

市售三种食用贝类可培养细菌多样性研究

张媛^{1,2}, 徐晓津^{1,2}, 黄力行^{1,2}, 赵玲敏^{1,2}, 鄢庆枇^{1,2,3}

(1. 集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 福建省天马科技股份有限公司, 福建省特种水产饲料重点实验室, 福建 福州 350308)

[摘要] 为了解厦门市售三种食用贝类中可培养细菌的多样性, 用自制培养基培养牡蛎、缢蛏、疣荔枝螺样品中的细菌, 并根据 16S rDNA 测序结果, 对所分离的细菌进行鉴定并进行系统发育分析。研究结果显示: 从牡蛎中分离得到的 35 株细菌分属 14 个种, 从缢蛏中分离得到的 32 株细菌分属 16 个种, 从疣荔枝螺中分离得到的 31 株细菌分属 7 个种。结果表明市售牡蛎、缢蛏、疣荔枝螺体内含有较为丰富的细菌种类, 而且分离得到的细菌(如解鸟氨酸拉乌尔菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌等)大多数具有致病性, 对食用人群具有潜在威胁, 不建议直接生食或食用加工不当的贝类产品。

[关键词] 牡蛎; 缢蛏; 疣荔枝螺; 细菌多样性; 致病性

[中图分类号] Q 939

Cultivable Bacterial Diversity of Three Kinds of Retail Edible Shellfish

ZHANG Yuan¹, XU Xiaojin¹, HUANG Lixing¹, ZHAO Lingmin¹, YAN Qingpi^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea (Ministry of Agriculture), Xiamen 361021, China; 3. Fujian Tianma Technology Company Limited & Key Laboratory of Special Aquatic Feed for Fujian, Fuzhou 350308, China)

Abstract: In order to understand the diversity of culturable bacteria in three types of edible shellfish commercially available in Xiamen, the bacteria isolated from *Ostrea plicatula*, *Sinonovacula constricta* and *Thais clavigera* were cultured with self-made medium. The species of bacteria were identified and phylogenetic analysis was carried out according to the results of 16S rDNA sequencing. The results showed that the 35 strains isolated from *Ostrea plicatula* belong to 14 species, the 32 strains isolated from *Sinonovacula constricta* belong to 16 species, and the 31 strains isolated from *Thais clavigera* belong to 7 species. The results indicated that commercially available oyster, sinonovacula and rock whelk are rich in bacteria, and most of the isolated bacteria (such as *Raoultella ornithinolytica*, *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*, etc.) were pathogenic. So it is not recommended to eat improperly processed shellfish products or the raw shell fish.

Keywords: *Ostrea plicatula*; *Sinonovacula constricta*; *Thais clavigera*; bacterial diversity; pathogenicity

0 引言

水产品含有丰富的蛋白质和各种特有的脂肪酸、维生素、矿物质等多种营养保健成分, 是人类重

[收稿日期] 2018-01-21

[修回日期] 2018-04-24

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31672694); 福建省科技重大专项(2016NZ0001-3)

[作者简介] 张媛(1992—), 女, 硕士生, 从事水产微生物学研究。通信作者: 鄢庆枇(1971—), 教授, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn。

要的食物源之一^[1]。当今,世界各国都十分关心食品安全,已报道的食源性疾病的致病因素有 250 种之多^[2]。福建省地处沿海地区,海产资源丰富^[3],人们喜食各种海产贝类,如紫贻贝、花蛤、疣荔枝螺、缢蛏和牡蛎等。这些常见的食用贝类大多为滤食性生物,主要以海水中的藻类和浮游生物为食^[4]。据世界卫生组织估计,全世界每年数以亿计的食源性疾病患者中,有 70% 是由于各种致病性微生物污染了食品和饮水引起的^[5]。近几年,关于食用贝类引发疾病的报道屡见不鲜,贝类污染也受到广泛关注。腹泻性贝类毒素^[6]、重金属污染^[7]、微囊藻毒素^[8]、诺如病毒^[9]、副溶血弧菌^[10]都被证实可以引发疾病。虽传统可培养方式能培养的细菌只占细菌总数的一小部分^[11],但其仍然十分重要,因为只有当细菌成功被培养,他们的作用才能被评估^[12]。

为了了解厦门水产品所含的菌群结构,本文选取三种常见市售食用贝类,通过自制培养基分离贝类中的可培养细菌,经纯化后用 16S rDNA 鉴定细菌的种类,以期增进对水产品中细菌多样性的认识,并为食品安全提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

牡蛎 (*Ostrea plicatula*)、缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 和疣荔枝螺 (*Thais clayigera*) 于 2016 年 4 月中旬购自集美区集美菜市场及各大超市生鲜区。

培养基:蛋白胨 5.0 g,牛肉膏 1.5 g,贝类组织 20 g (贝类全部壳内组织匀浆、熬煮、过滤去除滤渣),NaCl 5.0 g,琼脂 15.0 g。加蒸馏水至 1 L, pH 值为 (7.3 ± 0.1), 115 °C 灭菌 20 min。

1.2 仪器与设备

高压灭菌锅 (日本 Tomy 公司), BS223S 型电子天平 (北京赛多利斯公司), PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司), DYY-6C 型电泳仪、DYY-Ⅲ型水平电泳槽 (北京六一仪器厂), BioDoc-It 型凝胶成像仪 (美国 UVP 公司), 组织研磨仪 (上海净信实业发展有限公司 Tissue Lyser II), Shinesso 迅数全自动菌落计数仪 (杭州迅数科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 样品处理与细菌分离培养

按无菌操作要求,用无菌塑料袋购买三种贝类,带回实验室用灭菌海水将样品表面洗净,用组织研磨仪将三种贝类的壳内组织分别制成匀浆悬浊液,并将不同地点采集的同种样品等比例混匀,再用二层纱布过滤,取组织悬液按 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 共 6 个梯度进行稀释,分别取 200 μL 涂布于自制培养基平板。置于 28 °C 的培养箱中培养 24 h。

1.3.2 细菌的筛选与纯化

根据平板上菌落的大小、形状、颜色、边缘、表面隆起、光滑度、透明度等特征,分别选取不同特征的菌落若干,平板划线分离 3 次达到纯培养后,用 20% 甘油生理盐水保存于 -80 °C 超低温冰箱。

1.3.3 细菌 DNA 提取

分别取 1 mL 经过夜培养的菌液,按照 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN DP302) 的要求,提取菌液 DNA。取 5 μL DNA 产物在 1.2% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳上进行电泳。

1.3.4 PCR 扩增

使用细菌通用引物 27F: 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCA - 3'; 1492R: 5' - GGTTACCTTGT-TACGACTT - 3', 进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 70 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。反应结束后,取 5 μL DNA 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳上进行电泳。将 PCR 产物送往上海美吉生物公司进行 16S rDNA 测序。

1.3.5 16S rDNA 基因序列测定及构建系统树

将所得的 16S rDNA 基因序列在 NCBI 中用 BLAST 程序进行比对,选取与分离菌株相似度最高的

标准株,用MEGA 7.0软件以邻接法(neighbor-joining)构建系统进化树,bootstrap 设为1000次。

2 结果与分析

经过初筛和分离纯化后,根据菌落特征分别从牡蛎样品中挑选35个单菌落,从缢蛏样品中挑选32个单菌落,从疣荔枝螺样品中挑选31个单菌落,分别测定这些单菌落的16S rDNA序列。结果显示:牡蛎分离得到的菌株分别属于细菌域2个门(变形菌门Proteobacteria、厚壁菌门Firmicutes),7个科(肠杆菌科Enterobacteriaceae、希瓦氏菌科Shewanellaceae、假单胞菌科Pseudomonadaceae、莫拉菌科Moraxellaceae、气单胞菌科Aeromonadaceae、弧菌科Vibrionaceae、链球菌科Streptococcaceae),9个属(肠杆菌属Enterobacter、希瓦氏菌属Shewanella、假单胞菌属Pseudomonas、冷杆菌属Psychrobacter、气单胞菌属Aeromonas、拉乌尔菌属Raoultella、发光杆菌属Photobacterium、弧菌属Vibrio、乳球菌属Lactococcus),具体分离得出的菌株组成与各种菌在全部分离菌中的占比见图1a。缢蛏分离得到的菌株分别属于细菌域2个门(变形菌门Proteobacteria、厚壁菌门Firmicutes),7个科(气单胞菌科Aeromonadaceae、莫拉菌科Moraxellaceae、肠杆菌科Enterobacteriaceae、希瓦氏菌科Shewanellaceae、弧菌科Vibrionaceae、链球菌科Streptococcaceae、芽孢杆菌科Bacillaceae),10个属(气单胞菌属Aeromonas、不动杆菌属Acinetobacter、拉乌尔菌属Raoultella、柠檬酸杆菌属Citrobacter、克雷伯氏菌属Klebsiella、变形杆菌属Proteus、希瓦氏菌属Shewanella、弧菌属Vibrio、乳球菌属Lactococcus、芽孢杆菌属Bacillus),具体分离情况及占比见图1b。疣荔枝螺分离得到的细菌属于1个门(变形菌门Proteobacteria),2个科(希瓦氏菌科Shewanellaceae、弧菌科Vibrionaceae),3个属(发光杆菌属Photobacterium、希瓦氏菌属Shewanella、弧菌属Vibrio),见图1c。

虽然3种贝类中都分离得到变形菌门的希瓦氏菌科和弧菌科细菌,但3种贝类体内细菌的种类及多样性有所不同。疣荔枝螺体内细菌的多样性最低,缢蛏体内细菌的多样性最高。

3 讨论

本文用自制培养基从三种食用贝类中培养出大量细菌。由于自制培养基中加入了相应贝类组织的

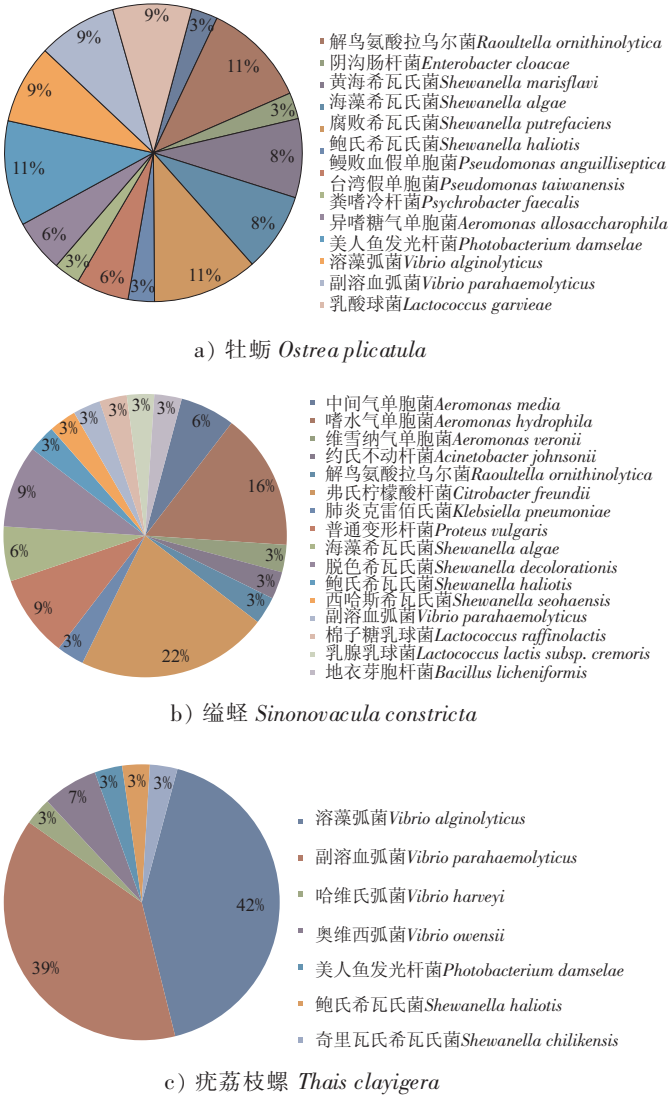


图1 牡蛎、缢蛏、疣荔枝螺中的细菌组成及占比
Fig.3 The composition and proportion of bacteria isolated from *Ostrea plicatula*, *Sinonovacula constricta* and *Thais clayigera*

提取液,更适合贝类中细菌的生长,本研究平板上菌落的形态和数量都远超营养琼脂培养基。从三种贝类中挑取的细菌数量基本一致,细菌组成最复杂的是缢蛏,而疣荔枝螺的细菌组成则最为简单。

由牡蛎中分离得到的细菌大部分属于希瓦氏菌与弧菌。希瓦氏菌广泛分布在自然界中,尤其是在海洋环境中,是兼性厌氧类群,同时也是导致海产品腐败的主要细菌之一^[13]。海洋弧菌广泛分布于各类与海洋有关的水域中,数量极为丰富,它们通常占沿岸和外洋海水中可培养异养细菌数量的10%~50%,并且海洋弧菌广泛分布于海洋生物的体表和体内,如珊瑚、鱼类、软体动物、海草、海绵、虾类和浮游动物等,是海洋生物的正常优势菌群,也是海洋环境中常见的危害鱼类、甲壳类和贝类等海洋水产动物的条件致病菌^[14]。

由缢蛏中分离得到的细菌大部分属于肠杆菌、气单胞菌与希瓦氏菌。在贝类养殖过程中其菌群组成具有明显的陆源性特点,革兰阳性菌占有绝对的优势,肠杆菌也为优势菌,说明滩涂贝类养殖环境受到陆源性的影响明显^[15]。气单胞菌广泛分布于淡水、河口与海洋中,是水体中无处不在的水生生态系统的常见细菌,同时也是重要的肠道致病菌^[16]。

由疣荔枝螺中分离得到的细菌大部分属于弧菌,可与海洋弧菌的广泛分布特性相互印证,同时与本实验从牡蛎中分离出的优势菌种有所重合(如副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*) 在两种贝类中均为优势菌种)。

大部分食源性致病菌在70℃左右加热10 min即可杀死,温度越高,加热时间可越短^[17]。生食或食用未充分煮熟的海产品,易引起相关食源性疾病。2009年Morais等^[18]首次报道了解鸟氨酸拉乌尔菌(*Raoultella ornithinolytica*)感染人类的病例,该菌可引起人类机体体温上升、支气管痉挛,并引发胆道疾病^[19]。感染溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)后,人体会出现恶心、呕吐、腹泻等症状,并会导致蜂窝组织炎、中耳炎、甚至是败血症等疾病^[20]。近年来副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)引发的食物中毒发生率呈现逐年上升趋势,副溶血弧菌现已成为引起我国沿海地区、许多亚洲国家及美国墨西哥湾沿岸地区食物中毒的首要食源性致病菌^[21]。维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)可以引起人体胃肠道感染,伤口和软组织感染,败血症等疾病^[22]。人体感染弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)其主要症状是腹泻、粪便中红细胞白细胞的数目增加、脓血便等^[23]。变形杆菌(*Proteus vulgaris*)引起的急性胃肠炎型中毒的主要表现为潜伏期较短,多为3~15 h,而引起的过敏型组胺中毒的潜伏期一般为30~60 min^[24]。人体感染嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)后会出现恶心、呕吐、脐周绞痛、腹泻、水样便等症状,易对机体免疫力较弱的人群引发内源性感染,引发败血症、胆囊炎、腹膜炎等,且病情发展快,死亡率高^[25]。

4 结束语

对三种市售贝类可培养细菌的分离与鉴定,可以对相关贝类可培养细菌的物种多样性和类群多样性,以及食品安全与微生物丰度研究提供一定的参考依据,同时再一次提醒广大群众,海鲜类食品不宜长时间存放以及烹饪时要充分煮熟。当然,这些细菌与生物体的相互关系及彼此的影响尚有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 乔庆林. 贝类养殖区分类与净化技术研究[J]. 现代渔业信息, 2007, 22(10): 11-14.
- [2] 乔庆林. 水产品特有的食源性危害与控制研究的进展[J]. 现代渔业信息, 2009, 24(6): 9-15.
- [3] 席英玉, 林娇, 林永青, 等. 福建闽南沿海养殖僧帽牡蛎中汞和砷的时空分布特征及风险评价[J]. 环境化学, 2017, 36(5): 1009-1016.
- [4] 汪靖, 郑竞, 鄢灵君, 等. 福建沿海市售海产贝类微囊藻毒素的污染状况[J]. 环境与职业医学, 2016, 33(11): 1037-1042.
- [5] WORLD HEALTH ORGANISATION. Global salmon-surveillance strategic plan (2001—2005) [R]. 2007.

- [6] 潘柳波,黄薇,王舟,等. 深圳市市售贝类的腹泻性贝类毒素污染状况分析 [J]. 职业与健康, 2016, 32(5): 630-632.
- [7] 程家丽,张贤辉,卓勤,等. 我国海洋食用贝类重金属污染特征及其健康风险 [J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(2): 175-181.
- [8] 郑竟,张薇,池慧钦,等. 微囊藻毒素检测方法与福州市市售水产品污染调查 [J]. 海峡预防医学杂志, 2016, 22(3): 60-62.
- [9] 寇晓霞,吴清平,薛亮,等. 贝类中诺如病毒的研究进展 [J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(2): 200-204.
- [10] 赵峰,周德庆,于维森,等. 东部沿海贝类中副溶血弧菌的分布及特征 [J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(5): 711-715.
- [11] TORSVIK V, SØRHEIM R, GOKSØYR J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities-a review [J]. Journal of Industrial Microbiology, 1996, 17(3/4): 170-178.
- [12] TAMAKI H, SEKIGUCHI Y, HANADA S, et al. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 2162-2169.
- [13] GRAM L, HUSS H H. Microbiological spoilage of fish and fish products [J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 33(1): 121-137.
- [14] 李亚晨,包永明,吕建发,等. 海洋水产动物弧菌病的生物防治 [J]. 水产科学, 2004, 23(2): 35-38.
- [15] 薛超波,王国良,金珊,等. 滩涂贝类养殖环境中细菌生态分布的初步研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(10): 1191-1193.
- [16] MONFORT P, BALEUX B. Dynamics of aeromonas-hydrophila, aeromonas-sobria, and aeromonas-caviae in a sewage-treatment pond [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(7): 1999-2006.
- [17] 赵怀龙,付留杰,唐功臣. 我国主要的食源性致病菌 [J]. 医学动物防制, 2012, 28(11): 1212-1216.
- [18] MORAIS V P, DAPORTA M T, BAO A F, et al. Enteric fever-like syndrome caused by *Raoultella ornithinolytica* (*Klebsiella ornithinolytica*) [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(3): 868-869.
- [19] SEKOWSKA A, DYLEWSKA K, GOSPODAREK E, et al. Catheter-related blood stream infection caused by *Raoultella ornithinolytica* [J]. Folia Microbiologica, 2015, 60(6): 493-495.
- [20] 林燕,郑双来. 一起由溶藻弧菌引起食源性疾病疫情的调查分析 [J]. 中国农村卫生事业管理, 2017, 37(1): 59-60.
- [21] 李灿. 基于群体感应分析腐败希瓦氏菌对副溶血弧菌毒力因子的影响机制 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2016.
- [22] 康元环,张冬星,杨滨瑾,等. 维氏气单胞菌最新研究进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(5): 452-458.
- [23] 薛巧,赵战勤,刘会胜,等. 弗氏柠檬酸杆菌对动物和人致病性研究进展 [J]. 动物医学进展, 2015, 36(7): 81-85.
- [24] 李春艳,杨闰媛,刘雅菲. 2000—2010 年中国 82 起变形杆菌致食物中毒案例分析 [J]. 亚太传统医药, 2010, 6(8): 181-182.
- [25] 赵晓艳,苏领彦,王明良. 北京市某敬老院一起食源性嗜水气单胞菌急性胃肠炎暴发调查 [J]. 职业与健康, 2014, 30(4): 521-523.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)