



文蛤浮游期发病幼虫细菌群落分析和致病菌的分离鉴定

隋炜金^{1,2}, 王鸿霞¹, 刘保忠^{1,2*}

(1. 中国科学院海洋研究所, 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为研究文蛤育苗过程中幼虫病害及其主要致病菌, 实验通过构建细菌 16S *rDNA* 克隆文库、病原菌分离纯化、人工感染和药敏实验等方法对育苗场发病的浮游期文蛤壳顶幼虫样品进行了系统分析。结果显示, 发病的文蛤壳顶幼虫细菌群落多样性低, 地中海弧菌占比高达 75% 以上, 推断其可能为引发此次幼虫发病的主要致病菌。从发病幼虫的匀浆组织中分离获得该优势菌株, 测序及系统发育鉴定为地中海弧菌。人工感染实验确定了其致病性, 菌株 US2-01 在 1.0×10^6 CFU/mL 的菌液浓度下浸泡感染文蛤浮游幼虫, 96 h 累计死亡率为 84%。药敏实验表明, 地中海弧菌菌株 US2-01 在 12 种抗生素的测试中对常用的青霉素、氨苄西林、红霉素等抗生素具有一定的耐药性, 对四环素和多西环素中度敏感, 对头孢他啶、庆大霉素、卡那霉素等其余 7 种抗生素呈现高度敏感。本研究首次报道了地中海弧菌为文蛤浮游期幼虫致病的一种潜在病原, 研究结果可为文蛤幼虫疾病研究及贝类苗种培育过程中的病害防控提供科学依据。

关键词: 文蛤幼虫; 地中海弧菌; 16S *rDNA* 克隆文库; 药敏实验

中图分类号: S 944.3

文献标志码: A

文蛤 (*Meretrix petechialis*) 是一种广温、广盐性的埋栖型贝类。因其味道鲜美, 营养价值高而广受消费者欢迎, 文蛤养殖产业具有广阔的市场空间。随着文蛤人工养殖规模的增加, 养殖产业对苗种需求也日益扩大, 而苗种繁育过程中幼体规模化死亡事件时有发生, 已成为制约文蛤养殖产业发展的一个重要因素。

文蛤等海洋双壳贝类幼虫在变态发育成稚贝前要经过一段时间的浮游生活, 而幼体与成体相比更容易受到病原的侵染, 对病原的抵抗能力也明显比成体弱^[1]。贝类浮游幼虫通过面盘纤毛摆动, 将海水中的单细胞藻类等微小颗粒送入口沟, 进入胃、肠道消化吸收, 因而面盘是浮游幼虫运

动和摄食的主要器官。贝类育苗过程中发病幼虫通常表现为面盘纤毛脱落, 肠胃空白, 沉入池底后死亡。已有研究报道了贝类性腺质量、饵料、水质等因子与贝类幼虫“面盘纤毛脱落”或“面盘解体”病症之间的关系^[2]; 也有研究表明, 细菌、病毒感染和寄生虫等是贝类苗种繁育过程幼体规模性死亡的重要原因^[3]。

文蛤在 6—7 月性腺成熟, 苗种繁育一般在夏季进行, 而夏季高温期弧菌类群在贝类生境中广泛存在, 它们可以通过产生外毒素或直接侵入幼虫组织等方式导致幼虫死亡。Dubert 等^[4]从濒死的蛤类幼虫中分离出了塔氏弧菌 (*Vibrio tubiashii*), Gómez-León 等^[5]发现溶藻弧菌 (*V. algin-*

收稿日期: 2022-10-24 修回日期: 2022-11-12

资助项目: 现代农业产业技术体系 (CARS-49); 山东省重点研发计划 (农业良种工程) 项目 (2021LZGC029)

第一作者: 隋炜金 (照片), 从事贝类遗传育种方面研究, E-mail: swj9805@163.com

通信作者: 刘保忠, 从事贝类发育遗传学研究, E-mail: bzliu@qdio.ac.cn



olyticus) 和灿烂弧菌 (*V. splendidus*) 是造成西班牙两起蛤类幼虫大规模死亡事件的病原菌, Prado 等^[6-7]证明了 *V. neptunius* 可以作为致病菌使牡蛎幼虫大量死亡。近年来贝类育苗厂夏季频繁出现蛤类幼虫规模性死亡现象, 但具体的发病原因和致病菌还鲜有报道。

本实验针对文蛤苗种培育过程中浮游期出现的幼体大规模死亡的现象, 基于 16S *rDNA* 克隆文库法分析了发病文蛤浮游幼虫细菌群落结构特征, 进一步从发病幼虫的匀浆组织中分离获得优势菌地中海弧菌, 并对其进行了致病性以及药敏实验, 旨在为蛤类苗种培育过程中的流行病学研究和病害防控提供技术支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 幼虫培育

2021 年夏季在浙江温州清江养殖基地进行文蛤幼虫的培育。培育用水为砂滤海水, 温度 28~31 °C, 盐度 18~25, 幼虫培育密度 8~10 个/mL。受精 24 h 后发育至 D 形幼虫期, 开始投喂等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*), 每日 3 次, 每次投喂量 1×10^4 个/mL; 随着幼虫的生长, 饵料投喂数量和种类逐步增加, 日投喂 3~5 次。每日换水 1 次, 每次换水 1/3~1/2。幼虫第 1 次倒池在受精后 25~30 h 进行, 以后每 2~3 日倒池 1 次。幼虫壳长达到 180 μm 时, 池底铺经过清洗消毒的细沙, 有利于幼虫附着变态。

1.2 幼虫和亲贝样品的收集

文蛤苗种繁育过程中, 浮游幼虫在受精后 4 d 出现活力减弱的情况, 对幼虫进行取样(壳顶幼虫 I), 收集幼虫 200 mg 置于-70 °C 冰箱保存。随后发现受精后 5 d 大量幼虫出现沉降, 立即对沉降的幼虫进行取样(壳顶幼虫 II), 收集幼虫 200 mg 置于-70 °C 冰箱保存。对池内剩余的幼虫持续进行健康状态的监测, 发现在受精后 6 d 幼虫几乎全部沉降到池底, 后续出现大量空壳, 死亡率高达 90%。

从苗种繁育所用的文蛤亲贝养殖池塘中随机取 3 个文蛤成体, 抽取血细胞, 离心后收集到约 10 mg 血细胞, 置于-70 °C 冰箱保存。实验过程中操作人员严格遵守中国科学院海洋研究所实验动物伦理规范, 并按照中国科学院海洋研究所伦

理委员会制定的规章制度执行。

1.3 细菌基因组 DNA 提取和 16S *rDNA* 扩增

分别取壳顶幼虫 I 和壳顶幼虫 II 样品各 1 份约 30 mg, 亲贝血细胞 10 mg, 用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒 [天根生化科技(北京)有限公司]提取总 DNA。以提取的 DNA 为模板, 用 16S *rDNA* 通用引物 27F(AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG) 和 1492R(GGTTACCTTGTTACGACTT) 进行扩增。PCR 扩增反应体系 (20 μL): 模板 DNA 1 μL, 上下游引物各 1 μL (pmol/μL), *Taq* 酶 10 μL, 加 ddH₂O 至 20 μL。反应程序: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环 30 次, 72 °C 延伸 10 min 后反应结束, 4 °C 保温备用。

1.4 16S *rDNA* 克隆文库的构建

将 PCR 扩增的引物通过琼脂糖凝胶回收试剂盒进行纯化, 纯化后产物进行 TA 克隆转化。先将 PCR 产物与载体连接起来, 然后转化至感受态细胞中, 加入 700 μL 不含氨苄青霉素 (Amp) 的液体 LB 培养基, 摇匀后取 200 μL 涂布在含 Amp 的 LB 固体培养基上, 37 °C 培养 12~16 h。再通过菌液 PCR 检测筛选阳性克隆子, 构建 16S *rDNA* 克隆文库。从 3 个克隆文库中分别随机挑选 50~100 株阳性克隆菌株测序。

1.5 16S *rDNA* 序列分析

将获得的 DNA 序列在 EZ BioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/identify>) 提供的公共数据库中进行序列同源性比对, 从结果中取相似性最高的序列, 初步确定种属。将测序结果以种为单位划分操作单元 (operational taxonomic unit, OTU)。克隆子与 GenBank 数据库中已知细菌的 16S *rDNA* 序列相似性最高为 100%, 最低为 90%。文库的覆盖率可以反映所建文库对系统中细菌多样性的表现程度, 用覆盖率 Coverage C 描述所建文库的库容^[8]。

$$\text{CoverageC}/\%=[1-(n1/N)] \times 100\%$$

式中, $n1$ 代表文库中只出现 1 次的克隆子数目 (个), N 代表文库中克隆子总数 (个)。

文库细菌群落结构的多样性也可通过 Shannon 指数 (H)、Simpson 优势度 (D) 及均匀度指数 (E) 进行分析^[9]。具体公式:

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i \quad (1)$$

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2 \quad (2)$$

$$E = H / \ln S \quad (3)$$

式中, S 表示克隆文库中 OTU 总数 (个), P_i 表示第 i 个 OTU 在克隆文库中所占的比例 (%)。

1.6 壳顶幼虫细菌的分离培养及 16S *rDNA* 鉴定

将 100 mg 壳顶幼虫 II 用无菌海水漂洗 3 次后与适量无菌海水混合后匀浆。匀浆液梯度稀释后在 2216E 平板上进行分离纯化, 置 28 °C 下恒温培养 24 h。从平板上挑取优势单菌落进行多次划线培养, 挑取优势菌进行分离纯化直到获得单一纯菌落 (菌株编号为 US2-01、US2-02), 并与体积分数为 50% 的甘油等体积混合制成菌悬液, 于 -80 °C 下冻存。提取菌株 US2-01 和 US2-02 的 DNA, 扩增 16S *rDNA* 序列, 并进行初步鉴定, 方法同上。下载 RDP 数据库相关门属代表序列作为参考序列, 使用 MEGA-X, 以最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 构建系统进化树。

1.7 人工感染实验

挑取 2216E 培养基上分离株的单菌落接种至液体培养基中, 置于 28 °C 恒温摇床 (200 r/min) 过夜培养, 获得菌悬液。高速离心菌悬液收集菌体, 用无菌磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 重悬, 血球计数板计数, 确定菌液浓度。文蛤幼虫人工感染实验在六孔板中进行, 每孔 30 个幼虫, 将健康的文蛤面盘幼虫 (受精后 2 d) 随机分为感染组和对照组。依据已有参考文献, 实验设置了 1.0×10^4 CFU/mL (低浓度) 和 1.0×10^6 CFU/mL (高浓度) 2 个浸泡感染浓度^[4-5]。每个处理设置 3 个平行。每 12 小时镜检观察并记录各处理组 (共 9 个孔) 幼虫死亡个数, 观察后的样品孔弃掉, 不进入下一个周期的观察计数。每 24 小时对剩余样品孔进行换水, 对照组更换新鲜的无菌海水加相应体积的无菌 PBS, 感染组更换为由无菌海水配置的相应浓度的菌液, 持续感染。实验周期为 4 d, 水温控制在 (28 ± 1) °C, 每日正常投喂等鞭金藻 3 次, 每次投喂量 1×10^4 个/mL。

1.8 病原菌药敏特性分析

采用纸片扩散法 (K-B 法), 测定 US2-01 菌株

对 12 种抗菌药物敏感性, 参照临床和实验室标准协会 (CLSL) 抗生素敏感实验标准。在超净工作台取 100 μL 纯培养菌液移至 MH 平板培养基上, 并用无菌涂布棒涂布菌液, 贴上药敏片后置于 37 °C 恒温箱中培养 18~24 h。测量抑菌圈直径, 判断标准是抑菌圈 < 10 mm 表现为耐药, 10~20 mm 为中度敏感, > 20 mm 为高敏。

2 结果

2.1 16S *rDNA* 克隆文库的构建和多样性分析

本实验构建了文蛤浮游期发病幼虫和健康亲贝血细胞的 16S *rDNA* 克隆文库。3 个文库测序的阳性克隆数目分别为 64、57 和 117 个, 文库的测序覆盖率在 83%~93%, 保证了测序数据能够较完整地反映细菌群落结构。由表 1 中的数据可以看出, 文蛤浮游期发病幼体细菌群落的 OTU 数目远低于亲贝血细胞 OTU 的数目。

表 1 样品覆盖率

Tab. 1 Coverage of samples

| 样品 samples | 克隆数 no. of clones | 分类单元 no. of OTUs | 覆盖率/% coverage |
|------------------------|-------------------|------------------|----------------|
| 壳顶幼虫 I umbo larvae I | 64 | 9 | 90.63 |
| 壳顶幼虫 II umbo larvae II | 57 | 7 | 92.54 |
| 亲贝血细胞 clam hemocytes | 117 | 42 | 82.91 |

多样性分析显示, 壳顶期两个样品的 Shannon、Simpson 和 Even 等多样性指数远远低于血细胞。而且壳顶幼虫 II 样品的多样性指数均低于壳顶幼虫 I, 发病的壳顶幼虫 I、II 样品呈现微生物群落结构单一, 细菌种类少, 种群多样性和复杂程度低的特点 (表 2)。

表 2 不同样品细菌多样性指数

Tab. 2 The bacterial diversity index of different samples

| 样品 samples | Shannon 指数 Shannon index | Simpson 指数 Simpson index | 均匀度指数 evenness index |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|
| 壳顶幼虫 I umbo larvae I | 0.991 | 0.422 | 0.451 |
| 壳顶幼虫 II umbo larvae II | 0.765 | 0.336 | 0.393 |
| 亲贝血细胞 clam hemocytes | 3.268 | 0.938 | 0.874 |

2.2 文蛤不同样品的菌群分布及优势菌

3 个文库细菌门种类分布及所占百分比见表 3。测得的 238 条序列归属于 6 个门 10 个纲, 分别为变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidia)、

蓝细菌门 (Cyanobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、梭杆菌门 (Fusobacteria) 及螺旋体门 (Spirochaetes)。变形菌门在 3 个文库中均为优势菌门, 占比高达 85%~95%, 其中又以 γ -变形菌纲占比最大。梭杆菌门和螺旋体门的细菌仅存在于亲贝血细胞样品中, 在浮游幼虫中未检测到该菌门的分布。

表 3 16S *rDNA* 文库中主要细菌门及数量百分比

| 16S <i>rDNA</i> libraries | | % | | |
|---------------------------|----------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 门 phylum | | 壳顶幼虫 I umbo larvae I | 壳顶幼虫 II umbo larvae II | 亲贝血细胞 clam hemocytes |
| 变形菌门 | Proteobacteria | 95.31 | 89.47 | 86.32 |
| 拟杆菌门 | Bacteroidetes | 1.56 | 10.53 | 4.27 |
| 蓝细菌门 | Cyanobacteria | 1.56 | 0 | 5.13 |
| 厚壁菌门 | Firmicutes | 1.56 | 0 | 0 |
| 梭杆菌门 | Fusobacteria | 0 | 0 | 1.71 |
| 螺旋体门 | Spirochaetes | 0 | 0 | 2.56 |

不同样品细菌群落组成在属水平上具有较大的差异。从属水平排名前 10 的微生物类型分布图中可以看出, 壳顶期中弧菌属占比超过 75%, 而血细胞中假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*) 占比最多, 约为 21.37%, 其次为弓形杆菌属 (*Malaciobacter*)、弧菌属 (*Vibrio*) 以及海单胞菌属 (*Marinomonas*), 分别占比 20.51%、15.38%、11.11%(图 1)。值得注意的是血细胞中弧菌属占比为 15%, 而发病的壳顶幼虫 I、II 样品弧菌属的比例高达 75%

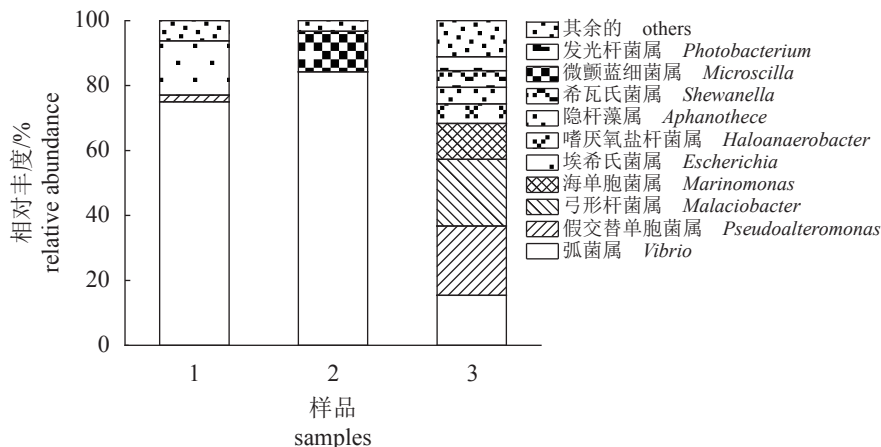


图 1 不同文蛤样品的 16S *rDNA* 克隆文库中微生物属水平的群落组成

1. 壳顶幼虫 I, 2. 壳顶幼虫 II, 3. 亲贝血细胞。

Fig. 1 Bacterial community composition at genus level in the 16S *rDNA* clone libraries of different *M. petechialis* samples

1. umbo larvae I, 2. umbo larvae II, 3. clam hemocytes.

和 84%, 提示弧菌属细菌是浮游期文蛤幼虫发病的潜在致病菌。

微生物类型种水平分析结果显示, 壳顶幼虫 I 和壳顶幼虫 II 的微生物群落组成种类和丰度具有较高的相似度(图 2)。地中海弧菌为发病的壳顶幼虫 I、壳顶幼虫 II 的优势菌种, 占比高达 75% 和 80%。据此我们推测地中海弧菌可能为浮游期幼虫发病的主要致病菌。

2.3 地中海弧菌的分离和初步鉴定

从发病的壳顶幼虫 II 匀浆组织中分离获得优势菌株 US2-01、US2-02, 其菌落在 TCBS 平板上为黄色, 菌落圆形扁平, 表面光滑湿润, 直径约为 900 μm , 不透明, 边缘整齐, 其中 US2-01 菌落形态如图 3 所示。16S *rDNA* 引物扩增和测序获得长度分别为 1 442 和 1 444 bp, 经比对与弧菌属细菌序列相似, 且与地中海弧菌菌株 20-1-15 (登录号: MT796340.1) 及菌株 117-T6 (登录号: CP033577.1) 的相似率都为 99%。系统发育分析显示, US2-01、US2-02 与地中海弧菌处于同一分支, 与其他几种弧菌相距较远, 初步判定分离的 2 株优势菌株属于地中海弧菌(图 4)。

2.4 地中海弧菌 US2-01 对文蛤浮游幼虫致病力分析

通过对文蛤幼虫的人工感染实验发现 US2-01 与 US2-02 两株地中海弧菌的毒力相近, 因此在本实验中仅展示了 US2-01 的结果。人工感染实

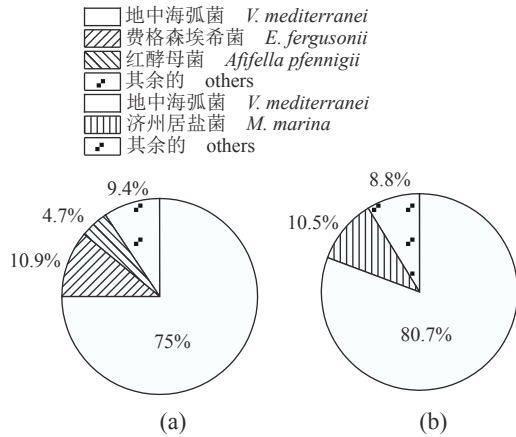


图2 壳顶幼虫 I (a) 和壳顶幼虫 II (b) 细菌种类和相对丰度分布

Fig. 2 Percentage of all kinds of bacteria in umbo larvae I (a) and umbo larvae II (b) in the library

实验发现 1.0×10^6 CFU/mL 高浓度组幼虫在攻毒后 24 h 即表现出运动能力下降, 大部分沉降到培养皿底部; 而 1.0×10^4 CFU/mL 低浓度组幼虫出现沉降的时间滞后, 攻毒后 36 h 才表现为部分幼虫

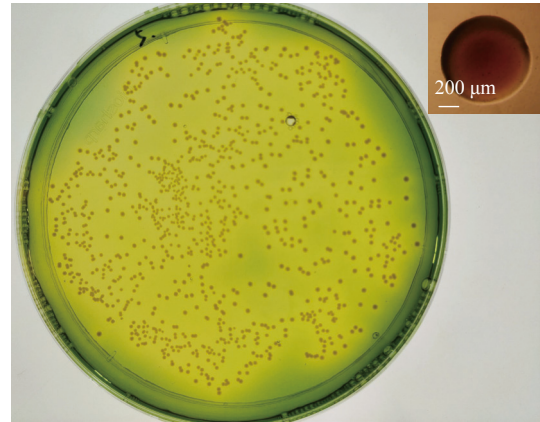


图3 地中海弧菌菌株 US2-01 在 TCBS 平板的菌落形态
Fig. 3 Colony morphology of strain US2-01 on TCBS plate

丧失运动能力。与攻毒组相比, 对照组幼虫在水中自由游动, 活力正常。运动能力丧失的感染组幼虫, 与正常浮游幼虫相比出现面盘纤毛脱落、面盘萎缩突出、部分组织解离、肠胃空等病症, 与自然患病文蛤病症基本一致(图版)。

浸泡感染实验显示, 在 30 °C 条件下 US2-01

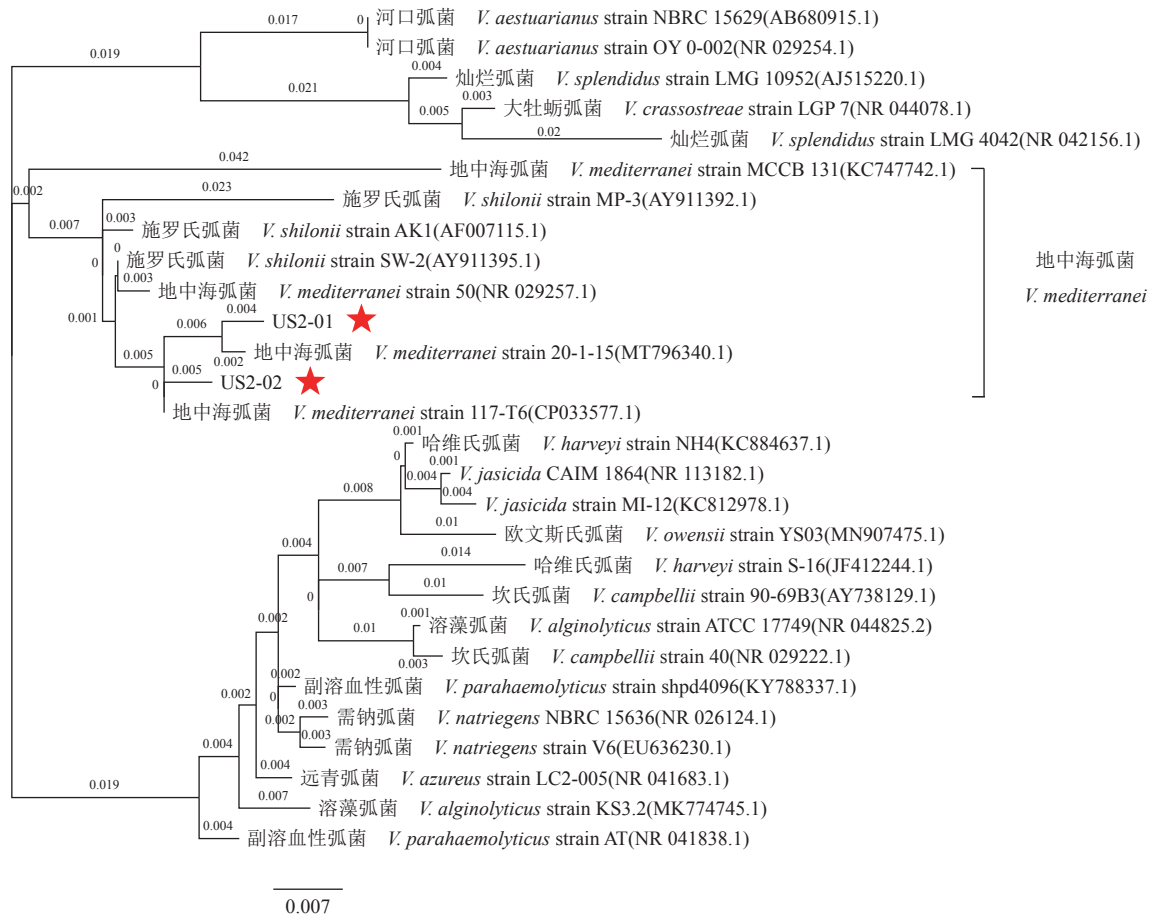
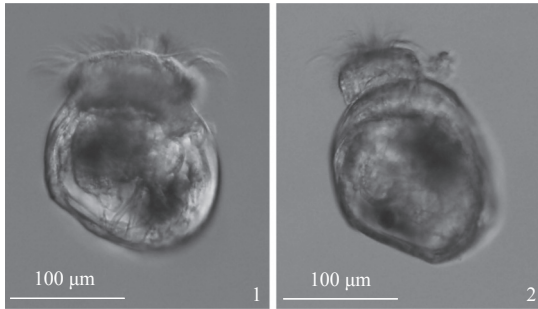


图4 基于 16S rDNA 构建优势菌株 US2-01、US2-02 的细菌系统发育树

Fig. 4 Bacterial phylogenetic tree of dominant strains US2-01, US2-02 based on 16S rDNA



图版 健康的文蛤幼虫 (1) 及发病的幼虫 (2)

Plate Healthy clam larvae(1) and infected clam larvae(2)

对文蛤幼虫的致病力呈现出剂量效应 (图 5)。1.0 × 10⁴ CFU/mL 低浓度下, 感染 96 h 文蛤幼虫累计死亡率为 58%; 1.0 × 10⁶ CFU/mL 高浓度下文蛤幼虫累计死亡率为 84%。对照组幼虫 96 h 死亡率约在 10%。从死亡动态曲线看两个浓度组在 36 h 之前只有零星的个体出现死亡, 在感染 48 h 后, 高浓度组累计死亡率达 25%, 而低浓度组则在感染 60 h 才达到相同的水平, 提示发病时间与弧菌浓度相关, 低浓度组在发病时间上有所延迟。

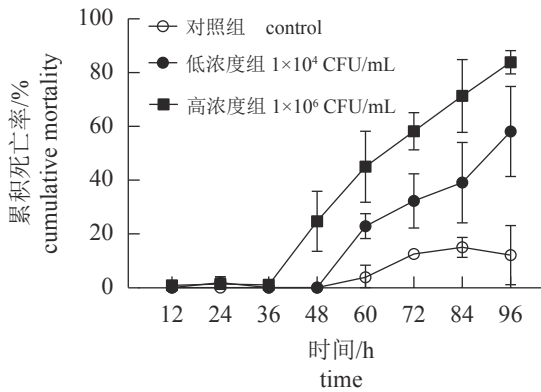


图 5 地中海弧菌感染在 96 h 内引起的文蛤幼虫累积死亡率

Fig. 5 Cumulative clam mortalities caused by immersion experimental infections with *V. mediterranei* for 96 hours

2.5 病原菌的药敏特征

2 株地中海弧菌的药敏特征相似, 故仅列出感染实验所用的地中海弧菌 US2-01 对 12 种常用抗菌素的药敏分析结果 (表 4)。在 12 种抗生素中, US2-01 弧菌对青霉素、氨苄西林、红霉素等抗生素具有一定的耐药性, 对四环素和多西环素呈现中度敏感, 对头孢他啶、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、氯霉素、诺氟沙星、环丙沙星等 7 种抗

表 4 药敏实验结果

Tab. 4 Drug sensitivity test results (n=3)

| 药物名称 drug name | 抑菌圈直径/mm IZD | 敏感性 sensitivity |
|---------------------|-----------------|-----------------------|
| 青霉素 penicillin | 7.00±0.04 | 耐药 drug resistance |
| 氨苄西林 ampicillin | 6.40±0.28 | 耐药 drug resistance |
| 红霉素 erythromycin | 8.01±0.21 | 耐药 drug resistance |
| 四环素 tetracycline | 19.02±0.78 | 中敏 moderate sensitive |
| 多西环素 doxycycline | 15.44±0.53 | 中敏 moderate sensitive |
| 头孢他啶 ceftazidime | 30.42±0.45 | 高敏 highly sensitive |
| 庆大霉素 gentamicin | 25.34±2.61 | 高敏 highly sensitive |
| 卡那霉素 kanamycin | 25.80±0.32 | 高敏 highly sensitive |
| 新霉素 neomycin | 24.44±1.08 | 高敏 highly sensitive |
| 诺氟沙星 norfloxacin | 37.92±1.08 | 高敏 highly sensitive |
| 环丙沙星 ciprofloxacin | 40.95±1.17 | 高敏 highly sensitive |
| 氯霉素 chloramphenicol | 30.37±0.58 | 高敏 highly sensitive |

生素呈现高度敏感。

3 讨论

本研究构建了文蛤浮游期壳顶幼虫发病样品的 16S *rDNA* 克隆文库, 发现发病幼虫样品微生物群落结构单一、多样性低, Shannon 指数在 0.77~0.99 之间, 远低于亲贝血细胞的 3.27。因为养殖场中本批次的文蛤幼虫全部发病, 因此无法获得与健康幼虫微生物群落结构特征进行比较的数据。基于目前样品, 实验发现指示壳顶幼虫 II 的各个多样性指数均低于壳顶幼虫 I, 与之相对应的是壳顶幼虫 II 的健康状态比壳顶幼虫 I 更差, 暗示随着幼虫健康状态的下降, 其微生物群落组成多样性出现降低。这一结果与文蛤成贝弧菌感染后微生物群落结构变化趋势相一致, 即感染后期濒死的文蛤出现了微生物群落多样性降低的趋势^[10]。壳顶幼虫 I、II 样品微生物群落组成分析显示地中海弧菌大量增殖的特征, 其在菌群中占比高达 75% 以上。实验进一步从发病的壳顶幼虫匀浆组织中分离获得的 2 株优势菌株均为地中海弧菌, 由此推测地中海弧菌为此次养殖场文蛤幼虫发病的主要致病菌。

地中海弧菌最早是 Pujalte 等^[11] 从西班牙巴伦西亚沿海地区的海水、浮游生物和沉积物等样本中发现报道的。Kushmaro 等^[12] 也发现施罗氏弧菌作为病原体能入侵珊瑚细胞内部感染共生虫黄藻, 从而导致珊瑚白化病发生。随后, 学者们通过对比施罗氏弧菌与地中海弧菌 16S *rDNA* 等分子序列

信息, 发现两者为同物异名^[13-14]。近年来的研究表明, 地中海弧菌是一种广泛分布的海洋细菌, 在大西洋和太平洋的海水和沉积物中均有分布, 而且地中海弧菌作为浮游生物、珊瑚、贝类和鱼类等的潜在病原体被广泛报道^[15-18], 但地中海弧菌作为文蛤浮游期幼虫的致病菌还是首次报道。

为进一步分析育苗过程中文蛤幼虫可能感染地中海弧菌的途径, 实验对亲贝的血细胞微生物群落构成进行了分析, 探究其生殖过程中病原垂直传播的可能性。研究选取血细胞作为靶组织是由于贝类循环系统为开管式循环, 血细胞可以散布到贝类不同的组织器官。水生无脊椎动物血细胞中栖居着一定数量的细菌, 贝类中如长牡蛎 (*Magallana gigas*)、偏顶蛤 (*Modiolus modiolus*) 血细胞中都有细菌存在的报道 ($1.4 \times 10^2 \sim 5.5 \times 10^2$ CFU/mL 血细胞)^[19]。实验在文蛤亲贝的血细胞中检测到了丰富的细菌类型, 分布在 7 个不同的门中, 其中变形菌门中的菌株数最多。本团队前期研究曾对文蛤鳃及肝胰腺组织内的细菌群落进行了分析, 同样发现变形菌门都是丰度最高的类群^[20]。本实验在亲贝血细胞中发现了一定比例的弧菌属细菌存在 (15%), 共包括 12 个种, 其中地中海弧菌占比不到 1%, 可见繁殖季节弧菌在亲贝体内或栖息地环境中是广泛分布的。因此, 幼虫中发现的弧菌存在着亲贝垂直传播和环境中的平行传播的可能。

以上结果均提示地中海弧菌是育苗场此次文蛤幼虫发病的致病菌。为了进一步确定其致病性, 本研究对文蛤幼虫开展了人工感染实验, 发现对照组幼虫 96 h 死亡率约在 10%, 这与贝类本身的繁殖策略为 *r* 对策 (*r*-strategy) 有关, 对照组幼虫存在一定程度的自然淘汰率。感染实验结果发现, 1.0×10^6 CFU/mL 菌液的浸泡感染能够引起文蛤浮游幼虫运动能力丧失和大规模死亡, 攻毒后 24 h 大部分浮游幼虫表现为丧失运动能力, 4 d 内累计死亡率为 84%。该结果表明地中海弧菌对文蛤幼虫具有很强的致病力, 其对贝类浮游幼虫的危害不亚于副溶血弧菌、创伤弧菌和灿烂弧菌等^[5, 21-22]。本研究分离的 US2-01 菌株对头孢他啶、庆大霉素、卡那霉素等 7 种抗菌药物敏感, 而对青霉素、氨苄西林、红霉素等 3 种抗菌药物耐药。

综上所述, 实验从发病的文蛤幼虫分离鉴定了地中海弧菌, 人工感染实验证明其对文蛤幼虫具有较强的致病性。药敏实验显示, 该菌对常见

的青霉素、氨苄及红霉素具有耐药性, 对其余的几种抗生素类药物敏感性仍较强。基于药敏实验结果, 在文蛤苗种繁育过程中选择有效和安全的药物进行防控, 是提高育苗成功率的途径之一。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Gómez-León J, Villamil L, Salger S A, *et al.* Survival of eastern oysters *Crassostrea virginica* from three lines following experimental challenge with bacterial pathogens[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2008, 79(2): 95-105.
- [2] 魏利平, 张榭令. 贝类幼虫面盘纤毛脱落病的起因及防治[J]. *海洋湖沼通报*, 1997(2): 64-69.
Wei L P, Zhang X L. On the cause and prevention of shellfish larva disease causing the falling off of face cilia[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1997(2): 64-69 (in Chinese).
- [3] 闫喜武. 菲律宾蛤仔养殖生物学、养殖技术与品种选育 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院 (海洋研究所), 2005.
Yan X W. The culture biology and technology and selective breeding in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*[D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, 2005 (in Chinese).
- [4] Dubert J, Aranda-Burgos J A, Ojea J, *et al.* Mortality event involving larvae of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* in a hatchery: isolation of the pathogen *Vibrio tubiashii* subsp. *europaensis* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2017, 40(9): 1185-1193.
- [5] Gómez-León J, Villamil L, Lemos M L, *et al.* Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 98-104.
- [6] Prado S, Dubert J, Barja J L. Characterization of pathogenic *Vibrios* isolated from bivalve hatcheries in Galicia, NW Atlantic coast of Spain. Description of *Vibrio tubiashii* subsp. *europaensis* subsp. nov[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2015, 38(1): 26-29.
- [7] Prado S, Romalde J L, Montes J, *et al.* Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster

- pathogen[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, 67(3): 209-215.
- [8] 王轶南, 王俊杰, 王姣姣, 等. 用16S *rDNA*克隆文库法分析患病刺参幼苗的菌群结构[J]. *大连海洋大学学报*, 2014, 29(3): 205-211.
- Wang Y N, Wang J J, Wang J J, *et al.* Flora of diseased juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* by 16S *rDNA* cloning library[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2014, 29(3): 205-211 (in Chinese).
- [9] Good I J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters[J]. *Biometrika*, 1953, 40(3-4): 237-264.
- [10] Wang H X, Yue X, Yu J J, *et al.* Microbial community changes in the digestive tract of the clam *Meretrix petechialis* in response to *Vibrio parahaemolyticus* challenge[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2021, 39(1): 329-339.
- [11] Pujalte M J, Garay E. Proposal of *Vibrio mediterranei* sp. nov. : a new marine member of the genus *Vibrio*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1986, 36(2): 278-281.
- [12] Kushmaro A, Banin E, Loya Y, *et al.* *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(4): 1383-1388.
- [13] Tarazona E, Lucena T, Arahal D R, *et al.* Multilocus sequence analysis of putative *Vibrio mediterranei* strains and description of *Vibrio thalassae* sp. nov.[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2014, 37(5): 320-328.
- [14] Thompson F L, Hoste B, Thompson C C, *et al.* The coral bleaching *Vibrio shiloi* Kushmaro *et al.* 2001 is a later synonym of *Vibrio mediterranei* pujalte and garay 1986[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001, 24(4): 516-519.
- [15] Torres M, Reina J C, Fuentes-Monteverde J C, *et al.* AHL-lactonase expression in three marine emerging pathogenic *Vibrio* spp. reduces virulence and mortality in brine shrimp (*Artemia salina*) and Manila clam (*Venerupis philippinarum*)[J]. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0195176.
- [16] Andree K B, Carrasco N, Carella F, *et al.* *Vibrio mediterranei*, a potential emerging pathogen of marine fauna: investigation of pathogenicity using a bacterial challenge in *Pinna nobilis* and development of a species-specific PCR[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 130(2): 617-631.
- [17] Rubio-Portillo E, Yarza P, Peñalver C, *et al.* New insights into *Oculina patagonica* coral diseases and their associated *Vibrio* spp. communities[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(9): 1794-1807.
- [18] Serrano W, Tarazona U I, Olaechea R M, *et al.* Draft genome sequence of a new *Vibrio* strain with the potential to produce bacteriocin-like inhibitory substances, isolated from the gut microflora of scallop (*Argopecten purpuratus*)[J]. *Genome Announcements*, 2018, 6(20): e00419-18.
- [19] Olafsen J A, Mikkelsen H V, Gjaever H M, *et al.* Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(6): 1848-1854.
- [20] 刘凯旋. 文蛤体内细菌的分离鉴定和群落结构分析[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2020.
- Liu K X. Isolation, identification and community structure analysis of bacteria in the clam *Meretrix petechialis*[D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, 2020 (in Chinese).
- [21] Xie Y H, Yao X T, Su Y C, *et al.* The contamination of *Vibrio* spp. of seashell products in 5 cities of Guangxi in 2017[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2020, 32(3): 271-275.
- [22] Yue X, Liu B Z, Xiang J H, *et al.* Identification and characterization of the pathogenic effect of a *Vibrio parahaemolyticus*-related bacterium isolated from clam *Meretrix meretrix* with mass mortality[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 103(2): 109-115.

Analysis of bacterial community and identification of pathogenic bacteria in the diseased clam larvae of *Meretrix petechialis*

SUI Weijin^{1,2}, WANG Hongxia¹, LIU Baozhong^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology,
Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The clam *Meretrix petechialis* is an important commercial bivalve mollusk widely distributed in China, Japan and Korea. The development of clam culture depends on the plenty of seed supply. However, mass mortalities of *M. petechialis* larvae often occur during hatchery rearing. Outbreak of disease is the main bottleneck for successful spat production. So, the characterization of pathogenic bacterial strains causing epizootics in larval culture is essential for developing efficient management strategies to prevent and control disease outbreaks in clam hatchery. In present study, the moribund umbo larvae of clam sampled from hatchery were analyzed by constructing bacterial 16S *rDNA* clone library. The results showed that the bacterial community diversity of moribund larvae was low, and the *Vibrio mediterranei* clones accounted for more than 75% in the library, indicating they may be the causative bacteria of clam larvae mortality. Furthermore, the dominant strain was isolated from the moribund larvae, and identified as *V. mediterranei* by 16S *rDNA* sequencing and phylogenetic analysis. The virulence of the obtained strain US2-01 was determined by artificial infection test, a dose effect was observed for the pathogenicity of US2-01 on clam larvae. The onset time of US2-01 infection was related to its concentration, and the onset time was delayed in the low concentration group (1.0×10^4 CFU/mL). The cumulative mortality rate of infected clam larvae was 84% when they were immersed in final concentration 1.0×10^6 CFU/mL US2-01 for 96 hours. The clinical signs were observed during the artificial infection experiment, the treated larvae gradually lost their swim ability, showing symptoms such as the shedding of veliger cilia, partial tissue dissociation, and the empty stomach, which were consistent with the symptoms of the naturally diseased larvae in hatchery. Finally, the drug sensitivity test was performed and the results showed that *V. mediterranei* strain US2-01 was resistant to commonly used antibiotics such as penicillin, ampicillin and erythromycin, moderately sensitive to tetracycline and doxycycline, and highly sensitive to the other seven antibiotics such as ceftazidime, gentamicin and kanamycin. Taken together, this is the first report that *V. mediterranei* is the potential pathogen of *M. petechialis* larvae in hatchery. The results could provide a scientific basis for the disease research and control for larvae breeding in the clam hatchery.

Key words: *Meretrix petechialis* larvae; *Vibrio mediterranei*; 16S *rDNA* clone library; drug sensitivity test

Corresponding author: LIU Baozhong. E-mail: bzliu@qdio.ac.cn

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-49); Key Research and Development Program of Shandong (2021LZGC029)