

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

郑国兴 李 何 黄宁宇 于业绍

杨季芳 吴友吕

(东海水产研究所,上海)

(国家海洋局第二海洋研究所,杭州)

提 要 近年来,江苏南部沿海在 8~10 月份常发生文蛤大批死亡,从病文蛤体内分离到病原菌,经人工感染试验得到证实。病原菌为革兰氏阴性短杆菌,以极生单鞭毛运动,在 TCBS 琼脂平板上形成黄色大菌落,在固体培养基上能游动。发酵葡萄糖产酸不产气,精氨酸-碱反应阴性,赖氨酸、鸟氨酸脱羧阳性。在无盐蛋白胨水中不能生长,在 10% NaCl 蛋白胨水中生长良好。在 43°C 下能正常繁殖。对弧菌抑制剂 0/129(150 μ g)和新生霉素(5 μ g)敏感,被鉴定为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus* Sakazaki)。病文蛤超薄切片的电镜观察表明,肠上皮及肝组织被细菌侵袭。病原菌在肠上皮细胞质中增生,形成上百个细菌的集群。上皮细胞核变形,被挤向一侧,线粒体内嵴模糊,部分上皮细胞微绒毛的结构被严重破坏,细菌周围的组织被腐蚀成空斑。

关键词 蛤,文蛤,弧菌病,溶藻弧菌,组织病理,电镜观察

文蛤(*Meretrix meretrix* Linnaeus)是江苏沿海的主要经济贝类,也是出口创汇的主要产品。近年来,连续发生文蛤死亡现象,使经济上受到损失,资源遭到破坏。造成文蛤死亡的原因推测很多,有的认为海洋污染,有的认为赤潮造成,有的认为气候影响,也有的认为与地震有关,但至今未找到确切原因。1987 年以来,我们从文蛤疾病方面着手进行了调查研究,先后在江苏省如东和启东两县有五个文蛤死亡的养殖场,从濒临死亡的文蛤体内分离到相同的细菌,经人工感染试验,证实是文蛤的致病菌,根据病原菌形态和生理生化测定,被鉴定为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus* Sakazaki)。我们还应用电镜技术,对病原菌、文蛤组织病理的超微结构作了观察。溶藻弧菌是鱼、虾类弧菌病的常见病原菌^[2, 6, 7],在美国与欧洲也曾报导引起蛤类和牡蛎幼体、成体的大量死亡^[8, 10, 11]。

我国有关文蛤病的研究,仅见 1978 年台湾省报导的丽文蛤(*Meretrix lusoria*)病原菌——副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)外^[5],其他未见报导。现将研究结果报告如下。

材 料 与 方 法

1. 供试验用的病文蛤 病文蛤在退潮后不能潜入沙中,壳顶外露于沙面上,由于闭壳肌松弛无力,两片贝壳不能紧密闭合。将贝壳剖开后,可看到软体部十分消瘦,肉色大多由正常的乳白色变为浅红

色;消化道内无食物或仅有少量食物,有的肠段坏死;外套膜发粘,紧贴于贝壳上,不易剥离;外套腔内几乎都能发现有桡足类(Copepoda)寄生,少则几个、十几个,多则三、四十个。

2. 细菌的分离 试验用菌是1988年10月和1989年10月分别取自江苏省如东县和启东县海涂病文蛤的体腔液和肝脏内,其来源列于表1。细菌分离的方法是:取濒临死亡的文蛤,以清水冲刷干净后,用80%酒精棉球将外壳反复擦拭,进行体表消毒,再以灭菌小刀小心将贝壳剖开,以1cc灭菌针筒抽取外套腔液,然后迅速将1或2滴外套腔液注到含有2%NaCl的营养琼脂平板上,以涂平板法接种。以灭菌镊子仔细地由内脏团内剥离少许肝组织,用无菌生理盐水将其表面冲洗干净,再以印膜法接种于营养琼脂平板上。接种后平板在室温下(约20~25°C)培养,待菌落长成后,划线分纯,然后再接种至斜面培养基上保存,供试验用。

表1 试验菌株的来源

Table 1 Source of isolations

菌株号	分离日期	分离部位	采样地点
80401	1988.10.8	外套腔液	启东县 吕北乡
81611	1988.10.27	同 上	启东县 三甲镇
81612	同 上	肝 脏	同 上
83102	1988.10.26	外套腔液	如东县 东凌乡
83312	同 上	同 上	同 上
84114	1988.10.20	同 上	如东县 北渔乡
84411	同 上	同 上	同 上
84414	同 上	肝 脏	同 上
89102	1989.10.11	外套腔液	启东县 东元乡
89103	同 上	同 上	同 上

3. 人工感染试验 将壳宽4~6厘米的健康文蛤分组饲养于水盆内(水盆直径约35厘米),每盆放养文蛤5~8个,取30°C下培养18~24小时的试验菌斜面培养物,用饲养海水制成悬液,然后加入到饲养健康文蛤的水盆中,每盆加一支新鲜斜面培养物,饲养水的容积约为3000毫升,对照组在相同条件下,不加菌液。试验在室温下进行(20~28°C),每日换水一次,为了模拟海水的涨落,换水前空干4~6小时。试验开始后,每日早晚各检查一次,记录文蛤的状况并取出松口濒临死亡的文蛤,分别饲养于单独的容器内,以免死亡张壳后干扰其他试验文蛤。

4. 病原菌的鉴定 病原菌生物学性状的测定按照《一般细菌常用鉴定方法》^[11]一书和Furniss等人^[9]介绍的方法进行,按照“伯捷氏系统细菌手册”^[12]和Furniss^[9]等人对弧菌属细菌的分类鉴定至种。各项细菌生理生化测定的培养基都添加2%NaCl,接种后,在30±1°C的恒温箱中培养。

5. 病原菌对盐度、温度和pH值的耐受性试验 试验用的培养基是1%蛋白胨水,接种方法是在每试管的培养基中(5毫升)加入一滴新鲜培养的试验菌菌液,静置培养24小时后,用721型分光光度计(波长420纳米)分别测量细菌悬液的混浊度。

6. 文蛤组织病理的电镜观察 选取经人工感染后病变较明显的病文蛤作超微结构研究,每个病蛤采取肝、鳃、肠、外套膜和斧足等组织。另外,采取正常文蛤的相应组织作对照。将用2.5%戊二醛固定的各组织块切成1~2立方毫米的小块,作PBS漂洗,1%四氧化锇后固定2小时,再用PBS漂洗,最后用丙酮进行逐级脱水,用Epon812包埋,Reichert-Jung超薄切片机切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色。细菌电镜样品制备按常规方法^[13]进行。最后用JEM-1200型和日立H-600A型透射电子显微镜观察和照相。

结 果

1. 人工感染试验 人工感染试验的结果列于表 2 与表 3。试验之一(见表 2), 试验时间是 89 年 5 月 13 日~5 月 23 日, 试验水温是 20~24°C, pH 值是 7.8, 海水比重 1.015。试验经 3~4 天, 开始出现死亡, 死亡高峰出现在第 7 天, 经 10 天后, 死亡数最低的是 80401 号菌, 有半数文蛤死亡; 死亡数最高的是 93312 和 84411 号菌, 试验文蛤全部死亡; 而对照组仅死亡一只。试验之二(见表 3), 试验时间是 89 年 8 月 23 日~8 月 30 日, 试验水温为 24~28°C, 海水比重是 1.012。试验开始后的第四天开始出现死亡, 死亡高峰出现在第 6 天, 经一周后, 三个试验组的死亡率分别达到 75.0%, 71.0% 和 90.3%, 而对照组的死亡率仅 4.2%。试验组濒临死亡的文蛤, 松口, 对刺激的反应迟钝, 壳缘周围分泌有许多粘液, 部分死亡文蛤的肉质变红; 对照组的健康文蛤, 对刺激的反应灵敏, 惊动后贝壳迅速紧闭, 用手难以剥开, 壳体周围清洁, 无粘液。

表 2 分离菌的人工感染试验之一

Table 2 One of the results of infection experiments of the isolated bacteria

菌株号	试验数(只)	累积死亡数(只)								死亡数/试验数
		(第)3天	4天	5天	6天	7天	8天	9天	10天	
80401	10	0	0	0	0	4	5	5	5	5/10
81611	10	1	3	5	5	5	6	6	6	6/10
83312	10	0	1	3	4	9	9	9	10	10/10
84411	10	2	4	4	4	5	9	10	—	同上
84414	10	1	1	3	4	7	7	7	7	7/10
对照	10	0	0	0	0	0	1	1	1	1/10

表 3 分离菌的人工感染试验之二

Table 3 Another of the results of infection experiments of the isolated bacteria

菌株号	试验数(只)	累积死亡数(只)					死亡率(%)
		(第)3天	4天	5天	6天	7天	
83312	92	0	0	3	24	24	75.0
84114	31	0	1	6	20	22	71.0
84411	31	0	3	8	22	28	90.3
对照	24	0	0	1	1	1	4.2

2. 病原菌的鉴定 病原菌是革兰氏阴性短杆菌, 以极生单鞭毛运动。在 TCBS(硫代硫酸钠—柠檬酸盐—胆盐)琼脂平板上培养一天后, 形成黄色的大菌落, 菌落直径为 3~5 毫米。细菌在固体培养基上能游动。发酵葡萄糖产酸不产气。在无盐蛋白胨水中不能生长。但在含 10% 的 NaCl 蛋白胨水中能生长。甲基红和 V.P 阳性。能还原硝酸盐成亚硝酸盐。精氨酸—碱反应阴性, 赖氨酸、鸟氨酸脱羧阳性。对弧菌抑制剂 0/129(150μg)

和新生霉素 (5 μ g) 敏感。有关病原菌的生物学性状和对酶类分解能力的试验结果分别列于表 4 和表 5。根据 Baumann, P. *et al.* (1984) 和 Furniss, A. L. *et al.* (1978) 对弧菌属细菌的分类, 病原菌被鉴定为溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus* Sakazaki)。

3. 病原菌对温度、盐度、pH 值的耐受性 病原菌对温度、盐度和 pH 值的适应范围分

表 4 文蛤病原菌(溶藻弧菌 10 支菌株)的生理生化特性

Table 4 Physiological and biochemical characteristics of *V. alginolyticus* (10 strains) isolated from diseased clam

特 性		特 性	
在 TCBC 上生长	Y	5℃ 生长	-
在 CLED 上生长	-	43℃ 生长	+
革兰氏染色	-	精氨酸—碱反应	-
极生单鞭毛	+	赖氨酸脱羧酶	+
O/F 试验	F	鸟氨酸脱羧酶	+ ⁽¹⁾
从葡萄糖产气	-	精氨酸双水解酶	-
氧化酶	+	在纤维二糖中生长	+
过氧化氢酶	+	木 糖	-
固体培养基上滑动	+	乙 醇	+
色 素	-	谷 氨 酸	+
发 光	-	亮 氨 酸	+
NO ₃ ⁻ →NO ₂ ⁻	+	丁 二 胺	-
吲 哚	+	淀 粉 酶	+
V. P.	+	明 胶 酶	+
甲 基 红	+	脂酶(吐温—80)	+
产硫化氢	+	酪蛋白酶	+
产 氨	+	卵磷脂酶(蛋黄)	+
0/129 敏感性 150 μ g	S ⁽¹⁾	藻 酸 酶	-
10 μ g	R	脲 酶	-
新生霉素敏感性	S	几丁质酶	+
在0% NaCl 中生长	-	琼 脂 酶	-
8%	+	七叶灵水解	+
6%	+	柠檬酸盐利用	+
8%	+	ONPG 水解	-
10%	+	溶血作用(羊血)	+
		DNA(G+C)克分子%	42.9

注: Y—黄色; S—敏感; R—抗; F—发酵。

(1) 83102 菌株例外。 (2) 81611 和 89103 菌株例外。

表 5 文蛤病原菌(溶藻弧菌 10 支菌株)对碳类的发酵试验
 Table 5 Carbohydrate fermentation tests of *V. alginolyticus*
 (10 strains) isolated from diseased clam

性 状		性 状	
葡萄糖	+	乳糖	-
半乳糖	+	肌醇	-
果糖	+	山梨醇	-
蔗糖	+	山梨糖	-
甘露糖	+	赤藓糖醇	-
麦芽糖	+	鼠李糖	-
淀粉	+	木糖	-
糊精	+	棉籽糖	-
海藻糖	+	卫矛糖	-
甘露醇	+	菊糖	-
甘油	+	松三糖	-
肝糖	+	密二糖	-
纤维二糖	-	水杨素	-
阿拉伯糖	-		

别见图 1、图 2 和图 3。病原菌能繁殖的温度范围是 10~45°C, 最适生长温度是 20~37°C, 在 5°C 和 50°C 下不能发育。细菌对盐度的适应范围广, 能在高盐度下生长, 能生长

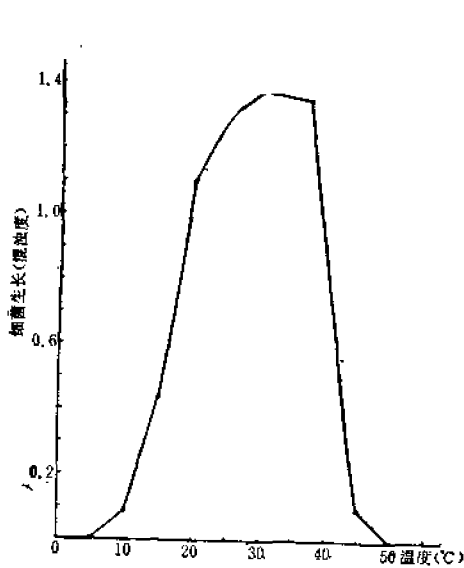


图 1 文蛤病原菌(溶藻弧菌 84411 菌株)的生长与温度关系(培养基: 1%蛋白胨水加 3% NaCl, pH7.6, 静置培养 24 小时)
 Fig. 1 The relationship between temperature and reproduction of *V. alginolyticus* strain 84411 (Culture medium: peptone water 1%; NaCl 3%; pH7.6; stilling culture 24 hours)

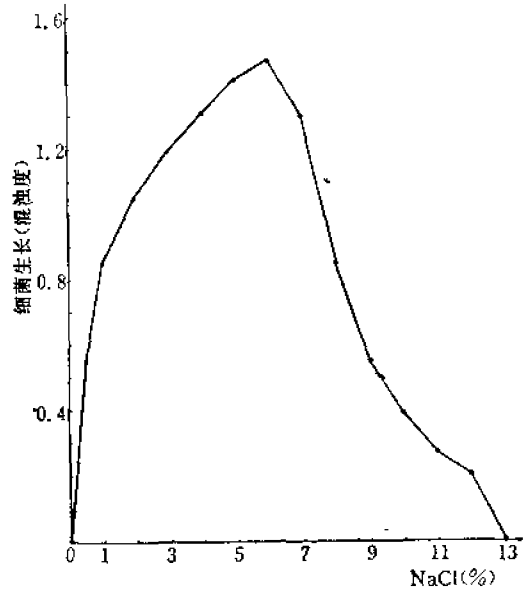


图 2 文蛤病原菌(溶藻弧菌 84411 菌株)的生长与食盐浓度的关系(培养基: 1%蛋白胨水, pH7.6, 30°C 下静置培养 24 小时)
 Fig. 2 The relationship between NaCl concentration and reproduction of *V. alginolyticus* strain 84411 (Culture medium: Peptone water 1%; pH7.6; temperature 30°C; stilling culture 24 hours)

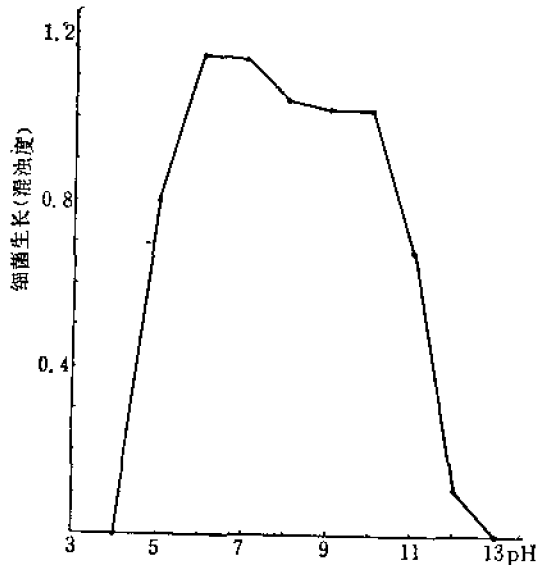


图3 文蛤病原菌(溶藻弧菌84411菌株)的生长与pH的关系(培养基: 1%蛋白胨水加3%NaCl, 30°C下静置培养24小时)

Fig. 3 The relationship between pH and reproduction of *V. alginolyticus* strain 84411 (Culture medium: Peptone water 1%; NaCl 3%; temperature 30°C; stilling culture 24 hours)

的食盐浓度范围是0.5~12%,最适生长的范围1~8%,在5%和6%NaCl的胨水中生长最旺盛,但在无盐胨水中不能生长。病原菌于pH5~12范围内均能生长,最适pH值是6~10。

4. 病原菌(溶藻弧菌)的超微结构 病原菌为短杆状,直或弧形,单个,少数双链,具端生单鞭毛,无芽孢,细胞胞质较致密,有拟核区。核糖体及核酸隐约可见(图版—1,2)。

5. 文蛤主要器官的病理组织变化

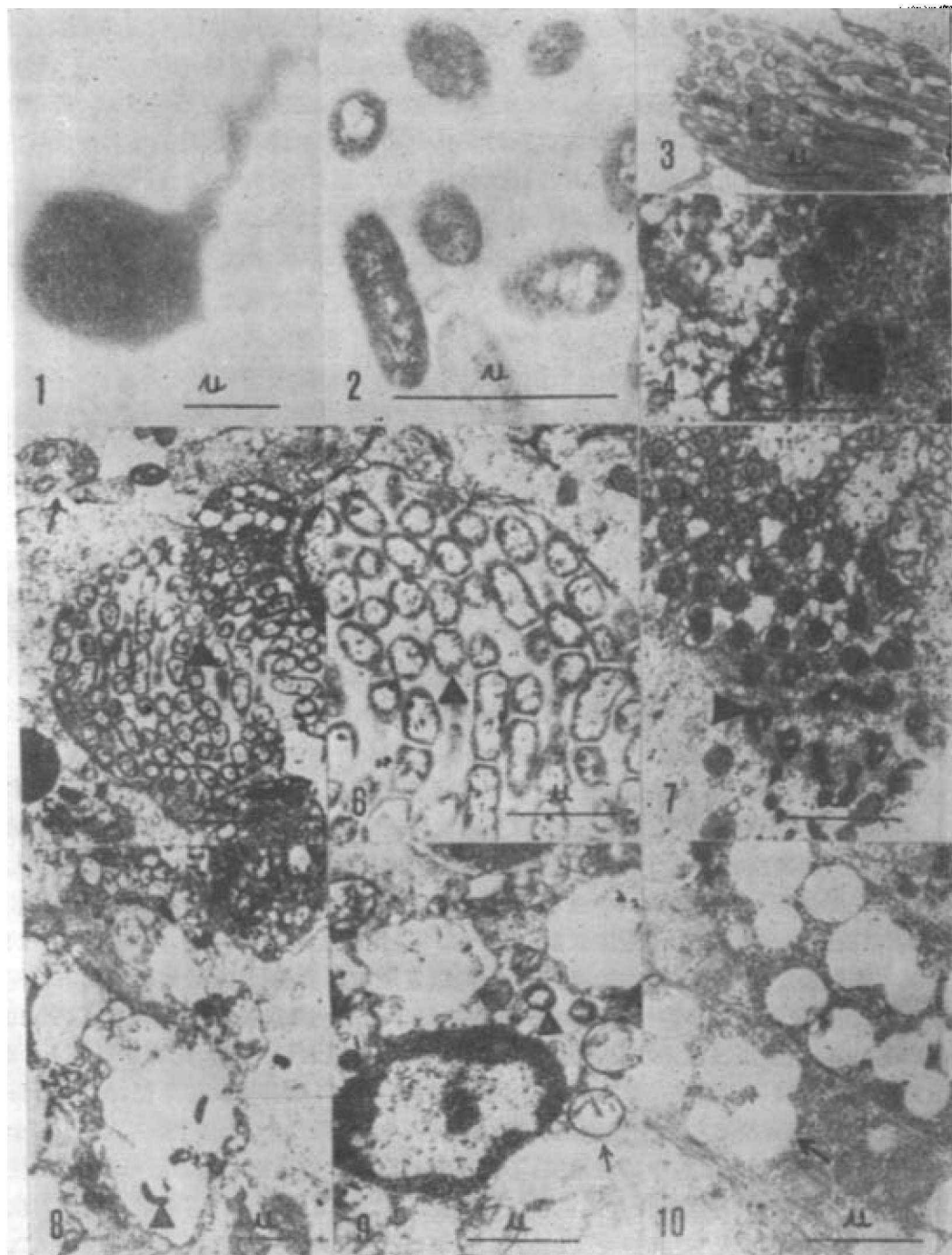
肠 文蛤肠是一条细长迂回蟠曲的管道,壁较薄,肌肉不发达。正常文蛤肠组织超薄切片显示(图版—3),肠内壁上皮细胞游离面上着生有微绒毛,其横切面上可见典型的“9+2”结构,即周围9对微管二联体,中间一对二联体。在绒毛纵切面上,可见细长的绒毛微管。病蛤肠组织超微结构显示,肠内壁上皮细胞的细胞质中有寄生的“细菌团”(图版—5,6,▲)。“细菌团”由近百个细菌集聚而成,外围被一囊体所包围,细胞核被挤向一

图版 病原菌、正常文蛤和病文蛤肠道及肝组织的超薄切片

Plate Ultrathin sections pathogenic bacteria, intestine and liver tissue of the normal and infected clam

1. 病原细菌负染色,PTA, 17000×。示细菌的形状及鞭毛。
2. 病原细菌超薄切片,40000×。示超微结构。
3. 正常肠超薄切片,20000×。示正常肠超微结构。
4. 正常肝超薄切片,20000×。示正常肝细胞的超微结构。
5. 病肠超薄切片,10000×。示病原菌侵入肠上皮细胞及宿主免疫反应。
6. 病肠超薄切片,20000×。示病肠组织中病原细菌的超微结构。
7. 病肠超薄切片,20000×。示病肠上皮组织细胞游离端上着生的微绒毛被破坏。
8. 病肝超薄切片,7500×。示病原侵入肝组织。
9. 病肝超薄切片,20000×。示病原侵入肝细胞细胞质中。
10. 病肝超薄切片,20000×。示病肝组织细胞质中内含物的变化。

边。线粒体内嵴变得不规则,成破碎状。细胞内的吞噬泡机能异常,许多正常细胞器被当作异物加以吞噬。图版—5, ←, 显示了许多线粒体等自身结构被吞噬成空斑状。胞质内的寄生细菌均有一层电子密度较浅的薄壁和一层电子密度高的膜。细菌内的拟核区依然可见,核酸物质隐约可见。细菌二分现象十分清楚。胞质内的细菌大小约 $350 \times 850\text{nm}$ 。



由于细菌侵入肠内壁上皮细胞,使得上皮细胞游离端上着生的微绒毛部分被侵蚀(见图版—7),部分绒毛典型微管二联体结构被破坏,中间一对二联体消失,周围9对微管二联体成破损状,电子密度也由浅变厚。

肝 文蛤肝脏是一大型黄褐色的消化腺,有肝管和消化道相通。正常文蛤肝细胞超微结构显示细胞核近似圆形,二层核膜清晰,其中有核周腔。核质中富含染色质。胞质中线粒体内嵴清楚,大量小泡充斥细胞质内(图版—4)。病蛤肝组织超微结构显示,病蛤肝脏组织也被细菌所侵袭(图版—8、9,▲)。由于细菌侵入肝细胞细胞质,细胞核变形,形状不规则。线粒体内嵴模糊,甚至破损。组织中,颗粒状糖原的数量少于正常文蛤,整个组织出现许多大小不一的空腔。细胞内含物的变化主要表现在溶酶体数目的增加,这可能同肝细胞的吞噬异物现象有关。此外,脂滴也有所增加(图版—10,←)。

鳃、外套膜和斧足 10个病例的鳃、外套膜和斧足超薄切片上,均未发现有病原菌存在,其组织细胞的超微结构也未发现任何异常,由此可见病原菌未侵入鳃、外套膜和斧足等组织。

讨 论

1988和1989两年在江苏省南部沿海滩涂文蛤死亡区的各个采样点,从濒临死亡的文蛤体内,都分离到溶藻弧菌,经人工感染试验,证实它们是文蛤的致病菌,人工感染试验的致病过程通常有3~4天的潜伏期,一周后的死亡率可达70%以上。1989年10月我们在启东县文蛤发病区和非发病区作了对比调查。在病区内,病文蛤体腔液中的细菌数很高,在1~2滴体腔液中可含细菌数百个,而且都检出了溶藻弧菌;在非病区,文蛤体腔液中细菌数极少,在1~2滴体腔液中,无细菌或仅有个别细菌。在调查过程中,我们还对文蛤死亡区的水质和底质的一般理化因子及重金属含量、文蛤体内的重金属含量作了分析,均未发现明显异常。调查结果表明,近年来江苏省沿海文蛤死亡的主要原因是由于细菌病的流行造成的。

根据病原菌形态和生理生化特性的测定,病原菌被鉴定为溶藻弧菌,溶藻弧菌是海水鱼类养殖、对虾养殖的常见病原菌,也是双壳类软体动物的病原菌之一,在美国东海岸的蛤类幼体、美国和欧洲的牡蛎幼体和成体都曾报导因此而引起突发性的大批死亡^[10,11]。溶藻弧菌在温带和热带沿海水域中很常见,从病原菌对温度、盐度和pH值的耐受性试验来看,病原菌的生命力极强,最适生长温度20~37°C,最适盐度是1~8%,pH值在5~10的范围内都能很好发育。江苏文蛤流行病的形成、发展与环境条件、文蛤体质状况有着密切关系,文蛤大批死亡的季节性很强,主要发生在每年的8~10月份,最严重的是在9、10两月,死亡高峰大多出现在海水交换差的小潮期,11月份随水温下降,死亡亦即停止。8月份除因水温升高有利于细菌繁殖外,也由于文蛤产卵后,其肥满度显著降低,体质下降;另外,在病文蛤的外套腔中几乎都能发现有桡足类寄生,少则几个、十几个,多则三、四十个。这种寄生于文蛤外套腔中的桡足类,不仅以利爪附着于外套膜和内脏团等组织上,使宿主组织受到机械损伤,而且摄食宿主组织,吸取宿主营养,虽然它们不至于对文蛤的生存构成直接威胁,但大量寄生时,使文蛤消瘦,体弱,无法抵御病菌的侵袭,容易染病死亡。

根据我们 8~10 月间的观察,雌性成虫几乎都带有成熟的卵囊,而且还有一定数量的幼体出现,12 月底及次年 4 月的抽样检查,在文蛤体内均未找到此种寄生虫,这说明秋季是寄生桫足类的繁殖盛期,与文蛤大批死亡的季节相吻合,它们与细菌病的传播与流行也有着密切的联系。

文蛤主要器官超微结构的电镜观察表明,病文蛤肠道和肝脏组织受到了病原菌的侵袭,其中尤以肠组织受害较为严重,病原菌在肠上皮细胞质中生长、繁殖,形成上百个细菌的集群,严重地破坏了上皮细胞微绒毛的超微结构,微管横切面上的电子密度增厚,微管二联体蛋白结构瓦解,上皮细胞核被挤向一边,细菌周围的组织被腐蚀成空斑状,寄生细菌的形状、大小及结构与病原菌(溶藻弧菌)的超薄切片上所显示的结构相同。从而在病理组织学上,为病文蛤的诊断提供了重要的证据。

病文蛤鳃、外套膜和斧足等组织的超薄切片中,未观察到病原菌,组织结构也未发现明显的病变,说明这些组织未受到病菌直接侵袭,其结果与病原菌人工感染试验的结果相一致。我们在作人工感染试验时,曾用无菌针头将健康文蛤的外套膜划破,然后再向饲养海水中加入细菌菌液,其试验结果与未被划破的文蛤饲养水中添加细菌的感染方法无明显差异。用肌注方法将细菌菌液注入到健康文蛤的斧足中,也无一例使文蛤感染得病。病文蛤组织的电镜观察和人工感染试验的结果都表明,病菌不是经伤口进入文蛤体内,也未直接侵害外套膜、斧足和鳃等组织,而是一种肠道传染病。文蛤在滤食时,将水中的病原菌—溶藻弧菌经水管吞入胃肠中。由于溶藻弧菌能分泌一些糖苷酸类的胞外酶,分解消化了由糖肽组成的肠内壁,进入到肠组织中,并在肠上皮细胞质中大量繁殖,破坏了上皮细胞的正常结构,使上皮细胞上的微绒毛微管成破碎状,电子密度增厚(图版—7),从而使肠组织营养吸收功能受阻,导致文蛤生理机能的衰退。另外,病原菌通过与消化道相通的肝管,进入肝脏中,危害肝组织,使肝细胞坏死。

病文蛤肠组织超微结构研究还表明(图版—5),肠上皮细胞内的吞噬泡,在行吞噬异物的功能时,吞噬泡将细菌包围住,形成囊状物。但是,与此同时,由于细菌的侵入及大量繁殖,使得细胞免疫机能发生“错乱”,吞噬泡难以判断异物与自身物质的区别,误将大小、结构与细菌相似的线粒体等细胞器当作异物加以吞噬(图版—5, ←,可清晰见到吞噬泡吞噬了结构正常的线粒体,使其成空泡状)。由于线粒体的缺乏,导致整个细胞功能的衰退,最终坏死。上述病原菌对肠、肝的直接侵袭和间接造成细胞免疫机能的“错乱”是造成文蛤病死的主要机制。

参 考 文 献

- [1] 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,94~194。科学出版社(京)。
- [2] 卞伯仲等,1987。虾类的疾病与防治,36~44。海洋出版社(京)。
- [3] 孟庆显,1984。牡蛎的疾病。国外水产,(2):33~37。
- [4] 洪 健,1989。实用生物电子显微术,71~171。辽宁科学技术出版社(沈阳)。
- [5] 杨美社等,1978。新竹区养殖文蛤病原菌 *Vibrio parahaemolyticus* 之分离。农发会鱼病研究专集(二)(台湾),59~67。
- [6] 江草周三,1983。鱼病学(感染症,寄生虫病篇),62~72。恒里社厚生阁。
- [7] Austin, B. & D. A. Austin, 1987. *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*, 263—287. Ellis Horwood Limited, England.

- [8] Baumann, P. et al., 1984. Genus *Vibrio*. In: Krieg, N. R. et al. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, T: 516—598. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- [9] Furniss, A. L. et al., 1978. *The Vibrios*. Public Health Laboratory Service Monograph Series, No. 11. Her Majesty's Stationery Office, London.
- [10] Sindermann, C. J. 1977. Bacillary necrosis of clam larvae. In: Sindermann, C. J., ed., *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*, 222—228. Elsevier Scientific Publ. Co., Amsterdam—Oxford—New York.
- [11] —, 1977. Bacillary necrosis of oyster larvae. In: Sindermann, C. J. ed., *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*, 190—192. Elsevier Scientific Publ. Co., Amsterdam—Oxford—New York.

**CHARACTERISTICS OF *VIBRIO ALGINOLYTICUS*
ISOLATED FROM DISEASED CLAM *MERETRIX*
MERETRIX AND HISTOPATHOLOGICAL
OBSERVATIONS ON DISEASED CLAM
BY ELECTRON MICROSCOPE**

Zheng Guoxing, Li He, Huang Ningyu and Yu Yeshao

(East China Sea Fisheries Research Institute, Shanghai)

Yang Jifang and Wu Youlu

(The second Institute of Oceanography, Hangzhou)

ABSTRACT An epizootic of high mortality of the hard clam *Meretrix meretrix* occurred along the seabeach of the East China Sea, an investigating had been carried out during the period of August to October 1988. The diseased clam looked very thin, it could not sink into muddy sand and its shells loosely closed. There was no residual of food in the digestive tract. The body colour became to light red. Parasitic copepoda were found in the mantle cavity.

Pathogenic bacterium was isolated from the diseased clam. Infection experiments ascertained that the bacteria were the cause of the disease. The isolates showed Gram-negative short rods with a single polar flagellum. All strains grew well and formed large yellow colonies on TCBS agar and swarmed strikingly on marine agar. They produced acid but no gas from glucose. Tests for the decarboxylation of lysine and ornithine were positive and arginine negative. They could not grow in peptone water lacking NaCl but grew well in peptone water containing 10% NaCl. They could normally grow at 43°C. The organisms were sensitive to vibriostatic agent 0/129 (150 µg) and novobiocin (5µg). Thus the pathogenic bacterium was identified as *Vibrio alginolyticus*. The bacteria grew in 1% peptone water at optimum temperatures of 20–37°C, at optimum NaCl of 1–8% and at optimum pH from 6 to 10 respectively.

Electron microscope examinations of the histological ultrathin sections of the

diseased clam demonstrated the presence of rod-shaped pathogenic bacteria in affected intestinal epithelial cells and liver cells. The pathogen multiplied and formed colonies in the cytoplasm of intestinal epithelial cells. Nucleus degenerated and was pushed to the margin of the cells. Microvilli and cytochondriomes in the epithelial cells were destroyed. The digestive tube and liver tissues of the host become necrosis and histolysis.

KEYWORDS clam, *Meretrix meretrix*, vibriosis, *Vibrio alginolyticus*, histopathology, electron microscopic observation

书 讯

《中国钢质海洋渔船图集》

《中国钢质海洋渔船图集》是在全国沿海各省、市水产局(厅)推荐的 50 种钢质海洋渔船船型基础上,再精选具有代表性的、优秀的船型共 36 种编纂而成。所选的船型包括拖网、围网、流钓等不同类型的捕捞渔船和冷藏运输、收鲜、渔政、渔业调查等渔业辅助船。这些船型基本上反映了七十年代后期以来我国自行设计、研究、建造的国营和群众渔业中先进渔船的水平。图集中对每种船型介绍了技术性能参数,设备配套,各种装载情况下的稳性,总布置图,型线图,横剖面结构图,机舱布置图,渔捞装置图,实船使用简况,配外形彩照一幅,并配有专文综述了渔船主机、捕捞机械、冷冻保鲜装置、助渔导航仪器等概况。在附录中列出了我国历年来建造的主要钢质海洋渔船的主尺度与性能参数表,介绍了确定渔船建造主要材料消耗量的计算方法。内容丰富,可供渔船设计、研究、建造、使用、船检部门和有关的大专院校参考。

图集由农业部水产司、渔业机械行业协会编著,科学出版社出版。精装、8 开本。

计划于 1991 年二季度出版,每册定价 100 元(含邮寄费)欲订者请向上海市赤峰路 63 号(邮政编码 200092)渔业机械行业协会办公室邱成宗联系,以便寄上征订单。(渔业机械行业协会办公室)

一九九一年三月