

文章编号: 1000-0615(2003)03-0273-05

栉孔扇贝病原感染与病害发生关系探讨

贺桂珍¹, 李 云¹, 宋微波¹, 王崇明², 黄剑宇¹, 王秀华²

(1. 青岛海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 利用电镜负染技术检测自然海区养殖和人工感染试验的栉孔扇贝组织提取液, 分别发现病毒和类立克次氏体(RLO)两种病原体。动态检测两类病原体感染状况与整个养殖期间栉孔扇贝发病死亡情况, 结果表明, 养殖期间病毒感染率在 80%~100% 之间, 最大感染强度出现在栉孔扇贝大规模死亡的 7、8 月份。人工感染病毒的栉孔扇贝, 其病毒感染率和感染强度与养殖栉孔扇贝大规模死亡时期相当。而两种情况下栉孔扇贝类立克次氏体的感染率和感染强度均未见明显变化。综合分析表明, 病毒可能是造成栉孔扇贝大规模死亡的直接病原体。

关键词: 栉孔扇贝; 病原体; 病毒; 类立克次氏体

中图分类号: S944.4 **文献标识码:** A

The relationship between pathogenic infection status and mortality of the scallop *Chlamys farreri*

HE Gui-zhen¹, LI Yun¹, SONG Wei-bo¹, WANG Chong-ming², HUANG Jian-yu¹, WANG Xiu-hua²

(1. The Key Laboratory of Mariculture Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Pathogenic infection status of the cultured scallop *Chlamys farreri* was investigated from May to November 2001. With negative staining technique, virus and Rickettsia-like organisms (RLO) were detected in tissue extract of samples. Infection rate of virus ranged from 80% to 100%. The highest infection intensity of virus is found in July and August when acute death of *Chlamys farreri* occurred. Similar results acquired after *Chlamys farreri* was injected with virus. The present work demonstrated that infection rates and intensity of RLO were not significantly different for cultured and artificial infected *Chlamys farreri*. The observation in 98 specimens confirmed that the direct pathogen of explosive epidemic disease of *Chlamys farreri* was possibly a kind of spherical RNA virus with envelope and spike in cytoplasm. Which was found in a large amount during whole culture period and throughout all parts of the host.

Key words: *Chlamys farreri*; pathogen; virus; Rickettsia-like organisms (RLO)

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)在我国海水养殖业中占有重要地位并曾产生了巨大的经济效益。但自 1997 年以来, 栉孔扇贝大规模死亡现象频繁发生, 目前已成为严重威胁该产业生存和发展的主要问题。

收稿日期: 2002-04-10

资助项目: 国家“973”重大基础项目(G1999012001); 教育部“长江学者奖励计划”项目联合资助

作者简介: 贺桂珍(1974-), 女, 山东平原人, 硕士研究生, 主要从事水生生物病害及免疫学研究

通讯作者: 李 云, E-mail: sxsdlw1@ouqd.edu.cn

国内相关研究人员从生态学、遗传学、病原学及养殖技术等多个方面对发病的原因进行了较深入的研究^[1-7]。本课题组自1999年以来对导致栉孔扇贝大规模死亡的病原开展了系统的排查分析,电镜组织病理学研究发现,发病栉孔扇贝组织细胞内广泛存在有病毒和类立克次氏体等病原体,但这些病原体是否为导致栉孔扇贝发病死亡的直接病原则是人们所关心的。本工作以青岛太平角贝类养殖区的栉孔扇贝和人工感染试验栉孔扇贝为研究对象,利用电镜负染技术,对病毒和类立克次氏体的感染状况进行了动态观测,结合养殖期间栉孔扇贝发病死亡的流行病学研究结果,试图了解病原与栉孔扇贝大规模死亡的关系,进而为栉孔扇贝的病害防治提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

养殖栉孔扇贝取自青岛太平角贝类养殖区。2001年5-11月份,每月采样1~2次,每次随机采集10个个体(表1),带回实验室。

人工感染实验于2001年7月28日-8月15日进行,栉孔扇贝采自青岛郊区一养殖场,运回实验室暂养两周,选择外观健康个体进行感染实验,实验期间控制水温20℃左右。试验设4个组合:空白对照组,病毒感染组(过0.45 μm滤膜后病贝组织悬液)、类立克次氏体感染组(0.45 μm滤膜上洗脱液)、病毒与类立克次氏体混合感染组(提纯原液10倍稀释)。死亡的扇贝立即解剖,实验结束时未死亡扇贝也解剖,剔除性腺和闭壳肌,称重,-70℃保存。

1.2 水文水质调查

采样时现场测量表层水温,并采集水样带回实验室测定盐度、pH值及溶解氧^[8],同时对养殖区水文情况及养殖方式、养殖密度作调查记录。

1.3 病原体分离提纯样品及负染电镜观察

自然海区样本测量壳长后与用作感染实验的扇贝进行同样处理:去外壳,剔除性腺和闭壳肌,其余组织混合称重;剪碎组织,按1:10比例加入TEN缓冲液(0.05 mol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.01 mol·L⁻¹ EDTA, 0.4 mol·L⁻¹ NaCl, pH7.8);以FSH-II型高速电动匀浆器冰浴下匀浆;匀浆液以3 000 r·min⁻¹离心20 min,重复2~3次;取上清液经7 000 r·min⁻¹离心20 min,重复2~3次;再取上清液加蔗糖配成25% (w/w)蔗糖溶液,以20 000 r·min⁻¹离心60 min。以上离心操作均在4℃下进行。沉淀重悬于0.3 mL TEN缓冲液中,-70℃保存。

取提纯后组织悬液,以2%磷钨酸(pH7.2)按常规方法负染后^[9],在JEM-1200EX透射电子显微镜下观察并拍照,用于结果分析。

表1 2001年青岛太平角栉孔扇贝采集记录

Tab. 1 Collecting records of samples of *C. farreri* from Taiping Bay of Qingdao in 2001

时间(年-月-日) year-month-day	样品数量(ind) sample number	壳高(cm) shell height	样品重量(g) sample weight
2001-05-21	10	3.2~5.2	2.3
2001-06-21	10	4.0~5.8	3.0
2001-07-19	10	5.3~6.5	3.5
2001-08-04	10	5.3~7.0	3.8
2001-08-21	10	5.4~6.8	3.8
2001-09-16	10	5.0~6.4	3.6
2001-10-21	10	4.9~6.3	3.3
2001-11-19	10	5.2~6.4	3.4

2 结果

2.1 水文水质调查结果

青岛太平角贝类养殖区位于胶州湾内, 砂泥砂砾底质, 水流速度 $0.5 \sim 1.6 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, 扇贝养殖水深 $1.0 \sim 5.0 \text{ m}$, 每笼扇贝数量 $220 \sim 260$ 个, 分 10 层, 每层约 $20 \sim 30$ 只。5- 11 月份, 养殖海区温度、盐度、pH 值、溶解氧 (DO) 分析结果表明 (图 1, 2), 温度变化范围为 $14 \sim 25.3 \text{ }^\circ\text{C}$, 盐度范围为 $30.5 \sim 31.8$, pH 值变动值为 $7.9 \sim 8.2$, 溶解氧为 $6.0 \sim 8.6 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, 与以往监测结果比较^[10], 以上指标未见明显异常变化。

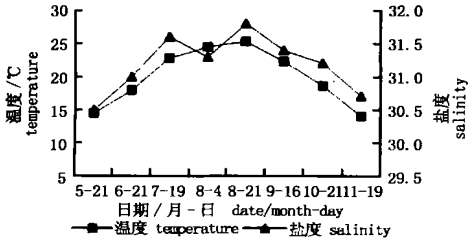


图 1 采样区水温、盐度动态变化

Fig. 1 The water temperature and salinity in sampling site in 2001

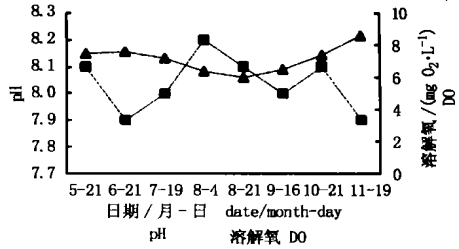


图 2 采样区 pH 值、溶解氧动态变化

Fig. 2 The water pH value and DO in sampling site in 2001

2.2 栉孔扇贝病原形态学观察

养殖海区栉孔扇贝组织悬液经负染色后在电镜下观察, 可见病毒粒子和类立克次氏体 (RLO) 两类病原体存在。病毒粒子存在于细胞质中, 呈球形, 直径为 $130 \sim 160 \text{ nm}$, 外被囊膜, 最外层为纤突, 长约 20 nm 左右, 内部结构不可见 (图 3)。类立克次氏体包涵体为圆形, 直径 $300 \sim 500 \text{ nm}$, 两层膜包被, 外膜不圆滑, 内部可见颗粒状包涵物 (图 3)。

2.3 栉孔扇贝病原体感染状况

海区栉孔扇贝的病原微生物感染状况连续观察发现, 在 5- 11 月份, 栉孔扇贝病毒感染率在 $80\% \sim 100\%$ 之间, 病毒感染强度, 5 月份仅能检测到零星的病毒粒子, 6 月份有所上升, 从 7 月下旬直到 8 月底病毒感染达到高峰, 随后 9 月份感染强度又趋于降低, 到 11 月份恢复到 5 月份的水平。栉孔扇贝累积死亡率 5、6 月份分别为 2% 和 3% , 7 月份明显上升, 达到 45% , 到 8 月初陡然增加到 90% 以上, 至 10、11 月份栉孔扇贝存活率仅为 $2\% \sim 3\%$ (图 4)。结果表明, 病毒感染强度的增加与栉孔扇贝暴发性死亡现象的发生时期几乎同步。同期类立克次氏体感染率变动范围为 $40\% \sim 50\%$, 感染强度基本维持在轻度感染水平, 未见明显涨落 (图 5)。

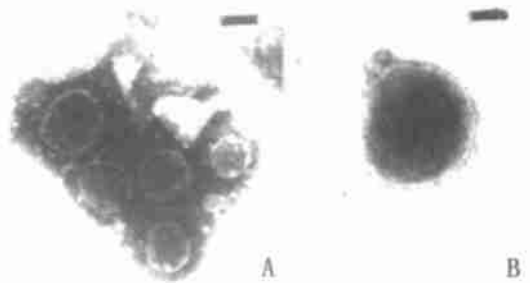


图 3 负染的病毒粒子与类立克次氏体

Fig. 3 Electron micrograph of negative staining viruses and RLO isolated from *C. farreni*, Bar= 100nm

人工感染实验结果表明 (表 2), 类立克次氏体感染组的病毒感染强度与对照组相似, 两者均有轻微感染。病毒和类立克次氏体混合感染组病毒感染强度有所上升, 为中度感染。病毒感染组所检测到的病毒粒子数量最高, 与养殖海区栉孔扇贝暴发性死亡期间发病扇贝的病毒感染强度相当。在 4 组感染实验组合中, 类立克次氏体的感染强度均未出现明显变化。

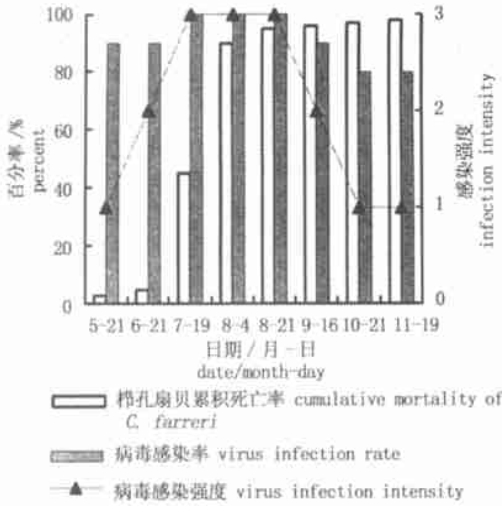


图5 病毒感染和栉孔扇贝累积死亡率动态变化

Fig. 5 The infection status of virus and the cumulative mortality of *C. farreri*

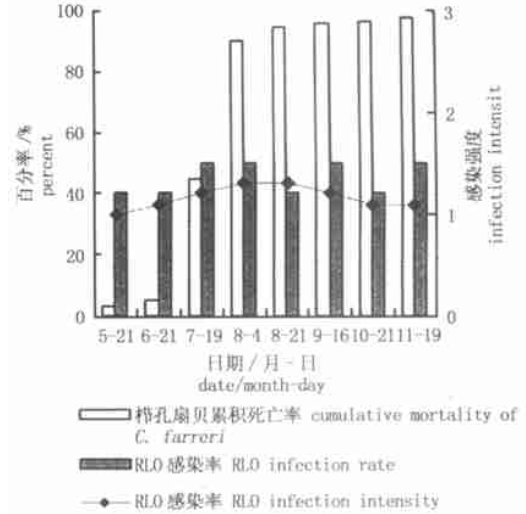


图6 RLO感染和栉孔扇贝累积死亡率动态变化

Fig. 6 The infection status of RLO and the cumulative mortality of *C. farreri*

表2 人工感染试验栉孔扇贝病原体感染情况

Tab. 2 Pathogenic infection status of artificial infected *C. farreri* in 2001

组别 treatment	数量 (ind) number	重量 (g) weight	病毒 virus		类立克次氏体 RLO	
			感染率 (%) infection rate	感染强度 infection intensity	感染率 (%) infection rate	感染强度 infection intensity
对照组 control	6	3.8	0	-	16.7	+
RLO 感染组 RLO	6	4.1	16.7	+	33.4	+
混合液感染组 virus and RLO	6	4.3	50	++	33.4	+
病毒感染组 virus	6	4.2	100	+++	16.7	+

注: - 未见; + 零星可见; ++ 粒子数较多; +++ 粒子数最多

Notes: - means no particles; + means few particles; ++ means more particles; +++ means most particles

3 讨论

3.1 栉孔扇贝大规模死亡与病毒的关系

流行病学的研究表明, 7、8月份是养殖海区栉孔扇贝发生大规模死亡的集中时期, 这一时期栉孔扇贝的死亡数量占到整个养殖期间死亡数量的90%以上。利用电镜负染技术对养殖期间栉孔扇贝病毒感染状况进行动态观测, 本研究结果表明, 在整个养殖期间栉孔扇贝病毒感染率一直在80%以上, 感染强度在不同养殖季节存在较大的变化, 养殖前期, 病毒感染率虽然较高, 但在感染栉孔扇贝的体内检测到的病毒粒子数量很少, 到了6月份, 扇贝组织体内病毒数量逐渐增高, 至7、8月份, 病毒感染强度达最高, 此时正是栉孔扇贝死亡集中发生时期, 进入9月份, 病毒感染强度开始下降, 至11月份, 感染强度与养殖前期相似。病毒的数量变动是感染程度的特征性标志^[1]。这一结果说明, 栉孔扇贝的大规模死亡可能与扇贝体内病毒粒子数量有关。电镜检测人工感染栉孔扇贝发现, 对照组虽然也检测到病毒粒子, 但病毒粒子数量不大, 在实验期间, 扇贝未大量死亡, 而病毒感染组中发病死亡的栉孔扇贝体内检测到数量极高的病毒粒子, 其感染强度与养殖扇贝发病时期(7、8月份)的感染强度相当。这一结果与宋微波等^[7]报道一致。综合分析认为, 病毒可能是导致栉孔扇贝大规模死亡的直接病原。

同期水文水质调查结果表明, 扇贝大规模死亡时期养殖海区饵料丰富, 底质条件适于栉孔扇贝生长, 温度、盐度、PH 值、溶解氧等各种理化因子均未见异常变化, 因而可以认为, 环境因素不是造成栉孔扇贝死亡的直接原因。进一步分析栉孔扇贝大规模死亡的季节性与病毒感染强度和养殖海区水温的季节性变化, 发现三者的季节性变化存在极大的相似性, 这似乎表明病害发生、扇贝体内病毒数量的增加与海水温度存在某种关系。据此推测, 我们认为, 海水温度可能是诱导病毒在栉孔扇贝体内大量增殖的主要环境因子。根据本研究的结果, 22~ 25℃是扇贝病毒增殖的适宜温度。

3.2 栉孔扇贝大规模死亡与类立克次氏体的关系

自从 Harshbarger 等^[12]首次在海洋双壳贝类体内发现衣原体、支原体和类立克次氏体以来, 目前全世界已在大约 25 种贝体内发现类立克次氏体, 其中在扇贝、巨蛤、鲍鱼、珍珠贝和牡蛎等都报道因类立克次氏体感染而发病及大规模死亡^[13- 15]。而本研究结果发现, 整个调查期间, 养殖扇贝虽有一定数量感染类立克次氏体, 但感染率未发生明显的季节性变化, 感染强度也始终维持在较低的水平, 与栉孔扇贝大规模死亡发生的时期没有表现出明显的相关关系, 该病原体不可能是导致扇贝发病的直接病原。

青岛大学医学院电镜室的谭金山, 侯颖[|] 和邹国祥老师给予了热情帮助, 在此[|] 并致谢。

参考文献:

- [1] Song Q Y, Luo W T, Wang W X, et al. Bacteriological study on the scallops (*Chlamys farreri* and *Argopecten irradians*) and their culture environment[J]. J Oceanography of Huanghai & Bohai Seas, 1997, 15(3): 26- 30. [宋庆云, 罗挽涛, 王文兴, 等. 扇贝养殖环境的细菌学分析[J]. 黄渤海海洋, 1997, 15(3): 26- 30.]
- [2] Yu R H, Wang R C, Tian C Y, et al. Discussion on the high mortality and its prevention in scallop, *Chlamys farreri*[J]. Trans of Oceanol and Limnol, 1998, (3): 69- 72. [于瑞海, 王如才, 田传远, 等. 栉孔扇贝大面积死亡的原因分析及预防探讨[J]. 海洋湖沼通报, 1998, (3): 69- 72]
- [3] Wang W X, Luo W T, Xue Q G, et al. Pathological research on chlamydia-like organisms in the hepatopancreatic gland of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck) [J]. Marine Science, 1998, 22(3): 23- 25. [王文兴, 罗挽涛, 薛清刚, 等. 海湾扇贝消化盲囊衣原体样生物的病理学研究[J]. 海洋科学, 1998, 22(3): 23- 25.]
- [4] Wang Y T, Xiang J H. Studies on causation of the mass mortality of *Chlamys farreri* [J]. Oceanol et Limnol Sin, 1999, 30(6): 770- 774. [王运涛, 相建海. 栉孔扇贝大规模死亡的原因探讨[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 770- 774.]
- [5] Guo F, Cui J, Song Y L, et al. Investigation on environmental pollution of *Chlamys farreri*. in culture waters of Shijiu in summer[J]. Marine Environmental Science, 2000, 19(2): 19- 21. [过 锋, 崔 毅, 宋云利, 等. 日照石臼扇贝养殖水域夏季环境调查分析[J]. 海洋环境科学, 2000, 19(2): 19- 21.]
- [6] Xiang J H. Disease occurrence and control strategies of mariculture organisms[M]. Beijing: Ocean Press, 2001. 1- 34. [相建海. 海水养殖生物病害发生与控制[M]. 北京: 海洋出版社, 2001. 1- 34.]
- [7] Song W B, Wang C M, Wang X H, et al. New research progress on massive mortality of cultured scallop *Chlamys farreri* [J]. Marine Science, 2001, 25(12): 23- 26. [宋微波, 王崇明, 王秀华, 等. 栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展[J]. 海洋科学, 2001, 25(12): 23- 26.]
- [8] State Oceanic Administration. Standard of ocean monitoring- standard of profession of the People' s Republic of China[S]. 1991, 2- 91. [国家海洋局. 中华人民共和国行业标准“海洋监测规范”[S]. 1991, 2- 91.]
- [9] Wang B Y, Li Y S, Huang G S, et al. Pathological techniques[M]. Beijing: People' s Hygiene Press, 2000, 304- 305. [王伯 , 李玉松, 黄高 , 等. 病理学技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 304- 305.]
- [10] Song W B. Progress in protozoology[M]. Qingdao: Qingdao Ocean University Press, 1999. 297- 324. [宋微波. 原生动物学专论[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1999. 297- 324.]
- [11] Fuhrman J A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects[J]. Nature, 1999, 399: 541- 548.
- [12] Harshbarger J C, Chang S C, Otto S V. Chlamydiae (with phages), mycoplasmas, and rickettsiae in Chesapeake Bay bivalves [J]. Science, 1977, 196: 666- 668.
- [13] Hine P M. Trends in research on diseases of bivalve mollusks[J]. Bull Eur Assoc Fish Pathol, 1997, 17(6): 181- 183.
- [14] Myers T R. Endemic diseases of cultured shellfish of Long Island, New York: adult and juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*) [J]. Aquac, 1981, 22: 305- 330.
- [15] Renault T, Cochenne N. Rickettsia-like organisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. J Invertebr Pathol, 1994, 64: 160- 162.