

鲜活细点圆趾蟹中组胺菌的分离鉴定与生长特性

Isolation, identification and growth characteristics of histamine-forming bacteria from live *Ovalipes punctatus*

余辉^{1,2} 陈洁¹ 何志勇¹ 张爽¹ 曾茂茂¹

YU Hui^{1,2} CHEN Jie¹ HE Zhi-yong¹ ZHANG Shuang¹ ZENG Mao-mao¹

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 浙江海洋大学食品与医药学院, 浙江 舟山 316022)

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

2. School of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316022, China)

摘要:利用 HBI 培养基结合薄层层析法对活细点圆趾蟹腮条和内脏中的组胺菌进行筛选,并通过高效液相色谱法对组胺菌产组胺能力进行测定,再利用 16S rDNA 基因测序对其进行分子鉴定。同时,研究了温度、初始 pH 值、NaCl 含量对组胺菌生长和组胺生成量的影响,以及壳低聚糖(COS)对组胺菌生长的抑制效果。结果显示,从细点圆趾蟹的腮条中分离获得 1 株组胺菌,经鉴定命名为 *Enterobacter aerogenes* OP-G2,其组胺生成量为 (46.96 ± 1.94) mg/L (30 °C 培养 48 h)。低温(<4 °C)和/或高 NaCl 含量($\geq 10\%$)能有效控制 *E. aerogenes* OP-G2 菌株的生长和组胺的生成量,且对菌株组胺生成量的抑制率可高达 92% 以上。另外,当 COS 浓度 ≥ 0.5 g/100 mL 时,对 *E. aerogenes* OP-G2 菌株抑菌率均在 30.58% 以上,且当 pH 6.0 时,1.0 g/100 mL 浓度的 COS 对 *E. aerogenes* OP-G2 菌株抑菌率高达 47.57%。

关键词:细点圆趾蟹;组胺菌;分离鉴定;组胺;抑菌

Abstract: The gills and guts of live *Ovalipes punctatus* were screened for histamine-forming bacteria (HFB) by HBI medium and TLC methods. Furthermore, the histamine-forming ability was evaluated by HPLC method, and the bacteria was identified by 16 S rDNA morphology sequence analysis. The effects of temperature, initial pH value and NaCl contents on the growth characteristics and histamine production as well as the inhibitory effects of chitooligosaccharide (COS) on the histamine-forming bacteria. One strain HFB was isolated, identified and named as *Enterobacter aerogenes* OP-G2 based on morphology and 16S rDNA sequence analysis. This strain could produce (46.96 ± 1.94) mg/L histamine in TSBH medium after incubation at 30 °C for 48 h. The growth and histamine formation of

E. aerogenes OP2-56 in TSBH medium could be effectively controlled both by low-temperature (≤ 4 °C) and high NaCl content ($\geq 10\%$), and the inhibitory rate for the strain could be up to more than 92%. Meanwhile, the growth of the strain could be effectively inhibited (all above 30.58%) by COS concentration higher than 0.5 g/100 mL, and the antibacterial rate of 1.0 g/100 mL COS at pH 6.0 against *E. aerogenes* OP2-56 could be up to 47.57%.

Keywords: *Ovalipes punctatus*; histamine-forming bacteria; isolation and identification; histamine; bacteriostasis

组胺是一种低分子量的碱性杂环伯胺,可天然存在于一些海产鱼类中,是导致食物中毒的致病物。国内外由鱼类中的组胺导致的中毒事件时有发生,如鲭科鱼类的金枪鱼、鲭鱼、鲱鱼和秋刀鱼中毒事件以及非鲭科鱼类的鲱鳕、青鱼、鲱鱼和沙丁鱼中毒事件^[1-2]。另外,发酵肉制品、豆豉、酒等发酵食品组胺中毒也偶有发生^[3-4]。组胺中毒症状严重程度与摄入组胺的量有关,当摄入 8~40, 40~100, 100 mg/kg 以上组胺时,可分别出现轻度、中度和重度中毒症状^[5]。因此,组胺作为海产鱼类的重要质量指标已被广泛认同^[6-7]。

食品中的组胺主要是由组胺菌(主要为细菌)分泌的胞外组胺酸脱羧酶催化鱼体中的游离组氨酸发生脱羧反应所产生。目前已从鱼及其制品中筛选出大量的组胺菌,主要为肠杆菌科细菌,其中 *Enterobacteria aerogenes*、*Kelbsiella pneumoniae*、*Morganella morganii* 和 *Hafnia alvei* 经常出现于组胺中毒的海产鱼中^[1-2]。另外,从腌制虾和贝类^[8-9]、奶酪^[10]、豆豉^[11]、香肠^[12]以及酒^[13]中也筛选出许多组胺菌。研究^[14]显示,冻藏/冷藏可有效控制食品的组胺超标,但由于组胺酸脱羧酶具有较强的稳定性,一旦解冻其活性可快速恢复而催化产生组胺。因此,避免组胺菌的污染以及控制其产胺是防止食品中组胺生成与超标的主要途径。

细点圆趾蟹(*Ovalipes punctatus*)俗称沙蟹、牛脚蹄,分

基金项目:浙江省科技厅优先主题重点农业项目(编号:2011C12041)

作者简介:余辉,男,江南大学在读博士研究生。

通信作者:陈洁(1969—),女,江南大学教授,博士后。

E-mail: chenjie@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2018-07-13

布于中国的黄海、东海和南海,盛产于东海与黄海。随着渔业资源的衰退,低值细点圆趾蟹成为了主要渔获物,年捕捞量高达 2.0×10^5 t 以上。细点圆趾蟹被加工成蟹肉罐头、冷冻蟹肉糜等,产品远销日本、韩国、东南亚、美国和欧盟。目前,关于蟹类中组胺的研究相对较少,仅有远海梭子蟹(*Portunus pelagicus*)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)低温保藏中产生组胺的报道^[15-16]。迄今为止,尽管很少有蟹及其产品的组胺中毒事件的报道,但关于蟹类过敏的报道却有很多,而轻度组胺中毒与 IgE 介导的过敏症状很相似,因此可能被误诊为蟹类过敏^[17]。由于细点圆趾蟹捕捞后不易存活,且具有高蛋白以及高游离组氨酸含量等特性^[18],使得其更易受到微生物污染,一旦被组胺菌污染,现有生产加工与储运条件下极有可能导致组胺超标。然而,有关蟹类中组胺菌的研究迄今未见报道。因此,本试验拟从活细点圆趾蟹的腮条和肠中分离鉴定出组胺菌,并进一步探讨培养条件对其生长与产组胺能力的影响,同时考察壳低聚糖对细点圆趾蟹中组胺菌的抑菌效果,以期对细点圆趾蟹的生产加工与贮藏提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

活细点圆趾蟹:购于沈家门水产码头,装于有碎冰的泡沫箱中,2 h 内完成试验;

组胺标准品($\geq 99.5\%$)、丹磺酰氯($\geq 98\%$)、乙腈:HPLC 纯,美国 Sigma-Aldrich 公司;

壳低聚糖(Chitosan oligosaccharides, COS):GPC 测其分子量 <10 kDa,实验室自制;

其他试剂:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

胰酪胨大豆琼脂培养基(TSA)、胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB):杭州微生物试剂有限公司;

TSBH 培养基:3%胰酪胨大豆肉汤培养基、1% L-组氨酸磷酸盐和 0.005%磷酸吡哆醛,用于组胺菌的富集和疑似组胺菌的确认与产组胺能力分析;

HBI(Histamine-forming bacteria isolation agar)培养基:5 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、2 g L-组氨酸磷酸盐、1 g 碳酸钙、5 g 氯化钠、0.06 g 溴甲酚紫、20 g 琼脂,溶于 1 L 去离子水,调 pH 至 5.2~5.3,用于组胺菌的初筛与纯化。

1.1.2 主要仪器设备

生化培养箱:SPX-250B-Z 型,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;

高效液相色谱仪:Alliance e2695 型,美国 Waters 公司;

扫描电子显微镜:HITACH S-3400N 型,日本 Hitachi 公司;

PCR 热循环仪:Applied Biosystems® Veriti™ 96-Well 型,美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 方法

1.2.1 组胺菌的初步筛选 对鲜活细点圆趾蟹的腮条和肠进行无菌取样、研磨。15 g 样品装入盛有 100 mL TSBH 的

三角瓶中。30 ℃富集培养 72 h 后,用无菌生理盐水依次稀释成 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 取 1 mL TSBH 培养基或稀释液,采用稀释混合平板法制成含菌 HBI 培养基平板,30 ℃培养 72 h,培养期间根据菌落形态特征挑取蓝色或紫色菌落或有紫色晕环的菌落,于 HBI 培养基上传代培养,直至分离出单菌落,取单菌落于 TSA 斜面中保存,此为疑似组胺菌。

1.2.2 组胺菌的确认与产组胺能力分析 挑取活化的疑似组胺菌,用无菌生理盐水稀释成 5.0 lg CFU/mL 菌悬液,吸 1 mL 菌悬液于 9 mL TSBH 培养基中,30 ℃培养 24 h 后,再吸 1 mL 上述 24 h 培养液于 9 mL 新鲜 TSBH 培养基中,30 ℃培养 48 h 后,TSBH 培养基于 $12\,000 \times g$ 离心 10 min,对上清液中的组胺进行分析。按照 Lieberd 等^[19]的 TLC 方法分析上清液中的组胺,确认疑似菌株是否为组胺菌;按照 Yu 等^[20]的 HPLC 方法测定上清液中的组胺含量,确定组胺菌的产组胺能力。

1.2.3 菌株鉴定

(1) 形态观察:组胺菌在 TSA 平板培养 12 h,参照 Tholozan 等^[21]方法对其细胞形态进行观察;培养 18 h,挑取菌落,进行革兰氏染色,油镜下观察其染色情况;培养 48 h 后,采用低倍镜对其菌落形态进行观察。

(2) 分子鉴定:参照 Kim 等^[22]的方法进行鉴定。

1.2.4 培养条件对组胺菌的生长与组胺生成量的影响 吸 1.2.2 中 5.0 lg CFU/mL 菌悬液 1 mL,接种于 9 mL 新鲜 TSBH 培养基中,培养条件为:温度 30 ℃、NaCl 含量 0.5%、初始 pH 7.0,其中单因素温度设定为 4, 15, 25, 30, 35 ℃、初始 pH 值设定为 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, NaCl 含量设定为 0.5%, 1.0%, 3.0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 静置培养 48 h。待培养结束后,菌落总数采用平板涂布法制成含菌 TSA 平板,30 ℃培养 48 h 后进行菌落计数;组胺含量按 1.2.2 中 HPLC 方法测定。

1.2.5 抑菌试验 取 7.0 lg CFU/mL 组胺菌悬液 1 mL,采用稀释混合平板法制成含菌 TSA 平板(培养基 pH 为 6.0 和 7.0)。用无菌打孔器在平板上打孔,挑出培养基圆饼以做成圆孔。以无菌生理盐水为阴性对照,0.5 mg/mL 头孢克肟生理盐水溶液为阳性对照,0.1, 0.5, 1.0 g/100 mL 壳低聚糖生理盐水溶液为抑菌剂。分别向孔中加入 80 μ L 上述 5 种溶液,做 3 个平行平板,30 ℃培养 48 h。采用十字交叉法,用游标卡尺测量抑菌圈直径,取平均值。按式(1)计算壳低聚糖对组胺菌生长的抑菌率。

$$c = \frac{d_1 - d_2}{d_1} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

c ——抑菌率, %;

d_1 ——阳性对照抑菌圈直径, mm;

d_2 ——壳低聚糖抑菌圈直径, mm。

1.2.6 统计分析 结果以(平均值 $\pm$ 标准偏差)表示,采用 SPSS 19.0 软件对其进行独立样本 T-test 检验,显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 组胺菌的筛选

根据组胺呈碱性的原理利用 HBI 培养基对组胺菌进行初步筛选,但由于一些微生物可利用 HBI 选择性培养基中的酵母提取物和蛋白胨代谢产生其他碱性物质^[23],因而本方法所筛选的菌株为疑似组胺菌。从腮条和肠中各获得 3 株不同菌落形态的疑似组胺菌株(表 1),其在 HBI 培养基上呈现蓝色菌落或蓝紫色晕环(图 1)。疑似组胺菌均为富集培养基直接涂布于 HBI 培养基所出现的菌株,而稀释液在

HBI 培养基却未出现疑似组胺菌,表明鲜活细点圆趾蟹中疑似组胺菌较少。另外,疑似组胺菌均为培养 12~24 h 就产生蓝紫色晕环,在培养 36 h 后整个平板变成紫色[图 1(c)],而 Niven 等^[24]报道 35 ℃ 培养 36~72 h 才有蓝紫色晕环出现,但并未对组胺进行定量;Rodriguez-Jerez 等^[25]报道芽孢杆菌属组胺菌(*Bacillus* spp.)在 37 ℃ 培养 48 h 才能被检测出,其组胺生成量为 10.54 mg/L。本研究结果与文献的差异可能是筛选出的疑似组胺菌的产组胺或其他碱性物质的能力较高,产生的组胺或碱性物质较多。

表 1 6 株疑似组胺菌的菌落与细胞形态

Table 1 Colony and cell morphology of six presumptive histamine-forming bacteria isolates

菌株	形状	颜色	隆起形态	边缘	透明度	表面	染色结果	形状
OP-G1	圆形	乳白	凸起	光滑	不透明	湿润有光泽	G ⁻	短杆
OP-G2	圆形	乳黄	扁平	光滑	略透明	湿润有光泽	G ⁻	短杆
OP-G3	圆形	黄色	隆起	光滑	透明	湿润有光泽	G ⁻	短杆
OP-I1	圆形	乳白	扁平	光滑	不透明	湿润有光泽	G ⁻	短杆
OP-I2	圆形	淡蓝色	扩展	光滑	略透明	干燥无光泽	G ⁻	短杆
OP-I3	圆形	乳白	扁平	光滑	不透明	干燥无光泽	G ⁻	短杆

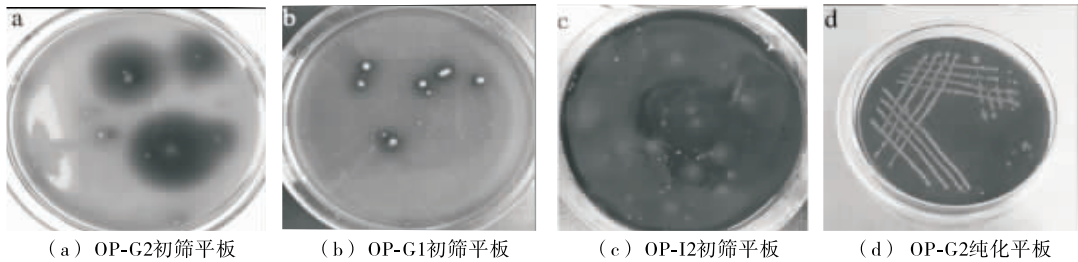


图 1 部分初筛与纯化 HBI 平板

Figure 1 HBI plates of partial preliminary screening and purification

对获得的 6 株疑似组胺菌 TSBH 培养基中的组胺进行 TLC 分析,结果见图 2。从图 2 中可以看出,仅 OP-G2 菌株培养基与标样有红色迁移斑点出现,而其他菌株培养基均无红色迁移斑点出现,而且 OP-G2 菌株的 R_f 值为 0.795,组胺标样的 R_f 值为 0.796,因此 OP-G2 菌株可被确认为组胺菌。



1. OP-G1 2. OP-G2 3. OP-G3 C. 空白对照 S. 组胺标样
4. OP-I1 5. OP-I2 6. OP-I3

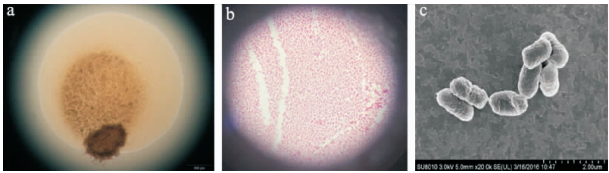
图 2 6 株疑似组胺菌 TSBH 培养基中组胺的 TLC 分析

Figure 2 TLC of histamine in their TSBH medium inoculated with 6 presumptive HFB isolates

2.2 OP-G2 菌株鉴定

2.2.1 形态观察 OP-G2 菌株在营养琼脂固体培养基上培养 48 h 后,菌落为乳黄色圆形、边缘整齐,外部菌落透明、表面湿润有光泽,直径为 1.1 mm 左右[图 3(a)],菌体黏稠不易挑起,后期菌落边缘不整齐,表面有皱褶。OP-G2 菌株革兰氏染色呈阴性,单个细胞呈杆状,两端钝圆,单个或成堆排列[图 3(b)],扫描电镜显示单个菌体呈短杆状,大小为 0.8~1.0 $\mu\text{m} \times 1.2 \sim 1.8 \mu\text{m}$,见图 3(c),其特征与肠杆菌属的形态特征基本相似。

2.2.2 OP-G2 菌株分子鉴定 OP-G2 菌株 16S rDNA PCR 扩增结果见图 4,得到序列总长 1 393 bp。将上述序列在 EzBioCloud 网站上 (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) 进行序列相似性比对,选择相似度最高的 10 株菌株的 16S rDNA



(a) 菌落形态(40×) (b) 革兰氏染色(1000×) (c) SEM

图 3 OP-G2 菌株菌落与细胞形态

Figure 3 Colony and cell morphology of stain OP-G2

序列,利用 Mega 6.0 软件进行多序列比对并采用邻接法(Neighbor-joining)构建系统发育进化树(图 5),OP-G2 菌株与 *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190(T) 菌株在同一分支上,且 16S rDNA 序列相似性达到 95%。因此,该菌株被定名为 *Enterobacter aerogenes* OP-G2(简称 *E. aerogenes* OP-G2)。

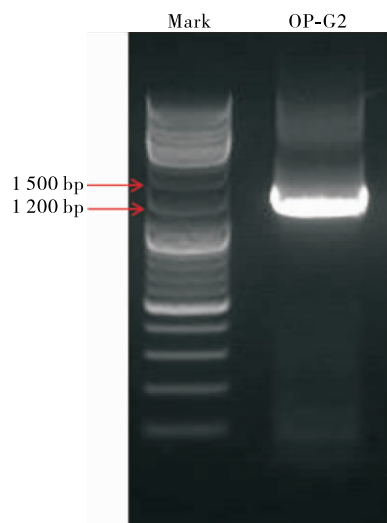


图 4 OP-G2 菌株 16S rDNA PCR 扩增产物电泳图
Figure 4 Agarose gel electrophoresis of the amplified 16S rDNA gene fragments of OP-G2

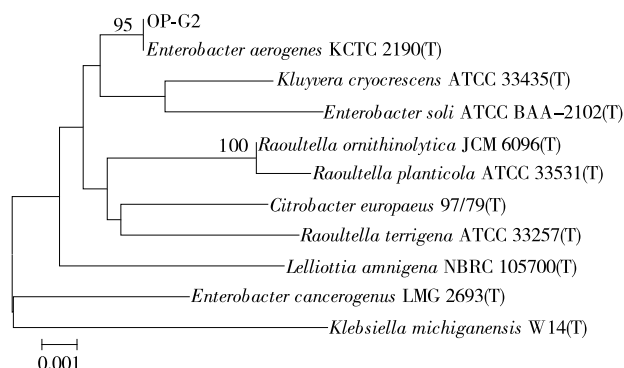


图 5 基于 16S rDNA 序列同源性的 OP-G2 菌株系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of strain OP-G2 based on 16S rDNA sequences

2.3 产组胺能力分析

为确定 *E. aerogenes* OP-G2 菌株产组胺能力,利用 HPLC 对其 TSBH 培养基中组胺含量进行测定,结果见图 6。从图 6 可以看出,该菌株培养基的 HPLC 色谱图在 18.095 min 出峰,与组胺标准品的出峰时间相吻合,进一步表明 *E. aerogenes* OP-G2 菌株为组胺菌,定量结果表明组胺含量为 (46.96 ± 1.94) mg/L。肠杆菌科组胺菌可分为两类^[26],一类在 15℃ 以上培养 24 h,可产生 1 000 mg/L 以上组胺的细菌为高产组胺菌;一类在 30℃ 及以上培养 48 h,可产生 250 mg/L 以下组胺含量的细菌为低产组胺菌。因此,本试验所筛选的菌株为低产组胺菌。目前,从组胺中毒的食品中分离出的产气肠杆菌属组胺菌,既有高产 *E. aerogenes* 组胺

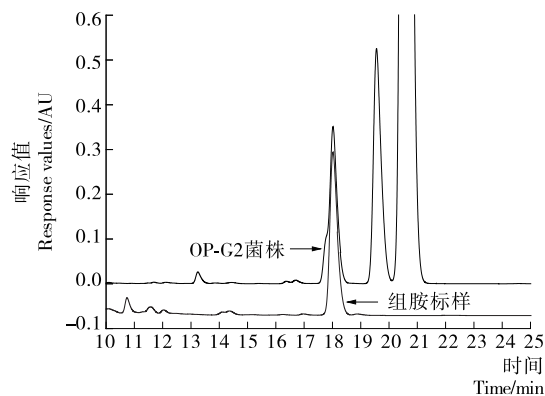


图 6 *E. aerogenes* OP-G2 菌株 TSBH 培养基中组胺的 HPLC 色谱图

Figure 6 HPLC chromatogram of histamine in TSBH medium inoculated with *E. aerogenes* OP-G2 strain

菌^[27],也有低产 *E. aerogenes* 组胺菌^[28-29]。因此,需要进一步对 *E. aerogenes* OP-G2 菌株的生长与产组胺特性进行研究。

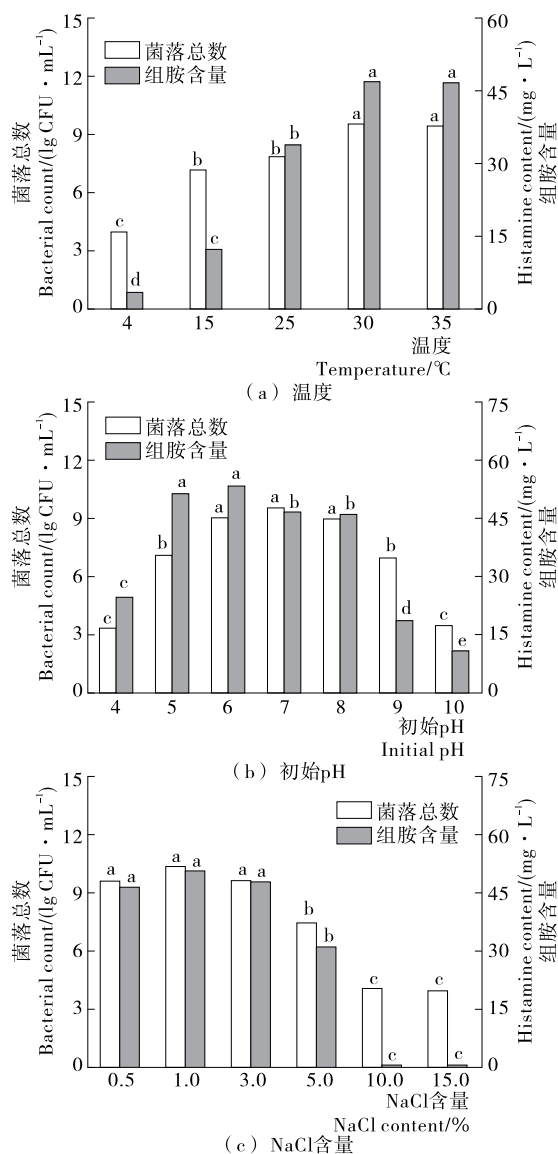
2.4 培养条件的影响

考察了不同培养温度、初始 pH 值和 NaCl 含量对 *E. aerogenes* OP-G2 菌株的生物量与组胺生成量的影响,结果见图 7。由图 7(a)可知,该菌株 30℃ 时菌落总数和组胺生成量均达到最高,分别为 (9.55 ± 0.45) lg CFU/mL 和 (46.78 ± 2.13) mg/L。在 4~30℃ 时,随着温度的升高,菌落总数和组胺生成量均增大,与 Rodtong 等^[30]的结果相一致。尽管 4℃ 下该菌株生长繁殖被抑制 $[(3.95 \pm 0.48)$ lg CFU/mL],但其培养基中仍有少量组胺生成(3.46 mg/L),可能是 *E. aerogenes* 组氨酸脱羧酶在 4℃ 下仍能保持活性^[31],即细菌代谢所分泌的少量胞外组氨酸脱羧酶仍能催化游离组氨酸转化为组胺。另外,相比于 30℃,4℃ 对菌株组胺生成量的抑制率高达 92.60%。

由图 7(b)可看出,初始 pH 7.0 时菌落总数最大,即 (9.55 ± 0.58) lg CFU/mL。当初始 pH ≤ 5.0 或 ≥ 9.0 时菌落总数均显著降低($P < 0.05$)。与菌落总数不同,菌株的组胺生成量却在初始 pH 6.0 时最大,即 (53.28 ± 1.79) mg/L。当初始 pH ≤ 5.0 或 ≥ 8.0 时其组胺生成量均显著降低($P < 0.05$),而 pH 9.0 和 10.0 比 pH 4.0 更能显著降低菌株的组胺生成量($P < 0.05$),且相比于 pH 6.0, pH 10.0 对该菌株的组胺生成量的抑制率达到 79.81%。可能是在微酸性条件下,组胺菌快速分泌组氨酸脱羧酶催化游离组氨酸脱羧生成组胺,促使培养基中 pH 值达到适宜生长条件^[32];也可能是该菌株组氨酸脱羧酶最适 pH 值为弱酸性,如 Rodtong 等^[30]报道的 *E. aerogenes* 组胺菌在 pH 5.0 时组胺生产量最高,而 Zou 等^[31]报道 *E. aerogenes* DL-1 组胺菌组氨酸脱羧酶的最适 pH 为 6.5,亦为弱酸性。

图 7(c)显示,0.5%~3.0% NaCl 对菌株的菌落总数和组胺生成量均无显著影响($P > 0.05$),且 NaCl 含量 1.0% 时,菌落总数和组胺生成量均最高,分别为 (10.33 ± 0.54) lg CFU/mL 和 (50.68 ± 1.63) mg/L,与 Wendakoon 等^[32]报道的一致,表明低盐促进组胺菌的生长与产组胺能力^[33]。当 NaCl 含量提高到 5.0% 时,菌株的菌落总数和组

胺生成量均显著降低($P<0.05$), NaCl 含量 $\geq 10\%$ 时,菌株生长繁殖和组胺生成能力几乎被抑制;相比于 NaCl 含量 1.0% , NaCl 含量 $\geq 10\%$ 时对菌株组胺生成量的抑制率高达 98.95% 以上。综上所述,低温($<4^{\circ}\text{C}$)和/或高 NaCl 含量($\geq 10\%$)能有效控制 *E. aerogenes* OP-G2 的生长和组胺生成量。



不同小写字母表示差异性显著($P<0.05$)

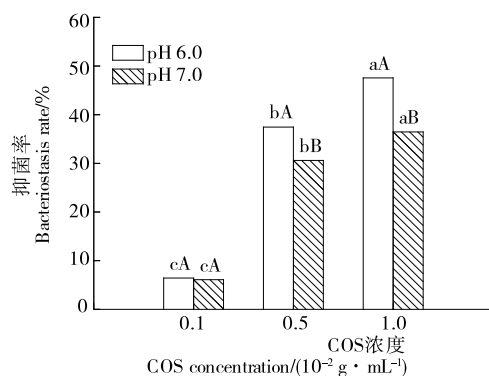
图 7 温度、初始 pH 值和 NaCl 含量对 *E. aerogenes* OP-G2 菌株生长与组胺生成量的影响

Figure 7 Effect of the temperature, initial pH and NaCl content on growth and histamine production of strain *E. aerogenes* OP-G2

2.5 抑菌试验

以头孢克肟为对照,考察了不同浓度的壳低聚糖对 *E. aerogenes* OP-G2 组胺菌的抑菌效果,结果见图 8。结果表明,随着 COS 浓度的增大,对 *E. aerogenes* OP-G2 菌株的抑菌效果显著增强($P<0.05$)。当 COS 浓度 ≥ 0.5 g/100 mL 时,对 *E. aerogenes* OP-G2 菌株抑制率均在 30.58% 以上,表明 COS 对该菌株有较好的抑制效果;pH 值对 COS 的抑菌活性的影响具有显著性差异($P<0.05$),且当 pH 6.0 时,

1.0 g/100 mL 浓度 COS 对 *E. aerogenes* OP-G2 菌株抑菌率高达 47.57%,可能是酸性条件下 COS 游离氨基带正电荷,更有利于与带负电荷的菌体结合,干扰菌体代谢通路,从而起到抑菌效果^[34]。



不同小写字母表示同一 pH 不同 COS 浓度之间的差异性显著($P<0.05$);不同大写字母表示同一浓度不同 pH 之间的差异性显著($P<0.05$)

图 8 壳低聚糖对 *E. aerogenes* OP-G2 菌株的抑菌率

Figure 8 Bacteriostasis rates of chitosan oligosaccharides to strain *E. aerogenes* OP-G2

3 结论

本研究从鲜活细点圆趾蟹的腮条中分离鉴定出 1 株组胺菌,经鉴定命名为 *Enterobacter aerogenes* OP-G2,其组胺生成量为 (46.96 ± 1.94) mg/L (30 °C 培养 48 h)。低温($<4^{\circ}\text{C}$)和/或高 NaCl 含量($\geq 10\%$)都能有效控制 *E. aerogenes* OP-G2 菌株的生长和组胺生成量,且对菌株的组胺生成量的抑制率高达 92% 以上。当 COS 浓度 ≥ 0.5 g/100 mL 时,对 *E. aerogenes* OP-G2 菌株抑制率均在 30.58% 以上,且当 pH 6.0 时,1.0 g/100 mL 浓度的 COS 对 *E. aerogenes* OP-G2 菌株的抑制率高达 47.57%。本研究结果可为细点圆趾蟹的加工与保藏提供参考。

本试验采用 HBI 培养基从细点圆趾蟹中筛选获得 1 株肠杆菌属组胺菌,后续试验可采用 TCBS 和 PI-CFC 培养基联合 HBI 培养基对细点圆趾蟹中弧菌属和假单胞菌属中组胺菌进行筛选。另外,仅研究了组胺菌在 TSBH 培养基中的产组胺特性,后续试验可对组胺菌在细点圆趾蟹或蟹肉中的产组胺特性进行研究。

参考文献

- [1] FENG C, TEUBER S, GERSHWIN M E. Histamine (Scombrotoxin) fish poisoning: a comprehensive review[J]. Clinical Reviews in Allergy and Immunology, 2016, 50(1): 64-69.
- [2] BIJI K B, RAVISHANKAR C N, VENKATESWARLU R, et al. Biogenic amines in seafood: a review[J]. Journal of Food Science and Technology, 2016, 53(5): 2 210-2 218.
- [3] 王新惠,白婷,李俊霞,等.发酵肉制品中组胺含量测定方法的比较[J].食品与机械,2015,31(3): 37-39.
- [4] SHIVANNE G S G, NARAYAN B, GOPAL S. Bacteriological properties and health-related biochemical components of fermented fish sauce: An overview[J]. Food Reviews International, 2016, 32(2): 203-229.

- [5] PARENTE E, MARTUSCELLI M, GARDINI F, et al. Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 90(6): 882-891.
- [6] European Commission (EC). Commission regulation No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for food-stuffs (Text with EEA relevance)[J]. Official Journal of the European Union, 2005, L338: 1-26.
- [7] Food and Drug Administration (FDA). Fish and fisheries products hazards and controls guidance[M]. 4th ed. Silver Spring: U. S. Food and Drug Administration, 2011: 113-120.
- [8] KIM M K, MAH J H, HWANG H J. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish[J]. Food Chemistry, 2009, 116(1): 87-95.
- [9] LAKSHMANAN R, SHAKILA R J, JEYASEKARAN G. Survival of amine-forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp[J]. Food Microbiology, 2002, 19(6): 617-625.
- [10] LADERO V, FERNÁNDEZ M, ALVAREZ M A. Effect of post-ripening processing on the histamine and histamine-producing bacteria contents of different cheeses[J]. International Dairy Journal, 2009, 19(12): 759-762.
- [11] TSAI Y H, KUNG H F, CHANG S C, et al. Histamine formation by histamine-forming bacteria in douchi, a Chinese traditional fermented soybean product[J]. Food Chemistry, 2007, 103(4): 1 305-1 311.
- [12] ROIG-SAGUES A X, HERNANDEZ-HERRERO M, LOPEZ-SABATER E I, et al. Histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from raw and ripened *Salchichón*, a Spanish cured sausage[J]. Journal of Food Protection, 1996, 59(5): 516-520.
- [13] NANNELLI F, CLAISSE O, GINDREAU E, et al. Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods[J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 47(6): 594-599.
- [14] FUJII T, KURIHARA K, OKUZUMI M. Viability and histidine decarboxylase activity of halophilic histamine-forming bacteria during frozen storage[J]. Journal of Food Protection, 1994, 57(7): 611-613.
- [15] ANUPAMA T K, LALY S J, KUMAR K N A, et al. Biochemical and microbiological assessment of crucifix crab (*Charybdis feriatus*) stored at 4 °C [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2018, 27(4): 531-541.
- [16] XU Yan-shun, XIA Wen-shui, KIM J M. Biogenic and volatile amines in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) stored at different temperatures [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2009, 44(8): 1 547-1 552.
- [17] SICHERER S H, SAMPSON H A. Food allergy[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010, 125(2): S116-S125.
- [18] BU Jun-zhi, DAI Zhi-yuan, ZHOU Tao, et al. Chemical composition and flavour characteristics of a liquid extract occurring as waste in crab (*Ovalipes punctatus*) processing[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(9): 2 267-2 275.
- [19] LIEBER E R, TAYLOR S L. Thin-layer chromatographic screening methods for histamine in tuna fish[J]. Journal of Chromatography A, 1978, 153(1): 143-152.
- [20] YU Hui, ZHUANG Dai-na, HU Xing-juan, et al. Rapid determination of histamine in fish by thin-layer chromatography-image analysis method using diazotized visualization reagent prepared with *p*-nitroaniline[J]. Analytical Methods, 2018, 10 (27): 3 386-3 392.
- [21] THOLOZAN J L, RITZ M, JUGIAU F, et al. Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88(2): 202-212.
- [22] KIM B, BYUN B Y, MAH J H. Biogenic amine formation and bacterial contribution in Natto products[J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 2 005-2 011.
- [23] CHEN Chii-ming, WEI Chen-i, KOBURGER J A, et al. Comparison of four agar media for detection of histamine-producing bacteria in tuna[J]. Journal of Food Protection, 1989, 52(11): 808-813.
- [24] NIVEN C F, JEFFREY M B, CORLETT D A. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1981, 41(1): 321-322.
- [25] RODRIGUEZ-JEREZ J J, MORA-VENTURA M T, LOPEZ-SABATER E I, et al. Histidine, lysine and ornithine decarboxylase bacteria in Spanish salted semi-preserved anchovies[J]. Journal of Food Protection, 1994, 57(9): 784-787.
- [26] BEHLING A R, TAYLOR S L. Bacterial histamine production as a function of temperature and time of incubation[J]. Journal of Food Science, 1982, 47(4): 1 311-1 314.
- [27] CHEN Hwi-chang, LEE Yi-chen, HWANG Deng-fwu, et al. Determination of histamine in mahi-mahi fillets (*Coryphaena hippurus*) implicated in a foodborne poisoning[J]. Journal of Food Safety, 2011, 31(3): 320-325.
- [28] CHEN Hwi-chang, KUNG Hsien-feng, CHEN Wen-chieh, et al. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning[J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 612-618.
- [29] LEE Yi-chen, HUANG Tzou-chi C, LIN Chung-saint, et al. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in striped marlin fillets (*Tetrapturus audax*) implicated in a food-borne poisoning[J]. Toxicon, 2012, 2(60): 161-162.
- [30] RODTONG S, NAWONG S, YONGSAWATDIGUL J. Histamine accumulation and histamine-forming bacteria in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*) [J]. Food Microbiology, 2005, 22 (5): 475-482.
- [31] ZOU Yu, HU Wen-zhong, JIANG Ai-li, et al. Partial purification and characterization of a novel histidine decarboxylase from *Enterobacter aerogenes* DL-1[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2015, 45(6): 605-615.
- [32] WENDAKOON C N, SAKAGUCHI M. Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract[J]. Journal of Food Protection, 1993, 56(5): 410-413.
- [33] KAROVICOVÁ G G M G J. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions[J]. Journal of Food and Nutrition Research, 2006, 45(1): 21-29.
- [34] HELANDER I M, NURMIAHO-LASSILA E L, AHVENAINEN R, et al. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 71(2): 235-244.