

闽南养殖九孔鲍暴发性流行病的病原研究

张朝霞, 王 军, 苏永全, 周化民, 鄢庆枇, 吕嘉扬

(厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 从 1999 年春季东山县九孔鲍暴发性流行病的病鲍内脏提取病原粗提液, 经电镜观察和回归感染实验, 证实其病原主要是病毒合并细菌感染, 细菌为两种弧菌, 病毒为球形, 其发生基质为细胞质中一种双层膜的泡状结构, 观察到病原入侵后引起鲍的组织细胞产生严重的病理变化, 探讨病原的入侵途径, 提出预防该流行病的一些措施。

关键词: 九孔鲍; 病毒; 合并感染

中图分类号: Q938.8

文献标识码: A

九孔鲍 (*Haliotis diversicolor supertexta*) 是我国南方沿海的福建、广东、广西等省沿岸的主要养殖品种, 福建省东山县更是以“鲍岛”之称誉满海内外。至 1998 年底, 该县工厂化养鲍面积已达 23.3 公顷。但是由于养鲍户着力追求高产, 忽视了科学养殖和管理, 导致近年来鲍病害频频发生, 并有愈演愈烈之势, 这对养鲍业的发展构成严重威胁。1999 年 2~5 月东山县暴发了一场恶性流行病, 波及到 95% 以上的养鲍场, 损失极其惨重。

有关鲍病的研究, 迄今为止国内外已发现的病害包括寄生虫性疾病^[1,2]、真菌性疾病^[1]、立克次氏体病^[3]、细菌性疾病^[4]、病毒性疾病^[5] 和外伤感染^[5] 等几大类。目前对鲍病的研究多针对单一病原生物, 对细菌性鲍病的研究已取得了不少进展, 而对于病毒性鲍病研究的报道较少。李霞等证实了一种球状病毒是皱纹盘鲍 (*H. discus hannai*) “裂壳病”的病原, 并对病鲍的外套膜等多个组织进行病理观察^[6]。日本的中津川俊雄曾推测病毒引起养殖鲍肌肉萎缩以至死亡^[7]。但在九孔鲍病害研究方面, 国内外鲜少见公开报道。本文作者针对 1999 年春季东山县暴发的养殖九孔鲍恶性流行病, 对该流行病的病原作出诊断, 并探讨病原的入侵途径和致病病理。

1 材料与方法

1.1 实验材料

病鲍样品: 分别于 1999 年 3 月 1 日、3 月 19 日和 4 月 3 日分别对东山县 T 和 P 两个大型养鲍场的发病鲍池进行现场调研, 并采集病鲍, 壳长 3.5~4.5 cm, 体重 6~10 g (含壳), 低温保存并带回实验室。

健康鲍: 回归感染实验用健康鲍取自同安区大嶝镇 C 养鲍场, 壳长 3.5~5 cm, 体重 5.5~11 g (含壳)。

1.2 现场调研

现场检测了鲍池的水质状况, 包括水温、比重、溶解氧、pH、氨氮、亚硝酸氮、硫化氢、水色和有无气泡异常现象, 调查了饲养管理情况并观察了鲍的生活和摄食情况以及病鲍的病症。

1.3 病原粗提液的制备

用灭菌生理盐水冲洗病鲍裸露部分及肠, 以无菌操作去壳并取内脏, 加入 5 cm³ 生理盐水匀浆, 匀浆液经 4℃ 5 000 r/min 离心 8 min, 取 2 cm³ 上清液制成 A 液, 其余上清液经 4℃ 12 000 r/min 离心 20 min 后, 取上清液制成 B 液。同时测定这两种病原粗提液中核酸的含量。

1.4 电镜检测

1.4.1 负染

取上述 A、B 液, 各滴一滴在取样板上, 将覆有 Formovar 膜的铜网反扣在悬液上。10 min 后吸去多余液体, 置于 2% 的磷钨酸液滴上负染 5 min, 用滤

收稿日期: 2002-09-06

作者简介: 张朝霞(1971-), 女, 工程师。

纸吸去余液,室温晾干, JEM-100CX ⑦电子显微镜下观察拍照。

1.4.2 超薄切片

无菌操作取病鲍的消化腺,切块(大小约 1 ~ 2 mm³),先后经 2.5% 的戊二醛及 1% 的锇酸固定、乙醇丙酮系列脱水、环氧树脂包埋及醋酸铅和柠檬酸铅双重染色后, JEM-100CX ⑦电子显微镜下观察。

1.5 回归感染

1.5.1 实验条件

实验用水族箱体积为 20 dm³, 30‰ 海水, pH 8.0 ~ 8.4, 使用前用漂白粉消毒, 水温为 22 ~ 25 °C, 每天换水一次, 换水量为 50%, 早晚各喂食干海带一次, 喂食量根据摄食情况而定, 一般不超过体重的 4%。

1.5.2 细菌计数

取 A 液 0.1 cm³, 用生理盐水稀释至 10⁻¹、10⁻²、10⁻³, 各取 0.2 cm³ 稀释液于营养琼脂平板上, 30 °C 培养 20 h 后计数。

2.5.3 回归感染

以注射方式对健康九孔鲍进行感染, 分口部注射和足部注射两种(均采用带针头的注射器), 实验持续 3W。

口部注射: 选用壳长 3.5 ~ 5.0 cm 的健康鲍, 按注射剂量分组, A 液分为 30、50、80 mm³ 共 3 组, B 液分为 50、80、120 mm³ 共 3 组, 除 B 液 120 mm³ 组实验鲍为 5 粒外, 其余各组实验鲍为 10 粒。另设对照组 4 组, 30、50、80 mm³ 剂量的实验鲍各 10 粒, 120 mm³ 剂量的 5 粒, 注射液为生理盐水。

无论是实验组还是对照组的注射方式均采用注射液经口部直接进入消化道。

足部注射: 分组情况同口部注射, 并同样设立 4 个对照组, 注射液、注射剂量和对照组鲍数均与口部注射相同。实验组和对照组均采用足部肌肉注射。

注射后观察病鲍的病症, 记录鲍的死亡时间, 取刚死鲍的内脏, 进行负染和超薄切片, 操作同 1.4。

2 结 果

1999 年 2 月 20 日(农历正月初四) 始, 东山县养鲍场陆续暴发恶性流行病, 病鲍主要表现为摄食量减少, 活力下降, 足部发黑变硬, 分泌大量粘液, 经现场解剖可见外套膜萎缩, 消化腺肿大, 一般在表现出病症后 3 ~ 7 内死亡, 全县 54 个养鲍场平均死亡率约为 70% 以上, 有的养殖池死亡率高达 95%。

2.1 水质及养殖情况

1999 年 3 月 ~ 4 月多次检测东山县 T 养鲍场的发病鲍池的水质因子, 因多次测得的数据变化不大, 表 1 中仅给出 3 月 19 日测得的水质数据。结果表明, 除了水色浑浊和出现较多含粘液的气泡外, 其它的水质因子均较为正常。调研得知, 在出现病情后, 养殖户根据以往的经验或借鉴别人的做法, 投入痢特灵和头孢氨苄等药物, 但未能控制住病况。

2.2 病原形态

在负染样品和病变组织的超薄切片中观察到, 此次流行病的病鲍体内可检测出细菌和病毒。

2.2.1 细菌

电镜观察 A 液中存在着众多细菌, 数量达 1.0 × 10³ 个 / cm³, 负染所示细菌为杆状, 端生单鞭毛, 大小为 0.6 ~ 0.8 μm × 1.0 ~ 1.3 μm, 有的细菌细胞正处于二分裂状态(图 1), 经鉴定细菌病原有两种, 一种为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*), 另一种为副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)^[8]。在养殖病鲍肝组织的超薄切片中还观察到在肝细胞被破坏、只余大量空泡的细胞碎片中有不少细菌, 图 2 显示这些细菌的形态。

2.2.2 病毒

在负染样品 A 液及 B 液中均观察到两种球状病毒, 较大的病毒颗粒大小为 135 ~ 150 nm, 中心是电子致密度高、直径为 100 ~ 110 nm 的核衣壳; 另一种球状病毒颗粒大小为 95 ~ 110 nm, 二者的核衣壳均呈二十面体对称, 外具囊膜(图 3)。

表 1 养殖池水质及养殖管理状况

Tab. 1 Status of water quality and management in ponds of cultured abalones

水 质 状 况								养殖管理状况			
水温 / °C	比重	DO / mg · dm ⁻³	pH	氨氮 / mg · dm ⁻³	硝酸氮 / mg · dm ⁻³	硫化氢 / mg · dm ⁻³	水色	粘液泡	养殖池面积 / m ²	放养数量 / 粒	饵料种类
17	1.023	8	8.4	< 0.2	< 0.01	< 0.05	浑浊	多细	3 × 9	6 × 10 ⁴	江蓠

超薄切片电镜观察结构显示,这两种病毒均成堆出现在细胞质中一种具有双层膜的泡状结构中,随着泡状结构的破裂,病毒逸出,两种病毒颗粒均未观察到形成包涵体(图4)。

2.3 回归感染实验

回归感染实验持续3w,由于注射6d后感染的病鲍不再发生死亡,剩余病鲍病症消失,摄食和活动恢复正常,因此至21d,结束实验周期。感染用的病原粗提液A液(含细菌和病毒)及B液(仅含病毒)中核酸的含量分别为 $1332 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 和 $91 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 。结果表明,实验中鲍的死亡时间集中在注射后的2~5d,尤其是第3、4d,6d以后剩余的鲍不再死亡,而对照组鲍在实验期间无一死亡,因此表2中仅列出了注射后1~7d鲍的死亡情况。

在回归感染实验中,无论是足部注射还是口部注射,随着注射剂量的加大,鲍的死亡时间提前,死亡率也高。表2中看出,足部注射 120mm^3 B液时,96h内鲍的死亡率达到了100%,且比同样注射方式的低剂量其他组的死亡时间提早24h(表2)。

注射A液比注射同剂量B液鲍的死亡率高,死亡时间往往提前24h或更早。例如口部分别注射 80mm^3 A及B液,鲍的死亡率分别为90%和80%,死亡开始时间分别为注射后第24h和第72h(表2)。

用同一感染液同一剂量注射健康鲍,口部注射比足部注射鲍的死亡速度快,但足部注射鲍的死亡率高。表2中看出,同样是注射 30mm^3 A液,口部注射鲍72h开始死亡,足部注射鲍96h后才开始死亡,但足部注射鲍死亡率为50%,比口部注射鲍高30%(表2)。

回归感染病鲍在死亡前观察到分泌粘液增多,附着力下降的病症,刚死的病鲍足部发硬发黑,消化腺肿大或糜烂,呈现出与养殖病鲍类似的症状。

2.4 消化腺的病理观察

2.4.1 养殖病鲍的肝肠组织

正常健康鲍的肠上皮细胞呈柱状紧密排列,细胞核质均匀,细胞器正常(图5)。在4月3日的病鲍样品中,肠组织细胞出现的病变程度不一。病变程度较轻的细胞胶原纤维排列凌乱,细胞核膜部分溶解,核质均质化,线粒体肿大,嵴消失,细胞质中存在多个病毒的泡状结构(图6)。有的病变严重的细胞萎缩,间隙加大,排列松散,细胞内容物流失,整个上皮层只余下细胞轮廓、零散的细胞器和大量的病原菌(图2)。

正常鲍肝组织细胞呈形状各异但排列紧密,核

仁清晰,核质均匀,内质网等细胞器发达(图7)。在3月19日的8份样品中,大部分病鲍的肝组织严重受损,成片的细胞核质均被破坏,仅存一个个空泡、病毒的泡状结构和许多的滑面型内质网小池(图8)。在这些病鲍的肝组织中仅余的细胞也出现了明显的病理变化,核变形,核仁消失,核膜受损,线粒体嵴减少或消失,细胞质中被严重破坏(图9)。

超薄切片中还观察到在细胞严重受损而细胞器尚未解体的肝及肠组织的一些区域,在成堆的内质网、线粒体等细胞器和细胞碎片之间,细菌和病毒同时出现在一个视野内(图10)。

2.4.2 回归感染病鲍的电镜观察

在回归感染病鲍的负染样品及超薄切片中均同时观察到形态结构类似于养殖病鲍的细菌及病毒病原。感染病鲍的肝肠组织细胞都发生了病变,只是病变程度更为严重,病原生物尤其是病毒的量大大增加,感染病鲍成片的组织细胞核质消失,在细胞轮廓之间的细胞器碎片中充满大量病原生物(图11)。在肝肠组织中合并感染细菌的区域往往只余成片的细胞轮廓和细胞碎片(图2),但在单独存在多个病毒泡状结构的区域,有的细胞基本结构仍存在(图12)。

3 讨论

1999年春季东山县养殖九孔鲍流行病,是东山县自1992年开展人工养殖九孔鲍以来最严重的一次。回归感染病鲍在感染后3~4d为发病高峰期,5d内病鲍死亡,经检测与养殖病鲍结构和理化特征一致的病毒和细菌。经过生理生化特性和电镜检测,证实细菌病原为溶藻弧菌和副溶血弧菌^[8]。回归感染实验中含细菌和病毒的A液对九孔鲍的致死效果明显强于仅含病毒的B液。电镜观察回归感染和自然发病的病鲍的病理情况,发现只有病毒感染部位的病鲍细胞结构基本正常,而同时有细菌入侵的部位细胞被严重破坏。因此,病毒是此次流行病的主要病原生物,而细菌的感染加剧了鲍的发病乃至死亡。

本文研究的引起养殖九孔鲍恶性传染病的两种球形病毒均不形成包涵体,而是位于细胞质中一种具有双层膜的泡状结构中,这种泡状结构与非包涵体杆状病毒感染中国对虾后在其体内细胞中形成封入体的结构相似^[9]。本文所报道的直径分别为95~110nm和135~150nm的两种球状病毒,其毒力明显强于李霞等在患“裂壳病”的皱纹盘鲍中检测到的球形病毒,二者在形态、大小和寄生部位上也存在

明显不同^[6].

病原生物的毒力和浓度、外界环境因素尤其是寄主的免疫机能,是决定寄主感染和发病的重要因素.对于鲍自身免疫系统的组成、特点、功能的研究,国内外几乎是空白.在回归感染实验中低剂量的病原生物进入消化道,并不导致九孔鲍的发病及死亡,推测九孔鲍可能与其它软体动物一样,其血细胞和一些体液因子具备一定的免疫能力^[1]现场调研发现,小鲍比大鲍发病率更高,传染也更快,可能是由于小鲍的免疫系统尚未发育完全、抵抗力较低所致.

外界环境因素也能间接影响病毒的传染^[11].本次流行病发病期间,随着气温的升高,鲍的死亡率降低,有些病鲍的病症随之减弱、消失.

对付鲍的病毒性疾病,目前尚无有效的治疗方法.只能采取预防为主措施,做好管理工作,尤其注意病原生物的隔离和疫区的封锁,以防止养殖池间的相互感染,平时可投喂一些含有天然免疫成分或增强鲍抗病性的药物以提高鲍的免疫机能,如在饲料中添加维生素 C 和多糖等.

表 2 回归感染实验结果
Tab. 2 Results of artificial infection

注射部位	注射液	剂量 / mm ³	实验鲍数 / (粒)	注射后 (h) 的死亡鲍数 / 粒							死亡率 / (%)				
				24	48	72	96	120	144	168	24h	48h	96h	168h	
口部	A	30	10	0	0	1	1	0	0	0	0	0	10	20	20
		50	10	0	2	1	4	0	0	0	0	30	70	70	
		80	10	1	5	3	0	0	0	10	90	90	90		
	B	50	10	0	0	1	2	3	0	0	0	10	30	60	
		80	10	0	0	2	6	0	0	0	20	80	80		
		120	5	1	0	2	1	0	0	20	60	80	80		
	对照组	30	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		50	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		80	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		120	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
足部	A	30	10	0	0	0	2	3	0	0	0	0	20	50	
		50	10	0	0	4	1	2	0	0	0	60	70	90	
		80	10	0	2	3	5	0	0	0	50	100	100		
	B	50	10	0	2	3	4	0	0	0	30	70	70		
		80	10	0	0	7	1	0	0	0	70	80	80		
		120	5	0	0	2	2	0	0	0	60	100	100		
	对照组	30	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		50	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		80	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		120	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

参考文献:

[1] 孟庆显. 鲍的疾病与防治[J]. 海洋湖沼通报, 1988, (11): 96- 98

[2] Gardner G R, Harshbarger J C, Lake J L, et al. Association of *Prokaryotes* with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalones, *Haliotis cracherodii*[J]. Journal of Invertebrate Pathogen, 1995, 66(2): 111- 120.

[3] Friedman C S, Robert W, Kisonandaka G, et al. Transmissibility of a coccidian parasite of abalones, *Haliotis* spp. [J]. Journal of Shellfish Research, 1993, 12: 201- 205.

[4] Anguianobeltran C, Searcybernal R, Lizarragapartida M L, Pathogen effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalones, *Haliotis rufescens*[J]. Disease of Aquaculture Organisms, 1998, 33(2): 119 - 122.

[5] 张明, 李世英. 鲍的疾病与防治[J]. 中国水产, 1999, (1): 37- 38.

[6] 李霞, 王斌, 刘淑范, 等. 皱纹盘鲍“裂壳病”的病原及组织病理研究[J]. 水产学报, 1998, 22(1): 61 - 66.

[7] 张朝霞, 王军, 苏永全, 等. 东山县九孔鲍细菌性疾病研究[J]. 台湾海峡, 2001, 20(2): 193 - 199.

[8] 中津川俊雄. 鲍肌肉萎缩症的病理研究[J]. 鱼病研究, 1990, 25(4): 207 - 212.

[9] 张建红, 高学兴, 陈棣华, 等. 中国对虾非包涵体杆状病

毒在体内的感染与发生[J]. 中国病毒学报, 1994, (4): 362-366.

研究进展[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(5): 558-561.

[10] 瞿玉梅, 丁秀云, 李光友. 软体动物血细胞及体液免疫

[11] 殷震, 刘景华 编著. 动物病毒学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985.

Virosis of Cultured *Haliotis divesicolor* in Southern Fujian

ZHANG Zhao-xia, WANG Jun, SU Yong-quan,

ZHOU Hua-min, YAN Qing-pi, LU Jia-yang

(College of Oceanography and Environment, Xiamen Univ., Xiamen 361005, China)

Abstract: A severe epidemic of cultured *Haliotis divesicolor* was broken out in Dongshan, Fujian province in the spring of 1999. On diseased abalones, mucus were increased, livers were enlarged and their activities were descended. Observed by the transmit electron microscope(TEM), there were two kinds of pathogens, bacteria and virus. The later was spherical type, diameters of which were 135 ~ 150nm and 95 ~ 110nm. They existed in the cell of abalones by this means that several virus were enclosed in a two-layers membranes' vesicle. Cells in liver and intestines of the ill abalones turned up pathologic changes. The nucleus was deformed and its membrane was damaged accompanying with those mitochondria expanding. The pathogenic suspension, extracted from the cell of diseased abalones, were used to do artificial infection experiments with the healthy abalones and confirmed to be toxic, because the healthy abalones were ill and dead within 5 days. They appeared the same symptoms as the cultured diseased ones. It showed that virus were more important to this epidemic of *H. divesicolor supertexta* than bacteria. So far, there were no effective measures to cure virosis of abalones. Scientific management, segregation of pathogens and adding some nutrition or immune materials, such as Vitamin C and LPS, could prevent the abalones from diseases.

Key words: *Haliotis divesicolor supertexta*; virus; co-infect

图版 iv

图 1 示负染样品中的细菌, 呈杆状, 端生单鞭毛, 正处于二分裂状态($\times 20\ 000$);

图 2 示肠上皮细胞发生严重病理变化, 细胞萎缩, 间隙加大, 整个上皮层只余下细胞轮廓(K)、零散的细胞器和大量病原菌(B), 细菌呈杆状或弧状($\times 5\ 000$);

图 3 示负染样品中大小为 135 ~ 150 nm 的球状病毒颗粒(V1), 中心部位为核衣壳, 外具囊膜; 以及 95 ~ 110 nm 的外具囊膜球状病毒颗粒(V2)($\times 20\ 000$);

图 4 示病毒粒子在核衣壳外具囊膜(\uparrow), 成堆出现在细胞质中一种具有双层膜(\uparrow)的泡状结构中, 随泡状结构的破裂, 病毒(V)正在逸出($\times 40\ 000$);

图 5 示正常肠上皮细胞呈柱状紧密排列, 核质均匀, 细胞器正常($\times 2\ 000$);

图 6 示病变程度较轻的肠上皮细胞胶原纤维排列凌乱(\parallel), 细胞核膜部分溶解(\uparrow), 核质均质化, 线粒体肿胀, 嵴消失(M), 细胞质中存在多个病毒的泡状结构(D)($\times 10\ 000$);

图 7 示正常肝组织细胞形状各异但排列紧密, 核仁清晰, 核质均匀, 内质网发达($\times 4\ 000$);

图 8 示成片的肝细胞核质均被破坏, 只余下空泡(P)、病毒的泡状结构(D)和许多滑面型内质网小池(U)($\times 10\ 000$);

图 9 示剩余的肝细胞核变形, 核仁消失, 核膜受损(\uparrow), 线粒体嵴被破坏(M), 细胞质被严重破坏($\times 14\ 000$);

图 10 示细胞受损、但细胞器尚未解体的区域, 在内质网、线粒体等细胞器和细胞碎片之间同时存在病毒(V)和细菌(B)($\times 8\ 000$);

图 11 示感染病鲍成片的的内质网小池(U)等细胞器碎片中充满大量病毒粒子(V)($\times 14\ 000$);

图 12 示在肝肠组织中单独存在 6 个病毒泡状结构(D)的区域, 细胞基本结构人仍存在($\times 4\ 000$).

