

王梦甜, 付璐璐, 姚韩韩, 等. 文蛤外套膜粘液菌群分析及其在弧菌胁迫下的代谢响应研究[J]. 海洋学报, 2026, 48(x): 1–14, doi:
Wang Mengtian, Fu Lulu, Yao Hanhan, et al. Mantle-Mucus Microbial Communities and Metabolic Responses to *Vibrio* Stress in the hard clam *Meretrix meretrix*[J]. Haiyang Xuebao, 2026, 48(x): 1–14, doi:

文蛤外套膜粘液菌群分析及其在弧菌胁迫下的代谢响应研究

王梦甜^{1,2,3}, 付璐璐^{2,3}, 姚韩韩^{1*}, 董迎辉^{2*}

(1. 浙江万里学院 生物与环境学院 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室, 浙江 宁波 315100; 2. 浙江万里学院 现代农学院, 浙江 宁波, 315101; 3. 浙江万里学院宁海海洋生物种业研究院, 浙江 宁海 315604)

摘要: 文蛤外套膜组织及其粘液在防御病原体中起着重要作用, 然而它们自身固有菌群组成和功能与宿主免疫之间的潜在联系尚不清晰。本研究采用 16S rRNA 基因高通量测序技术, 比较分析健康文蛤外套膜组织 (M 组) 与外套膜粘液 (N 组) 的菌群组成及潜在功能, 利用非靶向代谢组学 (UHPLC-Q-TOF/MS) 分析弧菌胁迫下粘液代谢物变化, 并通过斯皮尔曼相关性分析联合菌群与代谢物数据, 初步探索菌群与宿主免疫的潜在关联。结果显示, 外套膜和粘液的菌群存在显著生态位分化: 外套膜的菌群丰富度更高, 以螺旋体门 (Spirochaetota) 为绝对优势菌; 粘液的菌群均匀度更高, 以变形菌门 (Proteobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidota) 为主, 并显著富集了弧菌属 (*Vibrio*)、黏着杆菌属 (*Tenacibaculum*) 与黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 等具降解多糖或潜在致病能力的类群。功能预测显示, 粘液菌群在半胱氨酸/甲硫氨酸代谢、氧化磷酸化等免疫与能量通路中更为活跃。弧菌胁迫下代谢组结果表明, 粘液中存在琥珀酸、丙酸、苯丙氨酸等多种免疫相关代谢物; 菌群与代谢物相关性分析揭示了固有微生物与宿主代谢物的紧密联系, 如海单胞菌属 (*Marinomonas*) 与尿嘧啶强正相关, 黄杆菌属与硝酸盐强负相关。综合表明, 外套膜-粘液作为一个动态界面微环境, 其特定菌群结构可能通过与宿主代谢互作, 为机体应对病原体入侵提供了免疫准备。

关键词: 文蛤; 外套膜; 粘液; 细菌群落; 代谢组

中图分类号: 文献标志码: A 文章编号: 0253-4193(2026)x-0001-14

1 引言

海水贝类是对海洋碳汇形成和河口生态稳定具有重要意义的一类群, 它们主要栖息在微生物丰富的浅海或滩涂, 并时刻面临致病菌威胁^[1]。其中弧菌是导致其大规模死亡的主要病原体, 也是制约整个贝类养殖发展的最致命原因^[2-3]。作为无脊椎动物, 双壳贝类具有开放式循环系统, 营滤食生活。其组织定植着

复杂的共附生微生物, 这些微生物对宿主的物质代谢、能量平衡和免疫功能等起重要作用^[4-5]。对于多数贝类而言, 免疫系统主要依赖外部屏障来阻止病原微生物侵入, 如贝壳、体表、外套膜及腔隙表面分泌的粘液等的保护作用; 当屏障被破坏, 才会启动一系列的先天性免疫防御^[6]。其中贝类外套膜位于软体部外层, 直接与外界水环境接触, 不仅能物理阻隔外来颗粒或寄生虫, 其组织中还含有丰富的粘液细胞,

收稿日期: 2026-01-27; 修订日期: 2026-03-17。

基金项目: 国家科技资源共享服务平台项目课题“国家海洋水产种质资源库-浙江万里学院”; 国家现代贝类产业技术体系项目 (CARS-49)。

作者简介: 王梦甜 (2001—), 女, 浙江省金华市人, 主要从事贝类分子遗传学研究。E-mail: 2664397368@qq.com

* 通信作者: 姚韩韩 (1984—), 女, 正高级实验师, 主要从事贝类分子遗传和繁殖学研究。E-mail: yaohanhan1020@126.com; 董迎辉 (1980—), 男, 教授, 主要从事贝类分子育种学研究。E-mail: dongyinghui118@126.com

在病理或异常情况下粘液分泌量增多,在免疫过程中发挥重要作用^[8,14]。已有研究证实,贝类外套膜组织及其粘液含有独特的细菌群落,其外套膜和粘液中的共生菌群在抵御外来病原菌等免疫防御中发挥着重要作用^[4,7]。

文蛤(*Meretrix meretrix*)作为典型的底栖贝类,主要栖息在潮间带及浅海泥沙质滩涂环境。由于活动的局限性与滤食生存策略,导致文蛤直接且长期暴露于开放水体中,同样面临多重胁迫。其中副溶血弧菌是文蛤的一种破坏性病原体,对其养殖业造成了巨大的经济损失^[10-11]。研究表明,文蛤急性患病感染后,应激保护能力提升,鳃、外套膜等体表酸性粘液分泌显著增加,新生粘液细胞也会持续分化增殖,进而能够有效减轻病原体侵袭损伤^[9,12-13]。Yue等^[14]发现文蛤外套膜可内源性分泌并储存红霉素,并且红霉素可以随粘液分泌到体外发挥抗菌作用。然而,关于文蛤外套膜及其粘液自身固有菌群组成、功能及其与宿主代谢、免疫的潜在联系,目前尚未系统研究。

截止目前,16S rRNA 基因高通量测序技术已被广泛用于解析水产动物组织及粘液菌群鉴定、免疫防御机制研究。对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)粘膜共生菌群进行测序,发现节杆菌属(*Arthrobacter*)和冷杆菌属(*Psychrobacter*)直接参与抗真菌免疫^[15]。此外,代谢组学能够反映宿主在特定生理或病理状态下的代谢表型,进而揭示其免疫防御机制。海月水母(*Aurelia coerulea*)应激分泌的粘液通过小分子代谢物与免疫蛋白的协同作用实现自我保护,共同发挥调节功能^[16]。研究表明,宿主代谢物和菌群之间存在很强的相关性^[17],代谢物既可能是菌群结构的调控信号,菌群也可能参与代谢物的转化。如乌鳢(*Channa argus*)的皮肤粘液能通过干扰三羧酸循环与氨基酸合成,来抑制金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的代谢并破坏其生物膜^[18]。因此,将细菌群落与代谢组整合分析可显著提升对宿主-环境互作的解析能力,并在生态风险评估与健康监测中展现出广阔的应用前景^[19-20]。

为探究文蛤外套膜生态系统的响应规律及化学防御机制,本研究采用微生物组-代谢组联合分析策略。首先,通过16S rRNA 基因高通量测序,解析健康文蛤外套膜组织与粘液中菌群的群落特征,建立微生物生态基线;随后开展弧菌胁迫实验,利用非靶向代谢组学技术,对比分析粘液在副溶血弧菌胁迫前后的代谢谱差异,筛选关键差异代谢物;最后,关联群落基线与粘液代谢组动态变化,从微生物-代谢物互作层面,阐释

共生菌群的潜在功能、挖掘抗菌代谢标志物,为揭示文蛤微生态免疫防御机制提供理论依据与研究视角同时也为深入探究贝类外套膜-粘液免疫机制奠定理论基础。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2024年从浙江万里学院宁海海洋生物种业研究院育种基地采集2龄健康文蛤500粒,规格为壳长 43.23 ± 6.24 mm、壳宽 26.28 ± 2.72 mm、壳高 35.54 ± 4.53 mm、体重 26.88 ± 3.68 g。实验前,将文蛤暂养7 d,控制海水温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$,盐度 22 ± 1 ,每天全换水1次,每天早晚各投喂1次小球藻(*Chlorella vulgaris*)。暂养后,挑选活力强的文蛤200粒,随机分为实验组(弧菌胁迫)和对照组。实验组:将文蛤置于 1×10^8 CFU/mL 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)(索莱宝,菌株编号 ATCC17802)海水中,持续胁迫96 h;对照组:将文蛤置于正常养殖环境,与实验组同步培养。实验期间的养殖条件与暂养相同。

16S rRNA 基因扩增子测序:96 h后,随机采集对照组文蛤5粒,将其置于无菌操作台上,无菌滤纸吸干外套膜表面海水后,用无菌刮刀刮取文蛤外套膜粘液,依次标记为粘液(N1-N5);再取其外套膜组织,标记为外套膜(M1-M5),液氮速冻后 -80°C 保存。

代谢组分析:96 h后,分别从对照组和实验组各随机选取30粒文蛤,每组设6个生物学重复($n=6$),每个重复样本由同一组的5粒文蛤的外套膜粘液混合而成,样品装入无酶EP管,分别标记为对照组粘液(C1-C6)和实验组粘液(E1-E6),液氮速冻后 -80°C 保存。

组织学分析:96 h后,分别取对照组和实验组文蛤各3粒,活体解剖取外套膜组织,置于4%多聚甲醛固定、保存。

2.2 文蛤外套膜和粘液 DNA 提取、16S rRNA 基因扩增及高通量测序分析

使用 VAMNE stool/soil DNA Extraction Kit 分别提取文蛤外套膜和粘液总 DNA,用酶标仪(Gene Company Limited, Synergy HTX)进行 DNA 定量。以正向引物 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')、反向引物 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对16S rRNA 基因 V3-V4 区进行扩增,PCR 程序为:95℃ 预变性 5 min;25 个循环(95℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 40 s);72℃ 延伸 3 min。采用磁珠法(VAHTSTM DNA Clean Beads)纯化目标区域 PCR 产物(10 μL 体系按 10:8

比例与磁珠结合,经 80% 乙醇清洗后重悬洗脱)。以纯化 PCR 产物作为模板,用含 Index 的接头引物(MPPI-a/b)进行 Solexa PCR 扩增(20 μ L 体系,10 个循环),构建测序文库。文库经 Illumina NovaSeq 6000 测序,原始数据经 Trimmomatic 过滤、cutadapt 去引物,最终通过 QIIME2 (2020.6)的 DADA2 流程进行去噪、拼接及嵌合体去除,获得高质量非嵌合序列用于后续分析。

2.3 文蛤外套膜组织结构观察

取保存于 4% 多聚甲醛的文蛤外套膜组织($n=3$),随后经系列梯度乙醇脱水、二甲苯/正丁醇透明,石蜡包埋,制备成 4 μ m 厚的连续切片。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后,分别进行两种组织化学染色:(1)AB-PAS 染色(Alcian Blue - Periodic Acid Schiff staining):采用阿利新蓝-过碘酸雪夫法。切片依次经阿利新蓝(10 min)、氧化剂(5 min)、Schiff 试剂(10 min)染色,部分切片辅以苏木素复染细胞核,以区分酸性粘多糖(阿利新蓝,蓝色)与中性粘多糖/糖原等(PAS,紫红色)。(2)Masson 三色染色(Masson's trichrome staining):采用丽春红品红-苯胺蓝法。切片依次经丽春红品红(5 min)、磷钼酸(2 min)、苯胺蓝(2 min)染色,以区分胶原纤维(苯胺蓝,蓝色)与肌纤维、纤维素等(丽春红品红,红色)。所有染色步骤间均经充分洗涤,染色完成后常规脱水、透明,中性树胶封固。封固后的切片置于 Nikon 80i 荧光显微镜明场下观察、拍照。

2.4 文蛤粘液的非靶向代谢组学分析

将文蛤正常组和弧菌胁迫组的外套膜粘液(96 h)样品经 4 $^{\circ}$ C 解冻后,依次经甲醇/乙腈提取、离心、真空干燥及乙腈水溶液复溶处理,最终取上清液进行质谱分析。采用 Agilent 1290 UHPLC 系统和 HILIC 色谱柱,在 25 $^{\circ}$ C 柱温下进行分离。流动相为:(A)含 25 mM 乙酸铵与 25 mM 氨水的水溶液,(B)含乙腈,流速 0.5 mL/min,进样量 2 μ L。样品于 4 $^{\circ}$ C 自动进样器中保存,分析时按随机顺序进样,并插入 QC 样本以监控系统稳定性。使用 AB Triple TOF 6600 质谱仪在正、负离子模式下采集一、二级质谱图。离子源参数:Gas1/Gas2: 60, CUR: 30, 温度 600 $^{\circ}$ C, ISVF: ± 5 500 V。扫描范围:一级全扫描 m/z 60-1000,累积时间 0.20 s/spectra;二级扫描 m/z 25-1000,累积时间 0.05 s/spectra。采用 IDA 模式获取二级图谱,DP: ± 60 V,碰撞能量 35 \pm 15 eV,每周监测 10 个候选离子。原始数据经 ProteoWizard 转换.mzML 格式后,采用 XCMS 程序进行峰识别、保留时间校正与峰面积提取(参数:centWave m/z = 10 ppm, peakwidth = c(10, 60)。随后对数据进行代谢物鉴定

及预处理,包括删除缺失值 >50% 的离子峰、KNN 填充、并过滤 RSD >50% 的 feature,以供后续分析。

2.5 数据分析

使用 USEARCH(v10.0)在 97% 相似性水平下对序列进行聚类生成 OTU,并以总序列数的 0.005% 为阈值进行过滤^[21,22]。利用 QIIME2 分析 Alpha 多样性,并基于 Bray-Curtis 距离通过 R 语言进行主坐标分析(PCoA)和 NMDS 分析。利用 QIIME 软件生成不同分类水平上的物种丰度表。外套膜与粘液样本间的菌群差异显著性采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。利用 LEfSe 进行差异菌群的线性判别分析,最终确定两组间的标志性差异微生物类群。采用 PICRUST2 基于 OTU 表预测细菌功能,并与 KEGG 数据库比对获得代谢通路信息。使用 ropls 包对代谢组数据进行聚类分析和 PLS-DA 建模,以 $VIP \geq 1$ 、 $FC \geq 2$ 、 $FC \leq 0.5$ 且 $P \leq 0.05$ 为标准筛选差异代谢物。通过 KEGG 富集分析($Q \leq 0.05$)鉴定显著代谢通路。以相对中介中心性(relative betweenness centrality)表征通路的拓扑特征并分析差异代谢物富集通路的统计学显著性。最后利用斯皮尔曼相关分析探究主要细菌类群与差异代谢物间的关联性。

3 结果

3.1 文蛤外套膜和粘液菌群差异分析

3.1.1 16S rRNA 基因测序和菌群多样性分析

通过对文蛤外套膜和粘液 10 个样本的 16S rRNA 基因 V3-V4 区测序,共获得 611,600 对 reads,质控后得到 571,006 条高质量序列,各样本序列数介于 46,817 至 57,101 之间。所有序列经聚类共生成 2,346 个细菌 OTUs。分析显示,文蛤外套膜组织(M组)与外套膜粘液(N组)分别含有 1,689 和 990 个 OTUs,其中共有 OTUs 为 333 个(占总 OTUs 的 14.2%),而特有 OTUs 分别为 1,356 和 657 个。韦恩图及 OTU 分布比较表明,M组细菌丰富度高于 N组,且两组菌群结构存在明显差异,共有 OTUs 在各自组别中的占比分别为 19.7%(M组)和 33.6%(N组)。

α 多样性反映微生物区系内的物种丰富度与均匀度,而 β 多样性则表征不同样本间微生物组成的差异。稀释曲线、Shannon-Wiener 曲线、等级-丰度曲线及物种积累曲线(图 1A-D)均趋于平缓,表明测序深度充分,已覆盖样本中绝大多数物种信息。 α 多样性指数分析显示(图 2),外套膜组织(M组)细菌丰富度较高,而粘液(N组)的细菌群落均匀度更高,且两组

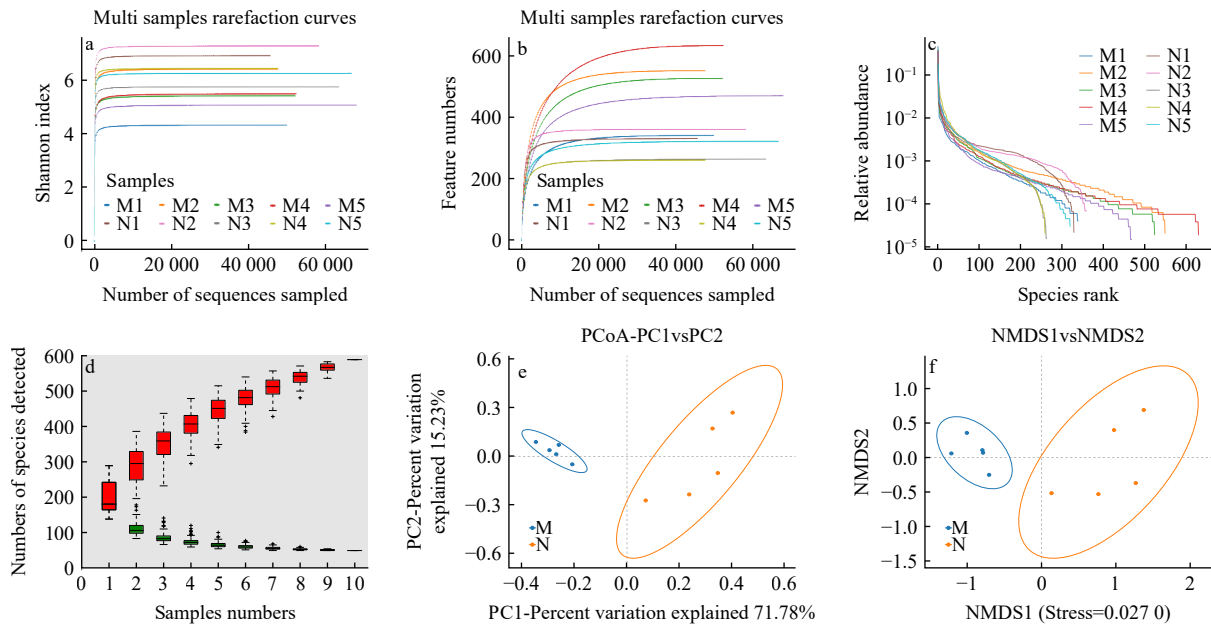


图 1 文蛤外套膜(M)和粘液(N)菌群的聚类及 β 多样性分析

Fig. 1 Clustering and β diversity analysis of the mantle (M) and mucus (N) microbiota in *M. meretrix*

- A. 所有样品的稀释曲线; B. 所有样品的 Shannon-Wiener 曲线; C. 所有样品的等级-丰度曲线; D. 所有样本的物种积累曲线;
E. PCoA 分析; F. NMDS 分析
A. Rarefaction curves of all samples; B. Shannon-Wiener curves of all samples; C. Rank-abundance curves of all samples;
D. Species accumulation curves of all samples; E. PCoA analysis; F. NMDS analysis

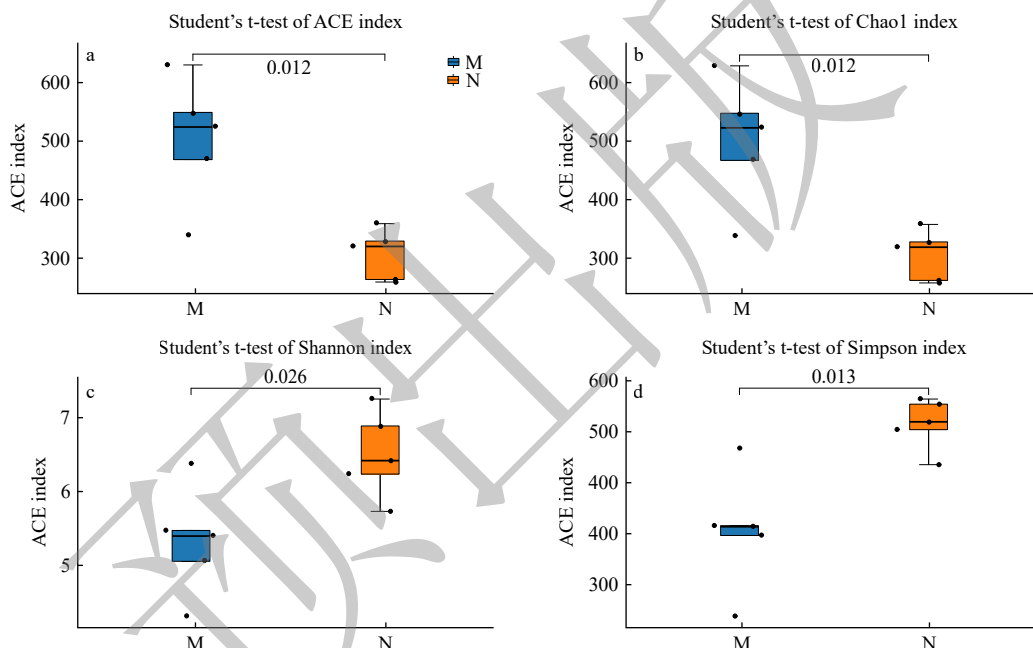


图 2 文蛤外套膜(M)和粘液(N)细菌群落的 α -多样性指数

Fig. 2 The α -diversity index of the bacterial communities in the mantle (M) and mucilage (N) in *M. meretrix*

间 ACE、Chao1、Shannon 及 Simpson 指数均存在显著差异($P < 0.05$)。PCoA 与 NMDS 分析, 结果表明外套膜组织与粘液样本在 β 多样性上显著分离, 形成独立聚类, 表明两者微生物群落结构存在显著差异(图 1E、1F)。

3.1.2 细菌群落组成差异

在门水平上(图 3A), 文蛤外套膜组织(M组)以

螺旋体门(Spirochaetota)(44.45%)和变形菌门(38.31%)为绝对优势菌门, 拟杆菌门(12.53%)次之; 而粘液(N组)则以变形菌门(44.86%)和拟杆菌门(29.32%)为主, 螺旋体门比例仅为13.04%。

科、属水平(图 3B、3C)综合分析表明, 外套膜与粘液形成了截然不同的微生物生态位。外套膜组织

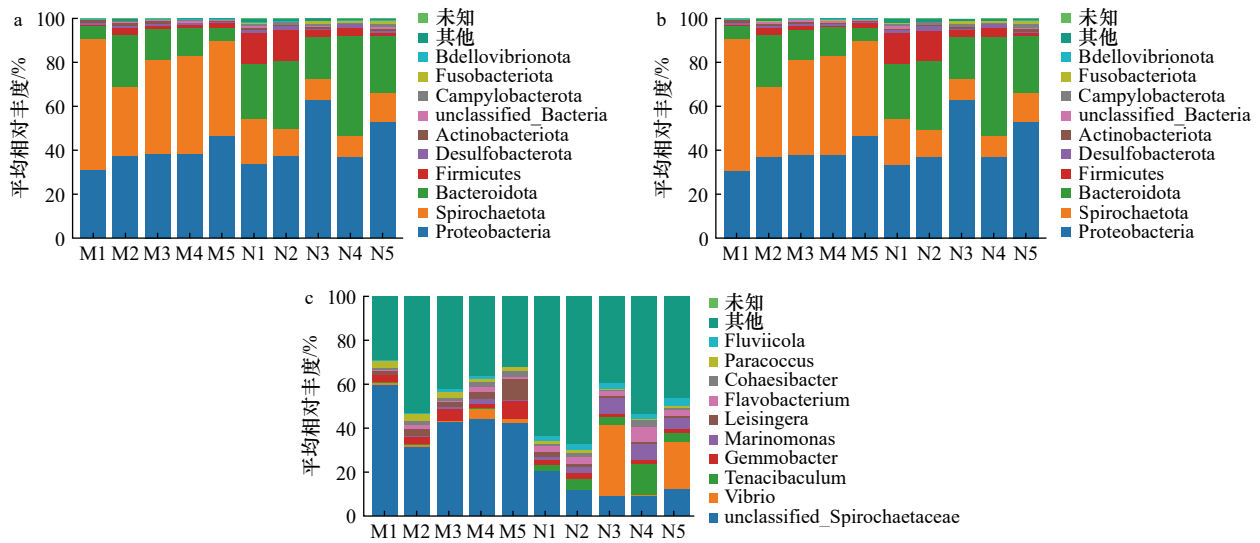


图 3 文蛤外套膜(M)和粘液(N)菌群在各分类水平的平均相对丰度分布情况

Fig. 3 Average relative abundance distribution of the microbial communities in the mantle(M) and mucus(N) at different taxonomic levels in *M. meretrix*

A. 门水平上分类组成; B. 科水平上分类组成; C. 属水平上分类组成

A. Taxonomic composition at the phylum level; B. Taxonomic composition at the family level; C. Taxonomic composition at the genus level

微环境较为稳定,以螺旋体科(Spirochaetaceae)为主导,并与红杆菌科(Rhodobacteraceae)下的芽殖杆菌属(*Gemmobacter*)、雷氏辛格菌属(*Leisingera*)、副球菌属(*Paracoccus*)等共同构成核心菌群;而粘液菌群则更为动态多元,螺旋体科生态位被弧菌科(Vibrionaceae)中主要成员弧菌属(*Vibrio*)和黏着杆菌属(*Tenacibaculum*)取代。同时,黄杆菌科(Flavobacteriaceae)中主要成员黄杆菌属(*Flavobacterium*)、海单胞菌属(*Marinomonas*)与栖河菌属(*Fluviicola*)等具有潜在益生或环境适应功能的类群也在粘液中显著富集。综上,文蛤粘液作为一个独特界面微环境,其菌群由组织中的螺旋体科绝对主导,转变为病原菌与多种适应性菌群共存竞争的多元格局。

本研究通过比较文蛤外套膜组织与粘液中的微生物群落,揭示了显著的生态位分化现象。在前20个差异分类群中,假交替单胞菌属(*Pseudomonas*)、未分类的螺旋体科(unclassified_Spirochaetaceae)、德沃斯氏菌属(*Devosia*)、假红杆菌属(*Pseudorhodobacter*)、硫杆菌属(*Sulfobacter*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、副球菌属等表现出明显的外套膜组织偏好。值得注意的是,内共生单胞菌属(*Endozoicomonas*)、栖河菌属(*Fluviicola*)、*Marivivens*、李氏杆菌属(*Lishizhenia*)和栖盐菌属(*Salinirepens*)等在粘液中表现出极强富集特征(图4)。

此外,使用线性判别分析效应大小来鉴定特定的细菌分类群。粘液组共鉴定出19个特异菌,外套膜

组共鉴定出12个(LDA score > 4)。这些分类群在区分这两个组的菌群组成方面发挥了关键作用(图5)。

3.1.3 菌群的功能预测

基于PICRUST2对16S rRNA基因特征序列进行功能预测分析,结果显示外套膜和粘液菌群在KEGG通路上存在显著差异($P < 0.05$)。在二级功能水平上,糖苷生物合成与代谢通路被显著富集;在三级功能水平上,半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、氧化磷酸化通路差异极显著,而药物感应、代谢途径和碳代谢也呈现显著富集(图6)。

3.2 弧菌胁迫后文蛤外套膜的组织结构观察

Masson染色结果显示,对照组文蛤外套膜区域呈致密胶原纤维结构(CFS),皮肤组织形态完整,细胞排列紧密规则;而经高浓度弧菌感染后,该区域胶原纤维结构解体,呈现液化改变(VS),而肌纤维和胞质(CM)排列松散,同时外套膜微绒毛(MV)出现增生性病变,伴随细胞完整性破坏。AB-PAS染色结果显示,弧菌感染后文蛤外套膜外褶区域酸性粘多糖含量显著升高,且可见酸性粘液细胞(AM)明显增生,体表存在持续的粘液分泌现象(图7)。

3.3 弧菌胁迫后文蛤粘液代谢组学分析

基于公共及自建二级质谱数据库进行物质注释后,多维统计分析显示,正常组与实验组在正、负离子模式下均呈现显著分离。布雷-柯蒂斯距离热图进一步揭示了组间代谢物组成差异,PLS-DA模型也进一步证实组间代谢物聚类显著且分离明显。样本重

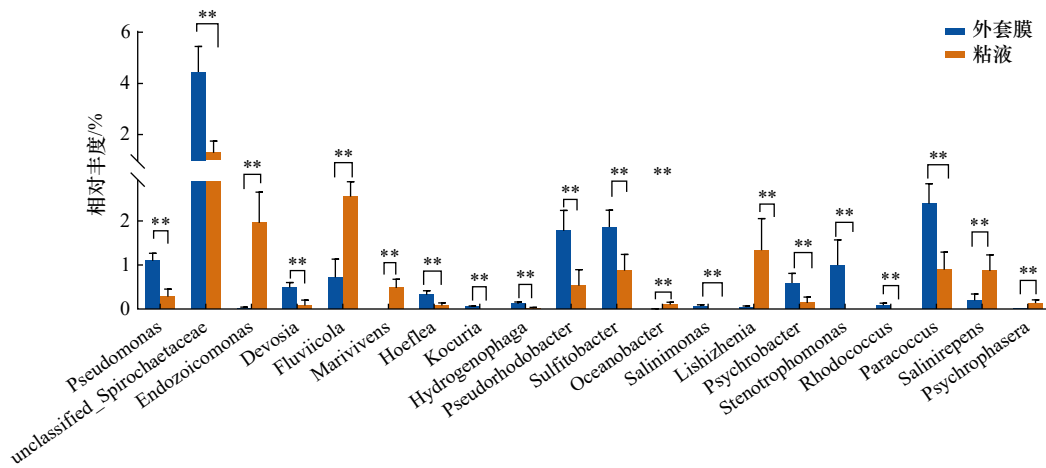


图 4 文蛤外套膜和粘液菌群在属水平上的组间方差分析柱状图

Fig. 4 Bar chart of intergroup analysis of variance (ANOVA) of the microbiota in the mantle and mucus of *M. meretrix* at the genus level

“***”表示差异极显著 ($P < 0.01$)

“***” indicates the significant difference in the level of $P < 0.01$

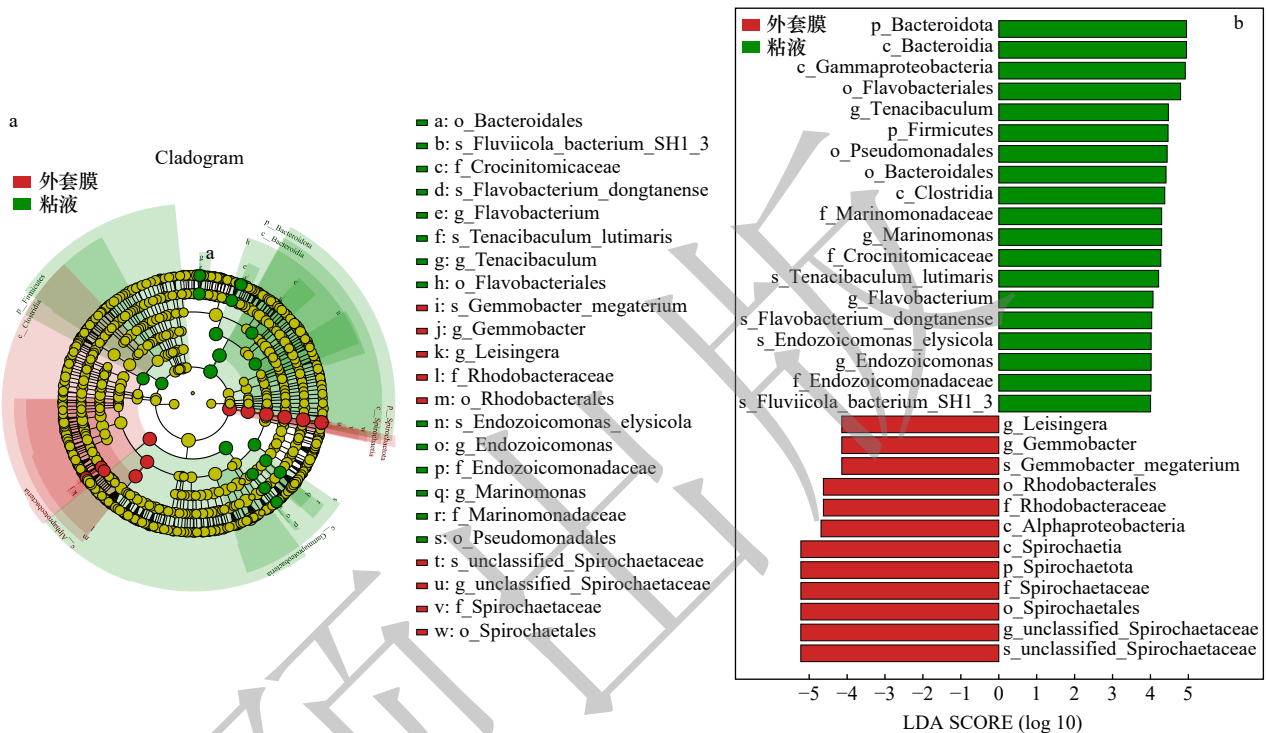


图 5 文蛤外套膜和粘液菌群 LEfSe 分析结果

Fig. 5 LEfSe analysis results of the mantle and mucus bacterial communities of *M. meretrix*

A. LDA 值分布直方图; B. 进化分歧图

A. Cladogram; B. Histogram of LDA value distribution.

复性评估结果显示, 正离子模式下 PC1 与 PC2 贡献率分别为 22.6% 和 9.4% (图 8A), 负离子模式下则为 22% 和 10.4% (图 8D), 组内样本聚集良好 (图 8B, 8E), 表明实验质量控制可靠。同时, 对照组与胁迫组样本明显分离, 说明弧菌胁迫可显著改变文蛤外套膜粘液的代谢谱。PLS-DA 模型在正、负离子模式下的 R2Y 分别达 0.997 和 0.996, Q2Y 分别为 0.711 和 0.84, R2Y

均高于 0.9, 表明模型具有较高的解释度与良好的预测能力 (图 8C, 8F)。此外, 样本相关性热图与上述分析结果一致, 综合表明组内样本重复性良好, 且弧菌胁迫显著改变了文蛤外套膜粘液的代谢物组成与状态。

基于高分辨质谱的非靶向代谢组学分析, 在正、负离子模式下分别检测到 1 160 和 844 个分子特征峰。对其中 459 种 (ESI+) 和 152 种 (ESI-) 代谢物进行

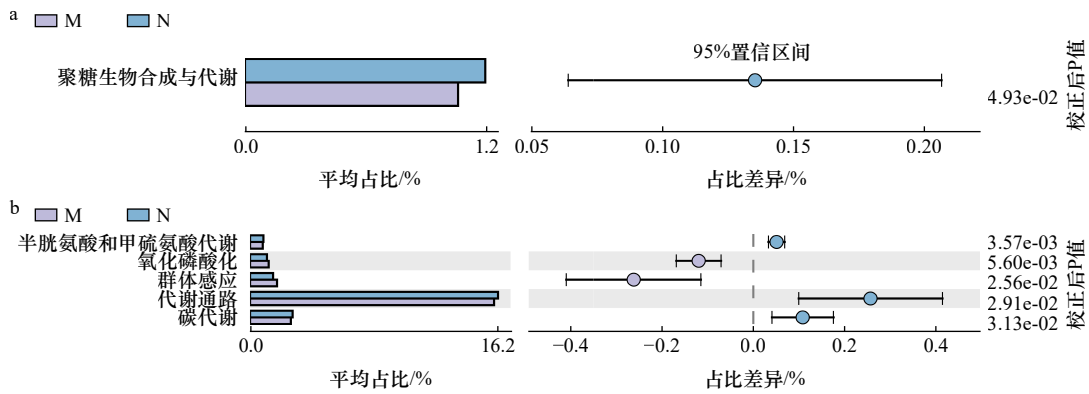


图 6 文蛤外套膜和粘液菌群的 KEGG 代谢途径分析

Fig. 6 KEGG metabolic pathway analysis of the mantle and mucus microbiota in *M. meretrix*.

A. 二级功能水平; B. 三级功能水平

A. Secondary functional level; B. Tertiary functional level

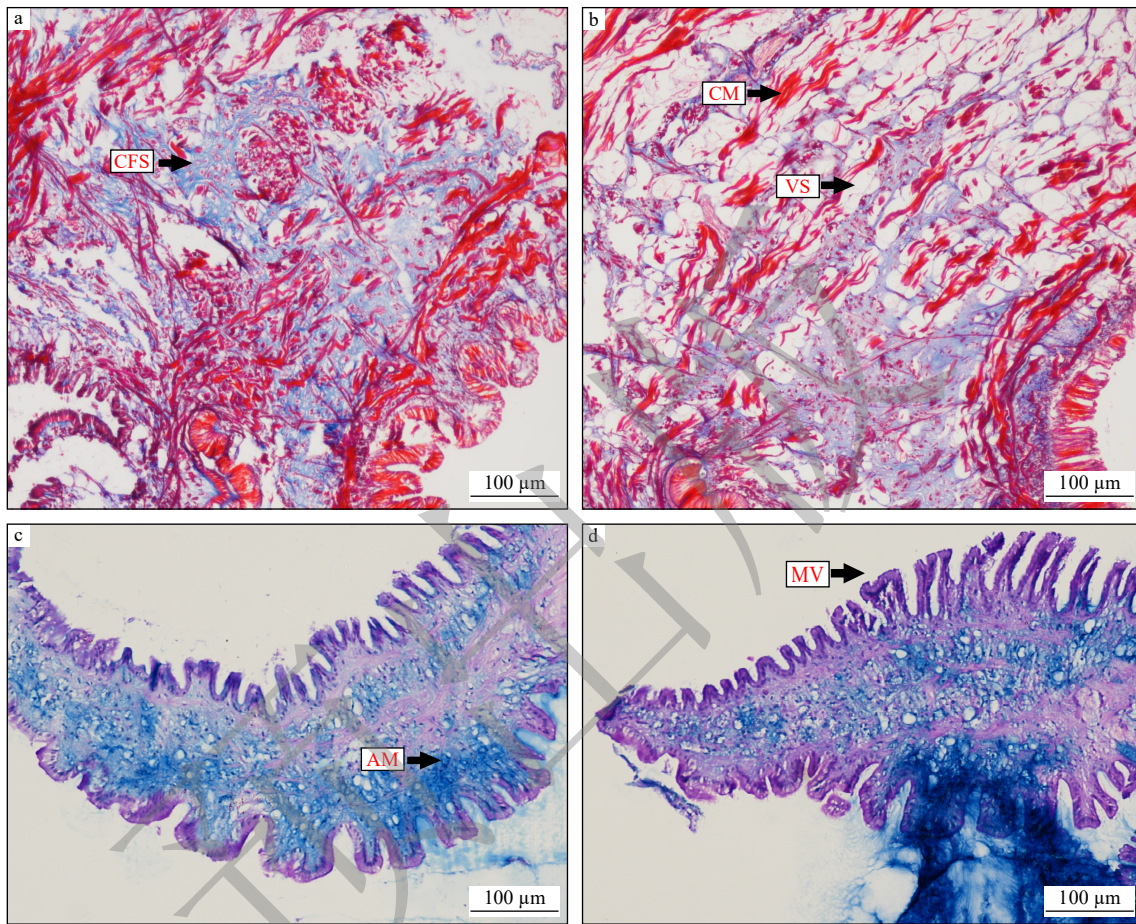


图 7 文蛤弧菌胁迫后外套膜组织切片

Fig. 7 Histological sections of mantle tissues after *Vibrio* infection in *M. meretrix*.

A, B. 外套膜区域 Masson 染色; C, D. 外套膜外褶区域 AB-PAS 染色。图 A, C 为对照组, 图 B, D 为副溶血弧菌感染组。CFS: 胶原纤维结构, CM: 肌纤维和胞质, VS: 液态结构, MV: 微绒毛, AM: 酸性黏液细胞; 比例尺为 100 μm

A, B. Masson's trichrome staining of the mantle region; C, D. Alcian blue-periodic acid-Schiff (AB-PAS) staining of the outer fold region of the mantle. A and C were the control groups, and B and D were the *Vibrio* infected groups. CFS: collagen fiber structure, CM: cytoplasmic matrix and muscle fibers, VS: liquid (-phase) structure, MV: microvilli, AM: acidic mucus; Scale bar = 100 μm.

统计分析, 以 $VIP \geq 1$, $FC \geq 2$, $FC \leq 0.5$, $P \leq 0.05$ 为标准筛选差异代谢物, 并对其进行 KEGG 功能注释, 共

筛选出 73 种差异代谢物, 其中 65 种显著上调, 8 种显著下调。在差异代谢物热图分析中, 实验组与对照组

间的聚类明显分离,表明弧菌胁迫显著重塑了文蛤粘液的代谢物谱。这些差异代谢物涵盖有机酸、前列腺素及其衍生物、甾体抗炎药、糖类与糖苷、生物碱、萜类、激素/受体调节剂、药物及天然活性化合物等类别。

在弧菌胁迫后,呈最显著差异的代谢物主要包括3'-半乳糖基乳糖腺苷、腺嘌呤、乙酰唑胺、丙酸、琥珀酸、反式创伤酸等($P < 0.001$, 图9)。KEGG富集结果表明,17种差异代谢物被注释到51条通路中,其中烟酸与烟酰胺代谢($P < 0.01$)、 α -亚麻酸代谢、丙酸代谢及苯丙氨酸代谢($P < 0.05$)最显著富集(图10A)。这些通路共涉及琥珀酸、丙酸、反式创伤酸等7种关键代谢物。MetPA拓扑分析进一步揭示了丙酸代谢、丁酸代谢、TCA循环等重要代谢途径受到显著扰动(图10B)。

3.4 粘液菌群与差异代谢物的相关性分析

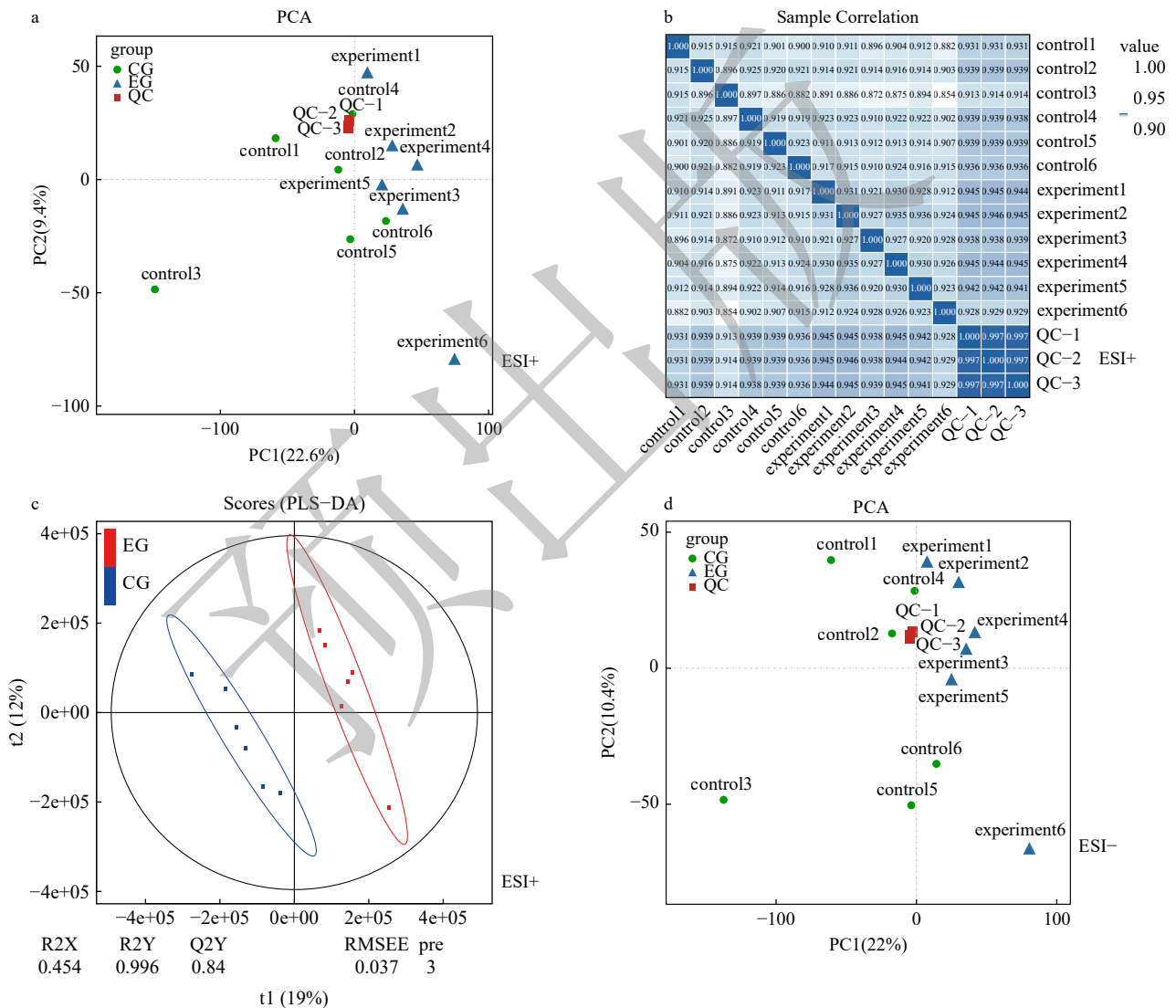
基于斯皮尔曼等级相关分析,本研究发​​现文蛤外

套膜粘液中30个细菌属与17种差异代谢物之间的显著关联(图11)。具体而言,海单胞菌属与尿嘧啶呈强正相关($r = 1.00, P < 0.001$),而亚硫酸盐杆菌属、另枝菌属、副球菌属、淤泥芽殖杆菌属和雷辛格氏菌属与尿嘧啶呈负相关($r = -0.89 \sim -1.00$)。李时珍氏菌属与二半乳糖醛酸显著正相关($r = 1.00$),快生黏着杆菌属与腺苷、腺嘌呤、马来酸、反式创伤酸、海柯皂苷元和茉莉酸均呈正相关($r = 0.90$)。中温黄杆菌属与苯乙酰谷氨酰胺强正相关($r = 1.00$),与海柯皂苷元和茉莉酸亦呈正相关($r = 0.90$)。内共生单胞菌属与琥珀酸、丙酸和他莫昔芬显著负相关($r = -0.90$),黄杆菌属与硝酸呈完全负相关($r = -1.00$)。

4 讨论

4.1 外套膜和粘液菌群的生态位分化

本研究发​​现,文蛤外套膜与粘液菌群结构存在显著差异,这种差异源于二者不同的生态位特性:外套



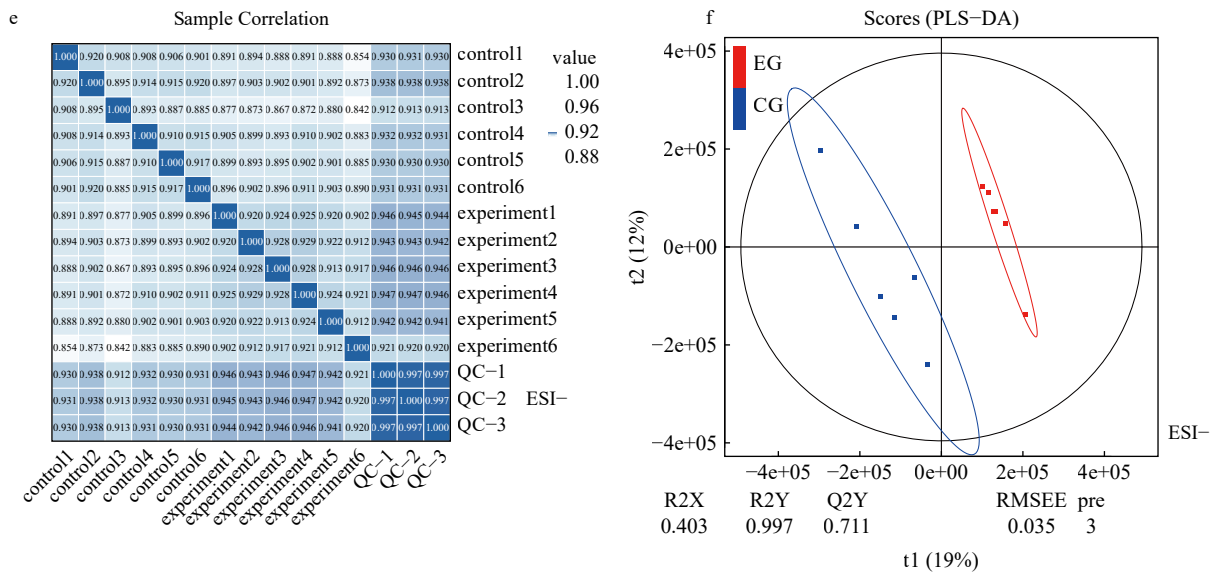


图 8 基于 UHPLC-Q-TOF/MS 的 12 份粘液样本和 3 份 QC 样本分析

Fig. 8 12 mucus and 3 quality control (QC) sample analysis based on UHPLC-Q-TOF/MS

A. 基于正离子模式的主成分分析图; B. 基于正离子模式的样本相关性热图; C. 基于正离子模式的偏最小二乘法判别分析的评分图; D. 基于负离子模式的主成分分析图; E. 基于负离子模式的样本相关性热图; F. 于负离子模式的偏最小二乘法判别分析的评分图

A. Principal component analysis (PCA) score plot in positive ion mode; B. Sample correlation heatmap in positive ion mode; C. Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) score plot in positive ion mode; D. PCA score plot in negative ion mode; E. Sample correlation heatmap in negative ion mode; F. PLS-DA score plot in negative ion mode

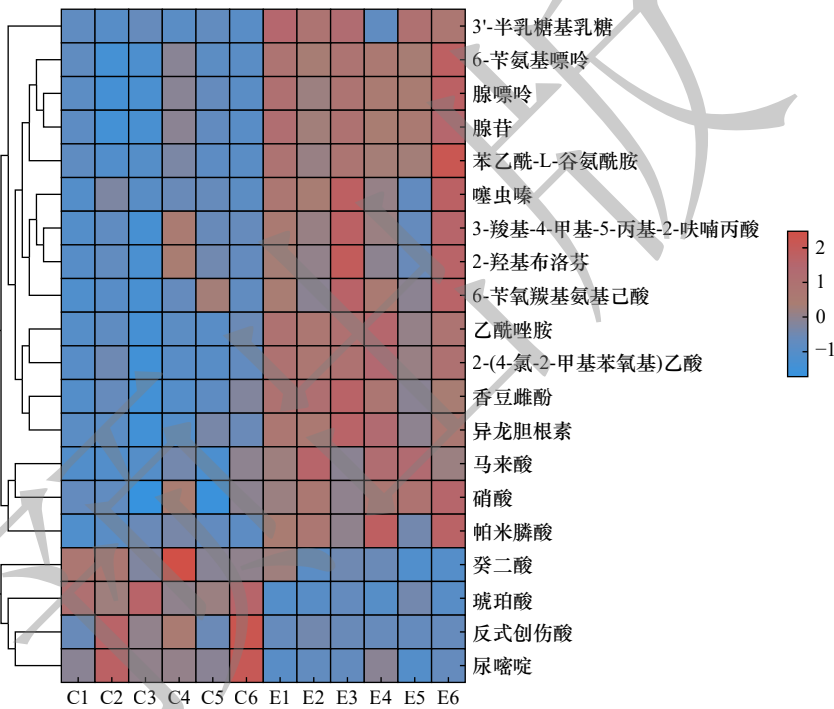


图 9 基于正、负离子模式 Top20 代谢物的聚类热图

Fig. 9 Clustered heatmap of the Top 20 metabolites.

C1-C6 为对照组; E1-E6 为实验组

C1-C6 are the control group; E1-E6 are the experimental group

膜组织为结构稳定的微环境, 其上皮褶皱与腺体结构有利于微生物滞留并形成功能复杂的生物膜, 从而提高了物种丰富度^[23]。相比之下, 粘液环境动态性强,

粘液持续分泌与外界物理冲刷限制了微生物的定植时间。同时其富含的黏蛋白、抗菌肽等活性分子, 能够构成化学筛选屏障, 阻止多数病原菌定位^[24-25]。变

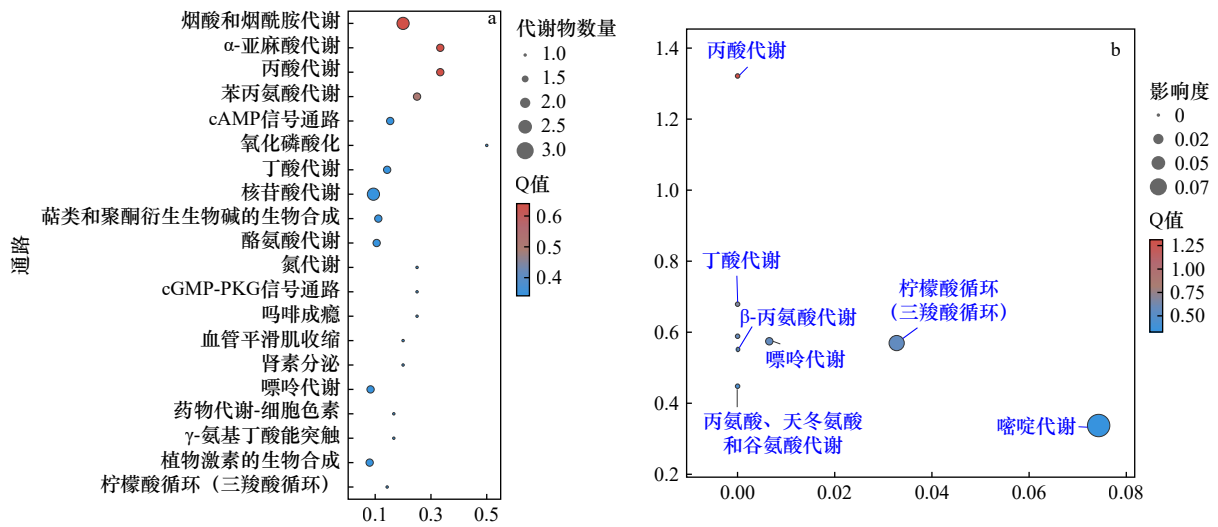


图 10 正、负离子模式下差异代谢物的 KEGG 富集气泡图(A)和 MetPA 拓扑分析(B)
Fig. 10 KEGG enrichment bubble chart (A) and MetPA topological analysis (B) of differential metabolites in positive and negative ion modes

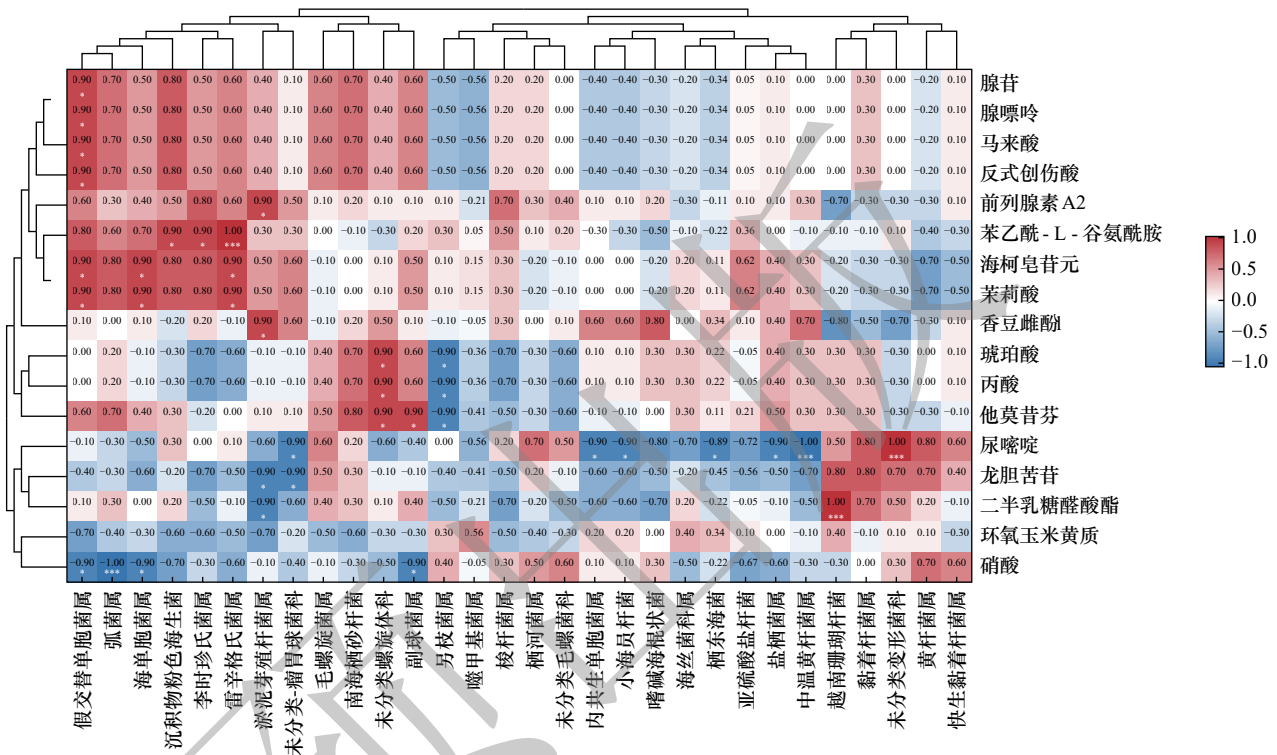


图 11 文蛤外套膜粘液优势菌属与代谢产物的相关性热图
Fig. 11 Correlation heatmap between the dominant bacterial genera and metabolites in the mucus of *M. meretrix*.

“*”表示差异显著 ($P < 0.05$), “**”表示差异极显著 ($P < 0.01$), “***”表示差异极显著 ($P < 0.001$)
“*” indicates the significant difference in the level of $P < 0.05$, “**” indicates the significant difference in the level of $P < 0.01$, and “***” indicates the significant difference in the level of $P < 0.001$

形菌门和螺旋体门是许多海洋生物中最丰富的门,这一结果与鱼皮中的结果保持一致^[26]。具体而言,变形菌门在两组样本中的相对丰度无显著差异,而螺旋体门和在拟杆菌门分别在外套膜和外套膜粘液中占据极显著优势。本研究发现,文蛤粘液中的拟杆菌门远远超过外套膜组织中的丰度,与变形菌门共同构成了

粘液微生物群落的主体。拟杆菌门作为常见的粘液定殖菌群,具有降解复杂多糖的代谢特性,其特有的 IX 型分泌系统 (T9SS) 能高效分泌降解酶,并与细菌滑翔运动协同,促进粘液多糖的快速分解^[27]。在文蛤粘液中,拟杆菌属显著富集,提示该菌门可能通过 T9SS 系统参与宿主粘液基质的代谢循环。

4.2 关键细菌类群在粘液免疫中的功能

研究表明, 内生单胞菌属在健康珊瑚(*Porites as-treoides*)粘液中占据优势地位, 能够通过编码粘液基质修饰酶(如 N-去糖基化酶)促进其在宿主界面的定殖, 并通过氧化应激缓解机制参与免疫调节^[28-29]。也有研究证实该菌能显著增强双壳贝类对弧菌的抵抗能力, 证实了文蛤粘液微环境中其能够作为兼具定殖适应性与免疫调节功能的重要共生微生物^[12]。另外海单胞菌属在粘液微环境中也表现出显著的免疫调节潜力。该菌不仅能合成广谱抗菌化合物(如具有赖氨酸氧化酶活性的细菌素)来直接抑制病原菌生长^[30]; 还能通过产生植物激素吲哚-3-乙酸(IAA)激活抗氧化系统, 增强宿主对环境胁迫的抵抗能力^[31]。这些特性共同表明海单胞菌属可能通过化学防御与氧化应激调节双重机制, 在文蛤粘液免疫中发挥重要作用。此外, 有文献指出栖河菌属与农村有机废水中的抗生素耐药性污染表现出很强的相关性^[32]。假交替单胞菌属能够携带编码抗生素耐药性和毒力因子基因^[33]。综合研究结果发现, 文蛤粘液是栖河菌属主要的定植位点, 而外套膜是假交替单胞菌属主要的定植位点, 因此进一步认为粘液和外套膜能够协同维护宿主的健康。弧菌属和黏着杆菌属在文蛤粘液中显著增殖, 导致变形菌门相对丰度上升。这两种病原菌对水产养殖业构成严重威胁^[34-35]。黏着杆菌属能分泌大量胞外聚合物形成生物膜, 并具备多种铁获取系统以增强其生存能力^[36-37]。弧菌属则表现出对粘液的强趋化性和鞭毛驱动的高运动性, 有助于其穿透宿主粘液屏障^[38-39]。这些适应机制共同促进了病原菌在粘液层的定殖, 表明文蛤粘液是病原体入侵与宿主防御的关键微环境。功能预测显示, 文蛤粘液菌群在半胱氨酸和甲硫氨酸代谢以及氧化磷酸化通路显著富集, 前者对于合成抗氧化剂谷胱甘肽至关重要, 后者则为免疫反应提供能量。综上, 文蛤粘液微环境是一个动态平衡的生态前沿, 其菌群结构、功能代谢以及病原与共生微生物的相互作用, 共同决定了宿主在面对弧菌胁迫时的免疫防御能力与健康状态。

4.3 弧菌胁迫影响文蛤粘液的代谢动态平衡

在本研究中, Masson 染色结果表明文蛤外套膜外褶区域是弧菌感染初期的主要病理应答部位, 且 AB-PAS 染色结果进一步证实弧菌感染后外套膜外褶酸性粘液水平的显著上调, 表明弧菌感染可诱导文蛤外套膜褶皱形态延伸, 推测该表型是组织损伤后的适应性修复响应, 即受损部位周边上皮细胞发生增殖与迁移, 同时新生细胞补充粘液细胞, 因此外套膜粘液

可能进一步增强了文蛤抵御弧菌侵染的抗菌防御能力, 从而维持机体长期免疫防御功能。粘液代谢组学分析表明, 弧菌感染导致文蛤外套膜粘液发生了剧烈的代谢变化。PCA 和 PLS-DA 模型清晰地显示对照组与实验组完全分离, 差异代谢物在烟酸和烟酰胺代谢、 α -亚麻酸代谢、丙酸代谢及苯丙氨酸代谢等核心通路中的显著富集。在能量与免疫调控层面, 琥珀酸作为三羧酸循环的关键中间体显著上调, 除参与能量代谢外, 在协调炎症与修复过程中增强宿主防御能力^[40]。文蛤可能通过协调炎症与修复过程, 增强对弧菌胁迫的防御能力。丙酸作为短链脂肪酸, 其富集可能源于微生物发酵或宿主代谢重编程, 并通过 GPCR 信号通路增强粘液屏障功能。KEGG 通路富集分析进一步证实了丙酸代谢和 TCA 循环的扰动, 表明弧菌胁迫打乱了宿主的基础能量代谢。这些差异代谢物(包括腺嘌呤、腺苷酸及二肽 Arg-Cys、Lys-Tyr 等)通过其代谢通路的作用, 为机体清除副溶血弧菌提供了必需的能量与分子基础。在溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)胁迫时, 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)能够通过苯丙氨酸代谢增强其免疫力和抗病能力^[41]。在免疫调节机制层面, 苯丙氨酸代谢途径的激活可能通过上调溶酶体和 C3b 增强宿主对弧菌的清除能力^[42], 其下游代谢物苯乙酰谷氨酰胺(PAGln)在弧菌胁迫后文蛤粘液中显著积累, 推测部分菌群可能参与了该免疫调控过程^[43]。综上所述, 弧菌胁迫下文蛤通过代谢网络的系统性重塑, 协调能量供应、屏障功能与免疫调节等多重机制, 构建了针对病原侵袭的整合性防御策略。

4.4 文蛤粘液菌群与代谢物相关性分析

本研究通过 16S rRNA 基因测序和非靶向代谢组学, 初步揭示了文蛤外套膜粘液菌群组成及其在弧菌胁迫下的代谢响应。文蛤粘液的优势菌海单胞菌属与尿嘧啶呈正相关, 雷氏菌属与尿嘧啶呈负相关。有研究表明海洋细菌可合成尿嘧啶^[44], 提示文蛤粘液海单胞菌属可能具有类似功能。雷氏菌属作为玫瑰杆菌类群成员, 能够产生靛蓝素等抗菌物质, 文蛤粘液菌群可能通过分解尿嘧啶作为氮碳源, 导致其丰度与尿嘧啶呈负相关^[45]。文蛤粘液的李时珍氏菌属与二半乳糖醛酸呈正相关, 李时珍氏菌属是拟杆菌门黄杆菌门的一员, 具有 β -半乳糖苷酶活性^[46], 推测粘液菌群通过降解半乳糖苷类物质获取碳源, 从而与降解产物浓度同步上升。中温黄杆菌属与苯乙酰谷氨酰胺呈显著正相关, 已有研究发现苯乙酰谷氨酰胺是一种与微生物群相关的代谢物, 在代谢疾病中发挥重要的作用^[47]。该菌作为有益菌可能参与文蛤粘液代谢物

转化,而苯乙酰谷氨酰胺作为微生物相关代谢物可能促进其生长。文蛤粘液黄杆菌属与硝酸呈显著负相关。脱硫弧菌属(*Desulfovibrio desulfuricans*)可以利用硝酸盐或亚硝酸盐作为替代的电子受体来进行无氧呼吸,亚硝酸盐的积累对许多细菌有毒性^[48-49],推测文蛤粘液的黄杆菌可能对亚硝酸盐特别敏感,可能抑制黄杆菌生长,导致其丰度与硝酸浓度负相关。此外,文蛤粘液其他代谢物也与上述菌群呈显著的相关性,而这些代谢物的精确功能需要进一步研究。以上结果表明,宿主的免疫代谢响应并非一个孤立事件,而是与其共生微生物群落构成一个协同互作的功能网络。由于文蛤粘膜代谢物易受环境影响,因此可能无法可靠地识别特定代谢物的真正菌群生产者^[17],未来研究可聚焦于关键有益菌群的定向操控,以验证其

在增强文蛤抗病性中的因果作用。

5 结论

文蛤外套膜为生物膜提供了稳定的定植基础,而粘液则构成了动态的免疫与代谢界面,其菌群结构精简,富集了拟杆菌门等具有粘液适应能力的类群。弧菌胁迫后导致文蛤粘液成分发生代谢重编程,激活了包括苯丙氨酸代谢、TCA循环在内的多条通路,协调了能量供应、免疫清除与组织修复。相关性分析表明,关键菌群(如海单胞菌属)与特定代谢物密切相关,提示宿主免疫代谢响应与共生微生物群落构成一个功能协同网络。综合表明,文蛤粘液微环境是一个受宿主-微生物互作调控的动态功能单元,为贝类黏膜免疫机制与微生物组的病害防控策略提供了新视角。

参考文献:

- [1] 王如才,王昭萍,张建中.海水贝类养殖学[M].青岛:中国海洋大学出版社,2008. (查阅网上资料,未找到对应的标黄作者信息,请确认) Wang Rucai, Wang Zhaoping, Zhang Jianzhong. Aquaculture of Marine Shellfish[M]. Beijing: Ocean University of China Press, 2008. (查阅网上资料,未找到对应的英文翻译,请确认)
- [2] Cook D W, O'leary P, Hunsucker J C, et al. *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in U. S. retail shell oysters: a national survey from June 1998 to July 1999[J]. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(1): 79-87.
- [3] Wu C J, Wang Hang, Chan Yilin, et al. Passive immune-protection of small abalone against *Vibrio alginolyticus* infection by anti-*Vibrio* IgY-encapsulated feed[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(4/5): 1042-1048.
- [4] 谢超伊,宋宏策,董美云,等.长牡蛎外套膜组织着色区和无色区的微生物多样性比较分析[J].海洋通报,2024,43(2):188-197. Xie Chaoyi, Song Hongce, Dong Meiyun, et al. Comparative analysis of microbial diversity between coloured and colorless areas of *Crassostrea gigas* mantle[J]. *Marine Science Bulletin*, 2024, 43(2): 188-197.
- [5] Venier P, Varotto L, Rosani U, et al. Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 69.
- [6] Beuerlein K, Löhr S, Westermann B, et al. Components of the cellular defense and detoxification system of the common cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda)[J]. *Tissue and Cell*, 2002, 34(6): 390-396.
- [7] 何治江,贾梦雪,王锦乙,等.厚壳贻贝不同组织中的微生物群落结构[J].水产学报,2022,46(12):2421-2431. He Zhijiang, Jia Mengxue, Wang Jinyi, et al. Differential distribution of indigenous microbiome in tissues of *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(12): 2421-2431.
- [8] Kumar M R, Krishnan K A, Vimexen V. Effect of trace metal contamination in sediments on the bioaccumulation of bivalve *Meretrix meretrix*[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2022, 176: 113422.
- [9] Wang Xiaotian, Zhou Shangjie, Dong Jianhao, et al. The impact of bisphenol A on gill health: a focus on mitochondrial dysfunction induced disorders of energy metabolism and apoptosis in *Meretrix petechialis*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2025, 279: 107259.
- [10] Zhang Shujing, Jiao Shuang, Liu Dongweu, et al. Characterization of the lipidomic profile of clam *Meretrix petechialis* in response to *Vibrio parahaemolyticus* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 134: 108602.
- [11] Su Rina, Fang Jun, Wang Hongxia, et al. Lipid metabolism changes in clam *Meretrix petechialis* in response to *Vibrio* infection and the identification of *Vibrio*-resistance markers[J]. *Aquaculture*, 2021, 539: 736611.
- [12] Dong Li, Wang Hongxia, Bo Haitian, et al. Probiotic potential of gill-symbiotic *Endozoicomonas* sp. in enhancing vibrio resistance in the clam *Meretrix petechialis*: a novel approach to sustainable aquaculture[J]. *Aquaculture*, 2025, 598: 742041.
- [13] 岳欣.文蛤弧菌病的病原分析、免疫应答及抗性选育研究[D].青岛:中国科学院研究生院(海洋研究所),2011. Yue Xin. *Vibrio* disease, anti-*vibrio* immunity and *vibrio*-resistance selective breeding of clam *Meretrix meretrix*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2011.
- [14] Yue Xin, Zhang Shujing, Wang Hongxia, et al. The mud-dwelling clam *Meretrix petechialis* secretes endogenously synthesized erythromycin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(49): e2214150119.
- [15] Lowrey L, Woodhams D C, Tacchi L, et al. Topographical mapping of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) microbiome reveals a diverse bacterial community with antifungal properties in the skin[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(19): 6915-6925.

- [16] Liu Wenwen, Mo Fengfeng, Jiang Guixian, et al. Stress-induced mucus secretion and its composition by a combination of proteomics and metabolomics of the jellyfish *Aurelia coerulea*[J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(9): 341.
- [17] Sinha A K, Laursen M F, Licht T R. Regulation of microbial gene expression: the key to understanding our gut microbiome[J]. *Trends in Microbiology*, 2025, 33(4): 397–407.
- [18] Leng Weijun, Wu Xiaoyun, Shi Tong, et al. Untargeted metabolomics on skin mucus extract of *Channa argus* against *Staphylococcus aureus*: antimicrobial activity and mechanism[J]. *Foods*, 2021, 10(12): 2995.
- [19] Ekman D R, Skelton D M, Davis J M, et al. Metabolite profiling of fish skin mucus: a novel approach for minimally-invasive environmental exposure monitoring and surveillance[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(5): 3091–3100.
- [20] Ivanova L, Rangel-Huerta O D, Tartor H, et al. Fish skin and gill mucus: a source of metabolites for non-invasive health monitoring and research[J]. *Metabolites*, 2022, 12(1): 28.
- [21] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996–998.
- [22] 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.
- [23] Yu H, Rhee M S. Characterization of ready-to-eat fish surface as a potential source of contamination of *Vibrio parahaemolyticus* biofilms[J]. *Food Research International*, 2023, 169: 112890.
- [24] Subramanian S, MacKinnon S L, Ross N W. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 148(3): 256–263.
- [25] Benhamed S, Guardiola F A, Mars M, et al. Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 171(1/2): 1–12.
- [26] Revault J, Desdevises Y, Magnanou É. Link between bacterial communities and contrasted loads in ectoparasitic monogeneans from the external mucus of two wild sparid species (Teleostei)[J]. *Animal Microbiome*, 2024, 6(1): 42.
- [27] McKee L S, La Rosa S L, Westereng B, et al. Polysaccharide degradation by the Bacteroidetes: mechanisms and nomenclature[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2021, 13(5): 559–581.
- [28] Ding J Y, Shiu J H, Chen Wenming, et al. Genomic insight into the host-endosymbiont relationship of *Endozoicomonas montiporae* CL-33^T with its coral host[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 251.
- [29] Meyer J L, Paul V J, Teplitski M. Community shifts in the surface microbiomes of the coral *Porites astreoides* with unusual lesions[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100316.
- [30] Lucas-Elio P, ElAlami T, Martínez A, et al. *Marinomonas mediterranea* synthesizes an R-type bacteriocin[J]. *Applied And Environmental Microbiology*, 2024, 90(1): e01273–23.
- [31] Bertrand C, Martins R, Nunes F, et al. Genomic insights into indole-3-acetic acid catabolism in the marine algae-associated bacterium, *Marinomonas* sp. NFXS50[J]. *Access Microbiology*, 2024, 6(9): 000856. v3.
- [32] Kang M, Van Le V, Ko S R, et al. Effect of rainfall in shaping microbial community during *Microcystis* bloom in Nakdong River, Korea[J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 928: 172482.
- [33] Wang Hailiang, Sun Bochao, Xie Guosi, et al. Spotlight on a novel bactericidal mechanism and a novel SXT/R391-like integrative and conjugative element, carrying multiple antibiotic resistance genes, in *Pseudoalteromonas flavipulchra* strain CDM8[J]. *Microbiological Research*, 2021, 242: 126598.
- [34] Zhao Na, Deng Qiuxia, Zhu Chunhua, et al. Mucus piRNAs profiles of *Vibrio harveyi*-infected *Cynoglossus semilaevis*: a hint for fish disease monitoring[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2022, 45(1): 165–175.
- [35] Conforto E, Vilchez-Gómez L, Parrinello D, et al. Role of mucosal immune response and histopathological study in European eel (*Anguilla anguilla* L.) intraperitoneal challenged by *Vibrio anguillarum* or *Tenacibaculum soleae*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 114: 330–339.
- [36] Burchard R P, Rittschof D, Bonaventura J. Adhesion and motility of gliding bacteria on substrata with different surface free energies[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(8): 2529–2534.
- [37] Echeverría-Bugueño M, Avendaño-Herrera R. *Tenacibaculum dicentrarchi* produce outer membrane vesicles (OMV) that are associated with the cytotoxic effect in rainbow trout head kidney macrophages[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2024, 47(2): e13888.
- [38] Rahman I, Al-Bar A H A, Richard F S, et al. Chemotactic response of *Vibrio coralliilyticus* to mucus from various coral species[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2021, 67(7): 548–552.
- [39] Grognot M, Mittal A, Mah'moud M, et al. *Vibrio cholerae* motility in aquatic and mucus-mimicking environments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(20): e01293–21.
- [40] Wei Yihan, Ma Xi, Zhao Jiangchao, et al. Succinate metabolism and its regulation of host-microbe interactions[J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2190300.
- [41] Kuo C H, Ballantyne R, Huang Polin, et al. *Sarcodia suae* modulates the immunity and disease resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio alginolyticus* via the purine metabolism and phenylalanine metabolism[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 127: 766–777.
- [42] Jiang Ming, Gong Qiyang, Lai Sisi, et al. Phenylalanine enhances innate immune response to clear ceftazidime-resistant *Vibrio alginolyti-*

- cus in *Danio rerio*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 912–919.
- [43] Zhu Yijun, Dwidar M, Nemet I, et al. Two distinct gut microbial pathways contribute to meta-organismal production of phenylacetylglutamine with links to cardiovascular disease[J]. *Cell Host & Microbe*, 2023, 31(1): 18–32. e9.
- [44] 尹宏权, 田黎, 付红伟, 等. 海洋细菌 *Bacillus marinus* 化学成分分离和结构鉴定[J]. 北京理工大学学报, 2007, 27(5): 460–462.
Yin Hongquan, Tian Li, Fu Hongwei, et al. Isolation and structure identification of chemical constituents from marine bacteria *Bacillus marinus*[J]. *Transactions of Beijing Institute of Technology*, 2007, 27(5): 460–462.
- [45] Gromek S M, Suria A M, Fullmer M S, et al. *Leisingera* sp. JC1, a bacterial isolate from Hawaiian bobtail squid eggs, produces indigoidine and differentially inhibits vibrios[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1342.
- [46] Chen Liping, Xu Haiying, Fu Songzhe, et al. *Lishizhenia tianjinensis* sp. nov., isolated from coastal seawater[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(10): 2400–2403.
- [47] Duan Yafei, Wang Yun, Liu Qingsong, et al. Changes in the intestine microbial, digestion and immunity of *Litopenaeus vannamei* in response to dietary resistant starch[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 6464.
- [48] Cadby I T, Faulkner M, Cheneby J, et al. Coordinated response of the *Desulfovibrio desulfuricans* 27774 transcriptome to nitrate, nitrite and nitric oxide[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 16228.
- [49] Bueno E, Sit B, Waldor M K, et al. Anaerobic nitrate reduction divergently governs population expansion of the enteropathogen *Vibrio cholerae*[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3(12): 1346–1353.

Mantle-Mucus Microbial Communities and Metabolic Responses to *Vibrio* Stress in the hard clam *Meretrix meretrix*

Wang Mengtian^{1,2,3}, Fu Lulu^{2,3}, Yao Hanhan¹, Dong Yinghui²

(1. Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources, College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China; 2. College of Modern Agriculture, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang, 315101, China; 3. Ninghai Marine Biological Seed Industry Research Institute, Zhejiang Wanli University, Ninghai 315604, China)

Abstract: The mantle tissue and its mucus of the hard clam *Meretrix meretrix* play a significant role in defending against pathogens. However, the potential links between the composition and function of their inherent microbiota and host immunity remains unclear. In this study, 16S rRNA gene high-throughput sequencing was used to compare the microbiota composition and potential functions between the mantle tissue (group M) and mantle mucus (group N) in health clams. Non-targeted metabolomics (UHPLC-Q-TOF/MS) was employed to analyze metabolite changes in the mantle mucus under *Vibrio* stress. Furthermore, spearman correlation analysis was applied to integrate the microbiota and metabolomics data, aiming to preliminarily explore potential associations between the microbiota and host immune metabolism. The results revealed significant niche differentiation between the mantle and mucus microbiota. The mantle microbiota exhibited higher richness and was dominated by the phylum Spirochaetota, while the mucus microbiota showed higher evenness, with Proteobacteria and Bacteroidota as the dominant phyla. The mucus was significantly enriched in taxa with polysaccharide-degrading or potential pathogenic capabilities, such as the genera *vibrio*, *Tenacibaculum* and *Flavobacterium*. Functional prediction indicated that the mucus microbiota was more active in immune- and energy-related pathways, like cysteine and methionine metabolism and oxidative phosphorylation. Metabolomic analysis under *Vibrio* stress showed significant alterations in various immune-related metabolites in the mucus, including succinate acid, propionate acid, and phenylalanine. Correlation analysis between microbiota and metabolites revealed close associations between resident microbes and host metabolites, such as a strong positive correlation between the genus *Marinomonas* and uracil, and a strong negative correlation between *Flavobacterium* and nitrate. Collectively, these findings suggest that the mantle-mucus complex functions as a dynamic interfacial microenvironment. Its specific microbial community structure may interact with host metabolism, providing immunological preparedness for the host to counteract pathogen invasion.

Key words: *Meretrix meretrix*; mantle; mucus; bacterial community; metabolomics