

文章编号: 1674-7054(2014)03-0220-08

氨氮质量浓度对感染白斑综合症病毒的 凡纳滨对虾的影响

向 赞¹ 王 刚¹ 龚 永¹ 陈兆明¹ 张 锐³ 孙成波^{1,2}

(1. 广东海洋大学 水产学院 广东 湛江 524025; 2. 广东高校热带海产无脊椎动物养殖工程技术研究中心, 广东 湛江 524025; 3. 广东海洋大学 实验教学部 广东 湛江 524025)

摘 要: 研究了氨氮质量浓度渐变和突变对白斑综合症病毒(WSSV)在凡纳滨对虾体内增殖的影响。结果表明:在氨氮质量浓度突变组实验中,氨氮质量浓度从起始浓度 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 向中浓度 $1.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和高浓度 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 突变过程中对凡纳滨对虾的累积死亡率和对虾体内病毒增殖影响显著($P < 0.05$)。先氨氮突变后感染WSSV实验中氨氮起始、中、高浓度胁迫下对虾累积死亡率分别为25.6%、34.4%和48.9%;病毒含量最大值分别为 9.59×10^5 、 5.75×10^6 、 $1.62 \times 10^6 \text{ copy} \cdot \text{g}^{-1}$ 。先感染WSSV后氨氮突变实验中氨氮起始、中、高浓度胁迫下对虾累积死亡率最大值分别为30%、38.9%和48.9%;病毒含量最大值分别为 9.59×10^5 、 9.58×10^5 、 $4.94 \times 10^6 \text{ copy} \cdot \text{g}^{-1}$ 。氨氮浓度渐变实验中各组至24 h对虾累积死亡率较低($P > 0.05$)。48 h后开始出现显著差异($P < 0.05$)。先氨氮渐变后感染WSSV实验中氨氮起始、中、高浓度胁迫下对虾累积死亡率最大值分别为28.9%、30.0%和45.6%;病毒含量最大值分别为 9.59×10^5 、 4.48×10^6 、 $1.86 \times 10^6 \text{ copy} \cdot \text{g}^{-1}$ 。先感染WSSV后氨氮渐变实验中氨氮起始、中、高浓度胁迫下对虾累积死亡率分别为25.6%、33.3%和45.6%;病毒含量最大值分别为 9.59×10^5 、 8.58×10^5 、 $6.55 \times 10^6 \text{ copy} \cdot \text{g}^{-1}$ 。这表明对于携带WSSV的对虾,氨氮变化越大,WSSV从潜伏感染转为急性感染的可能越大,所以控制水质中氨氮含量在低浓度水平对预防WSS爆发至关重要。

关键词: 氨氮质量浓度; 凡纳滨对虾; 白斑综合症病毒; 实时荧光定量PCR; 病毒含量

中图分类号: S 945.4

文献标志码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是世界对虾养殖的主要品种之一,具有抗病力强、广盐性等特点。1993年我国对虾养殖开始发生大规模疾病爆发,研究发现白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是病原体之一,该病毒传染性强,具有高致死性,全球对虾养殖业的发展因此受到严重制约^[1-2]。有研究指出,引起白斑综合症爆发的原因包括对虾免疫水平、感染方式、病毒数量,还有环境因子(如温度、盐度、氨氮含量、pH值等)^[3-4]。GUNALAN等^[5]指出,pH升高会加快斑节对虾死亡。长时间高浓度氨氮胁迫下会造成甲壳动物的免疫力下降及肝胰腺组织结构受到破坏^[6-9]。徐丽美等^[10]通过荧光定量PCR初步将对虾体内病毒含量 $10^3 \text{ copy} \cdot \text{mg}^{-1}$ 定为疾病暴发危险临界值。笔者通过不同时间感染WSSV及改变对虾养殖环境中氨氮含量研究不同氨氮质量浓度胁迫下对感染WSSV的凡纳滨对虾的影响,旨在阐明氨氮质量浓度变化对WSSV在对虾体内增殖的影响,以期对对虾产业健康可持续发展提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料 健康凡纳滨对虾取自广东海洋大学东海岛海洋生物研究基地,体长为 (8.12 ± 0.68)

收稿日期: 2014-03-28

基金项目: 广东省海洋渔业科技推广专项(A201301D02); 湛江市自主创新企业科技创新项目(2011【79】)

作者简介: 向赞(1987-),男,硕士。E-mail: x418312@126.com

通信作者: 孙成波(1970-),男,博士,教授。研究方向: 对虾养殖和病害防治。E-mail: suncb@gdou.edu

cm。实验前随机抽取 10 尾对虾进行荧光定量 PCR 检测,检测结果为阴性。实验前暂养 5 d,投喂对虾人工配合饵料 2 次/日,换水 1 次/日,日换水量接近 100%。

1.2 WSSV 粗提液制备 取感染 WSSV 症状明显的凡纳滨对虾,去除甲壳,按 1:1 (W:V) 加入高盐 PBS,冰浴中匀浆,将匀浆液于 4 °C $7\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min;离心后的上清液加入蔗糖至终浓度为 30% (w/w),4 °C $16\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 超速离心 50 min,弃上清,沉淀用 PBS (pH7.4) 重悬,将重悬液用 0.45 μm 的滤膜过滤,分装后 -80 °C 保存。

1.3 DNA 模板提取和引物设计 DNA 模板提取参照 SUN 等^[11]的方法,PCR 引物设计参照 YOU 等^[12]的进行,由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 感染方式 本实验采用人工注射感染,在凡纳滨对虾第 2 腹节与第 3 腹肌之间往心脏方向注射 40 μL 用 PBS 缓冲液稀释 10^4 倍的病毒粗提液。

1.5 氨氮质量浓度变化实验 实验水温为 (22 ± 1) °C,盐度为 (23 ± 1) ,氨氮质量浓度变化由起始浓度 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 向中浓度 $1.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和高浓度 $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行突变和渐变,突变时间为 6 h,渐变时间为 72 h;病毒感染分为变化前和变化后感染 2 种方式,实验组和对照组均设置 3 个平行组,每组对虾各 30 尾;实验组注射 40 μL PBS 缓冲液稀释 10^4 倍的病毒粗提液,对照组注射 40 μL PBS 缓冲液。实验中投喂对虾人工配合饵料 2 次/日,一直保持充气状态,定时吸出排泄物,日换水量 100%,用次溴酸盐法测定氨氮浓度 1 次/日,氨氮浓度或高或低时,通过 100% 换水及时调整水体中氨氮浓度。及时取出死亡对虾放入 -20 °C 冰箱保存,各组在感染后 0、6、12、24、48、72、96、120、144、168 h 取样保存。观察记录对虾发病及死亡率,定期检测对虾组织中病毒含量,并对死亡对虾进行病毒检测。

1.6 病毒检测方法 病毒检测参考程晓燕等的荧光定量 PCR 方法进行^[13]。

2 结果与分析

2.1 氨氮质量浓度突变后感染 WSSV 的结果

2.1.1 氨氮质量浓度突变后感染 WSSV 对凡纳滨对虾死亡情况的影响 氨氮质量浓度突变后感染 WSSV 对凡纳滨对虾死亡情况的影响见图 1。由图 1 可见,随着氨氮质量浓度增加,对虾死亡率升高,感染 WSSV 加快了对虾死亡。整个实验过程中感染 WSSV 组中起始浓度 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的对虾累积死亡率低于两突变组的 ($P<0.05$),起始浓度 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的累积死亡率最大值 25.6%,低于中浓度 $1.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的 34.4% 和高浓度 $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 48.9%,但远大于未感染 WSSV 组最大值 14.4%。

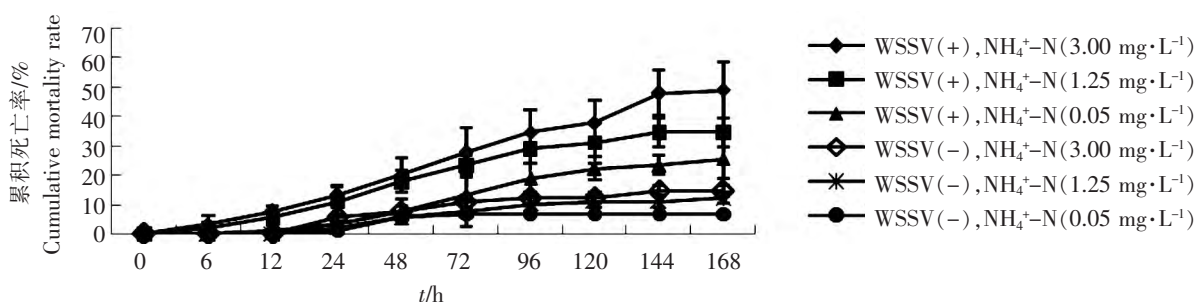


图 1 氨氮质量浓度突变后对凡纳滨对虾死亡情况的影响

Fig. 1 Effects of acute changes of ammonia nitrogen on the mortality of *L. vannamei* infected with WSSV

2.1.2 氨氮质量浓度突变后感染 WSSV 对凡纳滨对虾携带 WSSV 情况的影响 氨氮质量浓度突变后感染 WSSV 对凡纳滨对虾携带 WSSV 情况的影响见表 1。由表 1 可见,整个实验中,随时间推移病毒含量逐渐升高,起始质量浓度 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 感染组与高质量浓度 $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的病毒含量在 12、24、48 h 存在显著差异 ($P<0.05$),起始质量浓度 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 感染组与中质量浓度 $1.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组在 96 h 存在显著差异 ($P<0.05$)。至 12 h 高质量浓度 $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组出现病毒增殖高峰,约是其他两组的 200 倍,中质量浓度 $1.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组至 24 h 病毒增殖速度开始加快,起始质量浓度 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组至 48 h 病毒增殖速度才开始加快。

表 1 氨氮质量浓度突变后感染 WSSV 对凡纳滨对虾携带 WSSV 的影响
Tab. 1 Effects of acute changes of ammonia nitrogen on white spot syndrome virus copy number
in *L. vannamei* infected with WSSV

时间/h Time	氨氮质量浓度/(mg·L ⁻¹) Ammonia nitrogen concentration	WSSV 携带量/(copy·g ⁻¹) WSSV carrying capacity			
		WSSV carrying capacity			
		极小值 Minimum	极大值 Maximum	均值 Mean	标准差 Standard deviation
0	0.05	2.94×10^2	9.43×10^2	5.65×10^2	3.37×10^2
	1.25	2.56×10^2	1.95×10^3	9.14×10^2	9.05×10^2
	3.0	9.81×10^2	1.73×10^3	1.40×10^3	3.84×10^2
6	0.05	5.07×10^2	7.82×10^2	6.22×10^2	1.43×10^2
	1.25	5.77×10^2	5.20×10^3	2.27×10^3	2.55×10^3
	3.0	2.98×10^2	3.69×10^2	3.27×10^2	3.72×10^1
12	0.05	1.24×10^2	2.78×10^2	1.88×10^2	8.03×10^1
	1.25	3.22×10^2	4.17×10^2	3.60×10^2	5.03×10^1
	3.0	5.84×10^4	9.21×10^4	7.47×10^4	1.69×10^4
24	0.05	6.50×10^2	1.14×10^3	9.48×10^2	2.62×10^2
	1.25	4.22×10^3	6.12×10^3	5.15×10^3	9.52×10^2
	3.0	4.52×10^4	1.24×10^5	7.45×10^4	4.29×10^4
48	0.05	1.97×10^3	7.09×10^3	4.73×10^3	2.58×10^3
	1.25	3.41×10^4	5.75×10^4	4.42×10^4	1.20×10^4
	3.0	1.37×10^5	4.56×10^5	3.07×10^5	1.61×10^5
72	0.05	1.24×10^5	5.16×10^5	2.72×10^5	2.13×10^5
	1.25	1.66×10^5	2.21×10^5	1.91×10^5	2.78×10^4
	3.0	1.82×10^5	8.74×10^5	4.63×10^5	3.64×10^5
96	0.05	8.57×10^5	1.10×10^6	9.59×10^5	1.23×10^5
	1.25	1.34×10^6	8.13×10^6	5.75×10^6	3.82×10^6
	3.0	1.09×10^6	2.66×10^6	1.62×10^6	9.02×10^5

2. 2 感染 WSSV 后氨氮质量浓度突变的结果

2.2.1 感染 WSSV 后氨氮质量浓度突变对凡纳滨对虾死亡情况的影响 感染 WSSV 后氨氮质量浓度突变对凡纳滨对虾死亡情况的影响见图 2。由图 2 可见,从 12 h 至实验结束,感染 WSSV 组累积死亡率明显高于未感染组 ($P < 0.05$)。24 h 时高浓度突变组死亡明显加快 ($P < 0.05$)。感染 WSSV 组中 48 h 至实验结束起始浓度为 0.05 mg·L⁻¹ 的死亡率明显低于两突变组 ($P < 0.05$)。高浓度组累积死亡率最大值为 48.9%,大于中浓度组的 38.9% 和起始浓度组的 30%。

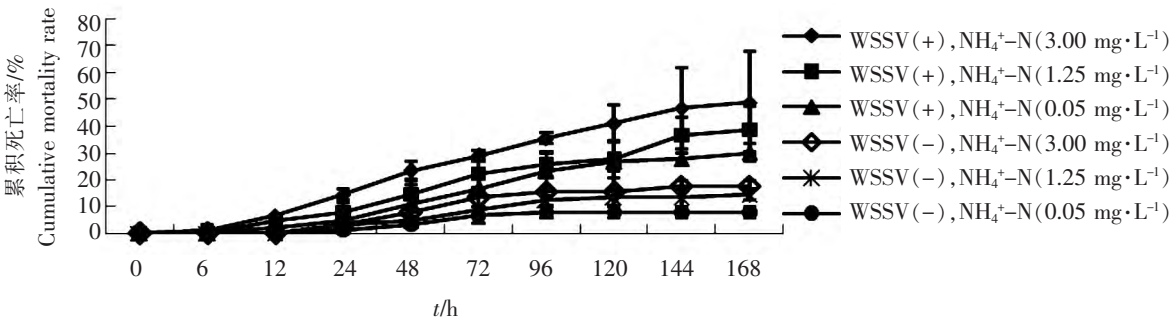


图 2 氨氮质量浓度突变对携带 WSSV 凡纳滨对虾死亡情况的影响

Fig. 2 Effects of acute changes of ammonia nitrogen on the mortality of *L. vannamei* infected with WSSV

2.2.2 感染 WSSV 后氨氮质量浓度突变对 WSSV 在凡纳滨对虾体内增殖的影响 感染 WSSV 后氨氮质

量浓度突变对虾携带白斑综合症病毒量的影响见表 2。由表 2 可见 ,氨氮质量浓度突变后 12 h 高浓度突变组病毒增殖明显加快 ,12 ~72 h 病毒含量都显著高于其他两组($P < 0.05$) ,中浓度组与起始浓度组在 24 h 和 48 h 差异显著($P < 0.05$) 96 h 各组病毒含量趋于稳定值($P > 0.05$) 。

表 2 氨氮质量浓度突变对携带 WSSV 对虾体内病毒量的影响
Tab.2 Effects of acute changes of ammonia nitrogen on white spot syndrome virus copy number
in *L. vannamei* infected with WSSV

时间/h Time	氨氮浓度/(mg · L ⁻¹) Ammonia nitrogen concentration	WSSV 携带量/(copy · g ⁻¹) WSSV carrying capacity			
		极小值 Minimum	极大值 Maximum	均值 Mean	标准差 Standard deviation
0	0.05	2.94×10^2	9.43×10^2	5.65×10^2	3.37×10^2
	1.25	1.22×10^3	3.38×10^3	1.96×10^3	1.23×10^3
	3.0	1.33×10^2	5.85×10^2	3.19×10^2	2.36×10^2
6	0.05	5.07×10^2	7.82×10^2	6.22×10^2	1.43×10^2
	1.25	1.61×10^2	9.17×10^2	5.64×10^2	3.80×10^2
	3.0	2.56×10^2	5.27×10^2	3.61×10^2	1.46×10^2
12	0.05	2.24×10^2	6.72×10^2	3.94×10^2	2.42×10^2
	1.25	8.72×10^2	1.69×10^3	1.22×10^3	4.22×10^2
	3.0	1.11×10^4	1.32×10^4	1.22×10^4	1.09×10^3
24	0.05	3.26×10^3	6.35×10^3	4.94×10^3	1.57×10^3
	1.25	1.35×10^4	3.12×10^4	2.22×10^4	8.86×10^3
	3.0	1.25×10^5	6.12×10^5	3.51×10^5	2.45×10^5
48	0.05	4.81×10^4	9.20×10^4	7.32×10^4	2.26×10^4
	1.25	1.12×10^5	2.03×10^5	1.56×10^5	4.54×10^4
	3.0	8.28×10^5	1.23×10^6	1.03×10^6	2.00×10^5
72	0.05	1.24×10^5	5.16×10^5	2.72×10^5	2.13×10^5
	1.25	7.40×10^5	1.16×10^6	9.58×10^5	2.11×10^5
	3.0	3.21×10^6	6.45×10^6	4.94×10^6	1.63×10^6
96	0.05	8.57×10^5	1.10×10^6	9.59×10^5	1.23×10^5
	1.25	8.21×10^5	1.02×10^6	9.20×10^5	9.77×10^4
	3.0	1.24×10^6	7.92×10^6	4.02×10^6	3.48×10^6

2.3 氨氮质量浓度渐变后感染 WSSV 的结果

2.3.1 不同氨氮质量浓度对凡纳滨对虾感染 WSSV 的影响 不同氨氮质量浓度对凡纳滨对虾感染 WSSV 的影响见图 3。由图 3 可见 ,感染 WSSV 实验组对虾累积死亡率缓慢提高 ,高浓度组对虾累积死亡率提升最快 ,整个实验中与其他组存在显著差异($P < 0.05$) ;至 72 h 时所有感染 WSSV 组才与未感染组存在显著差异 ,至实验后期感染 WSSV 组之间存在显著差异($P < 0.05$) ;高浓度感染组累积死亡率达最大值 45.6% ,高于中浓度的 30% 和起始浓度的 28.9% 。

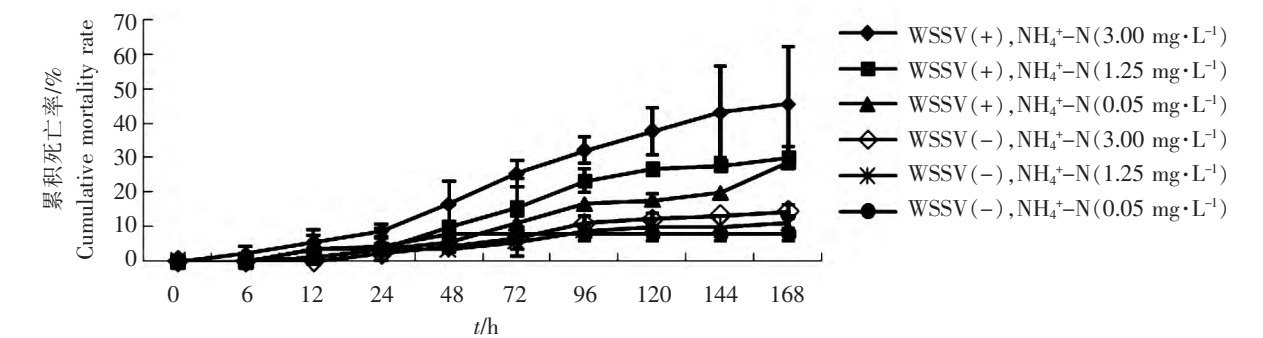


图 3 不同氨氮质量浓度对凡纳滨对虾感染 WSSV 的影响
Fig.3 Effects of different ammonia nitrogen concentration on *L. vannamei* infected with WSSV

2.3.2 不同氨氮质量浓度对 WSSV 在凡纳滨对虾体内增殖的影响 不同氨氮质量浓度对感染 WSSV 凡纳滨对虾体内病毒含量的影响见表 3。由表 3 可见,在整个实验过程中,起始浓度组与其他两渐变组在 12~48 h 存在显著差异 ($P < 0.05$) 72~96 h 各组之间病毒含量差异不明显 ($P > 0.05$) ,其中两渐变组病毒含量差异不明显 ($P > 0.05$) 。

表 3 不同氨氮质量浓度对凡纳滨对虾体内病毒含量的影响

Tab.3 Effects of different ammonia nitrogen concentration on white spot syndrome virus copy number in *L. vannamei*

时间/h Time	氨氮浓度/(mg·L ⁻¹) Ammonia nitrogen concentration	WSSV 携带量/(copy·g ⁻¹) WSSV carrying capacity			
		极小值 Minimum	极大值 Maximum	均值 Mean	标准差 Standard deviation
0	0.05	2.94×10^2	9.43×10^2	5.65×10^2	3.37×10^2
	1.25	2.30×10^2	3.72×10^3	1.78×10^3	1.78×10^3
	3.0	1.15×10^3	3.61×10^3	1.99×10^3	1.41×10^3
6	0.05	5.07×10^2	7.82×10^2	6.22×10^2	1.43×10^2
	1.25	2.90×10^1	8.08×10^1	5.85×10^1	2.66×10^1
	3.0	3.57×10^2	4.46×10^3	1.98×10^3	2.18×10^3
12	0.05	2.24×10^2	6.72×10^2	3.94×10^2	2.42×10^2
	1.25	1.25×10^1	6.70×10^1	3.80×10^1	2.74×10^1
	3.0	5.27×10^2	2.88×10^3	1.64×10^3	1.18×10^3
24	0.05	3.26×10^3	6.35×10^3	4.94×10^3	1.57×10^3
	1.25	3.69×10^3	9.96×10^3	6.17×10^3	3.34×10^3
	3.0	4.54×10^2	1.16×10^3	8.39×10^2	3.56×10^2
48	0.05	2.10×10^3	1.67×10^4	8.11×10^3	7.66×10^3
	1.25	1.07×10^4	5.02×10^4	3.42×10^4	2.08×10^4
	3.0	3.81×10^4	7.95×10^4	5.99×10^4	2.08×10^4
72	0.05	1.24×10^5	5.16×10^5	2.72×10^5	2.13×10^5
	1.25	1.27×10^5	3.13×10^5	2.04×10^5	9.69×10^4
	3.0	2.91×10^5	4.44×10^5	3.66×10^5	7.63×10^4
96	0.05	8.57×10^5	1.10×10^6	9.59×10^5	1.23×10^5
	1.25	2.58×10^6	6.73×10^6	4.48×10^6	2.10×10^6
	3.0	1.64×10^6	2.21×10^6	1.86×10^6	3.09×10^5

2.4 感染 WSSV 后氨氮质量浓度渐变的结果

2.4.1 氨氮质量浓度渐变对携带 WSSV 凡纳滨对虾累积死亡率的影响 氨氮质量浓度渐变对携带 WSSV 凡纳滨对虾累积死亡率的影响见图 4。由表 4 可见,感染 WSSV 组,在整个实验过程中,在 0~24 h 各组对虾累计死亡率差异不显著,且低于 6.7% ($P > 0.05$) ,高浓度感染组与起始浓度组在 48 h 至实验结束时存在显著差异 ($P < 0.05$) ;中浓度感染组与起始浓度组无显著差异 ($P > 0.05$) ;且高浓度浓度感染组累积死亡率达最大值 45.6% ,高于中浓度的 33.3% 和起始浓度的 25.6% 。

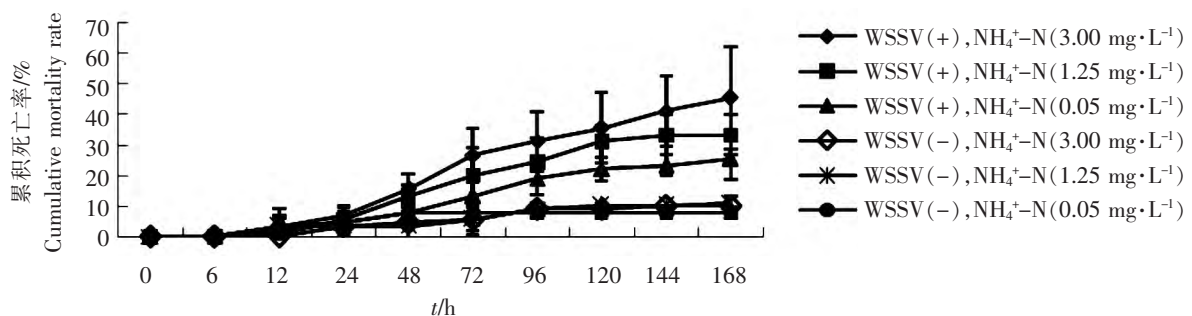


图 4 氨氮质量浓度渐变对凡纳滨对虾累积死亡率的影响

Fig.4 Effects of gradual changes of ammonia nitrogen on the mortality of *L. vannamei*

2.4.2 氨氮质量浓度渐变对凡纳滨对虾携带 WSSV 情况的影响 不同氨氮质量浓度胁迫下的病虾体内携带病毒量随时间推移逐渐增多(见表 4)。由表 4 可见,高浓度胁迫组与起始浓度组在 6、12、24、72、96 h 时的病毒含量差异显著;中浓度胁迫组与起始浓度组在 48 h 时差异显著($P < 0.05$)。从 6 h 开始到实验结束两渐变组病毒含量比起始浓度组都要高。

表 4 氨氮质量浓度渐变对凡纳滨对虾携带 WSSV 的影响
Tab.4 Effects of gradual changes of ammonia nitrogen on white spot syndrome virus copy number in *L. vannamei*

时间/h Time	氨氮质量浓度/(mg·L ⁻¹) Ammonia nitrogen concentration	WSSV 携带量/(copy·g ⁻¹) WSSV carrying capacity			
		极小值 Minimum	极大值 Maximum	均值 Mean	标准差 Standard deviation
0	0.05	2.94×10^2	9.43×10^2	5.65×10^2	3.37×10^2
	1.25	8.08×10^1	7.98×10^2	3.33×10^2	4.04×10^2
	3.0	4.38×10^2	9.03×10^2	6.83×10^2	2.34×10^2
6	0.05	5.07×10^2	7.82×10^2	6.22×10^2	1.43×10^2
	1.25	4.96×10^2	1.18×10^3	9.09×10^2	3.64×10^2
	3.0	1.02×10^3	2.06×10^3	1.43×10^3	5.53×10^2
12	0.05	2.24×10^2	6.72×10^2	3.94×10^2	2.42×10^2
	1.25	2.81×10^2	2.29×10^3	1.01×10^3	1.12×10^3
	3.0	1.51×10^3	4.31×10^3	3.12×10^3	1.44×10^3
24	0.05	2.46×10^3	5.15×10^3	4.12×10^3	1.45×10^3
	1.25	3.26×10^3	6.35×10^3	4.94×10^3	1.57×10^3
	3.0	2.07×10^4	5.29×10^4	3.48×10^4	1.65×10^4
48	0.05	2.20×10^4	7.95×10^4	4.65×10^4	2.96×10^4
	1.25	3.18×10^5	7.96×10^5	5.04×10^5	2.56×10^5
	3.0	1.98×10^5	4.03×10^5	2.75×10^5	1.12×10^5
72	0.05	1.24×10^5	5.16×10^5	2.72×10^5	2.13×10^5
	1.25	6.28×10^5	1.24×10^6	8.58×10^5	3.30×10^5
	3.0	1.27×10^6	3.02×10^6	1.94×10^6	9.48×10^5
96	0.05	8.57×10^5	1.10×10^6	9.59×10^5	1.23×10^5
	1.25	2.46×10^5	6.29×10^5	4.69×10^5	1.99×10^5
	3.0	4.12×10^6	9.41×10^6	6.55×10^6	2.67×10^6

3 讨 论

氨氮作为养殖水体中普遍存在的有毒物质之一,主要以 2 种形式存在: NH_3 (毒性较大)和 NH_4^+ ,两者之间的转化与水体的 pH 值、温度、盐度等密切相关,而且毒性较大的 NH_3 不带电荷,细胞膜电荷无法排斥,可以直接穿透细胞膜进入细胞产生毒害作用; pH 值和温度升高会引起氨增多,盐度升高会有下降^[14-17]。王方国等^[18]研究表明氨氮胁迫会使虾类抗病力下降,提高虾类对病原体的易感性。姜令绪等^[19]研究表明氨氮浓度改变会引起对虾体内相关免疫指标变化,随着氨氮浓度升高会引起对虾血细胞数量明显降低,导致酚氧化酶活性升高。

氨氮浓度突变组实验结果表明,实验后期氨氮浓度突变对健康对虾存活影响显著。感染 WSSV 组和未感染 WSSV 组,对虾累积死亡率都是随着氨氮胁迫浓度升高而增大。先氨氮突变后感染 WSSV 实验中,氨氮浓度突变后累积死亡率和病毒携带量从 24 h 开始氨氮突变组高于起始浓度组($P < 0.05$),这说明氨氮浓度突变加快对虾感染 WSSV 速度,也证实氨氮突变会提高对虾对病原体的易感性,并随氨氮突变浓度升高对虾对病原体易感性加强。李贵生等^[20]报道氨氮浓度升高会显著提高斑节对虾杆状病毒的感染度,且两者存在线性关系。氨氮浓度突变对携带 WSSV 对虾的影响结果中发现,起始浓度感染组明

显低于另外两感染组,至实验后期累积死亡率才明显高于未感染 WSSV 组。病毒增殖实验中发现 12 h 时两突变组出现第 1 个病毒增殖高峰,明显高于起始浓度感染组,这说明对于携带 WSSV 的对虾,不同氨氮浓度突变都给对虾体内 WSSV 增殖提供机会;随着胁迫时间延长,氨氮胁迫浓度越高对对虾体质损伤越严重,病毒快速扩增的机会越大。

在渐变实验中发现,感染 WSSV 组和未感染 WSSV 组中对虾累积死亡率均随着氨氮胁迫浓度升高而升高,与姚庆祯^[21]、孙国铭等^[22]的研究结果相似。氨氮质量浓度渐变后感染 WSSV 实验中高浓度组在 6 h 就出现死亡,可能原因是在渐变过程中,部分对虾体质已受到损伤,体质较弱,感染 WSSV 后出现应激反应,伴有死亡,至 48 h 后高浓度感染组的累积死亡率明显高于另外两个感染组。感染 WSSV 后氨氮浓度渐变实验中,在 0~24 h 由于氨氮浓度变化梯度不大各组累积死亡率差异不明显($P > 0.05$),但随着氨氮浓度的升高和胁迫时间的延长,48 h 后各感染组累积死亡率出现显著差异($P < 0.05$),这也说明氨氮浓度升高会诱导对虾疾病爆发。病毒检测结果发现高浓度感染组对虾体内病毒在前期增殖速度比另两组快,后期病毒含量趋于平稳。72 h 后病毒含量为 $2.04 \times 10^5 \sim 4.48 \times 10^6$ copies $\cdot$ g⁻¹,与孙成波等^[23]报道结果相似,这表明在氨氮胁迫下,病毒含量升高,伴随对虾体质损伤,最终死亡,因此,氨氮浓度变化可能引起 WSSV 从潜伏感染转为急性感染。不管氨氮浓度如何变化,当氨氮浓度高于一定值,且维持较长时间会诱发对虾氨中毒,降低健康对虾及感染 WSSV 对虾的抗病能力,提高对病原体的易感性,使 WSSV 从潜伏感染转为急性感染成为可能。因此,控制养殖环境中氨氮水平成为预防 WSS 爆发的关键措施之一。

参考文献:

- [1] TAPAY L M, NADALA JR E C B, LOH P C. A polymerase chain reaction protocol for the detection of various geographical isolates of white spot virus [J]. Journal of Virological Methods, 1999, 82(1): 39-43.
- [2] FLEGEL T, LIPOPO G. Current status of viral diseases in asian shrimp aquaculture [J]. Israeli Journal of Aquaculture-Bam-idgeh. 2009: 229-239.
- [3] 吴信忠. 中国海洋病害学主流研究的进展 [J]. 太平洋学报, 2005(10): 49-59.
- [4] 孙成波, 何建国, 黎子兰, 等. 凡纳滨对虾和斑节对虾对 WSSV 敏感性的比较 [J]. 湛江海洋大学学报, 2006, 26(3): 17-20.
- [5] GUNALAN B, SOUNDARAPANDIAN P, DINAKARAN G. The effect of temperature and pH on WSSV infection in cultured marine shrimp *Penaeus monodon* (fabricius) [J]. Middle East J. Sci. Res., 2010, 5(1): 28-33.
- [6] 于敏, 王顺昌, 卢韞. 中华绒螯蟹在不同 pH 下氨氮排泄和血淋巴含氮成分的变化 [J]. 水生生物学报, 2008, 32(1): 62-67.
- [7] 聂月美, 邵庆均. 氨氮对虾的免疫影响及其预防措施 [J]. 中国饲料, 2006(10): 28-31.
- [8] 黄鹤忠, 李义, 宋学宏, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 免疫功能的影响 [J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(3): 198-205.
- [9] 洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响 [J]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 412-418.
- [10] 徐丽美, 杨丰. 利用定量 PCR 方法研究对虾白斑杆状病毒感染与发病的关系 [J]. 高技术通讯, 2001, 11(12): 9-11.
- [11] SUN Y, LI F, XIANG J. Analysis on the dynamic changes of the amount of WSSV in chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* during infection [J]. Aquaculture, 2013, 376: 124-132.
- [12] YOU X X, SU Y Q, MAO Y, et al. Effect of high water temperature on mortality, immune response and viral replication of WSSV-infected *Marsupenaeus japonicus* juveniles and adults [J]. Aquaculture, 2010, 305(1): 133-137.
- [13] 程晓艳, 刘庆慧, 黄捷. 实时荧光定量 PCR 检测对虾白斑综合症病毒方法的建立 [J]. 安徽农业科学, 2010(26): 14265-14267.
- [14] 孙舰军, 丁美丽. 氨氮对中国对虾抗病力的影响 [J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 267-272.
- [15] 克行, 水产养殖. 虾蟹类增殖学 [M]. 北京: 中国农业出版社. 1997.
- [16] 胡贤德, 孙成波, 蔡鹤翔, 等. 不同盐度条件下氨氮对斑节对虾的毒性试验 [J]. 广西科学, 2009(2): 206-209.
- [17] ARMSTRONG D A, CHIPPENDALE D, KNIGHT A W, et al. Interaction of ionized and un-ionized ammonia on short-term survival and growth of prawn larvae, *Macrobrachium rosenbergi* [J]. The Biological Bulletin, 1978, 154(1): 15-31.
- [18] 王方国, 刘金灿. 水体环境因子与对虾疾病关系 [J]. 东海海洋, 1992, 10(4): 37-41.

- [19]姜令绪,潘鲁青,肖国强. 氨氮对凡纳对虾免疫指标的影响[J]. 中国水产科学, 2005, 11(6): 537–541.
- [20]李贵生,何建国. 斑节对虾杆状病毒感染度与水体理化因子关系模型的修订[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2001, 40(6): 67–71.
- [21]姚庆祯,徐桂荣. 亚硝酸盐和氨对凡纳对虾和日本对虾幼体的毒性作用[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(1): 21–26.
- [22]孙国铭,汤建华. 氨氮和亚硝酸氮对南美白对虾的毒性研究[J]. 水产养殖, 2002(1): 22–24.
- [23]孙成波,李婷,王平,等. 高位池养殖对虾携带白斑综合症病毒变化[J]. 海洋通报, 2009, 28(2): 116–120.

Effects of Ammonia Nitrogen Concentrations on *Litopenaeus vannamei* Infected with White Spot Syndrome Virus

XIANG Yun¹, WANG Gang¹, GONG Yong¹, CHEN Zhaoming¹, ZHANG Rui³, SUN Chengbo^{1,2}

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China; 2. Tropical Invertebrates Aquaculture Research Center of Guangdong Colleges and Universities, Zhanjiang 524025, China; 3. Education Example Center, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: Marine shrimp *Litopenaeus vannamei* inoculated with WSSV (white spot syndrome virus) and cultured in graduate and acute changes of ammonia nitrogen concentrations to observe WSSV proliferation in *L. vannamei*. The ammonia nitrogen in the acute changes from the initial concentration $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ to $1.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ produced a significant effect ($P < 0.05$) on the mortality of *L. vannamei* and the virus proliferation in *L. vannamei*. The shrimps treated with ammonia nitrogen at an acute change of concentrations of $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $1.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ followed by inoculation of WSSV showed respective cumulative mortality rates of 25.6%, 34.4% and 48.9%, respectively with the maximum virus contents of 9.59×10^5 , 5.75×10^6 and $1.62 \times 10^6 \text{ copy} \cdot \text{g}^{-1}$. However, the shrimps inoculated with WSSV prior to acute change of the ammonia nitrogen concentrations had the cumulative mortality rates of 30%, 38.9% and 48.9%, respectively, with the maximum virus contents of 9.59×10^5 , 9.58×10^5 and $4.94 \times 10^6 \text{ copy} \cdot \text{g}^{-1}$. Every group in the graduate change of ammonia nitrogen had a lower mortality of the shrimps at 24 h but started to show significant difference in mortality at 48 h ($P < 0.05$). The shrimps inoculated with WSSV after treated with graduate change of ammonia nitrogen concentrations of $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $1.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ showed the cumulative mortality rates of 28.9%, 30.0% and 45.6%, respectively with the largest virus contents being 9.59×10^5 , 4.48×10^6 and $1.86 \times 10^6 \text{ copy} \cdot \text{g}^{-1}$. The shrimps inoculated with WSSV before treated with the ammonia nitrogen at a graduate change of concentration displayed cumulative mortality rates of 25.6%, 33.3% and 45.6%, respectively, with the largest virus contents being 9.59×10^5 , 8.58×10^5 and $6.55 \times 10^6 \text{ copy} \cdot \text{g}^{-1}$. These results showed that the WSSV carrying shrimps are likely easy to change from latent to acute infection when the ammonia nitrogen concentration is changed more rapidly in culture of the shrimps. It is hence of paramount importance to control the ammonia nitrogen content in water at a low concentration level to prevent the outbreak of WSS.

Key words: ammonia nitrogen; *Litopenaeus vannamei*; white spot syndrome virus; real-time quantitative PCR; virus content