

# 养殖多宝鱼细菌菌相分析

丁洁<sup>1</sup>,侯红漫<sup>1,\*</sup>,刘彦泓<sup>2</sup>,刘胜楠<sup>1</sup>,王阳<sup>1</sup>

(1.大连工业大学生物与食品工程学院,辽宁大连 116034;

2.大连市产品质量监督检验所,辽宁大连 116021)

**摘要:**对新鲜多宝鱼微生物指标进行定性和定量分析。通过对体表的细菌进行分离、纯化后,采用细菌的传统鉴定方法与现代自动化鉴定仪器相结合的方法,对分离纯化所得到的鱼体菌种进行鉴定,完成多宝鱼的细菌菌相分析。结果表明:分离获得的206株细菌,革兰氏阳性菌占菌株总数的18.9%,革兰氏阴性菌占菌株总数的72.3%,其中的优势菌株为金黄色葡萄球菌(12.6%)、液化沙雷氏菌(10.7%)、肠杆菌属(19.4%)和莫拉氏菌属(8.3%)。其中肠杆菌的数量较多,说明养殖鱼所用海水受污染较重,应引起重视,为后期研究冷藏过程中多宝鱼的特定腐败菌及生鲜多宝鱼冷藏工艺的优化和新工艺的开发提供理论依据。

**关键词:**养殖多宝鱼,分离鉴定,细菌菌相分析

## Analysis of bacterial flora on cultured *Paralichthys Lethostigma*

DING Jie<sup>1</sup>, HOU Hong-man<sup>1,\*</sup>, LIU Yan-hong<sup>2</sup>, LIU Sheng-nan<sup>1</sup>, WANG Yang<sup>1</sup>

(1. Biological and Food Engineering College, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China;

2. Dalian Institute of Product Quality Supervision & Inspection, Dalian 116021, China)

**Abstract:** The microbiological characters and composition of bacterial flora of fresh *Paralichthys Lethostigma* were observed with qualitative and quantitative analysis. Bacteria from fresh *Paralichthys Lethostigma* skin were isolated and purified, using a combination method of the traditional and modern automated equipment identification, the bacteria from fresh fish skin were separated, purified and identified, bacteria flora analysis was completed. The results showed among 206 isolated bacteria, Gram-positive bacteria strains accounted for 18.9% of the total, Gram-negative bacteria accounted for 72.3% of the total number of strains, including advantaged strains of *Staphylococcus aureus* (12.6%), *Liquefaciens* (10.7%), *Enterobacter* (19.4%) and *Moraxella* (8.3%). The results showed that there were a large number of *Enterobacter* in fish farm, the farming water were polluted. The research provided a theoretical basis of optimization and the development of new technology for the latter study of the specific spoilage organism from cold storage *Paralichthys Lethostigma*.

**Key words:** cultured *Paralichthys Lethostigma*; isolation and identification; bacteria flora analysis

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)07-0112-03

水产品是多种腐败微生物和致病微生物生长的良好基质,受到污染的水产品能引起多种细菌性食物中毒,也就是说大部分水产品的卫生问题是由于微生物因素引起的,微生物与水产品安全有密切的联系,所以研究水产品中的微生物对我们的健康至关重要<sup>[1]</sup>。国内外对养殖鱼类、虾类和贝类的细菌菌群组成进行了研究<sup>[2-4]</sup>,而对多宝鱼的细菌学的相关报道很少见。多宝鱼即漠斑牙鲆(*Paralichthys Lethostigma*),学名大菱鲆鱼,为硬骨鱼纲鲽形目鲆科菱鲆属海洋底栖鱼类,是世界公认的优质比目鱼之一。我国上世纪90年代中叶开始引进养殖多宝鱼,

在山东、河北、辽宁等地,多宝鱼养殖业发展迅速。本研究通过对新鲜多宝鱼细菌菌相进行定性和定量分析,为后期研究冷藏过程中多宝鱼的特定腐败菌及生鲜多宝鱼冷藏工艺的优化和新工艺的开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验样品 均购自大连长兴鲜活海产品市场,样品在运输过程中要加养殖鱼所用海水,并且充氧以保持样品的鲜活状态,30min内运抵实验室。首先对鲜鱼进行感官评价,然后去腮、去内脏,在鱼体的不同部位取适量鱼肉,充分研碎后用于细菌总数(TVC)的测定。

### 1.2 样品处理

称取研碎鱼肉10.0g于锥形瓶中,加入90mL含0.1%蛋白胨的无菌生理盐水,经高速振荡充分混匀

收稿日期:2008-10-09 \*通讯联系人

作者简介:丁洁(1982-),女,硕士研究生,从事食品微生物与生物技术研究。

基金项目:辽宁省高等学校优秀人才支持计划(2007R04)。

后,以10倍递增稀释法进行稀释,取3个合适的稀释度各0.1mL,涂布于含2.5% NaCl的牛肉膏蛋白胨培养基(BPG)<sup>[5]</sup>表面。每个稀释液涂布2个平皿,25℃培养2~7d。

### 1.3 细菌分离、培养与鉴定

从以上细菌总数平皿中挑选菌数合适(30~100个)的计数平板,分离纯化整个平板的所有菌株,25℃培养2~7d。参照海产鱼贝类细菌简易识别图<sup>[6]</sup>、《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[7]</sup>,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法国梅里埃公司的全自动细菌系统鉴定仪(VITEK-AMS)相结合的方法进行测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌总数

对三批多宝鱼分别进行了鱼鳃、鱼体和养殖鱼用海水的细菌菌落总数的计数,结果如表1所示。

表1 细菌菌落总数计数(TVC)

鱼的不同部位	第一批 (log <sub>10</sub> cfu/g)	第二批 (log <sub>10</sub> cfu/g)	第三批 (log <sub>10</sub> cfu/g)
鱼鳃	3.19	3.34	4.28
鱼体	1.70	1.83	1.95
海水	3.46	3.75	3.82

### 2.2 细菌的鉴定结果

对鱼体上分离得到的菌株经革兰氏染色后,进行个体形态观察和菌落形态观察,可将其划分为11组。其中1、2组为革兰氏阳性菌,其余组为革兰氏阴性菌。对分离得到的这11组菌做常规生理生化实验,并且结合全自动细菌系统鉴定仪进行鉴定,结果如表2~表4所示。

表2 细菌常规生理生化实验结果

组别	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
形状	c	c	r	r	r	r	r	r	c/r	r	r
革兰氏染色	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
运动性	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
过氧化氢酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
氧化酶	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
甲基红	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
葡萄糖产酸	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
葡萄糖产气	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
吲哚	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
V-P	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
0% NaCl	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
7% NaCl	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
9% NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
明胶液化	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
柠檬酸盐	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
硫化氢	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5%乳糖	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-

注:c为球菌;r为杆菌;c/r为球杆菌;“+”代表阳性反应;“-”代表阴性反应。

表3 革兰氏阳性细菌生理生化鉴定结果(GPI)

组别	1	2	组别	1	2
蛋白胨基质	+	+	甘露醇	-	-
杆菌肽	-	-	棉籽糖	-	-
奥普托琴	-	-	水杨素	-	-
半纤维素酶	-	-	山梨醇	+	-
6%氯化钠	+	+	蔗糖	+	-
10%胆汁	+	-	海藻糖	-	-
40%胆汁	-	-	阿拉伯糖	+	-
七叶灵	-	-	丙酮酸	-	+
精氨酸阴性对照	+	-	淀粉(支链淀粉)	-	-
精氨酸	+	-	菊糖	+	-
尿素	-	-	蜜二糖	-	-
红四氮唑	-	-	松三糖	-	-
新生霉素	+	-	纤维二糖	+	+
右旋糖、葡萄糖	+	-	核糖	-	-
乳糖	+	-	木糖	+	-

表4 革兰氏阴性细菌生理生化鉴定结果(GNI)

组别	3	4	5	6	7	8	9	10	11
三氯新	+	+	-	-	-	-	-	-	-
葡萄糖氧化	+	+	+	-	-	-	-	-	+
阳性生长控制	+	+	-	-	-	-	-	-	-
乙酰胺	-	-	-	-	-	-	-	-	-
七叶树苷 (七叶灵)	+	+	-	-	-	-	-	-	-
植物鸟尿蓝母	+	-	-	-	-	-	-	-	-
尿素	-	+	-	-	+	+	-	-	-
枸橼酸盐	+	-	-	+	-	-	+	-	-
丙二酸盐	-	+	-	-	-	-	-	-	-
苯丙氨酸	-	-	-	-	-	-	+	-	-
多黏菌素 B	-	+	-	-	-	-	-	-	-
乳糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-
麦芽糖	+	-	-	-	-	-	-	-	+
甘露醇	+	-	-	-	-	+	-	-	-
木糖	+	+	-	-	-	-	-	-	-
山梨糖	+	-	-	-	-	-	-	-	-
蔗糖	+	+	-	-	-	-	-	-	+
肌醇	+	-	-	-	-	-	-	-	-
侧金盏花醇	-	+	-	-	-	-	-	-	-
香豆酸	-	-	+	-	-	-	-	+	-
硫化氢	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b-半乳糖苷酶	-	+	-	-	-	-	-	-	-
鼠李糖	-	+	-	-	-	-	-	-	-
阿拉伯糖	+	+	-	-	-	-	-	-	-
葡萄糖发酵	+	+	+	-	-	-	-	-	-
精氨酸	-	-	+	-	-	-	-	-	-
赖氨酸	+	-	-	-	-	-	-	-	-
鸟氨酸	+	-	-	-	-	-	-	+	-
10%乳糖	-	+	-	-	-	-	-	-	-

### 2.3 细菌菌群组成

上述生理生化鉴定结果结合海产鱼贝类细菌的简易识别图<sup>[6]</sup>,可判定实验所选三批多宝鱼所分离得到的这11种菌的菌属和细菌菌相组成如表5所示。

通过对三批多宝鱼的细菌菌相综合分析可知:革兰氏阴性菌占菌株总数的比例大,而第二批鱼体上的阳性菌所占比例比第一批和第三批的多。样品的菌相构成除了有海产鱼类的几大常见菌属外,还出现了一定数量的嗜蚀艾肯氏菌,这都和养殖鱼所

表5 新鲜多宝鱼的细菌菌相组成

组别	细菌	第一批		第二批		第三批		综合分析	
		菌株	所占比例(%)	菌株	所占比例(%)	菌株	所占比例(%)	菌株	所占比例(%)
1	革兰氏阳性菌(G <sup>+</sup> )	12	17.7	23	32.4	4	6.0	39	18.9
	金黄色葡萄球菌	7	10.3	15	21.1	4	6.0	26	12.6
2	微球菌属	5	7.4	8	11.3	-	-	13	6.3
3	革兰氏阴性菌(G <sup>-</sup> )	51	74.9	41	57.7	57	85.0	149	72.3
	液化沙雷氏菌	12	17.6	4	5.6	6	9.0	22	10.7
4	肠杆菌属	9	13.2	13	18.3	18	26.9	40	19.4
5	弧菌属	4	5.9	5	7.0	7	10.4	16	7.8
6	假单胞菌属	3	4.4	2	2.8	5	7.5	10	4.9
7	气味黄杆菌	8	11.8	-	-	3	4.5	11	5.3
8	莫拉氏菌属	6	8.8	3	4.2	8	11.9	17	8.3
9	产碱菌属	4	5.9	8	11.3	3	4.5	15	7.3
10	嗜蚀艾肯氏菌	2	2.9	-	-	-	-	2	1.0
11	腐败希瓦氏菌	3	4.4	4	5.6	7	10.4	14	6.8
	未鉴定	5	7.4	7	9.9	6	9.0	18	8.7
	总计	68	100	71	100	67	100	206	100

用海水的污染有很大关系。

### 3 讨论

鱼类细菌菌群组成与鱼类生存环境、季节等相关,大多数研究者认为,鱼类生存环境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<sup>[8,9]</sup>,弧菌属和发光杆菌属也是典型海洋性细菌;Gillespie<sup>[10,11]</sup>等发现,澳大利亚和非洲等热带、暖温带水域鱼的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。然而,本研究发现大连温水养殖的多宝鱼菌群组成成为革兰氏阴性菌占72.3%,除了海产鱼类常见的细菌菌群外,还出现了较大比例的肠杆菌属和金黄色葡萄球菌,说明养殖鱼所用海水受污染较重,应采取相应的措施防止污染。

### 4 结论

4.1 温度是影响鱼体菌数和种类的一个重要因素,温度稍高对鱼体上中温菌的生长是很有利的;此外鱼鳃上的细菌菌落总数多于鱼体上的,这与相关的鱼类微生物的研究报道是一致的;分离得到鱼体的细菌菌落形态与养殖海水中的细菌菌落形态有部分很相似,说明多宝鱼的菌相是由鱼体共生细菌和附生细菌两部分组成。

4.2 通过一系列的常规生理生化实验并结合海产鱼贝类细菌的简易识别图和细菌鉴定手册,判定分离得到的11组细菌分别为葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、微球菌属(*Staphylococcus aureus*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、肠杆菌属(*Enterobacteriaceae*)、弧菌属(*Vibrio*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、莫拉氏菌属(*Moraxella*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)、艾肯氏菌属(*Eikenella*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*),除嗜蚀艾肯氏菌外其它菌属都属于海产鱼类的常见菌属。进一步用全自动细菌系统鉴定仪鉴定出了五个菌种:分别为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、液化沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens*)、气味黄杆菌(*Flavobacterium*)

*odoratum*)、嗜蚀艾肯氏菌(*Eikenella corrodens*)和腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)。

4.3 细菌菌相综合分析显示,革兰氏阳性菌占菌株总数的18.9%,其中金黄色葡萄球菌占菌株总数的12.6%,微球菌属占菌株总数的6.3%;革兰氏阴性菌占菌株总数的72.3%,其中的优势菌株为液化沙雷氏菌(10.7%)、肠杆菌属(19.4%)、弧菌属(7.8%)、莫拉氏菌属(8.3%)和产碱菌属(7.3%)。

### 参考文献

- [1] 刘红英.水产品加工与贮藏[M].北京:化学工业出版社,2006.
- [2] Gram L, Wedell-Neergaard, Huss H H. The bacteria of fresh and spoilage Lake Victorian Nile perch (*Latesniloticus*) [J]. Int J Food Microbiol, 1990, 10: 303~316.
- [3] 郭全友, 杨宪时, 许钟. 养殖大黄花鱼细菌菌群分离鉴定与分析[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 92~97.
- [4] 王国良, 金珊, 等. 养殖泥螺体内细菌菌群组成及分析[J]. 微生物学通报, 2002(6): 9~11.
- [5] 陈奖励, 何邵阳, 赵文. 水产微生物学[M]. 北京: 农业出版社, 1993.
- [6] 纪家笙, 黄志斌, 杨运华, 季思溢, 沈月新. 水产品工业手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] Gram L. Evaluation of the bacteriology quality of seafood [J]. Journal of Food Microbiology, 1992, 16: 25~39.
- [9] Gram L, Huss H H. Microbiological spoilage of fish and fish products [J]. Int J Food Microbiology, 1996, 33: 121~137.
- [10] Gillespie N C, Macrae I C. The bacterial flora of some Queensland fish and its ability to cause spoilage [J]. J Appl Bacteriol, 1975, 39: 91~100.
- [11] Ola J B, Oladipo A E. Storage life of coraker (*Pseudolithius senglensis*) in ice and ambient temperature [J]. African Journal of Biomedical Research, 2004, 7: 13~17.