构分析中得到了广泛的应用, 并且在食品中微生物的多样性和群落演替性研究中应用较多。然而, 很多因素都会影响实验结果。PCR-DGGE 实验结果与样品来源, 方法的选择性和局限性、方法的灵敏度有很大的关系, 这都可能导致检测到的微生物种类不同。通过研究发现, 影响实验结果的因素包括样品处理方法、提取 DNA 方法、所提取 DNA 纯度、PCR 条件等。样品中菌体浓度低于 $10^3 \sim 10^4$ cfu/g 或占整个群落细菌数量不足 1%, DGGE 技术很难检测出来^[17,39,40]。

随着 PCR-DGGE 技术的应用, 在灵敏度及与其他方法, 尤其是传统培养方法相比较, 很多学者做了研究。孟赫诚等^[41]随机选取某肉菜市场的 8 份鸡肉和鸭肉样品, 增菌分离后, 对其中的弯曲菌(*Campylobacter*)分别采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)和 DGGE 对分离出的菌株进行分子水平的分型和溯源, 结果表明, 与 PFGE 相比, DGGE 分型的方法灵敏度略低, 但是更快速、成本更低, 且稳定、准确, 可用于食品中弯曲菌的快速分型。与其他分型方法相比较, PCR-DGGE 可以不依赖培养而直接检测和鉴定食品中微生物, 可以进行食源性致病菌快速检测和分型^[42]。

不同食品在加工过程中的微生物种群多种多样, 因此在研究中, 对于 DGGE 电泳中出现的不同条带进行克隆测序, 结合现代分子生物学技术研究方法, 利用统计学原理, 如何建立完整的食品安全微生物溯源动力学模式, 通过控制微生物的种类与数量, 为食品微生物安全溯源机制研究奠定基础, 并且通过分析食品中微生物种类以判断其地理来源, 从而达到控制食品质量、防止食品假冒的目的, 这些是 PCR-DGGE 技术发展的必然趋势。

参考文献

- [1] 宋年铎, 王伟, 王利明, 等. 生物多样性研究进展及展望[J]. 内蒙古林业调查设计, 2013, 36(2): 138-140.
Song NY, Wang W, Wang LM, et al. Progress and Prospects in Biodiversity [J]. Inner Mongolia Forest Invest Design, 2013, 36(2): 138-140.
- [2] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73(1): 127-141.
- [3] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems [J]. Curr Opin Microbiol, 1999, (2): 317-322.
- [4] 李丹, 王秋玉. 变性梯度凝胶电泳及其在土壤微生物生态学中的应用[J]. 中国农学通讯, 2011, 27(3): 6-9.
Li D, Wang QY. Denaturing gradient gel electrophoresis and its application in soil microbial ecology [J]. Chin Agric Sci Bull, 2011, 27(03): 6-9.
- [5] Chong CW, Annie Tan GY, Wong Richard CS, et al. DGGE fingerprinting of bacteria in soils from either ecologically different sites around Casey Station, Antarctica [J]. Polar Biol, 2009, 32: 853-860.
- [6] Grishkan I, ZE, Nevo E. Soil crust microfungi along a southward rainfall gradient in desert ecosystems [J]. Eur J Soil, 2006, 43: 33-42.
- [7] 李强, 赵越, 李玉华, 等. DGGE 分析微型真核浮游生物遗传多样性及其环境因子的相关性[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(8): 70-75.
Li Q, Zhao Y, Li YH, et al. DGGE analysis of picoeukaryotes genetic diversity and relationship with environmental factors [J]. J Northeast Agric Univ, 2013, 44(8): 70-75.
- [8] Diez B, Pedrós-AC, Marsh TL, et al. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(7): 2942-2951.
- [9] 江芸, 高峰, 徐幸莲, 等. 真空包装冷却猪肉冷藏过程中菌相变化[J]. 食品科学, 2011, 32(4): 241-245.
Jiang Y, Gao F, Xu XL, et al. Microfloral change of vacuum-packaged pork during chilled storage [J]. Food Sci, 2011, 32(4): 241-245.
- [10] Fischer SG, Lerman LS. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis [J]. Cell, 1979, 16: 191-200.
- [11] Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of 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(3): 695-700.
- [12] 唐玉林. DGGE 技术在环境微生物多样性研究中的应用[J]. 中国科技信息, 2013, 23: 199-200.
Tang YL. Application of DGGE technology in environmental microbiology diversity [J]. Chin Sci Technol Infor. 2013, 23: 199-200.
- [13] 鲍新宇, 杨剑, 高新艳, 等. DGGE 技术的原理及其在动物肠道微生态系统研究中的应用[J]. 畜牧与饲料科学, 2011, 32(11): 25-26.
Bao XY, Yang J, Gao XY, et al. Principle of DGGE and its application in animal gastrointestinal microbiota system [J]. Anim Husbandry Feed Sci, 2011, 32(11): 25-26.
- [14] 罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯, 等. 在 PCR-DGGE 研究土壤微生物多样性中应用 GC 发卡结构的效应[J]. 生态学报, 2003, 23(10): 2170-2175.
Luo HF, Qi HY, Xue K, et al. Influence of application of GC-clamp on study of soil microbial diversity by PCR-DGGE [J]. Acta Ecol Sinica, 2003, 23(10): 2170-2175.

- [15] Silvestri G, Santarelli S, Aquil A, *et al.* Investigation of the microbial ecology of Ciauscolo, a traditional Italian salami, by culture-dependent techniques and PCR-DGGE [J]. *Meat Sci*, 2007, 77(3): 413–423.
- [16] Yoshikawa S, Yasokawa D, Nageshima K, *et al.* Microbiota during fermentation of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) sauce mash inoculated with halotolerant microbial starters: analyses using the plate count method and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) [J]. *Food Microbiol*, 2010, 27(4): 509–514.
- [17] Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food [J]. *J Microbiol Methods*, 2004, 56(3): 297–314.
- [18] Han YQ, Xu XL, Jiang Y, *et al.* Inactivation of food spoilage bacteria by high pressure processing: evaluation with conventional media and PCR-DGGE analysis [J]. *Food Res Int*, 2010, 43(6): 1719–1724.
- [19] 岑璐伽, 唐善虎, 郝小倩, 等. DGGE 技术及其在食品微生物研究中的应用[J]. *粮食与油脂*, 2012, 1: 9–12.
- Cen LJ, Tang SH, Hao XQ, *et al.* DGGE technique and its applications in research on food microbiology [J]. *Cereals Oils*, 2012, 1: 9–12.
- [20] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phlogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiol. Rev*, 1995, 59(1): 143–169.
- [21] Ficher SG, Lerman LS. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Cell*, 1979, 16: 191–200.
- [22] 宫曼丽, 任南琪, 邢德峰. DGGE/TGGE 技术及其在微生物分子生态学中的应用[J]. *微生物学报*, 2004, 44(6): 845–848.
- Gong ML, Ren NQ, Xing DF. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis in microbial molecular ecology [J]. *Acta Microbiol Sinica*, 2004, 44(6): 845–848.
- [23] Bell T, Ager D, Song J I, *et al.* Larger islands house more bacteria taxa [J]. *Science*, 2005, 308(5730): 1884.
- [24] 王世宽, 侯华, 袁城金, 等. PCR-DGGE 用于浓香型大曲微生物群落分析的条件优化[J]. *四川理工学院学报(自然科学版)*, 2012, 25(3): 5–8.
- Wang SK, Hou H, Yuan CJ, *et al.* Optimization of denaturing gradient gel electrophoresis for microbial communities in luzhou-flavor Daqu [J]. *J Sichuan University Sci Eng (Nat Sci Addit)*, 2012, 25(3): 5–8.
- [25] Plulsen PHB, Moller J, Magid J. Determination of a relationship between chitinase activity and microbial diversity in chitin amended compost [J]. *Bioresource Technol*, 2008, 99(10): 4355–4359.
- [26] Yang CH, Crowley DE, Menge JA. 16S rRNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and phytophthora infected avocado roots [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, 35(2): 129–136.
- [27] 倪加加, 余育和, 吴含含, 等. 不同 DGGE 谱带信息提取方法对分析结果的影响[J]. *水生生物学报*, 2012, 36(5): 1009–1011.
- Ni JJ, Yu YH, Wu HH, *et al.* Effects generated by different band extracting methods in the analysis of DGGE profile [J]. *Acta Hydrobiol Sinica*, 2012, 36(5): 1009–1011.
- [28] Vallaes T, Topp E, Muyzer G, *et al.* Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs [J]. *FEMS Microbiol. Ecol*, 1997, 24: 279–285.
- [29] Muyzer G, Waal EC, Uitterliinden AG. Profiling of 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.
- [30] Sekiguchi H, Tomioka N, Nakahara T, *et al.* A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Biotechnol Letters*, 2003, 23(15): 1205–1208.
- [31] 陈芬, 林瑞庆, 朱兴全, 等. 病原体溯源技术研究进展及在寄生虫上的应用[J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(2): 88–92.
- Chen F, Lin RQ, Zhu XQ, *et al.* Research advances in tracing techniques for pathogens and their application in parasites [J]. *Chin Anim Husbandry Vet*, 2011, 38(2): 88–92.
- [32] 张先琴, 张小平, 敖晓琳, 等. PCR-DGGE 分析四川地区家庭制作泡菜中微生物多样性[J]. *食品科学*, 2013, 34(12): 129–134.
- Zhang XQ, Zhang XP, Ao XL, *et al.* PCR-DGGE analysis of microbial diversity of homemade pickles in sichuan region [J]. *Food Sci*, 2013, 34(12): 129–134.
- [33] Fontana C, Vignolo G, Cocconcelli PS. PCR-DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages [J]. *J Microbiol Meth*, 2005, (63): 254–263.
- [34] Fontana C, Sandro Cocconcelli P, *et al.* Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages [J]. *Int J Food Microbiol*, 2005, 103(2): 131–142.
- [35] 谢科, 余晓峰, 郑海松, 等. 传统分离培养结合 PCR-DGGE 技术分析广式腊肠中优势菌[J]. *食品科学*, 2013, 34(4): 157–160.
- Xie K, Yu XF, Zheng HS, *et al.* Analysis of dominant microbial species in cantonese sausage by independent culture and PCR-DGGE technology [J]. *Food Sci*, 2013, 34(4): 157–160.
- [36] 翁丽华, 江芸, 徐幸莲, 等. PCR-DGGE 研究热鲜肉贮藏过程中的菌相变化[J]. *食品科学*, 2012, 33(23): 199–203.
- Weng LH, Jiang Y, Xu XL, *et al.* Changes in microflora of hot-boned pork during storage as analyzed by PCR-DGGE [J]. *Food Sci*, 2012, 33(23): 199–203.
- [37] 刘鹏飞, 赵丹, 宋刚, 等. 变性梯度凝胶电泳技术在微生物多样性研究中的应用[J]. *微生物学杂志*, 2013, 33(6): 88–92.
- Liu PF, Zhao D, Song G, *et al.* Application of denatured gradient gel electrophoresis technology in microbial diversity research [J]. *J Microbiol*, 2013, 33(6): 88–92.
- [38] Coccolin L, Dolcip, Rantsiou K. Biodiversity and dynamics of meat fermentations: the contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem [J]. *Meat Sci*, 2011, 89(3): 296–302.
- [39] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of 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(3): 695–700.
- [40] 李沛军, 孔保华, 郑冬梅, 等. PCR-DGGE 技术在肉制品微生物生态学中的应用[J]. *食品科学*, 2012, 33(19): 338–343.

Li PJ, Kong BH, Zheng DM, *et al.* Application of PCR-DGGE to study microbial ecology of meat: a reviews [J]. Food Sci, 2012, 33(19): 338–343.

- [41] 孟赫诚, 毕水莲, 闫鹤, 等. 禽肉中弯曲菌的分离、PFGE 和 DGGE 分型[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2012, 40(5): 149–153.

Meng HC, Bi SL, Yan H, *et al.* Isolation of *Campylobacter* strains in poultry products and genotyping identification of strains by means of PFGE and DGGE [J]. J South China Univ Technol (Nat Sci Addit), 2012, 40(5): 149–153.

- [42] Cocolin L, Rantsiou K, Iacumin L, *et al.* Direct identification in food samples of *Listeria* spp. And *Listeria monocytogenes* by molecular methods [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 6273–6282.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



杨向莹, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全分析和检测。

E-mail: 2616yang@163.com



张捷, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检测及食品安全检测评估。

E-mail: zhangjie@bjciq.goc.cn