

CO发色罗非鱼片中耐冷腐败菌的分离、鉴定及其生长特性

张韵思¹, 郝淑贤², 黄卉², 张冲溢¹, 罗东红¹, 汪玲玲¹

(1. 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642; 2. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘要: 从一氧化碳(CO)发色罗非鱼片中分离到耐冷腐败菌LFA04和LFA09, 经细菌形态学观察和16S rDNA序列分析初步确定两株均为费氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)。菌株LFA04和LFA09生长的适宜温度范围均为4~37℃; 适宜的pH范围均为7~9; 适宜的NaCl浓度范围分别为0~60 g/L和0~40 g/L; 10℃下的生长代时分别为6.9 h和5.87 h, 25℃下的生长代时分别为2.44 h和2.37 h。8℃下菌株LFA04和LFA09在鱼片中的腐败规律相似。前3天细菌增殖较快, 数量由10³ CFU/g增至10⁸ CFU/g; 挥发性盐基总氮(TVB-N)则变化不大, 由10.94 mg/100 g分别变为20.32 mg/100 g (LFA04)和15.97 mg/100 g (LFA09)。第3~7天细菌数量维持稳定, 而TVB-N值则均迅速增加至70 mg/100 g以上, 鱼肉变软发黏, 肉色变绿, 散发腐败臭味。常见消毒剂对菌株LFA04和LFA09的致死率实验结果显示, 2%次氯酸钠和75%乙醇对菌株LFA04和LFA09的致死率均较高, 处理1 min时致死率接近或超过70%; 2.0 mg/L臭氧水对菌株LFA04和LFA09的影响差别较大, 浸泡20 min时致死率分别为34.8%和71.9%。本研究分离到的2株费氏柠檬酸杆菌能够在冰箱温度下正常生长且能导致鱼肉迅速腐败, 其中菌株LFA04经臭氧水处理后存活率较高。因此控制费氏柠檬酸杆菌的污染和繁殖对罗非鱼产品的加工和保鲜尤为重要。[中国水产科学, 2010, 17(3): 570-577]

关键词: CO发色罗非鱼片; 费氏柠檬酸杆菌; 耐冷菌; 鉴定; 生长特性

中图分类号: S983

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)03-0570-08

在食品微生物领域, 耐冷菌(Psychrotroph)通常是指那些能够在0~7℃生长, 并于10 d内产生可见菌落或者浑浊的微生物^[1], 耐冷菌的温度生长范围一般在0~43℃之间。而嗜冷菌(Psychrophile)则特指那些最适生长温度低于15℃, 最高生长温度低于20℃的微生物^[2]。耐冷菌承受温度波动能力较强, 在冰箱温度和常温下都能生长, 是导致各类冷藏食品腐败的主要微生物。食品中常见的耐冷腐败菌有假单胞菌(*Pseudomonas*)、气单胞菌(*Aeromonas*)、不动杆菌(*Acinetobacter*)、产碱杆菌(*Alcaligenes*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)等^[3-5], 还有一些致病菌如李斯特氏菌(*Listeria*)、耶尔森氏菌(*Yersinia*)等常常导致细菌性食物中毒^[6]。研究表明, 耐冷菌除了菌体本身能引起

食品腐败或食物中毒等严重后果外, 还可能产生耐高温酶, 其在高温灭菌后仍能分解食品中的营养成分, 影响产品质量和风味^[7-8]。因此, 耐冷菌在食品中的潜在危害不容忽视。

鱼肉的腐败主要是由细菌生长繁殖引起的, 冷链条件下代谢仍然活跃的耐冷菌通常是引起鱼肉腐败变质的主要微生物。从鱼肉中有针对性地分离耐冷菌, 从中选择腐败活性较强的菌株作为目标菌, 并进一步研究其在鱼肉中的生长规律, 可为优化生产工艺减少鱼肉产品的腐败提供实验依据。经过CO发色的罗非鱼片因其鲜亮的色泽深受消费者喜爱, 但发色处理对产品色泽和微生物的影响并不等效^[9], 部分耐冷菌仍可以在其中大量繁殖并可能引

收稿日期: 2009-09-21; 修订日期: 2009-11-28.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671631); 农业部“948”引进项目(2006-G640); 广东省自然科学基金项目(8451064201001115, 06023352); 华南农业大学生命科学院大学生博士创新项目资助。

作者简介: 张韵思(1987-), 女, 本科生, 生物技术专业, 国家奖学金资助对象. E-mail: cicizhang0418@163.com

通讯作者: 汪玲玲(1977-), 女, 博士, 讲师, 主要从事食品微生物研究. E-mail: llwang417@scau.edu.cn

发食物中毒,而发色产品鲜亮的色泽往往隐蔽了这种危害。CO发色金枪鱼中毒事件就是一个典型的例子^[10]。本研究从冷冻CO发色罗非鱼片中分离出能在8℃下5 d内导致鱼片腐败变质的耐冷菌,对其生长特性、腐败规律和致死条件等方面做了初步研究,旨在为有效控制罗非鱼片产品的微生物腐败提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

鱼片样品为市售冷冻CO发色罗非鱼片。

1.2 方法

1.2.1 耐冷菌的分离 实验设计依据文献[1]对狭义耐冷菌的^[1]定义:7℃时5 d内生长良好,且在40℃不能生长的微生物。称取鱼片样品10 g左右,剪碎后研磨,采用0.1%蛋白胨水溶液倍比稀释制备菌悬液,吸取适当稀释度的0.2 mL菌悬液分别涂布于肉汤培养基表面,7℃下培养5 d。根据菌落形态不同,挑取代表菌落在40℃下培养24 h,此时不能生长的为耐冷菌。

1.2.2 耐冷菌的腐败实验 将分离到的耐冷菌分别接种到液体肉汤培养基中,在25℃、150 r/min条件下培养至OD₆₀₀值达到0.5左右,所得菌液稀释1 000倍后,将无菌鱼片放入其中浸泡5 min,吸水纸吸去多余菌液,放入15 cm培养皿中。将接种后的鱼片置8℃冷藏箱中培养5 d,选择能产生明显腐败臭味的菌株作为实验用耐冷腐败菌。无菌鱼片的制备:华南农业大学三角菜市场购买鲜活罗非鱼,立即送至实验室,去皮骨后切成2.0 cm×2.0 cm×0.5 cm鱼片,2%次氯酸钠溶液浸泡5 min,无菌水冲洗8次。

1.2.3 细菌16S rDNA部分序列分析 PCR扩增的正向引物P1:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物P2:5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR反应条件为:94℃预变性5 min;94℃1 min,45℃1 min,72℃1 min,30个循环;72℃延伸10 min。将经胶回收柱纯化的PCR产物送广州英骏生物公司测序,从P1端测序,长度约为1 kb。将测序结果提交GenBank,用Blast程序进行序列相似性比较分析。

1.2.4 耐冷腐败菌的生长特性测定

(1)耐酸碱测定 将菌株LFA04和LFA09分别接种于pH值为4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0的液体肉汤培养基中,25℃、150 r/min摇床上培养2~3 d。

(2)耐盐性测定 将菌株LFA04和LFA09分别接种到NaCl浓度为0、10、20、30、40、50、60、70 g/L的液体肉汤培养基中,25℃、150 r/min培养2~3 d。

(3)耐高低温测定 将菌株LFA04和LFA09接种于固体肉汤培养基中,分别在0、4、8、20、25、30、37、40℃培养基中培养2~7 d。

(4)生长曲线绘制 将已活化的菌株LFA04和LFA09接种到含80 mL液体肉汤培养基的250 mL三角瓶中,分别于25℃、10℃振荡培养。从0 h开始,25℃下每隔2 h(10℃下每隔6 h)取样,用7230型分光光度计于600 nm处测定吸光值。分别绘制25℃和10℃下的生长曲线。

1.2.5 耐冷腐败菌的腐败规律研究 按1.2.2所述方法将菌株LFA04和LFA09分别接种于无菌鱼片,置于8℃冷藏箱中并于第0、3、7天分析鱼肉感官质量、菌数和挥发性盐基氮含量。

(1)感官质量分析按李杉等^[11]的方法略有改动,由6名食品专业人员组成的评分小组对生鱼片的色泽、气味和质地进行评分,平均值为最终得分。具体评分标准见表1。

(2)细菌总数的测定参考GB/T 4789.2—2003的方法。

(3)挥发性盐基氮含量测定按半微量定氮法^[12]。

1.2.6 常见消毒剂对耐冷腐败菌的致死率测定 按1.2.2所述方法将菌株LFA04和LFA09的菌悬液分别接种于无菌鱼片,4℃冰箱存放12 h,无菌水冲洗鱼片直到流出液无菌(表层的菌体会在浸泡时流失影响致死率的计算)。接着采用以下消毒处理:(1)采用臭氧含量为2 mg/L的臭氧水浸泡10 min、20 min;(2)2%次氯酸钠浸泡1 min、3 min;(3)75%乙醇浸泡1 min、3 min。处理完毕后用无菌水清洗3次,分别测定处理前后的活菌数,计算菌株致死率。

表1 罗非鱼生鱼片感官评定评分标准
Tab. 1 Standard for sensory quality of raw tilapia fillets

| 项目 Item | 分值 Score | | | |
|--------------------|-------------|--------------|---------------|------------|
| | 9-10 | 6-8 | 3-5 | 0-2 |
| 色泽 Color and shine | 肉色半透明,有光泽 | 光泽消失 | 略带褐色 | 褐色或绿色等 |
| 气味 Odor | 鱼特有的新鲜气味 | 无明显气味 | 轻微酸臭味 | 酸臭味明显 |
| 质地 Texture | 鱼肉坚实,指压立即复原 | 鱼肉坚实,指压后复原缓慢 | 鱼肉中度柔软,压痕不易复原 | 鱼肉柔软,表面有黏液 |

2 结果与分析

2.1 CO发色罗非鱼片中耐冷腐败菌的分离

将鱼片样品菌悬液涂布于肉汤培养基表面,7℃下培养5 d,共分离到9株耐冷菌,分别命名为LFA01~LFA09。将菌株LFA01~LFA09分别接入无菌鱼片上,8℃下培养5 d。结果发现接有菌株LFA04和LFA09的鱼片散发腐败臭味,其他鱼片与对照无明显差异。因此以菌株LFA04和LFA09作为试验菌株做进一步研究。菌株LFA04和LFA09的菌落形态基本相同,为灰白色、圆形隆起、不透明、边缘整齐、表面湿润,但两者的菌落直径略有差异,分别为1.5 mm和1.0 mm。经革兰氏染色和显微镜观察,两者均为短杆状革兰氏阴性菌。

2.2 细菌的16S rDNA序列分析

对细菌的16S rDNA的序列进行测定,并将测序结果与GenBank中已发表的16S rDNA序列做同源比对。结果表明,菌株LFA04和LFA09与费氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*) RI19株的16S rDNA同源

性最高,相似性分别为99%和100%。结合细菌形态和菌落特征初步确定菌株LFA04和LFA09均为费氏柠檬酸杆菌。费氏柠檬酸杆菌是人和动物肠道的正常菌群,和大肠杆菌一样,可视作粪便污染的卫生学指标。该菌为条件致病菌,能引起腹泻、尿道感染、菌血症、婴儿脑膜炎等病症^[13]。

2.3 细菌在不同pH值、盐浓度和温度下的生长状况

将菌株LFA04和LFA09分别接入pH为4~11、NaCl浓度为0~70 g/L的肉汤培养基中,分别放在0~40℃的培养箱中培养,观察菌株生长状况。结果表明不同条件下菌株LFA04和LFA09的生长状况基本相同(表2中仅列出菌株LFA04的生长情况),不同之处仅在于菌株LFA09的耐盐性略弱,NaCl浓度等于或低于40 g/L才能生长,而菌株LFA04适宜生长的NaCl浓度范围则为0~60 g/L。菌株LFA04和LFA09均不耐酸,适合在中性偏碱的环境中生长,适宜生长的pH值范围为7~9。多数肉制品、水产品 and 蛋制品的pH值均在此范围内^[14],因此易受该菌的污染。菌株LFA04和LFA09的温度生长范围均为

表2 菌株LFA04在不同pH值、盐浓度和温度下的生长状况
Tab. 2 Growth of strain LFA04 under different pH, NaCl concentration and temperatures

| pH | 结果 Result | NaCl/(g · L ⁻¹) | 结果 Result | 温度/℃ Temperature | 结果 Result |
|------|-----------|-----------------------------|-----------|------------------|-----------|
| 4.0 | — | 0 | ++ | 0 | — |
| 5.0 | — | 10 | ++ | 4 | + |
| 6.0 | — | 20 | ++ | 8 | + |
| 7.0 | ++ | 30 | ++ | 20 | + |
| 8.0 | ++ | 40 | ++ | 25 | ++ |
| 9.0 | + | 50 | + | 30 | ++ |
| 10.0 | — | 60 | + | 37 | + |
| 11.0 | — | 70 | — | 40 | — |

注:“—”表示不生长;“+”表示生长;“++”表示生长旺盛。

Note: “—” no growth, “+” growth, “++” better growth.

4~37℃,最适生长温度在25~30℃左右,可见菌株LFA04和LFA09既是耐冷菌,又是嗜温菌。此类菌株能够在低温下进行新陈代谢,遇到温度较高的常温下则生长更快,它们往往是引发食品变质的主要因素^[15]。根据以上生长特性可见,菌株LFA04和LFA09适合生长于各类生鲜畜禽肉、水产品、蛋制品等食品生境中,对于pH值较低的果蔬制品、乳酸发酵产品以及盐浓度较高的腌制品适应性较差。

2.4 细菌的生长曲线

分别在25℃和10℃条件下测定菌株LFA04和LFA09的生长曲线。由图1可见,菌株LFA04和LFA09在25℃下的生长曲线基本吻合(图1a),接

种后很快进入对数期,16h后细菌进入稳定期和衰亡期。10℃下(图1b)菌株LFA09的对数生长期比LFA04的略短,为6~54h,菌株LFA04则为6~60h。利用公式计算代时 $G=[(t_2-t_1)\lg 2]/(\lg N_{t_2}-\lg N_{t_1})$,其中 t_1 、 t_2 表示不同的生长时间, N_{t_1} 、 N_{t_2} 表示 t_1 、 t_2 时刻下对应的菌数。结合菌液OD₆₀₀与活菌数的关系分别计算代时(G),菌株LFA04 25℃和10℃下的 $G_{25℃}$ 和 $G_{10℃}$ 分别为2.44 h和6.9 h,菌株LFA09的 $G_{25℃}$ 和 $G_{10℃}$ 分别为2.37 h和5.87 h。可见两株菌在25℃下的生长速度差别不大,但在10℃下菌株LFA09的代时比LFA04的短1.03 h,说明低温下菌株LFA09更具有生长优势。

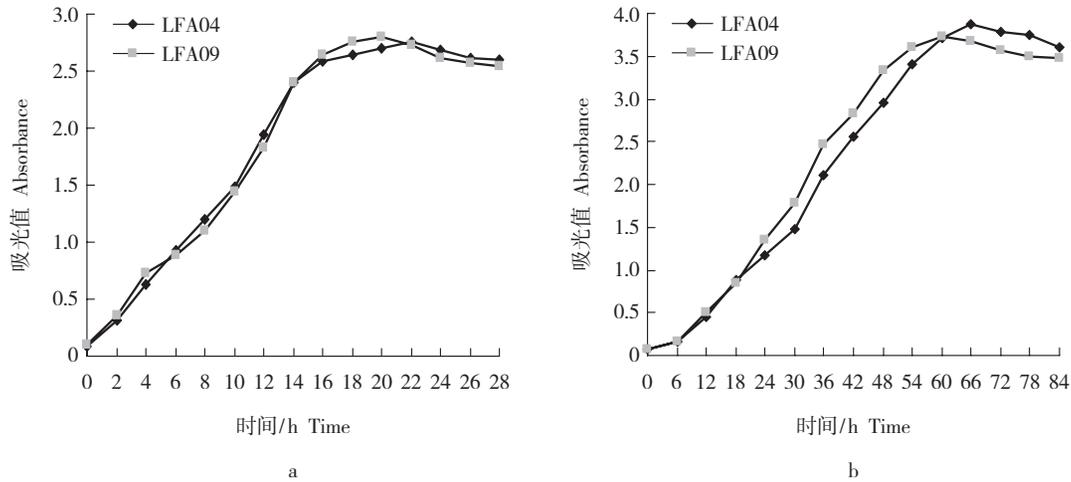


图1 菌株LFA04和LFA09在25℃(a)和10℃(b)条件下的生长曲线
Fig. 1 Growth curve of strain LFA04 and LFA09 at 25℃(a) and 10℃(b)

2.5 细菌的腐败特性

为了研究菌株LFA04和LFA09在罗非鱼片中的腐败过程,在第0、3、7天分别检测菌数、TVB-N值以及鱼片色泽、气味和质地,结果如表3所示,菌株LFA04和LFA09在鱼片中的增殖规律基本相同。前3天细菌增殖很快,菌数由 10^3 CFU/g增至 10^8 CFU/g,随着冷藏时间继续延长,菌数变化不大。TVB-N值变化情况与细菌增殖规律有所不同,前期增幅较小,后期增幅较大。新鲜鱼片的TVB-N值为10.94 mg/100 g,接种菌株LFA04和LFA09后第3天TVB-N值变为20.32 mg/100 g和15.97 mg/100 g,到第7天分别增至

74.76 mg/100 g和73.00 mg/100 g。感官指标变化趋势与TVB-N值变化趋势基本相同。冷藏终点时2种鱼片都出现肉质变软发黏,肉色变绿,散发腐败臭味等现象。

2.6 不同消毒处理下的菌株致死率

鱼片在加工前通常会采用一些消毒措施,减少初始菌量,延缓腐败发生。酒精和次氯酸钠是最常见的消毒剂,臭氧由于易于分解无残留也逐渐应用于水产品加工中。本研究以75%乙醇、2%次氯酸钠和2.0 mg/L臭氧水分别处理接有菌株LFA04和LFA09的罗非鱼片。结果如表4所示。2%次氯酸

表3 菌株LFA04和LFA09在不同冷藏时间的罗非鱼片中的腐败过程
Tab.3 Spoilage regulation of LFA04 and LFA09 in tilapia fillets after different cold preservation time

| 指标 Indicator | LFA04 | | | LFA09 | | |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 0 d | 3 d | 7 d | 0 d | 3 d | 7 d |
| 菌数/(CFU · g ⁻¹) Bacterial count | 4.5×10 ³ | 1.0×10 ⁸ | 7.7×10 ⁸ | 2.5×10 ³ | 1.5×10 ⁸ | 2.7×10 ⁸ |
| TVB-N/(mg · 100 ⁻¹ · g ⁻¹) | 10.94 | 20.32 | 74.76 | 10.94 | 15.97 | 73.00 |
| 色泽 Color and shine | 9.67 | 6.67 | 1.33 | 9.83 | 3.67 | 1.00 |
| 气味 Odor | 9.67 | 4.17 | 0.67 | 9.67 | 7.00 | 0.83 |
| 质地 Texture | 9.83 | 6.33 | 1.50 | 9.5 | 6.00 | 1.33 |

表4 消毒剂对菌株LFA04和LFA09的影响
Tab.4 Effect of disinfectant treatment on strain LFA04 and LFA09

| 消毒剂 Disinfectant | 处理时间/min Treatment time | 细菌数量/(CFU · g ⁻¹) Bacterial count | | 致死率/% Lethal rate | |
|--|----------------------------|--|---------------------|----------------------|-------|
| | | LFA04 | LFA09 | LFA04 | LFA09 |
| 75% 乙醇 75% Ethanol | 0 | 1.7×10 ⁴ | 3.8×10 ⁴ | / | / |
| | 1 | 4.1×10 ³ | 4.9×10 ³ | 76.2 | 87.1 |
| | 3 | 2.3×10 ³ | 3.2×10 ³ | 86.6 | 91.5 |
| 2% 次氯酸钠 2% Sodium hypochlorite | 0 | 1.7×10 ⁴ | 3.8×10 ⁴ | / | / |
| | 1 | 5.3×10 ³ | 1.2×10 ⁴ | 69.8 | 68.4 |
| | 3 | 4.7×10 ³ | 8.7×10 ³ | 72.9 | 77.1 |
| 2.0 mg · L ⁻¹ 臭氧水 2.0 mg · L ⁻¹ Ozone water | 0 | 4.0×10 ⁴ | 3.1×10 ⁴ | / | / |
| | 10 | 3.3×10 ⁴ | 1.2×10 ⁴ | 18.5 | 61.3 |
| | 20 | 2.6×10 ⁴ | 8.7×10 ³ | 34.8 | 71.9 |

钠和75%乙醇对菌株LFA04和LFA09的杀伤力均较强,处理1 min时致死率接近或超过70%。菌株LFA09比LFA04更为敏感,75%乙醇处理3 min致死率高达91.5%。2.0 mg/L臭氧水处理对菌株LFA04的杀伤力较弱,处理20 min致死率仍不足35%,而对菌株LFA09的杀伤力则相对较强,处理10 min和20 min的致死率为61.3%和71.9%。

3 讨论

3.1 CO发色罗非鱼片中耐冷菌的分离

本研究从市售冷冻CO发色罗非鱼片中分离出耐冷腐败菌LFA04和LFA09,细菌形态学和16S rDNA序列分析发现两菌株均为费氏柠檬酸杆菌。自从1946年Barnes等^[16]报道了第一起由费氏柠檬酸杆菌引起的食物中毒事件以来,国外曾多次报道该菌可引起腹泻等病症^[17-18]。1987年Alfredo等分离出能产生耐热性肠毒素的费氏柠檬酸杆菌菌株,

初步认定其是引起腹泻的病原菌之一^[19]。国内对费氏柠檬酸杆菌的报道较少,仅见周联等^[13]报道了由于食用受费氏柠檬酸杆菌污染的凉拌菜引起的细菌性食物中毒案例。尽管在国内该菌还未引起重视,但是随着人们生活水平的提高,对食品的要求也会越来越高,研究更多的条件致病菌在食品中的生长规律,有利于提高相关食品的食用安全性,保证人们的身体健康。

许钟等^[20]曾从闽东三都湾养殖密集海区捕获的大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)中分离到费氏柠檬酸杆菌,并发现该菌能在5℃下生长,腐败活性很强,与本研究结果相符。刘寿春等^[21]也从养殖罗非鱼的池水中分离过少量费氏柠檬酸杆菌。费氏柠檬酸杆菌为肠杆菌科(Enterobacteriaceae)细菌,主要存在于人和动物的肠道中。目前关于罗非鱼的腐败菌组成,多以假单胞菌、气单胞菌和大肠杆菌等革兰氏阴性菌为主^[22],也有芽孢杆菌的报道^[21],未见有柠檬酸杆菌的报道。分析原因有以下3个方面:1)鱼肉的腐败菌群

组成受多种因素,如鱼体生活环境、季节及加工方式等影响而存在较大差异。2)本研究采用低温培养7℃下培养,其他研究多采用25℃以上温度培养,培养温度的差异会导致分离到的菌群不同。3)CO发色鱼片中氧含量比未发色鱼片低,而费氏柠檬酸杆菌可能更适于生长在氧含量较低的发色鱼片中。

3.2 菌株LFA04和LFA09在鱼片中的腐败过程

菌株LFA04和LFA09不仅能在4℃的低温下生长,而且还具有较强的致腐能力,鱼片染菌后8℃下冷藏7d时TVB-N分别增至74.76 mg/100 g和73.00 mg/100 g,是腐败鱼片TVB-N界定值为30~35 mg/100 g^[23-24]的2~3倍。因此一旦鲜鱼或其加工产品在生产运输过程中污染该菌,很可能加速鱼肉腐败。染菌鱼片8℃冷藏0 d、3 d、7 d的检测数据结果表明,冷藏前期(0~3 d)细菌数量增幅较大,TVB-N值变化不大;后期(3~7 d)恰好相反,TVB-N值增加迅速,细菌数量维持稳定。别春彦等^[25]发现淡腌黄鱼产品5℃、10℃下保藏时,在保藏初期TVB-N增长缓慢,后期TVB-N值迅速上升,与本研究结果类似。彭勇等^[26]将肠杆菌(*Enterobacter*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)和索丝菌(*Brochothrix*)接种到冷却猪肉中观察腐败过程,发现肠杆菌产生的TVB-N在冷藏前期就开始迅速增加,而热杀索丝菌和假单胞菌的腐败规律则有所不同,冷藏初期产生的TVB-N值较低,在第10天以后,才开始快速增加。本研究中菌株LFA04和LFA09在鱼片中的腐败属于TVB-N产生明显滞后于细菌增殖的类型。推测鱼片腐败与细菌增值不同步与腐败菌产生的蛋白酶等致腐物质的表达时间以及表达量有关。

3.3 消毒剂对菌株LFA04和LFA09的致死率

CO发色罗非鱼片中腐败菌的来源包括养殖池水、鱼体本身、加工环境以及操作人员带菌等。次氯酸钠溶液和酒精溶液常作为鱼片加工器具的表面消毒剂,菌株LFA04和LFA09对2种溶液都较为敏感,处理1 min的致死率接近或大于70%,说明上述2种消毒液可以有效控制此类菌的生长繁殖。臭氧具有强氧化性,能够氧化细菌蛋白质的活性基团,

导致菌体死亡。刁石强等^[27]用臭氧冰保藏鲜罗非鱼片,结果有效降低了TVB-N的产生,细菌菌落总数减少82%~97%,使产品保鲜期延长3~4 d。本研究中菌株LFA04和LFA09的16S rDNA序列都与费氏柠檬酸杆菌RI19的相似性最高,但对臭氧水的耐受力却相差甚远,浸泡10 min的致死率分别为18.5%和61.3%。刘俊梅^[28]测定了2.0 mg/L臭氧水处理10 min对常见食品病原菌的杀灭情况,结果表明对李斯特菌的致死率为96.4%,对沙门氏菌的为93.9%,对金黄色葡萄球菌的为88%。臭氧水对目的菌株的致死率大小受多种因素如臭氧水浓度、温度以及目的菌株的初始菌数等影响。臭氧水对费氏柠檬酸杆菌的杀伤力是否比上述几种致病菌的低还有待进一步验证。

参考文献:

- [1] James M, Martin J, David A. Modern food microbiology [M] 7 Ed. 何国庆等,译.北京:中国农业大学出版社,2008:333.
- [2] 李晶,王继华,崔迪,等.嗜冷菌适冷代谢机制的研究[J].哈尔滨师范大学自然科学学报,2007,23(5):88-91.
- [3] Lawson P, Dainty R H, Kristiansen N, et al. Characterization of a psychrotrophic *Clostridium* causing spoilage in vacuum-packed cooked pork: description of *Clostridium algidicarnis* sp. nov [J]. Lett Appl Microbiol, 1994, 19: 153-157.
- [4] Güven U, Sumru Ç. The isolation of *Pseudomonas* and other Gram (-) psychrotrophic bacteria in raw milks [J]. J Basic Microbiol, 1998, 38(2): 129-134.
- [5] Bonde G J. Phenetic affiliation of psychrotrophic *Bacillus* [M]. Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity. New York: Academic Press, 1981: 39-54.
- [6] 郝涤非.嗜冷微生物与食品加工[J].农产品加工,2007,7:87-88.
- [7] 吴荣荣,王倩,王敏,等.原料乳中嗜冷菌的危害分析及控制研究[J].中国酿造,2008,19:13-16.
- [8] 吴石金,何光华,万常诘,等.原料乳嗜冷菌分离株微生物学特征研究[J].中国乳品工业,2005,33(8):4-6.
- [9] 郝淑贤,李来好,杨贤庆,等.一氧化碳发色肉制品安全性分析[J].食品科学,2006,10:604-608.
- [10] Giulietta S, Enrica D, Claudia F, et al. A rapid spectroscopic method to detect the fraudulent treatment of tuna fish with carbon monoxide [J]. Food Chem, 2007, 101(3): 1071-1077.

- [11] 李杉,马海霞,李来好,等. 减菌化预处理对鲜罗非鱼片质量的影响[J]. 食品科学, 2009,30(18): 379-384.
- [12] 上海市食品卫生监督检验所. GB/T5009.44-2003 食品卫生检验方法理化部分[S]. 北京: 中国标准出版社,2003.
- [13] 周联,张希圣,刘添发,等. 一起弗氏柠檬酸杆菌引起的食物中毒[J]. 现代预防医学,2002,29(5): 678-679.
- [14] 董明盛,贾英明. 食品微生物学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2008: 168-176.
- [15] Harrigan W F. Laboratory methods in food microbiology [M]. 3 ed. 李卫华,译.北京: 中国财政经济出版社,2008: 82.
- [16] Barnes L A, Cherry W B A. A group of paracolon organism having apparent pathogenicity [J]. Am J Public Health, 1946,36: 481-483.
- [17] Baylet R J, Linahard J. Paracoli bethesde (citrobacter) at escherichia freundii en pathological dakaroise [J]. Bull Soc Path Exot, 1959,52: 723-726.
- [18] Wadstrom T, Aust-kettis A, Habt D, et al. Enterotoxin producing bacteria and parasites in stools of Eethiopian children with diarrhea disease [J]. Arch Dis Child, 1976,51: 865-870.
- [19] Guarino A. Production of escherichia coli STa-like heat-stable enterotoxin by citrobacter freundii isolated from humans [J]. J Clin Microbiol, 1987,25(1): 110-114.
- [20] 许钟,肖琳琳,杨宪时,等. 罗非鱼特定腐败菌生长动力学模型和货架期预测[J]. 水产学报,2005,29(4): 540-545.
- [21] 刘寿春,周康,钟赛意,等. 淡水养殖罗非鱼中病原菌和腐败菌的分离与鉴定初探[J]. 食品科学,2008,29(5): 327-331.
- [22] 杨宪时,郭全友,许钟,等. 罗非鱼冷藏过程细菌种群的变化[J]. 中国水产科学,2008,15(6): 1050-1055.
- [23] 何定芬,乐建盛. 贮藏温度和时间对南美白鲜度的影响[J]. 浙江国际海运职业技术学院学报,2006,3: 24-26.
- [24] Huss H H. Fresh fish quality and quality changes [M]. FAO Fisheries Series No.29.FAO, Rome, 1988.
- [25] 别春彦,许钟,杨宪时. 淡腌黄鱼在不同温度下贮藏的微生物及品质变化[J]. 南方水产,2005,1(4): 60-63.
- [26] 彭勇. 冷却猪肉常见腐败微生物致腐能力的研究[D]. 北京: 中国农业大学,2005: 1-43.
- [27] 刁石强,吴燕燕,王剑河,等. 臭氧冰在罗非鱼片保鲜中的应用研究[J]. 食品科学, 2007,28(8): 501-504.
- [28] 刘俊梅. 臭氧杀菌对鸡蛋质量安全的影响[D]. 保定: 河北农业大学,2008: 1-45.

Isolation, identification and growth characteristics of psychrotrophic saprophytic bacteria from tilapia fillets treated with carbon monoxide

ZHANG Yunsi¹, HAO Shuxian², HUANG Hui², ZHANG Chongyi¹, LUO Donghong¹, WANG Lingling¹

(1. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. South China Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Two psychrotrophic and saprophytic strains of LFA04 and LFA09 were isolated from tilapia fillets treated with carbon monoxide (CO). With the method of morphological observation and 16S rDNA sequence analysis, strains LFA04 and LFA09 were both identified as *Citrobacter freundii*. The growth characteristics of LFA04 and LFA09 are as follows: Temperature range for growth was 4–37 °C; pH was 7–9; Sodium chloride concentration was 0–60 g/L for LFA04 and 0–40 g/L for LFA09; Generation time at 10 °C were 6.90 h and 5.87 h, respectively, which at 25 °C were 2.44 h and 2.37 h, respectively. The spoilage regulation of LFA04 and LFA09 on sterilized tilapia fillets was similar at 8 °C. In the first three days, the bacterial count increased rapidly, from 10³ CFU/g to 10⁸ CFU/g. And the value of total volatile basic nitrogen (TVB–N) changed little, from 10.94 mg/100 g to 20.32 mg/100 g (LFA04) and 15.97 mg/100 g (LFA09). In the following four days, the bacterial count kept unchanged, while the TVB–N value of both strains increased to more than 70 mg/100 g, and fillets grew soft and sticky, with green color and off-odors. Lethal rates of strain LFA04 and LFA09 treated with common disinfectant were measured. Strains LFA04 and LFA09 were both sensitive to 75% ethanol and 2% sodium hypochlorite, with the lethal rates reaching or exceeding 70% in one minute. The effects of 2 mg/L ozone water to LFA04 and to LFA09 were different, with the lethal rate being 34.8% and 71.9% after immersed for 20 minutes. Two *C. freundii* strains isolated in this study could grow well at refrigeratory temperature and lead to tilapia fillets' rapid corruption, and strain LFA04 had high survival rate after treated by ozone water. Therefore, it is very important to control contamination and multiplication of *C. freundii* strains in tilapia fillet product processing and storing. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (3): 570–577]

Key words: tilapia fillets treated with CO; *Citrobacter freundii*; psychrotrophs; identification; growth characteristics

Corresponding author: WANG Lingling. E-mail: llwang417@scau.edu.cn