

哈维氏弧菌浸泡感染下泥蚶(*Tegillarca granosa*) 不同组织弧菌载量的变化规律分析*

杨千元^{1,2} 滕爽爽² 蔡逸龙² 肖国强^{1,2①} 蔡西栗³

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 2. 浙江省海洋水产养殖研究所 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室 温州市海洋生物遗传育种重点实验室 温州 325005; 3. 浙江省平阳县农业农村局 平阳 325499)

摘要 为明确哈维氏弧菌感染下, 泥蚶(*Tegillarca granosa*)不同组织弧菌载量的变化规律, 通过哈维氏弧菌浸泡感染泥蚶的方法, 建立弧菌浓度计数标准曲线, 记录攻毒水体和泥蚶组织中的哈维氏弧菌含量的动态变化及相关关系。结果显示, 弧菌感染浓度为 1×10^7 CFU/mL, 泥蚶血液中弧菌载量显著高于鳃、闭壳肌、外套膜和肝胰腺, 各组织中的弧菌载量呈现先上升, 后下降, 最后维持较低水平的变化规律。持续感染 6 d, 泥蚶血液中弧菌载量降至 10^2 — 10^4 CFU/mL, 其他组织中弧菌载量降至 10^0 — 10^2 CFU/mg。检测不同浓度弧菌(1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 CFU/mL)浸泡感染后泥蚶肝胰腺的弧菌载量变化, 结果显示, 1 d 时各感染组肝胰腺弧菌载量均较对照组显著增加(81.0—667.8 倍), 且与浸泡水体中弧菌浓度呈显著正相关(Spearman's $\rho=0.762$, $P<0.001$), 5 d 时各感染组肝胰腺弧菌载量均较 1 d 明显降低, 但仍然高于对照组。研究结果为泥蚶感染弧菌发病过程中, 免疫识别及免疫响应机制的研究提供了参考。

关键词 泥蚶(*Tegillarca granosa*); 哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*); 弧菌载量; 免疫抗性

中图分类号 S944.3 doi: 10.11693/hyhz20210300074

泥蚶(*Tegillarca granosa*), 俗称“血蛤”, 隶属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、列齿目(Taxodonta)、蚶科(Arcidae)、泥蚶属(*Tegillarca*), 是一种典型的广温、广盐性滩涂贝类, 广泛分布于印度洋和西太平洋地区, 在我国主要分布于山东半岛以南沿海地区, 是我国四大经济养殖贝类之一, 并在沿海生态系统中发挥着至关重要的生态作用(李太武等, 2003; Shao *et al*, 2016; Shi *et al*, 2016)。近年来养殖泥蚶的流行性疾病和大规模死亡时有发生(金珊等, 2002), 其中, 弧菌性疾病最为常见, 并且导致的死亡最为严重, 已然成为制约泥蚶养殖产业健康发展的瓶颈问题之一(陈爱平, 2005; 陈爱平

等, 2007)。弧菌普遍分布于河口、海湾、近岸海域的海水和海洋动物体内, 截至目前弧菌科共发现 8 个属, 159 个种, 其中主要致病菌有副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)等(张晓华等, 2018)。目前关于泥蚶致病弧菌的研究主要集中在副溶血弧菌(刘文伟等, 2010; 汪青, 2012; Bao *et al*, 2013a, b; Yang *et al*, 2020b)、鳃弧菌(钟爱华等, 2020)、溶藻弧菌(Yang *et al*, 2020a)和哈维氏弧菌(Song *et al*, 2017; Zha *et al*, 2017)等。其中, 有关泥蚶感染哈维氏弧菌后, 机体免疫响应的研究报道较少。

* 国家自然科学基金项目, 31902358 号; 国家重点研发计划项目, 2018YFD0901405-2 号, 2020YFD0900802 号; 浙江省重点研发计划项目, 2019C02045 号, 2018C02039 号; 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助; 温州市农业新品种选育协作组项目, 2019ZX001-1 号。杨千元, 硕士研究生, E-mail: 1595380471@qq.com

通信作者: 肖国强, 研究员, E-mail: xiaogq1978@163.com

收稿日期: 2021-03-30, 收修改稿日期: 2021-05-18

细菌性疾病的暴发主要取决于宿主的体质、病原菌的数量和宿主与病原菌之间的相互作用(Asplund *et al.*, 2014)。当外来病原微生物入侵宿主机体时, 宿主的免疫系统被激活, 主要通过识别和消除的方式, 来保护自身避免受到病原体侵害。为了避免病原微生物侵害, 维持机体各项功能正常运行, 宿主必须控制病原菌在体内的荷载(Howick, 2017)。宿主的免疫系统通过消化、降解、吞噬等方式来控制靶组织中病原体的增殖, 以此来降低体内病原菌的数量, 这种宿主抵御病原微生物的能力被称为免疫抗性(Boots *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 2000)。因此, 免疫抗性常以感染后宿主体内靶组织中病原体数量来衡量(Murphy, 1987)。宿主体内菌载量的变化规律反映了外来病原菌入侵后, 宿主与病原菌之间的相互作用, 是一种重要的衡量免疫抗性的指标。

本研究采用浸泡感染实验模拟泥蚶在自然环境下遭受哈维氏弧菌胁迫的环境。通过绘制哈维氏弧菌的计数标准曲线, 检测攻毒水体中 24 h 内哈维氏弧菌的浓度变化, 分析感染后不同时间点泥蚶组织弧菌载量的变化趋势, 进而研究在不同浓度弧菌感染下, 攻毒水体的弧菌浓度与泥蚶肝胰腺的弧菌载量的变化及相关性, 以期为泥蚶感染弧菌发病过程中, 免疫识别及免疫响应机制的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的泥蚶[壳长(28.67±1.97) mm, 总重(9.08±1.61) g]取自浙江省温州市乐清湾(121°E, 28°N), 小心冲洗除去壳表污物后, 用浓度为 5 mg/L 的高锰酸钾溶液浸泡 5—10 min, 将泥蚶置于室内 500 L 大桶中暂养一周[砂滤海水的 pH 8.3±0.1, 盐度 22.5±0.1, 温度(28.0±2.0) °C]。暂养期间, 桶内海水保持连续充气, 每 24 h 换水一次, 每日早晚定时各投喂硅藻(密度为 5×10^4 个/mL) 1 次。

实验所用的哈维氏弧菌菌株是本实验室 2014 年从浙江滩涂发生规模性死亡的泥蚶中分离、鉴定并于 -80 °C 冰箱中长期保存。将菌株划线于 2216E 固体培养基上, 28 °C 培养 24 h 后挑取单菌落于 5 mL 的 2216E 液体培养基试管中, 28 °C 摇床中培养 12 h, 摇床转速为 160 r/min, 然后将其接种于大体积的 2216E 液体培养基扩大培养。

1.2 实验方法

1.2.1 弧菌计数标准曲线绘制 将哈维氏弧菌接

种至 50 mL 2216E 液体培养基中, 在 28 °C 摇床中培养 12 h。用无菌 PBS 溶液稀释成不同浓度的菌悬液。具体操作为: 以无菌 PBS 溶液二次重悬弧菌培养液, 分别吸取 10 μ L、20 μ L、50 μ L、100 μ L、200 μ L、0.5 mL、1 mL、2 mL 加 PBS 至终体积 10 mL, 稀释成 8 个不同浓度的菌悬液。以分光光度计测定的 8 个菌液的 OD₅₆₀ 值为横坐标, 用硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖(TCBS)琼脂培养基平板计数法得到的相应的弧菌浓度为纵坐标, 建立弧菌数与 OD₅₆₀ 值关系曲线, 获得直线回归方程(沈锦玉等, 2009)。

1.2.2 哈维氏弧菌感染实验

(1) 哈维氏弧菌感染水体中, 哈维氏弧菌含量的日变化。将已知浓度的哈维氏弧菌, 按照设定浓度 1×10^7 CFU/mL 添加至砂滤海水中。20 L 海水中放入 30 颗泥蚶, 感染期间海水温度保持(28.5±0.5) °C, 持续充气, 每天早晚定时投喂硅藻一次。分别在弧菌添加前和添加后 0、3、6、12、18、24 h 对实验水体进行取样, 每次在不同位置、不同深度随机取 3 个水样检测水体中的哈维氏弧菌数量。24 h 后更换实验海水并重新添加弧菌, 所有设置和取样时间同第一次实验, 连续三天检测水体中哈维氏弧菌的数量变化, 取平均值。实验设置 3 个感染组, 同时设置对照组, 即不放置泥蚶, 其他操作同感染组。采用 SPSS22.0 单因子方差分析(Analysis of variance, ANOVA), 检验不同处理组间海水中哈维氏弧菌浓度日变化, 显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

(2) 哈维氏弧菌感染过程中, 泥蚶组织弧菌载量变化。设置感染浓度为 1×10^7 CFU/mL, 对 400 只泥蚶进行连续 7 d 的哈维氏弧菌浸泡感染, 期间海水温度保持(28.5±0.5) °C, 持续充气, 每 24 h 更换海水和弧菌。分别在感染实验前和感染实验后 1、3、6 d, 每次取 50 颗泥蚶, 解剖取鳃、外套膜、闭壳肌、肝胰腺、血液用于弧菌载量检测。攻毒前后同一时间点泥蚶不同组织、同一组织不同个体间弧菌载量差异显著性检验采用 One-way ANOVA 方法, 显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

(3) 泥蚶体内弧菌载量与弧菌感染强度的相关性分析。实验设置 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 CFU/mL 四个不同强度的哈维氏弧菌刺激, 每个实验组设置 6 个重复, 每个重复 50 颗泥蚶, 以不添加哈维氏弧菌的砂滤海水为对照组。实验共进行 15 d, 浸泡感染 7 d, 后 8 d 停止添加弧菌, 实验期间保持海水温度(28.5±0.5) °C, 每 24 h 全换水并重新添加弧菌。在感

染实验开始后的 1 d 和 5 d, 在 3 个重复组中随机各取 10 颗泥蚶用于检测泥蚶肝胰腺的弧菌载量。同时, 每天观察记录另外 3 个重复组泥蚶的死亡情况。采用 SPSS22.0 Spearman 秩相关性分析泥蚶肝胰腺与实验水体中弧菌含量的相关关系; 感染后 1 d 和 5 d 在不同浓度下泥蚶体内弧菌载量差异显著性检验采用 One-way ANOVA 方法, 显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

1.2.3 哈维氏弧菌数量检测 通过涂板计数的方式检测海水中弧菌总数和泥蚶组织中的弧菌载量。泥蚶组织先用无菌生理盐水冲洗, 定性滤纸吸干表面水分, 经分析天平称重后, 按 1:9 (质量体积分数) 加无菌生理盐水稀释, 用眼科剪破碎, 将组织原液和血液梯度稀释 $10\times$ 、 $100\times$ 、 $1\ 000\times$, 分别吸取 $100\ \mu\text{L}$ 涂于 TCBS 琼脂培养基平板上。 $28\ ^\circ\text{C}$ 培养 20—24 h 后进行菌落计数, 组织弧菌载量根据稀释倍数和组织重换算成 CFU/mg, 血液弧菌载量根据稀释倍数换算成 CFU/mL。数据经过 lg 值转换后进行分析。

2 结果

2.1 弧菌计数标准曲线

以不同浓度菌悬液在 $\text{OD}=560\ \text{nm}$ 处的吸光值为横坐标, TCBS 平板计数值为纵坐标, 拟合得到一条直线, 其回归方程为 $y=(95.64x+0.291\ 3)\times 10^7$ (y 为菌液浓度, x 为 OD_{560} 值), $R^2=0.992\ 6$, 表明 OD_{560} 值在 0.01—0.60 之间, 菌液含菌量呈良好的线性关系(图 1)。利用该标准曲线能快速检测本研究培养的哈维氏弧菌浓度, 为后续感染实验中弧菌浓度的快速测定提供依据。

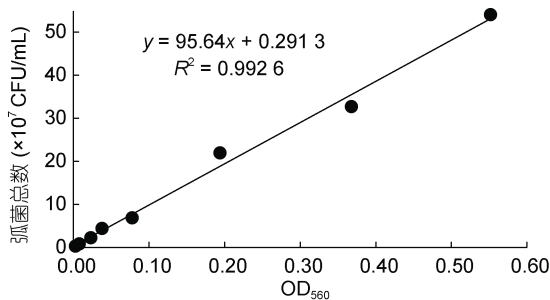


图 1 哈维氏弧菌数与 OD_{560} 值关系曲线

Fig.1 The relationship between the number of *V. harveyi* and the OD_{560}

2.2 攻毒水体中哈维氏弧菌含量的日变化趋势

为了检测哈维氏弧菌浸泡感染实验中, 海水中弧菌浓度能否达到预设浓度要求, 我们监测了感染过程中弧菌在水体中的动态变化过程。结果表明, 砂

滤海水中弧菌浓度为 $(32.25\pm 5.14)\ \text{CFU/mL}$, 按照设定的 $1\times 10^7\ \text{CFU/mL}$ 的浓度添加哈维氏弧菌后, 0 h 弧菌感染组海水中活菌初始浓度为 $(1.06\pm 0.08)\times 10^7\ \text{CFU/mL}$, 对照组活菌初始浓度为 $(1.07\pm 0.04)\times 10^7\ \text{CFU/mL}$, 均能够达到预期的弧菌浓度。弧菌感染组 6 h 和 12 h 活菌浓度与 0 h 无显著差异, 随后海水中活菌浓度逐渐下降, 24 h 最低为 $(7.83\pm 0.15)\times 10^6\ \text{CFU/mL}$ 。对照组活菌浓度在弧菌加入后, 逐渐上升, 在 12 h 达到最大, 为 $(1.54\pm 0.93)\times 10^7\ \text{CFU/mL}$, 之后缓慢下降至 $(1.20\pm 0.05)\times 10^7\ \text{CFU/mL}$ (图 2)。24 h 内弧菌感染组有约 1/2 的时间里海水中的弧菌浓度维持在 $1\times 10^7\ \text{CFU/mL}$, 对照组海水中的有效浓度基本维持在 $1\times 10^7\ \text{CFU/mL}$ 以上; 并且对照组的弧菌浓度高于感染组。

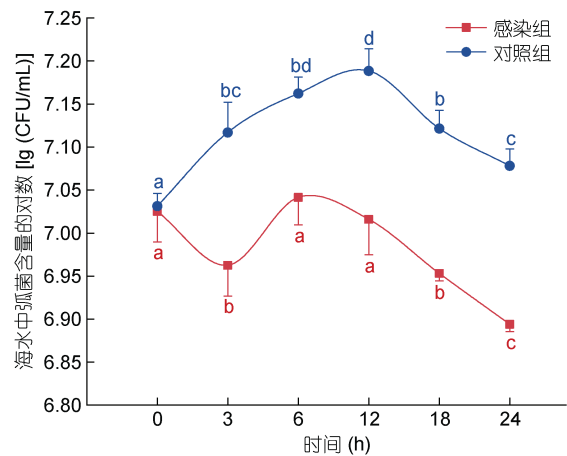


图 2 攻毒水体中哈维氏弧菌数量的日变化(h)

Fig.2 Daily variation of bacterial number in seawater under *V. harveyi* challenge (h)

注: 图中同一曲线中标有不同字母表示组间差异显著($P < 0.05$), 标相同字母表示组间差异不显著($P > 0.05$)

2.3 弧菌攻毒过程中泥蚶不同组织弧菌载量变化

哈维氏弧菌浸泡感染过程中, 对泥蚶不同组织弧菌载量的变化趋势进行分析, 结果显示(表 1), 哈维氏弧菌感染前, 50 颗泥蚶鳃、外套膜、闭壳肌、肝胰腺、血液中哈维氏弧菌的检出率分别为 34.0%、28.0%、30.0%、30.0%、36.0%, 血液弧菌载量显著高于其他 4 个组织。感染后 1 d 泥蚶组织中哈维氏弧菌载量较感染前有显著增加, 其中血液弧菌载量最高为 $(31\ 946.00\pm 19\ 633.84)\ \text{CFU/mL}$, 增加了 591 倍, 绝对弧菌载量和相对增加倍数均显著高于其他各组织。在持续感染的 3 d, 泥蚶各组织的弧菌载量较 1 d 显著下降($P < 0.05$); 除肝胰腺组织外, 感染后 6 d 其他组织的弧菌载量均处于与 3 d 相当的水平($P > 0.05$)。

表 1 哈维氏弧菌感染前后泥蚶组织中的弧菌载量
Tab.1 The *Vibrio* load in clam *T. granosa* under *V. harveyi* challenge

组织	弧菌载量			
	感染前	感染后 1 d	感染后 3 d	感染后 6 d
鳃(CFU/mg)	0.88±1.97 ^{aA}	53.19±76.90 ^{aC}	7.41±10.41 ^{aB}	10.17±14.01 ^{aB}
外套膜(CFU/mg)	1.06±2.40 ^{aA}	116.51±184.63 ^{abC}	13.71±18.73 ^{ab}	13.21±14.34 ^{ab}
闭壳肌(CFU/mg)	0.71±1.65 ^{aA}	90.56±114.65 ^{abC}	10.85±13.43 ^{ab}	12.34±18.40 ^{ab}
肝胰腺(CFU/mg)	0.98±2.03 ^{aA}	125.21±123.07 ^{bC}	36.14±60.44 ^{bB}	67.89±73.06 ^{bC}
血液(CFU/mL)	54.60±113.73 ^{bA}	31 946.00±19 633.84 ^{cC}	6 872.60±10 242.83 ^{cB}	9 009.60±12 744.11 ^{cB}

注: 表中数据不同小写字母表示相同时间下不同组织弧菌载量之间的差异显著($P<0.05$); 不同大写字母表示相同组织下不同时间弧菌载量之间的差异显著($P<0.05$)

攻毒后泥蚶同一组织不同个体弧菌载量存在较大差异(图 3)。感染前泥蚶鳃、外套膜、闭壳肌和肝胰腺有 90%的个体弧菌载量处于 10^0 CFU/mg 数量级。感染 1 d, 鳃组织的弧菌载量为(53.19±76.90) CFU/mg, 16%的泥蚶处于 10^0 CFU/mg 数量级, 72%处于 10^1 CFU/mg 数量级, 12%处于 10^2 CFU/mg 数量级; 外套膜的弧菌载量为(116.51±184.63) CFU/mg, 16%的泥蚶处于 10^0 CFU/mg 数量级, 60%处于 10^1 CFU/mg 数量级, 24%处于 10^2 CFU/mg 数量级; 闭壳肌的弧菌载量为(90.56±114.65) CFU/mg, 16%的泥蚶

处于 10^0 CFU/mg 数量级, 58%处于 10^1 CFU/mg 数量级, 26%处于 10^2 CFU/mg 数量级; 肝胰腺的弧菌载量为(125.21±123.07) CFU/mg, 12%的泥蚶处于 10^0 CFU/mg 数量级, 44%处于 10^1 CFU/mg 数量级, 44%处于 10^2 CFU/mg 数量级; 血液的弧菌载量为(31 946.00±19 633.84) CFU/mL, 14%的泥蚶处于 10^3 CFU/mL 数量级, 86%处于 10^4 CFU/mL 数量级。在感染后 3 d, 泥蚶体内弧菌载量下降, 鳃、外套膜、闭壳肌的弧菌载量主要分布在 10^0 CFU/mg 数量级, 分别占比 82.0%、72.0%和 68.0%; 肝胰腺弧菌载量主要在

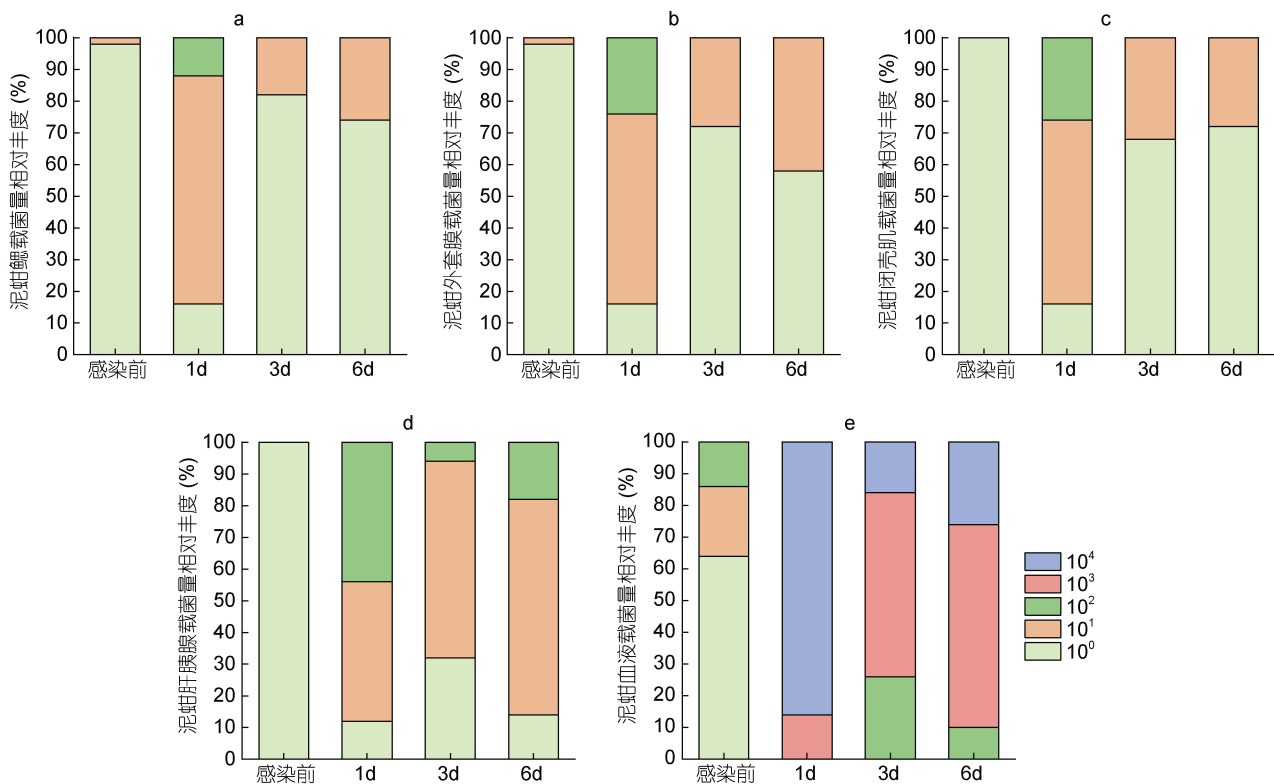


图 3 哈维氏弧菌攻毒过程中泥蚶组织中弧菌载量的分布

Fig.3 The distribution of *Vibrio* load in clam *T. granosa* tissues under *V. harveyi* challenge

注: a. 鳃, b. 外套膜, c. 闭壳肌, d. 肝胰腺, e. 血液

10^1 CFU/mg 数量级, 占比 62.0%; 血液中弧菌载量在 10^2 CFU/mL 数量级占比 26.0%, 在 10^3 CFU/mL 数量级占比 58.0%。在感染后 6 d, 鳃、闭壳肌、外套膜的弧菌载量在 10^0 CFU/mg 较多, 分别占比 74.0%、58.0%、72.0%; 肝胰腺的弧菌载量在 10^1 较多, 占比 68.0%; 血液的弧菌载量在 10^3 较多, 占比 64.0%。

2.4 泥蚶体内弧菌载量与弧菌感染浓度的相关性分析

不同浓度的哈维氏弧菌感染实验结果表明, 在感染 1 d, 随着弧菌感染浓度的增加, 泥蚶肝胰腺中弧菌载量也呈现出升高的趋势, 与对照组相比, 感染组肝胰腺弧菌载量增加了 81.0—667.8 倍, 显著高于对照组, 且与水体中的弧菌含量呈显著的正相关 (Spearman's $\rho=0.762$, $P<0.001$)。在感染 5 d, 四个弧菌浓度感染组泥蚶肝胰腺弧菌载量较 1 d 均明显减少, 除 1×10^5 CFU/mL 感染组外, 其余感染组泥蚶肝胰腺弧菌载量仍然显著高于对照组 ($P<0.05$), 1×10^5 CFU/mL 浓度组 1 d 的弧菌载量是 5 d 的 16.2 倍, 5×10^7 CFU/mL 浓度组 1 d 则为 5 d 的 7.0 倍(图 4)。同时我们统计了不同浓度哈维氏弧菌感染过程中泥蚶的死亡情况(图 5), 发现在 1×10^5 CFU/mL 感染浓度下, 泥蚶未出现死亡; 在 1×10^7 CFU/mL 条件下泥蚶累计死亡率为 $(6.67\pm 2.31)\%$; 在 5×10^7 CFU/mL 条件下泥蚶累计死亡率高达 100%。以上结果表明弧菌感染导致泥蚶死亡是一个阈值性状, 泥蚶健康或死亡与其体内弧菌载量之间的关系有待于进一步研究。

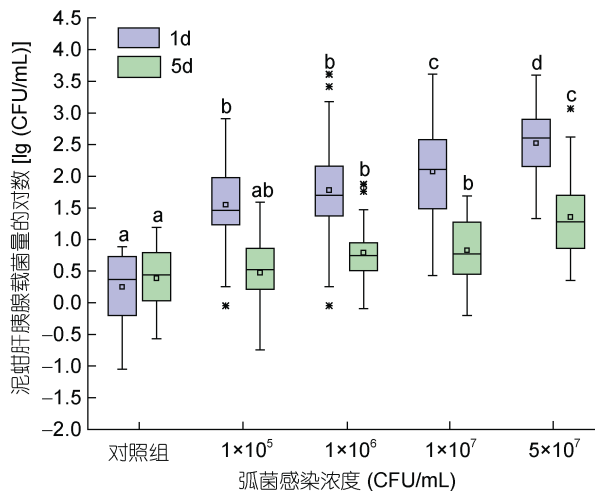


图 4 不同浓度哈维氏弧菌感染后 1 d 和 5 d 泥蚶肝胰腺哈维氏弧菌载量变化

Fig. 4 Bacterial load of *T. granosa* hepatopancreas challenged by different dose of *V. harveyi* at 1- and 5-day post infection
注: 图中含有不同字母表示在同一天弧菌载量之间的差异显著 ($P<0.05$)

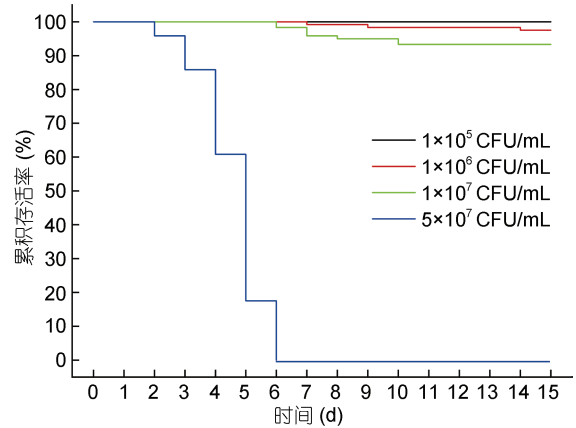


图 5 不同浓度哈维氏弧菌感染下泥蚶存活率

Fig. 5 Survival rate of *T. granosa* challenged by different dose of *V. harveyi*

3 讨论

3.1 攻毒水体中哈维氏弧菌含量的日变化分析

目前, 在水产动物的免疫学研究中, 常常利用外界病原菌刺激的方法来模拟宿主在自然条件下的胁迫环境, 然而宿主体内的病原菌及其含量阈值是激活宿主机体免疫系统的前提条件(王瑞等, 2019)。本研究通过人工浸泡感染的方法模拟自然条件下哈维氏弧菌的感染过程, 获得泥蚶在自然环境死亡相同的症状。为了明确弧菌添加到水体后的生长繁殖规律, 及能否达到预期设定的浓度。本研究采用 TCBS 琼脂培养基平板计数法, 对实验水体中的哈维氏弧菌活菌数量进行计数。弧菌添加到海水后实测的初始浓度与设定浓度基本一致, 证明了弧菌计数标准曲线的准确性。感染组在 0—3 h 弧菌数量呈现下降趋势, 推测可能是泥蚶通过滤食作用, 同时摄食了单胞藻和哈维氏弧菌。经过一段时间的适应, 弧菌开始繁殖, 海水中出现大量泡沫, 水体变得浑浊, 臭味变浓, 因此, 海水中弧菌浓度在 3—6 h 呈现上升的趋势。6 h 后攻毒水体的弧菌数量下降, 可能由于水体中营养物质的消耗以及泥蚶的滤食作用导致。实验过程中, 感染组至少有 1/2 的时间弧菌浓度维持在 1×10^7 CFU/mL, 表明人工浸泡感染实验能很好的模拟泥蚶在自然环境中的弧菌胁迫, 为进一步研究弧菌载量提供了可能。

3.2 弧菌攻毒过程泥蚶不同组织中弧菌载量变化分析

弧菌持续感染泥蚶过程中, 弧菌与宿主细胞间的相互作用, 包括体表吸附、侵袭、体内增殖、产生毒素等(Elston *et al.*, 1980), 会激发宿主的一系列免疫反应。泥蚶不同组织中弧菌载量检测结果, 显示了弧

菌在泥蚶体内增殖、死亡的过程。与感染前泥蚶相比,感染后 1 d 弧菌在各组织中数量显著上升。随着泥蚶细胞免疫和体液免疫系统被激活,吞噬作用、溶酶体降解作用、抗菌肽抑菌作用启动,体内大多数病原弧菌被杀死,因此,感染后 3 d 检测到的弧菌数量迅速下降,后期维持较低水平。王瑞等(2019)在对文蛤(*Meretrix petechialis*)进行副溶血弧菌感染的实验中,也发现了文蛤体内弧菌载量总体变化趋势表现为先急剧上升,后迅速下降,并在后期维持一个较低的水平。Wang 等(2010)利用副溶血弧菌人工感染长牡蛎(*Crassostrea gigas*),结果发现牡蛎各组织的副溶血载量的变化趋势也与本文一致。

贝类致病弧菌的特异性富集组织仍然没有统一的认识,有研究表明副溶血弧菌可在牡蛎(*Tiostrea chilensis*)消化腺(包括肠胃和消化盲囊)和鳃组织中高效富集(Cabello *et al*, 2005),创伤弧菌可在美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)淋巴、闭壳肌和外套膜中大量增殖(Tamplin *et al*, 1992)。本研究发现在哈维氏弧菌感染下,泥蚶鳃、闭壳肌、外套膜、肝胰腺和血液中均能检出弧菌,血液中弧菌载量最高,且显著高于其他组织,不同组织呈现弧菌载量的富集差异性。在感染过程中,泥蚶处于开口状态,外界高浓度的弧菌与泥蚶血窦直接接触,弧菌可能通过扩散作用进入血液中,导致血液中弧菌载量大量富集。外套膜直接接触外界环境,是泥蚶过滤防御细菌、病毒等第一道屏障(周永灿等, 1997);鳃是泥蚶的呼吸摄食器官,直接与水环境接触,具有气体交换与滤食水中颗粒物的作用(陈彩芳等, 2012),在此过程中可能伴随弧菌的侵入。肝胰腺的主要功能是饵料消化,弧菌会随饵料一同被泥蚶摄食,导致肝胰腺中有大量的弧菌累积。闭壳肌的功能是控制泥蚶两壳开合,在外套膜的免疫防线之内(赵丹等, 2020),推测弧菌随体液循环导致闭壳肌中有弧菌被检测到。贝类的细胞免疫和体液免疫协同作用,共同保护机体免受病原体的损害。因此,我们推测泥蚶体内弧菌载量的迅速降低以及弧菌载量的个体差异,可能与机体的免疫应答的强弱有关,这种泥蚶个体水平和不同组织的载菌差异为我们进行免疫抗病性状指标的筛选提供了素材。

3.3 泥蚶体内弧菌载量与弧菌感染浓度的相关性分析

无脊椎动物的免疫防御主要依赖于其先天免疫系统,其中肝胰腺是一个重要的免疫器官(Röszer, 2014)。本研究发现在感染早期,随着水体中弧菌浓度的升高,泥蚶肝胰腺的弧菌载量也随之变高。王瑞等

(2019)在副溶血弧菌感染文蛤的研究中发现与本文相一致的结果,即攻毒前期,文蛤肝胰腺的弧菌载量随攻毒水体中弧菌浓度的升高而升高。不同强度的弧菌对泥蚶的死亡率有极大影响,高浓度组会提前宿主的死亡时间,且导致高死亡率。同样在哈维氏弧菌感染皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)的研究中也发现类似的结果(何婷婷, 2018)。不同强度的病原菌感染导致宿主产生不同程度的免疫响应。例如,用不同浓度灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)感染厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)能引起宿主体内免疫相关因子发生不同程度的变化,导致宿主体内免疫机制响应的差异(梁箫等, 2018)。不同强度的弧菌感染造成泥蚶体内弧菌载量的差异,可能会引起泥蚶免疫系统产生不同程度的响应,最终导致死亡率差异。受到病原侵染的宿主会产生一系列免疫反应,通过水解 ATP,消耗机体能量,产生大量活性氧,免疫反应过强的个体,其活性氧分子在清除外来入侵的病原菌的同时也会对宿主的细胞、组织和器官造成损伤,从而导致宿主生理功能的损伤和免疫系统的破坏,这可能是除了高浓度致病菌对宿主的伤害外,另一个造成宿主高死亡率的原因(Yu, 1994)。

4 结论

本研究通过哈维氏弧菌浸泡感染来模拟泥蚶在自然界的弧菌胁迫环境。采用比浊法获得了哈维氏弧菌的计数标准曲线。通过 TCBS 平板计数对攻毒水体中 24 h 内哈维氏弧菌的浓度进行检测,发现 24 h 内浓度为 1×10^7 CFU/mL 的弧菌感染组有约 1/2 的时间里海水中的弧菌浓度维持在预设浓度。分析了弧菌感染前后不同时间点泥蚶组织中弧菌载量的变化规律,发现泥蚶组织中的弧菌载量呈现先上升,再下降,最后维持较低水平的变化趋势,其中血液中的弧菌载量显著高于其他 4 个组织。采用不同浓度的哈维氏弧菌浸泡感染实验,分析攻毒水体中的弧菌浓度与泥蚶体内肝胰腺弧菌载量的相关性分析,发现 1 d 时各感染组肝胰腺弧菌载量均较对照组显著增加,且与浸泡水体中弧菌浓度呈显著正相关,5 d 时各侵染组肝胰腺弧菌载量均较 1 d 明显降低,但仍然高于对照组。研究结果为泥蚶感染弧菌发病过程中免疫识别及免疫响应机制的研究提供了参考。

参 考 文 献

- 王 瑞, 于佳佳, 王鸿霞等, 2019. 副溶血弧菌攻毒过程中文蛤肝胰腺弧菌载量变化的分析. 海洋科学, 43(4): 29—35
刘文伟, 沈晓盛, 刘承初, 2010. 茶多酚对泥蚶中副溶血性弧

- 菌的抑制效果. 食品与发酵工业, 36(5): 41—44
- 李太武, 李成华, 宋林生等, 2003. 5 个泥蚶群体遗传多样性的 RAPD 分析. 生物多样性, 11(2): 118—124
- 何婷婷, 2018. 哈维氏弧菌胁迫下不同规格皱纹盘鲍和绿盘鲍免疫应答研究. 厦门: 厦门大学硕士学位论文
- 汪青, 2012. 泥蚶血红蛋白克隆、表达与免疫相关性研究. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文
- 沈锦玉, 潘晓芝, 尹文林等, 2009. 大黄鱼细菌性病原哈维氏弧菌培养特性的研究. 生物技术通报, (S1): 232—235
- 张晓华, 林禾雨, 孙浩, 2018. 弧菌科分类学研究进展. 中国海洋大学学报, 48(8): 43—56
- 陈爱平, 2005. 2004 年中国水产养殖病害监测报告(二). 科学养鱼, (10): 53—54
- 陈爱平, 朱泽闻, 王立新等, 2007. 2006 年中国水产养殖病害监测报告(一). 科学养鱼, (7): 48—49
- 陈彩芳, 沈伟良, 霍礼辉等, 2012. 重金属离子 Cd^{2+} 对泥蚶鳃及肝脏细胞显微和超微结构的影响. 水产学报, 36(4): 522—528
- 金珊, 赵青松, 王达根等, 2002. 虾塘养殖泥蚶大规模死亡原因及防治对策. 水产科学, 21(6): 31—32
- 周永灿, 潘金培, 1997. 贝类细胞和体液的防御机制研究进展. 水产学报, 21(4): 449—454
- 赵丹, 周丽青, 吴彪等, 2020. 魁蚶各组织溶菌酶活性对鳃弧菌侵染的响应. 水产学报, 44(3): 480—486
- 钟爱华, 储张杰, 王伟洪等, 2020. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)血细胞转录组序列中免疫相关基因的结构与 mRNA 表达量分析. 海洋与湖沼, 51(2): 354—363
- 梁箫, 张亚, 刘钰珠等, 2018. 灿烂弧菌对厚壳贻贝免疫指标和消化酶活性的影响. 水产学报, 42(9): 1438—1445
- Asplund M E, Baden S P, Russ S *et al*, 2014. Ocean acidification and host-pathogen interactions: blue mussels, *Mytilus edulis*, encountering *Vibrio tubiashii*. Environmental Microbiology, 16(4): 1029—1039
- Bao Y B, Li P F, Dong Y H *et al*, 2013b. Polymorphism of the multiple hemoglobins in blood clam *Tegillarca granosa* and its association with disease resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish & Shellfish Immunology, 34(5): 1320—1324
- Bao Y B, Shen H P, Zhou H S *et al*, 2013a. A tandem-repeat galectin from blood clam *Tegillarca granosa* and its induced mRNA expression response against bacterial challenge. Genes & Genomics, 35(6): 733—740
- Boots M, Bowers R G, 1999. Three mechanisms of host resistance to microparasites-avoidance, recovery and tolerance-show different evolutionary dynamics. Journal of Theoretical Biology, 201(1): 13—23
- Cabello A E, Espejo R T, Romero J, 2005. Tracing *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Tiostrea chilensis*) using a Green Fluorescent Protein tag. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 327(2): 157—166
- Elston R, Leibovitz L, 1980. Pathogenesis of experimental Vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 37(6): 964—978
- Howick V M, Lazzaro B P, 2017. The genetic architecture of defence as resistance to and tolerance of bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. Molecular Ecology, 26(6): 1533—1546
- Murphy F A, 1987. Genetic control of host resistance to infection and malignancy: Emil Skamene, 1985, 848 pages, \$98.00, New York: Alan R. Liss, Inc. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 6(1): 85—86
- Röszer T, 2014. The invertebrate midintestinal gland (“hepatopancreas”) is an evolutionary forerunner in the integration of immunity and metabolism. Cell and Tissue Research, 358(3): 685—695
- Roy B A, Kirchner J W, 2000. Evolutionary dynamics of pathogen resistance and tolerance. Evolution, 54(1): 51—63
- Shao Y Q, Chai X L, Xiao G Q *et al*, 2016. Population genetic structure of the blood clam, *Tegillarca granosa*, along the Pacific coast of Asia: isolation by distance in the sea. Malacologia, 59(2): 303—312
- Shi W, Zhao X G, Han Y *et al*, 2016. Ocean acidification increases cadmium accumulation in marine bivalves: a potential threat to seafood safety. Scientific Reports, 6(1): 20197
- Song D, Lin Z, Fu W *et al*, 2017. Hemoglobin from the blood clam *Tegillarca granosa* (Tg-HbIIA, Tg-HbIIB): expression and antibacterial activity of recombinant proteins. Invertebrate Survival Journal, 14(1): 149—156
- Tamplin M L, Capers G M, 1992. Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of Gulf Coast oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to seawater disinfected with UV light. Applied and Environmental Microbiology, 58(5): 1506—1510
- Wang D P, Yu S J, Chen W Y *et al*, 2010. Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster tissues following artificial contamination and depuration. Letters in Applied Microbiology, 51(1): 104—108
- Yang M H, Chen M L, Liu G S *et al*, 2020a. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding extracellular signal-regulated kinase (ERK) from the blood clam *Tegillarca granosa*. Developmental & Comparative Immunology, 105: 103602
- Yang S, Dong Y T, Aweya J J *et al*, 2020b. Antimicrobial activity and acting mechanism of *Tegillarca granosa* hemoglobin-derived peptide (TGH1) against *Vibrio parahaemolyticus*. Microbial Pathogenesis, 147: 104302
- Yu B P, 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiological Reviews, 74(1): 139—162
- Zha S J, Liu S X, Su W H *et al*, 2017. Laboratory simulation reveals significant impacts of ocean acidification on microbial community composition and host-pathogen interactions between the blood clam and *Vibrio harveyi*. Fish & Shellfish Immunology, 71: 393—398

LOAD VARIATION OF *VIBRIO HARVEYI* IN THE BLOOD CLAM *TEGILLARCA GRANOSA*

YANG Qian-Yuan^{1,2}, TENG Shuang-Shuang², CAI Yi-Long², XIAO Guo-Qiang^{1,2}, CAI Xi-Li³

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Zhejiang Mariculture Research Institute; Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bioresource; Wenzhou Key Laboratory of Marine Biological Genetics and Breeding, Wenzhou 325005, China; 3. Pingyang Agriculture and Rural Bureau of Zhejiang Province, Pingyang 325499, China)

Abstract To understand the variation detail of bacterial load in different tissues of the blood clam *Tegillarca granosa* (including gill, mantle, adductor, hepatopancreas, and blood) under *Vibrio harveyi* challenge, a *V. harveyi* immersion experiment was conducted and the standard curve of *V. harveyi* concentration was established by turbidimetric method, from which the dynamic relationship between the bacterial growth and reproduction in seawater under *Vibrio* challenge in 24 h was described, the bacterial load of the blood clam tissues was calculated, and the relationship between the *Vibrio* load in hepatopancreas and the immersion different concentrations (1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 CFU/mL) of *Vibrio* in seawater was specified. The results showed that the *Vibrio* load in the clam blood was significantly higher than in other tissues under the concentration of 1×10^7 CFU/mL. The bacterial load in the tissues was increased at first, then decreased, and finally stayed at a low level. The *Vibrio* load in the blood was decreased to 10^2 — 10^4 CFU/mL, and the *Vibrio* load in other tissues was decreased to 10^0 — 10^2 CFU/mg. Under different *Vibrio* concentrations, the *Vibrio* load in the hepatopancreas increased significantly on Day 1, which was 81.0—667.8 times of that of the control. Correlation between the bacterial load and the *Vibrio* dose in the seawater was significantly positive (Spearman's $\rho=0.762$, $P<0.001$). The bacterial load in the hepatopancreas was obviously decreased on Day 5, which was still higher than that of the control. This study provided a reference for the immune recognition and response during pathogenesis by *Vibrio* infection in *T. granosa*.

Key words *Tegillarca granosa*; *Vibrio harveyi*; *Vibrio* load; immune resistance