

# 文蛤弗尼斯弧菌病研究

王广和 沈艳云 沙培荣 曹祥志

(江苏海安县卫生防疫站, 226600)

于志华 姚国兴 宋晓村 王汉清 郑庆树

(江苏海洋水产研究所)

钱晓明 孙 祥 崔广细

(江苏海安县水产公司)

**摘要** 由江苏南部沿海滩涂死亡文蛤中分离到一种革兰氏阴性杆菌, 经系统生理生化特性鉴定为弗尼斯弧菌 (*Vibrio furnissii*)。该菌能利用文蛤汤作为培养基, 在 25—37℃ 海水中大量繁殖, 具有较强的毒力。用此菌感染健康文蛤, 发病症状及死亡情况均与自然发病一致。我们认为江苏南部文蛤大批死亡与文蛤弗尼斯弧菌病流行有关, 这在国内外尚未见报道。

**关键词** 文蛤; 弗尼斯弧菌

近几年来, 江苏南部沿海滩涂每年 8—10 月上旬常发生文蛤大批死亡现象。主要集中在一些潮位偏高及密度过大的文蛤暂养场内, 造成巨大的经济损失。从发现少量文蛤死亡到出现大批死亡约一周左右时间, 被死亡文蛤污染的水流到那里, 文蛤死到那里, 蔓延快、死亡率高。1988 年以来, 我们从流行病学调查, 死亡文蛤症状观察, 病原体分离鉴定, 文蛤人工感染试验等方面研究, 确认为是一种文蛤弗尼斯弧菌病造成的, 现介绍如下:

## 材料和方法

### (一) 细菌分离

文蛤死亡期间, 从疫区取回濒死文蛤, 以清水冲洗干净, 酒精进行体表消毒, 用灭菌小刀剖开贝壳, 将内脏团剪碎, 接种环挑取一小片病料直接划种于 TCBS 琼脂平板, 嗜盐菌选择性琼脂平板, 麦康凯琼脂平板, 于 37℃ 温箱培养分离可能的病原菌。同时每季对海水、泥沙和健康文蛤进行细菌分离工作。取得占优势的纯种。

### (二) 病菌生化鉴定

按照《Bergey's 系统细菌手册》<sup>[1]</sup> 和陈天寿对 10 种致病性弧菌的鉴别诊断方法将细菌分类到种。

### (三) 病菌生理学试验

1. 培养基试验: 取文蛤于烧杯中, 加海水

浸没贝体, 煮沸 10 分钟, 去壳去肉, 余液用脱脂棉过滤得文蛤汤, 将此汤加海水配成 5, 12.5, 25 和 50% 四个浓度, 灭菌后即成文蛤汤增菌液。另取文蛤汤加 1% 琼脂粉制成文蛤汤琼脂, 将分离到的弧菌、气单胞菌、沙门氏菌接种在上述培养基上, 37℃ 培养, 观察细菌生长情况。

2. pH 适应试验: 将 12.5% 文蛤汤用酸或碱校正 pH 至 4—11, 接种弗尼斯弧菌, 置 37℃ 培养 24 小时, 观察细菌生长情况。

3. 耐盐性试验: 将弗尼斯弧菌接种于不同含盐量的碱性胨水中, 置 37℃ 培养 24 小时, 观察细菌生长情况。

4. 温度生长试验: 将弗尼斯弧菌接种于 12.5% 文蛤汤中, 置不同温度下培养 24 小时, 观察细菌生长情况。

### (四) 菌种毒力测定

取分离到的溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*), 副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、弗尼斯弧菌 (*V. furnissii*) 和腐败假单胞菌 (*Pseudomonas putrefaciens*) 的 24 小时肉汤培养物 0.5ml, 先后二次腹腔注射 20g 重健康小白鼠, 每种菌试验小白鼠 5 只, 以肉汤对照, 观察一周。

### (五) 文蛤人工感染试验

取毒力较强的弗尼斯、溶藻、副溶血三种弧

海安县卫生防疫站黄信伦, 万梅华, 唐春明, 孔繁才, 陆丽生参加了部分工作, 特此致谢。

菌的 18 小时培养物, 用盐水制成含菌量约为  $10^7/\text{ml}$  细菌悬液, 分别加入装有健康文蛤和经破坏韧带受伤文蛤的塑料盆中, 每盆加海泥 20 斤, 海水 20 斤, 3.5cm 左右文蛤 40 只, 加菌液 4ml, 放  $26^\circ\text{C}$  室温浸养, 模拟海区自然条件, 每日换水一次, 换水前空干 2 小时, 观察、记录发病情况, 同时设不加菌对照。

#### (六) 弗尼斯弧菌含量测定

以无菌操作分别取死亡文蛤肉 25g, 海水 25ml, 用灭菌盐水稀释成  $10^{-1}$ — $10^{-5}$  不同浓度, 然后从各稀释液中取 0.5ml 涂布于 TCBS 平板上,  $37^\circ\text{C}$  培养, 经鉴定证实为弗尼斯弧菌的计算含菌数。

#### (七) 药敏试验

选毒力强, 经感染试验确认为造成文蛤死亡的主要病原菌弗尼斯弧菌为试验菌, 运用 K-B 纸片琼脂扩散法, 按 WHO 规定判定结果。

### 结 果

#### (一) 细菌分离情况

1988—1990 年, 在海安, 如东两地 9 个不同场址的文蛤死亡区, 从患病文蛤肉、内脏, 海水, 泥沙及正常文蛤中主要检出四种细菌。其中溶藻弧菌 43 株, 弗尼斯弧菌 12 株, 副溶血弧

菌 8 株, 腐败假单胞菌 8 株(见表 1), 在无文蛤大批死亡的 1—6 月及 11—12 月从健康文蛤及海水泥沙中也均检出了大量溶藻弧菌, 但没有查到弗尼斯弧菌。

#### (二) 病菌生化鉴定

将其中死亡文蛤中检出的 7 株弗尼斯弧菌进行了系统生物学特性鉴定, 7 株菌结果相同。该菌在 TCBS 平板上中等大小, 黄色, 圆形隆起, 麦康凯平板上无色半透明, 血平板上呈  $\beta$  溶血, 革兰氏染色为阴性杆菌, 生化特性见表 2。

根据上述特性, 该菌属弧菌科中的弗尼斯弧菌。该菌经上海市卫生防疫站复核, 结果一致。

#### (三) 病菌生理学试验

1. 培养基: 文蛤汤作为弧菌增菌效果不亚于碱性胨水, 而且不调 pH, 不需加其他营养成分, 经比较, 12.5% 文蛤汤既能达到增菌效果又节省原料。文蛤汤琼脂对分离弗尼斯等弧菌有很好的效果, 对肠道菌生长较差, 表明文蛤汤是弧菌生长的良好培养基。

2. pH: 弗尼斯弧菌在  $\text{pH} < 4$  或  $\text{pH} > 10$  时不生长, pH5 或 9 时生长缓慢, 最适 pH 为 7—8。

3. 耐盐: 弗尼斯弧菌在无盐及大于 8% 盐量时不生长, 最适含盐量为 3—4%。

4. 温度: 弗尼斯弧菌生长的最适温度为

表 1 细菌检出情况

采样时间(月)	样品名称	采样场次	检 出 场 次			
			溶藻弧菌	弗尼斯弧菌	副溶血弧菌	腐败假单胞菌
1—3	健康文蛤	8	8	0	0	0
		海水泥沙	2	0	0	0
4—7	健康文蛤	2	2	0	1	0
		海水泥沙	1	1	1	1
8—10	健康文蛤	4	4	0	0	0
		海水泥沙	10	4	3	4
		死亡文蛤	11	7	3	3
11—12	健康文蛤	4	4	0	0	0
		海水泥沙	1	0	0	0

表 2 7 株弗尼斯弧菌生化鉴定结果

试验项目	结果	试验项目	结果
氧化酶	+	酒石酸盐	-
甘露糖	+	胺基质	-
赖氨酸	-	醋酸盐	-
0/129 (10μg)	R	鸟氨酸	-
0/129 (150μg)	S	肌醇	-
七叶灵	-	硝酸盐还原	+
果糖	+	水杨素	-
尿素	-	苹果酸	-
H <sub>2</sub> S	-	麦芽糖	+
鼠李糖	-	木糖	-
密二糖	-	ONPG	+
乳糖	-	鞣质	+
葡萄糖	⊕	柠檬酸盐	+
蔗糖	+	0% NaCl 胨水	-
L-阿拉伯糖	+	3% NaCl 胨水	+
精氨酸双水解酶	+	7% NaCl 胨水	+
纤维二糖	-	10% NaCl 胨水	-
半乳糖	+		

25—37℃，而在小于 15℃ 和大于 44℃ 时不生长。

(四) 毒力试验

试验 10 小时，注射溶藻弧菌的 5 只小白鼠死亡 2 只，注射弗尼斯弧菌的 5 只小白鼠全部死亡，注射副溶血弧菌的 5 只小白鼠死亡一只，注射腐败假单胞菌和肉汤对照的 5 只小白鼠均未发病死亡。试验 10 小时后至一周未见继续死亡。可见弗尼斯弧菌毒力最强。

(五) 文蛤人工感染试验

1989 和 1990 年的 10 月，我们在海安，如东两地进行人工浸养文蛤感染试验，供试文蛤 120 只，两次发病情况与自然条件死亡情况基本一致。浸养 16 小时后文蛤仍潜在泥中，24 小时出现“浮头”，文蛤壳微开，光泽淡化，闭

壳肌松弛，出水管喷水无力，体内有粘液流出，随着病情加重，斧足残缺外突，两壳张开死亡，肉体由乳白色转粉红色乃至黑色。72 小时后文蛤出现大量死亡，其中溶藻弧菌感染健康文蛤死亡 75 只，弗尼斯弧菌感染健康文蛤死亡 101 只，副溶血弧菌感染健康文蛤死亡 49 只。对照不加菌的文蛤死亡 15 只 (表 3)。

另外用弗尼斯弧菌单独感染人工削去韧带

的文蛤 80 只，结果死亡 74 只，死亡率达 90.5%。由此看出，三种弧菌均可使文蛤感染病死，以弗尼斯弧菌感染病死率最高，特别是受伤的文蛤感染病死率更高。

(六) 弗尼斯弧菌含量测定

经两次初步测定，死亡文蛤中弗尼斯弧菌含量约为 10<sup>5</sup>—10<sup>6</sup>/g，文蛤死亡场地的海水中弗尼斯弧菌约为 10<sup>3</sup>—10<sup>4</sup>/ml，但在冬季未检出。

(七) 药敏试验

高敏：氯霉素、SMZ。中敏：呋喃妥因，红霉素，链霉素，四环素，万古霉素，妥布霉素，卡那霉素，庆大霉素。低敏：林可霉素，丁胺卡那霉素，SD。耐药：青霉素，先锋霉素。

讨 论

1. 文蛤人工感染试验表明，虽然溶藻，弗尼斯、副溶血三种弧菌均可引起文蛤发病死亡，但以弗尼斯弧菌感染死亡率最高，我们认为江苏南部近几年文蛤大批死亡主要是以弗尼斯弧菌为主要病原体，以海水为媒介的传染病造成的，这与东海水产研究所报道的文蛤死亡与弧菌有关类同<sup>[2]</sup>。弗尼斯弧菌分布于海水与河口环境中，从动物的肠道中也分离到。毒力强，具有类

表 3 人工感染健康文蛤试验结果

感染细菌	试验文蛤只数		72 小时后死亡只数		合计 死亡率(%)
	海安	如东	海安	如东	
溶藻弧菌(88002)	40	80	24	51	62.5
弗尼斯弧菌(88005)	40	80	35	66	84.2
副溶血弧菌(88010)	40	80	5	44	40.8
肉汤对照	40	80	5	10	12.5

$\chi^2 = 135.06, P < 0.01$

似霍乱的肠毒素和产生溶血素。可引起急性胃肠炎,并发现引起死亡病例报告,但由此引起文蛤大批死亡,国内外尚未见报道。

溶藻弧菌尽管检出数量多,但毒力低,据在冬季无文蛤死亡情况下也均能检出,说明可能是一种条件致病菌。副溶血弧菌和腐败假单胞菌数量少,不足以形成对文蛤死亡的危害。

海水中氨氮, pH, NaCl 含量非常适宜弧菌的生理特点和培养要求, 文蛤含蛋白质 10%, 脂肪 1.2%, 碳水化合物 2.5% 及丰富的钙、磷、铁、维生素等, 试验证明文蛤汤是弧菌生长的良好培养基, 特别在夏末秋初, 水温偏高, 更为弧菌繁殖提供了条件。我们初步测定, 死亡文蛤肉中弗尼斯弧菌达到  $10^5-10^6/g$ , 海水中可达  $10^3-10^4/ml$ , 达到了致病菌量, 尤其是那些高潮区文蛤养殖密度大、滩温高、文蛤摄食时间短, 那些产卵排精和韧带被破坏的受伤文蛤体质弱, 抵抗力差, 给弗尼斯弧菌入侵打开方便之门, 首先发病死亡, 成为传染源, 导致暴发流行。

2. 多年来, 文蛤大批死亡的严重事实也给渔民们积累了丰富的防治经验, 经过调查和试验, 提出以下几点供防治参考。

(1) 文蛤暂养场场址不能选择在潮位高的地方, 可放在低潮区, 那里粗沙多, 水流急, 弧菌生长困难, 文蛤也适宜养殖。

(2) 暂养场文蛤养殖密度过大会引起“贫营养”, 以控制每亩投放量 1 吨为宜。

(3) 受伤文蛤容易受到病菌感染, 投放时必须坚决剔除那些受伤有病的文蛤。

(4) 7—8 月份, 各种病菌大量繁殖, 收购暂养要避开这一时间, 推迟到 9 月底进行。

(5) 有计划地将高潮区文蛤疏散到低潮区养殖和投放到对虾池与对虾混养是改善文蛤生活环境、避免文蛤死亡的有效可行办法, 应尽快推广。因为对虾池的水温、盐度稳定, 不干露, 病菌能通过消毒措施得到控制。

(6) 药敏试验表明, 弧菌对氯霉素十分敏感, 建议文蛤用漂白粉消毒后再投放到暂养场或对虾池, 以杀死病菌, 起到预防作用。

#### 参 考 文 献

1. Krieg N R et al.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1, Williams and Wilkins Baltimore/London, P. 516—538, 1984.
2. 郑国兴等: 水产学报, 15(2):85—94, 1991.

## A REPORT OF THE CLAM'S DISEASE CAUSED BY *VIBRIO FURNISSII*

Wang Guanghe Shen Yanyun Sha Peirong Cao Xiangzhi

(Hatan County Hygiene and Antiepidemic station, Jiangsu Hatan 226600)

A gram-negative bacillus was isolated from the bodies of dead clams among clam-banks along the south beach of Jiangsu province. It was confirmed to the *Vibrio furnissii* by morphological and biochemical characteristic examinations. This isolate grows well in clam's body fluid media and may multiply rapidly in sea-water at temperature about 25—37°C. It is of high toxicity. The healthy clams were all diseased with the same syndrome and died as natural illness by inoculate them with the isolate. It is considered that the large enormous death of clams along the south beach of Jiansu province is concerned with the wide spreading of the clam's infectious disease caused by *Vibrio furnissii* which hasn't been reported both internal and abroad.

**Key words** Clam; *Vibrio furnissii*