|  |  |
| --- | --- |
| 分类号：S968.22 | 密 级 ：公开 |
| U D C：639.5 | 学 号 ：2111101128 |

广 东 海 洋 大 学

硕 士 学 位 论 文

环境因子和弧菌对白斑综合症病毒

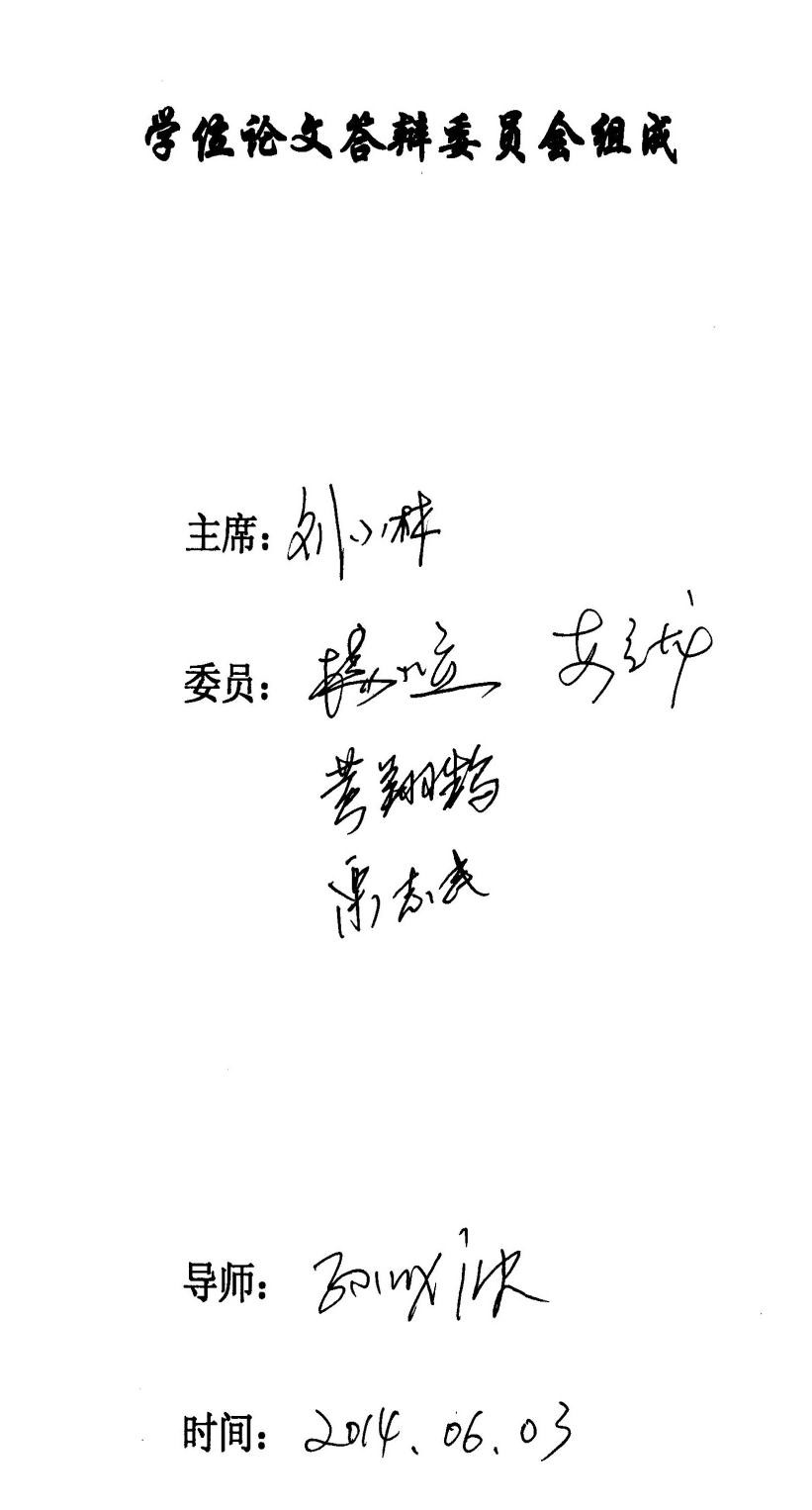
（WSSV）在凡纳滨对虾体内增殖的影响

向赟

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 指 导 教 师  申 请 学 位 类 别专 业 名 称研 究 方 向  培 养 单 位 | ：  ：  ：  ：  ： | 孙成波 教授  农学硕士 水产养殖 水产经济动物生物学及种苗工程  水产学院 |

中国·湛江

2014 年 6 月



**广 东 海 洋 大 学学位论文原创性声明**

本人郑重声明：所呈交的论文是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的研究成果。除了文中特别加以标注引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写的成果作品。对本文的研究做出重要贡 献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的 法律后果由本人承担。

作者签名：  2014 年 06 月 03 日

**学位论文版权使用授权书**

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文 被查阅和借阅。本人授权广东海洋大学可以将本学位论文的全部或部分内 容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于 1、保密□，在 年解密后适用本授权书。

2、不保密√□。

（请在以上相应方框内打―√‖）

作者签名： 2014 年 06 月 03 日



导师签名： 2014 年 06 月 03 日

环境因子和弧菌对白斑综合症病毒（WSSV）在凡纳滨对虾体内增殖的影响

摘 要

白斑综合症病毒(*White spot syndrome virus*, WSSV)是一种宿主广泛，传染性强，对虾高致死性病毒，严重制约世界对虾养殖业发展。WSSV在对虾体内增殖不仅与虾体的免疫水平，病毒自身有关，还与环境因子密切相关。环境因子不仅影响对虾的免疫水平，还能影响WSSV的致病力。研究环境因子对WSSV致病力及在宿主体内增殖的影响成为解决WSSV问题的重要手段。本文通过盐度、氨氮、亚硝酸氮渐变和突变对WSSV感染凡纳滨对虾及WSSV在对虾体内增殖的影响，并探讨不同温度条件下3种弧菌分别对白斑综合症病毒在对虾体内增殖的影响。结果如下：

1、盐度由起始盐度(23±1)往高盐度(32±1)和低盐度(14±1)突变在整个实验中对凡纳滨对虾的累积死亡率和对虾体内病毒增殖的影响显著(*P*<0.05)，盐度渐变实验各组至24h对虾死亡率低于18.9%, 48h出现死亡高峰，72h~96h存在显著差异（*P*<0.05）。因此盐度变化会影响对虾的抗病能力，可造成对虾体内WSSV快速增殖；对携带WSSV对虾，盐度变化会大大提高WSSV从潜伏感染转为急性感染的可能，盐度是引起WSSV从潜伏感染转为急性感染的关键影响因子之一。

2、氨氮浓度从起始浓度0.05 mg/L往中浓度1.25 mg/L和高浓度3.0 mg/L突变在整个实验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），氨氮浓度渐变实验各组至24h累积死亡率低于13.3%(*P*> 0.05)，48h后开始出现差异（*P*<0.05）。因此氨氮浓度变化越大对对虾体内病毒增殖影响越显著，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。

3、整个亚硝酸氮浓度变化实验，先感染WSSV实验中，亚硝酸氮由起始浓度0.05 mg/L往中浓度10 mg/L和高浓度20 mg/L渐变和突变过程中对凡纳滨对虾累积死亡率及病毒增殖影响显著（*P*<0.05）。后感染WSSV实验中，亚硝酸氮由起始浓度0.05 mg/L往中浓度10 mg/L和高浓度20 mg/L渐变、突变至24h对虾死亡率低于12.2%, 48h后突变组首先出现死亡高峰，72h~120h存在显著差异

（*P*<0.05），因此携带WSSV的对虾对亚硝酸氮浓度变化更敏感，引起WSSV从潜伏感染转为急性感染。亚硝酸氮突变结果和渐变相比，亚硝酸氮突变更容易提高对虾对WSSV的易感性。

4、不同温度下副溶血弧菌和WSSV的致病性：温度为19±1℃条件下，至实验结束各组累积死亡率和病毒携带量分别低于11.1%，1.2×10 3 copies/g。温度

25±1℃条件下，48h~96h单独感染WSSV组死亡率（最大值63.3%）与合并感染组（62.2%）无明显差异，但12 h~72 h所有合并感染组病毒携带量（最大值2.5×10 2

copies/g）明显低于单独感染WSSV组（1.9×10 5 copies/g）。96h合并感染组病毒增殖迅速（5.7×10 4 copies/g）。细菌单独感染组死亡率随浓度升高而升高（21.1%）。温度为31±1℃条件下，单独感染WSSV组死亡率和病毒携带量（47.8%，2.2×10 4

copies/g）明显低于合并感染组（77.8%, 3.9×10 5 copies/g）。合并感染组和单独感染细菌组（33.3%）致死率随细菌浓度升高而升高。说明合并感染（副溶血弧菌和WSSV）和单独感染副溶血弧菌对对虾的致病力随温度升高而升高，而且合并感染在不同温度下对WSSV增殖影响显著。

5、不同温度下鳗弧菌和WSSV的致病性：温度为19±1℃条件下，至实验结束各组累积死亡率和病毒携带量分别低于11.1%，1.2×10 3 copies/g。当温度为25±1℃时，48 h~96 h 单独感染WSSV 累积死亡率与合并感染组差异显著

（*P*<0.05），而且合并感染组不同浓度之间存显著差异（*P*<0.05），死亡率最大值为77.8%（合并感染浓度2.3×10 6 cfu/ml组）。当温度为31±1℃时，各组累积死亡率在48 h开始升高，合并感染组死亡率和病毒增殖明显快于单独感染WSSV组。随着感染时间延长，单独感染鳗弧菌组随浓度升高，对虾死亡加快。因此低温条件下，鳗弧菌和WSSV致病力不高，随着温度升高，合并感染的致病力随温度升高而升高，即温度能显著影响鳗弧菌和WSSV的致病力。

6、不同温度下哈维氏弧菌和WSSV的致病性：温度为19±1℃条件下，整个实验过程死亡率都低于8.9%，各组病毒携带量低于3.9×10 4 copies/g。温度

25±1 ℃条件下，病毒单独感染组（71.1%, 1.9×10 5 copies/g）和高浓度继发感染

组（77.8%, 3.2×10 6 copies/g）死亡率及病毒携带量从实验中期开始明显高于其他组（*P*<0.05），死亡加快，病毒携带量迅速增加。单独感染哈维氏弧菌组随感染浓度升高为增加，最大值为（21.1%）。温度31±1 ℃条件下，单独感染WSSV组（47.8%, 2.2×10 4 copies/g）从实验中期开始明显低于继发感染组（80.0%，6.1×10 6

copies/g）；单独感染哈维氏弧菌组随浓度升高而升高（24.4%）。说明温度对WSSV和哈维氏弧菌致病力影响显著，温度升高使继发感染和单独感染细菌的致病力升高，高温和低温对WSSV致病力有抑制作用。

**关键词：**白斑综合症病毒； 凡纳滨对虾； 环境因子； 弧菌； 荧光定量； PCR

**Effects of Environmental Factors and Vibrio on the Proliferation of White Spot Syndrome Virus in *L. Vannamei***

**Abstract**

White Spot Syndrome Virus (White spot syndrome virus, WSSV) was a host widely contagious, highly lethal virus of shrimp, seriously restricting the development of the world's shrimp farming industry. WSSV in shrimp immunity levels in vivo proliferation not only with the shrimp, the virus itself, but also on environmental factors are closely related. Environmental factors not only affect the level of immunity of shrimp, but also affect the virulence of WSSV. Research the effected of environmental factors on WSSV virulence and the proliferation of WSSV has become an important means to solve the problem of WSSSV. In this paper, exploreed the effected of Salinity, Ammonia, Nitrite-nitrogen gradual and mutations changed on penaeus infected with WSSV and the proliferation of WSSV in penaeus, and explore infected with three kinds of Vibrio would affect the proliferation of white spot syndrome virus in vivo penaeus under the different temperatures. The results were as follows:

1. There was significantly effect on the mortality of shrimp and WSSV proliferation in *L. vannamei* by the acute salinity changes from the initial salinity (23±1) to high salinity (32±1) and low salinity (14±1) (*P*<0.05), In the experiment of salinity gradient, the mortality in each group below 18.9% at 12h and had a death peak at 48h, there was a significant difference (*P*<0.05) at 72~96h, Therefore, salinity change was influence on the disease resistance of shrimp, which caused WSSV rapid proliferation in vivo shrimp; For carrying WSSV shrimp, salinity changes will greatly improve the possibility of WSSV from latent infection into acute infection, so salinity is one of the key factors which caused WSSV from latent infection into acute infection.

2. There was significantly effect on the mortality of shrimp and WSSV proliferation in *L. vannamei* by the acute concentration of ammonia nitroge changes from the initial concentration (0.05 mg/L) to mid-concentration (1.25 mg/L) and high

Concentration (3.0 mg/L) (*P*<0.05), In the experiment of concentration of ammonia nitroge gradient, the mortality in each group 13.3%(*p*> 0.05) at 24h and there was a

Significant difference after 48h(*P*<0.05). Therefore, the greater the change in concentration of ammonia nitrogen for shrimp viral proliferation more significant,

WSSV may be greater from a latent infection into acute infection, so the control of water in the ammonia content at low concentration levels is critical to prevent the outbreak of WSS.

3. Changes nitrite nitrogen concentration throughout the experiment, the first WSSV infection experiments, the initial concentration of nitrite 0.05 mg/L concentration to 10 mg/L and a high concentration of 20 mg/L during the course of gradual and abrupt Litopenaeus cumulative shrimp mortality and virus proliferation significantly (*P*<0.05). WSSV infection experiment, the initial concentration of nitrite

0.05 mg/L concentration to 10 mg / L and a high concentration of 20 mg/L gradients, mutations to 24h shrimp mortality of less than 12.2%, 48h after the mutation group first appeared mortality peak, 72h~120h significant difference (*P*<0.05), and therefore carry more sensitive shrimp WSSV change nitrite nitrogen concentration, causing WSSV from latent infection into acute infection. Nitrite nitrogen and gradual mutation results compared to nitrite mutations easier to improve shrimp on WSSV susceptibility.

4. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and WSSV under different temperatures: a temperature of 19±1℃conditions, to the end of the experiment each group carrying amount of cumulative mortality and virus were less than 11.1%, 1.2×103 copies/g. Temperature of 25±1℃conditions, 48h ~ 96h WSSV infection alone mortality ( 63.3%) and co-infection group ( 62.2%) had no significant

Difference, but 12 h~72 h for all coinfected group of viruses carrying capacity ( maximum value of 2.5×10 2 copies/g) was significantly lower than group WSSV infection alone (1.9×10 5 copies/g). 96h coinfected group of viruses proliferate rapidly (5.7×10 4 copies/g). Bacterial infection alone increases mortality increased with the concentration (21.1%). Temperature of 31±1℃under the conditions of mortality and infection alone WSSV virus carrying amount (47.8%, 2.2×10 4 copies/g) was

Significantly lower than coinfected group (77.8%, 3.9×10 5 copies/g). Coinfected group and individual bacterial infection group ( 33.3%) mortality rate increased with the increase of the concentration of bacteria. Description coinfection ( *Vibrio parahaemolyticus* and WSSV) and *Vibrio parahaemolyticus* infection alone virulence of shrimp increased with increasing temperature, and the impact of co-infection WSSV proliferation at different temperatures significantly .

5. The pathogenicity of *Vibrio anguillarum* and WSSV under different temperatures: temperature of 19±1℃conditions, to the end of each experimental group and a virus carrying amount of cumulative mortality was lower than 11.1%,

1.2×10 3 copies/g. When the temperature is 25±1℃when, 48 h ~ 96 h cumulative mortality WSSV infection alone coinfected group with significant difference (*P*<0.05), and save significant difference (*P*<0.05) between groups of different concentrations of co-infection, the highest mortality rate of 77.8% ( coinfection concentration 2.3×10 6

Cfu/ml group). When the temperature was 31±1℃, the cumulative mortality in each

Group began to increase in 48 h, mortality and virus co-infection group was significantly faster than the proliferation of WSSV infection alone group. With prolonged infection, bacterial infection alone with concentration, shrimp death accelerated. Therefore, low temperatures, and WSSV and *Vibrio anguillarum* virulence is not high, as the temperature increases, the combined virulence of infection increases with increasing temperature, the temperature can significantly affect *Vibrio anguillarum* and virulence of WSSV .

6. The pathogenicity of *Vibrio harveyi* and WSSV under different temperatures: a temperature of 19±1℃conditions throughout the experiment mortality are lower than 8.9%, less than the carrying capacity of each group of viruses 3.9×10 4 copies/g. Temperature of 25±1℃conditions, viral infection alone group (71.1%, 1.9×10 5 copies/g), and high concentrations of secondary infection group (77.8%, 3.2×10 6

Copies/g) mortality and virus carrying amount of the interim from experiments start significantly higher than other groups (*P*<0.05), the death rate, a rapid increase in the

Amount of virus carriers. Infection with bacterial infection alone group concentration is increased, the maximum value of ( 21.1%). Temperature of 31±1℃conditions WSSV infection alone group (47.8%, 2.2×10 4 copies/g) was significantly lower than the experimental mid secondary infection group (80.0%, 6.1×10 6 copies/g).

Description Temperature WSSV and Vibrio harveyi virulence affect significantly the temperature rises so that secondary infections and bacterial infection alone increased virulence, high and low temperatures inhibit virulence of WSSV.

**Key Words**: White Spot Syndrome Virus; *L. vannamei*; Environmental factors; Vibrio; Fluorescence Quantitative PCR

目 录

[摘 要](#_Toc686752401) 2

**[Abstract](#_Toc686752402)** 3

[1 前言](#_Toc686752403) 5

[1.1 国内外研究进展](#_Toc686752404) 5

[1.1.1 白斑综合症病毒的命名](#_Toc686752405) 5

[1.1.2 白斑综合症病毒的形态结构](#_Toc686752406) 5

[1.1.3 白斑综合症的症状](#_Toc686752407) 5

[1.1.4 白斑综合症病毒的宿主和传播途径](#_Toc686752408) 5

[1.1.5 白斑综合症病毒的致病机理](#_Toc686752409) 5

[1.1.6 白斑综合症病毒的分离纯化](#_Toc686752410) 5

[1.1.7 白斑综合症病毒的检测方法](#_Toc686752411) 5

[1.1.8 WSSV的致病条件](#_Toc686752412) 6

[1.2 研究目的和意义](#_Toc686752413) 6

[2 盐度变化对感染白斑综合症病毒的凡纳滨对虾的影响](#_Toc686752414) 6

[2.1 实验材料与方法](#_Toc686752415) 6

[2.1.1 实验材料](#_Toc686752416) 6

[2.1.2 实验仪器、试剂盒](#_Toc686752417) 7

[2.1.3 实验方法](#_Toc686752418) 7

[2.2 实验结果](#_Toc686752419) 7

[2.2.1 实时荧光定量PCR的标准曲线](#_Toc686752420) 7

[2.2.2 盐度先突变后感染WSSV的结果](#_Toc686752421) 7

[2.2.3 先感染WSSV后盐度突变实验结果](#_Toc686752422) 11

[2.2.4 先盐度渐变后感染WSSV实验结果](#_Toc686752423) 15

[2.2.5 先感染WSSV后盐度渐变实验结果](#_Toc686752424) 18

[2.3 讨论](#_Toc686752425) 22

[3 氨氮浓度变化对感染白斑综合症病毒的凡纳滨对虾的影响](#_Toc686752426) 22

[3.1 材料与方法](#_Toc686752427) 22

[3.1.1 实验材料](#_Toc686752428) 22

[3.1.2 实验方法](#_Toc686752429) 22

[3.2 实验结果](#_Toc686752430) 22

[3.2.1 先氨氮浓度突变后感染WSSV的结果](#_Toc686752431) 22

[3.2.2 先感染WSSV后氨氮浓度突变的结果](#_Toc686752432) 26

[3.2.3 先氨氮浓度渐变后感染WSSV的结果](#_Toc686752433) 29

[3.2.4 先感染WSSV后氨氮浓度渐变的结果](#_Toc686752434) 33

[3.3 讨 论](#_Toc686752435) 37

[4 亚硝酸氮浓度变化对感染白斑综合症病毒的凡纳滨对虾的影响](#_Toc686752436) 37

[4.1 材料与方法](#_Toc686752437) 37

[4.1.1 实验材料](#_Toc686752438) 37

[4.1.2 实验方法](#_Toc686752439) 37

[4.2 实验结果](#_Toc686752440) 38

[4.2.1 亚硝酸氮先突变后感染WSSV的结果](#_Toc686752441) 38

[4.2.2 先感染WSSV后亚硝酸氮浓度突变的结果](#_Toc686752442) 41

[4.2.3 先亚硝酸氮浓度渐变后感染WSSV实验结果](#_Toc686752443) 45

[4.2.4 先感染WSSV后亚硝酸氮浓度渐变实验结果](#_Toc686752444) 48

[4.3 讨论](#_Toc686752445) 52

[4.3 ×104~3.3×10 6 copies/g，此时对虾死亡明显加快，48 h后病毒含量已经高于简](#_Toc686752446) 52

[5 不同温度下副溶血弧菌和白斑综合症病毒对凡纳滨对虾的致病性](#_Toc686752447) 52

[5.1 材料与方法](#_Toc686752448) 52

[5.1.1 实验材料](#_Toc686752449) 52

[5.1.2 实验方法](#_Toc686752450) 53

[5.2 实验结果](#_Toc686752451) 53

[5.2.1 温度19±1 ℃下对感染WSSV和副溶血弧菌的凡纳滨对虾的影响](#_Toc686752452) 53

[5.2.2 温度25±1 ℃对感染WSSV和副溶血弧菌的凡纳滨对虾的影响](#_Toc686752453) 55

[5.2.3 温度31±1℃对感染WSSV和副溶血弧菌的凡纳滨对虾的影响](#_Toc686752454) 57

[5.3 讨论](#_Toc686752455) 59

[6 不同温度条件下鳗弧菌和白斑综合症病毒对凡纳滨对虾的致病性](#_Toc686752456) 59

[6.1 材料与方法](#_Toc686752457) 60

[6.1.1 实验材料](#_Toc686752458) 60

[6.1.2 实验方法](#_Toc686752459) 60

[6.2 实验结果](#_Toc686752460) 60

[6.2.1 温度19±1 ℃下WSSV和鳗弧菌对凡纳滨对虾的致病性](#_Toc686752461) 60

[6.2.2 温度25±1 ℃对感染WSSV和鳗弧菌的凡纳滨对虾的影响](#_Toc686752462) 62

[6.2.3 温度31±1℃对感染WSSV和鳗弧菌的凡纳滨对虾的影响](#_Toc686752463) 64

[6.3 讨论](#_Toc686752464) 67

[7 不同温度下哈维氏弧菌和白斑综合症病毒对凡纳滨对虾的致病性](#_Toc686752465) 67

[7.1 材料与方法](#_Toc686752466) 67

[7.1.1 实验材料](#_Toc686752467) 67

[7.1.2 实验方法](#_Toc686752468) 67

[7.2 实验结果](#_Toc686752469) 67

[7.2.1 温度19±1 ℃下对感染WSSV的凡纳滨对虾的影响](#_Toc686752470) 67

[7.2.2 温度25±1 ℃下对感染WSSV的凡纳滨对虾的影响](#_Toc686752471) 69

[7.2.3 温度31±1 ℃下对感染WSSV的凡纳滨对虾的影响](#_Toc686752472) 72

[7.3 讨论](#_Toc686752473) 74

[8 主要结论](#_Toc686752474) 74

[8.1 3种环境因子对凡纳滨对虾体内WSSV增殖的影响](#_Toc686752475) 74

[8.2 不同温度条件下3种弧菌和WSSV对凡纳滨对虾的致病性](#_Toc686752476) 74

[参考文献](#_Toc686752477) 74

[个人简介](#_Toc686752478) 78

[导师简介](#_Toc686752479) 78

# 1 前言

## 1.1 国内外研究进展

### 1.1.1 白斑综合症病毒的命名

Lo[1]等通过PCR技术将不同分离株的对虾白斑病毒DNA进行了比较分析，发现PCR产物只有细微差别；孔杰等[2]以日本对虾PRDV的*EcoR* I片段的DNA序列为参考，设计PCR引物，从中国对虾杆状病毒中扩增出相应DNA片段，经测序比较，中国对虾杆状病毒序列与PRDV的*EcoR* I片段序列完全同源。说明不同地域、不同宿主的病毒分离株之间基因序列有很大的同源性，他们密切相关。于是Lightner等[3]提出将这类杆状病毒统一命名为白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)，并获得普遍认同。国际病毒分类委员会(ICTV)在2005年第8次报告将WSSV放在线形病毒科(*Nimaviridae*)白斑病毒属(*Whispovirus*)[4]。

### 1.1.2 白斑综合症病毒的形态结构

WSSV是一种无包涵体杆状病毒，由囊膜、核衣壳、被膜层构成。核酸为双链DNA，属线性病毒科(*Nimaviridae*)白斑病毒属(*Whispovirus*)。从病毒形态学角度观察发现不同地域、不同宿主的WSSV病毒大小及核衣壳大小均有一定差异，但他们的形态结构十分相似[5-8]。完整包膜的病毒粒子长210~380 nm，宽70~167

nm。用负染电镜观察，病毒粒子末端是尾状附器（图1-1）。



**（a）（b）**

**图1-1 WSSV病毒粒子的形态（a）和电镜照片（b），尾状附器（箭头，标尺：250nm）**[9]**。**

### 1.1.3 白斑综合症的症状

WSSV感染对虾后，在不同时期病虾会出现不同症状，前期：病虾池边游动，拒食，偶尔浮出水面；中期：病虾静伏水底，空肠胃，头胸甲及腹甲易剥离，不粘连表皮，甲壳上会有0.5~2 mm大小的白斑出现；后期：病虾对外界刺激反应变的迟钝，色素加深，虾体出现微红，腹节肌肉略白，血淋巴变的稀薄不能凝固，伴随大量死亡[10]。

### 1.1.4 白斑综合症病毒的宿主和传播途径

WSSV的宿主范围非常广泛。检测发现对虾有18种，淡水虾8种，龙虾 7

种，鳌虾7种，蟹38种，而且毛颚动物门、轮虫纲、多毛类蠕虫和某些水生昆

虫幼虫中也发现WSSV的宿主成员[11]。这些宿主自然界分布极广，迁徙能力强，一些可以感染WSSV，却不会发病，但通过不同方式把WSSV传染给养殖对虾，引起对虾发病死亡。

WSSV的传播途径可分为水平传播和垂直传播两种。在水平传播中，经口感染是WSSV感染宿主的主要方式，刘萍等[[12]](#_bookmark77)研究认为游离在海水中的WSSV感染活性时间很短，很难通过体表感染对虾，所以不能通过浸浴方式感染健康虾。但Rajendran等[[13]](#_bookmark78)证明在实验条件下浸泡和接触感染存在，当水体中的病毒粒子达到一定浓度，病毒粒子会经虾的鳃，口等地方感染，使对虾携带病毒处于潜伏期，若受外界刺激促使对虾免疫力下降，病毒迅速增殖，引起对虾迅速死亡。在自然状态下，WSSV也可能垂直传播。刘萍等[[14]](#_bookmark79)对中国对虾亲虾的人工感染实验中发现有两尾虾产出的卵子检测WSSV呈阳性。Lo等[[15]](#_bookmark80)在发病野生斑节对虾亲虾的精巢、精荚、卵巢中检出WSSV阳性。所以控制亲虾感染WSSV对对虾健康养殖至关重要。

### 1.1.5 白斑综合症病毒的致病机理

WSSV对上皮组织和造血组织有较强的侵染性，这可能是WSSV的囊膜中存在增效蛋白或类增效蛋白的原因。WSSV感染对虾后，发病与否与病毒在细胞内生存及扩增的条件密切相关[[16]](#_bookmark81)。一般认为病毒主要是通过病毒内化感染入侵宿主的，在酸性环境下先由胞内体（主要指内膜系统）分检、然后被溶酶体分解，所以细胞器的生理状况及病毒的自身特性决定病毒内化后能否被降解。徐丽美等

[[17]](#_bookmark82)通过定量PCR方法初步将每毫克组织含103个病毒粒子作为疾病暴发的危险临界值。养殖对虾潜伏性感染的WSSV来源可有2个途径：一是WSSV来自亲虾的垂直传播；二是来自水平传播；研究发现来自亲虾的养殖对虾携带的病毒个体数量逐年增多，可能是因为WSSV在亲虾体内的潜伏感染造成了WSSV的垂直传播。

### 1.1.6 白斑综合症病毒的分离纯化

检测白斑综合症疾病必须掌握WSSV分离纯化方法。1995年，Lo[[1]](#_bookmark76)分离纯化了WSSV，但他分离获得的DNA不完整。Yang等[[18]](#_bookmark83)通过一种快速有效的方法首次获得获得了纯的较完整的病毒DNA，长度为290kb. Xie等[[19]](#_bookmark84)通过较简单的差速离心法在染病鳌虾组织中获得大量完整和形态一致的病毒粒子。此方法操作简单，耗时短，仪器要求不高，病毒获得率较高，且纯化所得WSSV依然具有极强感染力。建立快速提取纯化WSSV的方法对WSSV的进一步研究和检测有重要意义。

### 1.1.7 白斑综合症病毒的检测方法

目前主要的检测WSSV方法有病理学方法、免疫学方法、分子生物学方法

等。切片和组织病理学方法可检测急性爆发的病毒病，但无法检测潜在的病毒携带者。分子生物学方法因其特异性强、灵敏度高等优点得到迅速发展和应用。如聚合酶链式反应（*Polymerase Chain Reaction*, PCR）、核酸探针技术、实时荧光定量PCR等。实时荧光定量PCR因操作简单、特异性高、灵敏度高等特点得到迅速发展，它包括SYBR Green荧光染料法和TapMan探针法两种方法[[20]](#_bookmark85)。TapMan探针法发展虽日趋成熟，但由于探针合成价格昂贵没有得到广泛应用，而SYBR

Green荧光染料方法由于荧光染料价格低廉，对所有双链DNA分子都可用，并可通过检测荧光信号对模板进行绝对定量分析。而且此方法在一个全封闭环境中操作，避免了扩增产物被污染，且反应过程由电脑控制，因此在虾类的快速检测中得到广泛应用。

### 1.1.8 WSSV的致病条件

各种生物对环境因子都有一定的适应范围，超出这个范围就成为胁迫因子，不仅影响生物体自身，还影响病原体。涉及的胁迫因子包括水质理化因子（盐度、温度、溶解氧、pH值等），污染因子（氨氮、亚硝酸氮、硫化物等）和生物因子

（藻类、野生虾蟹类、浮游动物等）。在实际养殖水体中普遍存在致病弧菌，病毒等，但对虾并不发病。当周围环境发生剧烈变化时，导致宿主体内发生一系列变化，导致机体抗病能力下降，为病原体数目增加，致病性增强提供机会，进而爆发疾病。因此，养殖对虾疾病的发生与机体自身的抗病能力，病原生物及环境条件变化等多种因素密切相关。

#### 1.1.8.1 盐度

盐度是影响对虾养殖重要的环境因子之一。生长在对虾体液等渗点附近盐度环境下才能保证对虾正常生长。由于养殖虾类多为渗透压顺应者，当外界与体内渗透压差距太大时，机体会消耗太多能量用于调节渗透压，会引起对虾体内各种生理机能发生变化。Perazzolo 等[[21]](#_bookmark86)研究发现保罗美对虾（*Farfantepenaeus*

*paulensis*）在盐度34、22、13下养殖一个月后各组对虾体内血细胞数目相差可达

20 %，高盐度组高于低盐度组。潘鲁青等[[22]](#_bookmark87)研究发现盐度突变对中国对虾和南美白对虾血淋巴中抗菌活力、溶菌活力及酚氧化酶活力影响显著(*P*<0.05)，说明盐度变化能够影响对虾免疫水平。若对虾长时间生存在偏离原来存活盐度较大的环境中，免疫水平会明显降低，甚至引起对虾死亡。

#### 1.1.8.2 温度

温度是影响水生生物最重要的环境因子之一，在养殖环境中几乎所有的环境因子都受到温度的制约。温度不仅直接影响水生生物的生理代谢机能。如虾类作为变温动物，体温会随着环境温度变化而变化，并有其一定的适温范围。如最适生长和抗病力温度，若超出适温范围生长和抗病力都受影响。而且温度升高时，

虾摄食量减少，伏于池底，此时体质下降，抵抗力降低，有利于病毒的增殖。温度还会引起养殖环境其他环境因子变化，如温度变化引起水体pH值发生变化；温度升高促使残饵变质，有机质积累增厚，细菌增殖加快，导致细菌与病毒合并感染，加重对虾病情。Truscott等[[23]](#_bookmark88)研究表明温度升高会使多数甲壳类体内血细胞数目（*Total Haemocuyte Count*）及THC增加。罗氏沼虾体内的血细胞酚氧化酶活力在30~31℃时最高[[24]](#_bookmark89)。不同种类虾对WSSV易感温度大部分在它们的最适生长温度范围内，可能是对虾此时摄食量增大，经口感染机会加大，而且生长加快，细胞分裂加快，促使潜伏感染的WSSV数量超过一定阀值引起WSS的爆发。Vidal等[[25]](#_bookmark90)报道高温（32.3±0.8）℃对白斑综合症疾病发生有抑制作用。Pikul

J.等[[26]](#_bookmark91)研究认为低于温度16℃条件下WSSV对淡水螯虾的致病性降低。

#### 1.1.8.3 溶解氧

溶解氧是水生动物赖以生存的首要条件和促进养殖环境中物质循环和能量流动的重要动力。溶解氧影响养殖虾类的氨分泌、耗氧和血清渗透压[[27]](#_bookmark92)。如低溶氧会降低虾类的新陈代谢，使虾类生长缓慢，抗病力降低，对病原体的易感性提高。王克行等[[28]](#_bookmark93)认为水中溶解氧下降会引起对虾白斑综合症暴发，WSSV侵染对虾后，引起靶器官鳃及循环系统病变，对氧气的交换和输送产生阻碍作用，引起组织缺氧，从而影响对虾新陈代谢及抗病能力，最终造成对虾发病死亡。

#### 1.1.8.4 pH 值

对虾较适于生活在pH为7.8~8.8的环境中。当水环境中pH发生剧烈变化时，对虾需消耗大量的能量调节机体pH值达到再次平衡，易引起体内代谢短暂失调甚至组织受损，降低抗病能力。pH对中国对虾幼虾的24h急性致毒效应为：pH为8.2~8.6时，对虾存活率在95%以上，存活率随着pH值升高而下降[[29]](#_bookmark94)。潘鲁青等[[22]](#_bookmark87)研究表明低pH值易削弱对虾的携氧能力，所以对虾往低pH值突变的免疫适应性较差，pH值向低突变时中国对虾和南美白对虾抗菌活力和溶菌活力逐渐下降，中国对虾耗氧率随pH值的下降而升高，对WSSV等病原的易感性升高。

#### 1.1.8.5 氨氮

氨氮是对虾养殖环境中重要的污染胁迫因子，主要来源于残饵和养殖动物的排泄、粪便等含氮有机物的氨化作用。并与养殖环境的温度、盐度和酸碱度密切有关。孙舰军等[[30]](#_bookmark95)认为高浓度氨氮可引起对虾抗病相关酶活性降低（PO，SOD，

POD，溶菌酶和抗菌酶），减少血细胞的数目，导致病原体的易感性升高，引起病原体侵入或激活潜伏病原体，甚至发生继发感染，导致疾病迅速发生。姜令绪等[[31]](#_bookmark96)研究也发现氨氮对凡纳滨对虾血清中酚氧化酶活力、溶菌和抗菌活力的影响显著（*P*<0.05），氨氮浓度升高促使酚氧化酶活力逐渐增大，溶菌酶和抗菌酶活力逐渐降低。

#### 1.1.8.6 亚硝酸氮

亚硝酸氮不仅是污染胁迫因子之一，还是水质恶化主要指标之一。亚硝酸氮会与甲壳动物血液中的血蓝蛋白发生与血红蛋白相似的反应，导致对虾缺氧，伴有青紫症[[32]](#_bookmark97)。养殖池中的亚硝酸氮主要来自细菌的硝化作用：氧气充足时，主要来自于氨的转化；缺氧时，主要来自硝酸盐的转化。亚硝酸氮在水体中不稳定，所以浓度不高，但对虾对低浓度亚硝酸氮敏感，引起对虾抗病力下降，使病原体的易感性升高。

#### 1.1.8.7 细菌

细菌是养殖生态系统中物质循环和能量转换的主要推动者。可分为有益菌和致病菌，科学利用有益菌如枯草芽孢杆菌，光合细菌，硝化细菌等可改善水质，增强对虾免疫力，对预防疾病发生有积极作用[[33]](#_bookmark98)。水体中的致病菌大多为条件致病菌，如弧菌作为养殖水体中正常的菌群之一，已有很多报道弧菌引起高致死性疾病发生，致病条件：外界环境条件恶化，如水质、温度、盐度、pH值等；对虾体质下降，如病毒潜伏感染使对虾体质下降引起弧菌继发感染，弧菌的潜伏感染使对虾抗病力下降，将大大提高对WSSV的易感性。对虾弧菌病会引起对虾眼睛溃烂，鳃和肝胰腺病变，部分还会产生荧光。而且致病弧菌对不同生长期的对虾和不同种类对虾的致病性不同。

## 1.2 研究目的和意义

白斑综合症作为危害世界对虾养殖业的主要流行病，从发病至今，已经受到全世界的关注并研究。研究中发现病原体是一种不形成包涵体的杆状病毒，这种病毒致病性强，流行范围广，而且对虾致死时间短，死亡率高，已经给对虾养殖业造成了巨大损失和危害。已有研究表明疾病爆发是因为宿主、环境和病原体三者经过复杂的相互作用的结果，在一定环境条件下，宿主与其携带的病原体可以共存，当某些环境条件发生大的变化，会导致疾病的爆发。就目前白斑综合症爆发的影响因子研究中，研究比较多的是环境因子中的氨氮，亚硝酸氮和溶解氧，但对温度、盐度、pH值、藻类以及细菌的相关研究较少，本文将从研究部分环境因子变化和弧菌对对虾体内WSSV增殖情况的影响方面入手，在室内模拟养殖环境研究盐度、氨氮浓度、亚硝酸氮浓度变化对对虾体内WSSV增殖的影响，以及不同温度条件下不同浓度的三种弧菌在白斑综合症病毒从潜伏感染到急性感染的影响。并分析不同影响因子对白斑综合症病毒从潜伏到急性感染的影响力大小，以期能阐明在对虾养殖过程中对白斑综合症病毒从潜伏感染转化为急性感染的关键影响因子，为减少和控制白斑综合症爆发提供理论依据。

# 2 盐度变化对感染白斑综合症病毒的凡纳滨对虾的影响

白斑综合症病毒（White spot syndrome virus, WSSV）是一种对虾高致死性病毒，其宿主广泛，传染性强，感染后出现症状6-7 d死亡率可达80%-100%，造成的危害极大[[34]](#_bookmark99)。已使世界30多个国家对虾养殖业蒙受巨大损失，部分地区对虾养殖业濒临绝境，严重制约了全球对虾养殖业的发展[[35,](#_bookmark100) [36]](#_bookmark101)，而我国1993年开始大规模暴发流行。近年很多研究发现引起白斑综合症爆发的原因不仅与虾体的免疫水平、病毒数量、感染方式有关，还与环境因子密切相关，例如温度、盐度、pH值、氨氮含量等[[37,](#_bookmark102) [38]](#_bookmark103)。如高温或者低温可以抑制WSSV在对虾体内增殖[[26,](#_bookmark91) [39,](#_bookmark104) [40]](#_bookmark105)。pH升高可能提高斑节对虾死亡率[[41]](#_bookmark106)。盐度在1 h内突变大于4会引起中国对虾体内WSSV迅速增殖和抗病能力降低[[42]](#_bookmark107)。环境中盐度只有在对虾体液的等渗点附近，对虾才能保证正常的生理和生长状况。徐丽美等[[17]](#_bookmark82)通过定量PCR方法初步将每毫克组织含103个病毒粒子作为疾病暴发的危险临界值；何建国等

[[43]](#_bookmark108)认为WSSV的潜伏期感染具有很大的危害性，且潜伏期感染转为急性感染受众多气候和水环境因子影响。凡纳滨对虾（*L. vannanei*）是我国乃至全世界最主要的对虾养殖品种，本文研究不同盐度变化对感染WSSV凡纳滨对虾的影响，对对虾产业的健康可持续发展有重要意义。

## 2.1 实验材料与方法

### 2.1.1 实验材料

#### 2.1.1.1 健康对虾来源

健康凡纳滨对虾取自我校东海岛海洋生物研究基地，体长为（7.71±0.98 ）

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/d，换水1次/d，日换水量接近100%。

#### 2.1.1.2 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℃、7000 rpm离心15 min；离心后的上清液加入蔗糖至终浓度为30%(W/W)，4℃、16000 rpm超速离心50 min，弃上清，沉淀用PBS（pH 7.4）重悬，将重悬液用0.45μm的滤膜过滤，分装后-80℃冰箱保存。

#### 2.1.1.3 DNA模板提取和引物设计

DNA模板提取方法参照Sun Y等[[44]](#_bookmark109)的方法，用剪刀取对虾肌肉组织约0.1

g，放入EP管，加入450 ul NaOH（50 mM），涡旋混匀后在沸水浴中煮沸约10 min，加入50 ul Tris溶液（1 M, pH 8.0），涡旋混匀后在室温下12000 rpm离心10 min，取上清作为PCR模板。

PCR引物参照You X等[[45]](#_bookmark110)的引物设计，由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列如下：F: 5’-AAA CCT CCG CAT TCC TGT GA；R: 5’-TCC GCA TCT TCT TCC TTC AT，扩增120bp的目的片段。

#### 2.1.1.4 标准品的制备

参照程晓燕等[[46]](#_bookmark111)的方法制备重组质粒标准品，用核酸分析仪测定重组质粒的

DNA浓度，根据拷贝数公式计算重组质粒的拷贝数。

拷贝数(copies/μl) =质粒浓度（μg/μl）×10-6×阿伏加德罗常数/重组质粒分子量。式中：阿伏加德罗常数为6.02×10 23，重组质粒分子量=1个碱基对的平均分子量

（660g/mol）×重组质粒的总长度(bp)。

通过SYBR Green实时荧光定量PCR检测对虾中WSSV的增殖情况，扩增反应在Rotor-Gene 6000（Corbett Robotics, Australia）上进行。反应体系为20μl，其中包含：10μl 2×SYBR green PCR mix buffer，1μl DNA模板，10μmol/L的引物0.4μl，RNase-free蒸馏水8.2μl. 实时荧光定量PCR反应条件：95℃5 min；95℃10 s；60℃40 s（40个循环）。以103, 104，105，106，107, 108稀释的标准品作为模板做出标准曲线对病毒粒子进行定量。

### 2.1.2 实验仪器、试剂盒

Rotor-Gene 6000；核酸浓度测定仪；恒温培养箱；恒温水浴锅；大连宝生物公司pMDTM 18-T Vecter Cloning Kit; SYBR Green荧光染料（凯杰）等。

### 2.1.3 实验方法

#### 2.1.3.1 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40μl病原缓冲液。

#### 2.1.3.2 盐度变化实验

实验水温为26±1 ℃，盐度变化为起始盐度（23±1）往高盐度（32±1）和低

盐度（14±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两种方式，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40μl含9.2×10 2 copies/μl病毒粗提液稀释液，对照组注射40μl PBS缓冲液。实验中投喂对虾人工配合饵料2次/d，24 h充气，定时吸出排泄物，日换水量50%。及时取出死亡对虾放入-20℃冰箱保存。各组在感染后0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 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。

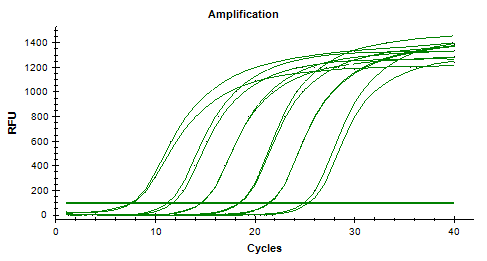
#### 2.1.3.3 病毒检测方法

病毒检测采用荧光定量PCR方法参考程晓燕等[[46]](#_bookmark111)。

## 2.2 实验结果

### 2.2.1 实时荧光定量PCR的标准曲线

根据标准品所含WSSV拷贝数（1.76×10 8~1.76×10 3 copies/μl）与Ct值之间相关性（图2-1、图2-2），得到标准曲线：Ct= -3.471 lg*X*+36.39 (*X*为重组质粒拷贝数，即病毒拷贝数)。相关系数*R2*=0.998, PCR循环效率为94.1%，复合定量要求。



1

2

3

4

5

6

**图 2-1** **重组质粒标准品10倍稀释梯度的实时定量PCR的扩增曲线**

**Fig.** **2-1** Real-time quantitative PCR amplification curve of the 10 fold series **diluted**

**amplicons**

注：1~6质粒浓度依次为1.76×10 8、1.76×10 7、1.76×10 6、1.76×10 5、1.76×10 4、1.76×10 3 copies/ul



**图 2-2** **定量PCR的标准曲线**

**Fig.** **2-2** Standard curve of quantitative **PCR**

### 2.2.2 盐度先突变后感染WSSV的结果

#### 2.2.2.1 盐度突变后感染WSSV对凡纳滨对虾死亡情况的影响

整个实验过程中，同一盐度感染WSSV组对虾累计死亡率显著高于未感染

WSSV组，且感染WSSV后不同盐度组的对虾累积死亡率显著提高，24 h出现死亡高峰，此时低盐度（14±1）突变组的累计死亡率54.1%明显高于高盐度（32±1）突变组的36.7%和起始盐度（23±1）组的24.4%。在整个实验过程中起始盐度

（23±1）组累积死亡率显著低于另外两突变组（*P*<0.05），各组累计死亡率至96

h达到最大，起始盐度（23±1）为52.2%，高盐度（32±1）突变组为75.6%，低盐度（14±1）突变组为63.3%，见图2-3。



**图 2-3** **盐度突变对对虾累积死亡率的影响**

**Fig.** **2-3** Effects of salinity acute changes on the mortality of **shrimp**

#### 2.2.2.2 盐度突变后感染WSSV对凡纳滨对虾携带WSSV情况的影响

整个实验过程中，不同盐度下病虾体内病毒含量随感染时间推移逐渐升高。在6 h、24 h、48 h、96 h时高盐度（32±1）突变组与起始盐度（23±1）组存在显著差异（*P*<0.05）；在6 h、12 h、48 h、72 h时低盐度（14±1）突变组与起始盐度（23±1）组存在显著差异（*P*<0.05）。高盐度（32±1）突变组和起始盐度（23±1）组对虾体内病毒含量都在96 h 达到最高值，分别为5.7×10 7 copies/g，2.3×1 06

copies/g，低盐度突变组在72 h达到最高值为2.8×10 7 copies/g，见表2-1.

**表 2-1** **盐度突变后感染WSSV对虾携带白斑综合症病毒量的情况**

**Tab.** **2-1** Effects of salinity acute changes on white spot syndrome virus copy **number**

in shrimp infected with WSSV

| 时间  （h） | 盐度 |  | WSSV 携带量（copies/g） | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 最小值 | 最大值 | 平均值 | 标准差 |
|  | 32±1 | 1.2×10 1 | 1.3×10 1 | 1.2×10 1 | 1.0×10 0 |
| 0 | 23±1 | 1.2×10 1 | 2.4×10 1 | 1.6×10 1 | 7.0×10 0 |
|  | 14±1 | 1.0×10 1 | 1.5×10 1 | 1.3×10 1 | 3.0×10 0 |
|  | 32±1 | 2.0×10 3 | 3.1×10 3 | 2.4×10 3 | 6.2×10 2 |
| 6 | 23±1 | 9.0×10 1 | 2.2×10 2 | 1.4×10 2 | 6.5×10 1 |
|  | 14±1 | 1.4×10 3 | 4.0×10 3 | 2.5×10 3 | 1.3×10 3 |
|  | 32±1 | 5.0×10 3 | 9.0×10 3 | 7.0×10 3 | 2.0×10 3 |
| 12 | 23±1 | 2.9×10 2 | 5.6×10 2 | 4.0×10 2 | 1.5×10 2 |
|  | 14±1 | 3.7×10 4 | 7.3×10 4 | 5.2×10 4 | 1.9×10 4 |
|  | 32±1 | 2.7×10 5 | 6.8×10 5 | 5.2×10 5 | 2.2×10 5 |
| 24 | 23±1 | 1.4×10 3 | 7.0×10 3 | 4.4×10 3 | 2.9×10 3 |
|  | 14±1 | 3.2×10 4 | 7.7×10 4 | 5.1×10 4 | 2.3×10 4 |
|  | 32±1 | 1.5×10 6 | 1.9×10 6 | 1.6×10 6 | 2.1×10 5 |
| 48 | 23±1 | 1.1×10 4 | 4.8×10 4 | 3.0×10 4 | 1.9×10 4 |
|  | 14±1 | 8.7×10 5 | 1.0×10 6 | 9.4×10 5 | 8.8×10 4 |
|  | 32±1 | 7.4×10 5 | 8.4×10 5 | 8.0×10 5 | 5.3×10 4 |
| 72 | 23±1 | 3.2×10 4 | 7.2×10 4 | 5.3×10 4 | 2.0×10 4 |
|  | 14±1 | 1.2×10 7 | 4.3×10 7 | 2.8×10 7 | 1.6×10 7 |
|  | 32±1 | 4.2×10 7 | 8.6×10 7 | 5.7×10 7 | 2.5×10 7 |
| 96 | 23±1 | 3.2×10 5 | 5.9×10 6 | 2.3×10 6 | 3.1×10 6 |
|  | 14±1 | 1.1×10 6 | 2.4×10 6 | 1.7×10 6 | 6.7×10 5 |

### 2.2.3 先感染WSSV后盐度突变实验结果

#### 2.2.3.1 先感染WSSV后盐度突变对凡纳滨对虾死亡情况的影响

整个实验过程中，同一盐度感染WSSV组对虾累计死亡率显著高于未感染

WSSV组，感染WSSV后盐度突变导致对虾累积死亡率显著提高，在整个实验过程中高盐度（32±1）突变组与起始盐度（23±1）组之间差异不显著（*P*> 0.05）；低盐度（14±1）突变组与起始盐度（23±1）组之间在12 h、24 h、48 h、72 h存在显著差异（*P*<0.05）；各组累计死亡率至96 h达到最大，起始盐度（23±1）为48.8%，高盐度（32±1）突变组为61.1%，低盐度（14±1）突变组为63.3%，见图2-2。



**图 2-4** **先感染WSSV后盐度突变对对虾累积死亡率的影响**

**Fig.** **2-4** Effects of salinity acute changes on the mortality of shrimp infected with **WSSV**

#### 2.2.3.2 先感染WSSV后盐度突变对WSSV在凡纳滨对虾体内增殖的影响

整个实验过程中，不同盐度下的病虾体内携带病毒量随时间推移而逐渐增多。高盐度（32±1）突变组与起始盐度（23±1）组在12 h、24 h、72 h、96 h存在显著差异（*P*<0.05）；低盐度（14±1）突变组与起始盐度（23±1）组在6 h、12

h、72 h、96 h存在显著差异（*P*<0.05），两盐度突变组病毒复制高峰期出现在盐度突变后6 h，而起始盐度（23±1）组出现在48 h。在0 h各组病毒含量差异不

大，至12 h高盐度（32±1）突变组病毒含量高出起始盐度（23±1）组的30倍，

低盐度（14±1）突变组高出起始盐度（23±1）组的400倍，到48 h后各组病毒含量相差不显著，见表2-2。

**表 2-2** **感染WSSV后盐度突变对虾携带白斑综合症病毒量的影响**

**Tab.** **2-2** Effects of salinity acute changes on white spot syndrome virus copy number **in**

shrimp infected with WSSV

| 时间（h） | 盐度 | WSSV 携带量（copies/g） | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 最小值 | 最大值 | 平均值 | 标准差 |
|  | 32±1 | 2.0×10 0 | 6.0×10 0 | 4.0×10 0 | 2.0×10 0 |
| 0 | 23±1 | 3.0×10 0 | 5.0×10 0 | 4.0×10 0 | 2.0×10 0 |
|  | 14±1 | 9.4×10 1 | 1.5×10 2 | 1.2×10 2 | 3.0×10 1 |
|  | 32±1 | 1.8×10 3 | 2.9×10 3 | 2.3×10 3 | 5.4×10 2 |
| 6 | 23±1 | 9.1×10 1 | 1.2×10 2 | 1.1×10 2 | 1.5×10 1 |
|  | 14±1 | 3.3×10 3 | 8.9×10 3 | 6.3×10 3 | 2.8×10 3 |

**续表2-2感染WSSV后盐度突变对虾携带白斑综合症病毒量的影响**

**Continued tab. 2-2** Effects of salinity acute changes on white spot syndrome virus **copy**

number in shrimp infected with **WSSV**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 时间（h） | 盐度 | WSSV 携带量（copies/g） | | | |
| 最小值 | 最大值 | 平均值 | 标准差 |
|  | 32±1 | 1.8×10 4 | 3.6×10 4 | 2.6×10 4 | 9.7×10 3 |
| 12 | 23±1 | 4.9×10 2 | 9.9×10 2 | 7.7×10 2 | 2.6×10 2 |
|  | 14±1 | 1.5×10 5 | 6.5×10 5 | 3.4×10 5 | 2.7×10 5 |
|  | 32±1 | 2.9×10 4 | 6.1×10 4 | 4.9×10 4 | 1.7×10 4 |
| 24 | 23±1 | 2.9×10 3 | 6.2×10 3 | 4.1×10 3 | 1.8×10 3 |
|  | 14±1 | 3.2×10 4 | 7.7×10 4 | 5.4×10 4 | 2.2×10 4 |
|  | 32±1 | 1.6×10 5 | 3.4×10 5 | 2.3×10 5 | 1.0×10 5 |
| 48 | 23±1 | 3.2×10 4 | 4.8×10 5 | 2.1×10 5 | 2.4×10 5 |
|  | 14±1 | 2.4×10 4 | 6.1×10 4 | 4.8×10 4 | 2.1×10 4 |
|  | 32±1 | 4.3×10 7 | 8.6×10 7 | 6.0×10 7 | 2.2×10 7 |
| 72 | 23±1 | 4.4×10 5 | 7.2×10 5 | 5.6×10 5 | 1.5×10 5 |
|  | 14±1 | 3.2×10 7 | 9.2×10 7 | 5.3×10 7 | 3.3×10 7 |
|  | 32±1 | 1.7×10 7 | 4.7×10 7 | 2.9×10 7 | 1.7×10 7 |
| 96 | 23±1 | 2.1×10 6 | 5.7×10 6 | 3.7×10 6 | 1.9×10 6 |
|  | 14±1 | 1.7×1 06 | 2.5×10 6 | 2.0×10 6 | 4.4×10 5 |

### 2.2.4 先盐度渐变后感染WSSV实验结果

#### 2.2.4.1 不同盐度对感染WSSV凡纳滨对虾死亡情况的影响

整个实验过程中，不同盐度对感染WSSV 对虾累积死亡率的影响，感染

WSSV组，在整个实验过程中，在0 h~24 h各组对虾累计死亡率差异不显著（*P*

＞0.05），高盐度（32±1）渐变组累计死亡率与起始盐度（23±1）组在48 h、72 h

存在显著差异（*P*<0.05）；低盐度（14±1）渐变组与起始盐度（23±1）组在48 h、

72 h、96 h存在显著差异（*P*<0.05），见图2-3



**图 2-5** **不同盐度对感染WSSV对虾累计死亡率的影响**

**Fig.** **2-5** Effects of different salinity on the mortality of shrimp infected with **WSSV**

#### 2.2.4.2 盐度渐变至相应盐度后感染WSSV对其在凡纳滨对虾体内增殖的影响在整个实验过程中，0 h~24 h凡纳滨对虾体内病毒平均含量较低，在6 h 时

低盐度（14±1）渐变组与起始盐度（23±1）组存在极显著性差异（*P*<0.01），至

12 h时高盐度（32±1）渐变组与起始盐度（23±1）组存在极显著差异（*P*<0.01）；

至48 h出现病毒增殖高峰期，并伴随死亡高峰期，且高盐度（32±1）渐变组与起始盐度（23±1）组存在显著差异（*P*<0.05）；到72 h至96 h时凡纳滨对虾体内

WSSV平均含量趋于平稳，并伴随着对虾死亡，见表2-3。

**表 2-3** **不同盐度对感染WSSV凡纳滨对虾体内病毒含量的影响**

**Tab.** **2-3** Effects of different salinity on white spot syndrome virus copy number in **shrimp**

infected with WSSV

| 时间（h） | 盐度 |  | WSSV 携带量（copies/g） | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 最小值 | 最大值 | 平均值 | 标准差 |
|  | 32±1 | 3.4×10 2 | 1.1×10 3 | 7.4×10 2 | 3.8×10 2 |
| 0 | 23±1 | 4.9×10 2 | 9.7×10 2 | 6.6×10 2 | 2.7×10 2 |
|  | 14±1 | 5.7×10 2 | 7.4×10 2 | 6.4×10 2 | 8.8×10 1 |
|  | 32±1 | 5.8×10 1 | 7.4×10 1 | 6.7×1 01 | 8.0×10 0 |
| 6 | 23±1 | 2.4×10 1 | 3.5×10 1 | 2.7×10 1 | 6.0×10 0 |
|  | 14±1 | 3.1×10 2 | 8.8×10 2 | 5.8×10 2 | 2.9×10 2 |
|  | 32±1 | 9.5×10 1 | 2.6×10 2 | 1.8×10 2 | 8.1×10 1 |
| 12 | 23±1 | 2.0×10 1 | 5.7×10 1 | 4.1×10 1 | 2.0×10 1 |
|  | 14±1 | 2.1×10 1 | 5.7×10 1 | 2.4×10 2 | 1.8×10 1 |
|  | 32±1 | 1.8×10 3 | 2.2×10 3 | 1.9×10 3 | 2.5×10 2 |
| 24 | 23±1 | 2.1×10 2 | 7.6×10 2 | 5.1×10 2 | 2.8×10 2 |
|  | 14±1 | 1.4×10 4 | 6.9×10 4 | 3.2×10 4 | 3.1×10 4 |
|  | 32±1 | 7.0×10 4 | 4.8×10 5 | 3.2×10 5 | 2.2×10 5 |
| 48 | 23±1 | 1.1×10 4 | 2.1×10 4 | 1.4×10 4 | 5.8×10 3 |
|  | 14±1 | 8.1×10 4 | 3.3×10 5 | 2.4×10 5 | 1.4×10 5 |
|  | 32±1 | 2.8×10 5 | 1.3×10 7 | 5.1×10 6 | 6.6×10 6 |
| 72 | 23±1 | 2.1×10 5 | 9.6×10 5 | 4.8×10 5 | 4.2×10 5 |
|  | 14±1 | 2.9×10 5 | 4.6×10 5 | 3.6×10 5 | 8.9×10 4 |
|  | 32±1 | 7.0×10 5 | 6.3×10 6 | 2.7×10 6 | 3.1×10 6 |
| 96 | 23±1 | 4.5×10 4 | 1.2×10 5 | 8.7×10 4 | 3.8×10 4 |
|  | 14±1 | 1.6×10 6 | 1.9×10 7 | 1.0×10 7 | 9.1×10 6 |

### 2.2.5 先感染WSSV后盐度渐变实验结果

#### 2.2.5.1 盐度渐变对携带WSSV的凡纳滨对虾死亡情况的影响



**图 2-6** **先感染WSSV后盐度渐变对对虾累积死亡率的影响**

**Fig.** **2-6** Effects of salinity gradual changes on the mortality of shrimp infected with **WSSV**

在整个实验过程中，感染WSSV组中高盐度（32±1）渐变组与起始盐度（23±1 ）

组在6 h、12 h、24 h存在显著差异（*P*<0.05）；低盐度（14±1）渐变组与起始盐度（23±1）组在整个实验过程中都存在显著差异（*P*<0.05）；在盐度渐变过程中，渐变组伴随死亡率升高，至24 h后死亡明显加快，并出现死亡高峰期，见图2-6。

#### 2.2.5.2 盐度渐变对凡纳滨对虾携带WSSV情况的影响

整个实验过程中，高盐度（32±1）渐变组与起始盐度（23±1）组在6 h、48 h存在显著差异（*P*<0.05）；低盐度（14±1）渐变组与起始盐度（23±1）组在6 h、48 h、96 h存在显著差异（*P*<0.05）；在整个实验中盐度渐变组对虾体内病毒增殖速度与起始盐度组的差不多，但后期死亡率明显比起始盐度高，见表2-4。

**表 2-4** **感染WSSV后盐度渐变至相应盐度对虾携带白斑综合症病毒量的情况**

Tab. 2-4 Effects of salinity gradual changes on white spot syndrome virus copy number in shrimp infected with WSSV

| 时间（h） | 盐度 | WSSV 携带量（copies/g） | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 最小值 | 最大值 | 平均值 | 标准差 |
|  | 32±1 | 2.7×10 1 | 6.9×10 1 | 4.2×10 1 | 2.3×10 1 |
| 0 | 23±1 | 5.3×10 1 | 1.1×10 2 | 8.7×10 1 | 3.1×10 1 |
|  | 14±1 | 3.4×10 1 | 4.1×10 1 | 3.7×10 1 | 4.0×10 0 |
|  | 32±1 | 2.1×10 3 | 4.3×10 3 | 3.1×10 3 | 1.1×10 3 |
| 6 | 23±1 | 3.3×10 2 | 8.9×10 2 | 6.3×10 2 | 2.8×10 2 |
|  | 14±1 | 1.7×10 3 | 2.7×10 3 | 2.1×10 3 | 5.1×10 3 |
|  | 32±1 | 4.1×10 4 | 6.6×10 4 | 5.4×10 4 | 1.2×10 4 |
| 12 | 23±1 | 1.5×10 4 | 6.5×10 4 | 3.4×10 4 | 2.7×10 4 |
|  | 14±1 | 1.8×10 4 | 2.7×10 4 | 2.2×10 4 | 4.5×10 3 |
|  | 32±1 | 5.0×10 4 | 1.3×10 6 | 4.9×10 5 | 7.2×10 5 |
| 24 | 23±1 | 3.2×10 3 | 7.7×10 3 | 5.4×10 3 | 2.2×10 3 |
|  | 14±1 | 2.5×10 4 | 6.7×10 4 | 4.9×10 4 | 2.2×10 4 |
|  | 32±1 | 1.1×10 6 | 1.3×10 6 | 1.2×10 6 | 9.0×10 4 |
| 48 | 23±1 | 2.4×10 4 | 6.1×10 4 | 4.8×10 4 | 2.1×104 |
|  | 14±1 | 1.6×10 6 | 1.9×10 6 | 1.7×10 6 | 1.5×10 5 |
|  | 32±1 | 4.3×10 6 | 8.0×10 6 | 5.8×10 6 | 1.9×10 6 |
| 72 | 23±1 | 3.2×10 6 | 9.2×10 6 | 5.3×10 6 | 3.3×10 6 |
|  | 14±1 | 1.1×10 6 | 4.4×10 6 | 2.4×10 6 | 1.7×10 6 |
|  | 32±1 | 5.7×10 6 | 9.6×10 6 | 7.6×10 6 | 2.0×10 6 |
| 96 | 23±1 | 1.6×10 6 | 2.5×10 6 | 2.0×10 6 | 4.4×10 5 |
|  | 14±1 | 4.6×10 4 | 7.4×10 4 | 6.2×10 4 | 1.4×10 4 |

## 2.3 讨论

已有研究报道：盐度突变会引起对虾体内产生一系列应激反应，在短时间内调节血液渗透压，如对虾体内的超氧阴离子产量随着盐度突变值增加而增加，血清中酚氧化酶活性随着盐度突变值增加活性升高越快，血清中SOD活性随着盐度突变值增加而降低，血清蛋白含量随着降低[[47]](#_bookmark112)。Perazzolo L M等也报道在盐度从34降至22或13会引起圣保罗对虾（*Farfantepenaeus paulensis*）体内血淋巴中血细胞数目减少了20%，而且抗菌活力也下降了[[21]](#_bookmark86)。Sudha P M等已将WSSV与印度对虾(*Penaeus indicus*)和斑节对虾（*Penaeus monodon*）的关系简单分为 3

种类型：第1种为早期急性感染，对虾感染症状为出现大面积红体，机体组织高度感染WSSV，将在2-3 d内出现大面积死亡，第2种为急性或亚急性感染，对虾组织感染程度为中度到高度之间，会在7-10 d内出现高的死亡率，主要的临床症状为病虾甲壳有明显的白斑，第3种类型为慢性感染（潜伏感染），组织只被轻度感染，不会伴随有白斑和红体等症状，将在15-28 d内出现死亡[[48]](#_bookmark113)。有研究认为盐度改变会引起对虾体内相关免疫指标变化，特别是盐度降低能引起对虾血细胞数量明显降低，导致酚氧化酶活性升高。血细胞计数作为对虾免疫指标的重要参数之一，是因为对虾血细胞具有溶菌作用、凝集作用，而且能合成与免疫相关的许多酶类如溶菌酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、酚氧化酶等[[49]](#_bookmark114)。

两组盐度突变实验中都发现盐度突变对健康凡纳滨对虾存活影响显著，特别是低盐度（14±1）突变组累积死亡率明显高于另两组（*P*<0.05），原因可能是盐度突变幅度已超出部分体质较弱对虾的渗透调节能力。在先盐度突变后感染

WSSV实验发现各盐度组对虾的累积死亡率在前期较低；病毒检测也发现前期对虾体内病毒含量维持在较低水平，未达到对虾体内病毒含量的濒死临界值，而且起始盐度（23±1）组对虾累积死亡率都显著低于另外两突变组（*P*<0.05），说明感染初期由起始盐度（23±1）突变至（14±1）和（32±1）提高了对虾对病原体的易感性；感染后期由起始盐度（23±1）突变至（14±1）和（32±1）促使病毒在对虾体内迅速扩增，伴随着对虾大量死亡。说明盐度突变造成对虾体质损伤，抗病力下降，为病毒的扩增提供了温床。

对携带WSSV的对虾进行盐度突变实验结果可知低盐度（14±1）突变组在12 h突然出现大量死亡，且与另外两组存在显著差异（*P*<0.05）；盐度（14±1）组累计死亡率比盐度（32±1）突变组高，此结果与Joseph A等报道的盐度突变改变中国对虾血淋巴代谢和降低了对WSSV免疫力的死亡结果相似[[50]](#_bookmark115)。从病毒检测结果中发现12 h 后低盐度（14±1）突变组对虾体内病毒含量是起始盐度

（23±1）组的400倍，高盐度（32±1）突变组是其的30倍，也说明了此时各组之间累积死亡率的差异性；至实验后期病毒含量已经高于简旭凤报道的对虾感染

WSSV死亡时携带病毒的数量1×10 5 copies/g[[51]](#_bookmark116)，促使对虾大量死亡。综上可知：盐度未突变时，病毒在对虾体内处于潜伏感染期，未有大量死亡和明显病症出现；盐度突变后，对虾出现大量死亡，期间伴随着红体，空胃、空肠、肝胰腺肿大等症状。盐度突变引起对虾与WSSV之间的关系发生转变，从潜伏感染转为急性感染。

两组盐度渐变实验中都发现盐度渐变过程中对对虾存活影响不显著；将对虾驯化至不同盐度后感染WSSV实验结果发现0 h~24 h各盐度组对虾累积死亡率无明显差异，而且0 h-12 h内检测到对虾体内的病毒含量有下降趋势，到24 h

时病毒含量开始升高，但是病毒含量明显低于简旭凤[[51]](#_bookmark116)报道对虾感染WSSV粗提液后死亡时携带病毒的数量超过1×10 5 copies/g，所以未见大量对虾死亡；48 h至实验结束盐度（14±1）组累积死亡率与其他组存在显著差异（*P*<0.05），且高于其他组的累积死亡率，这与李才文等研究不同盐度条件下感染WSSV日本对虾累积死亡结果相似[[52]](#_bookmark117)。48 h后病毒在对虾体内出现增殖高峰期，此后对虾体内病毒含量为3.6×10 5copies/g~1.01×10 7 copies/g，这与孙成波等研究的斑节对虾在

高位池养殖过程中体内病毒含量（9.5×10 5 copies/g）相似[[53]](#_bookmark118)，表明随着病毒含量升高，对机体造成严重损伤，最终导致对虾出现大量死亡。

先感染WSSV后盐度渐变实验结果发现0 h~24 h起始盐度（23±1）组与另外两盐度渐变组存在显著性差异，在24 h时感染组的累计死亡率都低于18.9%，未出现大量死亡，而且0 h~12 h内对虾体内病毒含量较低，但累积死亡率存在差异，可能是个别对虾感染WSSV后对虾机体已有损伤，外界环境稍有变化，即出现个别死亡。48 h时两盐度渐变组对虾出现死亡高峰，起始盐度（23±1）组死亡率有升高，到96 h达到最大值78.9%。产生这样的结果可能是对虾长期处于连续较大的盐度渐变，导致对虾必须长时间进行盐度适应调节降低了自身免疫能力，使WSSV在体内复制累积，当累积到一定值时出现大量死亡。

综上可知，盐度作为对虾生长与存活重要环境影响因子，不管盐度怎么变化，都会影响到对虾与WSSV之间的关系，在未感染WSSV时，盐度突变和渐变都会提高对虾对WSSV 的易感性，在感染WSSV 后，盐度变化可能引起对虾与

WSSV之间的关系发生转变，从潜伏感染转为急性感染，因此盐度是WSS爆发的关键影响因子。

# 3 氨氮浓度变化对感染白斑综合症病毒的凡纳滨对虾的影响

凡纳滨对虾作为我国及全世界主要的对虾养殖品种之一，具有抗病力强，广盐性等特点。但1993年我国对虾养殖开始发生大规模疾病爆发，研究发现病原体之一是一种高致死性，传染性强的病毒，病毒名为白斑综合症病毒，并使世界对虾养殖业蒙受巨大损失，全球对虾养殖业的发展因此受到严重制约[[35,](#_bookmark100) [36]](#_bookmark101)已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）[[37,](#_bookmark102) [38]](#_bookmark103)。Gunalan B等[[41]](#_bookmark106)指出

pH升高会加快斑节对虾死亡；而且在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[[54-57]](#_bookmark119)。徐丽美等[[17]](#_bookmark82)通过荧光定量PCR初步将对虾体内病毒含量103 copies/mg定为疾病暴发危险临界值；本文研究不同氨氮浓度变化胁迫下对感染WSSV的凡纳滨对虾的影响，对对虾产业的健康可持续发展有重要意义。

## 3.1 材料与方法

### 3.1.1 实验材料

3.1.1.1健康对虾来源同2.1.1.1.

3.1.1.2 WSSV粗提液制备同2.1.1.2.

3.1.1.3 DNA模板提取和引物设计同2.1.1.3.

3.1.1.4标准品的制备同2.1.1.4.

### 3.1.2 实验方法

#### 3.1.2.1 感染方式同2.1.2.1。

#### 3.1.2.2 氨氮浓度变化实验

实验水温为22±1℃，盐度25±1，氨氮浓度变化由0.05 mg/L往中浓度1.25

mg/L和高浓度3 mg/L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两种方式，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40μl含5.3×10 2 copies/μl病毒粗提液稀释液，对照组注射40μl PBS缓冲液。实验中投喂对虾人工配合饵料2次/d，24 h充气，定时吸出排泄物，日换水量80%，用次溴酸盐法测定氨氮浓度1次/d，及时调整水体中氨氮浓度。及时取出死亡对虾放入-20℃冰箱保存，各组在感染后0 h、6 h、

12 h、24 h、48 h、72 h、96 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。

#### 3.1.2.3 病毒检测方法同2.1.2.3。

## 3.2 实验结果

### 3.2.1 先氨氮浓度突变后感染WSSV的结果

#### 3.2.1.1 先氨氮浓度突变后感染WSSV对凡纳滨对虾死亡情况的影响

整个实验过程中，对虾死亡率随着氨氮浓度增加而升高，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 mg/L组累积死亡率低于两突变组的累积死亡率（*P*<0.05），起始浓度0.05 mg/L的最大值25.6%低于中浓度1.25 mg/L组的34.4%和高浓度3.0 mg/L的48.9%，但远大于未感染WSSV组最大值14.4%，见图3-1。



**图 3-1** **先氨氮浓度突变后感染WSSV对凡纳滨对虾死亡情况的影响**

**Fig.** **3-1** Effects of ammonia acute changes on the mortality of shrimp infected with **WSSV**

#### 3.2.1.2 先氨氮浓度突变后感染WSSV对凡纳滨对虾携带WSSV情况的影响整个实验中，病毒含量随时间推移逐渐升高，起始浓度0.05 mg/L感染组与

高浓度3.0 mg/L组在12 h、24 h、48 h存在显著差异（*P*<0.05），起始浓度0.05 mg/L

感染组与中浓度1.25 mg/L组在96 h存在显著差异（*P*<0.05）。至12 h高浓度3.0

mg/L组出现病毒增殖高峰，是其它两组的几百倍，中浓度1.25 mg/L组至24 h病毒增殖速度开始加快，起始浓度0.05 mg/L至48 h增殖速度才开始加快，见表3-1。

**表 3-1** **先氨氮浓度突变后感染WSSV对凡纳滨对虾携带WSSV情况的影响**

**Tab.** **3-1** Effects of ammonia acute changes on white spot syndrome virus copy number **in**

shrimp infected with WSSV

| 时间（h） | 氨氮浓度（mg/L） | W | SSV 携带量（copies/g | | ) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 极小值 | 极大值 | 均值 | 标准差 |
|  | 0.05 | 2.94×10 2 | 9.43×10 2 | 5.65×10 2 | 3.37×10 2 |
| 0 | 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 |
|  | 0.05 | 5.07×10 2 | 7.82×10 2 | 6.22×10 2 | 1.43×10 2 |
| 6 | 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 |
|  | 0.05 | 1.24×10 2 | 2.78×10 2 | 1.88×10 2 | 8.03×10 1 |
| 12 | 1.25 | 3.22×10 2 | 4.17×10 2 | 3.60×10 2 | 5.03×10 1 |
|  | 3.0 | 5.84×10 4 | 9.21×104 | 7.47×10 4 | 1.69×10 4 |
|  | 0.05 | 6.50×10 2 | 1.14×10 3 | 9.48×10 2 | 2.62×10 2 |
| 24 | 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 |
|  | 0.05 | 1.97×10 3 | 7.09×10 3 | 4.73×10 3 | 2.58×10 3 |
| 48 | 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 |
|  | 0.05 | 1.24×10 5 | 5.16×10 5 | 2.72×10 5 | 2.13×10 5 |
| 72 | 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 |
|  | 0.05 | 8.57×10 5 | 1.10×10 6 | 9.59×10 5 | 1.23×10 5 |
| 96 | 1.25 | 1.34×10 6 | 8.13×10 6 | 5.75×10 6 | 3.82×1 06 |
|  | 3.0 | 1.09×10 6 | 2.66×10 6 | 1.62×10 6 | 9.02×10 5 |

### 3.2.2 先感染WSSV后氨氮浓度突变的结果

#### 3.2.2.1 先感染WSSV后氨氮浓度突变对凡纳滨对虾死亡情况的影响

整个实验过程中，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0.05 mg/L明显低于两突变组（*P*<0.05），高浓度

3.0 mg/L浓度累积死亡率最大值为47.8%大于中浓度1.25 mg/L的38.9%和起始浓度0.05 mg/L的30%，见图3-2.



**图 3-2** **先感染WSSV后氨氮浓度突变对凡纳滨对虾死亡情况的影响**

**Fig.** **3-2** Effects of salinity acute changes on the mortality of shrimp infected with **WSSV**

#### 3.2.2.2 先感染WSSV后氨氮浓度突变对WSSV在凡纳滨对虾体内增殖的影响整个实验过程中，氨氮浓度突变后至12 h高浓度3.0 mg/L突变组病毒增殖

明显加快，伴随着对虾死亡，12 h~72 h都显著高于其他两组（*P*<0.05），中浓度

1.25 mg/L组与起始浓度0.05 mg/L组在24 h、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），见表3-2。

**表 3-2** **感染WSSV后氨氮浓度突变对虾携带白斑综合症病毒量的影响**

Tab. 3-2 Effects of ammonia acute changes on white spot syndrome virus copy number in shrimp infected with WSSV

| 时间（h） | 氨氮浓度（mg/L） | WSSV 携带量（copies/g） | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 极小值 | 极大值 | 均值 | 标准差 |
|  | 0.05 | 2.94×10 2 | 9.43×10 2 | 5.65×10 2 | 3.37×10 2 |
| 0 | 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 |
|  | 0.05 | 5.07×10 2 | 7.82×10 2 | 6.22×10 2 | 1.43×10 2 |
| 6 | 1.25 | 1.61×10 2 | 9.17×10 2 | 5.64×10 2 | 3.80×10 2 |
|  | 3.0 | 2.56×10 2 | 5.27×102 | 3.61×10 2 | 1.46×10 2 |
|  | 0.05 | 2.24×10 2 | 6.72×10 2 | 3.94×10 2 | 2.42×10 2 |
| 12 | 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 |
|  | 0.05 | 3.26×10 3 | 6.35×10 3 | 4.94×10 3 | 1.57×10 3 |
| 24 | 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 |
|  | 0.05 | 4.81×10 4 | 9.20×10 4 | 7.32×10 4 | 2.26×10 4 |
| 48 | 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 |
|  | 0.05 | 1.24×10 5 | 5.16×10 5 | 2.72×10 5 | 2.13×10 5 |
| 72 | 1.25 | 7.40×10 5 | 1.16×10 6 | 9.58×10 5 | 2.11×1 05 |
|  | 3.0 | 3.21×10 6 | 6.45×10 6 | 4.94×10 6 | 1.63×10 6 |
|  | 0.05 | 8.57×10 5 | 1.10×10 6 | 9.59×10 5 | 1.23×10 5 |
| 96 | 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 |

### 3.2.3 先氨氮浓度渐变后感染WSSV的结果

#### 3.2.3.1 先氨氮浓度渐变后感染WSSV对凡纳滨对虾死亡情况的影响

整个实验过程中，感染WSSV实验组对虾累积死亡率缓慢提高，高浓度3.0

mg/L 浓度感染组累积死亡率提升最快，整个实验中与其它组存在显著差异

（*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3.0 mg/L浓度感染组累积死亡率达最大值45.6%，高于中浓度1.25 mg/L的30%和起始浓度0.05 mg/L的28.9%，见图3-3。



**图 3-3** **先氨氮浓度渐变后感染WSSV对凡纳滨对虾死亡情况的影响**

**Fig.** **3-3** Effects of ammonia gradual changes on the mortality of shrimp **infected with WSSV**

#### 3.2.3.2 氨氮浓度渐变后感染WSSV对WSSV在凡纳滨对虾体内增殖的影响在整个实验过程中，起始浓度0.05 mg/L与其它两渐变组在12 h~48 h存在

显著差异（*P*<0.05），72 h~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），见表3-3。

**表 3-3** **不同氨氮浓度对感染WSSV凡纳滨对虾体内病毒含量的影响**

Tab. 3-3 Effects of different ammonia on white spot syndrome virus copy number in shrimp infected with WSSV

| 时间（h） | 氨氮浓度（mg/L） |  | WSSV 携带量（copies/g） | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 极小值 | 极大值 | 均值 | 标准差 |
|  | 0.05 | 2.94×10 2 | 9.43×10 2 | 5.65×10 2 | 3.37×10 2 |
| 0 | 1.25 | 2.30×10 2 | 3.72×10 3 | 1.78×10 3 | 1.78×1 03 |
|  | 3.0 | 1.15×10 3 | 3.61×10 3 | 1.99×10 3 | 1.41×10 3 |
|  | 0.05 | 5.07×10 2 | 7.82×10 2 | 6.22×10 2 | 1.43×10 2 |
| 6 | 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 |
|  | 0.05 | 2.24×10 2 | 6.72×10 2 | 3.94×10 2 | 2.42×10 2 |
| 12 | 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 |
|  | 0.05 | 3.26×10 3 | 6.35×10 3 | 4.94×10 3 | 1.57×10 3 |
| 24 | 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 |
|  | 0.05 | 2.10×10 3 | 1.67×10 4 | 8.11×10 3 | 7.66×10 3 |
| 48 | 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 |
|  | 0.05 | 1.24×10 5 | 5.16×10 5 | 2.72×10 5 | 2.13×10 5 |
| 72 | 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 |
|  | 0.05 | 8.57×10 5 | 1.10×10 6 | 9.59×10 5 | 1.23×10 5 |
| 96 | 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 |

### 3.2.4 先感染WSSV后氨氮浓度渐变的结果

#### 3.2.4.1 先感染WSSV后氨氮浓度渐变对凡纳滨对虾死亡情况的影响

整个实验过程中，感染WSSV组，在整个实验过程中，在0 h~24 h各组对虾累计死亡率差异不显著（*P*> 0.05），高浓度3.0 mg/L浓度感染组与起始浓度0.05 mg/L组在48 h至实验结束存在显著差异（*P*<0.05）；中浓度1.25 mg/L感染组与起始浓度0.05 mg/L组无显著差异（*P*> 0.05）；且高浓度3.0 mg/L浓度感染组累积死亡率达最大值45.6%，高于中浓度1.25 mg/L的33.3%和起始浓度0.05 mg/L的25.6%，见图3-4。



**图 3-4** **先感染WSSV后氨氮浓度渐变对对虾累积死亡率的影响**

**Fig.** **3-4** Effects of ammonia gradual changes on the mortality of shrimp **infected with WSSV**

#### 3.2.4.2 氨氮浓度渐变对凡纳滨对虾携带WSSV情况的影响

整个实验过程中，不同氨氮浓度胁迫下的病虾体内携带病毒量随时间推移逐渐增多，高浓度3.0 mg/L胁迫组与起始浓度0.05 mg/L组在6 h、12 h、24 h、72 h、96 h时的病毒含量差异显著；中浓度1.25 mg/L胁迫组与起始浓度0.05 mg/L组只在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起始浓度0.05 mg/L组都要高，见表3-4。

**表 3-4** **感染WSSV后氨氮浓度渐变至相应浓度对虾携带白斑综合症病毒量的情况**

**Tab.** **3-4** Effects of ammonia gradual changes on white spot syndrome virus copy **number**

in shrimp infected with WSSV

| 时间（h） | 氨氮浓度（mg/L） | WSSV 携带量（copies/g） | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 极小值 | 极大值 | 均值 | 标准差 |
|  | 0.05 | 2.94×10 2 | 9.43×10 2 | 5.65×10 2 | 3.37×10 2 |
| 0 | 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 |
|  | 0.05 | 5.07×10 2 | 7.82×10 2 | 6.22×10 2 | 1.43×10 2 |
| 6 | 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 |

**续表3-4感染WSSV后氨氮浓度渐变至相应浓度对虾携带白斑综合症病毒量的情况**

**Continued tab. 3-4 Effects of ammonia gradual changes on white spot syndrome virus copy**

number in shrimp infected with **WSSV**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 时间（h） | 氨氮浓度（mg/L） | WSSV 携带量（copies/g） | | | |
| 极小值 | 极大值 | 均值 | 标准差 |
|  | 0.05 | 2.24×10 2 | 6.72×10 2 | 3.94×10 2 | 2.42×10 2 |
| 12 | 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 |
|  | 0.05 | 2.46×10 3 | 5.15×10 3 | 4.12×10 3 | 1.45×10 3 |
| 24 | 1.25 | 3.26×103 | 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 |
|  | 0.05 | 2.20×10 4 | 7.95×10 4 | 4.65×10 4 | 2.96×10 4 |
| 48 | 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 |
|  | 0.05 | 1.24×10 5 | 5.16×10 5 | 2.72×10 5 | 2.13×10 5 |
| 72 | 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 |
|  | 0.05 | 8.57×10 5 | 1.10×10 6 | 9.59×10 5 | 1.23×10 5 |
| 96 | 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 |

## 3.3 讨 论

氨氮作为养殖水体中普遍存在的有毒物质之一，主要以两种形式存在：NH3

（毒性较大）和NH4+，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NH3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

[[30,](#_bookmark95) [58-60]](#_bookmark120)。如王方国等[[61]](#_bookmark121)报道氨氮胁迫提高了中国对虾对副溶血弧菌的易感性。很

多研究报道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。血细胞计数作为对虾免疫指标的重要参数之一，是因为对虾血细胞具有溶菌作用、凝集作用，而且能合成与免疫相关的许多酶类如溶菌酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、酚氧化酶等[[49,](#_bookmark114)

[62]](#_bookmark122). 姜令绪等[[31]](#_bookmark96)研究报道在亚致死浓度氨氮突变下，在前期会提高凡纳滨对虾血

清中的酚氧化酶活力，但后期稳定在较低水平。Sudha P M等[[48]](#_bookmark113)已将WSSV与印度对虾(*Penaeus indicus*)和斑节对虾（*Penaeus monodon*）的关系简单分为3种类型：第1种为早期急性感染，对虾感染症状为出现大面积红体，机体组织高度感染WSSV，将在2-3 d内出现大面积死亡，第2种为急性或亚急性感染，对虾组织感染程度为中度到高度之间，会在7-10 d内出现高的死亡率，主要的临床症状为被感染的对虾甲壳有明显的白斑，第3种类型为慢性感染（潜伏感染），组织只被轻度感染，不会伴随有白斑和红体等症状，将在15-28 d内出现死亡。

两氨氮浓度突变组实验中发现在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升高。先氨氮突变后感染WSSV实验中，氨氮突变后12 h死亡开始升高，两突变感染组之间累积死亡率存在显著差异（*P*<0.05），病毒携带量中也发现从12 h至实验结束氨氮高浓度3.0 mg/L感染组病毒增殖速度明显快于另两感染组（*P*<0.05），从24 h至实验结束氨氮中浓度感染组病毒增殖速度明显快于起始浓度组。氨氮浓度突变对携带WSSV对虾的影响结果中发现，起始浓度0.05

mg/L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。病毒增殖情况中发现在12 h时两突变组出现第一个病毒增殖高峰，明显高于起始浓度感染组，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。而且氨氮浓度突变降低了对虾的免疫力，提高了对虾对病原的易感性；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，为病毒快速扩增提供了机会。

在两渐变实验中发现，感染WSSV组和未感染WSSV组中对虾累积死亡率都是随着氨氮胁迫浓度升高而升高，与姚庆祯、孙国铭等[[63,](#_bookmark123) [64]](#_bookmark124)报道的死亡结果相似。先氨氮浓度渐变后感染WSSV实验中高浓度3.0 mg/L组在6 h就出现死亡，可能原因是对虾在渐变过程中，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3.0 mg/L感染组的累积死亡率明显高于另两感染组。先感染WSSV后氨氮浓度渐变实验中，0 h~24 h各组累积死亡率差异不明显（*P*> 0.05），可能是氨氮浓度渐变过程中前期氨氮浓度变化梯度不大，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，有研究也报道低浓度氨氮会提高对虾血清酚氧化酶活力，但长时间氨氮胁迫和发病都会降低病虾血清酚氧化酶活力。病毒检测结果发现高浓度3.0 mg/L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2.04×10 5 copies/g~4.48×106 copies/g，与孙成波等[[53]](#_bookmark118)报道的斑节对虾在高位池养殖

过程中体内病毒含量（9.5×10 5 copies/g）相似，表明在氨氮胁迫下，降低了对虾抗病能力，促使病毒含量升高，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。

综上：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。

# 4 亚硝酸氮浓度变化对感染白斑综合症病毒的凡纳滨对虾的影响

凡纳滨对虾因其广温广盐性，含肉率高，繁殖周期长、生长快等特性已成为全世界最主要的对虾养殖品种之一[[65]](#_bookmark125)。近年对虾养殖出现一系列问题，包括水质恶化，病害威胁等，其中白斑综合症病毒已对对虾养殖造成巨大危害。白斑综合症病毒是一种传染性强，宿主广泛，对虾高致死性病毒，感染后6-7 d 可造成

80%～100%的对虾死亡，危害极大[[34]](#_bookmark99)，致使全球对虾养殖产量严重下滑[[36]](#_bookmark101)。很多研究报道白斑综合症爆发原因很多，如虾体免疫水平、感染方式、病毒数量、环境因子。其中环境因子包括盐度、温度、氨氮含量、pH值、亚硝酸氮含量等

[[37,](#_bookmark102) [38]](#_bookmark103)，如高温或者低温可以抑制WSSV在对虾体内增殖[[26,](#_bookmark91) [39,](#_bookmark104) [40]](#_bookmark105)；亚硝酸氮是养

殖水质恶化的一个重要指标，对虾长期处于亚硝酸氮高浓度胁迫下，对虾体内免疫酶活力明显下降，提高了对病原体的易感性[[66]](#_bookmark126)。何建国等[[43]](#_bookmark108)认为WSSV的潜伏期感染具有很大的危害性，且潜伏期感染转为急性感染受众多气候和水环境因子影响。本文研究不同亚硝酸氮浓度变化对感染WSSV的凡纳滨对虾的影响，对对虾产业的健康可持续发展有重要意义。

## 4.1 材料与方法

### 4.1.1 实验材料

4.1.1.1健康对虾来源同2.1.1.1.

4.1.1.2 WSSV粗提液制备同2.1.1.2.

4.1.1.3 DNA模板提取和引物设计同2.1.1.3.

4.1.1.4标准品的制备同2.1.1.4.

### 4.1.2 实验方法

#### 4.1.2.1 感染方式同2.1.2.1。

#### 4.1.2.2 亚硝酸氮浓度变化实验

实验水温为25±1℃，盐度24±1，亚硝酸氮浓度变化由起始浓度0.05 mg/L

往中浓度10 mg/L和高浓度20 mg/L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两种方式，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40μl 含7.2×10 2 copies/μl病毒粗提

液稀释液，对照组注射40μl PBS缓冲液。实验中投喂对虾人工配合饵料2次/d，24 h充气，定时吸出排泄物，每天换水量80%，采用重氮-偶氮法来测定水体亚硝酸氮浓度1次/d。及时取出死亡对虾放入-20℃冰箱保存。各组在感染后0 h、6

h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 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。

#### 4.1.2.3 病毒检测方法同2.1.2.3。

## 4.2 实验结果

### 4.2.1 亚硝酸氮先突变后感染WSSV的结果

#### 4.2.1.1 亚硝酸氮先突变后感染WSSV对凡纳滨对虾死亡情况的影响

整个实验过程中，对虾死亡率在突变后感染WSSV至24 h各组都没有显著差异，至48 h高浓度20 mg/L感染组和中浓度10 mg/L感染组与其它组存在显著差异（*P*<0.05），至72 h出现死亡高峰，高浓度20 mg/L感染组明显高于其它组

（*P*<0.05），至96 h~120 h感染WSSV组累积死亡率显著高于未感染WSSV 组

（*P*<0.05），高浓度20 mg/L感染组最大值61.1%明显高于中浓度10 mg/L组的

48.9%和起始浓度0.05 mg/L组的31.3%（*P*<0.05），见图4-1.



**图 4-1** **亚硝酸氮先突变后感染WSSV对凡纳滨对虾死亡情况的影响**

**Fig.** **4-1** Effect of nitrite-N acute change stresses on cumulative mortality rate **of *L. vannamei* infected with WSSV**

#### 4.2.1.2 亚硝酸氮浓度突变后感染WSSV对凡纳滨对虾携带WSSV情况的影响整个实验过程中，对虾感染WSSV后，在0 h~24 h各组中病毒在对虾体内

增殖速度较慢（*P*> 0.05），48 h 高浓度20 mg/L 组病毒增殖明显快于另两组

（*P*<0.05），72 h~96 h各组病毒含量基本一致，此时死亡最高，见表4-1。

**表 4-1** **亚硝酸氮浓度突变后感染WSSV对凡纳滨对虾携带WSSV情况的影响**

**Tab.** **4-1** Effects of nitrite-N acute changes on WSSV copy number in ***L. vannamei* infected**

with WSSV

| 时间（h） | 亚硝酸氮浓度  (mg/L) | W | SSV 携带量（copies/g | | ) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 极小值 | 极大值 | 均值 | 标准差 |
|  | 0.05 | 3.4×10 2 | 1.1×10 3 | 7.4×10 2 | 3.8×10 2 |
| 0 | 10 | 6.3×10 1 | 2.9×10 2 | 1.7×10 2 | 1.1×10 2 |
|  | 20 | 7.6×10 2 | 2.8×10 3 | 1.4×10 3 | 1.2×10 3 |
|  | 0.05 | 6.9×10 0 | 7.4×10 1 | 4.6×10 1 | 3.5×10 1 |
| 6 | 10 | 3.4×10 2 | 9.6×10 2 | 6.6×10 2 | 3.1×10 2 |
|  | 20 | 3.2×10 1 | 4.1×10 2 | 2.4×10 2 | 1.9×10 2 |
|  | 0.05 | 1.8×10 2 | 3.0×10 2 | 2.5×10 2 | 5.7×10 1 |
| 12 | 10 | 2.3×10 2 | 4.3×10 2 | 3.5×10 2 | 1.1×10 2 |
|  | 20 | 1.5×10 2 | 4.1×10 2 | 2.4×10 3 | 1.5×10 2 |
|  | 0.05 | 1.0×10 2 | 7.7×10 3 | 2.7×10 3 | 4.3×10 3 |
| 24 | 10 | 1.2×10 3 | 6.2×10 3 | 2.9×10 3 | 2.8×10 3 |
|  | 20 | 1.8×10 3 | 2.3×10 4 | 1.2×10 4 | 1.1×104 |
|  | 0.05 | 4.4×10 3 | 4.6×10 4 | 1.9×10 4 | 2.4×10 4 |
| 48 | 10 | 1.3×10 4 | 1.7×10 5 | 8.1×10 4 | 8.2×10 4 |
|  | 20 | 4.8×10 5 | 4.0×10 6 | 1.7×10 6 | 2.0×10 6 |
|  | 0.05 | 6.8×10 3 | 2.9×10 4 | 1.6×10 4 | 1.2×10 4 |
| 72 | 10 | 1.2×10 4 | 2.1×10 6 | 7.5×10 5 | 1.2×10 6 |
|  | 20 | 2.8×10 5 | 1.3×10 7 | 5.2×10 6 | 6.7×10 6 |
|  | 0.05 | 1.9×10 5 | 3.6×1 05 | 2.7×10 5 | 8.3×10 4 |
| 96 | 10 | 2.0×10 5 | 5.3×10 6 | 2.1×10 6 | 2.8×10 6 |
|  | 20 | 7.0×10 5 | 6.3×10 6 | 2.7×10 6 | 3.1×10 6 |

### 4.2.2 先感染WSSV后亚硝酸氮浓度突变的结果

#### 4.2.2.1 先感染WSSV后亚硝酸氮浓度突变对凡纳滨对虾死亡情况的影响

在整个实验过程中，未感染WSSV组中起始浓度0.05 mg/L组在12 h、48 h、72 h、96 h、120 h与另外两未感染突变组存在显著差异（*P*<0.05），感染WSSV组中24 h高浓度20 mg/L组明显高于另两组（*P*<0.05），48 h~120 h起始浓度

0.05mg/L感染组始终低于另两感染突变组（*P*<0.05），且起始浓度0.05 mg/L组最大值52.2%明显低于中浓度的70.0%和高浓度20 mg/L组的76.7%，见图4-2。



**图 4-2** **先感染WSSV后亚硝酸氮浓度突变对凡纳滨对虾死亡情况的影响**

**Fig.** **4-2** Effect of nitrite-N acute change stresses on cumulative mortality rate **of *L. vannamei* infected with WSSV**

#### 4.2.2.2 感染WSSV后亚硝酸氮浓度突变对病毒在凡纳滨对虾体内增殖的影响整个实验过程中，亚硝酸氮浓度突变后病虾体内携带病毒量随时间推移而逐

渐增多。对于携带WSSV的对虾，亚硝酸氮浓度突变后12 h~24 h各组病毒增殖出现高峰期，高浓度20 mg/L组病毒增殖明显快于另两组（*P*<0.05），48 h~96 h各组病毒含量基本达到阀值（*P*> 0.05），见表4-2。

**表 4-2** **感染WSSV后亚硝酸氮浓度突变对WSSV在凡纳滨对虾体内增殖的影响**

**Tab.** **4-2** **Effects of nitrite-N acute changes on WSSV copy number in*L. vannamei* infected**

with **WSSV**

| 时间（h） | 亚硝酸氮浓度  (mg/L) |  | WSSV 携带量（copies/g） | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 极小值 | 极大值 | 均值 | 标准差 |
|  | 0.05 | 3.0×10 1 | 2.8×10 2 | 1.2×10 2 | 1.3×10 2 |
| 0 | 10 | 7.5×10 2 | 1.0×10 3 | 9.0×10 2 | 1.3×10 2 |
|  | 20 | 9.4×10 2 | 1.1×10 4 | 6.4×10 3 | 5.0×10 3 |
|  | 0.05 | 5.1×10 2 | 1.1×10 2 | 7.9×10 2 | 3.1×10 2 |
| 6 | 10 | 2.9×10 3 | 1.7×10 4 | 7.9×10 3 | 7.8×10 3 |
|  | 20 | 3.8×10 2 | 4.0×10 3 | 2.6×10 3 | 1.9×10 3 |
|  | 0.05 | 7.9×10 2 | 1.4×10 3 | 1.1×10 3 | 3.0×10 2 |
| 12 | 10 | 1.9×10 4 | 1.6×10 5 | 8.7×10 4 | 7.2×10 4 |
|  | 20 | 1.4×10 3 | 1.1×10 5 | 7.0×10 4 | 6.0×10 4 |
|  | 0.05 | 2.5×103 | 7.3×10 4 | 4.3×10 4 | 3.6×10 4 |
| 24 | 10 | 6.8×10 5 | 1.8×10 6 | 1.2×10 6 | 5.7×10 5 |
|  | 20 | 2.3×10 6 | 4.5×10 6 | 3.3×10 6 | 1.1×10 6 |
|  | 0.05 | 6.4×10 4 | 5.2×10 5 | 2.2×10 5 | 2.6×10 5 |
| 48 | 10 | 5.5×10 4 | 9.9×10 6 | 4.2×10 6 | 5.1×10 6 |
|  | 20 | 2.4×10 6 | 1.1×10 7 | 7.7×10 6 | 4.7×10 6 |
|  | 0.05 | 1.4×10 6 | 6.9×10 6 | 3.8×10 6 | 2.8×10 6 |
| 72 | 10 | 7.0×10 5 | 3.4×10 7 | 1.2×10 7 | 1.9×10 7 |
|  | 20 | 7.6×10 6 | 1.1×10 7 | 9.4×10 6 | 1.8×10 6 |
|  | 0.05 | 2.2×10 6 | 7.0×10 6 | 3.8×10 6 | 2.7×10 6 |
| 96 | 10 | 2.1×10 5 | 3.2×10 6 | 1.9×10 6 | 1.5×10 6 |
|  | 20 | 3.4×10 4 | 2.8×10 6 | 1.0×10 6 | 1.5×10 6 |

### 4.2.3 先亚硝酸氮浓度渐变后感染WSSV实验结果

#### 4.2.3.1 不同亚硝酸氮浓度对感染WSSV凡纳滨对虾死亡情况的影响

整个实验过程中，对虾死亡率在渐变后感染WSSV至24 h各组都没有显著差异，至48 h两高浓度渐变20 mg/L组与其它组存在显著差异（*P*<0.05），高浓度20 mg/L感染组死亡率最高，至72 h出现死亡高峰，特别是高浓度20 mg/L感染组明显高于其它组（*P*<0.05），至96 h~120 h感染WSSV组累积死亡率显著高于未感染WSSV组（*P*<0.05），高浓度20 mg/L感染组最大值50.0%明显高于中浓度10 mg/L组的30.0%和起始浓度0.05 mg/L组的21.3%（*P*<0.05），见图4-3。



**图 4-3** **亚硝酸氮先渐变后感染WSSV对凡纳滨对虾死亡情况的影响**

**Fig.** **4-3** Effect of different concentration nitrite-N on cumulative mortality rate **of *L. Vannamei* infected with WSSV**

#### 4.2.3.2 亚硝酸氮浓度渐变后感染WSSV对WSSV在凡纳滨对虾体内增殖影响整个实验过程中，不同亚硝酸氮浓度下感染WSSV在0 h~24 h病毒含量低

于5.5×10 4 copies/g(*P*> 0.05)，48 h后病毒增殖速度加快，高浓度20 mg/L组病毒含量明显高于另两组（*P*<0.05），72 h~96 h病毒含量继续升高，见表4-3。

**表4-3 不同亚硝酸氮浓度对WSSV在凡纳滨对虾体内增殖的影响**

**Tab.** **4-3** Effect of different concentration nitrite-N on WSSV copy number in ***L. vannamei***

Infected with WSSV

| 时间（h） | 亚硝酸氮浓度  (mg/L) |  | WSSV 携带量（copies/g） | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 极小值 | 极大值 | 均值 | 标准差 |
|  | 0.05 | 1.2×10 1 | 5.3×10 1 | 3.0×10 1 | 2.1×10 1 |
| 0 | 10 | 5.6×10 2 | 9.3×10 3 | 3.5×10 3 | 5.1×10 3 |
|  | 20 | 2.5×10 2 | 3.0×10 3 | 1.4×10 3 | 1.4×10 3 |
|  | 0.05 | 9.0×10 1 | 2.2×10 2 | 1.4×10 2 | 6.5×10 1 |
| 6 | 10 | 3.3×10 2 | 6.8×10 2 | 5.1×10 2 | 1.8×10 2 |
|  | 20 | 3.8×10 2 | 2.4×10 3 | 1.1×10 3 | 1.2×10 3 |
|  | 0.05 | 6.5×10 1 | 2.8×10 2 | 1.5×10 2 | 1.1×10 2 |
| 12 | 10 | 3.1×10 3 | 2.1×10 4 | 9.9×10 3 | 9.8×10 3 |
|  | 20 | 4.6×10 2 | 1.3×10 4 | 6.0×10 3 | 6.5×10 3 |
|  | 0.05 | 7.8×10 2 | 2.2×10 3 | 1.4×10 3 | 7.1×10 2 |
| 24 | 10 | 4.4×10 2 | 5.3×10 3 | 3.5×10 3 | 2.7×10 3 |
|  | 20 | 7.0×10 3 | 1.1×10 5 | 5.5×10 4 | 5.3×10 4 |
|  | 0.05 | 9.6×10 3 | 5.7×10 4 | 2.7×10 4 | 2.6×104 |
| 48 | 10 | 1.1×10 4 | 4.8×10 4 | 3.0×10 4 | 1.9×10 4 |
|  | 20 | 3.7×10 4 | 1.2×10 5 | 8.7×10 4 | 4.5×10 4 |
|  | 0.05 | 7.3×10 3 | 1.3×10 4 | 9.8×10 4 | 2.8×10 3 |
| 72 | 10 | 5.6×10 4 | 3.2×10 5 | 1.5×10 5 | 1.5×10 5 |
|  | 20 | 3.8×10 4 | 1.5×10 6 | 7.2×10 5 | 7.3×10 5 |
|  | 0.05 | 3.9×10 3 | 1.4×10 4 | 9.2×10 4 | 5.2×10 3 |
| 96 | 10 | 4.6×10 4 | 5.3×10 5 | 2.2×10 5 | 2.7×10 5 |
|  | 20 | 3.2×10 5 | 5.9×10 6 | 2.3×10 6 | 3.1×10 6 |

### 4.2.4 先感染WSSV后亚硝酸氮浓度渐变实验结果

#### 4.2.4.1 亚硝酸氮浓度渐变对携带WSSV的凡纳滨对虾死亡情况的影响

整个实验过程中，对虾累积死亡率在24 h时起始浓度0.05mg/L组与高浓度20mg/L组存在显著差异（*P*<0.05）,48 h~120 h起始浓度0.05mg/L组累积死亡率明显低于高浓度20 mg/L组和中浓度10 mg/L组（*P*<0.05），且起始浓度0.05mg/L组累积死亡率最大值50.0%低于高浓度20 mg/L组的66.7%和中浓度10 mg/L组的63.3%，见图4-4。



**图 4-4** **先感染WSSV后亚硝酸氮渐变对对虾累积死亡率的影响**

**Fig.** **4-4** Effect of nitrite-N gradual change stresses on cumulative mortality rate **of *L. Vannamei* infected with WSSV**

#### 4.2.4.2 亚硝酸氮浓度渐变对携带WSSV的凡纳滨对虾体内病毒增殖的影响

整个实验过程中，不同亚硝酸氮浓度下的病虾体内携带病毒量随时间推移而逐渐增多，6 h各组之间病毒携带量无显著差异，至12 h、24 h、48 h起始浓度

0.05 mg/L组与高浓度20 mg/L渐变组存在显著差异（*P*<0.05），且亚硝酸氮浓度升高，病毒扩增明显加快，对虾体内病毒携带量随之增加；至72 h~96 h后各组病毒携带量维持较高水平，达到4.2×10 5 copies/g~7.3×10 6 copies/g，见表4-4。

**表 4-4** **亚硝酸氮浓度渐变对携带WSSV的凡纳滨对虾体内病毒增殖的影响**

**Tab.** **4-4** Effect of nitrite-N gradual change stresses on WSSV copy number of ***L. Vannamei***

Infected with WSSV

| 时间（h） | 亚硝酸氮浓度  (mg/L) | WSSV 携带量（copies/g） | | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 极小值 | 极大值 | 均值 | 标准差 |
|  | 0.05 | 2.4×10 2 | 9.9×10 2 | 6.6×10 2 | 3.9×10 2 |
| 0 | 10 | 2.4×10 2 | 1.2×10 3 | 7.3×10 2 | 4.6×10 2 |
|  | 20 | 1.0×10 2 | 4.1×10 2 | 2.7×10 2 | 1.6×10 2 |
|  | 0.05 | 1.7×10 2 | 9.1×10 2 | 6.5×10 2 | 4.1×10 2 |
| 6 | 10 | 4.5×10 2 | 9.9×10 3 | 4.1×10 3 | 5.1×10 3 |
|  | 20 | 2.8×10 3 | 1.2×10 4 | 6.9×10 3 | 4.6×10 3 |
|  | 0.05 | 1.2×10 3 | 1.7×10 3 | 1.4×10 3 | 2.9×10 2 |
| 12 | 10 | 1.0×10 4 | 6.9×10 4 | 4.2×10 4 | 3.0×10 4 |
|  | 20 | 3.5×10 4 | 1.2×10 5 | 6.8×10 4 | 4.5×10 4 |

**续表4-4亚硝酸氮浓度渐变对携带WSSV的凡纳滨对虾体内病毒增殖的影响**

**Continued tab. 4-4** Effect of nitrite-N gradual change stresses on WSSV copy number of ***L.***

***Vannamei* infected with WSSV**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 时间（h） | 亚硝酸氮浓度  (mg/L) | WSSV 携带量（copies/g） | | |  |
| 极小值 | 极大值 | 均值 | 标准差 |
|  | 0.05 | 7.4×10 3 | 1.4×10 4 | 1.1×10 4 | 3.4×10 3 |
| 24 | 10 | 1.1×10 5 | 1.5×10 6 | 7.2×10 5 | 7.0×10 5 |
|  | 20 | 3.0×10 5 | 5.2×10 6 | 3.4×10 6 | 2.7×10 6 |
|  | 0.05 | 1.3×10 5 | 6.0×10 5 | 4.4×10 5 | 2.7×10 5 |
| 48 | 10 | 1.2×10 7 | 4.2×10 7 | 2.7×10 7 | 1.5×10 7 |
|  | 20 | 6.7×10 6 | 1.6×10 7 | 1.1×10 7 | 4.7×10 6 |
|  | 0.05 | 3.1×10 6 | 6.9×10 6 | 4.7×10 6 | 1.9×10 6 |
| 72 | 10 | 3.0×10 6 | 1.1×10 7 | 6.2×10 6 | 4.0×10 6 |
|  | 20 | 4.1×106 | 1.1×10 7 | 7.3×10 6 | 3.5×10 6 |
|  | 0.05 | 2.2×10 5 | 2.4×10 6 | 1.1×10 6 | 1.1×10 6 |
| 96 | 10 | 3.4×10 5 | 5.2×10 5 | 4.2×10 5 | 9.1×10 4 |
|  | 20 | 6.5×10 5 | 1.7×10 6 | 1.2×10 6 | 5.5×10 5 |

## 4.3 讨论

亚硝酸氮是影响虾类养殖重要的环境胁迫因子之一，亚硝酸氮高浓度可明显影响凡纳滨对虾的生长和生存[[64]](#_bookmark124)。有研究报道亚硝酸氮对机体产生毒害作用机理是由于亚硝酸氮进入对虾体内后，使血淋巴中氧合血蓝蛋白转为脱氧血蓝蛋白，对氧亲和力降低，输氧能力下降，使机体因为缺氧产生损伤[[67]](#_bookmark127)。有研究表明亚硝酸盐氮在水体中含量过高时会引起中国对虾(*Penaeus chinesis*)体内血细胞数减少，血清中有关免疫的酶活力（PO、ACP、SOD、POD等）下降[[68]](#_bookmark128)；也引起日本对虾(*Penaeus japonicus*)和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)抗病能力下降，血细胞吞噬活力降低，使虾对病原体的易感性提高[[69-71]](#_bookmark129)。

亚硝酸氮浓度突变实验中发现亚硝酸氮浓度突变对健康凡纳滨对虾的存活影响显著，往高浓度20 mg/L突变累积死亡率明显高于其他组，随着实验时间延长，虾的累积死亡率逐渐升高，说明在亚硝酸氮高浓度胁迫下，对对虾机体造成严重损伤，随着时间延长，死亡增多。亚硝酸氮浓度突变后感染WSSV实验中发现至24 h各组对虾累积死亡率低于12.0%，病毒携带量至24 h为2.7×10 3~ 1.2×10 4 copies/g低于简旭凤[[51]](#_bookmark116)报道的对虾死亡时携带病毒量1×10 5 copies/g，所以未出现大量死亡。48 h开始出现死亡高峰，48 h至实验结束起始浓度0.05 mg/L感染组累积死亡率明显低于另两突变感染组（*P*<0.05），且整个实验过程中亚硝酸氮高浓度20 mg/L组病毒增殖比其它两组快。亚硝酸氮浓度突变使对虾抗病力下降，使对虾感染WSSV，致使对虾死亡。感染WSSV后亚硝酸氮浓度突变实验中24 h高浓度20 mg/L感染组累积死亡率明显高于另两感染组，至48 h后起始浓度0.05 mg/L明显低于浓度突变感染组累积死亡率。此结果与陈怀文报道的携带WSSV对虾累积死亡率随亚硝酸氮浓度升高而升高的结果相符[[72]](#_bookmark130)。病毒检测结果在12 h 时病毒携带量为1.1×10 3~7.0×10 4 copies/g，但24 h 后升高到

## 4.3 ×104~3.3×10 6 copies/g，此时对虾死亡明显加快，48 h后病毒含量已经高于简

旭凤[[51]](#_bookmark116)报道的对虾感染WSSV死亡时携带病毒的数量1×10 5 copies/g，对虾出现大量死亡。综上可知，亚硝酸氮浓度突然升高，会降低健康对虾的抗病能力，提高对虾对病原体的易感性，同时会引起病虾与病原体之间关系发生变化，使

WSSV从潜伏感染转为急性感染，并缩短发病时间，造成对虾大量死亡。

两亚硝酸氮浓度渐变实验中发现各组对虾累积死亡率随亚硝酸氮浓度升高而升高；亚硝酸氮浓度渐变后感染WSSV实验结果发现0 h~24 h各盐度组对虾累积死亡率无明显差异，至48 h高浓度20 mg/L渐变组与其它组存在显著差异

（*P*<0.05），且0 h~24 h内检测到对虾体内的病毒含量较低，48 h的病毒含量明显升高，但也低于简旭凤[[51]](#_bookmark116)报道对虾感染WSSV粗提液后死亡时携带病毒的数量超过1×10 5 copies/g，所以未见大量对虾死亡，可能原因是亚硝酸氮胁迫时间较短，对虾的免疫系统对亚硝酸氮浓度胁迫有一定的抵抗能力，所以在前期感染WSSV对虾累积死亡率不高。至72 h后对虾累积死亡率迅速升高，且72 h病毒在对虾体内出现增殖高峰期，渐变浓度为10 mg/L,、20 mg/L两组病毒含量为1.5×10 5~2.3×10 6 copies/g，这与孙成波等研究的斑节对虾在高位池养殖过程中体

内病毒含量（9.5×10 5 copies/g）相似[[53]](#_bookmark118)，说明随着亚硝酸氮浓度胁迫时间延长，浓度升高，会引起对虾免疫功能下降。感染WSSV后亚硝酸氮浓度渐变实验中发现至24 h累积死亡率就出现显著差异，此时病毒扩增加快，高浓度20 mg/L组明显高于起始浓度0.05 mg/L组，48 h出现死亡高峰，且起始浓度0.05 mg/L感染组累积死亡明显低于两浓度渐变感染组（*P*<0.05），病毒含量只在48 h起始浓度0.05 mg/L组与高浓度20 mg/L渐变组有显著差异，之后没有显著差异，造成这样的结果可能是对虾机体已经受到WSSV侵染，机体已经受到严重损伤。

综上说明一定亚硝酸氮浓度范围内对对虾毒性可能不大，但是长时间处于一定亚硝酸氮浓度胁迫下会引起对虾慢性中毒，同时降低对虾的免疫力，提高对病原体的易感性，还会使机体受到损伤，严重的会引起死亡。携带WSSV对虾对亚硝酸氮的抵抗能力明显降低，亚硝酸氮浓度升高为WSSV在对虾体内快速增殖创造了条件，促使WSSV从潜伏感染转为急性感染。

# 5 不同温度下副溶血弧菌和白斑综合症病毒对凡纳滨对虾的致病性

凡纳滨对虾是一种广温广盐热带经济虾，具有肉质鲜美，含肉率高，便于运输等优点，已成为世界最主要的对虾养殖品种之一[[65]](#_bookmark125)。，随着养殖规模扩大，养殖环境随之恶化，引起各类疾病爆发，如白斑综合症、桃拉病、红体病、红腿病、烂鳃病等[[73,](#_bookmark131) [74]](#_bookmark132)。白斑综合症是有一种宿主广泛，传染性机强，对虾高致死性病毒引起，称为白斑综合症病毒。很多研究发现引起白斑综合症爆发与虾体免疫水平，感染方式，环境因子（温度、盐度、pH值、氨氮含量等）等有关[[37,](#_bookmark102) [38]](#_bookmark103)。如高温或者低温可抑制WSSV的增殖。副溶血弧菌（*Vibrio prahaemolyticus*）属革兰氏阴性菌，嗜温性，嗜盐性，细菌数目会随着水温度升高而增加。对虾中的红体病、红腿病、败血症是因副溶血弧菌感染引起的，且发病迅速，死亡率高。曾多次导致凡纳滨对虾幼虾大面积死亡[[75,](#_bookmark133) [76]](#_bookmark134)。有人认为副溶血弧菌的胞外产物具有多种酶活性和溶血活性，可能是其对对虾致病的主要原因[[77](#_bookmark135)]。翟秀梅等[[78](#_bookmark136)]认为凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后，引起对虾免疫机能损伤，导致防病、抗病能力下降，加重对虾患病，死亡。本文研究在不同温度条件下合并注射感染WSSV和不同浓度的副溶血弧菌，探讨在不同温度下副溶血弧菌和WSSV对凡纳滨对虾的致病性，对对虾养殖健康可持续发展有重要指导意义。

## 5.1 材料与方法

### 5.1.1 实验材料

#### 5.1.1.1 健康对虾来源同2.1.1.1。

#### 5.1.1.2 菌株

实验用副溶血弧菌（*Vibrio prahaemolyticus*）、鳗弧菌（*V. anguillarum*）、哈维氏弧菌由西北农林科技大学刘小林教授提供，经接种、活化培养24 h后，用无菌PBS缓冲液稀释制备菌悬液菌。

5.1.1.3 WSSV粗提液制备同2.1.1.2.

5.1.1.4 DNA模板提取和引物设计同2.1.1.3.

5.1.1.5标准品的制备同2.1.1.4.

### 5.1.2 实验方法

5.1.2.1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40μl病原缓冲液（单独感染注射液：含1.1×10 3 copies/μl的病毒稀释液，

3种含5.8×10 5 cfu/ml、5.8×10 4 cfu/ml、5.8×10 3 cfu/ml的副溶血弧菌菌悬液；3

种合并感染注射液：含1.1×10 3 copies/μl 的病毒稀释液分别与3 种含5.8×10 5

cfu/ml、5.8×10 4 cfu/ml、5.8×10 3 cfu/ml的副溶血弧菌菌悬液混合)。

#### 5.1.2.2 温度对感染不同浓度副溶血弧菌和WSSV的凡纳滨对虾的影响

将实验对虾分别培养在19±1℃、25±1℃、31±1℃有60 L水的0.1 m3塑料桶中，实验组分为合并感染组（合并感染WSSV与副溶血弧菌）与单独感染组（单独感染WSSV，单独感染3种浓度的副溶血弧菌）各组均设置3个平行，每组对

虾各30尾，对照组注射40μl PBS缓冲液。实验中投喂对虾人工配合饵料2次/d，24 h充气，定时吸出排泄物，日换水量20%。及时取出死亡对虾放入-20℃冰箱保存。各组在感染后0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 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。

#### 5.1.2.3 病毒检测方法同2.1.2.3。

## 5.2 实验结果

### 5.2.1 温度19±1 ℃下对感染WSSV和副溶血弧菌的凡纳滨对虾的影响

#### 5.2.1.1 温度19±1 ℃下感染WSSV和副溶血弧菌凡纳滨对虾的死亡情况

当温度为19±1℃时，单独感染不同浓度的副溶血弧菌和WSSV与合并感染两种病原对凡纳滨对虾的累积死亡率影响不显著（*P*> 0.05），且至实验结束各组累积死亡率都低于最大值11.1%，见图5-1。



**图 5-1** **温度19±1℃对感染副溶血弧菌及WSSV的凡纳滨对虾的影响**

**Fig.** **5-1** Impact of ***Vibrio prahaemolyticus* and WSSV infected *Litopenaeus vannamei* at 19±1 ℃**

#### 5.2.1.2 温度19±1℃下感染WSSV和副溶血弧菌对凡纳滨对虾携带WSSV影响当温度为19±1 ℃，整个实验过程中单独感染WSSV与合并感染对对虾体内

携带病毒量影响不显著，且各组病毒携带量都低于1.2×10 3 copies/g，见表5-1。

**表 5-1** **温度19±1℃下感染不同细菌浓度对凡纳滨对虾病毒携带量的影响**

Tab. 5-1 Effects on amount of virus in L. Vannamei of infected Different concentrations of bacterial at 19±1 ℃

| 时间  （h） | WSSV 携带量（copies/g） | | | | | |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 5.8×10 5 cfu/ml | | 5.8×10 4 cfu/ml | | 5.8×10 3 cfu/ml | | 0 cfu/ml | |
| 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 |
| 0 | 4.3×10 2 | 2.9×10 2 | 1.2×10 2 | 2.6×10 1 | 1.7×10 2 | 1.9×10 2 | 7.5×10 2 | 1.7×10 2 |
| 6 | 5.2×10 2 | 3.9×10 2 | 1.2×10 2 | 2.3×10 1 | 6.7×10 1 | 1.9×10 1 | 3.6×10 2 | 5.6×10 1 |
| 12 | 5.7×10 1 | 2.5×10 1 | 2.8×10 2 | 1.5×10 2 | 1.3×10 2 | 4.0×10 1 | 3.0×10 1 | 2.2×10 1 |
| 24 | 1.2×10 3 | 9.5×10 2 | 1.2×10 2 | 5.2×10 1 | 1.2×10 2 | 9.3×10 1 | 6.3×10 2 | 1.1×10 3 |
| 48 | 6.4×10 2 | 3.2×10 2 | 1.3×10 2 | 5.1×10 1 | 1.3×10 2 | 5.2×10 1 | 1.4×10 2 | 1.2×10 1 |
| 72 | 1.2×10 2 | 1.0×10 2 | 2.7×10 2 | 1.3×10 2 | 1.1×10 2 | 6.2×10 1 | 8.6×10 2 | 9.6×10 2 |
| 96 | 3.3×10 2 | 5.6×10 2 | 1.9×10 1 | 1.1×10 0 | 1.9×10 1 | 1.3×10 1 | 3.9×10 2 | 3.3×10 2 |

### 5.2.2 温度25±1 ℃对感染WSSV和副溶血弧菌的凡纳滨对虾的影响

#### 5.2.2.1 温度25±1 ℃下感染WSSV和副溶血弧菌凡纳滨对虾的死亡情况

当温度为25±1 ℃时，0 h~24 h各组的累积死亡率低于5.6%（*P*> 0.05），至48 h只感染WSSV组对虾累积死亡率最大为21.1%，且与其他组存在显著差异性

（*P*<0.05），空白对照组和副溶血弧菌浓度为5.8×10 3 cfu/ml单独感染组与其他组存在显著差异（*P*<0.05）；至72 h~96 h所有感染WSSV组与未感染WSSV组存在显著差异（*P*<0.05），感染WSSV组最大值为63.3%，远大于未感染WSSV组最大值21.1%，其中在96 h未感染WSSV所有组中各副溶血弧菌浓度组之间存在显著差异（*P*<0.05），5.8×10 5 cfu/ml 感染浓度组最大21.1%显著大于5.8×10 3

cfu/ml组的3.3%和空白对照组的5. 6%，见图5-2.



**图 5-2** **温度25±1℃对感染副溶血弧菌及WSSV的凡纳滨对虾的影响**

**Fig.** **5-2** Impact of ***Vibrio prahaemolyticus* and WSSV infected *Litopenaeus vannamei* at 25±1 ℃**

#### 5.2.2.2 温度25±1℃下感染WSSV和副溶血弧菌对凡纳滨对虾携带WSSV影响整个实验过程中，12 h~96 h单独感染WSSV组病毒携带量明显高于合并感

染组（*P*<0.05），合并感染组病毒携带量在72 h才开始增加，前期保持在较低水平，见表5-2。

**表 5-2** **温度25±1℃下感染不同细菌浓度对凡纳滨对虾病毒携带量的影响**

Tab. 5-2 Effects on amount of virus in L. Vannamei of infected Different concentrations of bacterial at 25±1 ℃

| 时间  （h） | WSSV 携带量（copies/g） | | | | | |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 5.8×10 5 cfu/ml | | 5.8×10 4 cfu/ml | | 5.8×10 3 cfu/ml | | 0 cfu/ml | |
| 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 |
| 0 | 1.8×10 1 | 1.2×10 1 | 5.6×10 0 | 1.0×10 0 | 1.7×10 1 | 4.8×10 0 | 2.8×10 2 | 2.3×10 2 |
| 6 | 1.8×10 1 | 6.0×10 0 | 6.8×10 0 | 1.6×10 0 | 1.7×10 1 | 5.9×10 0 | 1.1×10 2 | 9.7×10 1 |
| 12 | 1.4×10 1 | 3.7×10 0 | 1.5×10 1 | 1.9×10 0 | 2.4×10 1 | 9.6×10 0 | 1.4×10 2 | 9.5×10 1 |
| 24 | 1.8×10 1 | 8.4×10 0 | 1.4×10 1 | 2.4×10 0 | 1.9×10 1 | 5.7×10 0 | 6.0×10 2 | 3.5×10 2 |
| 48 | 2.5×10 2 | 1.4×10 2 | 2.3×10 1 | 1.1×10 1 | 5.5×10 1 | 1.7×10 1 | 1.9×10 5 | 7.9×10 4 |
| 72 | 4.2×10 2 | 8.7×10 1 | 1.1×10 2 | 3.8×10 1 | 1.5×10 1 | 4.8×10 1 | 2.3×10 4 | 3.3×10 3 |
| 96 | 5.7×10 4 | 1.9×10 4 | 2.5×10 4 | 9.3×10 4 | 2.3×10 4 | 1.1×10 4 | 1.3×10 4 | 2.0×10 4 |

### 5.2.3 温度31±1℃对感染WSSV和副溶血弧菌的凡纳滨对虾的影响

#### 5.2.3.1 温度31±1 ℃下感染WSSV和副溶血弧菌的凡纳滨对虾的死亡情况

当温度为31±1℃时，0 h~24 h各组的累积死亡率低于7.8%，至48 h合并感染组对虾累积死亡率与其他组存在显著差异性（*P*<0.05），其中合并感染浓度为5.8×10 4 cfu/ml组最大值为27.8%；至72 h~96 h各组存在显著差异（*P*<0.05），合并感染浓度为5.8×10 5 cfu/ml组累积死亡率达到最大为77.8%，远大于单独感染WSSV组的47.8%，见图5-3。



**图 5-3** **温度31±1℃对感染副溶血弧菌及WSSV的凡纳滨对虾的影响**

**Fig.** **5-3** Impact of ***Vibrio prahaemolyticus* and WSSV infected *Litopenaeus vannamei* at 31±1 ℃**

5.2.3.2温度31±1 ℃下感染WSSV和副溶血弧菌对凡纳滨对虾携带WSSV影响

整个实验过程中，6 h开始合并感染组病毒扩增明显快于单独感染WSSV组，24 h~48 h合并感染浓度为5.8×10 5 cfu/ml明显高于其它三组（*P*<0.05），72 h~96 h合并感染组病毒携带量维持在较高水平，且明显高于单独感染WSSV组，见表5-3。

**表 5-3** **温度31±1℃下感染不同细菌浓度对凡纳滨对虾病毒携带量的影响**

Table 5-3 Effects on amount of virus in L. Vannamei of infected Different concentrations of bacterial at 31±1 ℃

| 时间  （h） | WSSV 携带量（copies/g） | | | | | |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 5.8×10 5 cfu/ml | | 5.8×1 04 cfu/ml | | 5.8×10 3 cfu/ml | | 0 cfu/ml | |
| 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 |
| 0 | 6.2×10 2 | 1.9×10 2 | 4.9×10 2 | 3.3×10 2 | 3.1×10 2 | 3.4×10 1 | 3.7×10 2 | 2.9×10 2 |
| 6 | 4.6×10 3 | 3.9×10 3 | 1.3×10 3 | 7.4×10 2 | 9.6×10 2 | 1.8×10 2 | 1.1×10 2 | 1.0×10 2 |
| 12 | 6.6×10 3 | 4.6×10 3 | 2.4×10 3 | 1.0×10 3 | 1.8×10 3 | 5.2×10 2 | 4.6×10 1 | 7.6×10 0 |
| 24 | 2.6×10 5 | 1.9×10 5 | 5.0×10 3 | 2.0×10 3 | 8.1×10 3 | 5.7×10 3 | 2.8×10 2 | 6.1×10 1 |
| 48 | 3.3×10 5 | 6.1×10 4 | 5.3×10 4 | 4.0×10 4 | 1.2×10 4 | 1.4×10 4 | 2.2×10 4 | 1.1×10 4 |
| 72 | 3.9×10 5 | 2.4×10 5 | 2.2×10 5 | 1.0×10 5 | 1.4×10 5 | 4.2×10 4 | 1.5×10 3 | 1.1×10 3 |
| 96 | 3.7×10 5 | 1.1×10 5 | 1.3×10 5 | 2.2×10 4 | 8.3×10 4 | 1.0×10 4 | 4.5×10 2 | 3.4×10 2 |

## 5.3 讨论

温度作为最重要的环境因子之一，温度不仅直接影响对虾的新陈代谢、抗病能力、进食、生存发育。还对病毒在对虾体内增殖有重要影响。李侃等[[79]](#_bookmark137)研究报道病毒在温度为21～30℃之间增殖最快，而当温度低于20℃或超过30℃时，病毒的增殖速度受到部分抑制。Du H等[[80]](#_bookmark138)报道虾体内病毒携带量在低温10±1℃条件下明显低于24±1℃条件下，说明低温可以抑制WSSV在虾体内增殖。Jira等[[26]](#_bookmark91)报道将感染WSSV的垂死小龙虾从水温为22℃转移至16℃水温可以延缓小龙虾的死亡，说明低温可降低WSSV对小龙虾的致病性。Rahman等[[81]](#_bookmark139)研究报道在对虾感染WSSV前期，高温33℃可以延缓疾病爆发，有效降低对虾死亡率，抑制WSSV在对虾体内增殖；Du H等[[40]](#_bookmark105)通过实验也证明高温(33℃)可以延长病虾存活时间。温度同样影响弧菌的生长和致病性，如哈维氏弧菌在低于28℃或高于32℃条件下的生长速度和对幼虾的致死率都随之下降[[82](#_bookmark140)]。温度还通过影响弧菌粘附作用基因的表达和胞外产物的毒力活性影响弧菌的致病性。如杀对虾弧菌在高于30℃条件下产生的胞外产物无毒性，但较低温度下产生的胞外产物有毒力[[83,](#_bookmark141)[84]](#_bookmark142)。Sudha P M等[[48]](#_bookmark113)已将WSSV与对虾的关系分为3种：一种为前期急性感染，机体高度感染WSSV, 2-3 d大面积死亡；一种为急性和亚急性感染，机体中度或高度感染WSSV, 7-10 d出现高死亡率；最后一种为慢性感染（潜伏感染），机体轻微感染，15-28 d出现死亡。有研究说明虾体感染细菌后会打破细胞内水与离子含量平衡，促使细胞肿大，破坏细胞氧化酶系统，供能不足，引起物质代谢障碍和细胞功能下降[[85]](#_bookmark143)。

在温度为19±1℃条件下，各组累积死亡率都低于11.1%。病毒携带量检测结果中发现随着时间延长，各组病毒含量无明显变化，各组的病毒含量低于1.2×10 3 copies/g，与李侃等[[79]](#_bookmark137)研究报道温度降到8℃和20℃后，20d内感染WSSV的鳌虾每毫克组织内病毒含量维持在1×10 2拷贝的结果相似。且所有副溶血弧菌单独感染组同样未出现大量死亡。此结果表明：低温条件下两种病原体在对虾体内的生长受到抑制。管越强等[[86]](#_bookmark144)报道水温处于低温（15℃）对日本对虾体内WSSV的增殖有抑制作用。

在温度25±1℃条件下，0 h~24 h各组的累积死亡率低于5.6%(*P*> 0.05)，48 h单独感染WSSV组的累积死亡率高于合并感染组，72 h出现死亡高峰（*P*> 0.05）。弧菌单独感染组至72 h累积死亡低于14.4%，但至96 h随着感染浓度增加而升高，最高为21.1%（*P*<0.05）。病毒携带量检测结果中发现合并感染组在12h~72 h病毒携带量低于4.2×10 2 copies/g，明显低于单独感染WSSV组，96 h明显增多高于2.5×10 4 copies/g。以上结果可知在25±1℃温度条件下，单独感染WSSV组实验结果与李侃等报道的在27℃条件下螯虾体内WSSV增殖最快结果相符。但合并感染结果刚好相反，48 h~72 h死亡率高，病毒携带量低。原因可能是在WSSV感染初期副溶血弧菌引起WSSV侵染对虾组织细胞能力下降，促使WSSV增殖速度下降。李侃等认为WSSV在对虾体内增殖速度受到感染初期病毒侵染对虾组织细胞能力高低的直接影响[[79]](#_bookmark137)。副溶血弧菌单独感染结果可知在25±1℃温度条件下副溶血弧菌致病力随感染浓度升高而升高，但在实验设计的浓度下致死率不高低于21.1%。所以致使合并感染死亡率在48 h~72 h出现高增长的原因是副溶血弧菌和WSSV两者共同作用的结果。

在温度31±1℃条件下，0 h~24 h各组的累积死亡率低于7.8%（*P*> 0.05），但对虾体内病毒增殖速度明显比单独感染WSSV组快，48 h后合并感染组中累积死亡率随浓度升高而升高，且合并感染组明显高于单独感染组，病毒含量同样高于单独感染WSSV组。说明温度31±1℃下，单独感染WSSV组对虾体内WSSV增殖受到一定程度的抑制，与Du H等[[40]](#_bookmark105)报道的温度33℃可延长病虾存活时间及管越强等[[86]](#_bookmark144)报道在高温33℃对日本囊对虾体内WSSV的增殖有抑制作用相符。合并感染组累积死亡率和病毒增殖情况刚好跟他们报道的相反，温度对WSSV增殖似乎已经没有抑制作用。对于高温的抑制作用机理还不清楚，但有几种说法，有报道认为高温可能引起感染宿主细胞加速凋亡[[87]](#_bookmark145)；还有研究表明温度升高会引起甲壳动物体内血细胞数增加，酚氧化酶原系统被激活，提高对虾免疫水平[[23,](#_bookmark88)[88-90]](#_bookmark146)；已有研究报道高温对多数昆虫病毒有一定抑制作用，推测高温也能影响

WSSV复制的多个环节[[91,](#_bookmark148) [92]](#_bookmark149)。合并感染组中WSSV的增殖未受到温度31±1℃影响，而且研究报道弧菌致病力受温度影响，随着温度升高，副溶血弧菌生长加快，

致病力也升高[[93]](#_bookmark150)，导致对虾因高温而提高的免疫力急剧下降，进而提高了WSSV侵染对虾细胞组织能力，促使WSSV在对虾体内迅速增殖。与在高温可能抑制WSSV复制的某些环节推测不符，但无法否定此推测，还需生化分子有关实验研究证明。

综上，副溶血弧菌对凡纳滨对虾的致病随温度升高而升高；WSSV对凡纳滨对虾的致病在温度25±1℃下致病力最高；副溶血弧菌和WSSV合并感染，副溶血弧菌会引起WSSV在对虾体内增殖，缩短白斑综合症爆发的时间，所以合并感染引起WSSV对凡纳滨对虾致病力随温度升高而升高。

# 6 不同温度条件下鳗弧菌和白斑综合症病毒对凡纳滨对虾的致病性

凡纳滨对虾是一种广温广盐热带经济虾，具有肉质鲜美，含肉率高，便于运输等优点，已成为世界最主要的对虾养殖品种之一[[65]](#_bookmark125)。，随着人工养殖密度越来越大，养殖环境随之恶化，受到多种病害威胁，如白斑综合症、弧菌病等[[73,](#_bookmark131) [74]](#_bookmark132)。而且人工养殖过程中，养殖动物感染的病原体可能不仅仅只有一种，可能有两种或多种[[94-96]](#_bookmark151)。当水体中细菌数量增多，也为第二次感染提供机会。鳗弧菌（*Vibrio*

*anguillarum*）属革兰氏阴性菌，是一种条件致病菌，如果养殖环境水恶化，引起

鳗弧菌数量增多，致使对虾疾病发生。白斑综合症是由一种宿主广泛，传染性机强，对虾高致死性病毒引起，称为白斑综合症病毒。有研究发现各种疾病爆发与虾体免疫水平，感染方式，环境因子（温度、盐度、pH值、氨氮含量等）等有关[[37,](#_bookmark102) [38]](#_bookmark103)。如氨氮浓度提高会提高对虾对弧菌的易感性[[97](#_bookmark152)]。高温或者低温可以抑制WSSV在对虾体内增殖[[26,](#_bookmark91) [39]](#_bookmark104)。本文研究在不同温度条件下合并注射感染及单独注射感染WSSV和不同浓度的鳗弧菌，探讨在不同温度下鳗弧菌和WSSV对凡纳滨对虾的致病性，对对虾养殖健康可持续发展有重要指导意义。

## 6.1 材料与方法

### 6.1.1 实验材料

#### 6.1.1.1 健康对虾来源同2.1.1.1。

#### 6.1.1.2 菌株

同5.1.1.2.

6.1.1.3 WSSV粗提液制备同2.1.1.2.

6.1.1.4 DNA模板提取和引物设计同2.1.1.3.

6.1.1.5标准品的制备同2.1.1.4.

### 6.1.2 实验方法

#### 6.1.2.1 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40μl病原缓冲液（3种合并感染注射液：含1×10 3 copies/μl的病毒稀释液

分别与3种含2.3×10 6 cfu/ml、2.3×10 5 cfu/ml、2.3×10 4 cfu/ml的鳗弧菌菌悬液混

合；单独感染注射液：含1×10 3 copies/μl的病毒稀释液，3种含2.3×10 6 cfu/ml、

2.3×10 5 cfu/ml、2.3×10 4 cfu/ml的鳗弧菌菌悬液)。

#### 6.1.2.2 温度对感染不同浓度鳗弧菌和WSSV的凡纳滨对虾的影响

将实验对虾分别培养在19±1℃、25±1℃、31±1℃有60 L水的0.1 m3塑料桶中，实验组分为合并感染组（合并感染WSSV与鳗弧菌）与单独感染组（单独感染WSSV，单独感染3种浓度的鳗弧菌），各组均设置3个平行，每组对虾各

30尾，对照组注射40μl PBS缓冲液。实验中投喂对虾人工配合饵料2次/d，24 h充气，定时吸出排泄物，日换水量20%。及时取出死亡对虾放入-20℃冰箱保存。各组在感染后0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 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。

#### 6.1.2.3 病毒检测方法同2.1.2.3。

## 6.2 实验结果

### 6.2.1 温度19±1 ℃下WSSV和鳗弧菌对凡纳滨对虾的致病性

#### 6.2.1.1 温度19±1 ℃下感染WSSV和鳗弧菌对凡纳滨对虾死亡情况的影响

当温度为19±1℃时，单独感染不同浓度的鳗弧菌和WSSV与合并感染两种病原对凡纳滨对虾的累积死亡率影响不显著，且至实验结束各组累积死亡率都低于最大值7.8%，见图6-1。



**图 6-1** **温度19±1℃对感染鳗弧菌及WSSV的凡纳滨对虾的影响**

**Fig.** **6-1** Impact of ***Vibrio anguillarum* and WSSV infected *Litopenaeus vannamei* at 19±1 ℃**

#### 6.2.1.2 温度19±1 ℃下感染WSSV和鳗弧菌对凡纳滨对虾携带WSSV的影响整个实验过程中，单独感染WSSV对虾体内携带病毒量与合并感染组在6 h、

48 h、96 h存在显著差异（*P*<0.05），但各组病毒携带量都低于8.6×10 2 copies/g，见表6-1.

**表 6-1** **温度19±1℃下感染不同细菌浓度对凡纳滨对虾病毒携带量的影响**

Tab. 6-1 Effects on amount of virus in L. Vannamei by infected Different concentrations of bacterial at 19±1 ℃

| 时间  （h） | WSSV 携带量（copies/g） | | | | | |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2.3×10 6 cfu/ml | | 2.3×10 5 cfu/ml | | 2.3×10 4 cfu/ml | | 0 cfu/ml | |
| 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 |
| 0 | 9.2×10 0 | 4.5×10 0 | 9.2×10 0 | 3.8×10 0 | 4.4×10 0 | 7.0×10 -1 | 7.5×10 2 | 1.7×10 2 |
| 6 | 1.1×10 1 | 9.5×10 0 | 4.0×10 1 | 1.7×10 1 | 5.4×10 1 | 1.9×10 1 | 3.6×10 2 | 5.6×10 1 |
| 12 | 2.3×10 1 | 1.8×10 1 | 5.0×10 0 | 1.9×10 0 | 1.5×10 2 | 1.5×10 2 | 3.0×10 1 | 2.2×10 1 |
| 24 | 7.4×10 1 | 6.9×10 1 | 1.4×10 1 | 1.9×10 0 | 2.3×10 1 | 7.2×10 0 | 6.3×10 2 | 1.1×10 3 |
| 48 | 1.7×10 1 | 1.9×10 1 | 4.4×10 1 | 7.7×10 0 | 3.6×10 1 | 1.7×10 1 | 1.4×10 2 | 1.2×10 1 |
| 72 | 5.2×10 1 | 2.8×10 1 | 3.2×10 2 | 1.0×10 2 | 6.8×10 1 | 8.0×10 1 | 8.6×10 2 | 9.6×10 2 |
| 96 | 2.3×10 1 | 1.1×10 1 | 2.2×10 1 | 9.2×10 0 | 3.2×10 1 | 3.2×10 1 | 3.9×10 2 | 3.3×10 2 |

### 6.2.2 温度25±1 ℃对感染WSSV和鳗弧菌的凡纳滨对虾的影响

#### 6.2.2.1 温度25±1 ℃下感染WSSV和鳗弧菌对凡纳滨对虾死亡情况的影响

当温度为25±1 ℃，整个实验过程中0 h~24 h各组的累积死亡率低于4.4%

（*P*> 0.05），至48 h感染WSSV组对虾累积死亡率最大为21.1%，至72 h单独感染WSSV组累积死亡率50.0%低于合并感染浓度为2.3×10 6 cfu/ml的61.1%（最大值），高于合并感染浓度为2.3×10 5 cfu/ml的46.7%，这三组的累积死亡率与其

它组存在显著差异（*P*<0.05）。至96 h细菌单独感染浓度为2.3×10 6 cfu/ml显著

高于其它细菌单独感染浓度组和对照组，显著低于合并感染组浓度为2.3×10 6 cfu/ml(77.8%)、2.3×10 5 cfu/ml 61.1%及WSSV单独感染组的63.3%（*P*<0.05），见图6-2。



**图 6-2** **温度25±1℃对感染鳗弧菌及WSSV的凡纳滨对虾的影响**

**Fig.** **6-2** Impact of ***Vibrio anguillarum* and WSSV infected *Litopenaeus vannamei* at 25±1 ℃**

#### 6.2.2.2 温度25±1℃下感染WSSV和鳗弧菌对凡纳滨对虾携带WSSV的影响整个实验过程中，单独感染WSSV对虾体内携带病毒量与合并感染组在24

h、48 h、72 h存在显著差异，至72 h合并感染浓度为2.3×10 6 cfu/ml病毒携带量

显著低于单独感染WSSV组，但明显高于另两合并感染组（*P*<0.05）；至96 h各组病毒携带量差异不显著，维持在较高水平，见表6-2。

**表 6-2** **温度25±1℃下感染不同细菌浓度对凡纳滨对虾病毒携带量的影响**

Tab. 6-2 Effects on amount of virus in L. Vannamei by infected Different concentrations of bacterial at 25±1 ℃

| 时间  （h） |  |  | WSSV 携带量（copies/g） | | | |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2.3×10 6 cfu/ml | | 2.3×10 5 cfu/ml | | 2.3×10 4 cfu/ml | | 0 cfu/ml | |
| 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 |
| 0 | 5.5×10 2 | 2.9×10 2 | 3.3×10 2 | 1.2×10 2 | 2.5×10 2 | 7.0×10 2 | 6.5×10 2 | 5.5×10 2 |
| 6 | 4.0×10 2 | 4.3×10 2 | 1.8×10 2 | 1.2×10 2 | 7.1×10 2 | 3.0×10 2 | 1.1×10 2 | 9.7×10 1 |
| 12 | 5.1×10 2 | 3.3×10 2 | 3.0×10 2 | 2.6×10 2 | 3.5×10 2 | 1.2×10 2 | 1.4×10 2 | 9.5×10 1 |
| 24 | 3.8×10 2 | 4.5×10 2 | 4.3×10 2 | 2.5×10 2 | 6.8×10 2 | 2.5×10 2 | 6.0×10 2 | 3.5×10 2 |
| 48 | 1.3×10 4 | 4.0×10 3 | 5.5×10 2 | 3.1×10 2 | 1.8×10 3 | 6.8×10 2 | 1.9×10 5 | 7.9×10 4 |
| 72 | 6.1×10 4 | 3.0×10 4 | 1.7×10 4 | 3.5×10 3 | 1.2×10 4 | 2.9×10 3 | 2.3×10 4 | 3.3×10 3 |
| 96 | 2.7×10 5 | 1.3×10 5 | 3.5×10 5 | 2.2×10 5 | 5.5×10 4 | 2.8×10 4 | 2.0×10 5 | 1.4×10 5 |

### 6.2.3 温度31±1℃对感染WSSV和鳗弧菌的凡纳滨对虾的影响

#### 6.2.3.1 温度31±1 ℃下感染WSSV和鳗弧菌对凡纳滨对虾死亡情况的影响

当温度为31±1℃，0 h~24 h各组的累积死亡率低于3.3%，至48 h合并感染组中浓度为2.3×10 5 cfu/ml、2.3×10 6 cfu/ml的累积死亡率明显高于其它组；至72 h单独感染WSSV组累积死亡率（37.8%）明显高于空白组（5.6%）和细菌单独感染组浓度为2.3×10 4 cfu/ml(16.7%)、2.3×10 5 cfu/ml（20.0%），显著低于细

菌单独感染组浓度2.3×10 6 cfu/ml（67.7%）和合并感染组浓度为2.3×10 5 cfu/ml

（58.9%）、2.3×10 6 cfu/ml（70.0%），（*P*<0.05）。至96 h单独感染WSSV组累积死亡率（42.2%）只高于空白组和细菌单独感染组浓度为2.3×10 3 cfu/ml，显著低

于其它组的累积死亡率（*P*<0.05），最大值为细菌单独感染浓度为2.3×10 6 cfu/ml

的83.3%，见图6-3.



**图 6-3** **温度31±1℃对感染鳗弧菌及WSSV的凡纳滨对虾的影响**

**Fig.** **6-3** Impact of ***Vibrio anguillarum* and WSSV infected *Litopenaeus vannamei* at 31±1 ℃**

#### 6.2.3.2 温度31±1℃下感染WSSV和鳗弧菌对凡纳滨对虾携带WSSV的影响整个实验过程中，至12 h单独感染WSSV对虾体内携带病毒量显著低于合

并感染组，合并感染浓度为2.3×10 6 cfu/ml组病毒携带量在48 h、72 h、96 h明显高于其他组（*P*<0.05），72 h~96 h单独感染WSSV病毒携带量低于合并感染组对虾体内病毒携带量，见表6-3。

**表 6-3** **温度31±1℃下感染不同细菌浓度对凡纳滨对虾病毒携带量的影响**

Tab. 6-3 Effects on amount of virus in L. Vannamei by infected Different concentrations of bacterial at 31±1 ℃

| 时间  （h） |  |  | WSSV 携带量（copies/g） | | | |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2.3×10 6 cfu/ml | | 2.3×10 5 cfu/ml | | 2.3×10 4 cfu/ml | | 0 cfu/ml | |
| 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 |
| 0 | 1.6×10 2 | 2.2×10 2 | 8.8×10 1 | 1.9×10 1 | 3.3×10 2 | 6.6×10 1 | 3.7×10 2 | 2.9×10 2 |
| 6 | 1.6×10 2 | 2.2×10 2 | 3.2×10 1 | 1.2×10 1 | 2.2×10 1 | 1.4×10 1 | 1.1×10 2 | 1.0×10 2 |
| 12 | 4.3×10 2 | 1.7×10 2 | 1.8×10 3 | 3.0×10 2 | 4.8×10 2 | 1.8×10 2 | 4.6×10 1 | 7.6×10 0 |
| 24 | 7.1×10 4 | 7.7×10 4 | 2.3×10 3 | 1.0×10 3 | 1.6×10 3 | 3.6×10 2 | 2.8×10 2 | 6.1×10 1 |
| 48 | 3.6×10 5 | 2.8×10 5 | 1.4×10 4 | 3.3×10 3 | 1.3×10 4 | 6.2×10 3 | 2.2×10 4 | 1.1×10 4 |
| 72 | 2.4×10 5 | 5.4×10 4 | 1.1×10 5 | 4.1×10 4 | 6.5×10 4 | 3.5×10 4 | 1.5×10 4 | 6.3×10 3 |
| 96 | 9.4×10 4 | 2.8×10 4 | 1.4×10 4 | 3.0×10 3 | 1.4×10 4 | 3.0×10 3 | 1.3×10 4 | 1.7×10 3 |

## 6.3 讨论

对虾养殖中，随着凡纳滨对虾养殖业快速发展，伴随的一系列问题不容忽视，尤其是病害问题，如在表面健康无明显症状的对虾体内能检测到WSSV，且在夏季对虾体内病毒携带量高于秋季[[98]](#_bookmark153)。有人发现对虾养殖中出现同时感染WSSV和传染性皮下及造血组织坏死病毒（IHHNV）两种病毒的现象[[99]](#_bookmark154)，对虾养殖中也出现WSSV和致病弧菌合并感染现象，如Selvin等[[100]](#_bookmark155)在感染WSSV对虾体内分离到致病性鳗弧菌。对虾偷死综合症一般发生在养殖60天后，且多在高温季节爆发，尤其在蜕壳期间极易发生，在低温和养殖前期危害不大[[101]](#_bookmark156)。温度是重要的环境因子之一，温度不仅直接影响对虾的新陈代谢、抗病能力、进食、生存发育，还对病毒及弧菌在对虾体内增殖有重要影响。如李侃等[[79]](#_bookmark137)研究报道病毒在温度为21～30℃之间增殖最快，而当温度低于20℃或超过30℃时，病毒的增殖速度受到部分抑制。如哈维氏弧菌在低于28℃或高于32℃条件下的生长速度和对幼虾的致死率都随之下降[[82]](#_bookmark140)。温度还通过影响弧菌粘附作用基因的表达和胞外产物的毒力活性影响弧菌的致病性。如杀对虾弧菌在高于30℃条件下产生的胞外产物无毒性，但较低温度下产生的胞外产物有毒力[[83,](#_bookmark141) [84]](#_bookmark142)。还有虾体感染细菌后会引起细胞内水与离子含量平衡发生改变，细胞肿胀，细胞氧化酶系统受到破坏，供能不足，使物质代谢产生障碍和细胞功能下降[[85]](#_bookmark143)。Sudha P M等[[48]](#_bookmark113)已将WSSV与对虾的关系分为3种：一种为前期急性感染，机体高度感染WSSV, 2-3 d大面积死亡；一种为急性和亚急性感染，机体中度或高度感染WSSV, 7-10 d出现

高死亡率；最后一种为慢性感染（潜伏感染），机体轻微感染，15-28 d出现死亡。在温度为19±1℃条件下，各组累积死亡率都低于7.8%。病毒携带量检测结

果中发现随着时间延长，各组病毒含量无显著变化，且低于3.2×10 3 copies/g，说明在低温19±1℃条件下，WSSV和鳗弧菌对对虾致病性都很低，WSSV在对虾体内无法快速增殖，处于潜伏感染期，管越强等[[86]](#_bookmark144)报道水温处于低温（15℃）对日本对虾体内WSSV的增殖有抑制作用，Du H等[[80]](#_bookmark138)报道虾体内病毒携带量在低温10±1℃条件下明显低于24±1℃条件下。Jiravanichpaisal等[[26]](#_bookmark91)报道将感染WSSV的垂死小龙虾从水温为22℃转移至16℃水温可以延缓小龙虾的死亡，说明低温可降低WSSV对小龙虾的致病性。从鳗弧菌单独感染结果可知，在低温19±1℃条件下，设置的鳗弧菌的感染浓度对感染程度影响不大，说明此温度同样抑制了鳗弧菌在对虾体内的增殖，使鳗弧菌也处于潜伏感染期。

在温度25±1℃条件下，0 h~24 h各组的累积死亡率低于4.4%（*P*> 0.05），病毒携带量低于7.1×10 2 copies/g，48 h单独感染WSSV组累积死亡最大21.1%，合并感染浓度为2.3×10 6 cfu/ml组和单独感染WSSV组病毒携带量为1.3×10 4 copies/g~1.9×10 5 copies/g，明显高于其他组，此时两组死亡加快。72 h~96 h所有感染WSSV组出现死亡高峰，病毒增殖也出现高峰，都明显升高。单独感染WSSV组与合并感染组比较中发现在温度25±1℃条件下，单独感染WSSV组累积死亡率在后期低于合并感染浓度2.3×10 6 cfu/ml组，高于另两合并感染组，是否说明不同鳗弧菌感染剂量会影响WSSV致病力，但从病毒携带量发现前期合并感染组病毒携带量增殖速度低于单独感染WSSV组，有研究报道少量病原菌侵入对虾体内，酚氧化酶原系统被病原菌细胞壁的多糖激活，产生一种细胞毒杀作用[[102]](#_bookmark157)，是否由于少量细菌入侵，短暂提高对虾免疫力，对WSSV的感染初期产生影响有待进一步研究。李侃等认为WSSV在对虾体内增殖速度受到感染初期病毒侵染对虾组织细胞能力高低的直接影响[[79]](#_bookmark137)。合并感染组结果比较发现在此温度条件下，随着感染时间延长，鳗弧菌在对虾体内增殖，但细菌数量达到产生毒力阀值所需时间会因感染剂量不同而不同，对对虾免疫力影响也不同，所以鳗弧菌和WSSV合并感染对对虾的致病力随鳗弧菌感染剂量增加而增强。单独感染鳗弧菌组在72 h~96 h后死亡加快，特别是高浓度感染组在96 h后出现大量死亡达到40.0%，明显高于中浓度的16.7%，低浓度的15.6%，说明温度25±1℃条件下鳗弧菌对对虾的感染程度与感染剂量密切相关。

在温度31±1℃条件下，0 h~24 h各组的累积死亡率低于3.3%（*P*> 0.05），但对虾体内病毒在24 h时出现增殖高峰期，明显高于单独感染WSSV组，48 h后合并感染组中累积死亡率随浓度升高而升高，病毒含量同样高于单独感染WSSV组。对比温度25±1℃条件下单独感染WSSV组结果可知在温度31±1℃下单独感

染WSSV组对虾体内WSSV增殖受到一定程度的抑制，Rahman等[[81](#_bookmark139)]研究报道在对虾感染WSSV前期，高温33℃可以有效降低对虾死亡率，抑制对虾体内WSSV的增殖，从而延缓疾病爆发；Du H等[[40]](#_bookmark105)通过实验证明高温(33℃)可以延缓病虾死亡。管越强等[[86]](#_bookmark144)报道在高温33℃对日本囊对虾体内WSSV的增殖有抑制作用。合并感染组累积死亡率和病毒增殖情况刚好相反，温度31±1℃对WSSV增殖的抑制作用消失，实验后期病毒在对虾体内增殖迅速，死亡率也迅速升高。现在对高温对WSSV增殖的抑制作用机理尚不清楚，有报道认为高温可能引起感染宿主细胞加速凋亡[[87]](#_bookmark145)；还有研究表明温度升高会引起甲壳动物体内血细胞数增加，酚氧化酶原系统被激活，提高对虾免疫水平[[23,](#_bookmark88) [81,](#_bookmark139) [89]](#_bookmark147)；已有研究报道高温对多数昆虫病毒有一定抑制作用，推测高温也能影响WSSV复制的多个环节[[91]](#_bookmark148)。但合并感染组中WSSV的增殖未受到温度31±1℃抑制作用的影响，与在高温可能抑制WSSV复制的某些环节推测不符，但无法否定此推测，还需生化分子有关实验研究证明。从单独感染鳗弧菌组结果中发现至72 h浓度为2.3×10 6 cfu/ml

组累积死亡率突然升高达到67.7%，浓度2.3×10 5 cfu/ml组96 h出现死亡高峰为50.0%，浓度2.3×10 5 cfu/ml组至96 h为28.9%。结果表明在温度31±1℃条件下缩短了对虾感染鳗弧菌后发病时间，感染浓度越大致死时间越短。研究报道有些弧菌致病力受温度影响，随着温度升高，致病力升高[[93]](#_bookmark150)，邓欢等[[103]](#_bookmark158)研究报道在相同温度条件下鳗弧菌感染剂量与感染程度密切相关，不同温度条件下，高温能提高对虾对鳗弧菌的易感性，大大缩短对虾的发病时间。此结果与实际生产中对虾疾病一般发生在高温季节相符。

综上温度对WSSV和鳗弧菌对对虾的致病力影响显著，而且鳗弧菌对白斑综合症爆发影响显著。养殖过程中需注意温度变化，综合调控养殖水环境，做好消毒工作，预防合并感染及二次感染。

# 7 不同温度下哈维氏弧菌和白斑综合症病毒对凡纳滨对虾的致病性

凡纳滨对虾作为世界主要人工养殖对虾品种之一[[65]](#_bookmark125)，如今对虾养殖业已受到多种细菌病和病毒病的威胁，其中白斑综合症病毒作为一种对虾高致死性病毒，传染性强，宿主广泛，危害极大[[36]](#_bookmark101)。有研究报道白斑综合症爆发原因不仅与虾体免疫水平、感染方式、病毒数量、环境因子有关[[37,](#_bookmark102) [38]](#_bookmark103)，可能还与其他病原体有关，如副溶血弧菌，哈维氏弧菌等。其中哈维氏弧菌属革兰氏阴性，呈弧状，极生单鞭毛，广泛分布近岸温暖海洋环境中，能感染多种海洋无脊椎和脊椎动物[[104]](#_bookmark159)。而且主要感染苗期动物及动物的幼体，如哈维氏弧菌会引起中国对虾及凡纳滨对虾幼体发病死亡[[105,](#_bookmark160) [106]](#_bookmark161)，也会引起成虾发病死亡，陈月忠等[[107]](#_bookmark162)报道哈维氏弧菌会引起长毛对虾、日本对虾成虾发病死亡，严重制约了全球对虾养殖业的发展。本文对携带WSSV的凡纳滨对虾在不同温度条件下注射感染不同浓度的哈维氏弧菌，探讨哈维氏弧菌在不同温度下对感染WSSV的凡纳滨对虾的影响，对对虾养殖健康可持续发展有重要指导意义。

## 7.1 材料与方法

### 7.1.1 实验材料

7.1.1.1健康对虾来源同2.1.1.1.

7.1.1.2 WSSV粗提液制备同2.1.1.2.

7.1.1.3菌株

同5.1.1.3.

#### 7.1.1.4 DNA模板提取和引物设计同2.1.1.3。

#### 7.1.1.5 标准品的制备同2.1.1.4。

### 7.1.2 实验方法

#### 7.1.2.1 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40μl病原缓冲液。

#### 7.1.2.2 不同温度条件下哈维氏弧菌和WSSV对凡纳滨对虾的致病性

将实验对虾分别培养在19±1℃、25±1℃、31±1℃有60 L水的0.1 m3塑料桶中，实验组分为继发感染组（先注射40μl含1.0×10 3 copies/μl病毒粗提液稀释液，

一天后分别注射40μl浓度1.1×10 5 cfu/ml、1.1×10 4 cfu/ml、1.1×10 3 cfu/ml哈维氏

弧菌菌悬液）与单独感染组（单独注射含1.0×10 3 copies/μl病毒粗提液稀释液和

单独注射浓度为1.1×10 5 cfu/ml、1.1×10 4 cfu/ml、1.1×10 3 cfu/ml的哈维氏弧菌菌悬液40μl），各组均设置3个平行，每组对虾各30尾，对照组注射40μl PBS缓冲液。实验中投喂对虾人工配合饵料2次/d，24 h充气，定时吸出排泄物，日换水量20 %。及时取出死亡对虾放入-20℃冰箱保存。各组在感染后0 h、6 h、12

h、24 h、48 h、72 h、96 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。

#### 7.1.2.3 病毒检测方法同2.1.2.3。

## 7.2 实验结果

### 7.2.1 温度19±1 ℃下对感染WSSV的凡纳滨对虾的影响

#### 7.2.1.1 温度19±1 ℃下对对感染WSSV的凡纳滨对虾死亡情况的影响

当温度为19±1℃时，单独感染不同浓度的哈维氏弧菌和WSSV与继发感染两种病原对凡纳滨对虾的累积死亡率影响不大，至实验结束各组累积死亡率都低于8.9%，见图7-1。



**图 7-1** **19±1℃对感染哈维氏弧菌及WSSV的凡纳滨对虾的影响**

**Fig.** **7-1** Impact of ***Vibrio harveyi* and WSSV infected *Litopenaeus vannamei* at 19±1 ℃**

#### 7.2.1.2 温度19±1℃下哈维氏弧菌对感染WSSV的凡纳滨对虾携带WSSV影响整个实验过程中，单独感染WSSV对虾体内携带病毒量与继发感染组在6 h

存在显著差异，48 h时继发感染浓度为1.1×10 5 cfu/ml组病毒携带量明显高于其它组（*P*<0.05），96 h病毒携带较高，最大值为3.9×10 4 copies/g，见表7-1。

**表 7-1** **温度19±1℃下感染不同细菌浓度对凡纳滨对虾病毒携带量的影响**

Tab. 7-1 Effects on amount of virus in L. Vannamei of infected Different concentrations of bacterial at 19±1 ℃

| 时间  （h） | WSSV 携带量（copies/g） | | | | | |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1.1×10 5 cfu/ml | | 1.1×10 4 cfu/ml | | 1.1×10 3 cfu/ml | | 0 cfu/ml | |
| 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 |
| 0 | 2.2×10 0 | 7.9×10 -1 | 1.3×10 2 | 1.5×10 2 | 6.7×10 1 | 5.9×10 1 | 7.5×10 2 | 1.7×10 2 |
| 6 | 2.7×10 1 | 2.9×10 1 | 2.0×10 1 | 2.5×10 1 | 7.6×10 0 | 5.9×10 0 | 3.6×10 2 | 5.6×10 1 |
| 12 | 2.0×10 2 | 1.8×10 2 | 7.9×10 0 | 6.3×10 0 | 4.2×10 1 | 2.2×10 1 | 3.0×10 1 | 2.2×10 1 |
| 24 | 2.0×10 3 | 1.8×10 3 | 5.2×10 1 | 4.5×10 0 | 1.7×10 1 | 3.6×10 0 | 6.3×10 2 | 1.1×10 3 |
| 48 | 3.6×10 3 | 8.3×10 2 | 1.2×10 3 | 1.0×10 3 | 2.5×10 2 | 1.3×10 2 | 1.4×10 2 | 1.2×10 1 |
| 72 | 3.2×10 4 | 3.8×10 4 | 3.9×10 4 | 3.0×10 4 | 1.1×10 4 | 1.3×10 4 | 8.6×10 2 | 9.6×10 2 |
| 96 | 2.4×10 3 | 8.3×10 2 | 1.3×10 3 | 4.6×10 2 | 1.7×10 3 | 4.7×10 2 | 3.9×10 2 | 3.3×10 2 |

### 7.2.2 温度25±1 ℃下对感染WSSV的凡纳滨对虾的影响

7.2.2.1温度25±1 ℃下对对感染WSSV的凡纳滨对虾死亡情况的影响

当温度为25±1 ℃时，0 h~24 h各组的累积死亡率低于13.3%（*P*> 0.05），至48 h继发感染浓度为1.1×10 5 cfu/ml组对虾累积死亡率（34.3%）明显高于另两继发感染组（*P*<0.05）；至72 h继发感染组和单独感染WSSV高于单独感染不同浓度细菌组，且单独感染WSSV（62.2%）和继发感染浓度1.1×10 5 cfu/ml（65.7%）显著高于其他组（*P*<0.05）；至96 h继发感染及单独感染WSSV的累积死亡率显著高于细菌单独感染组，见图7-2。



**图 7-2** **温度25±1℃对感染WSSV和哈维氏弧菌的凡纳滨对虾的影响**

**Fig.** **7-2** Impact of ***Vibrio harveyi* and WSSV infected *Litopenaeus vannamei* at 25±1 ℃**

7.2.2.2温度25±1℃下哈维氏弧菌对感染WSSV的凡纳滨对虾携带WSSV影响整个实验过程中，至48 h单独感染WSSV对虾体内携带病毒量明显高于继

发感染组（*P*<0.05）至72 h单独感染WSSV对虾体内携带病毒量明显低于继发感染组（*P*<0.05），96 h继发感染浓度1.1×10 5 cfu/ml组病毒携带量明显高于其它

组，见表7-2。

**表 7-2** **温度25±1℃下感染不同细菌浓度对凡纳滨对虾病毒携带量的影响**

Tab. 7-2 Effects on amount of virus in L. Vannamei of infected Different concentrations of bacterial at 25±1 ℃

| 时间  （h） | 病毒携带量（copies/g） | | | | | |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1.1×10 5 cfu/ml | | 1.1×10 4 cfu/ml | | 1.1×10 3 cfu/ml | | 0 cfu/ml | |
| 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 |
| 0 | 4.5×10 0 | 1.3×10 0 | 2.0×10 2 | 1.2×10 2 | 2.9×10 1 | 2.9×10 1 | 6.5×10 2 | 5.5×10 2 |
| 6 | 1.5×10 2 | 1.7×10 2 | 3.4×10 1 | 6.2×10 0 | 7.6×10 0 | 1.1×10 1 | 1.1×10 2 | 9.7×10 1 |
| 12 | 7.0×10 1 | 7.0×10 1 | 3.6×10 1 | 1.4×10 1 | 2.6×10 2 | 2.1×10 2 | 1.4×10 2 | 9.5×10 1 |
| 24 | 1.8×10 3 | 1.4×10 3 | 2.2×10 3 | 1.6×10 3 | 5.2×10 3 | 1.9×10 3 | 6.0×10 2 | 3.5×10 2 |
| 48 | 2.6×10 4 | 8.7×10 3 | 1.2×10 4 | 3.2×10 3 | 8.9×10 3 | 9.0×10 3 | 1.9×10 5 | 7.9×10 4 |
| 72 | 3.2×10 6 | 1.2×10 6 | 1.5×10 6 | 7.3×10 5 | 1.4×10 6 | 4.5×10 5 | 2.3×10 4 | 3.3×10 3 |
| 96 | 2.3×10 5 | 8.1×10 4 | 5.5×10 4 | 4.1×10 4 | 5.5×10 4 | 3.7×10 4 | 1.3×10 5 | 6.0×10 4 |

### 7.2.3 温度31±1 ℃下对感染WSSV的凡纳滨对虾的影响

7.2.3.1温度31±1 ℃下对感染WSSV的凡纳滨对虾死亡情况的影响

当温度为31±1 ℃时，0 h~24 h各组的累积死亡率低于12.0%（*P*> 0.05），至48 h单独感染WSSV组累积死亡率显著低于继发感染浓度为1.1×10 3 cfu/ml、

1.1×10 5 cfu/ml（*P*<0.05）；至72 h单独感染WSSV累积死亡率明显高于单独感染细菌组，明显低于继发感染组（*P*<0.05），至96 h死亡率达到最高，继发感染浓度为1.1×10 5 cfu/ml的累积死亡率最大为80.0%显著高于单独感染WSSV组的42.3%（*P*<0.05），见图7-3。



**图 7-3** **温度31±1 ℃对感染WSSV和哈维氏弧菌的凡纳滨对虾的影响**

**Fig.** **7-3** Impact of ***Vibrio harveyi* and WSSV infected *Litopenaeus vannamei* at 31±1 ℃**

7.2.3.2温度31±1 ℃下哈维氏弧菌对凡纳滨对虾病毒携带量的影响

整个实验过程中，6 h时继发感染浓度1.1×10 5 cfu/ml组与其它组存在显著差异，12 h单独感染WSSV组病毒携带量低于继发感染组，且继发感染组之间存

在显著差异，随着细菌浓度增加病毒携带量也增加；24 h病毒开始加快增殖，继发感染浓度1.1×10 5 cfu/ml、1.1×10 4 cfu/ml明显高于另两组（*P*<0.05），48 h~72 h各组病毒携带量很高，无显著差异；96 h单独感染WSSV组显著低于继发感染组（*P*<0.05），表7-3。

**表 7-3** **温度31±1℃下感染不同细菌浓度对凡纳滨对虾病毒携带量的影响**

Tab. 7-3 Effects on amount of virus in L. Vannamei of infected Different concentrations of bacterial at 31±1 ℃

| 时间  （h） | 病毒携带量（copies/g） | | | | | |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1.1×10 5 cfu/ml | | 1.1×10 4 cfu/ml | | 1.1×10 3 cfu/ml | | 0 cfu/ml | |
| 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 | 均值 | 标准差 |
| 0 | 3.6×10 1 | 1.2×10 1 | 8.5×10 1 | 7.0×10 1 | 4.5×10 1 | 6.1×10 1 | 3.7×10 2 | 2.9×10 2 |
| 6 | 3.1×10 2 | 1.6×10 2 | 1.9×10 1 | 3.2×10 0 | 2.5×10 1 | 3.4×10 1 | 1.1×10 2 | 1.0×10 2 |
| 12 | 6.4×10 2 | 2.7×10 2 | 1.1×10 3 | 6.5×10 1 | 9.0×10 1 | 9.6×10 1 | 4.6×10 1 | 7.6×10 0 |
| 24 | 2.3×10 3 | 8.7×10 2 | 2.2×10 3 | 8.1×10 2 | 5.4×10 2 | 2.7×10 2 | 2.8×10 2 | 6.1×10 1 |
| 48 | 5.5×10 4 | 8.6×10 4 | 1.6×10 4 | 2.7×10 3 | 1.3×10 4 | 1.5×10 4 | 2.2×10 4 | 1.1×10 4 |
| 72 | 6.1×10 6 | 9.3×10 6 | 1.2×10 6 | 1.0×10 6 | 8.5×10 5 | 5.4×10 5 | 1.5×10 3 | 1.1×10 3 |
| 96 | 9.0×10 4 | 2.1×10 4 | 4.4×10 4 | 1.7×10 4 | 7.6×10 4 | 3.6×10 4 | 4.5×10 2 | 3.4×10 2 |

## 7.3 讨论

温度作为最重要的环境因子之一，温度不仅直接影响对虾的新陈代谢、抗病能力、进食、生存发育。还对病毒在对虾体内增殖有重要影响。李侃等[[79]](#_bookmark137)研究报道病毒在温度为21～30℃之间增殖最快，而当温度低于20℃或超过30℃时，病毒的增殖速度受到部分抑制。Du H等[[80]](#_bookmark138)报道虾体内病毒携带量在低温10±1℃条件下明显低于24±1℃条件下，说明低温可以抑制WSSV在虾体内增殖。Jira等[[26]](#_bookmark91)报道将感染WSSV的垂死小龙虾从水温为22℃转移至16℃水温可以延缓小龙虾的死亡，说明低温可以降低WSSV对小龙虾的致病性。Rahman等[[81]](#_bookmark139)研究报道在对虾感染WSSV前期，高温33℃可以延缓疾病爆发，有效降低对虾死亡率，抑制WSSV在对虾体内增殖；Du H等[[40]](#_bookmark105)通过实验也证明高温(33℃)可以延长病虾存活时间。Sudha P M等[[48]](#_bookmark113)已将WSSV与对虾的关系分为3种：一种为前期急性感染，机体高度感染WSSV, 2-3 d大面积死亡；一种为急性和亚急性感染，机体中度或高度感染WSSV, 7-10 d出现高死亡率；最后一种为慢性感染（潜伏感染），机体轻微感染，15-28 d出现死亡。有研究说明虾体感染细菌后会打破细胞内水与离子含量平衡，促使细胞肿大，破坏细胞氧化酶系统，供能不足，引起物质代谢障碍和细胞功能下降[[85]](#_bookmark143)。

在温度为19±1℃条件下，各组累积死亡率都很低，低于8.9%。病毒携带量检测结果中发现随着时间延长，继发感染组病毒含量有一个升高趋势，之后有下降波动，病毒单独感染组没有，各组的病毒含量低于3.9×10 4 copies/g，低于简旭

凤[[51]](#_bookmark116)报道的对虾濒死病毒携带临界值1.0×10 5 copies/g，因此感染WSSV未出现

大量对虾死亡。哈维氏弧菌单独感染组中各浓度组同样未出现大量死亡，说明在低温条件下，两种病原体处于潜伏感染期。管越强等[[86]](#_bookmark144)报道水温处于低温15℃对日本对虾体内WSSV的增殖有抑制作用。钟硕良等[[82]](#_bookmark140)报道当水温高于32℃或低于28℃时，哈维氏弧菌生长速度降低，仔虾累积死亡率也随之降低。本实验也证实在温度19±1℃下，不仅WSSV在凡纳滨对虾体内增殖受到抑制，而且哈维氏弧菌在对虾体内生长也受到影响。

在温度25±1℃条件下，感染哈维氏弧菌后0 h~24 h细菌最高浓度继发感染组累积死亡率比其他组高，但各组都低于13.4%，至24 h继发感染组病毒携带量高于WSSV单独感染组，病毒携带量也低于5.2×10 3 copies/g.48 h后不同浓度继发感染组和单独感染组之间出现显著差异，单独感染WSSV组的对虾累积死亡率与最高浓度继发感染组相似，继发感染组的累积死亡率随细菌感染浓度增加而升高，但单独感染WSSV组明显高于另两浓度继发感染组的结果与丁燏等[[108]](#_bookmark163)报道的继发感染累积死亡率要比单独感染高结果不相符，可能原因是哈维氏弧菌在低于28℃生长速度降低，且影响WSSV的感染方式。现在研究较多的是哈维氏弧菌对凡纳滨对虾仔虾、日本对虾成虾致病性的研究，在低于28℃条件下哈维氏弧菌对凡纳滨对虾成虾的致病性有待进一步研究。至48 h单独感染WSSV组病毒携带量比继发感染组高，但至72 h继发感染组病毒携带量迅速增加，明显高于单独感染组。说明随着时间延长，哈维氏弧菌对对虾组织引起损伤，抗病力下降，为WSSV增殖提供了条件。

在温度31±1℃条件下，感染哈维氏弧菌后0 h~24 h各组的累积死亡率低于12.0%，病毒携带量都低于2.3×10 3 copies/g.48 h后继发感染组累积死亡率明显快于单独感染组（*P*<0.05），而且病毒携带量随着细菌感染浓度的升高而增加。单独感染WSSV组累积死亡率和病毒携带量结果都说明在温度为31±1℃条件下可以减缓WSSV的增殖，推迟了白斑综合症爆发的时间。此结果与Vidal等[[25]](#_bookmark90)报道的在高温32.3±0.8℃条件下可推迟携带WSSV的凡纳滨对虾爆发白斑综合症相符。继发感染累积死亡率和病毒携带量的结果也证实了钟硕良等[[82]](#_bookmark140)报道在31±1℃条件下有利于哈维氏弧菌生长，先感染WSSV的对虾机体已有损伤，抗病能力下降，更加有利于哈维氏弧菌的侵染，随着细菌数量增多，对虾抗病能力下降更快，可加快WSSV在体内增殖，加速对虾死亡。陈细法等[109]认为携带病毒对虾生长在良好养殖环境中，可处于潜伏感染期，但由于抗病能力下降会因外在胁迫因子变化引发病毒病。所以细菌注射感染对虾后，随血淋巴循环扩散至全身，引起细菌大量繁殖，会加快疾病的发生。

综上，哈维氏弧菌和WSSV两种病原体在低温19±1℃条件下，在对虾体内增殖都受到抑制，处于潜伏感染期，两种病原体的致病力受到抑制；在温度

25±1℃条件下，WSSV对对虾的致病力高于哈维氏弧菌的致病力。温度为31±1℃条件下，单独感染WSSV结果发现，WSSV的致病力受到一定抑制。随着时间延长，哈维氏弧菌致病力在感染后期引起WSSV致病力提高，使WSSV在对虾体内增殖加快。因此，温度调控对于对虾养殖中的病害预防有重要意义。

# 8 主要结论

采用室内生态模拟方法，研究了3种环境因子（盐度、氨氮浓度、亚硝酸氮浓度）变化对凡纳滨对虾体内WSSV增殖的影响，及在不同温度条件下，3种弧菌（副溶血弧菌、鳗弧菌、哈维氏弧菌）和WSSV对凡纳滨对虾的致病性研究。主要结论有：

## 8.1 3种环境因子对凡纳滨对虾体内WSSV增殖的影响

水体盐度、氨氮浓度、亚硝酸氮浓度变化对凡纳滨对虾体内WSSV增殖的影响显著（*P*<0.05）。

1）盐度、氨氮浓度、亚硝酸氮浓度变化易导致凡纳滨对虾对病原体的易感性提高。

2）盐度、氨氮浓度、亚硝酸氮浓度变化易引起携带WSSV 凡纳滨对虾与

WSSV之间的关系从潜伏感染转为急性感染。

3）盐度、氨氮浓度、亚硝酸氮浓度是白斑综合症爆发的关键影响因子。

## 8.2 不同温度条件下3种弧菌和WSSV对凡纳滨对虾的致病性

不同温度条件下弧菌和白斑综合症病毒对凡纳滨对虾的致病性结果较好的解释了目前对虾养殖生产中的一些现象。如下：

1）冬棚养殖成功率较高的原因之一，即低温状态下病毒和细菌增殖较慢，也是对虾病毒病和细菌病不容易暴发的主要原因之一；

2）华南地区早、晚造虾发病率高，可能主要是因为春夏交替和夏秋交替时，温度较适宜WSSV在对虾体内增殖，引起WSS暴发流行。

3）近年来，随着养殖规模不断扩大和养殖时间推移，引起水体富营养化加重，细菌容易大量繁殖，使生态安全的问题变的越来越凸显，同时致使华南地区中造虾同样暴发病害，成功率较低，可能是在高温条件下细菌与WSSV合并或继发感染，引起对虾发病。

因此，在今后的对虾养殖中，病害防治要同时防控病毒单一引发、细菌单一引发及病毒和细菌合并感染或继发感染3种情况。

参考文献

[1] Lo C F, Leu J H, Ho C, *et al*. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1996, 25: 133~141.

[2]孔杰， 刘萍， 石拓. 中国对虾杆状病毒一个DNA片段序列测定[J]. 中国海

洋与湖沼学会甲壳动物学分会，中国动物学会，中国海洋与湖沼学会生态学分会2000 年学术研讨会论文摘要集, 2000: 1~5.

[3] Lighter D. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp[J]. World Aquaculture Society Baton Rouge, LA, 1996.

[4] Vetten H, Chu P, Dale J, *et al*. Nanoviridae[J]. 2005: 32~41.

[5]于佳，宋晓玲. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒的精细结构，核酸， 多肽及血清学研究[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1)：11~23.

[6]郭银汉，杨小强. 福州地区对虾白斑病毒的超微结构[J]. 中国病毒学, 2000, 15(3)：277~284.

[7] ChungHsiung W, JiannHorng L, ChihMing C, *et al*. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1995, 23(3): 239~242.

[8] 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(3): 165~173.

[9] Durand S, Lightner D, Nunan L, *et al*. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1996, 27(1): 59~66.

[10]魏静， 黄健. 用对虾的致病病毒人工感染克氏原螯虾[J]. 南京农业大学学

报, 1998, 21(4): 78~82.

[11]庄世鹏. 对虾白斑综合症病毒的形态分析和致病机理研究[J]. 中国水产, 2012，(4)：62~64.

[12]刘萍， 孔杰， 李健， 等. 白斑综合症病毒(WSSV) 对中国对虾月及各期幼

体人工感染的试验研究[J]. Marine Fisheries Research, 2001, 22(1): 1~6.

[13] Rajendran K, Vijayan K, Santiago T, *et al*. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from india[J]. Journal of Fish Diseases, 1999, 22(3): 183~191.

[14]刘萍， 孔杰. 暴发性流行病病原对中国对虾亲虾人工感染及对子代影响的

PCR检测[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(2): 139~144.

[15] Lo C F, Ho C H, Chen C H, *et al*. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of penaeus monodon with a special emphasis on reproductive organs[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1997, 30(1): 53~72.

[16]雷质文， 战文斌. 对虾白斑综合症(WSS)的分子流行病学研究进展[J]. 中国

水产科学, 2002, 9(3): 260~264.

[17]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.

[18] Yang F, Wang W, Chen R, *et al*. A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA[J]. Journal of Virological Methods, 1997, 67(1): 1~4.

[19] Xie X, Li H, Xu L, *et al*. A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles[J]. Virus Research, 2005, 108(1): 63~67.

[20] Ginzinger D G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream[J]. Experimental hematology, 2002, 30(6): 503~512.

[21] Perazzolo L M, Gargioni R, Ogliari P, *et al*. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress[J]. Aquaculture, 2002, 214(1): 19~33.

[22]潘鲁青， 姜令绪. 盐度，pH突变对2种养殖对虾免疫力的影响[J]. 青岛海洋

大学学报：自然科学版, 2002, 32(6): 903~910.

[23] Truscott R, White K. The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs[J]. Functional Ecology, 1990: 455~461.

[24] Cheng W, Chen J C. Effects of ph, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2000, 10(4): 387~391.

[25] 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.

[26] Jiravanichpaisal P, Söderhäll K, Söderhäll I. Effect of water temperature on the

Immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 17(3): 265~275.

[27] Rosas C, Sánchez A, Díaz -Iglesia E, *et al*. Critical dissolved oxygen level to *Penaeus setiferus* and *Penaeus schmitti* postlarvae (PL10–18) exposed to salinity changes[J]. Aquaculture, 1997, 152(1): 259~272.

[28]王克行， 马牲， 李晓甫. 试论对虾白斑病暴发的环境因子及防病措施[J]. 中

国水产, 1998, 12: 34~35.

[29]房文红，王慧. 碳酸盐碱度，pH对中国对虾幼虾的致毒效应[J]. 中国水产科学, 2000, 7(4)：78~81.

[30]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.

[31]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.

[32]曹煜成，李卓佳，杨莺莺，等. 浮游微藻生态调控技术在对虾养殖应用中的研究进展[J]. 南方水产科学, 2007, 3(4)：70~73.

[33]李卓佳，林亮，杨莺莺，等. 芽孢杆菌制剂对虾池环境微生物群落的影响[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(3)：1183~1189.

[34] Nakano H, Koube H, Umezawa S, *et al*. Mass mortalities of cultures kuruma shrimp, *penaeus japonicus*, in japan in 1993: Epizootiological survey and infection trials[J]. Gyobyo Kenkyu= Fish Pathology, 1994, 29(2): 135~139.

[35] 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.

[36] Flegel T, Lio P G, Current status of viral diseases in asian shrimp aquaculture[C]. Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh. 2009: 229~239.

[37]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.

[38]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.

[39] Granja C B, Vidal O M, Parra G, *et al*. Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *penaeus vannamei*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2006, 68(2): 175~180.

[40] 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): 175~178.

[41] 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 Journal Scientific Research, 2010, 5(1): 28~33.

[42] Liu B, Yu Z, Song X, *et al*. The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Aquaculture, 2006, 253(1): 163~170.

[43]何建国， 莫福. 对虾白斑综合症病毒暴发流行与传播途径， 气候和水体理化

因子的关系及其控制措施[J]. 中国水产, 1999, 7: 34~41.

[44] 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.

[45] 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.

[46]程晓艳， 刘庆慧， 黄倢. 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, (026): 14265~14267.

[47]叶建生，王兴强，马甡，等. 盐度突变对凡纳滨对虾非特异性免疫因子的影响[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(1)：38~43.

[48] Sudha P, Mohan C, Shankar K, *et al*. Relationship between white spot syndrome virus infection and clinical manifestation in indian cultured penaeid shrimp[J]. Aquaculture, 1998, 167(1): 95~101.

[49] Le Moullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in crustacea[J]. Aquaculture, 2000, 191(1): 121~131.

[50] Joseph A, Philip R. Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection[J]. Aquaculture, 2007, 272(1): 87~97.

[51]简旭凤，白斑综合症病毒(WSSV)原位PCR及定量PCR检测技术的建立

[D]: 广州：中ft大学, 2003.

[52]李才文，管越强. 盐度变化对日本虾暴发白斑综合症病毒病的影响[J]. 海洋环境科学, 2002, 21(4)：6~9.

[53]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.

[54]于敏，王顺昌，卢韫. 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.

[55]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.

[56]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.

[57]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.

[58]克行， 水产养殖. 虾蟹类增养殖学[M]: 中国农业出版社. 1997.

[59]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.

[60] Armstrong D A, Chippendale D, Knight A W, *et al*. Interaction of ionized and unionized ammonia on short-term survival and growth of prawn larvae, macrobrachium rosenbergh[J]. The Biological Bulletin, 1978, 154(1): 15~31.

[61]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.

[62]邱德全，杨士平，邱明生. 氨氮促使携带白斑综合症病毒凡纳滨对虾发病及其血细胞，酚氧化酶和过氧化氢酶变化[J]. 渔业现代化, 2007, 34(1)：36~39.

[63]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.

[64]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.

[65]王兴强， 马甡， 董双林. 凡纳滨对虾生物学及养殖生态学研究进展[J]. 海洋

湖沼通报, 2005, (4): 94~100.

[66]丁美丽，林林. 有机污染对中国对虾体内外环境影响的研究[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(1)：7~12.

[67] Cheng S Y, Chen J C. Hemocyanin oxygen affinity, and the fractionation of oxyhemocyanin and deoxyhemocyanin for *Penaeus monodon* exposed to elevated nitrite[J]. Aquatic Toxicology, 1999, 45(1): 35~46.

[68]王雷， 李光友. 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.

[69] Cheng W, Liu C H, Chen J C. Effect of nitrite on interaction between the giant freshwater prawn macrobrachium rosenbergii and its pathogen lactococcus garvieae[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2002, 50(3): 189~197.

[70] Cheng S Y, Chen J C. The time-course change of nitrogenous excretion in the kuruma shrimp *Penaeus japonicus* following nitrite exposure[J]. Aquatic Toxicology, 2001, 51(4): 443~454.

[71] Cheng S Y, Chen J C. Effects of nitrite exposure on the hemolymph electrolyte, respiratory protein and free amino acid levels and water content of *Penaeus japonicus*[J]. Aquatic Toxicology, 1998, 44(1): 129~139.

[72]陈怀文， 携带WSSV 凡纳滨对虾的养殖和环境因子胁迫的研究[D]: 广东

海洋大学, 2011: 25~42.

[73]沈文英，阳会军，尹军霞. 南美白对虾的病害及防治研究现状[J]. 水利渔业, 2004, 24(1)：58~60.

[74]陈爱平. 2002 年我国南美白对虾养殖及病害情况综述（中）[J]. 科学养鱼，

2003, 11: 41~42.

[75]张晓君，陈翠珍，阎斌伦，等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 病原副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的表型及分子特征[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(5): 654~662.

[76]温崇庆，薛明，何红，等. 两株对虾幼体弧菌病病原的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3)：346~352.

[77]牟海津， 李筠， 包振民， 等. 副溶血弧菌胞外产物对中国对虾的致病性分析

[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(3): 273~280.

[78]翟秀梅， 王斌， 毛连菊， 等. 副溶血弧菌对南美白对虾生理生化指标的影响

[J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(2): 162~168.

[79]李侃，罗淑娅，徐丽美. 温度影响对虾白斑综合症病毒增殖机制的研究[J]. 应用海洋学学报, 2013，(1)：61~66.

[80] 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.

[81] Rahman M M, Corteel M, Wille M, *et al*. The effect of raising water temperature to 33℃in *Penaeus japonicus* juveniles at different stages of infection with white spot syndrome virus (WSSV)[J]. Aquaculture, 2007, 272(1):

240~245.

[82]钟硕良，陈月忠. 环境因子对发光细菌的生长及日本对虾仔虾感染死亡率的影响[J]. 中国水产科学, 2001, 8(1)：41~45.

[83] Toren A, Landau L, Kushmaro A, *et al*. Effect of temperature on adhesion of

Vibrio strain ak-1 to oculina patagonica and on coral bleaching[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(4): 1379~1384.

[84] Goarant C, Herlin J, Brizard R, *et al*. Toxic factors of vibrio strains pathogenic to shrimp[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2000, 40(2): 101~107.

[85]黄琪琰， 水产. 水产动物疾病学[M]: 上海科学技术出版社. 1993.

[86]管越强，主要环境因子对养殖对虾抗病力及白斑综合症发生的影响[D]: 中国科学院研究生院博士学位论文, 2003: 29~58.

[87] Granja C B, Aranguren L F, Vidal O M, *et al*. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV) -infected *Litopenaeus vannamei*[J]. DiseasesofAquaticOrganisms, 2003, 54(1): 73~78.

[88]于建平. 日本对虾血细胞分类， 密度及组成[J]. 青岛海洋大学学报： 自然科

学版, 1993, 23(1): 107~114.

[89] Yepiz-Plascencia G, Vargas-Albores F, Jimenez-Vega F, *et al*. Shrimp plasma hdl andβ-glucan binding protein (bgbp): Comparison of biochemical characteristics[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1998, 121(3): 309~314.

[90] Sung H H, Chang H J, Her C H, *et al*. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1998, 71(1): 26~33.

[91]蒋杰贤， 王冬生， 曾爱平， 等. 温度对甜菜夜蛾核型多角体病毒流行的影响

[J]. 生态学报, 2004, 24(8): 1724~1730.

[92] Guan Y, Yu Z, Li C. The effects of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2003, 83(3): 257~260.

[93]谢珍玉， 周永灿， 冯永勤. 对虾弧菌病的研究进展——回顾对虾弧菌病的病

原种类，致病机制与条件，症状与组织病变及对虾的防御机制[J]. 海南大学学报：自然科学版, 2007, 25(1)：88~95.

[94] 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 japonicus*[J]. Aquaculture, 2009, 290(1): 61~68.

[95] Manivannan S, Otta S K, Karunasagar I, *et al*. Multiple viral infection in *Penaeus monodon* shrimp postlarvae in an indian hatchery[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2002, 48(3): 233~236.

[96] 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.

[97] Liu C H, Chen J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 16(3): 321~334.

[98] Meng X H, Jang I K, Seo H C, *et al*. A taqman real-time PCR assay for survey of white spot syndrome virus (WSSV) infections in *Litopenaeus vannamei* postlarvae and shrimp of farms in different grow-out seasons[J]. Aquaculture, 2010, 310(1): 32~37.

[99] 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.

[100] Selvin J, Lipton A. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of penaeus monodon[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 57(1): 147~150.

[101]孙成波. 南美白对虾美偷死综合症‖死的病因分析及调控措施探讨[J]. 中

国水产, 2008, (3): 65~67.

[102] Johansson M W, Söderhäll K. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes[J]. Journal of Comparative Physiology B, 1985, 156(2): 175~181.

[103]邓欢，王年斌，安育新. 日本对虾*penaeus japanicus*受弧菌感染的发病情况

与感染剂量，温度条件的关系[J]. 水产科学, 1998, 17(2): 3~7.

[104] Ramesh A, Venugopalan V. Response of enteric luminous bacteria to environmental conditions in the gut of the fish[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1989, 66(6): 529~533.

[105]刘问， 钱冬， 杨国梁， 等. 南美白对虾虾苗淡化期间发光病病原研究[J]. 集

美大学学报：自然科学版, 2005, 9(4): 300~304.

[106] Vandenberghe J, Li Y, Verdonck L, *et al*. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (crustacea: Decapoda) larvae in chinese shrimp hatcheries[J]. Aquaculture, 1998, 169(1): 121~132.

[107]陈月忠， 钟硕良， 周宸. 成虾发光病病原体的分离鉴定及防治技术研究[J].

中ft大学学报（自然科学版）, 2000, 39: 218~223.

[108] 丁燏, 王雷. 对虾病毒病暴发前期病毒和弧菌相互作用关系[J]. 湛江海洋

大学学报, 2000, 20(3): 26~31.

[109]陈细法，吴定虎. 对虾病毒病和细菌合并感染的病理特点和诊断价值[J]. 病毒学报, 1997, 13(2)：146~150.

致谢

在此论文完成之际，谨向三年研究生道路上指引我不断前行的老师和同学致以诚挚感谢。学位论文的完成离不开导师孙成波博士的悉心指导，从论文的选题、方案的设计、实验的进行，论文写作，都倾注了老师大量的精力，在生活中老师给予我极大的关心和帮助，在与老师的交流中学到很多做人，做事的哲理，受益匪浅。并在思想上的鞭策我，学业上引导，以及种种进修、学习的机会。本实验的顺利完成得到师弟王刚鼎力帮助，以及实验室同学帮助。最后，向我家人致谢，感谢他们对我的关心、理解与支持。

最后，感谢答辩委员会的所有专家和学者在百忙之中抽出时间来审阅本论文并给予的宝贵意见，并致以诚挚的感谢和深深的祝福。

# 个人简介

向赟，男，苗族，1987年9月出生于湖南省怀化市，中国共产党党员，现就读于广东海洋大学，所学专业为水产养殖。

**学习、工作经历：**

2003.09——2006.07会同县第三中学；

2007.09——20011.06怀化学院生物工程专业本科；

2011.09——广东海洋大学水产养殖专业研究生。读研期间发表的论文：

1、向赟，王刚，叶国峰，等. 盐度变化对携带白斑综合症病毒(WSSV)的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的影响[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(2): 450~458.

# 导师简介

孙成波，男，1970年10月14日出生于江苏赣榆，理学博士，专业方向为

水生生物学，广东海洋大学水产学院教授，硕士生导师，广东省高等学校第5批―千百十‖省级培养对象，广东海洋大学东海岛海洋生物研究基地副主任，广 东高校海产无脊椎动物养殖研究工程研究中心副主任，学术带头人，中国水产学会资深会员，《热带生物学报》编委。讲授《海产经济动物增养殖学》（本科生）、《虾蟹类增养殖学》（本科生），指导《海产经济动物增养殖及病害防治生产实习》和《水产经济动物增养殖及病害防治生产实习》。

获各级科技奖12项，其中省部级科学技术奖一等奖4项（分列第1, 2，3，

5 完成人），科技特派员农村科技创新创业大赛二等奖1 项，广东省农业推广二

等奖1项，市厅级科学技术奖特等奖1项（第3完成人），一等奖1项（第4完成人），三等奖2项（第1，4完成人），广东海洋大学―司徒锟奖励基金‖一等奖

1项。广东省先进个人1项，广东海洋大学第4、5、6届―挑战杯‖大学生课外学

术科技作品竞赛活动优秀指导老师5次。承担项目23项，发表论文40多篇，申

请发明专利7项（获授权3项），实用新型专利2项（获授权2项），主（参）编

专著6部。

1998年在海南省首次建立了地膜和地膜覆沙池对虾健康养殖模式，地膜养殖模式有效地防止池底老化，一定程度上切断WSSV的水平传播途径，且具有更广泛的地理适应性，推动了我国传统对虾养殖模式的改造，在广东、广西、海南和福建等省区乃至全国得到较大的发展，在南方广东、广西、海南和福建等地推广20多万亩。成为我国对虾精养的主要模式，揭示了斑节对虾和凡纳滨对虾WSSV潜伏感染转为急性感染的临界数量。