

青蛤体内细菌菌群组成及致病性弧菌的初步调查

郑国兴 周凯 于业绍 周琳

(中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

叶朝庚

(江苏省射阳盐场, 224342)

陆平 张沛花

(江苏省启东盐场, 226236)

摘要 青蛤样品体内需氧平板菌落数为 $0.16 \times 10^5 \sim 5.7 \times 10^5$ 个/克。从青蛤体内共分离到168株细菌,大多是革兰氏阴性杆菌。优势菌属是莫拉氏菌属(*Moraxella*)71株、弧菌属(*Vibrio*)33株、假单胞菌属(*Pseudomonas*)19株、气单胞菌属(*Aeromonas*)16株、其次是微球菌属(*Micrococcus*)6株、不动细菌属(*Acinetobacter*)3株和芽孢杆菌属(*Bacillus*)2株,还有未能鉴定到属的革兰氏阴性杆菌(11株)及传代中死亡的菌株(7株)等。弧菌是海产动物的主要致病菌,可引起蛤类和牡蛎幼体、成体的大批死亡。在青蛤体内共检得弧菌33株,溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)15株、创伤弧菌(*V. vulnificus*)9株、拟态弧菌(*V. mimicus*)2株和河弧菌(*V. fluvialis*)1株、弧菌 I (*Vibrio* I)4株、弧菌 II (*Vibrio* II)2株。上述弧菌在夏季分离到,冬季未检出,这些弧菌也是人的致病菌,在夏季人们如食用了生的或未经煮熟的青蛤,易发生食物中毒,应予以重视。

关键词 青蛤, 菌群组成, 致病性弧菌, 弧菌属

中图分类号 S944.3

为配合青蛤(*Cyclina sinensis*)增殖技术的推广应用,了解青蛤病害情况,我们对青蛤体内细菌菌群组成及致病性弧菌作了初步调查。调查的目的不仅可为青蛤养殖过程中提供有关病害防治的科学依据;而且从水环境的角度出发,可了解青蛤养殖环境的污染状况;从食品微生物学和流行病学的角度出发,可了解青蛤卫生状况。国内外有关贝类养殖环境及体内细菌菌群组成的调查已有一些报导[刘军义 1996, 宋庆云等 1997, 杉田治男等 1991]。但有关青蛤的微生物学分析,还未见有报告。现将我们初步调查结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

青蛤样品于1997年1月28日采自江苏启东,6月2日、8月15日、12月22日采自江苏射阳和

农业部“九五”重点资助项目(青蛤增殖技术研究), 渔95-B-96-04-05号。

收稿日期: 1999-01-18

1998年1月10日采自江苏启东。

1.2 样品处理和均质样品的制备

每次样品随机抽取青蛤5个,先用自来水冲洗干净,用75%酒精棉球将青蛤外表反复擦拭消毒;再用灭菌小刀将青蛤剖开,取出肉质部分并用灭菌剪刀剪碎,加一定量的无菌生理盐水稀释成 10^{-1} 稀释液,然后用组织匀浆仪捣碎,制成匀质样品。将5个青蛤的匀液充分混合,再用十倍递增稀释法进一步制成 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 等稀释度的稀释液,供进一步分析用。

1.3 细菌总数的测定

采用需氧平板菌落计数法。取0.2毫升各稀释度的稀释液,涂抹于营养琼脂平板上,置 30°C 的恒温培养箱中培养。两天后,取适当稀释度的双列平板计算长出的细菌菌落数。

1.4 大肠杆菌群数的检测

大肠菌群 MPN(最近似值)指数,按“细菌学分析手册”[甄宏太和俞平 1986]一书进行。

1.5 细菌的分析与鉴定

每批样品从营养琼脂平板上随机挑选40个菌落,划线分纯后,作细菌鉴定用。革兰氏阴性菌按杉田治男等[1981]提供的图式进行。革兰氏阳性细菌按“一般细菌常用鉴定方法”[中国科学院微生物研究所细菌分类组 1978]一书进行。致病性弧菌的鉴定参考吴顺娥等[1991]推荐的“致病性弧菌检验程序的建议”进行。

2 结果与讨论

2.1 细菌总数(需氧平板菌落数)

青蛤体内需氧平板菌落数的测定结果见表1。青蛤样品体内需氧平板菌落数为 $1.6 \times 10^4 \sim 5.7 \times 10^5$ 个/克。根据1982年6月中华人民共和国食品卫生国家标准[郁庆福和杨均培 1984],鱼类细菌总类应不超过10000个/克(贝壳类水产品细菌总数则未见规定)。从检测的结果看,97年6月和98年1月的样品超出标准不多,其余3次样品超出卫生标准一个数量级;上述5份样品的清洁度应视为可疑或不合格。细菌总数的多寡与季节未见明显关系。青蛤体内细菌总数较高,从一个侧面上反映其栖息环境不够清洁。

2.2 大肠菌群数

青蛤体内大肠菌群数的测定结果见表1。按欧共体理事会[1991]有关活双壳类生产和投放市场卫生条件的规定,供人类食用的活双壳类,每100克贝肉的大肠菌群数应少于300个。从测定的结果看,仅1997年1月的样品中,每100克青蛤肉的大肠菌群数小于300个,符合供人类食用的卫生标准外,其余四次样品的数值均超出规定的指标,尤其在夏季(1997年8月),每100克贝肉的大肠菌群数竟高达35000个,超出食用卫生标准一百多倍。大肠菌群数的严重超标,表明其栖息环境已受到生活污水的严重污染。

表1 青蛤体内的细菌总数和大肠菌群数测定结果

Tab. 1 Total aerobic plate counts for bacterial colonies and numbers of coliform group in the clam

采样日期 (年.月.日)	采样地点	青蛤体长 (厘米)	青蛤体高 (厘米)	去壳后肉重 (克)	细菌总数 ($\times 10^5$ 个/克)	大肠菌群 (个/100克)
1997.01.28	江苏启东	2.9~3.3	2.7~3.2	3.2~4.8	5.70	<300
1997.06.02	江苏射阳	3.3~4.2	3.1~3.9	6.8~13.2	0.27	300
1997.08.15	江苏射阳	3.8~4.0	3.8~4.0	4.3~6.5	1.30	35000
1997.12.22	江苏射阳	3.3~3.8	3.3~3.8	3.8~6.9	4.60	4900
1998.01.10	江苏启东	2.8~3.4	2.9~3.5	3.6~5.8	0.16	500

2.3 青蛤体内细菌的菌群组成及季节变化

四组青蛤样品体内共分离到168株细菌,根据其形态和生理生化特性,按“一般细菌常用鉴定方法”[中国科学院微生物研究所细菌分类组 1978]一书的检索表、图解和属的提要,参考杉田治男等[1981]对双壳类细菌组成的鉴定图解,青蛤体内的细菌大多是革兰氏阴性杆菌,优势菌属是莫拉氏菌属(71株)、弧菌属(33株)、假单胞菌(19株)、气单胞菌属(16株),其次是微球菌属(6株)、不动细菌属(3株)和芽孢杆菌属(2株),还有未能鉴定到属的革兰氏阴性杆菌(11株)及不适合人工培养生长在传代中死亡的细菌(7株)等。青蛤体内菌群组成在夏季和冬季有显著差异,夏季(1997年6月和8月)优势菌属主要是弧菌属和气单胞菌属,其次是莫拉氏菌属和假单胞菌属;冬季(1997年1月和1998年1月)的优势菌主要是莫拉氏菌属,其次是假单胞菌属和微球菌属,夏季占优势的弧菌属和气单胞菌属在冬季(1997年1月和1998年1月)未分离到(表2)。

表2 青蛤体内细菌的菌群组成及季节变化

Tab. 2 Microflora and thier seasonal change in the clam

菌群组成	1997年1月28日		1997年6月2日		1997年8月15日		1998年1月10日	
	菌株数	%	菌株数	%	菌株数	%	菌株数	%
溶藻弧菌			15	36.6				
创伤弧菌			9	21.9				
似态弧菌					2	5.0		
河弧菌					1	2.5		
弧菌 I			3	7.3	1	2.5		
弧菌 II			2	4.9				
气单胞菌属					16	40.0		
假单胞菌属	2	4.5	5	12.2	3	7.5	9	20.9
莫拉氏菌属	34	77.3			14	35.0	23	53.4
不动细菌属							3	7.0
微球菌属	1	2.3			1	2.5	4	9.3
芽孢杆菌属							2	4.7
鉴定不明菌			7	17.1	2	5.0	2	4.7
不生长	7	15.9						
总计	44	100.0	41	100.0	40	100.0	43	100.0

2.4 青蛤体内的致病性弧菌

在青蛤体内共检得弧菌33株,溶藻弧菌最多,有15株(占45.5%);创伤弧菌次之,分离到9

株(占27.3%);拟态弧菌2株(6.1%);河弧菌1株(3.0%);弧菌 I 4株(12.1%);弧菌 II 2株(6.1%)。上述弧菌仅在夏季(1997年6月2日和1997年8月15日)分离到,冬季(1997年1月28日和1998年1月10日)未检出。33株致病性弧菌的生物学特性列于表3。

表3 青蛤体内检出的33株致病性弧菌主要生物学特性

Tab. 3 Biological characteristics of 33 strains of *Vibrio* isolated from the clam

项目	拟态弧菌	创伤弧菌	溶藻弧菌	河弧菌	弧菌 I	弧菌 II
菌株数	2	9	15	1	4	2
氧化酶	+	+	+	+	+	+
过氧化氢酶	+	+	+	+	+	+
O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
葡萄糖产酸	+	+	+	+	+	+
葡萄糖产气	-	-	-	-	-	-
革兰氏染色	-	-	-	-	-	-
运动性	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	+	-	-	-
胨基质		+	+		+	+
甘露糖		+	+		+	+
甘露醇		+	+		+	+
蔗糖	-	-	+	+	+	-
阿拉伯糖		-	-		-	-
纤维二糖		+	-		+	+
肌醇		-	-		-	-
乳糖		[+]	-		-	+
水杨素		-	-		-	-
赖氨酸	+	+	+	-	-	-
鸟氨酸	+	+	+	-	-	+
精氨酸	-	-	-	+	-	-
0% NaCl 脓水	+	-	-	-	-	-
3% NaCl 脓水	+	+	+	+	+	+
6% NaCl 脓水	+	+	+	+	+	+
8% NaCl 脓水	-	-	+	-	-	+
10% NaCl 脓水	-	-	+	-	-	-
0/129 10 μ g	S	S	R	S	S	S
150 μ g	S	S	S	S	S	S
TCBS 生长	G	G	Y	Y	Y	G

注:S-敏感;R-耐药;G-绿色;Y-黄色。

弧菌是海产动物最主要的致病菌,常见可引起鱼类和对虾的出血性败血症。引起鱼虾类的致病性弧菌已见报导有近十种之多[黄琪琰 1993]。八十年代末至九十年代初对江苏沿海文蛤大批死亡原因的调查,先后报导溶藻弧菌[郑国兴等 1991]、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)[沈亚林和于业绍 1993]和弗尼氏弧菌(*V. furnissi*)[王广和等 1991]等均可引起文蛤死亡;在美国和欧洲各地也曾报导弧菌可引起蛤类和牡蛎幼体、成体的大量死亡[Sindermann 1977]。弧菌广泛分布于海水环境和海产动物体表和肠道中,一般认为是正常菌群,属条件属病菌,当环境条件不适应时(如氨氮过高、溶氧不足、盐度过低、pH值偏高、水温不适或上述环境因子突然变化等)或水产动物因外伤、营养不良、寄生虫感染等导致机体抗病

力下降时,极易诱发弧菌病。

弧菌也是人类的重要病原微生物,目前已确认有十一种弧菌对人致病,包括能引起急性腹泻的霍乱弧菌(*V. cholerae*)、河弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、拟态弧菌、弗尼氏弧菌和霍利氏弧菌(*V. hollisae*)及能引起伤口感染和败血症的创伤弧菌、海鱼弧菌(*V. damsella*)、麦氏弧菌(*V. metschnikovii*)和辛辛那提弧菌(*V. cincinnatiensis*)等。许多研究表明,人类大部分致病性弧菌的感染与食用生的或未煮熟的海产品及接触海水环境有关,是沿海地区的常见病。本次调查结果证实夏季青蛤体内有大量致病性弧菌存在,检出的溶藻弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌和河弧菌均能使人致病,如果人们食用了生的或未经煮熟的青蛤,极易发生食物中毒,应予以重视。

参 考 文 献

- 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 1978. 一般细菌常用鉴定方法. 北京:科学出版社. 1~97
- 王广和,沈艳云,柳福生等. 1991. 文蛤弗尼氏弧菌病研究报告. 中华流行病学杂志, 12(特3):73~76
- 刘军义. 1996. 广西沿海文蛤及其生境中细菌菌群的初步调查报告. 水产科技情报, 23(2):80~83
- 吴顺娥,王晓春,陈天寿. 1991. 致病性弧菌检验程序的建议. 中华流行病学杂志, 12(特3):123~126
- 宋庆云,罗挽涛,王文兴等. 1997. 扇贝的养殖环境及其体内细菌学分析. 黄渤海海洋, 15(3):26~30
- 沈亚林,于业绍. 1993. 副溶血弧菌对文蛤的致病性及其防治. 水产学报, 17(3):249~252
- 郑国兴,李 何,黄宁宇等. 1991. 文蛤病原菌(溶藻弧菌)的分离与性状及病文蛤组织的电镜观察. 水产学报, 15(2):85~95
- 郁庆福,杨均培(主编). 1984. 卫生微生物学. 北京:人民卫生出版社. 62~72
- 欧共体理事会. 1991. 活双壳类生产和投放市场的卫生条件的规定(91/492/EEC). 国外水产品质量控制法规选编. 中华人民共和国农业部渔业局. 国家水产品质量监督中心. 109~122
- 黄琪琰(主编). 1993. 水产动物疾病学. 上海:上海科学技术出版社. 95~141
- 甄宏太,俞 平(译). 1981. 细菌学分析手册(美国食品与药品管理局编). 北京:轻工业出版社. 1~41,472~495
- 杉田治男,店 秀男,小 二夫ら. 1981. 沿岸二枚貝の細菌相. 日本水産學會志, 45(5):655~661
- Sindermann C J. 1977. Disease diagnosis and control in north american marine aquaculture. Elsevier scientific publ. co., Amsterdam-Oxford-New York. 190~192, 222~223

PRELIMINARY INVESTIGATION OF MICROFLORA AND PATHOGENIC VIBRIOS IN THE CLAM, *CYCLINA SINENSIS*

ZHENG Guo-Xing, ZHOU Kai, YU Ye-Shao, ZHOU Lin
(East China Sea Fisheries Research Institute, CASF, Shanghai 200090)

YE Chao-Geng
(Sheyang Saltern of Jiangsu Province, 224342)

LU Ping, ZHANG Pei-Hua
(Qidong Saltern of Jiangsu Province, 226236)

ABSTRACT In this paper the results of the preliminary investigation of microflora and pathogenic vibrios in the clam, *Cyclina sinensis* were described. Total aerobic plate counts for bacterial colonies in the clam ranged from 0.16×10^5 to 5.7×10^5 cells per gram. 168 strains of bacteria were isolated from the clam and most of them were Gram-negative rod. These were composed of *Moraxella* (71 strains), *Vibrio* (33), *Pseudomonas* (19), *Aeromonas* (16), *Micrococcus* (6), *Acinetobacter* (3), *Bacillus* (2), unidentified Gram-negative rod (11) and died in reproduction (7). Vibrios are main pathogens of aquatic animals, usually cause large numbers of death in larvae and adults of clams and oysters. All of 33 strains of *Vibrio* were isolated from the clam, including *Vibrio alginolyticus* (15 strains), *V. vulnificus* (9), *V. mimicus* (2), *V. fluvialis* (1), *V. group I* (4) and *group II* (2). The *Vibrio* were all isolated in summer and not found in winter, and they are also the pathogens of man. In summer, if people eat the clam of raw or uncooking enough, they will be easily diarrhoea caused by food poisoning. It should be brought to attention.

KEYWORDS *Cyclina sinensis*, microflora, pathogenic vibrios, *Vibrio*

* * * * *

更 正

本刊1999年第8卷第1期中文目次页《青蛤增养殖技术研究及开发》目录中,第7作者顾永康、第9作者叶朝康分别系顾永庚(GU Y G)、叶朝庚(YE C G)之误,现予更正,并向作者、读者致歉。