

一株从栉孔扇贝病贝体内分离到的分类地位待定的特殊微生物*

徐彪^{1,2,3} 杨红生^{1**} 宋林生¹ 梁成珠² 朱来华²
吴华² 张福绥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)

(³中国科学院研究生院 北京 100008)

提要 从典型患病栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)体内分离到一株特殊微生物,光镜下可见的粒子为革兰氏染色阴性;电镜观察为圆形、近似圆形,已经发现的粒子大部分直径在300 nm以下,最小为50 nm左右,最大可达4 000 nm以上。该细菌在人工培养基上形不成肉眼可见的菌落,倒置显微镜下其菌落为无色透明、圆形、小点状菌落。生化特性测试表明该细菌能利用吐温-40与吐温-80。其分类地位尚待进一步分析和证实。

关键词 栉孔扇贝,特殊微生物

中图分类号 Q93 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)09-0074-04

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是我国浅海筏式养殖的主要贝类之一,具有生长快,肉质鲜美等特点。1997年以来,栉孔扇贝在夏季高温季节连年发生大规模死亡,引起社会各界的高度重视。为了查明栉孔扇贝大规模死亡的直接原因,国家基础研究规划项目(973项目)和国家自然科学基金项目都专门立项,国内学者做了大量卓有成效的研究工作,提出了许多见解。根据已有报道可能病原主要有:病毒^[3,5],类衣原体^[4],立克次氏体等。本研究从细菌的角度出发进行栉孔扇贝病原菌的分离、纯化和人工纯培养,探讨某些特殊细菌在栉孔扇贝发病过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料的采集

典型发病栉孔扇贝采自于岚山和胶南养殖海区。

1.2 细菌的分离与纯化

1.2.1 采集典型发病扇贝,打开贝壳,以3%的无菌盐水冲洗5遍,无菌取肝胰腺、消化腔、性腺、外套膜于灭菌的玻璃研磨器中研碎,于6 000 r/min低速离心10 min,取上清液接种于含2.2%氯化钠的营养平板上,24 h后镜检;解剖镜下挑取单个菌落,继续在平板上进行培养。

1.2.2 将1.2.1中处理获得的上清液,以直径为0.20 μm的微孔滤膜抽滤,滤液接种含2.2%NaCl、2%~5%小牛血清的MEM营养液或接种于含2.2%NaCl的脑心浸液。

1.3 微生物的人工大量纯培养

培养基使用含2.2%NaCl、2%~5%小牛血清的MEM营养液和2.2%NaCl的脑心浸液。取在平板上纯化的微生物接种于人工培养液中,并于30℃培养48 h,于14 000 r/min离心50 min,将培养液浓缩30倍后重新接种于适量MEM培养液中进行培养。

1.4 革兰氏染色及光镜检查

按细菌革兰氏染色法染色^[1],油镜下检查。以大肠杆菌和葡萄球菌为对照。

* 国家自然科学基金项目30170742号;国家“973”项目G1999012012号。

第一作者:徐彪,出生于1966年,高级兽医师,博士生,现从事出入境动物检疫研究, E-mail: xuwenlu@sohu.com

** 通讯作者, 研究员, 博士生导师, E-mail: hshyang@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:2003-01-10;修回日期:2003-06-20

1.5 提纯微生物的电镜检查

将上述含微生物的培养液于 14 000 r/min 离心 50 min, 浓缩约 100 倍, 分别进行负染和透射电镜检查。

1.6 细菌的鉴定

1.6.1 细菌鉴定系统鉴定 在中国流行病学微生物研究所用“BIOLOG(GN)细菌鉴定系统”,按海洋细菌的要求,反应缓冲液中加入 2.2% NaCl,对该微生物进行鉴定。

1.6.2 部分生化试验 用北京陆桥公司的普通细菌鉴定用生化管 23 种及 1 种氧化酶纸片,按产品说明书进行生化特性的测定。

2 结果

2.1 一般生物学特征

在发病扇贝体内分离到一株微生物,能在人工培养基平板上生长。该微生物在目前已使用的人工培

养基平板及斜面上基本形不成肉眼可见的菌落,血平板上可形成倒置显微镜(或解剖镜)可见的无色透明小点状菌落。光镜下可见的细菌为革兰氏染色阴性。初次分离该微生物基本为混杂在其它杂细菌中间的微小粒子,在光学显微镜下隐约可见。经连续几代培养后,光学显微镜下部分微生物为隐约可见的小点,较大的粒子为革兰氏染色阴性的圆球形微生物。在含 2.2% NaCl、2%~5% 小牛血清的 MEM 和 2.2% NaCl 脑心浸液中均可生长,培养液无混浊现象。

2.2 电镜检查结果

该微生物形状为圆形或近似圆形,大部分菌体外周有棉絮状物质包被(图 1,图 2)。目前已经发现微生物粒子的直径大部分在 300 nm 以下,最小的 50 nm 左右,最大的可达 4 μm 以上。菌体内均有液泡状空白区存在,大的菌体可见明显的细胞壁,在细胞壁的表面,可见绒毛状的包被物。

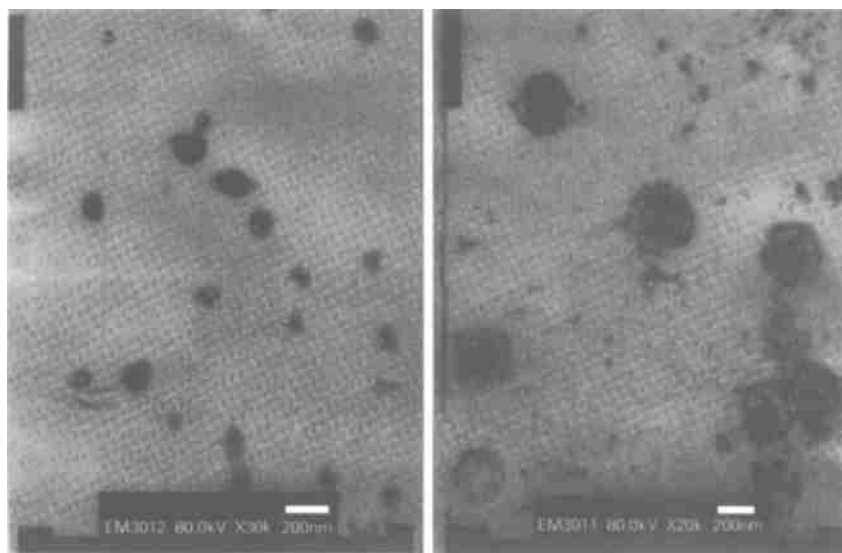


图 1 电镜照片

Fig.1 Electron micrograph

2.3 生化特性

经中国流行病学微生物研究所“BIOLOG(GN)细菌鉴定系统”鉴定其为“*Moraxella osloensis*”。BIOLOG(GN)细菌鉴定系统中进行的 95 种生化试验证实该细菌只有吐温-40 和吐温-80 呈阳性反应。而用陆桥公司的生化管进行的生化试验无阳性反应。

3 讨论

3.1 种的纯度及分类地位

大小差异大,目前已经发现的该微生物的粒子最小的直径约 50 nm 左右,与病毒的大小相近,形状也与某些球形病毒相似;最大的则比大多数细菌还大(直径 4 000 nm 以上)。较大的微生物透射电镜下细

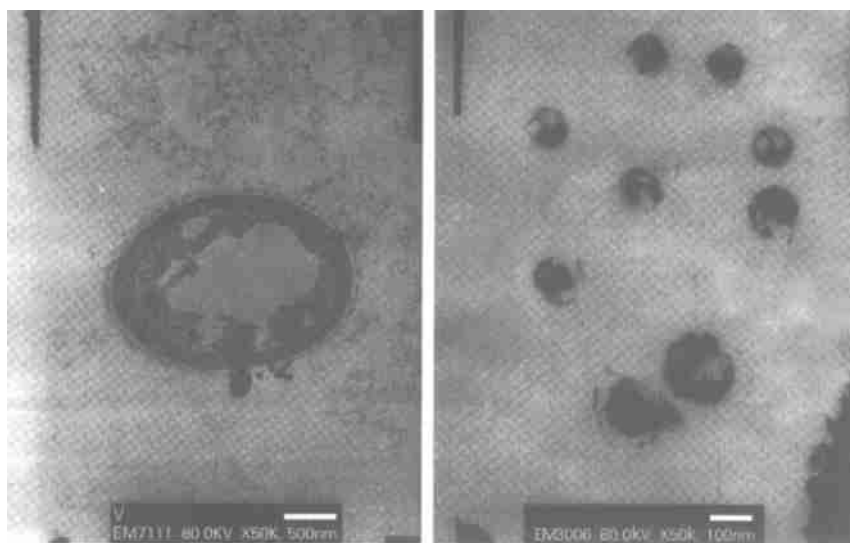


图 2 透射电镜照片

Fig.2 Transmission electron micrograph

胞壁清晰可见,细胞形状规则。起初作者认为可能是多种微生物混合物,但有三个方面的证据否定了这种假设:

(1) 在进行光镜、电镜检查时,均发现其大小是连续的。

(2) 以 $0.20\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,滤液接种细菌培养基培养,其结果与本文前面描述的特征完全一致。这一证据说明直径大于 $0.20\ \mu\text{m}$ 的微生物均是由 $0.20\ \mu\text{m}$ 以下的微生物生长发育而来的。

(3) 在解剖显微镜下挑取了单个菌落而获得的纯培养。

因此虽然其大小差异极大,但只是同一种微生物的不同发育阶段,经查阅有关资料未见类似微生物。根据其特征,该微生物可能为一种非常特殊的细菌,其具体的分类地位有待于进一步研究和证实。

3.2 可疑病原之一

该微生物是从发病栉孔扇贝体内分离到的,其形态特征与现今已经报道的病毒、立克次氏体、帕金虫有一定的相似性。其对栉孔扇贝的致病性,以及在栉孔扇贝病死过程中与其它病原的关系我们正在研究中。

3.3 生化特性

由于该微生物培养难度大,决定了其生化特性的测定难度也大,按常规方法许多生化试验无法进行,有些即使能够进行也往往因其增殖缓慢,利用生

化成分的速度慢而很难出现明显的阳性反应。BILOG细菌鉴定系统测定的95种生化反应呈阳性反应的仅有两种,可能就是上述原因造成的,因此有关该微生物生理生化特性尚须做大量的研究工作,才能最后确定。

参考文献

- 曹澍泽主编. 兽医微生物学及免疫学技术. 北京农业大学出版社, 1992. 3-4
- 李霞, 王斌, 刘淑范, 等. 一种球状病毒对近海几种贝类的感染. 大连水产学院学报, 2000, 15(2): 86-91
- 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
- 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
- 王崇明, 宋微波, 宋晓玲, 等. 栉孔扇贝一种球形病毒的分纯化及其超微结构观察. 水产学报, 2002, 26(2): 180-184
- 王秀华, 王崇明, 李筠, 等. 胶州湾栉孔扇贝大规模死亡的流行病学调查. 水产学报, 2002, 26(2): 149-155
- 吴信忠, 潘金培. 热带海洋珠贝类立克次体病研究. 海洋学报, 1999, 21(2): 93-98
- 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
- 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
- 张福绥, 杨红生. 栉孔扇贝大规模死亡问题的对策和应

- 激措施 . 海洋科学 , 1999 , (2) : 38-42
- 11 Roch P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates . Aquaculture , 1999 , 172 : 125-145
- 12 Rheims H, Frühling A, Schumann P. *Bacillus silvestris* sp. nov. , a new member of the genus *Bacillus* that contains lysine in its cell wall . International Journal of Systematic Bacteriology , 1999 , 49 : 795-802

A STRAIN OF UNSYSTEMATIZED MICROORGANISM ISOLATED FROM MORIBUND DISEASED SCALLOP

Chlamys farreri

XU Biao^{1,2,3} YANG Hong-Sheng¹ SONG Lin-Sheng¹ LIANG Cheng-Zhu² ZHU Lai-Hua²
WU Hua² ZHANG Fu-Sui¹

(¹ Institute of Oceanology , The Chinese Academy of Science , Qingdao , 266071)

(² Qingdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau , Qingdao , 266002)

(³ Graduate School , The Chinese Academy of Science , Beijing , 100008)

Received : Jan . , 10 , 2003

Key Words : *Chlamys farreri* , A peculiar microorganism

Abstract

A strain of microorganism was isolated from moribund diseased scallop *Chlamys farreri* . It is gram negative . This microorganism particles are round or near round , 0.05 ~ 4.0 μm in diameter . The colony can't be macroscopic on the plate . Only tween-40 and tween-80 were among the 95 carbon sources on BIOLOG GN plate . Its taxonomic rank hasn't been identified .

(本文编辑 : 张培新)