第9卷 第2期
1963年5月
微生物学报
ACTA MICROBIOLOGICA SINICA
Vol. 9, No. 2
May, 1963

鲤魚和黃魚体內的細菌种类的初步鉴定*

許如琛 周鴻彬 郁文煥 韓 仪
(南京大学生物系,南京)

一、前 言

直到目前为止,国内外关于魚体微生物方面的研究报导还是比較少的。Ulrich[10] 指出,在活魚体內和体表面存在着大量的細菌,这些細菌是大腸杆菌及变形杆菌属的細菌。Browne[2]发現,在嘉节魚的腸道存在着 *Bacterium coli* 及 *B. Welchii*。Hunter[5] 根据对鮭魚体各部分細菌鉴定的結果,认为使魚体腐烂的重要細菌有3种类型:(1)无色素、液化明胶的: *Bacterium formosum* 存在于腎脏、腹肌、鰓, *Bacterium cloacae* 存在于腹肌、背肌、鰓、口腔、胃、盲管;(2)无色素、不液化明胶的: *Bacterium alcaligenes* 存在于腹肌, *Bacterium coli*、*B. communior*、*B. aerogenes* 等存在于背肌, *B. aerogenes* 存在于鰓;(3)有色素的: *Bacterium breve* 存在于唾液与腹部, *Bacterium caudatum* 和 *B. aurantiacum* 存在于胃, *Erythrobacillus carnicolor* 存在于盲管。Harrison[4] 从活魚和死魚体分离出多种細菌,如: *Micrococcus varians, M. flavus, M. aurantiacus, M. citreus, M. candidus, Sarcina lutea, Flavobacterium fucatum, F. turcosum, F. dormitor, F. diffusum, F. maris, F. balustinum, F. marinum, Staphylococcus citreus, Rhodococcus agilis, Achromobacter pellucidum, Aerobacter cloacae* 等,还特别从魚的肌肉中分离出 *Achromobacter* 属的几个种: *A. formosum*、*A. liquidum*、*A. geniculatum*,并认为鮮魚的腐敗变化与 *Achromobacter* 属的这几种細菌有关。 Sanborn[7] 从新鮮魚肉培养基試驗中发現具有分解蛋白質能力的一些細菌如: *Micrococcus conglomeratus*、*M. subcitreus*、*M. citreus*、*Flavobacterium aurescens*、*F. sulfureum*、*F. annulatum*、*F. pruneaeum*、*Pseudomonas fluorescens*, 又从腐敗的魚体上分离出下列几种細菌: *Eberthella talavensis*、*Salmonella morgani*、*Escherichia formica*, 此外还从敗坏的比目魚体上分离出: *Proteus vulgaris*、*Chaetostylum Fresenii*、*Eberthella fienstockii*、*Micrococcus subcitreus*、*M. candidus*。新近, Meyers 等[6]的报导中指出, *Flavobacterium piscicida* 对于食蚊魚有毒。

魚类在貯藏运輸过程中,常常发生腐烂現象,造成水产上的巨大損失。关于活魚、死魚体的微生物种类,以及这些微生物与魚腐烂的关系,在我国的情况尚不甚明了。本研究的目的即以我国长江下游及沿海具有代表性的淡水魚和咸水魚为材料,研究魚体微生物的种类,为魚类的防腐工作提供資料。

---

* 本工作承郑集教授、俞大紱教授指导,工作过程中得到中国科学院微生物研究所姜书勤同志、上海水产学院郭大鈞同学、南京大学楊方中、陈玲、金丽华、杜圣隆、林晓仁等同学协助,深表謝意。
本文于1962年9月20日收到。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

二、試驗材料与方法

(一) 材料 本試驗所用材料有活鯉魚、鮮黃魚及死黃魚等几种类型。活鯉魚系在南京收集的；新鮮黃魚系由上海市水产供銷公司試驗船供应的刚捕获不久的魚，在上海就地进行分离和鉴定；死黃魚系由南京市水产公司供应(由上海运来，已捕获十余天)。先后共解剖活鯉魚 3 条、新鮮黃魚 4 条、死黃魚 6 条。从活鯉魚分离到 82 个菌样。經过菌落外部形态的比較鉴定以后，取其中表現类型不同的 31 个样品，进行詳細的生理生化試驗。从黃魚体共分离出 332 个菌样，从其中选 98 个样品为代表，进行生理、生化試驗。

(二) 分离菌样的方法 对供試的鯉魚或黃魚，以自来水冲洗外部，継用 75% 乙醇进行魚体表面消毒，再以灭菌水冲洗 2—3 次；經过表面消毒后，用灭菌刀剖开腹部，从肌肉、鰓、胃、腸、脑等各部位取出組織块，分别放入 9 毫升灭菌水中，稍加以振蕩后，靜置 15 分鈡，然后将菌液进行稀释分离。取 1 毫升菌液放入 9 毫升灭菌水中，輕輕搖蕩均匀后，以同法稀释两次，这样配成 10%、1% 及 0.1% 三种浓度的菌液。从第一、二、三管菌液中各吸取 0.5 毫升，分别放入灭菌的培养皿内，再傾入融化并冷却至 45℃ 的营养培养基 (其中含有 0.5% NaCl) 上，旋轉培养皿使均匀，有的是从第三管菌液中吸取 0.1—0.2 毫升，注于灭菌的平板营养培养基的表面上，然后用灭菌的三角形玻璃刮子使菌液均匀地分布于培养基表面。培养基的酸度皆为 pH 7.2，培养过程的溫度为 20℃。但对由死黃魚的消化道和鰓分离出来的細菌，則采用几种不同的培养条件：培养基的 pH 有 6.0、6.6、7.2、7.6 四种，培养过程的溫度有 4℃、12℃ 及 20℃ 三种。

在开始培养后的第一、二、三、四日进行观察，到第四日将平板培养基表面的单个菌落轉移到营养培养基斜面上，然后将已分純的細菌进行鉴定。

(三) 鉴定方法 鉴定試驗包括形态鉴定和生理生化特性鉴定两个部分。

1. 形态鉴定：

观察細菌的形态是用在营养培养基上、20℃ (或室溫) 培养 24—48 小时的菌。观察細菌的运动性是用培养 24 小时以內的菌。格兰氏染色，芽孢和莢膜染色方面系根据《細菌純培养研究法手册》[9]，芽孢以 Ziebl 氏石炭酸复紅染色法染色，莢膜以結晶紫染色。

測定活动力的方法是将培养不超过 24 小时的細菌制成悬浮液，随即取 1 滴放在盖玻片的中央，然后将此盖玻片倒置于凹玻片的凹处上。在低倍鏡和高倍鏡下观察細菌有无运动力。

2. 生理生化鉴定：

生理、生化鉴定方法参照《細菌純培养研究法手册》、《微生物研究法手册》[3]、《鉴定細菌学》[8]及《貝捷氏細菌鉴定手册》[1]等进行下面数种試驗。

氧气反应試驗：将細菌在含有0.5%葡萄糖的深层营养琼脂上培养，观察其对氧气的需要情况。

硝酸盐还原試驗：将細菌接种入硝酸盐培养液中，在 20℃ 下培养，分別在第 2、4、7 天加入亚硝酸盐測定試剂，如液体呈浅紅色或紅色，則証明为阳性反应。

吲哚試驗：以蛋白胨培养液，在 20℃ 下培养 1、2、4 天，用 Kovács 氏試剂測定吲哚的产生。

明胶液化試驗：用穿刺法将細菌接种入明胶培养基中，在 20℃ 下培养 1、4、7 天，观察明胶的液化以定其溶解型。

糖醱酵試驗：将細菌接种入含糖及指示剂溴甲酚紫培养液中，在 20℃ 下培养 7 天，观察其生长、产酸、产气的情况。

淀粉的水解：将細菌接种于淀粉培养液中，在 20℃ 下培养 4、7 天，以碘液測定淀粉的水解情况。如果呈蓝色，表示沒有水解；如呈紅褐色，表示部分水解；如无色，表示全部水解。

甲基紅和甲基乙酰甲醇 (Voges-Proskauer) 試驗：将細菌接种于甲基紅試驗培养液中(蛋白胨 10 克，NaCl 5 克，葡萄糖 20 克，水 1000 毫升)，在 20℃下培养 4—7 天，以甲基紅測定：如呈紅色，系阳性反应；

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

黃色系阴性反应。另以同一培养液培养 4—7 天，用 5% α-萘酚的无水酒精溶液和 40% KOH 測定。

石蕊牛乳試驗：将細菌接种于石蕊牛乳培养基中，在 20℃ 下培养 2、4、7、14 天，分别观察其酸、碱、牛乳凝固或胨化，石蕊还原等情况。

檸檬酸盐的利用：将細菌接种于檸檬酸盐培养液中，培养 7 天后，观察其生长情况及培养基的反应。

部分材料（从新鮮黃魚分离出的 *Flavobacterium okeanokoites*，从新鮮和腐烂黃魚分离出的 *Bacillus cereus*）的生理生化反应，由于当时在上海就地进行，故采用微量快速法鉴定。

三、試驗結果

根据魚类各个部位的分离和观察的結果，不論鯉魚或黃魚，新鮮的或死的，各个部位都出現不同形态类型的菌落。对分离的細菌，經过形态和生理、生化試驗初步鉴定結果，共发現有12个种和 1 个变种。

（一）从活鯉魚体分离出来的細菌有下列几种：

1. *Serratia plymuthica* (Lehmann and Neumann) Bergey et al.

从鰓部分离出的。

杆状，0.76×2.1 μ，端圓，单生或成短鏈，运动，格兰氏阴性。

明胶直刺：液化。

营养培养基上的菌落：圓形，凸起，边緣整齐，白色，較老的培养呈淡紅色。

营养培养基斜面：生长較多，边緣不規則，白色，老时带淡紅色。

石蕊牛乳：酸化，凝結，还原。

形成硫化氫。

自葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露醇、甘油产酸和产气。水解淀粉。

产生甲基乙酰甲醇。

需气的，兼性厌气的。

2. *Aerobacter aerogenes* (Kruse) Beijerinck

腸分离出。

短杆，单生，运动，格兰氏阴性。

明胶直刺：不液化。

营养培养基上的菌落：白色，凸起，边緣整齐，呈湿潤状。

营养培养基斜面：生长多，向外扩展，白色。

牛乳培养基：酸化，凝結。

不产生吲哚。

形成硫化氫。

自葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露醇、甘油产酸。

产生甲基乙酰甲醇。

利用檸檬酸盐作为碳源。

还原硝酸盐成为亚硝酸盐。

兼性厌气的。

3. *Achromobacter xerosis* Groupé et al.

鰓部分离出。

杆状，运动，格兰氏阴性。

明胶直刺：液化。

葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露醇：不产酸。

牛乳培养基：变碱，胨化。

不产生吲哚。

形成硫化氫。

利用檸檬酸盐作为碳源。

还原硝酸盐成为亚硝酸盐。

需气的。

（二）从新鮮黃魚体分离出来的有下列菌种：

1. *Flavobacterium okeanokoites* ZoBell and Upham

从魚肉分离出的。

杆状，0.5×1.4—1.8μ。运动，格兰氏阴性。

明胶直刺：液化。

营养培养基平板上的菌落：直径 0.5—1.0 毫米，圓形，边緣完整。

营养培养基斜面：浅黃色，扩展。

营养培养液：生长良好，菌体混浊，有沉淀。

石蕊牛乳：胨化。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

馬鈴薯块：淡黄色。
不产生吲哚。
不形成硫化氫。
对葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇、水楊苷等不起醱酵作用。
不水解淀粉。
还原硝酸盐为亚硝酸盐。
不氨化尿素。
需气的。

2. *Bacillus cereus* Frankland and Frankland

自腸胃部分分离出的。
杆状，0.5—0.8×1.1—2.2μ。运动，格兰氏阳性。产生芽孢細胞，不胀大。
明胶直刺：液化。
营养培养基平板上的菌落：大，圓形而边緣有纤毛状生长物，白色，表面粗糙。
营养培养基斜面：生长多，扩展，边緣不規則，微带肉色。
营养培养液：生长較多，表面有环形菌膜，混浊，有沉降物。
石蕊牛乳：胨化。
馬鈴薯块：乳黄色生长。
自葡萄糖、蔗糖、麦芽糖产酸，自乳糖、甘露醇不产酸，也不产气。
水解淀粉。
不形成硫化氫。
产生甲基乙酰甲醇。
利用檸檬酸盐作为碳源。
还原硝酸盐成为亚硝酸盐。
需气的，兼厌气菌。

（三）从腐烂黄魚体分离出来的有下列各种：

1. *Achromobacter delicatulus* (Jordan) Bergey et al.

从鰓、腸分离出。
杆状，0.4×2.2μ，单生，运动，格兰氏阴性。
明胶直刺：液化。
营养培养基斜面：白色。
营养培养液：混浊。
石蕊牛乳：产酸，胨化。
不产生吲哚。
形成硫化氫。
还原硝酸盐。
需气菌，兼厌气的。

2. *Pseudomonas perolens* (Turner) Szybalski

从腸分离出。
杆状，0.4×2.9μ。运动，格兰氏阴性。
明胶直刺：液化。
营养培养基斜面：蚌肉色，扩展。
营养培养液：混浊。
石蕊牛乳：变酸，凝固。
还原硝酸盐。
不形成吲哚。
形成硫化氫。
自葡萄糖、甘油产酸；自蔗糖、乳糖不产酸，不产气。
需气菌，兼厌气的。
在培养基中产生特殊刺鼻的臭味。

3. *Pseudomonas ambigua* (Wright) Chester

从腸部分离出。
小杆状，单生，有时成对；运动，格兰氏阴性。
明胶直刺：不液化。
营养培养基斜面：灰白色，微現螢光。
营养培养液：混浊。
石蕊牛乳：变酸，凝固，石蕊还原。
产生吲哚。
不形成硫化氫。
需气菌，兼厌气的。

4. *Chromobacterium violaceum* (Schroeter) Bergonzini

从肌肉分离出的。
长杆状，单生或成鏈，运动，格兰氏阴性。
明胶直刺：表面成盘状液化。
营养培养基平板：白色，平的，渐变成紫色。
营养培养基斜面：紫色，扩展。
营养培养液：混浊，具有紫色环。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

石蕊牛乳：漸还原，凝固，胨化，变成微碱。

不产生吲哚。

形成硫化氫。

自葡萄糖产酸，自乳糖不产酸。

还原硝酸盐。

需气菌，兼厌气的。

5. *Flavobacterium okeanokoites* ZoBell and Upham

从腸部分离出的。

杆状，有球状細胞存在。运动，格兰氏阴性。

明胶直刺：液化。

营养培养基斜面：呈黃色，中度生长。

营养培养液：生长良好。

石蕊牛乳：微量还原，胨化。

不产生吲哚。

产生硫化氫。

自葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露醇、甘油不产酸，不产气。

不水解淀粉。

还原硝酸盐为亚硝酸盐。

需气菌，兼厌气的。

6. *Micrococcus varians* Migula

自腸分离出。

球状，直径 0.7 μ 左右。成单，成对，或四个菌体在一起。不运动，格兰氏阳性。

明胶直刺：不液化，生长很少。

营养培养基斜面：呈黃色。

营养培养液：混浊。

石蕊牛乳：产酸。

不产生吲哚。

不产生硫化氫。

自葡萄糖、蔗糖、甘露醇产酸但不产气。

不水解淀粉。

硝酸盐还原为亚硝酸盐。

需气菌，兼厌气的。

7. *Micrococcus candidus* Cohn

自鰓部分离出。

球状，直径 0.7 μ，单生，不运动，格兰氏阳性。

明胶直刺：不液化。

营养培养基斜面：白色，平滑的。

营养培养液：混浊。

石蕊牛乳：变化不明显。

不产生吲哚。

不产生硫化氫。

自葡萄糖、蔗糖产酸，但不产气。

不水解淀粉。

不还原硝酸盐。

需气菌。

8. *Bacillus cereus* Frankland and Frankland

自肌肉分离出。

杆状，0.6×1.1—1.6 μ。运动，格兰氏染色阴性或阳性，有变异性。

产生芽孢，椭圓形。

明胶直刺：液化。

营养培养基平板：大，圓形，边緣粗糙，平隆起型，白色。

营养培养基斜面：生长較多，边緣粗糙，呈淡黃色。

营养培养液：生长較多，沉淀物成块状，有菌膜。

石蕊牛乳：胨化。

馬鈴薯块：淡黃色，生长扩展。

自葡萄糖产酸但不产气。自乳糖不产酸。

不水解淀粉。

不产生硫化氫。

产生甲基乙酰甲醇。

利用檸檬酸盐作为碳源时有变异性。

还原硝酸盐。

需气菌，兼厌气的。

9. *Bacillus cereus* var. *mycoides* (Flügge) Smith et al.

自腸分离出。除以下几个特征外，均与 *Bacillus cereus* 相同。

杆状，单生或成长鏈，有时候相互捲折形成繩状。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

营养培养基平板上的菌落:灰白色,由于有长的鏈生細胞,菌落扩展很大。

营养培养基斜面:生长稀薄,灰白色,分布广闊。老的菌較厚。

自葡萄糖、蔗糖产酸不产气,自乳糖不产酸也不产气。

不产生硫化氢。

10. *Serratia kiliensis* (Lehmann and Neumann) Bergey et al.

从鰓分离出。

杆状,运动,格兰氏阴性。

明胶直刺:液化。

营养培养基平板上的菌落:圓形,边緣光滑,白色,后变为肉紅色。

营养培养基斜面:白色,后成为肉紅色。

石蕊牛乳:变酸,凝固。

自蔗糖产酸。

不产生甲基乙酰甲醇。

产生硫化氢。

需气菌,兼厌气的。

魚体微生物,特别是从海魚体所分离出的細菌,与由其他来源的同种細菌比較,常常具有一定的变异性。根据 Sanborn[7] 的报导,与海魚腐烂有关的細菌,和由其他来源的同一細菌比較,在明胶液化、牛乳培养基的反应、糖类醱酵試驗、成为粘性生长的趋势等性状上都有差异。但是由于只有个别的性状或少数几个性状有差异,而絕大多数性状仍相符合,故仍可以正确地鉴定菌种。

四、摘 要

从鯉魚、黃魚的肌肉、鰓、胃、腸、脑等各部位取样分离,純化,并根据菌体的形态、菌落特征及生理生化特性的初步鉴定結果,发現有 12 个种及 1 个变种:其中来自活鯉魚体中的有 3 种,新鮮黃魚体中有 2 种,腐烂黃魚体中除从新鮮黃魚体分离的 2 种外,还有 7 种及 1 变种。

从鯉魚体中分离的 3 种細菌,格兰氏染色呈阴性反应,能对牛乳起作用(2 种凝固牛乳,1 种使牛乳腖化),皆能还原硝酸盐,并能利用柠檬酸盐。其中 2 种对糖类(葡萄糖、蔗糖、乳糖)、甘露醇及甘油起醱酵作用,2 种能液化明胶,1 种对吲哚試驗呈阳性反应。从新鮮黃魚体中分离的 2 种細菌,均能液化明胶、腖化牛乳,吲哚試驗呈阴性反应,能还原硝酸盐,并能利用柠檬酸盐。但对格兰氏染色 1 种呈阴性反应,1 种呈阳性,后者能醱酵葡萄糖及蔗糖。从腐烂黃魚体中分离的 9 种及 1 变种中,6 种对格兰氏染色呈阴性反应,3 种呈阳性,1 种有变异性,即呈阳性或呈阴性;7 种能液化明胶;9 种能使牛乳起变化(如凝固、腖化、酸化、碱化),1 种变化不明显;能使葡萄糖醱酵的、能还原硝酸盐的、能利用柠檬酸盐的各有 8 种,使蔗糖醱酵的有 5 种,使乳糖醱酵的有 1 种,使甘露醇、甘油醱酵的各 1 种;对吲哚試驗呈阳性反应的只有 1 种。

总之,从鯉魚及黃魚体分离出的細菌絕大多数能对蛋白質(如牛乳蛋白質及明胶)起作用,这說明魚肉的腐敗显然与这些細菌有关。

参 考 文 献

[1] Breed, R. S., Murray, E. G. D. and Smith, N. R. *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. Bailliere, Tindall and Cox, Ltd. London. 1957.

[2] Browne, W. W.: *Jour. Bact.*, 2: 417—422. 1917.

[3] Conn, H. J., Jennison, M. W. and Weeks, O. B.: *Manual of Microbiological methods*. Chap. 7.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

McGraw-Hill Book Co., Inc., New York. 1957.
[4] Harrison, F. C.: *Can. Jour. Res.*, **1**: 214—239. 1929.
[5] Hunter, A. C.: *Jour. Bact.*, **5**: 353—361. 1920.
[6] Meyers, S. P., Baslow, M. H., Bein S. J. and Marks, C. E.: *Jour. Bact.*, **78**: 225—230. 1959.
[7] Sanborn, J. R.: *Jour. Bact.*, **19**: 375—382. 1930.
[8] Schaub, I. G. and Foley, M. K.: *Diagnostic Bacteriology*. 1952.
[9] Society of American Bacteriologists.: *Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria*. 1955.
[10] Ulrich: *Ztsch. f. Hyg.*, **53**: 176. 1906. (此文献系根据谷川英一著，薛廷耀、李爱杰譯，水产細菌学，1956.)

PRELIMINARY STUDIES OF THE SPECIES OF THE BACTERIA OF CARP AND CROAK FISH

Hsu J. S., Cheo H. B., Yu W. H., Hang Y.
(*Department of Biology, Nanking University, Nanking*)

Decay of fishes by bacteria during transportation and storage causes great loss in fishery. The present investigation is a study of the bacterial flora of carp (*Cyprinus carpio* L.) and croak fish *Pseudosciaena crocea* (Richardson). Isolations of bacteria were made from the muscle, gill, stomach, intestine, and cerebrum of carp and croak fish. The morphological, physiological, and biochemical characteristics of these isolates were studied and identifications of species were made on the basis of these studies. From living carp were found *Serratia plymuthica, Aerobacter aerogenes, Achromobacter xerosis*; from freshly caught croak fish, *Flavobacterium okeanokoites, Bacillus cereus*; from dead croak fish, *Achromobacter delicatulus, Pseudomonas perolens, P. ambigua, Chromobacterium violaceum, Flavobacterium okeanokoites, Micrococcus varians, M. candidus, Bacillus cereus, Bac. cereus* var. *mycoides*, and *Serratia kiliensis*.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn