

研究简报

鱼类细菌性败血症菌苗浸浴免疫技术 及其预防效果

Studies on the technique of bacteria bath immunization and
its prophylactic effect on fish bacterial septicemia

陈月英 钱冬 沈智华 沈锦玉 曹铮 尹文林 张念慈

(浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001)

Chen Yueying Qian Dong Shen Zhihua Shen Jinyu Cao Zheng Yin Wenlin Zhang Nianci

(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001)

关键词 鱼类, 细菌性败血症, 全菌苗, 浸浴免疫, 预防效果

Key words Fish, Bacterial septicemia, Whole cell bacteria, Bath immunization, Prophylactic effect

淡水养殖鱼类细菌性败血症既危害吃食鱼类, 又危害滤食性鱼类, 流行期早, 流行面广, 池塘、湖泊等水域均可发生。对大水体病害, 难以用药物防治。注射或口服免疫是免疫接种的有效途径, 但对导致诸多鱼类发病死亡的细菌性败血症, 难度甚大。菌苗浸浴免疫技术简便易行, 颇受研究者瞩目^[3, 6, 8, 9]。目前对细菌性败血症鱼病免疫技术研究的报道还较鲜见。作者在该病嗜水气单胞菌病原、血清型及其菌苗制备技术研究^[2, 5, 7]的基础上, 开展了菌苗浸浴免疫技术及生产性防病研究。现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 网箱试验

按文献^[2]制备全菌苗, 菌苗含菌量为 5×10^9 CFU。以菌苗制备菌株嗜水气单胞菌 TPS-30 作攻击菌。供试鱼为本所夹山漾渔场专塘培育的 1~2 龄健康鲫鱼, 平均体重 10g 以上。试验网箱规格为 $1\text{m} \times 1\text{m} \times 2\text{m}$, 池塘水深 2m。受试鱼在聚乙烯薄膜袋中进行全菌苗浸浴免疫后, 放入网箱中饲养。定期取样, 测定免疫保护率。

1.1.1 菌苗浓度和浸浴时间试验 用清洁池塘水分别以 1:10、1:100、1:500 稀释菌苗, 浸浴免疫鲫鱼 1、5、60min, 实验水温 14°C 。235d 中共取样 5 批, 每组受试鱼 5~15 尾, 测免疫保护率。

1.1.2 增效剂试验 用市售的苜蓿碱作增效剂, 使用浓度为 5×10^{-6} , 菌苗 1:100 使用, 免疫方法同试验 1。免疫后 17d 和 42d 取样, 测保护率。

1.1.3 高渗剂试验 用市售食盐作高渗剂, 方法基本同试验 2。试验分为 2 组。A 组: 以 2% 食盐加入菌苗液中浸浴供试鱼 5 min; B 组: 供试鱼先于 2% 食盐溶液中浸浴 2 min, 再用菌苗浸浴免疫 5 min。35d 后取样, 测保护率。

1.1.4 加强免疫 初次免疫同试验 1 进行, 分别于初次免疫后 1、3、6 个月以同样方法加强免疫。免疫

收稿日期: 1997-01-13

45d 后每组取鱼 10~15 尾,测保护率。

1.1.5 连续多批次浸浴免疫试验 全菌苗稀释 1:10(含增效剂和高渗剂),浸浴受试鱼 1 min。连续浸浴 15 批鱼。各批鱼分别饲养于网箱。45d 后每组取鱼 10 尾测保护率。

1.1.6 增氧剂试验 为了防止鱼群免疫时缺氧进行了本试验,增氧剂由本所水化室提供。先将增氧剂溶解于清洁池塘水中,再 1:500 加入菌苗,浸浴鱼体 3 h。45d 和 101d 分别取鱼 7~20 尾/组,测保护率。

1.2 生产性防病试验

1.2.1 池塘 选择自 1990 年开始细菌性败血症流行严重的绍兴县马安十六方等渔场的 62hm² 亩成鱼塘,于 1993 年 12 月对 16 300kg 异育银鲫鱼种进行全菌苗浸浴免疫。试验在水泥船中进行,菌苗和增效剂浓度分别为 1:500 和 5×10^{-6} ,受试鱼浸浴 3h,水温 10℃ 左右,年终捕捞统计产量、成活率、计算防治鱼病成本等。

1.2.2 湖泊 选择杭州西湖水域,该湖水面 533hm² 左右,于 1990 年 8 月开始流行鲢、鲫等细菌性败血症,1991~1993 年死鱼 128 493 尾,计 28 万 kg。1993 年 12 月至 1994 年 1 月,对 60 余万尾鲢、鳙、鲫等 1 龄鱼种进行了全菌苗浸浴免疫试验。试验在鱼种运输的鱼篓中进行,菌苗、增效剂等使用浓度为 1:500 和 5×10^{-6} ,水温 10℃ 左右,运输浸浴时间为 2~3h。到达目的地后,将鱼捞出直接放入湖中,统计全年死鱼数。

2 结果与讨论

2.1 浸浴免疫技术

2.1.1 菌苗浸浴浓度与时间对免疫效果的影响 由表 1 可见,不同浓度菌苗及浸浴时间免疫接种的鲫,对同源活菌攻击均有不同程度的保护,45~188d 均能达到 66.7%~100% 的有效保护,其中 1:10 稀释浸浴免疫较好;35d 和 235d 的保护率较低,仅为 6.7% 和 50%。免疫有效期均可维持 6 个月左右。表明用这种全菌苗作抗原浸浴免疫 10 g 以上的鲫、鲢、团头鲂等易感鱼类,可以有效地预防这类鱼的细菌性败血症。本试验结果展示了嗜水气单胞菌全菌苗的应用前景。

表 1 菌苗浸浴浓度与时间对免疫保护率的影响

Table 1 The effect of bacterin concentration and bathing time on RSP(%) 水温 14℃

免疫时间/d Time	浓度与时间 Concentration and Time			对照死亡率/% Control
	1:10, 1 min	1:100, 5 min	1:500, 60 min	
35	28.7	13.3	6.7	100
45	100	83.3	66.7	85.7
80	100	75.0	75.0	80.0
188	100	100	80.0	100
235	—	50.0	50.0	80.0

2.1.2 增效剂和高渗剂对浸浴免疫效果的影响 如表 2 所示,不论是在 17d 或 42d 的免疫保护率均为增效剂组高于菌苗对照 25%。此外,含有增效剂的菌苗液中添加 2% 食盐后,可以使免疫保护率比不加高渗剂或先用 2% 食盐浸浴 2 min 提高 10%。茛菪碱和食盐可促进鱼体微循环,提高鱼体对抗原的吞噬及吸收,使菌体抗原易经鳃、体表侧线或肠道等器官进入体内^[4]。高渗剂的使用方法对免疫效果有较大影响。先用 2% 食盐处理,不能提高保护率,操作也比较麻烦。

2.1.3 加强免疫的间隔时间对免疫效果的影响 从表 3 可见,间隔 3 个月后二次免疫的保护率略高于相隔 1 个月。首次免疫及加强免疫后,用间接血凝法绝大多数受试鱼血清中能测到 >5 的抗体效价,2 次都用 1:10 浓度菌苗浸浴组效价最高,可达 1:17.5。以 1:10 浓度间隔 6 个月二次免疫,一年零 26d 后免疫保

护率还可达 80%, 表明两次免疫间隔的适当增大有利于免疫保护率的提高和免疫期的延长。首免以后究竟间隔多久进行加强免疫, 值得探讨。从生产上看, 细菌性败血症主要危害 2 龄以上的养殖鱼类, 尤其湖泊、水库等大水体养殖鱼类, 养殖周期长, 为使其免受危害, 采用加强免疫尤为必要。如若在 4~5 月份夏花鱼种培育阶段进行首次浸浴免疫, 到年底冬片鱼种放养时再重复接种 1 次可能更为有效。从免疫保护率和抗体效价分析, 以 1:10 浓度浸浴 1min 最好。这对于大水体的鱼病预防有重要意义。

表 2 增效剂试验

Table 2 The effect of immunization enhancer (IE) on RSP(%)

免疫时间/d	增效剂组	无增效剂组	对照死亡率/%
Time	Added with IE	No IE	Control
17	50.0	25.0	80.0
42	100	75.0	80.0

表 3 加强免疫的间隔时间对免疫保护率的影响

Table 3 The effect of immunization interval on RSP(%)

间隔时间/月	1:100		1:500		对照死亡率/%
	首次免疫	加强免疫	首次免疫	加强免疫	
	1st immun.	2nd immun.	1st immun.	2nd immun.	
1	63.6	72.7	72.7	72.7	72.7
3	71.4	100	62.5	75.0	

2.1.4 高浓度菌苗液反复多次使用的免疫效果 用 1:10 稀释的菌苗液分批浸浴的鱼种, 在第 1、4、8 和 10 批之内的保护率均达 60% 以上。这在生产上就地大批量放养鱼种时进行短时间快速浸浴免疫, 既可节省菌苗用量和操作时间, 又不影响效果, 更具有实用性(见表 4), 这一结果也与日本的水产疫苗用法用量相一致^[1]。

表 4 高浓度菌苗连续多批浸浴对免疫保护率的影响

Table 4 The effect of bacterin on RSP(%) after used for batches

水温 25℃

浸浴批次						对照死亡率/%
Immersion baths no.						
1	4	8	10	12	14	Control
90.0	80.0	80.0	60.0	30.0	10.0	0.00

2.1.5 增氧剂对浸浴免疫效果的影响 在低浓度菌苗中添加 600×10^{-6} 增氧剂后, 45d 的免疫保护率比不添加增氧剂组降低 40.6%。这可能由于增氧剂主要成份是 CaO_2 , 在水中释放的原子态氧破坏了菌苗的抗原结构。设想如果在浸浴免疫后期特别是在鱼群呈现缺氧浮头时再添加增氧剂, 可能既能解决鱼群缺氧浮头, 又不破坏浸浴初期菌苗的抗原结构。

2.2 生产性防病效果

2.2.1 成鱼塘 据绍兴县 115.7 亩鱼塘统计, 1992 年冬季免疫 7 800 尾、总体重为 1 300 kg 的异育银鲫, 1993 年共计捕获 9 600 kg, 比上年增产 1 041.3 kg, 成活率提高 15% 左右。同时, 鱼病防治费用比上年减少 2 476.55 元, 还提高了同池其它养殖鱼类的成活率和产量。据该场以往发病规律, 一般鲫鱼先发病死亡, 然后为鲢、团头鲂和鳊等。鲫鱼的免疫可能减少了传染源, 减少了其他鱼的发病死亡。

2.2.2 湖泊 根据 1994 年 1~11 月份杭州西湖的死鱼数统计结果, 共计死鱼 12 973 尾, 比上年同期减少 55.8%, 比前 3 年的年平均数减少 69.4%。

参 考 文 献

- [1] 李庆春. 水产养殖上之疫苗—寻求有效之投送途径. 养鱼世界(台), 1991(8):59~63
- [2] 陈月英等. 养殖鱼类细菌性败血症的菌苗制备技术. 水产学报, 1996, 20(2):125~131
- [3] 陈秀男等. 疫苗在鱼病防治上的应用. 中国水产(台), 1987(411):32~39
- [4] 张念慈等. 莨菪对夏花草鱼浸泡免疫的增效作用. 浙江水产学院学报, 1990, 9(2):79~83
- [5] 沈锦玉等. 浙江养殖鱼类暴发性流行病病原的研究: I. 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) 的分离、致病性及生理生化特性. 科技通报, 1993, 9(6):397~401
- [6] 徐德海等. 国外鱼类疫苗研究进展. 国外水产, 1992(4):1~3
- [7] 钱冬等. 引起鱼类暴发性流行病的嗜水气单胞菌的血清型、毒力及溶血性. 微生物学报, 1995, 35(6):460~464
- [8] 酒井正博等. ニシマスの β -溶血性連鎖球菌症に対する浸漬フクチンの有効性. 鱼病研究, 1988, 23(4):269~270
- [9] Croy T R, Amend D F. Immunization of sockeye salmon(*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. Aquacult., 1977, 12:317~325