

## 台灣近海漁獲物之細菌相—I

### 白口和紅瓜鱈

張士軒

Bacterial Flora of Fish Catches from the Inshore of Taiwan — I

White Croaker and *Decapterus russellii* (Ruppell)

Shyh-Shiuan Chang

The changes and characteristics of bacterial flora in fresh white croaker and those after storage at 5°C or -30°C for 4 days were studied. The bacterial flora of frozen horse mackerel, *Decapterus russellii* (Ruppell) was also studied. Total bacterial count of frozen *D. russellii* fresh white croaker, cold-stored white croaker, and frozen-stored white croaker was  $9.0 \times 10^4/g$ ,  $2.5 \times 10^4/g$ ,  $>10^6/g$  and  $6.6 \times 10^5/g$  respectively. The bacterial flora of these samples, in descending order, were as follows: frozen *D. russellii* *Bacillus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, Coliforms, *Alcaligenes*, *Pseudomonas IV*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Proteus* and *Pseudomonas II*; fresh white croaker, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Brevibacterium*, Coliforms, *Micrococcus*, *Neisseria* and *Pediococcus*; cold-stored white croaker, *Pseudomonas II*, *Pseudomonas I*, *Pseudomonas IV*, *Neisseria*, *Corynebacterium* and *Acinetobacter*; and frozen-stored white croaker, *Neisseria*, *Micrococcus*, *Moraxella* and *Pseudomonas IV*. The bacteria with higher deteriorative ability in these samples were: frozen *D. russellii* *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Microbacterium*, Coliforms, and *Pseudomonas IV*; fresh white croaker, *Bacillus* and *Microbacterium*; cold-stored white croaker, *Pseudomonas IV*; and frozen-stored white croaker, *Micrococcus* and *Moraxella*. Either in frozen *D. russellii* or in fresh white croaker the contents of *Bacillus* and Coliforms were very high. All the strains isolated from frozen *D. russellii* did not have amylase-producing ability; on the contrary, most strains isolated from three white croaker samples did. The coincidence between 3% KOH test and Gram stain method in these samples were 84%, 90%, 90% and 85% respectively.

### 前 言

魚類的鮮度保持方法，一般係利用冷藏、冷凍或防腐劑，藉低溫或殺菌作用以降低酵素活性、水分活性、減緩微生物之腐敗作用，以達維持其鮮度及品質之目的<sup>1-5)</sup>。

魚類的組織較陸上動物脆弱，在死前其肌肉中殆為無菌狀態<sup>6)</sup>，但死後因其天然抗菌作用消失，加上酵素作用，使蛋白質等大分子分解成小分子物質而成為微生物之良好營養源，此時其皮膚、鰓、內臟、腸管中固有的或二次污染的微生物便會侵入肌肉中大量繁殖，致使魚類產生品質降低及腐敗的現象<sup>7-9)</sup>。故微生物之抑制在魚類保鮮上具有很重要的意義。

受重視的魚類微生物有衛生指標細菌如大腸菌群 (Coliforms)、沙門氏菌 (*Salmonella*)、腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 以及腐敗細菌如 Fluorescent pseudomonads、*Pseudomonas putrefaciens*<sup>10)</sup> 等。腐敗細菌在新鮮魚肉中為數甚少，但貯藏時間延長時則顯著增加，故以腐敗細菌佔總菌數的百分比做為魚肉的鮮度指標應較以

總菌數表示為合理<sup>10)</sup>。

本省與水產方面有關的魚類微生物相之分離鑑定研究很少<sup>11,12)</sup>，其他報告中概以總菌數之多寡或目的菌（如大腸菌、沙門氏菌）之數量作為品質鮮度之指標。但在保鮮上應瞭解魚類在新鮮狀態時之微生物相以及在卸魚至加工或冷藏、凍藏期間微生物相之變化，尤其是腐敗細菌之變化乃為亟需加強探討的。國外在這方面的研究相當多，如日本和加拿大，頗值吾人借鏡。Shewan等<sup>13)</sup>及Castell等<sup>14,15)</sup>認為*Pseudomonas*屬會促使魚肉腐敗，為魚類腐敗時之最優勢細菌。Velanker等<sup>16)</sup>研究印度洋的魚類，Wood<sup>17)</sup>研究澳洲的魚類，都發見魚類腐敗時不產生孢子的桿菌如*Pseudomonas*以及*Achromobacter*佔有很大的比例。陳等<sup>12)</sup>研究台灣近海及遠洋漁船魚艙之微生物相，發見狗母魚的融化冰水中之細菌相依序為序有*Moraxella*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*及*Corynebacterium*；烏賊的融化冰水中之細菌相依序為*Moraxella*, *Neisseria*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Sarcina*及*Corynebacterium*。其中*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*及*Bacillus*具有較強的蛋白質分解力，為主要的魚類腐敗細菌，佔總菌數的 $\frac{1}{3}$ 。此外南極蝦之細菌相依序有*Moraxella*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Sarcina*, *Acinetobacter*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus*及*Pseudomonas*，其中只有*Bacillus*具有較強的蛋白質分解能力，佔1.6%。吳等<sup>11)</sup>探討鱈魚肉片在新鮮、冷藏及凍藏期間細菌相之變化，發見新鮮的鱈魚肉片中，Gram陰性菌佔優勢，3℃冷藏時*Pseudomonas*逐漸增加，但-28℃凍藏時*Pseudomonas*則逐漸減少；*Acinetobacter*及*Flavobacterium*則有逐漸增多之趨勢。

本研究在於瞭解本省近海拖網漁船漁獲物中紅瓜鱈及白口的微生物相及其在冷藏和凍藏時之變化，並測定其腐敗能力以瞭解腐敗細菌之種類和變化，做為魚類保鮮之參考。

## 材料與方法

### 一、供試魚類樣品

紅瓜鱈 *Decapterus russellii* (Ruppell) 於70年1月28日時值淡季，新鮮原料未能取得，故使用凍藏於-20℃以下者為樣品。於冰水中解凍後，採取其背部及腹部肌肉，供鮮度分析及細菌相分離鑑定之用。

白口 (White croaker) 係於70年3月5日在新竹南寮魚市場採得之碎冰冰藏一天的原料，裝入塑膠袋加碎冰置於採樣箱中，立刻返回實驗室做化學分析、總菌數測定及冷藏(5℃)和凍藏(-30℃)。貯藏4天後，亦同樣採取肌肉部份供化學分析及細菌相之分離鑑定。

### 二、鮮度之測定

酸度 (pH)：採取細碎魚肉10g加蒸餾水90ml，均質後用 Jenco pH/TEMP Meter (Model 671) 測定之。

揮發性塩基態氮 (Volatile basic nitrogen, VBN)：依 E. J. Conway 的微量擴散法為之<sup>18)</sup>。

K值：依內山和小林<sup>19)</sup>的簡易判定法測定。

全氮 (Total NH<sub>3</sub>)：取細碎魚肉10g加蒸餾水90ml，均質後遠心分離(4,000 rpm, 10 min)之，取其上澄液，以 Orion Research Ionalyzer (Model 901) 測定。

### 三、總菌數與細菌相的單離及鑑定

取細碎魚肉5g加45ml滅菌生理食塩水，均質後作 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 倍之稀釋，各取1ml稀釋液塗抹於 Nutrient agar 平板及 Plate count agar 平板上，20℃培養24~48hr，計算菌落數，由稀釋倍數換算成平均的總菌數(好氣性平板數)。選擇菌落數30~300個的平板，隨意鈎取20~50個進行單離，即劃線於 Nutrient agar 平板上，在20℃培養二天，如此反覆二次(即經三次純

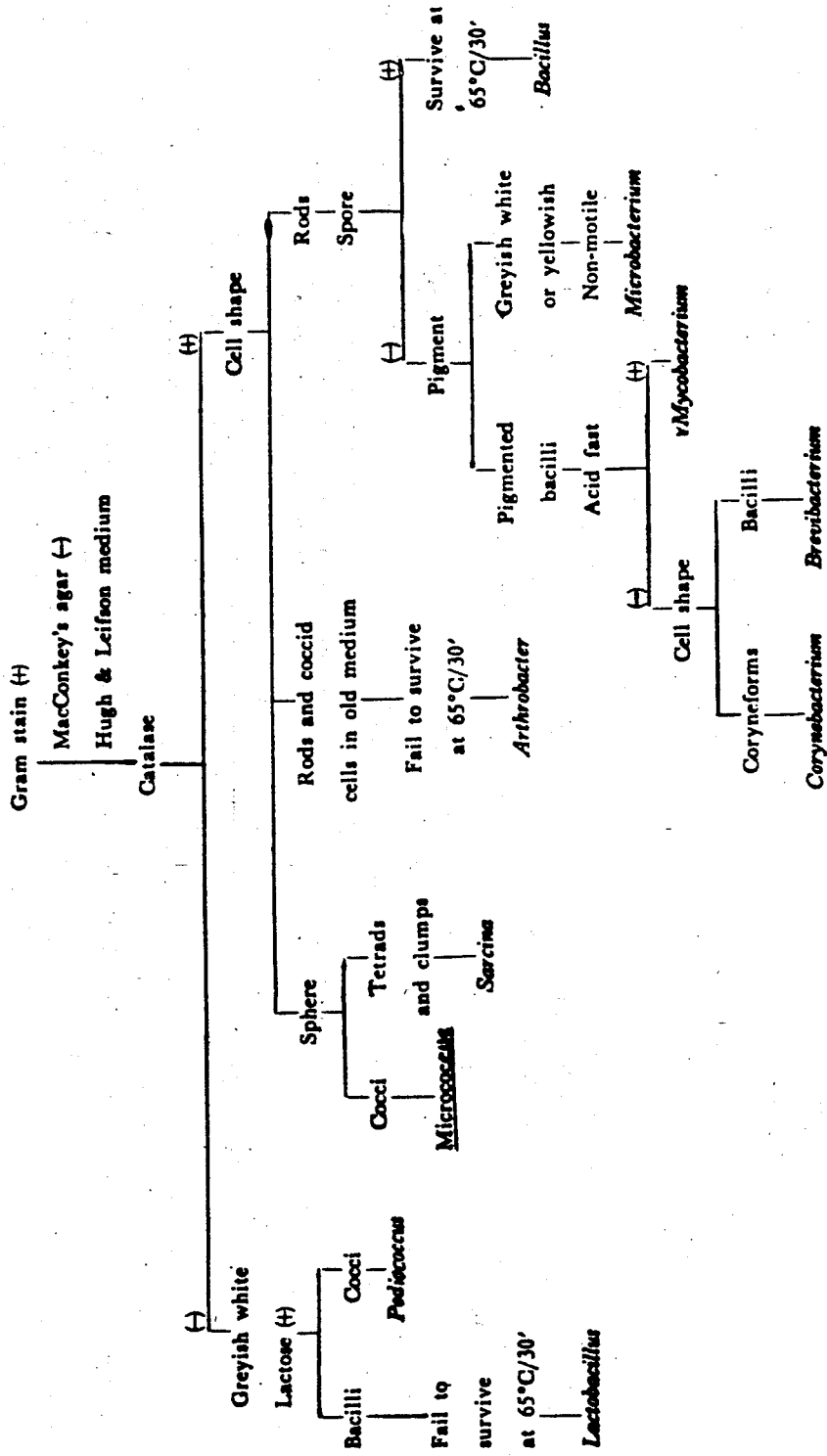


Fig. 1 The scheme for identification of Gram-positive isolates.

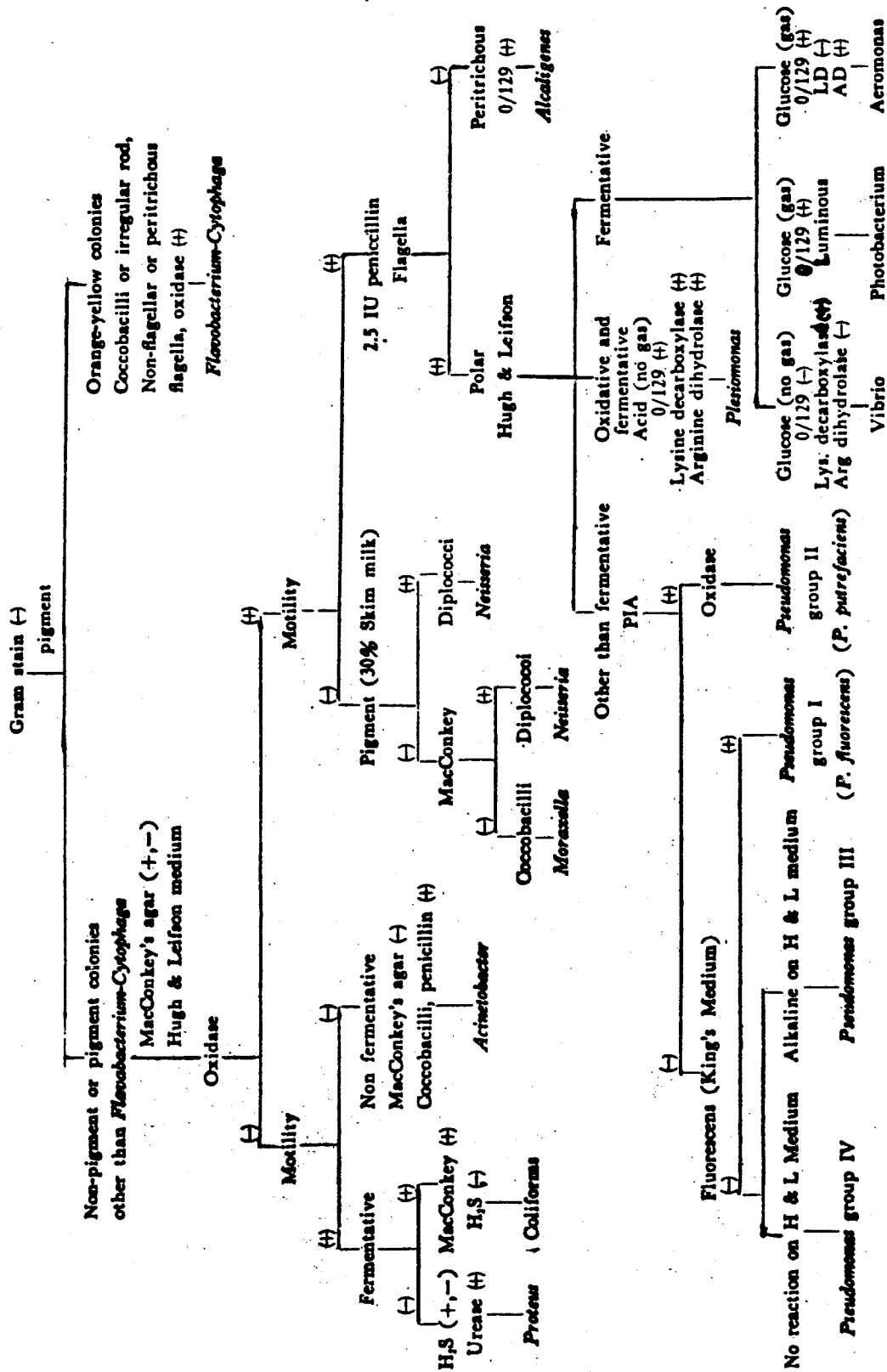


Fig. 2 The scheme for identification of Gram-negative isolates.

粹分離)後,劃線於Nutrient agar斜面上,適時重新接種(另作一組在5℃冰箱中保存)。然後以Kazanas<sup>20)</sup>的方法為主,再以Shewan等<sup>21)</sup>及Masurovsky等<sup>22)</sup>的方法修飾,並參考“Bergey's Manual of Determinative Bacteriology”<sup>23)</sup>來進行鑑定,其鑑定方法如圖1、2所示。

#### 四、細菌的酵素試驗

就單離的菌株,試驗其Cytochrome oxidase<sup>24)</sup>, Gelatinase<sup>25)</sup>, Catalase<sup>26)</sup>, Amylase<sup>27)</sup>, Lipase<sup>27 28)</sup>(含Olive oil agar test<sup>28)</sup>及Tributylin agar test<sup>27)</sup>)之產生能力。

#### 五、細菌的腐敗能力(蛋白質分解能力)之測定

就單離的菌株,試驗其H<sub>2</sub>S、DNase、RNase之產生能力<sup>10)</sup>。並參考前述的Gelatinase<sup>25)</sup>, Catalase<sup>26)</sup>, Amylase<sup>27)</sup>, Lipase<sup>27 28)</sup>的產生能力。這些方法亦可在蔡、陳等<sup>10)</sup>之“水產細菌學”找到。

#### 六、Gram陽性與Gram陰性菌之簡易測定法之檢討

參考蔡等<sup>10)</sup>及FDA<sup>29)</sup>的方法做Gram stain,並以3% KOH溶液<sup>30)</sup>作對照,以瞭解一般的Gram stain與3% KOH溶液所得結果之一致性如何。

### 結果與討論

#### 一、供試樣品的大小、鮮度及官能檢查之情形

試驗用的紅瓜鱈及白口之體型均屬於中等者。紅瓜鱈係使用凍藏於-20℃以下冷凍庫之原料,然由總菌數、pH、VBN、Total NH<sub>3</sub>、K value知其鮮度尚佳,由官能檢查知其組織仍佳(未軟化、骨肉未分離)。由於無剛漁獲的水冰貯藏原料作對照,故無法得知凍藏溫度及時間對其鮮度品質之影響,亦無法得知其細菌相之變化情形,此等缺點在有機會重做時當予改進。故紅瓜鱈樣品在本研究中僅當作參考,無法做深入的探討。

於新竹南寮漁港採取的碎冰冰藏(約1~2天)的樣品,總菌數為 $2.5 \times 10^4/g$ ,在5℃及-30℃分別貯藏4天後,5℃者總菌數超過 $10^6/g$ ,凍藏者則有減少之傾向(為 $6.6 \times 10^3/g$ )。此可能因海產魚之細菌概為嗜冷性,故在5℃時大量繁殖;又在凍藏時總菌數之減少,其原因可能是低溫的作用<sup>31-33)</sup>及水分活性降低所致<sup>3)</sup>。白口原料之K值較高(33.48%),而王等<sup>34)</sup>在70年度調查台灣地區近海漁獲物鮮度時,發見白口的K值平均為39.3%,最高值為80%,最低值為6%,低於20%者佔測定魚總數的 $\frac{1}{2}$ ,顯示白口之K值有較高之傾向,此可能與江平氏<sup>35)</sup>所指的魚種特異性有關;官能檢查知其鮮度甚佳,凍藏者亦甚佳,而冷藏者已有強烈的腐敗臭(表1)。

#### 二、冷藏和凍藏期間細菌相之變化

由表2知,凍結的紅瓜鱈之細菌相中,Gram陽性菌為優勢細菌,佔全部的66%,Gram陰性菌只佔34%,約為前者的 $\frac{1}{2}$ ;白口的冰藏原料,5℃貯藏4天者及-30℃貯藏4天者,Gram陽性菌分別佔86.6%、5%及30%,Gram陰性菌各佔13.4%、95%及70%,顯示白口經冷藏或凍藏後,Gram陰性菌變成佔優勢,以冷藏為最顯著,此可由細菌相之改變得知,與吳等<sup>11)</sup>之鱈魚肉片在新鮮冷藏及凍藏期間細菌相的變化相似。

就凍藏的紅瓜鱈言,其細菌相之多寡依序為*Bacillus*、*Microbacterium*、*Micrococcus* Coliforms、*Alcaligenes*、*Pseudomonas* IV、*Moraxella*、*Neisseria*、*Proteus*及*Pseudomonas* I;新鮮的白口原料為*Bacillus*、*Corynebacterium*、*Flavobacterium*、*Lactobacillus*、*Brevibacterium*、Coliforms、*Micrococcus*、*Neisseria*及*Pediococcus*;5℃貯藏4天的白口變化為*Pseudomonas* II、*Pseudomonas* I、*Pseudomonas* IV、*Neisseria*、*Corynebacterium*及*Acinetobacter*;凍藏4天後變化成*Neisseria*、*Micrococcus*、*Moraxella*及*Pseudomonas* IV。由此結果知,在白口原料中最佔優勢的*Bacillus*,在冷藏或凍藏後都消失了,取而代之的為*Pseudomonas* II、*Pseudomonas* I(冷藏中)及*Neisseria*、*Moraxella*、*Micrococcus*(凍藏中)

Table 1. The average length, average weight, total plate count (TPC), pH, volatile basic nitrogen (VBN), total NH<sub>3</sub>, K value, and organoleptic test of frozen *Decapterus russellii*, iced white croaker, and white croaker after storage at 5°C or -30°C for 4 days.

Sample	Average length (cm)	Average weight (g)	TPC (/g)	pH	VBN (mg%)	Total NH <sub>3</sub> (mg %)	K value (%)	Organoleptic test
<i>D. russellii</i>	24.10	152.88	9.0×10 <sup>4</sup>	5.98	19.84	31	20.25	good
White croaker (iced)	17.25	34.31	2.5×10 <sup>4</sup>	7.25	14.31	7	33.48	excellent
White croaker (5°C/4 days)	17.25	34.31	>10 <sup>6</sup>	-	-	-	-	deteriorative
White croaker (-30°C/4 days)	17.25	34.31	6.6×10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	excellent

Table 2. Percent distribution of bacterial flora in frozen *D. russellii*, iced white croaker, and white croaker after storage at 5°C or -30°C for 4 days.

Microorganism	<i>D. russellii</i>	White croaker		
		Iced	5°C/4 days	-30°C/4 days
<i>Acinetobacter</i>	-	-	5.0	-
<i>Alcaligenes</i>	8.0	-	-	-
<i>Bacillus</i>	28.0	40.0	-	-
<i>Brevibacterium</i>	-	3.3	-	-
Coliforms	10.0	3.3	-	-
<i>Corynebacterium</i>	-	20.0	5.0	-
<i>Flavobacterium</i>	-	6.7	-	-
<i>Lactobacillus</i>	-	6.7	-	-
<i>Microbacterium</i>	22.0	10.0	-	-
<i>Micrococcus</i>	16.0	3.3	-	30.0
<i>Moraxella</i>	4.0	-	-	30.0
<i>Neisseria</i>	2.0	3.3	5.0	35.0
<i>Pediococcus</i>	-	3.3	-	-
<i>Proteus</i>	2.0	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> I	-	-	15.0	-
<i>Pseudomonas</i> II	2.0	-	65.0	-
<i>Pseudomonas</i> IV	6.0	-	5.0	5.0

)；前者可能跟魚肉已經查覺腐敗臭味有關，因 *Pseudomonas* 為魚肉腐敗菌當中最佔優勢的<sup>13,15)</sup>，由其佔細菌相的 85 % 亦可明白；而凍藏時 *Pseudomonas* 則急速減少，只佔 5 %，相反地 *Moraxella*、*Micrococcus* 及 *Microbacterium* 則急速增加。吳等<sup>11)</sup> 之研究亦有類似之結果。

又從表 2 中可知凍藏的紅瓜鱈及白口原料均含 Coliforms 及高比例的 *Bacillus*，此可能為熱帶水域及沿海被污染的結果，與吳等<sup>11)</sup> 之結果一致。

### 三、分離菌株的酵素產生情形及其腐敗能力

在表 3 中，所有的 *Alcaligenes* 均能產生 Catalase、Oxidase、Gelatinase、RNase；*Bacillus*、*Microbacterium* 及 *Pseudomonas* IV 均能產生 Catalase；*Proteus*、*Micrococcus* 及 *Microbacterium* 均不產生 Oxidase；所有 50 株菌株均無產生 Amylase 的能力，對分解 Olive oil 之 Lipase 很弱或無；由產生 RNase、DNase 及 H<sub>2</sub>S 之能力知 *Alcaligenes*、*Bacillus*、*Microbacterium*、Coliforms、*Pseudomonas* IV 較具腐敗能力，*Proteus* 因只有 1 株，故無法肯定其腐敗能力。以上為凍藏紅瓜鱈之結果。

冰藏的原料白口細菌相中；如表 4 所示，*Pediococcus* 均無產生上述酵素及 H<sub>2</sub>S 之能力；很多菌株（佔 30 %）能分泌 Amylase，此與吳等<sup>11)</sup> 之結果相似，而大西洋菌株則無此現象<sup>27)</sup>。由於分離菌株少，對各種酵素的產生能力不能肯定；但對腐敗能力言，*Bacillus* 與 *Microbacterium* 較強。在所有菌株中則無 *Pseudomonas* 菌株，可知此時的原料還很新鮮。

5 °C 貯藏 4 天的白口，其細菌相之酵素與 H<sub>2</sub>S 產生能力示於表 5 中。除 *Acinetobacter* 外，其他菌株皆能產生 Oxidase；*Neisseria* 不產生 Gelatinase 外，其他菌株（除了 *Acinetobacter* 死去之外），皆能分泌 Gelatinase；大部份菌株均能產生 Amylase 及 Catalase，而 30 株中只有 1 株（*Pseudomonas* I）有分解 Olive oil 的 Lipase 產生能力。對蛋白質和核酸的分解能力以 *Pseudomonas* II 為最強，因此時魚肉已經腐敗，故 *Pseudomonas* II（佔總菌株的 65 %）為其最主要的腐敗細菌，此與 Shewan 等<sup>13)</sup> 及 Castell 等<sup>15)</sup> 的看法一致。

就 -30 °C 貯藏 4 天的白口言，其結果如表 6 所示。20 株分離的菌株中皆無產生 H<sub>2</sub>S 之能力，且只有 1 株 *Pseudomonas* IV 被檢出，此與其仍很新鮮有關。*Micrococcus* 的酵素產生能力最強，其次是 *Neisseria*、*Moraxella*，*Pseudomonas* IV 最弱，故此時以前三者成為佔優勢的菌株。有 40 % 的菌株能產生 Amylase，此可能因本省近海的水域環境較特殊吧。

### 四、Gram 陰性菌與 Gram 陽性菌之迅速判別法之檢討。

Gregersen<sup>30)</sup> 以 3 % KOH 溶液與 Gram 染色法對 71 株 Gram 陽性菌和 55 株 Gram 陰性菌標準菌株比較其一致性，發見 3 % KOH 溶液是可以信賴的，因為只有 1 株 *Bacillus macerans* 不一致，其他都一致，而 Gram 陰性菌可以完全且迅速地檢出。在本報告中，二者的一致性較低，為 84 ~ 90 %，其結果如表 7 所示，Gram 陽性菌有 4 株，Gram 陰性菌有 13 株無法正確檢出，其原因可能是 Gram 染色法本身亦無法完全地判別陽性或陰性，此與菌株的老化<sup>35,36)</sup> 或培養基種類、環境溫度、菌株的本性<sup>37)</sup> 等有關。對 1 株 *Escherichia coli* 及 1 株 *Staphylococcus aureus* 標準菌株以 3 % KOH 溶液可以正確迅速地區別。故在本報告中，細菌相之鑑定係以 Gram 染色法為主，而以 3 % KOH 溶液的方法為輔。3 % KOH 的方法為 Ryu<sup>38,39)</sup> 在 1938、1940 年於日本提出，目前在日本仍很流行<sup>40)</sup>，故其實用性很值得應用與研究。

## 摘 要

本報告主要在探討本省近海漁船用碎冰冰藏的白口在低溫下貯藏時之細菌相變化情形及其特性，以及凍藏的紅瓜鱈之細菌相和特性，並比較區別 Gram 陽性菌及 Gram 陰性菌之 3 % KOH 溶液鑑別法和一般的 Gram 染色法。

紅瓜鱈的總菌數為  $9.0 \times 10^4$  /g，冰藏白口為  $2.5 \times 10^4$  /g。白口在 5 °C 貯藏 4 天後則超過  $10^6$  /

Table 3. The enzymes and H<sub>2</sub>S produced by microflora isolated from frozen *D. russellii*.

Microorganism	Catalase	Oxidase	Gelatinase	Amylase	Lipase <sup>*1</sup>	RNase	DNase	H <sub>2</sub> S
<i>Alcaligenes</i>	4/4 <sup>*2</sup>	4/4	4/4	0/4	0/4	4/4	2/4	1/4
<i>Bacillus</i>	14/14	2/14	10/14	0/14	2/14	11/14	1(2)/14	2/14
Coliforms	5/5	1/5	1/5	0/5	0/5	4/5	1/5	1/5
<i>Microbacterium</i>	11/11	0/11	8/11	0/11	1/11	10/11	2/11	2/11
<i>Micrococcus</i>	8/8	0/8	3/8	0/8	1/8	5/8	2/8	0/8
<i>Moraxella</i>	1(1)/2	1/2	0/2	0/2	0/2	1/2	1/2	0/2
<i>Neisseria</i>	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1
<i>Proteus</i>	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Pseudomonas</i> I	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1
<i>Pseudomonas</i> IV	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	3/3	1/3	0/3

\*<sup>1</sup> Olive oil.

\*<sup>2</sup> Denominator indicates the number of bacteria tested. Numerator indicates the number of bacteria showing positive test. ( ) indicates the number of bacteria showing weakly positive test.

Table 4. The enzymes and H<sub>2</sub>S produced by microflora isolated from iced white croaker.

Microorganism	Catalase	Oxidase	Gelatinase	Amylase	Lipase <sup>*1</sup>	RNase	DNase	H <sub>2</sub> S
<i>Bacillus</i>	3(3)/12 <sup>*2</sup>	4(1)/12	3/12	5/12	1/12	4/12	3/12	1/12
<i>Brevibacterium</i>	1/1	0/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	0/1
Coliforms	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1
<i>Corynebacterium</i>	1(2)/6	2(1)/6	0/6	1/6	0/6	0/6	1/6	0/6
<i>Flavobacterium</i>	1(1)/2	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2
<i>Lactobacillus</i>	(1)/2	(1)/2	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2
<i>Microbacterium</i>	3/3	1/3	2/3	2/3	1/3	3/3	1/3	1/3
<i>Micrococcus</i>	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1
<i>Neisseria</i>	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1
<i>Pediococcus</i>	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

\*<sup>1</sup> and \*<sup>2</sup> are the same as Table 3.



Table 5. The enzymes and H<sub>2</sub>S produced by microflora isolated from white croaker after storage at 5°C for 4 days.

Microorganism	Catalase	Oxidase	Gelatinase	Amylase	Lipase <sup>*1</sup>	RNase	DNase	H <sub>2</sub> S
<i>Acinetobacter</i>	1/1 <sup>*2</sup>	0/1	? <sup>*3</sup> /1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1
<i>Corynebacterium</i>	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	1/1
<i>Neisseria</i>	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Pseudomonas</i> I	2/3	3/3	3/3	1 (1)/3	1/3	1/3	1/3	0/3
<i>Pseudomonas</i> II	5/13	13/13	13/13	6 (2)/13	0/13	11/13	7/13	13/13
<i>Pseudomonas</i> IV	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1

\*<sup>1</sup> and \*<sup>2</sup> are the same as Table 3.

\*<sup>3</sup> ? means that this test was not undertaken, because this strain was dead.

Table 6. The enzymes and H<sub>2</sub>S produced by microflora isolated from white croaker after storage at -30°C for 4 days.

Microorganism	Catalase	Oxidase	Gelatinase	Amylase	Lipase <sup>*1</sup>	RNase	DNase	H <sub>2</sub> S
<i>Micrococcus</i>	6/6 <sup>*2</sup>	2/6	5/6	5/6	1/6	4/6	3/6	0/6
<i>Moraxella</i>	4(2)/6	6/6	1/6	1/6	1/6	2/6	2/6	0/6
<i>Neisseria</i>	7/7	7/7	1/7	1/7	0/7	5/7	0/7	0/7
<i>Pseudomonas</i> IV	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1

\*<sup>1</sup> and \*<sup>2</sup> are the same as Table 3.

Table 7. The coincidence between Gram stain and the rapid method using 3% KOH solution.

Item	<i>D. russllii</i>	White croaker		
		Iced	5°C/4 days	-30°C/4 days
Coincidence	42/50 (84%)	27/30 (90%)	18/20 (90%)	17/20 (85%)
Gram (+) & 3% KOH(+)		<i>Bacillus</i> 1 <i>Microbacterium</i> 1	<i>Corynebacterium</i> 1	<i>Micrococcus</i> 1
Gram(-) & 3% KOH(-)	<i>Flavobacterium</i> 1 Coliforms 3 <i>Moraxella</i> 2 <i>Neisseria</i> 1 <i>Pseudomonas</i> I 1 <i>Pseudomonas</i> IV 1	<i>Flavobacterium</i> 1	<i>Acinetobacter</i> 1	<i>Moraxella</i> 2

g，在 $-30^{\circ}\text{C}$ 貯藏4天則減少為 $6.6 \times 10^3/\text{g}$ 。四種樣品的細菌相依所佔比例之多少，分別如下：凍藏的紅瓜鱈為 *Bacillus*，*Microbacterium*，*Micrococcus*，Coliforms，*Alcaligenes*，*Pseudomonas* IV，*Moraxella*，*Neisseria*，*Proteus* 及 *Pseudomonas* I；冰藏白口為 *Bacillus*，*Corynebacterium*，*Flavobacterium*，*Lactobacillus*，*Brevibacterium*，Coliforms，*Micrococcus*，*Neisseria* 及 *Pediococcus*； $5^{\circ}\text{C}$ 貯藏4天的白口為 *Pseudomonas* II，*Pseudomonas* I，*Pseudomonas* IV，*Neisseria*，*Corynebacterium* 及 *Acinetobacter*； $-30^{\circ}\text{C}$ 貯藏4天的白口為 *Neisseria*，*Micrococcus*，*Moraxella* 及 *Pseudomonas* IV。全部分離的菌株中較有腐敗能力者如下：凍藏的紅瓜鱈為 *Alcaligenes*，*Bacillus*，*Microbacterium*，Coliforms，*Pseudomonas* IV；冰藏的白口為 *Bacillus* 及 *Microbacterium*； $5^{\circ}\text{C}$ 貯藏4天的白口為 *Pseudomonas* II； $-30^{\circ}\text{C}$ 貯藏4天的白口為 *Micrococcus* 及 *Moraxella*。凍藏的紅瓜鱈和冰藏的白口都有高比例的 *Bacillus* 和 Coliforms。凍藏的紅瓜鱈之分離菌株皆無產生 Amylase 的能力，相反的大部分的三種白口中則有此能力。區別 Gram 陽性菌和 Gram 陰性菌的 3% KOH 溶液法與 Gram 染色法之一致性分別如下：凍藏的紅瓜鱈為 84%，冰藏的白口為 90%， $5^{\circ}\text{C}$ 貯藏4天的白口為 90%， $-30^{\circ}\text{C}$ 貯藏4天的白口為 85%。

#### 謝 辭

本研究承蒙本所王文政先生的熱心指導及劉世芬小姐的大力幫忙，實在衷心感佩，謹此致謝。

#### 參 考 文 獻

- (1) Bedford, R.H. (1933): Marine bacteria of the Northern Pacific Ocean. The temperature range of growth. *Contribs. Can. Biol. and Fish.* 7:433~438.
- (2) Shewan, J. M. (1961): The microbiology of seawater fish. In "Fish as Food", Vol. 1. (Ed., G. Borgstrom). Academic Press, London.
- (3) Stewart, M.M. (1935): Keeping quality of haddock from cold storage. *J. Soc. Chem. Ind. (London)*. 54:92 T-96 T.
- (4) Haines, R.B. (1938): The effect of freezing on bacteria. *Proc. Roy. Soc., B* 124:451-463.
- (5) Kiser, J. S. and Beckwith, T.D. (1942): The effect of fast freezing on bacterial flora of mackerel. *Food Research*, 7:255-259.
- (6) Shewan, J.M. (1949): Some bacteriological aspects of handling, processing and distribution of fish. *J. Roy. Sanit. Inst.* 59:394-421.
- (7) Adams, R., Farber, L. and Lerke, P. (1964): Bacteriology of spoilage of fish muscle. II. Incidence of spoilers during spoilage. *Appl. Microbiol.* 12:277-279.
- (8) Herbert, R. A., Hendrie, M.S., Gibson, D.M. and Shewan, J.M. (1971): Bacteria active in the spoilage of certain seafoods. *J. Appl. Bact.* 34:41-50.
- (9) Lerke, P., Adams, R. and Farber, L. (1965): Bacteriology of spoilage of fish muscle. III. Characterization of spoilers. *Appl. Microbiol.* 13:625-630.
- (10) Chai, T.J. and Chen, H.C. (1979): In "Fishery Bacteriology", JCRS Series No. 33.
- (11) Wu, C.Y. and Chen, H.C. (1978): The change of bacterial flora in dolphin filets during fresh cold storage and frozen storage. *Food Science*, 5(1):36-44.
- (12) Chen, H.C., Chen, S.S., Wu, C.Y., and Chai, T.J. (1979): Microbiological

- survey of fish pens of home-water fishing vessels in Taiwan. CAPD Fishery Series No.1, 133-146.
- (13) Shewan, J.M. and Bain, N. (1955): Unpublished data. Torry Research Station, Aberdeen, Scotland.
  - (14) Castell, C.H. and Greenough, M.F. (1957): The action of *Pseudomonas* on fish muscle: 1. Organisms responsible for odours produced during incipient spoilage of chilled fish muscle. J. Fish. Res. Bd. Can. 14: 617-625.
  - (15) Castell, C.H. and Anderson, G.W. (1948): Bacteria associated with spoilage of cod fillets. J. Fish. Res. Bd. Can. 7:370-377.
  - (16) Velanker, N.K. and Kamasastri, P.V. (1956): The bacterial flora, trimethylamine and total volatile nitrogen of fish muscle at 0°C (in ice). Indian J. Fish. 3:269-289.
  - (17) Wood, E.J.F. (1940): Studies on the marketing of fresh fish in Eastern Australia. Part 2. The bacteriology of spoiling marine fish. Australia Commonwealth Council Sci. Ind. Res. Div. Fish. Rept. No.3.
  - (18) 蘇和傑 (1974): 魚類鮮度之化學檢驗法-微量擴散法。"水產化學實驗", 一文出版社, 85-86。
  - (19) 內山均・小林宏 (1974): 魚類生鮮度のカラムクロマトグラフィーによる簡易判定。"水産生物化学・食品学実験書", 恒星社厚生閣出版。269-274。
  - (20) Kazanas, N. (1966): Effect of r-irradiation on the microflora of fresh water fish. Appl. Microbiol. 14:957-965.
  - (21) Shewan, J.M., Hobbs, G. and Hodgkiss, W. (1960): A determinative scheme for the identification of certain genera of Gram-negative bacteria with special reference to the *Pseudomonadaceae*. Appl. Bacteriol. 23: 379-390.
  - (22) Masurovsky, E. B., Voss, J. S. and Goldblith, S.A. (1963): Change in the microflora of haddock fillets and shucked soft shelled clams after irradiation with  $C_D^{60}$  gamma rays. Appl. Microbiol. 11:229-234.
  - (23) Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (1974): "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
  - (24) Kovacs, H. (1956): Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, 178:703.
  - (25) Levin, R.E. (1968): Detection and incidence of specific species of spoilage bacteria on fish. I. Methodology. Appl. Microbiol. 16:1734-1737.
  - (26) Whittenbury, R. (1964): Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. J. Gen. Microbiol. 35:13.
  - (27) Chai, T.J. (1970): Studies on the bacterial flora of fish pen slime. Dissertation for Master Degree, University of Massachusetts.
  - (28) Starr, M.P. (1941): Spirit blue agar: A medium for the detection of lipolytic microorganisms. Science, 93:333-334.
  - (29) FDA (1978): "Bacteriological Analytical Manual", 15th ed. Food and Drug Administration, Bureau of Foods, Division of Microbiology.
  - (30) Gregersen, T. (1978): Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 5:123-127.
  - (31) Hess, E. (1934): Effects of low temperatures on the growth of marine bact-

- eria. *Contribs. Can. Boil. and Fisheries*. 8:491-505.
- (32) Kiser, J.S. (1944): Effects of temperatures approximating 0 °C upon growth and biochemical activities of bacteria isolated from mackerel. *Food Research*. 9:257-267.
  - (33) Ingraham, J.L. (1958) : Growth of psychrophilic bacteria. *J. Bacteriol.* 76:75-80.
  - (34) 王文政、張士軒、劉世芬、陳茂松 (1981) : 台灣地區近海漁獲鮮度調查試驗(I), 台灣省水產試驗所試驗報告第33號(印刷中)。
  - (35) Cowan, S.T. (1974) : *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 2nd ed. Cambridge : University Press.
  - (36) Stanier, R.Y., Adelberg, E.A., and Ingraham, J.H. (1976): New Jersey, *The Microbial World*, 4th ed. Prentice Hall.
  - (37) Henriksen, S.D. (1976) : *Moraxella, Neisseria, Branhamella and Acinetobacter*. *Annu. Rev. Microbiol.* 30:63-83.
  - (38) Ryu, E. (1938) : On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. *J. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 17:31.
  - (39) Ryu, E. (1940) : A simple method of differentiation between gram-positive and gram-negative organisms without staining. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 17:58-63.
  - (40) Sakazaki, R. (1977) : Personal communication.