

文章编号: 1674-5566(2017)03-0392-08

DOI:10.12024/j.sou.20161101899

注射四联疫苗与有益微生物联用在草鱼池塘养殖中的应用效果

刘春花, 赵长臣, 江小燕, 陈总会, 陶家发, 黄志斌

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘要: 为提高草鱼抗病害能力, 并维持良好的水体环境, 在中山市东升镇北洋水产养殖场选用 12 口池塘开展注射草鱼细菌性烂鳃、肠炎、赤皮三联灭活疫苗与病毒性出血病冻干疫苗相混合的四联苗, 并联用有益微生物的示范性试验。结果显示, 注射四联疫苗后草鱼的抗体效价在 D7 时即可检测到, D30 时达最高值, D90 时仍维持该水平; 注射四联疫苗组草鱼的免疫原性比空白对照组提高, 平均成活率提高 29.7% ($P < 0.01$), 平均免疫保护率为 90.9%; 使用有益微生物在改良水质、优化养殖环境方面作用显著, 可提高草鱼平均存活率 7.9% ($P < 0.05$); 疫苗与有益微生物制剂联用组草鱼的平均成活率提高 31.7% ($P < 0.01$), 获得免疫保护率达 96.6%; 四联苗组、有益微生物组、四联苗与有益微生物联用组的日增重、净增重、增重率、特定生长率均比对照组提高, 饵料系数降低, 3 个试验组草鱼的收益比对照组分别增加 875、1854、2255 元 ($P < 0.05$)。上述试验结果证明, 草鱼四联疫苗与有益微生物联用的养殖效果最佳, 既可增强鱼体抗病害能力, 提高存活率, 促进生长, 又可改善养殖水体环境, 具有良好的协同效益, 极具推广应用价值。

关键词: 草鱼; 有益微生物; 四联疫苗; 注射免疫

中图分类号: S 942

文献标志码: A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 是中国淡水养鱼的主要品种, 其产量约占淡水养殖总产量的 20%^[1]。但草鱼养殖生产中病害多, 其中以高发病率、高死亡率的病毒性出血病、细菌性烂鳃病、肠炎病、赤皮病等草鱼“四病”最为严重, 直接影响草鱼养殖的经济效益^[2-3]。近年来草鱼养殖病害防治的重要手段主要是采用抗生素类化学药物, 但长期使用抗生素, 势必污染水体环境, 而药物的残留更是威胁人体健康, 且易导致病原体产生抗药性, 致使水产养殖动物病害更加难以控制。以中药理论为基础配伍中草药在防治草鱼病害上可取得良好效果, 然而渔用中草药药材存在加工工艺原始, 剂型单一, 剂量使用偏大, 适应性差, 药效、药理等基础研究薄弱, 尚未制定规范的产品标准和使用剂量等缺点^[4-5]。

随着当今对绿色环保食品及环境保护的要求提升、免疫学技术的发展, 对接种疫苗防治水产动物疾病方法的研发与应用已成为当前水产

养殖的热点。国外 20 世纪 70 年代即获得首个商品化疫苗^[6], 近年来更是飞速发展, 在北美、南美、北欧、东亚等主要水产养殖地区设立了工业化生产基地, 并在各养殖区普遍使用, 收到显著效果; 据不完全统计, 至 2012 年全球商业化生产的水产疫苗已超过 140 种^[7], 国内则已有草鱼出血病细胞灭活疫苗、鱼用嗜水气单胞菌灭活疫苗和牙鲆溶藻弧菌、鳗弧菌、迟缓爱德华菌病多联抗独特型抗体疫苗以及草鱼出血病活疫苗获得国家新兽药证书, 其中鱼嗜水气单胞菌灭活疫苗、草鱼出血病活疫苗取得商品化生产批准文号^[8-9]。有益微生物在水产养殖中的应用也日益被接受和重视, 在短短十多年时间内, 以迅猛的势头发展并应用于水产养殖业, 在促进养殖动物个体健康与改善养殖环境方面起到了不可估量的作用, 当前水产养殖中主要使用的益生菌有弧菌、假单胞杆菌、芽胞杆菌和一些乳酸菌^[10]。

本研究通过疫苗与有益微生物联用, 以分析

收稿日期: 2016-11-10 修回日期: 2017-01-23

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2012BAD25B02); 广东省科技计划项目(2013A020103012, 2016B020234003, 2016B090920089)

作者简介: 刘春花(1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产病害。E-mail: 2002302012@163.com

通信作者: 黄志斌, E-mail: hzb1393@163.com

二者在草鱼养殖中的协同作用效果,为解决当前水产养殖中病害频发、抗生素滥用、养殖环境恶化、病原耐药性加强和养殖动物药物残留等问题奠定基础,为水产养殖业朝着绿色健康养殖的方向发展提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验塘条件

试验塘位于广东省中山市东升镇北洋水产养殖场,选择 12 口排水系统完善、壤土底质、保水性能好、旱涝无忧的相邻鱼塘,方向东南向,水深 2.5 m,水面约 0.13 ~ 0.17 hm²。试验前各鱼塘均已排干塘水、日晒 2 ~ 3 d、回水,用二氯异氰尿酸钠进行水体消毒。将试验塘按照 1-12 分别编号,分别对每口池塘配置一台 1.5 kW 的增氧机,以防止因台风、高温低压、天气闷热造成缺氧死鱼影响试验结果。

1.2 试验组设置

1-3 号塘为对照组,未注射疫苗、未使用有益微生物;4-6 号塘为使用有益微生物组,未注射疫苗、使用有益微生物;7-9 号塘为四联苗组,注射草鱼出血病弱毒活疫苗及细菌性三联灭活疫苗、未使用有益微生物;10-12 号塘为四联苗 + 有益微生物组,注射草鱼四联苗、使用有益微生物。

1.3 试验时间

试验时间为 2016 年 6 月—2016 年 9 月。

1.4 苗种及管理

草鱼苗购自东升镇个体养殖场的同一批鱼,每池放养 8 000 尾,鱼种规格为 10 g 左右,个体健壮、无病,无疫苗注射记录。按当地传统养殖习惯,每个鱼池放养同等的混养鱼类,即鳊 500 ~ 750 g/尾,750 尾/hm²;鲫 100 ~ 150 g/尾,6 000 尾/hm²;鲤 350 ~ 500 g/尾,300 尾/hm²。投喂饲料均为通威“156”小颗粒草鱼饲料,日投放量为 20% ~ 30%,每 30 天根据鱼体重调整一次。日常管理按当地养殖四大家鱼的传统养殖方法管理,定期补足流失的水体。

1.5 疫苗的应用

草鱼四联疫苗是由中国水产科学研究院珠江水产研究所研制的防治病毒性出血病的草鱼出血病冻干弱毒活疫苗与防治细菌性烂鳃病、肠炎病、赤皮病的细菌性三联灭活疫苗混合而成。鱼种放养前,集中在预先准备好的网箱,然后用

连续注射器进行腹腔注射,0.2 mL/尾,疫苗注射后随机放养于 7 ~ 12 号塘,每口鱼塘放养 8 000 尾,做好放养记录。

1.6 有益微生物的应用

有益微生物为广州普麟生物制品有限公司研制的“菌优碳源”,是含多种水产益生菌如酵母菌、芽孢杆菌、硝化细菌及短链碳源的有益微生物制剂,在 4-6、10-12 号池塘消毒后第 3 天使用一次,以后视天气情况约每隔 10 d 使用 1 次,使用前开增氧机。

1.7 水质因子监测

每隔 10 天用 YSI 水质分析仪测定池塘水体的氨氮、亚硝酸氮、pH、溶解氧等水质指标,用赛氏盘测定水体透明度。

1.8 血清抗体效价的测定

草鱼疫苗注射后的 D7、D15、D30、D60、D90 分别随机捞取 2 ~ 3 尾草鱼,尾静脉采血于灭菌离心管中,4 °C 过夜,2 000 r/min 离心 10 min,分离血清, - 20 °C 保存。采用间接 ELLISA 检测血清中的抗体效价,首先用 100 μg/mL 浓度的 S11 蛋白包被 ELLISA 板,再添加已经稀释 100 倍的鱼体血清孵育,最后加载鼠抗鱼单克隆抗体,测定 450 nm 波长的 OD 值,得出血清中的抗体效价水平。

1.9 草鱼存活率统计

实验结束后,排水取鱼,统计存活鱼数,计算各组的存活率、免疫保护率。

$$S_{RP} = (1 - R_I/R_C) \times 100\% \quad (1)$$

式中: S_{RP} 为免疫保护率(%); R_I 为免疫组死亡率(%); R_C 为对照组死亡率(%).

1.10 草鱼生长性能测定

草鱼放养后的 D0、D30、D60、D90 分别随机捞取 30 尾草鱼称重,重复 3 次,记录每组鱼的平均体重,计算 D90 时的净增重、增重率、特定生长率等生产性能指标。分别统计各组所投喂饵料的总数,计算饵料系数。

$$W_G = W_t - W_0 \quad (2)$$

$$R_{WG} = (W_t - W_0)/W_0 \times 100\% \quad (3)$$

$$R_{SG} = (\ln W_t - \ln W_0)/t \times 100\% \quad (4)$$

$$F = F_t/W_Z \quad (5)$$

式中: W_G 为净增重(g); R_{WG} 为增重率(%); R_{SG} 为特定生长率(%); F 为饵料系数; W_0 为初始平均体重(g); W_t 为终末平均体重(g); t 为饲养天数

(d); F_t 为总投饵量(kg); W_z 为总增重量(kg)。

2 结果

2.1 使用有益微生物对草鱼养殖水质的影响

从图1可知,养殖过程中泼洒有益微生物制剂“菌优碳源”有利于优化养殖水体环境。与空白对照组相比,有益微生物组水体中的氨氮、亚硝酸氮盐含量显著降低($P < 0.05$),在试验中、后期,氨氮浓度始终处于0.05~0.10 mg/L的较低

水平,亚硝酸氮盐浓度由试验起始时的相对高浓度迅速降低,维持小于0.02 mg/L的较低水平。通过使用“菌优碳源”,使水体pH维持在8.2~8.4之间,保持养殖水体的弱碱性状态;使水体透明度保持在30~35 cm之间,优于对照组的40~50 cm;提高水体溶解氧含量,并维持在5.0~6.9 mg/L,高于对照组的4.0~5.3 mg/L($P > 0.05$)。

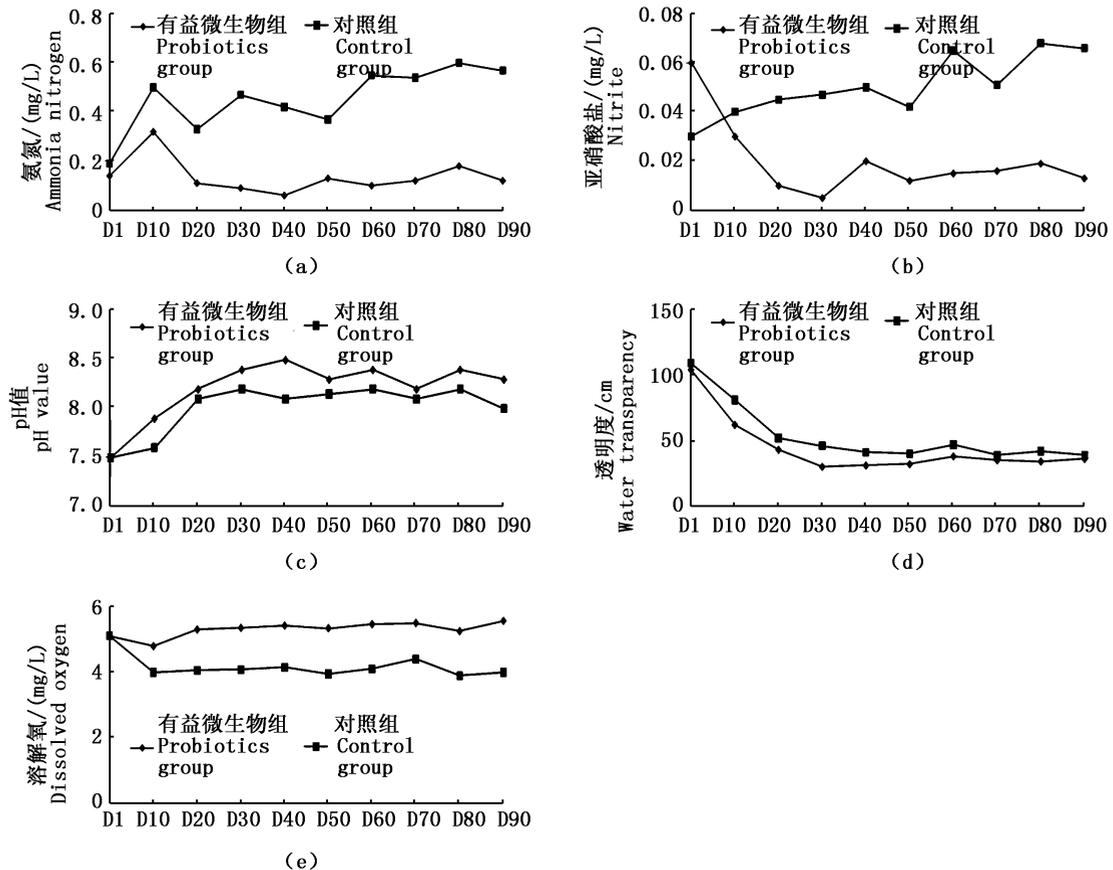


图1 有益微生物对养殖水体水质指标的影响

Fig. 1 The influence of beneficial microbes on water quality indicators

(a) 氨氮; (b) 亚硝酸氮盐; (c) pH; (d) 透明度; (e) 溶解氧

(a) Ammonia nitrogen; (b) Nitrite; (c) pH value; (d) Water transparency; (e) Dissolved oxygen

2.2 免疫血清中和效价测定

从图2可知,注射疫苗后的D7天,试验鱼已经产生抗体,增速较快,至D30时抗体效价达顶峰,随着时间延长,由D60、D90的检测结果可看出血清效价保持较为稳定、略微降低。从测定的结果分析,草鱼注射疫苗后的第7天,草鱼已经

产生抗体,但抗体水平相对较低,免疫保护率不高;D15后有较高的效价,显示免疫保护作用,D30后完全激发鱼体的免疫保护作用。在注射四联疫苗的同时,不间断使用“菌优碳源”,可提高血清抗体效价水平,促进疫苗的免疫作用。

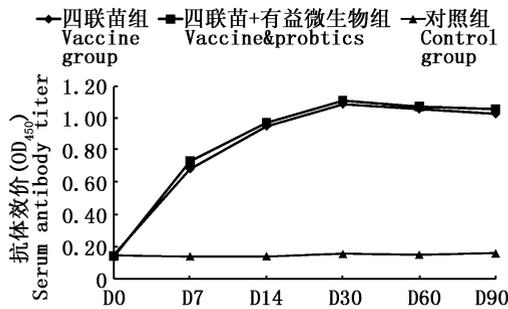


图2 草鱼免疫血清抗体效价检测结果

Fig.2 The testing results of serum immune antibody titer of grass carp

2.3 疫苗的免疫效果

7—9月期间,试验鱼塘都有不同程度的发病死亡现象,从死亡的病鱼剖检检查发现,有出现烂鳃、赤皮和出血病,对照组尤为严重,各组存活率见表1。结果显示,注射草鱼疫苗的鱼塘存活率高于对照塘,注射草鱼四联苗的试验组平均存活率比对照组高29.7%,差异极显著($P < 0.01$),四联苗组的平均免疫保护率为 $90.9\% \pm 1.6\%$ 。

2.4 益生菌对草鱼存活率的影响

养殖过程中使用有益微生物制剂“菌优碳源”,有利于促进草鱼的健康生长,对提高草鱼的存活率同样有效,由表1可见,有益微生物组存活率均值为 $75.2\% \pm 1.7\%$,高于空白对照组7.9%,差异显著($P < 0.05$)。

2.5 疫苗与有益微生物联用在草鱼存活率的影响

由表1数据可见,对试验草鱼接种疫苗,同时不间断使用“菌优碳源”,相比于空白对照组及单用有益微生物组的存活率极显著提高($P < 0.01$);相比于未使用有益微生物的免疫组,存活率提高2.0%,平均免疫保护率提高5.7%,差异均不显著($P > 0.05$)。

2.6 草鱼的生长性能

草鱼放养后的D0、D30、D60、D90分别随机捞取30尾草鱼称重,计算生长性能指标见表2, D90时四联苗组、有益微生物组、四联苗与有益微生物联用组的日增重、净增重、增重率、特定生长率均比对照组依次提高,四联苗与有益微生物联用的促生长作用最突出,特别是其特定生长率与空白对照组差异显著($P < 0.05$)。试验过程中,空白对照组、有益微生物组、四联苗组、四联苗与

有益微生物联用组的总投饵量分别是200、225、290、300 kg,计算得饵料系数依次是1.77、1.71、1.75、1.69,可见3个试验组的饵料利用率均高于空白对照组。

2.7 草鱼的养殖收益

各组在塘租、电费、人力成本、固定资产折旧等方面的费用,以及其他鱼类的收益等都基本一致,在本试验结果中不做统计,仅计算草鱼的养殖收益差异,如表3,其中,通威“156”小颗粒草鱼饲料单价记为7.5元/kg,投饵量如2.6所述;有益微生物20元/瓶,每试验塘每次用1瓶,共用10次;500尾份的“四联”疫苗记为50元/组,每试验塘用16组;实验结束收获的草鱼约32g/尾,以40元/kg的苗种价格计算产出。通过计算得出,3个试验塘草鱼的产值均极显著高于对照组($P < 0.01$),有益微生物组、四联苗组、四联苗与有益微生物联用组草鱼的收益分别为7730、8709、9110元/塘,每试验组分别比对照组高875、1854、2255元,直接经济收益显著($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 草鱼的抗体效价

抗体效价的高低是衡量血清中抗体水平的一项检测指标,能够反应鱼类特异性体液免疫水平^[12]。草鱼在受到外来抗原感染时能够产生较强的免疫应答反应,如杨先乐^[13]报道的草鱼出血病细胞培养疫苗对草鱼免疫后,可检测到抗体效价,且经二次免疫后,血清抗体效价比第一次免疫后的效价高;刘林等^[1]用核酸疫苗免疫草鱼后,鱼体血液抗体水平逐渐增加,28d达到最高,随后呈下降趋势,在免疫后第70天仍能检测到抗体。RENGPIPA^[14]的研究发现,益生菌细胞壁上存在的肽聚糖及其裂解产物作为良好的免疫激活剂,可刺激水产动物免疫器官发育和提高免疫细胞的活性,促进肠道免疫细胞产生抗体。本研究中,经草鱼四联疫苗免疫后,各组草鱼在实验的D7就检测到了抗体,D30时达到最大值,在随后的实验时间内维持该抗体水平,且注射四联疫苗的同时使用有益微生物的试验草鱼其抗体效价要稍高于仅注射疫苗组的草鱼,说明免疫鱼对四联疫苗产生了良好的免疫应答,所注射的疫苗对供试草鱼具有较强的免疫原性,且有较长的

免疫保护期,使用有益微生物可以促进草鱼机体免疫力的提高。

表 1 草鱼存活情况结果统计表
Tab.1 The survival statistics of grass carp

组别 Groups	放养数/尾 Grazing	死亡数/尾 Mortality	存活率/% Survival rate	免疫保护率/% Relative survival percent	均值/% Average	
					存活率 Survival rate	免疫保护率 Relative survival percent
对照组 Control group	8000	2328	70.9	-		
	8000	2576	67.8	-	67.3 ± 3.8 ^{aA}	-
	8000	2936	63.3	-		
有益微生物组 Probiotics group	8000	1848	76.9	-	75.2 ± 1.7 ^{bA}	-
	8000	1992	75.1	-		
	8000	2112	73.6	-		
四联苗组 Vaccine group	8000	168	97.9	92.7	97.0	90.9 ± 1.6
	8000	256	96.8	89.9	± 0.8 ^{cC}	
	8000	288	96.4	90.1		
四联苗 + 有益微生物组 Vaaine and probiotics group	8000	96	98.8	95.7	99.0	96.6 ± 0.8
	8000	56	99.3	96.7	± 0.3 ^{cC}	
	8000	80	99.0	97.3		

注: 同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。表 2-3 同

Note: Values with different small letter superscripts in the same precedence means significant difference ($P < 0.05$), while different capital superscripts means significant difference ($P < 0.01$). The same in fig. 2-3

表 2 草鱼的生长性能统计
Tab.2 The growth statistics of grass carp

组别 Groups	平均体质量/g Mean weight				日增重/g Average daily gain	净增重/g Net gain	增重率/% Weight gain rate	特定增长率/% Special growth rate	饵料系数 Food coefficient
	D0	D30	D60	D90					
对照组 Control group	10.03	12.45	18.27	31.01	0.23	21.00	2.09	1.13	1.77
	± 0.42	± 0.49	± 0.60	± 1.23	± 0.00	± 0.43	± 0.04	± 0.01 ^a	
有益微生物组 Probiotics group	10.08	12.68	18.57	31.90	0.24	21.90	2.17	1.15	1.71
	± 0.55	± 0.38	± 0.70	± 1.46	± 0.01	± 1.04	± 0.10	± 0.03 ^a	
四联苗组 Vaccine group	10.28	12.52	18.72	31.37	0.24	21.30	2.11	1.14	1.75
	± 0.48	± 0.38	± 0.63	± 1.38	± 0.01	± 0.83	± 0.08	± 0.02 ^a	
四联苗 + 有益微生物组 Vaaine and probiotics group	10.12	12.80	19.03	32.51	0.25	22.35	2.21	1.18	1.69
	± 0.33	± 0.47	± 0.82	± 1.80	± 0.01	± 0.84	± 0.08	± 0.03 ^b	

表 3 草鱼的养殖收益
Tab.3 The benefits of grass carp aquaculture

组别 Groups	鱼体总质量/kg Gross weight	饲料 Feed	成本/元 Cost			产值/元 Output	收益/元 Income
			有益微生物 Probiotics	疫苗 Vaccine	人工操作 Operation		
对照组 Control group	167.0	1500	0	0	0	8355 ^A	6855 ^{aA}
有益微生物组 Probiotics group	191.9	1687	200	0	可忽略	9617 ^B	7730 ^{bA}
四联苗组 Vaccine group	243.4	2175	0	800	500	12184 ^B	8709 ^{cC}
四联苗 + 有益微生物组 Vaccine and probiotics group	257.5	2250	200	800	500	12860 ^B	9110 ^{cC}

3.2 草鱼四联疫苗的免疫效果

联合疫苗是将两种或两种以上的疫苗以混合或同次使用等方式进行免疫接种,以预防多种或不同血清型的同种传染病的一种手段,该疫苗的各抗原成分不会相互竞争,因此它能对一种以上的疾病起到免疫保护作用^[15]。多个研究结果显示,注射草鱼四联疫苗对草鱼赤皮、烂鳃、肠炎及出血病等草鱼“四病”有很好的预防作用,经济效益显著增加^[16-19]。本试验中注射草鱼四联苗的试验组草鱼在试验期间发病少,摄食活跃,体态健康,存活率比对照组极显著提高($P < 0.01$),平均免疫保护率达 $90.9\% \pm 1.6\%$,取得了很好的免疫效果,说明接种草鱼四联疫苗能有效地增强草鱼对“四病”的抵御能力,注射四联苗是防治草鱼“四病”的有效措施之一。

3.3 有益微生物对池塘水质因子的影响

水质调节是养殖过程的重要环节,对池塘使用有益微生物制剂,通过微生物的氧化、氨化、硝化、反硝化、硫化、解磷和固氮等作用,快速降解水产养殖环境中的有机污染物,能形成优势种群有效抑制有害微生物和有害藻类的生长繁殖,在水产养殖生产中使用可达到优化养殖环境、增强养殖生物抗病能力、促进快速生长等综合效果。通常由枯草芽孢杆菌、光合细菌、硝化细菌、酵母菌和乳酸菌等多种有益微生物所组成的复合型微生物制剂,比使用单一光合细菌或硝化细菌的净化作用更迅速、时间更持久^[20-21]。本试验中,定期泼洒的“菌优碳源”有益微生物制剂,是一种由芽孢杆菌、酵母菌、硝化细菌及短链有机碳源组成的复合微生物制剂,通过多种有益微生物的快速增长,对氨氮、亚硝酸盐、有机酸的快速消耗,同时吸收水体无机氮的浮游藻类快速增多,通过光合作用释放氧气,得以平衡水体 pH、增加水体溶氧,最终实现水环境物质能量的良性循环,使得各项水质指标在 D20 后保持稳定、健康状态,优化了养殖环境,促使鱼体健康生长。

3.4 有益微生物对草鱼的影响

有益微生物也是一种良好的免疫激活剂,提高机体免疫力的形式多样,可提升溶菌酶活性及白细胞活力,还能促进机体免疫器官的生长、发育和成熟,从根本上增强机体免疫能力^[22-23],也可通过促进免疫细胞活性、增强体液和激素的水平来达到抗病防病的作用^[24],HNANSEN^[25]的研

究则表明,细菌通过鱼体口腔进入,在消化道内定植,而后部分益生菌分泌细菌素抑制或杀死周围其他异种有害菌群,通过对体内固定位点的竞争,使益生菌自身在体内占到优势,降低病害菌的数量和密度,起到防病害的作用^[26]。本研究中,有益微生物试验组草鱼的“四病”发生减少,存活率比空白对照组提高 7.9% ($P < 0.05$),结合四联疫苗使用时更能维护鱼体健康,比单注射疫苗存活率还提高 2.0%,显然有益微生物一定程度上增强了草鱼的机体免疫力和抗病害能力。

3.5 草鱼四联疫苗与使用有益微生物的协同效益

草鱼四联疫苗与有益微生物以其安全、高效、无副作用等特点,在草鱼病害防控及机体免疫力提高方面展示了较好的协同效益,养殖效果最佳。在养殖过程中,注射四联疫苗使草鱼获得强的免疫保护力,增强抗病害能力,再使用有益微生物制剂,一方面促进鱼体免疫力的提高,另一方面改良水质、优化养殖环境,减少鱼体的环境应激反应,在二者的共同作用下,草鱼的存活率提高,鱼体生长速度增加,带来可观的直接经济效益,有益微生物组、四联苗组、四联苗与有益微生物联用组草鱼的收益分别比对照组高 875、1 854、2 255 元,差异显著($P < 0.05$)。此外,在草鱼高密度精细养殖过程中使用疫苗及有益微生物产品可减少用药,提高水产品安全保障,并减排养殖废水、降低养殖业对环境的污染,保护环境,建立环境友好型的养殖技术,具有良好的社会收益,极具推广应用价值。

参考文献:

- [1] 刘林,徐诗英,李婧慧,等. 草鱼出血病病毒 vp6 核酸疫苗的免疫效果评估[J]. 中国水产科学, 2012, 19(5): 841-847.
LIU L, XU S Y, LI J H, et al. Evaluation of immune efficacy of GCRV vp6 DNA vaccine[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(5): 841-847.
- [2] 郑国风,史水利,陈励生. 草鱼“三病”多联灭活疫苗防病试验报告[J]. 水利渔业, 1983(2): 15-16, 28.
ZHENG G F, SHI S L, CHEN L S. Laboratory report of disease resistant by inoculating polyvalent inactivity vaccine on “three-disease” in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) culture[J]. Reservoir Fisheries, 1983(2): 15-16, 28.
- [3] 刘德福,孙世友,彭福峰,等. 草鱼病毒性出血病灭活疫苗的简易制备与应用[J]. 淡水渔业, 2002, 32(3): 33-34.
LIU D F, SUN S Y, PENG F F, et al. Preparation and use

- of inactive vaccine for viral hemorrhage of Grass carp [J]. *Freshwater Fisheries*, 2002, 32(3): 33-34.
- [4] 吕永辉, 王玉堂. 渔药中的中草药[J]. *中国水产*, 2006(9): 91-94.
LÜ Y H, WANG Y T. Chinese herbal medicine in fisheries drugs [J]. *China Fisheries*, 2006(9): 91-94.
- [5] 吕欣荣, 肖克宇. 中草药在水产养殖病害防治中的应用现状[J]. *内陆水产*, 2007(9): 29-31.
LÜ X R, XIAO K Y. Application of Chinese herbal medicine in aquaculture disease control [J]. *Inland Fisheries*, 2006(9): 29-31.
- [6] SOMMERSED I, KROSSØY B, BIERING E, et al. Vaccines for fish in aquaculture [J]. *Expert Review of Vaccines*, 2005, 4(1): 89-101.
- [7] 吴淑勤, 陶家发, 巩华, 等. 渔用疫苗发展现状及趋势[J]. *中国渔业质量与标准*, 2014, 4(1): 1-13.
WU S Q, TAO J F, GONG H, et al. Situation and tendency of the fishery vaccine development [J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2014, 4(1): 1-13.
- [8] 巩华. 水产疫苗添新军——嗜水气单胞菌败血症灭活疫苗获生产批文[J]. *海洋与渔业*, 2012(3): 49.
GONG H. A new member of aquatic vaccine-production approval of inactivated vaccine of aeromonas hydrophila septicemia was assigned [J]. *Oceanic and Fisheries*, 2012(3): 49.
- [9] 王忠良, 王蓓, 鲁义善, 等. 水产疫苗研究开发现状与趋势分析[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(6): 55-59.
WANG Z L, WANG B, LU Y S, et al. Development status and trend analysis in aquaculture vaccines [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(6): 55-59.
- [10] 杜震宇, 刘永坚, 何建国, 等. 水产动物益生菌研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2002, 14(1): 56-60.
DU Z Y, LIU Y J, HE J G, et al. The research on probiotics of aquatic animals [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2002, 14(1): 56-60.
- [11] AMEND D F. Potency testing of fish vaccines [C]// *International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines*. Leetown: Developments in Biological Standardization, 1981, 49: 447-454.
- [12] 张永安, 聂品. 鱼类体液免疫因子研究进展[J]. *水产学报*, 2000, 24(4): 376-381.
ZHANG Y A, NIE P. Humoral immune factors of fish: a review [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(4): 376-381.
- [13] 杨先乐, 左文功. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究: 疫苗的稳定性及佐剂和加强免疫对草鱼免疫应答的影响[J]. *水生生物学报*, 1993, 17(1): 46-52.
YANG X L, ZUO W G. Inactivated vaccine obtained through cell culture for hemorrhage of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): the stability of vaccine and influence of adjuvants and booster immunization on the immune response [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1993, 17(1): 46-52.
- [14] RENGPIPAT S, RUKPRATANPORN S, PIYATIRATITIVORAKUL S, et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus S11*) [J]. *Aquaculture*, 2000, 191(4): 271-288.
- [15] 杨先乐, 陈远新. 鱼用疫苗的现状及其发展趋势[J]. *水产学报*, 1996, 20(2): 159-167.
YANG X L, CHEN Y X. The existing situation and tendency in development of fish vaccine [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1996, 20(2): 159-167.
- [16] 林明辉, 刘春花, 陈道印, 等. 草鱼出血病冻干细胞疫苗与三联灭活疫苗在草鱼精养中的应用研究[J]. *江西农业学报*, 2010, 22(10): 126-127.
LIN M H, LIU C H, CHEN D Y, et al. Application study of hemorrhage freeze-dried cell vaccine and triple- inactivated vaccine in intensive rearing of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2010, 22(10): 126-127.
- [17] 刘春花, 林明辉, 陈道印. 草鱼出血病冻干细胞疫苗与三联灭活疫苗在草鱼养殖中的应用[J]. *江西水产科技*, 2010(3): 40-41.
LIU C H, LIN M H, CHEN D Y. Application of hemorrhage freeze-dried cell vaccine and triple- inactivated vaccine in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) culture [J]. *Jiangxi Fishery Science and Technology*, 2010(3): 40-41.
- [18] 李赫, 张继飞, 宋文华, 等. 草鱼“四联”疫苗在草鱼池塘养殖生产中的应用[J]. *河北渔业*, 2012(9): 29-30.
LI H, ZHANG J F, SONG W H, et al. Application study of quadrivalent vaccine in culture of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in pond [J]. *Hebei Fisheries*, 2012(9): 29-30.
- [19] 苏东琼. 草鱼四联疫苗在网箱养殖中的试验[J]. *北京农业*, 2011(15): 112.
SU D Q. The test of grass carp cage culture in the quadruple vaccine [J]. *Beijing Agriculture*, 2011(15): 112.
- [20] 陈仕江, 金仕勇, 李黎. 光合细菌净化日本医蛭养殖水体的研究[J]. *中药材*, 2001, 24(5): 323-324.
CHEN S J, JIN S Y, LI L. Water purification of breeding *Hirudo nipponica* with photosynthesis bacteria (PBS) [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2001, 24(5): 323-324.
- [21] 李清禄, 陈强, 林新华. 联合使用3种制剂净化特种水产养殖水体[J]. *中国水产科学*, 2001, 8(4): 83-86.
LI Q L, CHEN Q, LIN X H. Using three compound substances to purify aquaculture water [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(4): 83-86.
- [22] BALCÁZAR J L, VENDRELL D, DE BLAS I, et al. Immune modulation by probiotic strains: quantification of phagocytosis of *Aeromonas salmonicida* by leukocytes isolated from gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using a radiolabelling assay [J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2006, 29(5/6): 335-343.

- [23] 刘克琳,何明清. 益生菌对鲤鱼免疫功能影响的研究[J]. 饲料工业, 2000, 21(6): 24-25.
- LIU K L, HE M Q. The effect of the probiotic on growth and immunity for carps[J]. Feed Industry, 2000, 21(6): 24-25.
- [24] RENGPIPAT S, PHIANPHAK W, PIYATIRATTIVORAKUL S, et al. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth [J]. Aquaculture, 1998, 167(3/4): 301-313.
- [25] HANSEN G H, OLAFSEN J A. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish[J]. Microbial Ecology, 1999, 38(1): 1-26.
- [26] RINGØ E, GATESOUBE F J. Lactic acid bacteria in fish, a review[J]. Aquaculture, 1998, 160(3/4): 177-203.

The application of combination use of inoculating quadrivalent vaccine and beneficial microorganisms in culture of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

LIU Chunhua, ZHAO Changchen, JIANG Xiaoyan, CHEN Zonghui, TAO Jiafa, HUANG Zhibin
(Pearl River Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, Guangdong, China)

Abstract: To improve the disease-resistant ability and maintain good aquatic environment, experiments were carried out in 12 ponds in Beiyang Aquafarm located in Dongsheng Town of Zhongshan City by combination use of inoculating quadrivalent vaccine and beneficial microorganisms in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) aquaculture. The results indicated that when grass carp was inoculated, antibody titer was detected 7 days later, with maximum value in 30 days, and even sustained until the experiments ended. The average survival rate of grass carp in quadrivalent vaccine immunized group was 29.7%, significantly higher than control group ($P < 0.01$), and the relative percent survival was 90.9%. Use of beneficial microbes was useful to improve water quality, optimize the aquaculture conditions, and raise the average survival rate (7.9%, $P < 0.01$). The average survival rate of grass carp in combination use of inoculating quadrivalent vaccine and beneficial microorganisms group was 31.7% ($P < 0.01$) higher than control group, and the relative percent survival was 96.6%. All the average daily gain, net gain, weight gain rate and specific growth rate were increased, and the food coefficient was declined in 3 treatment groups. The profits of the 3 treatment groups were 875,1854,2 255 yuan higher than control group respectively ($P < 0.05$). The results showed that the disease-resistant ability, the average survival rate and the growth rate of grass carp were raised, and the aquatic environment was improved by using quadrivalent vaccine and beneficial microorganisms together, showing a great synergistic effect and opening up a new way of cooperative application.

Key words: grass carp; beneficial microorganism; quadrivalent vaccine; vaccination