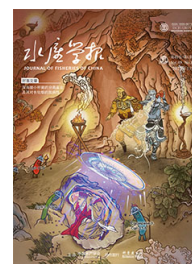


DOI: 10.11964/jfc.20240514519

深海微小杆菌的分离鉴定及其对长牡蛎的致病性



姜军, 孙洁洁*, 杨文文, 高磊, 冷金源, 王玲玲, 宋林生
大连海洋大学, 辽宁省海洋动物免疫学与疫病防控重点实验室, 辽宁 大连 116023;

第一作者: 姜军, 从事海洋生物学研究, E-mail: 571987448@qq.com



通信作者: 孙洁洁, 从事贝类免疫学与疾病防控研究, E-mail: sunjiejie@dlou.edu.cn



摘要:

【目的】从患有脓包病的长牡蛎中分离并鉴定致病菌, 系统分析其形态特征、生理生化特征及致病机制, 为长牡蛎脓包病的防治提供科学依据。

【方法】从辽宁省大连市庄河某养殖区采集了患有脓包病的长牡蛎, 利用 16S *rDNA* 测序及生物信息学技术鉴定出一株深海微小杆菌, 并对其进行药敏实验和溶血实验, 进一步结合人工感染实验、高通量测序和实时荧光定量 PCR 技术分析感染后长牡蛎鳃组织中炎症相关基因表达及细菌群落结构变化情况。

【结果】分离菌株在 2216 E 琼脂培养基中形成直径为 1.0~1.5 mm 的乳黄色菌落, 形态均一稳定; 对头孢哌酮、青霉素和阿莫西林等抗生素高度敏感; 在 28 °C 条件下表现出显著的 β 溶血活性。人工感染实验显示, 深海微小杆菌感染导致长牡蛎外套膜出现脓包, 鳃表面出现白色斑点, 同时伴有肿胀, 感染后长牡蛎鳃组织中 *Cgtr3*、*Cgap-1*、*Cgcaspase-3*、*Cgil-17-5* 和 *Cgil-17-6* 基因的 mRNA 表达水平显著升高。高通量测序分析显示, 感染后长牡蛎鳃组织中变形菌门和弯曲杆菌门的相对丰度增加, 弧菌科的相对丰度升高。

【结论】深海微小杆菌促进鳃组织炎症相关基因的表达, 同时提高了鳃组织中弧菌的丰度导致长牡蛎发病, 是诱发长牡蛎脓包病的潜在病原之一。研究结果为贝类病害的预防和控制提供了一定的数据支撑。

关键词:长牡蛎; 脓包病; 深海微小杆菌; 16S *rDNA* 测序; 转录组测序

资助项目: 国家自然科学基金 (32222086, 32173002); 国家贝类产业技术体系 (CARS-49); 兴辽英才计划 (XLYC2203087); 大连市优秀青年科技人才项目 (2022RY01)

收稿日期: 2024-05-15
修回日期: 2024-07-17

文章编号:
1000-0615(2025)01-019416-14
中图分类号: S 944.4¹
文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)

海水养殖贝类具有重要的经济和生态价值^[1]。细菌性疾病常导致养殖贝类出现大规模死亡, 给贝类养殖业造成了重大经济损失, 严重威胁着贝类养殖业的健康发展^[2]。已有报道显示, 弧菌病是世界各地养殖贝类的主要流行病, 导致沿海国家养殖贝类的大量死亡^[3-5]。例如, 灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*)^[6]、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)^[7] 和河口弧菌 (*V. aestuarianus*)^[8] 能诱发长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、美洲牡蛎 (*C. virginica*) 和欧洲扁牡蛎 (*Ostrea edulis*) 等消化器官萎缩代谢功能紊乱, 进而导致贝类死亡。坎氏弧菌 (*V. campbellii*)^[9] 和副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)^[10] 等也是引起贝类细菌性疾病的重要病原菌。近



年来, 养殖贝类受到弧菌感染的案例时有发生, 江苏省养殖的文蛤 (*Meretric meretrix*) 在感染副溶血弧菌后出现大规模死亡^[11], 山东某养殖基地的菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 因感染副溶血弧菌而大量死亡^[12]; 2016年, 在韩国沿海地区的牡蛎体内检测到具有致病性的溶藻弧菌^[13]。

已有报道显示, 细菌也能导致一些养殖贝类出现脓包病。例如, 中国沿海地区曾多次暴发扇贝脓包病^[14]。脓包病是导致养殖扇贝高死亡率的最直接诱因之一^[15-16]。脓包病的主要症状是扇贝闭壳肌上出现脓包和病变, 经鉴定发现, 引发该病的主要病原有灿烂弧菌、查格斯氏弧菌 (*V. chagasii*) 和新喀里多尼亚弧菌 (*V. neocaledonicus*)^[14-16]。研究表明, 新喀里多尼亚弧菌感染扇贝后, 可以导致扇贝超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 的活性升高并促进血淋巴细胞凋亡, 最终导致扇贝组织损伤, 引发脓包病^[16]。

我国贝类养殖产业在水产养殖业中占据重要地位, 其中牡蛎养殖产业是其主要的构成部分。据统计, 我国牡蛎养殖面积和养殖产量均居世界首位^[17-18]。由于牡蛎集约化养殖的加剧和养殖环境的污染, 细菌性疾病已对牡蛎的养殖生产造成严重危害^[19-21]。然而目前还没有关于长牡蛎脓包病的报道。本研究从辽宁省庄河某养殖区采集了一批患有脓包病的长牡蛎, 对从病灶部位分离到的细菌进行培养和筛选, 以深海微小杆菌 (*Exiguobacterium profundum*) 为研究对象, 分析该菌株的生理生化特征、观察由该菌株引起的长牡蛎组织病理变化, 并初步确定其致病机制, 以期为长牡蛎脓包病的流行病学研究和药物防控提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

从中国大连庄河牡蛎养殖区采集患病长牡蛎样本, 贝龄为 2~3 龄, 体重 90~110 g, 壳长 50~60 mm。对照组健康长牡蛎样本采自同一养殖区, 贝龄、体重及壳长与患病样本一致。实验用长牡蛎在 9 °C 水温条件下暂养 7 d, 随后升温至 16 °C 用于回归感染实验。

1.2 实验方法

致病菌的分离及鉴定 将患病长牡蛎样

本使用无菌海水反复冲洗, 取其病灶部位, 研磨后接种于 2216 E 琼脂培养基, 16 °C 条件下培养 24 h。根据菌落的形态和大小, 挑取单一优势菌落, 反复纯化培养, 直至获得单一菌株。将纯化后的单菌落接种于 2216 E 液体培养基中, 16 °C 摇床培养 24 h。培养的菌液与 30% 甘油按 1 : 1 比例 (体积比) 混合, -80 °C 保存备用。挑取纯化后的单菌落, 接种于含有 3 mL 2216 E 液体培养基的离心管中, 16 °C 摇床培养 12 h。取 1 mL 活化菌液, 以 8 000 × g 离心 5 min, 弃上清液, 用去离子水洗涤并重悬 1 次。再以相同条件离心, 加入 500 μL 去离子水重悬, 于 100 °C 金属浴加热处理, 冰上冷却 2 min, 3 000 × g 离心 3 min, 提取细菌粗 DNA。使用通用细菌引物扩增 16S *rDNA* 序列, 正向引物为 27 F, 反向引物为 1492 R。PCR 总反应体系为 50 μL, 包括 2 μL 细菌 DNA, 25 μL PCR Mastermix, 每条引物 1 μL, ddH₂O 21 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 54 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 °C 延伸 5 min。引物合成及 PCR 扩增产物测序由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成, 并在 EZBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) 进行序列比对, 在 EZBioCloud 数据库下载相应序列, 用 IQtree2 软件构建系统发育树, 通过 Bootstrap 法 (1 000 次重复) 检验。生化鉴定严格按照试剂盒中说明书要求操作。实验过程中操作人员严格遵守动物伦理规范, 并按照相关规章制度执行。

菌株的药敏实验 选择 19 种不同的抗生素, 采用 Kirby-Bauer 药敏纸片扩散法评估病原菌对抗生素的敏感性。将 100 μL 菌液均匀涂布于 Mueller-Hinton 固体培养基表面, 为每种抗生素设置 3 组平行实验, 静置 10 min 后将药敏纸片平铺于培养基表面。在 28 °C 恒温培养箱中倒置培养 24 h, 观察并测量抑菌圈直径 (mm)。取 3 组实验的平均值作为最终数据, 根据抑菌圈直径判断病原菌对抗生素的敏感性。药敏纸片由微生物试剂 (杭州) 有限公司提供。

菌株的溶血实验 将配制好的 Luria-Bertani 固体培养基在高温下灭菌, 稍微冷却后加入 5% 脱纤维羊血, 均匀混合制成血琼脂培养基。取 50 μL 菌液, 垂直滴于血琼脂培养基中央, 静置 10 min 后, 分别在 16、28 和 37 °C 恒温培养箱中倒置培养。观察是否形成溶血环

并测量溶血环直径。

菌株的人工感染实验 将分离纯化的深海微小杆菌菌株接种到 2216E 液体培养基中, 16 °C 培养 24 h, 以 $3\ 000 \times g$ 离心 5 min, 弃去上清液, 重新悬浮于无菌海水中并重复离心 3 次以除去上清液, 再加入无菌海水稀释。测量 OD₆₀₀, 调整细菌悬液浓度至 1×10^9 CFU/mL。将菌液用 50 L 无菌海水稀释至 1×10^6 CFU/mL, 用于对 50 只长牡蛎的浸泡感染实验。将长牡蛎随机分为 2 组 (回归感染组和无菌海水对照组, 每组 25 只), 浸泡感染 7 d。实验期间每天定时换水、投喂, 记录长牡蛎的死亡数量, 并及时捞出死亡个体进行解剖分析。

回归感染后的组织病理切片 取回归感染后患病长牡蛎和对照组健康长牡蛎的鳃组织及外套膜组织, 用 Bouin 氏液固定 24 h, 继而用梯度浓度的乙醇溶液 (30%、50%、70%、80%、95%、100%) 逐步脱水, 利用二甲苯处理使之变得透明, 进而使用石蜡对样本实施包埋, 使用切片机把样品切成厚度约 5 μm 的切片, 采用苏木精-伊红染色法 (H.E) 进行染色。最后通过光学显微镜检视, 对组织的病变进行病理切片分析。

回归感染后的转录组学测序分析 取回归感染后患病长牡蛎和对照组健康长牡蛎的鳃组织样本, 每组取 3 只长牡蛎的鳃组织混合在一起作为 1 个样品, 每个样品设置 3 个生物学重复。此样品数量和重复设置基于统计学要求, 确保数据的可靠性和生物学意义。RNA 提取严格按照 TRIzol 法操作规范进行, 提取的总 RNA 样品经诺禾致源科技 (北京) 公司采用二代 Illumina 技术进行高通量测序。测序所得数据经过严格的质量控制和序列组装处理, 确保数据的准确性和完整性。随后进行富集分析, 筛选出与炎症相关的关键基因。

实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测 为了验证转录组数据的准确性, 使用 Quant Studio 6 实时荧光定量 PCR 仪进行 qPCR, 对通过转录组学测序分析得到的 5 个炎症相关的基因 (*Cgil-17-5*、*Cgil-17-6*、*Cgtr3*、*Cgcaspase-3* 和 *Cgap-1*) 进行 qPCR 验证。用于 qPCR 扩增的引物见表 1, 以 *Cgef* 作为内参基因。qPCR 反应体系 (10 μL): 2 \times SYBR Green Master Mix 5 μL , ROX Reference Dye (50 \times) 0.2 μL , RT-F 0.2 μL , RT-R 0.2 μL , 20 倍稀释的 cDNA 模板 2 μL , DEPC 水

2.4 μL 。反应程序: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 45 s, 共进行 40 个循环。来自 3 只长牡蛎的鳃组织混合在一起作为 1 个样品, 每个样品有 3 个生物学重复。输出的 C_t 值通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析, 并通过 IBM SPSS statistics 20 软件进行显著性差异分析。显著性水平设为 0.05。

表 1 实验用引物

Tab. 1 The sequences of primers used in this study

引物 primer	序列(5'-3') sequence
27F	AGAGTTTGATCCTAGAGTTTGATCCTGG CTCAG
1492R	GGTTACCTTGTACGACTT
<i>Cgef</i> -RT-F	AGTCACCAAGGCTGCACAGAAAG
<i>Cgef</i> -RT-R	TCCGACGTATTTCTTTGCGATGT
<i>Cgil17-5</i> -RT-F	CCACCATCATGGTAGAGGACA
<i>Cgil17-5</i> -RT-F	CGTCACCTCCACGAGTTCACA
<i>Cgil17-6</i> -RT-F	CTCCATTTGTCCGACCTACCG
<i>Cgil17-6</i> -RT-R	CCCAGAGTACTGTCCAACACC
<i>Cgtr-3</i> -RT-F	CTCGGTAATCTCAGTTCCCTT
<i>Cgtr-3</i> -RT-R	TTCGTCAAATCGGTAATCCAGT
<i>Cgcaspase-3</i> -RT-F	TCCGTTGCTGAAAACCGTGT
<i>Cgcaspase-3</i> -RT-R	CTTATCAGTCTGTCCGCCAGT
<i>Cgap-1</i> -RT-F	TTTACTTGTCTCCGCCGACT
<i>Cgap-1</i> -RT-R	GGTGACCATTCCGTTTGCTT

回归感染后的 16S rRNA 测序 取回归感染后患病长牡蛎和对照组健康长牡蛎的鳃组织样本, 每组取 3 只长牡蛎的鳃组织混合为 1 个样品, 每个样品设置 3 个生物学重复。使用 TRIzol 法提取长牡蛎鳃组织总 RNA, 并严格按照操作指南进行。样品经诺禾致源科技 (北京) 公司采用二代 Illumina 技术进行测序。利用 Illumina 公司的 TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit 进行文库构建^[22], 构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测合格后, 使用 NovaSeq 6000 进行高通量测序, 测序由诺禾致源科技 (北京) 公司完成。利用 Barcode 序列和 PCR 扩增对扩增子进行标记, 实现测序结果中不同样本的识别, 并移除原始数据 (Raw Data) 中读序 (reads) 两端的引物序列, 得到的高质量数据 (Clean Data) 使用 FLASH 进行拼接, 生成 Tags 数据^[23]。对 Tags 数据进行额外筛选, 生成高质量 Tags 数据 (Clean Tags)^[24]。参照 Qiime 的 Tags 控制方法, 淘汰优质碱基串长度

未达到总长度 75% 的标签^[25]。随后将得到的标签序列与已知的物种注释数据库进行比对, 以确保获得的有效标签数据 (Effective Tags)^[26]。在通过 Effective Tags 获取必要信息之后, 采取 Uparse 软件^[27] 进行聚类分析, 将相似度不低于 97% 的标签集中以聚类成为操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU)。借助 Mothur 方法与 SILVA132^[28] 的 SSUrRNA 数据库^[29] 对 OTUs 序列进行施行物种层面的归纳定位 (定阈值为 0.8~1.0), 梳理分类学信息, 并根据生物分类的各级体系, 即从界至种的层次, 对各个样品中的生物群落成分进行编录和概算。使用 MUSCLE^[29] 软件进行有效率的多序列综合对比, 以此建立所有 OTU 代表序列的进化关系图谱。根据所有样本在目标层次上的物种注释和数据, 从众多属中筛出丰度排名前 35 的物种。采用 Chao1、Simpson、Shannon^[30] 等系列统计学分析指数评估样本中微生物群落的物种丰富度和多样性。

1.3 数据分析

所有数据均以平均值±标准差 (mean±SD) 表示, 采用单因素方差分析和多元比较分析, 采用 SPSS 20 软件进行分析。P<0.05 视为显著差异, P<0.01 视为极显著差异。

2 结果

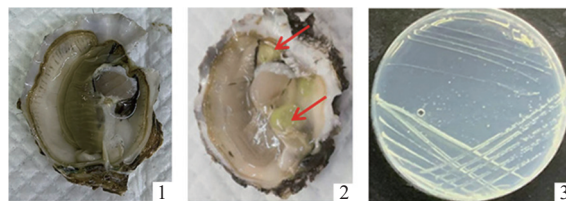
2.1 病原菌的分离鉴定

在本研究中, 正常长牡蛎闭壳肌收缩正常, 外套膜完整 (图版 I -1)。用于细菌分离的患病长牡蛎闭壳肌收缩无力、外套膜上有绿色脓包 (图版 I -2)。分离得到的深海微小杆菌在 2216E 琼脂培养基上形成直径为 1.0~1.5 mm 的乳黄色菌落, 形态均一稳定 (图版 I -3)。

深海微小杆菌对氧化酶和硫化氢的鉴定结果为阴性, 对过氧化氢酶、蔗糖及硝酸盐等的鉴定结果为阳性 (表 2)。经多序列比对, 该菌株与深海微小杆菌 (OY760436.1) 的序列具有高度同源性, 相似性超过 99%, 且该菌株与深海微小杆菌在同一分支上聚类 (图 1)。

2.2 菌株药敏实验

采用 19 种常用抗生素进行药敏实验, 判断标准: 抑菌圈直径 (d) ≤ 12 mm 为低敏感或不



图版 I 健康及发病长牡蛎症状和深海微小杆菌菌落
1. 正常长牡蛎, 2. 患病长牡蛎, 3. 深海微小杆菌菌落; 箭头表示病灶位置。

Plate I Symptoms of healthy and diseased *C. gigas* and morphology of colony of *E. profundum*

1. normal *C. gigas*, 2. diseased *C. gigas*, 3. the colonies of *E. profundum*; arrows indicate the location of the lesion.

表 2 深海微小杆菌生化鉴定结果

Tab. 2 The biochemical identification results of *E. profundum*

生化管种类 types of biochemical tubes	鉴定结果 identification results
氧化酶	-
过氧化氢酶	+
硫化氢	-
蔗糖发酵	+
硝酸盐还原	+
3% NaCl 生长	+
6% NaCl 生长	+
8% NaCl 生长	+
10% NaCl 生长	+

注: “+”表示阳性; “-”表示阴性。

Notes: “+” means positive; “-” indicates negative.

敏感, 13 mm < d ≤ 17 mm 为中度敏感, d > 18 mm 为高度敏感。结果显示, 深海微小杆菌对氯霉素、磺胺甲恶唑、红霉素和阿奇霉素不敏感, 对头孢哌酮、青霉素、阿莫西林、维布霉素、复方新诺明、恩诺沙星、氟苯尼考、头孢噻肟、诺氟沙星、阿奇霉素、利福平、卡那霉素和新霉素敏感 (表 3)。

2.3 菌株溶血观察

深海微小杆菌分别于 16、28 和 37 °C 下培养 72 h 后, 血琼脂培养基上呈现溶血现象。其中 28 °C 培养条件下的溶血现象最为明显。菌液在血琼脂培养基上形成 1~2 mm 的完全透明溶血环, 为 β 溶血型, 也称为完全溶血 (图版 II)。

2.4 回归感染实验

回归感染实验中, 无菌海水对照组未出现死亡个体, 实验组出现死亡。对濒死长牡蛎鳃

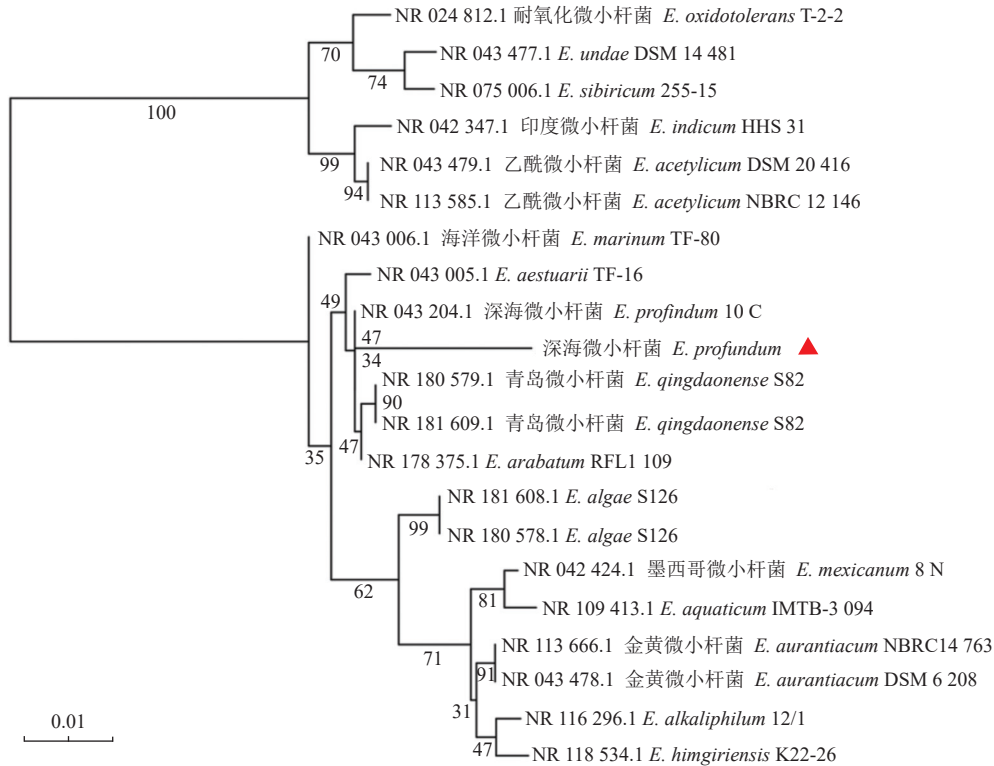


图 1 深海微小杆菌与相近菌株的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of strain *E. profundum* and other related strain

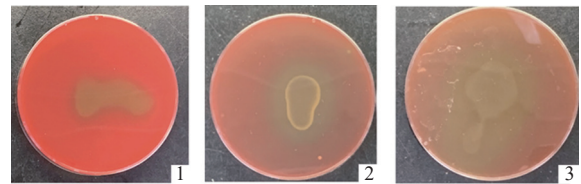
表 3 深海微小杆菌菌株药物敏感性

Tab. 3 Drug sensitivity of *E. profundum* strain

抗菌药物 antibiotics	抑菌圈直径/mm inhibition zone diameter	敏感性 sensitivity
头孢哌酮 cefoperazone	36.71	S
青霉素 penicillin	35.54	S
阿莫西林 amoxicillin	33.49	S
强力霉素 vibramycin	32.91	S
复方新诺明 SXT	32.39	S
恩诺沙星 enrofloxacin	30.38	S
氟苯尼考 florfenicol	27.55	S
头孢噻肟 cefotaxime	27.52	S
诺氟沙星 norfloxacin	27.16	S
四环素 achromycin	27.13	S
利福平 rifampin	24.42	S
卡那霉素 kanamycin	22.88	S
新霉素 neomycin	21.22	S
链霉素 streptomycin	13.65	I
罗红霉素 roxithromycin	13.63	I
氯霉素 chloramphenicol	10.26	R
磺胺异恶唑 sulfamethoxazole	10.25	R
红霉素 erythromycin	10.11	R
阿奇霉素 azithromycin	0	R

注: R. 低敏感或不敏感, I. 中度敏感, S. 高度敏感; 上述数据为3组实验平均值。

Notes: R. resistant, I. weak sensitive, S. sensitive; the value are the mean ± SD (n=3).



图版 II 深海微小杆菌在不同温度下的溶血现象

1、2、3 分别为 16、28 和 37 °C 下的溶血环。

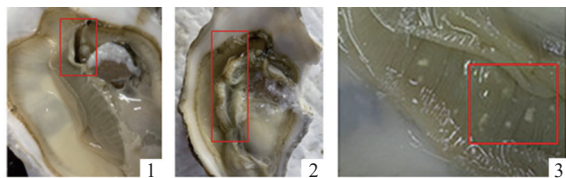
Plate II Haemolysis of *E. profundum* at different temperatures

1, 2, 3 were the hemolysis results at 16, 28 and 37 °C, respectively.

进行细菌的分离纯化, 从感染长牡蛎中均分离得到深海微小杆菌。深海微小杆菌感染后, 长牡蛎外套膜上出现脓包, 鳃表面出现白色斑点并伴有肿胀 (图版 III)。

2.5 组织病理学特征

组织病理学观察发现, 患病长牡蛎的外套膜和鳃组织发生了显著病变。对照组外套膜组织结构正常 (图版 IV-1), 而患病长牡蛎外套膜肌纤维坏死和结缔组织断裂且溶解稀疏 (图版 IV-2); 对照组鳃组织结构正常 (图版 IV-3), 而患病组鳃丝肿胀、排列紊乱 (图版 IV-4), 且有一定

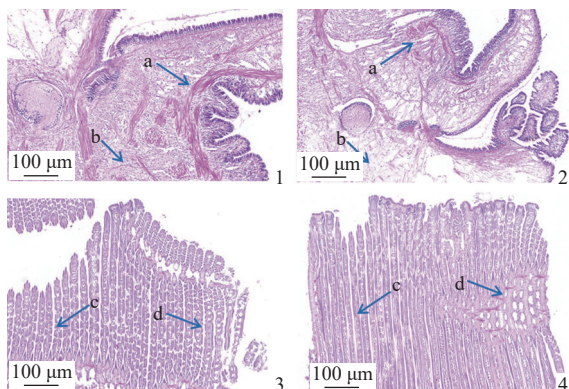


图版 III 人工感染长牡蛎解剖图

红色方框内为病灶部位。

Plate III Appearance of *C. gigas* after artificial infection

The site of the lesion is shown in the red box.



图版 IV 用苏木精-伊红染色的正常与患病长牡蛎的组织切片

1. 正常长牡蛎外套膜组织切片, 2. 患病长牡蛎外套膜组织切片, 3. 正常长牡蛎鳃组织切片, 4. 患病长牡蛎鳃组织切片; a. 肌纤维, b. 结缔组织; c、d. 鳃丝。

Plate IV Histological sections of the normal and diseased tissues of *C. gigas* stained with hematoxylin-eosin

1. normal mantle tissues of *C. gigas*, 2. diseased mantle tissues of *C. gigas*, 3. normal gill tissues of *C. gigas*, 4. diseased gill tissues of *C. gigas*; a. muscular tissue, b. connective tissue, c, d. gill filaments.

程度的溶解现象 (图版 IV -4)。

2.6 炎症相关基因的层次聚类分析及差异表达

通过富集分析, 发现 5 种炎症相关基因 (*Cgap-1*、*Cgtr3*、*Cgcaspase-3*、*Cgil-17-5*、*Cgil-17-6*) 在与免疫过程相关的基因集中富集, 且在深海微小杆菌感染后, 长牡蛎鳃组织中上述 5 种炎症相关基因的表达量呈上调趋势 (图 2)。

为进一步验证分级聚类分析的可信度, 以 *Cgef* 为内标对照, 通过 qPCR 技术检测深海微小杆菌感染后长牡蛎鳃组织 *Cgap-1*、*Cgtr3*、*Cgcaspase-3*、*Cgil-17-5* 和 *Cgil-17-6* 的 mRNA 表达量。结果显示, 深海微小杆菌感染后, 其 mRNA 表达量均显著升高。*Cgap-1* 的表达量是对照组的 3.47 倍 ($P < 0.001$); *Cgtr3* 的表达量是对照组的 2.46 倍 ($P < 0.05$); *Cgcaspase-3*

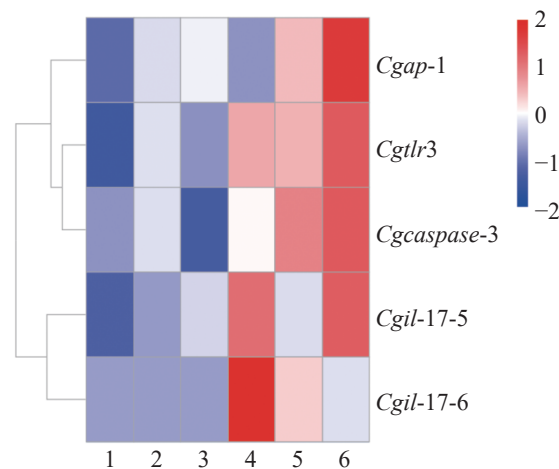


图 2 与炎症相关的 5 个基因的层次聚类分析和差异表达

1. 空白 1, 2. 空白 2, 3. 空白 3, 4. 深海微小杆菌 1, 5. 深海微小杆菌 2, 6. 深海微小杆菌 3; 从蓝色到红色的颜色强度表示差异表达的程度。

Fig. 2 Hierarchical clustering analysis and differential expression of 5 DTs related to inflammation

1. Blank 1, 2. Blank 2, 3. Blank 3, 4. *E. profundum* 1, 5. *E. profundum* 2, 6. *E. profundum* 3; the intensity of the color from blue to red indicates the magnitude of differential expression.

的表达量是对照组的 2.39 倍 ($P < 0.01$); *Cgil-17-5* 的表达量是对照组的 1.40 倍 ($P < 0.05$); *Cgil-17-6* 的表达量是对照组的 1.85 倍 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.7 高通量测序技术研究深海微小杆菌感染后长牡蛎鳃组织微生物群落分析与结构变化

将对照组和深海微小杆菌处理组的有效数据进行 OTU 聚类分析, 对照组和深海微小杆菌处理组长牡蛎鳃组织样本共同拥有的 OTUs 达 1421 个, 分别占对照组和深海微小杆菌处理组长牡蛎鳃组织样本 OTU 总个数的 63.35% 和 54.07%。

根据得到的所有 OTU 系统进化关系, 选取相对丰度排名前 15 位的门类所对应的数据, 并结合置信度信息构建门水平的系统发育树, 该菌所对应的门通过分支和颜色来表示, 不同样本中该菌属的丰度则由外侧的柱形图表示 (图 4)。系统进化树和柱形图分析结果显示, 经深海微小杆菌处理的长牡蛎鳃组织的微生物群落中, 变形菌门 (Proteobacteria) 中各菌属的丰度高于对照组鳃组织。

随着序列检测的次数增多, 稀释曲线渐趋

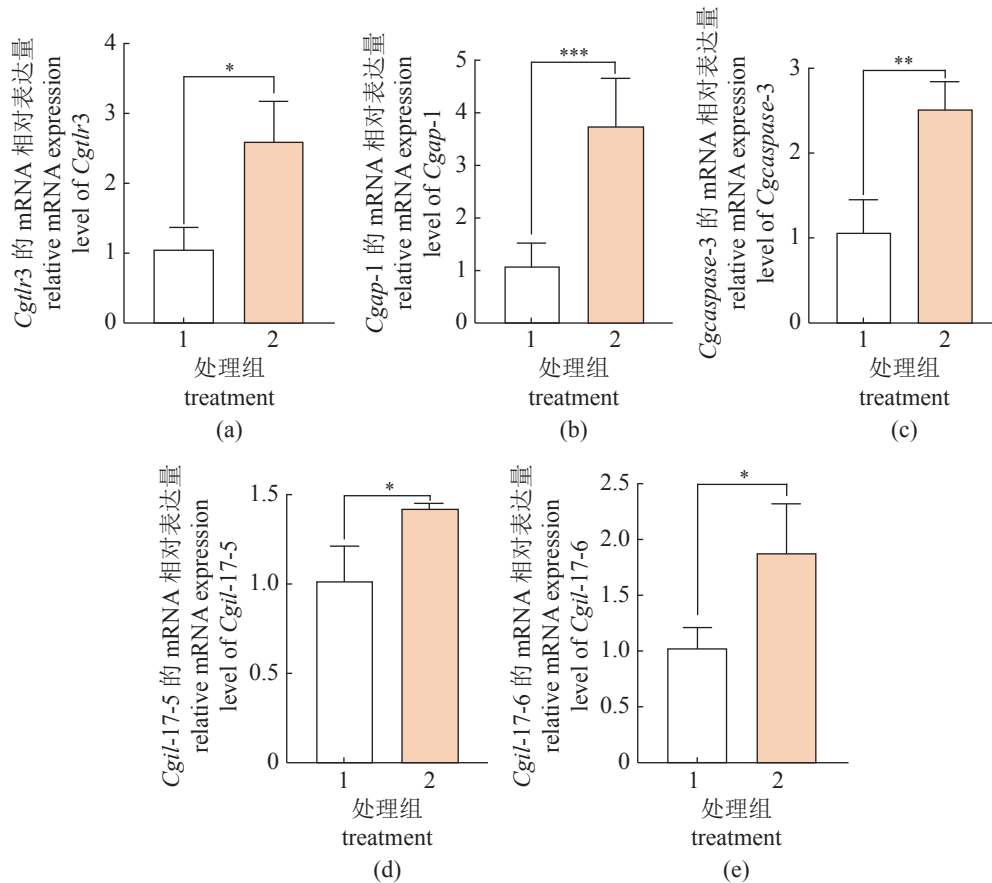


图3 深海微小杆菌感染后鳃中 *Cgthr3* (a)、*Cgap-1* (b)、*Cgcaspase-3* (c)、*Cgil-17-5* (d) 和 *Cgil-17-6* (e) 的 mRNA 表达。1. 对照组, 2. 深海微小杆菌处理组; “*”表示差异显著 ($P<0.05$), “***”表示差异极显著 ($P<0.01$), “****”表示差异极其显著 ($P<0.001$)。

Fig. 3 The mRNA expressions of *Cgthr3* (a), *Cgap-1* (b), *Cgcaspase-3* (c), *Cgil-17-5* (d) and *Cgil-17-6* (e) in gills after *E. profundum* infection

1. control group, 2. *E. profundum* treatment group; “*” indicate $P<0.05$, “***” indicate $P<0.01$, “****” indicate $P<0.001$.

于平稳, 表明测序的数据趋于合理化, 即使有更多的数据量只会产生少量新的 OTU (图 5-a)。通过等级聚类曲线的宽度和平滑程度发现, 两批样本中物种的分布相对均衡, 而且经深海微小杆菌处理的长牡蛎鳃组织样本相较于对照组鳃组织, 其物种的丰度更高 (图 5-b)。

物种丰度聚类热图, 包括门、纲、目、科 4 个分类级别的结果 (图 6); 深海微小杆菌感染后, 长牡蛎鳃组织微生物群落发生变化, 在门水平上, 变形菌门、弯曲杆菌门 (Campylobacterota) 相对丰度增加; 纲水平上, γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、弯曲杆菌纲 (Campylobacterina) 相对丰度增加; 目水平上, 弧菌目 (Vibrionales)、弯曲杆菌目 (Campylobacteriales) 相对丰度增加; 科水平上, 弧菌科 (Vibrionaceae)、弓形菌科 (Arcobacteraceae) 相对丰度增加。

3 讨论

近年来, 随着水产养殖业的迅猛发展, 尤其是贝类养殖规模的大幅增加, 极大地推动了沿海地区经济的发展^[18, 31]。然而, 细菌性疾病的频繁暴发已成为制约贝类养殖业健康发展的重要因素^[19, 21, 32]。水产养殖中的病害通常由病原体、生物体自身免疫力以及环境因素共同驱动^[33-34]。细菌、病毒、真菌和类毛霉菌均可导致牡蛎患病^[35], 其中细菌能在一定程度上调控机体微生物种群的动态变化^[36]。细菌性疾病具有爆发性, 能够在短时间内导致大规模的贝类死亡, 给贝类养殖业带来重大的经济损失^[37-38]。脓包病是近年来新发现的一种海水养殖贝类疾病, 然而, 目前对该病的发病机制仍然知之甚少。

实验室前期从庄河市养殖海区患脓包病的

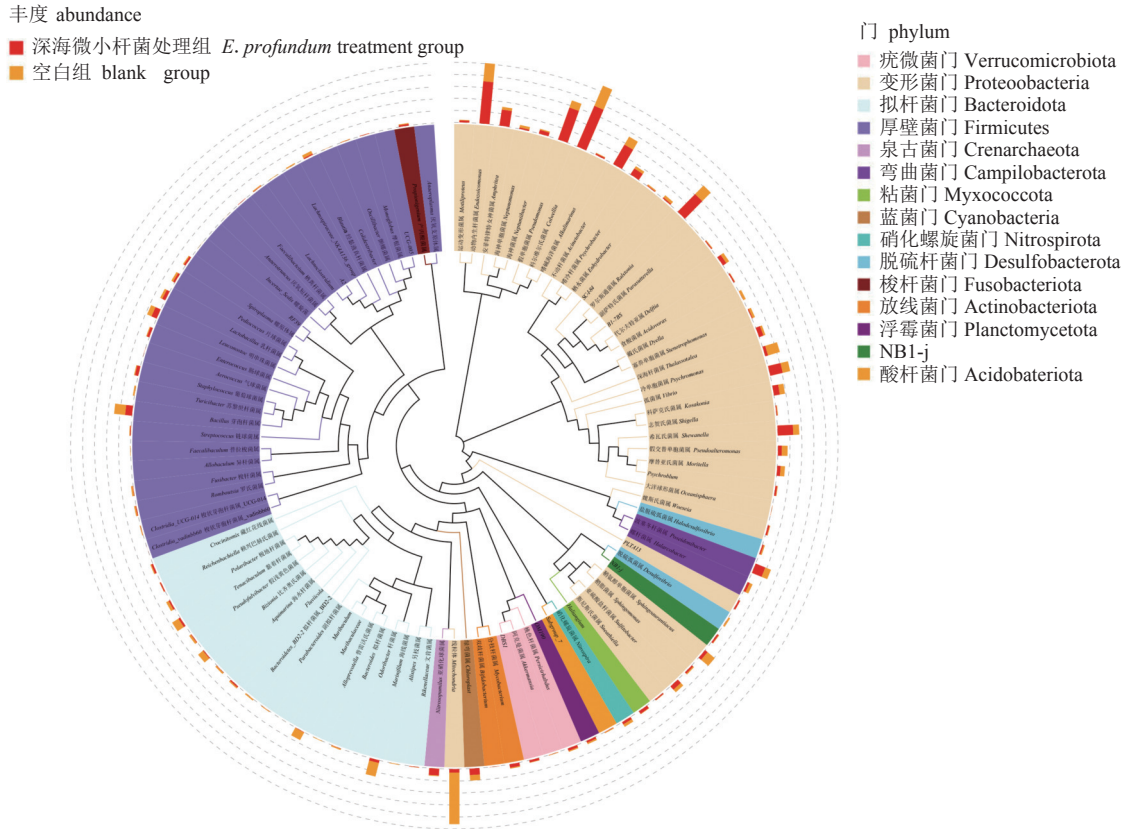


图 4 门水平的系统发育进化树
 Fig. 4 Phylogenetic tree at phylum level

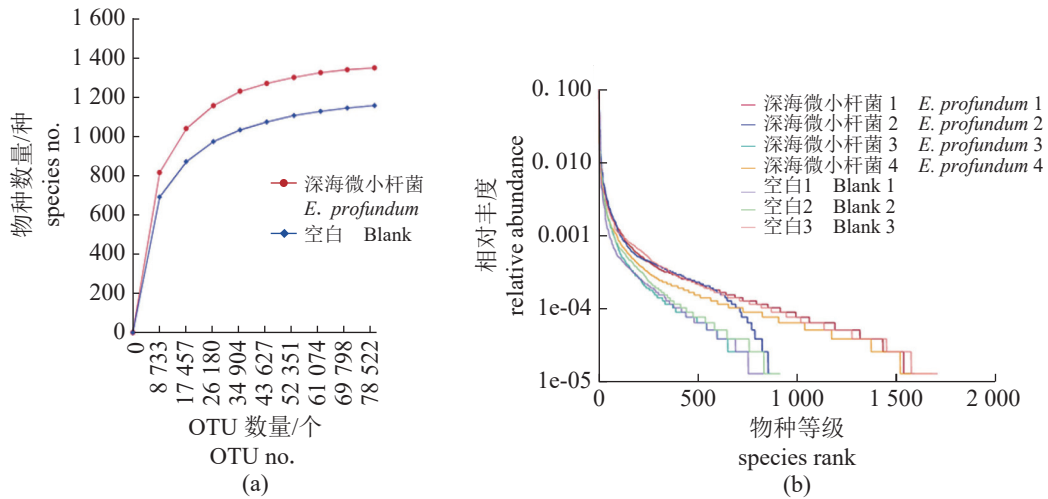


图 5 OTU 样本复杂度分析

(a) 稀释曲线, (b) 等级聚类曲线。

Fig. 5 OTU sample complexity analysis

(a) rarefaction curve, (b) rank abundance curve.

长牡蛎中分离到了假单胞菌属、弧菌属和微小杆菌属, 其中 1 株优势菌株经鉴定为深海微小杆菌。深海微小杆菌最早发现于深海热液喷口,

具有中度嗜热性和耐盐性^[39], 并被认为是某些水产养殖动物如克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 具有致病性^[40]。然而, 迄今为止尚未有

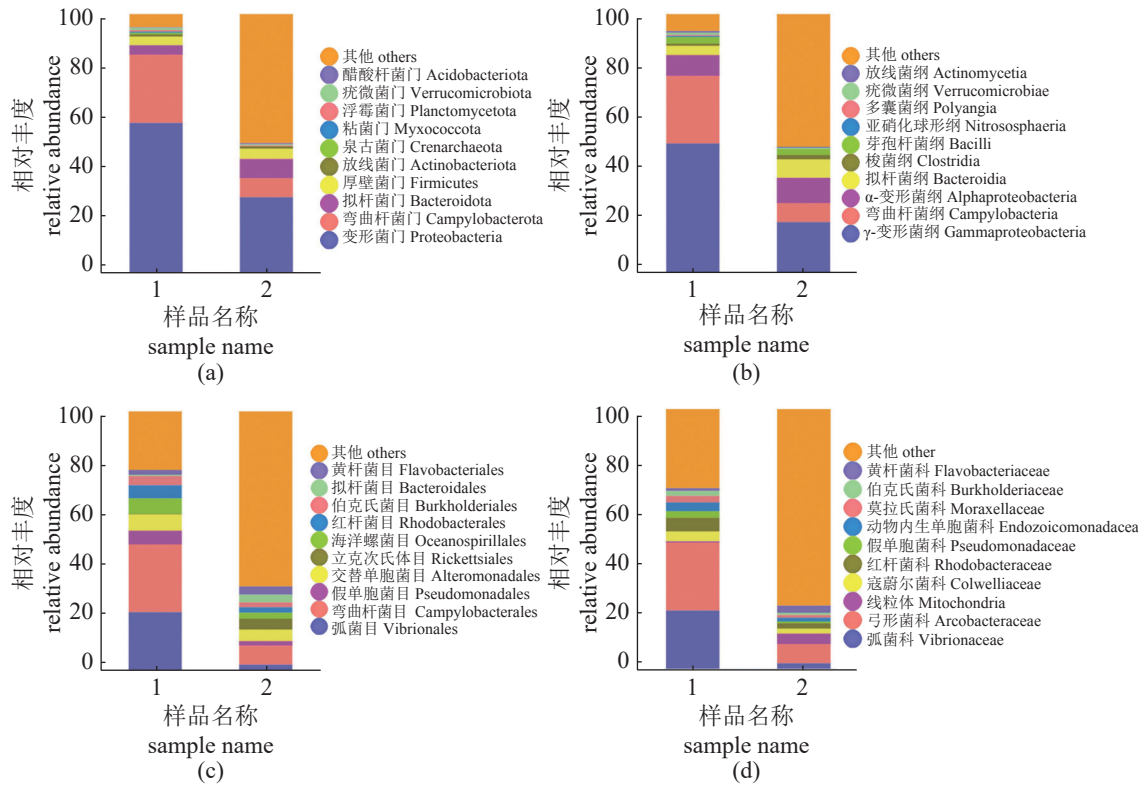


图 6 物种丰度柱状图

(a)、(b)、(c)、(d) 分别为门、纲、目、科水平的物种丰度柱状图；1. 深海微小杆菌处理组，2. 对照组。

Fig. 6 Species abundance bar chart

(a), (b), (c), (d) were bar chart of species abundance at the level of phylum, class, order and family; 1. *E. profundum* treatment group, 2. control group.

关于深海微小杆菌导致软体动物患病的报道。溶血活性是评估细菌溶血毒性的重要指标之一，溶血性细菌可通过溶解宿主红细胞，导致局部组织损伤，并引发一系列继发性反应^[41]。深海微小杆菌在 28 °C 时表现出较强的溶血活性，表明其在此温度下毒性较强，可能是该地区夏季细菌性疾病高发的原因之一。药敏实验结果显示，深海微小杆菌对头孢哌酮、青霉素、阿莫西林、强力霉素、复方新诺明和恩诺沙星具有较高的敏感性，即上述抗生素可能是控制该疾病的有效药物。

组织学分析表明，组织坏死和消化系统器官的病理性脂质沉积是细菌感染的特征之一^[42]。例如，弧菌产生的外毒素可导致双壳类动物鳃组织纤毛脱落和上皮细胞坏死^[43]。绦虫弧菌通过膜外间隙侵入软组织，造成菲律宾蛤仔的严重组织损伤^[44]。本研究使用深海微小杆菌对长牡蛎进行回归感染实验，感染后的长牡蛎外套膜上形成脓包，鳃表面出现白色斑点并伴有肿胀，表现出与脓包病相似的症状。组织病理学

观察显示，与对照组相比，患病长牡蛎的外套膜肌纤维坏死，结缔组织断裂且溶解稀疏；鳃丝肿胀且排列不规则。该症状与自然条件下的患牡蛎脓包病的症状具有一定的相似性，但不完全一致。这种现象在虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*) 脓包病的研究中也有报道，具体表现为菌株人工感染的致病能力以及脓包病的发生率会随温度等条件不同发生变化，甚至无脓包病症状^[45]。这种症状的差异可能是由于疾病的发生是由地理位置因素、宿主因素和毒力基因共同作用的复杂过程导致。此外，还需考虑生物体内的正常菌群通过其定植抗性直接或间接阻止病原进入的能力^[46]。细菌致病能力还与宿主健康状况、环境条件、海水中细菌数量以及海水理化性质等因素密切相关^[47-49]。人工感染过程中无法完全模拟所有相关因素，可能导致人工感染后长牡蛎脓包病症状与野外患病长牡蛎症状不完全一致。推测深海微小杆菌在正常长牡蛎中与其他细菌长期处于动态平衡状态，当环境变化或致病性细菌入侵破坏微生物种群

平衡时, 深海微小杆菌可能会导致长牡蛎发病。此外, 实验室从患脓包病的长牡蛎中分离鉴定出不止一种致病菌, 表明了引发长牡蛎出现脓包病是多种致病菌协同作用的结果。这些结果也进一步印证了实验的假设。

贝类缺乏基于 T/B 淋巴细胞抗体的适应性免疫系统, 仅依赖固有免疫系统抵御病原侵袭^[50]。研究表明, 炎症在贝类免疫防御中发挥重要作用^[51]。在双壳类固有免疫系统中, *Cgtr3* 在识别病原相关分子模式 (PAMPs) 时发挥关键作用, 激活下游固有免疫信号通路^[52-53]; *ap-1* 作为炎症发生中重要的转录因子, 在调控炎症基因表达中起重要作用^[54]。*Cgcaspase-3* 在细胞凋亡和炎症信号传导过程中扮演关键角色^[55]。*Cgil-17-5* 和 *Cgil-17-6* 则属于 *il-17* 家族的细胞因子, 具有显著的促炎活性^[56]。实验数据显示, 在感染深海微小杆菌后, *Cgtr3* 和 *Cgap-1* 的表达显著升高, 起到识别病原和信号传导的作用; *Cgcaspase-3*、*Cgil-17-5* 和 *Cgil-17-6* 的表达显著升高, 引发强烈的炎症反应。

细菌感染宿主后, 可能显著改变宿主体内的微生物群落组成。例如, 经细菌感染后, 中华文蛤 (*Meretrix petechialis*) 体内的细菌群落的丰富度和门水平上的组成发生显著变化^[57]。在本研究中, 深海微小杆菌感染长牡蛎后, 宿主微生物群落在多个分类水平上发生了显著变化。在门水平上, 变形菌门和弯曲杆菌门的相对丰度增加; 在纲水平上, 变形菌纲和弯曲杆菌纲的相对丰度增加; 在目水平上, 弧菌目和弯曲杆菌目的相对丰度增加; 在科水平上, 弧菌科和弓形菌科的相对丰度增加。结果表明, 深海微小杆菌感染长牡蛎后, 不仅会改变其微生物群落的结构, 还会导致某些特定菌群的相对丰度显著上升, 这与其他海域和养殖环境中变形菌门和拟杆菌门作为优势菌类的现象一致^[58-60], 且变形菌门也是长牡蛎体内的主要微生物群落^[61], 是导致长牡蛎患病的主要病原菌。这些研究结果也验证了深海微小杆菌可能通过与长牡蛎体内的弧菌产生协同效应, 增加弧菌在整体微生物群落中的占比进而导致脓包病的发生。

综上所述, 本研究从患脓包病的长牡蛎中分离鉴定了一株潜在致病菌——深海微小杆菌, 人工感染实验证明其对长牡蛎具有较强的致病性。该菌在 28 °C 时表现出较强的溶血活性。

药敏实验显示, 该菌对头孢哌酮、青霉素、阿莫西林、强力霉素、复方新诺明和恩诺沙星具有较高的敏感性。高通量测序和转录组测序结果显示, 该菌通过与长牡蛎体内的弧菌产生协同效应, 增加弧菌在整体微生物群落中的占比, 同时促进 *Cgtr3*、*Cgap-1*、*Cgcaspase-3*、*Cgil-17-5* 和 *Cgil-17-6* 的表达, 导致长牡蛎发病。以上实验结果证明了深海微小杆菌对长牡蛎具有致病性, 并初步揭示了其致病机制, 为开发基于贝类免疫机制的新型抗病策略提供了理论基础, 从而为贝类养殖中的疾病防控提供参考。

参考文献 (References):

- [1] 白昌明, 辛鲁生, 王崇明. 软体动物疱疹病毒及其对贝类养殖产业的危害 [J]. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 214-226.
Bai C M, Xin L S, Wang C M. Malacoherpesviruses and their associated damages to mollusk aquaculture industry[J]. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(1): 214-226 (in Chinese).
- [2] 张颖雪, 苏洁, 樊景凤, 等. 海水养殖贝类弧菌病流行暴发及其环境影响因素研究进展 [J]. 海洋环境科学, 2020, 39(3): 480-487.
Zhang Y X, Su J, Fan J F, et al. Outbreaks of vibriosis in mariculture shellfish and its research progress[J]. Marine Environmental Science, 2020, 39(3): 480-487 (in Chinese).
- [3] 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.
- [4] Jones J L, Lüdeke C H M, Bowers J C, et al. Biochemical, serological, and virulence characterization of clinical and oyster *Vibrio parahaemolyticus* isolates[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(7): 2343-2352.
- [5] Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan M J, et al. Two pathogens of Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus/neptunius*-like isolate[J]. Journal of Fish Diseases, 2009, 32(6): 499-507.
- [6] Lacoste A, Jalabert F, Malham S, et al. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France)[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2001, 46(2): 139-145.
- [7] Yang B, Zhai S Y, Li X, et al. Identification of *Vibrio alginolyticus* as a causative pathogen associated with mass summer mortality of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in

- China[J]. *Aquaculture*, 2021, 535: 736363.
- [8] Labreuche Y, Soudant P, Gonçalves M, *et al.* Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2006, 30(4): 367-379.
- [9] 沈晓盛, 蔡友琼, 房文红, 等. 养殖牡蛎体内检出坎氏弧菌的鉴定 [J]. *微生物学报*, 2005, 45(2): 177-180.
- Shen X S, Cai Y Q, Fang W H, *et al.* Identification of *Vibrio campbellii* isolated from cultured pacific oyster[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(2): 177-180 (in Chinese).
- [10] Gooch J A, DePaola A, Kaysner C A, *et al.* Evaluation of two direct plating methods using nonradioactive probes for enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(2): 721-724.
- [11] 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.
- [12] 李启蒙, 朱贝贝, 方皓, 等. 一起菲律宾蛤仔出血病病原的鉴定 [J]. *山东畜牧兽医*, 2017, 38(10): 7-8.
- Li Q M, Zhu B B, Fang H, *et al.* Identification of the pathogen of a *Venerupis philippinarum* haemorrhagic disease[J]. *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017, 38(10): 7-8 (in Chinese).
- [13] Kang C H, Shin Y J, Jang S C, *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Vibrio alginolyticus* isolated from oyster in Korea[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(20): 21106-21112.
- [14] Liu R, Qiu L M, Yu Z A, *et al.* Identification and characterisation of pathogenic *Vibrio splendidus* from Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) cultured in a low temperature environment[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2013, 114(2): 144-150.
- [15] 滕炜鸣, 李文姬, 张明, 等. 虾夷扇贝脓包病病原的分离、鉴定与致病性 [J]. *水产学报*, 2012, 36(6): 937-943.
- Teng W M, Zhang M, Yu Z A, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity of *Vibrio chagasii* from *Patinopecten yessoensis*[J]. 2011. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(6): 937-943 (in Chinese).
- [16] Geng Z, Gao L, Yu Z, *et al.* The isolation and identification of a pathogenic *Vibrio neocaledonicus* from Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*)[J]. *ISJ-Invertebrate Survival Journal*, 2022, 19(1): 91-104.
- [17] 李琪, 于瑞海, 孔令锋, 等. 长牡蛎高产优质新品种培育与应用 [R]. 中国海洋大学, 2021.
- Li Q, Yu R H, Kong L F, *et al.* Breeding and application of new oyster varieties with high yield and high quality[R]. Ocean University of China, 2021 (in Chinese).
- [18] 于潇, 卢钰博, 刘嘉卓, 等. 牡蛎的生态养殖 [J]. *水产养殖*, 2020, 41(4): 1-3,7.
- Yu X, Lu Y B, Liu J Z, *et al.* Ecological farming of oyster[J]. *Journal of Aquaculture*, 2020, 41(4): 1-3,7 (in Chinese).
- [19] 王强. 浅谈海水贝类养殖中的问题及对策 [J]. *山西农经*, 2021(4): 151-152.
- Wang Q. Discussion on problems and countermeasures in aquaculture of seawater shellfish[J]. *Shanxi Agricultural Economy*, 2021(4): 151-152 (in Chinese).
- [20] Wan Y, Bai Y, He J, *et al.* Temporal and spatial variations of aquatic environmental characteristics and sediment bacterial community in five regions of Lake Taihu[J]. *Aquatic Ecology*, 2017, 51(3): 343-358.
- [21] 李国, 闫茂仓, 常维山, 等. 我国海水养殖贝类弧菌病研究进展 [J]. *浙江海洋学院学报 (自然科学版)*, 2008, 27(03): 327-334.
- Li G, Yan M C, Chang W S, *et al.* Review on studing of *Vibriosis* of shellfish farming in China[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition)*, 2008, 27(03): 327-334 (in Chinese).
- [22] Huptas C, Scherer S, Wenning M. Optimized Illumina PCR-free library preparation for bacterial whole genome sequencing and analysis of factors influencing de novo assembly[J]. *BMC Research Notes*, 2016, 9: 269.
- [23] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [24] Bokulich N A, Subramanian S, Faith J J, *et al.* Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(1): 57-59.
- [25] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [26] Rognes T, Flouri T, Nichols B, *et al.* VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics[J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2584.
- [27] Haas B J, Gevers D, Earl A M, *et al.* Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J]. *Genome Research*, 2011, 21(3): 494-504.
- [28] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from

- microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [29] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D590-D596.
- [30] Preidis G A, Ajami N J, Wong M C, *et al.* Composition and function of the undernourished neonatal mouse intestinal microbiome[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2015, 26(10): 1050-1057.
- [31] 曾志南, 宁岳, 林向阳, 等. 福建牡蛎养殖业发展现状与对策 [C]//中国动物学会、中国海洋湖沼学会贝类学会分会第十四次学会研讨会论文摘要汇编. 南昌: 中国动物学会, 2009.
- Zeng Z N, Ning Y, Lin X Y, *et al.* Development status and countermeasures of oyster culture in Fujian Province[C]// Abstracts of the 14th Symposium of the Chinese Society of Zoology and the Shellfish Society of the Chinese Society of Marine Limnology. Nanchang: Chinese Society of Zoology, 2009 (in Chinese).
- [32] 潘晓艺, 沈锦玉, 尹文林, 等. 水生动物的弧菌病及其致病机理 [J]. 大连海洋大学学报, 2006, 21(3): 272-277.
- Pan X Y, Shen J Y, Yin W L, *et al.* *Vibriosis* and their mechanisms in aquatic animals[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2006, 21(3): 272-277 (in Chinese).
- [33] 董波, 相建海, 杨鸣, 等. 海水养殖生物病害发生和抗病力的基础研究 [J]. 中国基础科学, 2003(6): 19-24.
- Dong B, Xiang J H, Yang M, *et al.* Research on the disease occurrence and disease resistance of the commercially important organisms in mariculture[J]. *China Basic Science*, 2003(6): 19-24 (in Chinese).
- [34] Trabal Fernández N, Mazón-Suástegui J M, Vázquez-Juárez R, *et al.* Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 88(1): 69-83.
- [35] Chen H W. Diseases of cultured oysters caused by pathogenic microbes[J]. *Fisheries Science*, 2007, 26(9): 531-534.
- [36] Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(5): 723-735.
- [37] De Schryver P, Vadstein O. Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(12): 2360-2368.
- [38] Beaz-Hidalgo R, Balboa S, Romalde J L, *et al.* Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(1): 34-43.
- [39] Crapart S, Fardeau M L, Cayol J L, *et al.* *Exiguobacterium profundum* sp. nov., a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(Pt 2): 287-292.
- [40] 石瑞雪, 李艳和. 克氏原螯虾微小杆菌 *Exiguobacterium profundum* 的分离鉴定与药敏试验 [J]. 中国农学通报, 2023, 39(2): 123-129.
- Shi R X, Li Y H. Isolation, identification and antibiotics susceptibility test of *Exiguobacterium profundum* from *Procambarus clarkii*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2023, 39(2): 123-129 (in Chinese).
- [41] Gadeberg O V, Orskov I, Rhodes J M. Cytotoxic effect of an alpha-hemolytic *Escherichia coli* strain on human blood monocytes and granulocytes *in vitro*[J]. *Infection and Immunity*, 1983, 41(1): 358-364.
- [42] Elston R, Leibovitz L, Relyea D, *et al.* Diagnosis of vibriosis in a commercial oyster hatchery epizootic: diagnostic tools and management features[J]. *Aquaculture*, 1981, 24: 53-62.
- [43] Valério E, Chaves S, Tenreiro R. Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: a review[J]. *Toxins (Basel)*, 2010, 2(10): 2359-2410.
- [44] Allam B, Paillard C, Ford S E. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 48(3): 221-231.
- [45] 林雪洁, 高磊, 于子超, 等. 一株虾夷扇贝病原——科氏希瓦氏菌的分离鉴定及其致病性 [J]. 大连海洋大学学报, 2022, 37(6): 933-940.
- Lin X J, Gao L, Yu Z C, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity of *Shewanella colwelliana*, a pathogen of Yesso scallop *Patinopecten yessoensis*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2022, 37(6): 933-940 (in Chinese).
- [46] Antonelli G, Cutler S. Evolution of the Koch postulates: towards a 21st-century understanding of microbial infection[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2016, 22(7): 583-584.
- [47] Li X, Yang B, Shi C Y, *et al.* Synergistic interaction of low salinity stress with *Vibrio* infection causes mass mortalities in the oyster by inducing host microflora imbalance and immune dysregulation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 859975.
- [48] 马悦欣, 徐高蓉, 常亚青, 等. 大连地区刺参幼参溃烂病细菌性病原的初步研究 [J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(1): 13-18.

- Ma Y X, Xu G R, Chang Y Q, *et al.* Bacterial pathogens of skin ulceration disease in cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) juveniles[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2006, 21(1): 13-18 (in Chinese).
- [49] 马景雪, 张培玉, 王宗兴, 等. 黄海近海岸贝类养殖区细菌群落结构多样性及与环境因子响应 [J]. *水产学报*, 2022, 46(6): 984-994.
- Ma J X, Zhang P Y, Wang Z X, *et al.* Bacterial community structure diversity and environmental factors in the coastal shellfish culture area of Huangdao[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(6): 984-994 (in Chinese).
- [50] 王玲玲. 贝类神经内分泌系统对免疫应答的调节机制 [J]. *大连海洋大学学报*, 2022, 37(3): 363-375.
- Wang L L. Regulatory mechanism of neuroendocrine system on immune response in molluscs: a review[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2022, 37(3): 363-375 (in Chinese).
- [51] 孙洁洁, 宋林生. 贝类炎症及其发生机制研究进展 [J]. *大连海洋大学学报*, 2023, 38(3): 369-379.
- Sun J J, Song L S. Inflammation and its mechanism in molluscs: a review[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2023, 38(3): 369-379 (in Chinese).
- [52] Song L S, Wang L L, Qiu L M, *et al.* Bivalve immunity[M]//Söderhäll K. *Invertebrate immunity*. Boston: Springer, 2010: 44-65.
- [53] Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, *et al.* Cutting edge: toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product[J]. *The Journal of Immunology*, 1999, 162(7): 3749-3752.
- [54] 王秋金. 泥蚶抗弧菌免疫相关通路 AP-1 的鉴定和功能研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2023.
- Wang Q J. Identification and functional study of anti-*Vibrio* immune-related pathway AP-1 in *Tegillarca granosa*[J]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023 (in Chinese).
- [55] 李晓鹏. 长牡蛎 CgCaspase-1 和 CgCaspase-3 对细胞焦亡和炎症的调控作用 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2023.
- Li X P. Regulation on cell pyroptosis and inflammation mediated by CgCaspase-1 and CgCaspase-3 in Pacific oyster *Crassostrea gigas*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2023 (in Chinese).
- [56] 曹婉晴. CgIL17-1 及其受体对长牡蛎血淋巴细胞增殖的调节作用 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2022.
- Cao W Q. The involvement of CgIL17-1 and its receptor on regulating the proliferation of haemocytes in *Crassostrea gigas*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2022 (in Chinese).
- [57] 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.
- [58] 张艳. 山东近岸海域水体细菌多样性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- Zhang Y. Diversity of bacterial communities in coastal areas of Shandong Province[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010 (in Chinese).
- [59] Zhang T, Zhu H, Wang J, *et al.* Monitoring bacterial community dynamics in abalone (*Haliotis discus hannai*) and the correlations associated with aquatic diseases[J]. *Water*, 2022, 14(11): 1769.
- [60] 邓婕, 王秋水, 刘悦, 等. 北戴河水产养殖海域可培养微生物多样性及耐药性分析 [J]. *分析仪器*, 2023(1): 74-83.
- Deng J, Wang Q S, Liu Y, *et al.* Research on microbial diversity and antibiotic resistance of culturable bacteria in Beidaihe aquaculture area[J]. *Analytical Instrumentation*, 2023(1): 74-83 (in Chinese).
- [61] 曹荣, 张井, 孟辉辉, 等. 高通量测序与传统纯培养方法在牡蛎微生物群落分析中的应用对比 [J]. *食品科学*, 2016, 37(24): 137-141.
- Cao R, Zhang J, Meng H H, *et al.* Microbial flora analysis of oyster: a comparison between traditional plate culture method and high throughput sequencing[J]. *Food Science*, 2016, 37(24): 137-141 (in Chinese).

Isolation and identification of *Exiguobacterium profundum* and its pathogenicity analysis on *Crassostrea gigas*

JIANG Jun , SUN Jiejie * , YANG Wenwen , GAO Lei , LENG Jinyuan ,
WANG Lingling , SONG Linsheng

Liaoning Key Laboratory of Marine Animal Immunology and Epidemic Prevention and Control,
Dalian Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases Prevention and Control,
Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

Abstract: In the present study, a potential pathogenic bacterium was isolated and identified from Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) with abscess disease collected from a culture area in Zhuanghe, Dalian, Liaoning. *Exiguobacterium profundum* was identified in the lesions of the diseased *C. gigas* using 16S *rDNA* sequencing and bioinformatics techniques. Antimicrobial susceptibility and hemolysis experiments were conducted. The expression of inflammation-related genes and changes in bacterial community structure in the gill tissues following *E. profundum* infection were further analyzed using artificial infection experiments, high-throughput sequencing technology, and quantitative real-time PCR. The results showed that the strain formed creamy-yellow colonies with a diameter of 1.0-1.5 mm on marine agar 2216 E, exhibiting uniform and stable morphology. *E. profundum* demonstrated high sensitivity to cefoperazone, penicillin, and amoxicillin. It exhibited significant β -hemolytic activity at 28 °C. Artificial infection experiments revealed the presence of abscesses on the mantle and white spots and swelling on the gills, with significant increases in the mRNA expression levels of *Cgtr3*, *Cgap-1*, *Cgcaspase-3*, *Cgil-17-5* and *Cgil-17-6* in the gills post-infection. High-throughput sequencing analysis showed an increase in the relative abundance of Proteobacteria and Campylobacterota, as well as an induction in the relative abundance of Vibrionaceae in the gill tissues following *E. profundum* infection. These findings suggest that *E. profundum* may contribute to the pathogenesis of *C. gigas* by promoting the mRNA expression of inflammation-related genes and inducing the abundance of *Vibrio* spp. in the gill tissue. This study identifies *E. profundum* as a potential pathogen of *C. gigas* with abscess disease, providing valuable data support for the prevention and control of shellfish diseases.

Key words: *Crassostrea gigas*; pustule disease; *Exiguobacterium profundum*; 16S *rDNA* sequencing; transcriptomics

Corresponding author: SUN Jiejie. E-mail: [suniejie@dlou.edu.cn](mailto:sunjiejie@dlou.edu.cn)

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32222086, 32173002); Fund for China Agriculture Research System (CARS-49); Liaoning Revitalization Talents Program (XLYC2203087); Dalian Outstanding Young Scientific and Technological Talent (2022RY01)