

栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展*

NEW RESEARCH PROGRESS ON MASSIVE MORTALITY OF CULTURED SCALLOP *Chlamys farreri*宋微波¹ 王崇明² 王秀华² 李 贇¹ 李 筠³¹ 青岛海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 266003)² 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)³ 青岛海洋大学 海洋生命学院 266003)

对导致我国北方海区栉孔扇贝在养成期大规模死亡的病原研究已成为国内养殖界各方关注的焦点之一。其中对致病原因的探查工作至今至少涉及到原核类微生物(如立克次体、衣原体等)、病毒、寄生原生动物、环境因子(如饵料、水温等)以及微生物等几方面^[1-4, 6-9]。

在国家重大基础研究规划项目(973)的资助下,我们自2000年1月起对导致栉孔扇贝大规模死亡的各种可能诱因分别从流行病学、环境、组织病理学以及病原学角度开展了深入、全面的调查与检测^[2]。在此基础上,本课题组最近又开展和完成了对栉孔扇贝各类可疑病原的进一步的排查、感染与验证工作。目前所取得的结果进而显示,一种球形病毒可能系导致栉孔扇贝大规模死亡的直接病原。

本文扼要介绍了本课题研究所取得的最新进展。

1 有关病原排查

针对近年来连续发生的栉孔扇贝养殖中的大规模死亡现象,我们对南起山东日照、北至大连的十余个扇贝养殖水体开展了两个周期(2000~2001年)的流行病学调查。结果表明,栉孔扇贝的死亡表现了一致的规律:暴发性发作、高死亡率、在时间上自南向北的传染病样波及、集中在高水温期(23~26℃,即养殖中后期)以及患病个体表现出完全相同的表现征象等。考虑到栉孔扇贝在我国北方沿海地区已有30a甚至更长的养殖历史,而上述病害的发生仅为近年来才出现的现象,因此病因调查和排查工作从全方位的角度出发,包括详细的环境理化因子、生物性因子、组织病理学、寄生虫学以及流行病学等全面、系统的采集和分析。

1.1 环境因子

多因子调查工作选择在黄岛栉孔扇贝养殖场开展,调查所涉及的主要理化参数如水温,盐度, pH, NO₃⁻, NO₂⁻以及氨氮(NH₃-N), PO₄³⁻等因子与参照海区

近年来的周年变动无任何异常变化^[5]。其中对养殖生物危害性较大的如亚硝氮及氨氮的峰值均低于0.2 mg/L(安全浓度限内),且该峰值与扇贝死亡高发期明显偏离(图1)。因此可以认为,水体上述理化因子均不可能是导致栉孔扇贝大规模死亡发生的直接因子。

同步开展的对水体浮游植物生物量的调查结果也表明(文另发),饥饿或饵料匮乏在栉孔扇贝养殖中后期(5~8月;图2)的调查海区内不应存在或至少不会是一明显存在的因素,此结论同时也可由濒死个体以及存活下来个体仍然具有饱满的内脏团或生殖腺这一事实加以印证。据此,本调查可以明确地排除因饥饿原因而导致扇贝大量集中死亡原因的推测。

1.2 生物性因子

鉴于栉孔扇贝死亡期间所表现出的病害“传染病样”迅速发生和蔓延这一特征,我们对各类可疑病原生物分别开展了排查性研究,这项工作涉及了4大类群:细菌类微生物、原生动物类寄生虫、病毒以及立克次体。

利用分离自高发死亡期栉孔扇贝体表的优势菌所开展的宿主感染实验表明,绝大部分受试细菌无明确的感染性(文另发)。其中4株具感染力的菌株在高达10⁶/ml感染密度下,各组受试扇贝仍具有很高的存活率(>50%),这显然与自然状态下各调查海区(山东、辽宁沿海12个自然养殖海区)集中于7~8月份大规模暴发性死亡(死亡率往往>90%)这一现象不相符^[1-4]。而对濒死和新死亡个体的组织学检查结果也否定了病变组织内细菌的存在。因此,该类可疑寄生物应自致死性病原之列排除。

* 国家重大基础研究规划项目(973),课题编号 G199901-2001;本工作主要参加人另有:青岛大学的朱明壮、胡晓钟、龚骏、郑桂丽、黄剑宇、贺桂珍等。

收稿日期:2001-09-28;修回日期:2001-10-08

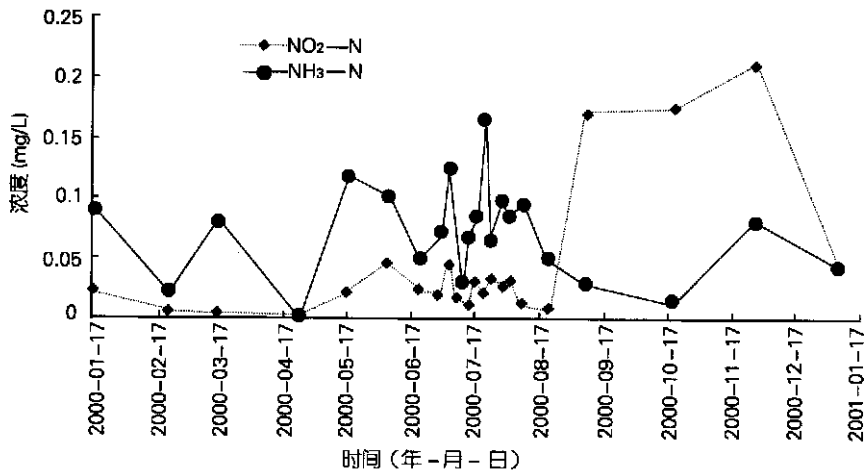


图1 青岛栉孔扇贝养殖海区2000~2001年亚硝酸盐氮和铵态氮的周年变化

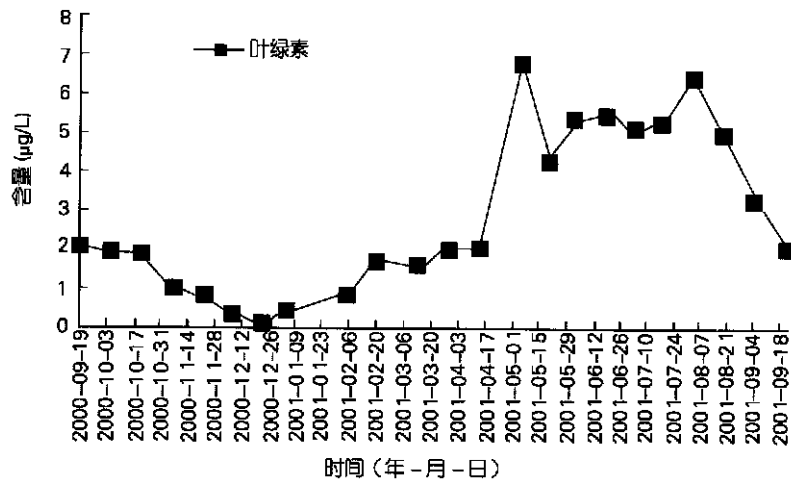


图2 青岛栉孔扇贝养殖海区2000~2001年叶绿素a的周年变化

对寄生物的详细检查还表明:至少有两类原生动物寄生虫较广泛地存在于扇贝体内外:外寄生的纤毛虫类及内寄生的顶复门类的帕金虫 (*Perkinsus* spp.)。它们分别存在于扇贝的体表(外套腔内-鳃表)或内寄生于组织内。但无论是病理组织学还是流行病学的调查结果均显示两者的感染率与宿主高发死亡时期以及死亡率完全不相关(表1),其中组织内寄生的帕金虫在高发死亡期被调查的濒死个体中感染率往往低于10%,且感染强度很低(通常甚至明显低于在几乎无死亡发生的稚贝期)(文另发)。因此完全有理由推论,这两类寄生虫显然也不应是导致扇贝大规模死亡的直接致死病原。

2 对病毒及立克次体病原的感染试验

电镜以及组织病理学检查的结果表明,在濒死个体中普遍存在一种球形病毒以及立克次体,且流行病学调查资料显示,该类病原感染分别与栉孔和海湾扇贝在死亡时机、死亡率与感染率上表现了一定或显著的(尤其是前者)相关性(表2)。基于这一结果,作者在2001年5~10月间分别安排了多批次的此两类可疑致病原对栉孔扇贝和海湾扇贝的感染试验。

目前已完成了对栉孔扇贝的感染试验以及对感染后个体的(电镜水平的)病原复检工作(待发),围绕海湾扇贝的工作尚在进行中。

表 1 2000 年栉孔扇贝及海湾扇贝体内外寄生性原生动

寄生原生动物种名	感染部位	感染率 (%)	感染强度	检获时间 (年.月.日)	宿主
庞氏尖颈虫 (<i>Trachelostyla pangi</i>)	外套腔	100	+++	2000.2.22	栉孔扇贝
	外套腔	100	++	2000.3.16	栉孔扇贝
	外套腔	100	+++	2000.4.9	海湾扇贝
海洋鬃毛虫 (<i>Stichotricha marina</i>)	外套腔/鳃	100	++++	2000.1.18	海湾/栉孔扇贝
扇贝聚缩虫 (<i>Zoothamnium chlamydis</i>)	鳃	100	+++	2000.3.16	栉孔扇贝
亚桶后口虫 (<i>Boveria subcylindrica</i>)	外套腔/鳃	40	+	2000.4.9	栉孔扇贝
拟武噬污虫 (<i>Philasterides armatalis</i>)	外套腔	50	+	2000.6.20	栉孔扇贝
指状拟舟虫 (<i>Paralembus digitiformis</i>)	外套腔	30	+++	2000.7.14	栉孔扇贝
蠕状康纤虫 (<i>Cohnilembus verminus</i>)	外套腔	60	+	2000.8.21	栉孔扇贝
相似拟尾柱虫 (<i>Paraurostyla similis</i>)	外套腔	50	+	2000.9.19	栉孔扇贝
中华后脑虫 (<i>Metanophrys sinensis</i>)	外套腔/鳃	100	++++	2000.9.20	栉孔扇贝
柱纤口虫 (<i>Chaenea retes</i>)	外套腔	100	++++	2000.5.17	栉孔扇贝
小腹柱虫 (<i>Gastrostyla minuta</i>)	外套腔	100	+	2000.8.21	栉孔扇贝

注: + 数目极少; ++ 数目一般; +++ 数目较多至很多; ++++ 数目极大, 表 2 同。

表 2 黄岛海区 2001 年栉孔扇贝之病毒和立克次氏体的自然感染检测(根据电镜负染结果统计)

日期 (年.月.日)	壳长 (cm)	累积死亡率 (%)	球状病毒		立克次氏体	
			感染强度	感染率 (%)	感染强度	感染率 (%)
2001.5.20	3.2~5.2	2	+	90	+	30
2001.6.21	4.0~5.8	3	++	90	+	30
2001.7.20	3.3~6.5	40	+++	100	+	20
2001.8.03	5.3~7.0	96	+++	100	+	50
2001.8.20	5.4~6.8	95	++	100	+	30
2001.9.16	5.0~6.0	98	++	100	+	60

注: 同期该水域内栉孔扇贝死亡集中于 7 月, 累积死亡率约为 90%。

在对栉孔扇贝所开展的试验中, 为了解病毒和立克次体这两类病原与病发之间的关系, 感染按照不同的组合加以开展。其中除(病毒 + 立克次体的)混合感染和空白对照外, 另行通过微孔滤膜筛选、加抗生素处理感染物等方法以分别获得单一的感染用源生物。

图 3 给出了 2001 年 9 月第 4 批次的感染试验结果, 其中空白对照组 100% 存活, 病毒感染与混合感染组(即病毒与立克次体同时存在)的死亡率相同, 均为 58%; 相比之下, 立克次体感染组为 17%(存活率高达 83%)。与养殖水体中栉孔扇贝 7~8 月份常达 90% 以上的“自然”死亡率相比, 感染试验中的死亡率略偏低(58%)。但需要提出的是, 该试验用扇贝取自大规模死亡期(7~8 月)之后的养殖水体, 这可能代表了经过自然淘汰而己在某种程度上获得了“免疫能力”的个体, 因此在经过高密度的注射感染后仍有较多的存活。同样可以推测的是, 由于本感染试验仅进行了 16 d, 后续死亡仍可能发生, 因此实际的致死率可能还要高些。但对照较前开展的 3 个批次的感染试验(待发), 第 4 批感染后个体存活时限明显较长(前期试验中 2 周内死亡率可达 80%~100%)。我们由此也可进一步推定, 在大规模死亡发生后, 存活者可能具备了对病毒的某种抗性, 此时扇贝可能为病

毒携带者, 但在自然状况下通常均可顺利生存(参见表 2、图 3)。

单独的病毒感染与混合感染(病毒与立克次体混合)显示了完全一致的致死率, 而单独的立克次体感染致死率仅为 17%。考虑到立克次体感染个体可能仍混有一定量的病毒(立克次体感染源系来自以 0.45 μm 微孔滤膜过滤掉病毒后的膜上堆积物, 而在滤膜孔被阻塞的情况下, 不可避免仍将有病毒粒子留在其内), 且感染用个体自身(理论上)也极可能为病毒携带者(参见表 2), 因此, 实际确由立克次体所导致的宿主死亡率应明显低于 17%。换言之, 这一较低的死亡率可能主要仍为病毒所致, 而立克次体仅为一协同因素。对人工感染并死亡后的个体所做的电镜检查也证实, 在病毒及混合感染组内死亡个体内均发现了大量病毒, 而立克次体在混合感染组未检出。在立克次体感染组可见少量的病毒但未见立克次体的存在(文另发)。这一结果与流行病学调查以及组织病理学检验的结果相吻合(表 2)。作为对本感染试验结果的综合分析和推论, 我们有证据客观地指出: 病毒感染与栉孔扇贝死亡具有最直接的相关, 而立克次体则对该宿主的死亡关系不显著。

3 讨论与小结

作为迄今各方信息的汇总,尤其是不同种(海湾扇贝与栉孔扇贝)在死亡现象与过程所表现的系统性差异以及感染试验所提供的结果,作者认为,通常所言的扇贝大规模死亡是一外延不清的模糊表述。作为

病症,针对两种扇贝而应予以不同的定义:与海湾扇贝的渐进性死亡及较早期发生和较低死亡率不同,栉孔扇贝死亡明显表现有自身所具的规律:(1)集中发生在养殖中后期,即较高水温期间;(2)具流行性、暴发性及极高的死亡率(短期内常达90%甚至以上)特征;(3)具共同的濒死体征:外套膜萎缩、反应迟钝、活

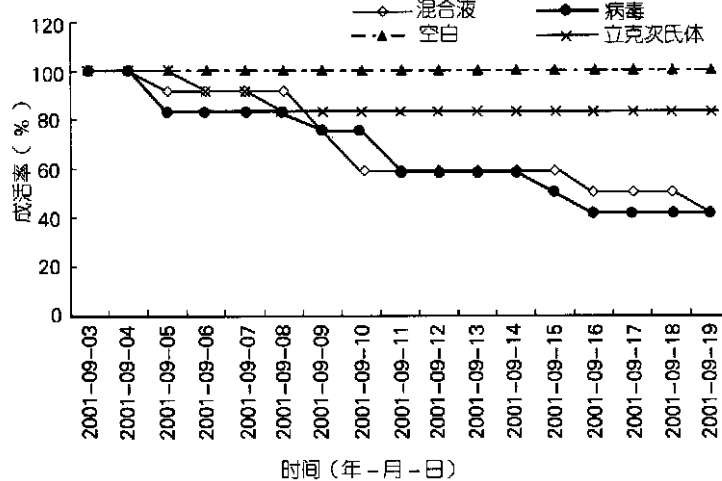


图3 栉孔扇贝病毒与立克次体感染试验结果(“混合液”为病毒+立克次体的混合体)

动力减弱、不表现任何可见的炎症或体色上的变化。组织学检验表明濒死个体普遍表现为大量存在同样特征的(球形)病毒样病原(可存在于鳃、外套膜、消化道、肝胰脏、肾等部位),且伴有受感染组织的广泛坏死现象(文另发)。

鉴于上述共同的特征,尤其是两年来全面、系统的病原排查以及感染试验所提示的结果,我们已可以基本认定,近年来引发栉孔扇贝在养殖中-后期大量死亡的直接(或首要)原因为病毒所致,并进一步建议将通常所称的栉孔扇贝大规模死亡现象予以合理的名称:栉孔扇贝的急性病毒性坏死症(Acute Virus Necrotic Disease; AVND),以区别于扇贝养殖早期因(非病毒性的)其他因素所致的死亡现象(同时也包括具不同表症的海湾扇贝死亡,有关导致后者病害的病原确定工作仍在进行中)。

综合迄今所取得的资料,有关栉孔扇贝死亡与其他生物及环境因子的关系初步可给予下列大致的结论:(1)排查和感染试验结果表明,病毒极可能为导致栉孔扇贝大规模死亡的直接原因。这一工作同时也认同许多前人的推论^[4],即大规模死亡的原因除上述直接病原外,环境污染、抗逆能力下降(种质退化)、其他寄生物的胁迫、不合理的养殖方式等也极可能是发病的重要诱因。(2)各单一的环境理化因子与扇贝大规模

死亡无直接的因果作用,但有可能通过协同病原繁殖等途径而间接地施加负面影响(如水温等)。(3)细菌及各类寄生虫(包括纤毛虫、阿米巴等)与扇贝大规模死亡的发生无明确的相关关系。(4)海湾扇贝与栉孔扇贝对病毒和立克次体两种病原可能存在不同的易感性及抵抗力,因此引致在相同或相邻水体两种扇贝在感染率、死亡率、发病特征等所表现的显著差异。(5)栉孔扇贝大规模死亡期间在大量感染病毒病原的同时,也往往伴有立克次体的存在,感染试验结果表明,后者对宿主的死亡极可能无明确的协同加害作用。

参考文献

- 王文兴等. 海洋科学, 1998, 22(3): 23~25
- 王崇明等. 海洋科学, 2001, 25(4): 24
- 王运涛, 相建海. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 770~774
- 张福绥, 杨红生. 海洋科学, 1999, 23(1): 44~47
- 胡晓钟, 宋微波. 原生动植物学研究进展. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1999. 1~362
- Hu X., Song W.. *Hydrobiologia*, 2001, 448: 171~179
- Song W.. *Acta Protozool.*, 2000, 39: 45~74
- Wu X., Pan J.. *J. Fish Diseases*, 2000, 23: 409~414
- Xu K., Song W., Warren A.. *Syst. Parasitol.*, 1999, 42: 229~237

(本文编辑:刘珊珊)