

应用PCR-DGGE研究液熏罗非鱼片贮藏过程中的菌相变化

陈胜军¹, 蔡秋杏², 李来好¹, 杨贤庆¹, 戚勃¹, 马海霞¹, 吴燕燕¹, 岑剑伟¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 国家水产品加工技术研发中心, 农业部水产品加工重点实验室, 广东广州 510300) (2. 钦州学院海洋学院, 广西钦州 535000)

摘要: 采用基于 PCR 反应的变性梯度凝胶电泳技术 (PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE), 对液熏罗非鱼片在贮藏过程中的菌相组成及变化进行分析, 旨在为液熏罗非鱼的贮藏条件提供理论基础。研究结果表明: 用 DGGE 法总共分离到 13 个条带, 测序比对相似度在 90% 以上的菌种有 10 种, 分别是: 2 株肠杆菌属 (*Enterobacter*), 2 株梭菌 (*Clostridium*), 2 株乳酸菌属 (*Lactococcus*), 2 株戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*), 1 株明串珠菌 (*Leuconostoc*), 以及 1 株假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 乳酸菌 (LAB) 占有所有菌株的 50%。贮藏早期 (<2 d) 和末期 (>7 d) 的菌相比较为复杂, 可辨识条带 >10, 贮藏中期 (2~7 d) 菌相条带表现出集中和明显的特点, 可辨识条带仅在 5 条左右, 微生物多样性减少, 图谱结合测序分析表明贮藏期的优势菌种为乳酸球菌 (*Lactococcus*)、戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) 和梭菌 (*Clostridium*)。

关键词: 液熏罗非鱼片; 变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE); 菌相

文章编号: 1673-9078(2014)9-49-54

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.009

PCR-DGGE to Detect Bacterial Flora Change in Liquid-smoked Tilapia Fillets during Storage

CHEN Sheng-jun¹, CAI Qiu-xing², LI Lai-hao¹, YANG Xian-qing¹, QI Bo¹, MA Hai-xia¹, WU Yan-yan¹, CEN Jian-wei¹

(1. National R&D Center For Aquatic Product Processing, Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China) (2. Qin Zhou University, Ocean College, Qinzhou 535000, China)

Abstract: Denaturing gradient gel electrophoresis technique based on polymerase chain reaction (PCR-DGGE) was used to investigate the constitution and changes of bacterial flora in the liquid-smoked tilapia fillets during storage, in order to provide a theoretical foundation for their storage conditions. The results showed that 13 bands were isolated using DGGE and after analysis their sequences, 10 of them had sequence similarity above 90%. These included two strains of *Enterobacter*, two strains of *Clostridium*, two strains of *Lactococcus*, two strains of *Pediococcus pentosaceus*, one strain of *Leuconostoc*, and one strain of *Pseudomonas*. Lactic acid bacteria (LAB) accounted for 50% of all bacteria. The bacterial flora during early storage (<2 d) and the last storage period (>7 d) were quite complex, with more than 10 identified bands. During the mid-storage period (2~7 d), however, the bacterial DGGE bands were distinctly grouped and there were only approximately five identified bands, indicating that the microbial diversity decreased. The bands from DGGE and sequencing results indicated that the dominant bacteria during storage were *Lactococcus*, *Pediococcus pentosaceus* and *Clostridium*.

Key words: smoked tilapia fillet; polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis; bacterial flora

水产品中微生物菌相会因原料、加工方式和贮藏

收稿日期: 2014-03-24

基金项目: 国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-49); 广东省海洋渔业科技推广专项 (A201101001); 2011 年度广西教育厅立项项目 (201106LX525)

作者简介: 陈胜军 (1973-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事水产品加工与质量安全研究

通讯作者: 李来好 (1963-), 男, 研究员

环境不同而在贮藏期间发生变化, 而这些变化是由于残存在产品里面的微生物在这种贮藏条件下具有不同的耐受力, 不适应的微生物种群被淘汰, 而那些适宜生存环境并得以繁殖的微生物, 将成为优势菌, 这些优势菌包括产生腐败代谢产物 (臭味、异味、颜色等) 的微生物, 还包括不产生腐败代谢产物的微生物, 前者被称之为特定腐败菌 (Specific Spoilage Organism,

SSO), 导致了产品的腐败^[1]。在贮藏初期, SSO数量和比例可能不高, 但对特定贮藏环境的忍耐能力强、生长繁殖快, 腐败活性强, 逐渐成为优势菌。由于SSO带来腐败, 所以SSO的生长与食品腐败速度密切相关。SSO及其腐败代谢产物可作为食品品质指标。国内外学者以乳制品、鱼和虾等水产品为研究对象, 在菌相变化和腐败方面进行了较多的研究^[2~3]。在液熏罗非鱼片的加工过程中, 腌渍、烟熏液浸渍、干燥和喷雾烟熏均会影响微生物菌落的变化, 残存下来的菌种将可能在贮藏的过程中, 在适宜的环境条件下, 迅速生长和繁殖。在贮藏过程中, 随着环境的变化, 一种或几种微生物适应环境的生长并大量繁殖, 发展成为优势菌群, 最终可能导致液熏罗非鱼片的腐败, 而其他种类则处于较低的数量, 甚至在相互竞争中逐渐消亡。已有的研究表明液熏罗非鱼片成品中大致的菌相构成: 肠杆菌属 (*Enterobacter*)、巨型球菌属 (*Macrococcus*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[4]。近年来, PCR-DGGE技术在分析各类食品加工过程中的微生物群落组成及动态变化, 区分不同发酵食品中的微生物方面得到了广泛的应用。本研究采用PCR-DGGE技术分析25 °C贮藏期的菌相变化, 以探明烟熏罗非鱼片在贮藏过程中的优势菌, 旨在为液熏罗非鱼片的贮藏条件提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料: 自制液熏罗非鱼片。

分析试剂: rTaq DNA聚合酶、100 bp DNA Ladder Marker、pMD18-T载体、DH5 α 感受态细胞, 大连宝生物工程公司; 15 kb DNA Marker, 广州东盛生物科技有限公司; PCR清洁试剂盒, 美国Axygen公司; 聚丙烯酰胺、琼脂糖、尿素、去离子甲酰胺、蔗糖、EDTA、Tris-HCl, 广州威佳科技有限公司; 上海生工生物工程公司合成引物。

1.2 主要仪器设备

RYX-50烟熏炉; 超净工作台, 苏州净化设备厂; SPX型智能生化培养箱, 宁波江南仪器厂; LDZX-40CI型立式自动电热压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械有限公司; 电子分析天平, PB602-N型, 精确度, 0.01 g, Mettler-Toledo瑞士; pH计, 雷磁PHS-25型, 上海精密科学仪器有限公司; 离心机, Sigma, 3K30型, 德国; PCR循环仪, Eppendorf, 德国; Tanon 1600凝胶成像系统, 中国上海天能科学仪器有限公司; Dcode通用

突变检测系统电泳仪, BioRad, 美国。

1.3 试验方法

1.3.1 取样及处理

自制烟熏罗非鱼片, 抽真空包装后, 置于25 °C恒温培养箱中贮藏, 分别于第0 d、第1 d、第2 d、第3 d、第4 d、第6 d、第7 d及第9 d取样, 分别记为J0、J1、J2、J3、J4、J6、J7、J9并进行分析。

1.3.2 细菌总DNA的提取及PCR扩增^[5]

1.3.2.1 细菌总DNA的提取

取20 g剪碎样品, 置于50 mL离心管里, 加入20 mL无菌生理盐水(含有0.5% Tween-80), 振荡混匀, 4 °C下10000 r/min离心20 min, 转移上清液10 mL至离心管中再次10000 r/min离心5 min, 再次转移上清液至另一支10 mL离心管中, 10000 r/min离心15 min, 弃上清, 将所得沉淀置于-20 °C保存。将沉淀置于室温解冻后, 加入1.8 mL的SET裂解缓冲液(20%蔗糖, 50 mM的EDTA, 50 mM的Tris-HCl, pH 7.6), 其余步骤参照Hovda^[6]的方法进行提取, 将提取的细菌总DNA溶于30 μ L的TE缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA), 取4 μ L经1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 其余置于-20 °C冰箱保存备用。

1.3.2.2 基因组总DNA的16S rDNA的PCR扩增^[7]

细菌16S rDNA扩增引物为通用引物对968f及1401r (968f: 5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3'; 1401r: 5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'), 为了调节目标片段的解链行为, 在正向引物968f的5端连接一个GC夹(CGCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGC ACGGGGGG)。PCR反应体系为50 μ L, 其中包括0.25 μ L的Taq DNA聚合酶, 10 \times buffer (Mg²⁺plus) 5 μ L, dNTP (各2.5 mM) 4 μ L, 引物968f及1401r各10 μ mol/dm³加入1 μ L, 模板4 μ L, 补ddH₂O为34.75 μ L。样品于PCR循环仪上扩增。取5 μ L PCR产物经1%琼脂糖电泳检测产量及特异性, 其余用于DGGE电泳分析。

1.3.3 PCR产物的变性梯度凝胶电泳^[8]

1.3.3.1 PCR产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)及指纹图谱的分析

在Dcode通用突变检测系统电泳仪上进行电泳, 电泳条件: 6%聚丙烯酰胺胶, 凝胶的变性梯度范围为30%~55% (100%的变性胶包含7 mol/dm³尿素和40%去离子甲酰胺); PCR产物的上样量为20 μ L, 60 °C恒温, 100 V恒压下电泳15 h。电泳缓冲液: 20 mmol/dm³ Tris, 10 mmol/dm³ NaAc, 1 mmol/dm³ EDTA, pH为7.4。电泳结束后以EB(溴化乙锭)染色30 min, 蒸馏水漂洗5 min, 紫外线照射成像。

1.3.3.2 DGGE 条带的切割、重扩增及 PCR 产物纯化

在紫外灯下对各泳道中主要的条带进行切割，共切割了13条主要条带，将胶条中的DNA片段进行回收。DNA片段回收后溶于30 μL ddH₂O中。取上述回收DNA溶液2 μL作模板，以968f（无GC夹）/1401r为引物，采用1.6中PCR反应体系和反应程序进行30个循环的扩增。取5 μL PCR产物，琼脂糖电泳检查产量及特异性。剩余PCR产物，采用PCR清洁试剂盒进行纯化。

1.3.3.3 DGGE 条带的克隆、测序及序列的种系发生分析

经纯化后的PCR产物连接到pMD18-T载体，转化DH5α细胞，将阳性克隆株由Invitrogen公司测序。测序后获得的14个主要细菌16S rDNA基因片段序列，递交到GenBank数据库中。用NCBI中BLAST命令搜索相近序列，并下载相近序列。以BIOEDIT中的Clustal W对序列进行排列，以MEGA 4.0构建种系发生树并输出。

2 结果与讨论

2.1 细菌 16S rDNA 的 V6-V8 可变区 PCR 扩增结果

各样品的细菌总DNA经PCR后的琼脂糖电泳图见图1。通用引物对968f/1401r对各样品中的微生物16S rRNA基因均产生了较好的扩增。从图1可见，各组样品均有较亮的带，扩增产量大，且无明显副带或拖带，说明各样品总DNA提取成功且PCR扩增条件是合适的。

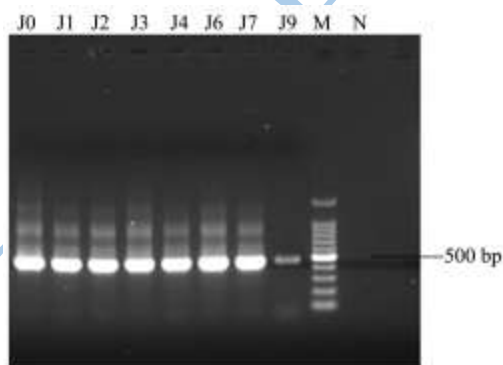


图1 样品中细菌16SrDNA的V6~V8可变区的PCR扩增产物电泳图
Fig.1 PCR amplification products of V6-V8 regions of sample DNA

注：J0-J9：样品代号（数字代表取样的天数）；M：100 bp DNA ladder Marker；N：阴性对照。

2.2 样品变性凝胶电泳图谱分析

2.2.1 贮藏过程中样品 DGGE 图谱的条带分

析

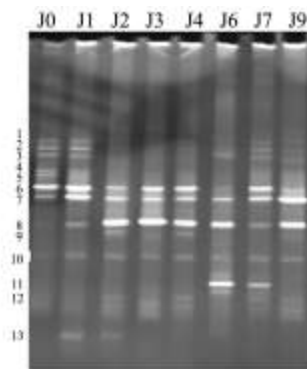


图2 液熏罗非鱼片在25 °C下贮藏细菌的DGGE图谱
Fig.2 DGGE fingerprinting of PCR samples during storing at 25 °C

注：J0~J9：表示样品；1~13：表示条带位置。

PCR产物经DGGE后形成的指纹图谱见图2，共产生13个条带，七个样品在DGGE图谱上分别产生9、10、7、5、7、6、8、7条可鉴别的条带。从图2可以看出，条带1、2、3只在贮藏的早期和末期出现，而在中期几乎不出现，条带4、5也呈现了类似的变化，只不过在末期也几乎观察不到，只在早期呈现了比较清晰地条带，而这5条条带除了在早期比较明显外，其他时期都比较微弱甚至观察不到，可见这5种条带代表的菌种在贮藏期间逐渐被抑制住了。条带6、7、8出现在贮藏的任何时期，其中条带7和8在早期的亮度很弱，其余时期都处于较亮的状态，说明了这2条带代表的菌种可能是贮藏过程中的优势菌，也可能是导致鱼片腐败变质的特定腐败菌（SSO）。优势腐败菌初始可能只占总群落很少部分，但后期却能以极快的速度生长繁殖而导致产品的腐败^[9]。而条带6则一直处于较亮的状态，也可能是优势菌之一。而6和8在末期时，有时会出现条带间断性减弱的现象，这个原因可能是末期那些没完全被抑制住的菌种又重新获得生长空间，使菌群的比例发生了改变而导致。条带10也一直存在于贮藏期的所有时期，只不过亮度很暗而且亮度变化不明显，表明它是一种非优势菌但它的生长不受其它优势菌的影响。条带11只在贮藏的末期出现，条带13只出现在早期，而条带12则呈间断性出现，可能是由于贮藏期的菌相变化是个复杂的过程，菌种间的比例不断发生变化更迭。从DGGE图谱可以看出贮藏期的菌相变化是复杂的，而DGGE图谱使这种复杂的变化得到了直观呈现。

2.2.2 DGGE 主要条带的克隆测序及鉴定结果分析

从DGGE图谱上选取13条清晰可见条带进行切割回收，回收片段经扩增、连接及克隆后测序，得到13

个条带的主要序列,经Blast比对后,在Genbank中共挑 取13种相似的菌种,结果见表1。

表1 细菌DGGE指纹图谱上优势条带的序列分析

Table 1 Identities of bands obtained from DGGE analysis of bacterial communities

条带编号	序列长度/bp	GenBank 数据库中最相似菌种名称 (登陆号)	最大相似性/%
1	406	<i>Enterobacter sp.RP1P(EF585402.1)</i>	98
2	403	<i>Enterobacter sp. 6B-8(AY689046)</i>	98
3	405	<i>Citrobacter freundii strain: JCM 24064(AB548829.1)</i>	89
4	406	<i>Clostridium sartagoforme strain BG-C95 (FJ384380.1)</i>	97
5	405	<i>Lactococcuslactissubsp. (AB494727.1)</i>	100
6	405	<i>Pediococcus pentosaceus (AB494722.1)</i>	99
7	395	<i>Clostridium sp. SH-C1 (FJ424472.1)</i>	98
8	405	<i>Lactococcusgarvieae strain FM1-1(GU299084.1)</i>	99
9	405	<i>Enterobacter sp. TSSAS2-48 (GO284539.1)</i>	86
10	410	<i>Leuconostoc sp. DIT 23 (GU071211.1)</i>	98
11	405	<i>Lactococcus sp. 2V2C(EU693546.1)</i>	86
12	400	<i>Pediococcus pentosaceus isolate N2a17(FM163360.1)</i>	99
13	406	<i>Pseudomonas sp. 12jan05 (FJ976053.1)</i>	97

选取最大相似性>90%的10个序列及相关序列(除3、9和11条带外)构建种系进化树,用ClustalX进行同源性比对后,经Mega软件构建的种系进化树如图3所示。

由图3可以看出,条带6和12聚合在一起,它们又同时和戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)相似,条带10与明串珠菌(*Leuconostoc*)相聚,而条带8则与乳球菌属下的两个种:乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis subsp. lactis*)和格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)都相似,故只能确定为乳酸球菌属。上述几种条带代表的菌种都与厚壁菌门下的乳酸杆菌目的细菌相似,戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)属于乳杆菌科,乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis subsp. lactis*)和格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)属于链球菌科,而*Leuconostoc*则属于明串珠菌属,这些菌通常统称为乳酸菌(LAB),但其实是很多种菌的综合,LAB常常出现于各种真空包装的食品中。条带4和条带7皆与梭菌(*Clostridium*)相似,梭菌也是厚壁菌门(*Firmicutes*)的细菌。所以这些条带所代表的菌种在进化树都聚属厚壁菌门(*Firmicutes*)的细菌。

条带1与肠杆菌属细菌(*Enterobacter* sp.)聚成一簇,条带2也与肠杆菌属细菌(*Enterobacter* spp.)相似。条带13则与假单胞菌属(*Pseudomonas*)相似,肠杆菌属细菌(*Enterobacter*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)都属于变形菌门(*Proteobacteria*),所以在进化树上聚成一簇。

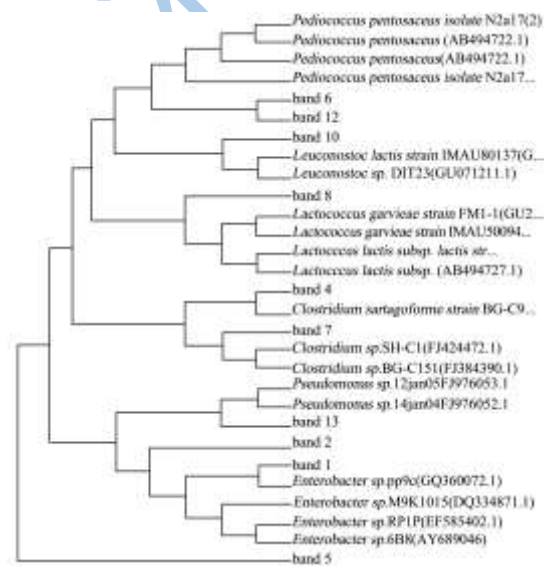


图3 10个主序列与一些相似序列与Neibor-joining方法构建的种系进化树

Fig.3 Phylogeny tree constructed by Neibor-joining method with ten main sequence and similar sequence

2.3 液熏罗非鱼片在贮藏期间的优势菌

液熏罗非鱼片贮藏期的菌相,经过PCR-DGGE方法得到的10个条带中,由前面分析可知,得到了戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)、乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis subsp. lactis*)和格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)属于链球菌科,而*Leuconostoc*则属于明串珠菌属,这些菌通常统称为乳酸菌(LAB),优势菌也几乎是乳酸菌,PCR-DGGE技术能将不同类

型的乳酸菌细分出来,这具有一定的优越性,除了乳酸菌,PCR-DGGE技术还分离出了梭菌(*Clostridium*),假如用选择性培养基分析菌相的变化时,必须先对样品的菌相有清楚的了解才能选用合适的培养基,而且选用选择性培养基往往会偏离原始的环境参数,人为地制造一些选择性的条件而富集某些微生物^[10],又有可能改变微生物种群结构。

由上述分析可知,液熏罗非鱼片在贮藏期的优势菌种为乳酸球菌(*Lactococcus*)、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)和梭菌(*Clostridium*)。近年来,其他水产品贮藏期的优势菌的研究也逐渐增多,因为某些优势菌与水产品的腐败有直接的联系,郭全友等^[11]研究了冷藏大黄鱼优势菌群为腐败希瓦氏菌(37.9%)和假单胞菌属(15.6%)。两种鱼的贮藏期优势菌群都有假单胞菌,但它们都是需氧而且低温贮藏,和本产品的贮藏方式不同,说明优势菌和贮藏条件有很大的关系。目前尚无关于烟熏水产品的菌相分析方面的报道,但是其他的烟熏产品的贮藏期菌相也有些研究,全拓等^[12]研究了市售三种品牌的真空包装低温熏烤火腿的贮藏期菌相,表明主要优势菌是乳酸菌,其次还有假单胞菌、葡萄球菌和微球菌等,说明烟熏产品的贮藏期优势菌比较相似,都包含乳酸菌。

2.4 乳酸菌的抗菌能力及对液熏罗非鱼片品质的影响

根据黄靖芬^[13]的实验发现,与鲜罗非鱼在0℃、5℃、10℃和15℃贮藏货架期分别为20 d、9.5 d、5 d和2.5 d相比,液熏罗非鱼片的货架期延长了7~60倍,而且与已见报道的热熏、液熏或冷熏真空包装三文鱼冷藏货架期不超过50 d相比,液熏罗非鱼片的货架期也延长了3倍,这说明了液熏罗非鱼片的货架期很长,乳酸菌作为液熏罗非鱼片贮藏期的优势菌,可能对液熏罗非鱼片的保质做出了重要的贡献。研究发现,研究发现,乳酸菌在代谢过程产生多种抑菌活性物质,主要包括有机酸(主要是乳酸和乙酸)、双乙酰、二氧化碳、过氧化氢、细菌素、抗菌肽和苯乳酸等,对细菌、霉菌和酵母等微生物具有广谱的抑制作用。产生过氧化氢的乳酸菌常见的有乳酸球菌,乳酸菌产生的乳酸菌素(nisin)具有广泛抑制革兰氏阳性菌的作用,尤其对一些病原菌和腐败菌的作用效果较好,并且乳酸菌素没有病原性特征,也不像抗生素会产生抗性,因此可用作食品防腐剂。乳酸菌在冷熏水产品中抑菌防腐的作用已有大量的研究,主要是针对冷熏鲑鱼,抑制的大部分为李斯特菌,也有抑制腐败菌的报道^[14]。

3 结论

本研究采用PCR-DGGE的方法分析液熏罗非鱼片在贮藏过程中的菌相组成及变化。结果表明:用DGGE法总共分离到13个条带,测序比对相似度在90%以上的菌种有10种,分别是:2株肠杆菌属(*Enterobacter*),2株梭菌(*Clostridium*),2株乳球菌属(*Lactococcus*),2株戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*),1株明串珠菌(*Leuconostoc*),以及1株假单胞菌属(*Pseudomonas*),乳酸菌(LAB)占有菌株的50%。贮藏早期(<2 d)和末期(>7 d)的菌相较为复杂,可辨识条带>10,贮藏中期(2~7 d)菌相条带表现出集中和明显的特点,可辨识条带仅在5条左右,微生物多样性减少,图谱表明贮藏期的优势菌种为乳酸球菌(*Lactococcus*)、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)和梭菌(*Clostridium*)。

参考文献

- [1] Dalgaard P. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish [J]. International Journal of Food Microbiology, 1995, 26: 319-333
- [2] FAN Wen-jiao, SUN Jun-xiu, CHEN Yun-chuan, et al. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage [J]. Food Chemistry, 2009, 115: 66-70
- [3] 林晓珊,阮征,刘飞,等.PCR-DGGE 技术对中华开菲尔微生物菌群的分析[J].现代食品科技,2013,29(6):1217-1221
LIN Xiao-shan, RUAN Zheng, LIU Fei, et al. Analysis of microbial community structures in kefir grains by PCR-DGGE techniques [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(6): 1217-1221
- [4] 蔡秋杏,李来好,陈胜军,等.液熏罗非鱼片加工过程中微生物群落的 PCR-DGGE 分析[J].食品科学,2009,30(23):35-40
CAI Qiu-xing, LI Lai-hao, CHEN Sheng-jun, et al. PCR-DGGE analysis of bacterial community during processing of liquid-smoked tilapia [J]. Food Science, 2009, 30(23): 35-40
- [5] LI Qiu-fen, ZHANG Y, JUCK D, et al. Phylogenetic analysis of bacterial communities in the shrimp and sea cucumber aquaculture environment in northern China by culturing and PCR-DGGE [J]. Aquaculture International, 2010, 18(6): 977-990
- [6] Hovda M B, Lunestad B T, Sivertsvik M, et al. Characterisation of the bacterial flora of modified atmosphere packaged farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) by PCR-DGGE of conserved 16S rRNA gene regions [J].

- International Journal of Food Microbiology, 2007, 117: 68-75
- [7] Flavia F Evans, Alexandre S Rosado, Gina V Sebastian, et al. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 48(2): 1-11
- [8] LIU Huai-de, LIU Mei, WANG Bao-jie, et al. PCR-DGGE analysis of intestinal bacteria and effect of *Bacillus spp.* on intestinal microbial diversity in kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2010, 28(4): 808-814
- [9] Sabrina Macé, Jean-Jacques Joffraud, Mireille Cardinal, et al. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from spoiled raw salmon (*Salmo salar*) fillets stored under modified atmosphere packaging [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 160(3): 227-238
- [10] Dal Bello F, Walter J, Hammes W P, et al. Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition [J]. Microbial Ecology, 2003, 45(4): 455-463
- [11] 郭全友, 杨宪时, 许钟, 等. 养殖大黄鱼冷藏过程中细菌菌相的变化[J]. 中国水产科学, 2007, 14(2): 301-307
GUO Quan-you, YANG Xian-shi, XU Zhong, et al. Bacterial flora changes on culture *Pseudosciaena crocea* during chilled storage [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(2): 301-307
- [12] 全拓, 贺稚非, 李洪军, 等. 低温熏烤火腿储藏过程中菌相变化规律研究[C]. 2011年中国农业工程学会农产品加工及贮藏工程分会学术年会暨全国食品科学与工程博士生学术论坛论文集. 重庆, 2011: 122-126
QUAN Tuo, HE Zhi-fei, LI Hong-jun, et al. Research on changes of the microflora of low-temperature smoke dham during storage [C]. The Agricultural Products Processing and Storage Engineering Branch of China Agricultural Engineering Institute and Academic Conference Proceedings of the National Food Science and Engineering Doctoral Student Academic Forum, Chongqing, 2011: 122-126
- [13] 黄靖芬. 罗非鱼片液熏加工工艺及其产品保藏特性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008
HUANG Jing-fen. Study of technology of liquid smoked tilapia fillets and changes in quality of products at stored different conditions [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008
- [14] Fall P A, Leroi F, Chevalier F, et al. Protective effect of anon-bacteriocinogenic *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 strain against *Listeria monocytogenes* in sterilized tropical cooked peeled shrimp [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2010, 19(2): 84-92