

一株形态特殊的细菌对栉孔扇贝致病性的初步研究*

徐彪^{①②} 杨红生^{①**}

(①中国科学院海洋研究所 青岛 266071; ②青岛出入境检验检疫局 青岛 266002)

摘要: 为研究分离到的一株形态特殊的细菌对栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 致病性, 采用测定病原液蛋白含量的方法, 对病原相对定量。用含 200 ~ 300 μg/ml 蛋白的病原液进行了不同浓度梯度、同一温度和相同浓度梯度、不同温度对栉孔扇贝的致病作用的测试, 结果表明: 扇贝人工感染后潜伏期 3 ~ 7 d, 死亡高峰期为 5 ~ 10 d, 符合一般病原感染的规律。病死贝的一般病理变化与养殖海区自然发病扇贝的病理变化一致。23, 26℃ 下该病原体对栉孔扇贝具有强致病作用。可以确定该细菌为造成栉孔扇贝大规模发病死亡的主要病原之一。

关键词: 栉孔扇贝; 细菌; 致病性

中图分类号: S944 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)04-24-04

Pathogenicity of a New Bacterium to *Chlamys farreri*

XU Biao^{①②} YANG Hong-Sheng^①

(① Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071;

② Qingdao Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

Abstract: In order to study the pathogenicity of a bacterium to the scallop *Chlamys farreri*, we calculated pathogenic protein in dilution to determine the pathogenic concentration. Scallops were infected with 200 - 300 μg/ml pathogenic protein to detect pathogenicity. The experimental design incorporated different pathogenic concentrations at the same temperature and different temperatures at same concentration. The incubation period was about 3 - 7 days and the highest mortality occurred at 5 - 10 days after infection. Tissue of dead and dying scallops was similar to that from spontaneous cases. The bacterium displayed intense pathological activity to scallops at 23℃, 26℃ and is one of the main scallop pathogens.

Key words: *Chlamys farreri*; Bacterium; Pathogenicity

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 在近几年夏季高温季节连续发生大规模死亡现象^[1,2], 已成为社会各界广泛关注的热点。根据已有报道, 其可能病原主要有: 病毒^[3-6]、类衣原体^[7]、类枝原体^[8]。作者从发病的栉孔扇贝体内分离到一种形态极为特殊的细菌^[8], 它的形状基本为圆形或近似圆形, 最小的直径约 50 ~ 60 nm, 而个别

大的菌体直径可达 4 000 nm 以上。与自然发病

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30170742), 国家“973”项目 (No. G1999012012);

** 通讯作者, E-mail: hshyang@ms.qdio.ac.cn;

第一作者介绍 徐彪, 男, 37 岁, 博士研究生, 高级兽医师; E-mail: xuwenlu@hotmail.com.

收稿日期: 2003-04-18

栉孔扇贝组织切片中发现的病原粒子进行比较,其形态特征一致。初步确定可能为一种新的细菌。本研究用该病原菌对栉孔扇贝进行人工感染,以研究其致病性、发病规律及病理变化等。

1 材料与方法

1.1 实验材料的采集 典型发病栉孔扇贝采自荣城养殖海区,健康贝购自黄岛海水养殖场。

1.2 细菌的分离与纯化 采集典型发病扇贝,打开贝壳,以灭菌海水冲洗5次,无菌取肝胰腺、消化腺、外套膜于灭菌的玻璃研磨器中进行研碎,5 000 g 低速离心 10 min,取上清液接种在含 2.2% NaCl 的营养琼脂平板上,24 h 后镜检;进一步纯化,直至形成在低倍显微镜下可见的无色透明圆形小点状菌落^[9,10]。

1.3 病原菌的人工大量纯培养 显微镜下挑取单个菌落接种于 MEM(2.2% NaCl、5% 小牛血清),于 30℃ 振荡培养 24 h,于 15 000 g 离心 30 min,将培养液浓缩 30 倍后重新接种于 MEM(2.2% NaCl、5% 小牛血清)中振荡培养 24 h,按上述方法浓缩 50 倍后,以灭菌海水洗两遍,重悬菌体,用核酸蛋白测定仪测定细菌蛋白含量,根据细菌蛋白的浓度将其稀释成含蛋白为 200~300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的病原液用于试验。

1.4 病原菌对栉孔扇贝的致病性

1.4.1 温度梯度病原回归感染试验 取重 35~50 g 的健康栉孔扇贝 240 粒,分 8 组,每组 30 粒,分别笼养于约 100 L 体积的水体内,试验期内每天换水约 50%。设定试验温度分别为 17、20、23、26℃,每个温度设 1 个试验组和 1 个对照组。常温适应 10 d,开始以海水控温仪按平均每天 0.5~1℃ 升温,到达每组相应的设定温度后停止升温。升温全部停止后,所有各组再适应 8 d,选活力良好的扇贝,每组保留 15 粒。试验组每粒闭壳肌注射 0.1 ml 含细菌蛋白 227 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 病原液,对照组每粒闭壳肌注射灭菌海水 0.1 ml。每天 8:00、12:00、17:00 时以水银温度计测定各组水体温度,并观察扇贝发病的症状,对濒死期扇贝进行解剖,观察其病理变化。

1.4.2 浓度梯度回归试验 取 30~45 g 健康栉孔扇贝 120 粒,分别笼养于 3 个装有 0.25 m^3 水体的自制人工养殖系统中,编号为 1、2、3 号,常温下适应 7 d。按平均每天 0.5~1℃ 升温,各组实测温度达到 23℃ 后,适应 7 d。选 90 粒活力良好的栉孔扇贝,每个系统 30 粒。按表 2 分组,1 号分 3 组,每组 10 粒,分别闭壳肌注射 0.1 ml 10^0 (246 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、 10^{-1} (24.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、 10^{-2} (2.46 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的病原液。2 号分 4 组,分别为:二组各 10 粒分别闭壳肌注射 0.1 ml 10^{-3} (0.246 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和 0.1 ml 10^{-4} (0.0246 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的病原液,一组 5 粒放入 10 L 富含病原的水体中 12 h 后放回 2 号,一组 5 粒闭壳肌注射 0.1 ml 生理盐水。3 号 30 粒为对照组。每天 8:00、12:00、17:00 时以水银温度计测定各组水体温度,并观察扇贝发病的症状,对濒死期扇贝进行解剖,观察其病理变化。

1.5 细菌的再分离 按 1.2 方法对发病死亡扇贝进行细菌分离。

1.6 自然发病与人工感染扇贝的比较 从荣成扇贝养殖海区采集发病栉孔扇贝进行解剖,检查其发病症状和病理变化。与人工感染栉孔扇贝的发病症状和病理变化进行比较。

2 结果

2.1 症状及病理变化 首先出现的症状是扇贝的活力减弱,外套膜逐渐由贝壳外周向闭壳肌萎缩,变苍白。滤食作用逐渐减少,濒死前外套膜与贝壳逐渐分离。发病初期闭壳肌收缩无力,最终完全松弛,贝壳张开死亡。发病后肠内容物减少,濒死期肠末端肛门处有黑褐色粘稠物质。死亡后的扇贝肠腔内基本无内容物。

2.2 潜伏期与死亡高峰 人工感然潜伏期在 3~7 d 之间,死亡高峰一般在 5~10 d 之间出现。

2.3 温度与发病的关系 该病的发生与温度的关系极强,从表 1 可以看出 17、20℃ 试验组死亡数虽多于对照组但超过的幅度较小,而 23、26℃ 试验组与对照组死亡数对比则非常明显。这表明温度与扇贝死亡有明显的相关性,且在

高温下,该病原体对栉孔扇贝具有强致病性。

2.4 浓度与发病的关系 如表 2 所示,用浓度高于 2.46 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的病原液感染栉孔扇贝,可致栉孔扇贝大量死亡。除 24.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组有些变化

外,总体趋势是随注射病原浓度的降低,死亡率降低。扇贝滤食高浓度病原也可导致其发病死亡。

表 1 温度梯度回归感染试验扇贝死亡情况(15 d)

	17℃		20℃		23℃		26℃	
	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组
试验投放数	15	15	15	15	15	15	15	15
死亡数	2	5	4	7	1	14	2	15

表 2 浓度梯度回归试验(15 d)

	1号(30粒)				2号(30粒)		3号(30粒)	
	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	吞饮滤食组	注射盐水组	对照组
试验投放数	10	10	10	10	10	5	5	30
死亡数	9	5	8	2	1	3	1	1

2.5 病原体的再分离 从病死栉孔扇贝体内重新分离到了试验用病原菌。

3 讨论

3.1 潜伏期、病理变化、临床症状等符合传染病的基本特征 该病原在接种后不论浓度大小、养殖水温度高低均具有一定时间的潜伏期,且发病后具有明显的死亡高峰。这一特征不同于一般致病性细菌的病原浓度太大会导致试验动物在十几小时或几小时之内死亡的特征,而是符合传染病的发病规律。其病理变化、临床症状与高温季节发病扇贝基本一致。本试验中没有对不同浓度病原、不同温度对栉孔扇贝死亡高峰及发病潜伏期的影响进行专门研究,有关这方面的问题在今后的研究工作中还要进一步探讨。

3.2 病原蛋白含量与病原浓度 该细菌大部分个体极小,光学显微镜下看不清楚,也不能按常规细菌计数法进行细菌计数,因此作者用核酸蛋白分析仪测定菌体蛋白含量,对病原菌进行相对定量,有关病原浓度的测定及病原定量问题有待于进一步研究。

3.3 扇贝死亡量与病原浓度的关系 在浓度梯度回归试验中,出现了病原浓度为 10^{-2} 组的死亡数低于 10^{-3} 组,这可能是由于所取的扇贝

个体差异较大造成的。但扇贝的死亡量与病原浓度的变化总体趋势基本一致,即随着病原稀释浓度的降低,扇贝死亡量趋于减少。

3.4 扇贝死亡率与温度的关系密切 由于试验条件所限,只进行了 4 个温度的病原回归感染试验。17、20℃ 对照组的死亡率较高,这可能是由于试验期间扇贝产卵、抵抗力降低而造成的。23、26℃ 下试验组有较高的死亡率,这一结果与近年来栉孔扇贝在高温季节大规模死亡的现象基本一致。高温下对照组在试验期间没有出现大量死亡,可能是由于采取了投入量远远高于试验量的作法,预先淘汰了抵抗力弱的扇贝所致。

栉孔扇贝在高温季节大规模死亡,可能是由于扇贝为变温动物,体温随海水温度的变化而变化,而适当的温度是病原菌能进行正常繁殖的必要条件,当养殖水体升到一定温度时,达到了该细菌生长所需温度,细菌开始繁殖,对贝体造成损害并导致扇贝的最终死亡。

总之,本研究所分离到的形态特殊的细菌为栉孔扇贝大规模死亡的主要病原之一。

参 考 文 献

- [1] 张福绥,杨红生. 山东沿岸夏季栉孔扇贝大规模死亡原因分析. 海洋科学, 1999, 1: 44 ~ 46.

- [2] 张福绥,杨红生. 栉孔扇贝大规模死亡问题的对策和应急措施. 海洋科学, 1999, 2: 38 ~ 42.
- [3] 王崇明,宋微波,王秀华等. 栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展. 海洋科学, 2001, 25(12): 23 ~ 26.
- [4] 王崇明,宋微波,宋晓玲等. 栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察. 水产学报, 2002, 26(2): 180 ~ 184.
- [5] 相建海,王运涛. 栉孔扇贝大规模死亡的原因探讨. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 770 ~ 773.
- [6] 李登峰,孙敬峰,吴信忠. 栉孔扇贝体内寄生的病毒的分离纯化及其形态学观察. 海洋学报, 2000, 24(4): 145 ~ 148.
- [7] 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. 海洋科学, 1998, 3: 23 ~ 25.
- [8] 李登峰,吴信忠. 栉孔扇贝体内类支原体样生物的分离纯化. 海洋学报, 2000, 24(4): 141 ~ 144.
- [9] 徐彪,杨红生,宋林生等. 一株从栉孔扇贝体内分离到的分类地位待定的特殊微生物. 海洋科学, 待发表.
- [10] 曹澍泽主编. 兽医微生物学及免疫学技术. 北京: 北京农业大学出版社, 1992. 3 ~ 4.
- [11] Roch P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 1999, 172: 125 ~ 145.