

doi: 10.3969/j. issn. 2095 - 0780. 2014. 02. 008

微囊藻和小球藻携带 WSSV 量的变化及 对水体游离 WSSV 的影响

李凡^{1,2}, 曹煜成², 胡晓娟², 王善龙^{1,2}, 文国樑², 吴垠¹, 李卓佳²

(1. 大连海洋大学, 辽宁 大连 116023; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东省渔业生态环境重点实验室, 广东 广州 510300)

摘要: 研究了铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 和蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 携带白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 数量变化及对水体游离 WSSV 量的影响。试验设置微藻高、低密度组和不加微藻的对照组, 分别加入等量的 WSSV 粗提液, 于第 2、第 24、第 72 和第 120 小时以实时荧光定量 PCR 检测藻液上清和沉淀藻体的 WSSV 数量。结果表明, 微囊藻和小球藻可携带少量 WSSV, 且随时间延长而减少; 微囊藻携带 WSSV 量与其细胞数呈显著正相关 ($P < 0.05$), 小球藻携带 WSSV 量与其细胞数相关性不显著 ($P > 0.05$); 2 种微藻均有促进水体 WSSV 数量消减的效果, 且小球藻的消减效果优于微囊藻, 对养殖对虾白斑综合症 (white spot syndrome, WSS) 的生态防控更有积极意义。

关键词: 微囊藻; 小球藻; WSSV 携带量; TaqMan real-time PCR

中图分类号: Q 178; S 945.1 文献标志码: A 文章编号: 2095 - 0780 - (2014) 02 - 0054 - 07

Dynamic changes of WSSV carried by *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella pyrenoidosa* and their effects on WSSV in water

LI Fan^{1,2}, CAO Yucheng², HU Xiaojuan², WANG Shanlong^{1,2}, WEN Guoliang², WU Yin¹, LI Zhuojia²

(1. Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2. Key Lab of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; Key Lab of Fishery Ecology and Environment, Guangdong Province; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: To investigate the dynamic changes of WSSV (white spot syndrome virus) carried by *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella pyrenoidosa* and their effects on WSSV amount in water, we added the same WSSV amount to high-density groups, low-density groups with those two microalgae and compared them with the control group without microalgae, then determined the WSSV amount in supernatant and precipitate algae by TaqMan real-time PCR at 2nd hour, 24th hour, 72th hour and 120th hour. Results show that both *M. aeruginosa* and *C. pyrenoidosa* carried WSSV but the amount decreased with time. The WSSV amount carried by *M. aeruginosa* was significantly positively correlated with the density of algae cells ($P < 0.05$), while there was no significant correlation between the WSSV amount carried by *C. pyrenoidosa* and the numbers of algae cells ($P > 0.05$). Both the two microalgae reduced WSSV amount in water, and the reduction effect of *C. pyrenoidosa* was better than that of *M. aeruginosa*, which is beneficial to the ecological prevention

收稿日期: 2013-11-12; 修回日期: 2013-12-25

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-47); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201103034); 广东省科技计划项目 (2012B020308003); 中央级科研院所基本科研业务费专项资金 (中国水产科学研究院南海水产研究所) 资助项目 (2013ZD02); 农业科技成果转化资金项目 (2012GB23260551); 广西科学研究与技术开发计划 (桂科攻 13470002-2)

作者简介: 李凡 (1989 -), 女, 硕士研究生, 从事浮游微藻与对虾病害相关性研究。E-mail: lifan1212@163.com

通信作者: 李卓佳 (1956 -), 女, 研究员, 从事健康养殖技术和养殖生态环境调控与修复研究。E-mail: zhuojiali609@163.com

and control of WSS (white spot syndrome).

Key words: *Microcystis aeruginosa*; *Chlorella pyrenoidosa*; WSSV amount; TaqMan real-time PCR

对虾白斑综合症(white spot syndrome, WSS)自爆发以来给全球对虾养殖业造成了巨大的经济损失, 据统计每年因白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)致使全球养殖对虾产量大幅削减^[1]。近二十年来, WSSV仍是严重影响对虾养殖生产的重要病原之一, 研究表明WSS的发病不仅与虾体的免疫水平、病毒数量、感染方式有关, 还与养殖环境密切相关^[2]。微藻作为虾池生态系统的重要组成部分, 既决定水体中天然饵料的丰度, 又是光合作用供氧的重要来源, 还起到改善水质的作用^[3]。绿藻类的许多微藻具有耐污、耐盐等性质, 能大量吸收氮肥, 容易保持池水“活、爽”, 形成的藻相也相对稳定, 虾病较少^[4]。而赤潮生物类群和数量被认为与虾病程度呈正相关^[5]。微囊藻(*Microcystis* sp.)、鱼腥藻(*Anabaena* sp.)和颤藻(*Oscillatoria* sp.)等分泌的蓝藻毒素可能会给对虾带来危害^[6-7], 对虾养殖期微囊藻长期成为优势种可导致养殖对虾发病^[8]。养殖环境中某些关键环境因子的改变、不良藻相转换等均可引起对虾体内WSSV含量较大的波动^[9]。还有学者发现在对虾感染WSSV的养殖水中微藻能够携带WSSV^[10-11], 且病毒可通过微藻、微藻-浮游动物微食物网等途径传播给对虾^[12-13]。但上述研究大多只限于对微藻携带WSSV进行定性描述, 未从定量层面分析微藻数量及藻体环境(藻体表和藻液)携带病毒量以及变动规律的关系。从对虾养殖的高位池^[14]、滩涂池塘^[15]、低盐度池塘^[16]、淡化池塘^[17]等进行的微藻种群结构和数量变动调查显示, 蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)和铜绿微囊藻(*M. aeruginosa*)为常见的优势藻种。对虾养殖前期水体微藻密度常为 10^3 细胞·mL⁻¹或低于 10^3 细胞·mL⁻¹, 后期微藻密度能够达到 $10^4\sim10^6$ 细胞·mL⁻¹。因此, 笔者选取蓝藻类的铜绿微囊藻和绿藻类的蛋白核小球藻为研究对象, 运用实时荧光定量PCR技术对藻体及水体中的WSSV量进行跟踪检测, 分析微藻数量及培养时间与WSSV量的相关性, 以期了解2种微藻携带WSSV的数量及对环境中游离WSSV量的影响, 为养殖对虾池塘藻相调控寻找依据, 达到生态防控WSS的目的。

1 材料与方法

1.1 试验材料

铜绿微囊藻购于中国科学院野生生物种质库——淡水藻种库, 蛋白核小球藻由中国水产科学研究院南海水产研究所提供, 2种微藻均使用BG11培养液培养, 达到指数生长期后用于试验。

病毒粗提液的制备方法为取经检测WSSV阳性的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)组织1 g, 加入PBS缓冲液, 于4℃研磨后6 300 g离心10 min, 经0.22 μm滤膜过滤后稀释, 检测WSSV拷贝数。

1.2 试验方法

微囊藻和小球藻分别设置高密度组(H-微囊藻, H-小球藻)、低密度组(L-微囊藻, L-小球藻)和病毒对照组(不加藻), 每组3个平行。其中, 高密度组藻密度为 5×10^5 细胞·mL⁻¹, 低密度组藻密度为 7×10^3 细胞·mL⁻¹。试验组分别取各密度藻液200 mL装于350 mL已消毒透明塑料瓶, 对照组取200 mL BG11培养液装入350 mL已消毒透明塑料瓶, 均加入WSSV病毒粗提液, 使培藻系统中的WSSV浓度达到 4.32×10^5 拷贝·mL⁻¹。各组置于25~30℃, 光照强度4 000~8 000 lx, 光暗比12 h:12 h条件下培养。

于试验开始后第2、第24、第72和第120小时取样。试验组每次取藻液20 mL, 6 300 g离心10 min, 取上清液500 μL待检; 分离上清后的藻沉淀用1 mL PBS重悬, 取500 μL待检; 对照组取培养液500 μL待检。同时取1 mL藻液, 以Olympus CX41RF显微镜和血细胞计数板计算藻细胞密度。

1.3 样品WSSV的检测

以OMEGA Tissue DNA Kit D3396提取藻体沉淀和藻液上清样品的DNA, 以实时荧光定量PCR-TaqMan探针法和巢式PCR检测样品中的WSSV。Real-time PCR反应参考DURAND和LIGHTNER^[18]建立的实时荧光定量PCR法检测WSSV, 目的片段长度为69 bp, 引物和探针由Invitrogen公司合成(表1)。选取20 μL PCR反应体系, 10 μL 2×Taq-Man Universal PCR Master Mix(TAKARA公司出品, 代号DRR390A), 上下游引物各0.5 μL(终浓度为

10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 探针 0.5 μL (终浓度为 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 模板 DNA 2 μL , 补充水至 20 μL 。PCR 反应参数为 95 30 s; 95 5 s, 55 15 s, 72 30 s, 40 个循环, 每个样品重复 4 次, 每批样品设

置空白对照和阳性对照。空白对照用灭菌超纯水作模板, 阳性对照用已知 WSSV 带毒虾提取的 DNA 调整浓度后作模板。反应在 Bio-Rad Mini Opticon Real-Time PCR System 进行。

表 1 白斑综合症病毒引物和探针的合成及序列

Tab. 1 Sequences of white spot syndrome virus (WSSV) primers and TaqMan probes

引物 primer	WSSV	序列 sequence
上游 forward	WSS1011F	5'-TGGTCCCGTCCTCATCTCAG-3'
下游 reverse	WSS1079R	5'-GCTGCCTGCCGGAAATTA-3'
探针 probe	TaqMan	5'-AGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACA-3'

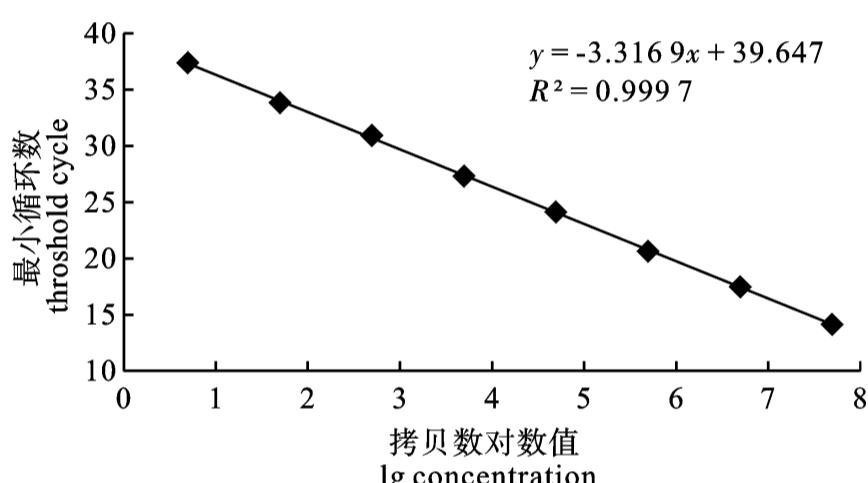


图 1 阳性质粒拷贝数与循环数(C_t)的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of positive plasmid copy and threshold cycle (C_t)

标准品的制备和标准曲线的建立。阳性质粒标准品制备是利用插入外源目的基因的方法得到纯化阳性质粒 DNA, 其浓度为 4.95×10^9 拷贝· μL^{-1} 。用 10 倍稀释阳性质粒至 8 个梯度作模板并对其进行扩增, 标准曲线见图 1, $R^2 = 0.999$, $E = 100.4\%$ 。

巢式 PCR。当荧光定量 PCR 检测 WSSV C_t 值大于 35(低拷贝数)时, 用巢式 PCR 检测以确认样品是否含 WSSV。参照潘忠诚等^[19] 巢式 PCR 检测 WSSV 的方法, 引物由 Invitrogen 公司合成。

1.4 数据分析

数据统计分析采用 SPSS 17.0 软件进行, 数据结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm \text{SD}$) 表示。各试验组之间的差异采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 进行。对不同时间点的藻体 WSSV 量、上清 WSSV 量、藻细胞数量等数据采用偏相关分析法分析其彼此间的相关性, $P < 0.05$ 表明变量间相关显

著。总 WSSV 量为上清 WSSV 量与藻体 WSSV 量之和。

2 结果

2.1 藻细胞密度变化

微囊藻和小球藻高密度组 120 h 内细胞密度均维持在 10^5 细胞· mL^{-1} , 无显著变化(表 2)。低密度组小球藻细胞密度第 72 小时后升高到 10^4 细胞· mL^{-1} , 低密度组微囊藻无显著增长。

2.2 微囊藻试验组 WSSV 量变化

第 2 小时时高、低密度组藻体 WSSV 量分别为 1.28×10^4 拷贝· mL^{-1} 和 4.11×10^3 拷贝· mL^{-1} , 上清 WSSV 量分别为 3.44×10^5 拷贝· mL^{-1} 和 3.20×10^5 拷贝· mL^{-1} , 藻体 WSSV 量占总 WSSV 量的 3.59% 和 1.27% (图 2)。第 24 小时时低密度组藻体 WSSV 量降低了 6.8%, 降低量不显著 ($P > 0.05$); 高密度组藻体、高密度组上清、低密度组上清的 WSSV 量分别降低了 90.1%、97.9%、87.6%, 降低量均显著 ($P < 0.05$)。第 72 小时时各组样品 WSSV 量已无显著差异 ($P > 0.05$)。除第 72 小时的低浓度组外, 其他时间点各组上清 WSSV 量均高于藻体。微囊藻藻体 WSSV 量与藻细胞数量呈显著正相关 ($P < 0.05$)。

2.3 小球藻试验组 WSSV 量变化

第 2 小时时高、低密度组藻体 WSSV 量分别为 1.16×10^4 拷贝· mL^{-1} 和 6.77×10^3 拷贝· mL^{-1} , 占总 WSSV 量的 2.33% 和 1.60% (图 3)。第 24 小时时低密度组藻体 WSSV 降低了 38.4%, 但降低量不显著 ($P > 0.05$); 高密度组藻体、高密度组上清、低密度组上清 WSSV 量分别降低了 88.9%、

表2 微囊藻、小球藻藻细胞密度

Tab. 2 Density of *M. aeruginosa* and *C. pyrenoidosa*细胞·mL⁻¹

	H-微囊藻 high density- <i>M. aeruginosa</i>	L-微囊藻 low density- <i>M. aeruginosa</i>	H-小球藻 high density- <i>C. pyrenoidosa</i>	L-小球藻 low density- <i>C. pyrenoidosa</i>
第0小时	5.0×10^5	7.0×10^3	5.0×10^5	7.0×10^3
第2小时	5.0×10^5	7.0×10^3	5.0×10^5	7.0×10^3
第24小时	4.3×10^5	< 10^4	6.5×10^5	< 10^4
第72小时	2.4×10^5	< 10^4	6.7×10^5	3.3×10^4
第120小时	1.9×10^5	< 10^4	2.6×10^5	2.7×10^4

注: 微藻密度低于 10^4 细胞·mL⁻¹ 时, 无法以血细胞计数板计数藻细胞数, 记为 < 10^4 细胞·mL⁻¹。认为第2小时时的藻细胞密度与接种密度一致, 记为接种密度。

Note: The value of microalgae density was inaccurate using hemacytometer when it was less than 10^4 cells·mL⁻¹ (expressed as < 10^4 cells·mL⁻¹). The microalgae density at 2nd hour was considered to be the same with the inoculation density, and expressed as inoculation density.

98.9%、94.1%, 降低量均显著($P<0.05$)。第24小时时各组藻体和上清的WSSV量已无显著差异($P>0.05$)。除第72小时低密度组外, 其他时间点各组的上清WSSV量均高于藻体。小球藻藻体WSSV量和藻细胞数量相关性不显著($P>0.05$)。

2.4 总WSSV量变化

各组WSSV起始浓度为 4.32×10^5 拷贝·mL⁻¹, 第2小时时WSSV量变化不明显。对照组第24小时时WSSV量为 2.01×10^5 拷贝·mL⁻¹, 比起始时降低了53.4%; 第72小时时WSSV量为 1.65×10^4 拷贝·mL⁻¹, 降低了96.2%, 下降幅度均显著

($P<0.05$); 第120小时时WSSV量为 7.66×10^3 拷贝·mL⁻¹, 降低了98.2%。微囊藻高、低密度组总WSSV量均呈下降趋势。第24小时时分别为 1.05×10^4 拷贝·mL⁻¹ 和 5.73×10^4 拷贝·mL⁻¹, 比起始时降低了97.6%和86.7%, 降幅显著($P<0.05$)。24 h以后总WSSV量变化不明显($P>0.05$), 且各组总WSSV量均显著低于对照组($P<0.05$)。小球藻高、低密度组总WSSV量呈下降趋势, 第24小时时分别为 5.99×10^3 拷贝·mL⁻¹ 和 2.98×10^4 拷贝·mL⁻¹, 比起始时降低了98.8%和93.0%, 降幅显著($P<0.05$)。24 h以后总WSSV

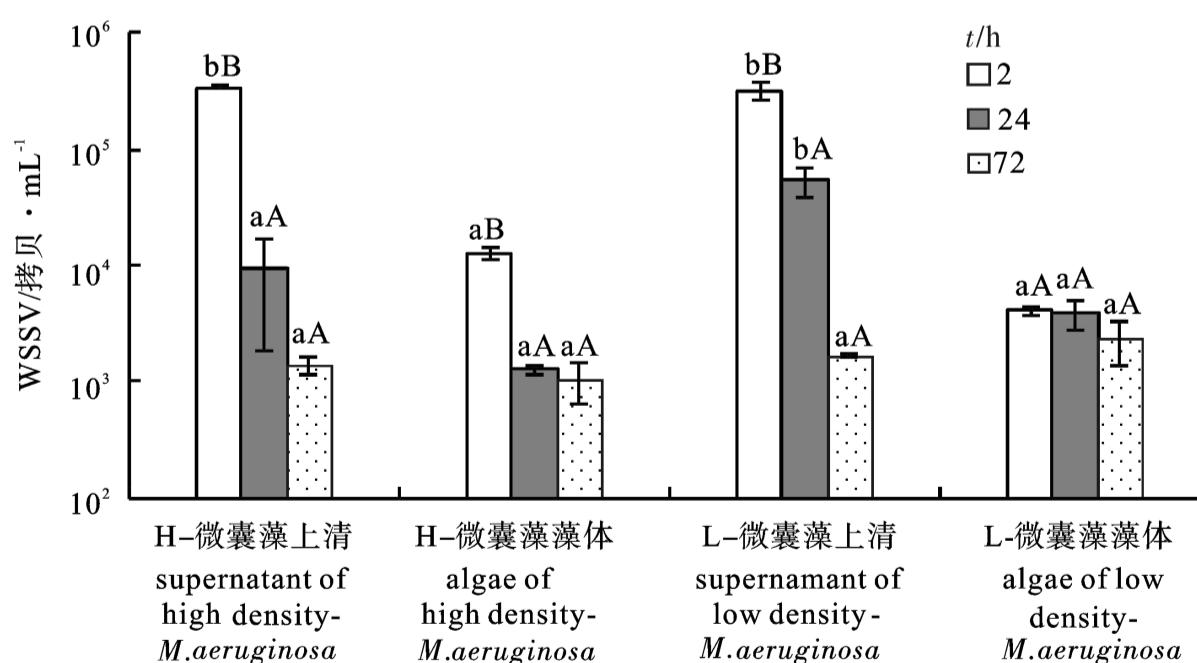


图2 微囊藻上清及藻体白斑综合症病毒数量

图中同时间点各组的数据不同上标小写字母表示数据之间有显著性差异($P<0.05$), 同试验组各时间点的数据不同上标大写字母表示数据之间有显著性差异($P<0.05$), 后图同此

Fig. 2 WSSV amount in supernatant and algae of *M. aeruginosa*

Data with different lowercase letters at the same time in each group are significantly different from one another ($P<0.05$), and data with different uppercase letters at different time in the same group are significantly different from one another ($P<0.05$). The same case in the following figure.

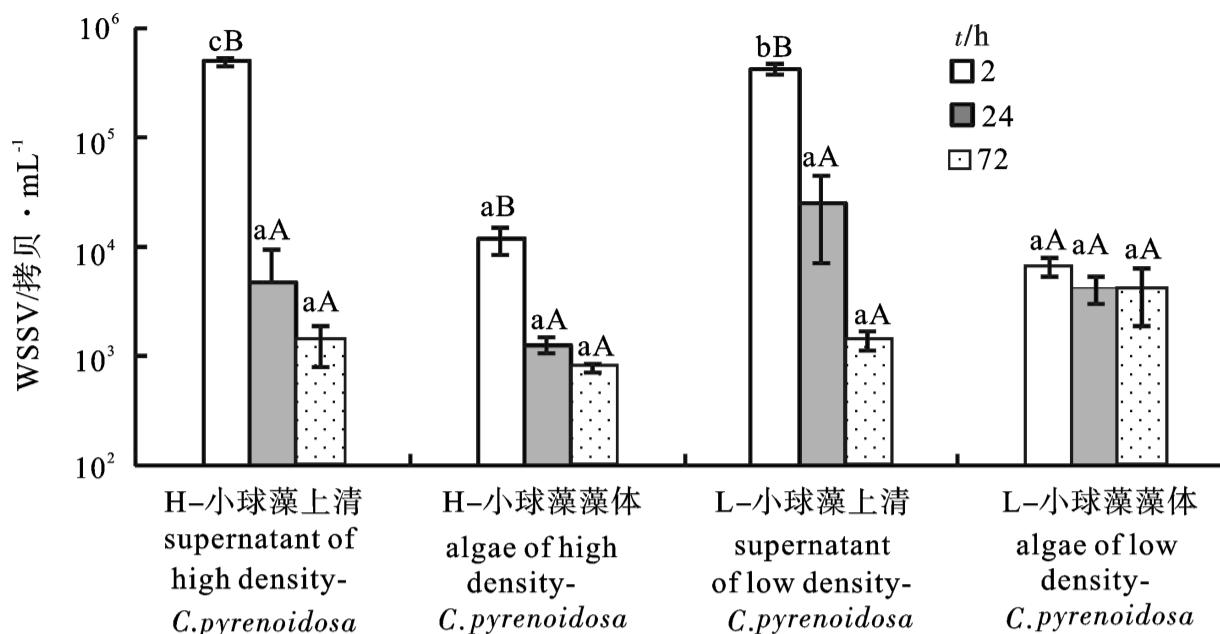


图 3 小球藻上清及藻体白斑综合症病毒数量

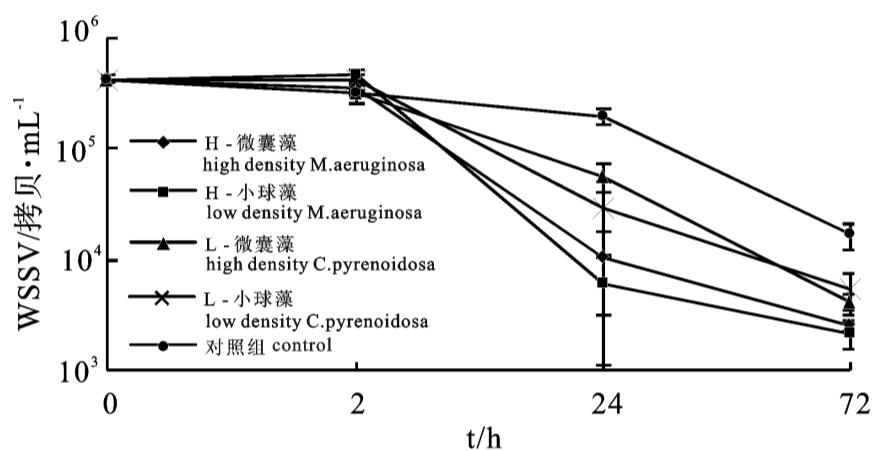
Fig 3 WSSV amount in supernatant and algae of *C. pyrenoidosa*

图 4 试验组和对照组总白斑综合症病毒量

Fig 4 Total WSSV amount in each group

量变化不明显($P > 0.05$)，且各组总 WSSV 量均显著低于对照组($P < 0.05$)。微囊藻和小球藻高密度组降幅均比低密度组大(图 4)。

2.5 巢式 PCR 检测结果

第 120 小时时荧光定量 PCR 检测各试验组样品 WSSV 拷贝数低，使用巢式 PCR 进行检测。各组微囊藻和小球藻的上清及藻体 DNA 样品扩产物均呈 WSSV 阳性(图 5)。

3 讨论

研究发现，某些种类的微藻能够携带 WSSV，且携带 WSSV 的微藻在数天以后不同时间开始呈现 WSSV 阴性^[10, 20]。微藻主要通过其细胞外表面的特定结构携带 WSSV 粒子，病毒无法进入藻类细胞内部进行有效繁殖，由于病毒在海水中成活时间短及感染活性的限制，当细胞外表面的 WSSV 经过一定时间仍无法寻找到合适的宿主，则在藻类这一短暂附着体上死亡，病毒 DNA 发生分解，不同藻类所

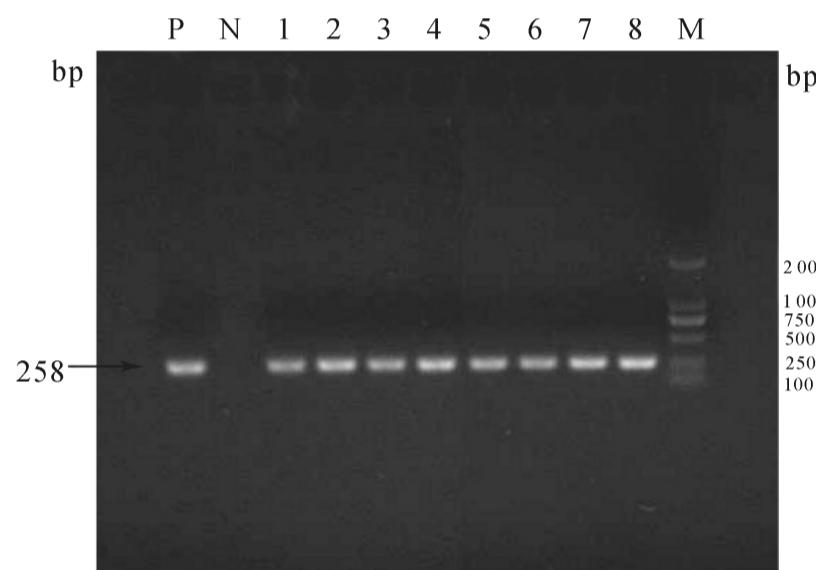


图 5 第 120 小时时巢式 PCR 检测上清及藻体中的白斑综合症病毒结果

M. marker; P. 阳性对照；N. 阴性对照；1 ~4. H-微囊藻上清、L-微囊藻上清、H-小球藻上清、L-小球藻上清；5 ~8. H-微囊藻藻体、L-微囊藻藻体、H-小球藻藻体、L-小球藻藻体

Fig 5 Detection of WSSV by nested-PCR at 120th hour
M. marker; P. positive control; N. negative control; 1 ~4. WSSV detection results for the supernatant of high density-*M. aeruginosa*, low density-*M. aeruginosa*, high density-*C. pyrenoidosa* and low density-*C. pyrenoidosa*, respectively; 5 ~8. WSSV detection results for the algae of high density-*M. aeruginosa*, low density-*M. aeruginosa*, high density-*C. pyrenoidosa* and low density-*C. pyrenoidosa*, respectively

携带 WSSV 呈阳性的时间不同，这也可能与其细胞表面特性有关^[20~22]。不同生长时期的对虾会直接或间接地以微藻为食，WSSV 可能会因为粘附在藻体上而被浮游动物等吞食，并通过食物链传播^[13, 20]，根据实时荧光定量 PCR 数据及巢式 PCR 检测结果，笔者认为微囊藻和小球藻在 120 h 内均

能携带少量WSSV, 而且藻体WSSV量在第2小时时最多, 说明WSSV游离到水体后能够迅速粘附到藻体上, 但藻体WSSV量远远低于上清, 第2小时时高、低密度微囊藻和小球藻藻体WSSV量仅占水体总WSSV的3.59%、1.27%和2.33%、1.60%, WSSV可能会粘附在包括微藻在内的水体各种悬浮颗粒物上。LIU等^[10]研究认为不同微藻对WSSV携带能力不同, 相比盐藻(*Dunaliella salina*)、中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)、球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*), 小球藻具有较强的WSSV携带能力。笔者研究各时间点检测到的微囊藻和小球藻藻体WSSV量无显著差异($P>0.05$), 但微囊藻藻体WSSV量与藻细胞数量呈显著正相关($P<0.05$), 小球藻藻体WSSV量和藻细胞数量相关性不显著($P>0.05$)。其原因可能是铜绿微囊藻细胞个体较蛋白核小球藻大, 个体表面积也较大, 与WSSV接触或被粘附的可能性大, 而微囊藻细胞壁外被胶质鞘, 也可能使其与WSSV的作用更为紧密, 不易脱离, 其作用机制需进一步的研究。微囊藻和小球藻携带WSSV的能力相似, 但微囊藻高密度组藻体携带的病毒量较高, 微藻粘附WSSV能力对养殖对虾携带WSSV以及WSS发生的影响也有待研究。

笔者研究结果显示, 24 h内对照组WSSV量降低了53.4%, 微囊藻高、低密度组总WSSV量降低了97.6%、86.7%, 小球藻高、低密度组总WSSV量降低了98.6%、93.1%, 表明水体WSSV量随时间延长而降低, 微囊藻和小球藻有利于促进水体WSSV的消减, 高密度组较低密度组效果明显。在微藻存在的条件下游离WSSV的减少主要发生在24 h内, 这就大大降低了游离WSSV粘附在其他物质上的可能, 若粘附在饲料上直接被对虾摄食, WSSV传播给对虾的风险将更高。小球藻组WSSV量的降低幅度大于微囊藻组, 这可能与微藻或其分泌物具有病毒抑制作用, 而小球藻的这种作用更强有关, 小球藻比微囊藻更有利于促进水体中游离WSSV数量的消减。

在对虾养殖环境中, 藻相的优劣直接或间接地影响对虾抵抗力的高低, 同时反映了对虾抗病能力的强弱^[9]。通常认为以绿藻、硅藻为优势种的池塘水质稳定, 病害少, 对虾生长亦较好, 绿藻类和硅藻类是用来构建优良藻相的备选种类^[23]。TENDENCIA等^[24]将WSSV攻毒对虾放入3种试验水体中(养殖罗非鱼的水体、接种小球藻的水体、

添加糖蜜的水体), 结果在接种小球藻的水体中WSSV攻毒对虾的成活率最高。养殖中后期的对虾池塘经常会出现蓝藻类的快速繁殖, 可分泌毒素的微囊藻类能形成高密度的水华。微囊藻毒素具有显著的肝脏毒性, 已被认为是严重威胁野生动植物及人类健康的环境污染物。CHEN和XIE^[25]已经在对虾肌肉中检测到了微囊藻毒素, 食用含有微囊藻毒素的对虾将对人体产生危害。还有研究发现, 微囊藻的大量繁殖可降低淡化虾池中浮游藻类群落的丰富度和多样性, 影响浮游藻类组成及群落稳定性, 进而导致养殖对虾发病, 并随微囊藻密度或优势度升高而病情加重, 对虾养殖成活率和生长速度随之降低^[8]。鉴于此, 笔者认为在对虾养殖池塘中培育以蛋白核小球藻等优良微藻为优势种群, 是生态防控WSS的有效手段。

综上所述, 微囊藻和小球藻均可携带少量WSSV, 其携带量随时间的延长而不断减少。微囊藻藻体WSSV携带量与藻细胞数呈显著正相关, 小球藻藻体WSSV携带量与藻细胞数相关性不显著。2种微藻均能促进水体游离WSSV数量的消减, 小球藻更有利于养殖对虾的健康生长和WSS的生态防控。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 李才文, 管越强, 于仁诚, 等. 赤潮异弯藻对中国对虾感染白斑综合症病毒的影响[J]. 海洋学报, 2003, 25(1): 132-137.
- [4] 米振琴, 谢俊, 潘德博, 等. 精养虾池浮游植物, 理化因子与虾病的关系[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(4): 304-308.
- [5] 郭皓, 于占国. 虾池浮游植物群落特征及其与虾病的关系[J]. 海洋科学, 1996(1): 39-45.
- [6] 吴玉霖, 周成旭. 甲藻赤潮的海洋危害及其防治[J]. 海洋环境科学, 1997, 16(4): 59-63.
- [7] CARMICHAEL W W, BENT P E. Hemagglutination method for detection of freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxins [J]. Appl Environ Microbiol, 1981, 41(6): 1383-1388.
- [8] 查广才, 周昌清, 牛晓光. 铜绿微囊藻对凡纳滨对虾低盐度养殖的危害研究[J]. 中山大学学报, 2007, 46(2): 64-67.
- [9] 王奕玲, 李卓佳, 张家松, 等. 高位池养殖过程凡纳滨对虾携带WSSV情况的动态变化[J]. 中国水产科学, 2012, 19(2):

- 301 - 309.
- [10] IU B, YU Z M, SONG X X, et al. Studies on the transmission of WSSV (white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae [J]. *J Inver Pat*, 2007, 95(2): 87 - 92.
- [11] 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]. 北京: 中国科学院, 2003.
- [12] ZHANG J S, DONG S L, TIAN X L, et al. Studies on the rotifer (*Brachionus urceus*Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission [J]. *Aquaculture*, 2006, 261(4): 1181 - 1185.
- [13] JIANG G J. Can white spot syndrome virus be transmitted through the phytoplankton rotifer artemia shrimp pathway? [J]. *Afr J Biotechnol*, 2012, 11(5): 1277 - 1282.
- [14] 张瑜斌, 龚玉艳, 陈长平, 等. 高位虾池养殖过程浮游植物群落的演替[J]. 生态学杂志, 2009, 28(12): 2532 - 2540.
- [15] 彭聪聪, 李卓佳, 曹煜成, 等. 粤西凡纳滨对虾海水滩涂养殖池塘浮游微藻群落结构特征研究[J]. 渔业科学进展, 2011, 32(4): 117 - 125.
- [16] 刘孝竹, 李卓佳, 曹煜成, 等. 珠江三角洲低盐度虾池秋季浮游微藻群落结构特征的研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(5): 1010 - 1018.
- [17] 查广才, 周昌清, 黄建荣, 等. 凡纳对虾淡化养殖虾池微型浮游生物群落及多样性[J]. 生态学报, 2004, 24(8): 1752 - 1759.
- [18] DURAND S V, LIGHTNER D V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp [J]. *J Fish Dis*, 2002, 25(7): 381 - 389.
- [19] 潘忠诚, 王芳宇, 何建国, 等. 凡纳滨对虾在不同实验条件下感染白斑综合症的研究[J]. 衡阳师范学院学报, 2008, 29(6): 63 - 67.
- [20] 张家松, 董双林, 田相利, 等. 浮游微藻携带和传播 WSSV 的研究[J]. 海洋环境科学, 2007, 26(3): 221 - 224.
- [21] 李奕雯, 曹煜成, 李卓佳, 等. 养殖水体环境与对虾白斑综合症关系的研究进展[J]. 海洋科学进展, 2008, 26(4): 532 - 538.
- [22] HONJO T. Overview on bloom dynamics and physiological ecology of *Heterosigma skashiwo* [M] SMAYDA T J, SHIMIZU Y. *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1993: 33 - 41.
- [23] 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, 2007, 3(4): 70 - 73.
- [24] TENDENCIA E A, BOSMA R H, SORIO L R. Effect of three innovative culture systems on water quality and white spot syndrome virus (WSSV) viral load in WSSV-fed *Penaeus monodon* cultured in indoor tanks [J]. *Aquaculture*, 2012, 350/351/352/353: 169 - 174.
- [25] CHEN J, XIE P. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China [J]. *Toxicon*, 2005, 45(5): 615 - 625.