

口服免疫型药物对养殖中国对虾 病害防治作用的研究*

王雷 李光友 毛远兴 张海岩

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

摘要 于1992年8—9月在山东乳山县海阳所镇虾场, 使用复合口服免疫药物防治中国对虾病害, 在现场观察对虾的发病情况、生长及增重速度; 在实验室测定对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力和酚氧化酶活力。研究表明, 对虾服用“口服免疫型”药物后具有明显的抗病防病能力及促生长等作用。

关键词 中国对虾 口服免疫药物 病害防治

关于对虾病害的防治, 目前养殖单位所普遍采用的抗菌素等药物存在许多缺点, 如预防作用弱, 有毒副作用等, 不能全面有效地防治各种病害。鉴于此, 国内外一些学者从免疫学角度对虾病进行防治研究, 此方面已有一些试验取得了成功(叶孝经, 1990; Bland Crowder, 1982)。本试验系采用富含免疫多糖、生物碱及氨基酸等成分的数种免疫药物制成药饵使中国对虾服用, 刺激其免疫系统, 提高其防御能力, 进而达到防病治病的目的。另外, 本试验中通过测定对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力及酚氧化酶活力等作为免疫指标, 以衡量对虾的免疫功能状态及不同免疫药物的抗病作用机理, 同时为对虾病害的监测提供手段。

1 材料与方法

1.1 实验地点及概况 于1992年8—9月在山东省乳山县海阳所镇虾场进行中国对虾(*Penaeus chinensis*)免疫型药物试验。该虾场位于乳山口外, 系全部自然纳水, 水质条件较好。全场虾池有8个, 共计600亩, 水深1—1.5m。选定3号池为试验池, 面积48亩, 放苗9000尾/亩, 该池底质、水质情况一般, 历年对虾的规格、产量属全场中等。选定2号池作为对照池, 面积为73亩, 放苗密度同试验池, 其各项环境条件及往年虾规格、产量均优于试验池。

1.2 免疫药物与管理方法 选用富含多糖及生物碱等的4种药物(A, B, C, D), 以一定配比混合(A:B:C:D ≈ 3:2:2:1)后, 按1%用量直接加入饵料中, 其他成分同一般饵料, 包括饼粕、虾糠、面粉、鲜杂鱼、引诱剂、微量元素及维生素等。

试验池自8月8日起开始投喂药饵, 其他一切管理均同全场各池。在预防病害方面, 全场视情况向池中施放数次漂白粉和生石灰, 在高温期还数次用氯霉素针剂喷洒饵料表面, 试验池饵料也作同样处理。

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第2349号。中国科学院“八五”重大项目, A0892081312号。

收稿日期: 1993年7月21日, 接受日期: 1994年5月4日。

1.3 生物学测量及观察 每隔 5 天进行一次生物体长测量, 后期测定体重, 方法按一般操作规程进行。体重以每公斤所称虾数及平均每尾虾的重量两种方式表示。

1.4 抗菌、溶菌活力及酚氧化酶活力的测定 每隔 5 天分别从试验池和对照池中用旋网随机取虾, 用 5 号针头及 1ml 或 2ml 注射器由头胸甲后插入心脏取血, 置于 1.5ml Eppendorf 离心管中。一般为清晨取血, 置冰瓶中带回实验室, 当天下午将样品略为离心后取出血清, 进行如下测定。

1.4.1 抗菌活力测定 以 *E. coli* D31 (抗链霉素) 为底物, 采用 Boman (1974) 及 Hultmark 等人的方法(1980)。将底物用 0.1mol/L, pH = 6.4 的磷酸钾盐缓冲液配成一定浓度的悬浊液 (O.D.₅₇₀ = 0.3—0.5)。取 3ml 该悬液与 50 μ l 待测血清于试管中混匀, 测定其保温前在 570nm 处的光密度值 (A_0), 然后置于 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30min, 取出后立刻置冰浴中 10min 以终止反应, 测定其保温后在 570nm 处的光密度值 (A)。抗菌活力 U_a 按下式计算:

$$U_a = \sqrt{\frac{A_0 - A}{A}}$$

为消除血蓝素的干扰, 用空白血清为对照, 于 570nm 处测其光密度值, 以校正 A_0 , A 值。

1.4.2 溶菌活力测定 以溶壁微球菌 (*Micrococcus lysolei*ticus, Sigma) 冻干粉为底物, 按 Hultmark 等人(1980)的方法进行。将底物用 0.1mol/L, pH = 6.4 的磷酸钾盐缓冲液配成一定浓度的悬液 (O.D.₅₇₀ \approx 0.3)。取 3ml 该悬液与 50 μ l 待测血清于试管中混匀, 测 A_0 , 然后置 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30min, 取出后立刻置冰浴中 10min 以终止反应, 测 A , 溶菌活力 U_L 按下式计算:

$$U_L = \frac{A_0 - A}{A}$$

1.4.3 酚氧化酶活力的测定 以 L-dopa 为底物, 参照 Ashida 方法(1971)进行。将 0.1mol/L, pH = 6.0 的磷酸钾盐缓冲液 3ml 分别与 0.01mol/L 的 L-dopa 100 μ l 及 100 μ l 待测血清于室温下混匀, 每隔 2 分钟读取 490nm 处的光密度值, 以 O.D.₄₉₀ 对反应时间 (min) 作图, 酶活力以试验条件下每分钟 O.D.₄₉₀ 增加 0.001 为一个酶活力单位。

2 结果

2.1 中国对虾的生长及增重 对虾体长测定结果见图 1、表 1。其中只取 8 月 4—29 日的测量数据。由于 1 号池原为暂养池, 基础饵料及水质条件好, 前期长势居全场之首, 故一并列入表中比较, 其余各池生长情况均不如 1, 2, 3 号池, 故表中略去。体重测定结果见表 2。体长、体重旬增长结果见表 3。

表 1 中国对虾体长 (cm) 测量结果

Tab. 1 Measurement of biological length of *P. chinensis*

日期(月·日)		8.4	8.9	8.14	8.19	8.24	8.29
池号	1 (原暂养池)	8.74	9.07	9.40	9.70	9.76	10.33
	2 (对照池)	8.52	8.87	9.42	9.42	9.90	10.10
	3 (试验池)	8.68	9.00	9.19	9.63	9.99	10.35

表 2 中国对虾体重测量结果(1992.8.24)

Tab. 2 Measurement of weight of *P. chinensis*

池 号		1	2	3	4	5	6	7	8
测 量	每公斤称虾数 (尾/kg)	74.4	72.8	70.8	83.4	92.8	86.4	75.4	121.6
	平均体重 (g/尾)	13.4	13.7	14.1	12.0	10.8	11.6	13.3	8.2

表 3 中国对虾体长、体重旬增结果

Tab. 3 Ten-day increment of biological length and weight of *P. chinensis*

测量项目	日 期 (月·日)	池 号		
		1	2	3
体 长 (cm)	9.9	10.99	10.80	10.50
	9.19	11.60	11.28	11.27
	旬增	0.61	0.48	0.77
平均体重 (g/尾)	9.9	17.5	16.1	15.2
	9.19	20.4	19.2	18.8
	旬增	2.9	3.1	3.6

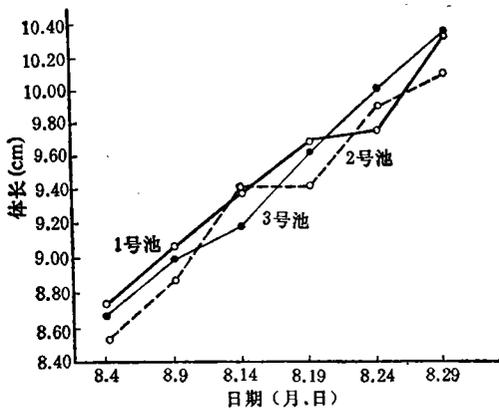


图 1 中国对虾体长增长

Fig. 1 The increment of biological length of *P. chinensis*

2.2 病害发生情况及观察结果 本年度全场未发生大规模流行病害,但局部发现有红腿、黑鳃、褐斑等病症。高温期内,在对照池(2号)及其他各池边,每天早晨可拣到1—1.5kg病死虾;在试验池(3号)则基本未发现死虾,偶尔见到个别红腿症状对虾,未有感染流行,逐步痊愈消失。

另据观察,自投喂药饵后,试验池对虾长势为全场最好,除表现在增长增重快以外,对虾摄食及活动能力强,体色和肥满度好,与其他各池有明显不同。

2.3 抗菌活力、溶菌活力、酚氧化酶活力测定结果 依次见表4、图2、表5。

3 讨论与结语

3.1 口服免疫型药物具有防治病害和促生长效果 口服免疫型药物后的测定结果表明,同期内对虾的生长及增重速度均大于条件优越的对照池及全场各池(表1—表3)。以8月24日测量为例,试验池的平均体长为9.99cm,而对照池的为9.90cm,原暂养池为9.76cm;平均体重,试验池的为14.1g/尾,而对照池的为13.7g/尾,原暂养池的为13.4g/尾。尤其是9月1日强热带风暴将试验池部分堤坝冲垮以后,由于忙于加固堤坝而放松

表 4 中国对虾血淋巴中的抗菌活力和溶菌活力

Tab. 4 The antibacterial and bacteriolytic activities in the haemolymph of *P. chinensis*

日期(月·日)		8.8		8.13		8.18		8.23		8.29	
池 号		2	3	2	3	2	3	2	3	2	3
抗菌活力	A_0	0.316	0.316	0.422	0.422	0.571	0.571	0.469	0.469	0.460	0.460
	A	0.285	0.290	0.400	0.360	0.524	0.369	0.425	0.333	0.426	0.371
	U_s	0.330	0.300	0.234	0.415	0.300	0.740	0.321	0.640	0.282	0.490
溶菌活力	A_0	0.359	0.359	0.357	0.357	0.299	0.299	0.190	0.190	0.292	0.292
	A	0.318	0.322	0.302	0.280	0.278	0.226	0.168	0.130	0.256	0.210
	U_L	0.129	0.115	0.182	0.275	0.075	0.323	0.131	0.462	0.141	0.390

表 5 中国对虾血淋巴中的酚氧化酶活力(units)

Tab. 5 The phenoloxidase activity in the haemolymph of *P. chinensis*

日期(月、日)		8.8	8.13	8.18	8.23	8.29
池 号	2	16.3	4.8	5.2	2.7	4.0
	3	45.0	16.5	7.0	6.3	5.3

了管理,造成对虾消瘦,9月9日测虾时,试验池对虾的体长及体重均低于对照池和1号池;但恢复投喂药饵并将免疫药物用量增至1.5%以后,对虾迅速增长增重,体长旬增0.77cm(全场平均为0.53cm),体重旬增3.6g/尾(全场平均为3.0g/尾),速度重新超过对照池和1号池。9月20日以后收虾时,试验池收虾共约2500余公斤,根据测量存虾数为十万尾左右,对虾规格在40—44尾/kg,而全场平均在52—56尾/kg。在高温期内,试验池内对虾的发病率和死亡率显著低于对照池和其他各池,提高成活率。实验室内所测对虾的免疫功能增强,与现场结果相吻合。

本试验采用的4种免疫药物,其中A,B富含免疫多糖、生物碱、有机酸、醇及多种氨基酸等,可有效地改善机体的免疫状态,提高其抵抗能力。C,D为抑菌药物,经作者对对虾的主要致病菌——弧菌所做的体外抑制试验表明,具有极强的抗菌消炎作用并优于多种抗菌素¹⁾。4种药物均无毒副作用,按恰当比例配合服用后,既可提高对虾的免疫抗病能力,又具抗菌消炎作用,还对生长增重有显

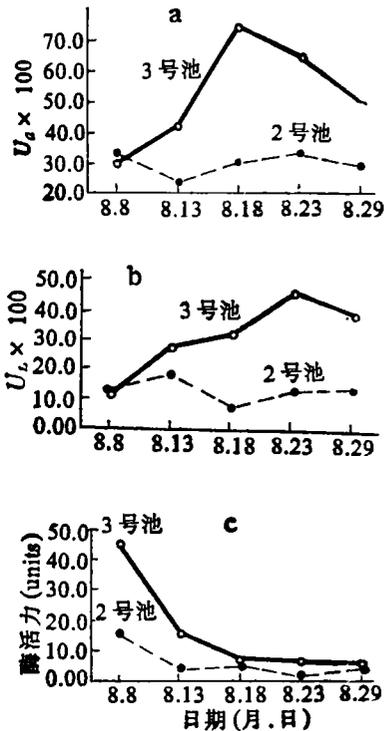


图 2 中国对虾血淋巴中的抗菌活力(a)、溶菌活力(b)和酚氧化酶活力(c)
Fig. 2 The antibacterial, bacteriolytic and phenoloxidase activities in the haemolymph of *P. chinensis*

著效果,这是一般抗菌素药物所不及的。另外,该药物的生产费用低(每公斤饵料约增加成本 0.07 元),价格大大低于各种抗菌素,并且制作和使用方便,易于大面积推广使用。

3.2 口服免疫型药物可增强对虾非特异性免疫功能 通过对抗菌、溶菌活力的测定结果可看出,服用免疫药物后,对虾血淋巴中的免疫因子活力显著提高(表 4 及图 2a,b),其中抗菌活力 U_a 随时间推移可增高至 0.74,而对照池平均始终在 0.30 左右;溶菌活力 U_L 基本呈同样变化规律,最高可达 0.462,而对照池的平均在 0.13。这在一定程度上可以解释药物的作用机理,即提高了机体的非特异性免疫功能。上述测定系借鉴昆虫免疫研究中较为成熟的抗菌肽、溶菌酶活性测定方法,至于将其应用于对虾免疫本研究在国内外尚属首次。由于本试验只进行了活力测定而未做分离纯化及分析鉴定,故称谓抗菌活力和溶菌活力,详见作者另文讨论²⁾。但由试验结果可初步断定,以此作为一种指标来衡量对虾的体液免疫状态及药物作用机理是可行的。至于表现抗菌、溶菌活力的是何种体液免疫因子以及与细胞免疫的关系等,有待于深入研究。本试验测定结果(表 5 及图 2c)初步表明,随着高温季节的到来,环境条件变差,对虾体内的酶活力有所降低,这与我们以前所做中国对虾亲虾产卵后酶活力下降以及向体内注射弧菌后酶活力下降的结果是一致的³⁾。另外,口服免疫药物后对虾血淋巴中的酶活力比对照略高,此方面有待进一步探索。国内外的研究表明(程振衡等,1990; Ashida et al., 1983; Söderhäll et al., 1979),甲壳动物血淋巴中的酚氧化酶活力与其免疫系统有某种相关性,但其作用机理及变化规律尚未搞清。

3.3 口服免疫型药物的持续性 本试验的整个过程系采取连续用药的方式。根据人体免疫作用的特点,免疫系统被激活后其活性一般可持续一定时间并有免疫记忆等特点。Steward 博士(叶孝经,1990)在研究 Gaffkemia 病疫苗时也发现,注射疫苗后 4 个月内,龙虾仍保持免疫力。本试验所用的免疫药物是否也有作用的持续性尚未作研究,但推测以一定的时间间隔、合适的剂量进行口服免疫应该具有同样的作用。

3.4 口服免疫型药物是全面有效防治对虾病害的新途径 数年来,虾病问题始终未得到全面有效的控制。面对有增无减的病害,养殖单位基本仍采用抗菌素类药物治疗,以及通过改善生态环境、强化饵料营养、加强管理等综合措施防止病害的发生。近几年虽有人从免疫学角度进行虾病防治研究并取得了一定的成果,但这些工作多由人体免疫学演变而来,如 Lewis 教授(Bland Crowder,1982)等的发明,均系将弧菌等病原菌灭活后作为疫苗,注射给虾体,使其产生对疾病的抵抗能力。这种方法操作繁琐且费用较高,难于在生产中在规模使用。而本试验所用的药物为口服免疫型,易分离制取,成本低,无毒副作用,便于在大面积养殖中使用。这为全面有效地防治对虾疾病提供了一种新途径。

1) 王雷、李光友、毛远兴,1993,11种天然药物对弧菌的体外拟制效果研究,海洋与湖沼。(待刊)

2) 王雷、李光友,1992,中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力及酚氧化酶的测定及其特性研究。(待刊)

3) 李光友、王雷,1992,中国对虾体内酚氧化酶性质研究。

参 考 文 献

- 叶孝经, 1990, 对虾弧菌苗免疫的研究, 海洋水产研究丛刊, **32**: 13—18。
- 程振衡、梁子才, 1990, 亚洲玉米螟血淋巴中酚氧化酶的研究, 昆虫学报, **33**(4): 424—429。
- Ashida, M., 1971, Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm, *Bombyx Mori*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **144**: 749—762.
- Ashida, M. et al., 1983, Activation of prophenoloxidase by cell walls of 1, 3-glucase in plasma of the silkworm, *Bombyx Mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **113**: 562—568.
- Bland Crowder, 1982, Viral disease control study develops shrimp culture immunization techniques, *Aquaculture Magazine*. **May-June**: 12—15.
- Boman, H. G. et al., 1974, Insect immunity I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia pupae*, *Insect Immune*, **10**: 136—145.
- Hultmark, D. et al., 1980, Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*, *Eur. J. Biochem.*, **106**: 7—16.
- Söderhäll, K., Unestam, T., 1979, Activation of crayfish serum prophenoloxidase in arthropod immunity: The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins, *Can. J. Microbiol.*, **25**: 404—416.

EFFECT OF ORAL IMMUNO DRUGS FOR PREVENTION AND CONTROL OF DISEASES OF CULTURED *PENAEUS CHINENSIS**

Wang Lei, Li Guangyou, Mao Yuanxing, Zhang Haiyan
(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071*)

ABSTRACT

An enlarged experiment on the above topic was carried in a prawn farm in Rushan County, Shandong Province, from August to September, 1992. The on-the-spot determination showed that prawn growth was accelerated while the incidence of diseases was decreased evidently after the immuno drugs were taken orally. The ten-day increase of body length and weight of the experimental prawns was 0.77cm and 3.6 grams/per prawn respectively, while that of the control were 0.53cm and 3.0 grams/per prawn respectively.

Every 5 day laboratory measurement of the antibacterial, bacteriolytic and phenoloxidase activities in the haemolymph of prawn showed that the antibacterial activity (U_a) and bacteriolytic activity (U_L) of the experimental prawns could be increased to as high as 0.74 and 0.462 (while that of the controls were only 0.30 and 0.13 respectively). The U_a and U_L related to the strengthening or weakening of the immune function of prawn, and are quantitative measures of the effects of immuno drugs.

All these proved that the immuno potency of prawn can be increased by immunological methods, and that the oral immuno drugs can be widely applied in prawn culture, to prevent and control the diseases of prawn and enhance their growth.

Key words *Penaeus chinensis* Oral immunization Disease of prevention and control

*Contribution No. 2439 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.