

凡纳滨对虾内源优势腐败菌的分离和鉴定

叶日英, 孙力军*, 王雅玲, 何国炜, 徐德峰, 刘唤明, 张永平

(广东海洋大学食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东 湛江 524025)

摘要: 为了确定凡纳滨对虾在冷藏条件下内源优势腐败菌的种类, 实验采用了细菌分离纯化法, 将分离得到的内源腐败菌菌株进行分解蛋白质对比实验, 筛选出分解蛋白质能力较强的菌株, 进一步采用细菌自动生化系统鉴定法以及 16S rRNA 序列测定法进行鉴定, 实验结果显示凡纳滨对虾在冷藏条件下的内源优势腐败菌是短杆菌属细菌, 可以通过控制短杆菌属细菌的方法进行研究对虾内源保鲜技术。细菌自动生化系统鉴定结果的相似度为 98.8%, 16S rRNA 序列鉴定结果的相似度为 99.065%。

关键词: 凡纳滨对虾; 内源优势腐败菌; 分离; 鉴定

中图分类号: Q 938.8; S 945.4

文献标志码: A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 原名凡纳对虾, 因其营养丰富、味道鲜美而受到人们的喜爱。对虾受腐败细菌的影响很大^[1-2], 离水后的新鲜对虾若没有进行任何的保鲜处理, 很快就会变质腐败。相关研究发现, 新鲜水产品腐败变质主要是由微生物的作用引起的^[3-4]。由于新鲜水产品含水量较大, 含可溶性蛋白质也较多, 细菌容易利用和分解其中的蛋白质, 代谢物是胺、硫化物、酮、醛和有机酸等等^[5-6], 使水产品产生不良气味或在感官上令人不能接受^[7-8], 由此促使水产品大量集中上市, 并且要在短时间内销售完毕, 这样会造成水产品低价销售, 还有部分产品因为滞销积压而变质腐败, 直接造成经济损失。引起水产品腐败的细菌包括来自贮藏环境和水产品体内固有的细菌群, 目前对水产品腐败菌的研究报道较多, 但主要集中在外源腐败细菌方面, 而针对水产品内源腐败菌即对虾体内固有的腐败细菌的研究很少。凡纳滨对虾内源腐败菌是指对虾体内固有生存的引起对虾腐败变质的细菌群, 内源腐败菌是对虾在贮藏和运输过程中变质的重要因素之一。对虾内源腐败菌对对虾贮藏过程有非常重要的影响^[9], 本实验对冷藏中的凡纳滨对虾进行

内源优势腐败菌的分离和鉴定, 从而可以通过特定的养殖方法减少或控制对虾内源腐败菌的腐败作用^[10-11], 或者通过研制对虾内源保鲜剂靶向抑制内源优势腐败菌, 从而提高对虾保鲜和保质的贮藏水平。

对水产品腐败菌的研究发现, 水产品中的微生物中只有一种或几种参与腐败过程, 这部分微生物称为特定腐败菌 (specific spoilage organism, SSO), 而 SSO 因水产品的种类、养殖环境^[12]、贮藏环境及加工条件等不同而不同, 例如新鲜鱼在冷藏时的 SSO 是假单胞菌^[13], 未冷藏的鲜鱼的 SSO 是弧菌科 (Vibrionaceae) 等发酵型革兰氏阴性细菌^[14]; 而咸鱼的 SSO 是微球菌属 (*Micrococcus*) 和盐杆菌属 (*Halobacterium*) 及霉菌 (Mold)^[15], 这些特定的腐败菌都具有优势腐败作用, 通过本实验项目的完成, 可以鉴定出凡纳滨对虾在冷藏时的内源优势腐败菌的种类, 在对虾保鲜技术方面提供新的技术依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

对虾: 鲜活的凡纳滨对虾, 购买于广东省湛江

收稿日期: 2013-01-18 修回日期: 2013-04-14

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30972287, 31201309); “十二五” 国家科技支撑计划 (2012BAD29B06); 广东省教育部产学研结合项目 (2011B090400154)

通信作者: 孙力军, E-mail: dfsun01@126.com

市东风市场。

培养基:蛋白酶筛选培养基、蛋白酶诱导培养基、三糖铁培养基、营养琼脂培养基,均购买于北京陆桥技术责任有限公司。

1.2 主要仪器:

紫外分光光度计 UV-2102PC:尤尼柯(上海)仪器有限公司生产;

全自动细菌鉴定仪 VITEK-60:法国梅里埃公司生产;

PCR 仪 GT9611:郑州南北仪器设备有限公司生产。

1.3 实验方法

产蛋白酶透明圈的腐败菌的分离和纯化
 在无菌条件下将对虾分别处理制成含内脏的匀浆样品和去除内脏的匀浆样品,根据《食品微生物学实验指导》^[16]中“水产品微生物菌群——微生物学基本技巧与标准平板计数”实验进行细菌分离,然后通过对比分离出来的产透明圈的菌落形态,初步筛选出内源腐败菌,找出产透明圈的菌落,选用蛋白酶筛选培养基,利用平板分离划线法,将目标菌接种到平板上划线纯化,每种菌划2个板,30℃培养。观察生长出来的单菌落,只生长在含内脏的对虾样品中,而不含内脏的对虾样品中不存在的菌落为内源腐败菌。

内源腐败菌产硫化氢实验 使用三糖铁培养基(高层斜面),将产蛋白酶透明圈的腐败菌分离纯化获得的内源腐败菌使用划线穿刺法接种到三糖铁培养基中,在30℃培养24h。若培养基变黑即可判断菌株产硫化氢,同时进行革兰氏染色、镜检。

腐败菌腐败能力测定 腐败菌产蛋白酶能力的测定:利用福林(Folin)-酚试剂法^[17]测定。

腐败菌样品挥发性盐基氮(TVBN)测定:根据《生物化学实验技术教程》^[18]中“挥发盐基氮的测定”实验方法进行。

1) 腐败菌的菌悬液制备:依据李学英等^[19]的方法制备。

2) 样品接种和培养:将无菌虾肉浸入腐败菌悬液中,捞出沥干,装进无菌密封小塑料袋中放进冰箱4℃培养。每天取样1次,做挥发性盐基氮、细菌总数的测定。

优势内源腐败菌的生化鉴定 根据上述测试结果,选取腐败能力较强的内源优势腐败菌株,利用细菌生化鉴定系统进行鉴定。使用方法:将3mL无菌盐水加入到清洁塑料管中,以无菌棒接种形态相同的菌落至盐水管中,按步骤准备菌悬液并混匀,用已校正的VITEK2比浊仪配制相当于0.50~0.63麦氏单位的菌悬液,将悬浮液管及GN卡置于载卡台上进行鉴定。

16S rRNA 序列鉴定 将典型的优势腐败菌进行菌悬液制备和预处理:吸取30μL ddH₂O加到1.5mL的无菌离心管中,按无菌操作要求挑取单个菌,并于水中吹吸混匀,使其成有一定浊度的菌悬液。并将其放到-20℃冰箱,15min后取出置于65℃水浴,10min。如此反复冻融3次,弹打后,即可作模板。PCR引物采用细菌通用引物,测序工作由上海英潍捷基贸易公司完成。

2 结果

2.1 内源腐败菌的分离及产硫化氢实验^[20]

对虾样品通过蛋白酶筛选培养基的分离纯化,一共分离得到9株腐败菌,其中有3株菌落只生长在含内脏的对虾样品平板中,而不含内脏的对虾样品平板中没有生长,可以判定这3株菌是对虾内源腐败菌。分别命名为1#菌、2#菌和3#菌,通过镜检观察,1#、2#、3#菌株均属于革兰氏阴性菌。经过利用三糖铁培养基进行硫化氢定性鉴定,这3株菌都不产硫化氢,其菌落特征见表1。

表1 细菌菌落形态
 Tab.1 The bacterial colonial morphology

菌落序号 bacterial colony number	形状 shape	边缘 edge	表面 surface	颜色 colour	透明度 transparency	是否产硫化氢 produce sulfureted hydrogen or not
1#	圆形 round	锯齿状 serration	有光泽 glossy	黄色 yellow	不透明 opacity	否 not
2#	乳头状 mamillary	整齐 tidiness	有光泽 glossy	白色 white	半透明 translucence	否 not
3#	圆形 round	锯齿状 serration	有光泽 glossy	黄色 yellow	半透明 translucence	否 not

2.2 内源腐败菌产蛋白酶能力

腐败菌产蛋白酶的能力越强,则其腐败能力越强,因此细菌的产蛋白酶能力是鉴定其腐败能力的重要指标之一^[21]。利用福林(Folin)-酚试剂法,绘出蛋白质标准曲线(图1),求得蛋白质与吸光度的线性关系方程式 $y = 7.8643x + 0.0339$, 相关系数 $R^2 = 0.9901$, 然后测得对应 1[#]、2[#]、3[#]菌的对虾样品的吸光度 OD 值分别是 0.0434、0.7519 和 0.0402, 按蛋白质和吸光度的标准线性关系 $x = (y - 0.0339) / 7.8643$, 求得相应的蛋白质浓度分别是 0.00121、0.0913 和 0.0008 mg/mL。可见 2[#]菌样品的蛋白质浓度最大, 1[#]和 3[#]菌样品的蛋白质浓度最低而且接近, 由于蛋白质浓度越低, 说明细菌产蛋白酶的量越大, 因此可以判定 1[#]和 3[#]菌产蛋白酶能力明显较强, 属于内源优势腐败菌。

2.3 样品挥发性盐基氮的测定

按照 GB 2741-94, 虾细菌总数(个/g) $\leq 10^5$ 为一级鲜度; $\leq 5 \times 10^5$ 为二级鲜度; 细菌总数达

到 $10^6 \sim 10^7$ 时, 通常虾已经严重腐败, 不能食用, 此时断定为货架期终点^[22]。将无菌虾肉分别接种 1[#]、2[#]、3[#]菌后在 4℃ 保存, 72 h 时达到货架期终点(表2), 1[#]、2[#]、3[#]菌样品对虾货架期终点时的 TVBN 含量分别为 34.74、29.05 和 34.32 mg/100 g, 产量因子 $Y_{TVBN/CFU}$ 分别为 6.17×10^{-6} 、 2.97×10^{-6} 和 7.80×10^{-6} mg TVBN/CFU。可见 1[#]和 3[#]菌在产挥发性盐基氮方面存在显著优势。

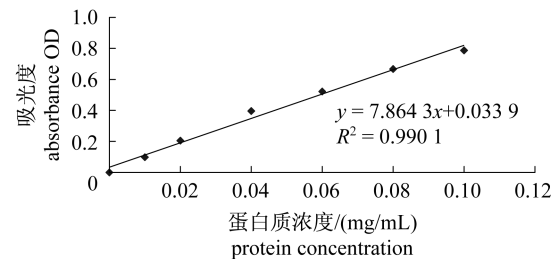


图1 蛋白质浓度与吸光度线性关系

Fig.1 Protein concentration and absorbance OD linear relationship

表2 产量因子统计表

Tab.2 The yield factor statistical table

菌号 bacterium number	T 样品初始/(mg/100 g) TVBN	样品终点/(mg/100 g) TVBN	样品初始/ Lg(CFU/g)	样品终点/ Lg(CFU/g)	$Y_{TVBN/CFU}$ / mg
1 [#]	8.71	34.74	2.31	7.89	6.17×10^{-6}
2 [#]	8.51	29.05	2.34	6.52	2.97×10^{-6}
3 [#]	9.13	34.32	2.10	7.53	7.80×10^{-6}

2.4 内源优势腐败菌的生化鉴定

由上述产蛋白酶和 TVBN 的测定结果可知, 1[#]和 3[#]菌具有典型的腐败作用优势, 属于内源优势腐败菌, 将 1[#]和 3[#]菌用细菌生化鉴定系统全自

动细菌鉴定仪进行鉴定, 结果显示 1[#]和 3[#]菌均属于短杆菌属(*Brevibacterium*), 相似度为 98.8%。生化鉴定的特征结果见表3。

表3 1[#]菌和 3[#]菌的生化鉴定结果

Tab.3 The biochemical identification result of No.1 and No.3 bacteria

项目 item	1 [#]	3 [#]	项目 item	1 [#]	3 [#]	项目 item	1 [#]	3 [#]
APPA 丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶	-	-	SAC 蔗糖	+	+	ProA L-脯氨酸芳胺酶	+	+
ADO 侧金盏花醇	-	-	dTAG D-塔格糖	-	-	LIP 酯酶	-	-
PyrA 吡咯烷基芳胺酶	-	-	dTRE D-海藻糖	-	-	PLE 古老糖	+	+
IARL L-阿拉伯醇	-	-	CIT 柠檬酸钠	-	-	TyrA 酪氨酸芳胺酶	-	-
dCEL D-纤维二糖	-	+	MNT 丙二酸盐	-	-	URE 尿素酶	-	-
BGAL β -半乳糖苷酶	-	-	5KG 5-酮-葡萄糖苷	-	-	dSOR D-山梨醇	-	-

续表 3

项目 item	1 [#]	3 [#]	项目 item	1 [#]	3 [#]	项目 item	1 [#]	3 [#]
H ₂ S	-	-	ILATk	+	+	ProA	-	-
H ₂ S 产生	-	-	乳酸盐产碱	+	+	L-脯氨酸芳胺酶	-	-
BNAG	-	-	AGLU	-	-	LIP	+	+
β-N-乙酰葡萄糖苷酶	-	-	α-葡萄糖	-	-	酯酶	-	-
AGLTp	-	-	SUCT	-	-	PLE	-	-
谷氨酰芳胺酶	-	-	琥珀酸盐产碱	-	-	古老糖	-	-
dGLU	+	+	NAGA	-	-	TyrA	-	-
D-葡萄糖	+	+	N-乙酰-β-半乳糖氨酶	-	-	酪氨酸芳胺酶	-	-
GGT	-	-	AGAL	-	-	URE	-	-
γ-谷氨酰转移酶	-	-	α-半乳糖苷酶	-	-	尿素酶	-	-
OFF	-	-	PHOS	-	-	dSOR	-	-
葡萄糖发酵	-	-	磷酸酶	-	-	D-山梨醇	-	-
BGLU	-	-	GlyA	-	-	O129R	-	-
β-葡萄糖苷酶	-	-	氨基乙酸芳胺酶	-	-	0/129 耐受	-	-
dMAL	-	-	ODC	-	-	GGAA	-	-
D-麦芽糖	-	-	鸟氨酸脱羧酶	-	-	谷氨酸-甘氨酸-精氨酸芳胺酶	-	-
dMAN	-	-	LDC	-	-	ILATa	-	-
D-甘露醇	-	-	赖氨酸脱羧酶	-	-	L-乳酸盐同化	-	-

注：“+”为阳性，“-”为阴性。

Notes: “+” for positive, “-” for negative.

2.5 16S rRNA 测定结果

将 1[#] 菌和 3[#] 菌作 16S rRNA 建树检测 (图 2), H1 和 H3 分别是 1[#] 菌和 3[#] 菌, 结果显示 1[#] 菌

和 3[#] 菌都是表皮短杆菌 (*Brevibacterium epidermidis*), 相似度为 99.065%。1[#] 菌和 3[#] 菌的序列号为 1620367。

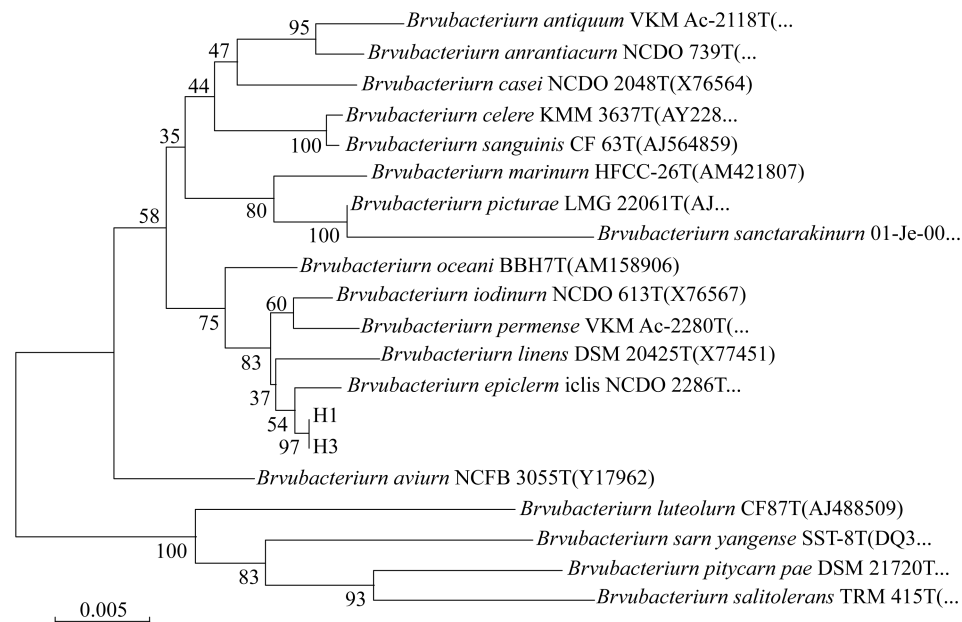


图 2 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree

3 讨论

目前相当多的学术研究证明, 细菌作用是引起对虾腐败变质的主要原因, 而其中占优势的腐败细菌往往是一种或几种^[23], 例如郭红等^[24]在

冰温条件下从对虾中分离得到的优势腐败菌是希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 和不动杆菌属 (*Aeromonas hydrophila*)。另外, 刘尊英等^[2]在冷藏条件下对虾分离得到的优势腐败菌均为不动杆菌属

(*Aeromonas* spp.) 细菌。本实验经过分离和鉴定对虾内源优势腐败菌,得到的结果是:在冷藏条件下,新鲜对虾的内源优势腐败菌是短杆菌属(*Brevibacterium*) 细菌。

本实验过程中在对对虾进行细菌总数测定以及对其中产透明圈的细菌总数进行测定时,发现带有内脏的对虾样品细菌总数明显较多,说明内源腐败菌是引起对虾变质腐败的主要细菌,宛立等^[25]在进行凡纳滨对虾内脏的细菌菌相分析时,也发现鲜活的凡纳滨对虾肠道中细菌数量最多,其次是胃、肝胰腺,而肌肉中几乎不含细菌。由于对虾在贮藏中由细菌引起腐败的机理是复杂的,例如细菌的作用会同时激发对虾的内在酶的活力,会引起酶促反应使对虾黑变等生化反应^[26]。另外,不同特征的对虾产品或不同的贮藏条件,对不同的腐败菌相都会产生较大的动态响应,所以,要提高对虾产品的贮藏保鲜质量,还需要进一步探索对虾腐败细菌以及内源酶等相互之间的动态影响。

感谢上海英滩捷基贸易公司帮助提供检测序列。

参考文献:

- [1] 赵海鹏,谢晶,严文蓉. 南美白对虾冷藏过程中的细菌分离、初步鉴定及菌相分析[J]. 江苏农业学报,2011,27(1):164-168.
- [2] 刘尊英,郭红,朱素芹,等. 凡纳滨对虾优势腐败菌鉴定及其群体感应现象[J]. 微生物学通报,2011,38(12):1087-1812.
- [3] 张娟,娄永江. 冰温技术及其在食品保鲜中的应用[J]. 食品研究与开发,2006,27(8):150-152.
- [4] 周德庆,马敬军,徐晶晶. 水产品鲜度评价方法研究进展[J]. 莱阳农学院学报,2004,21(4):312-315.
- [5] 张惠芹,姜红,杨俊,等. 常见食物的中毒症状及其预防与急救[J]. 微量元素与健康研究,2004,21(4):57-58.
- [6] Dalgaard P. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish[J]. International Journal of Food Microbiol,1995,26(3):319-333.
- [7] 王亮,曾名湧. 对虾保鲜技术研究现状及发展趋势[J]. 食品与发酵工业,2009,35(9):111-115.
- [8] Matsumoto M, Yamanaka H. Post-mortem biochemical changes in the muscle of Kuruma prawn during storage and evaluation of the freshness[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries,1990,56(7):1145-1149.
- [9] Shamshad S L, Riaz M. Shelf of shrimp stored at different temperatures[J]. Journal of Food Science, 1990,55(5):1201-1205.
- [10] 廖振平. 重视水产品加工,促进水产品发展[J]. 大众科技,2007(7):141-143.
- [11] Hong L C, Leblanc E L, Hawrysh Z J, et al. Quality of atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.) fillets during modified atmosphere storage[J]. Journal of Food Science,1996,61(3):646-651.
- [12] 何志刚,王金龙,袁海,等. 复合有机酸对南美白对虾生长性能及养殖效益的影响试验[J]. 科学养鱼,2011(1):66-67.
- [13] 许钟,肖琳琳,杨宪时. 罗非鱼特定腐败菌生长动力学模型和货架期预测[J]. 水产学报,2005,29(4):540-546.
- [14] 刘书成. 水产品食品加工学[M]. 郑州:郑州大学出版社,2011.
- [15] 邹玉萍. 即食鱼制品的防腐保藏研究[D]. 无锡:江南大学,2008.
- [16] 陈绍铭,郑福寿. 水生微生物学实验法(上册)[M]. 北京:海洋出版社1990.
- [17] 赵亚华. 生物化学实验技术教程[M]. 广州:华南理工大学出版社,2000:38-40.
- [18] 李学英,杨宪时,郭全友,等. 大黄鱼腐败菌腐败能力的初步分析[J]. 食品工业科技,2009,30(6):316-319.
- [19] 李学英,许钟,杨宪时,等. 大黄鱼腐败菌腐败能力分析与其特定腐败菌鉴别[J]. 上海海洋大学学报,2010,19(4):547-552.
- [20] GB 4789.2-2010. 食品卫生微生物学检验菌落总数测定方法[S]. 北京:中国标准出版社,2011.
- [21] 鲁长豪. 食品理化检验学[M]. 北京:中国卫生出版社,1993.
- [22] 徐丽敏,薛长湖,李兆杰,等. 水溶性壳聚糖对南美白对虾品质及腐败菌相变化的影响[J]. 食品工业科技,2008,29(6):107-110.
- [23] Ho M L, Cheng H H, Jiang S T. Effect of modified ice storage on the shelf life of shrimp[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries,1986,52(3):479-488.
- [24] 郭红,董士远,刘尊英,等. 南美白对虾冰温下菌相变化[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2010,40(6):77-80.
- [25] 宛立,王吉桥,高峰,等. 南美白对虾肠道细菌菌群分析[J]. 水产科学,2005,25(1):13-15.
- [26] 梁晶晶,戴志远,陈飞东,等. 南美白对虾防黑变保鲜的初步研究[J]. 水利渔业,2007,27(4):115-116.

Separation and identification of endogenous dominant spoilage bacteria from *Litopenaeus vannamei*

YE Riying, SUN Lijun* , WANG Yaling, HE Guowei, XU Defeng,
LIU Huanming, ZHANG Yongping

(College of Food Science and Technology, Key laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of
Guangdong Higher Education Institution, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: Endogenous spoilage bacteria of *Litopenaeus vannamei* are the bacterial floras living in *Litopenaeus vannamei* body which cause the *Litopenaeus vannamei* spoilage. It is one of the most important factors which cause spoilage while the *Litopenaeus vannamei* are stored up and in transportation process. In order to find out the endogenous dominant spoilage bacteria of *Litopenaeus vannamei* under refrigeration, the bacteria separation is applied in experiment and therefore the endogenous spoilage bacteria are gained, and then the bacterial strains of high capability of decomposing protein were obtained after protein comparison experiment. Once more, auto-biochemical identification system and 16S rRNA sequencing are applied in experiment process. The result shows that the endogenous dominant spoilage bacteria of *Litopenaeus vannamei* are of *Brevibacterium*, and the semblance of auto-biochemical identification and 16S rRNA sequencing is 98.833% and 99.065% respectively. Researches show that the endogenous dominant spoilage bacteria of *Litopenaeus vannamei* under refrigeration are of *Brevibacterium*, and it is possible to research on endogenous freshness preservation technology of *Litopenaeus vannamei* by controlling *Brevibacterium* bacteria.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; endogenous dominant spoilage bacteria; separation; identification

Corresponding author: SUN Lijun. E-mail: dfsun01@126.com