

水产品病原菌及其检测与控制技术研究进展

吴燕燕^{1*} 李凤霞^{1,2} 李来好¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 广东 广州 510300)

(2. 广东海洋大学 广东 湛江 524088)

摘要: 病原微生物一直以来是影响水产品质量安全的重要因素, 本文阐述了当前水产品中存在的主要病原微生物及其污染现状, 介绍了病原微生物快速检测新技术的研究进展, 并就如何控制水产品中病原微生物的污染, 提出预防措施和建议。

关键词: 水产品, 病原微生物, 检测技术, 预防措施

Research Progress of Pathogenic Microorganisms and Their Technologies of Detection and Control in Aquatic Products

WU Yan-Yan^{1*} LI Feng-Xia^{1,2} LI Lai-Hao¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Guangzhou, Guangdong 510300, China)

(2. Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

Abstract: Pathogenic microorganism always is influencing factor of the aquatic product security. In this paper, the main pathogenic microorganisms and their pollution actuality in the current aquatic products were expatiated, rapid detection of pathogenic microorganisms on the progress of new technology was introduced, and the prevention measures and proposals how to control the pollution of pathogenic microorganisms in aquatic products were put forward.

Keywords: Aquatic products, Pathogenic microorganism, Detection technology, Preventive measures

全球每年发生 40~60 亿例食源性疾病, 发展中国家每年约有 180 万人死于食源性疾病, 在发达国家, 每年亦有 10% 以上的人群感染食源性疾病^[1]。在 2007 年我国“两会”上食品安全也成为热点民生话题, 代表们指出致病微生物引起的食源性疾病(主要表现为胃肠炎、腹泻、发烧、呕吐、败血症、痢疾等症状)已经成为中国的头号食品安全问题。食源性疾病不仅严重危害人们的健康, 亦给国家造成重大经济损失^[2]。

随着人们生活水平的提高, 水产食品由于低脂

肪、高蛋白、富含人体所需各种氨基酸, 味道鲜美的特点, 深得消费者的喜爱, 消费量日益提高。由此带动了我国海水、淡水养殖业的迅猛发展。我国是水产养殖和水产品生产大国, 水产品产量占世界总产量的 1/3 左右, 位居世界第一位, 水产品远销世界各国, 同时, 为丰富国内水产品市场, 近年来远洋捕捞进境的水产品种类和数量均有所增加。但是长期以来, 我国的渔业管理者专注于追求水产品数量的提高, 以满足人们对水产及其制品不断增长的需求, 往往忽视了水产品的安全问题, 其中由病原微

基金项目: 中央级公益性专项资金项目(No. 2007ZD05)

* 通讯作者: Tel: 86-20-89108312; E: wuyy1028@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-05-28; 接受日期: 2008-07-28

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

生物引起的不安全事件占很大比例^[3]。2001 年香港大学医学院在罗非鱼等淡水鱼中发现一种新的细菌—海鸥型菌^[4], 该菌可引起的腹泻性胃肠炎, 有病人连泻 90 天的报道^[5]引起香港市民的一度恐慌, 香港市场淡水鱼及其制品出现滞销, 并直接影响广东省淡水水产品输港。2002 年福建省出入境检验检疫技术中心从 5 批进境冻墨鱼中 4 次检出非 O1、非 O139 群霍乱弧菌, 2 次检出沙门氏菌。2003 年北京检验检疫局抽检进口水产品发现进境海鲜近三成不合格, 主要检出致病性单核细胞增生李斯特氏菌、霍乱弧菌(非 O1、非 O139)、亚硫酸盐还原菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌等。2003 年上海市食品中食源性致病菌污染情况分析显示: 水产品受到的污染程度比较严重, 沙门氏菌、肠出血性大肠杆菌(O157 H7)、单核细胞增生李斯特氏菌和空肠弯曲菌的检测率为 10.53%, 仅次于生肉制品(45.34%)。上海某公司的冻煮小龙虾由于沙门氏菌超标被 FDA 列入黑名单。

本文作者就水产品中存在的主要病原微生物及其危害进行阐述, 介绍了现代病原微生物的检测新技术, 对今后我国在控制水产品病原微生物污染方面, 提出展望和控制措施。

1 水产品中的主要病原微生物

水产品的微生物污染可分为一次性污染和二次性污染。一次性污染是指鱼虾贝类遭受自然界微生物感染发病, 从而导致鱼虾贝类自身的污染。一次污染的微生物主要是鱼虾贝类病原菌, 如鳃弧菌、嗜水气单胞菌、柱状屈挠杆菌等; 二次性污染是指来自自然环境污染, 其中包括鱼虾贝类捕获后的污染, 二次污染的微生物主要包括病原微生物和腐败微生物。水产品二次污染的病原微生物主要有沙门氏菌、副溶血性弧菌和致病性大肠杆菌等。腐败微生物主要是各种杆菌及弧菌等^[6]。下面介绍水产品养殖和加工过程存在的主要病原微生物及其危害。

1.1 弧菌

1.1.1 副溶血性弧菌: 副溶血性弧菌是引起食源性疾病的主要病原菌之一, 也是我国沿海食物中毒和夏季腹泻的重要病原菌。近海海水及海底沉积物中副溶血性弧菌除使海产食品副溶血性弧菌带菌率较高外, 还可使附近塘、河中养殖的淡水鱼、虾贝等

受其污染, 沿海地区带菌饮食从业人员, 生熟食品工具的交叉使用, 食用污染该菌又未经良好加工的海产品等均可引起食物中毒^[7]。副溶血性弧菌引起的食物中毒, 在细菌性食物中毒中占的比例很高, 其危害仅次于沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和肉毒梭菌^[8]。

1.1.2 河流弧菌: 河流弧菌是一种嗜盐菌, 广泛存在于河流或出海口水中, 抵抗力较强, 是世界范围内海水鱼类和贝类养殖的主要威胁之一, 是引起鲍鱼死亡的主要病原菌。引起河流弧菌中毒的食品主要是海产品(近海鱼的带菌率高达 30%), 其次是被海产品和工具污染的熟食品, 或者是生食海鱼、食用热处理不彻底海产品等。河流弧菌对热敏感, 通过加热能够将其杀死^[7]。

1.1.3 霍乱弧菌: 霍乱弧菌是引起烈性传染病霍乱的病原体, 自 1817 年以来, 已发生过 7 次世界性霍乱大流行, 主要发生在夏、秋季节。食用或饮用被该类细菌污染的水产品和水源等是诱发腹泻疾病的主要因素, 其发病率超过沙门氏菌和志贺氏菌^[9], 特别是水源被该类菌污染后会造成霍乱病的暴发流行。

1.1.4 创伤弧菌: 创伤弧菌是人和动物共患病的重要致病菌, 在医学界和鱼病学界都广为重视^[10,11]。按寄主范围和生化反应类型可划分为生物 1 型和生物 2 型两个生物型^[12,13]。其中生物 2 型菌株是鱼类的重要病原菌, 使鱼的体表溃烂, 特别是对鳗鲡显示出很强的专一感染特性, 被认为是鳗鲡弧菌病的原发性病原菌。

1.2 沙门氏菌

沙门氏菌广泛存在于自然界中, 是主要食源性病原微生物之一, 在我国, 以沙门氏菌引起的食物中毒占细菌性食物中毒的首位。动物性食品是引起沙门氏菌食物中毒的主要食品, 鱼贝虾类水产品是其中之一。水产品带菌主要是由于其生长的水环境污染了该菌, 其次是在加工过程, 被人、苍蝇、鼠类等传染而带菌。

1.3 大肠杆菌

大肠杆菌是一个很大的菌属, 包括致病性和非致病性大肠杆菌, 是水产养殖中常见的微生物。多年来, 致病性大肠杆菌中的致泻性大肠杆菌引起的腹泻病例一直位于第二。由于大肠杆菌是人及各种动物肠道中的正常寄居菌, 常随粪便从人及动物体

排出,广泛散播于自然界,所以一旦检出大肠杆菌,即意味着直接或间接地被粪便污染。儿童和老人是该菌的易感人群,对其中 O157:H7 出血性大肠杆菌的感染发病率高达 50%^[7]。

1.4 嗜水气单胞菌

嗜水气单胞菌属于弧菌科、气单胞菌属,是嗜温、有动力的气单胞菌群,普遍存在于淡水、污水、淤泥、土壤和人类粪便中,对水产动物、畜禽和人类均有致病性,是一种典型“人兽鱼”共患病病原^[14],各种淡水鱼都可感染,尤其是人工密集养殖的温水鱼在水温较高的季节最为常发,给淡水养殖业造成惨重的经济损失。人类可因致病性嗜水气单胞菌感染而发生腹泻、食物中毒和继发感染。

1.5 迟钝爱德华氏菌

迟钝爱德华氏菌是目前在水产养殖中有极大危害的病原菌,迄今,该菌已在二十多种鱼类养殖中引发了病害,造成了巨大损失^[15]。另外,它是爱德华氏菌属中唯一感染人的成员。比较容易感染本来已患有肝炎和肿瘤疾病的人群,还可引起人的脑膜炎、肝脓肿、蜂窝组织炎、骨髓炎和败血症等。

1.6 其他

单核细胞增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、假单胞菌等常见的致病菌和肺炎克雷伯氏菌、阪崎肠杆菌、海鸥型菌、洋葱伯克霍尔德氏菌等不常见的致病菌在水产养殖和水产食品中也不同程度的被检出,已引起研究者的高度重视。

2 新技术在水产品病原微生物检测中的应用

及时、准确地检出水产品中的致病微生物是水产品安全检测中的重点。常规的微生物学检验操作复杂、检验周期长(6 d~7 d)、效率低且特异性不强,达不到对水产养殖和水产加工行业中的病原微生物进行实时、快速而准确的鉴定与监测的要求。因此,免疫学检测技术、核酸检测技术和基因芯片检测技术等病原微生物快速检测技术的研究得到迅猛发展。

2.1 免疫学检测技术

免疫学检测技术利用抗原抗体间能发生特异性免疫反应的原理来检测病原,包括了血清学反应、单(多)克隆抗体检测、免疫荧光技术、Western 印迹

和酶联免疫吸附试验(ELISA)等,是当前病原体检测中运用较为广泛、成熟的检测技术。

2.1.1 免疫荧光技术:免疫荧光技术是利用某些荧光素通过化学方法与特异性抗体结合制成荧光抗体,荧光抗体与被检抗原特异性结合后,形成的免疫复合物在一定波长光的激发下可产生荧光,借助荧光显微镜可检测或定位被检抗原。免疫荧光技术将免疫化学和血清学的高度特异性和敏感性与显微术的高度精确性相结合,在水产养殖病原的检测上得到一定应用^[16]。另有研究表明免疫技术在检测 VNC 菌(Viable but non-cultivable state, VBNC or VNC “活的未可培养状态”)方面具有独特优势,因为进入 VNC 的细菌仍然保持着和正常细菌一样的表面抗原^[17],姚斐和寇运同等^[18]用间接荧光免疫技术在 3 h 左右的时间内检测出进入 VNC 的副溶血性弧菌 1211U 株,其菌体变小,并缩成球形。

2.1.2 免疫酶技术:免疫酶技术利用了抗原-抗体反应的高度特异性和酶促反应的高度敏感性,通过肉眼或显微镜观察及分光光度计测定,达到在细胞或亚细胞水平上示踪抗原或抗体的部位,以及对其进行定量的目的。可分为固相、均相和双抗体酶免疫测定技术。酶联免疫吸附试验(ELISA)是目前应用最广泛的固相免疫酶测定技术。Snow 等^[19]运用 ELISA 检测方法从感染的大菱鲆中检测出血性败血症病毒。

2.1.3 Western 印迹法:Western 印迹技术是以生物物理学方法(凝胶电泳高效分离)和特异性免疫反应(固相免疫测定)相结合而建立的技术。它借助高分辨率的 PAGE 电泳将混合蛋白质样品有效分离成许多蛋白区带,分离后的蛋白经电转移至固相支持物,通过与特异性抗体的结合,即可定性或定量检测靶蛋白。Western 印迹法最早的应用是 HIV 感染的血清学诊断,后来还被应用于鳃弧菌、假单胞菌、霍乱弧菌和创收弧菌等流行病学诊断检测上^[20-23]。

2.1.4 免疫磁珠分离法:免疫磁珠分离法可将特异性抗体偶联在磁性颗粒表面,与样品中被检致病微生物发生特异性结合,载有致病微生物的磁性微球在外加磁场的作用下向磁极方向聚集,因此可特异性地将目的微生物从样品中快速分离出来。Tomoyasu^[24]用免疫磁性分离技术成功地从引起食物中毒的食物中分离出副溶血性弧菌。该方法与一

般细菌培养分离法相比,极大地提高了食品中病原性副溶血性弧菌的检出率。

2.2 核酸检测技术

核酸检测技术是以病原的核酸为研究对象,通过鉴定病原的核酸分子来证实病原。

2.2.1 直接核酸杂交技术:核酸杂交是利用特异性的标记 DNA 片段为指示探针,与其互补链退火杂交,从而达到检查核酸样品中特定基因序列的检测。按杂交的方式可分为打点杂交、斑点杂交、Southern 转移杂交和原位杂交等。根据核酸分子探针的来源和性质可分为基因组 DNA 探针、cDNA 探针、RNA 探针及人工合成的寡聚核苷酸探针等。在探针的长短方面,则分为全染色体探针、PCR 合成的长链探针及寡核苷酸探针。探针由放射性标记发展到非放射性标记,使核酸杂交技术运用更加广泛、灵活、方便^[25]。核酸杂交技术具有灵敏度高、特异性强、诊断速度快和操作较为简单等优点,它对流行性爆发病的诊断并制定及时的方案,以及抗特种病原的动物育种等方面可提供可靠实用的依据,具有极高的应用价值。近年来在对虾病毒等病毒性病原体检测中倍受青睐。Nunan 等^[26]用特异的 cDNA 基因探针作原位杂交检测对虾桃拉病毒。

2.2.2 PCR 技术:PCR(Polymerase Chain Reaction)即聚合酶链式反应,一种在体外快速扩增特定基因或 DNA 序列的方法,也称无细胞克隆系统。该方法可使极微量的目的基因或特定的 DNA 序列在短短几个小时内扩增至百万倍。当我们知道待检病原具有某一特定基因片段时,即可利用特异的引物对样品中微量的目标 DNA 进行 PCR 扩增,通过电泳检测扩增出的特定片段,即可确定感染的病原。目前 PCR 技术已广泛应用于微生物病原的检测、DNA 多态性分析、基因克隆、基因分离和序列分析等领域,同时荧光定量 PCR 技术和多重 PCR 技术对水产品中致病微生物的快速检测也在不断的完善、成熟中。杨小娟等^[27]运用多重 PCR 技术成功检测了畜产品和水产品中的 4 种致病菌。赵雪涛等^[28]应用荧光定量 PCR 方法对沙门氏菌进行了定量检测。

2.2.3 DNA 指纹技术:所谓 DNA 指纹是指限制性酶消化产物在电泳图谱或 Southern 杂交中产生的一系列带纹,不同带纹代表了在染色体不同位置上的不同长度的 DNA 序列。目前在病原微生物检测上应用的 DNA 指纹技术主要包括限制性片段长度多

态性,扩增片段长度多态性和随机扩增多态性 DNA 等技术。三种方法各有优缺点,但都已经在水产养殖病原菌的检测中得到广泛运用。Johan 等^[29]利用扩增片段长度多态性指纹技术成功研究了对虾不同发育期的孵化场及虾池中的病原微生物动力学变化,为预防不同发育期对虾的主要病原菌提供了依据。

2.2.4 16S rRNA(rDNA)基因:16S rRNA(rDNA)基因为所有生物体生存所必需的基因序列并且也是较保守的序列之一。16S rRNA(rDNA)基因的序列检测已被成功地建立为一种鉴定微生物种、属、家族种类的标准方法。同时,由于种间 16S rRNA(rDNA)基因之间的间隔区在长度、序列上具有相对多变性,利用 16S 及 23S rRNA(rDNA)基因中的保守区为引物,对此间隔区进行克隆和分析,就能为病原微生物各种菌株、种、属的鉴定、分型提供依据。16S rRNA(rDNA)技术在人及兽医开始得到广泛应用,在水产病害方面也开始运用^[30-32],并将快速发展。运用该方法可以从怀疑带菌但又无症状的鱼体检测出病原,具有较高的选择性和特异性。

2.3 基因芯片技术

基因芯片技术是将各种基因寡核苷酸点样于芯片表面,微生物样品 DNA 经 PCR 扩增后制备荧光标记探针,再与芯片上寡核苷酸点杂交,最后通过扫描仪定量并分析荧光分布模式来确定检测样品是否存在某些特定微生物。基因芯片技术可以对环境中的微生物实现高通量和并行检测。它在理论上可以在一次实验中检出所有潜在的致病原,可以用同一张芯片检测某一致病原的各种遗传学指标;同时具有灵敏、特异和快速便捷等优点,因而在致病微生物检测中有很好的发展前景^[33]。

3 展望与建议

病原微生物污染无论是在发达国家还是发展中国家都是影响食品安全的最主要原因。世界卫生组织(WHO)开始建立食源性致病菌全球性监测网络。随着水产品食源性致病菌检测新技术不断改进、创新,多种分子检测技术综合运用或多角度联合运用的发展,为水产养殖和加工过程中食源性致病菌的检验、鉴定、监测提供了方便、快捷、迅速的技术支持。在这个基础上,我国今后必须制定相应的政策,从水产品的饲料供应、养殖过程、加工过程和

流通环节保障水产品的安全,防止水产品病原生物污染。

3.1 加强养殖水系的监控

渔业水域生态环境恶化,水域污染频频发生,海上养殖设施破坏海洋自然生态循环,削弱了海洋自净能力,海域养殖的残饵、化肥和排泄废弃物导致了海区污染和富营养化,使水中病原生物增多,养殖病害蔓延。根据国家已颁布的《无公害水产品产地环境要求》(GB/T18407.4-2001)、《无公害食品淡水养殖用水水质》(NY5051-2001)和《无公害食品海水养殖用水水质》(NY5052-2001)等标准,指导渔民科学处理养殖水、调控水环境。事实说明,水产品养殖过程中病害的发生,并不完全在于水产品本身是否带有病菌、病毒,而是由于其生活环境——养殖水体受到污染,生态平衡遭到破坏,水产品抗病害能力下降所致。因此,始终保持养殖水体适应水产品生长的生态环境,才是水产养殖的根本和基础。

要加大养殖环境修复技术的研究,由于微生物具有繁殖速度快、对环境适应能力强、效果明显,与机械清理、化学药物处理等手段相比操作简单、节省人力物力、无药物残留等副作用等特点,特别适合在养殖水环境使用。我国水产养殖最初使用的是光合细菌,经过几年的实践,使用范围已相当广泛,并作为一种常规措施使用。目前研究中的以乳酸杆菌、枯草杆菌、双歧杆菌、假单胞菌、酵母菌和粪球菌等组成的微生态制剂,又称“有益微生物”、“益生菌”等,能抑制和减弱病原微生物的致病作用,对改善养殖水质效果颇佳^[34],所以对于微生态制剂的推广应用需要进一步加强。

3.2 加强对渔用饲料生物污染的监控

随着海洋水产业的结构由捕捞为主向以海水养殖为主的转化,水产饲料的安全性直接影响水产品的安全性,饲料的生物污染包括微生物及代谢产物、寄生虫等污染,特别是病原微生物的污染,可通过污染的饲料进入水产品体内,再通过食物链造成人类病变。根据我国颁布的《饲料卫生标准》(GB13078-2001,属强制性国家标准)和农业部发布的《无公害食品渔用配合饲料安全限量》(NY5072-2001)标准,加大对饲料及其添加剂中病原生物和霉菌毒素的监测,引导渔民正确合理使用来自于有生产许可证的企业,并具有企业、行业的国家标准,产品批准文号的饲料,防止饲料霉变而

降低饲料的营养价值和导致霉菌的代谢产物,防止沙门氏菌、大肠杆菌和病毒等微生物污染,确保饲料的安全。特别是要改变以往将水产加工下脚料、低值鱼类等未经任何处理就直接投喂养殖体,这不仅对养殖水体造成很大的污染,而且将饲料中的病原生物进一步转移到新的养殖体中,进一步危害人类。必须贯彻将生饲料发酵加工、杀菌处理后才能投喂养殖体。

3.3 在水产品加工企业实行 HACCP 管理模式

生产优质的水产品,必须从原料生产开始,保证生产过程的各个环节达到质量要求,从而确保最终产品的质量。农业部渔业局组织制定的《水产品加工质量管理规范》是具有我国特色的 HACCP,现已公布实施。企业要全面推行 HACCP 体系,对员工宣传质量卫生法规,从生产到产品销售等环节严把质量关,水产品进入加工厂前应经质量检验机构进行质量和病原生物的检测,合格后才允许上市或进入加工厂,并提供水产品质量检验部门核发的质量证明和产品产地证明,解决产品质量可追溯性问题。加大管理力度,提高我国水产品的质量水平,在国际市场具有较强的竞争力。

3.4 加强病原生物的基础研究

目前 WHO 全球食品安全战略中急需解决的问题包括由病原生物引起的食源性疾病的快速检测技术、相关数据的建立、微生物学危险性评价技术、降低病原性生物的危害等。寻找预防水产品污染的关键环节、提高对突发事件的反应能力、为制订行之有效的公共卫生政策提供科学依据、对公共卫生干预行为的效果进行追踪和评价都依赖于监测的能力和水平。我国是水产大国,在水产品病原生物的预测预报和快速检测方面远远比不上发达国家,特别是在易感染病原生物的方面,急需建立一套从筛选、定量到确证的技术方法,为进出口食品的快速检测、安全监测、预警和控制提供必要的技术支撑,从而及早发现问题,保证水产食品的安全性,减少食源性疾病的发生,促使我国在微生物预测技术方面与世界同步。

3.5 建立水产品病原生物预警系统

水产品的质量安全和品质是水产行业中至关重要的。HACCP 系统作为防止水产品带来的危害的有力手段已在各国推行,但作为新出现的危害分析和为设定 CCP 基准的微生物数据却很不充分。如果建

立水产品病原生物预警系统,将水产品在养殖、加工处理的各个过程、流通时的病原生物的生长、增殖、残存、死亡情况的各变化规律进行调查,病原生物的特性、温度、pH 和水分活度等影响因子进行调查确定,成为一个数据库,建立数学模型,作为一个水产品病原生物预警系统,就能通过随机的抽样检测:知道某种水产品在水系中是否感染病原生物,是否会大面积爆发,从而采取相应措施,指导于生产;或者知道水产品在加工处理、流通过程中是否感染病原生物,从而及早发现问题,保证水产食品的安全性,减少食源性疾病的发生。该系统还能快速评估人类对病原生物的反应和感染剂量,有利于快速鉴定污染源及特定条件下微生物的生长速度等等,协助管理者进行有效管理。

参 考 文 献

- [1] Ehiri JE, Azubuike MC, Ubbaonu CN, *et al.* Critical control points of complementary food preparation and handling in eastern Nigeria. *Bull WHO*, 2001, **79**(5): 423–433.
- [2] Mead PS, Slutsker L, Dietz V, *et al.* Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, 1999, **5**: 607–625.
- [3] 李泰然. 中国食源性现状及管理建议. *中国流行病学杂志*, 2003, **8**: 651–653.
- [4] Yuen KY, Woo Patrick Y, Tengjade LL, *et al.* *Laribacter hongkongensis* gen. nov., sp. nov. a novel gram-negative bacterium isolated from a cirrhotic patient with bacteraemia and empyema. *J Clin Microbiol*, 2001, **39**: 4227–4232.
- [5] Woo Patrick Y, Lau Susana KP, Tengjadel L, *et al.* Association of *Laribacter hongkongensis* in community acquired gastroenteritis with travel and eating fish: a multi-centre case-control study. *The Lancet*, 2004, **363**: 1941–1947.
- [6] 陈奖励, 何昭阳, 赵文. 水产微生物学. 北京: 农业出版社, 1993, pp.363–418.
- [7] 林洪. 水产品安全性. 北京: 中国轻工业出版社, 2005, p.526.
- [8] 乔华林, 章俊. 副溶血弧菌的致病性及其检验和测定. *水产科学*, 1999, **18**(4): 28–30.
- [9] 何小芹, 王国礼. 非 O1 群霍乱弧菌感染调查. *上海医学检验杂志*, 1999, **14**(5): 274.
- [10] Linkous DA, Oliver JD. Pathogenesis of *Vibrio vulnificus* (MiniReview). *FEMS Microbiol Letters*, 1999, **174**: 207–214.
- [11] Amaro C, Bosca EG. *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(4): 1454–1457.
- [12] Tison DL, Nishibuchi M, Greenwood JD, *et al.* *Vibrio vulnificus* biogroup 2: new biogroup pathogenic for eels. *Appl Environ Microbiol*, 1982, **44**(3): 640–646.
- [13] Biosca EG, Amaro C, Larsen JL, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio vulnificus*: proposal for the substitution of the subspecific taxon biotype for serovar. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(4): 1460–1466.
- [14] 吕爱军, 李任年, 余为一. 嗜温气单胞菌研究进展. *中国动物检疫*, 2000, **11**: 42–43.
- [15] Austin B, Austin DA. Bacterial Fish Pathogens. *Disease in Farmed and Wild Fish Third (revised) Edition*. Chichester, UK: Praxis Publishing Ltd, 1999, **22-23**: 81–84.
- [16] Largo DB, Fukami K, Adachi M, *et al.* Immunofluorescent detection of ice-ice disease-promoting bacterial strain *Vibrio* sp. P11 of the farmed macroalga, *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta). *J Mar Biotechnol*, 1998, **6**(3): 178–182.
- [17] Hiroyuki Yamamoto. Viable but nonculturable stage as a general phenomenon of non-spore-forming bacteria, and its modeling. *Japanese society of Chemotherapy and the Japanese Association For Infectious Diseases*, 2000, **6**: 112–114.
- [18] 姚斐, 寇运同, 陈刚, 等. 间接免疫荧光抗体技术检测活的非可培养状态的副溶血弧菌. *海洋科学*, 2000, **24**(9): 10–12.
- [19] Snow M, Smail DA. Experimental susceptibility of turbot *Scophthalmus maximus* to viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from cultivated turbot. *Dis Aquat Organ*, 1999, **38**(3): 163–168.
- [20] Ochsner UA, Vasil AI, Johnson Z, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* *fur* overlaps with a gene encoding a novel outer membrane lipoprotein, *OmlA*. *J Bacteriol*, 1999, **181**(4): 1099–1109.
- [21] Lee SE, Shin SH, Kim SY, *et al.* *Vibrio vulnificus* has the transmembrane transcription activator ToxRS stimulating the expression of the hemolysin gene *vvhA*. *J Bacteriol*, 2000, **182**(12): 3405–3415.
- [22] Pedersen K, Grisez L. Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. *Current Microbiology*, 1999, **38**(3): 183–189.
- [23] Provenzano D, Schuhmacher DA, Barker JL, *et al.* The virulence regulatory protein ToxR mediates enhanced bile resistance in *Vibrio cholerae* and other pathogenic *Vibrio* species. *Infect. Immun*, 2000, **68**(3): 1491–1497.
- [24] Tomoyasu T. Development of the immunomagnetic enrichment method selective for *Vibrio parahaemolyticus* serotype K and its application to food poisoning study.

- Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 26–79.
- [25] Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, *et al*. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 804–807.
- [26] Nunan LM, Poulos BT, Lighter DV. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of taura syndrome virus (TSV) in experimentally infected shrimp. *Dis Aquat Organ*, 1998, **34**(2): 87–91.
- [27] 杨小鹏, 吴清平. 多重 PCR 检测无公害畜禽肉和水产品中 4 种致病菌. *微生物学通报*, 2005, **32**(3): 95–101.
- [28] 赵雪涛, 陈 军. 荧光定量 PCR 方法在沙门菌鉴定中的应用. *上海预防医学杂志*, 2005, **17**(2): 64–66.
- [29] Vandenberghe J, Verdonck L, Robles-Arozarena R, *et al*. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(6): 2592–2597.
- [30] Giuliano L, De Domenico M, De Domenico E, *et al*. Identification of culturable oligotrophic bacteria within naturally occurring bacterio plankton communities of the Ligurian Sea by 16S rRNA sequencing and probing. *Microb Ecol*, 1999, **37**(2): 77–85.
- [31] Maeda T, Takada N, Furushita M, *et al*. Structural variation in the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **192**(1): 73–77.
- [32] Tan CK, Owens L. Infectivity, transmission and 16S rRNA sequencing of a rickettsia, *Coxiella cheraxi* sp. nov., from the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Dis Aquat Organ*, 2000, **41**(2): 115–122.
- [33] 杨文鸽, 孙翠玲, 潘云梯, 等. 水产品中致病微生物的快速检测方法. *中国食品学报*, 2006, **6**(1): 402–406.
- [34] 王祥红, 李 军, 纪伟尚, 等. 有益微生物在水产养殖中的应用. *海洋湖沼通报*, 1998, **1**: 33–39.

沉痛悼念王修垣先生



王修垣先生, 1932 年出生, 河南省内乡县人。1955 年武汉大学生物系毕业, 同年分配到中国科学院菌种保藏委员会(微生物所前身), 1988 年加入中国共产党。先后任助理研究员、副研究员、研究员, 享受国务院政府特殊津贴。2008 年 11 月 15 日凌晨, 王修垣先生因病医治无效, 在北京广安门医院逝世, 享年 76 岁。

王修垣先生作为国内油田微生物专业领域的学术带头人, 为我国原油开采效率的提高做出了很大贡献, 先后荣获中科院科研成果三等奖、玉门石油管理局科委科技成果一等奖、石油工业部科技成果三等奖、中科院科技进步三等奖、河南省轻工业厅科技腾飞奖等。

先生曾担任《微生物学通报》主编多年, 始终关心我刊的发展, 辛勤审稿撰稿, 退休后仍然关注编辑部的建设, 为本刊的发展奠定了坚实的基础。在他生病住院期间, 恰逢微生物所建所 50 周年, 他亲历亲为, 撰写长文, 全面概括综述了微生物所石油微生物学研究的发展历程, 为后人留下了宝贵的第一手资料, 该文已刊发于《微生物学通报》[2008, 35(12): 1851–1861], 可惜先生猝然离去, 未能亲眼看到成文。

王修垣先生忠于党和国家的科研教育事业, 对待工作兢兢业业、任劳任怨、无私奉献; 为人正直, 一生俭朴, 严于律己、宽以待人, 深受同事、学生和朋友们爱戴。王修垣先生的逝世, 使我们失去了一位好师长, 我们编辑部全体编辑永远怀念他!

《微生物学通报》编辑部

2008 年 11 月 15 日