

冷藏鲳鱼贮藏期间的细菌种群变化

蓝蔚青, 谢晶*, 施建兵, 周会, 张琛杰

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

摘要: 分析了鲳鱼(*Pampus argenteus*)冷藏期间的感官、pH值、微生物指标及主要细菌种群变化。研究表明,初始样品 pH 值为 7.217 ± 0.015 , 菌落总数(CFU/g)的对数值为 3.967 ± 0.012 ; 初始细菌种类较多, 其中 45.92% 为革兰氏阴性菌, 54.08% 为革兰氏阳性菌, 优势菌为腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus* 28.81%)、松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus sciuri* 15.38%)、嗜冷杆菌(*Psychrobacter spp.* 12.09%)、草莓假单胞菌(*Pseudomonas fragi* 9.02%)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens* 8.53%)与腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens* 6.39%), 同时检出一定比例的成团肠杆菌、微杆菌与嗜根库克菌。冷藏过程中, 腐生葡萄球菌与松鼠葡萄球菌等生长受到抑制, 细菌菌相组成逐渐单一, 适应低温环境条件的革兰氏阴性菌比例逐渐增加, 在贮藏的第 3、5、7 天至货架期终点(pH 值为 8.057 ± 0.005 , 菌落总数(CFU/g)的对数值为 9.137 ± 0.032)时, 阴性菌比例分别达到 83.82%、95.86%、96.88% 与 93.57%。其中, 假单胞菌与腐败希瓦氏菌增长显著, 在贮藏末期比例为 45.71% 与 33.57%, 荧光假单胞菌(35.00%)明显多于草莓假单胞菌(10.71%)。

关键词: 鲳鱼; 冷藏; 优势腐败菌; 细菌菌相

中图分类号: S 983 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)11—1141—08

Bacterial Species Changes in *Pampus argenteus* During Chilled Storage

LAN Wei-qing, XIE Jing*, SHI Jian-bing, ZHOU Hui, ZHANG Chen-jie

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In this paper, quality changes in *Pampus argenteus* during chilled storage (4 ± 1) °C were investigated in the aspects of sensory, pH value and aerobic plate count (APC), and its bacterial flora changes were also qualitatively and quantitatively studied. The results showed that TPC and the mean values of pH of sample at the initial storage were $(3.967 \pm 0.012) \lg$ (CFU/g), (7.217 ± 0.015) respectively. 45.92% gram negative bacteria and 54.08% gram positive bacteria were found in it, the dominant bacterial flora were composed of *Staphylococcus saprophyticus* (28.81%), *Staphylococcus sciuri* (15.38%), *Psychrobacter spp.* (12.09%), *Pseudomonas fragi* (9.02%),

收稿日期: 2013-06-13

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2013BAD19B06); 上海市科委工程中心建设项目(11DZ2280300); 上海海洋大学博士启动基金项目(A-2400-11-0202)。

作者简介: 蓝蔚青(1977—), 男, 福建闽侯人, 工学博士, 高级工程师, 主要从事食品冷冻与冷藏方面的研究。E-mail: wqlan@shou.edu.cn

* 通信作者: 谢晶(1968—), 女, 浙江嵊州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品冷冻与冷藏方面的研究。

E-mail: jxie@shou.edu.cn

Pseudomonas fluorescens (8.53%) and *Shewanella putrefaciens* (6.39%). A few percent of *Enterobacter agglomerans*, *Microbacterium esteraromaticum* and *Kocuria rhizophila* were also found. The growth of *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus sciuri* were inhibited during storage at low temperature, then the composition of bacteria flora gradually became simple, and the percent of gram negative bacteria which were suitable for low temperature increased significantly. The gram negative bacteria were 83.82%, 95.86%, 96.88% and 93.57% in the period of 3rd, 5th, 7th, 9th day respectively, indicating *Pseudomonas spp.* (45.71%) and *Shewanella putrefaciens* (33.57%) were the most predominated spoilage bacteria of *Pampus argenteus* stored at (4±1) °C. The species changes of *Pseudomonas spp.* indicated that the major species were *Pseudomonas fluorescens* (35.00%) and *Pseudomonas fragi* (10.71%).

Keywords: *Pampus argenteus*, chilled storage, dominated spoilage bacteria, bacterial flora

水产品在贮藏流通过程中, 由于受到温度、微生物等多种因素的影响, 鲜度极易下降。国内外学者对水产食品中腐败微生物进行了深入研究, 目前已明确在多数情况下, 水产食品中仅有部分微生物参与腐败过程^[1]。因鱼种、栖息水域、捕获方式、贮藏条件等不同, 细菌种群和数量的变化亦存在差异。鲜鱼在贮藏期间细菌种群会不断变化, 某些细菌适应此贮藏条件逐渐占据优势地位, 并产生腐败臭味和异味等代谢产物, 这些细菌就是该产品的特定腐败菌 (Specific Spoilage Organism, SSO)^[2]。由于各种细菌的腐败能力及产生的代谢产物不同, 造成对产品不同的腐败作用, 因此研究其腐败过程不仅需要研究细菌数量的变化, 还需掌握细菌种类的变化^[3]。

近几年, 国外正逐步对此关注, 国内也有少数相关报道。崔正翠^[4]等对大菱鲆在不同温度冷藏过程中的细菌菌相作定性定量分析。王焕庆^[5]等研究了高水分烤虾在贮藏期间的品质变化, 并对其菌相进行分析。裘迪红^[6]等通过生理生化鉴定法对梭子蟹冷藏期间体内的腐败菌菌相变化作了初步研究。杨宪时^[7]等对罗非鱼冷藏过程中的细菌种群变化开展实验研究, 刘寿春^[8]等人分析了刚捕获淡水养殖罗非鱼体表不同部位和养殖池水的细菌菌相。李新林^[9]等采用纳米银涂膜技术研究了其对微波冻干鲍鱼微生物的影响。郭全友^[10]等从菌落和细胞形态、生理生化特征、细胞脂肪酸组成及同源性分析等方面确定了冷藏养殖大黄鱼的优势腐败菌。作者以鲳鱼为研究对象, 在进行常规指标测定的同时, 将传统微生物分离纯化、生理生化反应与 16S rDNA 分子鉴定技术相结合, 探讨鲳鱼冷藏过程中不同种

类细菌的变化规律, 确定导致其腐败变质的优势腐败菌, 研究结果将为进一步阐明特定优势腐败菌和靶向抑制鲳鱼腐败奠定基础, 也为水产品微生物的快速鉴定技术方法的开发提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料 鲳鱼 (*Pampus argenteus*): 1 月购于上海市浦东新区芦潮港码头水产市场, 条重 0.25~0.50 kg, 选择体型较大, 色泽光亮, 肉质较硬, 无异味的鲜鲳鱼为试验原料。

1.1.2 药品与试剂 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA): 上海市疾病预防控制中心; 胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB): 上海市疾病预防控制中心; 2×Taq PCR Master Mix: 日本 TaKaRa BIO 株式会社; 引物 27f、1492r: 生工生物工程 (上海) 有限公司; TAE 电泳缓冲液 (50×TAE): 生工生物工程 (上海) 有限公司; Biospin 细菌基因组 DNA 提取盒: 生工生物工程 (上海) 有限公司; 革兰氏染液: 杭州天和生物制剂有限公司; 芽孢染色液: 杭州天和生物制剂有限公司; 微生物生理生化微量鉴定管: 杭州天和生物制剂有限公司; NaCl、溴化乙锭染色液 (EB)、6×Loading Buffer、Marker: λDNA /Hind III、100 bp DNA Ladder、琼脂糖等: 上海市疾病预防控制中心。

1.1.3 主要仪器与设备 THZ-82A 型气浴恒温振荡器: 江苏金坛市环宇科学仪器厂; 隔水式恒温培养箱: 上海一恒科技有限公司; SANYO MLS-3750 高压灭菌锅: 日本三洋; LDZX-75KBS 立式压力蒸汽灭菌器: 上海申安医疗器械厂; DHG-9053A 型电

热鼓风干燥箱:上海一恒科学仪器有限公司;VS-1300L-U 型标准超净工作台:苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;MiniSpan Plue 微型高速离心机:杭州奥盛仪器有限公司;DK-8D 型电热恒温水槽:上海一恒科学仪器有限公司;TC-24/H(b)型基因扩增仪:杭州博日科技有限公司;DYY-6C 型电泳仪:北京市六一仪器厂;Disrupter genie:美国 GENIE 公司;Bio-Rad 凝胶成像系统:美国伯乐公司;Cavli ZEISS 荧光显微镜;蔡司光学仪器(上海)国际贸易有限公司等。

1.2 实验方法

1.2.1 原料处理 将买来的鲳鱼放入准备好的碎冰中,用冰水清洗。将清洗后的鲳鱼去头、去尾、去内脏处理,并进行切块,每块约重 40 g,随机分组,放入 PE 保鲜袋,在 (4 ± 1) °C 的冰箱中贮藏。

1.2.2 感官评价 依据鲜、冻鲳鱼标准^[11],由受专门培训的 5 人组成感官评定小组,根据鲳鱼感官评定表^[12]对样品的色泽、气味、组织形态与组织弹性等进行综合评分,最后取其综合评分值,见表 1。

表 1 鲳鱼感官评定表

Table 1 Sensory evaluation of pomfret fillet

项目	好(5 分)	较好(4 分)	一般(3 分)	较差(2 分)	差(1 分)
色泽	色泽正常,肌肉切面富有光泽	色泽正常,肌肉切面有光泽	色泽稍暗淡,肌肉切面稍有光泽	色泽较暗淡,肌肉切面无光泽	色泽暗淡,肌肉切面无光泽
气味	本种类固有的香味清新	固有香味较清晰	固有香味清淡,略带异味	香味消失,有腥臭味或氨臭味	有强烈腥臭味或胺味
组织形态	肌肉组织致密完整,纹理清晰	肌肉组织紧密,纹理较清晰	肌肉组织不紧密,但不松散	肌肉组织不紧密,局部松散	肌肉组织不紧密,松散
组织弹性	坚实富有弹性,手指压后凹陷立即消失	坚实有弹性,手指压后凹陷较快消失	较有弹性,手指压后凹陷消失较慢	稍有弹性,手指压后凹陷消失很慢	无弹性手指压后凹陷不消失

1.2.3 pH 值 取绞碎鱼肉 10.00 g 于烧杯中,加入新鲜煮沸后已冷却的蒸馏水,定容至 100 mL,搅拌均匀,静置 30 min 后,用 pH 计进行测定。

1.2.4 菌落总数 (aerobic plate count, APC) 根据国家标准 GB 4789.2-2010 中食品微生物学检验菌落总数的测定方法^[13]进行测定。选 3 个合适的稀释度,每个稀释度 3 组平行。

1.2.5 菌株分离鉴定 通过纯培养方法得到多个不同形态的单菌菌落,根据菌落外观与菌体镜检形态对细菌进行初步分类,计算同一种菌落的个数。

1) 菌落与细胞形态观察:对分离纯化得到的单菌菌落进行形态观察记录与菌落计数,主要包括菌落大小、形态、颜色、质地、菌落隆起度、边缘结构、表面形态、光泽度与透明度等,并结合革兰氏染色与芽孢染色,观察菌株个体形态,包括细胞形状与细胞间的排列方式等,对细菌种类进行初步分类,计算在不同贮藏时间的同一类菌落个数。挑选菌落数合适(30~300 个菌落)的计数平板,随机挑取包含不同种类的 50 个典型单一菌落,平板划线法反复进行分离纯化 3 次,得到的纯化菌株保存于试管斜面培养基上,以备鉴定。

2) 分类保存:根据菌落特征和形态学特征,首

先将在不同贮藏时间挑选出来的菌株依次作好标记,进行分组归类,再将各组菌株进行纯培养,重复以上比较。将菌落特征和形态学特征有差异的重新标记分类,再进行纯培养,重复以上操作 3 次,分离得到纯菌株,每一种纯菌株作 2 组平行,记录细菌的形态特征。

1.2.6 单细菌 DNA 提取与纯化 将经过反复分离纯化,进行初步生理生化鉴定得到的纯菌株接种到 TSB 中。在 37 °C、170 r/min 的摇床中培养 17 h,处于对数生长期的细菌培养液取 10 mL,4 °C、10 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,将细菌-20 °C 保存,用于下一步提取 DNA^[14]。采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取纯化菌株的 DNA,同时增加了溶菌酶破壁。提取出的 DNA 编号后,置于-20 °C 冰箱中保存备用。

1.2.7 16S rDNA 片段的 PCR 扩增 以提取的细菌基因组 DNA 为模板,选用细菌通用引物,正向引物为 27f,反向引物为 1492r。

正向引物 27f:5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

反向引物 1492r:5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'

PCR 扩增采用 25.0 μL 体系, 反应条件为 12.5 μL 2 $\times$ Taq PCR Master Mix; 1.0 μL 正向引物; 1.0 μL 反向引物; 1.0 μL DNA 模板; 9.5 μL ddH₂O。反应步骤为: a) 94 $^{\circ}\text{C}$ 热启动 5 min; b) 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; c) 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min; d) 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min; e) 72 $^{\circ}\text{C}$ 复性 2 min; f) 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 重复步骤 c、d、e 25 次。使用 1.0 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 扩增产物, 产物约为 1 500 bp。使用北京天根生物工程有限公司的 DNA 纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化, 获得的纯化产物送生工生物工程(上海)有限公司测序。

1.2.8 系统发育树分析 测序得到菌株部分长度的 16S rDNA 序列(约 1 460 bp), 将测序结果登陆 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), 通过 Blast 程序与 GenBank 中的核酸序列进行比对, 从中选出相似性较高的序列, 应用 Chromas version 1.62 和 DNAMAN version 6.0 软件进行多重比较后构建系统发育树。

1.2.9 生理生化鉴定分析 参照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[14] 和东秀珠、蔡妙英编著的《常见细菌系统鉴定手册》^[15] 对分类得到的纯菌株进行生理生化鉴定, 主要包括: O/F、尿素利用、丙二酸盐利用与糖醇类发酵实验等。

2 结果与讨论

2.1 冷藏鲳鱼贮藏期间各指标的变化

参照鲜鲳鱼国标^[10]规定, 细菌总数 $\leq 4 \lg \text{CFU/g}$ 为一级鲜度, $4 \lg \text{CFU/g} < \text{细菌总数} \leq 7 \lg \text{CFU/g}$ 为二级鲜度。由表 2 可见, 在冷藏的第 3 天与第 5 天, 冷藏鲳鱼的细菌总数先后超过了一级与二级鲜度, 细菌总数分别达 $6.523 \lg \text{CFU/g}$ 与 $7.677 \lg \text{CFU/g}$,

在冷藏的第 9 天, 其细菌总数已高达 $9.137 \lg \text{CFU/g}$, 样品完全腐败。贮藏期间, 鲳鱼的感官品质发生明显变化, 在贮藏的第 5 天, 其体表色泽暗淡, 切面无光泽, 肉质松散, 固有色泽消失, 产生异味。鲳鱼在捕捞后, 鱼体内相继经历僵硬、自溶腐败两个过程, pH 值在僵硬期内持续下降, 在腐败期间持续上升^[16], pH 值越高, 表明样品的腐败程度相对越严重, 鱼体鲜度也发生着相应变化。从菌落总数的数值变化程度和趋势来看, 符合鲳鱼在冷藏条件下的腐败规律, 分离纯化所选的时间点具有代表性。

表 2 冷藏鲳鱼贮藏期间感官分值、pH 值与菌落总数变化
Table 2 Changes of sensory evaluation, pH value and APC in *Pampus argenteus* during chilled storage

贮藏时间/d	感官分值	pH 值	菌落总数的 lg 值
1	4.750 $\pm$ 0.129	7.217 $\pm$ 0.015	3.967 $\pm$ 0.012
3	3.375 $\pm$ 0.222	7.157 $\pm$ 0.015	6.523 $\pm$ 0.012
5	2.400 $\pm$ 0.605	7.677 $\pm$ 0.015	7.447 $\pm$ 0.025
7	1.625 $\pm$ 0.479	7.933 $\pm$ 0.071	8.307 $\pm$ 0.030
9	0.700 $\pm$ 0.283	8.057 $\pm$ 0.005	9.137 $\pm$ 0.032

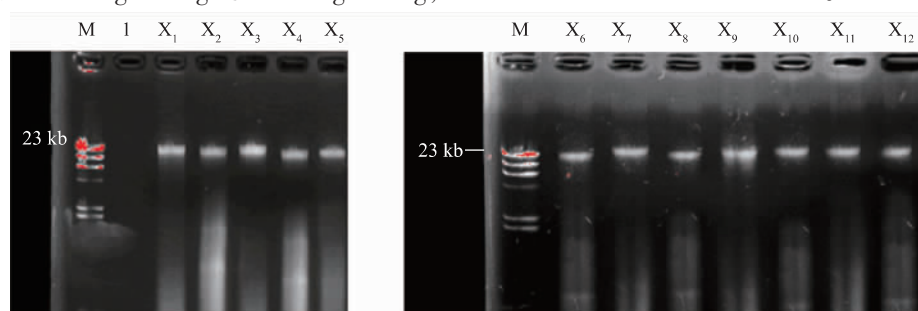
注: N_{APC} —菌落总数, CFU/g

2.2 冷藏鲳鱼的细菌菌落特征

采用稀释平板分离法和划线分离法, 经过 3 次以上的比较分组与归类计数, 共从不同贮藏时间的冷藏鲳鱼样品中主要分离出 12 种典型菌, 分别命名为 $X_1, X_2, \dots, X_{12}$, 其菌落与细菌的基本特征见表 3。

2.3 单菌落 DNA 的提取

对分离得到的 12 种未知菌株进行单细菌 DNA 提取, 提取结果通过 1.0 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果发现在 23 kb 左右出现条带, 表明已获得较为完整微生物基因组的 DNA, 图 1 为 12 种主要代表性菌株的 DNA 电泳图谱。



(M: λ DNA /Hind III, LANE1: 阴性对照)

图 1 12 种菌株的 DNA 电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic analysis of DNA from twelve samples

表 3 冷藏鲳鱼贮藏期间的细菌特征分析

Table 3 Analysis of the properties of bacteria on *Pampus argenteus* during chilled storage

编号	形状	革兰氏染色	芽孢有无	细菌形状	菌落形状	菌落颜色	菌落隆起度	菌落表面状态	菌落光泽	菌落边缘状态	菌落干湿程度	菌落透明度
X ₁	球形	G ⁻	无		圆形	乳白色	凸起	光滑	有光泽	光滑	湿润	半透明
X ₂	短杆形	G ⁻	无		圆形	浅黄色	凸起	光滑	有光泽	光滑	湿润	半透明
X ₃	中杆形	G ⁻	无		圆形	无色	凸起	光滑	有光泽	光滑	湿润	透明
X ₄	短杆形	G ⁻	无		圆形	浅棕色	凸起	光滑	有光泽	光滑	湿润	半透明
X ₅	短杆形	G ⁻	无		圆形	白色	凸起	光滑	有光泽	光滑	湿润	半透明
X ₆	球形	G ⁺	无		圆形	乳白色	凸起	光滑	有光泽	光滑	湿润	半透明
X ₇	球形	G ⁺	无		圆形	白色	凸起	光滑	有光泽	光滑	湿润	半透明
X ₈	短杆形	G ⁺	无		圆形	黄色	凸起	光滑	有光泽	光滑	湿润	半透明
X ₉	球形	G ⁺	无		圆形	橘红色	凸起	光滑	有光泽	光滑	湿润	半透明
X ₁₀	短形	G ⁺	无		圆形	白色	凸起	光滑	有光泽	光滑	湿润	半透明
X ₁₁	中短杆形	G ⁺	有		圆形	浅黄色	凸起	干燥	有光泽	光滑	湿润	半透明
X ₁₂	短杆形	G ⁺	无		圆形	橘黄色	凸起	光滑	有光泽	光滑	湿润	半透明

2.4 菌株的 16S rDNA 基因序列

通过引物 27f 和 1492r 对 12 株活化菌进行 16S 全长序列的 PCR 扩增,均得到重复性好且稳定、清晰的特异性条带,片段大小为 1 500 bp 左右,电泳图谱结果见图 2。

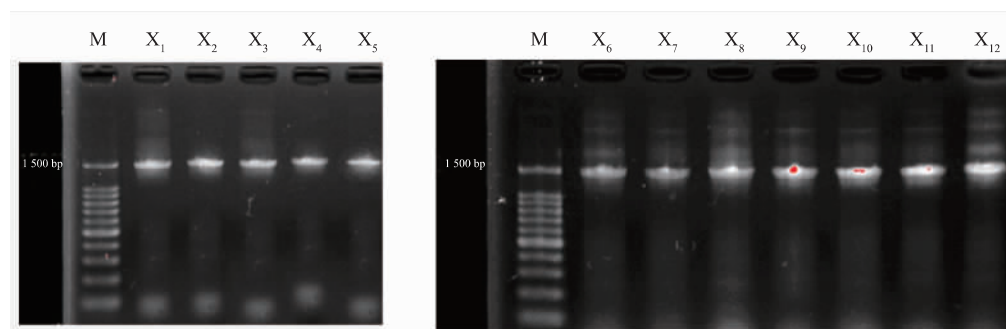
2.5 系统发育树分析

将 12 株分离细菌所获得的 16S rDNA 序列提交 NCBI,获得它们在 GenBank 数据库中的临时登

录号。通过 BLAST 软件与 GenBank 中已发表的 16S rDNA 序列进行同源性比较分析。

2.6 生理生化鉴定分析

鲳鱼冷藏货架期结束时,其菌相趋于简单,贮藏期间的主要优势菌为 X₁ 与 X₂ 两种,通过对冷藏鲳鱼贮藏期间 12 种主要优势菌株进行生理生化鉴定,其各项生理生化指标结果见表 4。



(M: 100 bp DNA Ladder)

图2 12种菌株的16S rDNA电泳图谱

Fig. 2 Electrophoretic analysis of PCR amplification products of the 16S rDNA gene fragments from twelve samples

表4 冷藏鲳鱼贮藏期间主要优势菌的生理生化特征

Table 4 Physiological and biological test of the dominant bacteria on *Pampus argenteus* during chilled storage

细菌编号	蔗糖	山梨醇	乳糖	麦芽糖	甘露糖	木糖	甘露醇	尿素	Hugh-Leifson(OF)	丙二酸盐	精氨酸双水解酶	细菌种类
X ₁	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	-	嗜冷杆菌
X ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	草莓假单胞菌
X ₃	-	-	-	-	-	NT	-	-	+	-	+	荧光假单胞菌
X ₄	+	NT	+	-	+	+	+	-	-	-	+	腐败希瓦氏菌
X ₅	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	成团肠杆菌
X ₆	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	腐生葡萄球菌
X ₇	+	+	-	+	-	-	NT	+	+	-	+	松鼠葡萄球菌
X ₈	-	-	-	NT	-	-	-	-	+	-	+	微杆菌
X ₉	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	嗜根库克菌
X ₁₀	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	热杀索丝菌
X ₁₁	+	+	-	+	NT	-	-	+	-	-	+	蜡样芽孢杆菌
X ₁₂	NT	-	-	-	-	-	-	-	NT	-	-	金黄杆菌

注:+:大多数(≥90%)菌株为阳性;-:大多数(≥90%)菌株为阴性,NT为未实验

参照 GenBank 比对的结果作相应的生理生化实验(表4),依据主要的生理生化反应和菌落特征,可判断出 X₁ 为嗜冷杆菌属(*Psychrobacter* spp.)中的一种,X₂ 与 X₃ 分别为假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)细菌,X₄ 为希瓦氏菌属(*Shewanella* spp.)中的一种,X₅ 为成团肠杆菌属(*Enterobacter* spp.)中的细菌,其余7种菌均在PCR扩增测序结果比对的基础上,结合生理生化鉴定与系统进化树分析加以鉴别得出其各自属种,可得 X₁ 为嗜冷杆菌(*Psychrobacter* spp.),X₂ 为草莓假单胞菌(*Pseudomonas fragi*),X₃ 为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*),X₄ 为腐败希瓦氏菌

(*Shewanella putrefaciens*),X₅ 为成团肠杆菌(*Enterobacter agglomerans*),X₆ 为腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*),X₇ 为松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus sciuri*),X₈ 为微杆菌(*Microbacterium esteraromaticum*),X₉ 为嗜根库克菌(*Kocuria rhizophila*),X₁₀ 为热杀索丝菌(*Brochothrix thermosphacta*),X₁₁ 为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),X₁₂ 为金黄杆菌(*Chryseobacterium* spp.)。

2.7 鲳鱼冷藏过程中的菌相组成及变化情况

根据对12种菌株的PCR扩增测序与生理生化鉴定结果,分别对不同天次的鲳鱼样品,经反复分离纯化与比较分类的典型菌株进行计数,并计算各

自所占比例,结果见表5。

表5 鲳鱼冷藏过程中的细菌变化与组成比例

Table 5 Proportion of bacteria changes and composition of *Pampus argenteus* during chilled storage

细菌种类	比例/%				
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
革兰氏阴性菌(G ⁻)	45.92	83.82	95.86	96.88	93.57
X ₁ 嗜冷杆菌	12.09	57.24	60.90	2.60	14.29
X ₂ 草莓假单胞菌	9.02	10.87	7.46	12.50	10.71
X ₃ 荧光假单胞菌	8.53	3.14	6.82	9.38	35.00
X ₄ 腐败希瓦氏菌	6.39	12.57	20.68	72.40	33.57
X ₅ 成团肠杆菌	9.89	0.00	0.00	0.00	0.00
革兰氏阳性菌(G ⁺)	54.08	16.18	4.14	3.12	6.43
X ₆ 腐生葡萄球菌	27.20	12.65	0.00	0.00	0.00
X ₇ 松鼠葡萄球菌	15.38	0.00	0.00	0.00	0.00
X ₈ 微杆菌	5.49	0.00	0.00	0.00	0.00
X ₉ 嗜根库克菌	4.40	0.00	0.00	0.00	0.00
X ₁₀ 热杀索丝菌	0.00	0.00	0.00	3.12	6.43
X ₁₁ 蜡样芽孢杆菌	1.61	0.00	0.00	0.00	0.00
X ₁₂ 金黄杆菌	0.00	0.00	4.14	0.00	0.00

由表5可知,鲳鱼样品在货架期终点时都是革兰氏阴性菌占绝对优势,达到93.57%,这一结果与Hubbs^[16]的研究一致。冷藏鲳鱼在货架期终点时,其主要微生物的种类与所占比例依次为:荧光假单胞菌(35.00%)、腐败希瓦氏菌(33.57%)、嗜冷杆菌(14.29%)、草莓假单胞菌(10.71%)、热杀索丝菌(6.43%),其中荧光假单胞菌与腐败希瓦氏菌为鲳

鱼冷藏期间的优势腐败菌。在鲳鱼冷藏过程中,随贮藏时间的延长,细菌种类趋于稳定。

3 结 语

冷藏货架期结束时,鲳鱼的主要优势腐败菌为荧光假单胞菌与腐败希瓦氏菌。荧光假单胞菌为假单胞菌科假单胞菌属杆菌,不产芽孢,革兰氏染色阴性,其广泛分布于自然界,如土壤、水、植物及动物活动环境中。在贮藏末期,其所占比例达到35.0%,其种类所占比例高低为荧光假单胞菌>草莓假单胞菌。腐败希瓦氏菌大量存在于水和土壤中,水产品携带较多,此前也将希瓦氏菌属归类到假单胞菌属,被称为腐败交替假单胞菌。Gill^[17]等人研究认为假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)和希瓦氏菌属(*Shewanella* spp.)是冷链流通中高水分蛋白食品的特定腐败菌。贮藏过程中腐败希瓦氏菌会产生H₂S和不良气味,同时导致肉变色、发粘,这可能是鲳鱼腐败的一个主要原因。本研究结合细菌的生理生化反应和16S rDNA序列比对的方法,初步鉴定了鲳鱼在冷藏过程中的细菌组成。然而,采用传统的微生物学方法与PCR技术相结合的技术也存在着不少缺点,细菌的分类鉴定不但耗时费力,而且对部分细菌的鉴定仍然困难重重^[18-19],传统方法很难全面反映污染微生物多样性的全貌,具有一定的局限性和盲目性^[20-21]。后期,课题组还将通过PCR-DGGE指纹图谱技术,深入探讨冷藏鲳鱼贮藏期间主要微生物的演替规律,以期更加客观真实地反映冷藏鲳鱼贮藏过程中的微生物种群变化情况,为生鲜水产品的低温保藏研究奠定理论基础。

参考文献:

- [1] 王亮,曾名湧,董士远,等.不同包装方式的凡纳滨对虾冰温贮藏过程中腐败微生物的变化规律[J].食品与发酵工业,2010,36(3):196-201.
WANG Liang,ZENG Ming-yong,DONG Shi-yuan,et al.,Microbiological changes in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) of various packaging conditions during controlled freezing point storage [J]. **Food and Fermentation Industries**,2010,36 (3):196-201. (in Chinese)
- [2] Taoukis P S,Koutsoumanis K,Nychas G J E. Use of time temperature integrators and predictive modeling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions[J]. **International Journal of Food Microbiology**,1999,53:21-31.
- [3] 杨宪时,许钟,肖琳琳.水产食品特定腐败菌与货架期的预测和延长[J].水产学报,2004,28(1):106-111.
YANG Xian-shi,XU Zhong,XIAO Lin-lin. Specific spoilage organisms from aquatic product and prediction & prolongation of the shelf life[J]. **Journal of Fisheries of China**,2004,28(1):106-111. (In Chinese)
- [4] 崔正翠,许钟,杨宪时,等.冷藏大菱鲆细菌组成变化和优势腐败菌[J].食品科学,2011,32(13):184-187.
CUI Zheng-cui,XU Zhong,YANG Xian-shi,et al. Change of bacterial flora and predominant spoilage bacteria in *Scophthalmus*

- maximus* during chilled storage[J]. **Food Science**, 2011, 32(13):184-187. (In Chinese)
- [5] 王焕庆, 李学英, 杨宪时, 等. 高水分烤虾贮藏过程中的品质变化和菌相分析[J]. 食品与机械, 2012, 28(3):165-169.
WANG Huan-qing, LI Xue-ying, YANG Xian-shi, et al. Quality and bacterial phase changes of high-moisture roast shrimp during storage at different temperatures[J]. **Food & Machinery**, 2012, 28(3):165-169. (in Chinese)
- [6] 裘迪红, 杨文鸽, 薛长湖. 梭子蟹腐败菌菌相的初步分析[J]. 食品科技, 2005, 8:33-35.
QIU Di-hong, YANG Wen-ge, XUE Chang-hu. Microflora of *Portunus trituberculatus* [J]. **Food Science and Technology**, 2005, 8:33-35. (in Chinese)
- [7] 杨宪时, 郭全有, 许钟. 罗非鱼冷藏过程细菌种群的变化[J]. 中国水产科学, 2008, 11:1050-1054.
YANG Xian-shi, GUO Quan-you, XU Zhong. Bacterial species changes in cultured tilapia during chilled storage [J]. **Journal of Fishery Sciences of China**, 2008, 11:1050-1054. (in Chinese)
- [8] 刘寿春, 周康, 钟赛义, 等. 淡水养殖罗非鱼中病原菌和腐败菌的分离与鉴定初探[J]. 食品科学, 2008, 5:327-331.
LIU Shou-chun, ZHOU Kang, ZHONG Sai-yi, et al. Isolation and identification of pathogens and spoilage bacteria on cultured hybrid tilapia[J]. **Food Science**, 2008, 5:327-331. (in Chinese)
- [9] 李新林, 张慙, 段续, 等. 纳米银涂膜对微波冻干鲍鱼微生物的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(1):44-49.
LI Xin-lin, ZHANG Min, DUAN Xu, et al. Effect of nano-silver coating on microorganism control of microwave freeze-dried abalone[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(1):44-49. (in Chinese)
- [10] 郭全友, 杨宪时, 许钟. 冷藏罗非鱼优势腐败菌的鉴定及其特征[J]. 食品与机械, 2009, 25(3):87-90.
GUO Quan-you, YANG Xian-shi, XU Zhong. Characterization and identification of dominated spoilage organism of chilled tilapia[J]. **Food & Machinery**, 2009, 25(3):87-90. (in Chinese)
- [11] SC/T 3103-2010, 鲜、冻鲳鱼[S].
- [12] 黄晓春, 侯温甫, 杨文鸽, 等. 冰藏过程中美国红鱼生化特性的变化[J]. 食品科学, 2007, 28(1):337-340.
HUANG Xiao-chun, HOU Wen-pu, YANG Wen-ge, et al. Study on changes of biochemical properties of *Sciaenops ocellatus* during frozen storage[J]. **Food Science**, 2007, 28(1):337-340. (in Chinese)
- [13] GB 4789.2-2010, 食品安全国家标准——食品微生物学检验菌落总数的测定[S].
- [14] 希坎南 R E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1989.
- [15] 东秀珠, 蔡妙英, 王宝玲, 等. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [16] Manju S, Jose L, Srinivasa Gopal T K, Ravishankar, et al. Effects of sodium acetate dip treatment and vacuum-packaging on chemical, microbiological, textural and sensory changes of Pearls spot (*Etroplus suratensis*) during chill storage[J]. **Food Chemistry**, 2007, 102(9):27-35.
- [17] Gill C O, Badoni M, Jones T. Hygienic effects of trimming and washing operations in a beef carcass dressing process [J]. **Journal of Food Protection**, 1996, 59:666-669.
- [18] Amann R I, Ludwig W, Schlefer K H. Phylogenetic identification in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. **Microbiology Reviews**, 1995, 59(1):143-169.
- [19] Pace N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere[J]. **Science**, 1997, 276(5313):734-740.
- [20] Jay J M, Vilai J P, Hughes M E. Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5~7 °C[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2003, 81:105-111.
- [21] Gill C O. Extending the storage life of raw[J]. **Meat Science**, 1996, 43(1):99-109.