

栉孔扇贝类立克次体自然感染调查及人工感染试验

刘英杰¹, 王崇明², 朱洛壮³, 王秀华²,
李 贇³, 张宏义⁴, 任晴光⁴, 潘金培¹

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301;

2. 中国水产科学院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266003; 3. 青岛海洋大学, 山东 青岛 266001;

4. 山东省莱州市金城镇渔管委, 山东 莱州 261400)

摘 要:从1999年10月至2001年3月对导致栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)大规模死亡的可疑病原进行了系统调查, 在栉孔扇贝体内发现1种细胞内寄生原核生物。根据该原核生物超微形态结构及所形成的包涵体形态特征及染色性质分析, 初步确定为类立克次体(Rickettsia-like organisms, RLO)。该RLO大小为 $(3.623 \pm 1.435) \mu\text{m} \times (1.343 \pm 0.326) \mu\text{m}$ ($n=45$), 主要寄生在栉孔扇贝的鳃、消化腺的上皮组织中。其感染率和感染强度与水温及栉孔扇贝死亡率呈负相关关系。人工感染试验证明, RLO可引起栉孔扇贝感染, 但不形成大面积明显的组织病理变化。本研究表明, RLO对栉孔扇贝不具明显的致病性, 不是导致栉孔扇贝大规模死亡的主要原因。

关键词:栉孔扇贝; 类立克次体; 自然感染; 人工感染

中图分类号: S944.43

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2002)04-0346-07

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)在我国已有多年养殖的历史, 养殖范围主要分布于濒临黄海和渤海的山东、河北及辽宁的沿岸水域。在我国海水养殖业中占有重要位置。但从1996年开始, 养殖栉孔扇贝出现大量死亡现象^[1], 1997年更加严重, 死亡率达60%以上, 到2000年养殖栉孔扇贝的死亡率更是高达90%以上, 死亡时间一般从6月下旬开始, 以后逐渐加重, 7月底至8月上旬达到高峰, 不少海区几乎绝产。为确认栉孔扇贝大规模死亡原因, 作者从2000年6月至2001年10月对可疑病原进行了系统调查, 调查对象包括病毒、细菌、原生动物以及相应理化因子等。有关贝类类立克次体(Rickettsia-like organisms, RLO)的研究报道已有很多^[2-24], 但尚无有关栉孔扇贝体内发现RLO的报道。本文报道了该类原核生物感染栉孔扇贝的感染率、感染强度, 寄生情况与宿主大小及环境温度的关系以及人

工感染试验的结果, 以为查明栉孔扇贝大规模死亡的原因提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 流行病学调查

1.1.1 试验材料 从1999年10月至2001年3月间对不同生长阶段的栉孔扇贝进行了系统的样品采集。正常情况下每月采集1次, 大规模死亡时样品采集频率为7~15 d 1次, 采集样品时测量现场海水的温度和盐度。

1.1.2 组织病理检查 将扇贝一侧贝壳去掉, 用眼科镊和眼科剪解剖贝体, 分别取外套膜、鳃、消化腺、闭壳肌、肠、唇瓣、生殖腺等器官, 用10% 福尔马林或波恩氏液固定, 按常规程序进行石蜡切片, 切片厚度为5 μm , 用HE染色, 在光学显微镜下观察并拍照。

1.1.3 超微病理检查 按1.1.2方法取不同组织切成0.5~1 mm³的组织块, 用2.5%的戊二醛磷酸缓冲液前固定, 然后用1% 锇酸进行后固定, 系列乙醇丙酮脱水, 用Epon812 环氧树脂包埋, 用LKB切

收稿日期: 2002-05-17.

基金项目: 国家“九七三”重点基础研究项目(G1999012001).

作者简介: 刘英杰(1963-), 男, 高级工程师, 博士, 主要从事海水养殖及海洋生物病害研究工作. E-mail: Linyjj@sina.com

片机进行超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,日立H-7000透射电子显微镜观察、拍照;对于光镜下观察到的含有嗜碱性包涵体的石蜡切片,选取相应位置对其石蜡包埋块进行脱蜡,经PBS冲洗后按程序脱水、包埋,进行超薄切片。

1.1.4 感染率及感染强度统计方法 每批样品随机取一定数量个体进行组织切片,光镜观察,统计含有RLO嗜碱性包涵体的切片数量,换算成百分率,即为其感染率。统计不同器官组织切片单位面积($0.3 \sim 0.5 \text{ cm}^2$)嗜碱性包涵体的数量,即为其感染强度。

1.2 人工感染试验

1.2.1 试验材料 感染试验用栉孔扇贝成贝和幼贝取自山东省长岛县山前养殖场,成贝平均壳长5.7 cm,幼贝平均壳长3.2 cm。现场水温 6.2°C ,取样后缓慢过度到 18°C ,暂养一段时间待其状态稳定,经抽样检查立克次体阴性后(方法同1.1.2)作为试验个体。

1.2.2 感染源来源 感染源取自类立克次体自然感染的栉孔扇贝,经组织切片及压片检查,在鳃和消化腺等器官组织细胞内含有较多的类立克次体及其包涵体。称取一定重量的上述组织,按W/W 1:4(质量比)加入PBS($\text{pH}=7.2$)或50%消毒海水在 4°C 下研磨后,在低温高速离心机上以 $300 \text{ g } 5 \text{ min}$, $750 \text{ g } 7 \text{ min}$ 离心去渣,重复2~3次,上清以 $10\,000 \text{ g}$ 离心 10 min 后去上清,沉淀用3~5倍体积的PBS悬浮,经电镜负染检查证实为类立克次体后, $0 \sim 4^\circ\text{C}$ (12 h 内)或液氮保存作为感染源。

1.2.3 感染方法及试验设计 采用从扇贝闭壳肌注射感染液方式进行感染,经试验注射扇贝存活3 d以上为安全剂量。成贝每只注射 $200 \mu\text{L}$ 左右(约合1 g自然感染扇贝组织),幼贝每只注射 $50 \mu\text{L}$ 左右(相当于0.25 g自然感染扇贝组织)。感染组设2个平行组,对照组注射同样剂量的PBS($\text{pH}=7.4$),空白组为正常个体。第1次注射后至第7天以同样剂量再注射1次。每组试验成贝为25个,幼贝为50个。

1.2.4 试验设施及日常管理 感染试验水槽为50 L,控温 $18 \sim 20^\circ\text{C}$,连续充气。实验用水经砂滤池过滤,次氯酸钠消毒,硫代硫酸钠中和余氯,盐度 $29 \sim 31$ 。试验期间各组试验条件和管理方法相同。每天投喂小新月菱形藻和扁藻,每天换水吸污各2次,换水率80%。每天记录温度、盐度、pH等水质因

子。试验期间对于活力较差的濒死个体及时取出,记录数量,按1.1.2和1.1.3方法固定部分样品组织,其余冷冻保存,按1.2.2方法进行RLO分离检查。

1.2.5 试验结果检查与统计 样品首先进行现场涂片检查,Giemsa染色红色者为阳性。每组抽取10个个体做组织切片,观察记录RLO阳性个体所占比例,换算成百分率即为各组的感染率。

2 结果 (图版见附页7~8)

2.1 栉孔扇贝自然感染调查结果

2.1.1 类立克次体的确定 在栉孔扇贝体内发现了1种细胞内寄生原核生物。根据该类原核生物超微形态结构及所形成的包涵体特征分析^[25],初步确定为类立克次体。

2.1.2 类立克次体包涵体形态结构及个体超微结构 在栉孔扇贝生长不同时期的个体均检出了RLO包涵体。组织切片观察显示,RLO包涵体呈圆形、椭圆形或不规则形状,有膜性结构包围,界限较清楚,均寄生在上皮组织细胞内,平均大小为 $(35 \pm 8.235) \mu\text{m} \times (21 \pm 5.126) \mu\text{m}$ ($n=50$),HE染色为嗜碱性(图版I-1)。较疏松的包涵体其内部RLO单体清晰可见,亦呈嗜碱性。有些包涵体膨大破裂,RLO个体呈散落状态(图版I-3)。有些包涵体从细胞中逸出,散落于管腔中(图版I-2)。对包涵体阳性切片的石蜡包埋块经定位脱蜡后进行电镜超薄切片观察,结果显示包涵体内含有许多RLO个体,这些个体呈相对一致的长棒状,平均大小为 $(3.623 \pm 1.435) \mu\text{m} \times (1.343 \pm 0.326) \mu\text{m}$ ($n=45$),较紧密的排列在一起(图版II-4),具有RLO特异的细胞壁,细胞壁由2层组成,层间具有明显透明间隙,最外层疏松呈绒毛状,可能为脂多糖。RLO内部四周胞质具有致密的类核糖体物质,中央区域为拟核区,可能为DNA。繁殖以二分裂方式进行(图版II-3,4)。这些特征体现了典型的类立克次体的特点。

2.1.3 宿主组织病理变化 由于RLO的寄生增殖,宿主细胞膨胀变大,核被挤向一边,有些细胞发生破溃崩解,呈空泡状(图版I-1)。由于寄生强度较低,仅感染单个或相邻少数细胞,对组织细胞形不成大面积的损伤。RLO主要寄生于鳃的上皮组织中,其次为消化腺(图版I-1,2),偶尔在外套膜和性腺外膜的上皮组织中也可见到(图版I-4,图版

Ⅱ 1、2), 肠粘膜上皮细胞中未见。

2.1.4 栉孔扇贝 RLO 自然感染规律 表 1 为 2000 年和 2001 年青岛海域栉孔扇贝 RLO 自然感染情况。从表中可以看出, 栉孔扇贝 RLO 感染率在水温较低时相对较高, 平均在 80% 以上, 鳃组织切片中 RLO 包涵体数量在 10 个/片以上, 此时栉孔扇贝群体累积死亡率仅为 3%~5%。在水温较高的 7 月中旬至 8 月中旬, 养殖栉孔扇贝群体大规模死亡,

累计死亡率可达 95% 以上, RLO 感染率反而较低, 在 10% 以下, 感染强度也相应下降, 每个鳃组织切片包涵体平均数量低于 5 个或未检出。同期相比, 2001 年栉孔扇贝 RLO 感染率和感染强度低于 2000 年, 而扇贝累计死亡率则高于 2000 年。以上结果表明 RLO 感染状况与栉孔扇贝死亡率及水温变化呈负相关规律。

表 1 青岛海区栉孔扇贝类立克次体自然感染情况

Table 1 Prevalence and intensity of RLO infection in scallop *Chlamys farreri* along Qingdao coast

取样日期 Sampling date	水温/℃ Temperature	流行率 Prevalence rate		感染强度 Infection intensity 鳃切片包涵体 Inclusion of gill slice		累计死亡率/% Accumulated mortality
		R ^①	阳性率/% Positive rate	N ^②	N ^③	
19 Jan 2000	4.8	19/20	95	15	23	—
18 Feb 2000	3.4	8/10	80	10	15	—
19 Mar 2000	5.6	7/7	100	7	12	5.3
18 Apr 2000	8.8	10/10	100	11	18	12.2
18 May 2000	13.9	10/10	100	12	13	18.6
17 Jun 2000	19.8	10/10	100	15	8	25.5
17 Jul 2000	24.6	4/16	25	10	5	28.4
16 Aug 2000	25.4	1/10	10	18	4	89.9
15 Sep 2000	23.6	1/5	20	8	7	93.1
15 Oct 2000	22.5	2/10	20	10	1	95.3
14 Nov 2000	18.7	2/8	25	10	4	—
15 Jan 2001	5.1	8/10	80	10	18	—
14 Feb 2001	3.9	6/10	60	10	19	—
16 Mar 2001	5.2	15/18	83.3	15	14	—
15 Apr 2001	8.4	10/10	100	10	7	—
15 May 2001	14.1	5/11	45.5	10	11	2.0
14 Jun 2001	20.5	4/18	22.2	15	5	4.6
14 Jul 2001	21.8	1/13	7.7	10	2	35.8
5 Aug 2001	23.2	1/20	5.0	15	0.3	95.0
15 Aug 2001	24.6	0/20	0	15	0	96.0
15 Sep 2001	23.1	1/9	11.1	9	0.2	98.0
15 Oct 2001	21.9	2/15	13.3	15	0.23	—

注: ①R = 阳性切片数/检测切片数; ②N 为切片检测数量; ③N 为包涵体平均数量/片。

Note: ①R = Positive slice numbers/Detected slice numbers; ②N means detected slice numbers; ③N means average numbers of inclusions/disc.

2.2 人工感染试验结果

表 2 和表 3 分别为 RLO 人工感染栉孔扇贝幼贝(1 龄)和成贝(2 龄)的试验结果。从表 2 可以看出, 栉孔扇贝幼贝人工感染后 30 d, 试验组成活率分别为 20%、24%、26%、34%, 对照组分别为 78%、76%, 空白组分别为 70%、60%, 差异较显著。现场检查(Giemsa 染色)其感染率为 80%~100%, 组织病理学观察表明, 试验组 RLO 感染明显(鳃上皮组

织), 但感染强度较低, 每个切片仅为 5~10 个包涵体, 消化腺有少量感染, 与之对应的组织损伤不明显。这说明 RLO 可引起栉孔扇贝幼贝一定程度的感染, 但由于感染强度很低, 只对个别细胞产生一定的机械损伤, 不导致大面积的组织细胞破坏, 试验组死亡可能另有原因(注射损伤、微生物感染、免疫反应或生理代谢失调等), 对照组和空白组亦有一定程度的感染, 但感染率较低, 这可能由于试验材料选取

不严格所致。成贝经 52 d 的试验,试验组成活率分别为 72%、76%、72%、64%,对照组成活率分别为 80%、68%,空白组分别为 72%、76%,差异不显著。现场检查感染率为 40%~60%,组织切片检查感染

率较低,仅为 10%~20%或未检出,感染强度 1~5 个/片,无明显相关组织病理变化。该结果表明,RLO 对栉孔扇贝成体可形成轻微感染,但不造成明显组织损伤,不会大量死亡。

表 2 栉孔扇贝幼贝类立克次体感染试验结果

Table 2 Results of experimental infection of juvenile scallop *Chlamys farreri* with RLO

感染天数 Infected days	试验组 I Test group I				试验组 II Test group II			
	感染组 I Test I	感染组 II Test II	对照组 Control	空白组 Blank	感染组 I Test I	感染组 II Test II	对照组 Control	空白组 Blank
0	50	50	50	50	50	50	50	50
5	45	44	46	46	43	42	47	44
10	45	43	46	45	40	34	45	39
15	41	41	46	42	39	32	42	38
20	35	39	45	40	36	28	42	34
25	16	22	43	38	21	21	39	31
30	10	12	39	35	12	17	38	30
感染率/% Infected rate	60	80	20	30	50	60	0	10
死亡率/% Mortality	80	76	22	30	76	68	24	40

表 3 栉孔扇贝成贝类立克次体感染试验结果

Table 3 Results of experimental infection of adult scallop *Chlamys farreri* with RLO

感染天数 Infected days	试验组 I Test group I				试验组 II Test group II			
	感染组 I Test I	感染组 II Test II	对照组 Control	空白组 Blank	感染组 I Test I	感染组 II Test II	对照组 Control	空白组 Blank
0	25	25	25	25	25	25	25	25
5	23	24	23	23	21	23	22	22
10	22	23	22	23	21	22	22	22
20	20	21	22	22	20	20	21	22
30	19	21	20	20	20	20	21	21
40	18	20	20	19	19	19	19	20
52	18	19	20	18	18	16	17	19
感染率/% Infected rate	10	20	10	0	0	10	0	10
死亡率/% Mortality	28	24	20	28	28	36	32	24

3 讨论

RLO 是一类无独立生活能量代谢系统、专性细胞内寄生的微生物,革兰氏染色阴性,有许多种类^[25]。贝类中发现的 RLO 由于目前尚未确定其具体分类地位,暂称之为类立克次体(RLO)。国外对于贝类 RLO 的感染在牡蛎、蛤、贻贝、扇贝、鲍鱼等已有很多报道^[2-24]。其中扇贝中已报道的有大西洋深水扇贝 (*Placopecten magellanicus*)^[12]、大扇贝 (*Pecten maximus*)^[16]、虾夷扇贝 (*Patinopectin*

yessoensis)^[10]、海湾扇贝 (*Argopecten irradians*)^[21]、盖栉孔扇贝 (*Chlamys operculari*) 和 *Chlamys varia*^[17]等。在大西洋深水扇贝、大扇贝和虾夷扇贝上发现 RLO 感染与扇贝死亡有一定的相关性,一般在水温较低时 RLO 感染较严重,扇贝死亡率较高^[12,16]。但进一步的感染试验证明,RLO 感染与扇贝死亡无直接相关关系,扇贝死亡可能另有原因^[14]。有关试验还证明 RLO 可使大西洋深水扇贝感染,但不能感染贻贝 (*Mytilus edulis*) 和海螂 (*Mya arenaria*)^[14]。在海洋无脊椎动物中,

Moore^[26]通过长时间温度诱导使鲍产生了一定程度的肌肉萎缩症, Bonami 等^[27]证明了 RLO 感染可导致海蟹的死亡, Frelie^[28]证明了 RLO 感染可引起凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)发生肝胰腺坏死病并导致死亡。但在海洋双壳贝类中, 根据有关的研究结论^[9-14, 21, 24], RLO 寄生是一较为普遍的现象, 一般认为对宿主不形成严重损伤, 到目前为止, 尚未有确凿证据证明 RLO 感染可导致其大量死亡, 相应的感染试验也证明 RLO 可导致宿主的感染, 但病理变化不明显, 不能明显引起宿主的死亡。本研究的栉孔扇贝自然感染 RLO 调查结果及人工感染试验结果也验证了上述结论。

对于我国海洋经济双壳贝类 RLO 感染的研究, 国内曾有报道^[29-32]。但在病原性质、组织病理变化与致病性等方面的结论与本研究结果有较大差异, 这可能是由于对于贝类 RLO 及其包涵体组织形态和染色特性判定标准不清以及缺少人工感染试验验证所致。贝类 RLO 在宿主鳃、消化腺及肾等器官的上皮组织中形成具有一定膜性结构包围的包涵体, 即 RLO 克隆, 一般与宿主细胞其他部分界限较为清楚(有些包涵体破裂, RLO 单体散落)。包涵体一般个体较大, 可达数十微米, 在光镜下清晰可见。对于寄生于有些贝类的个体较大的 RLO, 若其在包涵体内排列不太紧密, 还可在光镜下较为清楚的观察到 RLO 的单体及其基本形态结构。RLO 由于含有核酸及较为丰富的核糖体, 呈强烈的嗜碱性, 普通组织切片 HE 染色其包涵体及单体为深蓝色, 与宿主其他组织细胞结构较易区分。值得注意的是, 在很多贝类器官(外套膜、鳃、消化腺、肾、生殖腺、唇瓣等)的上皮组织中含有许多嗜酸性颗粒上皮细胞, 这类细胞的数量随着贝类个体的生长阶段及环境状况而有一定的变化, 这些细胞中含有许多嗜酸性分泌颗粒, 其成分一般为糖蛋白或酶类, 在同一器官组织中通常均匀一致、聚集成团, 随着贝类个体的生理代谢过程不断向外界分泌。这些颗粒由于组分呈嗜酸性, HE 染色随不同分泌状况呈现不同程度的红色, 其大小与有些 RLO 相似, 但性质截然不同, 它们是贝类上皮组织中的正常结构, 普遍存在于海洋贝类中。在病原检查时, 应注意二者的区别, 以免导致错误的结论。

已有研究表明, 寄生于海洋双壳贝类的 RLO 其生活适温一般较低, 不超过 20 °C^[14-17], 这一观点在本研究中得到了验证, 这也从另一侧面说明 RLO

不是导致栉孔扇贝大规模死亡的主要原因。有研究表明^[18], RLO 类微生物较易感染幼贝, 对成体感染率较低, 本研究的人工感染试验证实了这一论点。通过人工注射含有 RLO 的感染液可引起栉孔扇贝幼贝及成贝的感染, 但幼贝的感染率显著高于成贝, 这说明幼贝对 RLO 易感性较高。幼贝感染组死亡率显著高于对照组与空白组, 但由于没有与 RLO 感染相应的病理变化, 因此其死亡可能另有原因, 如注射方式不当引起器官损伤、代谢失调或其他微生物感染致死等, 这有待于今后的试验进一步验证。另外, 在本研究试验结束时, 对照组与空白组均有一定程度的 RLO 感染, 但感染率显著低于感染组。这可能是由于试验材料选取时不严格所造成的, 在今后进行类似的试验时应加以注意。本试验感染组个体超薄切片检查未见病毒、寄生虫等其他生物, 排除了其他病原感染的可能。在本试验中未见肠粘膜上皮细胞感染 RLO, 这一点与其他海洋生物如虾、蟹、鱼有所差异^[27-28, 33-34]。本研究初步证实, 人工感染可导致栉孔扇贝感染 RLO, 但不能使宿主产生明显的组织病理变化。RLO 在栉孔扇贝自然生活的一定阶段有一定程度的寄生, 但形不成大的危害, 与栉孔扇贝大规模死亡无直接联系。

致谢: 本工作得到了山东省长岛县第二海水育苗场戴玉勇场长、威海市水产研究所原永党工程师、中科院海洋研究所尤峰研究员、谢嘉琳老师、青岛大学医学院谭金山、姜明老师、广州医学院柳惠洪、彭杰老师的大力支持和帮助, 在此深表谢意!

参考文献:

- [1] 管华诗. 海水养殖动物的免疫、细胞培养和病害研究[M]. 济南: 山东科技出版社, 1999. 114-130.
- [2] Azevedo C, Villaba A. Extracellular giant rickettsiae associated with bacteria in the gill of *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia)[J]. J Invert Path. 1991, 58: 75-81.
- [3] Buchanan J S. Cytological studies on a new species of rickettsia found in association with a phage in the digestive gland of the marine bivalve mollusc, *Tellina tenuis* (da Costa)[J]. J Fish Dis, 1978, 1: 27-43.
- [4] Chiou M W, Guang H K, Shiu N C. Rickettsiaceae-like microorganism in the gill and digestive gland of the hard clam, *Meretrix lusoria* Roding[J]. J Invert Path, 1994, 64: 138-142.
- [5] Comps M, Raimbault R. Infection rickettsienne de la glande digestive de *Donax trunculus* Linné[J]. Science et Pêche Bull Inst Pêche Marit, 1978, 281.
- [6] Comps M, Deltreil J P. Un microorganisme de type rickettsien

- chez l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk[J]. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences de Paris, 1979, 289: 169 - 171.
- [7] Comps M, Tigé G, Duthoit J L, et al. Micro-organismes de type rickettsien chez les huîtres *Crassostrea gigas* Th. et *Ostrea edulis* L.[J]. Haliotis, 1979, 8: 317 - 321.
- [8] Comps M. Etude morphologique d'une infection rickettsienne de la palourde *Ruditapes philippinarum* Adan et Reeves[J]. Rev Trav Inst Pêches Marit, 1983, 46: 141 - 145.
- [9] Elston R, Peacock M G. A Rickettsiales-like infection in the Pacific razor clam, *Siliqua patula*[J]. J Invert Path, 1984, 44: 84 - 86.
- [10] Elston R. Occurrence of branchial rickettsiales-like infections in twobivalve molluscs, *Tapes japonica* and *Patinoplectin yessoensis*, with comments on their significance[J]. J Fish Dis, 1986, 9: 69 - 71.
- [11] Fries C R, Grant D M. Rickettsiae in gill epithelial cells of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*[J]. J Invert Path, 1991, 57: 166 - 171.
- [12] Gulka G, Chang P W. Prokaryotic infection associated with a mass mortality of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*[J]. J Fish Dis, 1983, 6: 355 - 364.
- [13] Gulka G, Chang P W. Host response to rickettsial infection in blue mussel, *Mytilus edulis* L.[J]. J Fish Dis, 1984, 8: 319 - 323.
- [14] Gulka G, Chang P W. Pathogenicity and infectivity of a rickettsia-like organism in the sea scallop, *Placopecten magellanicus* [J]. J Fish Dis, 1984, 8: 309 - 318.
- [15] Harshbarger J C, Chang S C, Otto S V. Chlamydiae (with phage), mycoplasma and rickettsiae in Chesapeake Bay Bivalves [J]. Science, 1977, 196: 666 - 668.
- [16] Le Gall G, Chagot D, Mialhe E, et al. Branchial rickettsiales-like infection associated with a mass mortality of sea scallop, *Pecten maximus*[J]. Dis Aquat Org, 1988(4): 229 - 232.
- [17] Le Gall G, Mialhe E, Chagot H, et al. Epizootiological study of rickettsiosis of the Saint-Jacques scallop *Pecten maximus*[J]. Dis Aquat Org, 1991(10): 139 - 145.
- [18] Leibovitz. Chlamydiosis: a newly reported serious disease of larval and postmetamorphic bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck)[J]. J Fish Dis, 1989, 12: 126 - 136.
- [19] Meyers T R. Preliminary studies on a chlamydial agent in the digestive diverticular epithelium of hard clams *Mercenaria mercenaria* (L.) from Great South Bay, New York[J]. J Fish Dis, 1979, 2: 179 - 189.
- [20] Moore J D, Robbins T T, Friedman C S. The role of a rickettsia-like prokaryote in Withering Syndrome in California red abalone, *Haliotis rufescens* [A]. The 4th International Abalone Symposium[C] South Africa, 2000. 38.
- [21] Morrison C, Shum G. Rickettsias in the kidney of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck)[J]. J Fish Dis, 1983, 6: 537 - 541.
- [22] Norton J H, Shepherd M A, Prior H C. Intracellular bacteria associated with winter mortality in juvenile giant clams, *Tridacna gigas*[J]. J Invert Path, 1993, 62: 204 - 206.
- [23] Norton J H, Shepherd M A, Abdon-Naguir M R, et al. Mortalities in the giant clam *Hippopus hippopus* associated with rickettsiales-like organisms[J]. J Invert Path, 1993b, 62: 207 - 209.
- [24] Renault T, Cochenec N. Rickettsia-like Organisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. J Invert Path, 1994, 64: 160 - 162.
- [25] 魏 曦. 医用立克次体学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983. 380 - 387.
- [26] Moore J M, Robbins T T, Friedman C S. Withering syndrome in farmed red abalone *Haliotis rufescens*: Thermal induction and association with a gastrointestinal Rickettsiales-like prokaryote[J]. J Aquat Health, 2000, 12: 26 - 34.
- [27] Bonami J R, Pappalardo. Rickettsial infection in marine crustacea [J]. Experimentia, 1980, 36: 180 - 181.
- [28] Frellet P F, Loy J K, Kruppenbach B. Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Pennaeus vannamei* [J]. J Invert Path, 1993, 61: 44 - 48.
- [29] 王文兴, 罗挽涛, 薛清刚, 等. 海湾扇贝消化盲囊衣原体样生物病理学研究[J]. 海洋科学, 1998, 3: 23 - 25.
- [30] Wu X Z, Pan J P. Studies on Rickettsia-like organism disease of tropical marine pearl oyster I. Fine structure and morphogenesis of *Pinctada maxima* pathogen Rickettsia-like organism[J]. J Invert Path, 1999, 73: 162 - 172.
- [31] 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: 770 - 774.
- [32] Wu X Z, Pan J P. An intracellular prokaryotic microorganism associated with the lesion of the oyster *Crassostrea ariakensis* Gould[J]. J Fish Dis, 2000, 23(6): 409 - 414.
- [33] Fryer J L, Lannan C N. Rickettsial and Chlamydial infections of freshwater and marine fishes, bivalves and crustacean[J]. Zoological Studies, 1994, 33: 95 - 107.
- [34] 姜 明. 真鲷(*Pagrosomus major*) 肠上皮组织中类立克次体的超微形态与细胞病理学的初步研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(2): 129 - 134.

Rickettsia-like organisms in scallop *Chlamys farreri* and an artificial transmission experiment

LIU Ying-jie¹, WANG Chong-ming², ZHU Ming-zhuang³

WANG Xiu-hua², LI Yun³, ZHANG Hong-yi⁴, REN Qing-guang⁴, PAN Jin-pei¹

(1. South China Sea Institute of Oceanology, China Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266003, China;

3. Fisheries College, Qingdao Ocean University, Qingdao 266001, China;

4. Fisheries Administration Committee of Jincheng District, Laizhou 261400, China)

Abstract: A systematic investigation on the pathogen leading to the high mortality of scallop *Chlamys farreri* was carried out from October 1999 to March 2001. An intracellular prokaryotic organism was found in the cells of *C. farreri* which was determined as Rickettsia-like organism based on the ultrastructure and morphology and the stain characteristics of their inclusions. The RLOs were in the shape of long rod with the average size of $(3.623 \pm 1.435) \mu\text{m} \times (1.343 \pm 0.326) \mu\text{m}$ ($n = 45$) and usually parasitically settled inside the epithelial cells of gill and digestive gland. The prevalence and infecting intensity of RLO were in negatively correlation with water temperature and mortalities of *C. farreri*. The artificial transmission experiment verified that RLO could infect *C. farreri* but could not cause obvious histopathological change in a large scale. No evidence shows RLO in *C. farreri* has obvious pathogenicity and the conclusion is that RLO was not the main reason causing the high mortality of *C. farreri* in 2000 and 2001 along the Yellow Sea and Bohai Sea.

Key Words: *Chlamys farreri*; Rickettsia-like organisms; natural transmission; artificial transmission experiment

(For Plates I and II see attached pages 7 and 8)

书讯:

《中国水产标准汇编·无公害食品卷》

为提高水产品质量安全水平,保障消费者食用安全,增强我国水产品国际竞争力,2001~2002年农业部全面实施了“无公害食品行动计划”,并已制定和修订了两批无公害水产品标准44项,及时为行业 and 部门的水产品质量安全管理,进行标准化生产示范,建立健全质量安全保障体系提供了技术依据,为渔业经济的发展、产业的现代化和水产科技进步提供了技术基础。

本卷汇集了这两批无公害水产品农业行业标准。包括鱼、虾、蟹、贝等24种主要水产品产品质量标准20项,配套的养殖技术规范18项,海水淡水养殖用水水质、水产品中渔药残留和有毒有害物质限量、渔用药物使用准则、渔用配合饲料安全限量等基础安全限量和规范标准6项。

本卷定价50.00元(含邮费)。请需要的单位和个人汇款至:北京丰台区永定路南青塔村150号,邮编:100039,中国水产科学研究院质量标准办公室。还可通过银行汇款至:北京工商银行永定路分理处,户名:中国水产科学研究院,帐号:144428 28(请注明购标准款),联系电话:68673936,68672898。