



克氏原螯虾细菌性病原分离鉴定及血清免疫因子变化

蒋国民¹, 李金龙¹, 刘 丽¹, 何志刚¹, 邹 利¹,
王余德², 吴启藩¹, 王冬武^{1*}, 邓时铭^{1*}

(1. 湖南省水产科学研究所, 湖南 长沙 410153;

2. 湖南师范大学生命科学学院, 湖南 长沙 410081)

摘要: 克氏原螯虾是当今中国人工养殖最广的淡水螯虾品种。近几年来, 稻田养虾面积呈暴发式增长, 但随着养殖规模的扩大, 养殖环境的恶化, 各种病害频发。为探明稻田养殖克氏原螯虾死亡的原因, 实验取濒死病虾胃和肠组织进行病原菌分离, 用生理生化实验、16S *rDNA* 基因序列测定与系统进化分析鉴定优势菌; 用回归感染和药敏实验评价优势菌毒力和药物敏感性, 通过血清免疫相关酶活性变化探究优势菌的致病机理。结果显示, 分离获得 1 株优势菌 PCW-01, 回归感染健康克氏原螯虾, 出现与自然发病虾相同的病理症状, 活力下降, 胃部有积液, 半致死量达 0.60×10^5 CFU/g, 经理化分析和分子鉴定为维氏气单胞菌, 对呋喃妥因、妥布霉素、头孢他啶等 7 种药物敏感。人工感染后的克氏原螯虾, 体内血清谷丙转氨酶 (ALT) 和溶菌酶 (LZM) 活性极显著上升, 总抗氧化能力 (T-AOC)、总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性极显著下降, 丙二醛 (MDA) 含量略有上升。研究表明, 优势菌 PCW-01 为致病菌, 可失活抗氧化因子, 破坏细胞膜结构, 导致疾病发生。本研究结果揭示出了克氏原螯虾细菌性疾病的免疫应答规律, 为其细菌性疾病的防控提供了科学依据。

关键词: 克氏原螯虾; 维氏气单胞菌; 分离鉴定; 免疫因子

中图分类号: S 945.1⁺2

文献标志码: A

克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 属节肢动物门 (Arthropoda) 软甲纲 (Malacostraca), 由于其味道鲜美、营养丰富, 还有很高的药用价值^[1], 深受广大消费者的青睐, 已成为中国养殖最广的淡水螯虾品种, 是长江中下游地区最大的出口创汇水产品。然而随着克氏原螯虾养殖规模化的兴起, 养殖环境条件日益恶化, 克氏原螯虾病害问题常有发生, 大大制约着克氏原螯虾产业的可持续发展。目前国内外学者对克氏原螯虾病害方面的研究报道, 主要集中在白斑综合征病毒 (white spot

syndrome virus, WSSV)^[2]、螺原体^[3]、气单胞菌^[4-5]等病原体引起的感染, 发病时间短, 死亡速率快, 可造成虾类大量死亡。

2018—2020 年, 湖南省水产科学研究所开展克氏原螯虾稻田养殖实验, 发现每年 5—7 月均出现大量死亡现象, 虾体为大中型虾, 持续时间长, 死亡率达 50%~70%。患病克氏原螯虾伏于水体边缘, 螯足无力, 遇人不躲, 不进食, 体表无明显病理特征, 解剖可见胃内充满淡棕黄色液体, 肝胰腺略肿大, 肠道呈蓝色, 黏液多, 略变粗 (图 1)。

收稿日期: 2021-02-07 修回日期: 2021-05-12

资助项目: 国家重点研发计划 (2020YFD0900104); 湖南省科技重大专项 (2017NK1033)

第一作者: 蒋国民 (照片), 从事水产养殖研究, E-mail: 24048576@qq.com;

李金龙, 从事水产动物营养研究, E-mail: 191475664@qq.com

通信作者: 王冬武, 从事稻渔综合种养技术研究, E-mail: 1309128968@qq.com;

邓时铭, 从事鱼类病害与生态防控技术研究, E-mail: dsmjgm@126.com



为防止疾病蔓延, 本研究取濒死克氏原螯虾进行病原菌分离鉴定和药敏实验, 并探讨感染后克氏原螯虾血清免疫因子的变化, 揭示克氏原螯虾细

菌性疾病的免疫应答规律, 为克氏原螯虾细菌性疾病防控提供科学依据。

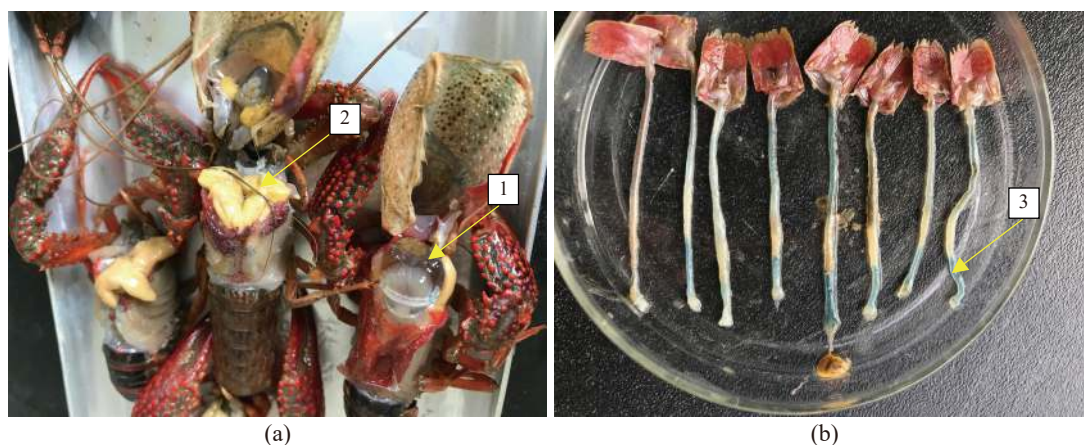


图 1 患病克氏原螯虾内脏病理症状

1. 胃积液, 2. 肝胰腺肿大, 3. 肠变蓝。

Fig. 1 Visceral symptoms of diseased *P. clarkii*

1. gastric effusion, 2. hepatopancreas swelling, 3. blue gut.

1 材料与方法

1.1 实验材料

患病克氏原螯虾来源于湖南省水产科学研究所实验稻田, 规格为 (15~22) g/尾。健康克氏原螯虾来源于湖南省水产科学研究所水泥池, 规格为 (12.30±2.08) g/尾。细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 酶活性试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 标准药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司。

1.2 实验方法

病原菌分离 75% 乙醇消毒患病克氏原螯虾体表后, 在无菌条件下取胃积液和肠道组织, 接种于普通营养琼脂平板上, 28 °C 恒温培养 18~24 h, 再挑选典型、可疑的单个优势菌落纯化培养, -60 °C 冰箱保存备用。

分离菌人工回归感染及半致死浓度测定^[6]

健康克氏原螯虾于小水泥池中暂养 7 d, 选无损伤、有活力的虾进行实验, 分设 12 组, 2 组为对照组, 10 组为实验组, 每组 20 尾, 每组设 1 平行, 定期投喂黄豆并清污。将 28 °C 培养 24 h 的分离菌用无菌生理盐水配置成 5.0×10^8 、 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 和 1.0×10^5 CFU/mL 的悬浊液, 于虾第一步足基部关节软膜处注射 0.1 mL, 对照组注射相同体积生理盐水, 连续观察 7 d, 记录克氏

原螯虾行为表现和死亡数量, 计算死亡率、48 h 半致死浓度和半致死量。实验过程中操作人员严格遵守实验动物相关伦理规范。

分离菌生理生化鉴定 挑取培养 18~24 h 的分离菌进行革兰氏染色, 显微镜下观察菌体形态特征。取分离菌进行生化特性分析, 参考《常见细菌系统鉴定手册》^[7]、《伯杰细菌鉴定手册 (第九版)》^[8] 进行初步鉴定。

分离菌 16S rDNA 序列分析 提取分离菌总 DNA, 以细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 上游引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3', 下游引物为 1492R: 5'-TACGTTACCTT GTTACGACTT-3', 纯化回收扩增产物进行测序。利用 Clustalw 和 DNASTAR 软件分别对分离菌序列与 NCBI 中已有序列进行同源性比对, 通过 Mega 4 软件邻接法 (Neighbour-Joining method) 构建系统发育进化树。

克氏原螯虾血清免疫相关酶活性分析 取健康克氏原螯虾, 分设 3 个实验组: 注射半致死浓度分离菌组 (LD₅₀ group, 简写 LG)、注射生理盐水组 (saline group, 简写 SG) 和无任何处理的空白组 (control group, 简写 CG)。每组设有 1 平行, 每组 20 尾, 于第一步足基部注射, 注射量为 0.1 mL, 48 h 后取未死虾体血清, 检测免疫相关酶活性。

分离菌药物敏感性实验 采用 K-B 药敏

纸片法^[7], 检测分离菌对药物的敏感性, 每种药片重复 3 次, 结果按中华人民共和国卫生部《纸片法抗菌药物敏感试验标准 (WS/T 125—1999)》进行判断。

1.3 数据分析

数据结果以平均值±标准差 (mean±SD) 表示, 采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 当数据差异性 $P<0.05$, 则采用 Duncan 氏法进行多重比较。

2 结果

2.1 分离菌的理化特征

从患病克氏原螯虾肠道分离得到 1 株优势菌, 命名为 PCW-01, 普通培养基上呈淡白色, 不透明, 个体小, 表面湿润, 边缘光滑, 有气味。革兰氏染色呈紫红色, 为革兰氏阴性, 杆状, 长短不一 (图 2), 可分解蔗糖、果糖, 不分解木糖、乳糖、肌醇等, 为发酵型菌, 其理化特征详见表 1。

2.2 分离菌的人工感染实验结果

注射分离菌 PCW-01, 克氏原螯虾活性明显下降, 5×10^8 CFU/mL 组 2 d 内全部死亡, 1.0×10^8 CFU/mL 组 2 d 内死亡率达 85%, 1.0×10^6 和 1.0×10^5 CFU/mL 组较为活跃, 有少量吃食现象, 死亡率低 (表 2)。死虾体表无明显病理特征, 解剖后, 可见胃部有积液, 取肠道组织再次进行病原菌分离, 可获得与分离菌 PCW-01 形态和理化特性一致的

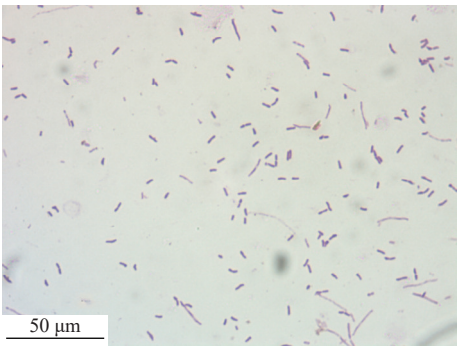


图 2 革兰氏染色后细菌形态特征 (1000×)

Fig. 2 Morphological characteristics of isolate bacteria with Gram stain (1000×)

菌株。对照组无死亡现象。

根据克氏原螯虾人工感染实验的死亡率与分离菌 PCW-01 注射剂量对数 [lg(CFU)] 的关系, 得方程 $y=28.25x-144.00$, 得出克氏原螯虾 48 h 的半致死浓度和半致死量分别为 7.37×10^6 CFU/mL 和 0.60×10^5 CFU/g。

2.3 16S rDNA 基因序列测定与系统进化分析

将分离菌 PCW-01 测序结果上传 GenBank, 获得登记号为 MT975235, 构建系统发育树, 可看到分离菌 PCW-01 与维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 聚为一支 (图 3)。

2.4 感染克氏原螯虾血清免疫相关酶活性特征

表 3 显示, 3 个实验组克氏原螯虾血清中的谷草转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (AKP) 和过氧化

表 1 分离菌理化特征

Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of pathogenic bacterium

测定项目 test items	PCW-01	测定项目 test items	PCW-01
硫化氢 H ₂ S	—	山梨醇 sorbitol	—
吲哚 indole	+	阿拉伯糖 arabinose	—
甲基红 methyl red chloride	—	木糖 xylose	—
乙酰甲基甲醇 voges-proskauer	+	肌醇 inositol	—
氧化酶 oxidase	+	淀粉 starch	+
葡萄糖 glucose	+	棉籽糖 raffinose	—
蔗糖 sucrose	+	七叶苷 aesculin	—
过氧化氢酶 catalase	+	半乳糖 galactose	+
麦芽糖 maltose	+	果糖 fructose	+
氧化型/发酵型 oxidation/fermentation	发酵型	鼠李糖 rhamnose	—
乳糖 lactose	—	甘露醇 mannitol	+
运动性 movability	+	赖氨酸脱羧酶 lysine	+

注: +, 阳性, —, 阴性。
Notes: +, positive, —, negative.

表 2 人工感染实验结果

Tab. 2 Results of artificial infection test

组别 groups	菌液浓度/(CFU/mL) concentration	数量 number	不同时间死亡数/尾 death number of tested fish at different time							死亡率/% mortality
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	
PCW-01	5×10 ⁸	20	18	2	0	0	0	0	0	100
		20	10	10	0	0	0	0	0	100
	1×10 ⁸	20	6	11	1	0	0	0	0	90
		20	8	8	2	2	0	0	0	100
	1×10 ⁷	20	2	9	1	0	0	0	0	60
		20	3	7	1	2	1	0	0	70
	1×10 ⁶	20	0	4	2	0	0	4	0	50
		20	0	8	1	1	0	0	0	50
	1×10 ⁵	20	0	0	4	0	2	2	0	40
		20	0	3	2	2	1	0	0	40
对照 control	0.85% NaCl	20	0	0	0	0	0	0	0	0
		20	0	0	0	0	0	0	0	0

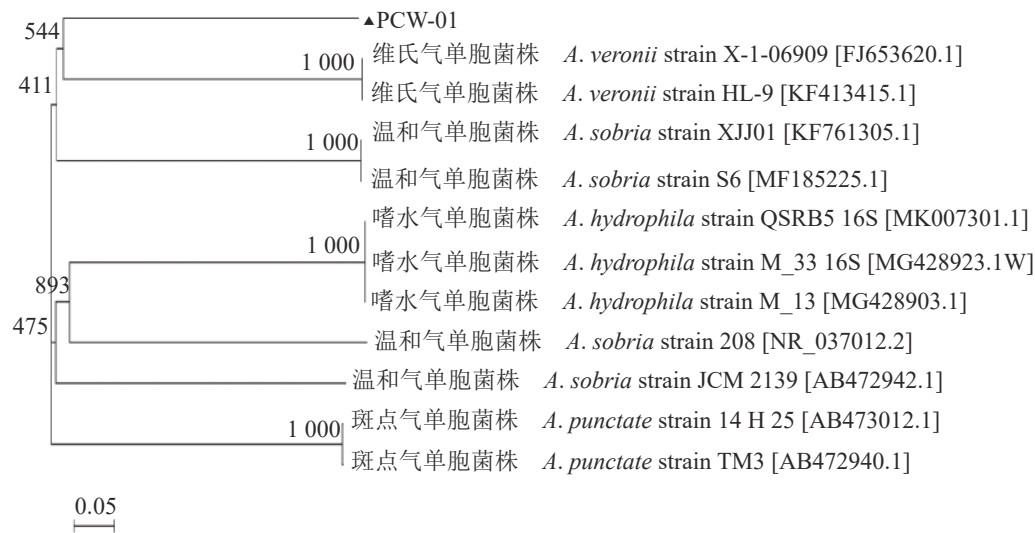


图 3 分离菌 PCW-01 及相关菌株 16S rDNA 基因序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *A. veronii* (isolated strain PCW-01) and other related strains based on 16S rDNA gene sequence

氢酶 (CAT) 活性无显著变化 ($P>0.05$), 酸性磷酸酶 (ACP) 活性大小为 LG 组>SG 组>CG 组, 组间差异极显著 ($P<0.01$)。注射分离菌 PCW-01, 克氏原螯虾血清中总抗氧化能力 (T-AOC)、总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性极显著低于 SG 组和 CG 组 ($P<0.01$), 谷丙转氨酶 (ALT) 和溶菌酶 (LZM) 活性极显著高于 SG 组和 CG 组 ($P<0.01$), SG 组和 CG 组间差异不显著 ($P>0.05$)。丙二醛 (MDA) 含量以分离菌组 (LG) 为最高, 显著大于 CG 组 ($P<0.05$), 与 SG 组

差异不显著 ($P>0.05$)。

2.5 分离菌的药敏实验结果

检测分离菌 PCW-01 对 13 种抗生素药物的敏感性, 结果显示, 其对青霉素、头孢噻吩、氨苄西林等 6 种药物产生了耐药性, 对庆大霉素、链霉素、四环素等 7 种药物敏感 (表 4)。

3 讨论

本研究从患病克氏原螯虾肠道中分离得到优

表 3 血清免疫相关酶活性
Tab. 3 Activity of immune-related enzymes in serum

指标 index	注射半致死浓度 分离菌组(LG) injection isolated bacteria group with half lethal concentration	注射生理盐水组(SG) injection saline group	空白组(CG) control group
谷丙转氨酶/(U/mL) ALT	144.21±12.31 ^A	4.66±0.23 ^B	4.40±0.08 ^B
谷草转氨酶/(U/mL) AST	0.50±0.12 ^a	0.32±0.12 ^a	0.50±0.12 ^a
总抗氧化能力/(U/mL) T-AOC	0.41±0.03 ^A	15.13±0.70 ^B	15.66±0.70 ^B
碱性磷酸酶/(U/100 mL) AKP	0.91±0.10 ^a	0.97±0.05 ^a	1.11±0.07 ^a
酸性磷酸酶/(U/100 mL) ACP	1.34±0.11 ^A	0.86±0.07 ^B	0.54±0.05 ^C
丙二醛/(mmol/mL) MDA	2.93±0.17 ^a	2.73±0.14 ^a	2.42±0.11 ^b
总超氧化物歧化酶/(U/mL) T-SOD	54.50±1.37 ^A	75.61±1.69 ^B	68.53±1.54 ^B
谷胱甘肽过氧化物酶/(U/mL) GSH-Px	81.08±3.84 ^A	153.14±5.61 ^B	162.35±7.81 ^B
过氧化氢酶/(U/mL) CAT	2.97±0.13 ^a	3.34±0.21 ^a	2.84±0.20 ^a
溶菌酶/(U/mL) LZM	240.07±23.23 ^A	155.17±18.07 ^B	174.05±9.11 ^B

注：同行中上标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)，不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。
Notes: The means with different lowercase letters within the same line have significant differences ($P<0.05$), the means with different capital letters within the same line have extremely significant differences ($P<0.01$).

表 4 药物敏感性实验结果
Tab. 4 Results of drug sensitive test

药名 drug	含药量/(μg/片) dose	抑菌圈直径判断标准/mm judgment standard of inhibition zone diameter			抑菌圈直径/mm inhibition zone diameter	敏感性 sensitivity
		不敏感 resistant	中度敏感 intermediate sensitivity	高度敏感 high sensitivity		
青霉素 penicillin	10 IU/片	≤14	—	≥15	0	R
头孢噻吩 cephalothin	30	≤14	15~17	≥18	0	R
氨苄西林 ampicillin	10	≤13	14~16	≥17	0	R
庆大霉素 gentamicin	10	≤12	13~14	≥15	20.33±0.58	S
利福平 rifampicin	5	≤16	17~19	≥20	0	R
克林霉素 clindamycin	2	≤14	15~20	≥21	0	R
呋喃妥因 furantoin	300	≤14	15~16	≥17	18.33±0.58	S
妥布霉素 tobramycin	10	≤12	13~14	≥15	19.00±1.00	S
链霉素 streptomycin	10	≤11	12~14	≥15	17.67±0.58	S
新霉素 neomycin	30	≤12	13~16	≥17	17.33±0.58	S
头孢拉定 cefadroxil	30	≤14	15~17	≥18	0	R
头孢他啶 ceftazidime	30	≤14	15~17	≥18	26.33±0.58	S
四环素 tetracycline	30	≤14	15~18	≥19	21.00±0.00	S

注：R. 不敏感；S. 敏感；—. 敏感与不敏感的交叉。
Notes: R. resistant; S. sensitive; —. the intersection of resistant and sensitivity.

势菌 PCW-01，经人工回归感染，实验虾出现与自然发病类似症状，48 h 半致死量为 0.60×10^5 CFU/g，表现出较高致病力，表明分离菌 PCW-01 为克氏原螯虾致病菌。通过形态学观察和理化特性测定，分离菌 PCW-01 与维氏气单胞菌较为一致^[7]，进一步通过 16S *rDNA* 序列比对分析，并构建系统进化发育树，发现其与维氏气单胞菌聚为

一支。因此，可鉴定优势菌 PCW-01 为维氏气单胞菌。

维氏气单胞菌是水生动物肠道内和自然界中普遍存在的细菌，当养殖条件恶化，水生动物肠道功能紊乱，维氏气单胞菌数量就会增加，继而感染宿主^[9-10]。稻田养殖水位浅、溶解氧含量高，与池塘水体相比，水体致病菌数量少，发病率和

死亡率低。本研究中的稻田养殖克氏原螯虾病害发生在5—7月, 病虾出现胃部积液, 肠变蓝、变粗, 黏液增多等病理症状, 但未见暴发性死亡, 与其他学者报道的维氏气单胞菌致池塘养殖克氏原螯虾暴发性死亡的现象有所不同^[11-12]。这可能是不同菌型的维氏气单胞菌导致, 其流行病学特征、致病性等方面存在一定的差异性^[13], 或是不同养殖水域特征所致。

克氏原螯虾属甲壳动物, 是开管式血液循环, 依靠细胞吞噬和体液中非特异性酶或免疫因子来排除异物, 完成机体免疫防御^[14]。当外界病原菌入侵感染, 机体产生氧应激反应^[15], 引起呼吸爆发, 产生超氧阴离子、过氧化氢等高活性氧物质, 对机体蛋白质产生氧化损伤^[16]。同时机体也会进行免疫防御反应, 产生CAT、SOD、GSH-Px等抗氧化酶来快速清除活性氧^[16], 维持体内抗氧化与呼吸爆发的动态平衡^[17], 保护机体免受氧化损伤^[18-19]。本研究中维氏气单胞菌感染克氏原螯虾, 机体T-AOC显著下降, 血清总抗氧化能力变弱, 抗氧化酶系统出现紊乱, 可能是氧应激产生的单态氧自由基失活了T-SOD清除超氧阴离子的功能^[20], 显著降低其活性, 出现了与王刚^[21]的研究类似的结果; 而对负责清除过氧化氢的CAT^[22]活性影响不明显, 对保护细胞膜结构和功能的GSH-Px^[23]活性影响较大, 极显著地降低其活性, 使得克氏原螯虾细胞受损, MDA含量上升^[24]。

ALT和AST是虾类肝胰腺功能的评估因子, 正常情况下, 它们存在于动物组织细胞内, 血清中活性较低^[25], 只有当细胞膜通透性增加或者组织器官大面积受损时才会大量释放至血清中^[26]。感染维氏气单胞菌后, 克氏原螯虾血清中ALT活性较生理盐水组和空白组极显著上升, 说明肝胰腺组织细胞结构受损, 器官功能出现问题。

AKP和ACP是溶酶体酶的重要组成部分^[27], AKP主要来源于肝脏^[25], 是重要的生物调控酶, 在甲壳动物非特异性免疫中有着重要的作用^[28]。ACP是细胞在发挥吞噬和包裹作用过程中所释放的物质, 在机体免疫反应中起到清除和水解微生物的作用^[18]。感染维氏气单胞菌后, 克氏原螯虾血清中AKP活性下降, 这与克氏原螯虾肝胰腺组织功能受损有关; 而血清ACP极显著升高, 是因为吞噬细胞杀菌的物质基础LZM活性极显著提升, 吞噬细胞的吞噬功能显著增强, 机体开启细胞吞噬免疫功能^[29], 伴随产生大量ACP。注射生理盐

水的克氏原螯虾, 机体产生应激, 提升LZM活性, 增强细胞吞噬能力, 但并未发生吞噬过程, 所以ACP活性低。

4 结论

本研究结果表明, 维氏气单胞菌感染克氏原螯虾, 分泌外膜蛋白A毒力因子诱导机体产生细胞免疫^[30], 增强细胞吞噬功能, 显著提升LZM活性。同时机体血细胞开启异物识别功能^[31], 激活免疫活性因子的释放通路^[32], 产生氧化应激, 发生呼吸爆发反应, 生产过量过氧化物, 失活T-SOD、GSH-Px抗氧化因子, 降低机体总抗氧化能力, 破坏细胞膜结构, 导致组织器官出现病变, 引起生理机能紊乱, 最终死亡。

对维氏气单胞菌进行药物敏感分析, 13种药物中有6种药物产生强耐药性, 7种药物敏感, 本研究结果为进一步有效治疗该类疾病提供了用药依据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 徐刚, 马正荣, 王亚娜, 等. 克氏螯虾壳聚糖抗疲劳作用研究[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(3): 363-366. Xu G, Ma Z R, Wang Y N, et al. Study on anti-fatigue effect of chitosan from red swamp crayfish[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2011, 30(3): 363-366 (in Chinese).
 - [2] 兰江凤, 代云佳, 林鑫. 养殖克氏原螯虾体内白斑综合征病毒的绝对定量分析[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 318-325. Lan J F, Dai Y J, Lin L. Quantitative analysis of white spot syndrome virus in the tissues of cultured red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(3): 318-325 (in Chinese).
 - [3] 王文. 虾蟹新型病原螺原体的发现和研究[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2016, 39(1): 1-13. Wang W. Discovery and studies of a novel pathogen, *Spiroplasma eriocheiris*, in economically important species of crustaceans[J]. Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition), 2016, 39(1): 1-13 (in Chinese).
 - [4] 周冬仁, 章文敏, 李建应, 等. 克氏原螯虾细菌性病原
- 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 的分离与鉴定[J]. 中国农学通报, 2011, 27(26): 102-105.
- Zhou D R, Zhang W M, Li J Y, *et al.* Isolation and identification of bacterial pathogen of *Procambarus clarkii*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(26): 102-105 (in Chinese).
- [5] 曹海鹏, 温乐夫, 杨移斌, 等. 克氏原螯虾源致病性豚鼠气单胞菌的分离及其生物学特性[J]. 水生生物学报, 2014, 38(6): 1047-1053.
- Cao H P, Wen L F, Yang Y B, *et al.* Isolation and biological characteristics of an *Aeromonas caviae* pathogen from *Procambarus clarkii*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(6): 1047-1053 (in Chinese).
- [6] 付应三. 克氏原螯虾传染性疾病的初步研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- Fu Y S. Preliminary study on infectious diseases of red swamp crayfish[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- Dong X Z, Cai M Y. Manual for systematic identification of common bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [8] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, *et al.* Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [9] 邓时铭, 程小飞, 刘丽, 等. 湘华鲮暴发性死亡病原菌的分离与鉴定[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2020, 35(3): 443-449.
- Deng S M, Cheng X F, Liu L, *et al.* Isolation and identification of pathogens from an outbreak deaths of *Sinilabe decorus tungting*[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science Edition), 2020, 35(3): 443-449 (in Chinese).
- [10] 胡天野. 健康乌鳢体内两种气单胞菌的分离、鉴定及其毒力基因检测 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.
- Hu T Y. Isolation, identification and virulence genes detection of two kinds of *Aeromonas* isolated from healthy *Channa argus* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [11] 彭博文, 杨移斌, 艾晓辉, 等. 克氏原螯虾源维氏气单胞菌分离鉴定及药敏特性研究[J]. 海洋湖沼通报, 2018(4): 108-114.
- Peng B W, Yang Y B, Ai X H, *et al.* Isolation and identification of *Aeromonas veronii* from *Procambarus clarkii* and its antibiotic sensitivity[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2018(4): 108-114 (in Chinese).
- [12] 胡骞, 胡瑞雪, 金玉立, 等. 克氏原螯虾源维氏气单胞菌的分离鉴定及组织病理学观察[J]. 水生生物学报, 2020, 44(4): 811-818.
- Hu Q, Hu R X, Jin Y L, *et al.* Isolation, identification and pathohistological observation of *Aeromonas veronii* from *Procambarus clarkii*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(4): 811-818 (in Chinese).
- [13] 汪开毓, 牟巧凤, 黄锦炉, 等. 38株维氏气单胞菌分离株的AFLP基因分型研究[J]. 水生生物学报, 2013, 37(5): 905-911.
- Wang K Y, Mou Q F, Huang J L, *et al.* Amplified fragment length polymorphism analysis of *Aeromonas veronii*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(5): 905-911 (in Chinese).
- [14] 吴芳丽, 王月, 尚跃勇, 等. 水生无脊椎动物血淋巴细胞分类及免疫研究进展[J]. 大连海洋大学学报, 2016, 31(6): 696-704.
- Wu F L, Wang Y, Shang Y Y, *et al.* Current progress of research on classification and immunity of hemocytes in aquatic invertebrates: a review[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2016, 31(6): 696-704 (in Chinese).
- [15] Wang W N, Zhou J, Wang P, *et al.* Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 150(4): 428-435.
- [16] 孟愔. 复方中草药对克氏原螯虾生长、免疫功能及肝肠组织的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- Meng Y. Effect of compound Chinese herbal medicine on growth, immunity, hepatopancreas and intestinal of *Procambarus clarkii*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [17] Liang S, Luo X, You W W, *et al.* The role of hybridization in improving the immune response and thermal tolerance of abalone[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 39(1): 69-77.
- [18] Yin X L, Li Z J, Yang K, *et al.* Effect of guava leaves on growth and the non-specific immune response of *Penaeus monodon*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 40(1): 190-196.

- [19] Lu X, Wang C, Liu B Z. The role of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 42(1): 58-65.
- [20] Mohankumar K, Ramasamy P. White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*[J]. *Virus Research*, 2006, 115(1): 69-75.
- [21] 王刚. 凡纳滨对虾免疫基因克隆与合并感染条件下的免疫应答 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2015.
- Wang G. Cloning of immunogene and immune responses after co-infection in *Litopenaeus vannamei*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2015 (in Chinese).
- [22] 田相利, 何瑞鹏, 钱圆, 等. 干露胁迫对刺参体壁非特异性免疫的影响[J]. *河北渔业*, 2014(7): 21-26,35.
- Tian X L, He R P, Qian Y, *et al.* Effects of desiccation on non-specific immune indices in sea cucumber *Apostichopus japonicus* under different temperatures[J]. *Hebei Fisheries*, 2014(7): 21-26,35 (in Chinese).
- [23] 马森. 谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽转硫酶研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2008, 29(10): 53-56.
- MA S. Progress on GSH-Px and GST[J]. *Progress in Veterinary Medicine* 2008, 29(10): 53-56(in Chinese).
- [24] Duan Y F, Liu P, Li J T, *et al.* Expression profiles of selenium dependent glutathione peroxidase and glutathione S-transferase from *Exopalaemon carinicauda* in response to *Vibrio anguillarum* and WSSV challenge[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(3): 661-670.
- [25] 王冰心, 叶均安. 虾类血清中免疫相关酶的研究进展[J]. *中国饲料*, 2009(3): 27-28,36.
- Wang B X, Ye J A. Research advance on enzyme related to immune in shrimp[J]. *China Feed*, 2009(3): 27-28,36 (in Chinese).
- [26] Chaplin A E, Huggins A K, Munday K A. The distribution of l- α -aminotransferases in *Carcinus maenas*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1967, 20(1): 195-198.
- [27] Liu S L, Jiang X L, Hu X K, *et al.* Effects of temperature on non-specific immune parameters in two scallop species: *Argopecten irradians* (Lamarck 1819) and *Chlamys farreri* (Jones & Preston 1904)[J]. *Aquaculture Research*, 2004, 35(7): 678-682.
- [28] 邹广众, 孙虎山. 水产甲壳动物免疫学研究进展与前景展望[J]. *生命科学仪器*, 2009, 7(6): 17-21.
- Zou G Z, Sun H S. Research advances and prospect in aquatic crustaceans immunology[J]. *Life Science Instruments*, 2009, 7(6): 17-21 (in Chinese).
- [29] 常青, 梁萌青, 王家林, 等. 壳聚糖对花鲈生长和非特异性免疫力的影响[J]. *海洋水产研究*, 2006, 27(5): 17-22.
- Chang Q, Liang M Q, Wang J L, *et al.* Influence of chitosan on the growth and non-specific immunity of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*)[J]. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(5): 17-22 (in Chinese).
- [30] 单晓枫, 吴同垒, 孟庆峰, 等. 框镜鲤维氏气单胞菌 CY0806株OMPA I 基因的克隆及生物信息学分析[J]. *中国兽药杂志*, 2011, 45(10): 3-6.
- Shan X F, Wu T L, Meng Q F, *et al.* Cloning and bioinformatic analysis of outer membrane protein gene A I of *Aeromonas veronii* CY0806 from *Cyprinus carpio*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2011, 45(10): 3-6 (in Chinese).
- [31] 梁虹, 王安利, 王维娜. 无脊椎动物模式识别蛋白研究进展[J]. *生理科学进展*, 2006, 37(2): 156-159.
- Liang H, Wang A L, Wang W N. Advance in pattern recognition proteins in invertebrate[J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2006, 37(2): 156-159 (in Chinese).
- [32] Houton C. The scope of the crustacean immune system for disease control[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110(2): 251-260.

Isolation and identification of bacterial pathogens from *Procambarus clarkii* and study on variations in serum immune factors

JIANG Guomin¹, LI Jinlong¹, LIU Li¹, HE Zhigang¹, ZOU Li¹,
WANG Yude², WU Qifan¹, WANG Dongwu^{1*}, DENG Shiming^{1*}

(1. Fisheries Research Institute of Hunan Province, Changsha 410153, China;

2. College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: In China, *Procambarus clarkii* is the most widely cultivated freshwater crayfish now, the breeding area and output are increasing every year and the culture models have also been constantly innovated. In recent years, the area of rice-*P. clarkii* co-culture has been increasing explosively, and its output has accounted for more than 80% of the national total output, so the rice-*P. clarkii* co-culture has become the basis for the rapid development of crayfish industry. With the expansion of aquaculture scale and deterioration of aquaculture environment, various diseases occur frequently which seriously affect the yield and quality of *P. clarkii*. In order to find out the death cause of *P. clarkii* cultured in paddy field, the pathogenic bacteria were isolated from stomach and intestine of these dying crayfish with obvious pathological characteristics, and were identified through physiological and biochemical testing, sequence alignment of 16S *rDNA* gene and phylogenetic analysis. At the same time the virulence and drug sensitivity of pathogenic bacteria were evaluated by artificial infection and drug sensitivity test, the pathogenic mechanism of pathogenic bacteria was studied by analyzing the variations of serum immune related enzymes activities of *P. clarkii* injected with pathogenic bacteria. Research results showed that a dominant strain named PCW-01 was obtained and identified as *Aeromonas veronii* which could cause the healthy *P. clarkii* to have these same pathological symptoms as the natural disease, such as less exercise, effusion in stomach, excessive intestinal mucus in the regression experiment, and its median lethal dose was 0.60×10^5 CFU/g to *P. clarkii*. The analysis of antimicrobial susceptibility test showed that *A. veronii* (PCW-01) was highly sensitive to furantoin, tobramycin, ceftazidime and other seven antibiotics. The results of serum immune enzyme test showed that in the body of *P. clarkii* injected with pathogenic bacteria, the activity of lysozyme (LZM) and alanine aminotransferase (ALT) increased considerably ($P < 0.01$), the activity of total antioxidant capacity (T-AOC), total superoxide dismutase (T-SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) decreased notably ($P < 0.01$), and the concentration of MDA increased slightly ($P > 0.05$). The conclusion was that the strain PCW-01 was the pathogen of the death of *P. clarkii*, which could inactivate antioxidant factors, destroy cell membrane structure and function, subsequently the pathological phenomena of tissues and organs or death appeared. In the study, these results revealed immune response law of *P. clarkii* to pathogenic bacteria and will provide scientific support for the prevention and control of the bacterial diseases of *P. clarkii* in future.

Key words: *Procambarus clarkii*; *Aeromonas veronii*; isolation and identification; immune factors

Corresponding authors: WANG Dongwu. E-mail: 1309128968@qq.com;

DENG Shiming. E-mail: dsmjgm@126.com

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2020YFD090104); Major Special Science and Technology Project of Hunan Province (2017NK1033)