

# PCR 结合表型鉴定对超高压处理后的冷藏带鱼细菌菌相分析

谢 晶, 刘 骁, 杨 茜, 钱韵芳, 张新林

(上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

**摘 要:** 为了研究超高压处理对带鱼微生物菌群组成的影响, 该文通过形态学特征、生理生化鉴定、16S rRNA 序列分析鉴定及系统发育树的建立, 分别分析 290 MPa、6 min 超高压处理前后于 4℃冷藏 12 d 内的带鱼菌相变化, 最终分离筛选到 24 株不同特征的纯化菌株。结果显示, 带鱼初始菌相中出现的布氏假单胞菌 (*Pseudomonas brenneri*)、黄褐假单胞菌 (*Pseudomonas fulva*)、粪嗜冷杆菌 (*Psychrobacter faecalis*) 菌株, 经超高压处理后的样品中未能筛选到; 波罗的海希瓦氏菌 (*Shewanella baltica*)、隆德假单胞菌 (*Pseudomonas lundensis*)、嗜根寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas rhizophila*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、氧化微杆菌 (*Microbacterium oxydans*) 等微生物在超高压处理后的贮藏期间数量逐渐减少至消失; 另有一些微生物在贮藏期间逐渐恢复生长, 如 *Rhizobium larrymoorei*、*Microbacterium halimionae*、溶酪大球菌 (*Macrococcus caseolyticus*), 而奥斯陆莫拉菌 (*Moraxella osloensis*)、藤黄微球菌 (*Kocuria rhizophila*)、产乳酸菌素的肉杆菌 (*Carnobacterium maltaromaticum*)、西宫皮肤球菌 (*Dermacoccus nishinomiyaensis*) 等受超高压的影响较小, 尤其是产乳酸菌素的肉杆菌 (*Carnobacterium maltaromaticum*) 占好氧菌和厌氧菌菌落总数的比例均较高; *Leucobacter aerolatus*、成团泛菌 (*Pantoea agglomerans*)、结肠炎耶尔森杆菌 *paleartica* 亚种 (*Yersinia enterocolitica subsp. paleartica*)、*Chryseobacterium vrystaatense*、鼠李糖短杆菌 (*Brachybacterium rhamnosum*) 在贮藏末期出现。从带鱼冷藏过程中细菌的组成与变化分析可见, 超高压处理对革兰氏阴性菌的抑菌效果较好, 而革兰氏阳性菌对超高压处理的耐受性较强。在超高压技术的影响下, 致腐败能力较强的微生物被抑制, 腐败能力稍弱的微生物成为优势菌, 这可能是超高压技术能够有效延长带鱼货架期的因素之一。

**关键词:** 细菌; 冷藏; 杀菌; 超高压技术; 带鱼; 聚合酶链式反应 (PCR); 生理生化鉴定; 菌相

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.05.045

中图分类号: TS254.7

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2016)-05-0307-08

谢 晶, 刘 骁, 杨 茜, 钱韵芳, 张新林. PCR 结合表型鉴定对超高压处理后的冷藏带鱼细菌菌相分析[J]. 农业工程学报, 2016, 32(5): 307—314. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.05.045 <http://www.tcsae.org>  
Xie Jing, Liu Xiao, Yang Xi, Qian Yunfang, Zhang Xinlin. Microbial ecology of *Trichiurus lepturus* of haitail pretreated by high hydrostatic pressure during cold storage based on phenotypic and 16S rRNA gene analysis[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(5): 307—314. (in Chinese with English abstract)  
doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.05.045 <http://www.tcsae.org>

## 0 引 言

海产品的营养价值虽高, 但极易引起腐败变质, 尤其在运输过程中受到细菌影响后, 许多食源性细菌无法用简单的清洗消毒除去<sup>[1]</sup>, 因此常运用生物保鲜剂、气调包装、超高压技术等进行抑菌杀菌。

超高压技术可在不破坏海产品营养成分的前提下<sup>[2]</sup>, 有效抑制细菌的生长繁殖并灭活<sup>[3]</sup>。目前超高压对海产品杀菌研究的方向主要有两点: 一方面是超高压技术对海产品的品质变化的应用型研究, 主要集中在超高压对海产品的保鲜效果, 微生物测定作为其中一个指标, Hsu 等<sup>[4]</sup>研究超高压对生切章鱼品质的影响, 结果显示与未经超高压处理的对照组相比, 150、300、450 和 600 MPa 超高压条件能使嗜冷菌分别降低了 0.1、0.5、1.3 和 2.8 lg (CFU/g) 单位。

Yi 等<sup>[5]</sup>研究超高压和热处理对南美白对虾微生物和理化品质的影响, 结果显示 2℃贮藏 90 d 时, 压力为 550 MPa、保压时间为 5 min、保压温度为 4℃的超高压条件下虾肉菌落总数 ( $2.57 \pm 0.16$  lg (CFU/g)) 始终低于 2℃冷藏对照组 ( $3.25 \pm 0.25$  lg (CFU/g))。

超高压技术的另一方面是对海产品中特定腐败菌的研究, Mengden 等<sup>[6]</sup>研究超高压处理对接种了单增李斯特、大肠杆菌的虹鳟鱼片、欧洲鲢鱼片微生物的影响, 结果显示超高压均会显著降低 2 种鱼片的单增李斯特菌 ( $P > 0.05$ )、大肠杆菌 ( $P > 0.05$ ) 数量。Lakshmanan 等<sup>[7]</sup>研究以 0.1 MPa 为对照, 150、200、250 MPa 超高压对冷熏鲑鱼中李斯特菌、腐败微生物、多种复合质量指标的影响, 结果显示 250 MPa 超高压不能杀灭李斯特菌, 但在 5℃冷藏的第 17 天、10℃冷藏的第 10 天时, 李斯特菌有一个显著滞后阶段, 200 MPa, 20 min 的超高压条件对冷熏鲑鱼的需氧菌有抑制作用, 比冷藏对照组低了 1~3 lg (CFU/g) 单位。他们都未全面地探讨超高压处理后海产品中不同菌群生长繁殖变化这一过程。前期试验<sup>[8]</sup>研究超高压 (220 和 290 MPa 分别处理 3、6、9 min) 对

收稿日期: 2015-11-23 修订日期: 2015-12-01

基金项目: 国家“十二五”支撑计划课题 (2013BAD19B06); 上海市科委重点项目 (14dz1205101)

作者简介: 谢 晶, 女, 浙江嵊州市人, 教授, 博士生导师。研究方向: 食品工程。上海 上海市浦东新区临港新城沪城环路 999 号上海海洋大学食品学院, 201306。Email: jxie@shou.edu.cn

冷藏带鱼的保鲜效果, 结果得出 290 MPa、6 min 的超高压条件处理带鱼后, 4℃贮藏期间, 冷藏带鱼的菌落总数较低, 且货架期与冷藏对照组相比延长了 3 倍, 但对于超高压处理后带鱼微生物菌群组成的影响还未见相关报道。

本试验通过形态学特征、生理生化鉴定、16S rRNA 序列分析鉴定及系统发育树的建立, 对 290 MPa、6 min 超高压处理后的冷藏带鱼进行细菌菌相分析, 进一步探讨 290 MPa、6 min 超高压条件对冷藏带鱼不同菌落阶段、需氧培养及厌氧培养条件下的细菌菌落演变, 以期针对不同菌种的杀菌方法、不同贮藏时期采取的保鲜措施、超高压在抑菌方面的进一步研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及仪器

#### 1.1.1 试验材料

新鲜东海带鱼购自上海芦潮港码头水产批发市场, 选购鱼鳃新鲜, 鱼体无破损, 表面银脂光亮, 弹性恢复较快, 质量、大小均相近的冰藏新鲜带鱼。

#### 1.1.2 试验试剂

胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (tryptose soya agar, TSA), 青岛海博生物技术有限公司; 胰蛋白胨大豆肉汤 (tryptic soy broth, TSB), 青岛海博生物技术有限公司; 革兰氏染液, 青岛海博生物技术有限公司; 微生物生理生化微量鉴定管, 青岛海博生物技术有限公司; dNTP Mixture, 生工生物工程 (上海) 有限公司; 引物 27f、1492r, 生工生物工程 (上海) 有限公司; Biospin 细菌基因组 DNA 提取盒, 生工生物工程 (上海) 有限公司; Marker: DL2000; 琼脂糖等。

#### 1.1.3 主要仪器

INV7-2996 型真空包装机 (美国 INTERVAC 公司, 抽气速率 20 m<sup>3</sup>/h, 抽气时间 10 s, 电热封口时间 1.5 s); HPP L2-600/2 超高压设备 (华泰森森仪器有限公司); HVE-50 灭菌锅 (日本 Hirayama 制造有限公司); BagMixer VW 拍打式均质器 (南京以马内利仪器设备有限公司); 洁净工作台 (上海康福特环境科技有限公司); DK-8D 型隔水式恒温培养箱 (上海恒科技有限公司); ZEISS Scope A1. AXIO 电子显微镜 (上海铸金分析仪器有限公司); MiniSpan Plue 微型高速离心机 (杭州奥盛仪器有限公司); SJH-4S 数控精密恒温水浴锅 (宁波天恒仪器厂); DYY-6C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂); UVP BioImaging Systems 凝胶成像系统 (美国 Alpha Innotech 公司)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 带鱼预处理及试验设计

带鱼去头去尾去内脏后用无菌蒸馏水洗净, 分割成 5~7 cm 段状, 装入聚乙烯包装袋 (共 8 袋), 真空包装后将其中 7 袋进行 290 MPa、6 min 的超高压处理<sup>[8]</sup>, 从超高压设备中取出进行分组。将未经超高压的新鲜带鱼和随机 1 袋刚经超高压处理的新鲜带鱼进行菌落总数的测定, 其他组别真空包装置于 4℃的冰箱中贮藏。在第 4 天、第 8 天、第 12 天时随机取出 2 袋超高压处理的带鱼

做菌落总数的测定, 并分别进行需氧培养和厌氧培养。由于初始时鲜带鱼刚使用真空包装贮藏, 而厌氧细菌在真空包装中需要一定的繁殖时间, 所以初始时未测定厌氧培养的菌落总数。

#### 1.2.2 菌落总数的测定

根据 GB/T4789.2—2010 菌落总数的测定, 倾注平板法操作<sup>[9]</sup>。

固体厌氧培养原理是燃烛耗氧, 将平板倒置在含有蜡烛的干燥器中, 点燃蜡烛后立即盖紧干燥器, 等蜡烛自动熄灭后放入 30℃的培养箱中培养。

液体厌氧培养原理是隔绝空气, 先将已灭菌的胰蛋白胨大豆肉汤 (tryptic soy broth, TSB) 试管中接种菌种, 然后将移液枪靠近玻璃内壁缓缓加入 2 mL 已灭菌的液体石蜡, 盖上试管盖后, 在试管盖与管接缝处裹上胶带, 静置放入 30℃的培养箱中培养。

#### 1.2.3 菌株分离纯化

将菌落总数培养计数完成的细菌分别挑菌, 挑选 30~300 个菌落的计数平板, 进行 3 次以上平板划线纯化, 并做初步归类标记。

#### 1.2.4 菌落形态学观察

通过纯培养方法得到不同形态的单菌落, 根据菌落形态、菌落颜色、菌落隆起度、边缘结构、表面状态、有无光泽、透明度、革兰氏染色与菌体形状进行初步分类<sup>[10]</sup>, 计算同种菌落的数量, 并归类标记。再进行划线纯培养, 重复 2 次后, 将单菌落液体 TSB 试管培养 (需氧培养为摇床培养, 厌氧培养为静止培养) 至其对数期后, 与已灭菌的质量分数为 40%甘油与菌液以体积比 1:1 混匀后 -40℃保存。

#### 1.2.5 细菌生理生化鉴定

根据郭光平<sup>[11]</sup>推荐的肉品中微生物鉴定图谱, 做相关生理生化试验 (氧化酶、过氧化氢酶、葡萄糖氧化发酵试验、有无鞭毛、精氨酸水解酶试验)。

#### 1.2.6 细菌基因组 DNA 提取

将保存至甘油中的纯菌株活化后, 根据 Biospin 细菌基因组 DNA 提取盒说明进行单细菌的 DNA 提取。提出的 DNA 标记后, 置于 -40℃保存。

#### 1.2.7 16S rRNA 的 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳检验

以 16S rRNA 细菌通用引物 27f、1492r 作为 PCR 扩增引物, 提取的 DNA 为模板。

PCR 扩增采用 25.0 μL 体系, 反应条件为 2.5 μL 10×PCRbuffer; 2.5 μL dNTP (含 Mg<sup>2+</sup>); 0.3 μL TaqDNA 酶; 1.0 μL 正向引物; 1.0 μL 反向引物; 1.0 μL DNA 模板; 16.2 μL ddH<sub>2</sub>O。反应步骤<sup>[12]</sup>为: 1) 94℃热启动 5 min; 2) 94℃预变性 5 min; 3) 94℃变性 1 min; 4) 57℃退火 1 min; 5) 72℃复性 2 min; 6) 72℃延伸 10 min; 重复步骤 3)、4)、5) 25 次。使用 DL2000 做 maker、2%的琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 扩增产物, 产物约为 1 500 bp, 获得的纯化产物送生工生物工程有限公司测序。

#### 1.2.8 系统发育树分析

双向测序得到的菌株 16S rRNA 基因片段用

Geneious8.1.6 软件剪切拼接，登陆 EzBioCloud 网站 [www.ezbiocloud.net](http://www.ezbiocloud.net) 和 NCBI 网站 [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) 进行核酸序列多重比对，从中选择相似性较高(99%以上)的序列，用 Geneious8.1.6 软件（Biomatter 有限公司）和 MEGA5.05 软件进行多重比较后构建系统发育树。

1. 2. 9 数据处理

菌落总数做 3 个平行组。用 Excel2010 软件进行数据处理，计算标准偏差。测序后的片段用 Geneious8.1.6 软件（Biomatter 有限公司）剪切拼接、多重比对，MEGA5.05 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2. 1 菌落总数的测定

根据中国水产品行业标准—鲜带鱼<sup>[13]</sup>，菌落总数超过 6 lg（CFU/g），表示超过带鱼二级鲜度，不可再食用。从表 1 可见，鲜带鱼的菌落总数为 4.94 lg（CFU/g），当超高压处理后，鲜带鱼的菌落总数下降至 3.74 lg（CFU/g），说明超高压具有杀菌效果。Ramirez-Suarez 等<sup>[14]</sup>研究表明超高压对细菌的细胞膜、遗传物质有一定的破坏能力，因此超高压能起到杀菌作用。随着贮藏时间的延长，某些受损细菌开始重新生长繁殖。冷藏 4 d 时，超高压处理后，无论需氧培养条件还是厌氧培养条件，带鱼的菌落总数均小于未经超高压处理的鲜带鱼的菌落

总数，由此说明超高压还有一定的抑菌作用<sup>[8]</sup>，这可能是超高压对细菌产生破坏后，细菌需要一定的恢复期，在此恢复期间细菌生长缓慢<sup>[7]</sup>。冷藏 12 d 时，需氧培养条件的菌落总数已超过二级限度范围，样品货架期结束。从菌落总数在冷藏期间的变化可见，该试验选取的样品分类纯化时间点符合超高压后冷藏带鱼的腐败规律。

表 1 带鱼冷藏过程中菌落总数的变化  
Table 1 Change of total bacterial counts of *Trichiurus lepturus* during cold storage

贮藏时间 Storage days/d	超高压处理前 Before high hydrostatic pressure/ lg(CFU·g <sup>-1</sup> )	超高压处理后 (需氧培养) After high hydrostatic pressure (aerobic culture)/lg(CFU·g <sup>-1</sup> )	超高压处理后 (厌氧培养) After high hydrostatic pressure (anaerobic culture)/lg(CFU·g <sup>-1</sup> )
0	4.94±0.06	3.74±0.06	ND
4	ND	4.77±0.06	4.18±0.08
8	ND	5.23±0.29	4.36±0.26
12	ND	6.52±0.40	5.69±0.10

注：“ND”表示未测定。  
Note: “ND” means not detect.

2. 2 菌落形态学观察及生理生化鉴定

经过平板划线分离纯化、菌落特征、生理生化鉴定过程中的 3 次归类标记，从不同贮藏期间、不同培养条件下分离得到 24 种典型菌株，有氧菌为 Bct 1~20，厌氧菌为 Anaerobic Bct 21~24。带鱼冷藏过程中细菌菌落形态与特征分析见表 2。

表 2 带鱼冷藏过程中各细菌菌落形态与特征分析  
Table 2 Analysis of colony morphology and characteristics of *Trichiurus lepturus* during cold storage

菌号 Number of bacteria	革兰氏染色 Gram stain	形态 Morphology	颜色 Color	隆起度 Level of apophysis	边缘结构 Edge shape	表面状态 Surface state	有无光泽 Gloss	透明度 Transparent	细菌形状 Bacteria shape
Bct 1	G <sup>-</sup>	圆形	淡黄	隆起	光滑	光滑	有	半透明	杆
Bct 2	G <sup>-</sup>	圆形	乳白	高隆起	光滑	光滑	有	不透明	杆
Bct 3	G <sup>-</sup>	圆形	白偏橙红	隆起	光滑	光滑	有	不透明	杆
Bct 4	G <sup>-</sup>	圆形	浅黄棕	同心圆状扁平	光滑	光滑	有	中间不透，边缘半透	杆
Bct 5	G <sup>-</sup>	圆形	白稍浅黄	有同心圆，乳头状隆起	光滑	光滑	有	中心不透，边缘半透	杆
Bct 6	G <sup>-</sup>	圆形	肉红	同心圆状隆起	光滑	光滑	有	不透明	杆
Bct 7	G <sup>-</sup>	圆形	肉粉	隆起	光滑	光滑	有	不透明	杆
Bct 8	G <sup>-</sup>	圆形	蜡黄	隆起	光滑	光滑	有	半透明	杆
Bct 9	G <sup>-</sup>	圆形	白偏黄	同心圆状隆起	光滑	光滑	有	不透明	杆
Bct 10	G <sup>-</sup>	圆形	白色	隆起	光滑	光滑	有	不透明	杆
Bct 11	G <sup>-</sup>	圆形	橙黄色	同心圆状隆起	光滑	光滑	有	不透明	杆
Bct 12	G <sup>+</sup>	圆形	白偏黄	高隆起	光滑	光滑	有	不透明	杆
Bct 13	G <sup>+</sup>	圆形	淡黄	隆起	光滑	光滑	有	不透明	杆
Bct 14	G <sup>+</sup>	圆形	白	扁平	光滑	光滑	有	不透明	球
Bct 15	G <sup>+</sup>	圆形	白偏黄	高隆起	光滑	光滑	有	不透明	球
Bct 16	G <sup>+</sup>	圆形	浅黄	隆起	光滑	光滑	有	不透明	杆
Bct 17	G <sup>+</sup>	圆形	白	同心圆状隆起	光滑	光滑	有	不透明	球
Bct 18	G <sup>+</sup>	圆形	白	隆起	光滑	光滑	有	不透明	杆
Bct 19	G <sup>+</sup>	圆形	白偏黄	隆起	光滑	光滑	有	不透明	短杆
Bct 20	G <sup>+</sup>	圆形	土黄	隆起	光滑	光滑	有	不透明	球
Anaerobic Bct 21	G <sup>+</sup>	圆形	白	同心圆状隆起	光滑	光滑	有	不透明	杆
Anaerobic Bct 22	G <sup>+</sup>	圆形	白	隆起	光滑	光滑	有	不透明	杆
Anaerobic Bct 23	G <sup>-</sup>	圆形	蜡黄	隆起	光滑	光滑	有	半透明	杆
Anaerobic Bct 24	G <sup>-</sup>	圆形	白色	隆起	光滑	光滑	有	不透明	杆

注：“G<sup>+</sup>”为革兰氏阳性菌，“G<sup>-</sup>”为革兰氏阴性菌。  
Note: “G<sup>+</sup>” means gram-positive bacterium, “G<sup>-</sup>” means gram-negative bacterium.

细菌生理生化鉴定结果见表 3。由郭光平<sup>[11]</sup>推荐的肉品中微生物鉴定图谱可知, Bct 1、Bct 5、Bct 9 属假单胞菌, Bct 6、Bct 7 属莫拉氏菌, Bct 8、Bct 10、Anaerobic Bct 23、Anaerobic Bct 24 属肠杆菌, Bct 3 属交替单胞菌, Bct 4、Bct 11 属不动杆菌, Bct 14、Bct 17 属葡萄球菌, Bct 18、Anaerobic Bct 21、Anaerobic Bct 22 属乳酸菌, Bct 15 属微球菌, 而 Bct 2、Bct 12、Bct 13、Bct 16、Bct 19、Bct 20 均不符生理生化鉴定图, 有待进一步鉴定。

表 3 24 种菌种的生理生化鉴定表  
Table 3 Physiological-biochemical characteristics of 24 strains

菌号 Number of bacteria	氧化酶 Oxidase	过氧化氢酶 Catalase	葡萄糖氧化发酵 O/F	有无鞭毛 Flagellum	精氨酸水解酶 Arginine hydrolytic enzyme
Bct 1	+	ND	氧化 Oxidation	√	ND
Bct 2	+	ND	碱性 Alkalinity	√	ND
Bct 3	+	ND	碱性 Alkalinity	√	—
Bct 4	—	ND	碱性 Alkalinity	√	ND
Bct 5	+	ND	氧化 Oxidation	√	ND
Bct 6	+	ND	碱性 Alkalinity	ND	ND
Bct 7	+	ND	碱性 Alkalinity	ND	ND
Bct 8	—	ND	发酵 Fermentation	ND	ND
Bct 9	+	ND	碱性 Alkalinity	√	+
Bct 10	—	ND	发酵 Fermentation	ND	ND
Bct 11	—	ND	氧化 Oxidation	ND	ND
Bct 12	ND	+	ND	ND	ND
Bct 13	ND	+	ND	ND	ND
Bct 14	ND	+	发酵 Fermentation	ND	ND
Bct 15	ND	+	氧化 Oxidation	ND	ND
Bct 16	ND	+	ND	ND	ND
Bct 17	ND	+	发酵 Fermentation	ND	ND
Bct 18	ND	—	ND	ND	ND
Bct 19	ND	+	ND	ND	ND
Bct 20	ND	+	碱性 Alkalinity	ND	ND
Anaerobic Bct 21	ND	—	ND	ND	ND
Anaerobic Bct 22	ND	—	ND	ND	ND
Anaerobic Bct 23	—	ND	发酵 Fermentation	ND	ND
Anaerobic Bct 24	—	ND	发酵 Fermentation	√	ND

注: “ND”表示未测定, “—”表示阴性, “+”表示阳性, “√”表示被测细菌有鞭毛。  
Note: “ND” means not detect, “—” means negative, “+” means positive, “√” means the detected bacterium have flagellum.

2.3 16S rRNA 的 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳检验

未知菌株 PCR 扩增后, 用 2% 的琼脂糖凝胶和 MakerDL2000 进行琼脂糖凝胶电泳检验, 图 1 为凝胶电泳图, 24 株活化菌经 PCR 扩增后均得到片段大小为 1 500 bp 左右稳定的条带, 说明 24 种未知菌株均提取成功, 将 PCR 扩增产物送至生工生物工程有限公司测序。

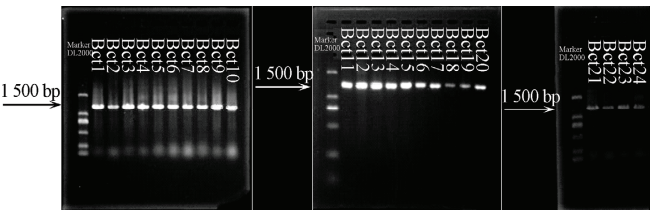


图 1 24 种菌株琼脂糖凝胶电泳检验图  
Fig.1 Agarose gel electrophoresis's picture of 24 strains

2.4 系统发育树分析

根据菌株之间相似度在 91%~95%之间为同科关系, 相似度在 95%~99%之间为同属关系, 相似度 99%以上

为同种关系<sup>[15]</sup>下载相似度 99%以上的多种不同菌株, 与未知菌株构建系统发育树见图 2。

由图 2 可见, Bct 5 与 *Pseudomonas fulva* NBRC 16637 在同一分支, 亲缘关系最近, 并结合生理生化鉴定结果得出 Bct 5 为黄褐假单胞菌 (*Pseudomonas fulva*)。Bct 1 与 *Pseudomonas brenneri* CFML 97-391 的亲缘关系最近, Bct 1 为布式假单胞菌 (*Pseudomonas brenneri*)。由图 2 可见, Bct 2 为 *Rhizobium larrymoorei*; Bct 3 为波罗的海希瓦氏菌 (*Shewanella baltica*); Bct 4 为嗜根寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas rhizophila*); Bct 6 为奥斯陆莫拉菌 (*Moraxella osloensis*); Bct 7 为粪嗜冷杆菌 (*Psychrobacter faecalis*); Bct 8、Anaerobic Bct 23 (用 Geneious 序列比对相似度为 100%, 说明 Bct 8 与 Anaerobic Bct 23 为同一种菌) 为成团泛菌 (*Pantoea agglomerans*); Bct 9 为隆德假单胞菌 (*Pseudomonas lundensis*); Bct 10 为结肠炎耶尔森杆菌 *paleartica* 亚种 (*Yersinia enterocolitica subsp. Palearctica*); Bct 11 为 *Chryseobacterium vrystaatense*; Bct 12 为 *Microbacterium halimionae*; Bct 13 为 *Leucobacter aerolatus*; Bct 14 为表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*); Bct

15 为藤黄微球菌 (*Kocuria rhizophila*); Bct 16 为氧化微杆菌 (*Microbacterium oxydans*); Bct 17 为 *Macrococcus caseolyticus*; Bct 18、Anaerobic Bct 22 (用 Geneious 序列比对相似度为 100%, 说明 Bct 18 与 Anaerobic Bct 22 为同一种菌) 为产乳酸菌素的肉杆菌 (*Carnobacterium*

*maltaromaticum*); Bct 19 为鼠李糖短杆菌 (*Brachybacterium rhamnosum*); Bct 20 为西宫皮肤球菌 (*Dermacoccus nishinomiyaensis*); Anaerobic Bct 21 为广布肉毒杆菌 (*Carnobacterium divergens*); Anaerobic Bct 24 为 *Serratia myotis*。

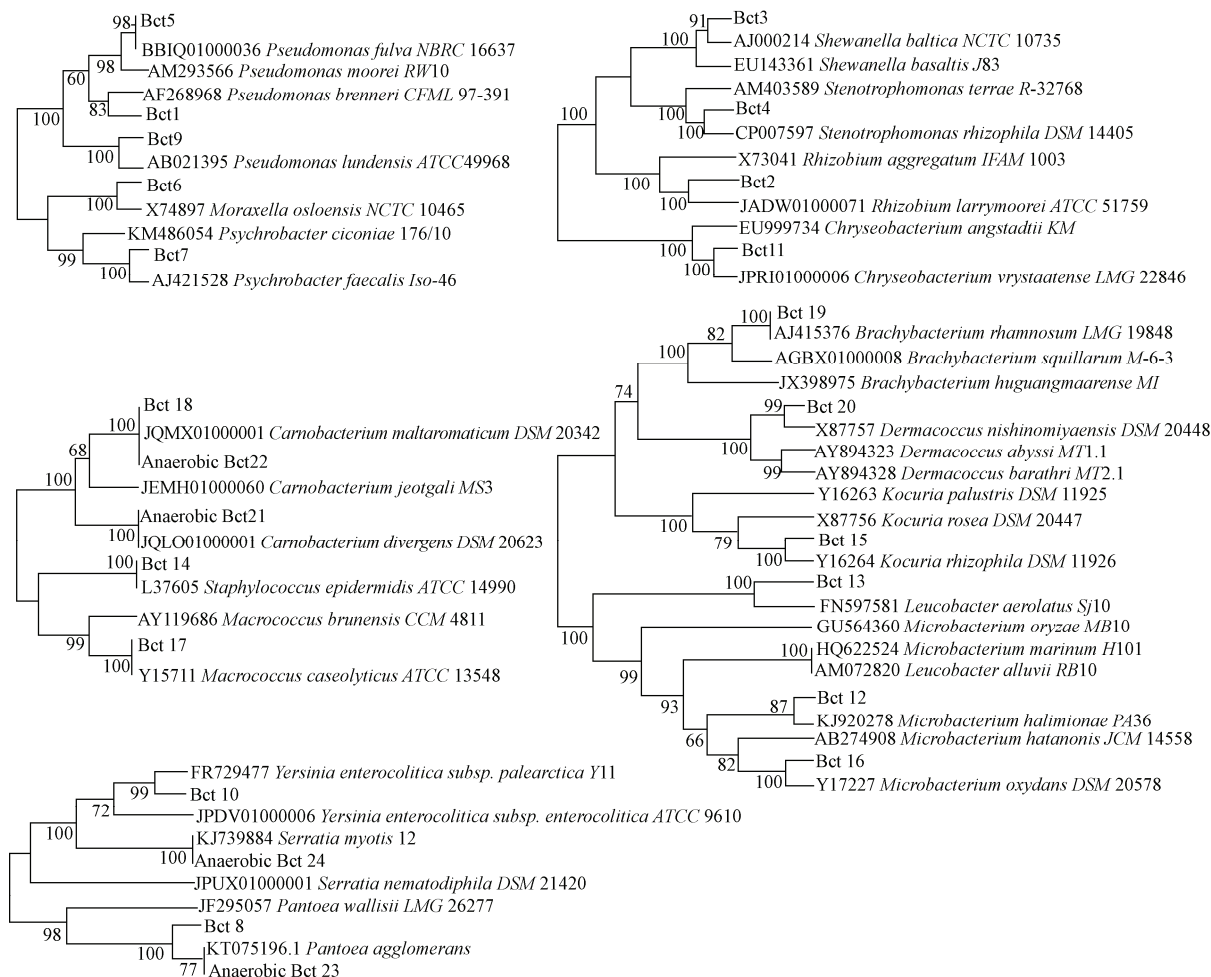


图 2 基于 16S rRNA 序列同源性的 24 种菌株的系统发育树  
Fig.2 Phylogenetic tree of 24 strains base on 16S rRNA gene analysis

## 2.5 货架期内冷藏过程中细菌的组成与变化分析

根据生理生化鉴定结合 PCR 扩增结果,对 24 种菌不同贮藏时间、不同培养方式再一次进行统计计数,并计算各菌种比例。需氧培养的细菌组成与变化分析见表 4,厌氧培养的细菌组成与变化分析见表 5。

由表 4 可见,需氧培养条件下,革兰氏阴性菌是鲜带鱼菌落总数中的主要菌落。但经过超高压处理后,鲜带鱼的革兰氏阴性菌比例下降迅速,革兰氏阳性菌初始时占细菌群落比例的 74.64%,由此说明革兰氏阴性菌受超高压影响较大,而革兰氏阳性菌对超高压具有一定的抗性,这可能与它们的细胞壁结构不同有关。革兰氏阴性菌的细胞壁疏松、肽聚糖分子较少,革兰氏阳性菌的细胞壁厚、肽聚糖网状分子连接紧密,因此超高压易于破坏革兰氏阴性菌的细胞结构,却不易破坏革兰氏阳性菌<sup>[16]</sup>。革兰氏阴性菌在超高压处理后,随着贮藏时间的延长其菌落数逐渐增加,可能是贮藏期间环境条件适宜

革兰氏阴性菌的受损菌种生长繁殖。虽然革兰氏阴性菌逐渐增加,但超高压处理后,革兰氏阳性菌始终在数量上占优势,贮藏末期革兰氏阳性菌为 75.28%,而革兰氏阴性菌为 24.72%。

分析各菌株群落的演变可见,黄褐假单胞菌 BBIQ01000036、粪嗜冷杆菌 AJ421528 及布氏假单胞菌 AF268968 在超高压处理后消失,说明这 3 种菌株极易受到超高压的破坏,而降德假单胞菌 AB021395、波罗的海希瓦氏菌 AJ000214、嗜根寡养单胞菌 CP007597、表皮葡萄球菌 L37605、氧化微杆菌 Y17227 在超高压处理后虽仍有菌落存在,但随后菌落逐渐消失,可能由于这些菌种的细胞结构受到超高压的损伤,且未得到适宜环境恢复生长,被其他群落所取代。蓝蔚青等<sup>[17]</sup>研究发现冷藏带鱼的优势腐败菌主要是希瓦氏菌和假单胞菌,而在本研究中希瓦氏菌和假单胞菌的数量较少,这可能是由于超高压处理能够有效抑制这 2 类致腐败能力较强的细菌。

Lopez-Caballero 等<sup>[18]</sup>也曾研究得出希瓦氏菌对超高压敏感。 *R.larrymoorei* JADW01000071、 *M. halimionae* KJ920278、溶酪大球菌 Y15711 随着贮藏时间的延长逐渐恢复生长，但在超高压处理后冷藏过程中菌落总数比例中均较低。革兰氏阴性菌中奥斯陆莫拉菌 X74897 在整个贮藏期间一直存在，且在革兰氏阴性菌的群落变化比例中较高。藤黄微球菌 Y16264、西宫皮肤球菌 X87757、产乳酸菌素的肉杆菌 JQMX01000001 这 3 种革兰氏阳性菌在贮藏过程中也一直存在，尤其是产乳酸菌素的肉杆菌 JQMX01000001 在超高压处理后冷藏过程中菌落比例始

终最高。贮藏末期，成团泛菌 KT075196.1、 *L.aerolatus* FN597581、结肠炎耶尔森杆菌 *palearctica* 亚种 FR729477、 *C.vrystaatense* JPRI01000006、鼠李糖短杆菌 AJ415376 出现生长，可能原因是冷藏期间的细菌培养周期内未形成肉眼可见菌落，或某种菌落变异所致。韩衍青等<sup>[19]</sup>研究显示 400MPa 以上超高压条件处理样品后均未检出嗜冷菌和肠杆菌的生长，与本研究中美嗜冷杆菌 AJ421528 可被超高压灭活，成团泛菌 KT075196.1、结肠炎耶尔森杆菌 *palearctica* 亚种 FR729477 等肠杆菌属在贮藏期间未测出均相符。

表 4 带鱼冷藏过程中细菌的组成与变化分析（需氧培养）  
Table 4 Colony evolution of *Trichiurus lepturus* during cold storage (aerobic culture)

							%
细菌菌号 Number of anaerobic bacteria	菌株名称 Name of strains	冷藏初始 (超高压前) Fresh <i>Trichiurus lepturus</i>	冷藏初始（超高压后） Fresh <i>Trichiurus lepturus</i> which pretreated high hydrostatic pressure	冷藏第 4 天 (超高压后) Cold storage for fourth days(after high hydrostatic pressure)	冷藏第 8 天 (超高压后) Cold storage for eighth days(after high hydrostatic pressure)	冷藏第 12 天 (超高压后) Cold storage for twelfth days(after high hydrostatic pressure)	
革兰氏阴性 G <sup>-</sup> (Gram negative)		72.99	25.36	20.09	20.29	24.72	
Bct 1	<i>Pseudomonas brenneri</i>	7.3	NG	NG	NG	NG	
Bct 2	<i>Rhizobium larrymoorei</i>	NG	NG	8.3	10.88	7.38	
Bct 3	<i>Shewanella baltica</i>	22.99	8.45	NG	NG	NG	
Bct 4	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	0.73	1.41	NG	NG	NG	
Bct 5	<i>Pseudomonas fulva</i>	10.95	NG	NG	NG	NG	
Bct 6	<i>Moraxella osloensis</i>	8.03	12.68	11.79	9.41	8.49	
Bct 7	<i>Psychrobacter faecalis</i>	9.49	NG	NG	NG	NG	
Bct 8	<i>Pantoea agglomerans</i>	NG	NG	NG	NG	2.58	
Bct 9	<i>Pseudomonas lundensis</i>	13.5	2.82	NG	NG	NG	
Bct 10	<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>Palearctica</i>	NG	NG	NG	NG	4.61	
Bct 11	<i>Chryseobacterium vrystaatense</i>	NG	NG	NG	NG	1.66	
革兰氏阳性 G <sup>+</sup> (Gram positive)		27.01	74.64	79.91	79.71	75.28	
Bct 12	<i>Microbacterium halimionae</i>	NG	NG	4.37	7.06	9.97	
Bct 13	<i>Leucobacter aerolatus</i>	NG	NG	NG	NG	3.87	
Bct 14	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.82	2.11	NG	NG	NG	
Bct 15	<i>Kocuria rhizophila</i>	4.02	10.56	9.17	5.88	2.95	
Bct 16	<i>Microbacterium oxydans</i>	1.09	2.82	NG	NG	NG	
Bct 17	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	NG	NG	5.24	4.71	5.54	
Bct 18	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	11.68	43.66	49.34	51.77	47.23	
Bct 19	<i>Brachybacterium rhamnosum</i>	NG	NG	NG	NG	3.69	
Bct 20	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	8.4	15.49	11.79	10.29	2.03	

注：“NG”表示未生长。  
Note: “NG” means not growth.

由表 5 可见，厌氧培养条件下，革兰氏阴性菌在贮藏过程中未测出，贮藏末期成团泛菌 KT075196.1、 *S.myotis* KJ739884 出现生长。革兰氏阳性菌的广布肉毒杆菌 JQLO01000001、产乳酸菌素的肉杆菌 JQMX01000001 随着贮藏时间的延长逐渐生长，尤其产乳酸菌素的肉杆菌

JQMX01000001 在贮藏末期生长迅速，占菌落总数的比例最高。产乳酸菌素的肉杆菌和广布肉毒杆菌均为乳酸菌科，常在冷冻冷藏条件下真空和气调包装中被发现，并占微生物群落的数量比例较高<sup>[20]</sup>。Casaburi 等<sup>[21]</sup>研究认为产乳酸菌素的肉杆菌具有一定的防腐能力。



表 5 带鱼冷藏过程中细菌的组成与变化分析（厌氧培养）  
Table 5 Colony evolution of *Trichiurus lepturus* during cold storage(anaerobic culture)

细菌菌号 Number of anaerobic bacteria	菌株名称 Name of strains	冷藏初始 (超高压前) Fresh <i>Trichiurus lepturus</i>	冷藏初始 (超高压后) Fresh <i>Trichiurus lepturus</i> which pretreated high hydrostatic pressure	冷藏第 4 天 (超高压后) Cold storage for fourth days(after high hydrostatic pressure)	冷藏第 8 天 (超高压后) Cold storage for eighth days(after high hydrostatic pressure)	冷藏第 12 天 (超高压后) Cold storage for twelfth days(after high hydrostatic pressure)	%
革兰氏阴性 G <sup>-</sup> (Gram negative)				0	0	23.58	
Anaerobic Bct 23	<i>Pantoea agglomerans</i>	NG	NG	NG	NG	6.13	
Anaerobic Bct 24	<i>Serratia myotis</i>	NG	NG	NG	NG	17.45	
革兰氏阳性 G <sup>+</sup> (Gram positive)				100	100	76.42	
Anaerobic Bct 21	<i>Carnobacterium divergens</i>	NG	NG	100	100	16.04	
Anaerobic Bct 22	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	NG	NG	NG	NG	60.38	

注：“NG”表示未生长。  
Note: “NG” means not growth.

3 结 论

本研究采用生理生化鉴定结合 PCR 法分别分析了 0、4、8、12 d 不同贮藏时期经超高压处理的冷藏带鱼的微生物菌相。结果表明，超高压技术具有较好的杀菌抑菌效果，可将菌落总数降低 1~2 lg(CFU/g)。带鱼初始菌相中，革兰氏阴性菌的比例较高，波罗的海希瓦氏菌是细菌群落的优势腐败菌，但超高压处理后，革兰氏阳性菌的比例较高，带鱼冷藏期间，奥斯陆莫拉菌 X74897、产乳酸菌素的肉杆菌 JQMX01000001 这 2 种细菌菌数占微生物群落的比例较高，其次是西宫皮肤球菌 X87757。产乳酸菌素的肉杆菌常在真空和气调包装中占有主导菌落地位，虽然具有一定致腐能力，但较希瓦氏菌属和假单胞菌属的致腐败能力弱。贮藏末期各细菌菌落比例由高到低分别是：产乳酸菌素的肉杆菌 JQMX01000001、*M.halimionae* KJ920278、奥斯陆莫拉菌 X74897、*R.larrymoorei* JADW01000071、溶酪大球菌 Y15711、结肠炎耶尔森杆菌 *paleartica* 亚种 FR729477、*L.aerolatus* FN597581、鼠李糖短杆菌 AJ415376、藤黄微球菌 Y16264、成团泛菌 KT075196.1、西宫皮肤球菌 X87757、*C.vrystaatense* JPRI01000006。在超高压技术的影响下，致腐败能力较强的微生物被抑制，腐败能力稍弱的微生物成为优势菌，这可能是超高压技术能够有效延长带鱼货架期的因素之一。

【参 考 文 献】

[1] Bagge-Ravn D, Ng Y, Hjelm M, et al. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries—analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 87(3): 239—250.

[2] Truong B Q, Buckow R, Stathopoulos C E, et al. Advances in high-pressure processing of fish muscles[J]. Food Engineering Reviews, 2014, 7(2): 109—129.

[3] Yagiz Y, Kristinsson H G, Balaban M O, et al. Effect of high pressure treatment on the quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and mahi mahi (*Coryphaena hippurus*)[J]. Journal of Food Science, 2007, 72(9): C509—C515.

[4] Hsu C P, Huang H W, Wang C Y. Effects of high-pressure processing on the quality of chopped raw octopus[J]. LWT—Food Science and Technology, 2014, 56(2): 303—308.

[5] Yi J J, Zhang L, Ding G W, et al. High hydrostatic pressure and thermal treatments for ready-to-eat wine-marinated shrimp: An evaluation of microbiological and physicochemical qualities[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2013, 20: 16—23.

[6] Mengden R, Röhner A, Sudhaus N, et al. High-pressure processing of mild smoked rainbow trout fillets (*Oncorhynchus mykiss*) and fresh European catfish fillets (*Silurus glanis*)[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2015, 32: 9—15.

[7] Lakshmanan R, Dalgaard P. Effects of high - pressure processing on *Listeria monocytogenes*, spoilage microflora and multiple compound quality indices in chilled cold-smoked salmon[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(2): 398—408.

[8] 杨茜, 谢晶. 超高压对冷藏带鱼段的保鲜效果[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(6): 201—207.

Yang Xi, Xie Jing. High hydrostatic pressure treatment on the preservation of beltfish with cold storage[J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(6): 201—207. (in Chinese with English abstract)

[9] 中华人民共和国国家标准[S]. 食品微生物学检验：菌落总数测定 GB/T 4789.2—2010.

[10] 王宁. 冷却羊肉腐败菌菌相变化及其控制技术研究[D]. 武汉：华中农业大学, 2007: P9.

Wang Ning. Study on Spoilage Microflora Change and Control Technologies in Chilled Mutton[D]. Wu Han: Huazhong Agricultural University, 2007: P9. (in Chinese with English abstract)

[11] 郭光平. 烧鸡腐败菌菌相分析及保鲜技术的研究[D]. 烟台：烟台大学, 2011: 21—22.

Guo Guangping. Studies on the Changes of Spoilage Microflora and Preservation Techniques of Roast Chicken[D]. Yan Tai: YanTai University, 2011: 21—22. (in Chinese with English abstract)

[12] 蓝蔚青, 谢晶. 传统生理生化鉴定技术结合 PCR 法分析复合保鲜剂对冷藏带鱼贮藏期间菌相变化的影响[J]. 食品工业科技, 2012, 33(10): 330—335.

Lan Weiqing, Xie Jing. Effect of complex biological fresh-keeping agents for the main bacteria composition on cutlassfish *Trichiurus haumela* under the cold storage by PCR and physiology-biochemistry technology[J]. Science and

- Technology of Food Industry, 2012, 33(10): 330—335. (in Chinese with English abstract)
- [13] 中华人民共和国水产品行业推荐标准[S]. 鲜带鱼 SC/T3102—1984.
- [14] Ramirez-Suarez J C, M T Morrissey. Effect of high pressure processing (HPP) on shelf life of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) minced muscle[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2006, 7(1): 19—27.
- [15] Bosshard P P, Abels S, Zbinden R, et al. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation)[J]. Journal of clinical microbiology, 2003, 41(9): 4134—4140.
- [16] Gram L, Huss H H. Flesh and processed fish and shellfish[M]. Frederick: Aspen Publishers, Lund M B, Baird-Parker C T, Gould W G(Eds.), 2000: 472—506.
- [17] 蓝蔚青, 谢晶. PCR 结合生理生化鉴定对冷藏带鱼主要细菌菌相组成分析[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(2): 11—17. Lan Weiqing, Xie Jing. Analysis on the Main Bacteria Composition for *Trichiurus haumeda* Under the Cold Storage by PCR and Physiology-biochemistry Technology[J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(2): 11—17. (in Chinese with English abstract)
- [18] Lopez-Caballero M E, Pérez-Mateos M, Montero P, et al. Oyster preservation by high-pressure treatment[J]. Journal of Food Protection, 2000, 63(2): 196—201.
- [19] 韩衍青, 张秋勤, 徐幸莲, 等. 超高压处理对烟熏切片火腿保质期的影响[J]. 农业工程学报, 2009, 25(8): 305—311. Han Yanqing, Zhang Qiuqin, Xu Xinglian, et al. Effect of high pressure processing on refrigerated shelf-life of sliced smoked cooked ham[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2009, 25(8): 305—311. (in Chinese with English abstract)
- [20] Laursen B G, Bay L, Cleenwerck I, et al. *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization[J]. Systematic and applied microbiology, 2005, 28(2): 151—164.
- [21] Casaburi A, Nasi A, Ferrocino I, et al. Spoilage-related activity of *Carnobacterium maltaromaticum* strains in air-stored and vacuum-packed meat[J]. Applied and environmental microbiology, 2011, 77(20): 7382—7393.

## Microbial ecology of *Trichiurus lepturus* of haitail pretreated by high hydrostatic pressure during cold storage based on phenotypic and 16S rRNA gene analysis

Xie Jing, Liu Xiao, Yang Xi, Qian Yunfang, Zhang Xinlin

(Shanghai Engineering Research Center of Aquatic Product Processing & Preservation,  
College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The effect of high hydrostatic pressure (290 MPa, 6 min) on microbial ecology changes of *Trichiurus lepturus* during vacuum-packaged storage (12 d) was studied via 16S rRNA gene sequencing analysis and phenotypic methods. The microbial colonies of aerobic culture and anaerobic culture, which were obtained from 5 microflora's growth stages (including fresh *Trichiurus lepturus*, fresh *Trichiurus lepturus* which were stored under 4°C for 4, 8 and 12 d after high hydrostatic pressure treatment), were isolated and purified by the tryptic soy agar medium and tryptic soy broth medium, repeatedly classified by the traditional phenotypic methods (morphological, physiological and biochemical characteristics of bacteria strains), and then the bacteria DNA of pure culture was extracted and amplified by the polymerase chain reaction (PCR). Finally, 24 bacteria strains of aerobic culture and anaerobic culture in the vacuum-packaged *Trichiurus lepturus* under the 4°C cold storage were obtained. The result showed that *Pseudomonas brenneri*, *Pseudomonas fulva* and *Psychrobacter faecalis* which appeared in the initial microflora of fresh *Trichiurus lepturus* were inactivated and non-existent after the high hydrostatic pressure treatment; 5 bacteria strains (including *Shewanella baltica*, *Pseudomonas lundensis*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Staphylococcus epidermidis* and *Microbacterium oxydans*) gradually reduced and disappeared after the high hydrostatic pressure treatment. Three bacteria strains gradually grew with the extension of storage time, which were *Microbacterium halimionae*, *Macroccoccus caseolyticus* and *Rhizobium larrymoorei*. In the whole process of storage after the high hydrostatic pressure treatment, 4 bacteria strains (*Moraxella osloensis*, *Kocuria rhizophila*, *Carnobacterium maltaromaticum* and *Dermacoccus nishinomiyaensis*) always existed, and they were not sensitive to the high hydrostatic pressure treatment. Especially *Carnobacterium maltaromaticum*, which had a high proportion of total bacteria amount under the conditions of aerobic and anaerobic cultivation, could be considered as a dominate strain during the 4°C cold storage. At the end of the shelf life of vacuum-packaged *Trichiurus lepturus* pretreated by high hydrostatic pressure, 5 bacteria strains (*Leucobacter aerolatus*, *Pantoea agglomerans*, *Yersinia enterocolitica* subsp. *Palaearctica*, *Chryseobacterium vrystaatense* and *Brachybacterium rhamnosum*) appeared. The colony evolution of *Trichiurus lepturus* during the cold storage showed that Gram negative bacteria were sensitive to the high hydrostatic pressure treatment, while Gram positive bacteria had a high tolerance to the high hydrostatic pressure treatment. Under the influence of high hydrostatic pressure treatment, the microorganisms which have stronger ability of causing corruption are inhibited, and the microorganisms which have weaker ability of causing corruption become dominant bacteria, which may be one of the factors that the high hydrostatic pressure treatment can effectively extend the shelf life of *Trichiurus lepturus*.

**Keywords:** bacteria; cold storage; sterilization; high hydrostatic pressure treatment; *Trichiurus lepturus*; polymerase chain reaction (PCR); physiology-biochemistry technology; microflora