

DOI: 10.12264/JFSC2023-0074

克氏原螯虾病原菌感染发病标志性免疫及生理生化指标的筛选

张雪梅^{1,2}, 王秀华², 杨冰², 张红芳², 连新宇², 苟紫玥², 朱欣洁²

1. 浙江海洋大学水产学院, 浙江 舟山 316022;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室, 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 为筛选克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)因受病原菌感染导致发病的标志性生理生化指标, 以嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)为攻毒菌株, 采用半致死剂量注射感染克氏原螯虾, 分析了感染初期(12 h)、发病期(24~72 h)和感染后恢复期(90 h)血淋巴中的非特异免疫、糖类代谢、脂类代谢、蛋白质代谢及常规生理生化指标共 23 项, 结果显示, 在发病期, 8 项非特异免疫指标中, 感染组过氧化氢酶(CAT)活力和总抗氧化能力(T-AOC)在发病状态下提高显著($P<0.01$), 均值分别是空白对照组的 3.29 倍和 2.56 倍; 感染组发病期蛋白代谢指标白蛋白(ALB)和尿素(UREA)浓度极显著提高($P<0.01$), 其浓度均值比空白对照组分别提高了 1.75 与 5.58 倍; 感染组发病期消化酶指标中淀粉酶(AMY)活力在发病过程中活性显著下降($P<0.01$), 比空白对照组下降了 74.18%; 血清中肌酸激酶(CK)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px) 4 种酶活力在发病期显著提高($P<0.01$), 与空白对照组比分别提高了 16.72、219.21、74.43、2.66 倍。在所检测指标中, 葡萄糖(GLU)、甘油三酯(TG)、总蛋白(TP)和脂肪酶(LPS) 4 项指标在克氏原螯虾发病过程中均变化不显著($P>0.05$)。结果表明, 克氏原螯虾血清中 CAT、T-AOC、ALB、UREA、AMY、CK、ALT、AST 及 GSH-Px 9 项指标变化对细菌感染发病极敏感, 可作为判断其受细菌感染发病的标志性指标。本研究结果可为克氏原螯虾患病风险评估和疾病预警提供新的技术依据。

关键词: 克氏原螯虾; 嗜水气单胞菌; 感染致病; 评价指标; 免疫指标; 生理生化指标

中图分类号: S945

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)06-0786-13

克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)是我国重要的淡水养殖品种, 2021 年产量达 263 万 t^[1], 克氏原螯虾养殖已成为我国渔业经济的重要组成部分。近年来, 随着养殖业的快速发展, 克氏原螯虾病害问题逐渐显露, 各种病毒病、细菌病暴发给养殖业造成了巨大的经济损失^[2-3]。虾类疾病的发生与病原感染、环境恶化、营养失调及自身抗病力减弱等多种因素有关, 不同因素的加害作用, 给虾类体内生理代谢带来不同的影响, 并通过免疫、代谢及生理生化指标的变化得以体现^[4-7]。研究筛选出与疾病发生相关的标志性指标, 有助于

虾类疾病预警, 在多病原感染中识别主要的加害因素, 还可为患病群体建立有效的治疗措施提供依据。

虾类作为一种低等的水生动物, 依靠自身的天然防御系统, 抵御病原入侵, 当外界环境发生变化时, 能够在细胞及体液免疫水平上做出调节^[8], 虾血清中含有葡萄糖、甘油三酯、总胆固醇、血清总蛋白等基本的生化成分^[9], 体内存在胃蛋白酶、胰蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶等消化酶, 同时含有乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶和酯酶等同工酶参与能量代谢^[10]。当受到病毒或细菌

收稿日期: 2023-03-28; 修订日期: 2023-05-08.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD2400205); 广西创新驱动发展专项(桂科 AA17204044).

作者简介: 张雪梅(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为对虾养殖生物安保. E-mail: 1187586237@qq.com

通信作者: 王秀华, 研究员, 研究方向为水产养殖动物疾病防控. E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn

病原感染后,其调控生理(生长和耗氧)、生化(葡萄糖、血清素和血细胞因子)反应的基因在表达水平上发生改变^[11],通过分析血清指标可以掌握虾类健康状况。

水产养殖生物安保为近年来的研究热点,养殖动物疾病风险评估与风险管控技术是生物安保的重要研究内容,但在基于病原感染与疾病发生的相关研究中,缺少可以量化的评价指标。本研究为了建立可用于指示病原菌感染导致虾类发病死亡的标志性血清学指标,以克氏原螯虾为模型动物,采用病原嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)为攻毒菌株,对感染发病后的虾血清进行了非特异免疫、糖类代谢、脂类代谢、蛋白质代谢及常规生理生化指标的检测,以期筛选出可用于评价病原菌感染发病程度的标志性指标,为虾类养殖中发病风险评估提供新的技术方法,支撑虾类养殖业的健康发展。

1 材料与方法

1.1 实验用虾及养殖管理

克氏原螯虾平均体长(7.87±0.40) cm,平均体重(25.43±3.47) g,采集自青岛市西海岸新区琅琊镇一池塘中,外观健康、附肢完整无损失,经实验室检测,不携带对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)及嗜水气单胞菌病原。实验前暂养7 d,养殖用水为曝气3 d的自来水,期间日吸污换水1次,换水量30%,按虾体重3.0%的投饵量投喂对虾饵料(通威股份有限公司)2次(9:00和18:00),连续充气,DO维持在6.0~6.3 mg/L,水温为20.0~22.0 °C, pH7.3~7.5。

1.2 感染实验用细菌及菌悬液制备

1.2.1 菌悬液的制备 挑取活化的嗜水气单胞菌单菌落接种于LB液体培养基(胰蛋白胨1.0 g、酵母膏0.5 g、氯化钠1.0 g、蒸馏水100 mL)中,在28 °C恒温摇床(150 r/min)中培养24 h后,3500 g离心10 min,弃上清,用PBS缓冲液重悬沉淀,测定菌悬液OD值,利用嗜水气单胞菌的OD值-菌株浓度关系曲线,计算菌悬液浓度。用PBS缓冲液将测得的菌悬液稀释成浓度为 1×10^{10} CFU/mL的母液,根据试验浓度稀释使用。

1.2.2 半数致死量(LD₅₀) 取嗜水气单胞菌母液用无菌PBS分别稀释成 8.29×10^9 、 8.29×10^8 、 8.29×10^7 、 8.29×10^6 、 8.29×10^5 及 8.29×10^4 CFU/mL 6个浓度。用1 mL无菌注射器于虾的腹部第二腹节进行肌肉注射感染,每尾注射菌液0.1 mL,对照组每尾注射PBS 0.1 mL,每个浓度梯度8尾虾。感染后,每天正常投喂、换水,随时记录克氏原螯虾死亡情况,稳定后停止实验,统计克氏原螯虾累计死亡率,运用软件SPSS16.0计算半致死剂量(LD₅₀)。

1.2.3 病原菌感染浓度、发病率及发病时间的确定 为获得因嗜水气单胞菌感染导致的发病期实验用虾,用攻毒剂量为1.0 LD₅₀的嗜水气单胞菌菌液进行腹部肌肉注射,用剂量0.25 LD₅₀菌液作参考组,每尾注射嗜水气单胞菌菌液0.1 mL,进行预实验,确定感染剂量的可靠性。每个处理组分别设3个平行,每个平行6尾虾。感染后,每天正常投喂、吸污,换水,记录克氏原螯虾死亡时间,运用Excel绘制发病率与发病时间关系曲线,根据曲线确定后续的取样时间。

1.2.4 获得发病实验虾的感染方法 实验设细菌感染组(bacterial infection, BI)、PBS组及空白对照组(control, C),每组3个平行,每个平行45尾虾。空白组不做任何处理。根据1.2.3的预实验结果,确定用1.0 LD₅₀的剂量进行攻毒,每尾虾注射体积0.1 mL,根据虾的体重推算感染浓度为 4.53×10^6 CFU/mL。

1.3 样品采集方法

根据发病率与发病时间关系曲线,设置取样时间段为感染初期(12 h)、发病期(24~72 h)及感染后恢复期(90 h)。感染初期于各组每个平行中随机取15尾虾,发病期及感染后恢复期采样数量根据具体的发病虾数及剩余存活虾数而定,用一次性注射器(1 mL)从克氏原螯虾的围心腔抽取血淋巴0.5 mL,注入无菌的离心管中,每5尾虾的血淋巴等量混合成一个样(恢复期存活虾少,实际每个平行采集9尾,每3尾虾的血淋巴等量混合成一个样),每组共9个平行样品。发病期采集的对虾症状需表现出行动迟缓,螯足不能抬起,对刺激有微弱反应,且保持呼吸状态。采集的血淋巴于

4℃条件下静置过夜后, 4000 g 4℃离心 30 min, 取上清液-80℃冰箱中冷冻保存备用^[12]。

1.4 指标测定方法

1.4.1 免疫指标 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、一氧化氮合成酶(total nitric oxide synthetase, T-NOS)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)使用试剂盒测定(南京建成生物工程研究所); 酚氧化酶(polyphenol oxidase, PO)、溶菌酶(lysozyme, LZM)、抗菌活力(antibacterial activity, U_a)根据王雷等^[13]的方法测定。

1.4.2 糖类代谢指标 葡萄糖(glucose, GLU)浓度采用 CHEMRAY-800 全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司)测定。

1.4.3 脂类代谢指标 甘油三酯(triacylglycerol, TG)、总胆固醇(total cholesterol, T-CHO)采用 CHEMRAY-800 全自动生化分析仪测定。

1.4.4 蛋白质代谢指标 总蛋白(total protein, TP)、白蛋白(albumin, ALB)、尿素(urea, UREA)、尿酸(uric acid, UA)采用 CHEMRAY-800 全自动生化分析仪测定。

1.4.5 消化酶 胰蛋白酶(trypsin, TRP)和脂肪酶(lipase, LPS)使用试剂盒测定(南京建成生物工程研究所); 淀粉酶(serum amylase, AMY)采用 CHEMRAY-800 全自动生化分析仪测定。

1.4.6 其他生理指标 丙二醛(malondialdehyde, MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)使用试剂盒测定(南京建成生物工程研究所); 肌酸激酶(creatine kinase, CK)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)采用 CHEMRAY-800 全自动生化分析仪测定。

1.5 病原菌感染发病相关的非特异免疫及生理生化指标的确定

比较实验组、PBS 组与空白对照组在采样时间段各指标检测值范围的大小及数值区间的重合情况, 同时比较实验组与空白对照组检测值的平均值。规定实验组检测指标值范围完全不在空白对照组检测范围内, 均值差异检验极显著($P<0.01$),

则表示病原菌感染发病导致的检测指标变化极敏感(标记为 ES); 实验组检测指标范围与空白对照组检测范围部分重叠, 或实验组检测指标测量范围在空白对照组指标范围内, 且均值经差异显著性检验为显著($P<0.05$), 则表示病原菌感染发病导致的检测指标变化较敏感(标记为 S); 实验组检测指标检测值范围完全在空白对照组检测范围, 均值差异检验不显著($P>0.05$), 则表示病原菌感染发病导致的检测指标变化极不敏感(标记为 EI); 实验组检测指标值范围与空白对照组检测范围部分重叠, 且均值经差异显著性检验不显著($P>0.05$), 则表示病原菌感染发病导致的检测指标变化不敏感(标记为 I)。根据检测指标的敏感性, 将极敏感的指标作为克氏原螯虾感染发病相关的标志指标。

1.6 数据统计分析

实验数据用 Excel 软件进行统计分析, 数据取平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$), 使用 SPSS 分析软件对数据进行单因素方差分析及差异显著性检验。空白对照组对应实验组感染初期、发病期及感染后恢复期采集的样品, 不进行级别划分, 在数据处理时 27 个平行样, 作为一个样品的多个平行。

2 结果与分析

2.1 半数致死量(LD₅₀)的确定

用不同浓度的嗜水气单胞菌注射感染克氏原螯虾, 实验至 6 d 后, 各组虾数量保持稳定, 统计死亡率结果见表 1。养殖过程中发现 8.29×10^9 CFU/mL 和 8.29×10^8 CFU/mL 组感染后 1 d 内全部死亡; 8.29×10^7 CFU/mL 组感染后 1 d 内死亡 2 尾, 第 2 天剩余 6 尾虾全部死亡; 8.29×10^6 CFU/mL 组分别在感染后 1 d 内死亡 2 尾, 感染后第 5 天死亡 3 尾, 之后稳定; 8.29×10^5 CFU/mL 组感染后第 2 天死亡 1 尾虾, 之后稳定; 8.29×10^4 CFU/mL 组和 PBS 组无死亡现象。发病克氏原螯虾分泌黄色黏液, 行动迟缓, 螯足无力抬起。计算嗜水气单胞菌感染克氏原螯虾的 LD₅₀ 为 4.5×10^5 CFU/尾, 相当于 1.78×10^4 CFU/g 体重。

2.2 病原菌感染浓度、发病率及发病时间的确定

分别按照 1.0 LD₅₀ 及 0.25 LD₅₀ 的剂量注射克氏原螯虾, 统计发病率及发病死亡时间关系如图 1 所示,

表 1 克氏原螯虾注射感染嗜水气单胞菌后的死亡率
Tab. 1 Mortalities of *Procambarus clarkii* challenged by *Aeromonas hydrophila*

菌株 strain	菌液浓度/(CFU/mL) bacteria concentration	实验虾数/ind number of experimental crayfish	累计死亡数/ind number of deaths	死亡率/% mortality	半数致死量/(CFU/g) LD ₅₀
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	8.29×10 ⁹	8	8	100	1.78×10 ⁴
	8.29×10 ⁸	8	8	100	
	8.29×10 ⁷	8	8	100	
	8.29×10 ⁶	8	5	62.5	
	8.29×10 ⁵	8	1	12.5	
	8.29×10 ⁴	8	0	0	
PBS	0	8	0	0	

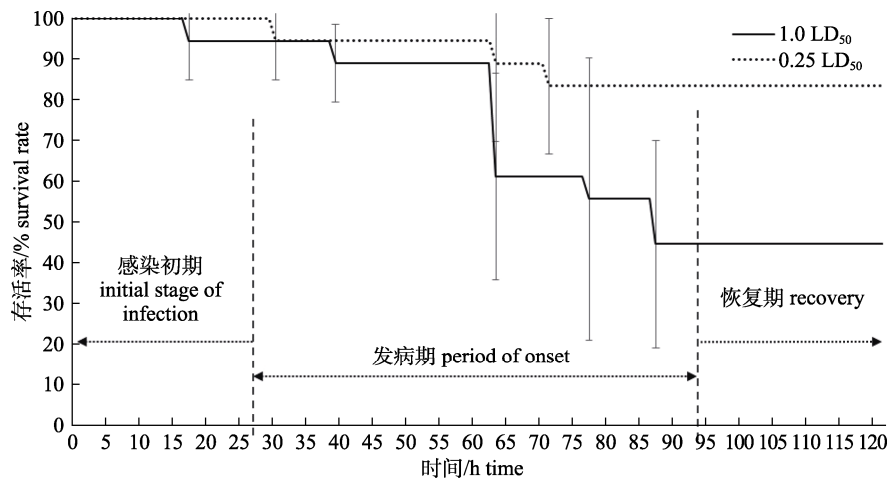


图 1 克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌后不同时间的存活率
Fig. 1 Survival rate of *Procambarus clarkii* challenged by *Aeromonas hydrophila* at different time

可知 1.0 LD₅₀ 浓度组的死亡时间出现在注射后 17 h。随着时间的延长, 克氏原螯虾的存活率也呈现降低的趋势, 死亡高峰时间在注射后 60 h 前后, 到注射后 88 h 死亡停止, 存活虾进入感染后恢复期, 最终存活率为 44.4%。用剂量为 0.25 LD₅₀ 的嗜水气单胞菌注射克氏原螯虾, 发病期推迟到注射后 38 h 之后出现缓慢死亡, 到注射后 71 h 时停止死亡, 存活率为 83%。根据两个浓度组的发病趋势及发病时间, 确定后续的攻毒浓度为 1.0 LD₅₀, 确定感染初期采样时间点为攻毒后 12 h, 发病期采样时间为攻毒后 24~72 h, 感染后恢复期为注射后 90 h。

2.3 克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌后 8 种非特异免疫指标值变化

克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌初期、发病期到恢复期 3 个阶段, 8 种非特异免疫指标值变动如表 2 所示, 可见病原菌感染初期, 尚未出现明显

病症时, 感染组 PO、U_a 和 T-AOC 3 个指标即出现显著的变化($P<0.05$), PO 与 T-AOC 活力下降, 而 U_a 活力提高; 发病期感染组 CAT 和 T-AOC 指标出现极显著变化($P<0.01$), 均值分别比空白对照组高 3.29、2.56 倍, 数值区间远离空白对照组区间。SOD、T-NOS、PO 和 U_a 等 4 项指标对病原感染致病较敏感, 发病期 SOD 及 U_a 活力比空白对照组显著提高($P<0.05$), 而 T-NOS、PO 活性显著下降($P<0.05$), 检测值范围与空白对照组范围部分重合。POD 和 LZM 两项指标对病原感染致病不敏感, 感染组检测值范围在空白对照组范围内或部分重叠, 均值与空白对照组差异不显著($P>0.05$); 恢复期, 感染组仅有 PO 及 T-AOC 两项指标低于空白对照组, 其他各指标恢复至空白对照组水平。以上结果表明 CAT 和 T-AOC 可以作为评价克氏原螯虾感染病原菌致病的标志性指标。

表 2 克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌后 8 种非特异免疫指标值的变化情况

Tab. 2 The change of 8 nonspecific immune index values of *Procambarus clarkii* infected by *Aeromonas hydrophila*

$n=9; \bar{x}\pm SE$

免疫指标 immune parameter	组别 group	参考范围/均值(敏感性) reference range/mean (sensitiveity)		
		感染初期 initial period of infection	发病期 period of onset	恢复期 recovery period
SOD (U/mL)	BI	1766.95–2598.30/2308.56±304.74 ^b (EI)	2783.55–3328.15/3061.76±220.19 ^a (S)	1638.05–2654.78/2220.20±386.27 ^b (EI)
	PBS	1052.91–2965.08/2201.92±692.33 ^b (I)	1415.98–2812.94/2047.69±527.47 ^b (I)	1779.05–2790.34/2359.94±406.70 ^b (EI)
	C		1258.65–3044.95/2341.91±618.85 ^b	
POD/ (U/mL)	BI	59.82–174.42/103.91±39.55 ^a (I)	73.23–124.07/93.73±20.10 ^a (EI)	75.35–149.26/110.49±25.42 ^a (I)
	PBS	68.04–174.91/113.99±34.55 ^a (I)	73.75–132.45/102.36±20.46 ^a (EI)	83.34–167.65/114.39±32.60 ^a (I)
	C		66.82–139.22/105.79±20.26 ^a	
T-NOS/ (U/mL)	BI	2.01–13.42/8.66±4.49 ^{ab} (I)	0.46–18.28/6.53±6.52 ^b (S)	8.72–17.49/13.39±2.95 ^a (EI)
	PBS	3.38–14.46/9.80±4.07 ^{ab} (EI)	4.47–11.94/8.80±2.65 ^{ab} (EI)	7.22–13.31/9.69±2.29 ^{ab} (EI)
	C		2.57–18.87/12.98±3.72 ^a	
PO/V	BI	6.67–15.70/10.42±3.52 ^{cd} (S)	2.20–13.43/7.56±4.60 ^d (S)	9.10–20.10/13.56±3.94 ^{bc} (S)
	PBS	11.73–16.93/14.93±2.13 ^b (S)	15.57–17.97/17.09±0.87 ^{ab} (EI)	18.03–21.33/19.96±1.19 ^a (EI)
	C		12.37–29.27/20.74±5.26 ^a	
LZM/ (U/L)	BI	0.01–0.31/0.14±0.14 ^a (I)	0.01–0.28/0.10±0.10 ^{ab} (I)	0.01–0.09/0.05±0.03 ^{ab} (EI)
	PBS	0.01–0.08/0.05±0.03 ^{ab} (EI)	0.01–0.28/0.08±0.10 ^{ab} (I)	0.01–0.07/0.03±0.02 ^b (EI)
	C		0.00–0.12/0.04±0.03 ^{ab}	
U _a / (U/mL)	BI	0.57–0.73/0.64±0.05 ^a (S)	0.54–0.67/0.60±0.05 ^{ab} (S)	0.49–0.60/0.56±0.04 ^{bc} (EI)
	PBS	0.40–0.58/0.50±0.06 ^c (I)	0.45–0.59/0.50±0.05 ^c (EI)	0.47–0.58/0.53±0.04 ^c (EI)
	C		0.46–0.61/0.52±0.07 ^c	
CAT/ (U/mL)	BI	23.05–89.10/57.44±22.88 ^b (I)	67.39–194.10/142.55±44.05 ^a (ES)	31.35–79.71/56.07±20.79 ^b (I)
	PBS	34.24–55.82/45.71±8.37 ^b (EI)	15.98–75.07/49.21±20.85 ^b (I)	27.81–68.07/51.14±15.62 ^b (I)
	C		11.38–57.56/43.32±14.85 ^b	
T-AOC/ (mmol/L)	BI	0.03–1.16/0.28±0.43 ^c (S)	1.63–2.28/1.92±0.28 ^a (ES)	0.09–0.40/0.28±0.20 ^c (S)
	PBS	0.07–0.48/0.26±0.19 ^c (S)	0.05–0.71/0.32±0.27 ^c (S)	0.24–0.74/0.46±0.21 ^{bc} (EI)
	C		0.15–1.16/0.75±0.39 ^b	

注：“BI”、“PBS”和“C”分别表示细菌感染组、PBS 组和空白对照组；ES 和 S 分别表示该指标对细菌感染导致发病极敏感($P<0.01$)和较敏感($P<0.05$)；EI 和 I 分别表示该指标对细菌感染导致发病极不敏感和不敏感($P>0.05$)；同一个指标中各期参数上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$)。

Note: BI, “PBS and C mean bacterial infection group, PBS group and blank control group respectively; ES and S mean the index is extremely sensitive ($P<0.01$) and sensitive ($P<0.05$) to the onset of bacteriosis respectively; EI and I mean the index is extremely insensitive and insensitive to the onset of bacteriosis ($P>0.05$) respectively. Values in each index with different superscripts at different period are significantly different ($P<0.05$).

2.4 克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌后糖类代谢指标值变化

克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌初期、发病期到恢复期 3 个阶段，糖代谢指标 GLU 值变动如表 3 所示，经对比分析可知，感染组与空白对照组 GLU 在感染初期、发病期及恢复期均与空白对照组差异均不显著($P>0.05$)，可见在感染初期发病期与恢复期，感染组检测值范围在空白对照组范

围内，对克氏原螯虾发病极不敏感。

2.5 克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌后 2 种脂类代谢指标值变化

克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌初期、发病期到恢复期 3 个阶段，血清中 2 种脂类代谢指标范围变化如表 4 所示，可见 TG 在感染的各个阶段，其均值与空白对照组差别不显著($P>0.05$)，数值范围在感染初期及发病期部分重叠，而恢复期

表 3 克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌后糖类代谢指标值的变化情况

Tab. 3 The change of carbohydrate metabolism index value of *Procambarus clarkii* infected by *Aeromonas hydrophila*

$n=9$; $\bar{x}\pm\text{SE}$

糖类代谢指标 carbohydrate metabolism index	组别 group	参考范围/均值(敏感性) reference range/mean (sensitiveity)		
		感染初期 initial period of infection	发病期 onset period	恢复期 recovery period
GLU/(mmol/L)	BI	0.10–2.50/0.89±0.87 (I)	0.20–0.59/0.36±0.16 (EI)	0.15–2.70/1.14±0.97 (EI)
	PBS	0.21–4.50/1.76±1.60 (EI)	0.13–2.20/0.99±0.74 (I)	0.19–3.60/1.67±1.42 (EI)
	C	0.14–11.20/3.09±3.64		

注: “BI”、“PBS”和“C”分别表示细菌感染组、PBS 组和空白对照组; “EI”和“I”分别表示该指标对细菌感染导致发病极不敏感和不敏感 ($P>0.05$)。

Note: “BI”, “PBS” and “C” mean bacterial infection group, PBS group and blank control group respectively; “EI” and “I” mean the index is extremely insensitive and insensitive to the onset of bacteriosis ($P>0.05$) respectively.

表 4 克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌后 2 种脂代谢指标值的变化情况

Tab. 4 The change of 2 lipid metabolism index values of *Procambarus clarkii* infected by *Aeromonas hydrophila*

$n=9$; $\bar{x}\pm\text{SE}$

脂类代谢指标 lipid metabolism index	组别 group	参考范围/均值(敏感性) reference range/mean (sensitiveity)		
		感染初期 initial period of infection	发病期 onset period	恢复期 recovery period
TG (mmol/L)	BI	0.05–1.14/0.28±0.42 ^a (I)	0.08–1.01/0.32±0.34 ^a (I)	0.12–0.60/0.29±0.16 ^a (EI)
	PBS	0.08–0.46/0.24±0.15 ^a (I)	0.08–0.79/0.36±0.29 ^a (I)	0.13–0.71/0.35±0.22 ^a (EI)
	C	0.12–1.37/0.60±0.40 ^a		
T-CHO (mmol/L)	BI	0.20–0.57/0.34±0.14 ^b (S)	0.34–0.68/0.46±0.16 ^{ab} (I)	0.30–0.59/0.40±0.10 ^{ab} (I)
	PBS	0.30–0.50/0.39±0.08 ^{ab} (I)	0.26–0.53/0.38±0.11 ^{ab} (I)	0.27–0.46/0.40±0.08 ^{ab} (I)
	C	0.38–0.70/0.49±0.10 ^a		

注: “BI”、“PBS”和“C”分别表示细菌感染组、PBS 组和空白对照组; “S”分别表示该指标对细菌感染导致发病较敏感 ($P<0.05$); “EI”和“I”分别表示该指标对细菌感染导致发病极不敏感和不敏感 ($P>0.05$); 同一个指标中各期参数上标不同表示组间存在显著差异 ($P<0.05$)。

Note: “BI”, “PBS” and “C” mean bacterial infection group, PBS group and blank control group respectively; “S” mean the index is extremely sensitive ($P<0.05$) to the onset of bacteriosis respectively; “EI” and “I” mean the index is extremely insensitive and insensitive to the onset of bacteriosis ($P>0.05$) respectively. Values in each index with different superscripts at different period are significantly different ($P<0.05$).

在空白对照组范围内。感染组 T-CHO 仅在感染初期出现显著下降 ($P<0.05$), 在发病期及恢复期与对照差异不明显, 该两项不能作为克氏原螯虾感染病原菌致病的标志性指标。

2.6 克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌后 4 种蛋白质代谢指标值变化

克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌初期、发病期到恢复期 3 个阶段, 血清中各蛋白质代谢指标范围如表 5 所示, 可见在感染初期及恢复期, TP、ALB、UREA 和 UA 指标的均值与空白对照组差别不显著 ($P>0.05$), 且其数值范围在空白对照组范围内或重叠; 在发病期, 感染组的 ALB 和 UREA 检测范围均在空白对照组范围外, 且均值差异极显著 ($P<0.01$), 感染后其浓度分别提高了

1.75 与 5.58 倍, 表明对细菌性病原感染致病极敏感, 而 TP 和 UA 的均值与空白对照组差异不显著 ($P>0.05$)。显示 ALB 和 UREA 可以作为评价克氏原螯虾感染病原菌致病的标志性指标。

2.7 克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌后 3 种消化酶指标值变化

克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌初期、发病期到恢复期各阶段, TRP、LPS 及 AMY 3 种消化酶活力范围如表 6 所示, 可知, 在感染初期感染组 AMY 活力显著下降 ($P<0.05$), 其数值范围与空白对照组有部分重叠, 而在发病期, 均值极显著降低 ($P<0.01$), 比空白对照组下降了 74.18%, 检测值范围超出空白对照组范围, 表明 AMY 对细菌感染致病极敏感; LPS 在感染的各个阶段,

表 5 克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌后 4 种蛋白质代谢指标的变化情况

Tab. 5 The change of 4 protein metabolism index values of *Procambarus clarkii* infected by *Aeromonas hydrophila*

$n=9$; $\bar{x}\pm\text{SE}$

蛋白质代谢指标 protein metabolism index	组别 group	参考范围/均值(敏感性) reference range/mean (sensitivity)		
		感染初期 initial period of infection	发病期 onset period	恢复期 recovery period
TP/(g/L)	BI	26.10–52.10/36.13±8.81 ^a (I)	33.51–56.02/42.30±8.94 ^a (EI)	30.39–39.21/ 35.98±3.05 ^a (EI)
	PBS	31.37–46.38/37.65±5.27 ^a (EI)	28.44–48.84/37.51±7.16 ^a (I)	27.27–47.77/ 35.53±8.33 ^a (I)
	C	29.01–59.49/41.54±9.09 ^a		
ALB/(g/L)	BI	3.97–9.78/5.89±2.20 ^b (I)	14.24–18.87/16.89±1.76 ^a (ES)	4.90–9.16/ 6.89±1.63 ^b (I)
	PBS	4.80–8.41/6.47±1.58 ^b (I)	3.76–10.06/6.64±2.57 ^b (I)	4.32–8.64/ 6.2±1.57 ^b (I)
	C	5.75–13.89/9.64±2.80 ^b		
UREA/(mmol/L)	BI	1.01–4.19/2.80±1.34 ^b (I)	17.98–33.51/24.02±6.43 ^a (ES)	2.02–6.38/ 3.26±1.62 ^b (I)
	PBS	1.34–4.41/2.81±1.23 ^b (I)	2.24–5.07/3.30±1.11 ^b (I)	1.72–6.27/ 3.37±1.66 ^b (I)
	C	2.34–10.25/4.30±2.31 ^b		
UA/(μmol/L)	BI	15.37–51.17/30.80±13.09 ^{ab} (EI)	15.37–201.79/76.70±68.23 ^a (I)	19.70–70.30/ 38.35±23.00 ^{ab} (EI)
	PBS	26.63–45.16/30.27±15.40 ^b (EI)	26.18–122.28/59.55±35.93 ^{ab} (I)	10.01–55.49/ 30.04±15.69 ^b (EI)
	C	7.69–102.57/50.16±29.37 ^{ab}		

注:“BI”、“PBS”和“C”分别表示细菌感染组、PBS 组和空白对照组;“ES”表示该指标对细菌感染导致发病极敏感($P<0.01$);“EI”和“I”分别表示该指标对细菌感染导致发病极不敏感和不敏感($P>0.05$); 同一个指标中各期参数上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$)。

Note: “BI”, “PBS” and “C” mean bacterial infection group, PBS group and blank control group respectively; “ES” mean the index is extremely sensitive ($P<0.01$) to the onset of bacteriosis respectively; “EI” and “I” mean the index is extremely insensitive and insensitive to the onset of bacteriosis ($P>0.05$) respectively. Values in each index with different superscripts at different period are significantly different ($P<0.05$).

表 6 克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌后 3 种消化酶活力的变化情况

Tab. 6 The activity change of 3 kinds of digestive enzymes of *Procambarus clarkii* infected by *Aeromonas hydrophila*

$n=9$; $\bar{x}\pm\text{SE}$

消化酶 digestive enzyme	组别 group	参考范围/均值(敏感性) reference range/mean (sensitivity)		
		感染初期 initial period of infection	发病期 onset period	恢复期 recovery period
TRP (U/L)	BI	13.00–72.68/27.05±22.91 ^b (EI)	61.78–328.96/186.27±101.04 ^a (S)	7.68–60.75/39.59±22.77 ^b (EI)
	PBS	1.80–47.27/29.89±18.56 ^b (I)	4.97–47.98/25.71±21.16 ^b (I)	1.30–46.51/20.91±17.06 ^b (I)
	C	6.25–152.10/60.07±46.19 ^b		
LPS (U/L)	BI	5.80–46.51/22.69±15.47 ^a (EI)	15.78–43.69/31.84±12.50 ^a (EI)	9.85–32.01/20.38±8.06 ^a (EI)
	PBS	13.94–39.56/24.34±9.15 ^a (EI)	12.04–32.44/19.82±8.72 ^a (EI)	8.27–46.71/23.01±15.19 ^a (EI)
	C	3.21–56.73/22.65±17.37 ^a		
AMY (U/L)	BI	170.97–1311.78/647.26±418.16 ^b (S)	203.10–946.48/537.05±276.59 ^b (ES)	94.59–1292.89/605.80±444.66 ^b (S)
	PBS	613.56–3461.48/1544.16±1358.79 ^{ab} (I)	225.69–3698.68/1593.19±1398.33 ^{ab} (I)	475.34–2056.77/1213.85±692.37 ^{ab} (I)
	C	1178.73–3798.95/2080.62±1280.08 ^a		

注:“BI”、“PBS”和“C”分别表示细菌感染组、PBS 组和空白对照组;“ES”和“S”分别表示该指标对细菌感染导致发病极敏感($P<0.01$)和较敏感($P<0.05$); “EI”和“I”分别表示该指标对细菌感染导致发病极不敏感和不敏感($P>0.05$); 同一个指标中各期参数上标不同表示组间存在显著差异($P<0.05$)。

Note: “BI”, “PBS” and “C” mean bacterial infection group, PBS group and blank control group respectively; “ES” and “S” mean the index is extremely sensitive ($P<0.01$) and sensitive ($P<0.05$) to the onset of bacteriosis respectively; “EI” and “I” mean the index is extremely insensitive and insensitive to the onset of bacteriosis ($P>0.05$) respectively. Values in each index with different superscripts at different period are significantly different ($P<0.05$).

其均值与空白对照组没有差异($P>0.05$), 且范围均在空白对照组范围内。指标 TRP 的均值仅在发病期高于空白对照组($P<0.05$), 但检测值范围与空白对照组部分重叠, 在感染初期及恢复期与空

白对照组差异不显著($P>0.05$)。

2.8 克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌后 MDA、GSH-Px、CK、ALT 及 AST 5 项指标值变化

克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌初期、发病期到恢复期各阶段, 血清中 CK、ALT、AST MDA 及 GSH-Px 指标范围及均值如表 7 所示, 分析对比可知, 感染组 CK、ALT、AST 和 GSH-Px 4 种酶活力在感染的初期及恢复期, 其均值与空白对照组差别均不显著($P>0.05$), 检测值范围与空白对照组部分重叠, 但在发病期, 其检测值范围均在空白对照组范围外, 且均值均显著高于空白对照组($P<0.01$), 与空白对照比分别提高了 16.72、219.21、74.43、2.66 倍; 而血清中 MDA 浓度在感染的初期及发病期, 其均值显著低于空白对照组($P<0.05$), 比空白对照组分别降低了 1.72 及 2.06 倍, 但检测值范围与对空白对照组部分重叠, 在恢复期与空白对照组无差异($P>0.05$)。表明 CK、ALT、AST 和 GSH-Px 4 项指标可以作为评价克氏原螯虾感染病原菌致病的标志性生理生化指标。

表 7 克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌后其他 5 种常规生理指标变化情况
Tab. 7 The change of other 5 physiological index values of *Procambarus clarkii* infected by *Aeromonas hydrophila*

$n=9; \bar{x}\pm SE$

其他生理指标 other physiological index (unit)	组别 group	参考范围/均值(敏感性) reference range/mean (sensitiveity)		
		感染初期 initial period of infection	发病期 onset period	感染后恢复期 recovery period
CK/(U/L)	BI	2.55–34.46/8.51±12.73 ^b (I)	16.27–59.53/36.29±14.28 ^a (ES)	1.05–16.55/6.25±5.56 ^b (I)
	PBS	0.88–5.51/2.92±2.36 ^b (I)	1.31–19.66/7.44±8.63 ^b (I)	0.53–12.77/5.85±5.28 ^b (I)
	C		0.32–5.47/2.17±1.80 ^b	
ALT/(U/L)	BI	2.93–25.42/14.05±9.38 ^b (I)	105.53–8905.50/4664.69±3681.19 ^a (ES)	14.46–43.30/27.67±10.94 ^b (EI)
	PBS	7.45–38.65/15.90±11.76 ^b (EI)	7.83–24.72/13.61±6.71 ^b (EI)	24.56–119.60/45.08±36.88 ^b (I)
	C		4.86–49.72/21.28±15.06 ^b	
AST/(U/L)	BI	36.44–351.60/156.81±111.77 ^b (I)	14067.48–23165.40/18613.92±3823.51 ^a (ES)	145.56–491.00/325.73±111.62 ^b (EI)
	PBS	87.03–202.85/119.6±42.36 ^b (EI)	49.70–262.46/133.02±83.15 ^b (EI)	134.87–729.77/365.47±198.28 ^b (I)
	C		43.00–658.45/250.09±197.63 ^b	
MDA/(U/L)	BI	2.12–10.29/5.48±3.09 ^b (S)	3.03–7.43/4.60±1.99 ^b (S)	3.94–8.00/6.01±1.60 ^{ab} (I)
	PBS	1.82–10.00/6.14±3.32 ^{ab} (I)	2.12–9.14/5.98±2.85 ^{ab} (I)	2.42–6.86/4.87±1.71 ^b (S)
	C		4.24–16.86/9.47±4.18 ^a	
GSH-Px/U	BI	65.75–222.86/144.52±61.08 ^b (I)	220.22–373.15/304.26±61.74 ^a (ES)	72.33–142.42/117.76±26.04 ^b (I)
	PBS	36.16–152.97/107.80±40.74 ^b (I)	62.47–201.76/125.65±51.36 ^b (I)	75.62–305.93/135.40±92.55 ^b (I)
	C		90.00–161.10/114.59±21.61 ^b	

注: “BI”、“PBS”和“C”分别表示细菌感染组、PBS 组和空白对照组; “ES”和“S”分别表示该指标对细菌感染导致发病极敏感($P<0.01$)和较敏感($P<0.05$); “EI”和“I”分别表示该指标对细菌感染导致发病极不敏感和不敏感($P>0.05$); 同一个指标中各期参数上标不同表示组间存在显著差异。

Note: “BI”, “PBS” and “C” mean bacterial infection group, PBS group and blank control group respectively; “ES” and “S” mean the index is extremely sensitive ($P<0.01$) and sensitive ($P<0.05$) to the onset of bacteriosis respectively; “EI” and “I” mean the index is extremely insensitive and insensitive to the onset of bacteriosis ($P>0.05$) respectively. Values in each index with different superscripts at different period are significantly different.

3 讨论

3.1 细菌感染对克氏原螯虾非特异免疫因子活性影响

虾类通过非特异免疫抵御病原感染, 该系统由体表屏障、体液免疫及细胞免疫构成, 体液免

疫主要指血淋巴中的各类模式识别受体、细胞激活因子、抗氧化因子、血凝因子及免疫相关酶类^[14-15]。当病原突破体表屏障进入机体后, 被体液免疫系统识别, 通过凝集、溶菌及呼吸爆发等途径对病原进行杀伤, 并通过信号传递, 诱导细胞免疫^[16]。研究发现日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)感染

维氏气单胞菌(*A. veronii*)后,其抗氧化及免疫酶活力均发生变化^[16];红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)感染副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)后,发病期 PO、SOD、T-AOC 和总蛋白水平显著降低, LZM 活力在感染期显著提高^[17]。本研究结果表明,克氏原螯虾感染嗜水气单胞菌发病后, PO 活性显著下降, LZM 活力显著提高,结果与前人一致,而 SOD 活力在感染前及恢复期与空白对照组差别不大,在感染期活力提高,其差异的原因有待后续研究。T-AOC 为动植物体内广泛具有的由抗氧化物质和抗氧化酶等构成的总抗氧化能力, T-AOC 高低反映了生物机体抗氧化损伤水平,当凡纳滨对虾感染 *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) 后,其 T-AOC 活力在感染前、中、后期呈现下降、升高及下降趋势^[18],本研究中也发现相似的变化,克氏原螯虾 T-AOC 在感染初期及恢复期显著降低,在发病期极显著提高,表明 T-AOC 可以作为克氏原螯虾感染病原菌发病的免疫标志性指标,指示虾体发病状态。CAT 是氧化物酶体的标志酶,广泛分布于动物的各个组织中,其功能是在细胞中促进过氧化氢分解,减少氢氧自由基的产生,维持机体正常生理活动。栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)感染病毒前中期,血淋巴 CAT 活性极显著增强,而感染后期差异不显著^[19],而本研究表明在感染初期及恢复期,虾血清 CAT 活力与对照差别不显著,但在感染发病期极显著提高。类似研究也发现,当克氏原螯虾受到亚硝基氮应激后,体内 CAT 活性也显著提高^[20]。表明克氏原螯虾受病原感染及环境变化导致的免疫指标改变,能够通过检测 CAT 得到体现。

3.2 细菌感染对克氏原螯虾糖类、脂类及蛋白质代谢的影响

虾类生长与糖类、脂类及蛋白质代谢密切相关, GLU 为对虾体内的功能性物质, Jiao 等^[21]研究发现,凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)感染副溶血弧菌后,血清 GLU 浓度在 24 h 增加显著,而凡纳滨对虾感染 EHP 后, GLU 浓度降低^[18],本研究结果显示克氏原螯虾的血糖浓度变化不明显,其差异机制有待阐明。

TG 为一种中性脂质,可以通过氧化分解为

生物体提供能量^[22],在对虾幼体发育中发挥重要作用^[23], Chen 等^[24]研究表明,日本对虾(*Penaeus japonicus*)感染 WSSV 12 h 后,血淋巴 TG 水平持续下降,而经 EHP 感染后的凡纳滨对虾血淋巴中 TG 水平也降低^[18],该研究的结果显示,经嗜水气单胞菌感染致病的克氏原螯虾, TG 及 T-CHO 浓度均有下降的趋势,但与空白对照组差异不明显。

蛋白质是生长和新陈代谢所需的基本物质,血清 TP 浓度降低表示细胞生长和代谢活性降低^[18]。Yoganandhan 等^[25]研究显示受 WSSV 感染的对虾血淋巴中的总蛋白含量显著增加。同样用 EHP 感染凡纳滨对虾,血清中总蛋白与白蛋白含量均显著升高^[26],该研究显示,克氏原螯虾经病原菌感染致病后, TP 有升高的趋势,但与空白对照组差异不显著。UREA 是蛋白质分解代谢的主要含氮代谢产物,无脊椎动物中 UREA 来源于精氨酸的水解及尿酸的氧化两个代谢途径^[27],研究发现,甲壳类内的 UREA 参与渗透压调节^[28], WSSV 感染能够导致凡纳滨对虾渗透压调节能力降低,在低盐度时渗透压变低,在高盐度时渗透压变高^[29]。氨氮胁迫可导致对虾血淋巴 UREA 含量升高^[30],该研究发现克氏原螯虾受病原菌感染发病后,血淋巴中 UREA 极显著升高,表明血淋巴渗透压调节能力发生异常改变,虾机体处于发病状态。哺乳动物中 ALB 源自肝脏的血清蛋白,是一种水溶性蛋白, ALB 具有生物相容性、生物可降解性、非免疫原性,还可调节血液 pH 值和渗透压,防止体液从血管渗透到其他组织及促进伤口愈合^[31]。甲壳类、鱼类及哺乳动物的白蛋白在结构及理化性质上具有相似性^[32]。锯腹脂鲤(*Piaractus mesopotamicus*)感染嗜水气单胞菌后,血清中 ALB 浓度降低^[33],克氏原螯虾暴露在较高浓度的亚硝酸盐环境中,可导致血淋巴中 ALB 的浓度降低^[34]。本研究表明克氏原螯虾在感染嗜水气单胞菌的发病期浓度极显著提高,推测是由于虾肝胰腺组织受损,导致合成的 ALB 大量释放到血淋巴中所致。

3.3 细菌感染对克氏原螯虾消化酶活性的影响

AMY 是重要的消化酶,可催化淀粉水解成小分子糖类,便于肠道吸收。Sathish 等^[18]研究发现

EHP 感染凡纳滨对虾后, α -AMY 及 LPS 活力显著降低。该研究也表明 AMY 活力在细菌性病原感染致病过程中活性显著下降, 具有发病期的标志性, 而 LPS 活力对细菌性病原感染致病极不敏感, 可能与实验虾的种类及病原致病机制不同有关。凡纳滨对虾口服感染致对虾肝胰腺坏死性细菌(necrotizing hepatopancreatitis bacterium, NHPB)后, 在感染后的 18 d 内, 血淋巴 TRP 活力提高^[35], 该研究结果显示, TRP 对细菌性病原感染致病较敏感, 其活力也呈现升高的趋势。

3.4 细菌感染对克氏原螯虾 CK、ALT、AST 和 GSH-Px 活性影响

CK 常存在于动物的心脏、肌肉以及脑等组织的细胞浆和线粒体中, 是一个与细胞内能量运转、肌肉收缩、ATP 再生有直接关系的重要激酶。小鼠感染葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 48 h 与 72 h 后, CK 的活性显著提高^[36]。葡萄球菌感染新西兰大白兔后 48 h 血浆 CK 活性提高, 并认为 CK 可作细菌外毒素导致皮肤及肌肉组织损失的早期标志^[37]。血清中 AST 和 ALT 活性是反映动物肝功能的重要指标, 正常情况下, 血清中相关转氨酶活性处于较低水平, 肝脏细胞受损导致其细胞膜通透性变强时, ALT、AST 会大量渗透到血液^[38], 鱼类(*Sebastes schlegelii*)血清中 AST 和 ALT 活力升高提示肝损伤^[39]。Kim^[39]等研究表明, 凡纳滨对虾感染 EHP 后血淋巴中 AST 和 ALT 活性显著提高, 而美洲龙虾(*Homarus americanus*)感染绿色气球菌(*Aerococcus viridans*), AST 和 ALT 水平也显著升高, 并认为是由于肝胰腺结缔组织损伤所致^[40]。本研究也取得了相似的结果, 细菌感染发病后, CK、ALT 及 AST 活性极显著提高, 表明克氏原螯虾受细菌感染导致肝胰腺及肌肉组织等损伤, CK、ALT 及 AST 可作为细菌感染致病的标志性指标。

GSH-Px 可以消除机体内的过氧化氢及脂质过氧化物, 在病原体感染期间参与消除过量的活性氧并将有毒过氧化物还原为无毒羟基化合物来保护细胞^[41], 本研究结果表明, 感染后患病的克氏原螯虾 GSH-Px 比空白对照显著提高, 这是机体为消除抗感染过程中产生的大量过氧化物而进

行的生理代谢调整, 有利于保护机体免受过氧化损伤。

参考文献:

- [1] Fishery Bureau of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs. China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022: 24. [农业农村部渔业局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022: 24.]
- [2] Li Q B, Li Y H, Wang W M, et al. Investigation of white spot syndrome virus in different *Procambarus clarkii* populations in Hubei[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2019, 35(12): 157-164. [李青彬, 李艳和, 王卫民, 等. 湖北省不同克氏原螯虾群体携带白斑综合征病毒情况调查[J]. 中国农学通报, 2019, 35(12): 157-164.]
- [3] Li X D, Ai X H, Liu Y T, et al. Isolation, identification and drug sensitivity test of pathogenic bacteria associated with “plague of May” in *Procambarus clarkii*[J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2021, 11(4): 17-22. [李旭东, 艾晓辉, 刘永涛, 等. 克氏原螯虾“五月瘟”致病菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 中国渔业质量与标准, 2021, 11(4): 17-22.]
- [4] Tao Y F, Qiang J, Wang H, et al. Acute toxicity of low-pH stress and its effect on enzyme activity and histological structure of gill and hepatopancreas in *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(6): 1279-1289. [陶易凡, 强俊, 王辉, 等. 低 pH 胁迫对克氏原螯虾鳃和肝胰腺酶活力及组织结构的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(6): 1279-1289.]
- [5] Soo T C C, Bhasu S. Biochemical indexes and gut microbiota testing as diagnostic methods for *Penaeus monodon* health and physiological changes during AHPND infection with food safety concerns[J]. Food Science & Nutrition, 2022, 10(8): 2694-2709.
- [6] Yu Q R, Han F L, Huang M X, et al. The effects of dietary myo-inositol on growth and physiological, biochemical, and molecular responses in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2023, 568: 739323.
- [7] He N J, Ruan G L, Liu Y L, et al. Effects of sustained high-temperature stress on growth performance, digestive enzyme activities and immune indexes of crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2022, 46(3): 395-402. [何乃娟, 阮国良, 刘玉林, 等. 持续高温胁迫对克氏原螯虾生长、消化酶活性与免疫指标的影响[J]. 水生生物学报, 2022, 46(3): 395-402.]
- [8] Mengal K, Kor G, Kozák P, et al. Effects of environmental factors on the cellular and molecular parameters of the immune system in decapods[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology,

- 2023, 276: 111332.
- [9] Cheng L F, Dai X L. Effects of chronic ammonia nitrogen stress on growth, survival and energy metabolism of *Macrobrachium rosenbergii* [J/OL]. Journal of Southern Agriculture, 2023. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail/45.1381.S.20230208.150.001.html>. [成良峰, 戴习林. 慢性氨氮胁迫对罗氏沼虾生长与存活及能量代谢的影响[J/OL]. 南方农业学报, 2023. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail/45.1381.S.20230208.150.001.html>.]
- [10] Luo W, Zhao Y L, Yao J J, et al. Changes in main digestive enzyme and isozyme activities during embryonic development of redclaw crayfish[J]. Chinese Journal of Zoology, 2006, 41(1): 12-18. [罗文, 赵云龙, 姚俊杰, 等. 红螯螯虾胚胎发育期主要消化酶和同工酶的活性变化[J]. 动物学杂志, 2006, 41(1): 12-18.]
- [11] Rahi M L, Sabbir W, Salin K R, et al. Physiological, biochemical and genetic responses of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to differential exposure to white spot syndrome virus and *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Aquaculture, 2022, 546: 737337.
- [12] Liu J D, Liu H J, Fan Y, et al. Effects of acute nitrite stress on oxidative stress, energy metabolism and osmotic regulation of *Penaeus monodon*[J/OL]. Journal of Fisheries of China, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1283.S.20220303.1105.002.html>. [刘吉丹, 刘洪军, 樊英, 等. 亚硝态氮胁迫对斑节对虾(非洲群体)氧化应激、能量代谢和渗透调节的影响[J/OL]. 水产学报. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1283.S.20220303.1105.002.html>.]
- [13] Wang L, Li G Y, Mao Y X. Studies on the activities and characteristics of the antibacteria, bacteriolysis and phenoloxidase in the haemolymph of *Penaeus chinensis*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1995, 26(2): 179-185. [王雷, 李光友, 毛远兴. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(2): 179-185.]
- [14] Tong R X, Pan L Q, Zhang X, et al. Neuroendocrine-immune regulation mechanism in crustaceans: A review[J]. Reviews in Aquaculture, 2022, 14(1): 378-398.
- [15] Xu H S, Xu B J. Progress on the researches of cellular and humoral immunity of crustacean[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2001, 16(1): 49-56. [徐海圣, 徐步进. 甲壳动物细胞及体液免疫机理的研究进展[J]. 大连水产学院学报, 2001, 16(1): 49-56.]
- [16] Yi C. Screening and identification of genes related to *Macrobrachium nipponense* resistance to *Aeromonas veronii*[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2021. [易操. 日本沼虾抗维氏气单胞菌相关基因的筛选、鉴定[D]. 泰安: 山东农业大学, 2021.]
- [17] Chen D D. Effects of *Vibrio parahaemolyticus* infection on the transcriptome and metabolome of the hepatopancreas and functional analysis of relish and TRAF6 genes in redclaw crayfish[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2022. [陈端端. 副溶血弧菌感染对红螯螯虾肝胰腺转录组和代谢组的影响及 Relish 和 TRAF6 基因的功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.]
- [18] Sathish Kumar T, Praveena P E, Sivaramkrishnan T, et al. Effect of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) infection on physiology, metabolism, immunity, and growth of *Penaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2022, 553: 738105.
- [19] Sun H S, Wang Y Y, Yang J, et al. Effects of virus on the activities of catalase and peroxidase in haemolymph of *Chlamys farrei*[J]. Fisheries Science, 2004, 23(8): 4-6. [孙虎山, 王宜艳, 杨静, 等. 病毒感染对栉孔扇贝血淋巴中过氧化氢酶和过氧化物酶活力的影响[J]. 水产科学, 2004, 23(8): 4-6.]
- [20] Li Q S, Liu Y L, Li S X, et al. Impact of nitrite exposure on oxidative stress and antioxidative-related genes responses in the gills of *Procambarus clarkii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 131: 624-630.
- [21] Jiao L F, Dai T M, Zhong S Q, et al. *Vibrio parahaemolyticus* infection impaired intestinal barrier function and nutrient absorption in *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 99: 184-189.
- [22] Ohshima T, Li N, Koizumi C. Oxidative decomposition of cholesterol in fish products[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1993, 70(6): 595-600.
- [23] Palacios E, Racotta I S, Heras H, et al. Relation between lipid and fatty acid composition of eggs and larval survival in white Pacific shrimp (*Penaeus vannamei*, Boone, 1931)[J]. Aquaculture International, 2001, 9(6): 531-543.
- [24] Chen I T, Aoki T, Huang Y T, et al. White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the Warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection[J]. Journal of Virology, 2011, 85(24): 12919-12928.
- [25] Yoganandhan K, Thirupathi S, Sahul Hameed A S. Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus*[J]. Aquaculture, 2003, 221(1-4): 1-11.
- [26] Santhoshkumar S, Sivakumar S, Vimal S, et al. Biochemical changes and tissue distribution of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in naturally and experimentally EHP-infected whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), in India[J]. Journal of Fish Diseases, 2017, 40(4): 529-539.
- [27] Scaraffia P Y, Tan G H, Isoe J, et al. Discovery of an

- alternate metabolic pathway for urea synthesis in adult *Aedes aegypti* mosquitoes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(2): 518-523.
- [28] Nash M T, Quijada-Rodriguez A R, Allen G J P, et al. Characterization of 3 different types of aquaporins in *Carcinus maenas* and their potential role in osmoregulation[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2022, 272: 111281.
- [29] Ramos-Carreño S, Valencia-Yáñez R, Correa-Sandoval F, et al. White spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to low and high salinity[J]. Archives of Virology, 2014, 159(9): 2213-2222.
- [30] Chen J C, Chen C T, Cheng S Y. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels[J]. Marine Ecology Progress Series, 1994, 110: 85-94.
- [31] Hutapea T P H, Madurani K A, Syahputra M Y, et al. Albumin: Source, preparation, determination, applications, and prospects[J]. Journal of Science: Advanced Materials and Devices, 2023, 8(2): 100549.
- [32] Zorin N A, Zhabin S G, Lykova O F, et al. A comparative study of the physicochemical and antigenic properties of human and animal albumins[J]. Zhurnal Evoliutsionnoi Biokhimii i Fiziologii, 1994, 30(4): 505-510.
- [33] Gallani S U, Valladão G M R, Kotzent S, et al. Dietary intake of *Rubrivivax gelatinosus* biomass enhances phagocytic cells in tropical fish *Piaractus mesopotamicus* infected with *Aeromonas hydrophila*[J]. Aquaculture International, 2019, 27(3): 711-720.
- [34] Li Q S, Liu Y L, Li S X, et al. Impact of nitrite exposure on oxidative stress and antioxidative-related genes responses in the gills of *Procambarus clarkii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 131: 624-630.
- [35] Ávila-Villa L A, Fimbres-Olivarria D, García-Sánchez G, et al. Physiological and immune responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with necrotizing hepatopancreatitis bacterium[J]. Aquaculture, 2012, 324-325: 14-19.
- [36] Perin G, Baldissera M D, Jaguezski A M, et al. Involvement of the phosphoryl transfer network on cardiac energetic metabolism during *Staphylococcus aureus* infection and its association to disease pathophysiology[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 126: 318-322.
- [37] Georgieva T, Petrov V, Lyutskanov M, et al. Effect of *Staphylococcus aureus* infection on plasma creatine kinase activity in rabbits[J]. Trakia Journal of Science, 2016, 14(1): 52-59.
- [38] Yuan Z W, Li Y J, Li Y A, et al. Effect of microcin C7 on growth performance, serum and hepatopancreas biochemical indexes of *Procambarus clarkii*[J]. Feed Research, 2022, 45(9): 66-69. [袁志文, 李佑杰, 李永安, 等. 杆菌七肽对克氏原螯虾生长性能、血清以及肝胰脏生化指标的影响[J]. 饲料研究, 2022, 45(9): 66-69.]
- [39] Kim J H, Kang J C. Changes in hematological parameters, plasma cortisol, and acetylcholinesterase of juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii* supplemented with the dietary ascorbic acid[J]. Aquaculture Reports, 2016, 4: 80-85.
- [40] Battison A. Tissue distribution and hemolymph activity of six enzymes in the American lobster (*Homarus americanus*): Potential markers of tissue injury[J]. Journal of Shellfish Research, 2006, 25(2): 553-560.
- [41] Xia X F, Zheng J J, Shao G M, et al. Cloning and functional analysis of glutathione peroxidase gene in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(6): 1587-1595.

Screening of immunological, physiological and biochemical indices of *Procambarus clarkia* indicating disease caused by bacterial infection

ZHANG Xuemei^{1,2}, WANG Xiuhua², YANG Bing², ZHANG Hongfang², LIAN Xinyu², GOU Ziyue², ZHU Xinjie²

1. Fisheries College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity; Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences Qingdao 266071, China

Abstract: Crayfish, *Procambarus clarkia*, is an important freshwater aquaculture species in China. Nonetheless, with this rapid development of the aquaculture industry, crayfish diseases have emerged as an increasing problem in recent years, with outbreaks of various viral and bacterial diseases causing huge economic losses. The occurrence of diseases in shrimp is related to pathogenic infection, environmental degradation, nutrition disorders, and a decrease in self-immunity. Different pathogenic factors have different effects on the physiological metabolism of shrimp, which are reflected by changes in immunity, metabolism, and physiological and biochemical indicators. Establishing these disease-associated indicators will provide a helpful tool to rapidly identify shrimp infections and establish the major harmful factors of multi-pathogenic infections. To screen for the serological markers, physiological markers, and biochemical indices of diseased *P. clarkia* and provide a basis for disease risk assessment in shrimp culture, a virulent pathogenic bacterial strain, *Aeromonas hydrophila*, was injected into *P. clarkia* at a dose of 1 LD₅₀. A total of 23 indices, including non-specific immunity, carbohydrate metabolism, lipid metabolism, protein metabolism, and physiological and biochemical indices, were analyzed in the serum at the early stage of infection (12 h), onset (24–72 h), and post-infection recovery (90 h) periods. The results showed that among the eight non-specific immune indices in the onset period, catalase (CAT) activity and total antioxidant capacity (T-AOC) were significantly higher in the infection group ($P < 0.01$), with mean values 3.29 and 2.56 times higher than those of the control group, respectively. The concentrations of albumin (ALB) and urea (UREA) were significantly higher in the infected group during the diseased period ($P < 0.01$), with average concentrations 1.75 and 5.58 times higher than those in the control group, respectively. The activity of amylase (AMY) was significantly lower in the onset period ($P < 0.01$), with a 3.87 times lower activity than that in the control group. Activities of the enzymes creatine kinase (CK), alanine aminotransferase (ALT), glutamate aminotransferase (AST), and glutathione peroxidase (GSH-Px) were significantly higher in the onset period ($P < 0.01$), with activities 16.72, 219.21, 74.43, and 2.66 times higher than those in the control group, respectively. Among the detected indices, glucose (GLU), triglycerides (TG), total protein (TP), and lipase (LPS) did not change significantly ($P > 0.05$). These results indicated that changes in the CAT, T-AOC, ALB, UREA, AMY, CK, ALT, AST, and GSH-Px indices in the serum of *P. clarkia* were extremely indicative of disease onset caused by bacterial infection. The results of this study could, ultimately, provide a novel technical basis for disease risk assessment and allow early warning of disease in crayfish aquaculture.

Key words: *Procambarus clarkia*; *Aeromonas hydrophila*; bacteriosis; disease-associated indicator; immune indexes; physiological and biochemical indexes

Corresponding author: WANG Xiuhua. E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn