

# 海水鱼腌制过程细菌群落和 N-亚硝胺变化分析

孙 瑛, 王萍亚\*, 黄朱梁, 蒋玲波, 彭志兰, 崔 洁, 林吉恒  
(舟山市食品药品检验检测研究院, 舟山 316021)

**摘要:** 研究海水鱼腌制过程细菌群落多样性和N-亚硝胺变化的关系。采用构建16S rDNA基因克隆文库的分析方法, 检测分析不同盐鱼比的海水鱼腌制过程中细菌群落多样性及优势菌变化规律, 同时采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)方法检测分析上述腌制过程中N-亚硝胺的含量变化。结果表明, 嗜冷杆菌属是1:4和1:8盐鱼比腌制海水鱼前期(5 d)、中期(10 d和15 d)、后期(20 d)的共有优势菌群, 且该菌属中优势菌种养料嗜冷杆菌变化趋势为先上升后下降。上述腌制时期的N-亚硝胺含量的变化趋势也均为先上升后下降。通过对海水鱼腌制过程中细菌群落多样性和N-亚硝胺的含量变化分析, 表明海水鱼腌制过程中优势菌种养料嗜冷杆菌变化趋势和N-亚硝胺含量变化趋势一致, 两者间关联需进一步深入研究。

**关键词:** 海水鱼腌制; 16S rDNA基因克隆文库; 细菌群落多样性; N-亚硝胺

**中图分类号:** TS 254.1      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1005-9989(2018)12-0154-07

**DOI:**10.13684/j.cnki.spkj.2018.12.029

## The analysis of microbial community diversity and N-nitrosamine changes during pickled processing of marine fish

SUN Ying, WANG Pingya\*, HUANG Zhuliang, JIANG Lingbo, PENG Zhilan, CUI Jie, LIN Jiheng

(Zhoushan Institute for Food and Drug Control, Zhoushan 316021)

**Abstract:** To study the relationship between microbial community diversity and N-nitrosamine changes in marinating process of ocean fish, the methods of constructing 16S rDNA gene cloning library were used to analyze the diversity of microbial communities and the change rule of dominant bacteria during the pickled processing of ocean fish with different salt concentrations, at the same time GC-MS method was used to analyze the change of N-nitrosamine in different periods of marinated ocean fish. Results showed that *Psychrobacter* in the pickled system with 1:4 and 1:8 salt fish ratio was the predominant microbial communities in the early (5 d), metaphase (10 d and 15 d) and later (20 d) stage. The changes tendency of the dominant bacteria *Psychrobacter cibarius* was first increased and then decreased. N-nitrosamine content in these four periods was also increased at first and then decreased. Microbial diversity of the pickled processing for ocean fish could be investigated by 16S rDNA clone library method, and the content of N-nitrosamines could be detected by GC-MS method. The research showed that the change

收稿日期: 2018-06-10

\*通信作者

基金项目: 浙江省科技计划项目(2016C32082); 舟山科技计划项目(2015C31046)。

作者简介: 孙瑛(1984—), 女, 工程师, 研究方向为微生物与分子生物学检测。



trend of the dominant strain *Psychrobacter cibarius* was consistent with that of N-nitrosamine content during the pickled processing of ocean fish, and there may be some correlation between them remained to further study.

**Key words:** pickled marine fish; 16S rDNA gene cloning library; the diversity of microbial communities; N-nitrosamine

腌制海产品是一种传统的加工保藏产品,不仅保存了海产品丰富的营养价值,且具有独特的口感和风味,深受大众的喜爱,具有非常广泛的市场需求<sup>[1]</sup>。海产品腌制过程是以食盐为主要辅料,在海产品表面直接撒上适量的固体食盐(干腌法)或者将海产品浸入食盐水中(湿腌法)<sup>[2]</sup>。浙江东南沿海地区食用腌制海产品非常普遍,例如咸带鱼、咸黄鱼、咸鳓鱼等产品<sup>[3-4]</sup>。但长期以来人们对腌制海产品的食用安全性缺乏认识,如腌制条件控制不当会使亚硝酸盐含量超标。近年来许多学者对沿海地区的海产品进行了硝酸盐、亚硝酸盐、亚硝胺的含量调查,结果从腌制水产品中检测到了不同水平的致癌物质亚硝胺,其中以挥发性二甲基亚硝胺最为常见<sup>[5]</sup>。

研究表明,亚硝胺的产生是因为新鲜鱼类等水产品在进行腌制、烘烤等加工处理时分解出较多的胺类化合物,胺类化合物在亚硝酸盐等亚硝化试剂存在时即可生成亚硝胺<sup>[6]</sup>。亚硝胺是一种很强的致癌物质,其一般结构为R2(R1)N-N=O,在食品、饮水、消费品以及受污染空气中广泛存在,目前是国际上公认的一种强致癌物,已检测的300种亚硝胺类化合物中已证实90%至少可诱导一种动物致癌<sup>[6-7]</sup>。腌制海产品中所含的硝酸盐和亚硝酸盐主要为产地环境以及腌制所用粗盐带入。针对亚硝胺,我国《食品安全国家标准食品中污染物限量》(GB 2762—2017)规定了肉及肉制品中N-二甲基亚硝胺(NDMA)的限量标准为 $\leq 3.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,水产动物及其制品中N-二甲基亚硝胺(NDMA)的限量标准为 $\leq 4.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[8]</sup>。随着检测设备和检测技术的提升,食品中测定N-亚硝胺的检测方法多种多样,有薄层色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法等,气相色谱-质谱联用(GC-MS)方法是近年来最常被用于测定食品中N-亚硝胺含量的检测方法,具备前处理快速简捷、易于操作、灵敏度高等优点,能够满足腌制海产品中N-亚硝胺残留含量的测定需求<sup>[9]</sup>。

长期以来关于腌制海产品中亚硝胺生成因素

及影响因素的研究局限于温度、时间、环境等,例如王秀元等<sup>[2]</sup>研究了腌制温度、腌制时间等因素对腌制水产品中挥发性亚硝胺生成量影响。目前还未有人研究海产品腌制过程中细菌群落和挥发性亚硝胺的关系。海产品腌制过程中作用的细菌菌群种类复杂多样,部分菌群能把硝酸盐还原为亚硝酸盐,为亚硝胺形成提供前体物质,因此研究腌制体系中的菌群种类及其变化对于控制亚硝胺含量具有一定意义。自然环境中很多菌群无法用传统培养的方法生长<sup>[10]</sup>,故利用普通的培养法不能完全反映海产品腌制体系中菌群种类的多样性。现今分子生物学技术的发展尤其是16S rDNA克隆文库分析技术突破了传统方法无法得到微生物纯培养的限制。由于16S rDNA序列有保守性及高变性,既可以反映生物物种的亲缘关系为分析系统发育提供线索,又可以表明具有种、属的结构特征生物物种的特征核酸序列,是生物种属鉴定的分子基础<sup>[11]</sup>,因此16S rDNA序列分析已成为分子鉴定和系统学研究中最具权威性和准确性的检测方法之一<sup>[12-13]</sup>,广泛应用于不同样品生态系统中微生物多样性的调查<sup>[14-15]</sup>。万力婷等<sup>[15]</sup>利用16S rDNA克隆文库法研究了茼蒿梗腌制过程中细菌菌群变化;翁佩芳等<sup>[16]</sup>利用16S rDNA克隆文库法研究了榨菜低盐腌制体系细菌菌群组成及优势菌种变化。本文采用16S rDNA基因克隆文库分析方法研究海产品腌制过程中细菌群落的多样性及其变化,同时利用气相色谱-质谱联用技术测定海产品腌制过程中N-亚硝胺的含量,通过分析海产品腌制过程中细菌群落和N-亚硝胺含量的变化规律,分析探讨其相互关系及影响,可为腌制海产品的食用安全性、品质控制等提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

海水鱼:浙江舟山市农贸市场;Ezup柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒、DreamTaq-TM DNA

聚合酶、dNTP、SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒、SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒：上海生工生物工程技术有限公司；pMD<sup>®</sup>18-T Vector连接试剂盒：宝生物工程(大连)有限公司(大连Takara公司)；引物：上海生工生物工程技术有限公司；N-二甲基亚硝胺(纯度98.0%)、N-二丙基亚硝胺(纯度98.0%)：美国CIL公司；N-二乙基亚硝胺(纯度99.9%)、N-亚硝基吡咯烷(纯度99.9%)、N-亚硝基哌啶(纯度99.9%)、N-二丁基亚硝胺(纯度99.9%)：美国SUPELCO公司。

### 1.2 仪器与设备

My Cycler PCR仪、Gel Doc XR凝胶成像系统、电泳仪：美国Bio-Rod公司；Microfeller离心机：德国BECKMAN COULTER公司；Agilent GC7890A/MS5975C气相色谱-质谱联用仪(GC/MS)：美国Agilent公司，配备7683B自动进样器、增强型化学工作站；DS-1高速组织捣碎机：上海标本模型厂；SER JSE09L31高速冷冻离心机；固相萃取装置：美国VISIPRETMDL公司；KQ5200DE数控超声波清洗器：昆山市超声波仪器有限公司；数显型漩涡混合器：美国Talboys公司。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 海水鱼的腌制** 采用传统干腌法腌制海水鱼。将市场购买的海水鱼(带鱼和黄花鱼)洗净并去除内脏，称重并放入坛中，以一层鱼一层盐的顺序进行放置，盐鱼比分别为1:4和1:8，放于阴凉处腌制20 d。

#### 1.3.2 16S rDNA克隆文库建立

**1.3.2.1 样品总DNA提取** 采用Ezup柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒，按试剂盒给定步骤，取0、5、10、15、20 d的腌制海水鱼制成的1:10样品液5 mL进行总DNA的提取。

**1.3.2.2 PCR扩增纯化回收** PCR扩增所用反应体系为：10×Buffer(含Mg<sup>2+</sup>)2.5 μL、dNTP(各2.5 mmol/L)1 μL、DreamTaq-TM DNA聚合酶0.2 μL、上下游引物(10 μmol/L)各0.5 μL、模板DNA 0.5 μL，用无菌ddH<sub>2</sub>O补足25 μL体系。PCR反应的循环条件为：94 °C预变性4 min，30个循环(94 °C变性45 s，55 °C退火45 s，72 °C延伸1 min)，72 °C修复延伸10 min。采用1%琼脂糖电泳，150 V、100 mA 20 min电泳观察。PCR产物电泳条带切割所需DNA目的条带，采用纯化试剂盒对目的条带进行

纯化回收。扩增通用引物具体见表1。

表1 16S rDNA扩增通用引物

名称	序列(5' → 3')	引物长度/bp
7F	CAGAGTTTGATCCTGGCT	18
1540R	AGGAGGTGATCCAGCCGCA	19

**1.3.2.3 克隆测序** 按Takara pMD<sup>®</sup>18-T Vector连接试剂盒操作将纯化后的PCR产物与pMD<sup>®</sup>18-T载体连接，并转化感受态细胞E.coli JM109。将连接转化后的菌液涂布在预先用20 μL 100 mmol/L IPTG和100 μL 20 mg/mL X-gal涂布的氨苄青霉素平板上于37 °C培养过夜。按SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒操作提取质粒，用引物M13+和M13-进行扩增测序。5个时期共检测300个阳性克隆。

**1.3.2.4 分析鉴别** 测序结果采用DAMBE、DNA star、MEGA5.0等软件进行编辑分析，在GeneBank数据库中进行BLAST同源性比对，分析出克隆所属物种的系统位置和与之最近似的种类。

### 1.3.3 N-亚硝胺检测

**1.3.3.1 样品前处理** 称取腌制海水鱼样品10 g粉碎匀浆置于50 mL具塞离心管中，加入10 mL乙腈，涡旋1 min，在-20 °C冰箱中冷冻30 min，加入2个陶瓷均质子和萃取盐(4 g MgSO<sub>4</sub>和1 g NaCl)迅速振荡30 s，随后再以8000 r/min在0 °C低温离心10 min，取上清液6 mL加入到15 mL Bond Elut QuEChERS基质分散净化管(QuEChERS基质分散净化成分：50 mgPSA，150 mgC18粉末，900 mg Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)中，涡旋1 min，再以8000 r/min在0 °C低温离心10 min，取上清液经0.2 μm滤膜过滤后置于进样小瓶中上机备用。

**1.3.3.2 GC-MS分析条件** 色谱条件：色谱柱为DB-WAX，30 m×0.25 mm×0.25 μm；载气为He(纯度>99.999%)；隔垫吹扫流量为3 mL/min；进样模式为不分流进样；进样量1.0 μL；起始温度40 °C，保持3 min，以10 °C/min升温至110 °C，再以15 °C/min升温至200 °C，再以40 °C/min升温至240 °C，进样口温度为250 °C。质谱条件：离子源温度230 °C，四极杆温度150 °C，接口温度240 °C，电离方式为电子轰击(EI)离子源，电子能量70 eV，电子倍增器电压1671 V，SIM采集模式，扫描质量范围为(40~350)m/z，阈值150，采样频率



2, 溶剂延迟4 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同盐鱼比样品16S rDNA克隆文库构建

#### 2.1.1 1:4盐鱼比腌制过程细菌16S rDNA克隆文库构建 1:4盐鱼比的海水鱼腌制的5个不同时期150

个阳性克隆子的测序结果在GenBank数据库中进行BLAST同源性比对, 150个克隆子与GenBank数据库中已知细菌的16S rDNA序列相似性范围在95%~100%。1:4盐鱼比腌制海水鱼不同时期细菌群落测定结果见表2。

从表2中可知, 1:4盐鱼比海水鱼腌制过程中

表2 16S rDNA克隆文库法分析1:4盐鱼比腌制海水鱼样品的细菌群落组成结果

菌属名	最相似菌	不同腌制时期的克隆子数量占比/%				
		0 d	5 d	10 d	15 d	20 d
芽孢梭菌属( <i>Clostridium</i> )	腐化芽孢梭菌( <i>Clostridium putrefaciens</i> )	40.0	23.3	10.0	20.0	20.0
	<i>Clostridium tagluense</i> strain A121	13.3	0	6.7	0	0
嗜冷杆菌属( <i>Psychrobacter</i> )	养料嗜冷杆菌( <i>Psychrobacter cibarius</i> )	3.3	26.7	30.0	40.0	26.7
	近海生嗜冷杆菌( <i>Psychrobacter maritimus</i> )	0	20.0	0	16.7	3.3
	水栖嗜冷杆菌( <i>Psychrobacter glacincola</i> )	0	10.0	0	0	0
	粪嗜冷杆菌( <i>Psychrobacter faecalis</i> )	3.3	3.3	0	0	6.7
	<i>Psychrobacter</i> sp.298B4_12ER2A	0	0	0	0	3.3
	<i>Psychrobacter</i> <i>fozii</i> strain Spedv2	0	0	6.7	6.7	0
	<i>Psychrobacter</i> sp.P2-18(2011)	0	10.0	0	13.3	33.3
	<i>Psychrobacter</i> sp.SON-1410	0	3.3	0	0	0
	<i>Psychrobacter</i> <i>fozii</i> strain 0226	0	3.3	0	0	0
	<i>Psychrobacter</i> sp.88B3_12ER2A	0	0	0	0	3.3
假单胞菌属( <i>Pseudomonas</i> )	荧光假单胞菌( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )	0	0	26.7	0	0
	氮假单胞菌( <i>Pseudomonas azotoformans</i> )	0	0	16.7	0	0
	莓实假单胞菌( <i>Pseudomonas fragi</i> )	23.3	0	0	0	0
	嗜冷假单胞菌( <i>Pseudomonas psychrophila</i> )	6.7	0	3.3	0	0
藻青菌属( <i>Carnobacterium</i> )		0	0	0	3.3	3.3
沙雷氏菌属( <i>Serratia</i> )	液化沙雷氏菌( <i>Serratia liquefacies</i> )	6.7	0	0	0	0
金黄杆菌属( <i>Chryseobacterium</i> )	金黄杆菌( <i>Chryseobacterium</i> )	3.3	0	0	0	0

共检测出6个菌属19个菌种, 腌制开始(0 d)主要菌属有芽孢梭菌属、假单胞菌属、沙雷氏菌属、金黄杆菌属、嗜冷杆菌属, 其中芽孢梭菌属占53.3%, 假单胞菌属占30.0%, 主要优势菌属为芽孢梭菌属, 优势菌种为腐化芽孢梭菌, 占比40.0%; 腌制5 d主要菌属有嗜冷杆菌属、芽孢梭菌属, 分别占比76.6%和23.3%, 这个时期优势菌属由芽孢梭菌属变为嗜冷杆菌属, 优势菌种为养料嗜冷杆菌; 腌制10 d主要菌属有假单胞菌属、嗜冷杆菌属、芽孢梭菌属, 其中假单胞菌属占46.7%, 嗜冷杆菌属占36.7%, 芽孢梭菌属占16.7%, 优势菌属为假单胞菌属和嗜冷杆菌属, 芽孢梭菌属占比继续降低, 假单胞菌属比嗜冷杆菌属略占优势, 但优势菌种仍为嗜冷杆菌属的养料嗜冷杆菌占比30.0%; 腌制15 d主要菌属有嗜冷杆

菌属、芽孢梭菌属、藻青菌属, 前一时期的优势菌属假单胞菌属消失, 优势菌属为嗜冷杆菌属占76.7%, 芽孢梭菌属占20.0%, 优势菌种依旧为养料嗜冷杆菌; 腌制20 d主要菌属有嗜冷杆菌属、芽孢梭菌属、藻青菌属, 优势菌属为嗜冷杆菌属占76.7%, 芽孢梭菌属占20.0%, 优势菌种则发生了变化, 由养料嗜冷杆菌变为*Psychrobacter* sp.P2-18(2011)。

2.1.2 1:8盐鱼比腌制过程细菌16S rDNA克隆文库构建 1:8盐鱼比的海水鱼腌制的5个不同时期150个阳性克隆子的测序结果在GeneBank数据库中进行BLAST同源性比对, 150个克隆子与GenBank数据库中已知细菌的16S rDNA序列相似性范围在92%~100%。1:8盐鱼比腌制海水鱼不同时期细菌群落测定结果见表3。

表3 16S rDNA克隆文库法分析1:8盐鱼比腌制海水鱼样品的细菌群落组成结果

菌属名	最相似菌	不同腌制时期的克隆子数量占比/%				
		0 d	5 d	10 d	15 d	20 d
芽孢梭菌属( <i>Clostridium</i> )	腐化芽孢梭菌( <i>Clostridium putrefaciens</i> )	13.3	0	0	0	0
	溶组织梭菌( <i>Clostridium histolyticum</i> )	3.3	0	0	0	0
	解脲梭菌( <i>Clostridium proteolyticum</i> )	66.7	0	0	0	0
嗜冷杆菌属( <i>Psychrobacter</i> )	养料嗜冷杆菌( <i>Psychrobacter cibarius</i> )	0	23.3	30.0	43.3	30.0
	近海生嗜冷杆菌( <i>Psychrobacter maritimus</i> )	6.7	10.0	3.3	10.0	16.7
	水栖嗜冷杆菌( <i>Psychrobacter glacincola</i> )	0	6.7	3.3	3.3	6.7
	粪嗜冷杆菌( <i>Psychrobacter faecalis</i> )	0	3.3	10.0	6.7	6.7
	肺嗜冷杆菌( <i>Psychrobacter pulmonis</i> )	0	3.3	10.0	0	6.7
	快生嗜冷杆菌( <i>Psychrobacter celer</i> )	0	0	6.7	6.7	0
	海水嗜冷杆菌( <i>Psychrobacter aquimaris</i> )	0	0	0	3.3	0
	<i>Psychrobacter fulvigenes</i> strain KC 40	0	0	0	3.3	0
	<i>Psychrobacter</i> sp.M3-2	0	3.3	6.7	0	0
	<i>Psychrobacter</i> sp.strain ANT_P10B	0	0	3.3	0	0
	<i>Psychrobacter fozii</i> strain Spedv2	0	6.7	3.3	3.3	0
	<i>Psychrobacter</i> sp.P2-18(2011)	0	0	3.3	6.7	0
	<i>Psychrobacter</i> sp.M4-12	0	0	10.0	0	0
	<i>Psychrobacter</i> sp.R3.4	0	0	3.3	0	0
	<i>Psychrobacter fozii</i> strain 0226	0	3.3	0	0	10.0
<i>Psychrobacter</i> sp.88B3_12ER2A	0	10.0	0	3.3	0	
假单胞菌属( <i>Pseudomonas</i> )	荧光假单胞菌( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )	3.3	3.3	6.7	0	0
	恶臭假单胞菌( <i>Pseudomonas putida</i> )	0	3.3	0	0	0
	猴假单胞菌( <i>Pseudomonas simiae</i> )	0	3.3	0	0	0
	莓实假单胞菌( <i>Pseudomonas fragi</i> )	0	6.7	0	0	0
	<i>Pseudomonas</i> sp.44B3_12ESS	0	0	0	3.3	0
藻青菌属( <i>Carnobacterium</i> )		0	0	0	0	3.3
芽孢八叠球菌属( <i>Sporosarcina</i> )	海水芽孢八叠球菌( <i>Sporosarcina aquimarina</i> )	0	13.3	0	0	0
紫色杆菌属( <i>Janthinobacterium</i> )	蓝黑紫色杆菌( <i>Janthinobacterium lividum</i> )	6.7	0	0	0	0
葡萄球菌属( <i>Staphylococcus</i> )	腐生葡萄球菌( <i>Staphylococcus saprophyticus</i> )	0	0	0	6.7	0
	马胃葡萄球菌( <i>Staphylococcus equorum</i> )	0	0	0	0	20.0

从表3可知, 1:8盐鱼比海水鱼腌制过程中共检测出7个菌属29个菌种, 腌制开始(0 d)主要菌属有芽孢梭菌属、嗜冷杆菌属、假单胞菌属、紫色杆菌属, 优势菌属为芽孢梭菌属占83.3%, 其他菌属占16.7%, 优势菌种为解脲梭菌; 腌制5 d主要菌属有嗜冷杆菌属、假单胞菌属, 芽孢八叠球菌属, 优势菌属变为嗜冷杆菌属占69.9%, 芽孢梭菌属消失, 假单胞菌属和芽孢八叠球菌属分别占16.6%和13.3%, 优势菌种为养料嗜冷杆菌; 腌制10 d主要菌属有嗜冷杆菌属、假单胞菌属, 优势菌属为嗜冷杆菌属占93%, 假单胞菌属占7%, 优势菌种依旧为养料嗜冷杆菌; 腌制15 d主要菌

属有嗜冷杆菌属、假单胞菌属、葡萄球菌属, 优势菌属依然为嗜冷杆菌属占89.9%, 其他菌属占10.0%, 养料嗜冷杆菌在所有菌种中占绝对优势; 腌制20 d主要菌属有嗜冷杆菌属、葡萄球菌属、藻青菌属, 假单胞菌属消失, 优势菌属仍为嗜冷杆菌属占76.8%, 葡萄球菌属占20.0%, 优势菌种仍然为养料嗜冷杆菌。

## 2.2 不同盐鱼比样品腌制过程N-亚硝胺测定结果

通过GC-MS分析方法, 在1:4盐鱼比和1:8盐鱼比的海水鱼腌制的5个不同时期分别检测其N-亚硝胺[6种化合物: N-二甲基亚硝胺(NDMA)、N-二乙基亚硝胺(NDEA)、N-二丙基亚硝胺(NDPA)、



N-亚硝基吡咯烷(NPYR)、N-亚硝基哌啶(NPIP)、N-二丁基亚硝胺(NDBA)]的含量,各个时期分别检测6个平行样品取平均值。测定结果见表4和表5。

由表4和表5中可知,1:4和1:8盐鱼比海水鱼腌制过程中N-亚硝胺含量变化均表现为先上升后

下降,前3个时期(0、5、10 d)呈逐渐上升趋势,15 d达到峰值,20 d含量下降。1:4盐鱼比腌制体系不同时期测得的N-亚硝胺含量都高于1:8盐鱼比腌制体系测得的N-亚硝胺含量,且前者测得的N-亚硝胺化合物有2种(NDEA、NDBA),后者测得的N-亚硝胺化合物只有一种(NDPA)。

表4 1:4盐鱼比的海水鱼腌制不同时期N-亚硝胺含量测定结果

N-亚硝胺名称	腌制不同时期的含量测定结果/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				
	0 d	5 d	10 d	15 d	20 d
NDMA	ND	ND	ND	ND	ND
NDEA	ND	$3.52 \pm 0.10$	$3.00 \pm 0.30$	$3.96 \pm 0.48$	$3.52 \pm 0.35$
NDPA	ND	ND	ND	ND	ND
NDBA	ND	$5.30 \pm 0.38$	$6.80 \pm 0.76$	$25.8 \pm 1.26$	$7.25 \pm 0.90$
NPIP	ND	ND	ND	ND	ND
NPYR	ND	ND	ND	ND	ND
6种化合物总量	ND	$8.82 \pm 0.40$	$9.8 \pm 0.95$	$29.76 \pm 1.41$	$10.77 \pm 0.85$

注:表中ND表示检测的浓度低于检测限,除N-二丙基亚硝胺(NDPA)检测限为 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 之外,其他5种N-亚硝胺化合物检测限为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。表5同。

表5 1:8盐鱼比的海水鱼腌制不同时期N-亚硝胺含量测定结果

N-亚硝胺名称	腌制不同时期的含量测定结果/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				
	0 d	5 d	10 d	15 d	20 d
NDMA	ND	ND	ND	ND	ND
NDEA	ND	ND	ND	ND	ND
NDPA	ND	$2.57 \pm 0.41$	$5.69 \pm 0.49$	$10.83 \pm 1.48$	$6.51 \pm 0.62$
NDBA	ND	ND	ND	ND	ND
NPIP	ND	ND	ND	ND	ND
NPYR	ND	ND	ND	ND	ND
6种化合物总量	ND	$2.57 \pm 0.41$	$5.69 \pm 0.49$	$10.83 \pm 1.48$	$6.51 \pm 0.62$

### 3 讨论

由16S rDNA克隆文库分析结果可知,1:8盐鱼比腌制体系菌群构成比1:4盐鱼比腌制体系菌群构成更复杂,细菌种类更丰富。1:4盐鱼比和1:8盐鱼比海水鱼腌制前(腌制0 d)的主要优势菌属均为芽孢梭菌属,该菌属在自然界分布广泛,多为厌氧或微需氧菌,含量过高能导致食物腐败<sup>[17]</sup>;腌制后(腌制5、10、15、20 d)1:4盐鱼比腌制体系和1:8盐鱼比腌制体系主要优势菌属均为嗜冷杆菌属,只有腌制10 d时1:4盐鱼比腌制体系的优势菌属除了嗜冷杆菌属外增加了假单胞菌属,说明不同的盐度对于嗜冷杆菌属在海水鱼腌制过

程的不同时期的优势地位没有影响;优势菌种为*Psychrobacter sp.*P2-18(2011)和养料嗜冷杆菌,且2种盐鱼比腌制体系下养料嗜冷杆菌的占比变化相同,均为先上升,腌制15 d占比达到最高值,20 d占比下降。嗜冷杆菌属因在低温下生长良好而得名,通常为革兰氏阴性需氧球杆菌,无动力、无鞭毛、无芽孢,氧化酶阳性、触酶阳性,形态学上与莫拉菌属细菌、表型特征上很难与奈瑟菌属细菌区分,包括沙质嗜冷杆菌、肺炎嗜冷杆菌、粪嗜冷杆菌、不动嗜冷杆等<sup>[18]</sup>。欧昌荣等<sup>[19]</sup>从冰鲜鲭鱼中分离筛选到1株高活力组胺降解菌为嗜冷杆菌属;杨红玲<sup>[20]</sup>等研究发现嗜冷杆菌(*Psychrobacter sp.*)SE6对副溶血弧菌、哈维氏弧菌、梅氏弧菌和金黄色葡萄球菌等常见水产致病菌有一定的抑制作用。国内外还未有关于养料嗜冷杆菌和*Psychrobacter sp.*P2-18(2011)的研究报道。

由GC-MS方法检测1:4和1:8盐鱼比不同腌制时期N-亚硝胺含量结果可知,N-亚硝胺含量在这2种腌制体系下的变化趋势一致,均为先上升后下降。N-亚硝胺含量在1:4盐鱼比腌制体系下测得的值高于1:8盐鱼比腌制体系测得的值,与王秀元<sup>[2]</sup>盐浓度增加N-亚硝胺含量偏低的研究成果有所区别,主要原因可能是N-亚硝胺产生原因较为复杂,腌制温度、时间以及原料不同都会导致

腌制体系中细菌群落结构不同,对N-亚硝胺生成量的影响也就不同。可以从菌群结构发现1:8盐鱼比腌制体系中嗜冷杆菌属的占比要高于1:4盐鱼比腌制体系中嗜冷杆菌属的占比,侧面说明嗜冷杆菌属可能与N-亚硝胺生成量有关联。腌制初期可能由于嗜冷杆菌属占比低,对N-亚硝胺生成量影响较小,腌制15 d时,两者都达到了峰值,嗜冷杆菌属对N-亚硝胺含量影响也达到最大,因此在之后N-亚硝胺含量降低,而该菌属占比也有所降低,两者之间很有可能互相影响,至于嗜冷杆菌属是抑制N-亚硝胺生产还是能够利用N-亚硝胺从而降低其含量,以及两者互相影响的形成机制等问题都需进一步深入研究。通过其他相关研究,进一步揭示菌群结构和N-亚硝胺含量的相互影响,对海水鱼腌制过程中N-亚硝胺的控制、腌制海水鱼的质量保持及食用安全具有重要意义。

**参考文献:**

- [1] 张婷. 腌渍鱼类物理、生化特性分析及品质评价模型建立[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013
- [2] 王秀元. 腌渍水产品中挥发性亚硝胺含量检测与控制技术研究[D]. 舟山: 浙江海洋学院, 2013
- [3] 章银良, 夏文水. 腌鱼产品加工技术与理论研究进展[J]. 中国农学通报, 2007, 23(3): 116-120
- [4] 陈维娟. 咸鱼深加工工艺探讨[J]. 中国水产, 2002, (4): 74-75
- [5] 樊丽琴, 杨贤庆, 陈胜军, 等. 腌渍水产品中N-亚硝胺化合物的研究进展[J]. 食品工业科技, 2009, (4): 360-363
- [6] 马俪珍, 南庆贤, 方长法. N-亚硝胺类化合物与食品安全性[J]. 农产品加工学刊, 2005, (12): 8-14
- [7] 王秀元, 蒋玲波, 王萍亚, 等. 腌渍水产品中N-亚硝胺物质的危害分析及预防控制[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(3): 1271-1272
- [8] GB 2762—2017, 食品安全国家标准食品中污染物限量[S]
- [9] 王秀元, 赵华, 蒋玲波, 等. GC-MS法测定腌渍水产品中3种N-亚硝胺含量[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2012, 31(6): 521-526
- [10] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification, and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59: 143-169
- [11] 肖作为, 张红刚, 杨岩涛, 等. 基于16S rRNA基因的7种乳酸杆菌的分子系统发生[J]. 广东农业科学, 2010, (4): 198-200
- [12] Amann R, Ludwig W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24(5): 555-565
- [13] 周贤轩, 杨波, 陈新华. 几种分子生物学方法在菌种鉴定中的应用[J]. 生物技术, 2004, (6): 35-38
- [14] 燕平梅, 马雁飞, 倪玲. 发酵食品微生物多样性研究进展[J]. 中国酿造, 2011, (2): 12-14
- [15] 万力婷, 吴祖芳, 张天龙, 等. 苋菜梗腌渍过程细菌群落变化及风味的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(2): 160-170
- [16] 翁佩芳, 陈希, 沈锡权, 等. 榨菜低盐腌渍细菌群落多样性的分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(02): 338-345
- [17] 董银苹, 徐进, 王伟, 等. 浓缩乳清蛋白粉及其制品中梭状芽孢杆菌的分离及鉴定[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(05): 494-498
- [18] 曹俊敏, 杨雪静, 周宏伟, 等. 一株嗜冷杆菌属细菌的分离鉴定[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(12): 1183-1184
- [19] 欧昌荣, 管娟, 汤海青, 等. 鲭鱼中组胺降解菌的筛选鉴定和发酵条件初探[J]. 中国食品学报, 2014, 14(8): 158-164
- [20] 杨红玲, 马如龙, 孙云章. 石斑鱼肠道原籍嗜冷杆菌(Psychrobacter sp.) SE6作为益生菌的体内外评价[J]. 海洋学报(中文版), 2012, 34(02): 129-135

 微信搜索shipinkj或扫描二维码

 新浪微博@食品科技 或扫描二维码
