

研究简报

栉孔扇贝大规模死亡的原因探讨*

王运涛 相建海

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 于1998年7—9月,在发生贝类大规模死亡的山东省长岛县和烟台四十里湾养殖区,选取濒死的栉孔扇贝,通过组织病理分析和电镜观察,发现大量寄生原核生物——衣原体样原核生物(Chlamydia-like Organisms, CLO)和类立克次氏体(Rickettsia-like Organisms, RLO)。病理学研究表明,寄生原核生物(CLO和RLO)造成栉孔扇贝组织细胞严重病变,可能是引起栉孔扇贝大规模死亡的重要原因。

关键词 栉孔扇贝 衣原体样原核生物 类立克次氏体

学科分类号 S944.3

栉孔扇贝在中国海水养殖业中占有重要地位,也是出口创汇的支柱产品。近年来,频繁发生的栉孔扇贝大规模死亡事件,给中国的贝类养殖业造成了重大损失。根据山东省海洋与水产厅提供的资料,1997年山东省30万亩扇贝,有60%绝产,直接经济损失约15亿元。与1997年相比,1998年山东省的养殖扇贝发病迅速,死亡率高,受灾情况更为严重,直接经济损失达25亿元以上。辽宁省扇贝养殖区发生同样严重的死亡情况。贝类病害(shellfish disease)的研究最早见诸文献为1919年Danglade在佛罗里达的一种牡蛎体发现一种寄生蠕虫(Danglade, 1919);Orten(1924)报道了1920—1921年间发生在英国牡蛎苗期异常死亡原因的调查结果;Harshbarger等(1977)首次在海洋双壳贝类体内发现了衣原体、支原体和立克次氏体;Theodore(1981)研究了纽约长岛地区养殖贝类的地方性病害,在美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)和硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)体内发现了致病的节肢动物、寄生蠕虫、寄生原虫、放线菌、原核生物等多种致病生物。中国国内有关贝类病害的研究刚刚起步(吴信忠等,1997;王文兴,1998),研究报道较少。本文在对山东省养殖扇贝大规模死亡调查的基础上,从病原学、病理学角度探讨养殖扇贝大规模死亡的原因,以期为贝类病害的防治提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 样品

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)于1998年7—9月取自发生贝类大规模死亡的山东省长

* 国家“九五”攻关资助项目,96-922-02-04;中国科学院重大资助项目,KZ951-A1-102-02号。王运涛,男,出生于1966年10月,博士,E-mail: xbyc@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:1999-01-08,收修改稿日期:1999-01-22

岛县和烟台四十里湾养殖区的濒死个体,壳长为 4cm 左右。肉眼观察贝壳上附着生物较多,扇贝较瘦小,外套膜色素增多并向内收缩,贝壳开闭缓慢而无力。

1.2 组织病理检查

选取濒死的栉孔扇贝,将一侧贝壳去掉,用眼科剪解剖贝体,分别取外套膜、鳃、肝胰腺、肠、生殖腺,进行冷冻切片,切片厚度为 $8\mu\text{m}$,采用革兰氏(Gram-Weigert)染色法和吉姆萨(Giemsa)染色法进行染色,在光学显微镜下观察。

1.3 超微病理检查

选取濒死的栉孔扇贝,将贝壳去掉,用眼科剪解剖贝体,并用刀片将其外套膜、鳃、肝胰腺、肠、生殖腺分别切成 1mm^3 左右的小组织块,固定于 2.5% 的戊二醛中,然后再更换到 2% 的戊二醛固定液中,再经锇酸固定, Epon812 环氧树脂包埋,常规超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双染色,日立 H-7000 型透射电镜观察并拍照。

2 结果

2.1 组织病理切片观察

在光学显微镜下,栉孔扇贝外套膜、鳃、肝胰腺、肠组织中均有大量包涵体(Inclusion Bodies)。该包涵体形态多样,内含许多大小不等、圆形、椭圆或短杆状的嗜酸性颗粒,有的还形成空泡,使组织细胞及细胞的核膜膨大变形。该包涵体嗜酸性,吉姆萨染色呈紫色,革兰氏反应呈阴性。

栉孔扇贝的生殖腺组织结构正常,未发现包涵体样异物。

2.2 超微病理观察

通过透射电镜观察,在濒死的栉孔扇贝体内发现二种寄生原核生物:(1)衣原体样原核生物(Chlamydia-like Organisms, CLO);(2)类立克次氏体(Rickettsia-like Organisms, RLO)。CLO 主要侵染栉孔扇贝外套膜平滑肌的肌纤维间质(图 1a),破坏鳃丝细胞,使鳃丝细胞的线粒体膨大变形(图 1b);RLO 主要存在于栉孔扇贝的肝胰腺、肠和鳃组织,侵染这些组织细胞的核围隙(perinuclear space)及核膜周围的膜状结构,使核膜及膜状结构出现水肿、膨大,引起严重病变(图 1e, f)。这二种原核生物的寄生部位和数量见表 1。

表1 CLO、RLO在栉孔扇贝体内的寄生部位和数量

Tab.1 Positions and numbers of CLO and RLO in *Chlamys farreri*

| 原核生物 | 外套膜 | 鳃 | 肝胰腺 | 肠 | 生殖腺 |
|------|-----|---|-----|---|-----|
| CLO | + | + | - | - | - |
| RLO | - | + | + | + | - |

注: +表示病原体数量较多; -表示未发现病原体

3 讨论

在栉孔扇贝的外套膜、鳃、肝胰腺、肠组织中均发现有原核生物(CLO 或 RLO)侵染,其中外套膜、鳃、肝胰腺、肠的病变均十分严重。寄生于外套膜平滑肌的肌原纤维间质和鳃丝细胞质中的 CLO,大小介于细菌和病毒之间,革兰氏染色呈阴性,具有细胞壁,形态多型,有二分裂、出芽等多种繁殖形式,在其生活史中具有三个阶段,如图 1a 所示: IB(Initial Bodies)为 CLO 的初始体,较大的圆形颗粒,中央无致密的类核结构,而是呈纤维网状,外

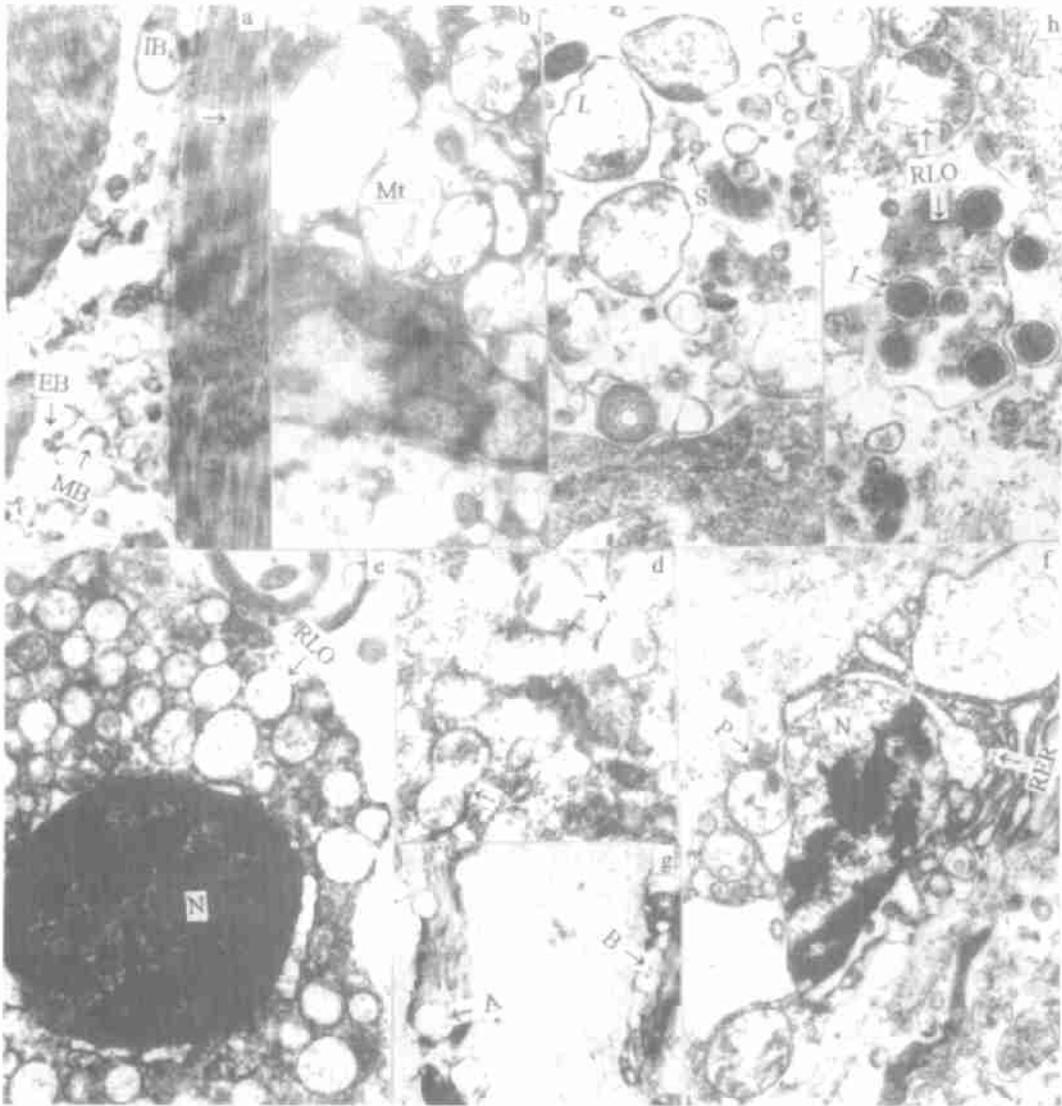


图1 濒死栉孔扇贝的超微病理检测结果

Fig.1 Ultrastructure pathological research in mortal specimens of *Chlamys farreri*

a. 示外套膜平滑肌纤维间质中大量存在的 CLO, 箭头示明暗不规则的平滑肌纤维, $\times 12\ 000$; b. 示被 CLO 侵染的鳃组织细胞的线粒体 (Mt), $\times 13\ 500$; c. 示鳃丝细胞中的 RLO, $\times 18\ 000$; d. 箭头示 RLO 的二分裂繁殖, $\times 22\ 500$; e. 示被 RLO 侵染的鳃组织细胞核的核空隙, $\times 15\ 000$; f. 示被 RLO 侵染的消化腺细胞的核空隙 (P) 及核膜周围的粗面内质网 (RER), $\times 15\ 000$; g. 示肠壁平滑肌被 RLO 侵染的情况, $\times 7\ 500$; h. 示肠组织细胞中发现的病毒粒子, $\times 30\ 000$. IB. CLO 的初始体; MB. CLO 的中间体; EB. CLO 的原始体; L. 呈空泡状的颗粒前体 (大细胞期); S. 结构致密的颗粒期 (小细胞期); N. 细胞核; A. 侵入肌纤维中的 RLO; B. 肌纤维间隙中的 RLO; I. 存在于 RLO 体内的病毒粒子 (噬菌体)

周围着一层致密的颗粒样物质, 并有二层囊膜包裹; MB (Intermediate Bodies) 为 CLO 的中间体, 出现明显的致密核区, 颗粒样物质增多; EB (Elementary Bodies) 为 CLO 的原始体, 体

形较小,电镜下呈致密的圆球形结构(王文兴等,1998)。CLO多侵染栉孔扇贝的外套膜、鳃等与外界环境接触较多的组织器官,充满外套膜平滑肌的肌原纤维间质,破坏鳃丝细胞的线粒体,造成栉孔扇贝的外套膜平滑肌病变萎缩,鳃丝细胞的线粒体膨大变形(图1a,b)。

RLO也是一类寄生于细胞质中的原核生物,大小介于细菌和病毒之间,革兰氏染色呈阴性,形态多型,有二分裂、出芽等多种繁殖方式。在生活史中具有明显的颗粒期(小细胞期)和颗粒前期(大细胞期)。RLO的颗粒期大多呈圆球形、短棒状或肾形,出现大量致密颗粒,有细胞壁,细胞壁表面常出现荚膜样的膨松结构。颗粒前期呈圆形或不规则空泡状,出现细丝状的类核区(吴信忠等,1997; Renault *et al*, 1994)(图1c,d)。RLO多侵染扇贝肝胰腺、肠、鳃组织,充满这些组织细胞的核围隙(perinuclear space)及核膜周围的粗面内质网,使核膜出现水肿、膨大,引起严重病变(图1e,f)。国外在牡蛎及蛤类方面也有过类似的报道(Harshbarger *et al*, 1977; Theodore, 1981)。在病变严重的栉孔扇贝肠壁平滑肌肌纤维间质中有大量RLO,在肌纤维内部也存在RLO,RLO在肌纤维内部寄生的现象(图1g),还未见报道。

在栉孔扇贝的肠组织上皮细胞中,发现有少量的病毒粒子,该病毒粒子呈卵原形,直径为180nm左右,形成两层膜的包涵体,外膜与核体间有一层电子密度较低的区域。在扇贝肠组织上皮细胞的细胞质中发现有该病毒粒子,同时,在寄生于细胞内的RLO体内也发现有该病毒粒子,Harshbarger等(1977)将这种病毒也称之为噬菌体(图1h)。

在濒死的栉孔扇贝体内发现的寄生原核生物(CLO和RLO),特别是RLO的侵染部位广,数量多,很可能是造成栉孔扇贝大规模死亡的重要原因。本研究中发现的病毒粒子,数量较少,是否也会引起栉孔扇贝的死亡,还有待深入研究。

参 考 文 献

- 王文兴,罗挽涛,薛清刚等,1998. 海湾扇贝消化盲囊衣原体样生物的病理学研究. 海洋科学, 3:23—25
- 吴信忠,潘金培,1997. 热带海洋珍珠贝类立克次体病研究. 热带海洋研究, 5:110—117
- Danglade E, 1919. The flatworm as an enemy of Florida oysters. Rep U S Commer Fish, 1918(Appendix), (5):1—8
- Harshbarger J C, Chang S C, Otto S V, .1977. Chlamydiae (with phage), mycoplasma and rickettsiae in Chesapeake Bay Bivalves. Science, 196:666—668
- Orton J H, 1924. An account of investigations into the cause or, causes of the unusual mortality among oysters in English oyster beds during 1920 and 1921. Fisheries Investigation, SeriesII, Marine Fisheries Great Britain, Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food, 6(3):1—199
- Renault T, Cochenne N, 1994. Rickettsia-like Organisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. J Invertebr Pathol, 64:160—162
- Theodore R Meyers, 1981. Endemic diseases of cultured shellfish of Long Island, New York: adult and juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*). Aquaculture, 22:305—330

STUDIES ON CAUSATION OF THE MASS MORTALITY OF *CHLAMYS FARRERI*

WANG Yun-tao, XIANG Jian-hai

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

Abstract From July to Sept., 1998, the pathological changes of the mass mortality of *Chlamys farreri* in Changdao and Yantai districts of Shandong province were studied by light and electron microscopes. Two parasitic organisms were discovered in *Chlamys farreri*. They are Chlamydia-like Organisms (CLO) and Rickettsia-like Organisms (RLO). Under the light microscope, the organisms parasitized in *Chlamys farreri* appeared as eosinophilic intracytoplasm inclusions, the inclusion was Gram-weigert negative and Giemsa positive. Ultrastructurally, CLO appeared to have three stages: initial bodies, intermediate bodies and elementary bodies; RLO underwent typical pregranular and granular developmental stages with outer puffy trilaminar membranes. It is regarded as RLO and CLO that had caused the mass mortality of *Chlamys farreri*.

Key words *Chlamys farreri* Chlamydia-like Organisms Rickettsia-like Organisms

Subject classification number S944.3