

## 海湾扇贝类衣原体寄生及人工感染试验

刘英杰<sup>1</sup>, 宋微波<sup>2</sup>, 王崇明<sup>3</sup>, 朱洛壮<sup>2</sup>, 贺桂珍<sup>2</sup>, 张宏义<sup>4</sup>, 姜卫蔚<sup>4</sup>, 潘金培<sup>1</sup>

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301; 2. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;

3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266003;

4. 山东省莱州市金城镇渔管委, 山东 莱州 261400)

**摘要:**于1999年10月至2001年3月海湾扇贝(*Argopecten irradians*)大量死亡期间,对不同生长阶段的海湾扇贝进行了组织学及超微结构观察,在贝消化腺上皮细胞内发现嗜碱性的类衣原体包涵体,该包涵体为圆形及不规则形状,大小约 $9\ \mu\text{m} \times 7\ \mu\text{m}$ , HE染色呈兰色。包涵体发育至晚期破裂,宿主细胞崩解,类衣原体逸出。超微结构观察显示,包涵体内部含有大小不同的3种个体形态,即网状体、原体和中间体。网状体大而疏松,呈圆形或不规则形,大小为 $(890.5 \pm 164.6)\ \text{nm} \times (623.6 \pm 129.3)\ \text{nm}$  ( $n=20$ );原体个体小而致密,呈较为整齐的短棒状或纺锤形,大小为 $(317.5 \pm 40.1)\ \text{nm} \times (180.3 \pm 40.0)\ \text{nm}$  ( $n=18$ );中间体数量较少,大小介于上述2种个体之间,可能处于二者的过渡阶段。将类衣原体分离后对海湾扇贝的幼体、稚贝和成贝进行了人工感染,结果表明,类衣原体可以感染海湾扇贝不同发育阶段(幼贝、稚贝、成贝)的个体,受感染个体生长缓慢,内脏干瘪,易从附着基上脱落。但不同阶段的贝体感染率与死亡率差异较大,幼体组感染率和死亡率分别达80%和90%以上;稚贝组分别达50%和70%左右;成贝组的感染率达50%以上,但死亡率与空白组及对照组无显著差异。说明类衣原体在一定条件下可造成对幼体和稚体扇贝的危害,但对成贝影响不大,不能导致成贝宿主的大量死亡。

**关键词:**海湾扇贝;类衣原体;超微结构;人工感染

**中图分类号:** S944.43

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8737-(2003)02-0137-06

衣原体(Chlamydia)最早在1907年发现于人类沙眼病患者,是一类在真核细胞内营寄生生活的原核微生物,具有很多与革兰氏阴性细菌相似的特点<sup>[1]</sup>。Harshbarger等<sup>[2]</sup>于1977年在研究美国Chesapeake湾双壳类病害时,首次在硬壳蛤中发现了寄生在贝类细胞内的衣原体,之后关于其他双壳类体内寄生的衣原体的报道不断出现<sup>[3-7]</sup>。但有关类衣原体对双壳类组织的组织损伤及危害程度,不同文献的研究结论不尽相同。至今,海洋虾、蟹和贝类类克次体人工感染已有一些研究<sup>[8-13]</sup>,而对于衣原体对扇贝致病性的人工感染试验尚未见报道。作者于1999年至2001年对海湾扇贝(*Argopecten irradians*)的大规模死亡原因进行流行病学调

查,在海湾扇贝消化腺上皮细胞细胞质内发现一种寄生原核生物,其超微形态结构、发育阶段及其包涵体的形态特点与衣原体生物学性状一致,由于尚未鉴定种类,暂称为类衣原体生物(Chlamydia-like Organism, CLO),并通过不同感染方式对海湾扇贝的幼体、稚贝和成贝进行了回接感染,以期证明类衣原体对海湾扇贝的危害作用,同时为海湾扇贝人工育苗生产中亲体和苗种的选择提供科学依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 病原病理检查

**1.1.1 材料** 从1999年10月至2001年3月间在山东省莱州市金城镇养殖场及附近养殖海域对海湾扇贝幼体、稚贝及不同生长阶段的成贝进行了系统的样品采集。海湾扇贝幼体取自育苗池,稚贝取自中间暂养池,样本数量100~200个;成贝取自养成池,样本数量200~300个。

收稿日期:2002-09-17.

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. E-mail: Liuyjj@sina.com

**1.1.2 组织学检查** 用尼龙筛绢将幼贝滤出,过滤海水冲洗后用吸管吸入 1.5 mL 离心管中用波恩氏液固定;将稚贝从附着基上刮下,过滤海水冲洗后直接用 10% 中性福尔马林固定;将扇贝成贝一侧贝壳去掉,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 Davidson 液或 10% 中性福尔马林固定。按常规程序进行石蜡切片,切片厚度为 5  $\mu\text{m}$ , HE 染色,在光学显微镜下观察。

**1.1.3 超微结构检查** 成贝按 1.1.2 同样的方法取不同组织切成 1~2 mm<sup>3</sup> 的组织块,用 2.5% 的戊二醛磷酸缓冲液前固定,稚贝用解剖针剥掉贝壳后固定,幼体直接固定。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。

## 1.2 人工感染试验

**1.2.1 样品** 海湾扇贝成贝取自莱州越冬群体,抽样检查无类衣原体感染,稚贝和幼体取自山东省莱州市金城镇育苗场。成贝平均壳长 5.2 cm;幼体为变态过程中的担轮幼体、1 天 D 形幼体和 3 天 D 形幼体;稚贝为出库 3 天虾池暂养个体,平均壳长(580 $\pm$ 25) $\mu\text{m}$ 。

**1.2.2 感染源** 感染源取自山东胶南海区类衣原体自然感染的大海湾扇贝,经组织切片及压片检查,在消化腺组织细胞内含有较多的类衣原体及其包涵体。取上述组织称取一定重量,按质量比 1:4 加入 PBS(pH 7.4)或 50% 消毒海水在 4  $^{\circ}\text{C}$  下研磨后,在低温高速离心机上以 300 g、5 min, 750 g、7 min, 1 500 g、10 min 离心去渣,重复 2~3 次,上清以 10 000 g 离心 10 min 后,再去上清,沉淀用 3~5 倍体积的 PBS 悬浮,0~4  $^{\circ}\text{C}$  (12 h 以内)或液氮保存作为感染源。

**1.2.3 试验设施及日常管理方法** 成贝感染试验水槽为 50 L,控温 18~23  $^{\circ}\text{C}$ ,幼体及稚贝感染试验水槽为 10 L。控温 22~24  $^{\circ}\text{C}$ ,连续充气。试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 29~31。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,并水吸污各 2 次,换水率 80%。每天测量温度、盐度、pH、NH<sub>3</sub>-N 等水质因子,及时调整管理方法。

**1.2.4 感染方法及试验设计** 成贝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),感染组设 2 个平行组,对照组注射同样剂量的 PBS(pH 7.4),空白组为正常个体。第 1 次注射后的 7 天以同样剂量再注射 1 次,每组试验个体数为 25 个;幼体采用浸泡方式感染,先将幼体放入 1 L 海水中,每升投放感染液 1~2 mL,1~3 h 后更新全部海水,将水加至 10 L 并调整幼体密度,使各试验组一致。每组设 2 个平行组,1 个空白组;稚贝采用投喂方式进行感染,将附着有稚贝的附着基放入试验水槽中,试验组每天投喂 2 次感染液,每次 2 mL,每 2 天补充投喂 1 次藻液,空白组按正常管理,每天投喂 3 次藻液。试验组设 2 个平行组,空白为 1 组。各试验组材料试验前镜检以确定本底阴性。

**1.2.5 统计方法** 成贝每日记录濒死及死亡个体数量;幼体每日取样并记录密度变化,密度显著变化时取底层不活泼或面盘脱落幼体固定;稚贝每 5 天取样 1 次,在解剖镜下观察记录存活个体与空壳的比例,以上结果换算成百分率作为各试验组的成活率。成贝及稚贝每试验组抽取 10 个个体做组织切片,幼体则在切片上随机观察 10 个以上个体,记录 CLO 包涵体阳性个体所占比例,换算成百分率即为各组的感染率。

## 2 结果

### 2.1 类衣原体感染的组织学及超微结构特征

在消化腺的上皮组织中发现 CLO 的嗜碱性包涵体,其他组织中未发现。包涵体形状为圆形、椭圆形或不规则形状,大小约为 9  $\mu\text{m}$   $\times$  7  $\mu\text{m}$ , HE 染色呈兰色(图 1)。由于包涵体的发育,细胞变大、膨胀,细胞器被挤向一侧,有些包涵体从细胞逸出,散布于消化腺管腔中。超微结构观察显示,包涵体内部含有大小不同的 3 种个体形态:①网状体(reticular body)或始体(initial body),个体较大,呈圆形、椭圆形或不规则形状,大小为(890.5 $\pm$ 164.6) nm  $\times$  (623.6 $\pm$ 129.3) nm ( $n=20$ ),细胞外有完整的包膜,外层为细胞壁,内层为细胞膜。细胞膜内周边区域为高电子密度的核糖体样颗粒,中心区为拟核。网状体为营养体阶段,以二分裂或复分裂进行增殖(图 2)。②原体(elementary body),个体小,呈较为整齐的短棒状或纺锤形,大小为(317.5 $\pm$ 40.1) nm  $\times$  (180.3 $\pm$ 40.0) nm ( $n=18$ )。细胞外具细胞壁和细胞膜,细胞中央区域致密,在中央区 and 细胞膜之间

有明显的空白区域(图2)。原体由于个体小,细胞壁厚,具有体外存活的能力和侵染能力。③中间体 (intermediate body), 数量较少, 大小介于上述2种个体之间, 可能为二者的过渡阶段(图2)。

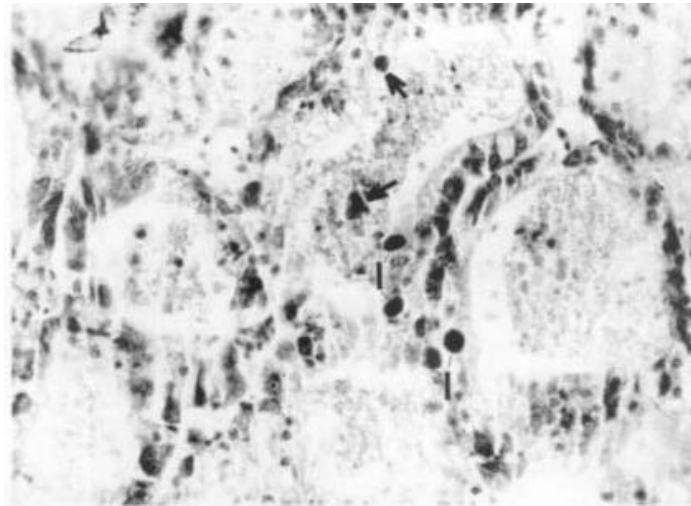


图1 示海湾扇贝成贝消化腺上皮细胞内衣原体嗜碱性包涵体(I)。可见散落在管腔中的包涵体(箭头), ×400

Fig. 1 Light photograph, showing CLO inclusions(I) in the epithelial cell of digestive gland. The scattered inclusions (arrow) can be seen in the lumen of diverticular. ×400

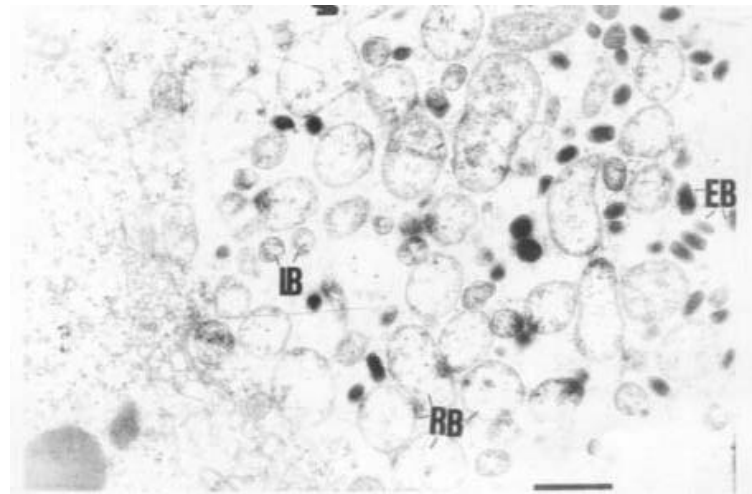


图2 TEM照片,示类衣原体包涵体及不同发育阶段个体。可见原体(EB)、始体(RB)、中间体(IB),分裂过程中的始体(箭头)及被挤向一侧的宿主细胞器。Bar = 400 nm

Fig. 2 Electron micrograph of chlamydia-like organism, showing elementary body (EB), reticulate body (RB), intermediate body (IB), reticulate body in fission (arrow) and the edged organelles. Bar = 400 nm

## 2.2 人工感染试验结果

表1~3为人工感染试验结果。从表1可以看出,在试验开始的初期各组幼体密度变化较为正常,但感染组在第5~7天幼体密度显著下降,此时多数幼体处于水体中下层,游泳缓慢,姿态异常,面盘纤毛细胞脱落。光镜检查各感染组幼体感染率平均在50%以上,对照组在10%以下。试验结束时各感染组死亡率平均在80%以上,最高达90%,而对照组平均在50%左右,二者差异显著。各试验组结果有一定差异,1天D形幼体组感染率和死亡率略高于担轮幼体组和3天幼体组(表1);经过25天试验,人工投喂含有CLO的感染液可以导致海湾扇贝稚贝CLO感染并引起死亡,感染率为40%~50%,死亡率可达70%左右。

表1 海湾扇贝幼体人工感染类衣原体结果

Table 1 Infected results in larval *A. irridians* by immersion with CLO suspension

| 组别<br>Group   | 感染天数<br>Days of experiment | 感染率/%<br>Infected rate | 死亡率/%<br>Mortality |
|---------------|----------------------------|------------------------|--------------------|
|               | 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9        |                        |                    |
| I A           | 14 14 15 13 11 9 9 5 3     | 55.6                   | 78.6               |
| B             | 13 12 12 11 11 8 9 6 2     | 58.3                   | 84.6               |
| 对照<br>Control | 11 10 10 9 8 8 8 7 7 6     | 0                      | 45.5               |
| II A          | 11 8 7 5 5 2 2             | 79.2                   | 81.8               |
| B             | 11 10 8 4 4 2 1            | 52.0                   | 90.9               |
| 对照<br>Control | 11 10 10 11 8 9 8 7 8 6    | 8.7                    | 45.5               |
| III A         | 15 12 10 8 5 4 2           | 40.0                   | 86.7               |
| B             | 15 13 10 7 6 4 3           | 45.8                   | 80.0               |
| 对照<br>Control | 13 11 9 9 7 8 7 6 6        | 7.7                    | 53.8               |

注: I - 担轮幼体组; II - 1天D形幼体组; III - 3天D形幼体组。  
Notes: I - Trochophore; II - One day D larvae; III - Three day D larvae.

表2 海湾扇贝稚贝人工感染类衣原体结果

Table 2 Infected results in postmetamorphic *A. irridians* fed with CLO suspension

| 组别<br>Group   | 试验天数<br>Days of experiment          | 感染率/%<br>Infected rate | 死亡率/%<br>Mortality |
|---------------|-------------------------------------|------------------------|--------------------|
|               | 0 5 10 15 20 25                     |                        |                    |
| I A           | 8/128 11/79 11/54 19/34 25/38 21/32 | 50                     | 66.7               |
| 对照<br>Control | 8/128 6/67 11/71 6/34 8/41 11/50    | 20                     | 22.0               |
| II A          | 8/128 8/61 12/48 20/31 24/34 18/25  | 40                     | 72.0               |
| 对照<br>Control | 8/128 5/53 9/68 10/78 5/31 9/51     | 10                     | 17.6               |

注: 表中分数指死亡数量/总数。

Note: The fractions mean dead numbers/total numbers.

感染组个体生长缓慢,内脏干瘪,易从附着基上脱落(表2);表3为成贝感染试验结果。各感染组感染率平均在50%以上,空白组与对照组低于10%。感染组的平均死亡率在40%左右,空白与对照组在30%左右。在试验I和试验II,感染组与空白、对照组平均死亡率较为接近或基本一样(表3)。以上各试验组病理学检查未发现其他微生物。该结果说明CLO可以导致海湾扇贝成贝感染,但不能造成明显的病理变化,不能引起大量死亡。

表3 海湾扇贝成贝人工感染类衣原体结果

Table 3 Infected results in adult *A. irridians* by injection with CLO suspension

| 组别<br>Group     | 试验天数<br>Days of experiment | 感染率/%<br>Infected rate | 死亡率/%<br>Mortality |
|-----------------|----------------------------|------------------------|--------------------|
|                 | 0 5 10 15 20 25 30         |                        |                    |
| I 对照<br>Control | 25 22 19 17 17 16 16       | 20                     | 36                 |
| 空白组<br>Blank    | 25 23 21 21 21 20 19       | 20                     | 24                 |
| II A            | 25 23 22 20 19 19 14       | 50                     | 44                 |
| B               | 25 22 19 19 19 17 16       | 70                     | 36                 |
| 对照<br>Control   | 25 22 22 21 20 19 17       | 10                     | 32                 |
| 空白组<br>Blank    | 25 24 23 21 21 20 19       | 20                     | 24                 |
| III A           | 25 21 21 18 - - -          | -                      | -                  |
| B               | 25 22 21 20 20 18 17       | 50                     | 32                 |
| 对照<br>Control   | 25 23 20 20 20 18 15       | 0                      | 40                 |
| 空白组<br>Blank    | 25 24 22 19 19 18 17       | 20                     | 32                 |

注: '-' 指意外死亡。

Note: '-' means unexpected death.

## 3 讨论

根据Cajaraville<sup>[5]</sup>的研究结论,衣原体寄生于双壳贝类的消化腺上皮细胞内,原体首先吸附在细胞表面,经胞饮进入细胞浆形成吞噬小泡(phagocytic vesicle),经过一段时间,原体发育成始体并在细胞质内形成包涵体(inclusion),始体经多次分裂后形成具有侵染性的原体,随着宿主细胞的破裂,原体被释放出来,进入宿主细胞后开始新的生活周期。衣原体对宿主细胞的破坏程度根据感染强度、宿主的生活状态和发育阶段不同而有所差异,有些可使宿主细胞完全崩解,有些则是逐渐释放或部分释放,有些宿主细胞在感染衣原体的情况下仍然能够分裂。

子细胞中有些含有衣原体,有些不含衣原体<sup>[1]</sup>。本研究结果显示,寄生于海湾扇贝体内的类衣原体只侵染消化腺上皮细胞,形成典型的嗜碱性包涵体,并导致部分细胞破裂,包涵体逸出(图1),但在其他器官组织细胞中未发现。该类衣原体原体、始体和中间体3个发育阶段,在宿主细胞质内形成膜性结构包围的克隆,细胞核及细胞器被挤向一侧。衣原体发育晚期宿主细胞崩解,包涵体破裂,原体释放到外界。这些结论与已有的报道基本一致。一般认为<sup>[4-5]</sup>,感染双壳贝类成体的类衣原体仅寄生在消化腺上皮细胞内,感染强度较低,仅对局部组织的部分细胞造成有限的机械损伤,对机体不形成系统感染,其分泌的外毒素对贝类宿主细胞的生理功能没有太大的影响。这一点与寄生于贝类的另一种原核生物—类立克次体的研究结论相类似<sup>[1,13-22]</sup>,即与该类生物感染巧合的宿主大规模死亡,通常由其他因素(如环境因素)所造成,而与原核生物寄生无直接关系。但对于早期发育阶段的宿主个体其危害程度可能相对较大。Leibovitz等<sup>[3]</sup>报道,在海湾扇贝人工育苗时,衣原体感染可造成幼体和稚贝在短期内的大量死亡,死亡率可高达100%;而对于海湾扇贝成贝则没有明显的危害,这可能与扇贝的生活阶段有关。本研究结果显示,类衣原体可以感染海湾扇贝不同阶段的个体,但不同的试验组感染率与死亡率有较大差异。幼体组感染率可达80%,死亡率可达90%以上,稚贝组的感染率在50%左右,死亡率也达70%,感染组与空白组在感染率和死亡率方面差异显著。成贝组的感染率平均在50%以上,与空白、对照组差异显著,而死亡率各试验组间没有太大差异。值得注意的是在幼体和稚贝的感染试验中,死亡率普遍高于感染率,在切片观察中发现,衣原体感染的多数幼体和稚贝的组织细胞,并未产生明显的机械损伤和大面积的坏死,细胞感染强度也较低,但死亡率却明显高于成贝。这可能与试验检查取材局限性有关,也可能与扇贝幼体和稚贝生命力相对脆弱有关。而成体则由于个体较大,对其感染有较强的承受能力。该结论在一定程度上验证了Leibovitz<sup>[3]</sup>的结论,即类衣原体可以感染不同阶段的海湾扇贝,在一定条件下可能造成对幼体和稚贝的危害,对成贝则基本没有影响,不能导致成贝宿主大量死亡。这一结论对海湾扇贝养殖生产,尤其是人工育苗生产具有一定的参考价值。

#### 4 结论

类衣原体感染可能是造成育苗失败的原因之一,其他因素可能亦有一定的协同作用。在人工育苗时,类衣原体很可能通过亲贝传染给幼体。因此在亲贝选择方面应严格检查挑选,避免使用类衣原体自然感染率高的亲贝,杜绝其传播来源,以免对幼体培育造成可能的危害而导致育苗失败。值得注意的是,在不同感染试验的空白和对照组中均有一定的感染率,但感染率较低,这可能与试验材料选取的检测手段及严格程度有关,也从另一侧面说明海湾扇贝类衣原体感染是较普遍的现象。

致谢:本工作得到了青岛海洋大学水产学院李赞教授、黄海水产研究所的黄健研究员、威海市水产研究所原永党工程师、山东省长岛县第二海水育苗场戴玉勇场长、中科院海洋研究所尤峰研究员、谢嘉琳老师、青岛海洋大学测试中心姜明老师的大力支持和帮助,在此特表谢意!

#### 参考文献:

- [1] 魏 曦. 医用立克次体学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1983. 380-387.
- [2] 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.
- [3] Leibovitz. Chlamydiosis: a newly reported serious disease of larval and postmetamorphic bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck) [J]. J Fish Diseases, 1989, 12: 126-136.
- [4] 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 Disease, 1979, 2: 179-189.
- [5] Cajaraville M P, Angulo E. Chlamydia-like organisms in digestive and duct cells of mussels from the Basque coast [J]. J Invert Pathol, 1991, 58: 381-386.
- [6] 王文兴, 罗婉涛, 薛清刚, 等. 海湾扇贝消化盲囊衣原体样生物的病理学研究[J]. 海洋科学, 1998, 3: 23-25.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Moore J D, Robbins T T, Friedman C S. Withering syndrome in farmed red abalone *Haliotis rufescens*: Thermal induction and association with a gastrointestinal Rickettsiales-like procaryote [J]. J

- Aqu Anim Health, 2000, 12: 26–34.
- [11] Bonami J R, Pappalardo. Rickettsial infection in marine crustacea [J]. Experimentia 1980, 36: 180–181.
- [12] Frellet P F, Loy J K, Kruppenbach B. Transmission of necrotizing heparopancretitis in *Penaeus vannamei* [J]. J Invert Pathol, 1993, 61: 44–48.
- [13] 刘英杰, 王崇明, 朱洛壮, 等. 栉孔扇贝类立克次体自然感染调查及人工感染试验[J]. 中国水产科学, 2002, 9(4): 346–352.
- [14] Elston R. Occurrence of branchial rickettsiales-like infections in two bivalve molluscs, *Tapes japonica* and *Patinopecten yessoensis*, with comments on their significance [J]. J Fish Dis, 1986, 9: 69–71.
- [15] Elston R, Peacock M G. A Rickettsiales-like infection in the Pacific razor clam, *Siliqua patula* [J]. J Invert Pathol, 1984, 44: 84–86.
- [16] Fries C R, Grant D M. Rickettsiae in gill epithelial cells of the hard clam, *Mercenaria mercenaria* [J]. J Invert Pathol, 1991, 57: 166–171.
- [17] Culka 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.
- [18] Culka G, Chang P W. Host response to rickettsial infection in blue mussel, *Mytilus edulis* L [J]. J Fish Dis, 1984, 8: 319–323.
- [19] 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.
- [20] Renault T, Cochenne N. Rickettsia-like organisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. J Invert Pathol, 1994, 64: 160–162.
- [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 Pathol, 1993, 62: 204–206.

## Natural infection and artificial transmission of Chlamydia-like organism in *Argopecten irradians* Lamarck

LIU Ying-jie<sup>1</sup>, SONG Wei-bo<sup>2</sup>, WANG Chong-ming<sup>2</sup>, ZHU Ming-zhuang<sup>3</sup>, HE Gui-zhen<sup>2</sup>,  
ZHANG Hong-yi<sup>4</sup>, JIANG Wei-wei<sup>4</sup>, PAN Jin-pei<sup>1</sup>

- (1. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;  
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266003, China;  
3. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;  
4. Fisheries Administration Committee of Jincheng District, Laizhou 261400, China)

**Abstract:** The samples of bay scallop *Argopecten irradians* were collected at different stages during Oct. 1999 to Mar. 2001 when the outbreak of death happened to the bay scallop. The observation was conducted under light microscope and transmission electron microscope and the inclusions of Chlamydia-like organisms (CLO) were found in the epithelial cells of digestive gland, which showed basophilic. The inclusions have round shape and some irregular shapes with the size of about  $9\ \mu\text{m} \times 7\ \mu\text{m}$  and show blue under HE staining. At the late development stage of the CLO, the inclusions break down and CLOs release. The ultrastructure results show that the inclusions have three types in shape, which are ①elementary body: small and electron dense with short-rod or spindle shape, sized  $(317.5 \pm 40.1)\ \text{nm} \times (180.3 \pm 40.0)\ \text{nm}$  ( $n=18$ ); ②reticular body: large and electron dispersal with round shape or irregular shapes, sized  $(890.5 \pm 164.6)\ \text{nm} \times (623.6 \pm 129.3)\ \text{nm}$  ( $n=20$ ); ③intermediate body: at middle size between the above two with fewer numbers, maybe at the transitional stage between the elementary body and the reticular body. The CLO artificial transmission experiment was carried out in larval, postmetamorphic and adult individuals. The results show that CLO can infect bay scallop at different stages at the infecting rate of 50%–80% and lead to high mortality in larval and postmetamorphic individuals, but can do little harm to the adults. The conclusion is that CLOs may have great harmful effects on larval and postmetamorphic bay scallop under certain conditions, but can not lead to the large scale of death in adult bay scallop.

**Key words:** *Argopecten irradians* Lamarck; Chlamydia-like organism (CLO); ultrastructure; artificial transmission