

水产品鲐鱼(*Pneumatophorus japonicus*) 细菌多样性及优势微生物分析*

翁佩芳¹ 李微微¹ 吴祖芳¹ 周秀锦² 陈树兵³ 张静娇¹

(1. 宁波大学海洋学院 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211;

2. 舟山出入境检验检疫局 舟山 316100; 3. 宁波检验检疫科学技术研究院 宁波 315012)

摘要 为研究鲐鱼(*Pneumatophorus japonicus*)在不同冻藏时期的优势微生物,并且得到一个较全面的细菌群落组成结构,采用16S rDNA基因克隆文库及克隆子分析等方法,分别对冻藏1d、8d和20d条件下鲐鱼鳃体系中的细菌种群多样性、优势微生物及其中产组胺菌的变化进行分析。结果表明,不同时期鲐鱼鳃内的细菌多样性均较强;冻藏1天的鳃体系中不动杆菌属(*Acinetobacter*)占优势为总数的77.5%,产组胺细菌如泛菌属(*Pantoea*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)较少;第8天优势细菌种群是梭杆菌属(*Fusobacterium*)和希瓦氏菌属(*Shewanella*),而产组胺菌如发光杆菌属(*Photobacterium*)和弧菌属(*Vibrio*)较前期数量有所增加;冻藏到第20天的优势种群为哈夫尼菌属(*Hafnia*)和沙雷菌属(*Serratia*),它们均是产组胺的菌群。鲐鱼中细菌多样性及其优势微生物的变化等全面信息可为了解鲐鱼水产品组胺发生的微生物机制及其控制方法提供重要依据。

关键词 鲐鱼; 16S rDNA 克隆文库; 产组胺菌; 优势种群; 系统发育分析

中图分类号 S983

古人有云“鱼之味,乃百味之味,吃了鱼,百味无味”。新鲜的鱼肉味道鲜美,肉质细嫩,易被消化,营养价值高,但处理不当的鱼肉极易腐烂,产生有毒有害成分,其中组胺就是毒性最大的生物胺(鲍建民, 2006; Chang *et al.*, 2008),食入过量的组胺会引起人体一系列的过敏和炎症,严重者甚至出现死亡;部分水产品组胺超标问题导致我国出口渔业产业受挫,造成很大的经济损失,影响了渔业经济的发展,因此组胺检测和产生机制方面的研究一直是热点问题。含高组胺鱼类主要是海产鱼中的青皮红肉鱼类,如鲐鱼(*Pneumatophorus japonicus*)(鲐巴鱼、青花鱼、油筒鱼、鲭鱼、花鲢和花身滚),金枪鱼、扁舵鲣、秋刀鱼和鲭鱼等(林洪等, 2005)。由于它们肌肉中含血红蛋白较多,因此组氨酸含量也较高,当遇到富含组氨酸脱羧酶的细菌后可使鱼肉中的游离组氨酸脱羧基形

成组胺(Tsai *et al.*, 2005a);组胺生成菌如摩根氏变形杆菌、组胺无色杆菌、埃希氏大肠杆菌、链球菌和葡萄球菌等普遍存在于海水鱼的体表,也生活在活鱼的鳃中(陶志华等, 2009)。目前,对水产制品中组胺的研究多停留在检测及中毒的报道上,产组胺细菌的分析也常采用传统的细菌分离培养方法(翟红蕾等, 2010; 谢超等, 2009),然后进行分类鉴定,这种方法受培养基成分及培养方法的限制,难以客观真实地反映样品中原有的微生物群落组成,从而对水产品原料微生物控制方法的建立带来一定的盲目性。分子生态检测方法的日益发展为环境样品微生物种群结构及优势微生物的了解提供了可能性(韩少锋, 2010)¹⁾,其中构建16S rDNA克隆文库是微生物分子生态学中用来调查环境中原核微生物组成的常用方法之一;蒋燕等(2010)利用16S rDNA文库随机测序

* 宁波市自然科学基金项目, 201101A6111020号; 浙江省公益性技术应用研究项目, 2010C33180号。翁佩芳, 副教授, E-mail: weng-pf@163.com

1) 韩少锋, 2010. 罗非鱼腐败过程中菌群结构分析及腐败菌的分离、鉴定与调控. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 7—23

收稿日期: 2012-07-13, 收修改稿日期: 2012-09-21

法分析了草鱼肝胰脏和胆汁细菌菌落组成,鉴定出各自的共生细菌和优势菌;刘淮德(2010)¹⁾应用PCR-DGGE法和16S rDNA文库法研究了中国明对虾和日本囊对虾肠道微生物组成,鉴定其优势种群,结果表明克隆文库法比DGGE法更完整和全面;Liu等(2005)采用16S rRNA序列分析技术对除磷活性污泥中的菌群进行研究,对其中114个克隆进行测序,发现污泥中的菌群多样性较高,其中71%为变形杆菌、23.7%黄杆菌、2.6% *Plsinctom ycetales*、1.8% *Verrucomicrobiales*和0.9% *Firmicutes*属微生物;这些方法的运用也为作者对产组胺微生物的研究提供了一个全新的手段。

本文以鲇鱼的鳃组织为研究对象,通过16S rDNA克隆文库法的建立和系统发育树分析,来较全面反映鲇鱼鳃组织的细菌群落结构和优势微生物,结合前人已分离鉴定得到的产组胺微生物,确定鲇鱼水产品中产生组胺的主要细菌种群,为出口鲇鱼水产品组胺的控制及加工工艺改进等提供微生物学依据。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 材料 新鲜鲇鱼(*Pneumatophorus japonicus*)购买于宁波市江北区水产市场,用无菌袋包装,冰袋冷藏,于30min内运到实验室,每2条分装于无菌袋中,置于-20℃低温冰箱中保藏,以备实验时使用。

1.1.2 主要试剂 0.9%的灭菌生理盐水,10%的SDS,STE缓冲液(pH 8.0),TE缓冲液(pH 8.0),溶菌酶,RNase A,蛋白酶K,异丙醇,苯酚,氯仿:异戊醇(24:1)(购于阿拉丁试剂公司),UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒(购于上海捷瑞生物工程有限公司),dNTP、Ex-Taq polymerase、DNA Marker (DSTM 2000)、Solution I、pMD18-T Vector、氨苄青霉素和*E. coli* DH5 α 感受态细胞(购于上海生工)。

1.1.3 仪器与设备 LRH-190-S型恒温恒湿培养箱,广东省医疗器械厂;LDZX-40BI型立式蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;pHS-3C型pH计,上海精密科学仪器有限公司;双控电泳仪,北京市君意机电技术公司;显微图像操作仪Alpha Innotech;TGL-20M型高速台式冷冻离心机,长沙湘仪离心机仪器有限

公司;PCR仪 eppendorf,上海中贸集团公司;数显控温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;SW-CJ-1FD型单人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司。

1.1.4 培养基 平板计数琼脂(PCA)培养基、LB培养基和选择性LB培养基(Amp⁺)按文献方法配制(Tsai et al, 2005b)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液的制备 分别取冻藏1d、8d、14d、20d和26d的鲇鱼进行处理。取20g鲇鱼的鱼鳃,加入180mL灭菌的0.9%的生理盐水,匀浆2min,纱布过滤,收集菌悬液备用。

1.2.2 pH和总菌数的测定 分别取预处理过的1d、8d、14d、20d和26d的菌液样品进行酸度的测定。另外,分别取每个时期的菌液进行梯度稀释,选取合适的稀释梯度(10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4})进行细菌总数测定。实验过程中所使用的试管、锥形瓶、玻璃棒、枪头、培养皿等材料均在121℃条件下灭菌20min。

1.2.3 样品总DNA提取纯化 采用传统的方法来提取DNA。先将菌悬液样品于灭菌的离心管中,4℃,2000r/min低速离心5min,移取所得上清液4℃,13000r/min高速离心30min,弃去上清液,沉淀富含细菌供DNA提取。将所得沉淀中加入800 μ L的STE缓冲液,混匀转移到1.5ml EP管中,并且加入10mg/ml的溶菌酶,使其终浓度为1—2mg/ml,同时加入10 μ L的RNase A酶,37℃水解1h。然后加入10% SDS溶液,使其终浓度为1%—2%,再加入约20 μ L的蛋白酶K,放入55℃水浴中1h。后续处理方法根据文献(王芳等, 2010)方法进行。

1.2.4 PCR扩增 将上述制备的细菌基因组DNA作为PCR扩增的模板,采用50 μ L体系进行PCR扩增(Kung et al, 2009)。PCR扩增所用引物:27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'),1492R(5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR扩增所用反应体系:10 $\times$ Buffer (Mg²⁺ free) 5 μ L, Mg²⁺ (25mmol/L) 5 μ L, dNTP (2.5mmol/L) 8 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各1.0 μ L, Ex-Taq DNA聚合酶(5U/ μ L) 0.4 μ L,模板DNA 1.0 μ L,用灭菌超纯水(ddH₂O)补足反应总体积至50 μ L。PCR反应的循环条件为95℃预变性35min,30个循环(94℃变性50s,52℃退火50s,72℃延伸1min30s,72℃末端延伸10min)。

1) 刘淮德, 2010. 应用微生物分子生态学方法研究对虾肠道细菌组成及变化规律. 北京: 中国科学院博士学位论文,

1.2.5 16S rDNA 克隆文库的构建 PCR 产物采用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒切胶回收。将纯化后的 PCR 产物与克隆载体 pMD18-T Vector 连接, 转化到 *E. coli* DH5 α , 在含有氨苄的 LB 平板培养基中培养 12h, 进行蓝白斑筛选。挑取单菌落用引物 M13⁺ 和 M13⁻ 随机检测, 每个时期选出约 40 个合格的阳性克隆子, 检测其结合位点, 并送至华大基因有限公司完成测序。

1.2.6 基因序列的分析鉴别 将测序得到的序列结果采用 DAMBE、DNASTAR 和 MEGA4.1 等软件进行编辑和剪除分析, 并把编辑好的序列与国家生物技术信息数据库(NCBI)现有的 16S rDNA 基因片段进行对比, 使用 GenBank 的 BLAST 同源性检索, 找到最接近的菌属, 序列相似性 $\geq 97\%$ 的认为是一个同样的类型(刘玮琦等, 2008), 并且确定其相似种属。系统发育树的绘制使用 MEGA4.1 软件完成, 算法为邻位相连法(neighbor-joining-analysis)(马鸣超等, 2008)。

2 结果与分析

2.1 不同冻藏时期下的鲈鱼鱼鳃的 pH 变化和总菌数变化分析

对鲈鱼在不同冻藏时期鱼鳃的菌液样品进行酸度和总菌数测定, 其结果如图 1 所示。

由图 1 可知, 鲈鱼在冻藏 1d、8d、14d、20d 和 26d 时鱼鳃菌液的 pH 分别为 6.75、6.42、6.13、5.98 和 5.84, 鱼鳃体系呈弱酸性, 在最初的 15d 左右, 随着冻藏天数的增加, pH 一直不断下降, 但到 20d 以后, pH 下降趋势缓慢, 基本趋于平衡。与 pH 相对的是细菌总数的变化, 经冻藏 1d、8d、14d、20d 和 26d 的鲈鱼鱼鳃其细菌总数的变化为从起初的 9.05×10^4

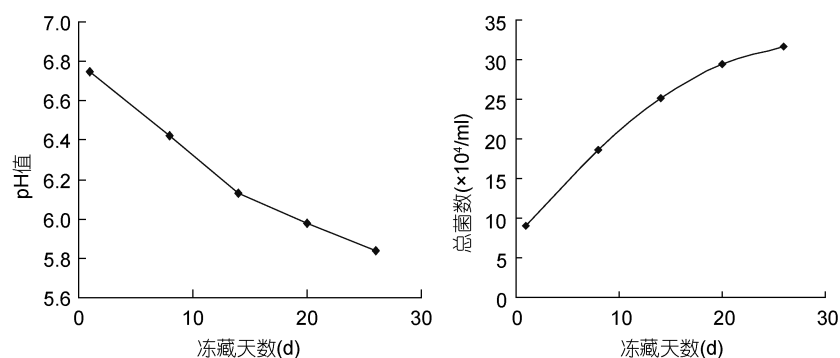


图 1 不同冻藏时期鲈鱼鱼鳃的 pH 和总细菌数变化

Fig.1 The change of pH and total bacterial count in different frozen storage period of *P. japonicus* gill

cfu/ml 上升到最后的 3.16×10^5 cfu/ml。即随着冻藏天数的增加, 鲈鱼鱼鳃中细菌总数总的变化趋势是不断增加, 其中第 1—20 天期间细菌总数增加较快, 经 20d 之后细菌总数增加速度减慢, 但总体还是呈上升趋势。

2.2 不同冻藏时期样品总 DNA 的提取和 PCR 扩增结果

分别对冻藏 1d、8d 和 20d 的样品分别进行细菌总 DNA 的提取, 将所提取的总 DNA 用通用引物 27F 和 1492R 进行扩增, 再通过电泳检测, 电泳检测结果如图 2 所示, 其中 1、3、4 均为提出的总 DNA 稀释 100 倍后 PCR 扩增的结果, 2 是未稀释的 DNA。由图 2 可知, 2、4 条带较亮, 说明提取的 DNA 浓度较高, 但有轻微的拖尾现象, 条带不够干净。四个样品的电泳条件相同, PCR 扩增体系也相同, 只是加入的 DNA 模板不同, 轻微拖尾可能是加入的 DNA 模板量过多, 可以对其进行稀释以减少 DNA 模板的量。从检测结果发现, 各时期所提的总 DNA 片段都在约 1500bp 处出现荧光条带, 说明 PCR 反应特异性较好, 适合下一步 16S rDNA 克隆文库的构建, 因此选用 1、3、4 条带进行 DNA 回收。

2.3 16S rDNA 克隆文库的构建

PCR 扩增的 16S rDNA 片段经切胶回收, 同 pMD-18T 载体连接后转化入 *E. coli* DH5 α , 每个时期的克隆文库均含 100 个以上的克隆子, 用 M13⁺ 和 M13⁻ 对每个文库随机检测出 40 个左右阳性克隆子。对不同冻藏时期的鲈鱼鱼鳃体系中细菌进行测序, 再与 NCBI 现有的基因片段进行比对, 构建 16S rDNA 克隆文库, 检测出冻藏 1d、8d 和 20d 的样品分别有 10、13 和 10 种不同的菌株, 3 个时期的克隆子

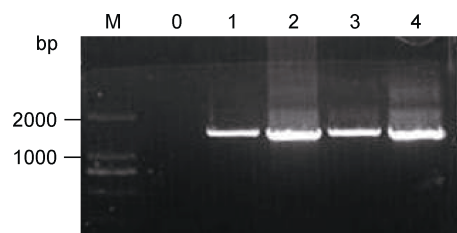


图 2 冻藏不同时期鲈鱼样品菌液总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 The agarose gel electrophoresis profile of total DNA from the gill of *P. japonicus* in different period of storage

注: M. Marker; 0. 空白; 1. 20d 稀释 100 倍; 2. 20d 未稀释; 3. 8d 稀释 100 倍; 4. 1d 稀释 100 倍

与 GenBank 数据库中已知细菌的 16S rDNA 序列相似性范围在 90%—100%, 结果如表 1 所示。

由表 1 可知, 冻藏 1d 的鲈鱼鱼鳃体系中细菌文库共测序克隆子 40 个, 测序结果在 GenBank 数据库中进行 Blast 检索, 共得到 10 类 OTU (Operational Taxonomic Unit); 其中 *Acinetobacter*(不动杆菌)为优势菌, 共 31 株约占总菌数的 77.5%; *Enterobacter*(肠杆菌属)共 3 株占 7.5%; *Leclercia adecarboxylata*(非脱羧勒克菌)共 2 株占 5%, 其它菌种比较少, 如 *Moraxellaceae*(莫拉菌属)等。冻藏 8d 的鱼鳃样品中细菌文库共测序克隆子 45 个, 共得到 13 类 OUT, 其中 *Fusobacteria bacterium*(梭杆菌)和 *Shewanella* (希瓦

氏菌属)为优势菌, 均为 15 株分别占 33.3%, *Vibrio*(弧菌属)共 7 株占 15.6%, *Photobacterium*(发光杆菌属)共五株占 11.1%, 还有 *Pseudoalteromonas*(单胞菌属)等。冻藏 20 天的鱼鳃样品中细菌文库共测序克隆子 41 个, 得到 10 类 OTU, 其中占优势的为 *Hafnia*(哈夫尼菌属)11 株和 *Serratia*(沙雷菌属)13 株, 分别占 26.8%和 31.7%, *Rahnella*(拉恩氏菌属)有 7 株占 17.1%, *Shewanella*(希瓦氏菌属)共 4 株占 9.8%, 还有一些 *Enterobacter*(肠杆菌属)等比较少。

2.4 系统发育树分析

对于测序后得到的碱基序列, 与 Blast 进行比对, 获取同源性较高的 16S rDNA 序列, 用 MEGA4.1 软

表 1 16S rDNA 克隆文库法对冻藏 1d、8d 和 20d 鲈鱼样品细菌群落组成分析
Tab.1 The bacterial community composition of samples at different frozen storage periods of 1, 8 and 20 days, respectively, by 16S rDNA clone library method

菌属名	菌种名	不同时期的克隆子数量		
		1d	8d	20d
<i>Acinetobacter</i> (不动杆菌属)	<i>Acinetobacter radioresistens</i> 抗辐射不动杆菌	14		
	<i>Acinetobacter</i> sp. 不动杆菌	17		
<i>Enterobacter</i> (肠杆菌科)	<i>Enterobacter ludwigii</i> 肠杆菌属路德类酵母	1		
	<i>Enterobacter bacterium</i> 肠杆菌科细菌	1		3
	<i>Enterobacter cloacae</i> 阴沟肠杆菌	1		
<i>Leclercia</i> (勒克菌属)	<i>Leclercia adecarboxylata</i> 非脱羧勒克菌	2		
<i>Moraxellaceae</i> (莫拉菌属)	<i>Moraxellaceae bacterium</i> 莫拉菌属细菌	1		
<i>Pantoea</i> (泛菌属)	<i>Pantoea eucrina</i>	1		
<i>Stenotrophomonas</i> (寡养单胞菌属)	<i>Stenotrophomonas</i> sp. 寡养单胞菌属某种	1		
<i>Pseudomonas</i> (假单胞菌属)	<i>Pseudomonas fragi</i> 莓实假单胞菌	1		
<i>Fusobacteria</i> (梭杆菌属)	<i>Fusobacteria bacterium</i> 梭杆菌		15	
<i>Photobacterium</i> (发光杆菌属)	<i>Photobacterium</i> sp. 发光杆菌属某种		2	
	<i>Photobacterium kishitanii</i>		1	
	<i>Photobacterium phosphoreum</i> 发光杆菌		2	
<i>Vibrio</i> (弧菌属)	<i>Aliivibrio logei</i>		3	
	<i>Vibrio salmonicida</i> 杀鲑弧菌		4	
<i>Psychrilyobacter</i>	<i>Psychrilyobacter</i> sp.		2	
<i>Shewanella</i> (希瓦氏菌属)	<i>Shewanella</i> sp.		8	
	<i>Shewanella vesiculosa</i>		4	
	<i>Shewanella algidipiscicola</i>		1	
	<i>Shewanella putrefaciens</i> 腐败希瓦菌		1	
	<i>Shewanella baltica</i> 希瓦氏菌		1	
	<i>Shewanella glacialipiscicola</i>			4
<i>Pseudoalteromonas</i> (假交替单胞菌属)	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 假交替单胞菌		1	
<i>Serratia</i> (沙雷氏菌属)	<i>Serratia proteamaculans</i> 变形斑沙雷氏菌			1
	<i>Serratia</i> sp. 沙雷氏菌属某种			12
<i>Hafni</i> (哈夫尼菌属)	<i>Hafnia</i> sp. 哈夫尼菌属某种			11
<i>Rahnella</i> (拉恩氏菌属)	<i>Rahnella aquatilis</i> 水生拉恩菌			4
	<i>Rahnella</i> sp. 拉恩氏菌属菌			3
<i>Leuconostoc</i> (明串珠菌属)	<i>Leuconostoc gasicomitatum</i> 明串珠菌			1
<i>Aeromonas</i> (单胞菌属)	<i>Aeromonas salmonicida</i> 杀鲑产气单胞菌			1
<i>Buttiauxella</i> (布丘菌属)	<i>Buttiauxella agrestis</i> 乡间布丘菌			1

件绘制鲈鱼在不同冻藏时期内鱼鳃中优势细菌的系统发育树,如图3、图4和图5所示。

发育树的构建选择了数据库中相似性最高且相似性至少大于90%的序列,相似性为94%—100%。图3、图4和图5中的分支都很多,揭示了鲈鱼鱼鳃中微生物菌群的多样性,图3中 *Acinetobacter* 为最多的一类, *Enterobacter ludwigii* 和 *Pantoea eucrina* 在一个大的分支上,亲缘关系比较近, *Enterobacter cloacae* 和 *Moraxellaceae bacterium* 的同源性达99%;图4中 *Fusobacteria bacterium* 和 *Shewanella* sp. 为优势种群, *Photobacterium phosphoreum*、*Vibrio* 和 *Pseudoalteromonas* 也在一个大的分支上;图5中 *Hafnia* 和 *Serratia* 占优势,并且它们之间的某些种同源性高达99%, *Aeromonas salmonicida* 和 *Shewanella glacialipiscicola* 同源性也达到99%。

3 讨论

鲈鱼血红蛋白含量高,有青皮红肉的特点,是弱酸性鱼类,随着冻藏时间的增加,鱼体内的微生物不断增殖,总数不断增加。这说明低温冻藏没有完全抑制微生物生长活动,只是减缓了其生存生长速度,一旦解冻温度上升,细菌会再度急剧增加。而且部分低温微生物能够在比较低的温度下生存并繁殖,引起

冻藏食品变质。鲈鱼微生物群落结构中有部分菌是产酸菌,比如梭杆菌的主要代谢产物是丁酸,哈夫尼菌属发酵葡萄糖能够产酸,导致了pH的下降。鲈鱼死后一段时间,组织中的组氨酸在弱酸性(pH 5.8—6.8)、渗透压不高(盐分含量3%—5%)条件下,在脱羧作用很强的细菌、组胺无色菌等作用下脱羧产生组胺(鲍建民,2006)。

通过16S rDNA克隆文库的构建,能较好地反映鲈鱼在不同冻藏时期的细菌多样性并揭示其存在的优势微生物。三个不同冻藏时期内,鲈鱼鱼鳃中的优势菌不尽相同,冻藏起始的鱼鳃中,优势菌为 *Acinetobacter* (不动杆菌),不动杆菌广泛分布于外界环境中,主要在水体和土壤中,易在潮湿环境中生存,因鱼鳃是用来呼吸的,与海水接触,因此刚冻藏的鲈鱼鱼鳃中不动杆菌是优势菌;由于刚冻藏的鱼体比较新鲜,组胺含量也较少,此时产组胺的菌株也少。经冻藏一周左右后其优势菌为 *Fusobacteria bacterium* (梭杆菌)和 *Shewanella* (希瓦氏菌属),其中梭杆菌正常寄生于人或动物的口腔、上消化道、肠道及泌尿生殖道和土壤中;希瓦氏菌属是耐盐、耐低温的菌,经冻藏8d的鱼体鳃组织中成为优势菌,其中如腐败希瓦氏菌,能在低温下生长,是腐败菌,具有很强的产生氨等腐败产物的能力,易引起食物的腐败变质,

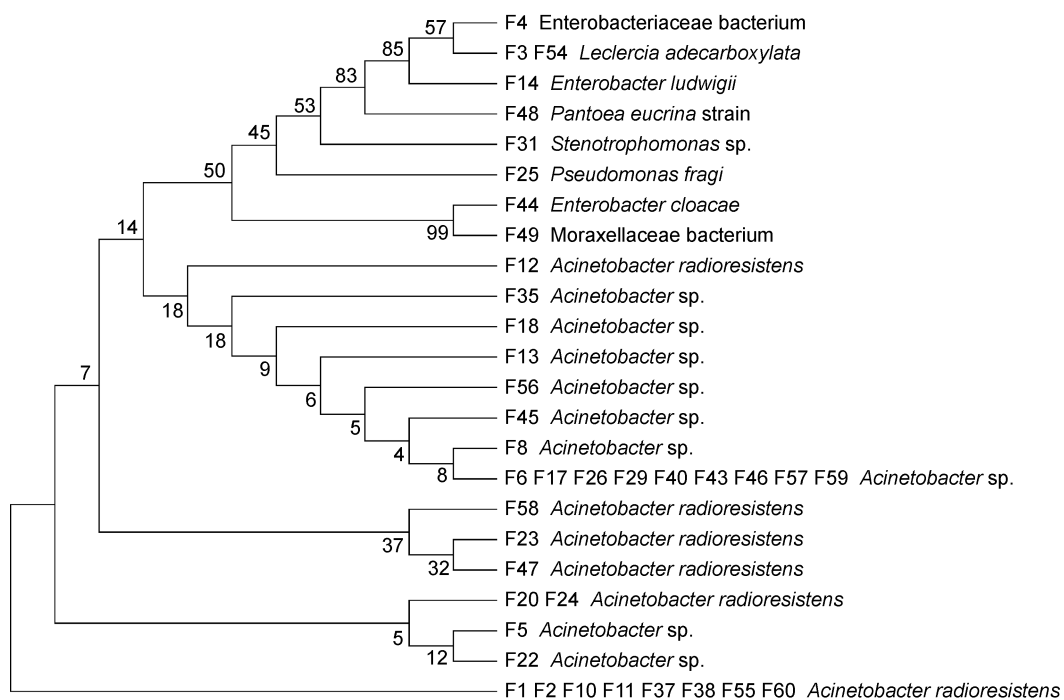


图3 冻藏1d鲈鱼鱼鳃中微生物菌群系统发育树(F1—F60为编号)

Fig.3 The phylogenetic tree of microbial flora in *P. japonicus* gill of 1 day frozen storage (F1—F60 as a serial number)

是冷藏食品腐败的重要原因菌。冻藏 20d 的鲈鱼鱼鳃中优势菌为 *Hafnia*(哈夫尼菌属)和 *Serratia*(沙雷菌属), 哈夫尼菌属分布在人和动物包括鸟类的粪便, 也分布在污水、土壤、水和乳制品中, 沙雷菌属细菌广泛存在于自然界, 为条件致病菌, 一般情况下不引起感染。经文献分析, *Hafnia*(哈夫尼菌属)(Kung *et al*, 2009)和 *Serratia*(沙雷菌属)(Chen *et al*, 2008)中的一些菌种均可能产生组胺; 也有研究表明(Kung *et al*, 2010), *Enterobacter*(肠杆菌属)、*Pantoea*(泛菌属)(杨健等, 2011)、*Vibrio*(弧菌属)(陶志华等, 2009)、*Photobacterium*(发光杆菌属)(Emborg *et al*, 2005)、*Aeromonas salmonicida*(杀鲑产气单胞菌)(赵中辉等, 2011)都是产组胺菌; 其中肠杆菌属、泛菌属是高组胺产生菌, 而哈夫尼菌属在 22℃ 比 35℃ 产生的组胺更多 (Daniele *et al*, 2008), 说明鱼肉在室温中放置更容易产生组胺。作者在序列比对过程中发

现, 三个文库 126 个克隆子中有一半克隆子与 GenBank 数据库中已知 16S rDNA 序列相似性高达 100%, 但还有一部分在 95% 以下, 表明鲈鱼鳃体系中附着有新的未开发的微生物资源。因为鲈鱼处于海洋环境中, 由于其特殊的压强、pH 等条件使很多微生物难于用纯培养的方法分离、鉴定, 有待于进一步研究。构建的系统发育树中一些可能产组胺的菌群之间的亲缘关系比较近, 有些甚至高达 99% 以上。

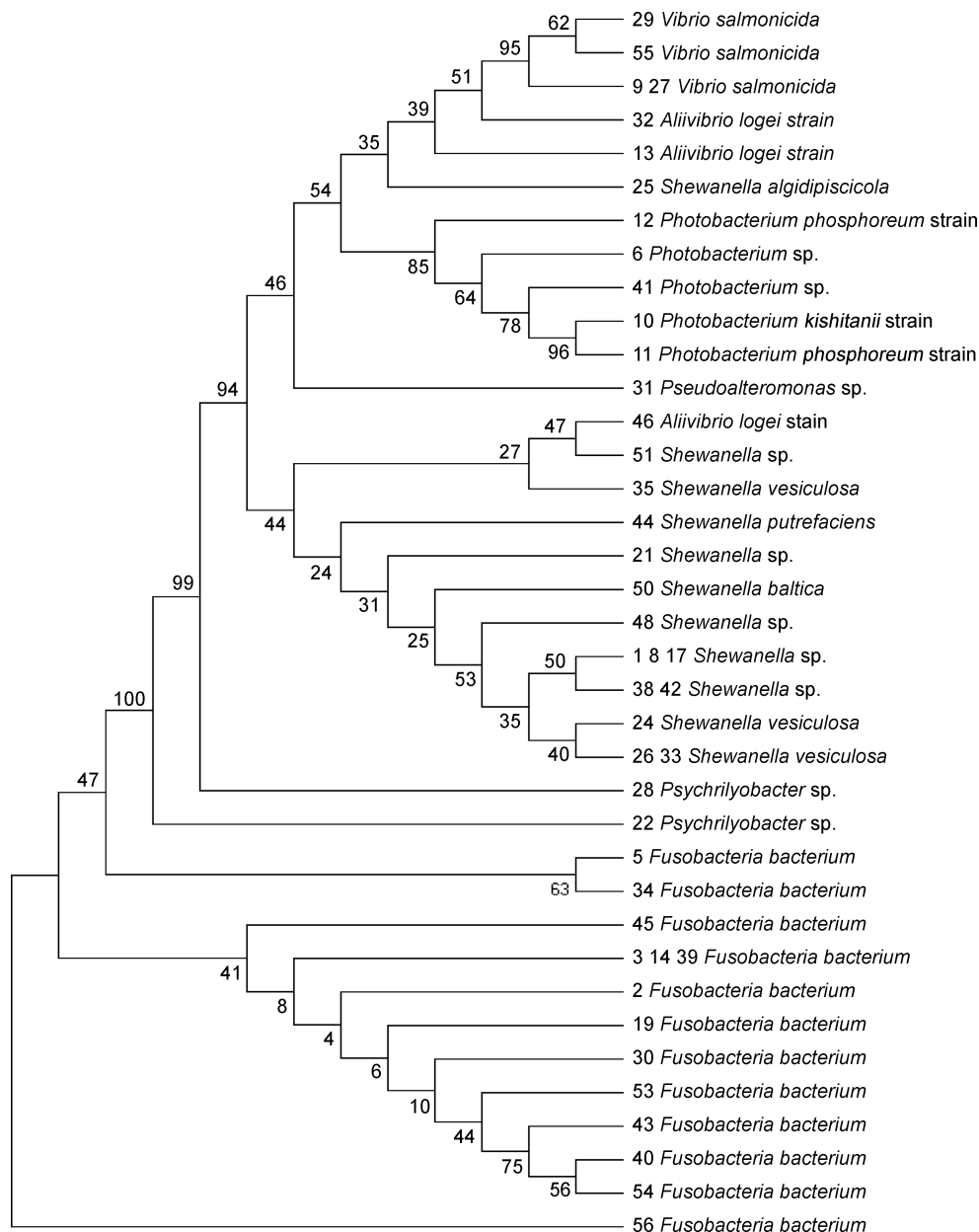


图 4 冻藏 8d 鲈鱼鱼鳃中微生物菌群的系统发育树(1—56 为编号)

Fig.4 The phylogenetic tree of microbial flora in *P. japonicus* gill of 8 day frozen storage (1—56 as a serial number)

由 16S rDNA 克隆文库方法检测鲈鱼鳃内细菌多样性结果表明, 随着冻藏时间的增加, 产组胺菌种类越来越多, 其数量也不断增加, 由此影响到水产品加工品的食用安全问题; 因此, 为防止组胺中毒事件的发生, 对鲈鱼进行深加工其原料新鲜度的控制变得非常重要。有关鲈鱼不同冻藏时期内脏体系中的优势微生物及其动态变化规律的进一步研究, 可完善鲈鱼加工体系的微生物群落结构及数量变化规律, 为

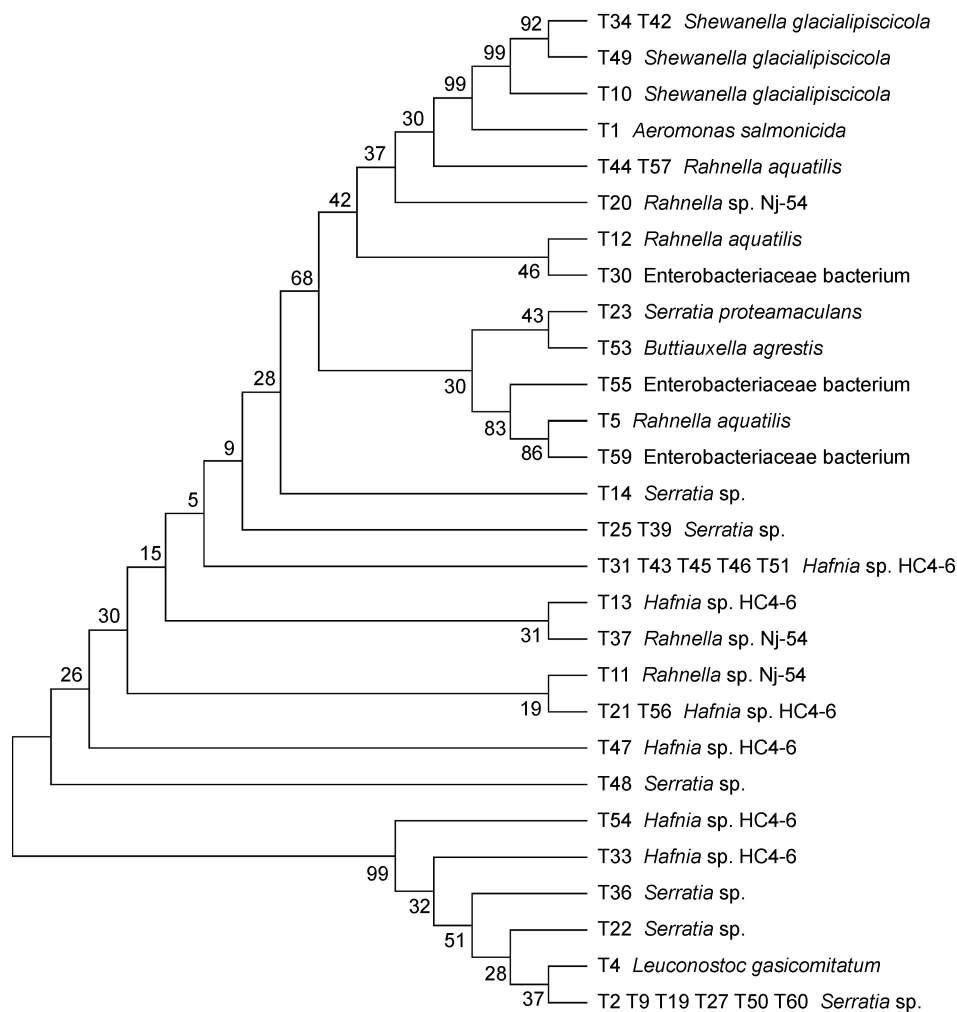


图5 冻藏 20d 鲈鱼鱼鳃微生物菌群的系统发育树(T1—T59 为编号)

Fig.5 The phylogenetic tree of microbial flora in *P. japonicus* gill of 20 day frozen storage (T1—T59 as a serial number)

解决水产品卫生安全问题和建立有效的控制方法提供捷径。

4 结论

4.1 鲈鱼鳃体系呈弱酸性, pH 在 5.8—6.8 之间, 有助于产组胺菌的脱羧作用。鲈鱼鱼鳃的细菌总数随着冻藏天数的增加, 总的变化趋势是不断增加, 冻藏后期呈缓慢上升趋势, 其细菌总数均 $<1.0 \times 10^6$ cfu/ml。

4.2 采用不依赖于传统培养的分子检测技术可揭示鲈鱼鳃内细菌菌群组成的多样性及优势微生物。研究表明, 不同时期鲈鱼鳃内的菌群多样性均较强, 冻藏初期的鲈鱼鱼鳃组织其细菌种群分别有不动杆菌(*Acinetobacter*)、肠杆菌(*Enterobacter*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、非脱羧勒克菌(*Leclercia adecarboxylata*)和单胞菌(*Stenotrophomonas*)等; 冻藏 8d 的

鳃体系细菌组成种类有梭杆菌(*Fusobacteria*)、发光杆菌(*Photobacterium*)、弧菌(*Vibrio*)和希瓦氏菌(*Shewanella*)等; 冻藏 20d 的鲈鱼鳃组织有单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、拉恩氏菌(*Rahnella*)、哈夫尼菌(*Hafnia*)、肠杆菌(*Enterobacter*)、乡间布丘菌(*Buttiauxella agrestis*)和沙雷氏菌(*Serratia*)等。

4.3 鲈鱼冻藏不同时期的优势菌群和产组胺菌都有变化。冻藏 1d 的鳃体系中不动杆菌属(*Acinetobacter*)为优势菌, 占 77.5%, 产组胺菌如泛菌属(*Pantoea*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)较少; 第 8 天优势种群是梭杆菌属(*Fusobacteria* bacterium)和希瓦氏菌属(*Shewanella*), 而产组胺菌如发光杆菌属(*Photobacterium*)、弧菌属(*Vibrio*)较前期产组胺菌数量有所增加; 第 20 天的优势种群为哈夫尼菌属(*Hafnia*)、沙雷菌属(*Serratia*), 它们均为产组胺的菌群。

参 考 文 献

- 马鸣超, 姜 昕, 李 俊, 2008. 应用 16S rDNA 克隆文库解析人工快速渗滤系统细菌种群多样性. 微生物学通报, 35(5): 731—736
- 王 芳, 杨季芳, 陈吉刚等, 2010. 海水养殖蟹体内与外部环境菌群结构的 PCR-DGGE 比较——以三疣梭子蟹和锯缘青蟹为例. 海洋学研究, 28(4): 59—64
- 刘玮琦, 茆振川, 杨宇红, 2008. 应用 16S rRNA 基因文库技术分析土壤细菌群落的多样性. 微生物学报, 48(10): 1344—1350
- 杨 健, 吴祖芳, 2011. 食品中产组胺微生物及其控制的研究进展. 食品工业科技, 3: 384—387
- 林 洪, 周德庆, 2005. 水产品安全性. 中国轻工业出版社, 95—96
- 赵中辉, 林 洪, 李振兴, 2011. 鲛鱼鱼肉中组胺菌的分离与鉴定. 食品科学, 32(7): 194—197
- 陶志华, 佐藤实, 2009. 金枪鱼肉中组胺菌的分离及其理化性

- 质分析. 生物技术, 19(5): 41—43
- 蒋 燕, 鲍宝龙, 谢彩霞等, 2010. 16S rDNA 文库法分析草鱼肝胰脏和胆汁细菌群落组成. 上海海洋大学学报, 19(4): 440—446
- 谢 超, 王阳光, 邓尚贵, 2009. 水产品中组胺控制降解技术研究概述. 食品工业科技, 12: 414—417
- 鲍建民, 2006. 鲐鱼的营养价值及组胺中毒的预防. 中国食物与营养, 3(3): 55—55
- 翟红蕾, 杨贤庆, 郝淑贤等, 2010. 水产品中组胺的研究概述. 广东海洋大学(2010年10月16, 17日)“食品加工与安全”学术研讨会暨2010年广东省食品学会年会论文集, 398—402
- Chang S, Kung H, Chen H *et al*, 2008. Determination of histamine and bacterial isolation in swordfish fillets (*Xiphias gladius*) implicated in a food borne poisoning. Food Control, 19(1): 16—21
- Chen H, Kung H, Chen W *et al*, 2008. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning. Food Chemistry, 106: 612—618
- Daniele P, Grassi M, Civera T, 2008. Production of biogenic amines by some Enterobacteriaceae strains isolated from dairy products. Italian Journal of Food Science, 20(3): 411—417
- Emborg J, Laursen B, Dalgaard P, 2005. Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2°C — effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. International Journal of Food Microbiology, 101(3): 263—279
- Kung H, Lee Y, Huang Y *et al*, 2010. Biogenic amines content, histamine-forming bacteria, and adulteration of pork and poultry in tuna dumpling products. Food Control, 21(7): 977—982
- Kung H, Wang T, Huang Y *et al*, 2009. Isolation and identification of histamine-forming bacteria in tuna sandwiches. Food Control, 20(11): 1013—1017
- Liu Y, Zhang T, Fang H, 2005. Microbial community analysis and performance of a phosphate-removing activated sludge. Bioresource Technology, 96(11): 1205—1214
- Tsai Y, Kung H, Lee T *et al*, 2005a. Determination of histamine in canned mackerel implicated in a food borne poisoning. Food Control, 16: 579—585
- Tsai Y, Lin C, Chang S *et al*, 2005b. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan. Food Microbiology, 22: 461—467

ANALYSIS OF BACTERIA DIVERSITY AND PREDOMINANT MICROORGANISM IN AQUATIC PRODUCTS OF MACKEREL

WENG Pei-Fang¹, LI Wei-Wei¹, WU Zu-Fang¹, ZHOU Xiu-Jin²,
CHEN Shu-Bing³, ZHANG Jing-Jiao¹

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo, 315211; 2. Zhoushan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhoushan, 316100;

3. Ningbo Academy of Science & Technology for Inspection and Quarantine, Ningbo, 315012)

Abstract In order to investigate the bacteria community and predominant microbes in *Pneumatophorus japonicus* at different frozen periods of 1, 8 and 20 days, the analysis of 16S rDNA gene clone library and clones methods were used in this paper. The microbial diversity, predominant species and the changes of histamine-producing strains of the samples of *P. japonicus* gills were detected at the different storage periods. The results indicated that a microbial diversity profile was shown from a mackerel gill. The predominant microorganism is *Acinetobacter* sp. which accounted for 77.5% in total population of microbes, over 1 day frozen storage. There are less histamine-producing strains such as *Pantoea* and *Enterobacter* species in this period. The predominant microorganisms change to *Fusobacteria* bacterium and *Shewanella* species at the 8th day of frozen storage period, and the population of histamine-producing strains such as *Photobacterium* and *Vibrio* species increased in this period. The predominant microbes are *Hafnia* and *Serratia* species over 20 days of frozen storage. They are all histamine-producing strains. The understanding of bacterial diversity and its predominant microorganisms in a mackerel gill can provide important information for quality control and histamine formation caused by microbes of the aquatic product.

Key words *Pneumatophorus japonicus*; 16S rDNA clone library; histamine-forming strains; dominant species; phylogenetic analysis