

氨氮胁迫下凡纳滨对虾对副溶血弧菌的易感性*

葛红星^{1,2} 李健^{1①} 陈萍¹ 梁忠秀^{1,2} 任海^{1,2} 李东利^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 为探讨养殖水体中总氨氮胁迫对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)“急性肝胰腺坏死综合征(Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome, AHPNS)”发生的影响,设置了1个对照组和4个不同质量浓度氨氮实验组:2.5、5.0、7.5、10.0 mg/L 实验组,胁迫20 d后腹肌注射副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)进行感染。凡纳滨对虾感染后6–24 h,除对照组外,各实验组均出现死亡高峰。24 h后,5.0、7.5和10 mg/L 实验组对虾累积死亡率均高于2.5 mg/L 组,且在同一取样时间各实验组对虾累积死亡率随着氨氮浓度的升高而升高,48 h后各实验组对虾不再死亡,其累计死亡率分别为0、8%、12%、20%和36%。PO活性呈现先升高再降低的趋势,对照组、2.5和5.0 mg/L 实验组PO活性差异性不显著($P>0.05$),7.5和10 mg/L 实验组除12 h外均显著低于对照组($P<0.05$)。SOD活性呈现先升高后下降的趋势,7.5和10 mg/L 实验组SOD活性在感染后除24 h外均显著高于对照组($P<0.05$),而2.5 mg/L 实验组与对照组差异性不显著($P>0.05$)。对照组和2.5 mg/L 实验组对虾LSZ活性在各取样时间点差异性不显著($P>0.05$),7.5和10 mg/L 实验组对虾LSZ活性在3 h、6 h、24 h、48 h时间点显著低于对照组($P<0.05$)。感染6 h后各实验组对虾肝胰腺中LvLT mRNA表达量开始上升,24 h后开始下调,至72 h恢复至原水平。实验结果表明,氨氮胁迫能降低凡纳滨对虾的非特异性免疫酶活性,影响对虾肝胰腺中LvLT mRNA对病原刺激的应答反应,增加对副溶血弧菌的易感性,为预防凡纳滨对虾AHPNS的暴发,养殖水体中总氨氮浓度应控制在1.96 mg/L以下。

关键词 凡纳滨对虾;急性肝胰腺坏死综合征;总氨氮;副溶血弧菌

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0076-07

自2009年以来,凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死综合征(Acute Hepatopancreas Necrosis Syndrome, AHPNS)或早期死亡综合症(Early Mortality Syndrome, EMS)在亚洲地区暴发并蔓延,造成养殖对虾大量死亡(Flegel, 2012)。Lightner等(2012)对AHPNS的症状(昏睡、厌食、生长缓慢、颜色苍白、软壳等)进行了精确的描述并认为该病主要以肝胰腺坏死为主要病理特征。有专家认为,AHPNS的暴发可能是因为病毒感染引起对虾免疫系统损坏,导致急性肝胰腺坏死,从

而发生细菌继发性感染(黄捷, 2012)¹⁾。2013年联合国粮农组织报道副溶血弧菌是其致病菌(FAO, 2013)。副溶血弧菌是一种条件致病菌,当养殖对虾机体免疫力下降时,副溶血弧菌可能侵入机体大量繁殖,引起各类病害的暴发。氨氮是对虾养殖池中最主要的污染物之一,主要来源于对虾的排泄(对虾体内含氮废物主要以氨氮的形式从鳃组织排出),残饵、粪便等含氮有机物的氨化作用。氨氮胁迫可以降低对虾抗病力,导致病害的发生(管越强, 2003¹⁾;刘晓华, 2007)。

* 国家虾产业技术体系专项(CARS-47)和公益性行业(农业)科研专项(201103034)共同资助。葛红星, E-mail: hongxinggelu@163.com

① 通讯作者:李健,研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期:2013-12-08, 收修改稿日期:2014-02-24

1) 黄捷. Research progress on MS/AHPNS of shrimp. 第八届世界华人虾蟹养殖学术研讨会, 宁波, 2012

氨氮胁迫下中国对虾对副溶血弧菌的易感性提高(孙舰军等, 1999), 罗氏沼虾感染弧菌后累计死亡率与水体氨氮浓度呈正相关(Chang *et al*, 2002)。有学者运用副溶血弧菌噬菌体防治副溶血弧菌病, 发现较高浓度氨氮胁迫下效果较差(邱德全等, 2008)。组织病理学和超微病理研究显示, 弧菌常导致对虾淋巴器官、鳃、心脏、肝胰腺及其他组织的坏死和炎症, 尤以淋巴器官和肝胰腺最为严重(Anderson *et al*, 1988; Egusa *et al*, 1988)。

作者研究了氨氮的变化对凡纳滨对虾肝胰腺中免疫相关因子及凡纳滨对虾对副溶血弧菌易感性的影响, 为研究凡纳滨对虾 AHPNS 暴发的环境机制提供相关资料, 也为通过调控养殖环境防治该病的暴发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用凡纳滨对虾购自青岛市宝荣水产科技发展有限公司, 体重(1.76±0.07) g, 体长(5.45±0.18) g, 室内暂养 2 d 后开始氨氮胁迫实验。对虾饲养于 PVC 桶(容积 200 L)中, 每桶分别投放 40 尾。每天按照体重的 4% 投饵, 分早、中和晚 3 次投喂。实验海水为经过沉淀、曝气后的地下海水, 氨氮浓度 0.03 mg/L, 水温 26℃, 盐度 28.50, pH 7.79。采用气石连续充氧, 保证溶解氧在 5.5 mg/L 以上。

1.2 实验方法

1.2.1 氨氮胁迫 根据养殖水体中通常的氨氮浓度和氨氮对凡纳滨对虾的安全浓度(孙国铭等, 2002; 韩永望等, 2012), 采用单因子实验设计, 设置了 1 个对照组和 4 个不同质量浓度氨氮实验组: 2.5、5.0、7.5 和 10.0 mg/L 组, 每组 6 个平行。实验溶液以 NH₄Cl 溶于海水中制得, 各处理组实测氨氮值分别为(0.03±0.006)、(4.21±0.209)、(6.68±0.350)和(9.16±0.375) mg/L。各梯度使用 2 g/L 的 NH₄Cl 溶液调节。实验期间, 为保证水体中氨氮浓度稳定, 投喂后 3 h 吸污, 每隔 24 h

换水 1 次, 换水量为 90%, 并使用实验室光度计(PhotoLab S12, 德国)按时监测水体中氨氮浓度并及时调整。各实验组养殖条件与暂养期间相同, 氨氮胁迫实验进行 20 d。

1.2.2 副溶血弧菌培养及活菌攻毒 副溶血弧菌分离自患 AHPNS 的凡纳滨对虾肝胰腺。将副溶血弧菌接种在 2216E 液体培养基中, 28℃、150 r/min 条件下培养 8–10 h, PBS 缓冲液梯度稀释菌液进行预实验。根据预实验结果, 确定副溶血弧菌注射浓度约为 1.04×10⁷ CFU/ml, 每尾虾注射剂量为 15 μl。每个氨氮胁迫组设 6 个重复, 每个重复随机取虾 40 尾腹肌注射副溶血弧菌。注射后对照组和各实验组对虾随机分为 6 个重复, 其中 3 个重复(各 25 尾对虾)分别于 0、3、6、9、12、24、48、72、96 和 120 h 统计累计死亡率, 另 3 个重复(各 40 尾对虾)分别于各取样时间点随机取对虾 3 尾, 解剖后取肝胰腺, 保存于液氮中备用。

1.3 样品制备

于液氮中研磨对虾肝胰腺。准确称取研磨后的肝胰腺, 按质量(g): 体积(ml)=1: 9 的比例加入 PBS (4℃), 2500 r/min 离心 10 min, 取上清液用于非特异性免疫酶活性的测定。另取研磨后的肝胰腺 0.05–0.1 g 于 1.5 ml 离心管中, 加入 1 ml Trizol (4℃)用于 RNA 的提取。

1.4 酶活测定及基因表达

1.4.1 酶活性测定 分别取 1.3 所制备上清液用于非特异性免疫酶活性的测定。超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶(LSZ)活性的测定参照南京建成试剂盒说明书, 酚氧化酶(PO)的测定按照改进的雷质文等(2001)的方法。

1.4.2 肝胰腺中 LvLT mRNA 表达分析 Trizol 法提取总 RNA, 反转录合成第一链 c DNA。应用 RT-PCR 技术, 以 c DNA 为模板, 凡纳滨对虾 18S rRNA 为管家基因检测 Lv LT mRNA 表达量。引物序列见表 1。

1.5 数据统计

RT-PCR 所测数据采用 2^{-ΔΔCt} 法进行处理。实验结果以平均值±标准差表示, 采用 SPSS 17.0 进行单

表 1 引物编号及序列
Tab.1 The sequence of the primers used in this study

正向引物 Forward primer	序列 Sequence (5'-3')	反向引物 Reverse primer	序列 Sequence (5'-3')
LvLT	GGGAAAGTAGAAGGGCGAGTTA	LvLT	CAACAAAGGTCACGAACAAGAG
18s-F	CCTCGGTTCTATTTTGTCTCGGTTT	18s-R	GCAGATGCTTTCGCAGTAGGT

因素方差分析($P<0.05$)。

2 结果

2.1 凡纳滨对虾死亡的变化

凡纳滨对虾在不同氨氮浓度胁迫后,继续感染副溶血弧菌后,各组对虾 120 h 内死亡率如图 1 所示。氨氮胁迫实验结束后,对虾的体长随着氨氮浓度的升高呈现减小的趋势,且其活动能力和自净能力下降。人工感染副溶血弧菌后,对照组没有出现死亡对虾。各实验组随着注射副溶血弧菌后时间的延长,对虾的死亡率逐渐升高。感染后 3 h 内各实验组均没有出现死亡对虾,多数对虾趴伏于桶底,厌食。感染后 6–24 h 各实验组对虾出现死亡高峰。濒死对虾体色呈白色并微红,软壳,肝胰腺呈淡白色。24 h 后,5.0、7.5 和 10 mg/L 实验组对虾累积死亡率均高于 2.5 mg/L 实验组,并且在同一取样时间各实验组对虾累积死亡率随着氨氮浓度的升高而升高。48 h 后各实验组对虾累计死亡率基本不再变化,各实验组对虾累计死亡率分别为 0、8%、12%、20%和 36%。72 h 后对虾活动增强,摄食率增加。

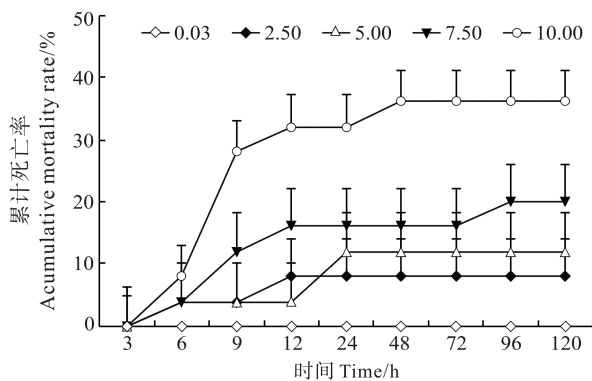


图 1 副溶血弧菌攻毒后对虾的死亡率

Fig.1 The accumulative mortality rate of *Penaeus vannamei* after being challenged by *V. parahaemolyticus*

2.2 副溶血弧菌对经氨氮胁迫的凡纳滨对虾肝胰腺非特异性免疫酶活性的影响

如图 2 所示,凡纳滨对虾感染副溶血弧菌前,氨氮浓度越高,PO 活性、LSZ 活性越低,SOD 活性越高。对虾感染副溶血弧菌后,PO 活性呈现先降低再升高的趋势,对照组、2.5 和 5.0 mg/L 实验组 PO 活性差异性不显著($P>0.05$),7.5 和 10 mg/L 实验组除

12 h 外均显著低于对照组($P<0.05$)。SOD 活性呈现先升高后下降的趋势,各实验组在 12–48 h 后分别达到最高值,后逐渐降低,7.5 和 10 mg/L 实验组 SOD 活性在感染后 3、6、48、72、96、120 h 显著高于对照组($P<0.05$),而 2.5 mg/L 处理与对照组差异性不显著($P>0.05$)。对虾 LSZ 活性在同一取样时间点随着氨氮浓度的升高各实验组 LSZ 活性呈现下降的趋势。对照组和 2.5 实验组对虾 LSZ 活性在各取样时间点差异性不显著($P>0.05$),7.5 和 10 mg/L 实验组对虾 LSZ 活性在 3、6、24、48 h 时间点显著低于对照组($P<0.05$)。

2.3 副溶血弧菌对经氨氮胁迫的凡纳滨对虾肝胰腺中 LvLT 基因相对表达量的影响

感染副溶血弧菌后,RT-PCR 测定的凡纳滨对虾肝胰腺中的 LvLT mRNA 相对表达量如图 3 所示。感染 6 h 后,各实验组对虾肝胰腺中 LvLT mRNA 表达量上升,对照组、2.5、5.0 和 7.5 mg/L 实验组显著高于 10.0 mg/L 实验组($P<0.05$)。感染 12 h 后,各实验组对虾肝胰腺中 LvLT mRNA 表达量均达到最大值,其中,10.0 mg/L 实验组显著高于其他各实验组($P<0.05$)。感染 24 h 后,各实验组对虾肝胰腺中 LvLT mRNA 表达量开始下调,至 72 h 恢复至原水平。对照组 LvLT mRNA 表达量在 6、12、24 h,高于 2.5、5.0 和 7.5 mg/L 实验组,但差异性不显著($P>0.05$),在 48 h 和 72 h 显著高于其他各实验组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 氨氮胁迫对凡纳滨对虾副溶血弧菌易感性的影响

副溶血弧菌是一种广泛分布于世界各地沿海水域中的条件致病菌。当虾蟹类长期在不良的环境条件、受伤或遭遇不利刺激时,会诱发疾病的发生甚至死亡(邱德全等,2008;刘昌彬等,2001;于赫男,2007¹⁾)。注射副溶血弧菌后,对虾体内的微生态平衡被打破,进而导致对虾发病和死亡。实验期间,感染副溶血弧菌后对照组没有死亡对虾,这可能是由于本研究注射剂量为 15 μ l,剂量较小且对照组对虾所处环境没有氨氮等胁迫因子,对虾通过自身免疫应答,快速清除了机体内弧菌的结果。感染弧菌 120 h 内,各实验组对虾的累计死亡率在同一取样时间内,随着氨氮浓度的升高而升高。这可能是由于氨氮胁迫降低了实验组对虾的抗病力,增加了对副溶血弧菌的易感

1) 于赫男. 环境胁迫对罗氏沼虾和凡纳滨对虾行为、生长及生理活动的影响. 暨南大学博士学位论文,2007,34–48

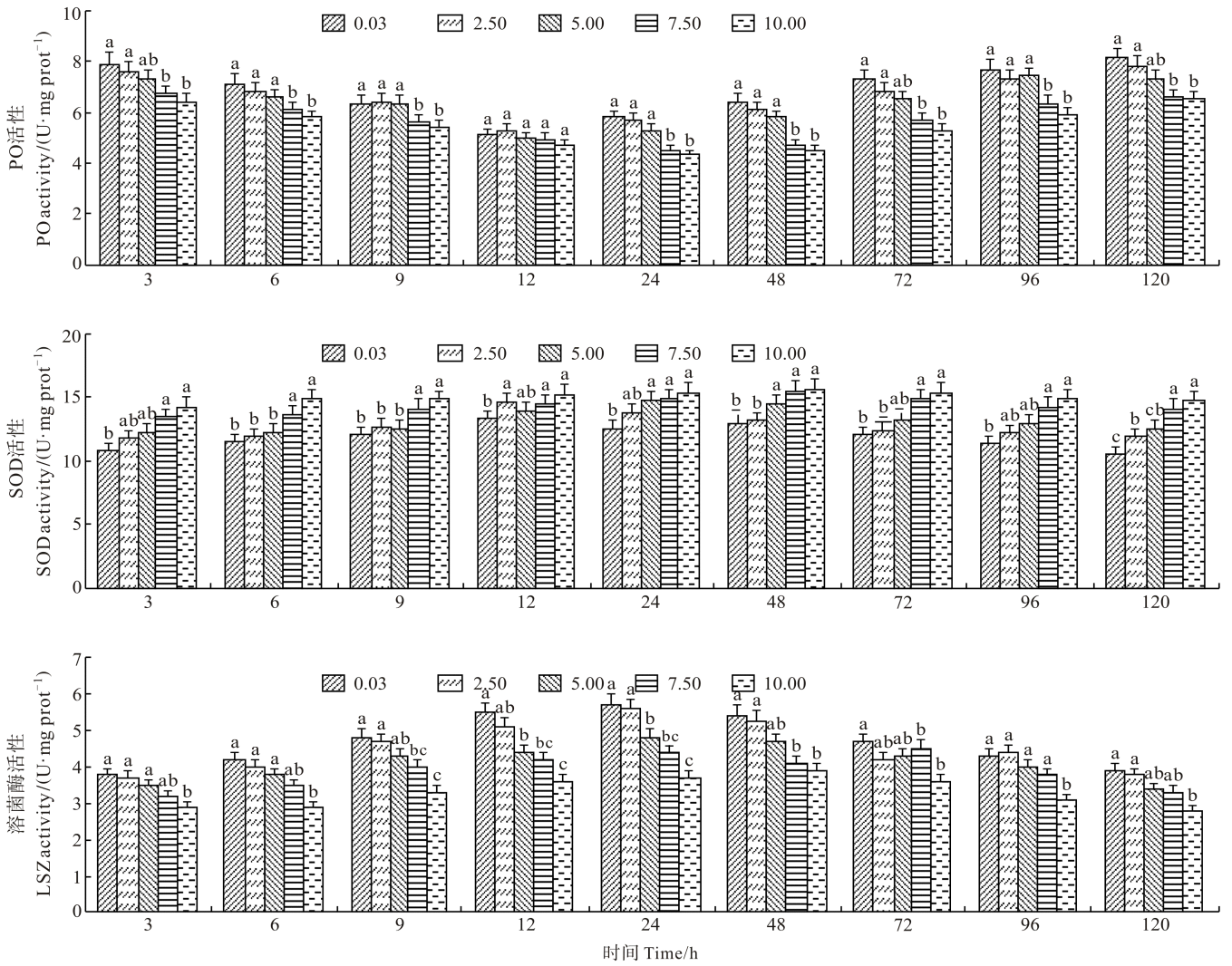


图 2 副溶血弧菌对经氨氮胁迫的凡纳滨对虾肝胰腺非特异性免疫酶活性的影响

Fig.2 Effects of ammonia nitrogen on the immune parameters in hepatopancreas of *P. vannamei* after being challenged by *V. parahaemolyticus*

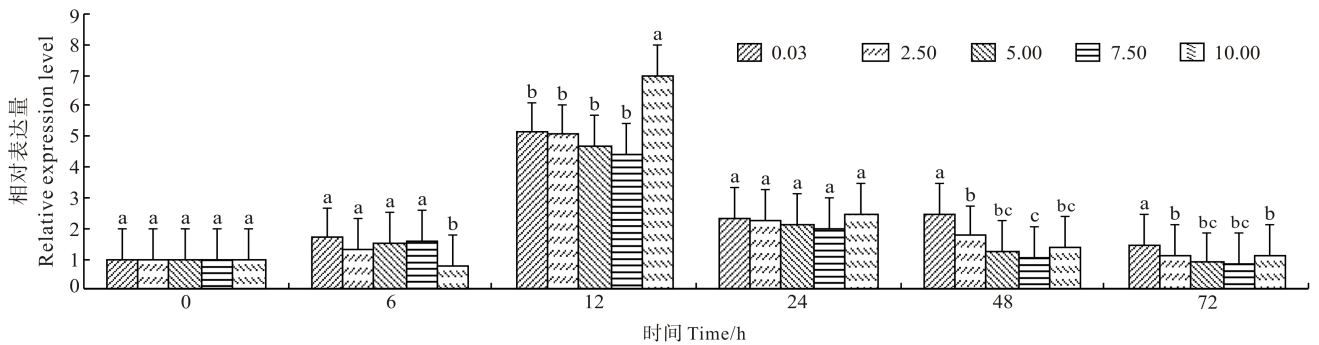


图 3 副溶血弧菌对经氨氮胁迫的凡纳滨对虾肝胰腺中 LvLT 基因相对表达量的影响

Fig.3 Effects of ammonia nitrogen on the relative expression of LvLT mRNA gene in hepatopancreas of *P. vannamei* after being challenged by *V. parahaemolyticus*

性, 这与其他学者关于氨氮导致对虾对病害的发生的结论是一致的(何建国等, 1999)。注射同样剂量的副溶血弧菌后, 对照组死亡率为 0, 这可能是由于对照

组对虾所处环境没有氨氮等胁迫因子, 对虾通过自身免疫应答, 快速清除了机体内弧菌的结果。本研究还发现, 对虾感染副溶血弧菌 6-24 h 内出现死亡高峰,

48 h 后对虾死亡较少,并且注射部位肌肉由发白逐渐变为黑色,这可能是对虾清除或抑制机体内弧菌的结果;感染副溶血弧菌 24 h 后,5.0、7.5 和 10 mg/L 实验组对虾累积死亡率均高于 2.5 mg/L 实验组,且在同一取样时间各实验组对虾累积死亡率随着氨氮浓度的升高而升高,表明氨氮提高了凡纳滨对虾对副溶血弧菌的易感性。参考氨氮对凡纳滨对虾的安全浓度(孙国铭等,2002)建议为预防 AHPNS 的暴发,养殖水体中总氨氮浓度控制在 1.96 mg/L 以下。

3.2 副溶血弧菌对经氨氮胁迫的凡纳滨对虾肝胰腺非特异性免疫酶活性的影响

虾蟹类的酚氧化酶原激活系统的识别和防御作用,在虾蟹类的非特异性免疫反应中发挥着重要作用。异物入侵激活虾类酚氧化酶原系统,酚氧化酶活化后可以迅速杀死异物。人工感染副溶血弧菌前,各实验组 PO 活性随着氨氮浓度的升高而降低,表明长时间氨氮胁迫抑制对虾 PO 活性。感染副溶血弧菌后,对照组和较低浓度实验组比高浓度组先下降到最低值后,较快恢复且在同一取样时间下随着氨氮浓度的升高而降低,这可能也是因为较高浓度氨氮破坏了酚氧化酶激活系统(于赫男,2007¹⁾;刘昌彬等,2001;李永等,2012),影响机体的应激反应,从而降低对虾抗病力。对照组、2.5 和 5.0 mg/L 实验组 PO 活性差异性不显著($P>0.05$),7.5 和 10 mg/L 实验组除 12 h 外均显著低于对照组($P<0.05$),说明氨氮高于 5.0 mg/L 超出了机体的调节范围并对 PO 活性造成影响。本研究说明,总氨氮质量浓度超过 5.0 mg/L 处,可能降低凡纳滨对虾免疫力,从而提高对虾对副溶血弧菌的易感性。

超氧化物歧化酶(SOD)是机体内重要的抗氧化酶,能有效清除氧自由基并对机体的氧化和抗氧化平衡起着重要作用。感染副溶血弧菌前,各实验组氨氮越高,对虾肝胰腺中 SOD 活性越高,这可能是由于高浓度的氨氮胁迫下,对虾体内氧自由基较多。感染副溶血弧菌后,各实验组 SOD 活性呈现先升高后降低的趋势,对照组和 2.5 mg/L 实验组于 24 h 达到最高值,而高浓度实验组达到最高值时间延后且同一取样时间点 SOD 活性随着氨氮浓度的升高而升高。这可能是由于长时期高浓度氨氮胁迫抑制对虾 SOD 活性,扰乱了对虾清除氧自由基等生化过程(刘昌彬等,2001)。7.5 和 10 mg/L 实验组 SOD 活性在感染后第 3、6、48、72 和 96 h 显著高于对照组($P<0.05$),而 2.5 mg/L 处理与对照组差异性不显著($P>0.05$),说明低浓度氨

氮不会显著影响对虾 SOD 活性,但高浓度氨氮则会扰乱机体内正常生理功能,导致抗病力降低。本研究表明,总氨氮质量浓度超过 2.5 mg/L 可能影响机体内抗氧化防御功能,从而提高对虾对副溶血弧菌易感性。

溶菌酶是一种碱性蛋白,能够破坏细菌细胞壁,是虾蟹类非特异性免疫防御体系的重要组成部分(冯伟等,2011;Lee *et al*,2004)。本研究表明,凡纳滨对虾在氨氮胁迫 20 d 后,肝胰腺中溶菌酶活性随着氨氮浓度的升高而降低,表明长期氨氮胁迫会降低对虾肝胰腺中溶菌酶的活性。感染副溶血弧菌后,各实验组溶菌酶活性呈现先升高后降低的趋势。这可能是由于副溶血弧菌刺激机体产生免疫反应,促进机体中抗菌蛋白和溶菌蛋白的合成,故机体 LSZ 活性升高,这与其他学者等关于对虾在弧菌感染初期,LSZ 基因的表达显著上升的结论是一致的(Hikima *et al*,2003)。而在感染后期,可能是副溶血弧菌导致机体机细胞的代谢紊乱,破坏了某些合成机制,故 LSZ 活性降低。对照组和 2.5 实验组对虾 LSZ 活性在各取样时间点差异性不显著($P>0.05$),7.5 和 10 mg/L 实验组对虾 LSZ 活性在 3、6、24、48 h 显著高于对照组($P<0.05$),且在同一取样时间各实验组 LSZ 活性随着氨氮浓度升高而降低,说明低浓度氨氮不会显著降低 LSZ 活性,但高浓度氨氮显著降低 LSZ 活性。以上研究表明,总氨氮质量浓度高于 2.5 mg/L 情况下,对虾溶菌酶活性就会受到抑制,免疫水平下降。

3.3 副溶血弧菌对经氨氮胁迫的凡纳滨对虾肝胰腺中 LvLT 基因相对表达量的影响

C-型凝集素是一类具有结构和功能多样性的模式识别蛋白,具有结合糖类和凝聚细胞的能力,在甲壳类非特异性免疫系统中扮演着重用作用。凡纳滨对虾体内存在着多个 C-型凝集素,包括 LvLT、LVL、LvCTL1 等(Ma *et al*,2007;Sun *et al*,2007;Zhao *et al*,2009)。感染副溶血弧菌前,各实验组对虾肝胰腺中 LvLT mRNA 表达量与对照组没有差异,这是因为 LvLT 基因正常情况下表达水平很低,各实验组对虾虽经氨氮长期胁迫,但没有病原刺激诱导其表达。本研究发现,感染副溶血弧菌后,各实验组肝胰腺中 LvLT mRNA 表达水平均上升,后逐渐恢复正常值,表明 LvLT mRNA 参与了机体应答副溶血弧菌的侵染。凡纳滨对虾注射 WSSV 2 h 后 LvLT mRNA 表达量开始上升至 4 h 达到最高值(Ma *et al*,2007),而本研究中 12 h 后达到最大值,这可能是由于氨氮胁迫抑

1) 于赫男. 环境胁迫对罗氏沼虾和凡纳滨对虾行为、生长及生理活动的影响. 暨南大学博士学位论文,2007,34-48

制了机体内免疫应答机制,也可能是因为本研究刺激病原是弧菌,而非 WSSV 所致。本研究中,10 mg/L 实验组 LvLT mRNA 表达量于 12 h 显著高于其他实验组,这可能是由于氨氮胁迫导致机体内应激紊乱。感染 24 h 后,各实验组对虾肝胰腺中 LvLT mRNA 表达量开始下调。LvLT mRNA 表达量下降的原因可能是机体在感染副溶血弧菌过程中,肝胰腺中 LvLT mRNA 降解或转移到感染部位。本研究中 PO, SOD 及 LSZ 活性在 12–48 h 内达到极值,表明 LvLT mRNA 可能参与凡纳滨对虾机体内非特异性免疫酶活性的调节作用,这与本研究中感染副溶血弧菌 48 h 后,各实验组对虾不再死亡的结果也是一致的。以上研究结果表明,感染副溶血弧菌后, LvLT mRNA 在凡纳滨对虾的天然免疫中起着重要作用。对照组 LvLT mRNA 表达量在 6、12、24 h 高于 2.5、5.0 和 7.5 mg/L 实验组,但差异性不显著($P>0.05$),在 48 h 和 72 h 显著高于其他各实验组($P<0.05$),表明氨氮胁迫影响了对虾肝胰腺中 LvLT mRNA 对免疫系统的调控。另外,本研究发现,对虾感染副溶血弧菌后, LvLT mRNA 表达量与感染前有显著变化,这表明对虾肝胰腺中 LvLT mRNA 可以作为 AHPNS 的参考指标。

4 结语

氨氮是对虾养殖池中最主要的污染物之一,已经有研究表明,水体中氨氮超过对虾耐受限度时,可能严重影响对虾的呼吸、蜕皮和排泄等正常生理功能,导致对虾对病原微生物抵抗力的下降,提高其易感性。本研究发现,高浓度的氨氮(高于 2.5 mg/L)长期胁迫凡纳滨对虾,导致对虾感染副溶血弧菌后死亡率增大,且其肝胰腺中重要的非特异性免疫酶活性降低。同时影响其 LvLT 基因表达量,表明高浓度氨氮胁迫下凡纳滨对虾非特异性免疫力下降,增加其对副溶血弧菌的易感性。目前有报道称,凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死综合征的暴发,可能是因为病毒感染或者是养殖环境恶化引起对虾免疫系统损坏,导致急性肝胰腺坏死,从而发生细菌继发性感染,而高浓度氨氮胁迫可直接损伤对虾肝胰腺。本实验为研究凡纳滨对虾 AHPNS 暴发的环境机制提供相关资料,也为通过调控养殖环境防治该病的暴发提供理论依据。所以在凡纳滨对虾养殖过程中,为预防 AHPNS 的暴发,水体中总氨氮浓度应控制在 1.96 mg/L 以下。

参 考 文 献

孙舰军, 丁美丽. 氨氮对中国对虾抗病力的影响. 海洋与湖

- 沼, 1999, 30(3): 267–272
- 刘晓华, 曹俊明, 杨大伟, 等. 氨氮胁迫前后凡纳滨对虾组织中抗氧化酶和脂质过氧化产物的分布. 水利渔业, 2007, 27(6): 24–26
- 刘昌彬, 王金星, 刘存仁, 等. 非生物环境因子对暴发性流行病病原感染的中国对虾发病的影响. 水产学报, 2001, 25(1): 58–63
- 孙国铭, 汤建华, 仲霞铭, 等. 2002. 氨氮和亚硝酸氮对南美白对虾的毒性研究. 水产养殖, 2011, 1: 22–24
- 冯伟, 李健, 李吉涛, 等. Vc 对中国对虾非特异免疫因子及 TLR/NF- κ B 表达量的影响. 水产学报, 2011, 35(2): 200–208
- 何建国, 莫福. 对虾白斑综合征病毒爆发流行与传播途径、气候和水体理化因子的关系. 中国水产, 1999, 7: 34–37
- 李永, 杨其彬, 苏天凤, 等. 氨氮对斑节对虾的毒性及免疫指标的影响. 上海海洋大学学报, 2012, 21(3): 358–362
- 邱德全, 周鲜娇, 邱明生. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾抗病力和副溶血弧菌噬菌体防病效果研究. 水生生物学报, 2008, 32(4): 455–461
- 韩永望, 李健, 潘鲁青, 等. 微孔管增氧和气石增氧对凡纳滨对虾室内养殖影响的比较研究. 中国海洋大学学报, 2012, 42(4): 41–47
- 雷质文, 黄健, 杨冰, 等. 感染白斑综合征病毒(WSSV)对虾相关因子的研究. 中国水产科学, 2001, 8(4): 46–51
- Anderson IG, Shamsudin MN, Shariff M, *et al.* Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, culture in Malaysian brackish water ponds, *Asian Fish Sci*, 1988, 2: 93–108
- Chang W, Chen JC. The virulence of *Enterococcus* to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress. *Fish Shellfish Immunol*, 2002, 12: 97–109
- Egusa S, Takahashi Y, Itami T, *et al.* Histopathology of vibriosis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate. *Fish Pathol*, 1988, 23(1): 59–65
- Flegel TW. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *J Invert Pathol*, 2012, 110: 166–173
- Hikima S, Hikima J, Rojtinnakorn J, *et al.* Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene*, 2003, 316: 187–195
- Lee MH, Shiau SY. Vitamin E requirements of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16: 475–485
- Lightner DV, Redman RM, Pantoja CR, *et al.* Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*, January/February: 2012, 40
- Ma TH, Tiu SH, He JG, *et al.* Molecular cloning of a C-type lectin(LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: early gene down-regulation after WSSV infection. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(2): 430–437
- Sun J, Wang L, Wang B, *et al.* Purification and characterization of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(2): 292–299
- Zhao ZY, Yin ZX, Xu XP, *et al.* A novel C-type lectin from the shrimp possesses anti-white spot syndrome virus activity. *J Virol*, 2009, 83(1): 347–356

(编辑 江润林)

The Immune Response of *Litopenaeus vannamei* and Its Susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* Under Stress Caused by Ammonia Nitrogen at Different Concentrations

GE Hongxing^{1,2}, LI Jian¹①, CHEN Ping¹, LIANG Zhongxiu^{1,2}, REN Hai^{1,2}, LI Dongli^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS), also known as Early Mortality Syndrome (EMS), was officially reported in China in 2010 and has caused large-scale die-offs of cultivated shrimp in several Asian countries. A research team of the University of Arizona has identified that the pathogen is *Vibrio parahaemolyticus* which is a strain of a bacterium commonly found in brackish coastal waters around the globe. Because *V. parahaemolyticus* is a conditioned pathogen, it is very important to study the effects of ammonia nitrogen on the toxicity of this pathogen to *Litopenaeus vannamei*. To evaluate the effects of total ammonia nitrogen during the outbreak of AHPNS in *L. vannamei*, we examined the susceptibility to the pathogen, the non-specific immunity and the expression of LvLT mRNA in the hepatopancreas of the shrimp. Shrimp underwent the ammonia stress for 20 days with different ammonia nitrogen concentrations: 2.5 mg/L, 5.0 mg/L, 7.5 mg/L, 10.0 mg/L and the control concentration. After the exposure to *V. parahaemolyticus*, the death rate of shrimp peaked in 6–24 h. The accumulative mortality rates of the treated groups were 0, 8%, 12%, 20% and 36% respectively at 120 h. The activities of phenoloxidase (PO) reached the lowest at 12 h in the control, 2.5 and 5.0 mg/L groups, and at 24 h in the 7.5 and 10.0 mg/L groups. The activity of superoxide dismutase (SOD) increased at first and then gradually declined, and lysozyme (LSZ) exhibited the same trend. The expression of LvLT mRNA in the hepatopancreas increased at 6 h in all groups and was significantly higher in the control, 2.5, 5.0 and 7.5 mg/L group than that in the 10.0 mg/L group. The LvLT mRNA expression reached the maximum at 12 h and then declined gradually at 24 h. The results indicated that high ammonia nitrogen could cause depression in the immunity of *L. vannamei*, and subsequently increase their susceptibility to *V. parahaemolyticus* and the resultant mortality rate. Therefore it is crucial to regulate the concentration of total ammonia nitrogen in aquatic environment to prevent the breakout of Acute Hepatopancreas Necrosis Syndrome.

Key words Acute Hepatopancreas Necrosis Syndrome; *Litopenaeus vannamei*; Total ammonia nitrogen; *Vibrio parahaemolyticus*

① Corresponding author: LI Jian, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn