

• 微生物检测方法 •

海水鱼腌制过程细菌群落多样性的分析

孙瑛, 王萍亚, 黄朱梁, 彭志兰, 崔洁

舟山市食品药品检验检测研究院, 浙江 舟山 316021

摘要: 目的 揭示海水鱼腌制过程细菌群落组成及优势菌变化规律。方法 采用构建 16S rDNA 基因克隆文库的分析方法检测分析不同盐鱼比的海水鱼腌制过程中细菌群落多样性、优势菌群及其变化规律。结果 1:4 和 1:8 盐鱼比腌制海水鱼前期(5 d) 优势菌群都为嗜冷杆菌属, 优势菌种为养料嗜冷杆菌; 1:4 盐鱼比腌制海水鱼中期(10 d) 优势菌群为嗜冷杆菌属和假单胞菌属, 优势菌种为荧光假单胞菌和养料嗜冷杆菌; 1:8 盐鱼比腌制海水鱼中期(10 d) 优势菌群为嗜冷杆菌属, 优势菌种为养料嗜冷杆菌; 2 个盐鱼比腌制海水鱼中后期(15 d) 优势菌群都为嗜冷杆菌属, 优势菌种为养料嗜冷杆菌; 1:4 盐鱼比腌制海水鱼后期(20 d) 优势菌群为嗜冷杆菌属, 优势菌种为 *Psychrobacter* sp. P2-18 (2011); 1:8 盐鱼比腌制海水鱼后期(20 d) 优势菌群为嗜冷杆菌属, 优势菌种为养料嗜冷杆菌。结论 通过 16S rDNA 克隆文库分析方法可检测分析海水鱼腌制过程细菌群落多样性及变化趋势, 对腌制海水鱼的质量保持及食用安全具有重要意义。

关键词: 海水鱼腌制; 16S rDNA 基因克隆文库; 细菌群落多样性

中图分类号: R155.5

文献标识码: A

文章编号: 1004-8685(2018)14-1698-05

Microbial community diversity analysis of ocean fish in pickling process

SUN Ying, WANG Ping - ya, HUANG Zhu - liang, PENG Zhi - lan, CUI Jie

Zhoushan Institute for Food and Drug Control, Zhoushan, Zhejiang 316021, China

Abstract: Objective The composition of microbial communities and the change rule of dominant bacteria of ocean fish in the pickling process were revealed. **Methods** The method of constructing 16S rDNA gene cloning library were used to analyze the diversity of microbial communities and the change of dominant bacteria. **Results** *Psychrobacter* in the pickled system with 1:4 and 1:8 salt to fish ratio was the predominant microbial communities at the earlier phase(5 d), and *Psychrobacter cibarius* was the dominant strain. *Pseudomonas* and *Psychrobacter* in the pickled system of 1:4 salt to fish ratio were the predominant microbial communities in the middle stage(10 d), and the dominant bacterial strains were *Pseudomonas fluorescens* and *Psychrobacter cibarius*. But the predominant microbial communities in the pickled system of 1:8 salt to fish ratio was *Psychrobacter*, and *Psychrobacter cibarius* was the dominant strain. In the mid-late stage(15 d), *Psychrobacter* and *Psychrobacter cibarius* played a leading role in the pickled system of two salt to fish ratio. At the late phase of pickled processing(20 d), *Psychrobacter* in the pickled system of 1:4 and 1:8 salt to fish ratio was the predominant microbial communities. In addition, at the late phase, *Psychrobacter* sp. P2-18(2011) was the dominant strain in the pickled system of 1:4 salt to fish ratio, and *Psychrobacter cibarius* was the dominant strain in the pickled system of 1:8 salt to fish ratio. **Conclusion** Microbial diversity in the pickling process for ocean fish could be investigated by 16S rDNA clone library method. It is of great significance to the quality and safety of pickled ocean fish.

Key Words: Pickled ocean fish; 16S rDNA gene cloning library; Diversity of microbial communities

腌制海产品是一种传统的加工保藏产品,其不仅保存了海产品丰富的营养价值,且具有独特的口感和风味,深受大众的喜爱,具有非常广泛的市场需求^[1]。腌制过程是以食盐为主要辅料,在海产品表面直接撒上适量的固体食盐(干腌法)或者将海产品浸入食盐

水中(湿腌法)^[2]。海产品通过腌制能抑制腐败菌生长,从而提高食品的防腐性能,延长保质期,改善产品风味。浙江东南沿海地区食用腌制海产品非常普遍,例如咸带鱼、咸黄鱼、咸鳓鱼等产品^[3-5]。海产品腌制过程中作用的细菌菌群种类复杂多样,有害菌群的大量繁殖会危害人体健康。普通的培养法不能完全反应菌群种类的多样性,很多菌群无法用传统培养的方法生长^[6],分子生物学技术突破了传统方法无法得到微生物纯培养的限制,故广泛应用于不同样品生态

基金项目: 舟山科技计划项目(2015C31046)

作者简介: 孙瑛(1984-),女,本科,工程师,主要从事微生物与分子生物学检测。

系统中微生物多样性的调查^[7,8]。16S rDNA 序列既有保守性,又具有高变性,保守性可以反映生物物种的亲缘关系,并给分析系统发育提供了线索,而高变性能则可以表明生物物种的特征核酸序列,并且具有种、属的结构特征,因此,高变性是生物种属鉴定的分子基础^[9]。16S rDNA 序列分析目前已成为分子鉴定和系统学研究中最具权威性和准确性的检测方法之一^[10]。16S rDNA 基因克隆文库分析方法能较好应用于微生物的分类鉴定和系统发育关系^[11],据文献报道在土壤微生物系统、海洋微生物系统等环境微生物群落分析上均有应用^[12-14]。本文利用分子生物学技术,采用 16S rDNA 基因克隆文库分析方法^[15],研究海产品腌制过程中细菌群落的多样性及其变化,可为腌制海产品的食用安全性、品质控制等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 海水鱼购自中国浙江舟山市农贸市场。

1.2 仪器与试剂 My Cycler PCR 仪(美国 Bio-Rod 公司);Gel Doc XR 凝胶成像系统(美国 Bio-Rod 公司);Mini-Sub Cell® GT 电泳仪(美国 Bio-Rod 公司);Microfeller 离心机(德国 BECKMAN COULTER 公司)。Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(批号:SK8255);DreamTaq-TM DNA 聚合酶(批号:EP0-702);Dntp(批号:D0056);SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(批号:SK8131);SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒(批号:SK8191);pMD® 18-T Vector 连接试剂盒(批号:D101A);引物由中国上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 海水鱼的腌制 采用传统干腌法腌制海水鱼。将市场购买的海水鱼(带鱼和黄花鱼)洗净并去除内脏,称重并放入坛中,以一层鱼一层盐的顺序进行放置,盐鱼比分别为 1:4 和 1:8。

1.3.2 样品总 DNA 提取 采用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒,按试剂盒给定步骤,取 0 d、5 d、10 d、15 d、20 d 的腌制海水鱼制成的 1:10 样品液 5 ml 进行总 DNA 的提取。

1.3.3 PCR 扩增

1.3.3.1 扩增通用引物 16S rDNA 扩增通用引物具体为 7F(5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3')和 1540R(5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。

1.3.3.2 PCR 扩增反应体系 PCR 扩增所用反应体系:10×Buffer(含 Mg²⁺) 2.5 μl、dNTP(各 2.5 mmol/L) 1 μl、DreamTaq-TM DNA 聚合酶 0.2 μl、上游引物及下游引物(10 μmol/L) 各 0.5 μl、模板 DNA 0.5 μl,用

无菌 ddH₂O 补足 25 μl 体系。

1.3.3.3 PCR 循环条件 PCR 反应的循环条件:94℃预变性 4 min,30 个循环(94℃变性 45 s,55℃退火 45 s,72℃延伸 1 min),72℃修复延伸 10 min。

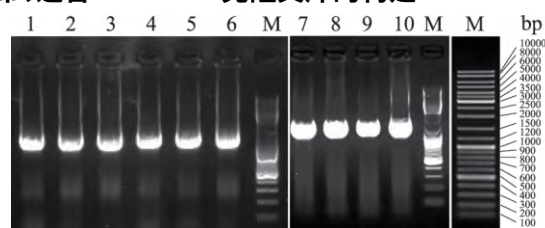
1.3.4 纯化回收 采用 1% 琼脂糖电泳,150 V、100 mA 20 min 电泳观察。PCR 产物电泳条带切割所需 DNA 目的条带,采用纯化试剂盒对目的条带进行纯化回收。

1.3.5 克隆测序 按 Takara pMD® 18-T Vector 连接试剂盒操作将纯化后的 PCR 产物与 pMD® 18-T 载体连接,并转化感受态细胞 *E. coli* JM109。将连接转化后的菌液涂布在预先用 20 μl 100 mmol/L IPTG 和 100 μl 20 mg/ml X-gal 涂布的氨苄青霉素平板上于 37℃培养过夜。按 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒操作提取质粒,用引物 M13+和 M13-进行扩增测序。5 个时期共检测 300 个阳性克隆。

1.4 统计学处理 测得序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源性比对,分析出克隆所属物种的系统位置和与之最近似的种类。

2 结果

2.1 不同盐鱼比样品总 DNA 提取和 PCR 扩增 将 1:4 和 1:8 2 个盐鱼比的样品不同腌制时期(0 d、5 d、10 d、15 d、20 d)样品稀释液提取的总 DNA 用通用引物进行扩增,PCR 扩增产物经电泳检测如图 1 所示。从检测结果发现,在约 1 500 bp 处均出现了荧光条带,适合 16S rDNA 克隆文库的构建。



注:1、2、3、4、5 分别为 1:4 盐鱼比 0 d、5 d、10 d、15 d 和 20 d 样品 DNA 的 PCR 扩增结果;6、7、8、9、10 分别为 1:8 盐鱼比 0 d、5 d、10 d、15 d 和 20 d 样品 DNA 的 PCR 扩增结果;M 为 marker。

图 1 PCR 扩增结果

2.2 16S rDNA 克隆文库构建

2.2.1 1:4 盐鱼比腌制过程细菌 16S rDNA 克隆文库构建 1:4 盐鱼比的海水鱼腌制的 5 个不同时期 150 个阳性克隆子的测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源性比对,150 个克隆子与 GenBank 数据库中已知细菌的 16S rDNA 序列相似性为 95%~100%。1:4 盐鱼比腌制海水鱼不同时期细菌群落测定结果见表 1。1:4 盐鱼比腌制海水鱼,腌制开始(0 d)主要菌属有芽胞梭菌属、假单胞菌属、沙雷菌属、金黄杆菌属、嗜冷杆菌属,优势菌属为芽胞梭菌属

和假单胞菌属,其中芽胞梭菌属占 53%,假单胞菌属占 30%,优势菌属中的优势菌种分别为腐化芽胞梭菌和莓实假单胞菌;腌制 5 d 主要菌属有嗜冷杆菌属、芽胞梭菌属,优势菌属为嗜冷杆菌属,占 77%,芽胞梭菌属占 23%,优势菌属中的优势菌种为养料嗜冷杆菌;腌制 10 d 主要菌属有假单胞菌属、嗜冷杆菌属、芽胞梭菌属,优势菌属为假单胞菌属和嗜冷杆菌属,其中假单胞菌属占 47%,嗜冷杆菌属占 37%,芽胞梭菌属占 16%,优势菌属中的优势菌种分别为荧光假单胞

菌和养料嗜冷杆菌;腌制 15 d 主要菌属有嗜冷杆菌属、芽胞梭菌属、藻青菌属,优势菌属为嗜冷杆菌属,占 67%,芽胞梭菌属占 30%,优势菌属中的优势菌种依旧为养料嗜冷杆菌;腌制 20 d 主要菌属有嗜冷杆菌属、芽胞梭菌属、藻青菌属,优势菌属为嗜冷杆菌属,占 77%,芽胞梭菌属占 20%,优势菌属中的优势菌种则发生了变化,由养料嗜冷杆菌变为 *Psychrobacter sp. P2-18* (2011)。

表 1 16S rDNA 克隆文库法对 1:4 盐鱼比腌制海水鱼样品的细菌群落组成分析结果

菌属名	最相似菌	不同腌制时期的克隆子数量(个)				
		0 d	5 d	10 d	15 d	20 d
芽胞梭菌属(<i>Clostridium</i>)	腐化芽胞梭菌(<i>Clostridium putrefaciens</i>)	12	7	3	9	6
	<i>Clostridium tagluense strain A121</i>	4		2		
嗜冷杆菌属(<i>Psychrobacter</i>)	养料嗜冷杆菌(<i>Psychrobacter cibarius</i>)	1	8	9	12	8
	近海生嗜冷杆菌(<i>Psychrobacter maritimus</i>)		6		2	1
	水栖嗜冷杆菌(<i>Psychrobacter glacincola</i>)		3			
	粪嗜冷杆菌(<i>Psychrobacter faecalis</i>)	1	1			2
	<i>Psychrobacter sp. 298B4_12ER2A</i>					1
	<i>Psychrobacter fozii strain Sped2</i>			2	2	
	<i>Psychrobacter sp. P2-18</i> (2011)		3		4	10
	<i>Psychrobacter sp. SON-1410</i>		1			
	<i>Psychrobacter fozii strain 0226</i>		1			
假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i>)	<i>Psychrobacter sp. 88B3_12ER2A</i>					1
	荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)			8		
	氮假单胞菌(<i>Pseudomonas azotoformans</i>)			5		
	莓实假单胞菌(<i>Pseudomonas fragi</i>)	7				
藻青菌属(<i>Carnobacterium</i>)	嗜冷假单胞菌(<i>Pseudomonas psychrophila</i>)	2		1		
				1	1	
沙雷氏菌属(<i>Serratia</i>)	液化沙雷菌(<i>Serratia liquefacies</i>)	2				
金黄杆菌属(<i>Chryseobacterium</i>)	金黄杆菌(<i>Chryseobacterium</i>)	1				

2.2.2 1:8 盐鱼比腌制过程细菌 16S rDNA 克隆文库构建 1:8 盐鱼比的海水鱼腌制的 5 个不同时期 150 个阳性克隆子的测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源性比对,150 个克隆子与 GenBank 数据库中已知细菌的 16S rDNA 序列相似性为 92% ~ 100%。1:8 盐鱼比腌制海水鱼不同时期细菌群落测定结果见表 2。1:8 盐鱼比腌制海水鱼,腌制开始(0 d) 主要菌属有芽胞梭菌属、嗜冷杆菌属、假单胞菌属、紫色杆菌属,优势菌属为芽胞梭菌属,占 83%,其他菌属占 17%,优势菌属中的优势菌种为解脲梭菌;腌制 5 d 主要菌属有嗜冷杆菌属、假单胞菌属,芽胞八叠球菌属,优势菌属为嗜冷杆菌属,占 70%,假单胞

菌属和芽胞八叠球菌属分别占 17% 和 13%,优势菌属中的优势菌种为养料嗜冷杆菌;腌制 10 d 主要菌属有嗜冷杆菌属、假单胞菌属,优势菌属为嗜冷杆菌属,占 93%,假单胞菌属占 7%,优势菌属中的优势菌种依旧为养料嗜冷杆菌;腌制 15 d 主要菌属有嗜冷杆菌属、假单胞菌属、葡萄球菌属,优势菌属为嗜冷杆菌属,占 90%,其他菌属占 10%,养料嗜冷杆菌在嗜冷杆菌属中仍然占绝对优势;腌制 20 d 主要菌属有嗜冷杆菌属、葡萄球菌属、藻青菌属,优势菌属仍为嗜冷杆菌属,占 77%,葡萄球菌属占 20%,优势菌属中的优势菌种仍然为养料嗜冷杆菌。

表 2 16S rDNA 克隆文库法对 1 : 8 盐鱼比腌制海水鱼样品的细菌群落组成分析结果

菌属名	最相似菌	不同腌制时期的克隆子数量(个)				
		0 d	5 d	10 d	15 d	20 d
芽胞梭菌属(<i>Clostridium</i>)	腐化芽胞梭菌(<i>Clostridium putrefaciens</i>)	4				
	溶组织梭菌(<i>Clostridium histolyticum</i>)	1				
	解脲梭菌(<i>Clostridium proteolyticum</i>)	20				
嗜冷杆菌属(<i>Psychrobacter</i>)	养料嗜冷杆菌(<i>Psychrobacter cibarius</i>)		7	9	13	9
	近海生嗜冷杆菌(<i>Psychrobacter maritimus</i>)	2	3	1	3	5
	水栖嗜冷杆菌(<i>Psychrobacter glaciicola</i>)		2	1	1	2
	粪嗜冷杆菌(<i>Psychrobacter faecalis</i>)		1	3	2	2
	肺嗜冷杆菌(<i>Psychrobacter pulmonis</i>)		1	3		2
	快生嗜冷杆菌(<i>Psychrobacter celer</i>)			2	2	
	海水嗜冷杆菌(<i>Psychrobacter aquimaris</i>)				1	
	<i>Psychrobacter fulvigines</i> strain KC 40				1	
	<i>Psychrobacter</i> sp. M3 - 2		1	2		
	<i>Psychrobacter</i> sp. strain ANT_P10B			1		
	<i>Psychrobacter</i> <i>fozii</i> strain Spedv2		2	1	1	
	<i>Psychrobacter</i> sp. P2 - 18(2011)			1	2	
	<i>Psychrobacter</i> sp. M4 - 12			3		
	<i>Psychrobacter</i> sp. R3. 4			1		
	<i>Psychrobacter</i> <i>fozii</i> strain 0226		1			3
	<i>Psychrobacter</i> sp. 88B3_12ER2A		3		1	
假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i>)	荧光假单胞菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	1	1	2		
	恶臭假单胞菌(<i>Pseudomonas putida</i>)		1			
	猴假单胞菌(<i>Pseudomonas simiae</i>)		1			
	莓实假单胞菌(<i>Pseudomonas fragi</i>)		2			
	<i>Pseudomonas</i> sp. 44B3_12ESS				1	
藻青菌属(<i>Carnobacterium</i>)						1
芽孢八叠球菌属(<i>Sporosarcina</i>)	海水芽孢八叠球菌(<i>Sporosarcina aquimarina</i>)		4			
紫色杆菌属(<i>Janthinobacterium</i>)	蓝黑紫色杆菌(<i>Janthinobacterium lividum</i>)	2				
葡萄球菌属(<i>Staphylococcus</i>)	腐生葡萄球菌(<i>Staphylococcus saprophyticus</i>)				2	
	马胃葡萄球菌(<i>Staphylococcus equorum</i>)					6

3 讨 论

由 16S rDNA 克隆文库分析结果可知,1 : 4 盐鱼比腌制体系不同时期总共检测出 6 个菌属 19 个菌种,1 : 8 盐鱼比腌制体系不同时期总共检测出 7 个菌属 29 个菌种,盐度高低对腌制体系菌群构成有一定影响,低盐度的腌制体系菌群构成比高盐度的腌制体系菌群构成更复杂,细菌种类更多。腌制前期(5 d),2 个盐鱼比的腌制体系菌群组成不同,但优势菌属和优势菌种一致,优势菌属均为嗜冷杆菌属,优势菌种均为养料嗜冷杆菌。腌制中期(10 d),1 : 8 盐鱼比腌制体系的菌群组成比 1 : 4 盐鱼比腌制体系的菌群组成少了芽胞梭菌属,1 : 4 盐鱼比腌制体系的优势菌属除了嗜冷杆菌属外增加了假单胞菌属,而 1 : 8 盐鱼比腌制体系的优势菌属只有嗜冷杆菌属,两者有相同优势菌属嗜冷杆菌属和相同的优势菌种养料嗜冷杆

菌,且养料嗜冷杆菌的占比较前一时期有所增加。腌制中后期(15 d),2 个盐鱼比的腌制体系菌群组成依然不同,但优势菌属和优势菌种一致均为嗜冷杆菌属和养料嗜冷杆菌,且优势菌种养料嗜冷杆菌的占比都继续增加。腌制后期(20 d),2 个盐鱼比的腌制体系菌群都由 3 个菌属组成,其中 2 个菌属相同,只有 1 个菌属不同,而优势菌属都相同为嗜冷杆菌属,优势菌种有所不同,1 : 4 盐鱼比腌制体系的优势菌种为 *Psychrobacter* sp. P2 - 18(2011),1 : 8 盐鱼比腌制体系的优势菌种依然为养料嗜冷杆菌,且养料嗜冷杆菌的占比较上一时期都有所下降。上述表明,不同盐度对海水鱼腌制过程中的菌群构成有所影响,但不影响优势菌属及菌群的动态变化趋势,优势菌属嗜冷杆菌属在不同盐度的腌制过程中均占优势地位,且优势菌种养料嗜冷杆菌的变化趋势相同。上述研究表明,

(下转第 1704 页)

的经验治疗,这与徐燕等^[5]报道的一致。

综上所述,绍兴第二医院下呼吸道感染分离的流感嗜血杆菌主要分布在肿瘤内科、呼吸内科和小儿科;流感嗜血杆菌的耐药机制是非产 β -内酰胺酶机制占优势,因此流感嗜血杆菌感染时经验治疗抗菌药物选择:肿瘤内科和呼吸内科患者可选择美罗培南、氯霉素、环丙沙星和头孢噻肟;小儿科患者可选择美罗培南和头孢噻肟。但是随着流感嗜血杆菌对抗菌药物的耐药率不断增加,对其耐药性的检测显得尤为重要,最好根据药敏结果选择抗菌药物。

参考文献

- [1] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 734-736.
- [2] 张真,田磊. 2011 年湖北省流感嗜血杆菌耐药性分析 [J]. 医药导报, 2013, 32(9): 1239-1241.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S24 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S]. CLSI, 2014.
- [4] 鲁梅华,洪永富. 脑膜炎败血杆菌致恶性肿瘤患者下呼吸道感染的临床分析 [J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(8): 935-937.
- [5] 叶满,文晓君. 儿童流感嗜血杆菌感染分布及耐药性监测 [J]. 现代预防医学, 2014, 41(11): 2010-2011.
- [6] 刘东华,胡艳华. 儿童呼吸道不可分型流感嗜血杆菌感染及耐药现状 [J]. 中华全科医学, 2014, 12(8): 1304-1308.

- [7] 杨晓华,谭南,林爱心,等. 儿童呼吸道流感嗜血杆菌的耐药性分析 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(5): 436-439.
- [8] 张文芳,郑珊,李丁,等. 肿瘤患者呼吸道感染嗜血杆菌的临床分布与耐药性分析 [J]. 中国肿瘤临床, 2012, 39(17): 1292-1293.
- [9] Tap LL, Hu BJ, He LX, et al. Etiology and antimicrobial resistance of community acquired pneumonia in adult patients in China [J]. Chin Med J, 2012, 125(17): 2967-2972.
- [10] Herrera-Lara S, Fernández-Fabrellas E, Cervera-Juan A, et al. Do seasonal changes and climate influence the etiology of community acquired pneumonia [J]. Arch Bronconeumol, 2013, 49(4): 140-145.
- [11] 张泓,孔菁,王传清,等. 2010 中国 CHINET 流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(3): 180-184.
- [12] 桂和翠,王中新,沈继录. 48 株流感嗜血杆菌耐药性分析及 β -内酰胺酶基因检测 [J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(1): 56-59.
- [13] 吴敏,徐浩. 流感嗜血杆菌致老年社区获得性肺炎的危险因素与耐药状况分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(24): 3636-3641.
- [14] 陶琪,李永祥. 学龄前儿童流感嗜血杆菌感染的流行病学特征与耐药性研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(14): 2114-2117.
- [15] 徐燕,闫涛,彭斐. 儿童呼吸道感染流感嗜血杆菌的耐药性分析 [J]. 继续医学教育, 2014, 28(2): 25-26.

收稿日期: 2017-12-11

(上接第 1701 页)

16S rDNA 克隆文库分析方法可以较好分析海水鱼腌制过程中细菌群落结构,菌群变化规律,一定程度上打破传统培养方法检测的局限性^[16-17]。通过分析细菌群落多样性及变化趋势对腌制海水鱼的质量保持及食用安全具有重要意义。

参考文献

- [1] 张婷. 腌制鱼类物理、生化特性分析及品质评价模型建立 [J]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- [2] 王秀元. 腌制水产品中挥发性亚硝胺含量检测与控制技术研究 [J]. 舟山: 浙江海洋学院, 2013.
- [3] 王秀元,蒋玲波,王萍亚,等. 腌制水产品中 N-亚硝胺物质的危害分析及预防控制 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41(3): 1271-1272.
- [4] 陈维娟. 咸鱼深加工工艺探讨 [J]. 中国水产, 2002(4): 74-75.
- [5] 章银良,夏文水. 腌鱼产品加工技术与理论研究进展 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(3): 116-120.
- [6] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification, and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiol Rev, 1995, 59(1): 143-169.
- [7] 燕平梅,马雁飞,倪玲. 发酵食品中微生物多样性研究方法进展 [J]. 中国酿造, 2011, 30(2): 12-15.
- [8] 万力婷,吴祖芳,张天龙,等. 苋菜梗腌制过程细菌群落变化及风味研究 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(2): 160-170.
- [9] 肖作为,张红刚,杨岩涛,等. 基于 16S rRNA 基因的 7 种乳酸

杆菌的分子系统发生 [J]. 广东农业科学, 2010, 37(4): 198-200.

- [10] Amann R, Ludwig W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology [J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(5): 555-565.
- [11] 刘琳,刘洋,刘红娟. 基于 16S rDNA 的系统发育分析在微生物进化关系中的应用 [J]. 生物学通报, 2008, 43(11): 4-6.
- [12] Brambilla E, Hippe H, Hagelstein A, et al. 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica [J]. Extremophiles, 2001, 5(1): 23-33.
- [13] Carola B, Stefan W. Evaluation of the use of PCR and reverse transcriptase PCR for detection of pathogenic bacteria in biosolids from anaerobic digestors and aerobic composters [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(8): 4618-4627.
- [14] Juck D, Charls T, Whyte LG, et al. Polyphasic microbial communities analysis of petroleum hydrocarbon contaminated soils from two northern Canadian communities [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2000, 33(3): 241-249.
- [15] 周贤轩,杨波,陈新华. 几种分子生物学方法在菌种鉴定中的应用 [J]. 生物技术, 2004, 14(6): 35-38.
- [16] 翁佩芳,陈希,沈锡权,等. 榨菜低盐腌制细菌群落多样性的分析 [J]. 中国农业科学, 2012, 45(2): 338-345.
- [17] 张安,梁会朋,孟霞,等. 应用 16S rDNA 克隆文库技术解析四川泡菜发酵过程中的细菌多样性 [J]. 中国调味品, 2017, 42(2): 1-6.

收稿日期: 2018-01-18