

[文章编号] 1007-7405(2001)02 - 0134 - 04

口服免疫添加剂对养殖大黄鱼 免疫机能影响的初步研究

鄢庆彬¹, 苏永全², 王 军², 周化民², 皮灵宝¹, 张朝霞²

(1. 集美大学水产生物技术研究所、水产学院, 福建 厦门 361021;

2. 厦门大学海洋学系、亚热带海洋研究所, 福建 厦门 361005)

[摘要] 对福建省连江县厦宫乡新辉村的养殖大黄鱼病害进行免疫防治试验, 通过定期口服免疫添加剂后, 检测大黄鱼血清中溶菌酶活力、抗菌活力和酚氧化酶活力, 测定大黄鱼体长和体重. 研究结果表明: 大黄鱼在服用免疫添加剂后血清中的溶菌酶活力平均值提高了 26%, 抗菌活力增加了 18%, 酚氧化酶活力提高幅度高达 46%. 与此同时, 实验组大黄鱼的生长速度也比对照组要快, 其中实验组平均体长比对照组高 3.8%, 平均体重增加 13.5%.

[关键词] 大黄鱼; 免疫添加剂; 溶菌酶; 抗菌活力; 酚氧化酶

[中图分类号] S 942.5

[文献标识码] A

0 引言

随着大黄鱼 (*Pseudosciana crocea* (Richardson)) 养殖业的快速发展, 其病害越来越严重, 造成了巨大的经济损失^[1,2]. 有关大黄鱼病害的防治, 目前大多使用抗生素. 大量、盲目使用抗生素不但防治效果差, 而且还造成药物残留、水体正常微生物种群失调、耐药性微生物增加、养殖动物内脏机能损伤等一系列不良后果^[3]. 因此, 国内外一些学者从免疫学角度进行水产养殖病害防治研究, 通过给水产动物服用维生素等免疫添加剂来提高动物体的特异性和非特异性免疫机能, 从而提高其抗病能力. Lall 和 Olivier 发现服用维生素 C 可以提高养殖鱼的抗病能力^[4], Waagbo 等的实验表明维生素 C 可以提高大西洋鲑的溶菌酶活性等免疫功能^[5], Siwicki 等证实服用葡萄糖可以激发鲑鳟的免疫机能, 提高抗病能力^[6], 王雷等用口服免疫药物来防治中国对虾养殖病害, 收到良好的效果^[7]. 本试验采用低聚多糖、维生素等多种免疫添加剂拌饵投喂大黄鱼, 以刺激其免疫系统, 提高免疫机能, 进而达到防病治病、促长增重的目的. 经过一段时间的投喂后, 测定大黄鱼血清中溶菌酶、酚氧化酶和抗菌活力, 以衡量大黄鱼免疫功能状态, 同时结合大黄鱼的生长和病害发生情况来评价添加剂的功效, 为大黄鱼养殖病害防治提供理论依据.

[收稿日期] 2001 - 01 - 08

[基金项目] 国家高技术发展计划资助项目 (863 - 819 - 02 - 012)

[作者简介] 鄢庆彬 (1971 -) 男, 讲师, 现为厦门大学海洋学系在职博士生, 从事水产养殖病害防治研究.

1 材料与方 法

1.1 实验地点及概况

于 2000 年 5 月至 9 月在福建省连江县厦宫乡大黄鱼养殖渔排进行免疫添加剂试验。该渔排位于罗源湾靠近排水口出处,水质较好。渔排共有 72 个网箱,其中 2000 年春苗 24 个网箱均投喂添加剂,1999 年春苗 48 个网箱中用药的有 20 个网箱,其余 28 个网箱作为对照组。

1.2 添加剂使用方法

选用低聚糖、维生素 C、鱼用多维与鱼康乐 2 号四种免疫添加剂。其用量分别是:低聚糖为 25 g/30kg 饲料;维生素 C 为 25 g/50kg 饲料;鱼用多维为 25 g/50kg 饲料;鱼康乐 2 号为 25 g/30kg 饲料。各种添加剂按以上比例添加到饲料中投喂大黄鱼,从 3 月 12 日起开始投喂,服用添加剂 10 d 后停止服用 10 d,如此循环。

1.3 生物学测量与观察

每个月按一般操作规程进行 1~2 次大黄鱼体长测量和体重测定。

1.4 溶菌酶、酚氧化酶和抗菌活力测定

每个月 1~2 次分别从试验网箱和对照网箱中随机捞取大黄鱼各 10 尾,从尾动脉取血置于 Eppendorf 离心管中,使其析出血清后进行以下测定。

1.4.1 溶菌酶活力测定 按 Hultmark 等^[8]的方法进行测定。以溶壁微球菌 (*Micrococcus lysolei*ticus, Sigma) 冻干粉为底物,将底物用 0.1 mol/L、pH = 6.4 的磷酸钾盐缓冲液配成 $A_{570} = 0.3$ 的菌悬液。取 3.0 mL 该菌悬液与 50 μ L 待测血清于试管中混匀,于 570 nm 处测定其 A_0 ,然后将试管置于 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30 min,尔后取出立即置冰浴中 10 min 以终止反应,测定其 A 值,溶菌活力 U_L 按下式计算: $U_L = (A_0 - A) / A$ 。

1.4.2 抗菌活力测定 以 *E. Coli* D31 为底物,采用 Boman 及 Hultmark 等的方法^[8,9]进行测定。将底物用 0.1 mol/L、pH = 6.4 的磷酸钾盐缓冲液配成 $A_{570} = 0.3 \sim 0.5$ 的菌悬液。取 3.0 mL 该菌悬液与 50 μ L 待测血清于试管中混匀,测定其在 570 nm 处的光密度值 A_0 ,然后将试管置于 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30 min,尔后取出立即置冰浴中 10 min 以终止反应,测定其保温后的 A 值。抗菌活力 U_a 按下式计算: $U_a = ((A_0 - A) / A)^{1/2}$ 。

1.4.3 酚氧化酶活力测定 以 L-dopa 为底物,参照 Ashida 的方法^[10]进行。将 0.1 mol/L、pH = 6.0 的磷酸钾盐缓冲液与 0.01 mol/L 的 L-dopa 100 μ L 及待测血清 100 μ L 于室温下混匀,每隔 2 min 测定其光密度值 A_{490} ,以 A_{490} 对反应时间作图,以试验条件下每分钟 A_{490} 增加 0.001 为一个酶活力单位。

2 结果

2.1 大黄鱼生长与增重

每次从试验网箱和对照网箱各取大黄鱼 10 尾,测定其体长和体重。在同等养殖管理的情况下,实验组大黄鱼平均体长比对照组高 3.8%,平均体重增加 13.5%。经过成组双样本均值分析 (t -检验),试验网箱大黄鱼与对照网箱大黄鱼在体长方面不存在显著差异 ($P > 0.05$),同时试验网箱大黄鱼与对照网箱在体重方面也不存在显著差异 ($P > 0.05$),测量结果见表 1。

2.2 溶菌酶活力、抗菌活力及酚氧化酶活力

在服用免疫添加剂后, 实验组大黄鱼与对照组相比, 溶菌酶活力平均值提高了 26%, 抗菌活力增加 18%, 酚氧化酶活力提高幅度最大, 高达 46%。成组双样本均值分析 (t -检验) 结果表明: 实验组大黄鱼血清中的溶菌酶活力 ($P < 0.05$)、抗菌活力 ($P < 0.05$) 及酚氧化酶活力 ($P < 0.05$), 皆显著地高于没有服用添加剂的对照组 (见表 2)。

表 1 大黄鱼体长与体重测量结果

日期	体长/cm		体重/g	
	实验组	对照组	实验组	对照组
0507	22.9	22.1	148.3	133.3
0525	26.5	25.8	199.0	179.9
0623	27.1	26.1	216.3	193.4
0718	27.6	26.4	234.7	197.4
0815	28.9	27.5	275.0	229.2
0904	28.8	28.1	260.0	241.8
平均	27.0	26.0	222.2	195.8

表 2 大黄鱼血清中溶菌酶活力、抗菌活力和酚氧化酶活力测量结果

日期	溶菌酶活力		抗菌活力		酚氧化酶活力	
	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
0507	0.48	0.39	0.45	0.38	1.26	0.67
0525	0.28	0.18	0.30	0.24	0.45	0.40
0623	0.48	0.43	0.36	0.23	1.62	0.66
0718	0.91	0.79	0.51	0.46	2.64	2.28
0815	0.88	0.61	0.62	0.54	1.16	0.97
0904	0.81	0.60	0.54	0.49	1.75	1.06
平均	0.63	0.50	0.46	0.39	1.48	1.01

3 讨论

当前, 网箱养殖大黄鱼病害频发, 给养殖业带来巨大的经济损失。导致这个结果的原因除了养殖密度过大, 水质恶化等原因外, 是否还因为养殖动物自身免疫机能低下, 给各种条件致病菌以可乘之机。要弄清这个问题, 首先要对大黄鱼的免疫系统及其功能有个比较全面的了解。此前, 这方面的研究还是一个空白。在哺乳动物, 用于评价免疫功能的技术较多, 而且也比较成熟^[11~13]。本试验给大黄鱼服用添加剂后, 通过测定某些免疫指标来评价添加剂对大黄鱼非特异性免疫机能的影响。从实验结果来看, 虽然在不同月份测得大黄鱼血清中溶菌酶活力、抗菌活力、酚氧化酶活力的结果有较大幅度的波动, 但每次有服用添加剂的实验组的数值均高于没有服用添加剂的对照组, 这说明服用添加剂后大黄鱼的非特异性免疫机能有所加强。同时大黄鱼血液白细胞数量及吞噬细胞的吞噬功能测定结果也说明这些添加剂能增加白细胞数量, 增强吞噬细胞的吞噬功能 (另文发表)。除此之外, 实验组在生长速度、成活率和体色等方面也好于对照组。这表明添加剂对提高大黄鱼的免疫功能有一定的帮助, 而且能促进大黄鱼的生长。

近年来从免疫学角度进行的鱼病防治工作主要是将一些病原通过灭活制成疫苗, 再通过注射等途径使鱼体对特定的疾病有一定的抵抗能力^[14]。由于当前养殖鱼病种类繁多, 这种通过提高鱼体特异性免疫力的方法在应用中有一定的困难和局限性。本试验所用的添加剂为口服型免疫添加剂, 无毒副作用, 而且能提高鱼体的非特异性免疫力, 因此在养殖生产中有广泛的应用前景。

[参考文献]

- [1] 林克冰, 刘家富. 海水网箱养殖大黄鱼病原菌研究 [J]. 海洋科学, 1999 (4): 58-62.
- [2] 全汉锋, 刘巧灵. 大黄鱼育苗常见的白点病及其防治 [J]. 中国水产, 1997 (4): 30-31.
- [3] 潘连德, 陈辉. 药物防治的临床药理学与水产药物学问题 [J]. 水产科技情报, 1998, 25 (4): 169-173.
- [4] Lall S P, Olivier G. Role of micronutrients in immune response and disease resistance in fish [J]. Fish Nutrition in Practice, 1993, 61: 101-118.
- [5] Waagbo R, Gette J, Nilsen E R, Et al. The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmon salar* [J]. Aquat Fish Manage, 1994, 25: 175-179.
- [6] Siwicki A K, Anderson D P, Rumsey G L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protects against furunculosis [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1994, 41: 125-139.
- [7] 王雷, 李光友, 毛远兴, 等. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究 [J]. 海洋与湖沼, 1994, 25 (5): 486-491.
- [8] Hultmark D. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* [J]. Eur J Biochem, 1980, 106: 7-16.
- [9] Boman H G. Insect immunity I: Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia pupae* [J]. Insect Immune, 1974, 10: 136-145.
- [10] Ashida M. Purification and characterization from hemolymph of the silkworm [J]. Bombyx Mori Arch Biochem Biophys, 1971, 144: 749-762.
- [11] Anne M D. Determination of phagocytosis of 32 P-labeled *Staphylococcus aureus* by bovine polymorphonuclear leukocytes [J]. Am J Vet Res, 1984, 45 (4): 786-789.
- [12] Quie P G. In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous diseases of childhood [J]. J Clin Invest, 1967, 46: 668-679.
- [13] Songhua Hu. Influence of medicinal herbs on phagocytosis by bovine neutrophils [J]. J Vet Med, 1992, 39A: 593-599.
- [14] 陈月英. 养殖鱼类细菌性败血症的菌苗研制和试用取得较大进展 [J]. 鱼类病害研究, 1994, 16 (2): 28, 48.

The Effect of Immune Additive on the Immunity Function of Farmed *Pseudosciana crocea* (Richardson)

YAN Qing-pi¹, SU Yong-quan², WANG Jun², ZHOU Hua-min², PI Ling-bao¹, ZHANG Zhao-xia²

(1. Institute of Aquaculture Biotechnology, Fisheries College, Jimei University, 361021;

2. Dept. of Oceanography & Institute of Subtropical Oceanography, Xiamen University, 361005)

Abstract: The lysozyme, phenoloxidase and anti-bacterial activities in the serum of *Pseudosciana crocea* (Richardson) were measured after immune drugs were orally intook by the farmed fish at the net-caged farm at xiagong township, lianjiang county, Fujian province, from May to September, 2000. At the same time, the length and weight of fish were monitored. The results showed that after feeding the immune drugs, the lysozyme in the serum of *P. crocea* increased 26%, the phenoloxidase increased 18%, and the anti-bacterial activities increased 46%. Meanwhile, the grow rate of *P. crocea* also had a remarkable increase, the length increase 3.8%, and the weight increase 13.5%.

Key words: *Pseudosciana crocea* (Richardson); immune additive; lysozyme; phenoloxidase; anti-bacterial activities