

养殖大黄鱼冷却链全程细菌定性和定量研究*

许 钟 郭全友 杨宪时

(中国水产科学研究院东海水产研究所,上海,200090)

摘 要 对在闽东三都湾养殖密集海区所捕获的大黄鱼冷却链全过程的产品品质和细菌相变化进行了定性和定量研究。刚捕获的大黄鱼,其细菌总数受养殖水域卫生状况影响很大,为 4.1×10^6 cfu/g,菌群中嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)居优势,占25.2%,阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)和弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)占较大比例。处理后的细菌总数和细菌相表明,加工处理过程没有明显的细菌污染。冰藏初期细菌总数明显下降,菌群中好冷的不动细菌(*Acinetobacteria*)和摩氏杆菌(*moxeralle*)比例上升,其他菌群不同程度下降,出现了较多比例的假单胞菌(*Pseudomonas spp.*)和腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*),表明鱼体温度迅速下降对有些细菌产生了冷冲击致死作用。冷藏过程中,腐败希瓦氏菌增殖比其他细菌快,在货架期终点达到86.0%,是冷却链大黄鱼产品的优势腐败菌。货架期终点12 d时,细菌总数为 6.7×10^7 cfu/g。

关键词 大黄鱼,冷却链,细菌相,腐败希瓦氏菌,养殖水域卫生

对于鲜鱼产品而言,在鱼被捕获后的处理加工、贮藏流通过程中,保持鱼体始终维持0~8℃的冷却链温度是至关重要的^[1]。调查显示,不同加工企业的产品冷却链,在70%~90%的时间鱼体温度可以保持在0~8℃^[2]。研究表明,低温菌群能够较好地适应冷却温度并生长增殖,其中生长增殖速度快并产生感官不能接受的代谢产物的腐败菌,称为特定腐败菌(SSO)^[3]。国外近10年来不间断地进行了鱼类从新鲜到腐败的微生物菌相研究^[4-6]。但是SSO涉及不同水域和鱼种,在这方面我国应该开展自己的研究,尤其鉴于养殖鱼情况不同,开展冷却链过程细菌相变化的研究更显重要。

本文研究了改进后的大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)冷却链中刚捕获、处理后、冷藏初期、货架期终点大黄鱼的微生物学品质,定性和定量研究了这些样品的细菌相,对冷却链过程细菌种群的消长情况进行了分析,从这两个方面对影响冷却链大黄鱼品质安全的因素进行了评估,找出存在的问题和改进的途径,也为进一步研究大黄鱼冷却链特定腐败菌(SSO)打下基础。

1 材料与方 法

1.1 改进后的冰鲜大黄鱼产品冷却链过程

大黄鱼从养殖网箱捕获后立即投入冰水中冷却

致死,经过挑选、分级等处理,3层冰2层鱼装入专用聚苯乙烯泡沫塑料鱼箱。一般19:00~20:00开始捕获,深夜运入加工厂,第2天上午8:00~10:00加工结束。采用3~5℃冷藏车运输,到达市场后,鱼箱放置于3~5℃的冷藏库,直到卖出。自捕获至卖出的鱼体温度用数字式测温计和自动温度-时间记录仪监测。

1.2 鱼体温度测定

按照参考文献[2]的方法测定。

1.3 冷却链各阶段大黄鱼样品采集

刚捕获大黄鱼2004年9月从福建闽东三都湾的养殖场网箱中取样,处理后大黄鱼从宁德市宇杰水产品有限公司加工厂包装台取样。立即装入隔热容器,冰埋,3 h内用于实验。冷藏初期大黄鱼,从宇杰公司加工厂包装台取整箱大黄鱼,随冷藏车商业运输至上海批发市场,再运入实验室,放入 5 ± 0.1 ℃低温贮藏箱(Sanyo MIR510),2 d(捕获后3 d)内取样用于实验。货架期终点大黄鱼,鱼箱放入 5 ± 0.1 ℃低温贮藏箱后,隔天取样进行感官评价、TVBN和细菌总数测定,到综合判断不可接受时即为货架期终点样品。所有样品都是一般规格(300~400 g/尾)。

1.4 样品处理

每次实验取2尾大黄鱼,先对生鱼进行感官评价,然后去鳞,去内脏,去鳃,洗净,用滤纸把鱼体表面的水吸干,沿脊骨剖切,取半侧鱼肉连同鱼皮,用组织捣碎机捣碎成鱼肉浆,用于TVBN和细菌总数测定,其余半侧鱼连同鱼头煮熟后用于感官评价。

1.5 货架期终点判定

第一作者:学士,副研究员。

* 国家引进国际先进农业科学技术项目(No. 2001-478)

收稿日期:2005-05-30

以感官评分为主,结合 TVBN 值和细菌总数,综合评价鱼的鲜度,判定货架期终点。感官评分、TVBN 值和细菌总数测定按照参考文献[2]的方法。

1.6 细菌种群的分离鉴定

挑选菌落数合适的平板,分离 1/2 平板的所有菌株或整个平板的所有菌株,然后接种到肉汤或在琼脂培养基平板划线,纯化培养 25℃,24~48 h。肉眼观察菌落形态,革兰氏染色,显微镜观察细胞形态,用荧光法微生物鉴定仪(英国 Sensitire Automated Microbiology System),进行细菌鉴定和分类。

2 结果与分析

2.1 冷却链各阶段大黄鱼微生物学品质变化和货架期

冷却链过程温度变化见图 1。由图 1 可见,由于捕获后的冷却处理不足,处理结束时(捕获后 12~14 h)鱼体温度尚未下降到 0~8℃ 的冷却链范围,这仍是冷却链一个有待改进的环节。

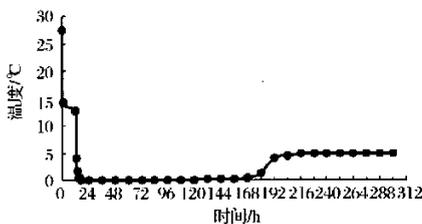


图 1 养殖大黄鱼冷却链过程的温度变化

表 1 冷却链各阶段养殖大黄鱼的品质

冷却链各阶段	刚捕获	处理后	冷藏初期	货架期终点
经过时间	0 h	12~14 h	2~3 d	12 d
鱼体温度/℃	27.4	14.1	0.1	5.7
细菌总数/cfu.g ⁻¹	4.1×10 ⁶	2.3×10 ⁶	6.5×10 ⁴	6.7×10 ⁷
TVBN/ mg(100.g) ⁻¹	—	—	10.65	30.35

刚捕获、处理后、冷藏初期、货架期终点大黄鱼的品质参数见表 1。表 1 大黄鱼取自养殖密集、离岸近的非清洁区,细菌总数很高,为 4.1×10⁶ cfu/g,表明鱼体受养殖水域污染程度高,这一点从对细菌菌相的分析中可以看得更清楚。处理后大黄鱼细菌总数没有明显变化,表明处理过程没有明显的污染,同时也表明尽管捕获后进行了冷却,但是冷却不够充分,鱼体温度为 10℃ 以上,自捕获到处理结束时间较短(不超过 14 h),并且没有进行冲洗,所以细菌总数下降不明显。冷藏初期,细菌总数有所下降,显示冰藏后鱼体温度很快冷却到 0℃,对一些细菌产生了冷冲击(cold shock)致死作用。这些从细菌菌群的变化中可

以看得更清楚。以感官评分、TVBN 值和细菌总数综合判定货架期终点,自捕获到货架期终点为 12 d。

2.2 大黄鱼冷却链过程的细菌相变化

分析细菌总数测定平板可知,刚捕获、处理后和冷藏初期大黄鱼细菌相均很复杂。由表 2 可见,从刚捕获的大黄鱼中鉴定出细菌 7 个种、属,占细菌总数的 85.3%。气单胞菌占 34.1%,尤其嗜水气单胞菌占 25.2% 的很高比例,气单胞菌属弧菌科(Vibrionaceae),非好盐性,嗜水气单胞菌是鱼类和人类的致病菌。嗜麦芽窄食单胞菌或称嗜麦芽寡养单胞菌,原来属于假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.),在刚捕获大黄鱼中占 21% 的较高比例。好冷的不动细菌和摩氏杆菌被认为是冷藏鱼的非腐败菌,在刚捕获大黄鱼中各占 2.2% 的很少比例。被认为海产鱼中检出率应该很低的归属肠杆菌科(Enterobacteriaceae)的阴沟肠杆菌和弗氏柠檬酸杆菌,在刚捕获大黄鱼中占有一定比例,表明大黄鱼养殖场距生活区域和动物活动区域较近,受海水非原有细菌污染较大。

处理过程中,嗜水气单胞菌从 25.2% 下降到 0,而其他气单胞菌呈上升趋势,在冷藏初期仍有一定比例。嗜麦芽窄食单胞菌属中温菌,被认为在冷藏鱼中未显出腐败活性,在处理过程到冷藏初期有所上升和下降。不动细菌和摩氏杆菌在处理过程到冷藏初期呈上升趋势。处理后阴沟肠杆菌和弗氏柠檬酸杆菌上升,到冷藏初期弗氏柠檬酸杆菌仍占有不少比例,阴沟肠杆菌和弗氏柠檬酸杆菌在 5℃ 左右也能增殖,腐败活性强,而且是条件致病菌,给产品带来品质和卫生安全问题。处理后出现了一定比例的革兰氏阳性菌玫瑰小球菌,冰藏初期变化不明显。这些菌群的消长情况表明,捕获后的冷却处理温度不够低,鱼体温度没有充分冷却下来。

冰藏初期的菌群变化是正常的,除了好冷的不动细菌和摩氏杆菌呈上升趋势,其他菌群比例都有所下降,出现了较高比例的假单胞菌和一定比例的腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)。假单胞菌和腐败希瓦氏菌在低温条件下比其他细菌生长显著快,尤其是腐败希瓦氏菌。

货架期结束时菌相趋于简单,腐败希瓦氏菌占 86%,出现了原来属于假单胞菌属的缺陷短波单胞菌。腐败希瓦氏菌即原来属于假单胞菌属非好盐性 IV 群(*Pseudomonas* IV-NH)的腐败假单胞菌(*P. putrefaciens*),后来根据 GC% 转为交替单胞菌属(*Alteromonas* spp.),但依据 5SRNA 又重新归为一个

新属希瓦氏菌属 (*Shewanella* spp.), 在低温下生长速度快, 腐败活性强, 产生 H_2S 、不良气味产物和还原氧化三甲氨(TMAO), 是有名的冰藏鱼腐败菌, 已经

被确认为冰藏冷、温海水鱼特定腐败菌^[4,7]。缺陷短波单胞菌也是冷藏鱼腐败菌。

表2 冷却链各阶段养殖大黄鱼的细菌相

细菌种群	刚捕获(0 h)		处理后(12~14 h)		冷藏初期(2~3 d)		货架期终点(10~12 d)	
	菌株数	比例/%	菌株数	比例/%	菌株数	比例/%	菌株数	比例/%
嗜水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	34	25.2	0	0	0	0	0	0
其他气单胞菌 (<i>Aeromonas</i> spp.)	12	8.9	12	19.4	5	7.1	0	0
嗜麦芽窄食单胞菌 (<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)	28	21.0	15	24.2	13	18.6	0	0
阴沟肠杆菌 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	13	9.6	5	8.1	3	4.3	0	0
弗氏柠檬酸杆菌 (<i>Citrobacter freundii</i>)	7	5.2	8	12.9	7	10.0	0	0
不动细菌 (<i>Acinetobacter</i> spp.)	3	2.2	6	9.7	11	15.7	0	0
摩氏杆菌 (<i>Moraxella</i> spp.)	3	2.2	5	8.1	8	11.4	0	0
玫瑰小球菌 (<i>Micrococcus rose</i>)	0	0	4	6.5	3	5.7	0	0
假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i> spp.)	0	0	0	0	9	12.9	0	0
腐败希瓦氏菌 (<i>Shewanella putrefaciens</i>)	0	0	0	0	5	7.1	74	86.0
缺陷短波单胞菌 (<i>Brevendimonas diminuta</i>)	0	0	0	0	0	0	4	4.7
未鉴定	19	14.7	7	16.1	6	7.2	8	9.3
总数	135	100	62	100	70	100	86	100

3 讨论

(1) 许多研究者指出, 在未污染冷水及温水海域捕获鱼的细菌相中, 非发酵适冷或好冷革兰氏阴性菌占优势, 有假单胞菌、摩氏杆菌、不动细菌、产碱杆菌、希瓦氏菌、黄杆菌等, 例如地中海沙丁鱼初始菌以假单胞菌、好冷菌 (*Psychrobacter*)、不动细菌等革兰氏阴性菌为主^[6]。但温带水域中发酵型革兰氏阴性菌气单胞菌、弧菌也是常见水生菌和鱼类典型菌, 例如日本近海捕获鱼弧菌较多^[4,8]。澳大利亚暖水海域捕获鱼以革兰氏阳性菌小球菌、芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.)、类棒状杆菌 (*Coryneforms*) 为主^[9]。本研究养殖大黄鱼取自福建闽东三都湾养殖区(中国东海约 $N27^{\circ}30'$), 海水温度周年变化幅度约为 $11.6 \sim 29.4^{\circ}C$, 刚捕获大黄鱼菌群中气单胞菌、嗜麦芽窄食单胞菌、不动细菌、摩氏杆菌属正常暖温带海域细菌, 但嗜水气单胞菌和肠细菌科的阴沟肠杆菌和弗氏柠檬酸杆菌占较大比例, 与自然海域鱼的细菌群有很大不同, 应该引起足够重视, 看来清洁养殖势在必行。另外弧菌 (*Vibrio* spp.) 是典型暖、温带海水菌, 但在刚捕获大黄鱼中未检出, 可能是由于其数量少, 也可能是因为所用培养基中含盐量较少, 或培养温度较低, 对其生长不太适宜。

(2) 新鲜海产鱼到达货架期终点最重要的现象是感官判断是否有腐臭味, 新鲜和感官拒绝大黄鱼细菌菌落包括许多腐败细菌, 依据细菌活性和腐败时出现

几率来确定对腐败的重要性, 腐败速率主要受鱼体温度和腐败细菌数两个因素及优势腐败菌的增殖速率影响。鱼捕获后到货架期终点, 主要腐败菌根据鱼种、海域、贮藏条件的差异而不同, 有氧冷藏 ($-1.5 \sim 15^{\circ}C$ 贮藏) 温带海水鱼优势腐败菌为腐败希瓦氏菌, 热带海水鱼冷藏中假单胞菌和腐败希瓦氏菌为优势腐败菌^[4, 10]。本研究养殖大黄鱼捕获于东海暖水海域, 冷却链货架期终点腐败希瓦氏菌比例占 86%, 是冷却链大黄鱼的主要腐败菌, 与其他作者的研究结果相一致。

(3) 腐败和致病菌危害是食用鱼类细菌学研究的两个主要方面, 其中对腐败菌的研究更为普遍。鱼在捕获、处理、流通、贮藏等环节中菌数和菌相与海域环境、处理中设备和人等的卫生状况以及冷却温度条件相关, 清洁冷水海域鱼比暖水海域鱼菌数稍低, 在污染暖水海域中捕获的鱼菌数甚至高达 10^7 cfu/g^[11]。从本研究可知, 冷却链冰鲜大黄鱼产品的微生物污染主要来自养殖海域环境。养殖海水中原有细菌与陆上细菌混合在一起, 构成了复杂的细菌相, 直到冷藏初期, 细菌相复杂, 细菌数比远洋和深海鱼细菌数高, 其中阴沟肠杆菌和弗氏柠檬酸杆菌低温可以生长, 能还原 TMAO 和产生腐败气味, 给大黄鱼冷却链造成不利影响。但决定冷却链大黄鱼货架期的优势腐败菌腐败希瓦氏菌在刚捕获大黄鱼中比例很少, 没有检出, 这是养殖大黄鱼冷却链货架期较长的一个主要原因。如果加强捕获后的冷却, 形成自捕获至卖出的连续不

断的0~8℃冷却链,货架期将会更长。对于我国这样幅员辽阔、人口众多、养殖鱼产量大因而需要大量远距离流通和出口的情况,这是非常重要的。

参 考 文 献

- Hall G M 著. 夏文水, 陈洁, 吕冰译. 水产品加工技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003
- 许钟, 蔡作斌, 肖琳琳, 等. 养殖大黄鱼冰藏流通的货架期试验[J]. 海洋渔业, 2004, 26(4): 306~311
- 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
- Gram L, Huss H H. Microbiological spoilage of fish and fish products [J]. Int J Food Microbiology, 1996, 33: 121~137
- Koutsourmanis K, Nychas G - J E. Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean boque (*Boops boops*) stored aerobically at 0, 3, 7 and 10℃ [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 698~706
- Gennari M, Tomaselli S, Cotrona V. The microflora of fresh and spoiled sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) Sea and stored in ice[J]. Food Microbiology, 1999, 16: 15~28
- Jorgensen B R, Huss H H. Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish [J]. Int J Food Microbiol, 1989, 9: 51~62
- 奥积昌世. 鲜鱼のチルド・フローズン貯蔵における細菌相の変化[J]. 冷冻, 1986, 61: 121~130
- Gram L. Evaluation of the bacteriological quality of seafood [J]. Int J Food Microbiol, 1992, 16: 25~39
- Gram L, Melchiorson J. Interaction of two fish spoilage bacteria, *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas* sp. In fish model systems [J]. J Appl Bacteriol, 1996, 80: 589~595
- Dalgaard P. Freshness, quality and safety in seafoods[Z]. <http://www.exp.ie/flair.html>, 2000

Qualitative and Quantitative Characterization of the Bacteriology of Cultured *Pseudoscianca crocea* in a Chilled Chain

Xu Zhong Guo Quanyou Yang Xianshi

(East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

ABSTRACT The quality and bacterial flora changes of cultured *Pseudoscianca crocea* from SanDu bay in Fujian province in a chilled chain were investigated. The total viable count that was influenced by sanitary condition of the cultured waters on newly caught *Pseudoscianca crocea* reached 4.1×10^6 cfu/g. *Aeromonas hydrophila* (25.5%) dominated in the microflora, and *Enterobacter cloacae* and *Cirtobacter freundii* were in smaller proportion. There was no significant pollution in the preservation on basis of the total viable count and the bacterial flora. During the initial period of chilled storage, the total viable count decreased dramatically, the proportion of *Acinetobacteria* and *moxeralle* increased, the proportion of other bacteria decreased. The higher proportion of *Pseudomonas* spp. and *Shewanella putrefaciens* indicated the dramatically temperature decrease in fish body had a cold-fatal effect on some bacteria. During a chilled storage, *Shewanella putrefaciens* that dominated in the bacterial flora of *Pseudoscianca crocea* in chilled chain grew faster than other bacteria, and its proportion reached 86.0% at the end of shelf life. The total viable count reached 6.7×10^6 cfu/g at the end of shelf life (12 d).

Key words *Pseudoscianca crocea*, chilled chain, bacteriology, *Shewanella putrefaciens*, sanitary of cultured waters

市
场
动
态

燕京啤酒借推介会向法国市场推广

“燕京啤酒——2005年巴黎大型推介会”已在巴黎举行。燕京啤酒将向法国市场推广,力争在年销售量达19亿L的法国啤酒市场争得一席之地。

燕京啤酒2004年初进入英国,2005年4月进入法国,7月又向西班牙和意大利挺进。在进入国外市场初期,燕京啤酒并不着眼于盈利,而在于提升产品的国际知名度,使燕京啤酒成为家喻户晓的品牌。

其在法国市场的具体做法是:确定巴黎中国城进出口公司作为在法国的独家经销代理商;实行有奖销售,开瓶有惊喜;通过当地华文媒体开展推广和宣传,先在中餐馆立足,然后再向其他餐饮店扩展。