

DOI: 10.12264/JFSC2024-0391

氨氮胁迫对虹鳟幼鱼 IHNV 易感性的影响

刘雪娇, 李洁, 郦彩霞, 海强, 刘浩, 刘哲, 朱利瑞, 王建福

甘肃农业大学动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070

摘要: 为探究氨氮胁迫对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)感染传染性造血坏死病病毒(IHNV)后血清抗氧化酶及肠道免疫相关基因及微生物种群结构的影响。选用体重为(13.5±0.5) g 的虹鳟幼鱼, 分别设置对照组(C 组)和 3 个氨氮胁迫组(L 组 2 mg/L, M 组 4 mg/L, H 组 6 mg/L), 进行为期 10 d 的氨氮胁迫, 之后腹腔注射 TCID₅₀ 为 10^{-7.875}/mL 的 IHNV 0.25 mL, 分别在攻毒后的 0、3、5、7 和 9 d 检测其血清中的碱性磷酸酶(AKP)、谷丙转氨酶(ALT)和丙二醛(MDA)的活力, 肠道中免疫相关基因 *Mx*、*IgM*、*IRF7* 和 *IFN-α* 的表达量, 以及攻毒后第 7 天其肠道组织学变化和菌群差异。结果显示, IHNV 攻毒后虹鳟幼鱼的死亡率与氨氮胁迫浓度呈正相关; 随着氨氮浓度升高, 虹鳟肠上皮细胞空泡化程度加重, 绒毛面积减小; 攻毒后其血清中 AKP 活力显著降低($P<0.05$), 而 ALT 和 MDA 活力表现出先升高后降低的趋势, 肠组织中 *Mx*、*IRF7*、*IFN-α* 和 *IgM* 表达量均表现为先升高后降低的趋势; 攻毒后 7 d, 在门水平上, 随着氨氮浓度升高其肠道内假单胞菌门(Pseudomonadota)和支原体门(Mycoplasmata)丰度显著升高($P<0.05$), 而蓝藻门(Cyanobacteriota)和芽孢杆菌门(Bacillota)丰度显著降低($P<0.05$); 在属水平上, 相较于对照组, 氨氮胁迫组中有害菌群丰度升高, 而有益菌群丰度则表现出下降趋势。以上结果表明, 氨氮胁迫会增加虹鳟对 IHNV 的易感性, 降低其抗氧化能力和免疫力, 并破坏其肠道组织及菌群稳态。本研究为虹鳟养殖中生态防控 IHNV 提供理论依据。

关键词: 虹鳟; 氨氮胁迫; IHNV; 抗氧化酶; 免疫基因; 肠道菌群

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)02-0246-12

虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)属鲑科(Salmonidae)太平洋鲑属(*Oncorhynchus*), 是全球广泛养殖的重要冷水鱼类。然而, 全球鲑鳟养殖业一直面临着传染性造血器官坏死病(infectious hematopoietic necrosis, IHN)的威胁。IHN 由传染性造血坏死病病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)引起, 是许多鲑鳟鱼急性传染性疾病^[1]。当鱼类种类、病毒株和环境条件发生变化时, IHNV 的传播可能导致超过 90% 的死亡损失^[2]。目前, 采用网箱、流水池以及室内设施高密度为主的养殖方式, 这往往会导致养殖水体中氨氮浓度升高, 从而降低虹鳟对病原感染的免疫力。氨氮作为影响鱼类生长的主要环境因子和重要污染物, 给虹鳟养殖

产业造成了巨大危害^[3]。

水体中的氨氮浓度是评估水质优劣的重要指标。氨氮(或总氮)是指离子氨(NH₄⁺)和分子氨(NH₃)含量的总和, 这两者在水体中可相互转化^[4]。研究表明, 养殖水体中残饵和鱼类排泄物等含氮有机物通过氨化作用产生大量氨态氮, 增加了水体中含氮物质的负荷, 导致水体交换率不足, 从而引发氨氮积累^[5]。分子氨具有较高的脂溶性, 能够通过水生生物的上皮细胞膜进入细胞内部, 造成严重危害^[6]。相关研究发现, 长期暴露在氨氮环境中的钝吻鲷(*Leiocassis crassirostris*)和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)幼鱼摄食量显著下降, 导致增重率降低^[7-8]。吴雪阳等^[9]研究表明, 养殖水

收稿日期: 2024-12-18; 修订日期: 2025-01-20.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060257, 32460271); 甘肃省科技计划项目(24CXNA040); 甘肃农业大学学科团队项目(GAU-XKTD-2022-23).

作者简介: 刘雪娇(2001-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物健康养殖相关研究. E-mail: 2249506240@qq.com

通信作者: 王建福, 副教授, 主要从事水产动物健康养殖相关研究. E-mail: wangjf@gsau.edu.cn

体氨氮浓度升高会降低鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)和黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*) 4 种不同食性鱼种的抗氧化能力, 进而导致氧化应激损伤。此外, 高浓度的氨氮还对水生生物表现出显著的免疫毒性效应^[10-12]。况宇等^[13]的研究发现, 长期氨氮暴露会扰乱斑马鱼(*Danio rerio*)肠道微生物群落的稳定性, 可能增加致病菌对肠道的损伤。海强等^[14]的研究揭示了虹鳟肠道菌群与其对 IHNV 易感性之间存在着密切关系。

肠道不仅是脊椎动物进行消化和吸收器官, 也是免疫防御的关键器官, 作为抵御病原入侵的第一道防线, 肠道在防止毒素、病原微生物的进入及维护动物健康方面发挥着重要作用^[14]。鱼类肠道菌群与机体健康密切相关, 当水体环境发生变化时, 肠道菌群可能发生紊乱, 进而影响机体健康^[15-16]。氨氮是影响鱼类健康的主要环境因子之一, 因此, 深入研究养殖水体中氨氮浓度对虹鳟感染 IHNV 易感性的影响, 对于综合防控虹鳟鱼类感染 IHNV 具有重要意义。然而, 目前国内有关氨氮浓度胁迫下虹鳟感染 IHNV 后的生理机制研究尚未见报道。本研究旨在探究不同氨氮浓度胁迫下虹鳟感染 IHNV 后血清抗氧化酶活力、肠道组织病理变化、肠道免疫相关基因表达的变化及肠道微生物菌群的差异, 为虹鳟养殖中生态防控 IHN 提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验用鱼

实验用鱼购自甘肃省甘南藏族自治州玛曲县的大水土著鱼类繁育场, 选择 200 尾无感染史、遗传背景一致、体重为(13.5±0.5) g 的虹鳟幼鱼, 暂养于甘肃农业大学水产科学校内实训中心帆布鱼池中。

1.2 实验设计

实验鱼共分为 4 组, 每组 50 尾。养殖用水为充分曝气的自来水, 保持溶解氧>8.5 mg/L, 温度(12±1) °C, 日换水量为水体总体积的 1/3, 每天定时定量投喂虹鳟商品颗粒饲料, 投饵率为体重的

1.5%, 暂养 14 d。暂养结束后, 用干燥分析纯晶体 NH₄Cl 配制成浓度为 1000 mg/L 的母液, 分别调制出低(L 组, 2 mg/L)、中(M 组, 4 mg/L)、高(H 组, 6 mg/L) 3 个氨氮胁迫浓度组, 并通过滴定氨氮浓度测定法进行校准, 每次换水后重新校准, 以保持氨氮浓度稳定。进行为期 10 d 的氨氮胁迫, 之后腹腔注射 TCID₅₀ 为 10^{-7.875}/mL 的 IHNV 0.25 mL (本实验室从患病虹鳟中分离)^[17]。攻毒后, 每天观察实验鱼的行为变化, 记录死亡数。

1.3 实验样品采集及处理

分别在氨氮暴露 10 d 后及 IHNV 攻毒后 3、5、7 和 9 d, 每组随机采集 6 尾, MS-222 麻醉后, 分别采集尾部血液和肠道组织。血液样本在冰上放置 1 h 后, 4 °C、4000 r/min 离心 10 min, 取上清液保存于-80 °C 用于后续酶活力测定; 肠道组织样本液氮速冻后储存于-80 °C 冰箱, 用于免疫相关基因表达分析。在攻毒后 7 d, 采集虹鳟肠道内容物, 迅速放入液氮冷冻后储存于-80 °C 冰箱。同时, 采集肠道中部组织, 使用 4% 的多聚甲醛固定 24 h 以上, 常温保存。

1.4 实验方法

1.4.1 组织病理学分析 将肠组织修整后, 进行酒精梯度脱水 and 醇苯、二甲苯处理。将融化石蜡倒入包埋框, 冷却至-20 °C 凝固, 修整蜡块并切片(4 μm)。将切片漂浮于 40 °C 水中, 烤片至固化, 最后常温保存。最后, 采用数字切片扫描仪(DX1, 山东斯瑞蒂医疗科技有限公司)进行组织病理学观察。

1.4.2 血清指标测定 按照碱性磷酸酶(AKP)、谷丙转氨酶(ALT)和丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所)操作说明对血清处理后, 用多功能微孔板读数仪(Varioskan LUX, 美国 Thermo Fisher)测定。

1.5 肠道基因表达测定

TRIzol 法提取虹鳟肠道总 RNA 后, 采用超微量分光光度计(Nano Drop One, 美国 Thermo Fisher)检测其浓度, 通过 A₂₆₀/A₂₈₀ 和 A₂₆₀/A₂₃₀ 值评估其质量, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。使用 Evo M-MLV 反转录试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司)将提取的总 RNA 反转录为 cDNA。以 β-actin

作为内参基因,依据 NCBI 数据库中 β -actin、*Mx*、*IgM*、*IRF7* 和 *IFN- α* 基因序列,通过 Primer 5.0 设计 qPCR 引物(详见表 1),引物由陕西中科羽瞳生物科技有限公司合成。qPCR 反应体系为 10 μ L,反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。

表 1 引物信息
Tab. 1 Primer information

基因名称 gene name	基因库登录号 GenBank no.	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
<i>β-actin</i>	NM_001124235.1	R: CAGGTCATCACCATCGGCAAC F: CAGGTCATCACCATCGGCAAC
<i>Mx</i>	NM_001171901.1	F: ACCTCACACTCATCGACCTG R: TGGCACAACCACCAAGCTG
<i>IgM</i>	X65263.1	F: ACCTTAACCAGCCGAAAGGG R: TGTCCCATTGCTCCAGTCC
<i>IRF7</i>	XM_021600499.2	F: TCGCTGACTGGCTGATAGA R: CTTGGTAGTATGGCTGCTGTA
<i>IFN-α</i>	NM_001124531.1	F: GCGTGTGTCATTGCTGTGA R: CGCTCAAGTGACCGTAATGG

注: *Mx* 为抗黏蛋白基因; *IgM* 为免疫球蛋白 M 基因; *IRF7* 为干扰素调节因子 7 基因; *IFN- α* 为干扰素 α 基因; β -actin 为肌动蛋白基因。

Note: *Mx* is anti-mucin gene; *IgM* is immunoglobulin M gene; *IRF7* is interferon regulatory factor 7 gene; *IFN- α* is interferon α gene; β -actin is actin gene.

1.6 16S rRNA 测序

在攻毒后 7 d, 采集肠道内容物并使用干冰保存,送至华大基因科技有限公司进行 16S rRNA 测序。采用 TGuide S96 磁珠法提取待测样品的 DNA,并 PCR 扩增 16S rDNA 的 V3~V4 可变区序列。使用引物为 338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3' 和 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' 进行扩增。PCR 产物经 Agencourt AMPure XP 磁珠纯化后,用 Elution Buffer 溶解,完成建库。使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测文库的片段大小与浓度,检测完成后,根据插入片段的大小,通过 Illumina HiSeq 平台进行测序。

1.7 数据处理

使用 SPSS 22.0 进行统计分析,用平均值 \pm 标准误($\bar{x} \pm SE$)表示,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)及 Duncan's 检验(Duncan's test)比较对照组与氨氮胁迫组之间的统计学差异。基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析,统计显著性水平设定 $P < 0.05$ 。使用 Origin2019 绘图。

2 结果与分析

2.1 不同氨氮浓度对虹鳟感染 IHNV 后致死率的影响

如表 2 所示,随着实验组氨氮浓度升高和实验时间延长,虹鳟死亡率显著增加。在攻毒后 5 d 内,C、L 和 M 组均未发生死亡,而 H 组攻毒后 3 d 即发生死亡,5 d 死亡率达 100%。攻毒 7 d 后,随着氨氮浓度升高,剩余 3 个实验组虹鳟死亡率显著上升。

表 2 不同氨氮浓度下虹鳟感染 IHNV 后的死亡率
Tab. 2 The mortality of rainbow trout infected with IHNV under different ammonia concentration

氨氮浓度/(mg/L) ammonia nitrogen concentration	死亡率/% mortality			
	3 d	5 d	7 d	9 d
C	0	0	5.5	11.1
L	0	0	22.2	33.3
M	0	0	72.2	88.9
H	33.3	100	-	-

注: C、L、M 和 H 表示为 C 组、L 组、M 组和 H 组。

Note: C, L, M and H are denoted as groups C, L, M and H.

2.2 不同氨氮浓度下虹鳟感染 IHNV 后肠道组织病理变化

由图 1 可见,攻毒后 7 d 的 C、L 和 M 组肠道组织发现,随着氨氮浓度升高和 IHNV 联合影响,虹鳟的肠道组织损伤程度逐渐加重。C 组肠道结构相对完整,绒毛排列整齐,但肌层纹理不清晰,上皮细胞出现了少量空泡化(图 1a、d、g、j); 而 L 组,肠道上皮细胞的空泡化程度加重,肠绒毛面积增大,肠道固有层松散,环形和纵行肌层严重分层,细胞核染色变深(图 1b、e、h、k); 3 组中, M 组上皮细胞空泡化最为严重,肠绒毛大量病变坏死,肠上皮细胞分离(图 1c、f、i、l)。

2.3 不同氨氮浓度下虹鳟感染 IHNV 对血清酶活力的影响

由图 2 所示, IHNV 攻毒前,虹鳟血清中 AKP 活力随着氨氮浓度升高而增加,但 H 组 AKP 活力最低($P < 0.05$)(图 2a),相对于 C 和 L 组, M 和 H 组 ALT 活力和 MDA 含量显著下降 ($P < 0.05$)(图 2b、c)。IHNV 攻毒后,各浓度组的 AKP 活力均呈显著下降趋势,而 ALT 活力和 MDA 含量在 3 d 后

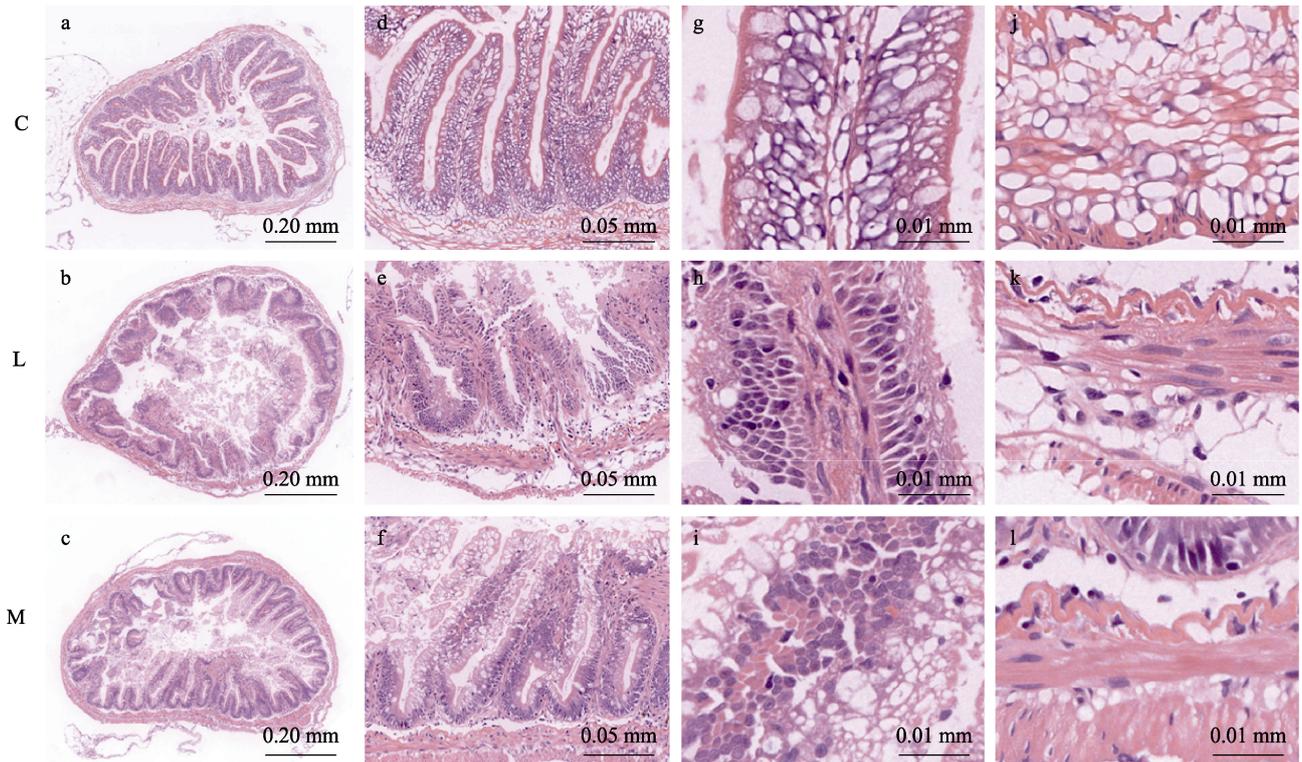


图 1 不同氨氮浓度下虹鳟感染 IHNV 后 7 d 肠道病理变化

C、L 和 M 表示为 C 组、L 组和 M 组。a-c、d-f、g-i 及 j-l 分别表示虹鳟中肠 6×、虹鳟中肠 20×、肠上皮和肠肌层 100× 组织形态变化。

Fig. 1 Intestinal histopathological changes in rainbow trout infected with IHNV after 7 days under different ammonia nitrogen concentration

C, L, and M are denoted as the C, L, and M. a-c, d-f, g-i, and j-l represent the morphological changes in the midgut of rainbow trout at 6× magnification, the midgut of rainbow trout at 20× magnification, the intestinal epithelium and the intestinal muscular layer at 100× magnification respectively.

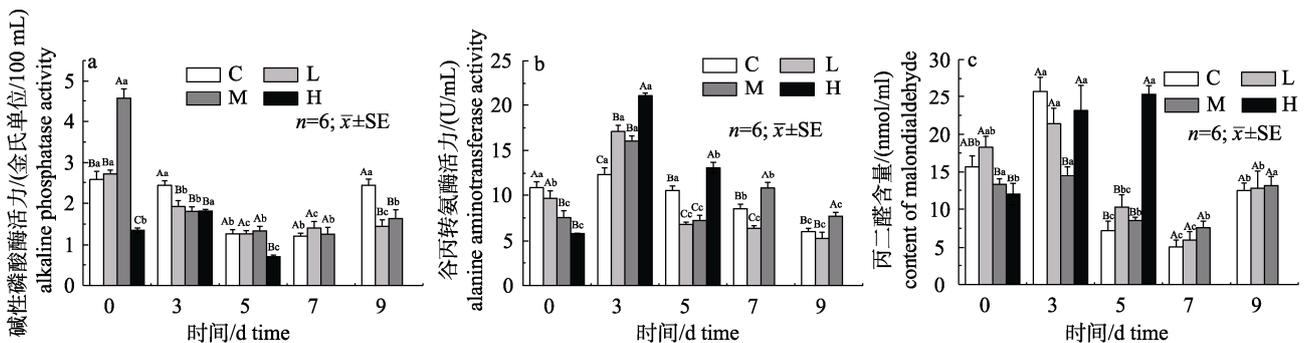


图 2 不同氨氮浓度下虹鳟感染 IHNV 后血清中 AKP 和 ALT 活力及 MDA 含量变化图

C、L、M 和 H 表示为 C 组、L 组、M 组和 H 组。不同大写字母表示同一时间不同组别差异显著 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示同一组别不同时间差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 2 Activity changes of AKP, ALT and MDA in serum of rainbow trout infected with IHNV under different ammonia nitrogen concentrations

C, L, M, and H are denoted as groups C, L, M, and H. Different capital letters indicate significant differences between different groups at the same time ($P < 0.05$), while different lowercase letters indicate significant difference within the same group at different time ($P < 0.05$).

显著上升, 之后 ALT 活力显著下降 ($P < 0.05$), C、L 和 M 组 MDA 含量呈现先下降后上升趋势

($P < 0.05$), 而 H 组 MDA 含量呈现逐渐上升趋势 ($P < 0.05$).

2.4 不同氨氮浓度下虹鳟感染 IHNV 后免疫基因表达变化

由图 3 所示, IHNV 攻毒后, *IgM*、*IRF7*、*IFN- α* 和 *Mx* 表达量随时间均呈现出诱导-抑制的趋势, *IgM*、

IRF7 和 *IFN- α* 的表达量在 3 d 达到峰值, *Mx* 的表达量在 5 d 达到峰值。整体具有一定的浓度依赖性, 低浓度氨氮下免疫系统反应更迅速, 且随着氨氮浓度的增加, 免疫相关基因的表达量逐渐下降。

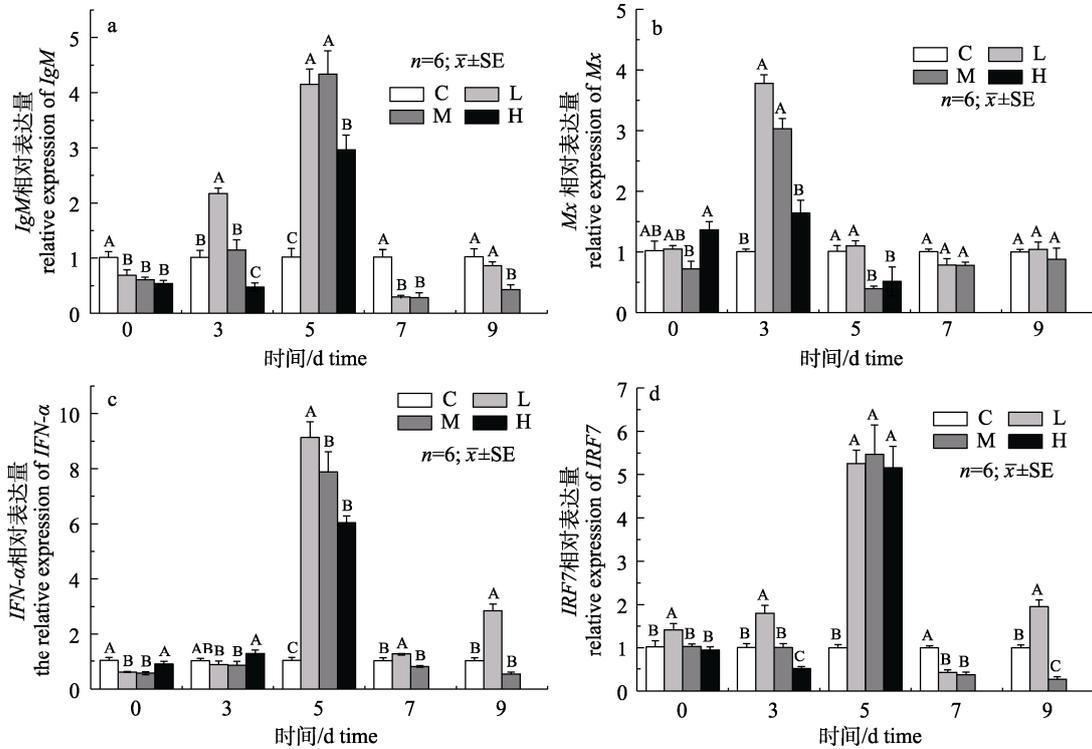


图 3 不同氨氮浓度下虹鳟感染 IHNV 后 *IgM*、*Mx*、*IFN- α* 和 *IRF7* 基因的相对表达差异
C、L、M 和 H 表示为 C 组、L 组、M 组和 H 组。不同大写字母表示同一时间不同组别差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 The relative expression of *IgM*, *Mx*, *IFN- α* and *IRF7* genes in rainbow trout after infected with IHNV under different ammonia nitrogen concentrations

C, L, M, and H are denoted as groups C, L, M, and H. Different capital letters indicate significant differences between groups at the same time ($P < 0.05$).

2.5 不同氨氮浓度下虹鳟感染 IHNV 后肠道菌群检测结果

2.5.1 OTU 统计分析

IHNV 攻毒 7 d 后, C、L 和 M 组虹鳟肠道内容物检测的 15 个样本中共获得有效序列 905790 条, 基于 97% 相似性对获得的微生物序列进行 OTU (operational taxonomic units) 聚类分析。Venn 图显示(图 4 左), 各实验组共有 OTUs 为 449 个, C、L 和 M 组特有的 OTUs 数分别为 243、110 和 169 个。通过稀释曲线观察(图 4 右), 曲线趋于平缓, 能够满足样品的测序深度和抽样数量需求。

2.5.2 菌群多样性分析

由肠道微生物 Alpha 多样性组间差异图(图 5)所示, Ace 指数随着氨氮浓

度升高而上升, Chao1 指数则未见明显变化(图 5a、b); Shannon 指数随着氨氮浓度升高而降低, 而 Simpson 指数有上升趋势(图 5c、d)。

基于 PcoA 分析可知, 氨氮胁迫的 L 和 M 组虹鳟肠道微生物菌群结构较为接近, 而 C 组肠道微生物菌群与氨氮胁迫组差异明显且组内亦有明显差异(图 5e)。

2.5.3 菌群组成分析

肠道菌群组成分析结果显示(图 6 和表 3), 在门水平上, C 组中优势菌门为蓝藻门(Cyanobacteriota)(40.43%)、芽孢杆菌门(Bacillota)(30.98%)和假单胞菌门(Pseudomonadota)(17.92%), L 组为假单胞菌门(91.42%), M 组为假单胞菌门(77.04%)和支原体门(Mycoplasmata)

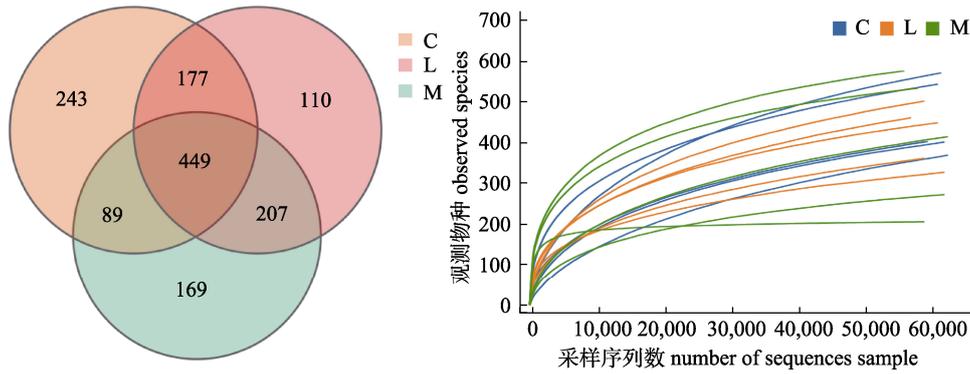


图 4 不同氨氮浓度下虹鳟感染 IHNV 7 d 后肠道微生物的 Venn 图(左)和稀释曲线(右)

C、L 和 M 表示为 C 组、L 组、M 组。

Fig. 4 Venn diagram (left) and dilution curve (right) of intestinal microorganisms of rainbow trout infected with IHNV for 7 days under different ammonia nitrogen concentrations

C, L and M are denoted as groups C, L and M.

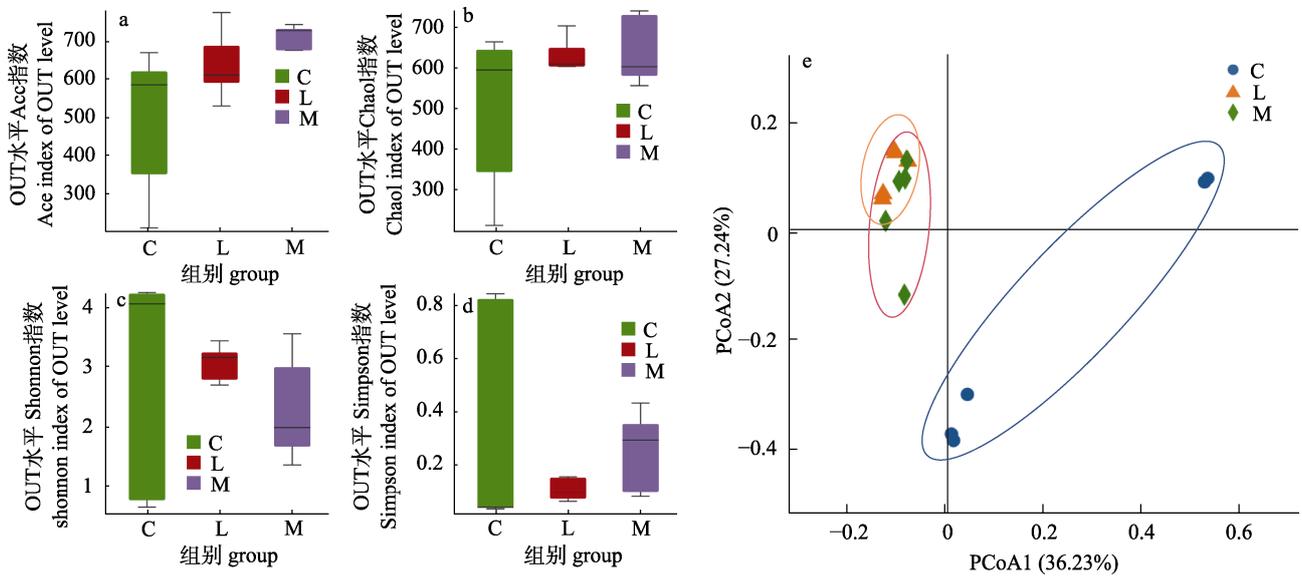


图 5 不同氨氮浓度下虹鳟感染 IHNV 7 d 后肠道微生物菌群多样性指数及 PCoA 分析

Fig. 5 The diversity index and the PCoA analysis of intestinal microbial community in rainbow trout infected with IHNV after 7 days under different ammonia nitrogen concentrations

(11.65%)。在属水平上, C 组的优势菌属为粪杆菌属(*Faecalibacterium*)(6.72%)和埃希氏菌属(*Escherichia*) (5.81%), L 组为不动杆菌属(*Acinetobacter*) (11.31%), M 组为戴尔福特菌属(*Deefgea*) (33.41%)、气单胞菌属(*Aeromonas*)(12.01%)、软形菌属(*Malacoplasma*)(11.56%)和不动杆菌属(10.83%)。

在门水平上, 氨氮胁迫组虹鳟肠道中蓝藻门和芽孢杆菌门丰度显著降低($P < 0.05$), 而假单胞菌门和支原体门丰度显著升高($P < 0.05$); 在属水平上, 氨氮胁迫组虹鳟肠道中布劳特氏菌属

(*Blautia*)和拟杆菌属(*Bacteroides*)丰度显著降低($P < 0.05$), 而戴尔福特菌属、气单胞菌属和软形菌属丰度显著升高($P < 0.05$), 且表现出与氨氮浓度的相关性。此外, 蛭弧菌属(*Bdellovibrio*)和极单胞菌属(*Polaromonas*)在 L 组中显著富集。

3 讨论

3.1 氨氮胁迫对虹鳟感染 IHNV 后死亡率的影响

高浓度的氨氮会抑制水生动物的免疫防御, 并对其产生急性和慢性毒性效应^[18-19]。随着虹鳟养殖规模的不断扩大及养殖密度的增加, 所带来

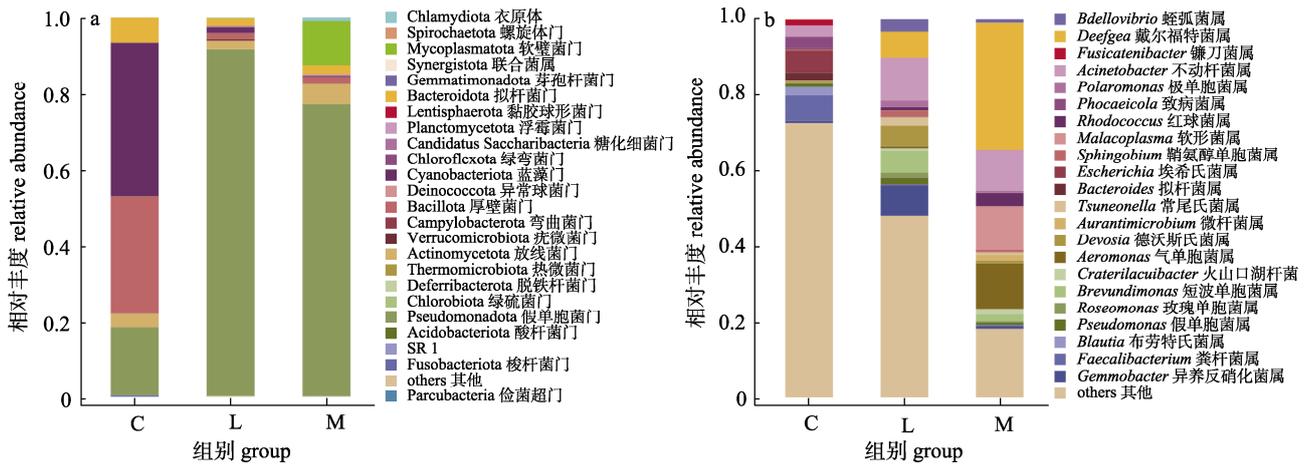


图 6 各组虹鳟肠道菌群在门水平(a)和属水平(b)上的组成

Fig. 6 The microorganisms community composition in rainbow trout's intestinal at phylum (a) and genus level (b) infected with IHNV after 7 days under different ammonia nitrogen concentrations

表 3 各组虹鳟肠道菌群在门和属水平上组成差异统计 (相对丰度>1%)

Tab. 3 The statistics of microorganisms community composition difference in rainbow trout's intestinal at phylum and genus level (relative abundance >1%)

门 phylum	C/%	L/%	P	M/%	P
假单胞菌门 Pseudomonadota	18.34	91.34	0.01	76.87	0.04
芽孢杆菌门 Bacillota	31.93	1.62	0.01	1.64	0.02
蓝藻门 Cyanobacteriota	38.75	1.58	0.01	0.32	0.01
支原体门 Mycoplasmatota	0.01	0.03	0.12	11.58	0.04
属 genus	C/%	L/%	P	M/%	P
拟杆菌属 Bacteroides	2.11	0.02	0.04	0.03	0.30
布劳特氏菌属 Blautia	2.24	0.02	0.01	0.01	0.01
极单胞菌属 Polaromonas	0.01	1.69	0.01	0.57	0.21
蛭弧菌属 Bdellovibrio	0.02	3.14	0.02	0.95	0.09
戴尔福特菌属 Deefgea	0.11	7.02	0.04	33.12	0.01
软形菌属 Malacoplasma	0.00	0.03	0.05	11.58	0.01
气单胞菌属 Aeromonas	0.05	0.57	0.02	11.94	0.01

注: C、L 和 M 表示为 C 组、L 组、M 组。

Note: C, L and M are denoted as groups C, L and M.

的危害问题逐渐成为关注焦点。IHNV 作为虹鳟最具破坏性的病原体之一，因其高频发和高死亡率，给养殖业造成了巨大的经济损失，严重制约了虹鳟产业的健康发展。鱼类对低浓度单一氨氮胁迫具有一定的耐受性，有研究表明，史氏鲟 (*Acipenser schrencki*) 幼鱼在氨氮浓度 2 和 4 mg/L 下，胁迫 60 d 未对其生存率产生显著影响^[10]，吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 幼鱼在氨氮浓度为 3.25、6.51 和 13.01 mg/L 下，胁迫 30 d 也未出现死亡^[11]。虹鳟感染 IHNV 后，一般从第 3 天

开始出现死亡，到第 7 天死亡率可达 75% 以上^[20]。本研究发现，在高达 6 mg/L 氨氮浓度下对虹鳟幼鱼进行 10 d 的胁迫，并未导致其死亡，但 IHNV 攻毒后 3 d 开始出现死亡，第 5 天死亡率达 100%，明显高于低氨氮浓度组及对照组。这表明，氨氮胁迫下虹鳟感染 IHNV 所形成的协同效应致使其抗应激、免疫及抗病力下降，可能是导致其更高死亡率的原因。

3.2 氨氮胁迫对虹鳟感染 IHNV 后肠道组织病理损伤的影响

氨氮胁迫和病原感染均可导致鱼类等水产动物肠道等器官的病理损伤，从而影响其消化和吸收等功能，同时也会降低肠道黏膜免疫能力^[13]，且二者往往具有协同危害的现象。本研究发现，虹鳟感染 IHNV 后肠上皮细胞出现少量空泡，且肌层纹理不清晰。氨氮胁迫后，随着氨氮浓度的增加，肠道上皮细胞的空泡化程度逐渐加重，组织发生明显病变，绒毛面积减小，固有层松散，细胞核染色变深，肠上皮细胞受损加剧。这与先前研究中虹鳟感染 IHNV 后肠道组织出现黏膜下层水肿，肠黏膜上皮细胞变性、坏死及脱落的结果一致^[20]。可见，氨氮胁迫进一步加剧了 IHNV 感染对虹鳟肠道组织所造成的病理损伤。

3.3 氨氮胁迫对虹鳟感染 IHNV 后血清抗氧化性的影响

氧化应激是环境应激对水生生物的毒性机制

之一^[21], 当养殖水体中氨氮浓度升高会引发鱼类体内强烈的氧化应激反应, 严重时可能导致大规模死亡。本研究发现, 在 IHNV 攻毒前, 低氨氮组 AKP、ALT 和 MDA 均出现“毒物兴奋效应”^[22]。这一现象也出现在吴乐等^[23]对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)在高氨氮条件下抗氧化酶的活性变化研究中。MDA 作为氧化应激的生物标志物, 可用于评估机体的氧化应激和损伤程度^[24-25]。管敏等^[26]研究发现, 慢性氨氮胁迫下, 史氏鲟幼鱼肝脏中 MDA 含量上升。本研究发现, 在氨氮的毒性作用和病毒感染初期引发的氧化应激下, MDA 含量显著升高。这可能是由于氨氮削弱了鱼类的免疫功能, 导致 IHNV 复制和扩散更加严重, 从而加剧免疫组织损伤。此外, L 和 M 组的 MDA 含量在攻毒后出现下降, 可能是由于抗氧化系统调节作用下, 细胞的抗氧化机制逐渐加强, 减轻了脂质过氧化反应。然而, H 组的 MDA 含量持续上升, 表明高浓度氨氮对鱼类免疫和抗氧化系统造成了严重损伤, 导致 IHNV 攻毒后免疫和抗氧化系统防线被迅速攻破, 进一步加剧 MDA 含量积累。

ALT 是肝脏损伤的重要标志酶, 当肝脏受到损伤时, ALT 会释放到血液中, 导致血清 ALT 活力升高。研究发现, 虹鳟^[27]感染 IHNV 以及鲤^[24]在氨暴露下, 血清中 ALT 活力均呈现显著升高。本研究中, 实验鱼在攻毒后, ALT 活力呈现先上升后下降的趋势。这可能是由于氨氮应激和病毒感染导致肝细胞损伤, 导致血清中 ALT 活力显著升高。然而, 随着时间的推移, 鱼体的修复机制逐渐激活, 肝脏细胞的自我修复和适应性调节可能减少了 ALT 的释放, 导致血清 ALT 活力逐渐下降。AKP 是一种重要的免疫反应酶, 不仅参与鱼类的免疫反应, 还具有解毒作用^[28-29]。研究表明, 长期氨氮胁迫会损伤鱼类的免疫系统, 降低其抗病能力^[30]。肖炜等^[10]的研究也发现, 氨氮应激会显著降低吉富罗非鱼幼鱼的 AKP 活力。本研究中, 虹鳟在氨氮和 IHNV 双重胁迫下, AKP 活力也呈现显著下降趋势。

3.4 氨氮胁迫对虹鳟感染 IHNV 后肠组织免疫相关基因表达的影响

鱼类氨中毒可能与氧化应激有关, 氧化应激

可以诱导免疫抑制、炎症和细胞凋亡^[31]。为探究氨氮环境下虹鳟感染 IHNV 对免疫相关基因的影响, 本研究选择 4 个典型免疫相关基因(*IgM*、*Mx*、*IRF7* 和 *IFN- α*)进行检测。免疫球蛋白 M (IgM) 是机体初次免疫应答中最早出现的抗体, 具有强大的抗感染作用^[32]。本研究结果显示, 氨氮胁迫组虹鳟肠组织中 *IgM* 表达量均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 这与管敏等^[26]对史氏鲟的研究结果一致。在 IHNV 攻毒后 5 d, 氨氮胁迫组 *IgM* 表达量均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 但之后则迅速下降。可见, 氨氮胁迫导致虹鳟肠组织 *IgM* 表达量变化, 对 IHNV 感染的敏感性增强, 降低了感染后期机体对病毒的抗性。

IFN- α 是 I 型干扰素的一种, 具有抗病毒免疫调节等作用, 在抗病毒感染过程中发挥着重要作用^[33]。*IRF7* 是干扰素调节因子, 依赖其的 *IFN* 反应对先天抗病毒免疫至关重要^[34]。*Mx* 的表达对 I 型和 II 型干扰素依赖性强, 是诱导细胞天然抗病毒能力的关键效应分子^[35-36]。研究发现, 虹鳟在 IHNV 感染后, 头肾和肝脏中的 *Mx-1*、*IFN- α* 和 *IRF7* 均出现显著上调^[37-38]。Huang 等^[39]研究表明, 虹鳟在感染 IHNV 后, 肠道黏膜内抗病毒免疫相关基因也被激。本研究结果显示, 虹鳟在 IHNV 攻毒后, 肠组织免疫相关基因均呈现先上升后下降的趋势, 相对于 C 组, 氨氮胁迫组肠组织中 *Mx* 表达量在攻毒后 3 d 显著升高, *IFN- α* 和 *IRF7* 在攻毒后 5 d 显著上调, 而之后此三者表达量均出现明显下降。这表明氨氮胁迫可激活鱼类免疫系统中的炎症反应, 并通过上调免疫相关基因的表达, 可能在短期增强或调节鱼类在病毒感染中的免疫应答, 而在感染后期反而降低机体对病毒的抗性。

3.5 氨氮胁迫对虹鳟感染 IHNV 后肠道菌群的影响

肠道菌群在营养物质的消化吸收以及调控宿主免疫功能方面均具有重要作用^[40]。研究表明, 长期处于氧化应激状态会对成年斑马鱼造成肠道菌群失调^[41]。本研究针对在氨氮胁迫下虹鳟感染 IHNV 7 d 后肠道菌群变化, 利用 16S rRNA 分子

标记进行微生物多样性分析。结果显示,相对于 C 组, 氨氮胁迫组虹鳟肠道菌群数量有显著增加, 但物种均匀度下降, 部分菌群丰度显著升高。氨氮胁迫导致虹鳟肠道中有害的假单胞菌门和支原体门丰度显著升高, 有益的芽孢杆菌门丰度显著降低; 有害的气单胞菌属、软形菌属、极单胞菌属、戴尔福特菌属和蛭弧菌属丰度显著上升, 有益的布劳特氏菌属和拟杆菌属丰度降低。以上菌群的变化可能是导致虹鳟对 IHNV 感染抗性降低的重要原因。

4 结论

氨氮胁迫可导致虹鳟抗氧化能力和免疫力降低, 并破坏其肠道组织及菌群稳态, 最终导致其对 IHNV 感染的耐受性降低。

参考文献:

- [1] Xu L M, Zhao J Z, Liu M, et al. Phylogeography and evolution of infectious hematopoietic necrosis virus in China[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2019, 131: 19-28.
- [2] LaPatra S E, Corbeil S, Jones G R, et al. Protection of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus four days after specific or semi-specific DNA vaccination[J]. *Vaccine*, 2001, 19(28-29): 4011-4019.
- [3] Han Y, Lin J W, Lyu X N, et al. Comparison of tolerance between diploid and triploid female rainbow trout under acute ammonia nitrogen stress[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2021, 52(5): 49-58. [韩英, 蒯佳文, 吕晓楠, 等. 氨氮急性胁迫下二、三倍体雌性虹鳟应激耐受性比较[J]. *东北农业大学学报*, 2021, 52(5): 49-58.]
- [4] Fu Y, Zhao Y R. A review: Toxicity of ammonia and detoxification of ammonia in fish[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2018, 31(3): 49-54. [付莹, 赵玉蓉. 氨氮对鱼类的毒性及鱼类应对氨氮毒性的策略[J]. *水产学杂志*, 2018, 31(3): 49-54.]
- [5] Wang Y, Li J, He Y Y, et al. Effects of ambient ammonia-N exposure on hemolymph nitrogen metabolism and antioxidant capacity of *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(1): 180-189. [王芸, 李健, 何玉英, 等. 氨氮胁迫对中国明对虾血淋巴氨氮、尿素氮含量和抗氧化能力的影响[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(1): 180-189.]
- [6] Wang M J, Wang H H, Ma B H, et al. Toxicological effect of ammonia on embryos and prolarvae of Taiwan loach[J]. *Fisheries Science*, 2020, 39(4): 483-490. [王梦杰, 王海华, 马本贺, 等. 氨氮对台湾泥鳅胚胎及卵黄囊期仔鱼的毒理效应[J]. *水产科学*, 2020, 39(4): 483-490.]
- [7] Zhang W X, Xia S L, Zhu J, et al. Growth performance, physiological response and histology changes of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* exposed to chronic ammonia[J]. *Aquaculture*, 2019, 506: 424-436.
- [8] Foss A, Imsland A K, Roth B, et al. Effects of chronic and periodic exposure to ammonia on growth and blood physiology in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Aquaculture*, 2009, 296(1-2): 45-50.
- [9] Wu X Y, Guo H H, Kuang Y, et al. Antioxidant and non-specific immune responses of four species of fish larvae under ammonia stress[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(8): 1237-1248. [吴雪阳, 郭红会, 况宇, 等. 氨氮胁迫下不同食性鱼类仔鱼抗氧化和非特异性免疫的差异响应[J]. *水生生物学报*, 2022, 46(8): 1237-1248.]
- [10] Xiao W, Li D Y, Xu Y, et al. Effects of chronic external ammonia stress on growth, immunity and metabolism of juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(4): 81-87. [肖炜, 李大宇, 徐杨, 等. 慢性氨氮胁迫对吉富罗非鱼幼鱼生长、免疫及代谢的影响[J]. *南方水产科学*, 2015, 11(4): 81-87.]
- [11] Li H Y, Li Q Y, Wang S, et al. Ammonia nitrogen stress increases susceptibility to bacterial infection via blocking IL-1R-Relish axis mediated antimicrobial peptides expression in shrimp[J]. *Aquaculture*, 2023, 563: 738934.
- [12] Huang Y, Dai X L. Effects of chronic ammonia nitrogen stress on indexes related to ammonia metabolism and apoptosis in hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2022, 53(10): 2804-2811. [黄勇, 戴习林. 氨氮慢性胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺氨代谢相关指标及细胞凋亡的影响[J]. *南方农业学报*, 2022, 53(10): 2804-2811.]
- [13] Kuang Y, He Y, Ouyang K, et al. Effects of combined exposure to ammonia and microcystin-LR on intestinal immunity and microbial community in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2024, 19(3): 287-305. [况宇, 何亚, 欧阳康, 等. 氨氮和微囊藻毒素-LR 联合作用对斑马鱼肠道免疫和菌群的影响[J]. *生态毒理学报*, 2024, 19(3): 287-305.]
- [14] Hai Q, Wang J F, Kang W G, et al. Analysis of immune-related gene expression and differences in gut microflora between two sizes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2023, 31(5): 1043-1052. [海强, 王建福, 康维国, 等. 2 种规格虹鳟免疫相关基因表达及肠道微生物菌群差异分析[J]. *农业生物技术*

- 学报, 2023, 31(5): 1043-1052.]
- [15] Fang M X, Hu W, Liu B. Effects and regulatory mechanisms of trace element selenium on animal intestinal health[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2024, 36(6): 3425-3437. [方满新, 胡威, 刘森. 微量元素硒对动物肠道健康的影响及其调控机制[J]. 动物营养学报, 2024, 36(6): 3425-3437.]
- [16] Sullam K E, Essinger S D, Lozupone C A, et al. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: A meta - analysis[J]. Molecular Ecology, 2012, 21(13): 3363-3378.
- [17] Kang W G, Wang J F, Lyu N N, et al. Detection, isolation and identification of IHNV in Liujiaxia Reservoir[J]. Biotechnology, 2023, 33(4): 448-452, 457. [康维国, 王建福, 吕娜娜, 等. 刘家峡水库 IHNV 检测与分离鉴定[J]. 生物技术, 2023, 33(4): 448-452, 457.]
- [18] Li M J, Wang Q, Zhang T, et al. Growth, antioxidant capability, and immunity of blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* juveniles under chronic ammonia nitrogen stress[J]. Fisheries Science, 2024, 43(4): 640-647. [李梦娇, 王倩, 张婷, 等. 氨氮胁迫对团头鲂生长、抗氧化和免疫的影响[J]. 水产科学, 2024, 43(4): 640-647.]
- [19] Li Y F, Pan L Q, Tong R X, et al. Effects of ammonia-N stress on molecular mechanisms associated with immune behavior changes in the haemocytes of *Litopenaeus vannamei*[J]. Molecular Immunology, 2022, 149: 1-12.
- [20] Liu T, Wei W Y, Liu J X, et al. Isolation, identification and of an infectious hematopoietic necrosis virus isolated from *Oncorhynchus mykiss* at Penzhou city, Sichuan province[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(12): 2567-2573. [刘韬, 魏文燕, 刘家星, 等. 四川彭州地区养殖虹鳟传染性造血器官坏死病毒的分离、鉴定及病理学观察[J]. 水产学报, 2019, 43(12): 2567-2573.]
- [21] Liang Z X, Liu R, Zhao D P, et al. Ammonia exposure induces oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 54: 523-528.
- [22] Stebbing A R D. Hormesis—The stimulation of growth by low levels of inhibitors[J]. Science of the Total Environment, 1982, 22(3): 213-234.
- [23] Wu L, Li J Y, Zhou W Z, et al. Effects of short-term ammonia nitrogen stress and recovery on red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. Fisheries Science, 2024, 43(3): 390-399. [吴乐, 李嘉尧, 周文宗, 等. 氨氮短期胁迫与恢复对克氏原螯虾的影响[J]. 水产科学, 2024, 43(3): 390-399.]
- [24] Hoseini S M, Yousefi M, Hoseinifar S H, et al. Antioxidant, enzymatic and hematological responses of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with myrcene-or menthol-supplemented diets and exposed to ambient ammonia[J]. Aquaculture, 2019, 506: 246-255.
- [25] Xie M M, Peng S M, Zhang C J, et al. Effects of acute temperature stress on antioxidant enzyme activities and immune indexes of juvenile *Pampus argenteus*[J]. Marine Fisheries, 2015, 37(6): 541-549. [谢明媚, 彭士明, 张晨捷, 等. 急性温度胁迫对银鲌幼鱼抗氧化和免疫指标的影响[J]. 海洋渔业, 2015, 37(6): 541-549.]
- [26] Guan M, Zhang D Z, Tang D M. Effects of chronic ammonia stress on growth, antioxidative and immunity indices in liver of juvenile *Acipenser schrenckii*[J]. South China Fisheries Science, 2020, 16(2): 36-42. [管敏, 张德志, 唐大明. 慢性氨氮胁迫对史氏鲟幼鱼生长及其肝脏抗氧化、免疫指标的影响[J]. 南方水产科学, 2020, 16(2): 36-42.]
- [27] He Q Y, Wei W Y, Wang K Y, et al. Construction of glycoprotein gene nucleic acid vaccine against infectious hematopoietic necrosis, and its effect on serum biochemical indices[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(8): 1830-1838. [何琦瑶, 魏文燕, 汪开毓, 等. 传染性造血器官坏死病毒表面糖蛋白基因核酸疫苗的构建及对虹鳟血液生化指标的影响[J]. 水产学报, 2019, 43(8): 1830-1838.]
- [28] Zhou S J, Yang R, Yu G, et al. Relationship between body mass and activities of digestive enzymes and immune-related enzymes of juvenile yellowfin tuna (*Thunnus albacares*)[J]. South China Fisheries Science, 2022, 18(3): 163-169. [周胜杰, 杨蕊, 于刚, 等. 黄鳍金枪鱼体质量与消化酶和免疫相关酶活性的关系研究[J]. 南方水产科学, 2022, 18(3): 163-169.]
- [29] Tian H J, Chen J G, Long Y, et al. Effects of Chinese herbal compounds on transaminase activity in hepatopancreas in common carp[J]. Fisheries Science, 2007, 26(11): 625-627. [田海军, 陈建国, 龙勇, 等. 复方中草药对鲤肝脏转氨酶的影响[J]. 水产科学, 2007, 26(11): 625-627.]
- [30] Xiong D L, Duan Y F, Wang Y, et al. Response of non-specific immune related indexes in intestines of *Litopenaeus vannamei* under ammonia-N stress[J]. Marine Fisheries, 2020, 42(1): 53-60. [熊大林, 段亚飞, 王芸, 等. 氨氮胁迫对凡纳滨对虾肠道免疫相关指标的影响[J]. 海洋渔业, 2020, 42(1): 53-60.]
- [31] Xiao L F, Chen C, Liang Y J, et al. Ammonia-nitrogen stress affects immune regulation via TNF α in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. Aquaculture, 2024, 583: 740593.
- [32] Xie M M, Peng S M, Zhang C J, et al. Effects of acute temperature stress on antioxidant enzyme activities and

- immune indexes of juvenile *Pampus argenteus*[J]. Marine Fisheries, 2015, 37(6): 541-549. [谢明媚, 彭士明, 张晨捷, 等. 急性温度胁迫对银鲳幼鱼抗氧化和免疫指标的影响[J]. 海洋渔业, 2015, 37(6): 541-549.]
- [33] Li L, Zou J, Su J G, et al. Interferon (IFN) system in fish: Research progress and contributions from China[J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(11): 153-168. [李丽, 邹钧, 苏建国, 等. 鱼类的干扰素系统: 研究进展与我国学者的贡献[J]. 水产学报, 2023, 47(11): 153-168.]
- [34] Honda K, Yanai H, Negishi H, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses[J]. Nature, 2005, 434(7034): 772-777.
- [35] Sun Y P, Gao F. Structural and functional studies of the innate immune effector Mx proteins: A review[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2010, 37(7): 699-706. [孙业平, 高福. 天然免疫抗病毒效应分子 Mx 蛋白的结构与功能研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(7): 699-706.]
- [36] Li Y, Zhao J Z, Liu M, et al. Construction of a nucleic acid vaccine against infectious hematopoietic necrosis, and the influence of resistance genes on resistance of environmental bacteria[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(1): 220-227. [李渊, 赵景壮, 刘淼, 等. 传染性造血器
- 官坏死病核酸疫苗的构建及其抗性基因对环境细菌抗性的影响[J]. 中国水产科学, 2018, 25(1): 220-227.]
- [37] Shao Y Z, Zhao J Z, Ren G M, et al. Early or simultaneous infection with infectious pancreatic necrosis virus inhibits infectious hematopoietic necrosis virus replication and induces a stronger antiviral response during co-infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Viruses, 2022, 14(8): 1732.
- [38] Zhao L, Huang J Q, Li Y J, et al. Comprehensive analysis of immune parameters, mRNA and miRNA profiles, and immune genes expression in the gill of rainbow trout infected with infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2023, 133: 108546.
- [39] Huang Z Y, Zhan M T, Cheng G F, et al. IHNV infection induces strong mucosal immunity and changes of microbiota in trout intestine[J]. Viruses, 2022, 14(8): 1838.
- [40] Ghanbari M, Kneifel W, Domig K J. A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing[J]. Aquaculture, 2015, 448: 464-475.
- [41] Li R X, Nie J J, Qiu D G, et al. Toxic effect of chronic exposure to polyethylene nano/microplastics on oxidative stress, neurotoxicity and gut microbiota of adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Chemosphere, 2023, 339: 139774.

Effects of ammonia nitrogen stress on IHNV susceptibility of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

LIU Xuejiao, LI Jie, DAN Caixia, HAI Qiang, LIU Hao, LIU Zhe, ZHU Lirui, WANG Jianfu

College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: This study aimed to investigate the effects of ammonia-nitrogen stress on serum antioxidant enzymes, intestinal immunity-related genes, and microbial community structures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). Rainbow trout with an average body weight of (13.5 ± 0.5) g were selected for the study. The experimental design included a control group (C group) and three ammonia stress groups: a low (L) group at 2 mg/L, a medium (M) group at 4 mg/L, and a high (H) group at 6 mg/L. A 10-day ammonia stress exposure was administered to these groups. Thereafter, an intraperitoneal injection of IHNV with a $TCID_{50}$ of $10^{-7.875}$ /mL, at a volume of 0.25 mL, was administered. The activities of alkaline phosphatase (AKP), alanine aminotransferase (ALT), and malondialdehyde (MDA) in the serum were measured 0, 3, 5, 7, and 9 days post-infection. Additionally, the expression levels of immune-related genes *Mx*, *IgM*, *IRF7*, and *IFN- α* in the intestine were assessed. Seven days post-infection, histological changes and differences in the microbial community within the intestinal tissues were examined. The results indicated that the mortality rate of rainbow trout following infection with IHNV was positively correlated with the concentration of ammonia-nitrogen stress. As the concentration of ammonia-nitrogen increased, the degree of vacuolation in the intestinal epithelial cells of the rainbow trout intensified, and villus area decreased. Additionally, the activity of AKP in the serum decreased significantly ($P < 0.05$) after infection, whereas the activities of ALT and MDA exhibited a trend of initially increasing and then decreasing. The expression levels of *Mx*, *IRF7*, *IFN- α* , and *IgM* in the intestinal tissue exhibited a pattern of initial increase followed by a decrease. Seven days post-infection, at the phylum level, the abundances of Pseudomonadota and Mycoplasmatota in the intestine significantly increased ($P < 0.05$) in correlation with rising ammonia-nitrogen concentrations. Conversely, the abundances of Cyanobacteriota and Bacillota significantly decreased ($P < 0.05$). At the genus level, compared with the control group, the ammonia-nitrogen stress group showed an increase in harmful bacteria, whereas the abundance of beneficial bacteria demonstrated a decreasing trend. The results indicate that ammonia-nitrogen stress increases the susceptibility of rainbow trout to IHNV, reduces their antioxidant capacity and immune responses, and disrupts the stability of their intestinal tissue and microbiota. This study provides a theoretical basis for the ecological prevention and control of IHN in rainbow trout farming.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*; ammonia-nitrogen stress; infectious hematopoietic necrosis virus; antioxidant enzymes; immune genes; intestinal microbiota

Corresponding author: WANG Jianfu. E-mail: wangjf@gsau.edu.cn