

“四大家鱼”对暴发性鱼病的抗病力的种间差异*

蔡完其 孙佩芳

(上海水产大学, 200090)

摘 要 嗜水气单胞菌所引起的暴发性鱼病,是近年来危害我国淡水养殖业的主要病害之一。本文报导草鱼、青鱼、鳙、鲢对该病的抗病力的差异及机理的研究结果。在菌液浓度为 6.0×10^8 CFU/ml ($10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ 四个稀释度), 注射剂量为 0.3 ml/尾时, 半数致死量 (LD_{50}) 分别是草鱼 $10^{-0.48}$, 青鱼 $10^{-1.25}$, 鳙 $10^{-1.37}$, 鲢 $10^{-2.19}$, 差异显著 ($P < P_{0.05}$)。四种鱼的白细胞吞噬百分率存在极显著差异 ($P < P_{0.01}$), 其中草鱼极显著地 ($P < P_{0.01}$) 强于其他三种鱼。四种鱼的补体替代途径 (C_3 旁路) 杀菌力 12 小时测定结果的大小顺序是草鱼 > 青鱼 > 鳙 > 鲢, 差异显著 ($P < P_{0.05}$)。草鱼的补体总量极显著地 ($P < P_{0.01}$) 低于鲢、鳙。四种鱼的红细胞 C_3b 受体花环率存在显著差异 ($P < P_{0.05}$), 顺序为鳙 > 鲢 > 草鱼 > 青鱼。“四大家鱼”对暴发性鱼病的抗病力的种间差异, 不仅同它们的免疫力的大小有关, 也同它们对特定病原的易感性的大小有关。

关键词 草鱼, 青鱼, 鳙, 鲢, 暴发性鱼病, 抗病力

80 年代以来, 我国主要养鱼地区出现了暴发性鱼病。同我国以前出现的绝大多数鱼病的显著不同点是, 暴发性鱼病除对草鱼危害不大外, 对我国淡水混养系统里的所有鱼类都有很大危害; 而以前所发生的大多数疾病只危害一、二种鱼类, 具有种类专一性。许多学者对暴发性鱼病及时地做了大量研究工作, 这些工作侧重于病原、发病机理及药物防治等。我们的工作则着重于物种内在抗病力的研究。在种内差异方面, 对品系众多的鲫、鲤已作了研究和报导^[5,6]。本文以尚无品系的草鱼、青鱼、鳙及鲢(以下简称“四大家鱼”)为对象, 报导它们对暴发性鱼病的抗病力的种间差异及机理。

材 料 与 方 法

(一) 人工感染试验

收稿日期: 1994-11-23。

* 嗜水气单胞菌由上海水产大学孙其焕副教授提供。淡水渔业 1989 届巴哈尔古丽、钟波兰、郭占芳, 1990 届柳絮、胡小红参加部分工作。谨致谢忱。

1. 试验鱼 “四大家鱼”的试验鱼取自上海水产大学种质资源试验站。四种鱼由长江原种鱼苗在同一池塘中培育了 10 个月,同塘饲养的目的是为了消除饲养环境因子对试验的影响,饲养期间无暴发病史。试验前选取大小相似的个体(体长 18.1—19.8 厘米,体重 86.5—100 克)。

2. 菌种 暴发病病原菌为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。

3. 方法 所有器皿均经灭菌处理,以下操作均为无菌操作。

(1)半数致死量(LD₅₀)测定 第一次试验每种鱼 20 尾,共 80 尾;第二次试验每种鱼 12 尾,共 48 尾。

(2)补体试验 血清制备,血清抗体检查,补体替代途径(C₃ 旁路)杀菌试验及补体总量测定。每种鱼 10 尾,共 40 尾。下述两项试验用鱼也是这批鱼。

(3)白细胞吞噬试验

(4)红细胞 C₃b 受体花环试验 红细胞 C₃b 受体花环率 A 组——红细胞上黏附一个以上酵母的计为一个花环。红细胞 C₃b 受体花环率 B 组——红细胞上黏附二个以上酵母的计为一个花环。

有关(1)~(3)的试验方法见参考文献[5];有关(4)的试验方法见参考文献[6]。

(二)半数致死量的计算方法 参考 Reed—Muench 法^[1]。

(三)方差分析方法 参考 Zar^[12]。

结 果

(一)半数致死量(LD₅₀)测定结果

感染嗜水气单胞菌后,“四大家鱼”在三天内的死亡情况见表 1,实测半数致死量见表 2。方差分析表明,“四大家鱼”的半数致死量的差异显著($P < P_{0.05}$)。

(二)白细胞吞噬试验

“四大家鱼”白细胞对嗜水气单胞菌的吞噬百分率见表 3。方差分析结果差异极显著($P < P_{0.01}$)。白细胞对嗜水气单胞菌的吞噬功能的大小顺序为草鱼 > 青鱼 > 鳊 > 鲢。

(三)补体试验

1. 试验鱼血清抗体检查 试验鱼的血清无凝集现象,由此证实试验鱼均为没有感染过嗜水气单胞菌的鱼。

2. 补体替代途径(C₃ 旁路)杀菌试验 “四大家鱼”补体替代途径(C₃ 旁路)对嗜水气单胞菌的杀菌试验结果(表 4)表明,随着培养时间的延长,残存菌逐渐增加。经过 12 小时的培养,血清中残存菌量都达到了 10⁸ 数量级。

对培养 12 小时残存率的分析结果表明,“四大家鱼”之间有显著差异($P < P_{0.05}$),残存率的大小顺序是:草鱼 < 青鱼 < 鳊 < 鲢。残存率小表示杀菌力强,残存率大表示杀菌力弱。因而,补体替代途径(C₃ 旁路)杀菌力的大小顺序是草鱼 > 青鱼 > 鳊 > 鲢。

3. 补体总量测定 “四大家鱼”补体总量测定结果是,草鱼为 1.83 单位/ml[补体总量以 1ml 血清所含的 50%溶血剂量(CH₅₀单位)数表示]。青鱼为 1.87 单位/ml;鳊为 3.10 单位/ml;鲢为 6.90 单位/ml。草鱼和青鱼的补体总量几乎一致,但这两种鱼同鳊、鲢的补体总量的差异显著。

表1 “四大家鱼”人工感染嗜水气单胞菌后死亡率的比较

Table 1 Mortality of grass carp, black carp, bighead carp and silver carp after infection by *Aeromonas hydrophila*

试验次数 Test number	鱼别 Species	病菌 Pathogen 稀释度 Dilution	试 验 组 Test group			累 积 数 Accumulate number		
			死亡数 Mortality	存活数 Survival	死亡比数 Survival ratio	总死亡数 Total mortality	总存活数 Total survival	(比数)死亡率(%) Mortality ratio
第一次 First time	草鱼 Grass carp	10 ⁰	3	2	3/5	3	2	(3/5) 60
		10 ⁻¹	0	5	0/5	0	7	(0/7) 0
		10 ⁻²	0	5	0/5	0	12	(0/12) 0
		10 ⁻³	0	5	0/5	0	17	(0/17) 0
	青鱼 Black carp	10 ⁰	4	1	4/5	8	1	(8/9) 88
		10 ⁻¹	4	1	4/5	4	2	(4/6) 66
		10 ⁻²	0	5	0/5	0	7	(0/7) 0
		10 ⁻³	0	5	0/5	0	12	(0/12) 0
	鳊 Bighead carp	10 ⁰	5	0	5/5	10	0	(10/10) 100
		10 ⁻¹	5	0	5/5	5	0	(5/5) 100
		10 ⁻²	0	5	0/5	0	5	(0/5) 0
		10 ⁻³	0	5	0/5	0	10	(0/10) 0
	鲢 Silver carp	10 ⁰	5	0	5/5	11	0	(11/11) 100
		10 ⁻¹	5	0	5/5	6	0	(6/6) 100
		10 ⁻²	1	4	1/5	1	4	(1/5) 20
		10 ⁻³	0	5	0/5	0	9	(0/9) 0
第二次 Second time	草鱼 Grass carp	10 ⁰	3	0	3/3	4	0	(4/4) 100
		10 ⁻¹	1	2	1/3	1	2	(1/3) 33
		10 ⁻²	0	3	0/3	0	5	(0/5) 0
		10 ⁻³	0	3	0/3	0	8	(0/8) 0
	青鱼 Black carp	10 ⁰	3	0	3/3	5	0	(5/5) 100
		10 ⁻¹	2	1	2/3	2	1	(2/3) 67
		10 ⁻²	0	3	0/3	0	4	(0/4) 0
		10 ⁻³	0	3	0/3	0	7	(0/7) 0
	鳊 Bighead carp	10 ⁰	3	0	3/3	5	0	(5/5) 100
		10 ⁻¹	2	1	2/3	2	1	(2/3) 67
		10 ⁻²	0	3	0/3	0	4	(0/4) 0
		10 ⁻³	0	3	0/3	0	7	(0/7) 0
	鲢 Silver carp	10 ⁰	3	0	3/3	10	0	(10/10) 100
		10 ⁻¹	3	0	3/3	7	0	(7/7) 100
		10 ⁻²	3	0	3/3	4	0	(4/4) 100
		10 ⁻³	1	2	1/3	1	2	(1/3) 33

表 2 “四大家鱼”人工感染嗜水气单胞菌后半数致死量(LD₅₀)测定值
Table 2 Observed value of median lethal dose(LD₅₀)of grass carp, black carp, bighead carp and silver carp after infection by *Aeromonas hydrophila*

试验次数 Test number	草鱼 Grass carp	青鱼 Black carp	鳊 Bighead carp	鲢 Silver carp
第一次试验 First test	10 ^{-0.17}	10 ^{-1.24}	10 ^{-1.30}	10 ^{-1.63}
第二次试验 Second test	10 ^{-0.75}	10 ^{-1.25}	10 ^{-1.24}	10 ^{-2.73}
平均 Average	10 ^{-0.46}	10 ^{-1.25}	10 ^{-1.37}	10 ^{-2.18}

表 3 “四大家鱼”白细胞对嗜水气单胞菌的吞噬百分率(%)
Table 3 Percentages of leukocyte phagocytic function on *Aeromonas hydrophila* in grass carp, black carp, bighead carp and silver carp

试验次数 Test number	种 类 Species	试验鱼编号 Fish number					均值±标准差 Mean±standard difference
		1	2	3	4	5	
第一次试验 First test	草鱼 Grass carp	34	30	35	35	28	32.4±3.2
	青鱼 Black carp	28	27	28	27	31	28.2±1.6
	鳊 Bighead carp	30	29	25	25	30	27.8±2.6
	鲢 Silver carp	28	26	24	20	21	23.8±3.4
第二次试验 Second test	草鱼 Grass carp	31	27	29	28	26	28.2±1.9
	青鱼 Black carp	27	27	25	21	25	25.0±2.5
	鳊 Bighead carp	25	20	22	27	23	23.4±2.7
	鲢 Silver carp	21	21	20	22	21	21.0±0.7

(四)红细胞 C₃b 受体花环试验

“四大家鱼”的红细胞均能与 C₃b 致敏酵母结合形成花环,结果见表 5。无论是红细胞 C₃b 受体花环率 A 组,即红细胞上黏附一个以上酵母为一个花环的,还是红细胞 C₃b 受体花环率 B 组,即红细胞上黏附二个以上酵母为一个花环的,“四大家鱼”红细胞 C₃b 受体花环率有显著差异(P<P_{0.05}),大小顺序是鳊>鲢>草鱼>青鱼。青鱼、草鱼明显低于鲢、鳊;草鱼和青鱼比较接近,鳊和鲢比较接近。

表 4 “四大家鱼”补体替代途径(C_3 旁路)对嗜水气单胞菌的杀菌试验结果Table 4 Observed values of bactericidal reaction on *Aeromonas hydrophila* by the alternative pathway of complement(C_3 shunt) for grass carp, black carp, bighead carp and silver carp

培养 时数 Culture hour number	指 标 Index	试验组 I *				试验组 I **				试验组 I ***			
		Test group I				Test group I				Test group I			
		草鱼 Grass carp	青鱼 Black carp	鳊 Big head	鲢 Silver carp	草鱼 Grass carp	青鱼 Black carp	鳊 Big head	鲢 Silver carp	草鱼 Grass carp	青鱼 Black carp	鳊 Big head	鲢 Silver carp
1	残存菌浓度(CFU/ml)	3.4×	3.6×	3.1×	3.4×	3.7×	2.6×	3.0×	4.4×	8.4×	1.5×	1.2×	1.3×
	Survival pathogen density	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁶
	残存率 Survival rate	0.58	0.60	0.52	0.58	0.62	0.43	0.50	0.73	1.40	2.50	2.00	2.17
3	残存菌浓度(CFU/ml)	1.3×	1.6×	1.1×	1.8×	2.0×	1.8×	4.0×	2.8×	7.0×	7.3×	7.7×	9.7×
	Survival pathogen density	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
	残存率 Survival rate	2.30	2.67	1.83	3.0	3.33	3.0	6.67	4.67	11.7	12.2	12.8	16.2
6	残存菌浓度(CFU/ml)	2.0×	3.9×	1.5×	1.8×	2.2×	5.1×	1.1×	1.1×	9.2×	9.0×	9.9×	3.6×
	Survival pathogen density	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁷
	残存率 Survival rate	3.33	6.50	25.0	30.0	3.67	8.50	18.3	18.3	15.3	15.0	165.0	60.0
12	残存菌浓度(CFU/ml)	1.0×	1.1×	1.7×	2.8×	1.1×	1.2×	1.6×	3.2×	5.0×	5.9×	8.8×	8.8×
	Survival pathogen density	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
	残存率 Survival rate	167	188	283	467	183	205	267	533	833	983	1467	1467

* 加热; ** 加 EGTA(乙二醇双乙胺—N,N'-四乙酸); *** 不加热, 不加 EGTA

表 5 “四大家鱼”的红细胞 C_3b 受体花环率(%)Table 5 Percentages of red cell C_3b receptors—aggregates of grass carp, black carp, bighead carp and silver carp

种 类 Species	尾 数 Number	红细胞 C_3b 受体花环率 Red cell C_3b receptors rate	
		A 组	B 组
		Group A	Group B
草鱼 Grass carp	8	23.74±2.15	6.23±0.46
青鱼 Black carp	8	22.26±3.22	5.35±0.80
鳊 Bighead carp	8	33.95±3.16	10.40±1.62
鲢 Silver carp	8	31.48±2.10	9.30±1.05

讨 论

1. 这种暴发性鱼病是由嗜水气单胞菌引起。该菌是水产动物病害中常见的条件致病菌。鱼体内在生理功能和外界环境条件的变化是该菌发病的重要因素。鉴于此, 本研究所用试验

鱼,从鱼苗开始就在同一池塘中培养,不但通过密切观察确定无暴发性鱼病史,又经血清抗体检查,确认未感染过嗜水气单胞菌。此外,抗病力试验均在同等条件下进行。通过这些努力,力求消除外界环境因子对抗病力的影响,突出鱼在先天性免疫力上的差异。

由于暴发性鱼病是一种细菌性败血症^[4]。因此,我们从白细胞吞噬功能、补体及红细胞免疫功能等非特异性免疫来探讨其抗病机理。

白细胞吞噬是鱼类非特异性免疫的重要组成部分,它具有吞噬和消灭病原微生物的作用。二次试验结果均表明,“四大家鱼”嗜中性白细胞对暴发性鱼病的病原——嗜水气单胞菌的吞噬百分率存在着极显著的种间差异($P < P_{0.01}$)。吞噬百分率的大小顺序是:草鱼>青鱼>鳊>鲢。即草鱼最强,鲢最弱。

在正常人和动物血清中,补体是具有酶活性的一组球蛋白,其主要作用是杀菌、灭活病毒及溶解细胞等。补体激活有两条途径。一是经典途径(C_1 激活途径)—抗原与特异性抗体结合成复合物后即有激活补体的能力;二是替代途径(C_3 旁路)—它可直接被抗原激活,无需特异性抗体存在。饭田贵次和若林久嗣^[7]在血清中加 EGTA,以络合血清中的钙离子,证实了河鲈、虹鳟、鲤、罗非鱼及黑鲫的补体的杀菌作用存在着种间差异。本试验首先通过凝集反应,确定试验鱼没有感染过嗜水气单胞菌的试验资格后,所进行的补体替代途径杀菌试验结果表明,杀菌力的种间差异显著,草鱼>青鱼>鳊>鲢。

上述两点结果同半数致死量(LD_{50})的结果一致。

2. 在补体替代途径(C_3 旁路)杀菌力测定中,总的趋势是,随着时间的延长,残存菌浓度增加,培养 12 小时达到 10^8 数量级时,才表现杀菌力草鱼>青鱼>鳊>鲢的差异。但在第 1、3 及 6 小时的时候,这种差异并没表现出来。分析其原因,可能是鱼的非特异性防御屏障物发挥作用,使病菌感染需要一个过程,差异的暴露也需要一定的时间。草鱼对嗜水气单胞菌的杀菌能力强于其他三种鱼,这可能是草鱼不易发生暴发性鱼病的一个重要内在因素。

3. 补体总量是检查机体免疫功能的一种方法。据 Smith 等^[11]对大鳞鳞太阳鱼(*Lepomis macrochirus*)的研究和 Chiller 等^[8,9]对鲢科鱼类研究,鱼类的补体总量有种的特异性。本试验结果是,草鱼、青鱼、鳊及鲢的补体总量分别为 1.83, 1.87, 3.10 及 6.90 单位/毫升。草鱼、青鱼低于鳊、鲢,这进一步证实了鱼类补体总量存在种的特异性。

4. 红细胞免疫系统是近年来开拓的免疫学新领域之一^[2,3,10]。本实验证实了鱼类红细胞表面存在 C_3b 受体,即鱼类红细胞具有免疫功能。在鱼类中,红细胞多数是黏附一个酵母,黏附二个以上酵母的很少。而在人类中,红细胞大多黏附二个以上酵母。这表明,鱼类的免疫功能大大低于人类。

在“四大家鱼”中,草鱼同青鱼之间,鳊和鲢之间,红细胞 C_3b 受体花环率差异不大明显,表明草鱼同青鱼,鳊同鲢的红细胞免疫功能极相似,各成为相似的一组。草鱼、青鱼组低于鳊、鲢组;而在同一组里,红细胞 C_3b 受体花环率则是青鱼略低于草鱼,鲢略低于鳊。

从补体总量和红细胞免疫功能这两方面看,草鱼和青鱼的先天性免疫功能低于鳊和鲢。

5. 众所周知,草鱼易患多种疾病,而鲢则不易患病。本试验从补体总量和红细胞 C_3b 受体花环率都证明,鲢的免疫力强于草鱼。本试验和生产实践还一致证明,草鱼对暴发性疾病的病原——嗜水气单胞菌不易感染,而鲢易感染。这两点充分表明,对于某种特定的病原体来说,不同种鱼类存在着不同的易感性,即特异性,而这种特异性同免疫力的强弱并不一定一致。由此我们认为,在进行提高抗病能力的鱼类选育时,不但要重视鱼的免疫力,而且要注意对特定疾病的抗病力,方能育成较理想的抗病力较强的品种。

参 考 文 献

- [1] 安德森, D. P. 著, 张寿山, 华鼎可译, 1984. 鱼类免疫学, 45—113. 农业出版社。
- [2] 郭锋等, 1987. 红细胞免疫功能初步研究. 中华医学杂志, 64(12): 715—716.

- [3] 郭峰,1990. 红细胞免疫及其调节功能测定方法. 免疫学杂志,6(1):60—65.
- [4] 蔡完其、胡静珍,1992. 团头鲂、鳊及其正反杂交种对暴发性鱼病的抗病力比较和发病机理的初步探讨. 水产科技情报,19(1):6—9.
- [5] 蔡完其、孙佩芳,1993. 三种鲫鱼对暴发性鱼病的抗病力. 水产学报,17(1):44—51.
- [6] 蔡完其、孙佩芳,1994. 三种鲤鱼对暴发性鱼病的抗病力的差异. 水产学报,18(4):290—301.
- [7] 饭田贵次、若林久嗣,1983. 鱼类的补体的代替径路による杀菌作用. 鱼病研究,18(2):77—83.
- [8] Chiller, J. M. *et al.*, 1969a. Antibody response in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). I. Immunocompetent cells in the spleen and anterior kidney. J. Immunol, 102:1193—1201.
- [9] Chiller, J. M. *et al.*, 1969b. Antibody response in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). II. Studies on the kinetics of development of antibody—producing cells and on complement and natural hemolysin. J. Immunol. , 102:1202—1207.
- [10] Siegel, I. *et al.*, 1981. The red—cell immune system, Lancet. 2:556—559.
- [11] Smith, A. M. *et al.*, 1967. Antibody—forming cells in the pronephros of the teleost, *Lepomis macrochirus*. J. Immunol. , 99:876—882.
- [12] Zar, J. H. 1974. Biostatistical Analysis. Prentice—Hall, INC. 620.

AMONG—SPECIES VARIATION OF RESISTANCE OF GRASS CARP, BLACK CARP, BIGHEAD CARP AND SILVER CARP TO THE OUTBREAK—FISH DISEASE

Cai Wanqi Shen Peifang

(Shanghai Fisheries University, 200090)

ABSTRACT The outbreak—fish disease, caused by *Aeromonas hydrophila*, is one of the most harmful disease spread in freshwater fish culture in China since 1980s. This paper reports the variation of resistance and mechanism among grass carp, black carp, bighead carp and silver carp to the outbreak—fish disease. When the bacteria concentration was 6.0×10^8 CFU/ml (four gradient at 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}), and the injection dosage was 0.3 ml/fish, the observed median lethal dose (LD_{50}) for grass carp, black carp, bighead carp and silver carp was $10^{-0.48}$, $10^{-1.25}$, $10^{-1.37}$ and $10^{-2.19}$ respectively with a significant difference ($p < p_{0.05}$). The leucocyte phagocytic functions of these four species had a high significant difference ($p < p_{0.01}$), the function of grass carp was higher than those of other three species significantly ($p < p_{0.01}$). The observed values of the bactericidal reaction by alternative pathway of complement (C_3 shunt) after 12 hours incubation were grass carp > black carp > bighead carp > silver carp ($p < p_{0.05}$). The total amount of complement of grass carp was lower than those of other three species significantly ($p < p_{0.01}$). The red cell C_3b receptors—aggregates of the four species had a significant difference ($p < p_{0.05}$), with a rank of bighead carp > silver carp > grass carp > black carp. The species difference of resistance to the outbreak—fish disease not only relates to immune capacity of fish, but also to their susceptibility to a specific pathogen.

KEYWORDS Grass carp, Black carp, Bighead carp, Silver carp, Outbreak—fish disease, Resistance