

福建牡蛎致病菌沙氏弧菌的分离鉴定及全基因组分析

葛辉¹,李慧耀¹,巫旗生¹,宁岳¹,祁剑飞¹,温凭¹,郭香¹,潘洁茹²,
吴丽云¹,王为刚³,王晓伟⁴,李苗苗⁵,戴燕彬⁶,林向阳¹,林琪^{1*}

(1. 福建省水产研究所,福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室,福建 厦门 361013;2. 福州市疾病预防控制中心,福建 福州 350209;3. 连江县水产技术推广站,福建 福州 350599;4. 福建海洋职业技术学校,福建 宁德 355212;
5. 福建省水产技术推广总站,福建 福州 350025;6. 漳州市水产技术推广站,福建 漳州 363099)

摘要: [目的] 对患病福建牡蛎(*Crassostrea angulata*)幼虫进行病原分离鉴定和全基因组测序,以期对牡蛎细菌性疾病的预防和治疗提供科学依据。[方法] 采用平板分离法进行病原微生物的分离纯化,结合形态学、生理生化特征和分子生物学对病原进行种属鉴定,并对分离得到的病原菌进行基因组测序和药物敏感性试验。[结果] 从患病牡蛎幼虫分离纯化获得优势菌株 M05,通过外观形态、生理生化特征和 16S rRNA 基因测序判定为沙氏弧菌(*Vibrio chagasii*)。回归感染试验证实其可引起牡蛎幼虫发病死亡。基因组测序分析表明,M05 菌株携带副定殖因子基因 *AcfB*、溶血素基因和 II 型分泌途径基因 *EpsD* 等毒力基因;此外,菌株本身及其携带的质粒中含有大量耐药基因,药物敏感性试验结果显示菌株对环丙沙星、替加环素和碳青霉烯类抗生素较敏感,对青霉素类、氨基糖苷类和头孢类抗生素均具有较强的耐药性。[结论] 沙氏弧菌 M05 携带多种致病因子,可引起福建牡蛎幼虫感染,且对多种抗生素具有耐药性,研究结果可为福建牡蛎幼虫病害防控提供科学依据。

关键词: 水产养殖;福建牡蛎;沙氏弧菌;全基因组分析;药物敏感性试验

中图分类号:P735

文献标志码:A

文章编号:0438-0479(2025)05-0839-10

Isolation, identification, and whole-genome analysis of *Vibrio chagasii*, a pathogenic bacterium in *Crassostrea angulata*

GE Hui¹, LI Huiyao¹, WU Qisheng¹, NING Yue¹, QI Jianfei¹, WEN Ping¹, GUO Xiang¹,
PAN Jieru², WU Liyun¹, WANG Weigang³, WANG Xiaowei⁴, LI Miaomiao⁵,
DAI Yanbin⁶, LIN Xiangyang¹, LIN Qi^{1*}

(1. Fisheries Research Institute of Fujian, Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Xiamen 361013, China; 2. Fuzhou Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou 350209, China;
3. Aquaculture Technology Promotion Station of Lianjiang County, Fuzhou 350599, China; 4. Fujian Ocean Vocational School, Ningde 355212, China; 5. Aquaculture Technology Promotion Station of Fujian Province, Fuzhou 350025, China; 6. Zhangzhou Aquaculture Technology Promotion Station, Zhangzhou 363099, China)

Abstract: [Objective] *Crassostrea angulata* has become the most important oyster breed variety in the Fujian region due to its advantages of high yield, thin shell, and fast growth. The microbial composition of oysters is highly susceptible to the influence of the

收稿日期:2024-04-01 录用日期:2025-09-05

基金项目:“十四五”农业农村部国家贝类产业技术体系厦门综合试验站现代农业产业技术体系建设专项(CARS-9);现代农业产业技术体系建设专项(nycytx-49);国家海洋水产种质资源库项目;福建省海洋服务与渔业高质量发展专项(FJHY-YYKJ-2024-1-13);海洋与渔业综合服务专项(FYZF-KTYJ-2025-10, FYZF-BHZZL-2025-2)

*通信作者:251217482@qq.com

引文格式:葛辉,李慧耀,巫旗生,等.福建牡蛎致病菌沙氏弧菌的分离鉴定及全基因组分析[J].厦门大学学报(自然科学版),2025,64(5):839-848.

Citation: GE H, LI H Y, WU Q S, et al. Isolation, identification, and whole-genome analysis of *Vibrio chagasii*, a pathogenic bacterium in *Crassostrea angulata* [J]. J Xiamen Univ Nat Sci, 2025, 64(5): 839-848. (in Chinese)



aquaculture environment due to their filter feeding habits, which in turn can affect their own health. Pathogenic *Vibrio* is the main bottleneck in shellfish farming, and the economic losses caused by diseases in shellfish farming reach ten billions of yuan every year. In recent years, with the expansion of aquaculture scale, especially the rapid growth of triploid oyster aquaculture area, the incidence of oyster vibriosis has increased, posing a serious threat to the aquaculture industry. The aim of this study is to identify the pathogen that causes juvenile onset disease in *C. angulata*. [Methods] The process of isolating and purifying pathogenic microorganisms began with the plate separation method, which ensured the purity of the samples. Rigorous identification procedures were then carried out, including detailed morphological, physiological and biochemical analyses, followed by molecular biology techniques for greater precision. Additionally, genome sequencing was performed to gain insights into the genetic makeup of these pathogens, and drug sensitivity testing was conducted to determine their resistance or susceptibility to various therapeutic agents. [Results] The investigation revealed significant findings on the pathogenic strain M05 isolated from diseased oysters. The strain, which has a short rod morphology, was successfully isolated and purified. Its identification was comprehensive, involving not only a visual examination of its appearance but also a thorough analysis of its physiological and biochemical characteristics. In addition, 16S rRNA gene sequencing confirmed its classification as *Vibrio chagasii*. A crucial step in validating its pathogenicity was the regression infection test, which showed that the M05 strain could indeed induce disease and lead to the death of oyster larvae. Genomic sequencing analysis provided further insights into the virulence of the M05 strain. The presence of virulence genes such as the colonisation factor *AcfB*, haemolysin gene and the type II secretion pathway gene *EpsD*, which facilitate bacterial invasion and infection. On the other hand, numerous resistance genes were also identified in the genome and plasmid of the bacterial strain. These resistance genes posed a challenge in the treatment of infections caused by this strain. Drug sensitivity testing revealed that the M05 strain is relatively sensitive to antibiotics such as ciprofloxacin, tigecycline, and carbapenem, but highly resistant to antibiotics belonging to the penicillin, aminoglycoside, and cephalosporin classes. This information is crucial for developing effective treatment strategies against infections caused by *V. chagasii*. [Conclusion] The discovery of *V. chagasii* strain M05, which harbors numerous pathogenic factors, underlines its potential threat to oyster larvae. Capable of causing infection and subsequent mortality in these fragile organisms, this bacterium poses a significant challenge to the aquaculture industry. Its resistance to multiple antibiotics further complicates the problem and limits the effectiveness of traditional treatments. The research findings on *V. chagasii* M05 provide critical scientific evidence for the prevention and control of *C. angulata* disease. Understanding the pathogenic mechanisms and antibiotic resistance patterns of this bacterium is essential for developing targeted strategies to protect the health of oyster populations and ensure the sustainability of oyster aquaculture.

Keywords: aquaculture; *Crassostrea angulata*; *Vibrio chagasii*; genome-wide analysis; drug sensitivity analysis

贝类增养殖是海水养殖的支柱产业之一,具有重要的社会、经济及生态效益。福建省是全国贝类苗种生产和养殖的核心基地,贝类育苗产量居于全国首位,贝类养殖在全国养殖产量占比超过 20%,且其贡献比例在逐年增加^[1-2]。福建省贝类养殖主要以牡蛎为主,其年均产量占比超过 60%^[2]。福建牡蛎(*Crassostrea angulata*)在我国主要分布在福建、浙江、广东、广西等长江以南沿海地区,由于其具有产量高、壳薄及生长快等优势,成为福建地区最重要的牡蛎养殖品种^[3]。

我国的海水养殖贝类多为双壳、滤食性、不投饵种类,受滤食习性影响,体内微生物构成极易受养殖环境的影响,进而影响自身的健康状况,每年养殖贝类因病害导致的经济损失高达上百亿元^[4-5]。贝类病害依据其致病机制不同,可分为病原性病害与环境胁迫性病害两大类^[5]。病原性病害主要包括脓胞病、疱疹病毒病和黏孢子虫病等,由细菌、病毒及寄生虫等病原体所致^[6-7]。致病性弧菌病是双壳类动物育苗过

程中的主要瓶颈^[3],患病贝类幼虫主要表现为活动能力下降,随后大量死亡,成熟个体会出现外套膜萎缩、组织溃烂等症状^[8-9]。许多不同的弧菌种类会导致养殖牡蛎感染弧菌疾病,通过幼虫活体检查及组织学分析发现,组织坏死、消化系统器官的病理脂质沉积是弧菌病特征之一^[10]。研究表明致病性弧菌还能与牡蛎疱疹病毒 OsHV-1 协同作用,导致牡蛎大规模死亡^[11]。近年来随着三倍体牡蛎养殖技术的兴起与广泛推广,三倍体牡蛎育苗与养殖迅速扩张,但牡蛎育苗厂频繁出现幼虫规模性死亡现象,对蓬勃发展的牡蛎养殖产业构成了严峻挑战,严重影响养殖效益与产业的可持续发展。

本研究针对福建牡蛎苗种培育过程中出现大规模苗种死亡现象,通过平板分离法从患病牡蛎幼虫中分离得到一株优势菌,结合形态学特征、生理生化和分子生物学技术进行鉴定,并对分离得到的菌株进行全基因组测序分析和药物敏感性试验,以期对牡蛎弧菌病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细菌分离纯化

患病福建牡蛎幼虫采集自福建省漳州市漳浦县,采样时水温 28 °C,幼虫发育阶段为壳顶幼虫初期,长度 110~120 μm ,整体死亡率超过 80%,通过光学显微镜观察发现牡蛎幼虫出现空肠现象,未观察到寄生虫.使用无菌采样袋将牡蛎幼虫转移至实验室,用 75%(体积分数)乙醇对样品进行表面消毒 1 次,用无菌海水漂洗 3 次后与适量无菌海水混合置于无菌袋中匀浆,匀浆液梯度稀释后涂布于海生细菌培养基 2216E 和硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐蔗糖琼脂培养基(TCBS)平板,并置于 28 °C 下恒温培养 24 h.培养完成后挑取单菌落在 TCBS 平板上进行划线纯化 3 次.纯化后的菌种采用 20%(体积分数)丙三醇保存于一80 °C 冰箱.

1.2 形态学观察

将分离株在 2216E 平板上进行划线纯化,28 °C 恒温培养 12 h,使用无菌牙签轻轻刮取平板上的菌落,并重悬于无菌磷酸盐缓冲液(PBS)中,将铜网置于菌悬液中 5 min,转移到 2.5%(体积分数)戊二酸中固定 5 min,用无菌去离子水清洗铜网 2 次,于 1%(体积分数)钨酸中染色 1 min,自然干燥,使用电子显微镜观察细菌形态.

1.3 回归感染

取对数生长期分离菌 3 000 r/min 离心 5 min,用无菌生理盐水(质量分数 0.9% NaCl 溶液)重悬并调整至浓度约 1.6×10^9 CFU/mL(CFU 表示菌落形成单位),采用浸泡法进行回归感染.实验用天然海水经二氧化氯消毒并曝气 1 d,健康牡蛎幼虫取自福建省漳浦县,将牡蛎幼虫密度调整为约 3 mL^{-1} ,分装于 6 个玻璃缸中,每个玻璃缸 10 L 水体,并添加适量小球藻(*Chlorella vulgaris*).实验设 1 个实验组和 1 个对照组,每组设置 3 个平行.实验组添加 1 mL 菌液,攻毒浓度约 1.6×10^5 CFU/mL;对照组添加 1 mL 生理盐水.实验过程全程曝气,水温 28 °C.每隔 4 h 取 50 mL 水体用 300 目筛绢网收集牡蛎幼虫并在显微镜下(100 \times)观察存活个体并计数,观察 24 h 后挑取发白个体进行病原菌重分离.

1.4 系统发育分析

细菌基因组提取按照细菌基因组提取试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司)说明书步骤进行,使用 27F/1492R 引物对扩增细菌 16S rRNA 基因序

列^[12].PCR 反应体系为:2 \times Taq Master Mix(Vazyme) 12.5 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ,基因组 DNA 1 μL ,ddH₂O 9.5 μL .反应条件如下:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min;72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存.反应循环 35 次,反应体系 50 μL .反应产物交由厦门铂尚生物技术有限公司进行测序.通过 BLAST 从 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) GenBank 下载沙氏弧菌(*Vibrio chagasii*)和其他弧菌菌株的参考序列,并使用 Mega7.0 软件(邻接法)对测序所得序列进行系统发育分析.

1.5 生理生化表型及药物敏感性分析

采用 VITEK2 Compact 全自动细菌鉴定系统,对目标细菌进行生理生化表型鉴定及最小抑菌质量浓度(MIC)测定.首先,将分离菌接种于 TCBS 平板上,于 28 °C 下培养 18 h 后挑选单一、典型的菌落,溶解于 0.45%(质量分数)NaCl 溶液中,并利用比浊仪(梅里埃 DensiCHEK™)精确调整悬液浊度至 0.5 McF(麦氏浊度单位);然后将预置的生化鉴定与药敏测试卡片按顺序置于载卡架上,通过自动化系统将处理好的菌液引入卡片,启动 VITEK2 Compact 进行自动检测^[13].

1.6 全基因组测序分析

使用细菌基因组提取试剂盒提取细菌基因组 DNA,并交由广州基迪奥生物科技有限公司采用三代 ONT 和二代 Illumina 两种技术相结合的方式全基因组测序及分析.采用 Fastp 软件基因组对 Illumina 测序数据进行质量控制,去除含有接头、N 质量分数 > 10% 和质量值 $Q \leq 20$ 的碱基数占整条 reads 50% 以上的 reads^[14].使用三代 ONT 测序数据进行基因组组装,并使用 Illumina 数据对组装结果进行校正^[15].基于校正后的组装结果进行基因组的组分分析和功能注释^[16].

2 结果与分析

2.1 细菌分离培养及回归感染分析

从患病牡蛎幼虫分离得到优势菌株 M05,其在 TCBS 平板上呈黄色圆形菌落,不透明,表面光滑湿润,边缘整齐,直径 1~2 mm,边缘整齐[图 1(a)].电子显微镜观察结果显示,分离菌株呈短杆状[图 1(b)].回归感染牡蛎幼虫在显微镜下苗体发白,无摄食现象[图 2(a)],与养殖场发病幼虫一致,对照组牡蛎幼虫正常存活[图 2(b)],实验组牡蛎幼虫 24 h 后死亡率达到 60% 以上[图 2(c)].回归感染后发病的牡蛎幼虫

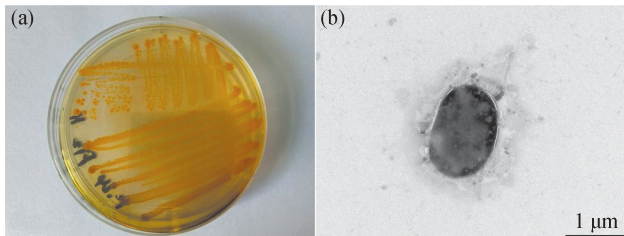


图 1 分离菌 M05 的菌落形态(a)和电镜图(b)

Fig. 1 Characteristics of colony morphology (a) and electron microscopy image (b) of isolated bacterium M05

中分离得到的菌株经 16S rRNA 测序鉴定与感染菌株一致(GenBank 登录号:PQ157627).

2.2 分离菌株测序与系统发育分析

经测序获得分离菌株 M05 的 16S rRNA 核苷酸序列与 GenBank 下载的基因序列进行系统发育分析,结果显示分离菌株与沙氏弧菌聚为一类,聚类置信度为 100%(图 3),进一步表明分离得到的 M05 菌株为沙氏弧菌.

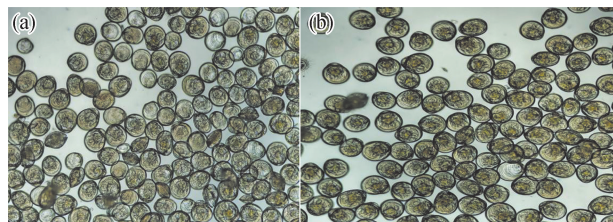


图 2 感染(a)和健康(b)牡蛎幼虫形态及回归感染死亡率(c)
Fig. 2 Morphologies of infected (a) and healthy (b) *C. angulata* larval and mortality (c) in regression infection experiments

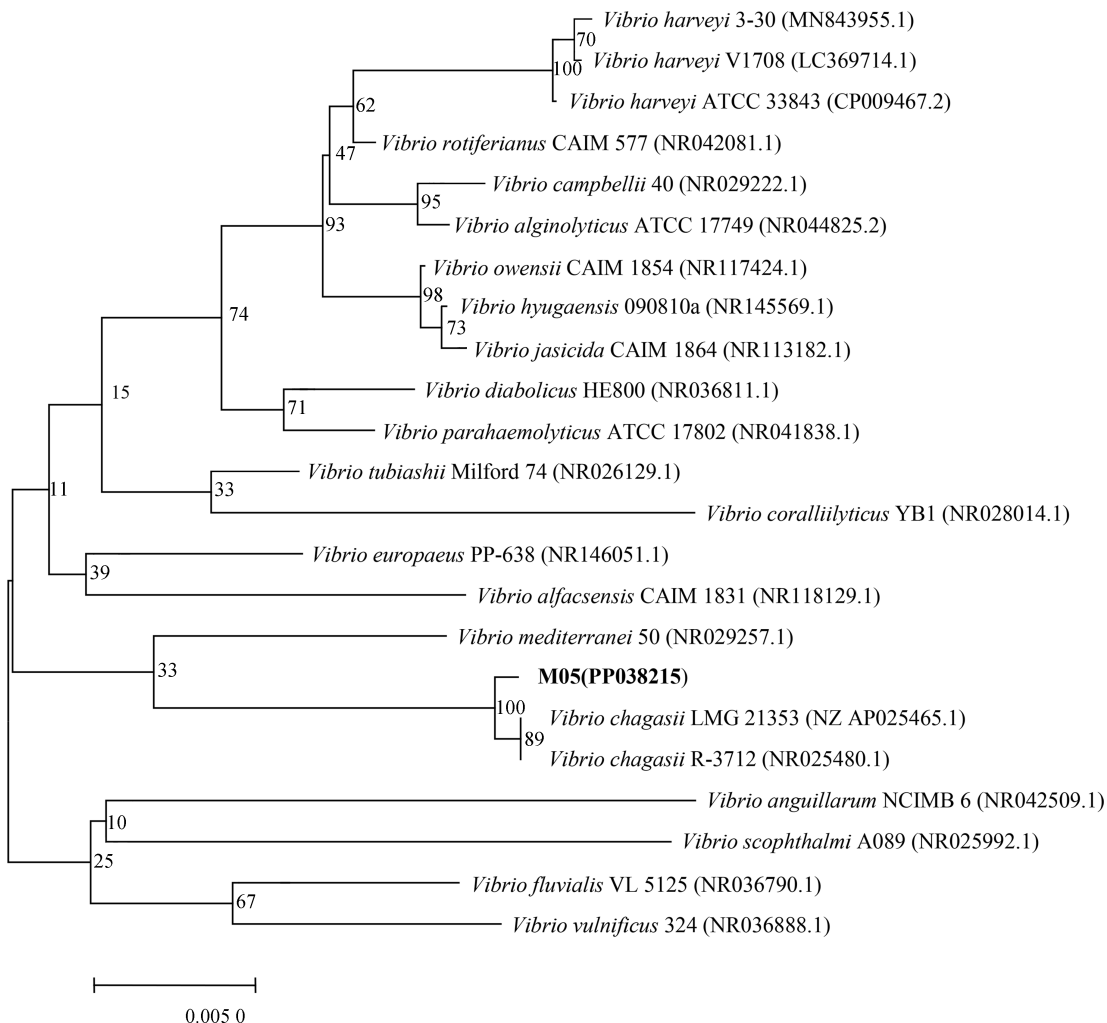
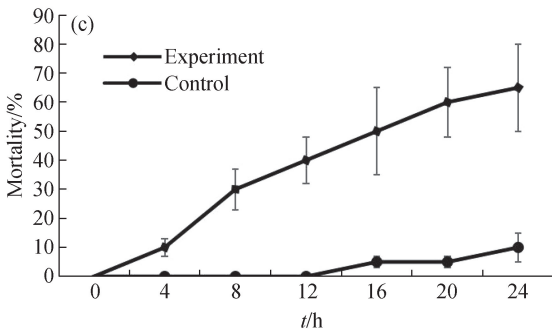


图 3 沙氏弧菌 16S rRNA 核苷酸序列的系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic relationship between the nucleotide sequences of 16S rRNA of *V. chagasii*

2.3 生理生化鉴定结果

分离菌株的生理生化特征鉴定结果显示(表 1):菌株对 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、L-脯氨酸芳胺酶、 β -N-乙酰氨基半乳糖苷酶、磷酸酶和谷氨酸-甘氨酸-精氨酸芳胺酶的反应呈阳性,对葡萄糖、麦芽糖等其他反应均呈阴性。

表 1 分离菌株的生理生化特征

Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of the isolated strain

测定项目	反应结果	测定项目	反应结果
丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶	—	β -N-乙酰氨基半乳糖苷酶	+
侧金盏花醇	—	丙二酸盐	—
吡咯烷酮芳胺酶	—	5-酮基-D-葡萄糖酸盐	—
阿拉伯醇	—	L-乳酸盐碱化	—
纤维二糖	—	α -葡萄糖苷酶	—
β -半乳糖苷酶	—	琥珀酸盐碱化	—
H ₂ S 生成	—	柠檬酸盐(钠)	—
β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶	+	α -半乳糖苷酶	—
谷氨酰芳胺酶 pNA	—	磷酸酶	+
葡萄糖	—	甘氨酸芳胺酶	—
谷氨酰转移酶	—	鸟氨酸脱羧酶	—
发酵/葡萄糖	—	赖氨酸脱羧酶	—
β -葡萄糖苷酶	—	脱羧酶基础	—
D-麦芽糖	—	L-组氨酸同化	—
D-甘露醇	—	香豆酸	—
D-甘露糖	—	β -葡萄糖醛酸酶	—
β -木糖苷酶	—	O/129 耐药	—
β -丙氨酸芳胺酶	—	L-苹果酸盐同化	—
L-脯氨酸芳胺酶	+	ELLMAN	—
脂肪酶	—	L-乳酸盐同化	—
古老糠	—	蓝糖	—
酪氨酸芳胺酶	—	D-堪格糖	—
尿素酶	—	D-海薄桐	—
D-山梨醇	—	谷氨酸-甘氨酸-精氨酸芳胺酶	+

注: + 表示阳性、- 表示阴性。ELLMAN: Ellman 试剂法测定巯基或相关酶活性的生化检测指标。

2.4 药物敏感性分析

抗生素药物敏感性检测结果如表 2 所示,分离菌株

对呋喃妥因和氨基曲南表现出极高的耐药性, MIC 分别为 32 和 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。环丙沙星对分离菌株的 MIC 最低, 为 0.062 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其次是美罗培南, MIC 为 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 2 抗生素药物敏感性检测结果

Tab. 2 Results of antibiotic susceptibility determination

抗生素类别	药物名称	MIC/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
青霉素类	氨苄西林	2
	氨苄西林-舒巴坦	1/0.5
头孢类	头孢噻肟	1
	头孢西丁	2
	头孢他啶	8
四环素类	四环素	1
	替加环素	0.25
磺胺类	甲氧苄啶-磺胺甲恶唑	0.5/9.5
多肽类	黏菌素	1
大环内酯类	阿奇霉素	8
喹诺酮类	环丙沙星	0.062 5
	萘啶酮酸	4
氨基糖甙类	链霉素	4
	阿米卡星	4
酰胺醇类	氯霉素	4
硝基呋喃类	呋喃妥因	32
β -内酰胺类	氨基曲南	16
	碳青霉烯类	厄他培南
	亚胺培南	0.25
	美罗培南	0.125

注: 联合用药以“A-B”表示, 并用 a/b 表示药物 A、B 的 MIC(a 对应 A, b 对应 B)。

2.5 全基因组测序分析

2.5.1 基因组概况

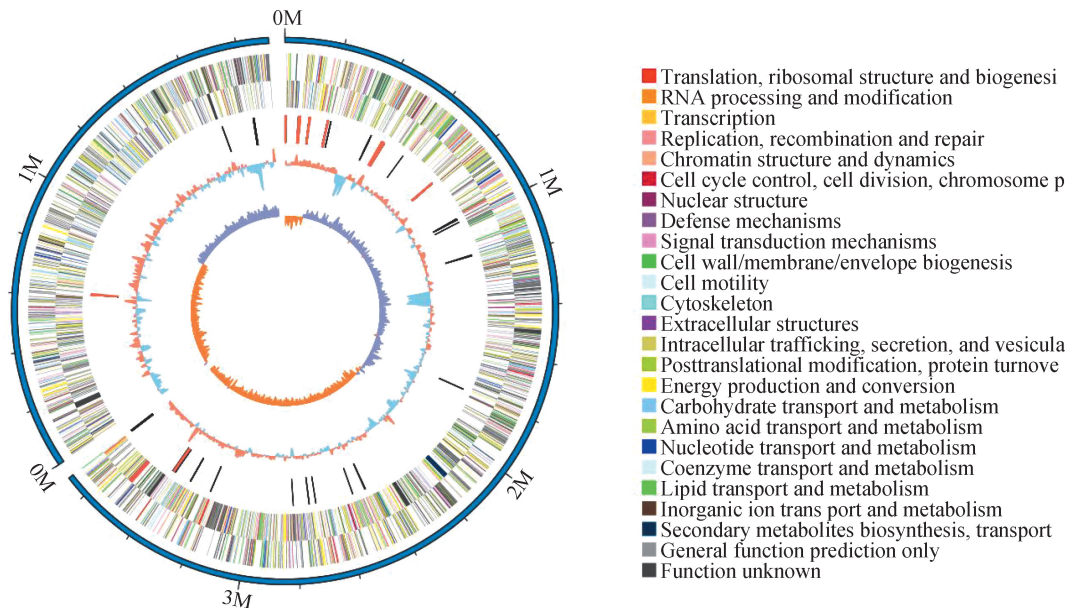
沙氏弧菌 M05 基因组大小为 5 585 575 bp, GC 含量 44.42%, 编码基因 4 844 个, 其中包括分泌蛋白编码基因 483 个, 细菌毒素分泌系统(TNSS)效应蛋白编码基因 10 个。基因组圈图如图 4 所示。此外, M05 菌株包含 3 个质粒, 大小分别为 332 018, 89 375 和 41 562 bp, 编码基因数分别为 352, 59 和 40 个。基因组组装数据 GenBank 登录号: CP125664~CP125668。

2.5.2 基因功能注释

沙氏弧菌 M05 基因组在 Gene Ontology(GO)数据库中共注释基因 4 827 个, 功能分类统计结果显示

(图 5):在生物过程部分,基因主要分布在细胞过程、代谢过程、定位和对刺激的响应等功能分类中;在细胞组分部分,基因主要分布在细胞膜、细胞膜组件、大

分子复合物和细胞器等功能分类中;在分子功能部分,基因主要分布在催化活性、结合、转运活性和核酸结合转录因子活性等功能分类中。



最外圈是基因组序列位置坐标,由外圈到里圈分别为:正链基因、负链基因、非编码 RNA(黑色表示 tRNA,红色表示 rRNA)、GC 含量(红色表示大于均值,蓝色表示小于均值)、GC 偏移(用来衡量 G 和 C 的相对含量,用于环状染色体中标记起点和终点;GC 偏移=(G 含量-C 含量)/(G 含量+C 含量);紫色表示大于 0,橙色表示小于 0)。

图 4 基因组圈图

Fig. 4 Genome circle map

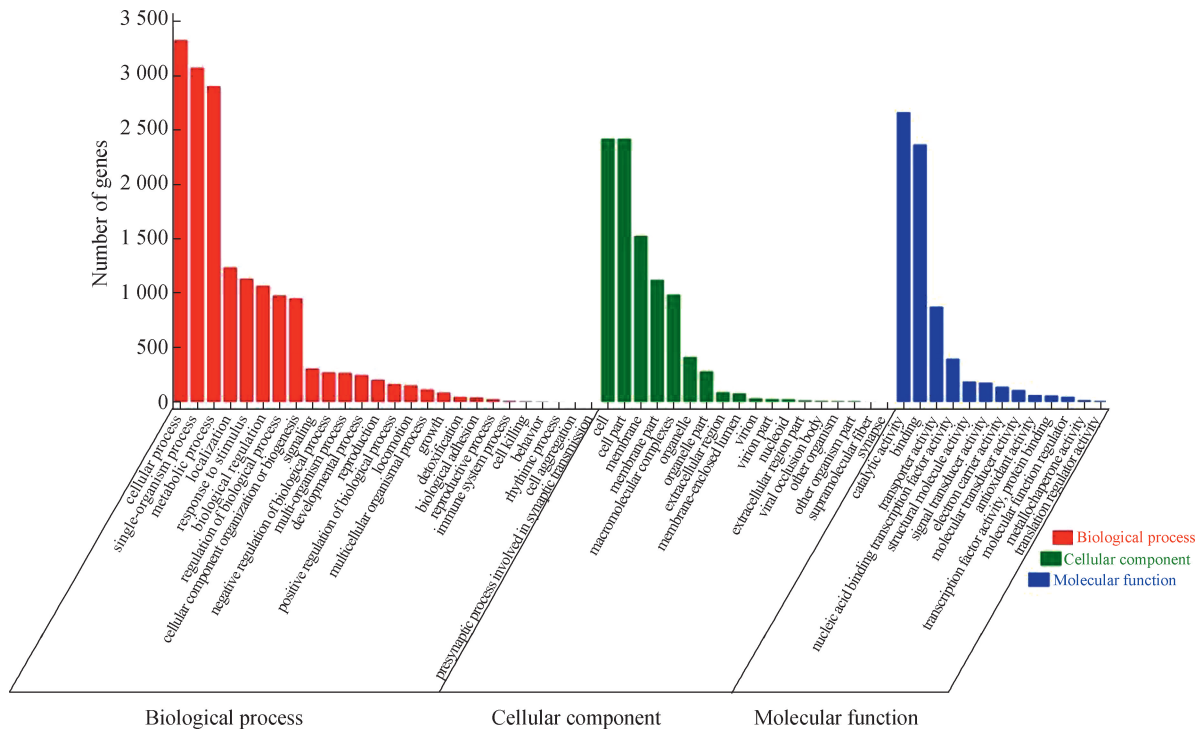


图 5 GO 功能注释图

Fig. 5 GO functional annotation diagram

M05 基因组在 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库注释到 2 789 个基因, 分布于 131 个通路, 主要富集在碳水化合物代谢、氨基酸代谢、辅因子和维生素的代谢、翻译、复制和修复、膜传输、信号传导、细胞群落和细胞运动性等通路中 (图 6)。

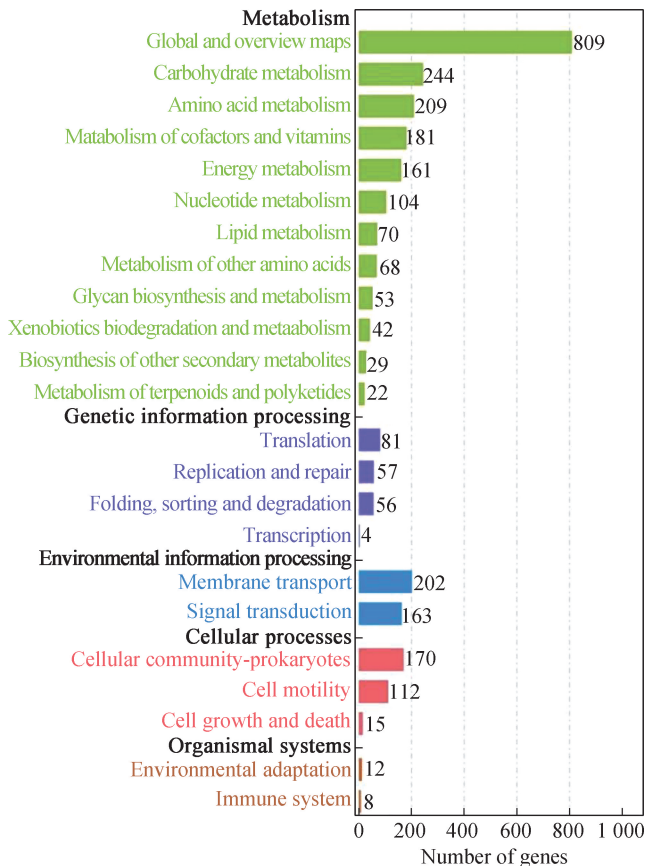


图 6 KEGG 功能注释图

Fig. 6 KEGG functional annotation diagram

2.5.3 毒力基因分析

M05 基因组在 VFDB (Virulence Factors of Pathogenic Bacteria) 数据库注释到 10 个基因片段, 对应 4 种毒力基因, 分别为 AHML_18530-溶血素、ASA_0824-膜蛋白、sigma54 特异性转录调控因子的编码基因和 II 型分泌途径基因 *EpsD*, 以及质粒 1 含毒力基因副定殖因子 *AcfB* 基因。

2.5.4 耐药性与抗性基因分析

M05 菌株基因组及质粒 1 和 3 包含的抗性基因如表 3 所示: 其中 *gidB* 与氨基糖苷类抗生素抗性相关; *cya* 与磷霉素抗性相关; ABC antibiotic efflux pump 与林可酰胺抗生素抗性相关; EF-Tu 与埃夫霉素抗生素抗性相关; *gyrB* 与氨基香豆素类抗生素抗

性相关; ABC-F ribosomal protection protein 与大环内酯类抗生素、林可酰胺抗生素、链菌素抗生素、四环素抗生素、恶唑烷酮类抗生素、氯霉素抗生素和胸膜菌素抗生素抗性相关; *fusA* 与夫西地酸抗性相关; *ethA* 与乙硫异烟胺抗性相关。

3 讨论与结论

弧菌病是导致水生动物大规模死亡的主要疾病, 已成为贝类育苗生产的主要威胁之一^[17-18]。患弧菌病的贝类幼虫染病过程相似, 可观察到患病幼虫失去活动能力, 随后大量死亡, 但致病菌种类多样^[19]。最常见的导致贝类幼体死亡的弧菌包括灿烂弧菌 (*V. splendidus*)、河口弧菌 (*V. aestuarianus*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 和溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 等^[10]。沙氏弧菌是水产养殖病原菌之一, 可引起虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 贝柱脓胞病^[20]; 对紫扇贝 (*Argopecten purpuratus*) 幼虫和厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 也具有致病性^[21-22]; Fabbro 等^[23] 在患病的银带真银汉鱼 (*Atherina boyeri*) 皮肤表面鉴定到沙氏弧菌; 但沙氏弧菌未被报道会导致牡蛎幼虫死亡。本研究从患病福建牡蛎幼虫中分离得到沙氏弧菌 M05 菌株, 并通过回归感染试验证明其致病性, 扩大了沙氏弧菌的天然宿主范围。

细菌的毒力基因与其致病性密切相关, 毒力基因可在不同菌株之间转移, 导致菌株毒力基因的传播与扩散^[24]。从生物被膜中分离的沙氏弧菌菌株携带 23 个毒力基因, 包括溶血素基因、外膜蛋白基因 *OmpW*、铁摄取调控蛋白基因 *fur* 等, 能够引起成年贻贝的感染^[22]; 已有研究从养殖鲷鱼 (*Sparus aurata*) 苗体中分离出的沙氏弧菌检测到与毒力、疾病和防御相关的各种基因, 包括参与霍乱毒素生物合成、有毒化合物、主动宿主入侵和细胞内抗性的基因^[25]; 紫扇贝中分离的沙氏弧菌菌株携带的毒力因子包括金属蛋白酶、溶血素和胞外多糖 II 型分泌系统等^[13]。本研究中分离的沙氏弧菌 M05 菌株携带的毒力基因有溶血素、膜蛋白、sigma54 特异性转录调控因子的编码基因和 II 型分泌途径基因 *EpsD*, 以及副定殖因子 *AcfB* 基因。溶血素基因是常见的细菌毒力基因, 在水产常见致病性弧菌中广泛分布^[26-30]。膜蛋白是细胞控制物质进出的关键, 可能作为细胞控制毒素分泌的关键因子^[31]。sigma54 特异性转录调控因子负责细胞应激信号相关的基因转录起始^[32], 受 sigma54 调控的基因在鞭毛合成、细菌趋化性和双组分系统组中显著富集, 而这些基

表 3 抗性基因及对应的抗生素类别
Tab. 3 Resistance genes and corresponding antibiotic categories

抗性基因位置	抗性基因/蛋白名称	对应的抗生素类别
M05 基因组	<i>gidB</i>	氨基糖苷类
	<i>cya</i>	磷霉素
	ATP-binding cassette (ABC) antibiotic efflux pump	林可酰胺
	Elongation factor (EF)-Tu	埃夫霉素
	<i>gyrB</i>	氨基香豆素类
	ABC-F ribosomal protection protein	大环内酯类、林可酰胺、链菌素、四环素、恶唑烷酮类、氯霉素、胸膜菌素
	<i>fusA</i>	夫西地酸
	<i>ethA</i>	乙硫异烟胺
质粒 1	<i>aftA</i>	多胺
	<i>murA</i>	磷霉素
	<i>gyrA</i>	喹诺酮类
	Penicillin-binding protein mutations conferring resistance to β -lactam antibiotics	头孢菌素、头霉素、青霉烷
	<i>katG</i>	异烟肼
	resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	大环内酯类、氟喹诺酮类、内酰胺类、碳青霉烯类、头孢菌素、头霉素、青霉烷、四环素类、抗菌肽、氨基香豆素类、二氨基嘧啶类、磺酰胺类、氯霉素
质粒 3	MCR phosphoethanolamine transferase	抗菌肽
	TRU β -lactamase	头孢菌素、青霉烷
	subclass B3 PEDO β -lactamase	碳青霉烯类
	tetracycline-resistant ribosomal protection protein	四环素类
	<i>rpoB</i>	利福霉素
	RND antibiotic efflux pump	大环内酯类、氟喹诺酮类、内酰胺类、碳青霉烯类、头孢菌素、头霉素、青霉烷、四环素类、抗菌肽、氨基香豆素类、二氨基嘧啶类、磺酰胺类、氯霉素

因在细菌表面附着、运动性、生物膜形成以及致病性中起重要作用^[33]. EPS II 型分泌系统广泛存在于格兰氏阴性细菌中,是一个双跨膜的蛋白质分泌系统,其与周质丝状假菌毛、十二体外膜复合物和细胞质分泌 ATP 酶的相互作用来协调分泌过程^[34],EPS II 型分泌系统参与肠毒素、外毒素 A 和造孔毒素等的分泌^[35-37]. 副定殖因子 *AcfB* 基因编码一个外排泵的组分,是 III 型分泌系统的组成成分,该外排泵能够将细菌的毒力因子分泌至宿主细胞内,从而促进细菌的感染和致病,*AcfB* 基因在辅助细胞的定殖和生物膜形成中起关键作用^[38-39].

回归感染试验表明沙氏弧菌 M05 菌株感染牡蛎幼虫 24 h 致死率可达到 60%,与从紫扇贝中分离的 VPAP40 菌株相近,而高于 VPAP36 菌株^[26],表明 M05 菌株具有较强的致病性. 弧菌感染贝类幼虫的方式主要是弧菌细胞被幼虫摄食,通过食道进入消化系统,定殖在消化腺,并迅速扩展到周围器官,最终完全定殖在幼虫体内^[40-41]. M05 菌株携带的定殖因子和溶血素等毒力因子有助于其在牡蛎体内定殖并导致疾病的发生.

在外部环境的选择压力下,细菌可通过基因水平转移或突变等方式获得新的耐药性^[42]. 本研究分离的

沙氏弧菌携带多种耐药性相关基因,其中包括常见的头孢类、氨基糖苷类、四环素类和喹诺酮类等的抗性基因。滕炜鸣等^[20]从虾夷扇贝中分离的沙氏弧菌菌株对头孢类、氨基糖苷类和青霉素类等多种抗生素敏感,而 M05 菌株药敏试验结果显示其具有较强的耐药性,主要对环丙沙星、替加环素和青霉素类的厄他培南、亚胺培南和美罗培南等新研发的抗生素较敏感,而对青霉素类、氨基糖苷类和头孢类抗生素均具有较强的耐药性。除 M05 菌株自身携带的耐药基因外,质粒 1 和质粒 3 中携带的大量抗性基因可能是导致其获得多种耐药性的原因。

综上,本研究明确了福建牡蛎幼虫细菌性疾病的病原及耐药特征,为针对性制定牡蛎幼虫病害防控策略、科学选择治疗药物提供了重要理论依据。

参考文献:

[1] 张康鸣,颜金培,叶旺旺,等.福建省贝藻类养殖碳汇及其潜力评估[J].应用海洋学学报,2022,41(1):53-59.

[2] 田吉腾,吴薇,李嘉伟,等.中国海水经济贝类产业的发展现状、存在问题及对策建议[J].渔业信息与战略,2024,39(2):91-98.

[3] 祁剑飞,魏姗姗,郑盛华,等.连江黄岐湾三倍体福建牡蛎湾内、外养殖群体的形态差异分析[J].渔业研究,2023,45(5):448-454.

[4] LOKMER A, KUENZEL S, BAINES J F, et al. The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success of Pacific oysters[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(3):970-987.

[5] 宋林生.我国海水养殖贝类病害发生现状及防控策略[J].水产学报,2023,47(11):148-152.

[6] 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.

[7] ZHANG X, HUANG B W, ZHENG Y D, et al. Identification and characterization of infectious pathogens associated with mass mortalities of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in northern China[J]. Biology, 2023, 12(6):759.

[8] DUBERT J, BARJA J L, ROMALDE J L. New insights into pathogenic vibrios affecting bivalves in hatcheries: present and future prospects[J]. Frontiers in Microbiology, 2017(8):762.

[9] HU Q X, CHEN L M. Virulence and antibiotic and heavy metal resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from crustaceans and shellfish in Shanghai, China[J]. Journal of Food Protection, 2016, 79(8):1371-1377.

[10] 李晨.长牡蛎幼虫养殖环境中一株致病性盐单胞菌的分

离鉴定[D].大连:大连海洋大学,2022.

- [11] DE LORGERIL J, LUCASSON A, PETTON B, et al. Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters[J]. Nature Communications, 2018, 9(1):4215.
- [12] WAN Q J, WU L Q, YANG Q H, et al. First identification and pathogenicity study of *Vibrio harveyi* isolated from diseased American eel (*Anguilla rostrata*) cultivated in freshwater[J]. Aquaculture Research, 2022, 53(4):1240-1253.
- [13] 肖开提,丁剑,古丽娜尔,等.新疆和静县羊腐蹄病细菌分离鉴定及耐药性分析[J].草食家畜,2023(4):34-40.
- [14] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y R, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. bioRxiv, 2018:274100.
- [15] WALKER B J, ANEELI T, SHEA T, et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement[J]. PLoS One, 2014, 9(11):e112963.
- [16] TATUSOVA T, DICUCCIO M, BADRETDIN A, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline [J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(14):6614-6624.
- [17] 郑玉东,张翔,姚梦丽,等.养殖环境及贝源溶藻弧菌 MLST 分型及其毒力基因、耐药性分析[J].渔业科学进展,2024,45(1):211-223.
- [18] ROMALDE J, DIEGUEZ A, LASA A, et al. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review[J]. Frontiers in Microbiology, 2014(4):413.
- [19] FAN C L, LIU S, DAI W F, et al. Characterization of *Vibrio mediterranei* isolates as causative agents of vibriosis in marine bivalves[J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11(2):e04923-22.
- [20] 滕炜鸣,李文姬,张明,等.虾夷扇贝脓胞病病原的分离、鉴定与致病性[J].水产学报,2012,36(6):937-943.
- [21] URTUBIA R, MIRANDA C D, RODRÍGUES S, et al. First report, characterization and pathogenicity of *Vibrio chagasii* isolated from diseased reared larvae of Chilean scallop, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) [J]. Pathogens, 2023, 12(2):183.
- [22] LIANG X, WANG J S, LIU Y Z, et al. Complete genome of a marine bacterium *Vibrio chagasii* ECSMB14107 with the ability to infect mussels[J]. Marine Genomics, 2019, 48:100683.
- [23] FABBRO C, CELUSSI M, RUSSELLI H, et al. Phenotypic and genetic diversity of coexisting *Listonella anguillarum*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio chagasii* recovered from skin haemorrhages of diseased sand smelt, *Atherina boyeri*, in the Gulf of Trieste (NE

- Adriatic Sea) [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 54(2):153-159.
- [24] 周华书. 一株史氏鳟源腐生葡萄球菌的分离鉴定及其基因组分析[J]. *渔业研究*, 2021, 43(5):461-471.
- [25] SANCHES-FERNANDES G M M, SÁ-CORREIA I, COSTA R. Vibriosis outbreaks in aquaculture: addressing environmental and public health concerns and preventive therapies using gilthead seabream farming as a model system[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13:904815.
- [26] 伍水龙, 黄瑜, 王蓓, 等. 水生动物病原菌 VI 型分泌系统 (T6SS) 及其溶血素共调节蛋白研究进展[J]. *大连海洋大学学报*, 2024, 39(1):162-171.
- [27] 李丹. 嗜水气单胞菌溶血素基因的功能及其作用机制的研究[D]. 成都: 电子科技大学, 2021.
- [28] 许斌福, 龚晖, 李素一, 等. 鳗源创伤弧菌的鉴定与血清型分析[J]. *渔业研究*, 2016, 38(5):351-356.
- [29] 陈卓. 杀香鱼假单胞菌鱼体内分布及其溶血素相关蛋白 Hcp 的克隆、表达[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019.
- [30] 李焯, 李楠, 张晓林, 等. 鱼类烂鳃病病原柱状黄杆菌溶血素基因的初步研究[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(3):604-607.
- [31] 张苑桢. 基于 sfGFP 的大肠杆菌膜蛋白表达筛选与纯化分析[D]. 南京: 南京理工大学, 2021.
- [32] 洪婷, 梅子青, 王丰. Sigma54 依赖性转录起始[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2022, 38(3):237-248.
- [33] PHUONG D N. 水稻白叶枯病菌 sigma54 因子的功能分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- [34] KOROTKOV K V, SANDKVIST M. Architecture, function, and substrates of the type II secretion system [J]. *EcoSal Plus*, 2019, 8(2):ESP-0034-2018.
- [35] SANDKVIST M, MICHEL L O, HOUGH L P, et al. General secretion pathway (*eps*) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(22):6994-7003.
- [36] WRETLIND B, PAVLOVSKIS O R. Genetic mapping and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants defective in the formation of extracellular proteins [J]. *Journal of Bacteriology*, 1984, 158(3):801-808.
- [37] SIKORA A E, ZIELKE R A, LAWRENCE, et al. Proteomic analysis of the *Vibrio cholerae* type II secretome reveals new proteins including three related serine proteases [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(19):16555-16566.
- [38] EVERISS K D, HUGHES K J, KOVACH M E, et al. The *Vibrio cholerae* acfB colonization determinant encodes an inner membrane protein that is related to a family of signal-transducing proteins [J]. *Infection and Immunity*, 1994, 62(8):3289-3298.
- [39] GUO K P, ZHANG H Y, HE J, et al. Whole genome analysis and molecular traceability of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking water [J]. *Food and Machinery*, 2023, 39(7):6-12.
- [40] WANG D D, MBEWE N, DE BELS L, et al. Pathogenesis of experimental vibriosis in blue mussel (*Mytilus edulis*) larvae based on accurate positioning of GFP-tagged *Vibrio* strains and histopathological and ultrastructural changes of the host [J]. *Aquaculture*, 2021, 535:736347.
- [41] ZHENG Y D, HUANG B W, ZHANG X, et al. The probiotic *Bacillus hwajinpoensis* colonizes the digestive system of *Crassostrea gigas* larvae and protects them from *Vibrio alginolyticus* infection [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(12):2918.
- [42] 蒋宇轩, 袁琳, 路娟娥, 等. 动物源性黏菌素耐药基因 *mcr-1* 携带率变化及适应性代价的研究进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2023(19):22-28.

(责任编辑:徐婷婷)