

文章编号: 1000-0615(2001)01-0058-06

非生物环境因子对用暴发性流行病病原实验感染的中国对虾发病的影响

刘昌彬¹, 王金星¹, 刘存仁¹, 吴中华², 陈忠科¹, 张红卫¹

(1. 山东大学生命科学院, 山东 济南 250100; 2 湖北黄冈师范专科学校生物系, 湖北 黄冈 436100)

摘要: 在保证有充足氧气的前提下, 按正交设计, 研究水质氨态氮浓度、pH 值、盐度和温度四种环境因子, 对实验感染暴发性流行病病原的中国对虾发病的影响。在感染的不同时期, 这四种环境因子对带毒对虾死亡率的影响程度不同。感染后 3~4 天, 影响程度从大到小的次序为盐度、pH 值、温度、氨态氮浓度, 感染后 5 天, 影响程度从大到小的次序变为氨态氮浓度、pH 值、温度、盐度。我们还进行了混合水平的正交实验, 即在盐度水平不变, 氨态氮浓度降到适宜的水平, 再研究温度、pH 值、氨态氮三种因子对带毒对虾的影响, 结果表明: 三种环境因子的影响程度由大到小的次序为温度、氨态氮浓度和 pH 值, 这与我国养殖对虾发病时间从南到北推移的现象相符合。还对环境因子与发病率和死亡率的关系进行了探讨。

关键词: 中国对虾; 环境因子; 暴发性流行病; 正交设计

中图分类号: S945.4 文献标识码: A

Effects of non-biologic environmental factors on *Penaeus chinensis* infected by the explosive epidemic disease virus

LIU Chang-bin¹, WANG Jin-xing¹, LIU Cun-ren¹,
WU Zhong-hua², CHEN Zhong-ke¹, ZHANG Hong-wei¹

(1. Life Science College, Shandong University, Jinan 250100, China;

2. Department of Biology, Huanggang Normal College of Hubei, Huanggang 436100, China)

Abstract: The effect of non-biologic environmental factors under saturated dissolve oxygen concentration on *Penaeus chinensis* infected by explosive epidemic virus was studied. The level of salinity, temperature, pH and NH₃-N was changed, according to the orthogonal table. Factors appeared different influence degree at the different stages after infection. In 3-4 days the influence degree of these four factors from heavy to light was salinity, pH, temperature and NH₃-N, but from the fifth day the order was changed as NH₃-N, pH, temperature and salinity. After that, the level of salinity was fixed and the level of temperature, pH and NH₃-N was changed, according to mixed level of orthogonal design. The result showed that the influence degree of three factors from heavy to light was temperature, NH₃-N and pH. This result accorded with the explosive time of the shrimp

收稿日期: 2000-04-03

资助项目: 国家九五攻关项目资助(96-005-03)

第一作者: 刘昌彬(1964), 男, 山东文登人, 工程师, 主要从事水产养殖及病害防治研究。Tel: 0531-8564524, E-mail: zhw@sdu.edu.cn

disease in shrimp culture industry in China. The relationship among environmental factors, and incidence of the disease and mortality rate of *Penaeus chinensis* was discussed.

Key words: *Penaeus chinensis*; environmental factor; explosive epidemic disease; orthogonal design

自 1993 年以来, 由于中国对虾暴发性流行病的发生, 给我国对虾养殖业带来了巨大的经济损失, 国内外学者已进行了大量的研究. 多数报道主要集中在关于对虾暴发性流行病的病症、病原以及寄生虫病、赤潮生物和病原菌的影响等方面的研究^[1-7]. 对暴发性流行病的发病原因, 尚缺乏深入的实验研究和综合性的报道. 在水产养殖中, 非生物性环境因子往往引起生物性因子的变化, 进而影响养殖生态环境的复杂系统. 我们选用温度、盐度、pH 值(或总碱度)、氨态氮四种环境因子, 按正交法设计不同水体环境, 结合进行人工感染实验, 研究非生物环境因子对实验感染暴发性流行病病原的中国对虾发病的影响.

1 材料与方法

1.1 材料与饲养管理

1997 年 6 月 12 日, 从青岛流亭虾池运回体长约 3cm 左右的健康虾苗及中国水产科学研究院黄海水产研究所麦岛试验基地过滤海水, 在我们循环海水实验室进行实验. 海水蓄在室外蓄水池, 虾苗分别放入室内以往实验中已证明效果较好的瓦缸中暂养. 在暂养期间, 保持间歇充气(停 10min, 充气 10min), 每天抽取缸底部残饵, 添加 1/3~ 1/2 体积海水, 投喂少量的人工饵料及菲律宾蛤仔肉. 为节约海水, 抽出的底水经过曝气、沙滤、活性炭过滤、再曝气、单细胞藻类培养, 加注人工海水一系列处理后可以反复利用 3~ 5d. 经过 42d 暂养, 对虾已完全适应此饲养体系, 平均体长已达到 6cm 左右, 选择大小一致、生命力活跃的健康对虾进行人工感染正交实验. 在 1997 年实验的基础上, 调整了几个环境因子的水平, 于 1998 年从山东无棣虾场运回健康虾, 进行了补充正交实验.

1.2 毒种来源与感染实验

对虾感染实验采用投喂法, 所投喂病虾采自山东文登华山盐场, 经病毒纯化实验证明确实含有暴发性流行病病毒^[7].

1.3 $L_9(3^4)$ 正交法实验设计

选择温度、盐度、pH 值(或总碱度)和氨态氮四种非生物环境因子, 按正交 $L_9(3^4)$ 法设计不同实验水体环境组, 进行人工感染实验^[8]. 每种环境因子各设三个水平(低、中、高)(如表 1 所示)和二一个平行, 实验虾共为 9 个实验组. 每组用 2 个瓦缸, 每个瓦缸水体 30 升, 放养对虾约 10 只(表 4). 利用过滤海水在每种饲养温度条件下另各设一对照组.

实验虾饲养的水体温度控制通过调节室温达到. 水体盐度是先用 2 的变化使对虾进行驯化之后再保持稳定. 水体 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量通过添加 NH_4Cl 维持稳定. pH 值的调节采用 $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 溶液、饱和生石灰上清液 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 、 $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 溶液、 $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2SiO_3 溶液进行.

表 1 正交 $L_9(3^4)$ 法实验设计

Tab. 1 The experiment of orthogonal design

水平	温度(℃)	盐度	pH	氨态氮($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	17~ 18	10±2	6.50~ 7.20	0.75~ 1.32
2	20~ 22	20±2	7.92~ 8.14	1.83~ 2.65
3	25~ 27	35±2	8.40~ 9.2	2.98~ 3.38

1.4 环境因子的测定

对各种水体因子进行定时检测。盐度用折光盐度计检测。pH 值、总碱度用酸度计测定,亚硝酸盐用对氨基苯磺酰胺一二盐酸 + 奈乙二胺分光光度法检测, $\text{NH}_3\text{-N}$ 采用次溴酸钠氧化法检测^[9]。

2 结果与分析

2.1 养殖水体的动态变化和对暴发性流行病发病的影响

在养殖水体中温度和盐度是相对稳定的,酸碱度 pH 值为 8 时也相对稳定。当水体的 pH 值为 9 时, 5h 后降低至 8.41。在 pH 值为 6.5 时, 1h 后上升至 7.01, 而氨态氮是随着饵料污染及对虾排氨作用会不断增加, 为维持条件的稳定必须控制水体 CO_2 缓冲体系的变化, 采用定量添加 Na_2CO_3 、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 使 pH 上升保持 8.40 以上; 添加 H_2SiO_3 、 HCl 使 pH 降至 6.5, 或保持在 7.00 左右, 同时按实验设计采取多次配水或换水。养殖水体中几种环境因子的动态变化情况如表 2 示。

表 2 养殖水体中几种因子的动态变化

Tab. 2 The dynamic changes of factors in culture waters

试验组	水温 (A) ($^{\circ}\text{C}$)	盐度 (B)	pH (C)	氨态氮 (D) ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	总碱度 ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	亚硝酸氮 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	17~ 18	10 \pm 2	6.5~ 7.2	0.751~ 1.234		
2	17~ 18	20 \pm 2	8~ 8.12	2.156~ 2.342		
3	17~ 18	35 \pm 2	8.9~ 8.51	2.984~ 3.325		
4	20 \pm 2	10 \pm 2	7.98~ 8.14	3.15~ 3.27	3.72~ 4.20	0.17~ 0.223
5	20 \pm 2	20 \pm 2	9.11~ 8.61	1.057~ 1.326	5.06~ 6.72	0.128~ 0.184
6	20 \pm 2	35 \pm 2	6.58~ 7.18	2.25~ 2.588	2.89~ 3.54	0.215~ 0.279
7	25~ 27	10 \pm 2	8.95~ 8.76	1.83~ 2.655	4.52~ 6.24	0.125~ 0.151
8	25~ 27	20 \pm 2	6.63~ 7.05	3.18~ 3.38	2.63~ 3.49	0.322~ 0.392
9	25~ 27	35 \pm 2	7.92~ 8.09	1.212~ 0.8	4.47~ 4.35	0.10~ 0.15

表 2 中的实验组 6 和 8 的 pH 和氨态氮条件相似, 即 pH 值低, $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度较高, 相应的 $\text{NO}_2\text{-N}$ 含量也高, 但两组的温度不同, 实验组 6 为中温组, 而 8 为高温组。高温条件下实验组 8 于 96h 首先出现暴发性流行病症状, 而中温组实验 6 于 136h 出现典型症状。暴发性流行病典型病症: 病虾头胸甲上有白斑, 严重者 5~ 6 腹节也出现, 肌肉浑浊。在出现白斑之前, 几乎所有被感染对虾的肝胰腺包膜先后从底面(腹面) 向后、向上方扩大呈现白色, 头胸区背面甲壳微红呈模糊不清的特征。另外出现少量黑鳃、黄鳃、鳃水肿、较多的红腿、白肌等症状, 高 pH 值的实验组对虾鳃部变白, 原因可能是水体中二价以上阳离子的 OH^- 、 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 等沉淀物。

2.2 正交实验的统计分析

根据表 3 被感染虾的死亡率总和获得 3~ 5d 正交实验的极差分析见表 4。在感染的不同时期, 这四种环境因子对感染暴发性流行病病原的对虾死亡率的影响程度不同, 于感染后 3~ 4d, 影响程度从大到小的次序为盐度、pH 值、温度、氨氮浓度; 感染后 5d, 影响程度从大到小的次序变为氨态氮浓度、pH 值、温度、盐度。3~ 4d, 盐度的变化对死亡率影响最大, 中等盐度对死亡率影响小, 低盐影响较大, 高盐对死亡率影响最大; 5d 氨态氮的变化对死亡率影响最大, 高氨态氮引起最大的死亡率; 3~ 5d pH 变化对死亡率影响始终为较重要的环境因子。其中 3~ 4d 高 pH 值引起最大的死亡率。

表 3 感染虾死亡之情况

Tab. 3 The dead number of infected shrimps

试验组	尾数		死亡数								
			1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d
1	15	7(重复 I)	0	0	1	0	2	1	0	2	0
		8(重复 II)	0	0	4	0	2	1	0	1	0
2	14	7	0	0	1	0	0	1	0	2	0
		7	0	0	0	1	0	0	1	1	0
3	14	7	0	7							
		7	0	7							
对照 I	14		0	0	0	0	0	1	0	0	
4	12	7	1	1	0	1	0	0	2	1	
		5	1	0	1	0	1	0	1	1	
5	21	11	0	0	1	1	4	3	1	1	
		10	0	0	0	2	3	3	1		
6	20	11	0	0	0	1	2	1	5	2	
		9	1	0	2	0	0	2	1	2	
对照 II	20		1	0	0	0	0	0	0	0	
7	12	6	3	0	1	0	0	1	0	1	
		6	2	1	0	0	1	1	0	0	1
8	16	8	0	0	1	2	4	1			
		8	1	0	0	1	2	4			
9	19	10	0	2	2	0	3	3			
		9	3	1	0	2	1	2			
对照 III	20		0	1	0	0	0	0	1	0	0

表 4 3~5 天正交实验极差分析

Tab. 4 Analysis of the orthogonal experimental ranks from the third to the fifth day

天数	温度(A)				盐度(B)				酸碱度(C)				氨态氮(D)				因素主次顺序
	水平			极差值	水平			极差值	水平			极差值	水平			极差值	
	1	2	3		1	2	3		1	2	3		1	2	3		
3	92.9	37	75.4	55.9	83.2	16.1	105.9	89.8	40.9	55.8	108.6	67.7	52.6	54.8	97.9	45.3	BCAD
4	97.6	54.5	95.3	43.1	88.0	43.1	116.4	73.3	56.4	72.7	118.3	61.9	69.7	62.6	102.6	40	BCAD
5	115.5	89.3	139.6	50.3	118.1	90.2	136.1	45.9	105.3	93.1	146	52.9	123.4	74.2	46.8	72.6	DCAB

将感染后 3d 和 5d 的正交试验结果进行 F 检验(表 5)。3d 时, 四种因子差异显著 ($P < 0.05$), 其中盐度和 pH 值差异极显著 ($P < 0.01$)。5d 时, 四种因子差异显著 ($P < 0.05$), 其中氨态氮差异极显著 ($P < 0.01$)。这与极差分析直观判断是一致的。

由于正交试验是部分实施的多因素试验, 而多因素之间差异极显著。有必要采用多重比较法进行处理间差异性检验, 以免漏掉优良的组合。3d

和 5d 的无差异的优越组合分别为 $A_2B_3C_1D_2$ 、 $A_3B_2C_1D_3$ 、 $A_1B_2C_2D_2$ 、 $A_2B_2C_3D_1$ 和 $A_2B_3C_1D_2$ 、 $A_1B_2C_2D_2$ 。两者合而为一, 最优越的组合(即到第 5 天死亡率最低组合) $A_1B_2C_2D_2$ (实验组 2, 即低温、中等盐度、中等 pH 和中等氨态氮的条件下的实验组) 和 $A_2B_3C_1D_2$ (实验组 6, 高盐度、中温、低 pH 和中等氨态氮的条件下实验组)。它们的死亡率在第 6 天分别为 21.4% 和 45%。而在高温、高氨态氮的第 8 实验组, 第 6 天的死亡率达到 100%。

表 5 3d 和 5d 的 F 检验结果

Tab. 5 The result of F test in the third day and fifth day

因素	F 检验	
	3d	5d
温度(A)	6.25*	5.42*
盐度(B)	18.16**	4.6*
pH(C)	10.56**	6.57*
NH ₅ -N(D)	5.43*	11.78**

注: * 为差异显著 ($P < 0.05$), ** 为差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.3 混合水平实验的统计分析

1998年,在中等盐度(25~27)、氨态氮浓度降到适宜水平的条件下,我们进行了温度、酸碱度、氨态氮三种环境因子对带毒对虾影响的混合水平的正交实验,实验结果于表6。

极差分析表明:3d后,三种环境因子对带毒对虾的影响程度从大到小依次为温度、氨态氮、pH值。

表6 混合水平正交 $L_6(2 \times 3^2)$ 法实验设计与结果

Tab. 6 The experimental design and result of mixed level orthogonal table

实验组	虾数	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	pH	氨态氮 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	累计死亡率(%)								
					1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	9d	11d
1	42	15~16	6.5+0.5	<0.5	2.4	2.4	4.8	4.8	4.8	7.2	9.5	59.6	88.2
2	41	15~16	8.0±0.1	1	4.9	7.3	21.9	26.8	31.7	34.1	34.1	38.9	48.6
3	40	15~16	9.1-0.5	≥2	5	7.5	7.5	15	15	25	25	27.5	50
4	29	26~27	9.1-0.5	1	27.6	58.6	86.2	93.1	100				
5	28	26~27	6.5+0.5	≥2	59.2	74	92.8	97.2	100				
6	29	26~27	8.0±0.1	<0.5	3.4	13.7	62.1	69	72.4	93.1	100		
3d极差		66	6.9	16.6									

3 讨论

对虾暴发性流行病的发生与多种因素的作用有关,暴发性流行病病毒感染是必要条件,而是否发病与温度、溶解氧、盐度、氨态氮、pH或总碱度、浮游生物、放养密度和营养条件等多种生物与非生物因子有关。根据有关文献和我们一些初步研究结果,在一系列的环境因子中,选择温度、盐度、pH和氨态氮四个非生物环境因子,利用正交实验的方法设计了本实验。关于三个水平的选择,其中的中等水平接近对虾在大田养殖条件的实际水平,低等水平和高等水平为两个极端水平。

我们采用了投喂病虾的感染实验方法,以便更加接近对虾养殖的实际情况。为了保证实验对虾都能感染,对虾在感染前停食一天,感染当天分几次投喂。同时对死亡对虾的特征进行观察记录,并随机取材,用于电镜观察和生化检测。在感染对虾胃、后肠和鳃中,检出了大量的杆状病毒,并且生化指标与大田病虾相似^[10],这证明对虾确实感染病毒而死。根据对正交实验结果分析,四种环境因子对带毒对虾的死亡率影响程度不同,感染3~4d,影响程度从大到小的次序为盐度、pH、温度和氨态氮。感染5d后,影响程度从大到小的次序为氨态氮、pH、温度和盐度。即对虾带毒感染5d以上,氨态氮对对虾的死亡率影响最大。感染的对虾在养殖过程中发病时间早晚,与养殖水体的环境条件密切相关。根据我们的实验结果,即使是带毒对虾,在适宜的环境的条件下(如 $A_2B_3C_1D_2$ 和 $A_1B_2C_2D_2$),就可以延缓对虾的发病时间。另外,我们的实验还说明,即使在较低温度条件下(15~17 $^{\circ}\text{C}$),只要对虾正常摄食,即可以感染病毒,只是出现典型症状和引起死亡需要较长时间。

从表3可以看出,第3实验组(低温、高盐、高pH、高氨态氮)对虾放养2d后全部死亡。通过测定水中氨态氮(表2)可见,在低温条件下,氨态氮的浓度始终为较高水平(2.98~3.325 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),这可能造成带毒对虾迅速死亡的原因。这说明高pH、高氨态氮浓度对带毒对虾的死亡率影响很大。为此,1998年我们又进行了重复和补充实验,因为高pH、高 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度,在低温条件下引起对虾快速死亡,高温和高pH条件下又很难保持高氨态氮(大于3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)水平,因此我们调整了氨态氮的浓度在2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右。在盐度不变的情况下,用低温和高温组又针对pH和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 进行了重复实验。通过极差分析表明,在温度、pH和氨态氮三因素中,温度对带毒对虾的死亡率影响最大。该结果与对虾养殖中的发病规律相符^[4],即养殖对虾的发病时间从南向北推移,这显然与温度变化有关。

在1997年正交实验中,我们设定的各因子的高水平都接近对虾承受的极端水平,特别是pH(或总

碱度) 和氨态氮的水平。因此得出氨态氮是造成对虾发病的主要因子。1998 年的实验, 调低了氨态氮水平, 使高水平的氨态氮浓度降为约 $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 通过极差分析得出温度是造成对虾发病的主要因子。因此我们可以这样认为, 如果环境中某些极端因子的存在, 就会引起对虾发病, 如果环境因子均接近中等水平或较低水平, 引起带毒对虾发病的主要因子即为温度。

参考文献:

- [1] 张立人, 张建红, 陈棣华, 等. 东方对虾杆状病毒宿主细胞内的装配[J]. 电子显微学报, 1994, (5): 354.
- [2] 王书锦, 国际翔, 薛德林, 等. 辽宁沿海中国对虾常见病多发病原菌及防治[J]. 海洋科学, 1995, 1: 8- 11.
- [3] 张红卫, 王金星, 于士广, 等. 山东中国对虾暴发病病原体的研究[J]. 海洋科学, 1995, 1: 5- 7.
- [4] 蔡生力, 黄 , 王崇明, 等. 1993- 1994 年对虾暴发病的流行病学研究[J]. 水产学报, 1995, 19(2): 112- 119.
- [5] 黄 , 蔡生力, 宋晓玲, 等. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死——对虾暴发性流行病的病原和病理学[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 1- 10.
- [6] 黄 , 蔡生力, 宋晓玲, 等. 对虾暴发性流行病病原的人工感染研究[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 55- 62.
- [7] 王金星, 刘昌彬, 张红卫, 等. 中国对虾暴发性流行病病原体研究 II . 病原体的分离纯化[J]. 海洋学报, 1997, 19(2): 88- 91.
- [8] 王宏年. 生物统计学[M]. 兰州: 兰州大学出版社, 1998. 140- 172.
- [9] 集美水产学校主编. 海洋化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995. 5.
- [10] 王金星, 赵小凡, 于士广, 等. 对虾组织蛋白质和同工酶表型及其在病虾中的变化[J]. 海洋科学, 1995, (3): 46- 50.