

王功地區產牡蠣之低溫性大腸菌群分佈

王文亮 · 陳茂松

Studies on Psychrotrophic Coliforms Distribution of Cultured Oyster
in Wang-Kung Area

Wen-Liang WANG and Mao-Song CHEN

Eleven samples of unshucked oyster were collected from Wang-Kung area. Oyster was cultured with long line method before bacteriological analysis.

Most of samples were inadequate for eating raw without cooking. According to IMViC system, motility and gelatinase test, 98 coliform isolates were classified into 12 types, each was subdivided into 3 groups on the basis of growth ability at 5 and 40°C. Of these coliforms there were 4 types: type 1 (25 strains), type 8 (25 strains), type 6 (16 strains) and type 9 (13 strains) accounted for 80.6% of the total. The distribution of types mentioned above is very centralized.

On the other hand, 26.5% of all coliform strains were psychrotrophic, it was clear that the mesophilic coliforms contributed a relatively large amount (73.5%) to total coliform isolated. Among 39 coliform isolates in winter, 15 strains (38.5%) were psychrotrophic, while among 59 coliform isolates in autumn and spring 11 strains (18.6%) were psychrotrophic.

The coliform group taxonomy by E C test and IMViC system were centralized in *Citrobacter freundii* I 39 strains, *C. freundii* II 26 strains (26.5%), *Escherichia coli* I 18 strains (18.4%), *E. coli* IV 11 strains (11.2%).

The same as previous report¹⁾, most of isolates were resistant to penicillin, erythromycin, novomycin, and very sensitive to chloromycetin, tetracycline and streptomycin.

前 言

筆者等在前報¹⁾調查本省主要牡蠣產地之牡蠣大腸菌群分佈，發現低溫性大腸菌群僅佔大腸菌群之23.7%，而中溫性大腸菌群則佔76.3%，顯示養殖牡蠣受溫血動物排泄物之污染相當嚴重；又低溫性大腸菌群在冬季似佔有較大比率，惟因採樣地點分散，乃繼續以王功為定點做進一步之確認。

材 料 與 方 法

一、樣品

採自王功產垂吊式養殖之帶殼性蠔。

二、樣品之處理

自民國68年9月10日至69年5月28日共採取11個樣品，樣品採後封於塑膠袋中立即帶回試驗室。各樣品採取約50g於滅菌之燒杯中，以超音波高速乳化機均質5分鐘後，取5.0g於盛45ml無菌生理食鹽水之100ml稀釋瓶中 (10^{-1})，吸取均質液適當稀釋成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 倍等供下列測定用。

三、細菌學檢查方法

1. 總生菌數 (Total bacterial count) 之測定：取上述各稀釋液0.1ml，塗佈於Nutrient agar

培養基上，以30°C培養18~24小時，挑選菌落數在30~300間之二重皿計算菌落數。

2. 大腸菌 (*E. coli*) MPN之測定²⁾³⁾

取上述各種釋液1ml接種於5支EC broth，於44.5°C之恆溫水槽培養24小時，由產生氣體的陽性管數計算MPN。

3. 大腸菌群 (Coliforms) MPN之測定與菌株之分離⁴⁾⁵⁾：

依前報¹⁾之程序檢測之。

四、生化學檢測法

1. IMViC：依FDA法檢測之⁶⁾。

2. 運動性：以懸滴法 (hanging drop method)⁷⁾檢測之。

3. Gelatinase：依蔡⁷⁾法檢測之。

4. 硝酸鹽還元性：依常法⁸⁾檢測之。

5. Cytochrome oxidase：將濾紙浸入新配的1% tetramethyl-*p*-phenylene diamine至潤濕為止，取一白金耳之新鮮菌種，沾於上述濾紙上，若呈藍紫色為陽性，淡黃或無色為陰性。

6. 抗生素感受性試驗：以Difco公司出品之抗生素環片 (Difco sensitivity disk) 檢測之。

7. 革蘭氏菌性別判定¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾：取一滿白金耳之新鮮菌種塗於已沾一小滴3%KOH之載玻片上塗抹，若會凝聚且可以火柴棒或白金耳拉成絲狀者為革蘭氏陰性菌，若不凝聚則為陽性菌。若有疑問者再以革蘭氏染色法⁹⁾行染色判定。

8. 5°C及40°C之發育試驗：

接種於Nutrient broth，置於5±2°C及40±2°C之恆溫箱中培養觀其是否發育。

結果與討論

一、總生菌數與大腸桿菌

總生菌數除No. 8及No. 10外均在生食標準範圍內 (如表一)。大腸桿菌之MPN/100g，除No. 3、No. 4及No. 8外均超過生食標準。一般而言，大腸桿菌量都過高，上述之No. 3、No. 4及No. 8三個樣品是在春、秋兩季，而No. 8大腸桿菌量雖符合生食條件，但其總生菌數却超過生食標準，所以真正符合生食條件的僅No. 3及No. 4而已。

Table 1. Enumeration of coliforms in oyster and grouping of the isolates

No.	Sampling date	Total bact. count (/g)	<i>E. coli</i> (MPN/100g)	Coliforms			
				Coliform (MPN/g)	Complete test		
				No. of strains tested	No. of strains positive	Grouping test	
1	Sep. 10. '79	2.82×10 ⁴	1.7×10 ³	3.5×10 ³	12	9	1A†-1†, 1-B2, 2B-1 5B-1, 6B-3, 7B-1
2	Oct. 3. '79	1.38×10 ⁴	4.2×10 ³	1.3×10 ³	12	10	1A-1, 1B-2, 2B-1 6B-2, 6C-1, 8B-3
3	Oct. 21. '79	4.80×10 ⁴	2.0×10 ³	3.3×10 ³	12	10	1B-3, 3B-1, 8A-2 8B-3, 9B-1
4	Dec. 3. '79	1.00×10 ⁴	<1.8×10	7.8×10 ³	12	10	1B-1, 1C-1, 4B-3 8A-1, 8B-2, 9B-2
5	Dec. 26. '79	7.70×10 ³	2.2×10 ³	2.6×10 ³	12	7	1B-1, 5B-1, 5C-1 8A-1, 8B-1, 9C-2
6	Jan. 22. '80	7.50×10 ³	2.3×10 ³	3.5×10 ⁴	12	9	1B-2, 2B-1, 6C-1 8B-3, 8C-1, 9A-1

7	Feb. 24.'80	1.20×10^4	2.4×10^3	1.6×10^5	15	13	1A-1, 1B-2, 5B-2 6C-2, 8B-3, 9A-2 9C-1
8	Mar. 21.'80	1.84×10^5	$<1.8 \times 10$	1.8×10	12	2	6B-1, 7B-1
9	Apr. 16.'80	2.20×10^4	1.3×10^3	3.3×10^3	12	10	1A-1, 1B-2, 6B-2 6C-1, 7B-2, 8B-2
10	May 10.'80	1.45×10^5	1.3×10^3	2.4×10^4	12	11	1B-2, 6B-2, 6C-1 8A-1, 8B-1, 8C-1 9B-2, 10B-1
11	May 28.'80	3.70×10^4	6.8×10	1.7×10^3	12	27	1B-3, 9B-1, 9C-1 11B-1, 12B-1

† Group shown in Table 2.

‡ Number of isolates.

二、大腸菌群及分離菌株之群別

一般言之，大腸菌群之MPN約在 $10^3 \sim 10^5/g$ 之間，除No.8 外其餘樣品之陽性菌株比率均高(58.3~86.6%)(表一)。

本試驗所採11個樣品均取130個菌落，經完全試驗結果，得大腸菌群98株，所得菌株依IMViC型、運動性，Gelatinase等分類為12個菌型，各菌型再以 5°C 及 40°C 之發育試驗區分為3群，結果如表二所示：

Table 2. Coliform distribution by IMViC types, motility, gelatinase and growth temperature test.

Grouping by growth temperature							A	B	C	Total
Growth at	40°C						+	+	-	
	5°C	7-10 days								
		6 days								
Type	I	M	Vi	C	Mo	G	+	-	-	
1	+	+	-	-	+	-	4	20	1	25
2	+	+	-	-	-	-		2		2
3	+	+	-	-	+	+		2		2
4	+	+	-	+	+	+		3		3
5	+	+	-	+	+	-		4	1	5
6	+	+	-	+	-	-		10	6	16
7	+	+	-	+	-	+		4		4
8	-	+	-	+	+	-	5	18	2	25
9	-	+	-	+	-	-	3	6	4	13
10	-	+	-	+	-	+		1		1
11	+	-	+	+	-	-		1		1
12	-	-	+	+	+	-		1		1
Total							12	72	14	98

A及C型可在 5°C 發育(低溫性大腸菌群)，其中A型也可在 40°C 發育。B型則僅在 40°C 發育(中溫性大腸菌群)。本試驗共得低溫性大腸菌群26株，佔大腸菌群的26.5%， 5°C 不發育而僅在 40°C 發育者有72株佔73.5%(多係溫血動物排泄物污染而來)，顯示本地區之低溫性大腸菌群比率仍偏低，

污染情形甚為嚴重。

依菌型來分，很明顯的集中在type 1 (+ + - - + -) 25株，type 8 (- + - + + -) 25株，type 6 (+ + - + - -) 16株，type 9 (- + - + - -) 13株，以上四種type佔80.6%。E C test 陽性者在表三中有30株 (*Escherichia coli* I, IV及*Klebsiella aerogenes* IV)。

依E C test及IMViC system分類(如表三)則明顯的集中在*Citrobacter freundii* I (39株) 佔39.8%，*Citrobacter freundii* II (26株) 佔26.5%，這二型合計為65株佔63.3%。其次為*Escherichia coli* I (18株) 佔18.4%，*Escherichia coli* IV (11株) 佔11.2%，這二型合計為29株佔29.6%。以上四型共94株佔95.9%。

Table 3. Taxonomy by EC test and IMViC system of oyster coliforms.

Coliforms No	<i>Escherichia coli</i>				<i>Citrobacter freundii</i>		<i>Klebsiella aerogenes</i>				Total	No. of Strains tested	No. of Coliforms	Other Coliforms
	I	II	III	IV	I	II	I	II	III	IV				
1	3			4	2						9	12	9	0
2	2				5	3					10	12	10	0
3	2			3	5						10	12	10	0
4				2	6	2					10	12	10	0
5					1	5		1			7	12	7	0
6					2	4				1	7	12	9	2
7	5			2	6						13	15	13	0
8					2						2	12	2	0
9	1				4	5					10	12	1	0
10	3				3	5					11	12	11	0
11	2				3	2					7	12	7	0
Total	18	0	0	11	39	26	0	1	0	1	96	135	89	2

No.5. No.6. No.7. 共分離大腸菌群39株，其中有15株為低溫性(佔38.5%)，而其他樣品共分離大腸菌群59株，僅11株為低溫性(佔18.6%)，可說低溫性大腸菌群較集中在冬季。

抗生素感受性試驗如表四所示，在98株大腸菌群陽性株中有94株對青黴素具有抵抗性(Resistance)，91株對紅黴素(Erythromycin)有抵抗性，67株對諾巴黴素(Novomycin)有抵抗性。而感受性(Sensitive)之強度依序為Chloromycetin > tetracycline > streptomycin > Kanamycin > neomycin，此結果與前報¹⁾有相同之傾向。

Table 4. Sensitivity of the 98 strains of coliforms from oyster to antibiotics.

Resistant Antibiotic	<i>Escherichia coli</i>				<i>Citrobacter freundii</i>		<i>Klebsiella aerogenes</i>				Others	Total	
	I	II	III	IV	I	II	I	II	III	IV			
Novomycin	13			7	28	18						1	67
Tetracycline	7			4	15	9						2	37
Erythromycin	16			9	37	25		1		1		2	91
Penicillin	17			10	38	25		1		1		2	94

Streptomycin	5	3	11	7	1	27
Chloromycetin	6	4	12	9	1	32
Kanamycin	3	1			1	5
Neomycin	4	2	9	4	2	21

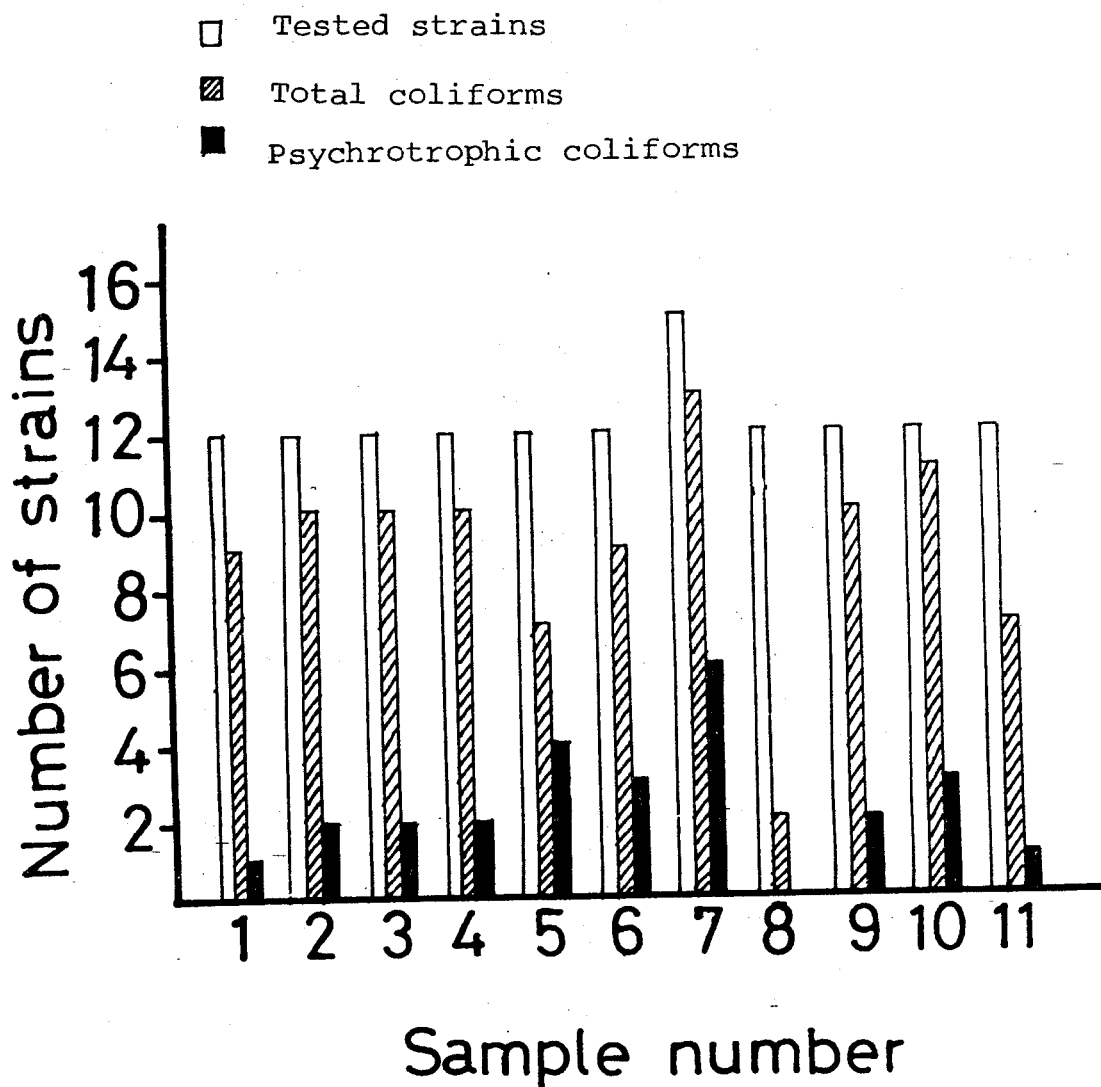


Fig. 1. Distribution of psychrotrophic coliforms in oyster

摘 要

1. 所採11個樣品中僅No. 3及No. 4符合生食標準。
2. 由135個菌落分離出大腸菌群陽性株98株，依IMViC型、運動性及Gelatinase可分12型，再依5°C及40°C發育情形可分3群。
3. 本試驗低溫性大腸菌群，僅佔所分離大腸菌群的26.5%，顯示受溫血動物排泄物污染甚為嚴重。
4. 本地區低溫性大腸菌群在冬季比率較大（38.5%），而春、秋兩季只佔18.6%。
5. 分離菌株集中在 *Citrobacter freundii* I (39.8%)，*Citrobacter freundii* II (26.5%)，*Escherichia coli* I (18.4%)，*Escherichia coli* IV (11.2%)。
6. 一般而言本地區之大腸菌群對青黴素、紅黴素及諾巴黴素具有抵抗力，而對氯黴素、四環素及鏈黴素之感受性甚大，此結果與前報¹⁾有相同之傾向。

謝 辭

本試驗係執行農發會「生鮮貝類之衛生處理及凍結貯藏研究計畫，69農建—5.1—產—022（2）」之部分結果，對農發會之經費補助及李所長燦然博士之鼓勵謹申謝忱。又本系同仁駱秋燕小姐、張憲章先生對實驗上之協助，鄭溪潭先生之協助採樣一併致謝。

參 考 文 獻

1. 王文亮等 (1979)：台灣產牡蠣之低溫性大腸菌群分佈，台灣省水產試驗所報告第31號，pp321~331。
2. 食品衛生の小六法 (1977)：法令—1，食品衛生p158，厚生省。
3. Wallace H. Andrews and Maynard W. Presnell (1978)：Rapid Recovery of *Escherichia coli* from Estuarine Water, U. S. Department of Health.
4. 堀江進等 (1975)：土壤における低溫性大腸菌群の分布，食衛誌Vol 16. No5, pp324~329。
5. 堀江進等 (1976)：市販むき身カキにおける低溫性大腸菌群の分布，日水會誌42 (1)，131。
6. FDA (1976)：Bacteriological Analytical Manual, Chapter V.
7. 蔡土及 (1979)：水產細菌學，p. 13, pp17~20, p55。農復會特刊第33號。
8. American Public Health Association (1976)：Compendium of Method for the Microbiological Examination of Food, p83, p89, pp277~300。
9. Tetsuo Lino and Masatoshi (1971)：Method in Microbiology, Vol. 5A, pp146~147.
10. T. Gregersen (1978)：Rapid Method for Distinction of Gram-Negative from Gram-Positive Bacteria. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 5, 123~127.
11. Pyv, E (1938)：On the Gram-Differentiation of Bacteria by the Simplest Method. J. Jpn. Soc. Vet Sci 17 p 31.
12. Ryu, E (1940)：A Simple Method of Differentiation between Gram-Positive and Gram-Negative Organisms without Staining. Kitasato Arch. Exp. Med 17, 58~63.