

冷藏罗非鱼特定腐败菌的鉴定和生长动力学

郭全友 许 钟 杨宪时*

(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)

摘要 对0、5和10℃冷藏养殖罗非鱼货架期终点的特定腐败菌进行定性和定量研究,并建立特定腐败菌的生长动力学模型。实验结果表明,0、5和10℃冷藏养殖罗非鱼货架期终点时,假单胞菌占总菌数比例分别为80.7%、68.1%和57.5%。该类菌在营养琼脂和胰酶解大豆胨琼脂培养基上菌落圆状隆起,边缘整齐,透明,无色;菌体为革兰氏阴性杆菌,极生单鞭毛,具有运动性,大小为(0.5~0.7)μm×(1.6~3.2)μm;氧化酶反应为阳性,不能利用海藻糖、棉子醇和甘露醇等;直链、支链、环丙基和羟基脂肪酸等被检出,富含单不饱和脂肪酸(50.18%),主要脂肪酸有16:1ω7c、iso-15:0、16:0和17:1ω8c,比例分别为26.16%、14.83%、7.96%和3.94%;Riboprinter测试其核糖体类型为56-S-7。采用修正的Gompertz方程拟合假单胞菌生长模型表明,0、5和10℃冷藏过程延滞时间分别为(59.63±61.88)、(7.25±24.06)和(3.95±9.83)h;最大比生长速率分别为(0.02±0.00)、(0.04±0.00)和(0.08±0.01)/h。

关键词 养殖罗非鱼 特定腐败菌 假单胞菌 生长动力学

中图分类号 S984 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)04-0117-07

Identification and growth dynamics of specific spoilage organisms in chilled tilapia

GUO Quan-you XU Zhong YANG Xian-shi*

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

ABSTRACT The specific spoilage organisms (SSO) in cultured tilapia at the end of shelf life during storage at 0, 5 and 10 °C were qualitatively and quantitatively investigated, and the growth model of SSO was established. The results indicated that the percentage of *Pseudomonas* spp. in total bacteria in the tilapia were 80.7%, 68.1% and 57.5% at the end of shelf life of tilapia stored at 0, 5 and 10 °C, respectively. Colonies of *Pseudomonas* spp. on nutrition agar and trypticase soy broth agar were circular apophysis with smooth edge, transparent and colourless; The cells were gram negative rod (0.5~0.7 μm×1.6~3.2 μm) and motile by means of polar flagellum; Positive for oxidation, but the strains could not assimilated trehalose, mannitol and raffinose, etc. A variety of acids were detected in these organisms, including branched and straight-chained acids, cyclopropane, and hydroxy acids. Unsaturated fatty acids comprised a large part of all fatty acids (50.18%), and the major ones were 16:1ω7c, iso-15:0, 16:0

国家自然科学基金项目(30771675)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2007M05)共同资助

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

收稿日期:2008-08-14;接受日期:2008-11-18

作者简介:郭全友(1974-),男,助理研究员,主要从事水产食品微生物安全和控制研究。E-mail: quanyouguo21@hotmail.com

and 17:1 ω 8c, which were 26.16%, 14.83%, 7.96% and 3.94% of total fatty acids, respectively. The type of ribosome of these bacteria was 56-S-7, as tested by Riboprinter. The growth dynamic for *Pseudomonas* spp. was fitted by modified Gompertz equation. The results showed that lag time reached (59.63 \pm 61.88), (7.25 \pm 24.06) and (3.95 \pm 9.83)h during storage at 0, 5 and 10 °C, respectively. The maximum specific growth rates for *Pseudomonas* spp. were (0.02 \pm 0.00)h⁻¹, (0.04 \pm 0.00)h⁻¹ and (0.08 \pm 0.01)h⁻¹ at 0, 5 and 10 °C, respectively.

KEY WORDS Cultured tilapia Specific spoilage organism *Pseudomonas* spp.
Growth dynamics

鱼类是极易腐败的食物,受各种生化和微生物等因子影响,鲜度极易下降。研究表明,冻结温度以上微生物活动是影响鱼类品质的最主要因素(Gram *et al.* 1996)。然而,并非水产食品所有的微生物对产品变化起到同种程度作用。鱼种、地理位置、季节、水域温度、捕获方式和贮藏条件等差异决定了特定腐败菌(SSO, Specific spoilage organisms)的腐败范围的差异性(Gram *et al.* 1996;杨宪时等 2004)。磷发光杆菌 *Photobacterium phosphoreum*、腐败希瓦氏菌 *Shewanella putrefaciens*、热杀索氏菌 *Brochothrix thermosphacta*、假单胞菌 *Pseudomonas* spp. 和气单胞菌 *Aeromonas* spp. 是温带水域鱼类的腐败菌(Gram *et al.* 1996;Lehane *et al.* 2000)。然而,腐败希瓦氏菌是冰藏海水鱼类的SSO,磷发光杆菌是气调包装鱼类的SSO,腐败希瓦氏菌和假单胞菌被认为是地中海温带水域冰藏鱼类的SSO。与肉和肉制品中相比,还未对不同贮藏条件下的鱼类SSO特性和鉴定进行充分研究(Edwards *et al.* 1987;Mossel *et al.* 2000;Stanbridge *et al.* 1998)。同时,假单胞菌是组种群和亚种间具有高的不同成分和生物多样性的细菌,然而许多假单胞菌组没有明确的分类或与其他种间没有明确的自然关系(Moore *et al.* 1985)。

鲜鱼腐败主要表现在某些微生物生长和代谢生成胺、硫化物、醛、酮、酯和有机酸等,产生不良气味和味道,使产品变得感官上不可接受,因此了解产品微生物动态变化,探求导致产品变质的特定腐败菌,可以为快速有效监控鲜鱼品质变化和靶向抑制产品腐败,因此开展冷藏鱼类特定腐败菌的鉴别是非常必要的。本文在对养殖罗非鱼 *Oreochromis niloticus* 0、5 和 10 °C 冷藏过程中感官、化学和微生物学品质特征研究基础上,从货架期终点(感官剔除点)分离出优势菌群,通过菌落形态、细胞形态和生理生化等特征进行初步归类,在表型特征的基础上将各组菌株系统化,因在用来培养和测试分离菌株的方法中,变异会产生不同的结果。因此,测定其脂肪酸组成和核糖体特征并进行数值分类,利用 Sherlock MIS 和 Riboprinter 系统对特定腐败菌进行确认。同时在确定冷藏罗非鱼特定腐败菌的基础上,采用修正的 Gompertz 模型拟合细菌生长曲线,经非线性回归分析,求出预测模型的动力学参数,并对生长模型的适用性进行评价。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品与贮藏

实验用淡水养殖罗非鱼,由北极品水产(浙江)有限公司提供。活鱼运到实验室后立即放入冰水中致死。0、5 和 10 °C(Sanyo MIR 153, Japan)低温贮藏,每隔适当时间取出样品鱼进行感官鲜度评价和总菌数、假单胞菌计数。

1.1.2 菌株来源

0、5 和 10 °C 低温贮藏至货架期终点时,挑选菌落总数平板一定区域内的菌落(通常 30~100 个菌落),测试相关关键特征,分离鉴定特定腐败菌。

1.1.3 仪器

气相色谱仪(Agilent 6890N, Palo Alto, USA)、Sherlock 微生物鉴定系统(Microbial ID, Inc., Newark, Del. USA)、透射电镜(JEM-100CX II, Japan)、Sensititre 微生物鉴定系统(Trek Diagnostic System Ltd, UK)、Ribo-

printer 全自动微生物鉴定系统(RP-411, USA)等。

1.1.4 试剂

脂肪酸甲酯混合物标样(Microbial ID, Inc., Newark, Del. USA)、胰酶解大豆胨琼脂(Trypticase soy broth agar, TSBA, Sigma)培养基、GNID 鉴定板(Trek Diagnostic System Ltd, UK)、CFC 培养基(Oxoid code CM 559, 添加 SR 103, UK)、营养琼胶培养基(中国科学院上海昆虫科技开发公司康乐培养基有限公司, China)、Riboprinter 系统 PVUII 试剂套装和 Riboprinter 系统样品制备包等(杜邦公司, USA)。

1.2 方法

1.2.1 特性测定

挑选菌落数合适的菌落总数平板,对整个平板或一定区域内所有菌落(通常 30~100CFU 菌落),依据菌落形态、革兰氏染色和细胞形态,芽孢有无,运动性及氧化/发酵等特征进行分组,每组挑取所有菌落或若干菌落(至少 2~3CFU 菌落),分离纯化 25 °C 培养 24~48 h,所有菌株检测以下关键特性:革兰氏反应,运动性,过氧化氢酶反应(3% H₂O₂),在 TMAO 培养基中 TMAO 的还原以及从硫代硫酸盐中产生 H₂S;同化一些碳水化合物(柠檬酸盐、葡萄糖和蔗糖)等。综合上述菌落形态、细胞形态学、生态学和生理生化等特征参照《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等 2001)、海产鱼类细菌鉴定图(须田三千三等 1987)等,并使用 Sensititre 微生物鉴定系统对优势腐败菌进行归类,采用 MIDI 细菌鉴定系统快速鉴定特定腐败菌(从最优势菌组中选择 LF-001 菌株)。

1.2.2 电镜观察

取 LF-001 菌株 14~18 h 培养物,置于无菌水中自由扩散 2 min,取 1 滴与铜网上,磷钨酸负染,晾干,透射电镜下观察细菌形态及鞭毛,并测定大小。

1.2.3 细菌脂肪酸测定

试验方法参照 MIDI 操作手册,即在培养基上 28 °C 恒温培养 LF-001 菌株 24 h,通过提取和分离细菌细胞膜中的磷脂脂肪酸(PLFA),甲基化后进行气相色谱鉴定分析。根据各组分保留时间计算等链长(ECL)值确定目标组分的存在、采用峰面积归一化法计算各组分的相对含量,再将二者与系统谱库中的标准菌株数值匹配计算相似度(Similarity index, SI),从而给出一种或几种可能的菌种鉴定结果。一般以最高 SI 的菌种名称作为鉴定结果,但当其报告的几个菌种的 SI 比较接近时,则根据色谱图特征及菌落生长特性进行综合判断。

1.2.4 自动核糖体分型

在琼脂培养基上挑取 LF-001 菌株过夜菌落,将适量菌体溶于 40 μl 缓冲液中混匀,取出 30 μl 含菌缓冲液置于样品管支架中,于热处理台灭活,然后分别加入 5 μl 裂解液 A 与裂解液 B 破壁细胞,加入限制型内切酶将 DNA 切成片段,用凝胶电泳将 DNA 片段按大小分离开,片段被转移并固定在移动的尼龙膜上,膜处理是一系列的化学酶反应过程,导致特殊片段发出荧光,谱带的影像被数码相机捕捉,数字化的影像被计算机自动存储,利用专用软件生成 Riboprinter 模式。

1.2.5 假单胞菌生长模型

取鱼肉 10.0 g,加入 90 ml 0.1% 无菌的蛋白胨生理盐水,高速振荡后,将鱼肉浆以 10 倍梯度稀释,取 3 个浓度合适的稀释液 0.1 ml,涂布于 CFC 培养基表面,每个稀释液涂布两个平皿,25 °C 培养 48 h,用于假单胞菌计数。

假单胞菌数增殖动态数据采用修正的 Gompertz 方程描述其生长动态(Hiroshi *et al.* 2003)。修正 Gompertz 方程如下:

$$\log N(t) = \log N_0 + \log \frac{N_{\max}}{N_0} \times \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{\max} \times 2.718}{\log(N_{\max}/N_0)} \times (Lag - t) + 1 \right] \right\}$$

式中, t 为时间(h), $N(t)$ 为 t 时的菌数, N_{\max} 和 N_0 为最大和初始菌数(CFU/g), μ_{\max} 为微生物生长的最大比生长速率(h⁻¹), Lag 为微生物生长的延滞时间(h)。

1.2.6 生长模型的可靠性评价

细菌生长动力学模型求得的预测值,与贮藏实验所得的细菌生长的实测值比较,依据均方根(Whitng *et al.* 1996)评价建立的生长动力学预测模型的可靠性。均方根用下式表示:

$$RMS = \left[\frac{\sum_i (\lg N_{i,\text{predicted}} - \lg N_{i,\text{observed}})^2}{n} \right]^{0.5}$$

式中, $\lg N_{i,\text{predicted}}$ 为冷藏实验中假单胞菌数预测值 (\lg CFU/g), $\lg N_{i,\text{observed}}$ 为假单胞菌菌落总数实测值 (\lg CFU/g), n 为测试次数。

2 结果和分析

2.1 特定腐败菌鉴定

0.5 和 10 °C 冷藏至货架期终点时, 菌落总数为 $10^7 \sim 10^9$ CFU/g, 假单胞菌数为 $10^7 \sim 10^8$ CFU/g, 假单胞菌数占菌落总数的 60%~70%。0.5 和 10 °C 冷藏至货架期终点时分别分离获得 44、36 和 47 株菌, 依据双歧分类法进行初步归类, 其中优势菌群分别占 80.7%、68.1% 和 57.5%。从 88 株优势菌群中随机挑选 60 株菌, 进行生理学测试, 依据数值分类法并参照 Sensititre 微生物鉴定系统数据库, 共分为 I~V 组 (每组相似水平 $\geq 75\%$) (表 1)。所有菌株均为革兰氏阴性, 有鞭毛, 具有运动性, 过氧化氢酶和氧化酶呈阳性。52 株能水解精氨酸, 不能利用果糖、甘露醇和棉子醇, 与荧光底物 4MU-双磷酸盐、4MU- α -D-吡喃葡萄糖、4MU- α -D-吡喃半乳糖、4MU-葡萄糖醛酸化物、4MU- β -D 吡喃半乳糖和 4MU-2-乙酰氨基-乙去氧吡喃葡萄糖 + 4MU- α -L-阿拉伯吡喃葡萄糖苷反应呈阴性。腐败能力测试显示, 不能还原 TMAO 和产生 H_2S 。由各种生化测试得到的表型特征 (表 1), 比对 Sensititre 微生物鉴定系统菌种数据库, 将菌株确定为假单胞菌, 初步确定第 I 组为荧光假单胞菌, 第 II 组为铜绿假单胞菌, 第 III 组为恶臭假单胞菌, 第 IV 组为产碱假单胞菌, 第 V 组为假单胞菌属。在这些表型特征基础上, 从第 I 组随机挑选 LF-001 菌株进行脂肪酸组成测定, 从而进一步确认最优势种或亚种。

2.2 形态特征

在营养琼脂和 TSBA 培养基上菌落圆状隆起, 边缘整齐, 透明, 无色; 革兰氏阴性杆菌, 大小为 $(0.5 \sim 0.7) \mu\text{m} \times (1.6 \sim 3.2) \mu\text{m}$, 极生单鞭毛, 电镜照片见图 1。

2.3 细菌脂肪酸组成

由表 2 可见, $C_{12} \sim C_{18}$ 直链、支链和羟基脂肪酸等 28 种脂肪酸被检出, 该菌株富含单不饱和脂肪酸 (50.18%) 和末端支链脂肪酸 (26.09%), 并出现一定比例的饱和脂肪酸 (17.68%) 和少量羟基脂肪酸, 但未检测到反式脂肪酸 (Trans Fatty Acid) 和环丙基脂肪酸 (Cyclo Fatty Acid), 其中, 16:1 ω 7c、iso-15:0、16:0 和 17:1 ω 8c 占优势, 比例分别为 26.16%、14.83%、7.96% 和 3.94%。同时比照 Sherlock MIS 脂肪酸组成数据库。结果显示, 该菌株为荧光假单胞菌, 概率为 98%, SI 为 0.847 (SI > 0.50)。

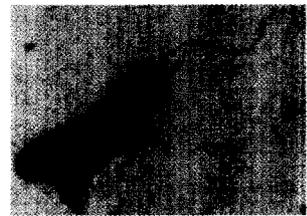


图 1 菌株 LF-001 的电镜照片 ($\times 10\,000$)
Fig. 1 Electron micrograph of strain LF-001 ($\times 10\,000$)

2.4 特定腐败菌的核糖体分型

使用限制型内切酶对 LF-001 菌株进行鉴定, 将所得结果与 Riboprinter 数据库进行比较, 其核糖体类型为 56-S-7, 基因图谱见图 2, 符合图谱库中 DUP 18540 型荧光假单胞菌的特征, 证实该菌为荧光假单胞菌, 相似系数为 0.85。

2.5 生长动力学特征

细菌生长曲线通常呈不对称 S 形, 使用 Logistic 模型定量描述细菌生长时, 不能有效表示细菌生长的延滞期, 修正的 Logistic 模型和 Gompertz 模型 (Gibson *et al.* 1988; Buchanan *et al.* 1997), 能更好的描述细菌生长情况, 许多研究者 (Hiroshi *et al.* 2003; Buchanan *et al.* 1997; 郭全友等 2005) 对不同数学模型的性能和适用性进行分析与比较。结果显示, 相同的数学模型针对不同的研究对象预测结果存在差异。即使如此, 大

表 1 优势菌形态学、生理生化及营养特征

Table 1 Morphological, physiological and biochemical characteristics for strain clustering of dominant bacteria

特征 Characteristics	菌系 Cluster					
	1(22 ^b)	2(8 ^b)	3(12 ^b)	4(4 ^b)	5(14 ^b)	1~5(60 ^b)
形状 Shape	r	r	R	r	r	r
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+	+	+
运动性 Mobility	+	+	+	+	+	+
鞭毛 Flagellum	+	+	+	+	+	+
TMAO 和 H ₂ S	-	-	-	-	-	-
糖发酵测试 ^a Sugar fermentation tests						
阿拉伯糖 Arabinose	2	3	-	-	2	7
阿拉伯醇 Arabitol	-	-	-	1	-	1
纤维二糖 Cellobiose	4	1	4	-	2	8
果糖 Fructose	-	-	-	-	-	-
肌醇 Inositol	-	2	-	1	-	3
麦芽糖 Maltose	6	-	8	-	3	13
甘露醇 Mannitol	-	-	-	-	-	0
棉子醇 Raffinose	-	-	-	-	-	0
蔗糖 Sucrose	6	-	8	3	1	15
山梨醇 Sorbitol	1	-	4	3	8	23
海藻糖 Trehalose	-	-	-	-	-	1
木糖 Xylose	20	8	12	1	13	48
荧光底物测试 ^a Fluorogenic substrate tests						
7AMC+赖氨酸 Lysine	-	-	-	1	-	1
4MU+磷酸盐 Phosphate	4	-	-	-	1	4
7AMC+脯氨酸 Proline	16	6	-	-	5	20
7AMC+γ-谷氨酸盐 Glutamine	16	+	+	3	13	49
4MU-双磷酸盐 Bisphosphate	-	-	-	-	-	-
4MU-α-D-吡喃葡萄糖 Glucopyranoside	-	-	-	-	-	-
4MU-α-D-吡喃半乳糖 Galactopyranoside	-	-	-	-	-	-
4MU-葡萄糖醛化物 Glucuronide	-	-	-	-	-	-
4MU-β-D 吡喃半乳糖 Galactopyranoside	-	-	-	-	-	-
FR12	-	-	-	-	-	-
丙二酸盐 Malonate	6	+	1	0	7	26
赖氨酸 Lysine	4	2	4	1	7	29
精氨酸 Arginine	18	+	8	1	14	52
丙酮酸 Pyruvate	20	+	+	3	12	49
鸟氨酸 Ornithine	-	1	-	1	1	4
柠檬酸盐 Citrate	18	+	+	1	13	48
胍丁胺 Agmatine	20	+	+	3	+	46
其他特殊测试 ^a Other specific tests						
七叶苷 Esculin	2	-	-	-	-	1
尿素 Urea	6	5	-	-	2	8
色氨酸脱氨酶 Trptophan -deaminase	-	-	-	-	-	-
相似水平 Similarity level(%)	75~100	76~100	75~100	79~99	83~99	

注:r 为杆菌, c/r 为球杆菌; a 为使用 Sensititre 系统 Gnid 试剂板测试结果; b 为菌株总数; 4MU 为 4-甲基-伞形酮; 7AMC 为 7-甲基-香豆素酰胺; FR12 为 4MU-2-乙酰氨基-乙氧吡喃葡萄糖+4MU-α-L-阿拉伯吡喃葡萄糖; “+”为阳性; “-”为阴性

家普遍认为 Logistic 模型和 Gompertz 模型的预测效果较好,并得以广泛应用。本文采用修正的 Gompertz 方程拟合得到的罗非鱼 0、5 和 10 °C 贮藏中微生物生长曲线(图 3)。生长动力学参数见表 3,罗非鱼贮藏初期,0 °C 贮藏罗非鱼延滞时间约为(59.63±61.88) h,明显高于 5 °C 和 10 °C 的延滞时间,细菌生长缓慢;进入指数生长期后,0、5 和 10 °C 最大比生长速率分别为(0.02±0.00)、(0.04±0.00)和(0.08±0.01)/h,可知 5 °C 和 10 °C 冷藏罗非鱼细菌增殖速度明显快于 0 °C 时的细菌增殖速度。

3 讨论

采用表型特征来区分 88 株优势菌株(表 1),均为革兰氏阴性和运动型杆菌,有阳性的氧化酶和过氧化氢酶反应,不能发酵葡萄糖,不还原 TMAO 和产生 H₂S,用这些关键特征只能解决属水平的鉴定,可初步鉴定为假单胞菌。然而,由于缺乏准确的分类系统,假单胞菌的分类、命名和鉴定往往依据多重表型特征的差异,例如碳源利用和色素形成等被用于种群的区分,但存在一定的不确定性(Yamamoto *et al.* 2000)。

对冷藏鱼中这些假单胞菌的大量变化和其延续性描述的基础上,采用细菌脂肪酸含量测定加以证明是非常必要的。由于本研究的目的不是描述新的假单胞菌种,分类学特征将不进一步讨论。

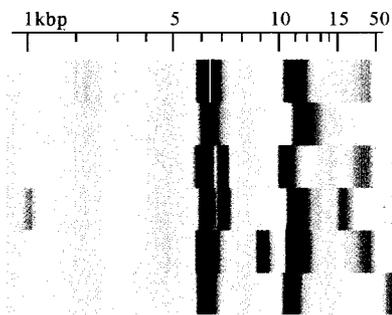


图 2 假单胞菌菌株的 Riboprinter

Fig.2 Profiles of the pseudomonas strains ribo-printed with EcoRI

表 2 特定腐败菌脂肪酸组成和含量

Table 2 Fatty acid composition and contents of specific spoilage organism

脂肪酸 Fatty acid	测试值 Value	脂肪酸 Fatty acid	测试值 Value
12 : 0	2.21	17 : 1 ω 6c	1.21
13 : 0	0.72	17 : 1 ω 8c	11.96
14 : 0	1.02	18 : 1 ω 7c	3.94
15 : 0	3.72	18 : 1 ω 9c	2.77
16 : 0	7.96	18 : 1 ω 7c, ω 9t/12t	0 ^a
17 : 0	1.78	Sum n : 1cis	50.18
18 : 0	0.27	10 : 0 3OH	0 ^a
Sum n : 0	17.68	12 : 0 2OH	0 ^a
13 : 0 ISO	5.97	12 : 0 3OH	1.20
14 : 0 ISO	1.89	13 : 0 3OH	0.72
15 : 0 ISO	14.83	14 : 0 3OH	1.55
16 : 0 ISO	1.00	Sum n : 0 OH	1.95
17 : 0 ISO	2.40	iso-13 : 0 3OH	1.50
Sum n : 0 ISO	26.09	iso-15 : 0 2OH	0 ^a
15 : 1 ω 6c	1.00	iso-15 : 0 3OH	0.31
15 : 1 ω 8c	1.15	Sum iso-n : 0 OH	1.81
16 : 1 ω 7c	26.16	Sum n : 0 cyclo	0 ^a
16 : 1 ω 9c	1.99	Sum n : 1 trans	0 ^a

注:n 为碳原子数;a 为低于检出限

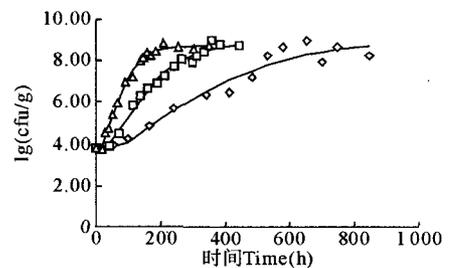


图 3 自然污染罗非鱼在 0 °C(◇)、5 °C(□)、10(△)°C 贮藏中的假单胞菌生长曲线

Fig.3 Curves of *Pseudomonas* spp. growth in *Oreochromis niloticus* stored at 0(◇)、5(□) and 10(△)°C

表 3 罗非鱼在 0、5 和 10 °C 贮藏中假单胞菌的生长动力学参数

Table 3 Kinetics parameters of *Pseudomonas* spp. grown in *Oreochromis niloticus* stored aerobically at 0 °C, 5 °C and 10 °C

贮藏温度(°C)Temperature	N ₀ (lgCFU/g)	Lag(h)	N _{max} (lgCFU/g)	μ_{max} (h ⁻¹)	RMS
0	3.81±0.32	59.63±61.88	8.55±0.20	0.02±0.00	0.31
5	3.71±0.28	7.25±24.06	8.65±0.14	0.04±0.00	0.25
10	3.70±0.23	3.95±9.83	8.61±0.10	0.08±0.01	0.21

由于原料、加工、流通和贮藏等因素的差异,产品具有其自身独有的菌群组成并逐渐发生变化,适应条件的细菌逐渐占据优势地位,并产生腐败臭味和异味的代谢产物,其发展主要依赖鱼的种类及来源。在有氧冷藏鱼类中产品腐败主要是由嗜冷革兰氏阴性菌、非发酵杆菌组成的,在有氧冰藏中,菌落几乎完全是由假单胞菌属和腐败希瓦氏菌组成的。这对于所有鱼类和水生贝壳类动物都是适用的,无论它们是在温带水域、亚热带水域或热带水域(Gram *et al.* 1990;Gennari *et al.* 1999)。由于栖息水域的差异,冷藏淡水鱼和海水鱼类的特定腐败菌往往是不同的,例如假单胞菌属是有氧冰藏热带淡水鱼的特定腐败菌(Gennari *et al.* 1999),而腐败希瓦氏菌是有氧冰藏海洋温带水域鱼的特定腐败细菌,腐败希瓦氏菌已经从热带淡水中分离出来,但是在冰藏淡水鱼的腐败中不占主要地位,这可能是由于其产生的数量少,同高数量的假单胞菌相比竞争能力低(Gram *et al.* 1996)。

淡水养殖罗非鱼的特定腐败菌(假单胞菌)不能还原 TMAO 和产生 H_2S (表 1),但产生其他挥发性的不良产物,货架期终点呈现出比较典型果味、巯基的变气味和变味道。其中荧光假单胞菌是最优势腐败菌,出现几率高于其他假单胞菌(表 1),往往产生其他挥发性成分(杨宪时等 2004;Edwards *et al.* 1987)。然而,海洋温带水域鱼类的腐败在感官上以令人不愉快的鱼味、腐烂的、 H_2S 、变气味和变味道的发展为特征,与罗非鱼的感官特征明显不同,还有待深入探讨不良气味的来源和机理。

参 考 文 献

- 东秀珠,蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 第1版,北京:科学出版社
- 郭全友,杨宪时. 2005. 养殖大黄鱼不同细菌生长模型比较. 南方水产, 26(5):44~49
- 杨宪时,许 钟,肖琳琳. 2004. 水产食品特定腐败菌与货架期的预测和延长. 水产学报, 28: 106~111
- 須田三千三,鴻巢章二. 1987. 水産食品學. 東京:恒星社厚生閣, 241~242
- Buchanan, R. C., Whiting, R. C., and Damert, C. D. 1997. When is simple good enough: A comparison of Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. Food Microbiol. 14: 313~326
- Edwards, R. A., Dainty, R. H., and Hibbard, C. M. 1987. Volatile compounds produced by meat pseudomonads and related reference strains during growth on beef stored in air at chilled temperature. J. Food Prot. 53:600~605
- Hiroshi Fujikawa, Akemi Kai, and Satoshi Morozumi. 2003. A new Logistic model for bacterial growth. J. Food. Hyg. Soc. Japan, 44:155~160
- Journal of Systematic Bacteriology Since the 1980. Approved lists of bacterial names (1 January 1980 to 1 January 1985). 1985. Int. J. Syst. Bacteriol. 35:382~407
- Gennari, M., Tomaselli, S., and Cotrona, V. 1999. The microflora of fresh and spoiled sardines(*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) Sea and stored in ice. Food Microbiology, 16:15~28
- Gibson, A. M., Bratchell, N., and Roberts, T. A. 1988. Predicting microbial growth: growth responses of *Salmonella* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. Int. J. Food Microbiol. 6:155~178
- Gram, L., Wedell, N. C., and Huss, H. H. 1990. The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch(*Lates niloticus*). Int. J. Food Microbiol. 10:303~316
- Gram, L., and Huss, H. H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. Int. J. Food Microbiol. 33:121~137
- Gram, L., and Melchiorson, J. 1996. Interaction of two fish spoilage bacteria, *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas* sp. in fish model systems. J Appl. Bacteriol. 80:589~595
- Lehane, L., and Olley, J. 2000. Histamine fish poisoning revisited. Int. J. Food Microbiol. 58:1~37
- Moore, W. E. C., Cato, E. P., and Moore, L. V. H. 1955. Index of bacterial and yeast nomenclatural changes published in the Mossel. D, A. A, Ingram M. 1955. The physiology of microbial spoilage of foods. J. Appl. Bacteriol. 18: 232~268
- Rowe, M. T., and Finn, B. A. 1991. Study of *pseudomonas fluorescens* biovars using the automated microbiology identification system (AM-BIS). Lett. Appl. Microbiol. 13:238~242
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L. *et al.* 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: Intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. Microbiology, 146:2 385~2 394
- Whiting, R. C., and Buchanan, R. L. 1996. Microbial modeling. Food Technol. 12:203~207