

方斑东风螺细菌性病害 病原菌的分离鉴定及 人工感染研究

高 晟¹, 赵 旺^{2,3}, 马振华^{2,3}

¹大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连

²中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州

³三亚热带水产研究院, 海南 三亚

收稿日期: 2025年5月30日; 录用日期: 2025年6月22日; 发布日期: 2025年6月30日

摘 要

方斑东风螺是我国东南沿海重要的经济贝类, 然而近年来细菌性病害严重制约其养殖产业发展。本研究旨在分离鉴定方斑东风螺细菌性病害的病原菌, 并通过人工感染实验探究其致病特性。从患病螺体中分离优势菌, 进行纯化、鉴定及药敏实验, 同时开展人工感染实验评估病原菌致病性, 建立剂量-效应关系。结果显示, 发病螺体内弧菌载量显著升高, 分离菌株对多种抗生素耐药。人工感染实验表明, 哈维氏弧菌等病原菌的致病性与接种剂量呈正相关。本研究为方斑东风螺细菌性病害的防控提供了重要的理论依据。

关键词

方斑东风螺, 细菌性病害, 病原菌分离, 人工感染

Isolation, Identification of Pathogenic Bacteria of Bacterial Diseases in *Babylonia areolata* and Studies on Artificial Infection

Sheng Gao¹, Wang Zhao^{2,3}, Zhenhua Ma^{2,3}

¹School of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian Liaoning

²South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou Guangdong

文章引用: 高晟, 赵旺, 马振华. 方斑东风螺细菌性病害病原菌的分离鉴定及人工感染研究[J]. 水产研究, 2025, 12(2): 158-169. DOI: 10.12677/ojfr.2025.122017

³Sanya Tropical Fisheries Research Institute Sanya Hainan, Sanya Hainan

Received: May 30th, 2025; accepted: Jun. 22nd, 2025; published: Jun. 30th, 2025

Abstract

Babylonia areolata is an important economic shellfish along the southeast coast of China. However, in recent years, bacterial diseases have severely restricted the development of its aquaculture industry. This study aims to isolate and identify the pathogenic bacteria of bacterial diseases in *Babylonia areolata*, and explore their pathogenic characteristics through artificial infection experiments. Dominant bacteria were isolated from diseased snails, and purification, identification, and drug sensitivity tests were carried out. At the same time, artificial infection experiments were conducted to evaluate the pathogenicity of the pathogenic bacteria and establish a dose - response relationship. The results showed that the *Vibrio* load in diseased snails increased significantly, and the isolated strains were resistant to multiple antibiotics. Artificial infection experiments indicated that the pathogenicity of pathogenic bacteria such as *Vibrio harveyi* was positively correlated with the inoculation dose. This study provides an important theoretical basis for the prevention and control of bacterial diseases in *Babylonia areolata*.

Keywords

Babylonia areolata, Bacterial Diseases, Pathogen Isolation, Artificial Infection

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

方斑东风螺(*Babylonia areolata*)是我国东南沿海重要的经济贝类,具有生长速度快、肉质鲜美等特性,在水产养殖业中占据重要地位[1]。其高经济价值推动了养殖规模的快速扩张,但随之而来的细菌性病害问题日益凸显。近年来,养殖过程中频发的“肿吻症”“翻背症”“脱壳症”等疾病,常导致螺体活力下降、大规模死亡及软体组织异常,对养殖产业造成严重经济损失[2][3]。这些病害的暴发不仅与高密度养殖环境下的病原传播密切相关,还可能受水质恶化、温度波动等环境胁迫因素的协同影响[4]-[6]。然而,目前针对上述病害的病原学研究和防控手段仍存在明显短板,尤其是对核心病原菌的种类鉴定、致病机制解析及针对性防治策略的开发尚未形成系统性成果,严重制约了产业的可持续发展[7]-[9]。

当前,方斑东风螺细菌性病害的研究滞后于养殖实践需求,突出表现为两方面问题:其一,病原菌的多样性及分类地位尚未完全明确,现有研究多聚焦于表观病症描述,缺乏基于分子生物学技术的精准鉴定[10];其二,病原菌的致病机制(如毒素作用、免疫逃逸等)研究薄弱,导致防控措施多依赖经验性用药,易引发耐药性及生态环境风险[11]。针对这一现状,本研究通过分离患病螺体内的优势菌株,结合形态学观察、生理生化特性及分子鉴定(如 16S rRNA 基因序列分析)明确病原种类,并进一步通过人工感染实验验证其致病性,量化评估剂量-效应关系及毒力参数(如 LC50)。研究结果旨在填补方斑东风螺病原数据库的空白,为建立基于病原特性的差异化防控策略(如疫苗开发或生态调控)提供理论支撑,最终推动病害防控从经验性管理向科学精准化方向转型。

2. 材料与方法

2.1. 优势菌的分离与纯化实验

2.1.1. 实验材料

采集正常池、发病池的池水与底沙、东风螺内脏团作为样品。选用 2216E 平板、TCBS 平板、营养平板作为培养基。准备无菌海水、酒精灯、玻璃涂布棒、电子天平、离心管及离心管架子、95%酒精、移液枪及枪头、样品袋、记号笔、无菌水样瓶、多参数水质分析仪等实验用品。

2.1.2. 实验方法

在平板上进行细菌培养, 28℃培养 48 h 后进行菌落计数, 以确定细菌含量。从平板上挑取优势菌落进行纯化、鉴定及药敏分析, 为回归感染试验确定病原。使用无菌 1 mL 玻璃匀浆器和无菌生理盐水处理样品[12]。

2.2. 优势菌药敏实验

2.2.1. 实验材料

分离纯化的病螺体内优势弧菌及异养菌菌株为样品来源。采用 2216E 固体培养基用于菌株活化及药敏试验。准备无菌生理盐水、多种抗生素药敏纸片、无菌 1 mL 玻璃匀浆器、培养箱、酒精灯、无菌镊子、移液枪、游标卡尺等试剂与耗材和仪器设备[13]。

2.2.2. 实验方法

挑取纯化的菌落, 用无菌玻璃匀浆器研磨, 加入无菌生理盐水制成均匀菌悬液。取 100 μ L 菌悬液均匀涂布于 2216E 平板表面, 静置 5 min 后, 用无菌镊子将药敏纸片贴于平板表面, 在与 2.1 中平板培养条件一致的环境下培养。培养后测量药敏片周围抑菌圈直径并记录数据[14]。

2.3. 人工感染实验

2.3.1. 材料

选用健康方斑东风螺(平均体重 1.25 g)为实验动物, 每组设置 3 个平行, 每平行 10 个体, 同时设立灭菌海水对照组。菌株复苏后采用划线法纯化单克隆(28℃培养 24 小时), 使用 LB 液体培养基扩培(28℃, 180 rpm 振荡培养 16~20 小时), 离心收集菌体(8000 rpm, 1 分钟)后用灭菌海水洗涤两次, 制备菌株母液并进行系列稀释。

2.3.2. 方法

试验设置肌肉注射和浸浴感染两种方式 and 多个浓度梯度。肌肉注射时每螺注射 0.1 ml 菌液, 注射部位为腹足肌肉, 全程监测水体参数(温度 $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 盐度 $30 \pm 2\text{‰}$, $\text{pH} 8.0 \pm 0.2$)。每日定时记录死亡率和临床症状, 定期进行菌落计数验证感染剂量。采用 SPSS 26.0 软件进行线性回归分析, 建立剂量 - 效应曲线计算 96 h LD50 值, 比较不同感染的致病性差异[15]。

2.4. 优势菌株鉴定实验

2.4.1. 实验材料

准备离心机(5417R, Eppendorf)、PCR 仪(9700, ABI)、电泳仪(DYY-8C, 北京六一仪器厂)、水浴锅(DK-24, 上海精宏实验设备有限公司)、测序仪(3730XL, ABI)等仪器, 以及 BGI 2xSuper PCR Mix (with dye)、BGI D2000 Plus DNA Ladder、细菌基因组提取试剂盒、琼脂糖、PCR 产物磁珠法纯化试剂盒等试剂和耗材[16]。

2.4.2. 实验方法

取适量菌样品于 1.5 ml 离心管，加入预处理液和玻璃珠研磨，依次加入 Proteinase K 溶液、裂解液、无水乙醇等进行基因组 DNA 提取。以提取的 DNA 为模板，使用特定引物进行 16S/18S 扩增，扩增产物经琼脂糖凝胶检测后，按照磁珠纯化标准操作流程进行纯化[17]。

3. 结果

3.1. 优势菌的分离与纯化实验结果

3.1.1. 外观检查与养殖环境评估

在本次研究中，针对方斑东风螺养殖水体进行了全面且细致的水质检测，旨在精准评估养殖环境状况。检测结果显示，水体的溶解氧含量为 6.8 ± 0.3 mg/L，而正常的溶解氧范围要求大于 5 mg/L，这表明养殖水体在溶解氧方面能够满足方斑东风螺的生存需求，为其呼吸作用提供了充足的氧气来源。水体的 pH 值为 8.1 ± 0.2 ，处于 7.8~8.5 的正常区间内，这一适宜的酸碱度环境有助于维持方斑东风螺体内酸碱平衡，保障其生理功能的正常运行。同时，氨氮浓度检测值为 0.12 ± 0.05 mg/L，远低于 0.5 mg/L 的安全阈值，有效避免了氨氮对螺体的毒性危害，减少了应激反应的发生概率。

3.1.2. 优势菌的培养与纯化

弧菌分布特征：基于 TCBS 琼脂培养基确定为弧菌，螺体内弧菌菌落(cfu)在发病池显著升高 24.5 倍 ($p < 0.01$)，显著高于正常池，但水体、底沙的弧菌菌落总数在正常池和发病池中无明显差异，根据前期研究，哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)可能性较大。

Table 1. Measurement of vibrio and heterotrophic bacteria concentrations
表 1. 弧菌及异养菌浓度测定

样本类型	弧菌		异养菌	
	正常	发病	正常	发病
螺体(cfu/g)	1.2×10^5	2.94×10^6	4.17×10^2	4.39×10^4
池水(cfu/mL)	8.58×10^5	1.56×10^5	-	2.74×10^5
底沙(cfu/g)	1.79×10^7	9.11×10^6	3.26×10^4	2.93×10^6

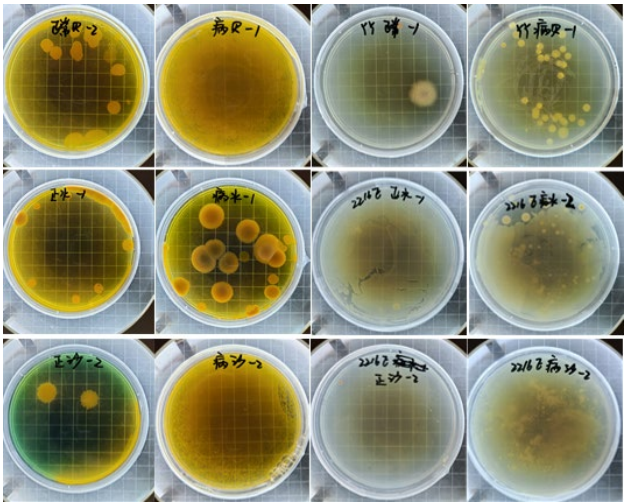


Figure 1. Isolation, purification, and cultivation of strains
图 1. 菌株分离纯化培养

异养菌动态变化：所有样本中异养菌均显著高于正常池，可能引起继发感染导致微生态失衡，病螺排泄物增加异养菌负荷，养殖系统自净能力下降(见表 1，图 1)。

3.2. 优势菌药敏实验结果

如表 2 所示，米诺环素和多西环素(四环素类)表现出中等抑菌效果(抑菌圈 2.0~2.5 cm)。四环素类抗生素虽在沉积物中吸附性强、残留时间长，但耐药性传播相对较慢[18]，可能因相关耐药基因尚未广泛扩散，但长期使用仍需警惕环境积累风险。相比之下，氨基糖苷类药物(如庆大霉素、卡那霉素)抑菌效果有限(抑菌圈 1.2~2.3 cm)，需结合高浓度使用，实际应用中可能增加生态负担。青霉素类(如氨苄西林)和 β -内酰胺类(如羧苄西林)则因 β -内酰胺酶基因广泛存在，导致药物失效，抑菌效果最差(≤ 1.7 cm) [13]。

Table 2. Diameter of inhibition zones (cm) in antimicrobial susceptibility testing of dominant vibrio and heterotrophic bacteria from diseased snails

表 2. 病螺体内优势弧菌及异养菌药敏试验抑菌环直径(cm)

药物名称	病螺弧菌	病螺异养菌
诺氟沙星	2.4	3.0
克林霉素	1.4	—
氯霉素	2.1	2.5
呋喃唑酮	1.8	1.2
红霉素	2.2	2.1
苯唑西林	—	—
多西环素	2.0	2.3
米诺环素	2.0	2.5
卡那霉素	1.0	2.3
新霉素	1.1	1.9
青霉素	1.5	—
四环素	1.7	1.6
羧苄西林	1.7	—
哌拉西林	1.3	1.1
氧氟沙星	1.8	3.0
环丙沙星	2.2	3.2
万古菌素	—	1.4
复方新诺明	—	—
多粘菌素	1.8	1.2
麦迪霉素	1.6	1.6
庆大霉素	1.2	1.8
氨苄西林	1.3	—
丁胺卡那	1.1	1.7

3.3. 人工感染实验结果

3.3.1. TCBS 菌株人工感染实验

Table 3. Experimental results of artificial infection with TCBS strains
表 3. TCBS 菌株人工感染实验结果记录表

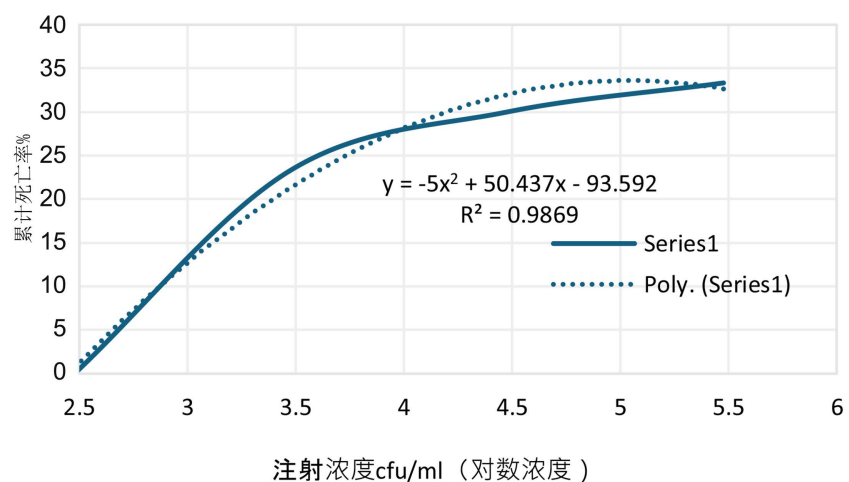
稀释倍数	6 h		12 h		24 h		36 h		48 h		72 h		96 h	
	翻 背	死 亡	翻 背	死 亡	翻 背	死 亡	翻 背	死 亡	翻 背	死 亡	翻 背	死 亡	翻 背	死 亡
对照组 A	0	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
对照组 B	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
对照组 C	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
A10 ⁻²	2	0	3	0	3	0	3	1	1	2	4	1	5	0
B10 ⁻²	1	0	3	0	2	0	1	1	4	2	5	0	7	0
C10 ⁻²	2	0	2	1	1	0	2	0	3	1	4	1	6	0
A10 ⁻³	2	0	2	0	2	0	2	0	0	2	3	1	4	0
B10 ⁻³	1	0	2	0	1	0	1	1	1	1	2	0	4	1
C10 ⁻³	1	0	1	0	2	1	4	1	2	0	1	1	3	0
A10 ⁻⁴	1	0	3	0	2	0	2	1	1	0	2	0	4	1
B10 ⁻⁴	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	2	1	2	0
C10 ⁻⁴	1	0	2	0	2	0	1	0	1	1	1	1	3	1
A10 ⁻⁵	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B10 ⁻⁵	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
C10 ⁻⁵	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
A10 ⁻⁶	0	0	1	0	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0
B10 ⁻⁶	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C10 ⁻⁶	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0

Table 4. Injection concentration and cumulative mortality
表 4. 注射浓度与累计死亡率

注射浓度(cfu/ml)	累计死亡率
3.0 × 10 ⁵	33.33%
3.0 × 10 ⁴	30%
3.0 × 10 ³	23.33%
3.0 × 10 ²	0
3.0 × 10	0

实验结果表明，TCBS 菌株对方斑东风螺的致病性呈现显著的剂量依赖性：当注射浓度从 3.0 × 10⁵ cfu/mL (累计死亡率 33.33%)降至 3.0 × 10² cfu/mL 时，死亡率趋近于零，且通过剂量 - 效应曲线计算得出其 96 h LC50 为 4.33 × 10⁷ cfu/mL，这一高阈值提示其毒力相对较弱，但与前期毒力更强的 YY 菌株(LC50 低三个数量级)形成鲜明对比，进一步印证了弧菌科内不同菌株的致病性差异。研究局限性包括：(1) 96 小

时观察周期可能遗漏慢性致病效应或潜伏期感染特征；(2) 对照组中偶发的“翻背”症状(如 12 h 出现 2 例)需排除环境胁迫或操作干扰；(3) 菌株特异性致病机制(如毒素作用或免疫抑制途径)尚未解析，需结合转录组学分析或组织病理学技术深入探究。以上结果为弧菌科病原的毒性评估及防控阈值设定提供了基础数据，同时指明了后续研究的优化方向(表 3、表 4，图 2)。



注：96 h 后 LC50 的注射浓度约为 4.33×10^7 cfu/ml。

Figure 2. Correlation analysis between injection concentration of TCBS strains and cumulative mortality
图 2. TCBS 菌株注射浓度与累计死亡率相关性分析

3.3.2. YY 菌株人工感染实验

本实验通过对比分析 YY 菌株与 TCBS 菌株对方斑东风螺的致病性，揭示了 YY 菌株显著更强的毒力特征。实验数据显示，在相同感染浓度(5.85×10^5 cfu/mL)下，YY 菌株引发 77.67% 的累计死亡率，较 TCBS 菌株的 33.33% 高出两倍以上。毒力差异更突出体现于半数致死浓度(LC50)：YY 菌株 96 h LC50 仅为 3.36×10^4 cfu/mL，较 TCBS 菌株(4.33×10^7 cfu/mL)降低三个数量级，表明其致病效率极显著提升。高浓度感染组(10^{-2} 组)24 小时内即出现爆发性死亡，提示 YY 菌株可能通过急性毒性机制(如高效毒素分泌或宿主免疫逃逸)快速致死，这与弧菌属典型病原(如副溶血弧菌)的溶血素/蛋白酶破坏模式具有相似性。研究同时发现，两种菌株的剂量效应差异为水产病害风险评估提供了关键毒力参数，并暗示东风螺疾病可能涉及多病原协同致病机制。该结果不仅强调了螺类病原多样性研究的紧迫性，也为制定差异化防控策略(如针对高毒力菌株的早期监测)提供了理论依据(表 5、表 6，图 3)。

Table 5. Experimental results of artificial infection with YY Strains

表 5. YY 菌株人工感染实验结果记录表

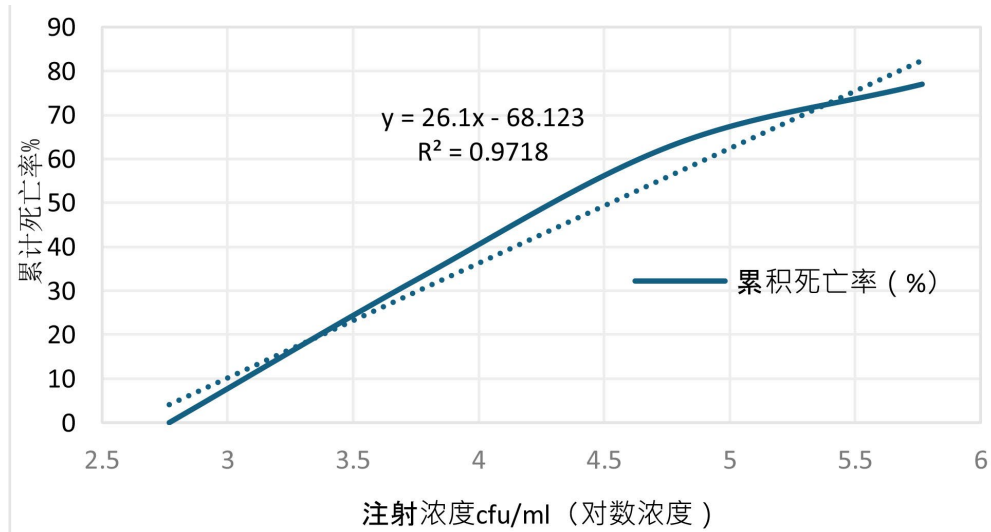
稀释倍数	6 h		12 h		24 h		36 h		48 h		72 h		96 h	
	翻背	死亡	翻背	死亡	翻背	死亡	翻背	死亡	翻背	死亡	翻背	死亡	翻背	死亡
对照组 A	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
对照组 B	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
对照组 C	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A 10^{-2}	2	0	6	0	2	5	1	0	2	1	0	1	0	1
B 10^{-2}	5	0	7	0	0	5	1	1	1	1	0	0	0	0

续表

C 10 ⁻²	8	0	8	0	1	7	0	0	2	0	0	1	0	0
A 10 ⁻³	6	0	8	0	0	3	2	2	0	0	1	1	1	0
B 10 ⁻³	7	0	7	0	3	3	1	1	1	1	2	0	0	1
C 10 ⁻³	3	0	2	0	1	1	3	4	2	0	1	1	0	1
A 10 ⁻⁴	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
B 10 ⁻⁴	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	2	1
C 10 ⁻⁴	1	0	2	0	1	1	1	0	2	1	0	1	1	0
A 10 ⁻⁵	1	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B 10 ⁻⁵	2	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
C 10 ⁻⁵	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
A 10 ⁻⁶	0	0	1	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B 10 ⁻⁶	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
C 10 ⁻⁶	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Table 6. Injection concentration and cumulative mortality
表 6. 注射浓度与累计死亡率

注射浓度(cfu/ml)	累计死亡率
5.85 × 10 ⁵	77.67%
5.85 × 10 ⁴	63.33%
5.85 × 10 ³	33.33%
5.85 × 10 ²	0
5.85 × 10	0



注：96 h 后 LC50 的注射浓度约为 3.36 × 10⁴ cfu/ml。

Figure 3. Correlation analysis between injection concentration of YY strains and mortality rate
图 3. YY 菌株注射浓度与死亡率相关性分析

3.4. 优势菌株鉴定实验结果

3.4.1. 琼脂糖凝胶电泳图

Table 7. Correspondence of electrophoresis wells to samples and primers
表 7. 电泳孔位对应样品和引物

孔号	扩增引物	测序引物	样品名称
1	27F + 1492R	V4-515F + V4-806R	TCBS
2	27F + 1492R	V4-515F + V4-806R	YY

使用特定引物(表 7)对细菌 DNA 进行 PCR 扩增,通过琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测,得到不同样本的电泳条带,为后续测序及菌株鉴定提供基础(图 4)。泳道 1 (TCBS): 样本来自 TCBS 培养基分离的菌株。泳道 2 (YY): 样本来自另一分离菌株(可能为 2216E 或营养平板)。泳道 M(Marker): DNA 分子量标准,条带大小依次为 5000、3000、2000、1000、750、500、250、100 bp。

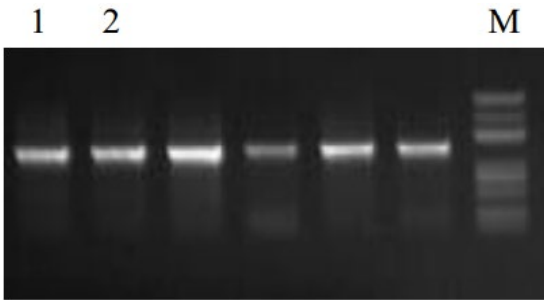


Figure 4. Agarose gel electrophoresis image
图 4. 琼脂糖凝胶电泳图

3.4.2. 测序及 BLAST 比对结果

分子鉴定结果显示,两株实验菌株的分类地位存在显著差异:样本 TCBS 的 BLAST 比对表明,其与弧菌科塔氏弧菌(*Vibrio tubiashii*)的相似度达 99.46%~99.66%,最高匹配菌株为未完全分类的 *Bacterium* 3H101 (99.79%相似度),提示其可能为弧菌科中与塔氏弧菌近缘的潜在新种或未充分鉴定的菌株,需通过 *toxR*、*gyrB* 等多基因系统发育分析进一步确认;而样本 YY 则与已知水产病原菌哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*, MT605241.1 标准株)高度一致(99.93%相似度),明确归属为该物种。结合前期致病性数据,YY 菌株(哈维氏弧菌)的极强毒力与其典型水产致病菌特性相符,而 TCBS 菌株的潜在弧菌科分类地位可能解释其相对较弱的致病模式,两类菌株的系统发育差异为解析其致病机制分化提供了分类学依据(表 8)。

Table 8. Top 3 blast results of sample YY against NCBI database
表 8. 样本 YY 与 NCBI 数据库比对前 3 条结果

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<i>Vibrio harveyi</i> strain MFB03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2702	2702	99%	0	99.93%	MT605241.1
<i>Vibrio harveyi</i> strain 2010 V-1024 chromosome 1	2702	29641	99%	0	99.93%	CP051122.1
<i>Vibrio harveyi</i> strain SEDPROD3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2702	2702	99%	0	99.93%	MN066575.1

4. 讨论

4.1. 优势菌的分离与药敏实验分析

螺体内微生物存在复杂互作关系,发病池东风螺体内弧菌载量显著高于正常池,而水体和底沙中弧菌数量未见显著差异,表明宿主选择性富集可能是致病性弧菌增殖的关键环节[19]。发病池螺体内弧菌与异养菌比值下降,显示出明显的菌群失调特征,可能由弧菌分泌信号分子、病螺排泄物增加有机负荷以及宿主免疫功能下降等因素导致[20]。从养殖池塘中分离出的细菌对抗生素的耐药性普遍存在,本研究中分离菌株对四环素类药物敏感度中等,但对喹诺酮类和 β -内酰胺类耐药性显著[21]。因此,需减少对抗生素的依赖,采用噬菌体疗法、植物提取物等替代策略,并建立完善的抗生素使用和耐药性监测体系[22]。

4.2. 人工感染实验分析

人工感染实验观察到病螺死亡呈现典型阶段性特征,翻背症状可作为早期感染指标,但需区分病原性症状与病螺应激反应。因注射操作本身会造成机械损伤,可能引发贝类应激反应,如代谢紊乱、能量消耗增加、行为异常等,导致出现少量翻背症的个体[23]。通过实验系统评估了两种菌株对健康方斑东风螺的致病性,验证了其作为病原体的生物学特性。高浓度病原菌暴露导致更快速和更严重的症状发展,可能与病原菌高效表达和分泌毒力因子有关[24]。环境因素对病原菌致病性有重要影响,本实验通过控制水体环境参数模拟自然养殖条件,为研究提供可靠背景。未来研究可进一步探究环境因素与病原菌致病性的关系,以及宿主免疫相关基因和蛋白在应对病原感染过程中的作用[25]。

4.3. 优势菌株鉴定实验分析

明确了哈维氏弧菌是导致方斑东风螺“翻背症”和“肿吻症”的主要病原,其强致病性可能源于毒力基因的高表达及环境适应性。样本 TCBS 可能属于弧菌科,近缘于 *Vibrio tubiashii*,需通过多基因联合分析明确分类地位[26]。实验采用的标准化分子鉴定流程与高质量检测体系确保了鉴定准确性,但仍有提升空间。未来可借鉴实时荧光 RPA 检测技术,结合特异序列标签快速鉴定目标菌株,同时通过多基因联合分析进一步明确菌株分类地位,并研究其致病性和环境适应性[27]。

4.4. 肠道菌群与病原菌互作分析

患病方斑东风螺体内弧菌载量显著升高,伴有异养菌异常增殖,表明肠道菌群失衡与疾病发生密切相关。健康螺肠道菌群通过生态位竞争和代谢产物调控抑制病原菌定殖,例如乳酸杆菌属等益生菌可分泌细菌素直接抑制弧菌生长[28],而短链脂肪酸通过维持黏膜屏障完整性和调节宿主免疫应答抑制病原侵袭[29]。高密度养殖环境下,弧菌可能通过分泌胞外蛋白酶破坏宿主肠道上皮屏障,并利用铁载体等毒力因子争夺营养物质,进而降低有益菌的竞争优势[30]。病原菌感染可能触发宿主免疫抑制,如哈维氏弧菌(YY 菌株)通过抑制 Toll 样受体信号通路降低宿主对异养菌的清除能力,进一步加剧菌群失调[31]。未来研究需结合宏基因组学解析菌群功能基因网络,并通过微生物群落干预实验验证靶向调控菌群对弧菌感染的拮抗效应,为病害防控提供新策略。

5. 结论

本研究成功从患病方斑东风螺中分离出优势菌,并鉴定出哈维氏弧菌和塔氏弧菌为主要致病菌。药敏实验表明分离菌株对多种抗生素耐药,为合理用药提供了参考。人工感染实验明确了病原菌的剂量-效应关系,揭示了其致病特性。优势菌株鉴定实验为后续深入研究病原菌的生物学特性奠定了基础。本研究结果为方斑东风螺细菌性病害的防控提供了重要的理论依据,有助于推动方斑东风螺养殖产业的健

康发展。

6. 展望

未来研究可进一步聚焦病原菌致病机制的分子解析, 结合转录组学和蛋白质组学技术, 筛选关键毒力因子并验证其功能。针对肠道微生物组, 需开展功能验证与调控策略研究, 明确特定菌群的生态功能, 开发靶向益生菌制剂。建立环境因子与微生物组互作的动态监测体系, 结合宏基因组学和代谢组学技术, 构建病害预警模型。同时, 加强绿色防控技术的集成与应用, 深入研究耐药性传播与生态风险管控, 为方斑东风螺养殖产业的可持续发展提供更有力的支持。

基金项目

海南省科技专项(ZDYF2022XDNY351); 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-49); 农业农村部财政专项(NHYYSWZZZYKZX2020)。

参考文献

- [1] 陈建华, 阎斌伦, 高焕, 等. 方斑东风螺生物学特性及养殖技术[J]. 水利渔业, 2008, 28(3): 74-75.
- [2] 赵旺, 吴开畅, 王江勇, 等. 方斑东风螺“翻背症”的病原及初步治疗研究[J]. 水产科学, 2016, 35(5): 552-556.
- [3] 狄桂兰, 张朝霞, 孔祥会, 等. 方斑东风螺“脱壳病”病原及病理初步研究[J]. 水产科学, 2017, 36(4): 411-420.
- [4] 杨章武, 郑养福, 李正良, 等. 温度对方斑东风螺生长与摄食影响的初步试验[J]. 福建水产, 2008(1): 23-26.
- [5] 刘建勇, 罗俊标. 几种环境因子对方斑东风螺稚螺生长与存活的影响[J]. 海洋科学, 2008, 32(7): 15-19.
- [6] 郑纪盟, 高霄龙, 邱天龙, 等. 不同底质对方斑东风螺生长及存活的影响[J]. 海洋科学, 2015, 39(11): 1-6.
- [7] 蒋启成, 许芮, 刘晓坤, 等. 湛江市方斑东风螺产业发展现状及对策[J/OL]. 海洋开发与管理, 1-9. <https://doi.org/10.20016/j.cnki.hykyfjgl.20240219.001>, 2024-05-29.
- [8] 黄瑜, 汪志文, 周纬, 等. 徐闻方斑东风螺暴发性疾病病原分离鉴定以及防治手段探索[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(12): 3401-3409.
- [9] 董杨, 符书源, 王国福. 海南省方斑东风螺养殖业的发展及其前景展望[J]. 科学养鱼, 2011(12): 39-40.
- [10] 王建钢, 乔振国. 方斑东风螺肉壳分离病病因的初步研究[J]. 现代渔业信息, 2011, 26(10): 16-18.
- [11] 王国福, 张瑞姿, 曾令明, 等. 方斑东风螺肉壳分离病的防治方法[J]. 河北渔业, 2008(8): 37-40.
- [12] 刘巧红, 王世锋, 蔡岩, 等. 海南养殖方斑东风螺暴发性疾病病原分离鉴定及药敏分析[J]. 渔业科学进展, 2014(1): 74-81.
- [13] Nadella, R.K., Panda, S.K., Madhusudana Rao, B., Pani Prasad, K., Raman, R.P. and Mothadaka, M.P. (2021) Antibiotic Resistance of Culturable Heterotrophic Bacteria Isolated from Shrimp (*Penaeus vannamei*) Aquaculture Ponds. *Marine Pollution Bulletin*, 172, Article 112887. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112887>
- [14] 申晨, 余细红, 王瑞旋, 等. 过表达哈维弧菌 *lexA* 基因对恩诺沙星敏感性的影响[J]. 生物技术, 2024, 34(6): 671-676.
- [15] 张正, 廖梅杰, 李彬, 等. 两种疾病发生对养殖半滑舌鳎肠道菌群结构的影响分析[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1565-1572.
- [16] 陈星. 北部湾海洋弧菌多样性及其群落结构研究[D]: [硕士学位论文]. 南宁: 广西大学, 2021.
- [17] 龚婷, 骆祝华, 于艳萍, 等. 基于 16S rDNA 和看家基因序列分析技术的鲍鱼养殖水体弧菌种类的鉴定[J]. 应用海洋学学报, 2014, 33(4): 531-538.
- [18] 凌玉婷, 贲玉婕, 黄林艳, 等. 白洋淀沉积物中抗生素的赋存特征与生态风险[J/OL]. 生态毒理学报, 1-18. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5470.X.20250328.1300.002.html>, 2025-04-18.
- [19] 王文琳, 杨耿介, 李乐洲, 等. 3 种水质调控方式对参池底泥异养菌和弧菌数量的比较[J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(4): 961-971.
- [20] 孙航. 饲喂抗菌肽对不同养殖环境下鱼类肠道微生物群落结构和共生细菌定植的影响研究[D]: [博士学位论文]. 厦门: 厦门大学, 2022.

-
- [21] Devadas, S., Zakaria, Z., Shariff, M., Bhassu, S., Karim, M. and Natrah, I. (2024) Methodologies and Standards for Monitoring Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in Shrimp Aquaculture. *Aquaculture*, **579**, Article 740216. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740216>
- [22] 杨雯翔. 创伤弧菌对水产养殖的影响及致病机制[J]. 黑龙江水产, 2024, 43(6): 679-683.
- [23] 李晨科, 公婉婷, 钱怡霖, 等. 贝类运输过程中的应激反应与保活技术研究进展[J/OL]. 生物加工过程, 1-12. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1706.Q.20250227.1718.004.html>, 2025-05-23.
- [24] Zhang, X., He, X. and Austin, B. (2020) *Vibrio harveyi*: A Serious Pathogen of Fish and Invertebrates in Mariculture. *Marine Life Science & Technology*, **2**, 231-245. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00037-z>
- [25] 田静. 文蛤夏季死亡的组学分析及细胞免疫机制研究[D]: [博士学位论文]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2024.
- [26] 张磊, 刘剑飞, 周丽君, 等. 创伤弧菌毒力因子研究进展[J]. 解放军医学院学报, 2023, 44(2): 168-172.
- [27] 宋德瑞, 张萍萍, 王晓磊, 等. 中国边缘海和西北太平洋可培养弧菌多样性及可培养弧菌胞外酶活性研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2024, 54(12): 52-62.
- [28] 赵新宇, 史宝, 程汉良, 等. 肠道菌群对水产动物重要经济性状影响的研究进展[J]. 水产学杂志, 2024, 37(3): 100-108+116.
- [29] 董嘉欣, 刘童, 高善语. 基于肠道微生物探讨炎症性肠病发病机制的研究进展[J]. 现代消化及介入诊疗, 2024, 29(3): 255-261.
- [30] 黄洪辉, 林钦, 郭志勋, 等. 有益微生物的应用对海水对虾养殖池塘中细菌数量动态变化的影响[J]. 南方水产, 2007, 3(3): 14-19.
- [31] 张建中. 模型动物中的肠道菌群分析及微生物组研究[J]. 微生物学通报, 2016, 43(7): 16-49.