

台灣產牡蠣之低溫性大腸菌群分佈

王文亮 · 馮貢國 · 陳茂松

Studies on Psychrotrophic Coliforms Distribution in Cultured Oyster

Wen-Liang WANG, Kung-Kuo FENG and Mao-Song CHEN

Fifteen samples of oyster were collected from the culture area (unshucked) and market (shucked). Oyster were cultured with long-line or off-bottom method before bacteriological analysis.

Most of samples were inadequate for eating raw without cooking. According to IMViC, motility and gelatinase test, 135 coliform isolates were classified into 23 types, each was subdivided into 5 group on the basis of growth ability at 5 and 40°C. Of these coliforms there were 8 types: type 1 (16 strains), type 2 (11 strains), type 16 (10 strains), type 4 and type 15 (9 strains), type 3, type 6 and type 18 (8 strains) accounted for 58.5% of the total. Generally, the distribution of types mentioned above is rather homogeneous.

On the other hand, 23.7% of all coliform strains were psychrotrophic, it was clear that the mesophilic coliforms contributed a relatively large amount (76.3%) to total coliform isolated. Among 82 coliform isolates in winter, 22 strains (26.8%) were psychrotrophic, while among 53 coliform isolates in autumn and spring, 10 strains (18.9%) were psychrotrophic.

Coliforms in oyster sampling from Keelung market, Wang Kung, Lu Kang, Chien Liao and Tsai Yuan were sensitive to chloromycetin and tetracycline, while others were only sensitive to tetracycline.

前 言

牡蠣為本省主要淺海養殖貝類之一，從古至今生鮮牡蠣一直被認為是最珍貴的食品，但因牡蠣等貝類易於蓄積大量微生物，因而常由生食牡蠣引起肝炎、傷寒、霍亂及赤痢等消化系統傳染病（68年6月底屏東林邊就發生了生食牡蠣集體食中毒案），因此歐美、日本及我國對生食牡蠣之衛生要求均甚嚴格：規定生菌數在 5×10^4 個/公克以下，大腸菌MPN 230個/100公克以下¹⁾²⁾，又美國對於貝類養殖場水質之衛生亦有特別要求：大腸菌羣70個/100毫升以下，大腸菌14個/100毫升以下³⁾。

大腸菌羣包括糞便大腸菌羣 (Fecal coliforms) 及非糞便大腸菌羣 (Non-fecal coliforms) 後者廣泛存在於土壤、水等自然環境中，而前者多屬於溫血動物之腸內細菌，在食品衛生法上常以此類細菌做為食品污染之指標⁴⁾。糞便大腸菌羣和大腸菌羣一樣，至今在分類學上沒有適當的地位⁴⁾，堀江進等⁵⁾⁶⁾認為溫血動物腸管存在的大腸菌羣會在40°C以上的高溫發育，而不會在5°C以下的低溫發育，並以土壤、川水之泥土及剝殼之牡蠣進行調查結果，發現低溫性大腸菌羣分布廣泛。又鈴木⁷⁾以E.C test和IMViC系統及坂崎⁷⁾以IMViC, gelatinase和44°C之發育來分類大腸菌羣均顯示低溫性大腸菌羣廣泛分布於自然界中，本試驗之目的乃在於深入瞭解本省產牡蠣之衛生狀況及低溫性大腸菌羣所佔比率、菌型等並加以檢討。

材 料 與 方 法

一、樣品：除購自基隆市仁愛市場者為已剝殼者外，其餘均採自養殖場、魚塭蓄養及港內蓄養之帶殼牡蠣，並以牡蠣產量較多者為採樣地點。

二、樣品之處理：自67年10月7日至68年5月22日共採取15個樣品（如表一），樣品採取後封於塑膠袋中以碎冰保溫帶回實驗室。

各樣品均採取5g於稀釋瓶中，注入無菌生理食鹽水45ml，以超音波高速乳化器均質5min (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 bat. 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⁸⁾⁹⁾：

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

3. 大腸菌羣 (Coliforms) MPN之測定與菌株之分離⁵⁾⁶⁾：

依圖 1之程序檢測之。

四、生化學檢測法：

1. IMViC：依FAD法檢測之¹⁰⁾。

2. 運動性：以懸滴法 (hanging drop method)¹¹⁾檢測之。

3. Gelatinase：依蔡³⁾法檢測之。

4. 硝酸鹽還元性：依常法⁴⁾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¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾：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⁴⁾行染色判定。

8. 5°C 及 40°C 之發育試驗：

接種於Nutrient broth，置於 $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 及 $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 之恒溫箱中培養觀其是否發育。

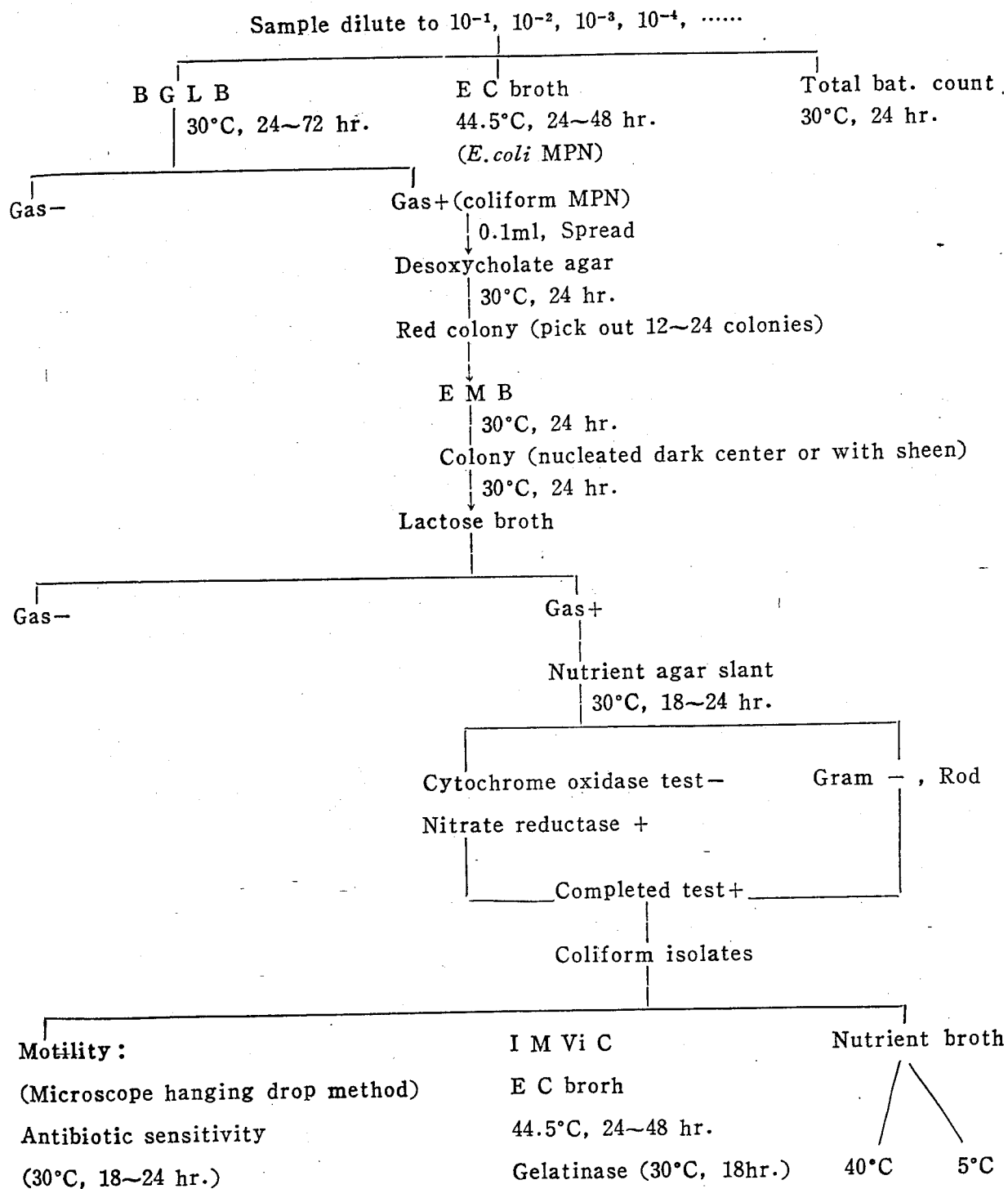


Fig 1. Scheme for the determination of TBC, *E. coli* MPN, coliform MPN and identification of the isolates.

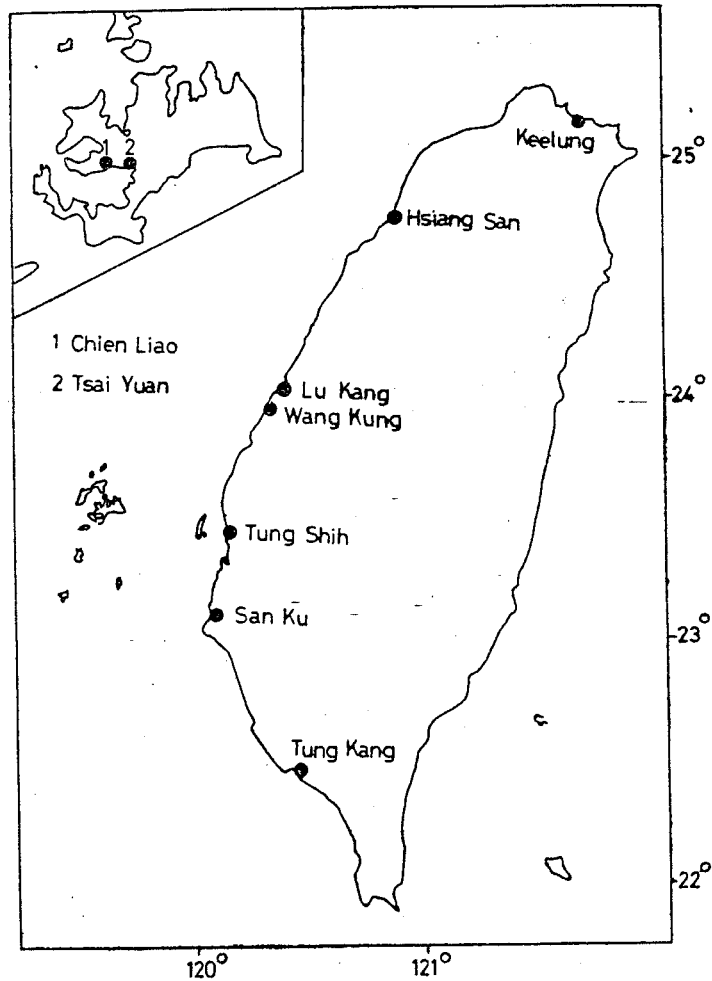


Fig 2 Sampling station

結果與討論

一、總生菌數：

在基隆仁愛市場所採的 2 個樣品 (No.1, No.8) 都在 $10^5/g$ 以上；新竹香山 (No.2) 超過 $10^6/g$ ；彰化王功 (No.5) 和鹿港 (No.6) 都在標準量以下；嘉義東石 6 個樣品中有 2 個 (No.3, No.12) 超過 $10^5/g$ ，其餘 4 個在標準量下；臺南三股 (No.11) 超過 $10^5/g$ ；屏東東港 (No.7) 及澎湖的前寮 (No.14) 和菜園 (No.15) 各 1 個樣品都在標準量以下 (如表一)

二、大腸菌：

除了澎湖、東港及東石的 2 個樣品外，其餘 10 個樣品都在標準量以上，其中以市場採得者較為嚴重，一般而言垂下式養殖者要比插筊法大腸菌 MPN 低。值得一提的是垂下式養殖之牡蠣，在港內蓄養者受魚市場及都市廢水之污染，而魚塢蓄養則時常施肥 (動物糞便)，其大腸菌 MPN 反比陳等¹⁵⁾ 報告中之淺海養殖者為低，是因季節抑或糞便已醱酵過，或係其他原因，仍待日後究明。

四、大腸菌羣及分離菌株之羣別：

關於大腸菌羣之 MPN 有 8 個樣品在 $10^2 \sim 10^4$ 個/g，其餘 7 個在 1.8~4.9 個/g 之間，其中 No.3 (東石) 所鈎取的 12 個菌落沒有一株是陽性 (魚塢蓄養，已施過肥)。此外，No.7、No.14 及 No.15 的陽性株數也很低，其他則陽性比率都很高 (50~100%) (表一)。

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

No.	Sampling			Total bact. count(/g)	E. coli (MPN/100g)	Coliform (MPN/g)	Complete test		Grouping test
	Station	Date	Culture type				No. of Strains tested	No. of Strains positive	
1	Keelung market	Oct. 7, '78	unknown	2.84×10^7	7.9×10^4	2.4×10^4	24	20	⁺ 1E-1, 2B-6, 3A-1, 4A-3, 8B-1, 9B-1, 14B-3, 15D-3, 16B-1
2	Hsiang San	Sep. 8, '78	long-line	2.02×10^6	7.0×10^4	3.5×10^3	24	10	2B-1, 3B-1, 4B-1, 4E-2, 5B-1, 11B-3, 16E-1
3	Tung Shih	Sep. 16, '78	long-line *2	1.33×10^5	$< 1.8 \times 10$	1.0×10^2	12	0	
4	Tung Shih	Dec. 4, '78	long-line *2	3.40×10^3	4.5×10^2	1.3×10	12	11	1B-11
5	Wang Kung	Dec. 9, '78	off-bottom	2.14×10^4	1.7×10^4	1.6×10^3	24	22	3B-2, 3C-1, 9B-6, 11E-1, 12B-1, 15A-1, 18B-4, 20C-3, 22D-1, 22E-1, 23B-1
6	Lu Kang	Dec. 9, '78	off-bottom	1.40×10^4	3.3×10^3	3.5×10^2	18	12	2B-3, 5B-3, 15B-1, 16B-2, 17D-2, 18B-1
7	Tung Kang	Dec. 23, '78	long-line *2	3.75×10^4	$< 1.8 \times 10$	1.8	12	3	1B-3
8	Keelung market	Feb. 6, '79	unknown	3.17×10^5	1.4×10^4	1.6×10^3	24	12	1B-1, 2D-1, 6B-2, 12D-1, 13D-1, 13E-1, 15C-1, 19D-1, 19E-1, 21B-1, 22B-1
9	Tung Shih	Feb. 7, '79	long-line *2	1.40×10^4	7.8×10^2	2.4×10^3	12	12	6B-1, 6C-1, 8B-1, 15B-3, 16B-3, 19B-1, 21B-1, 23C-1
10	Tung Shih	Mar. 7, '79	long-line *2	5.20×10^3	4.0×10^3	4.9×10	12	9	5B-2, 6B-2, 7B-2, 10B-1, 11A-1, 20A-1,
11	San Ku	Mar. 20, '79	long-line *2	2.90×10^5	3.3×10^3	4.9×10	12	7	3B-3, 4B-3, 7B-1
12	Tung Shih	Apr. 14, '79	long-line *2	1.70×10^6	1.7×10^2	1.6×10^3	12	9	5B-1, 6B-1, 10B-2, 16B-1, 18B-2, 19B-1
13	Tung Shih	Apr. 23, '79	long-line *2	2.10×10^4	9.1×10^2	2.0×10	12	6	6B-1, 16B-2, 17B-1, 18B-1, 19B-1
14	Chien Liao	May. 22, '79	long-line	1.34×10^4	$< 1.8 \times 10$	4.0	12	1	13B-1
15	Tsai Yuan	May. 22, '79	long-line	1.80×10^4	$< 1.8 \times 10$	1.8	12	1	13B-1

*1 All unshucked except Keelung market.

*2 Kept in fishing port

*3 Kept in table 2

*4 Kept in fish pond.

*5 Number of strains

本試驗所採15個樣品，其鈎取 234個菌落，經完全試驗結果，得大腸菌羣 135菌株，所得菌株依 IMViC型，運動性，Gelatinase等分類為23菌型，各菌型再以 5°C及40°C之發育試驗區分為 5 羣，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	D	E	Total
Growth at	40°C						+	+	-	-	+	
	5°C	7~10days					+	-	+	+	+	
		6 days						+	-	-	+	
Type	I	M	Vi	C	Mo	G						
1	+	+	-	-	+	-	15				1	16
2	-	+	-	-	+	-	10			1		11
3	-	+	-	-	-	-	1	6	1			8
4	-	+	-	+	-	-	3	4			2	9
5	-	+	-	+	+	-	7					7
6	+	+	-	+	+	-	7	1				8
7	+	+	-	+	-	-	3					3
8	-	-	+	+	+	-	2					2
9	-	-	+	+	-	-	7					7
10	+	-	+	+	-	-	4					4
11	+	-	+	+	-	+	1	3			1	5
12	-	-	+	-	-	-	1			1		2
13	-	-	+	-	+	-	2			1	1	4
14	-	-	+	+	-	-	3					3
15	-	-	+	+	+	-	1	4	1	3		9
16	-	+	+	+	+	-	9				1	10
17	+	-	+	+	+	-	1			2		3
18	+	+	+	-	+	-	8					8
19	+	+	+	+	+	-	3			1	1	5
20	+	+	+	+	-	-	1		3			4
21	-	-	-	+	+	-	2					2
22	+	+	+	+	+	+	1			1	1	3
23	-	-	-	+	-	-	1	1				2
Total							7	103	7	10	8	135

A.C.D.E等型可在5°C發育(低溫性大腸菌羣)，其中A與E兩型也可在40°C發育，B型則僅能在40°C發育(中溫性大腸菌羣)。本試驗共得低溫性大腸菌羣32株，佔大腸菌羣的23.7% (多係由土壤、水中而來)，5°C不發育而僅在40°C發育者有103株佔76.3% (多係由溫血動物污染而來)，比廬江進等⁶⁾之報告：低溫性大腸菌羣佔75.8%，顯然本省牡蠣所含之低溫性大腸菌羣比率偏低，可見污染較為嚴重。

依菌型來分，type 1 (+ + - - + -) 16株、type 2 (- + - - + -) 11株、type 16 (- + + + -) 10株、type 4 (- + - + - -)、type 15 (- - + + + -) 各9株、type 3 (- + - - - -)，type 6 (+ + - + + -)，type 18 (+ + + - + -) 各8株，以上各型佔58.5%，其餘各種型各2~7株不等甚為平均，並無明顯集中之傾向。一般而言，具有運動性者有88株，佔大腸菌羣陽性菌株的65.2%，而具有Gelatinase的只有8株，僅佔5.9% (表二)。E.C test陽性者在表三中有33株，未能依表三分類而列入其他者有17株共51株佔37.8%。

依季節而分，在11~2月共分離出大腸菌羣82株，其中低溫性佔22株(26.8%)，中溫性佔60株(73.2%)；在10月、3~5月等4個月中共得53株大腸菌羣，低溫性佔10株(18.9%)，中溫性佔43株(81%)。

依採集地點而言，基隆仁愛市場的2個樣品所含低溫性大腸菌羣(圖3)，No.1有8株(佔該樣品大腸菌羣陽性株之40.0%)，No.8有7株(佔該樣品大腸菌羣陽性株之58.3%)，所佔比例相當大，可能是因為漁民或中間販將剝好殼的牡蠣浸漬淡水(用來增重)，而在產地至消費市場之輸送過程，由於氣溫不高致從自然界之土壤或水而來的低溫性大腸菌羣，在整個大腸菌羣的羣落(Flora)中，逐漸佔優勢所致⁶⁾。雖然採樣地點不同不易加以比較，但一般而言，在冬季之大腸菌羣數並不比秋、春兩季少，且經完全試驗後之大腸菌羣所佔比率也是具有相同的結果，然低溫性大腸菌羣所佔的比率較大者，却似乎集中在冬季(32株低溫性大腸菌羣中佔22株)。

抗生素感受性試驗如表四所示，在135株大腸菌羣陽性株中有133株對青黴素(Penicillin)具有抵抗力(Resistance)，而有128株對紅黴素(Erythromycin)具有抵抗力。而感受性(Sensitive)以氯黴素(Chloromycetin)最強，其次為康納黴素(Kanamycin)，再次為鏈黴素(Streptomycin)，但是氯黴素的溶菌環(Clear zone)却不及康納黴素透明清晰。

雖然抗生素對於魚介之保藏，大多數國家現已不用，然其對細菌之生理與化學性質之研究以及鑑定方面的功用仍是大家研究之主題，本試驗乃供菌株鑑定之參考及做為今後分離具有R-factor菌株之參考。

一般而言，基隆市仁愛市場、王功及鹿港等地之菌株對紅黴素、青黴素及諾巴黴素(Novobiocin)具有抵抗力，而對氯黴素及四環素(Tetracycline)之感受性最大，香山、東石、三股及東港等地之菌株則對四環素感受性不大，而澎湖之菌株則僅對青黴素、紅黴素有抵抗力，對氯黴素及四環素之感受性甚大。

摘 要

1. 冬季蓄養之牡蠣，即使時常施肥，其大腸菌羣MPN仍比在淺海中養殖者為低，其因仍待研究。
2. 由234個菌落分離出大腸菌羣陽性135株，依IMViC型，運動性及Gelatinase可分為23型，再依5°C及40°C可分為5羣。
3. 所採15個樣品中僅No.7, No.14, No.15, 等符合生食標準，但這3個樣品却不含低溫性大腸菌羣，在大腸菌羣量多的幾個樣品中低溫性大腸菌羣比率反而比大腸菌羣量少者為大。
4. 本試驗共得低溫性大腸菌羣32株，僅佔所分離大腸菌羣的23.7%，而中溫性大腸菌羣比率甚大，顯示大部分樣品受到溫血動物的污染。

Table 3. Taxonomy by E.C test and IMViC system of oyster coliforms in Taiwan area.

coliforms Station	<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				
	Keelung market	1	6		4			1						
Hsiang San		1		1	2			3				24	10	3
Tung Shih												12	0	0
Tung Shih	11											12	11	0
Wang Kung		1		2			3	1	3			24	22	12
Lu Kang				3					1			18	12	8
Tung Kang	3											12	3	0
Keelung market	1	1				2						24	12	8
Tung Shih						2						12	12	5
Tung Shih					2	4		2				12	9	1
San Ku				3	2	1						12	7	1
Tung Shih						1						12	9	8
Tung Shih					1	1		3				12	6	1
Chien Liao												12	1	1
Tsai Yuan								1				12	1	0
Total	16	9	0	13	7	11	9	8	2	4	79	234	135	56

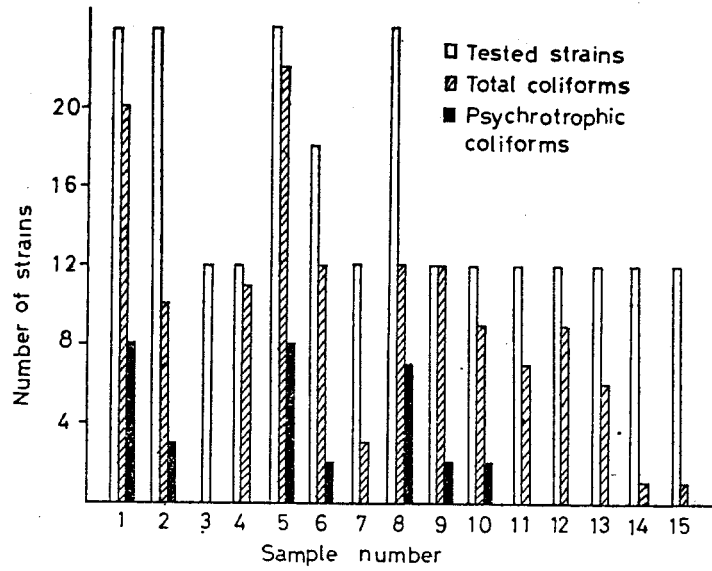


Fig 3 Distribution of psychrotrophic coliforms in oyster

Table. 4 Sensitivity of the 135 strains of Coliforms from oyster to antibiotics.

Resistant Antibiotics	<i>Escherichia coli</i>				<i>Citrobater freundii</i>		<i>Klebsiella aerogenes</i>				Others	Total
	I	II	III	IV	I	II	I	II	III	IV		
Novobiocin	16	9		13	7	10	8	3	1	2	41	110
Tetracycline	13	2		11	4	3		2			7	42
Erythromycin	16	9		10	6	8	9	8	2	4	56	128
Penicillin	17	9		11	6	11	9	8	2	4	56	133
Streptomycin	2						1				9	12
Chloromycetin	8	1									2	11
Kanamycin	8	1									1	10
Neomycin	10	1				2	2				16	31

5. No.1, No.8 兩個樣品低溫性大腸菌羣所佔比率較大，可能受浸漬淡水的影響，一般而言，低溫性大腸菌羣在冬季佔有較大的比率，唯因採樣地點分散，尚需以一定點做進一步的確認。
6. 基隆市場、王功、鹿港及澎湖等地之菌株對氯霉素及四環素之感受性甚大，而香山、東石及三股等地則對四環素感受性不大。

謝 辭

本試驗係執行農復會「生鮮牡蠣之衛生處理及凍結貯藏計畫，79-33-0-211」之部分結果，對農復會之補助試驗經費及已故技正陳金城先生之鼓勵，臺大農化系林良平教授之協助解決試驗上的困難，謹申謝忱。

參 考 文 獻

- 1) 中華民國行政院衛生署藥字第164300號，生食用食品類衛生標準 (1977)。
- 2) 佐藤忠勇 (1966)：かきの衛生と浄化，養殖Vol.3 No.8 P52~55。
- 3) 蔡士及 (1979) 水產細菌學，p13, pp17~20, p55。農復會特刊第33號。
- 4) American Public Health Association (1976)：Compendium of Method for the Microbiological Examination of Food, p83, p89, pp277~300。
- 5) 堀江 進等 (1975)：土壤における低溫性大腸菌羣の分布，食衛誌Vol 16. No5, pp324~329。
- 6) 堀江 進等 (1976)：市販むき身カキにおける低溫性大腸菌羣の分布，日水會誌42(1)，131~135。
- 7) 齋藤恒行等編 (1974)：水產生物化學、食品學實驗書pp409~424。
- 8) 食品衛生の小六法 (1977)：法令—1，食品衛生p158，厚生省。
- 9) Wallace H. Andrews. Maynard W. Presnell (1978)：Rapid Recovery of *Escherichia coli* from Estuarine Water, U. S. Department of Health.
- 10) FAD (1976)：Bacteriological Analytical Manual, Chapter V.
- 11) Tetsuo Lino and Masatoshi (1971)：Method in Microbiology, Vol.-5A, pp146~147.
- 12) T. Gregersen (1978)：Rapid Method for Distinction of Gram-Negative from Gram-Positive Bacteria. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 5, 123~127.]
- 13) Ryu, E (1938)：On the Gram-Differentiation of Bacteria by the Simplest Method. J. Jpn. Soc. Vet Sci 17 p 31.
- 14) Ryu, E (1940)：A Simple Method of Differentiation between Gram-Positive and Gram-Negative Organisms Without Staining. Kitasato Arch. Exp. Med 17, 58~63.
- 15) 陳茂松、吳純衡(1978)：牡蠣之人工浄化試驗，臺灣省水產試驗所報告第30號，pp373~381。
- 16) The Shorter Bergey's Manual Determinative Bacteriology. 8 Edition (1977).
- 17) 瀧田聖親 (1976)：食品衛生における大腸菌の意義とその検査法について。New Food Industry, Vol. 8, No.7, pp35~42.