

文章编号: 0529-6579 (2000) S-0159-05

养虾水体环境因子变化与 对虾病毒病之间的关系^{*}

黄灿华^{1,2}, 石正丽², 张建红², 张立人², 陈棣华²,
吴清江¹, 王建平³, 伊祥华⁴, 斯烈钢³, 吴雄飞³

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院武汉病毒研究所;
3. 宁波市水产研究所; 4. 宁波象山大目涂经济技术开发公司)

摘 要: 研究养虾水体的盐度、溶氧量及 pH 值等主要理化指标的变化与对虾暴发性病毒病害大流行之间的关系. 以低剂量病毒感染中国对虾 (*Penaeus chinensis*), 人工改变海水盐度、溶氧量、pH 值等理化指标, 发现其变化与对虾发病死亡之间存在明显的诱发关系. 结果对阐明对虾暴发性病毒性流行病成因及指导虾农科学养虾具有重要参考价值.

关键词: 养虾水体; 环境因子; 对虾病毒; 诱发关系

中图分类号: Q945.5 **文献标识码:** A

1993 年至今, 人工养殖对虾暴发性病毒性流行病一直是阻碍我国沿海对虾养殖业发展的主要原因. 近几年来国内外学者在主要的对虾病毒病原鉴定、病毒的形态与发生、病毒理化性质、基因组克隆及检测手段的建立等方面已进行了大量研究^[1,2]. 要控制对虾暴发性流行病的发生, 除做好早期检测与预报之外, 加强虾场管理、了解环境与生态因子与病害发生之间的关系也应予以足够重视. 因为从生态流行病学角度来看, 对虾暴发性流行病的发生是病原因子与宿主之间、宿主与环境之间相互作用的结果. 作者近年来在沿海生产一线进行了广泛的调研, 发现虾池某些理化指标诸如虾池溶氧量、盐度、环境温度的变化与对虾病害的发生之间有着密切关系. 本文拟以对虾白斑综合症杆状病毒 (WSBV) 为毒源, 以低剂量病毒感染宿主后, 改变对虾环境中某些理化因子, 并研究其变化与虾发病死亡之间的关系.

1 材料与方法

1.1 材 料

(1) 实验用对虾来自宁波市象山大目涂养殖总公司二场刚起捕的中国对虾 (*Penaeus chinensis*), 体长 7~9 cm, 平均体长 8.4 cm.

(2) 感染毒源为 1998 年 5 月从宁波采集典型发病的中国对虾, 并经核酸探针原位杂交

^{*} 收稿日期: 1999-09-15

证实病原为WSBV。

(3) 实验仪器: 实验用盐度密度计, pH 值快速比色检测试剂盒(北京大学化学系研制), 溶氧量快速比色检测试剂盒(北京大学化学系研制), 均由宁波象山大目涂经济开发总公司养殖二场提供。

1.2 方法

(1) 理化因子变化与对虾发病死亡之间的关系。从虾池中捕捞的对虾选择体色及生命活力正常的个体按每组15尾分成7组, 依次编号。每个水族箱中加注40 L经过滤净化的海水(育苗场提供), 对虾感染前充气暂养2 d。第1~6组每组按1/2病虾虾头组织(约2 g)与适量饵料混匀投喂一次, 以后每日投喂饵料; 第7组设为对照组, 一直投喂饵料直至实验结束; 实验组感染病毒56 h后, 开始改变海水的理化因子。

第1组为双气头充气, 维持溶氧量5~6 mg/L; 第2组依次充气, 中断充气各4 h, 间断充气维持溶氧量2~2.5 mg/L; 第3~7组用单气头连续充气, 维持溶氧量在3~4 mg/L。第3组用“海马牌”海水晶调节海水盐度至33‰, 密度1.025 g/cm³; 第4组用普通淡水调节海水盐度22‰, 密度1.015 g/cm³; 第5组用浓盐酸(AR)调节pH值至5.0~5.5; 第6组用NaOH(AR)调节pH值至7.9~8.1; 第7组为对照组, 盐度26‰, 密度1.019 g/cm³, pH 6.0~6.5。

每天换水1次, 充气饲养, 观察并记录发病与死亡情况。

(2) PCR 检测分析。引物合成及模板制备参照文献^[3], 引物由Gilbo Brl公司合成。反应体系含4 μL 1.25 mmol/L dNTP, 2.5 μL 10倍缓冲液(含合适浓度的MgCl₂, Biostar)、引物各0.5 μL (25 pmol), 2 μL 模板(含病毒的上清)、Taq酶(Biostar) 0.5 μL (0.5 U), 加水补足反应体系至25 μL。95℃预变性2 min; 94℃变性30 s, 58℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 共40循环, 最后72℃充分延伸7 min。反应结束后, ρ为1%琼脂糖凝胶电泳紫外灯观察、拍照。

2 结果与分析

实验组感染低剂量病毒56 h后, 人工改变水质中溶氧量、盐浓度、pH等主要理化因子, 结果发现某些指标的改变明显能诱发对虾发病死亡。未改变以前(对照组)海水中相关的理化指标为: 盐度25‰, pH 6.5~7.0, 溶氧量3~4 mg/L, 实验温度23~25℃。

2.1 溶氧量变化对对虾发病死亡的影响

从图1结果可见断续充气组低剂量病毒感染对虾后, 溶氧量不足明显能诱发对虾发病死亡, 诱发52 h后积累死亡数15尾, 死亡率达100%; 与之对应的高溶氧组52 h死亡率仅为20.7%、72 h也只有33.3%。结果表明缺氧能明显诱发低剂量感染WSBV的对虾发病死亡。

2.2 盐度改变对对虾发病死亡的影响

对虾感染低剂量病毒56 h后分别用海水晶或调整海水盐度为33‰和22‰, 结果二者均能明显诱发对虾发病死亡(图1)。但对虾在低盐环境中的耐受性较高盐环境中强, 对虾转入高盐环境中6~12 h体色明显发白, 从诱发40 h死亡率结果比较可得到证实。高盐组诱发40 h, 对虾死亡率为100%, 而在低盐环境中积累死亡数目9尾, 死亡率为60%。

2.3 pH 值改变对对虾发病死亡的影响

根据当地技术人员提供的资料，中国对虾生长最适 pH 值为 7.8~8.3。本实验进行时，时值雨季节，虾池及附近水域 pH 值 6.0~6.5，呈酸性，对虾感染低剂量病毒 56 h 后，分别转入用 HCl 和 NaOH 调整的 pH 值 5.0 与 pH 值 7.8~8.1 之间环境中。转入酸性环境中（第 5 组）的 15 尾对虾 4 h 内全部死亡（结果未显示），可能是由于对虾对这种极酸性环境严重不适所致。转入碱性环境（第 6 组）15 尾对虾 4 h 内半数以上出现侧卧或沿水箱周围不停游动，8 h 后部分个体恢复正常，诱发至 24 h，积累死亡数目为 8 尾、死亡率 53%。继续延长诱发时间，死亡率并不增加，可能由于对虾已适应这种“最适”的 pH 生长环境。

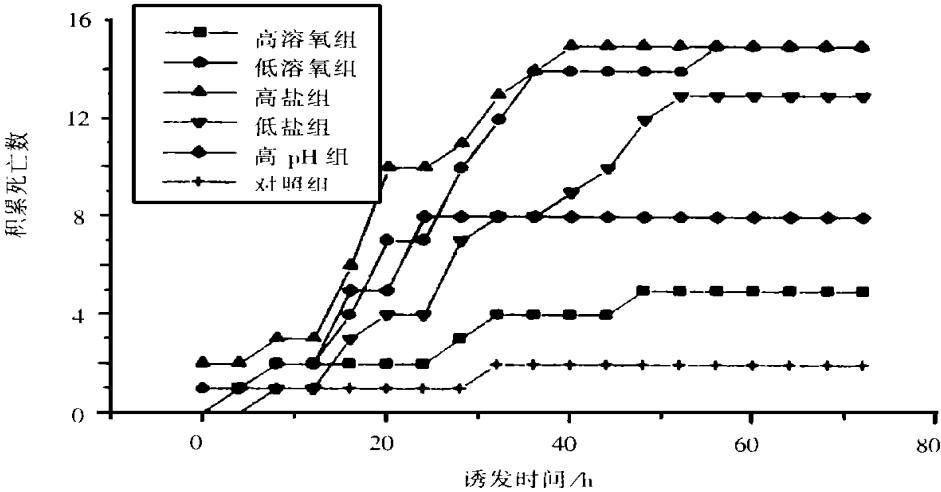


图 1 部分理化因子改变对低剂量病毒感染中国对虾发病死亡的影响

2.4 对照组结果

对照组至实验结束积累死亡数为 2 尾，死亡率 13.3%。由于实验对虾均从虾场捕捞，对照组与实验组在诱发之前死亡对虾可能由于受伤所致。

2.5 PCR 检测

随机抽取高盐组、低盐组、低溶氧组、高 pH 组调整化因子后诱发发病死亡的个体，经高度特异性的引物扩增，均能在 570 bp 处出现明显的 PCR 扩增产物（图 2）。结果证实实验组对虾死亡并非单纯由于对改变后的环境不适应所致，而是环境因子变化与病毒感染相互作用的结果。



图 2 对虾 PCR 检测结果

- 1 刚起捕的对虾；2 对照组对虾；
- 3 高 pH 组诱发死亡对虾；
- 4 低溶氧组诱发死亡对虾；
- 5 高盐组诱发死亡对虾；
- 6 低盐组诱发死亡对虾；
- 7 阳性对照（感染毒源）；8 阴性对照；
- 9 Mark III (λDNA/HindIII + EcoRI)

3 讨论

(1) 溶解氧是水产养殖虾池管理中断定水质好坏的一个重要指标. Sataporn (1998) 研究含氧量对斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 免疫机能的影响时发现, 高溶氧能明显提高吞噬细胞活力. 吞噬细胞对传染性病原的清除作用是甲壳纲动物一种重要的免疫防御机制. 本实验低溶氧组诱发低剂量病毒感染的宿主发病死亡可能也与宿主本能性免疫机能下降相关. 一般来说虾池中临界含氧量应不低于 3.7% ^[4]. 影响虾池含氧降低的因素很多, 一般说来高温及虾池底部有机质的沉积是导致虾池溶氧量, 特别是深水域虾池底部溶氧量下降的主要因素^[5]. 虾池匹配增氧设施, 不仅可以为对虾生长提供充足的溶解氧, 提高对虾抵御外界病原侵染的免疫机能; 同时还有助于清除水质中氨、 H_2S 及某些金属离子对对虾生长造成的危害^[6].

(2) 海水盐度和 pH 值变化直接影响对虾体内酸碱离子浓度与渗透压平衡, 国内外类似的报道不多. 近年来我国沿海对虾发病一般多集中在 5~7 月间, 南部沿海发病时间较早 (5~6 月), 这段时间一般雨水较多, 大量的降雨使得海水中 pH 值大幅度下降, 盐度降低. 常常出现 $pH < 6.5$ 的较强酸性, 一般说来对虾生长最适 pH 范围在 7.8~8.3 范围之间, 盐度为 25% ; 而渤海湾天津、唐山等虾场发病集中在 7 月中下旬至 8 月初, 由于华北地区这段时间高温少雨, 导致海水盐度、pH 值升高及溶氧量下降. 在对通常的苗种和虾池中养成期对虾检测过程中发现均存在不同程度带毒或隐性感染现象, 环境或生态因子变化幅度不大或只有少数胁迫因子发生作用时, 对虾还可以表现出一定的耐受性; 然而当虾池理化因子大幅度改变或多数胁迫因子协同发生作用时, 对虾表现为摄食能力下降, 机体免疫防御机能减弱, 往往诱发病害的大规模发生^[7].

(3) 本实验只是人工模拟改变海水中某些理化因子, 并分别研究这种变化对低剂量病毒感染后的宿主的影响. 结果表明某些环境因子 (如高盐、低溶氧) 的变化能明显诱发对虾发病死亡. 然而现实养殖中的对虾虾池, 这些环境胁迫因子不是单一、孤立地发生作用的, 它们之间往往密切联系、相互关联. 为此, 在实际工作中既要认识到环境因子变化诱发对虾发病死亡的复杂性, 同时又要针对一些主要的理化因子变化采取有效的补救措施, 如在采用高位虾池养虾或在高温季节增设充氧机, 及时补充水体中的溶解氧. 投放饵料时注意少量、多次投喂, 以免大量有机残余物在虾池底部沉积 (有机质的氧化分解会消耗底层溶解氧, 同时产生毒害性的氨). 对持续干旱或阴雨时节所造成的盐度变化可通过适度更换海水或引入淡水加以调节. 我国南部地区一般采取多茬养殖, 有经验的虾农在虾池进水与苗种投放等方面有计划地避开连绵阴雨或高温少雨季节, 减少环境因子对养成期对虾特别是仔虾造成的危害.

参考文献:

- [1] 张建红, 陈棣华, 高学兴, 等. 中国对虾非包涵体杆状病毒在体内的感染与发生[J]. 中国病毒学, 1994, 9(4): 362~366.
- [2] 石正丽, 黄灿华, 陈棣华, 等. 中国对虾杆状病毒的基因克隆及核酸探针的制备与检测[J]. 中国病毒学, 1998, 13(3): 263~267.
- [3] KIMURA T, YAMANO K, NAKANO H, et al. Detection of *Penaeid rodshaped DNA virus* (PRDV) by PCR[J].

Fish Pathology, 1996 31(2): 93~98.

- [4] CHEN J. Water quality criteria for farming the grass shrimp *Penaeid monodon*[A] . In: Proceeding of the first international conference on the culture of *Penaeid prawns*[C] . Philippines: SEAFDEC, Iloilo, 1985. 165.
- [5] CLIFFORD III H C. Marine shrimp pond management; A review[A] . In: WYBAN J. Proceedings of the special session on shrimp farming[C] . World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 1992. 110~137.
- [6] BOYD C E. Water quality management and aeration in shrimp farming. Fisheries and Allied Aquaculture Experiment Station[M] . Alabama: Auburn University, 1989.
- [7] USJSA. An evaluation of potential shrimp virus impacts on cultured shrimp and wild shrimp populations in the Gulf of Mexico and southeast US Atlantic Coastal Waters. JSA Shrimp Virus Working Group[M] . Washington DC, 1997. 20~36.

Relationship of Environmental Factors in Penaeid Shrimp Pond with the Shrimp Explosive Epidemic Diseases

HUANG Can-hua^{*}, SHI Zheng-li, ZHANG Jian-hong, ZHANG Li-ren, CHEN Di-hua,
WU Qing-jiang, WANG Jian-ping, YI Xiang-hua, SI Lie-gang, WU Xiong-fei

Abstract: Some environmental and ecological factors such as salt density, dissolved oxygen and pH in the shrimp-cultured pond were studied to investigate the relationship of their change with the shrimp's explosive epidemic diseases (EEDS). After the shrimp were infected with low dose of virus, the salt density, dissolved oxygen and pH of the seawater were artificially changed respectively. It shows that some of the changes can apparently induce the shrimps to get diseases and improve the death rate. The results help to give some explanation of the cause of the EEDS and bear great importance for guiding the farmer to culture penaeid shrimp on the scientific basis.

Keywords: shrimp-cultured waters; environmental and ecological factors; Penaeid shrimp virus; inducible relationship

^{*} Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China.