

文章编号: 1674-7054(2016)01-0001-09

哈维氏弧菌和白斑综合症病毒对墨吉明对虾仔虾的致病性

王 刚, 孙成波, 蔡传彬, 曹佩星

(广东海洋大学 水产学院/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)

摘 要: 研究了不同浓度哈维氏弧菌与白斑综合症病毒单独、合并浸泡感染, 以及不同温度和盐度条件下单独、合并浸泡感染对墨吉明对虾仔虾死亡情况和 WSSV 携带量的影响。结果表明: 高浓度哈维氏弧菌浸泡感染仔虾, 48 h 死亡率可达 100%, 高浓度 WSSV 浸泡感染仔虾, 96 h 死亡率可达 97%; 盐度突变可以降低弧菌与病毒浸泡感染对仔虾的致病性; 高温条件下(32 ℃) 弧菌对仔虾的致病性较强, 低温条件下(26 ℃) 病毒对仔虾的致病性较强; 盐度 26、水温 26 ℃ 条件下, 合并感染组死亡率较 WSSV 单独感染组低; 哈维氏弧菌感染可以抑制 WSSV 在对虾体内的复制。

关键词: 墨吉明对虾; 哈维氏弧菌; 白斑综合症病毒; 浸泡感染

中图分类号: S 945.4 **文献标志码:** A **DOI:** 10.15886/j.cnki.rdsxb.2016.01.001

随着对虾养殖业集约化、工厂化程度不断提高, 对虾病毒病、弧菌病成为对虾养殖业健康发展的主要制约因素^[1-3]。对虾白斑综合症病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV) 具有宿主范围广、传染性极强等特点, 是威胁对虾养殖最严重的病毒之一, 对虾感染后死亡率可达 90% ~ 100%^[4-5]。WSSV 可以在对虾体内潜伏感染而不爆发^[6], 当受到外界环境刺激时, 会引起对虾的免疫反应, 加快病毒扩增^[7-8]。WSSV 在不同的温度、盐度环境条件下对养殖对象产生不同程度的危害^[9-10], 同时, 病毒与弧菌的合并感染也给对虾养殖业带来了巨大的挑战^[11]。哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*) 是一种海洋发光弧菌, 部分有毒菌株对海产品种具有一定的致病性^[12]。据报道, 哈维氏弧菌可以引起澳大利亚、印度以及台湾等国家和地区对虾育苗场斑节对虾幼体大量死亡^[13], 同时, 哈维氏弧菌也可以引起墨吉明对虾幼体的大量死亡^[14]。笔者以墨吉明对虾(*Penaeus merguensis*) 为研究对象, 探讨不同温度、盐度条件下哈维氏弧菌和白斑综合症病毒单独和合并感染对墨吉明对虾的致病性, 以及不同环境条件对 WSSV 在墨吉明对虾体内增殖的影响, 旨在为墨吉明对虾病害防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 本实验在广东高校热带海产无脊椎动物养殖工程技术研究中心完成。健康墨吉明对虾取自广东海洋大学东海岛海洋生物研究基地, 体质量为(0.19 ± 0.02) g。实验前随机抽取 20 尾进行 WSSV 检测, 结果均为阴性。对虾取回后于温度为(26 ± 1) ℃, 盐度为(26 ± 1) 的自然海水中暂养 1 周。期间每天投喂对虾人工配合饲料 2 次、换水 1 次, 及时吸污。沙滤海水于实验前经次氯酸钠消毒并曝气 7 d, 经测氯试纸检测无余氯残留, 实验用水经 TCBS 平板检测无菌落生长。

WSSV 来源于本实验室, 保存于 -80 ℃ 的 WSSV 病毒粗提液, 经 PBS 缓冲液 10⁴ 倍稀释后, 人工肌肉

收稿日期: 2015-03-16

基金项目: 广东省重点科技计划项目(2013B020501004), 广东省扬帆计划高层次人才项目

作者简介: 王刚(1989-), 男, 广东海洋大学水产学院 2012 级硕士研究生。E-mail: wgang2015@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: sunchb468@gdou.edu

注射感染墨吉明对虾 48 h 后出现大量死亡,经 PCR 检测,结果为阳性。哈维氏弧菌由广东海洋大学水产品加工与安全重点实验室赠予。

1.2 实验方法

1.2.1 病毒液与菌悬液制备 取感染 WSSV 症状明显、体长为 (8.13 ± 0.82) cm 的墨吉明对虾,去除甲壳,按 $m_{\text{对虾}} : V_{\text{高盐PBS}} = 1 : 1$ 的比例加入高盐 PBS,冰浴匀浆, $6\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 低温离心 15 min 后微膜过滤,滤液为病毒粗提液。病毒粗提液经 PBS $10^2, 10^3, 10^4$ 倍稀释后用于各部分实验。

将哈维氏弧菌接种于营养肉汤液体培养基(盐度 10)中,置于恒温培养箱中($30\text{ }^{\circ}\text{C}, 120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)培养 16 h 后,分装于 50 mL 离心管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}, 4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,去上清,沉淀用 PBS 重悬,既得感染对虾菌悬液。同时进行涂平板计数。

1.2.2 实验设计

1.2.2.1 不同浓度哈维氏弧菌与 WSSV 对墨吉明对虾的致病性 实验设计弧菌单独感染组($V_1, 3.0 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$; $V_2, 3.0 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$; $V_3, 3.0 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)、WSSV 病毒单独感染组($W_1, 2.2 \times 10^5 \text{ copies}$; $W_2, 2.2 \times 10^4 \text{ copies}$; $W_3, 2.2 \times 10^3 \text{ copies}$)、弧菌病毒合并感染组($C_1(W_2 + V_1)$; $C_2(W_2 + V_2)$; $C_3(W_2 + V_3)$)和空白对照组 CK,重复 3 次。弧菌与病毒按照实验养殖水体计算用量加入,使养殖水体最终浓度达到实验设定的标准。实验于 20 L 小桶内进行,海水盐度(24 ± 1),温度(26 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,每个小桶最终水体为 4 L(计数组),仔虾 10 尾,或最终水体 15 L(取样组),仔虾 40 尾。仔虾于实验前禁食 24 h,实验开始加入菌悬液与病毒粗提液后立即投喂人工配合饲料。实验开始 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 h 取样和计数。实验开始 12 h 后换水,每次换水 50 %。

1.2.2.2 不同盐度和温度条件下哈维氏弧菌与 WSSV 对墨吉明对虾的致病性 实验分别设计 3 个(14, 26, 32)盐度条件下哈维氏弧菌单独感染组($2.1 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)、WSSV 单独感染组($2.2 \times 10^4 \text{ copies}$)、弧菌病毒合并感染组($2.2 \times 10^4 \text{ copies WSSV} + 2.1 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 哈维氏弧菌菌悬液)和空白对照组 CK,重复 3 次。感染、取样和计数方法与浓度感染实验相同。盐度实验水温 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$,实验从 26 盐度条件下突变至相应的实验盐度。温度实验养殖水体盐度 26,仔虾在相应的温度下暂养 5 d 后开始实验。

1.2.3 测定方法 取仔虾肌肉 0.05 g,加入 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 45 μL 冰浴混匀,沸水水浴 10 min,加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris 溶液 5 μL , $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清作为 WSSV 荧光定量 PCR 模板。

1.3 数据分析 数据用 SPSS 21 软件处理,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 Duncan 检验法进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度哈维氏弧菌与 WSSV 对墨吉明对虾的致病性

2.1.1 不同浓度哈维氏弧菌与 WSSV 对墨吉明对虾死亡情况的影响 从表 1 可以看出,各处理组墨吉明对虾死亡率均随着浸泡浓度的增加而增加。高浓度哈维氏弧菌 V_1 浸泡感染仔虾 48 h 死亡率达 100 %。比较各处理组 96 h 死亡率,合并感染组 C_1, C_3 累计死亡率分别高于病毒单独感染组 W_1, W_3 ,而 WSSV 单独感染组 W_2 的 96 h 累计死亡率高于 C_2 处理组。

2.1.2 不同浓度哈维氏弧菌和 WSSV 对墨吉明对虾 WSSV 携带量的影响 从表 2 可以看出,高浓度 WSSV 浸泡感染仔虾病毒复制速度较快,72 h 时, W_1 处理组仔虾 WSSV 携带量明显高于 W_3 感染组($P < 0.05$)。WSSV 单独感染组仔虾病毒携带量在 96 h 时均达到最大值(10^6 copies),明显高于合并感染组(10^5 copies)($P < 0.05$)。在 48 ~ 96 h 期间, WSSV 单独感染组 W_2 仔虾病毒携带量都明显高于合并感染组 C_2 ,且差异显著($P < 0.05$)。

2.2 不同盐度条件下哈维氏弧菌与 WSSV 对墨吉明对虾的致病性

2.2.1 不同盐度条件下哈维氏弧菌与 WSSV 对墨吉明对虾死亡情况的影响 由表 3 可知,盐度突变后浸泡感染哈维氏弧菌和 WSSV,各感染组在盐度 26 条件(未突变组)下死亡率最高,分别为 48 %, 69 %, 55 %;

向高盐度(32) 突变组 96 h 死亡率明显高于低盐度组(14) ,且差异显著($P < 0.05$) 。各盐度条件下合并感染组 96 h 死亡率都高于哈维氏弧菌单独感染组; 14,26 盐度条件下,合并感染组 96 h 死亡率都低于 WSSV 单独感染组,差异不显著($P > 0.05$) 。

表 1 不同浓度哈维氏弧菌与 WSSV 对墨吉明对虾死亡情况的影响

Tab. 1 Effects of immersion infection of <i>V. harveyi</i> and WSSV on the mortality of <i>P. merguensis</i>						
处理组 Group	WSSV / Copies	<i>V. harveyi</i> / (cfu • mL ⁻¹)	累计死亡率 Mortality /%			
			24 h	48 h	72 h	96 h
CK	—	0	0	0	0	0
	—	3.0×10^8	13	100	100	100
<i>V. harveyi</i>	—	3.0×10^7	36	41	44	47
	—	3.0×10^6	9	15	15	20
WSSV	2.2×10^5	0	19	37	75	97
	2.2×10^4	0	14	38	49	91
	2.2×10^3	0	18	21	26	62
合并感染 Co-infection	2.2×10^4	3.0×10^8	97	100	100	100
	2.2×10^4	3.0×10^7	14	34	64	89
	2.2×10^4	3.0×10^6	40	50	60	70

表 2 哈维氏弧菌对墨吉明对虾 WSSV 携带量的影响

Tab. 2 Effects of <i>P. merguensis</i> infection on the amount of WSSV in the infected <i>V. harveyi</i> copies						
时间 Time /h	WSSV 单独感染 WSSV single infection					
	$W_1 (2.2 \times 10^5 \text{ copies})$		$W_2 (2.2 \times 10^4 \text{ copies})$		$W_3 (2.2 \times 10^3 \text{ copies})$	
	均值 Mean	标准差 Standard D	均值 Mean	标准差 Standard D	均值 Mean	标准差 Standard D
6	3.92×10^4	7.24×10^3	6.02×10^3	1.56×10^3	2.91×10^3	5.99×10^2
12	1.40×10^4	1.88×10^3	4.00×10^2	4.17×10^2	2.77×10^2	2.63×10^2
24	5.94×10^4	1.93×10^4	4.02×10^3	6.20×10^2	3.89×10^3	1.44×10^2
48	5.23×10^4	3.24×10^3	2.82×10^4	5.28×10^3	5.76×10^3	7.00×10^2
72	4.09×10^6	8.06×10^5	1.40×10^6	6.44×10^5	6.77×10^4	4.81×10^3
96	3.22×10^6	4.93×10^5	1.86×10^6	5.49×10^5	1.84×10^6	4.93×10^5
时间 Time /h	合并感染 Co-infection					
	$C_1 (W_2 + V_1)$		$C_2 (W_2 + V_2)$		$C_3 (W_2 + V_3)$	
	均值 Mean	标准差 Standard D	均值 Mean	标准差 Standard D	均值 Mean	标准差 Standard D
6	6.83×10^3	2.81×10^3	2.63×10^2	2.29×10^1	8.12×10^2	1.59×10^2
12	2.18×10^3	1.11×10^3	5.99×10^2	2.21×10^2	2.41×10^2	1.20×10^2
24	3.35×10^5	2.05×10^5	5.83×10^3	5.39×10^2	4.51×10^6	4.07×10^6
48	—	—	4.02×10^3	8.80×10^2	7.39×10^4	1.15×10^4
72	—	—	5.73×10^2	4.57×10^1	4.73×10^4	1.94×10^3
96	—	—	6.26×10^3	2.25×10^3	4.18×10^5	3.55×10^5

表 3 不同盐度条件下哈维氏弧菌与 WSSV 对墨吉明对虾死亡情况的影响

Tab. 3 Effects of immersion infection of *P. merguensis* and WSSV on the mortality of *V. harveyi* under different levels of salinity

处理组 Group	盐度 Salinity	累计死亡率 Mortality / %			
		24 h	48 h	72 h	96 h
CK	14	0	0	0	0
	26	0	0	0	0
	32	10	10	10	10
<i>V. harveyi</i>	14	0	3	9	9
	26	19	40	46	48
	32	19	42	42	45
WSSV	14	12	12	21	21
	26	10	22	40	69
	32	19	23	23	23
合并感染 Co-infection	14	10	10	10	10
	26	13	24	47	55
	32	6	25	50	50

2.2.2 不同盐度条件下哈维氏弧菌与 WSSV 对墨吉明对虾 WSSV 携带量的影响 从表 4 可以看出,各盐度条件下 WSSV 单独浸泡感染病毒最高携带量分别为 $10^7, 10^8, 10^6$ copies; 合并感染组病毒最高携带量分别为 $10^6, 10^6, 10^5$ copies; 盐度 26 条件(未突变)下病毒单独浸泡与合并感染组病毒最高携带量都分别高于盐度 14, 32 条件下的单独与合并感染处理组。实验 96 h, 各盐度条件下 WSSV 单独感染组仔虾病毒携带量都高于各盐度合并感染组, 盐度 32 条件下两者差异显著($P < 0.05$)。

表 4 不同盐度条件下哈维氏弧菌对墨吉明对虾 WSSV 携带量的影响

Tab. 4 Effects of immersion infection of *P. merguensis* on the amount of WSSV in the infected *V. harveyi* under different levels of salinity copies

时间 Time / h	WSSV 感染 WSSV single infection					
	盐度 14		盐度 26		盐度 32	
	均值 Mean	标准差 Standard D	均值 Mean	标准差 Standard D	均值 Mean	标准差 Standard D
6	5.63×10^2	8.66×10^1	7.49×10^3	9.65×10^2	2.47×10^3	8.43×10^2
12	5.89×10^2	2.33×10^2	8.03×10^2	1.81×10^2	5.58×10^2	1.96×10^2
24	5.86×10^3	2.47×10^3	4.42×10^3	9.10×10^2	1.66×10^3	4.32×10^2
48	2.94×10^6	2.14×10^6	1.38×10^6	7.27×10^5	3.16×10^4	1.13×10^4
72	1.08×10^7	7.73×10^6	3.44×10^5	2.40×10^5	9.87×10^6	1.41×10^7
96	4.96×10^6	5.00×10^6	1.80×10^8	2.17×10^8	1.11×10^5	2.75×10^4
时间 Time / h	合并感染 Co-infection					
	盐度 14		盐度 26		盐度 32	
	均值 Mean	标准差 Standard D	均值 Mean	标准差 Standard D	均值 Mean	标准差 Standard D
6	3.02×10^2	9.09×10^1	4.61×10^3	3.00×10^3	4.15×10^3	2.46×10^3
12	2.67×10^1	1.21×10^1	1.23×10^2	1.24×10^2	5.31×10^2	1.58×10^2
24	8.53×10^3	1.95×10^3	4.59×10^5	5.27×10^4	5.37×10^2	6.14×10^1
48	3.53×10^3	1.36×10^3	4.28×10^4	1.15×10^4	4.10×10^5	3.92×10^4
72	5.47×10^3	2.33×10^3	1.67×10^6	4.18×10^5	7.59×10^4	2.10×10^4
96	1.23×10^6	3.32×10^5	4.46×10^4	1.16×10^4	2.38×10^3	2.06×10^3

2.3 不同温度条件下哈维氏弧菌与 WSSV 对墨吉明对虾的致病性

2.3.1 不同温度条件下哈维氏弧菌与 WSSV 对墨吉明对虾死亡情况的影响 从表 5 可以看出,高温(32 ℃) 条件下,哈维氏弧菌浸泡感染墨吉明对虾仔虾 96 h 累计死亡率显著高于在低温条件(26 ℃) 下的累计死亡率($P < 0.05$); 高温条件下,WSSV 感染组累计死亡率显著低于低温处理组($P < 0.05$); 在高温条件下,合并感染组对仔虾的致死率更高,与低温处理组差异不显著($P > 0.05$)。32 ℃条件下,合并感染组较 WSSV 单独感染组致死率高; 而 26 ℃条件下,WSSV 单独感染组 96 h 累计死亡率较合并感染组高($P < 0.05$)。

表 5 不同温度条件下哈维氏弧菌与 WSSV 对墨吉明对虾死亡情况的影响

Tab.5 Effects of immersion infection of *P. merguiensis* and WSSV on the mortality of *V. harveyi* in different temperature

处理组 Group	盐度 Salinity	累计死亡率 Mortality /%			
		24 h	48 h	72 h	96 h
CK	32	0	0	0	0
	26	0	0	0	0
<i>V. harveyi</i>	32	18	35	62	84
	26	26	58	58	58
WSSV	32	18	21	30	39
	26	27	47	57	67
合并感染 Co-infection	32	22	31	47	50
	26	25	42	45	48

2.3.2 不同温度条件下哈维氏弧菌与 WSSV 对墨吉明对虾 WSSV 携带量的影响 从表 6 可知,实验开始 12 h 至实验结束,26 ℃条件下 WSSV 单独感染组仔虾病毒携带量总是高于 32 ℃条件下的病毒携带量,并在实验 24,48,72 h 差异显著($P < 0.05$)。实验整个过程中,合并感染组在 26 ℃条件下病毒携带量始终

表 6 不同温度条件下哈维氏弧菌对墨吉明对虾 WSSV 携带量的影响

Tab.6 Effects of immersion infection of *P. merguiensis* on the amount of virus WSSV in the infected *V. harveyi* under different temperatures copies

时间 Time /h	WSSV 单独感染 WSSV single infection			
	32 ℃		26 ℃	
	均值 Mean	标准差 Standard D	均值 Mean	标准差 Standard D
6	7.96×10^2	2.85×10^2	6.32×10^2	1.23×10^2
12	3.84×10^2	2.34×10^2	5.47×10^2	7.45×10^1
24	1.67×10^3	5.98×10^2	4.01×10^3	1.02×10^3
48	4.41×10^3	6.56×10^2	2.67×10^4	1.59×10^3
72	5.80×10^4	1.31×10^4	1.41×10^5	3.30×10^4
96	2.18×10^3	9.65×10^2	1.12×10^7	9.47×10^6
时间 Time /h	合并感染 Co-infection			
	32 ℃		26 ℃	
	均值 Mean	标准差 Standard D	均值 Mean	标准差 Standard D
6	4.75×10^2	2.69×10^2	7.31×10^2	1.08×10^2
12	6.15×10^1	2.89×10^1	2.48×10^2	1.01×10^2
24	4.13×10^3	4.13×10^3	2.29×10^4	1.07×10^4
48	3.68×10^2	2.73×10^2	1.44×10^3	7.01×10^1
72	2.11×10^3	7.00×10^1	1.37×10^4	5.56×10^3
96	1.78×10^4	3.57×10^3	5.44×10^6	3.52×10^6

高于 32 ℃ 处理组,并于实验开始后 12,24,48 和 72 h 差异显著 ($P < 0.05$)。实验 48,72 和 96 h,26 ℃ 条件下 WSSV 单独感染组病毒携带量总是高于合并感染组,48,72 h 时差异显著 ($P < 0.05$)。各温度条件下各处理组病毒最高携带量分别为 10^4 , 10^7 , 10^4 , 10^6 copies。

3 讨 论

3.1 不同浓度哈维氏弧菌与 WSSV 对墨吉明对虾的致病性 哈维氏弧菌是威胁对虾养殖的主要弧菌之一。发病幼虾虾体和附肢出现红斑,并伴有发光现象,组织病理学检查可以发现肝胰腺中存在大量哈维氏弧菌^[3]。哈维氏弧菌主要通过分泌胞外蛋白酶、溶血素和磷脂酶对甲壳动物产生毒力作用^[4]。已有研究表明, 10^6 cell · mL⁻¹ 副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 浸泡感染凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 72 h 死亡率可达 100 %^[17]; 8.0×10^3 cfu · g⁻¹ 哈维氏弧菌注射感染凡纳滨对虾 24 h 死亡率可达 100 %^[18],随着感染浓度升高死亡速度加快,这与笔者的研究结果一致。

1993 年中国台湾地区凡纳滨对虾养殖首先爆发了白斑综合症,随后 WSSV 遍及亚洲各国^[19],WSSV 给对虾养殖业带来了巨大的经济损失,但目前仍然没有有效的防治办法^[20]。WSSV 可以与传染性皮下及造血组织坏死病毒、肝胰腺腺小病毒等多种病毒进行合并感染^[21-22],通过抑制酚氧化酶活力、降低血细胞数目,给机体带来严重损伤^[23]。本研究中,合并感染组 C₂ 96 h 累计死亡率低于 WSSV 单独感染组 W₂,这与 Phuoc 等^[24]的研究结果相似。高浓度弧菌与 WSSV 合并感染致死速度明显快于 WSSV 单独感染组,但与高浓度哈维氏弧菌感染组无显著差异,可能由于高浓度条件下弧菌毒性起了主要作用。原位杂交、斑点杂交和 PCR 技术等已经用于 WSSV 检测^[25-26],但是这些技术方法都不能准确定量 WSSV 的携带量,实时荧光定量 PCR 技术克服了上述技术的不足,已经被用于定量 WSSV 的拷贝数^[27]。笔者利用实时荧光定量 PCR 技术定量墨吉明对虾仔虾 WSSV 携带量,实验结果发现,仔虾病毒最大携带量为 10^6 copies。WSSV 感染组仔虾死亡主要集中在 72 ~ 96 h,此时仔虾病毒携带量达到 10^6 copies,这与孙成波等^[8]的 10^5 copies 的实验结果略有不同,可能是研究对象不同导致。 10^6 copies 可能是墨吉明对虾仔虾 WSSV 爆发的临界值。

3.2 不同盐度条件下哈维氏弧菌与 WSSV 对墨吉明对虾的致病性 盐度是水产动物生存的重要环境因子,盐度波动可以引起机体一系列的应激反应,破坏生理功能最终影响其生长和存活^[28]。急性盐度变化会影响对虾摄食^[29]和免疫防御机能^[30-32]。本研究中,各处理组仔虾均在盐度 26 条件下出现最高死亡率,向低盐度突变组累计死亡率均低于高盐度突变组,这与 Alavandi 等^[33]研究结果有所不同。笔者认为,这与浸泡感染主要依赖仔虾摄食病原有关,突变条件下仔虾由于应激反应摄食率降低^[29],从而导致实际感染剂量与未突变组(盐度 26)有所差异。本研究中,WSSV 单独感染未突变组最高病毒携带量(10^8 copies)都高于盐度突变组。仔虾在盐度 26 条件下出现最高死亡率,笔者认为,这与盐度突变后可能引起仔虾进食率下降有关。整个实验过程中,各盐度条件下 WSSV 单独感染组仔虾病毒携带量都高于各盐度合并感染组,可以看出,合并感染条件下 WSSV 在对虾体内复制受到抑制,其机理有待进一步研究。

3.3 不同温度条件下哈维氏弧菌与 WSSV 对墨吉明对虾的致病性 墨吉明对虾仔虾最适生长温度为 24 ~ 33 ℃^[34],环境温度不仅影响其新陈代谢、耗氧率、摄食率和生长^[35-37],同时也影响其免疫功能,增加患病风险^[38]。22 ~ 30 ℃ 条件下,WSSV 增殖速度较快^[39],高温条件可以降低携带 WSSV 对虾死亡率,延缓 WSSV 爆发^[40-41]。另外,温度也可以诱导弧菌毒性^[42],提高致病能力^[42-44]。本实验中,温度升高哈维氏弧菌单独浸泡感染组仔虾死亡率明显升高,这与 Alavandi 等^[33]的研究结果一致。32 ℃ 条件下,WSSV 单独感染组仔虾死亡率明显低于 26 ℃ 处理组,与 Vidal 等^[45]高温(32 ~ 33 ℃)可以减少感染 WSSV 凡纳滨仔虾的死亡率一致。You 等^[46]认为,感染 WSSV 的对虾在高温条件(31 ℃)下,血细胞数目和酚氧化酶活力都明显高于低温处理组(27 ℃),这为进一步抑制 WSSV 在体内扩增起了重要作用。高温(32 ℃)条件下,合并感染组仔虾死亡率高于 WSSV 单独感染组,但差异不显著;比较 2 个处理组仔虾 WSSV 携带量发现,单独感染组与合并感染组 WSSV 最高携带量均为 10^4 copies。比较各时间点 WSSV 携带量,单独感染组总是高于合并感染组,且 WSSV 增殖速度明显较快。26 ℃ 条件下,WSSV 单独感染组仔虾累计死亡率明显高于合并感染组,且 WSSV 增殖速度明显快于合并感染组,WSSV 最大携带量达 10^7 copies,明显高

于合并感染组 10^6 copies。病毒感染细胞后,需要利用细胞合成核酸和蛋白质,完成自身大分子的合成^[47]。合并感染仔虾后,可能由于哈维氏弧菌的毒性影响仔虾活力,减缓细胞新陈代谢,不能够及时为 WSSV 复制提供所需要的能量和材料,从而影响 WSSV 增殖速度。

本研究结果表明,哈维氏弧菌与 WSSV 浸泡感染会给墨吉明对虾仔虾带来严重伤害;盐度突变可以降低弧菌与病毒浸泡感染对仔虾的致病性;高温条件弧菌对仔虾的致病性较强,低温条件下病毒对仔虾的致病性较强;盐度 26、温度 26 °C 条件下,哈维氏弧菌的感染可以抑制 WSSV 在对虾体内的复制。

参考文献:

- [1] Karunasagar I, Ababouch L. Shrimp Viral Diseases, Import Risk Assessment and International Trade [J]. Indian Journal of Virology, 2012, 23(2): 141–148.
- [2] Moss S M, Moss D R, Arce S M, et al. The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture [J]. Journal of invertebrate pathology, 2012, 110(2): 247–250.
- [3] Stentiford G D, Neil D M, Peeler E J, et al. Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors [J]. Journal of invertebrate pathology, 2012, 110(2): 141–157.
- [4] Flegel T W, Lightner D V, Lo C F, et al. Shrimp disease control: past, present and future [J]. Diseases in Asian Aquaculture, 2008(6): 355–378.
- [5] Ramos-carreño S, Valencia-y-Núñez 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.
- [6] 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.
- [7] 向赞, 王刚, 龚永, 等. 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 [J]. 热带生物学报, 2014, 5(3): 220–227.
- [8] Penaranda M M D, Purcell M K, Kurath G. Differential virulence mechanisms of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) include host entry and virus replication kinetics [J]. Journal of General Virology, 2009, 90(9): 2172–2182.
- [9] Du H, Dai W, Han X, et al. Effect of low water temperature on viral replication of white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* [J]. Aquaculture, 2008, 277(3): 149–151.
- [10] Gao H, Kong J, Li Z, et al. Quantitative analysis of temperature, salinity and pH on WSSV proliferation in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* by real-time PCR [J]. Aquaculture, 2011, 312(1): 26–31.
- [11] Jang I K, Qiao G, Kim S K. Effect of multiple infections with white spot syndrome virus and *Vibrio anguillarum* on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (L.): mortality and viral replication [J]. Journal of fish diseases, 2014, 37(10): 911–920.
- [12] Soonthomchai W, Rungrassamee W, Karoonuthaisiri N, et al. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(1): 19–28.
- [13] 张晓华. 中国对虾育苗池水中哈维氏弧菌的检测 [J]. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 1998, 28(1): 70–74.
- [14] Tansutapanit D, Ruangpan L. Third National Seminar on Marine Science, Bangkok, 1986 [C]. Bangkok: Burapha University Press, 1987.
- [15] Diggles B K, Moss G A, Carson J, et al. Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi* [J]. Dis. Aquat. Org, 2000, 43: 127–137.
- [16] Liuxy P C, Lee K K, Chen S N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon* [J]. Letters in Applied Microbiology, 1996, 22(6): 413–416.
- [17] Joshi J, Srisala J, Truong V H, et al. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) [J]. Aquaculture, 2014, 428: 297–302.
- [18] Soto-rodriguez S A, Gomez-gil B, Lozano R, et al. Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “Bright-red” Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of invertebrate pathology, 2012, 109(3): 307–317.
- [19] Chou H Y, Huang C Y, Wang C H, et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1995, 23: 156–173.
- [20] Cock J, Gitterle T, Salazar M, et al. Breeding for disease resistance of Penaeid shrimps [J]. Aquaculture, 2009, 286(1):

- 1 – 11.
- [21] Flegel T W, Nielsen L, Thamavit V, et al. Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest [J]. *Aquaculture*, 2004, 240(1): 55 – 68.
- [22] Umesha K R, Dass B K M, Manja N B, et al. High prevalence of dual and triple viral infections in black tiger shrimp ponds in India [J]. *Aquaculture*, 2006, 258(1): 91 – 96.
- [23] Yeh S P, Chen Y N, Hsieh S L, et al. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2009, 26(4): 582 – 588.
- [24] Phuoc L H, Corteel M, Thanh N C, et al. Effect of dose and challenge routes of *Vibrio spp.* on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 2009, 290(1): 61 – 68.
- [25] Chang P S, Lo C F, Wang Y C, et al. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization [J]. *Diseases of aquatic organisms*, 1996, 27(2): 131 – 139.
- [26] Shekhar M S, Azad I S, Ravichandran P. Comparison of dot blot and PCR diagnostic techniques for detection of white spot syndrome virus in different tissues of *Penaeus monodon* [J]. *Aquaculture*, 2006, 261(4): 1122 – 1127.
- [27] Jang I K, Kim J S, Kim B R, et al. Comparison of white spot syndrome virus quantification of fleshy shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in outdoor ponds between different growing seasons by Taq Man real - time polymerase chain reaction [J]. *Aquaculture Research*, 2011, 42(12): 1869 – 1877.
- [28] Young B A, Walker B, Dixon A E, et al. Physiological adaptation to the environment [J]. *Journal of animal science*, 1989, 67(9): 2426 – 2432.
- [29] Silva E, Calazans N, Soares M, et al. Effect of salinity on survival, growth, food consumption and haemolymph osmolality of the pink shrimp *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante, 1967) [J]. *Aquaculture*, 2010, 306(1): 352 – 356.
- [30] Cheng W, Juang F M, Chen J C. The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2004, 16(3): 295 – 306.
- [31] Prayitno S B, Latchford J W. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity [J]. *Aquaculture*, 1995, 132(1): 105 – 112.
- [32] Wang L U, Chen J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels [J]. *Fish & shellfish immunology*, 2005, 18(4): 269 – 278.
- [33] Alavandi S V, Manoranjita V, Vijayan K K, et al. Phenotypic and molecular typing of *Vibrio harveyi* isolates and their pathogenicity to tiger shrimp larvae [J]. *Letters in applied microbiology*, 2006, 43(5): 566 – 570.
- [34] 王克行. 虾蟹类增养殖学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 204 – 205.
- [35] Chen J C, Kou T T. Effects of temperature on oxygen consumption and nitrogenous excretion of juvenile *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Aquaculture*, 1996, 145: 295 – 303.
- [36] Wyban J, Walsh W A, Godin D M. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) [J]. *Aquaculture*, 1995, 138(1): 267 – 279.
- [37] Hewitt D R, Duncan P F. Effect of high water temperature on the survival, moulting and food consumption of *Penaeus* (*Mar-supenaeus*) *japonicus* (Bate, 1888) [J]. *Aquaculture Research*, 2001, 32(4): 305 – 313.
- [38] Cheng W, Wang L U, Chen J C. Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus* [J]. *Aquaculture*, 2005, 250(3): 592 – 601.
- [39] Moser J R, Álvarez D A G, Cano F M, et al. Water temperature influences viral load and detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* and wild crustaceans [J]. *Aquaculture*, 2012, 326: 9 – 14.
- [40] Rahman M M, Corteel M, Wille M, et al. The effect of raising water temperature to 33 °C in *Penaeus vannamei* juveniles at different stages of infection with white spot syndrome virus (WSSV) [J]. *Aquaculture*, 2007, 272(1): 240 – 245.
- [41] Du H H, Li W F, Xu Z R, et al. Effect of hyperthermia on the replication of white spot syndrome virus (WSSV) in *Procambarus clarkii* [J]. *Diseases of aquatic organisms*, 2006, 71(2): 175.
- [42] Hurme R, Rhen M. Temperature sensing in bacterial gene regulation – what it all boils down to [J]. *Molecular microbiology*, 1998, 30(1): 1 – 6.
- [43] Elgaml A, Higaki K, Miyoshi S. Effects of temperature, growth phase and luxO-disruption on regulation systems of toxin production in *Vibrio vulnificus* strain L-180, a human clinical isolate [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(2): 681 – 691.

- [44] Kimes N E, Grim C J, Johnson W R, et al. Temperature regulation of virulence factors in the pathogen *Vibrio coralliilyticus* [J]. The ISME journal, 2011, 6(4): 835 – 846.
- [45] Vidal O M, Granja C B, Aranguren F, et al. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus [J]. Journal of the world aquaculture society, 2001, 32(4): 364 – 372.
- [46] You X, Su Y, 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.
- [47] 谢天恩, 胡志红. 普通病毒学 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 73 – 157.

The Pathogenicity of *Vibrio Harveyi* and White Spot Syndrome Virus to *Penaeus Merguiensis* Larva

WANG Gang¹, SUN Chengbo^{1,2}, CAI Chuanbin¹, CAO Peixing¹

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

Abstract: *Penaeus merguiensis* larva were immersion infected with *Vibrio harveyi* and WSSV, both single or combined, at different concentrations under different levels of salinity or different temperature to study its mortality and its load of WSSV. The *P. merguiensis* larva were found to have 100% mortality after immersion infected with the highest concentration of the *V. harveyi* at 48h, 97% mortality after injected with the highest concentration of the WSSV at 96h. The acute changes of salinity decreased the pathogenicity of *V. harveyi* and WSSV to shrimp larva. The *P. merguiensis* larva was more vulnerable to infection of *V. harveyi* than WSSV under 32 °C, and the WSSV resulted in more severe damage to shrimp larva at 26 °C. Combined immersion infection group resulted in less mortality than the WSSV single immersion infection group at the salinity level of 26 and 26 °C, which indicated that *V. harveyi* might inhibit the proliferation of the WSSV in the shrimps.

Keywords: *Penaeus merguiensis*; White Spot Syndrome Virus; *Vibrio harveyi*; immersion infection