

大黄鱼源气单胞菌的分离鉴定及致腐表型

葛阳杨, 朱军莉*, 刘丽, 任奕婧

(1. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018;

2. 浙江省食品安全重点实验室, 浙江 杭州 310018)

摘要: 为鉴别大黄鱼腐败菌气单胞菌的致腐能力, 采用生理生化和分子方法(16S *rRNA*)鉴定冷藏大黄鱼货架期终点不产H₂S的菌株。分析菌株在体外培养条件下的生长、胞外酶活性、三甲胺(TMA)和生物胺形成的腐败表型, 将菌株接种在灭菌鱼汁中测定其致腐能力。结果显示, 分离株AE03和AE04在0~37 °C及0~60的盐度下生长良好, 在4和25 °C条件下AE03菌株的生长速率显著高于AE04菌株。2株细菌不产H₂S, 能还原氧化三甲胺(TMAO), 分解尿素和液化明胶, 氧化酶、赖氨酸、鸟氨酸脱羧酶、精氨酸水解酶等都呈阳性, 能利用葡萄糖。结合16S *rRNA*鉴定发现分离株AE03为杀鲑气单胞菌, AE04为软体动物气单胞菌。在体外培养中, 2种气单胞菌均能产生蛋白酶、形成TMA和生物被膜, 其中AE03菌株生成各指标的能力高于AE04菌株, 同时AE03菌株还具有脂酶活性, 产生生物胺, 其中尸胺含量较高。气单胞菌AE03在灭菌鱼汁中产生的挥发性盐基氮(TVB-N)显著高于AE04。通过紫色杆菌CV026和根癌农杆菌A136 2种报告菌检测发现, 2株气单胞菌是高丝氨酸内酯(AHLs)产生菌, 其中AE03菌株产生的AHLs含量显著高于AE04菌株。研究表明, 杀鲑气单胞菌AE03为冷藏大黄鱼的强致腐菌, 且能分泌高含量的AHLs, 研究为从群体感应角度阐明气单胞菌的致腐机理奠定了良好的基础。

关键词: 大黄鱼; 气单胞菌; 鉴定; 致腐; 胞外酶; 群体感应

中图分类号: S 983

文献标志码: A

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)为我国海洋四大主要经济鱼类之一, 为广温广盐集群洄游性鱼类, 其食性广, 在我国及太平洋西部海洋渔业中具有相当重要的地位, 是我国六大优势养殖出口水产品之一^[1], 产品大多数以冰鲜整鱼出口韩国等周边国家, 并销往国内多地。

细菌生长代谢是引起鲜活水产品腐败变质的主要原因, 由于原料、加工、流通、贮藏等因素存在差异, 不同产品具有其自身独有的菌群并逐渐发生变化, 适应条件的细菌逐渐占据优势地位, 并产生腐败臭味和异味的代谢产物, 这种细菌就是该产品的特定腐败菌(specific spoilage organisms, SSO)^[2]。低温冷藏鱼类的腐败细菌包括腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)、

假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、气单胞菌属(*Aeromonas* sp.)等^[3]。

气单胞菌属于γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria)、气单胞菌目(Aeromonadales)、气单胞菌科(Aeromonadaceae), 该属包括嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)、温和气单胞菌(*A. sobria*)、豚鼠气单胞菌(*A. caviae*)、维氏气单胞菌(*A. veronii*)和杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)等20个种^[4]。气单胞菌广泛分布于自然生态系统中, 包括河流、湖泊、池塘、海水、河口等水生生境, 是一种导致胃肠炎和败血症的人畜共患条件致病菌^[5], 也是淡水养殖中细菌性出血病的主要病原之一。目前关于气单胞菌的研究主要集中在致病性方面, 而对致腐能力鲜有报道。朱军莉等^[6]在前期研究

收稿日期: 2016-05-12 修回日期: 2016-07-13

资助项目: 国家自然科学基金(31271954); 浙江省大学生科技创新计划(2016R408024); 研究生科研创新基金(1402000359)

通信作者: 朱军莉, E-mail: junlizhu0305@163.com

中发现市售养殖大黄鱼冷藏过程中波罗的海希瓦氏菌(*Shewanella baltica*)是优势腐败菌^[6],同时还分离出2株气单胞菌。因此,本研究基于生理生化和分子方法鉴定气单胞菌,分析其生长、胞外酶及生物被膜等致腐表型,对深入探究该菌的致腐机制和调控具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

冰鲜大黄鱼购自杭州某菜市场,平均体质量(502.8±48.2)g,平均体长(24.8±1.3)cm,8尾。加入碎冰块30 min内送至实验室,4℃冷藏,用于细菌分离和灭菌鱼汁的制备。

1.2 实验试剂

组胺、β-苯乙胺、酪胺、腐胺、尸胺、色胺、亚精胺、精胺、L-甲硫氨酸、L-半胱氨酸、丹磺酰氯、氧化三甲胺(Sigma公司);乙腈、丙酮、盐酸、甲苯、苦味酸等为色谱纯(上海化学试剂公司);营养琼脂(NA)、LB肉汤、铁琼脂(IA)、胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB)、气单胞菌选择性培养基(RYAN)(青岛海博生物技术有限公司);API 20NE生化鉴定系统(法国生物梅里埃股份有限公司);Taq酶、dNTP、Marker DL2000(宝诚生物工程有限公司);GENMED细菌脂肪酶活性比色法定量检测试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司);X-gal(上海星科生物科技有限公司)。

1.3 实验仪器与设备

紫外可见分光光度计UV-2550(日本岛津公司);高效液相色谱仪1100A(美国安捷伦科技公司);全自动凯氏定氮仪KJELTEC2300(丹麦FOSS公司);凝胶成像系统,Quantity One system(Bio-Rad公司);酶标仪infinite F50(奥地利Tecan公司)。

1.4 细菌的分离培养

大黄鱼冷藏货架期终点时(第6天)随机取1尾试样鱼,沿脊骨剖切,无菌取半条鱼肉(带鱼皮),拍打,以无菌生理盐水稀释,取适当的稀释度涂布于铁琼脂上,25℃培养24 h,挑取白色菌落用营养琼脂和气单胞菌培养基划线纯化。挑取单菌落置于LB肉汤中活化培养。

1.5 实验方法

生化及分子鉴定 取过夜培养的菌液,按

照梅里埃生化鉴定试剂盒说明进行理化指标的鉴定。活化的细菌采用Biospin细菌基因组DNA提取试剂盒抽提DNA,引物设计及PCR反应条件参照赵二科等^[7]的方法稍作修改。PCR采用50 μL的反应体系,10×Buffer 5 μL,dNTP 4 μL,引物各1 μL,模板DNA 1 μL,Taq酶0.5 μL,ddH₂O 37.5 μL。反应结束后采用1%琼脂糖凝胶电泳区分条带,最后将纯化后PCR产物测序。序列采用BLASTN软件进行同源性分析,并用MEGA 5.0软件生成系统进化树图谱进一步分析细菌亲缘性关系。

蛋白酶和脂肪酶活性测定 蛋白酶活性测定参照SB/T 10317-1999标准^[8]中的方法;脂肪酶活性测定参照GENMED细菌脂肪酶活性比色法。

TMA和生物胺测定 TMA采用苦味酸法测定,参照GB/T 5009.179-2003^[9]和许龙福等^[10]的方法略作修改,表示为mg/100 mL菌液。生物胺采用高效液相色谱法,提取、衍生及检测方法参照赵二科等^[7],将2株气单胞菌按1:100的比例分别接种于TSB培养基中(含氨盐:0.5% L-组氨酸盐酸盐、0.5% L-赖氨酸盐酸盐、0.5% L-鸟氨酸盐酸盐和含0.0005%吡哆醛溶剂的0.25% L-酪氨酸二钠盐)。

生物被膜测定 取过夜活化的菌液,浓度稀释至10⁶ CFU/mL,以1:100的比例接种于TSB中,25℃连续培养48 h。采用结晶紫定量法检测生物被膜形成量,根据Djordjevic等^[11]的方法略做修改,生物被膜形成量以在595 nm处OD值来表示。

灭菌鱼汁中菌落总数和TVB-N测定 参照Daugaard^[12]的方法制备大黄鱼灭菌鱼汁。将过夜培养的菌液(约10⁸ CFU/mL)用生理盐水稀释至约10⁵ CFU/mL,以1:100的比例接种至灭菌鱼汁中,接种的鱼汁冷藏于(4.0±0.1)℃,分别在72和120 h取出样品测定菌落总数和挥发性盐基氮(TVB-N)含量。菌落计数采用GB 4789.2-2010方法^[13]平板倾注计数,用NA作为计数培养基。参照GB/T 5009.44-2003方法^[14]中半微量定氮法测定TVB-N含量,表示为mg/100 mL鱼汁。

报告菌检测信号分子 根据Holden等^[15]的方法制备报告平板,报告菌紫杆菌(*Chromobacterium violaceum*) CV026、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) A136过夜活化2次后,按1:100的比例接种至温度适宜的含有0.8%琼脂的

LB培养基中, 混合均匀后倾注平板。含CV026的平板凝固后, 取研究中分离鉴定的菌株各10 μ L分别点样于平板中心; 含A136的平板凝固后, 在表面均匀涂布40 μ L X-gal(20 mg/mL), 平板干燥后, 将10 μ L菌液点样于平板中心, 25 $^{\circ}$ C过夜培养。

1.6 数据处理

每组样品设3个重复, 采用Microsoft Excel 2007和Origin 8.5进行数据处理和作图, 并利用ANOVA进行方差分析, 采用Duncan氏法进行多重比较, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 气单胞菌的分离与鉴定

挑取不产 H_2S 的菌落分离纯化后, 利用生化鉴定API 20NE系统测定2株分离株的理化特性。结果发现, 在4~37 $^{\circ}$ C、0~60 g/L NaCl条件下均能生长, 能还原TMAO, 不产 H_2S 气体, 可以利用葡萄糖, 但不利用蔗糖、甘露醇、柠檬酸盐等; 尿素、凝胶和对硝基苯酚- β -D-半乳糖苷水解活性都呈阳性。从酶活性看, AE03的氧化酶、精氨酸水解酶、赖氨酸、鸟氨酸及色氨酸脱羧酶都呈阳性, AE04只有色氨酸脱羧酶呈阴性(表1)。基于生化特性结果初步鉴定2株不产 H_2S 的分离株为气单胞菌属, 其种还需进一步鉴定。

采用16S *rRNA*通用引物扩增2株细菌约1440 bp的片段, BLASTN对比发现分离株均为气单胞菌属, 其中AE03菌株(NCBI登录号: KU870472)与杀鲑气单胞菌KC210757的同源性达99%; AE04菌株(NCBI登录号: KU870473)与软体动物气单胞菌(*A. molluscorum*) LMG 22214最接近, 同源性达98%。为进一步明确菌株种属关系, 以比对相似度较高的已报道菌株及同属的模式菌株作为参照构建系统发育树, AE03和AE04在进化树中分别与杀鲑气单胞菌(KC210757)和软体动物气单胞菌(LMG 22214)亲缘关系最近, 可信值分别为99%和97%(图1)。因此, 基于生理生化和16S *rRNA*分子鉴定, 冷藏大黄鱼中分离的AE03和AE04菌株分别为杀鲑气单胞菌和软体动物气单胞菌。

2.2 生长曲线

将2株气单胞菌接种于LB肉汤中培养, 测定4和25 $^{\circ}$ C条件下的生长曲线(图2)。结果显示, 2株气单胞菌在4和25 $^{\circ}$ C条件下能稳定生长, 其

表1 两株气单胞菌的生理生化特征

Tab. 1 Physical and chemical characteristics of two *Aeromonas* isolates

		生理生化特征 physical and chemical characteristics		
		AE03	AE04	<i>A. salmonicida</i> (NBRC13784)
有氧生长 aerobic growth	4 $^{\circ}$ C	+	+	+
	25 $^{\circ}$ C	+	+	+
	30 $^{\circ}$ C	+	+	+
	37 $^{\circ}$ C	+	+	+
耐盐性 salt tolerance	0	+	+	+
	10 g/L	+	+	+
	30 g/L	+	+	+
	60 g/L	+	+	+
产物 product	是否产 H_2S	-	-	-
	是否还原 TMAO	+	+	+
水解活性 hydrolytic activity	尿素	+	+	+
	凝胶	+	+	+
	对硝基苯酚- β -D-半乳糖苷	+	+	-
酶活性 enzymatic activity	氧化酶	+	+	+
	精氨酸水解酶	+	+	+
	赖氨酸脱羧酶	+	+	+
	鸟氨酸脱羧酶	+	+	+
	色氨酸脱羧酶	+	-	+
碳源利用情况 carbon source	葡萄糖	+	+	+
	蔗糖	-	-	-
	甘露醇	-	-	-
	山梨醇	-	-	-
	柠檬酸盐	-	-	-
	阿拉伯糖	-	-	-

注: “+”表示阳性; “-”表示阴性

Notes: the symbol “+” means positive; “-” means negative

中AE03菌株在2种温度条件下生长速率都显著高于AE04菌株。在25 $^{\circ}$ C条件下培养12 h时细菌生长逐步达到稳定期, AE03 OD₅₉₅值达到1.28, AE04仅为1.08; 培养21 h后2株细菌生长曲线呈下降趋势。4 $^{\circ}$ C条件下, 2株细菌随着培养时间的延长菌量逐渐增长, 培养至第4天均呈现稳定趋势; AE03菌株第7天生长达到最大值, OD₅₉₅值达到0.94, 而AE04菌株培养至第6天达到最大

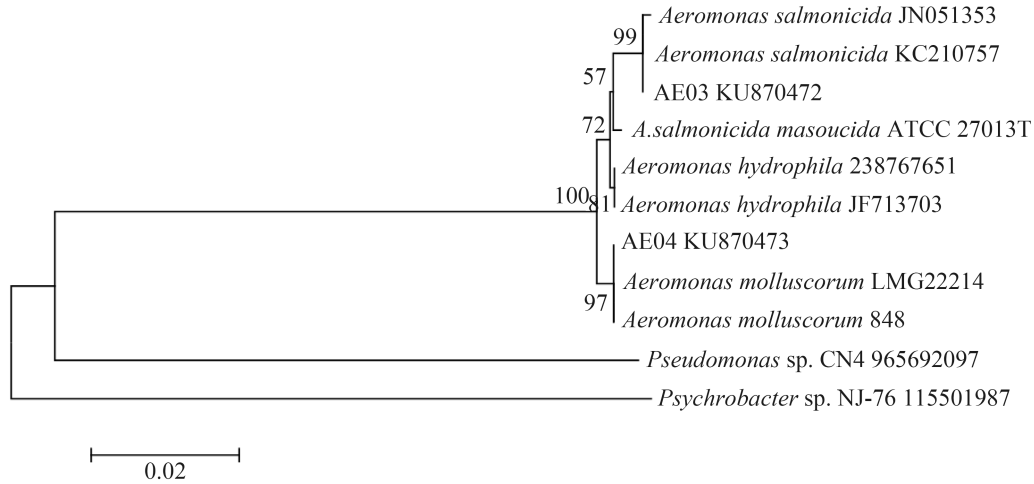


图 1 两株气单胞菌16S rRNA进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree derived from the 16S rRNA gene of two Aeromonas isolates

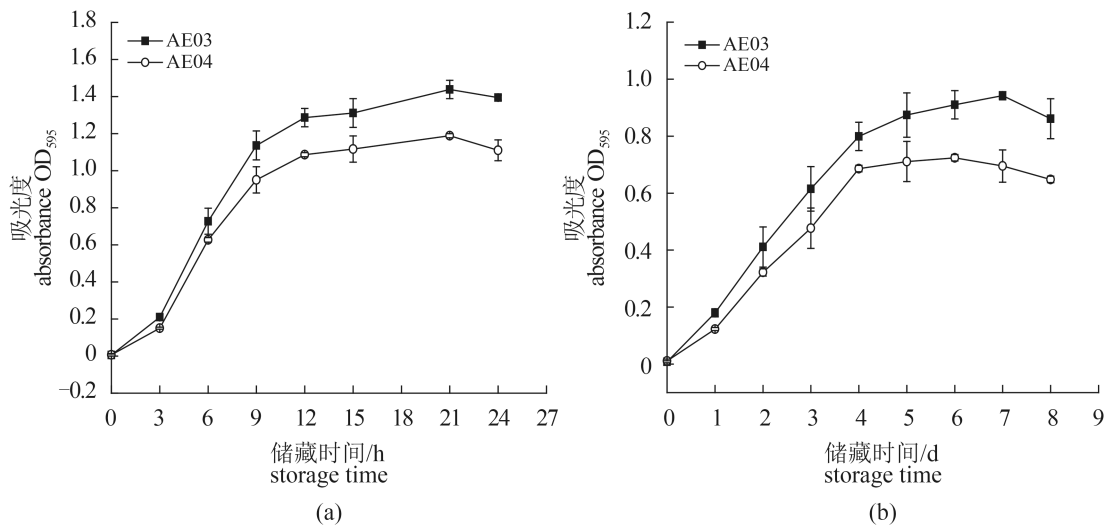


图 2 两株气单胞菌分别在25 °C(a)和4 °C(b)条件下的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of two Aeromonas isolates at 25 °C(a) and 4 °C(b)

菌量，OD₅₉₅值为0.72。可见，AE03生长繁殖速率显著高于AE04菌株(P<0.05)。

2.3 气单胞菌的胞外蛋白酶和脂肪酶活性

研究表明，腐败菌的胞外酶参与促进鲜活食品的腐败^[16]。结果显示，AE03菌株经25 °C培养24 h后，蛋白酶和脂酶活性分别为9.4和0.1个活性单位；而AE04菌株仅有蛋白酶活性，为8.5个活性单位，而无脂酶活性(图3)。可见，AE03菌株的2种胞外酶活性均高于AE04菌株。

2.4 气单胞菌中TMA、生物胺和生物被膜的形成

TMA和生物胺含量可以作为水产品品质的

重要评价指标，经25 °C培养12 h后，AE03和AE04菌株都能产生TMA，含量分别为87.80和49.77 mg/100 mL，具有显著性差异(P<0.05)(图4-a)；经25 °C培养24 h后，AE03菌株能产生较高含量的生物胺，其中主要为尸胺和腐胺，含量分别为179.9和3.1 mg/L，尸胺含量占总胺的96%，而AE04几乎无生物胺形成(图4-b)。2株气单胞菌在25 °C条件下培养48 h后均能形成生物被膜(图4-c)，AE03和AE04菌株OD₅₉₅值分别为0.73和0.29，AE03生物被膜形成量明显高于AE04(P<0.05)，此结果提示AE03菌株具有更强的黏附能力。结合2株气单胞菌形成TMA和生物胺的能力，发现生物被膜的形成量与致腐表型存在正

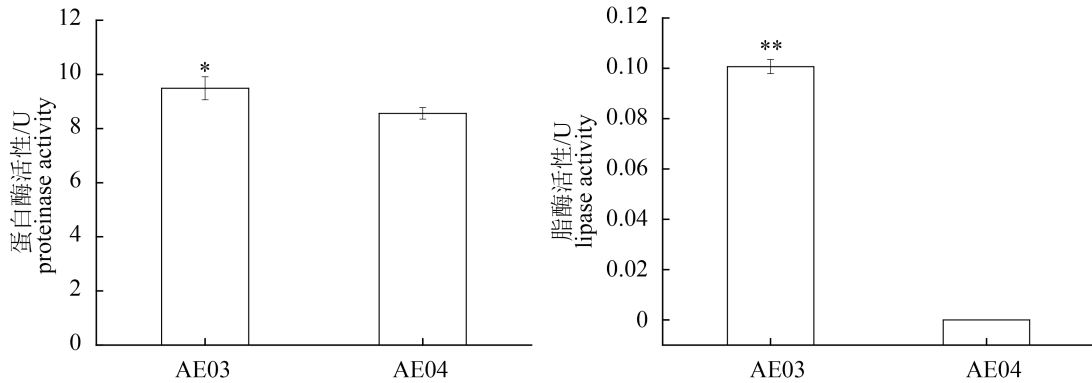


图3 两株气单胞菌胞外蛋白酶(a)和脂酶(b)活性

*. 差异显著 ($P < 0.05$), **. 差异极显著 ($P < 0.01$); 下同

Fig. 3 Extracellular protease (a) and lipase (b) enzymatic activity of two *Aeromonas* isolates

*. significant difference ($P < 0.05$), **. extremely significant difference ($P < 0.01$); the same below

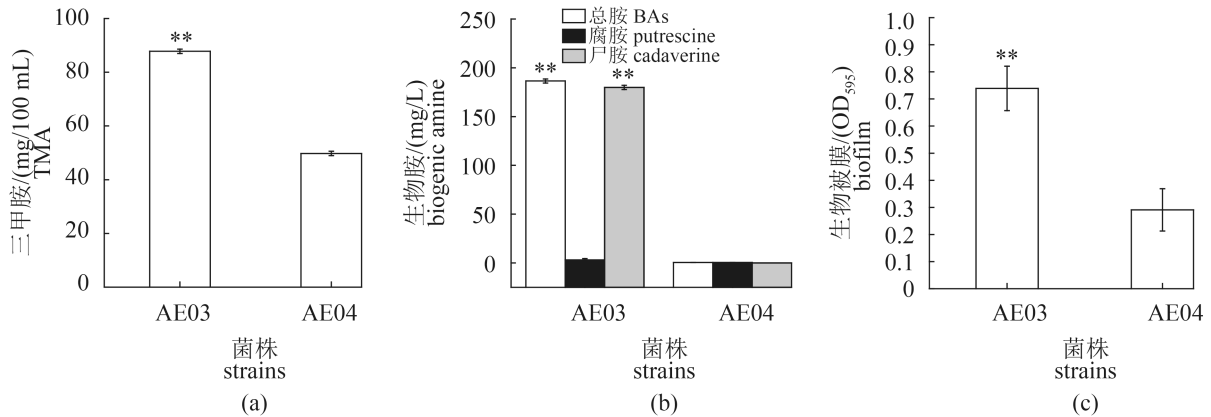


图4 两株气单胞菌在体外培养中TMA (a)、生物胺(b)和生物被膜(c)的形成

Fig. 4 The production of TMA (a), biogenic amine (b) and biofilm formation (c) in two *Aeromonas* isolates

相关性, 因此AE03菌株致腐潜能强于AE04。

2.5 致腐能力

为进一步评价气单胞菌分离株在鱼体中的致腐能力, 将2株细菌接种至灭菌鱼汁, 分析4 °C冷藏培养条件下生长和TVB-N生成的变化(图5)。接种鱼汁的初始细菌数约为 $(0.7\sim 1.2)\times 10^7$ CFU/mL。在冷藏条件下灭菌鱼汁对照组中无细菌生长, 接菌(AE03, AE04)的鱼汁中细菌在72 h内增长缓慢, 2种细菌增长速率无显著性差异($P > 0.05$), 分别为 5.2×10^7 和 4.7×10^7 CFU/mL。当冷藏120 h后, 实验组鱼汁中细菌增长变得迅速, AE03菌落总数达到 3.1×10^8 CFU/mL, AE04达到 3.0×10^8 CFU/mL, 2种菌株细菌总数并无显著性差异($P > 0.05$)(图5-a)。

TVB-N包括蛋白质分解过程中产生的三甲胺、二甲胺、氨类和其他含氮物质, 其含量是

水产品品质评价的重要指标之一。灭菌鱼汁中TVB-N的初期值为14.2 mg N/100 mL, 在4 °C培养72 h后, 对照组鱼汁和实验组鱼汁的TVB-N含量都增长缓慢, TVB-N含量为18.0~18.9 mg N/100 mL, 无显著性差异($P > 0.05$); 冷藏120 h后, 实验组中TVB-N含量显著增加, 分别达到39.4和30.9 mg N/100 mL, AE03菌株所产生的TVB-N含量明显高于AE04菌株, 对照组中TVB-N含量无明显变化(图5-b)。结果显示, 2株气单胞菌中AE03的致腐能力显著强于AE04。

2.6 报告菌平板法检测信号分子

生物报告菌根癌农杆菌A136和紫色杆菌CV026在外源信号分子AHLs的存在下会分别产生绿色素和紫色素, 其中色素圈的大小与AHLs浓度成正相关。AE03和AE04菌株经25 °C培养24 h

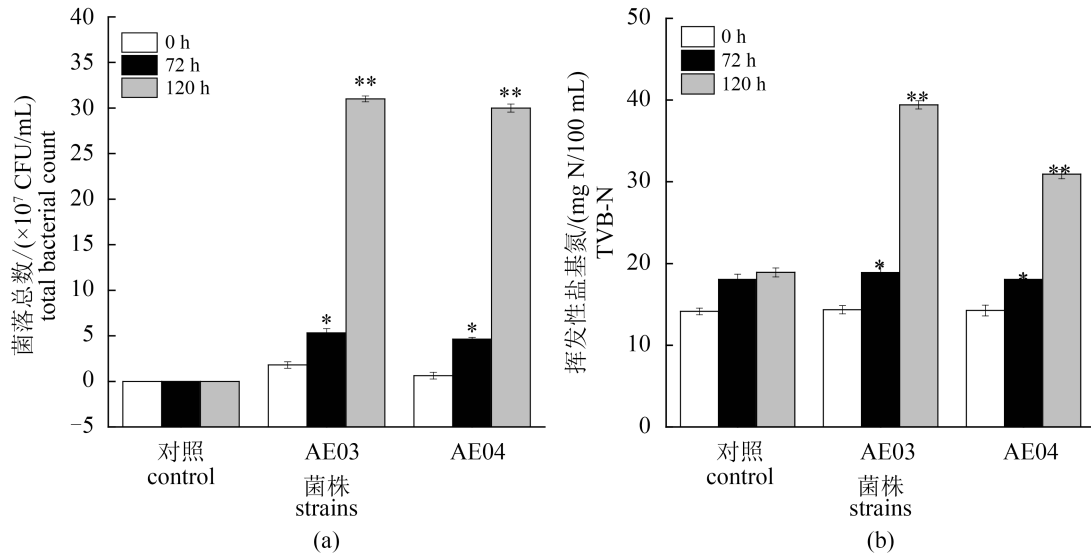


图5 接种灭菌鱼汁的两株气单胞菌菌落总数(a)和TVB-N含量(b)的变化

Fig. 5 Changes of total plate count (a) and TVB-N value (b) in sterile fish juice of two *Aeromonas* isolates

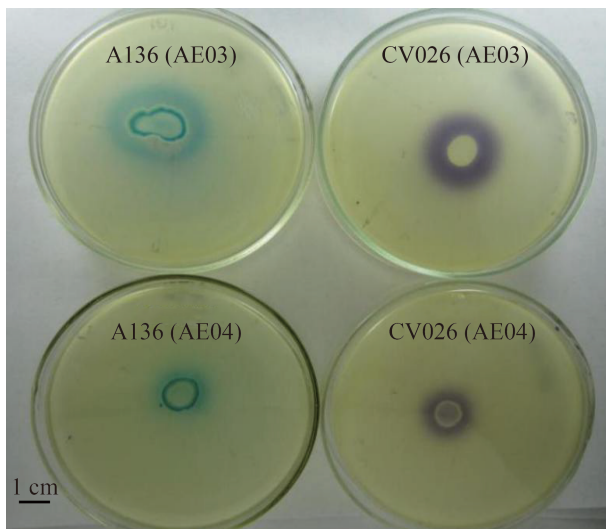


图6 两株气单胞菌产AHLs能力

Fig. 6 The ability of producing AHLs of two *Aeromonas* isolates

后能使根瘤农杆菌A136和紫杆菌CV026分别产生绿色和紫色，表明2株菌都能产生AHLs信号分子；同时发现接种AE03菌株的信号报告平板的绿色和紫色圈都明显大于AE04，表明AE03菌株分泌的AHLs含量明显高于AE04。

3 讨论

气单胞菌是危害水产养殖业的一类重要病原菌，能导致多种水产动物感染患病，其中以细菌性出血病最为严重。目前气单胞菌的研究

主要集中在致病性。本课题组在冷藏大黄鱼货架期终点分离出2株不产 H_2S 的菌株，经生理生化和分子鉴定为气单胞菌属，其中AE03为杀鲑气单胞菌，AE04为软体动物气单胞菌。研究表明，气单胞菌是冰藏海鲑鱼(*Pseudoperca semifasciata*)腐败菌群的成员^[17]。钱韻芳等^[18]报道在气调包装的凡纳滨对虾(*Litopen-aeus vannamei*)中发现希瓦氏菌和气单胞菌的致腐能力强于肉杆菌。尽管气单胞菌被报道为水产品中的腐败菌，然而对其致腐活性的系统性研究依然较少。

腐败微生物能分解鱼肉的蛋白质和脂肪等营养物质，积累胺、吲哚、硫化氢、有机酸、醛和酮等腐败代谢产物。海产鱼类肌肉还富含TMAO，腐败菌分泌的氧化三甲胺还原酶能将其还原为腥臭味的TMA^[19]，而组胺、腐胺、尸胺和酪胺等生物胺可作为水产品新鲜度的重要指标^[20]。研究在培养基层面发现，杀鲑气单胞菌AE03在常温和低温下繁殖速率较快，产生蛋白酶活性，形成较高含量的TMA和生物胺，并且具有较强的被膜形成能力。生物被膜是细菌黏附在接触物体表面上，代谢分泌多糖、纤维蛋白和脂质蛋白基质等物质，同时将菌体自身包裹其中的一种膜状物。水产鱼类表面一旦形成被膜菌就很难清除，并成为持续的污染源。并且，灭菌鱼汁的接种实验发现AE03鱼汁中TVB-N含量显著高于AE04($P < 0.05$)，进一步证实AE03为强致腐株，而AE04为弱致腐株，也提示气单胞

菌属中不同分离株的致病能力存在明显的差异。李云苗等^[21]发现气单胞菌对冷却猪肉储藏过程中腐败指标影响不大,但在混合细菌中气单胞菌对产品腐败进程的群体效应起关键作用。Parlapani等^[22]报道冰藏养殖金头鲷(*Sparus aurata*)货架末期的腐败菌主要由杀鲑气单胞菌、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)和腐败希瓦氏菌(*S. putrefaciens*)共同组成。本课题组前期研究已报道希瓦氏菌属为冷藏大黄鱼的优势腐败菌,本研究分离的AE03腐败代谢活性较高,也提示该气单胞菌可能在大黄鱼腐败进程中发挥重要的协同作用。

群体感应(quorum sensing, QS)是细菌根据自身浓度变化进行自我协调的一种群体行为,高丝氨酸内酯是革兰氏阴性菌的主要自诱导物,已在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)、嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)等多种腐败菌中报道能分泌多种AHLs。本研究分离的气单胞菌AE03和AE04均能诱导报告菌紫色杆菌CV026和根癌农杆菌A136分别产生紫色和绿色,表明2株细菌具有AHLs活性,并且AE03的产AHLs能力显著强于AE04。Lim等^[23]在豚鼠气单胞菌中发现短链信号分子C₄-HSL和C₆-HSL,其中C₄-HSL活性较高。Swift等^[24]报道嗜水气单胞菌和杀鲑气单胞菌主要产生较高含量的C₄-HSL。研究中发现2种气单胞菌的致病能力与AHLs浓度存在正相关,强致病株AE03的AHLs浓度也更高,暗示气单胞菌致病能力的调控可能与QS信号分子有关。已有水产品致病菌嗜水气单胞菌^[25]和杀鲑气单胞菌^[26]通过AHLs的群体感应信号分子调节毒力因子表达的报道。Natrah等^[27]发现灭活嗜水气单胞菌信号分子合成酶和信号分子识别受体后的江鲢幼鱼的存活率比含野生菌的江鲢幼鱼成活率高。研究将进一步探究AHLs信号分子参与杀鲑气单胞菌AE03致病的作用。

可见,气单胞菌是冷藏大黄鱼腐败菌群的重要成员,其中杀鲑气单胞菌AE03腐败代谢活性强,能积累高含量TMA、尸胺和TVB-N,且能分泌高浓度的AHLs。本研究为从群体感应角度探讨气单胞菌致病特性提供了理论依据,为更好地理解水产品腐败菌群微环境的相互作用奠定了良好基础。

参考文献:

- [1] 郭全友, 杨宪时, 许钟. 养殖大黄鱼细菌菌群分离鉴定与分析[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 92-97.
Guo Q Y, Yang X S, Xu Z. Analysis, isolation and identification of bacterial flora on cultured *Pseudosciaena crocea*[J]. Microbiology China, 2006, 33(3): 92-97(in Chinese).
- [2] Gram L, Huss H H. Microbiological spoilage of fish and fish products[J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 33(1): 121-137.
- [3] Stenstrom I M, Molin G. Classification of the spoilage flora of fish, with special reference to *Shewanella putrefaciens*[J]. The Journal of Applied Bacteriology, 1990, 68(6): 601-618.
- [4] Lindberg M R, Havens J M, Lauwers G Y, et al. Aeromonas: an emerging food-borne cause of infectious colitis[J]. Laboratory Investigation, 2008, 88(1): 127.
- [5] 王高学, 黄增荣. 白斑狗鱼“败血症”病原及组织病理研究[J]. 水产学报, 2006, 30(3): 383-387.
Wang G X, Huang Z R. Studies on the pathogen and histopathology of septicemia in *Esox lucius*[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(3): 383-387(in Chinese).
- [6] 朱军莉, 赵二科, 孙丽霞, 等. 冷藏大黄鱼腐败菌群和群体感应信号分子的动态变化规律[J]. 中国食品学报, 2015, 15(4): 175-181.
Zhu J L, Zhao E K, Sun L X, et al. Dynamic variation rule of spoilage bacterial and quorum sensing signal molecules in the refrigerated large yellow croaker[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(4): 175-181(in Chinese).
- [7] 赵二科, 朱军莉, 冯立芳, 等. 冷藏大黄鱼SSO希瓦氏菌致病能力差异机制初探[J]. 水产学报, 2015, 39(2): 256-264.
Zhao E K, Zhu J L, Feng L F, et al. Preliminary mechanism of different spoilage potential of specific spoilage organism, *Shewanella*, in refrigerated *Larimichthys crocea*[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(2): 256-264(in Chinese).
- [8] SB/T 10317-1999. 蛋白酶活力测定法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
SB/T 10317-1999. Measurement of proteinase activity [S]. Beijing: Standards Press of China, 1999(in Chinese).
- [9] GB/T 5009.179-2003. 食品卫生检验方法理化部分[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
GB/T 5009.179-2003. Methods of food hygienic analysis-physical and chemical section[S]. Beijing:

- Standards Press of China, 2003(in Chinese).
- [10] 许龙福, 俞飞兰, 胡振友, 等. 火腿中三甲胺氮测定方法的修订及验证[J]. 预防医学论坛, 2006, 11(6): 641-643.
Xu L F, Yu F L, Hu Z Y, *et al.* Amendment of method for determination of trimethylamine nitrogen in ham[J]. Preventive Medicine Tribune, 2006, 11(6): 641-643(in Chinese).
- [11] Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough L A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(6): 2950-2958.
- [12] Dalgaard P. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish[J]. International Journal of Food Microbiology, 1995, 26(3): 319-333.
- [13] GB/T 4789.2-2010. 食品微生物学检验-菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
GB/T 4789.2-2010. Food microbiological examination: Aerobic plate count[S]. Beijing: Standards Press of China, 2003(in Chinese).
- [14] GB/T 5009.44-2003. 食品卫生检验方法理化部分[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
GB/T 5009.44-2003. Methods of food hygienic analysis-physical and chemical section[S]. Beijing: Standards Press of China, 2003(in Chinese).
- [15] Holden M T G, Mcgowan S J, Bycroft B W, *et al.* Cryptic carbapenem anti-biotic production genes are widespread in *Erwinia carotovora*: facile trans activation by the *carR* transcriptional regulator[J]. Microbiology, 1995, 17: 345-356.
- [16] Hantsis-Zacharov E, Halpern M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(22): 7162-7168.
- [17] Hozbor M C, Saiz A I, Yeannes M I, *et al.* Microbiological changes and its correlation with quality indices during aerobic iced storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*)[J]. LWT-Food Science and Technology, 2006, 39(2): 99-104.
- [18] 钱韻芳, 杨胜平, 谢晶, 等. 气调包装凡纳滨对虾特定腐败菌致腐败能力研究[J]. 中国食品学报, 2015, 1(1): 85-91.
Qian Y F, Yang S P, Xie J, *et al.* Studies on the putrefaction potential of the specific spoilage organisms from modified atmosphere packaged *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 1(1): 85-91(in Chinese).
- [19] Jaffres E, Sohier D, Leroi F, *et al.* Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 131(1): 20-29.
- [20] Kim M, Mah J, Hwang H. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish[J]. Food Chemistry, 2009, 116(1): 87-95.
- [21] 李苗云, 赵改名, 张建威, 等. 冷却猪肉贮藏过程中主要腐败菌的聚类分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(12): 2531-2537.
Li M Y, Zhao G M, Zhang J W, *et al.* Cluster analysis of the main spoilage bacteria during storage in chilled pork[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(12): 2531-2537(in Chinese).
- [22] Parlapani F F, Meziti A, Kormas K A, *et al.* Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S *rRNA* gene analysis[J]. Food Microbiology, 2013, 33(1): 85-89.
- [23] Lim Y, Ee R, Yin W, *et al.* Quorum sensing activity of *Aeromonas caviae* strain YL12, a bacterium isolated from compost[J]. Sensors, 2014, 14(4): 7026-7040.
- [24] Swift S, Karlyshev A V, Fish L, *et al.* Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the *LuxRI* homologs *AhyRI* and *AsaRI* and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(17): 5271-5281.
- [25] Janda J M, Abbott S L. The Genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2010, 23(1): 35-73.
- [26] Schwenteit J, Gram L, Nielsen K F, *et al.* Quorum sensing in *Aeromonas salmonicida* subsp *achromogenes* and the effect of the autoinducer synthase *AsaI* on bacterial virulence[J]. Veterinary Microbiology, 2011, 147(3-4): 389-397.
- [27] Natrah F M I, Alam M I, Pawar S, *et al.* The impact of quorum sensing on the virulence of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida* towards burbot (*Lota lota* L.) larvae[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 159(1-2): 77-82.

Spoilage phenotypic characterization and identification of *Aeromonas* isolated from spoiled *Larimichthys crocea*

GE Yangyang, ZHU Junli*, LIU Li, REN Yijing

(1. College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China;

2. Food Safety Key Lab of Zhejiang Province, Hangzhou 310018, China)

Abstract: To identify the spoilage potential of two *Aeromonas* strains isolated from the spoiled *Larimichthys crocea*, we identified the isolates that did not produce H₂S by biochemical characterization and 16S *rRNA*. All of the isolates were able to grow aerobically from 4 °C to 37 °C, survived below 60 salinity, and could reduce trimethylamine N-Oxide to trimethylamine (TMA). Biochemical characterization and phylogenetic tree analysis of 16S *rRNA* gene showed that AE03 and AE04 belonged to *A. salmonicida* and *A. molluscorum*, respectively. The isolate AE03 showed the faster growth rate than AE04 on the growth curves at 4 °C and 25 °C, and exhibited the higher production of biogenic amine, TMA, and extracellular enzyme activity *in vitro*. In sterile fish juice, the total volatile basic nitrogen (TVB-N) value of AE03 was also significantly higher than that of AE04. Furthermore, two isolates could produce AHLs by *C. violaceum* CV026 and *A. tumefaciens* A136 biosensor detecting system, and AHLs activity in AE03 was higher than that in AE04. Thus, it was found that AE03 (*A. salmonicida*) was a strong spoiler in deterioration of *L. crocea* at refrigerated storage, and produced higher AHLs activity. The present study provided a good foundation to clarify the mechanism of spoilage of *Aeromonas* from the point of quorum sensing.

Key words: *Larimichthys crocea*; *Aeromonas*; identification; spoilage; extracellular enzyme; quorum sensing

Corresponding author: ZHU Junli. E-mail: junlizhu0305@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31271954); College Student's Innovation Project of Zhejiang Province (2016R408024); Innovation Project of Zhejiang Gongshang University (14020000359)