

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

Load variation of *Vibrio harveyi* in the blood clam *Tegillarca granosa*

杨千元^{1,2} 滕爽爽² 蔡逸龙² 肖国强^{1,2*} 蔡西粟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 温州 325005; 3. 浙江省平阳县农业农村局 平阳 325499)



前言



泥蚶(*Tegillarca granosa*)是我国重要的滩涂养殖贝类之一。近年来养殖泥蚶的流行性疾病和大规模死亡时有发生,其中,弧菌性疾病最为常见,并且导致的死亡最为严重。目前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。

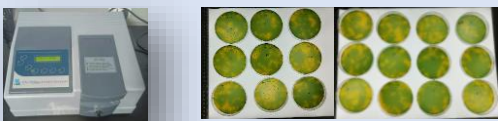
宿主体内菌载量的变化规律反映了外来病原菌入侵后,宿主与病原菌之间的相互作用,是一种重要的衡量免疫抗性的指标。



方法及流程

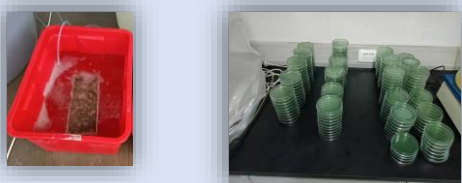
1、绘制哈维氏弧菌的计数标准曲线

建立弧菌数与OD₅₆₀值关系曲线,获得直线回归方程。



2、检测攻毒水体中24h内哈维氏弧菌的浓度变化

弧菌感染浓度设置1×10⁷CFU/mL,在0h, 3h, 6h, 12h, 18h, 24h连续三天检测水体中哈维氏弧菌的数量变化。



3、分析感染后不同时间点泥蚶组织弧菌载量的变化趋势

弧菌感染浓度设置1×10⁷CFU/mL,对400只泥蚶进行连续7天的哈维氏弧菌浸泡感染,在感染实验前和感染实验后1d, 3d, 6d, 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。

4、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。

设置1×10⁵、1×10⁶、1×10⁷、5×10⁷ CFU/mL四个不同强度的哈维氏弧菌刺激,以不添加哈维氏弧菌的砂滤海水为对照组。实验共进行15d,浸泡感染7d,在感染实验开始后的1d和5d,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。



结果

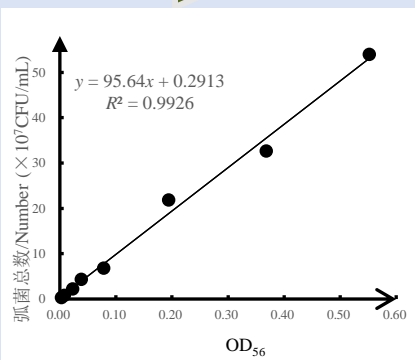


图1 哈维氏弧菌数与OD₅₆₀值关系曲线

$y = (95.64x + 0.2913) \times 10^7$ (y为菌液浓度, x为OD₅₆₀值), $R^2 = 0.9926$, OD₅₆₀值在0.01-0.60之间,菌液含菌量呈良好的线性关系。

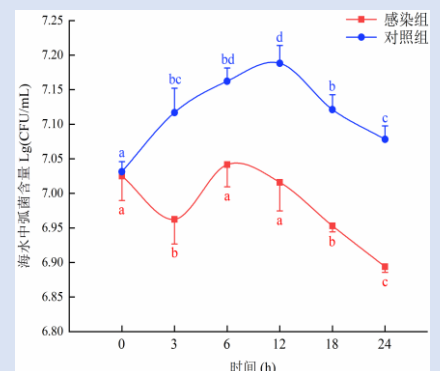


图2 攻毒水体中哈维氏弧菌数量的日变化(h)

24h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1×10⁷CFU/mL,对照组海水中的有效浓度基本维持在1×10⁷CFU/mL以上;并且对照组的弧菌浓度高于感染组。

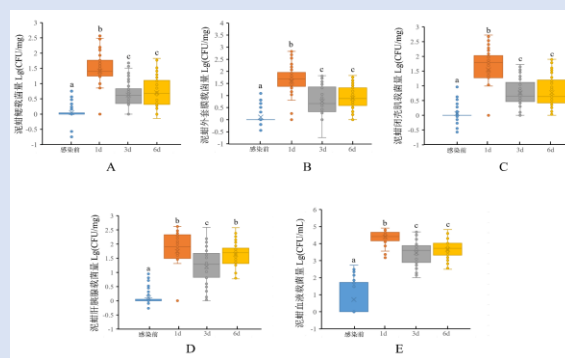


图3 哈维氏弧菌感染前后泥蚶组织中的弧菌载量

感染的3d,泥蚶各组织的弧菌载量较1d显著下降($P < 0.05$);除肝胰腺组织外,感染后6d其他组织的弧菌载量均处于与3d是相当的水平。

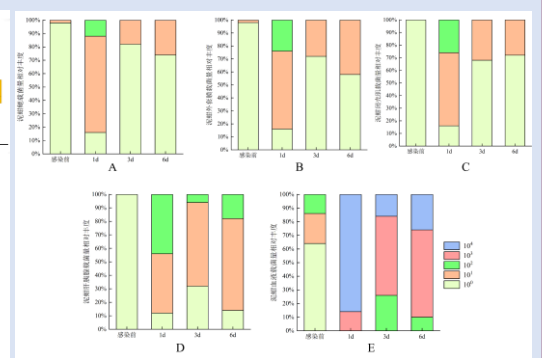


图4 哈维氏弧菌攻毒过程中泥蚶组织中弧菌载量的分布

持续感染6d,泥蚶血液中弧菌载量降至10²-10⁴CFU/mL,其它组织中弧菌载量降至10⁵-10⁷CFU/mg。

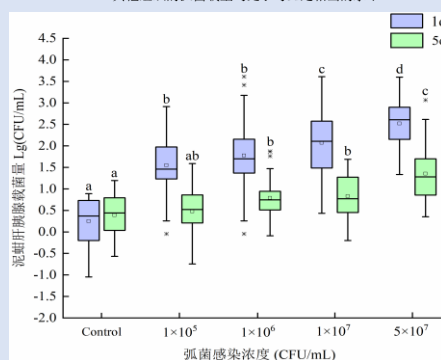


图5 不同浓度哈维氏弧菌感染后第1天和第5天泥蚶肝胰腺哈维氏弧菌载量变化

使用Spearman秩相关性分析。发现在攻毒早期泥蚶体内弧菌载量与水体环境的弧菌含量之间呈显著的正相关(Spearman's $\rho = 0.762$, $P < 0.001$)

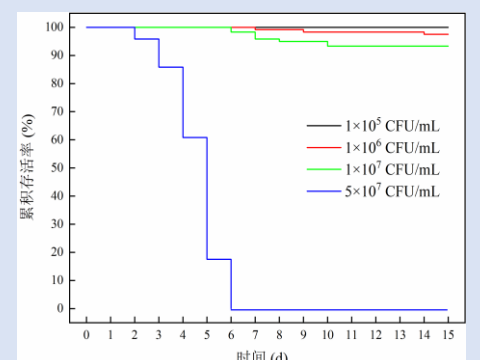


图6 不同浓度哈维氏弧菌感染下泥蚶存活率

1×10⁵CFU/mL感染浓度下,泥蚶未出现死亡;在5×10⁷CFU/mL条件下泥蚶累计死亡率高达100%。

结论

- 24h内浓度为1×10⁷CFU/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。
- 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它4个组织。
- 1d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;5d时各感染组肝胰腺弧菌载量均较1d明显降低,但仍然高于对照组。