

养殖大黄鱼细菌菌群分离鉴定与分析*

郭全友^{1,2} 杨宪时¹ 许 钟^{1**}

(中国水产科学研究院东海水产研究所农业部海洋与河口渔业重点开放实验室 上海 200090)¹

(上海水产大学食品学院 上海 200090)²

摘要: 对新鲜大黄鱼感官、化学、微生物品质和细菌菌群组成进行定性和定量分析。结果表明, 细菌总数为 $5.51 \pm 0.25 \log_{10} \text{cfu/g}$, 挥发性盐基氮为 $7.84 \pm 2.25 \text{mg/100g}$ 。分离获得 279 株细菌, 84.2% 是革兰氏阴性菌, 少量革兰氏阳性菌被检出 (6.1%)。优势菌群是肠杆菌科 (14.7%)、气单胞菌属 (12.5%)、不动杆菌属 (11.5%)、摩氏杆菌属 (11.1%), 并出现了一定比例的假单胞菌属、嗜麦芽窄食单胞菌和其他细菌。肠杆菌科出现较多, 表明大黄鱼细菌污染主要来自养殖海区, 受非原有菌污染较重, 应引起重视。

关键词: 养殖大黄鱼, 细菌菌群, 分离鉴定, 优势菌

中图分类号: S994.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0092-06

Analysis, Isolation and Identification of Bacterial Flora on Cultured *Pseudosciaena crocea**

GUO Quan-You^{1,2} YANG Xian-Shi¹ XU Zhong^{1**}

(East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key and Open Laboratory of Marine Estuarine Fisheries, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090)¹

(Food Science College of Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)²

Abstract: Sensory, chemical, microbiological quality and bacterial flora on fresh *Pseudosciaena crocea* were qualitatively and quantitatively investigated. The results showed that total viable counts and total volatile basic nitrogen reached $5.51 \pm 0.25 \log_{10} \text{cfu/g}$, $7.84 \pm 2.25 \text{mg/100g}$ respectively. 279 strains of bacteria were isolated and 84.2% of them were gram negative bacteria, a small percentages of gram positive bacteria were detected (6.1%). The predominant bacterial floras were composed of Enterobacteriaceae (14.7%), *Aeromonas* spp. (12.5%), *Acinetobacter* spp. (11.5%) and *Moraxella* spp. (11.1%). A few percent of *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* and other bacteria were also found. The high number of Enterobacteriaceae showed that bacterial contamination on *Pseudosciaena crocea* was mainly from cultural water field and polluted seriously by non-borne bacteria, and it should be paid attention to.

Key words: Cultured *Pseudosciaena crocea*, Bacteria flora, Isolation and identification, Predominant bacterial

水产品微生物安全日益受到重视, 国内外对养殖鱼类、虾类和贝类细菌菌群组成进行了研究^[1-3], 但未见有关养殖大黄鱼细菌学研究的报道。大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 是我国六大优势养殖水产品之一, 产区主要集中在福建闽东, 年产量在 $3 \sim 4 \times 10^4 \text{t}$, 约占全国总产量的 70%。本研究在对其鲜度品质研究的基础上, 重点对细菌菌群进行分离、鉴定和分析, 为客观了解大黄鱼和养殖环境的卫生状况, 确定相应改进措施提供依据。

* 农业部引进国际先进农业科学技术项目资助 (No. 2001-478)

** 通讯作者 Tel: 021-65678984, E-mail: yangxianshi@hotmail.com

收稿日期: 2005-09-02, 修回日期: 2005-10-26

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 采集：样品 1、3 捕获于福建省宁德市三都湾（N26°35' ~ 26°55'）养殖场，立即放入冰水中冷休克。选用大小基本一致的个体（300 ~ 400g/尾），加冰保藏（0℃ ~ 1℃），2 ~ 3d 运达上海实验室；样品 2 由福建宁德市宇杰水产有限公司提供，样品 4 购自上海市铜川路水产品批发市场，产地均为宁德市三都湾，距离捕获时间不详，鲜度符合鲜品要求。

1.1.2 处理：随机取 2 尾试样鱼，先进行生鱼感官评价，然后去鳞去内脏去腮洗净，用干净吸纸擦干。沿脊骨剖切，取半条鱼肉（带鱼皮），用组织捣碎机打碎，用于挥发性盐基氮（TVBN）和细菌总数（TVC）测定；其余半条鱼煮熟后用于感官评价。

1.2 品质评价

1.2.1 感官和化学指标：由 6 名经过训练的评价员组成感官评价小组，评价生鱼的气味和煮熟后鱼的气味和味道，评定方法参照文献[4]。按照 GB/T5009.44 ~ 1996 测定 TVBN。

1.2.2 细菌总数：称取打碎鱼肉 10.0g，加入 90mL 0.1% 蛋白胨无菌生理盐水，高速振荡后，以 10 倍稀释，取 3 个浓度合适的稀释液 0.1mL，涂布于盐份含量适当调整过的标准培养基（上海昆虫科技开发公司）表面。每个稀释液涂布 2 个平皿，25℃ 培养 48h。

1.3 细菌分离、培养与鉴定

挑选菌数合适（30 ~ 100 株）的计数平板，分离纯化整个平板的所有菌株，25℃ 培养 24 ~ 48h。参照《常见细菌系统鉴定手册》^[5]、海产鱼类细菌鉴定图^[6]，综合菌落形态学、细胞形态学、生理生化等特征进行鉴定；生理生化等特征采用传统方法与英国微生物鉴定分析仪（Sensitire Automated Microbiology System）相结合进行测定。

2 结果

2.1 鲜度品质

新鲜健康鱼类肌肉呈无菌状态，来自栖息水域的微生物主要分布在鱼腮、鱼体表面及肠内，菌数主要受生长环境（如温度、盐度）的影响。表 1 显示 TVBN 为 5.04 ~ 10.36 mg/100g，平均值为 7.84mg/100g；细菌总数为 5.21 ~ 5.81log₁₀cfu/g，平均值为 5.51log₁₀cfu/g，第 2、3 批样品捕获时水温较第 1、4 批低，但细菌数变化不显著；第 2、4 批样品运达实验室时感官品质略差。

表 1 新鲜大黄鱼感官、化学、微生物品质

样品	地点	时间	产地水温（℃）	感官品质	TVBN（mg/100g）	TVC（lg cfu/g）
1	福建	2004.09	27.2 ~ 28.7	0.2	8.65 ± 0.04	5.52 ± 0.41
2	上海	2004.12	4.3 ~ 20.2	0.4	10.36 ± 0.12	5.81 ± 0.51
3	福建	2005.03	10.5 ~ 11.1	0.0	5.04 ± 0.12	5.21 ± 0.38
4	上海	2005.07	24.7 ~ 28.8	0.4	7.31 ± 0.23	5.48 ± 0.05
$\bar{X} \pm S. D$					7.84 ± 2.25	5.51 ± 0.25

2.2 细菌分类与鉴定

对分离获得的 279 株细菌进行分类与鉴定, 共分为 15 组, 第 1~13 组呈革兰氏阴性, 第 14、15 组呈革兰氏阳性; 第 1~3 组、第 5 组、第 7~10 组和第 13 组具有运动

表 2 革兰氏阴性细菌形态学、生理生化及营养特征鉴定结果

鉴定项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
形状	r	r	r	c/r	r	c/r	r	r	r	r	r	r	r
氧化酶	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
运动性	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
鞭毛	f	f	f	-	f	-	f	f	f	f	-	-	f
赖氨酸 7AMC	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
木糖	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
4MU + 磷酸盐	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
麦芽糖	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
脯氨酸 7AMC	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
阿拉伯糖	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
γ-谷氨酸盐 7AMC	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
丙二酸	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
尿素	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
FR12	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
海藻糖	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
4MU-α-D-吡喃葡萄糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
果糖	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
赖氨酸	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
精氨酸	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
丙酮酸	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
鸟氨酸	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
蔗糖	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
4MU-双磷酸盐	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
肌糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
色氨酸脱氨酶	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
色氨酸	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4MU-α-D-吡喃半乳糖	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
柠檬酸盐	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
山梨醇	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
4MU-β-葡萄糖醛酸化物	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
甘露醇	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
4MU-β-D-吡喃半乳糖	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
阿拉伯糖醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
棉子糖	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
纤维二糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
胍丁胺	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-

注: r 杆菌, c/r 球杆菌, f 鞭毛, FR12 为 4MU-2-乙酰氨基-2-脱氧吡喃葡萄糖 + 4MU-α-L-阿拉伯吡喃葡萄糖苷, 4MU 为 4-甲基-伞形酮, 7AMC 为 7-甲基-香豆素酰胺

性；显微镜油镜观察发现第 4、6 组呈球杆状，第 14 组呈球状，其他各组均呈杆状；生理生化、营养特征等鉴定结果见表 2、表 3。根据表 2、表 3，可以判定第 1~3 组均为肠杆菌科（Enterobacteriaceae），分别为爱德华菌属（*Edwardsiella* spp.）、阴沟肠杆菌（*Enterobacter cloacae*）、弗氏柠檬酸杆菌（*Citrobacter freundii*）。第 4~13 组依次为不动杆菌属（*Acinetobacter* spp.）、气单胞菌属（*Aeromonas* spp.）、摩氏杆菌属（*Moraxella* spp.）、假单胞菌属（*Pseudomonas* spp.）、嗜麦芽窄食单胞菌（*Stenotrophomonas maltophilia*）、腐败希瓦氏菌（*Shewanella putrefaciens*）、缺陷短波胞单胞菌（*Brevendimonas diminuta*）、嗜冷杆菌属（*Psychrobacter* spp.）、稳杆菌属（*Empedobacter* spp.）和弧菌属（*Vibrio* spp.）。依据表 3、表 4 判断第 14、15 组分别为玫瑰小球菌（*Micrococcus rose*）和棒状杆菌属（*Corynebacterium* spp.）。

表 3 革兰氏阳性细菌形态学、生理生化及营养特征鉴定结果

鉴定项目	14	15	鉴定项目	14	15
形状	c	r	运动性	-	-
过氧化氢酶	+	+	鞭毛	-	-
尿素酶	-	+	精氨酸	-	+
4MU-吡喃稀糖苷	-	-	丙氨酸 7AMC	+	+
4MU-β-D-吡喃葡萄糖	-	-	D-丙氨酸 7AMC	-	-
4MU-β-D-吡喃甘露糖	-	-	精氨酸 7AMC	-	-
4MU-α-D-吡喃葡萄糖	-	-	丙三醇	-	-
蛋氨酸 7AMC	+	-	蔗糖	-	-
丝氨酸 7AMC	+	-	瓜氨酸 7AMC	+	-
山梨醇	-	-	白氨酸 7AMC	+	+
七叶灵	-	-	4MU-β-D-吡喃半乳糖	-	-
鼠李糖	-	-	甘露糖醇	-	-
海藻糖	-	-	麦芽糖	-	-
鸟氨酸 7AMC	+	-	4MU-β-D-葡萄糖苷酸	-	-
胱氨酸 7AMC	+	-	苏氨酸 7AMC	+	+
葡萄糖	-	-	脯氨酸 7AMC	-	-
β-甲基葡萄糖苷	-	-	焦谷氨酸 7AMC	+	-
酪氨酸 7AMC	+	+	缬氨酸 7AMC	-	-

注：r 杆菌，c 球菌

2.3 细菌菌群组成

细菌菌群组成复杂，种类繁多，由于采样地点、时间等存在差异，所占比例亦有较大差异（表 4）。从样品 1 分离到 70 株菌，优势菌为嗜麦芽窄食单胞菌、不动杆菌属、肠杆菌科等；从样品 2 分离到 68 株菌，优势菌为假单胞菌属、嗜麦芽窄食单胞菌等；从样品 3 分离到 64 株菌，优势菌为不动杆菌属、肠杆菌科、摩氏杆菌属等；从样品 4 分离到 77 株菌，优势菌为气单胞菌属、肠杆菌科、摩氏杆菌属等。4 批样品综合分析显示，革兰氏阴性菌占总菌株数的 84.2%，优势菌群为肠杆菌科（14.7%），气单胞菌属（12.5%），不动杆菌属（11.5%）和摩氏杆菌属（11.1%）。

表 4 大黄鱼细菌菌群组成

组别	细菌	样品 1		样品 2		样品 3		样品 4		综合分析	
		菌株	(%)	菌株	(%)	菌株	(%)	菌株	(%)	菌株	(%)
革兰氏阴性菌		59	84.3	54	79.4	56	87.5	66	85.7	235	84.2
	肠杆菌科	10	14.3	6	8.8	10	15.6	15	19.5	41	14.7
1	爱德华菌属	-	-	-	-	6	9.4	5	6.5	11	3.9
2	阴沟肠杆菌	3	4.3	6	8.8	4	6.3	7	9.1	20	7.2
3	弗氏柠檬酸杆菌	7	10.0	-	-	-	-	3	3.9	10	3.6
4	不动细菌属	11	15.7	3	4.4	11	17.2	7	9.1	32	11.5
5	气单胞菌属	5	7.1	5	7.4	8	12.5	17	22.1	35	12.5
6	摩氏杆菌属	8	11.4	6	8.8	9	14.1	8	10.4	31	11.1
7	假单胞菌属	9	12.9	11	16.2	3	4.7	4	5.2	27	9.7
8	嗜麦芽窄食单胞菌	13	18.6	9	13.2	-	-	-	-	22	7.9
9	腐败希瓦氏菌	3	4.3	6	8.8	2	3.1	8	10.4	19	6.8
10	缺陷短波单胞菌	-	-	2	2.9	5	7.8	2	2.6	9	3.2
11	嗜冷杆菌属	-	-	4	5.9	6	9.4	-	-	10	3.6
12	稳杆菌属	-	-	-	-	2	3.1	5	6.5	7	2.5
13	弧菌属	-	-	2	2.9	-	-	-	-	2	0.7
革兰氏阳性菌		5	7.1	4	5.9	2	3.1	6	7.8	17	6.1
14	玫瑰小球菌	5	7.1	4	5.9	-	-	6	7.8	15	5.4
15	棒状杆菌属	-	-	-	-	2	3.1	-	-	2	0.7
	未鉴定	6	8.6	10	14.7	6	9.4	5	6.5	27	9.7
合计		70	100	68	100	64	100	77	100	279	100

3 讨论

海产鱼类细菌菌群组成与鱼类生存及捕获环境、季节、捕获方法相关，许多研究者认为鱼类栖息水域的温度和盐度是影响细菌菌群组成的主要因子。干净未污染的冷水、温水水域鱼类，非发酵革兰氏阴性菌为优势菌，如假单胞菌属、嗜冷杆菌属、摩氏杆菌属、不动杆菌属和黄杆菌属等^[1,7]，弧菌属和发光杆菌属也是典型海洋性细菌；Gillespie 等^[8,9]发现澳大利亚特和非洲等热带、暖带水域鱼优势菌群为微球菌属、芽孢杆菌属等革兰氏阳性菌，其他菌群与温带水域相似，例如尼日利亚拉各斯海岸新捕获的热带鱼 (*Pseudotolithus senegalensis*) 中微球菌属等革兰氏阳性菌比例约为 60%。然而，一些研究者^[10]发现热带鱼类与温带水域细菌菌群组成相似，革兰氏阳性菌和肠细菌含量稍高。本研究发现捕获于暖带水域的大黄鱼革兰氏阴性菌占 84.2%，出现一定比例的微球菌属和棒状杆菌属，其他菌群与温带水域鱼类相似，然而出现了较高数量的肠杆菌科和细菌总数，说明养殖海区受污染较重。

淡水鱼类和海水鱼类细菌菌群组成也存在差异，淡水鱼分离的细菌中非好盐菌比海产鱼检出比例高。气单胞菌属为非好盐性菌，最适生长温度为 20℃~35℃，0℃ 仍能生长，包含有对鱼类和人致病的种类，是淡水鱼的典型菌株，但气单胞菌属为海水养殖大黄鱼的优势菌，平均比例为 12.5%，可能因为养殖海区距岸近，岸上淡水与海水混和，海水盐度下降，利于其生长；其他需盐性细菌如希瓦氏菌属、摩氏杆菌属、不动杆菌属在淡水鱼中也常被检出^[1,7]。腐败希瓦氏菌是海洋性革兰氏阴性菌，假单胞菌

属是淡水鱼和海水鱼常见细菌, 比例分别为 6.8% 和 9.7%。弧菌是典型海洋性细菌, 多数是非致病性的, 样品中检出 2 株弧菌, 其腐败活性和是否具有致病性有待进一步研究。

参考文献

- [1] Gram L, Wedell N, Huss H H. *Int J Food Microbiol*, 1990, **10**: 303 ~ 316.
 - [2] 王国良, 金 珊, 於 宏, 等. *微生物学通报*, 2002, **29** (6): 9 ~ 11.
 - [3] 李志强, 何丽明, 吴 杰, 等. *微生物学通报*, 2005, **32** (6): 82 ~ 86.
 - [4] Jorgensen B R, Gibson D M, Huss H H. *Int J Food Microbiol*, 1988, **6**: 295 ~ 307.
 - [5] 东秀珠, 蔡妙英. *常见细菌系统鉴定手册 (第一版)*. 北京: 科学出版社, 2001.
 - [6] 須山三千三, 鴻巢章二. *水産食品学*. 東京: 恒星社厚生閣, 1987.
 - [7] 奥積昌世. *冷凍*, 1986, **61** (1): 120 ~ 130.
 - [8] Ola J B, Oladipo A E. *African Journal of Biomedical Research*, 2004, **7**: 13 ~ 17.
 - [9] Gillespie N C, Macrae I C. *Journal of Applied Bacteria*, 1975, **39**: 91 ~ 100.
 - [10] Surette M E, Joseph J, Shenoy A V, *et al.* *Fish Res*, 1999, **7**: 1 ~ 6.
- © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>