

微生态制剂对提高杂交鲤越冬能力的研究*

吴 垠 马悦欣 祝国芹 桂远明

(大连水产学院 116023)

刘 妮 郭雁群 牟希亚

(大连医科大学菌毛室 116024)

康 白 孔庆友 孙文平

(大连医科大学微生物室 116024)

摘 要 利用微生态制剂(Jy10 节杆菌 *Arthrobacter* SP, Jy31 乳杆菌 *Lactobacillus casei* 制成的活菌制剂)饲养并定期灌喂鲤, 30-35 天后在低温条件下感染致病菌, 观察死亡率、发病情况和测定各项生理生化指标。结果表明, 微生态制剂实验组死亡率明显低于对照组, 半数致死量(LD₅₀) $10^{-0.799}$ 高于对照组 $10^{-0.921}$, 差异显著($P < 0.05$); 血清总蛋白、 γ -球蛋白、血糖量、血脂量、红细胞脆性、脑胆碱酯酶活力及白细胞吞噬功能等, 实验组均优于对照组。

关键词 杂交鲤, 越冬能力, 微生态制剂

提高鱼类越冬成活率是养鱼业的重要课题。到目前为止, 国内外通过选育抗寒品种、培养大规格鱼种、改善鱼类越冬环境条件及加强管理措施等途径提高越冬成活率, 皆取得较好效果^[1-3]。然而就如何提高鱼类本身越冬能力方面的研究尚未见诸报道。

桂远明等^[4,5]的研究表明微生态制剂具有调节鱼体微生态平衡, 促进鱼类生长并提高其抗病力等方面作用。本研究拟用微生态制剂(Jy10、Jy31 复合制剂)饲养并定期灌喂鲤, 然后在低温条件下进行感染攻击试验, 旨在探讨生态制剂对提高鲤在低温条件下抗逆性(抗寒性和抗病力)的作用, 从而为北方鱼类安全越冬提供一种有效途径。

收稿日期: 1996-03-29。

* 农业部重点科研项目(鱼虾贝生态制剂开发和利用)专题论文之一。

本文承蒙大连水产学院刘焕亮教授指导, 深表谢忱。

材 料 和 方 法

(一) 材料

试验鱼为当年建鲤, 采自大连南关岭养鱼场和海城鱼种场。入箱时体长为 17.5 - 25cm, 体重为 102.5 - 168.1g。

微生态制剂由大连水产学院和大连医科大学微生态室联合研制的 Jy10(节杆菌 *Arthrobacter* SP) 和 Jy31(乳杆菌 *Lactobacillus casei*) 的活菌制剂。

感染用菌种由大连水产学院从吉林越冬病鱼体内分离出的迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*), 并经感染实验证实毒力较强。

(二) 鲤的饲养管理

1994年5月-6月和11月-12月间分两次于实验室玻璃缸水槽(1.2×0.7×0.7m³)中饲养。实验组投喂基础饲料添加微生态制剂(并每隔3-5日灌喂一次生态制剂菌液0.3ml/尾), 对照组投喂基础饲料(并每隔3-5日灌喂一次生理盐水0.3ml/尾)。鱼在入箱前经浸泡消毒, 饲养期间每日换水一次, 定时充气, 溶解氧>4mg/L, 水温19±1℃。

(三) 感染试验

第一次试验饲养30日后将实验组和对照组各分为四组, 其中二组放入低温环境箱中(水温1℃以下)维持7日, 其余二组在室内(水温升至22-25℃)维持7日, 然后进行感染试验。菌液浓度为 6×10^8 个/ml, 鱼背鳍后方肌肉注射0.3ml/尾, 未感染组注射生理盐水0.3ml/尾。观察发病、死亡情况, 感染10日后进行各项生理生化指标检测。

第二次试验饲养35日后将实验组和对照组各分为三大系列。一个系列未经感染, 置于快速降温条件下(12小时内从20℃→0℃, 表面结冰); 其余二个系列分别置于室温(22-25℃)和低温(3-8℃)条件下维持7日, 然后经不同浓度的致病菌感染(原菌液浓度为 9×10^8 , 以 10^0 , $10^{-0.7}$, $10^{-1.4}$, $10^{-2.1}$, $10^{-2.8}$ 五种稀释度)后放回原箱, 观察发病、死亡情况, 进行半数致死量(LD₅₀)测定和白细胞吞噬功能的检测。

(四) 实验数据测定方法

用抗凝血测红细胞脆性^[8], 白细胞吞噬功能^[5]。另分离血清, 测定血清总蛋白(双缩脲法)^[7]、γ-球蛋白(盐析法)^[7]、血糖(邻甲苯胺法)^[7]、血清总脂(香草醛法)^[7]。

脑胆碱酯酶活力测定。取鱼全脑, 用pH7.2 0.01M磷酸缓冲液配制成2mg/ml脑组织匀浆液, 以氯化乙酰胆碱为底物, 用Hestrin法显色, 进行比色测定^[6]。

结 果

(一) 鲤经感染后于不同水温条件下发病情况及死亡率

从表1可见, 在常温条件下, 实验组与对照组鱼的死亡率和发病症状相似; 而在低温条件下, 实验组经感染鲤的成活率(100%)明显高于对照组(20%)。

表1 鲤的发病情况及死亡率(第一次试验)
Table 1 The mortality and disease incidence of carp under the various condition

组别 Group	水温(°C) Water Temp	尾数 No.	死亡数 No. mortality	72h死亡率(%) Mortality rate till 72h	发病情况 Disease condition	
对照组 Control	常 温 18-25 Normal	未感染 Not Inoculated	5	0	0	正常无任何症状 感染后48h注射部位红肿竖鳞,后溃烂面积为2-3cm ² ,并游动不安。
	低 温 0.5-1 Lower	未感染 Not Inoculated	5	0	0	降温24h内正常,76h后两尾侧卧休克 其余呼吸微弱不活动。
		感 染 Inoculated	5	4	80	感染24h内基本正常,36h后两尾侧卧休克, 48h后死亡,60h后又有两尾休克死亡。
	实 验 组 Ep-offered	常 温 18-25 Normal	未感染 Not Inoculated	5	0	0
低 温 0.5-1 Lower		未感染 Not Inoculated	5	1	20	降温72h后死亡一尾,其余正常无症状,降温 后正常无症状。
		感 染 Inoculated	5	0	0	

表2为微生物制剂组在急速降温过程中抵抗能力的试验结果。当水温在12h内由20℃急速下降至0℃(水表面结冰)时,对照组鱼全部冷休克,实验组除了10#箱有3尾鱼未休克外,其余也全部冷休克。当水温逐渐回升时,部分鱼开始复苏,最终实验组鲤死亡率(52%)比对照组(63.9%)低11.9%。

表2 鲤在快速降温条件下死亡率(第二次试验)
Table 2 The mortality of carp under a rapid decrease in temperature

组别 Group	箱号 Boxno.	尾数 No.	饲养期 水温°C	水温变化及鱼的状态 Fish status under different water T°C				死亡 数 No.	死亡 率(%) Mortality
				晚22:00 1.5°C	翌晨8:00 0°C	10:00 4°C	13:30 9°C		
对 照 组 Control	1	9	19.5±1.87	正常	全部休克	复苏尾数0	复苏尾数0	9	100
	3	9	19.7±1.47	正常	全部休克	复苏尾数0	复苏尾数4	5	55.6
	5	9	19.7±2.27	正常	全部休克	复苏尾数0	复苏尾数5	4	44.4
	7	9	19.8±1.78	正常	全部休克	复苏尾数3	复苏尾数1	5	55.8
平均 83.9±24.64									
实 验 组 EP-offered	2	10	19.0±1.03	正常	全部休克	复苏尾数1	复苏尾数1	8	80
	4	10	19.7±1.69	正常	全部休克	复苏尾数1	复苏尾数3	6	60
	6	10	19.7±1.74	正常	全部休克	复苏尾数4	复苏尾数2	4	40
	8	10	19.7±1.76	正常	全部休克	复苏尾数2	复苏尾数3	5	50
	10	10	19.95±1.81	正常	7尾休克	复苏尾数3	复苏尾数1	2	30
平均 52±19.24									

从表3可见,在常温和低温条件下,鲤死亡率随病菌感染浓度的增大而增加;经同一病菌浓度感染的鲤,实验组的死亡率小于对照组。对照组和实验组在常温和低温条件下的半致死量(LD₅₀)分别为10^{-1.035}、10^{-0.921}和10^{-0.992}、10^{-0.799},经t值检验低温下两组差异显著(P<0.05),常温下两组差异不显著(P>0.05)。

表3 经感染后鲤在不同水温条件下死亡率及半数致死量 LD₅₀ (第二次试验)

Table 3 The mortality and median lethal dose (LD₅₀) of carp infected under different temperature condition

组别 Group	水温 (°C) Temp	病菌 稀释度 inoculation dilution	尾 数 No.	死亡数 No. mortality	存活数 No. Survival	积 累 数				半数致 死量 LD ₅₀ Median lethal does
						总死亡数 Total No. mortality	总存活数 Total no. survival	比数 Nortality Ratio	死 亡 率 (%) rate (%)	
对 照 组 Control	常 温 18-25 Normal	10 ⁰	5	5	0	13	0	13/13	100	10 ^{-1.036}
		10 ^{-0.7}	5	4	1	8	1	8/9	88.9	
		10 ^{-1.4}	5	2	3	4	4	4/8	50	
		10 ^{-2.1}	5	1	4	2	8	2/10	20	
		10 ^{-2.5}	5	1	4	1	12	1/13	7.7	
	低 温 3-8 Lower	10 ⁰	9	9	0	19	0	19/19	100	
		10 ^{-0.7}	9	5	4	10	4	10/14	71.4	
		10 ^{-1.4}	10	2	8	5	12	5/17	29.4	
		10 ^{-2.1}	10	2	8	3	20	3/23	13	
		10 ^{-2.8}	9	1	8	1	28	1/29	3.5	
实 验 组 Ep-offered	常 温 18-25 Normal	10 ⁰	5	5	0	11	0	11/11	100	10 ^{-0.992}
		10 ^{-0.7}	5	4	1	6	1	6/7	85.7	
		10 ^{-1.4}	5	1	4	2	5	2/7	28.8	
		10 ^{-2.1}	5	1	4	1	9	1/10	10	
		10 ^{-2.5}	5	0	5	0	14	0/14	0	
	低 温 3-8 Lower	10 ⁰	9	9	0	16	0	16/16	100	
		10 ^{-0.7}	9	4	5	7	5	7/12	58.3	
		10 ^{-1.4}	9	2	7	3	12	3/15	20	
		10 ^{-2.1}	9	1	8	1	20	1/21	4.8	
		10 ^{-2.8}	9	0	9	0	29	0/29	0	

(二) 在低温条件下鲤血液指标的变化

当水温由18-25℃逐渐降至0.5-1℃时各血液指标变动幅度较大,但实验组(投喂生态制剂组)变动幅度比对照组小(见表4)。以常温下未经感染鲤为对照求变化率,则结果表明:低温下未经感染的实验组鲤各指标变动范围是10.0-26.1%,对照组是14.2-30.9%;低温下经感染后实验组鲤各项血液指标变动范围是2.0-43.9%,对照组是12.3-67.2%。

(三) 低温条件下鲤脑胆碱酯酶(AchE)活力的变化

表5可见,随水温下降脑AchE活力均下降,用致病菌感染后AchE活力下降幅度较大,但实验组AchE活力下降幅度比对照组小。以常温未感染组为对照求变化率,当水温降至0.5-1℃时,实验组未感染状态下下降27.9(P<0.01),感染后下降37.6%(P<0.01);对照组未感染下降31.3%(P<0.01),感染后下降61.6-65.1%(P<0.005)。实验组与对照组在未感染状态下AchE活力差异不显著(P>0.05),经感染后AchE活力差异极显著(P<0.01)。

表 4 低温条件下鲤鱼血液指标的变化
Table 4 The changes of blood indexes of carp under lower temperature condition

组别 Group	项目 Item	红细胞压积(NaCl%)											
		血清总蛋白 (g/100ml) Serum total protein (g/l)	变化率 (%) Variabi- lity (%)	血清 r-球蛋白 (g/100ml) r-globulin (%)	变化率 (%) Variabi- lity (%)	血清葡萄糖 (g/100ml) S. glucose (%)	变化率 (%) Variabi- lity (%)	血清总脂 (g/100ml) S. total lipid (%)	变化率 (%) Variabi- lity (%)	开始溶血 Beginning Hemolysis	变化率 (%) Variabi- lity (%)	完全溶血 Complete Hemolysis	变化率 (%) Variabi- lity (%)
对 照 组 Control	常温 18-25°C Normal	4.43±0.23	100*	0.522±0.02	100*	205.4±7.58	100*	0.489±0.021	100*	0.445±0.087	100*	0.29±0.007	100*
	低温 0.5-1°C Lower	3.08±0.14	30.9†	0.448±0.009	14.2‡	159.6±8.9	22.3‡	0.598±0.023	22‡	0.55±0.035	23‡	0.325±0.016	16.1‡
	未感染 Not inoculated	**2.75±0.15	28‡	**0.287±0.015	45‡	**67.38±1.78	67.2‡	**0.76±0.017	55.4‡	**0.69±0.089	55‡	**0.45±0.03	60.7‡
	感染 Inoculated	3.02	31.8‡	0.453	12.3‡	91.7	55.4‡	0.68±0	39‡	0.6	34‡	0.425	51.8‡
实 验 组 EP-offered	常温 18-25°C Normal	4.44±0.09	100*	0.587±0.01	100*	209.8±8.9	100*	0.421±0.016	100*	0.415±0.008	100*	0.25±0.014	100*
	低温 0.5-1°C Lower	3.38±0.10	23.9‡	0.468±0.016	17.5‡	154.4±8.8	26.1‡	0.486±0.019	15.4‡	0.48±0.012	15‡	0.275±0.012	10‡
	未感染 Not inoculated	3.58±0.12	19.4‡	0.58±0.007	2‡	11.7±7.7	43.9‡	0.440±0.025	4.7‡	0.50±0.01	20‡	0.35±0.013	40‡
	感染 Inoculated												

* 各血液指标变化率按下列公式求出: $\frac{x - (a \text{ 或 } d)}{a \text{ 或 } d}$
 ** 谓感染死亡前采血, 其余为活鱼采血。

表5 低温条件下脑 AchE 活力的变化

Table 5 The changes of brain AchE activity under lower temperature condition in carp

			脑 AchE 活力	相对活力/(%)	变化率 (%)
			(微克分子/毫克/小时)	Relative activity	Variability(%)
			Brain AchE Activity		
对 照 组 Control	常温	未感染	2.81 ± 0.05	100 *	0
	18-25℃	Not Inoculated			
	Normal				
实验 组 EP-offered	低温	未感染	1.93 ± 0.3	68.7	31.3 ↓
	0.5-1℃	Not Inoculated			
	Lower	感 染 Inoculated	1.08 ± 0.11	38.4	61.6 ↓
对 照 组 Control	常温	未感染	2.92 ± 0.2	100 *	0
	18-25℃	Not Inoculated			
	Normal				
实验 组 EP-offered	低温	未感染	2.09 ± 0.25	72.1	27.9 ↓
	0.5-1℃	Not Inoculated			
	Lower	感 染 Inoculated	1.81 ± 0.7	62.4	37.6 ↓

(四)低温条件下鲤白细胞吞噬功能的变化

表6可见,低温下实验组白细胞吞噬率高于对照组26.5-76.4%,吞噬指数也高于对照组20.3-44.8%。白细胞吞噬功能随致病细菌感染程度而发生变化,但实验组的变化幅度比对照组小(见表6,图1,2)。白细胞吞噬功能还受水温影响,常温组与低温组比较,实验组白细胞吞噬率、吞噬指数随水温下降而降低,幅度为16.3-25.7%和11.0-26.1%;对照组下降幅度为32.7-43.7%(吞噬百分率)和12.2-39.0%(吞噬指数)。

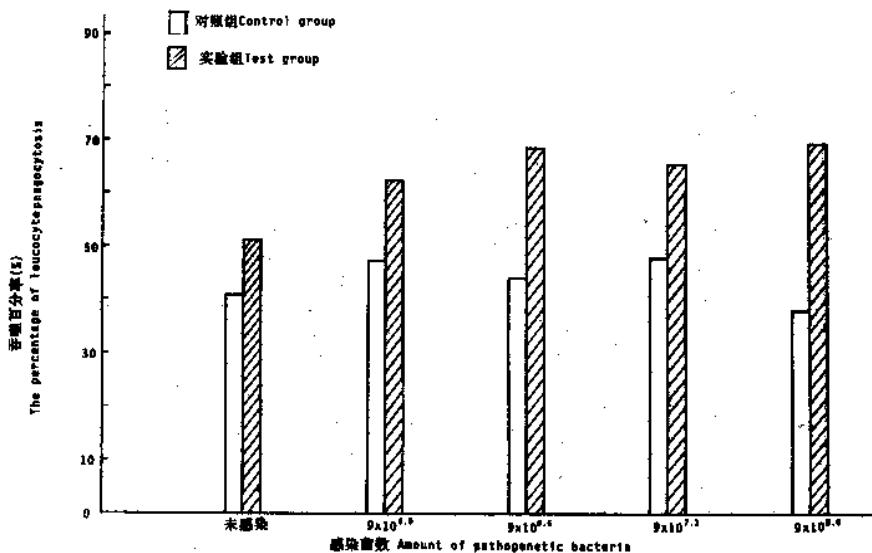


图1 低温感染后鲤白细胞的吞噬率

Fig. 1 The percentage of leucocyte phagocytosis in carp infected under lower temperature condition

表 6 不同水温条件下吞噬百分率和吞噬指数的变化
Table 6 The percentage and index of leucocyte phagocytosis under lower temperature condition in carp

对 照 组 Control	常 温 18-25°C Normal	未 感 染 Not Inoculate	吞 噬 指 数		吞 噬 百 分 率		对 照 组 Control	常 温 18-25°C Normal	未 感 染 Not Inoculate	吞 噬 指 数		吞 噬 百 分 率			
			变 化 率 (%) Variability %	变 化 率 (%) Variability %	吞 噬 百 分 率 (%) phagocytosis %	吞 噬 指 数 变 化 率 (%) Phagocytotic Variability index %				变 化 率 (%) Variability %	变 化 率 (%) Variability %	吞 噬 百 分 率 (%) phagocytosis %	吞 噬 指 数 变 化 率 (%) Phagocytotic Variability index %		
对 照 组 Control	常 温 18-25°C Normal	未 感 染 Not Inoculate	63.00±3.12	100*	2.58±0.25	100	60±8.75	100*	2.53±0.059	100*	60±8.75	100*	2.53±0.059	100*	
			39.08±0.28	38↓	2.27±0.23	12.1↑	40.36±3.20	32.7↑	2.1±0.14	17↓					
			41.03±0.05	35↓	2.03±0.08	21.3↓	44.34±3.04	26.1↓	2.27±0.21	10.3↓					
实 验 组 EP-offered	常 温 18-25°C Normal	未 感 染 Not Inoculate	78.67±3.21	100	3.08±0.13	100*	68.72±3.63	100*	2.87±0.27	100*	68.72±3.63	100*	2.87±0.27	100*	
			60.66±2.31	22.9↓	2.73±0.21	11.4↓	51.07±1.56	25.7↓	2.56±0.12	108↓					
			72.36±3.47	8↓	2.94±0.04	4.5↓	69.74±1.54	1.5↓	3.08±0.10	7.3↓					
实 验 组 EP-offered	低 温 0.5-1°C Lower	未 感 染 Not Inoculate													
实 验 组 EP-offered	低 温 0.5-1°C Lower	感 染 Inoculate													

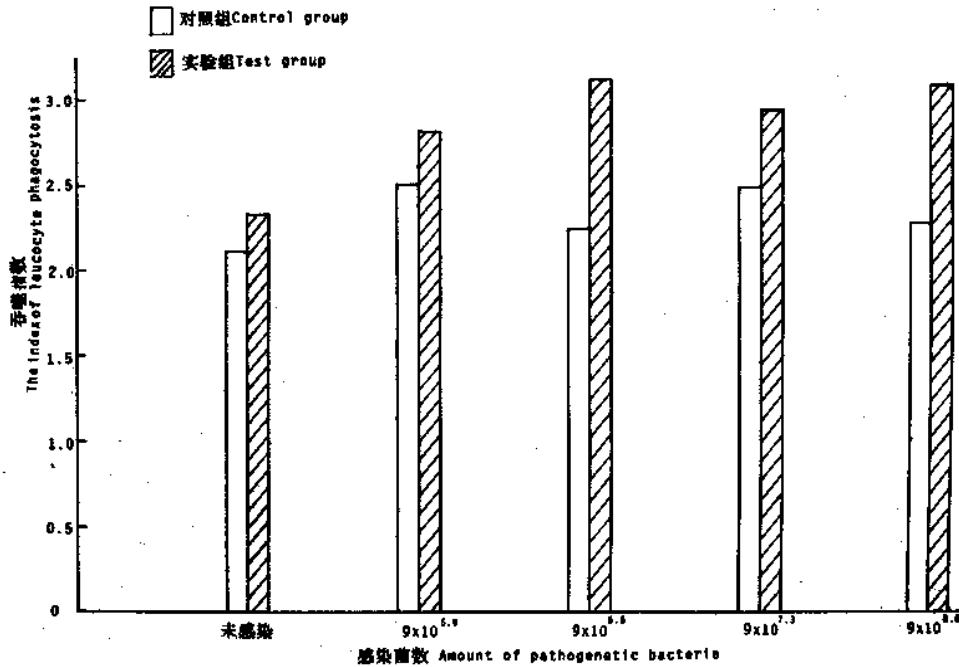


图2 低温感染后鲤的吞噬指数

Fig.2 The index of leucocyte phagocytosis in carp infected under lower temperature condition

讨 论

本研究表明,投喂微生态制剂后的鲤在低温条件下的死亡率明显低于对照组,特别经感染后死亡率较对照组低,半数致死量(LD₅₀)实验组 $10^{-0.799}$ > 对照组 $10^{-0.921}$,差异显著($P < 0.05$),说明杂交鲤在建立了有益的微生态平衡后,提高了在低温条件下的抗寒性和抗病力。同时通过对机体血液生理生化指标、脑胆碱酯酶活性、白细胞吞噬活性等项目测定,对低温下微生态制剂作用机制进行了初步探讨。

在北方鱼类越冬受多种环境因子影响,其中水温突变对鱼类越冬影响尤其明显。低温将导致鱼类新陈代谢失调和紊乱,从而影响机体多项生理生化指标。桂远明^[9]、邓会山^[10]在进行这方面的研究中发现鱼类在越冬过程中红细胞膜脆性、红细胞膜流动性、血糖、血脂水平等将发生明显变化,而且在北方越冬较困难的杂交鲤(丰鲤和建鲤)各项指标的变化幅度大于鲢、鳙、草鱼,因而认为红细胞膜脆性、血糖、血脂等可作为评价北方鱼类越冬能力的重要生理生化指标。本项研究显示,生态制剂能够调节机体微生态平衡,促进新陈代谢,改善红细胞膜的组成成分和膜的流动性,使膜的脆性下降,在低温下不易破裂造成溶血,而起到一种保护作用。其次投喂生态制剂后鲤的血糖水平、血脂水平在低温感染情况下的变化幅度也明显低于对照组,这说明微生态制剂在维持机体正常代谢水平及正常生理功能,特别是在低温条件下使其代谢过程有较大的适应性是有明显作用的。

鱼类脑 AchE 活性大小与温度有关,而且不同种类鱼脑 AchE 活性的适温范围与其本身的遗传性能、长期适应性及机体本身代谢状况有关。在广温性鲮鱼中,AchE 的蛋白分子构型在不同温度条件下是可变化的,对温度的适应也就较广^[12],定温性南极鱼的脑 AchE 与

底物亲和力在低温区内(0℃左右)最大,温度高于0℃时,脑 AchE 活力下降,7℃时 AchE 失活^[12],说明了该酶在温度适应中的作用。本文研究杂交鲤在越冬期间随水温下降 AchE 活性显著下降,下降幅度为 31.3%,特别是在低温感染期间,AchE 活性下降 61.6%,此时出现死亡率高现象,这与冯祖强等^[11]报道的鲢鱼脑 AchE 抑制到大约 45%时,鱼就接近死亡报道是一致的。而投喂微生态制剂的鲤,在低温和低温感染情况下 AchE 活性下降幅度均较对照组小,表明机体经微生态调节后扩大了对环境温度变化忍耐力的范围。

桂远明等^[5]曾通过对鲤血清抗体、白细胞吞噬功能、巨噬细胞吞噬功能等检测发现,常温下投喂生态制剂的鲤受到感染攻击后不仅成活率提高,且各项免疫功能增强。本研究结果也表明,在投喂生态制剂后鲤的白细胞吞噬率和吞噬指数均增加,而且在低温条件下,其变化幅度也明显小于对照组,说明微生态制剂可作为一种免疫调节剂。Gordin·J 曾报道巨噬细胞激活的淋巴细胞,其细胞浆膜的液态(膜流动性)及重要的膜酶系统均变得活跃起来^[13],因而细胞免疫功能是与膜流动性有关的,微生态制剂对改变膜流动性具有重要作用,可能是增强其免疫功能的原因之一。

综上所述,以人工方法(如使用微生态制剂等)来增强鱼体自身免疫保护力,调节其生理功能,提高鲤和其它鱼类抗病力、抗寒性,是使北方鲤(杂交鲤)和其它鱼类安全越冬的重要途径之一。

参 考 文 献

- [1] 刘明华等,1994. 选育中的高寒鲤。中国水产科学,1(1):10-19。
- [2] 李永函等,1979. 冰下浮游植物,溶氧和池鱼越冬问题。淡水渔业,(2):6-13
- [3] 张守藩,1959. 养鱼安全越冬问题.21-27. 辽宁人民出版社。
- [4] 桂远明等,1993. 生态制品对鲤生长的影响及其作用机理的研究。中国微生态学杂志,5(4):11-17
- [5] 桂远明等,1994. 生态制品饲料添加剂对提高鲤抗病力的研究。中国微生态学杂志,6(6):27-33。
- [6] 周永欣,1989. 水生生物毒性试验方法,农业出版社。
- [7] 上海医化所主编,1984. 临床医学检验,上海科技出版社。
- [8] 福州部队医院主编,1977. 临床医学检验,上海科技出版社。
- [9] 桂远明等,1994. 几种养殖鱼类越冬生理生化指标的变化 I。大连水产学院学报,9(3):15-27。
- [10] 邓会山等,1993. 鱼血红细胞膜流动性的研究。大连水产学院学报,8(4):9-14。
- [11] 冯祖强等,1984. 鲢鱼冷休克及其死亡的某些生化因素。水生生物学集刊,8(3):289-297。
- [12] Moon T. W, 1975. Temperature adaptation: Isozymic function and the maintenance of heterogeneity in Isozyme II. *physiol. Funct.* 207-220.
- [13] Gordin·J., 1978. *The Molecular basis of Immune cell function*, amsterclan, New York, Oxford, Elsevier North - Holland Biomedical Press. 223-238.

STUDY OF INCREASING HYBRID CARP'S OVERWINTERING BY FEEDING A COMPOUND ECOLOGICAL PREPARATION

Wu Yin Ma Yuexin Zhu Guoqin Gui Yuanming

(Dalian Fisheries College 116023)

Liu Ni Kang Bai et al.

(Dalian Medical University 116023)

ABSTRACT With a compound ecological preparation (a living bacterium preparation of *Arthrobacter* SP, and *latobacillus casei*) used as pilled ration additive, a trial of raising overwintering for hybrid carp's ability was carried out in 1994. After 30 - 50 days, the test and control fish groups were infected with pathogenetic bacteria under lower temperature condition. The experiment result showed that the survival rate of the test group with lethal dose 50% (LD_{50}) was apparently higher than that of the control, and the serum total protein and α -globulin, serum glucose content and total lipid, fragility of Rbc, brain AchE, leucocyte phagocytosis, etal were all higher than those of the control too.

KEYWORDS Hybrid carp, Overwinter survival, Ecological preparation