

温度胁迫下罗非鱼(*GIFT Oreochromis niloticus*)机体免疫力的变化及其对海豚链球菌易感性的影响

陈家长^{1,2}, 臧学磊², 瞿建宏¹, 胡庚东¹, 孟顺龙¹, 宋超¹

(1.中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 中国水产科学研究院内陆渔业生态环境和资源重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;
2.南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘要:为了揭示温度这一重要环境因子与罗非鱼免疫力及对海豚链球菌的易感性之间的关系,分别进行了不同温度下罗非鱼感染海豚链球菌的死亡率试验和不同温度对罗非鱼非特异免疫相关酶(超氧化物歧化酶,SOD;溶菌酶;碱性磷酸酶,AKP以及补体C₃)活性影响的试验。试验结果表明,罗非鱼感染海豚链球菌的死亡率与水温的变化呈现明显的正相关;特别是在高温条件下,罗非鱼免疫力受到了明显的抑制,具体表现为SOD活性呈现先诱导后抑制的趋势,AKP活性在12 h较28℃时显著上升($P<0.05$),血清溶菌酶活性则受到抑制作用,而补体C₃活性在12 h和24 h与对照组相比显著升高了10.99%和13.40%($P<0.05$)。试验结果显示高温能够引起罗非鱼免疫力低下,使鱼体对病原菌易感性增强,致使罗非鱼因感染海豚链球菌造成的死亡率显著升高,为研究罗非鱼海豚链球菌病爆发的环境机制提供了相关资料。

关键词:罗非鱼;海豚链球菌;温度;免疫力;易感性

中图分类号:Q945.78 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)09-1896-06

The Immune Response of Tilapia (*GIFT Oreochromis niloticus*) and Its Susceptibility to *Streptococcus Iniae* Under Temperatures Stress

CHEN Jia-zhang^{1,2}, ZANG Xue-lei², QU Jian-hong¹, HU Geng-dong¹, MENG Shun-long¹, SONG Chao¹

(1.Key Open Laboratory of Ecological Environment and Resources of Inland Fisheries, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2.Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China)

Abstract: The experiment, including the susceptible test of tilapia exposed to *Streptococcus iniae* and the test on effect of nonspecific immunity related enzymes (superoxide dismutase, SOD; lysozyme; alkaline phosphatase, AKP and supplement C₃) to tilapia under different temperature was carried out to reveal the relationship between temperature and its stress effect on the susceptible to tilapia and the immunity to fish exposed to *Streptococcus iniae*. The results showed that, the mortality of fish exposed to *Streptococcus iniae* depended on the water temperature strictly, especially in high temperature treatments, the immunity of tilapia was inhibited obviously, the activity of SOD was first induced, and then inhibited. Compared to the 28℃ treatment, the activity of AKP increased in 12 h significantly ($P<0.05$), the activity of serum lysozyme was inhibited, and the activity of supplement C₃ increased by 10.99% and 13.40% respectively, in 12 h and 24 h, compared to the 28℃ treatment ($P<0.05$). The results revealed that high temperature could cause the inhibition of immunity of tilapia, and then enhance the susceptibility of pathogenic bacteria, and make the mortality increase when fish was exposed to *Streptococcus iniae*. The experiment provided the more scientific details to the study on the environmental mechanism of the disease of *Streptococcus iniae* of tilapia.

Keywords: tilapia; *Streptococcus iniae*; temperature; immunity; susceptible

由于具有生长快、食性杂、抗病力强、无肌间刺等优点,罗非鱼已被联合国粮农组织向全世界推广养殖,我国南方各省罗非鱼的养殖产量已占到世界总产

量的50%以上^[1]。然而近年来,链球菌病的爆发给罗非鱼产业造成了重大的损失。对罗非鱼爆发链球菌病的情况调查显示,海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)是目前危害罗非鱼的重要病原菌。该病的发生除了与病原菌本身的致病力有关,一些环境因子也起到了重要的作用,如水温较高和养殖密度偏高引起的池水溶氧低等,特别是养殖的环境温度与该病的发生率呈现明

收稿日期:2011-02-25

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-49)

作者简介:陈家长(1964—),男,硕士,研究员,主要从事环境方面的研究工作。E-mail:chenjz@ffrc.cn

显的相关性,发病时水温一般在 26℃以上,发病高峰在 5—10 月,水温在 31℃以上^[2]。

温度变化引起鱼类免疫力低下,致使鱼体对病原菌的易感性增强的研究已多有报道^[3]。Cheng 研究发现斜带石斑鱼在 35℃时对溶藻弧菌的抵抗力显著低于在 27℃(最适养殖温度)时的抵抗力,感染溶藻弧菌的斜带石斑鱼在 35℃的死亡率显著高于 27℃的死亡率,由此可以推断,斜带石斑鱼在 35℃时的免疫力相对于 27℃的免疫力被明显抑制^[4]。罗非鱼链球菌病的爆发可能正是因为季节性高温引起鱼类免疫力低下,造成鱼体对海豚链球菌易感性的增强。

由于鱼类处于生物进化的低级阶段,其免疫功能并不像高等脊椎动物那样由特异性免疫作用占主导地位,非特异性免疫系统在鱼体抵抗病原生物入侵时发挥着更为重要的作用^[5]。与非特异性免疫相关的各种酶如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、溶菌酶(lysozyme)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)以及鱼类的补体 C₃在各级非特异免疫作用的应答过程中发挥着不同的作用^[6-11]。

本文从环境因素的角度出发,研究了温度的变化对罗非鱼非特异免疫作用相关酶活性的影响,试图揭示温度这一重要环境因子与罗非鱼免疫力及对海豚链球菌的易感性之间的关系,为研究罗非鱼海豚链球菌病爆发的环境机制提供相关资料。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

试验用鱼为吉富品系罗非鱼(GIFT *Oreochromis niloticus*),取自中国水产科学院淡水渔业研究中心宜兴养殖基地,体重为(95.1±4.6)g(*n*=20)。罗非鱼在实验室暂养池内暂养 7 d,池水温度用加热棒调至 28℃,为罗非鱼最适生长温度,试验期间温度变动幅度为±0.5℃。

1.2 试验用水

实验用水为曝气 3 d 以上的自来水。溶解氧为

6.0~6.5 mg·L⁻¹, pH 为 6.5~7.0,氨氮浓度低于 0.1 mg·L⁻¹,其他条件均符合渔业水质标准。

1.3 试验用菌

海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)由广西水产研究所赠送。菌株接种于液体牛脑浸心培养基(100 mL,培养基各组分配置见表 1),在 28℃下培养 24 h,使菌体含量达到 6×10⁸ cfu·mL⁻¹。

表 1 液体牛脑浸心培养基的配置方法
Table 1 The collocation method of liquid cow brain leaching heart medium

组分	比例
牛脑浸粉	0.5%
牛心浸粉	1%
胰蛋白胨	1%
葡萄糖	0.2%
NaCl	0.5%
pH	6.8~7.2

1.4 试验设计

试验由两部分组成,分别为不同温度下罗非鱼感染海豚链球菌的死亡率试验(试验 1)和不同温度对罗非鱼非特异免疫相关酶活性影响的试验(试验 2)。试验时将暂养池的鱼移至容量为 80 L 的水族箱中进行。每个试验均设置 1 个重复,参见表 2。

1.5 试验 2 的样品采集与测定方法

在不同温度应激的 0(暂养时的背景值)、3、24、48 h 和 96 h 时,每次采样时在各温度组取出 3 条鱼,连同重复每组共计 6 条鱼。用一次性注射器(规格为 5 mL)从鱼体尾静脉取血 1 mL 左右,取出的血置于 1.5 mL Eppendorf 离心管内,室温静置 1 h,置于 4℃冰箱内过夜,然后 4 000 r·min⁻¹离心 20 min,取血清进行 SOD、AKP、溶菌酶和补体 C₃指标的测定。SOD、AKP、溶菌酶活性采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒测定,测定方法为比色法。SOD 单位为 U·mL⁻¹, AKP 单位为金氏单位·mL⁻¹,溶菌酶的单位为 U·mL⁻¹。补体 C₃的活性采用美国 R&D 公司提供的酶联免疫试剂盒检测,其单位为 μg·mL⁻¹。

表 2 罗非鱼感染海豚链球菌引起的死亡率试验与温度变化对罗非鱼非特异性免疫相关酶活性的应激试验
Table 2 The immune response of GIFT *Oreochromis niloticus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under temperatures stress

温度组设置	正常温度组(25℃)	最适温度组(用作对照组)(28℃)	高温组 1(31℃)	高温组 2(34℃)
(试验 1)不同温度下罗非鱼感染海豚链球菌的死亡率	对照组 15 尾·组 ⁻¹ ,各条鱼均腹腔注射 0.1 mL 液体牛脑浸心培养基;每日观察罗非鱼的死亡情况,直至死亡率稳定。	处理组 15 尾·组 ⁻¹ ,各条鱼均腹腔注射 0.1 mL 海豚链球菌悬液;每日观察罗非鱼的死亡情况,直至死亡率稳定。		
(试验 2)不同温度对罗非鱼非特异免疫相关酶活性影响	15 尾·组 ⁻¹ ,在 3、12、24、48 h 和 96 h 时取样,用于分析不同温度的应激下罗非鱼非特异性免疫相关酶活性的急性变化情况。			

1.6 数据分析

采用 JMP 软件(SAS 公司旗下商用软件)进行统计差异性和显著性检验,显著性水平取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 温度对罗非鱼感染海豚链球菌死亡率的影响

对照组罗非鱼没有出现死亡现象,而在处理组中,罗非鱼感染海豚链球菌的死亡率与水温的变化呈现明显的正相关。从图 1 可见,在第 14 d,罗非鱼的死亡率达到稳定,25、28、31 °C 和 34 °C 处理组罗非鱼的累积死亡率分别为 30.00%、33.33%、46.67% 和 56.67%,高温组(31 °C 和 34 °C)死亡率明显高于正常温度组(25 °C)和最适温度组(28 °C)。实验中死亡的罗非鱼均出现感染海豚链球菌的临床症状:眼球突出,体色发黑,腹鳍基部出血,胆囊肿大,肠道糜烂等。

2.2 不同温度的应激下罗非鱼非特异性免疫相关酶活性的急性变化情况

2.2.1 温度对罗非鱼血清 SOD 活性的影响

从图 2 可以看出,34 °C 实验组罗非鱼血清 SOD 活性表现出先升高后降低的趋势,而 25 °C 和 31 °C 实验组 SOD 活性在 3~96 h 呈先诱导后恢复的趋势,且在 24 h 达到稳定。统计分析表明:各采样时间下,25 °C 的罗非鱼血清 SOD 活性与对照组相比差异性均不显著($P>0.05$);31 °C 条件下,罗非鱼血清 SOD 活性在 12 h 较对照组升高了 7.4%,与对照相比均差异显著($P<0.05$);34 °C 条件下,罗非鱼血清 SOD 活性在 3 h 和 24 h 分别较对照组显著升高 15.26% 和 11.25% ($P<0.05$),而在 48 h 和 96 h 较对照组显著下降了 14.46% 和 12.89% ($P<0.05$)。

2.2.2 温度对罗非鱼血清 AKP 活性的影响

从图 3 可以看出,25 °C 和 31 °C 实验组 AKP 活性在 3~96 h 呈先诱导后恢复的趋势,而 34 °C 实验组

AKP 活性则呈先升高后抑制的趋势,各实验组 AKP 活性在 24 h 处达到稳定。统计分析表明:25 °C 实验组的罗非鱼血清 AKP 活性在 3 h 较对照组显著降低了 12.54% ($P<0.05$);31 °C 实验组罗非鱼血清 AKP 活性在 12 h 比对照组显著升高了 21.38% ($P<0.05$);34 °C 实验组罗非鱼血清溶菌酶活性在 12 h 比对照组显著提高了 22.59%,在 48 h 和 96 h 较对照组显著下降了 10.25% 和 23.06% ($P<0.05$)。

2.2.3 温度对罗非鱼血清溶菌酶活性的影响

从图 4 可以看出,25 °C 条件下,罗非鱼血清溶菌酶活性呈现先降低后恢复的趋势,而 34 °C 条件下,溶菌酶活性在各个采样时间一直受到抑制。统计分析表明:25 °C 实验组罗非鱼的血清溶菌酶活性在 12 h 与对照组相比显著下降了 17.76% ($P<0.05$);31 °C 实验组罗非鱼血清溶菌酶活性在 3 h 较对照组显著下降了 15.94% ($P<0.05$);与对照组相比,34 °C 实验组的罗非鱼血清溶菌酶活性在 3、12、24、48 h 和 96 h 分别下降了 13.45%、17.53%、17.18%、17.18% 和 19.67% ($P<0.05$),溶菌酶活性在 24 h 时达到最低值。

2.2.4 温度对罗非鱼血清补体 C₃ 活性的影响

从图 5 可以看出,各实验组罗非鱼血清补体 C₃ 活性随应激时间延长均呈明显的先诱导后恢复的趋势。统计分析表明:25 °C 实验组在 3 h 时,罗非鱼血清补体 C₃ 活性较对照组显著下降了 22.22% ($P<0.05$);31 °C 实验组罗非鱼血清补体 C₃ 活性在 12 h 较对照组显著升高了 11.85% ($P<0.05$);与对照组相比,34 °C 实验组的罗非鱼血清补体 C₃ 活性在 12 h 和 24 h 显著升高了 10.99% 和 13.40% ($P<0.05$)。

3 讨论

SOD 是一种重要的抗氧化酶,对清除机体活性氧自由基、增强吞噬细胞的吞噬能力及整个机体的免疫

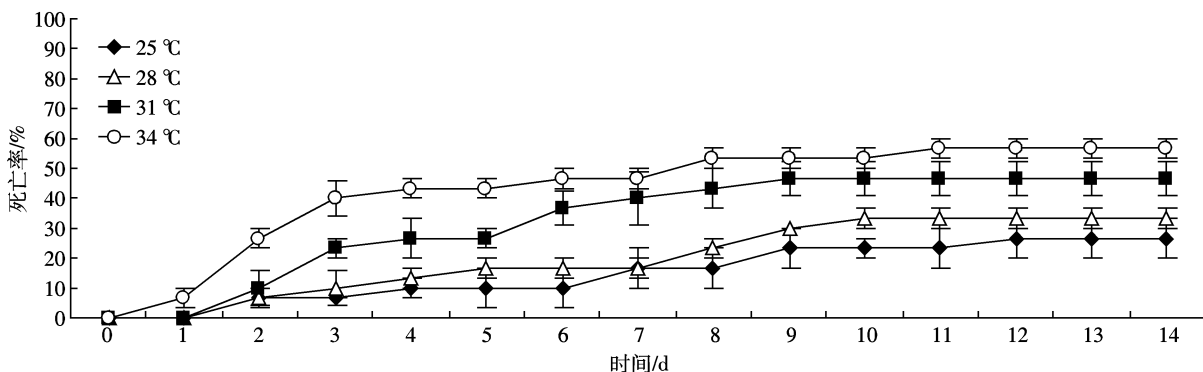
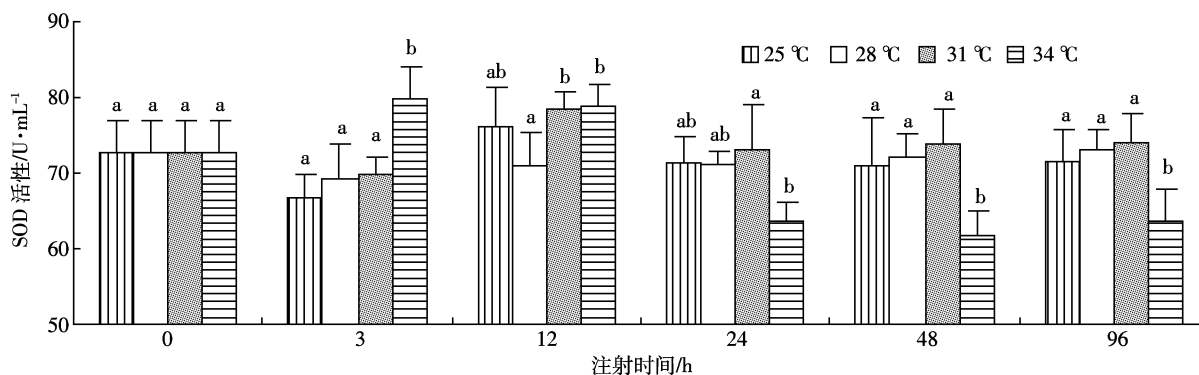


图 1 不同水温下海豚链球菌对罗非鱼死亡率的影响

Figure 1 Time-dependent alteration of cumulative mortality when tiapia held at different temperatures

功能起着重要作用^[12-13]。本实验结果表明,34℃时罗非鱼血清 SOD 活性呈先诱导后抑制的趋势,而 25℃和 31℃实验组罗非鱼血清 SOD 活性则呈先诱导后恢复的趋势。李大鹏等报道,随着水温的升高,中华鲟血清活性氧(ROS)含量显著升高,SOD 活性与血清 ROS 含量间存在正相关关系,高温组(26℃和 31℃)的 SOD 活力显著高于其他温度组^[14],本实验也得到

了类似的结果。本研究中的 34℃实验组罗非鱼在温度胁迫下发生应激,产生的活性氧增多,机体通过提高 SOD 活性来清除过多的活性氧,但随着应激的延长 SOD 活性逐渐下降,清除氧自由基能力减弱,并在 48 h 时 SOD 活性达到最低,说明温度应激对 SOD 有一定的诱导,但持续性的高温胁迫,可能对组织产生一定的氧化损伤,SOD 活性降低;而 31℃实验组在 3~



图中同一时间不同浓度组间,相同字母则表示这两组间差异不显著($P>0.05$),不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

图2 不同水温下 SOD 活性随时间的变化

Figure 2 Time-dependent alteration of SOD when tilapia held at different temperatures

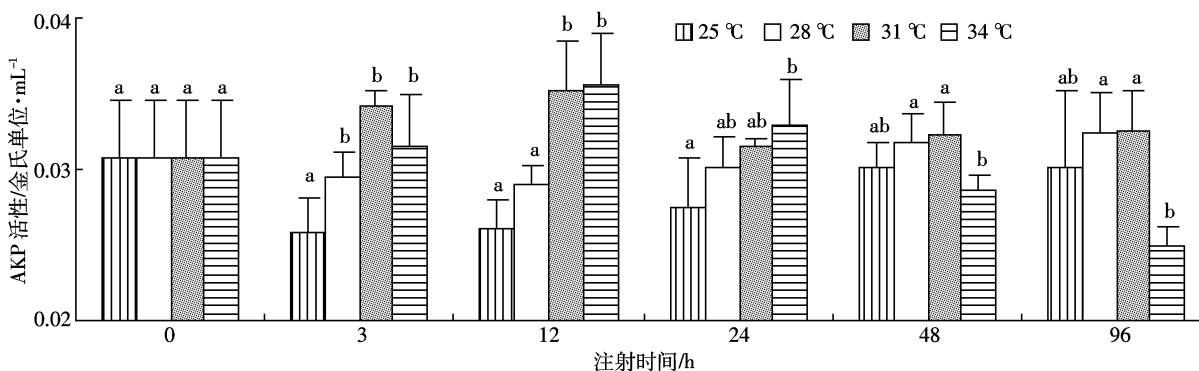


图3 不同水温下 AKP 活性随时间的变化

Figure 3 Time-dependent alteration of AKP when tilapia held at different temperatures

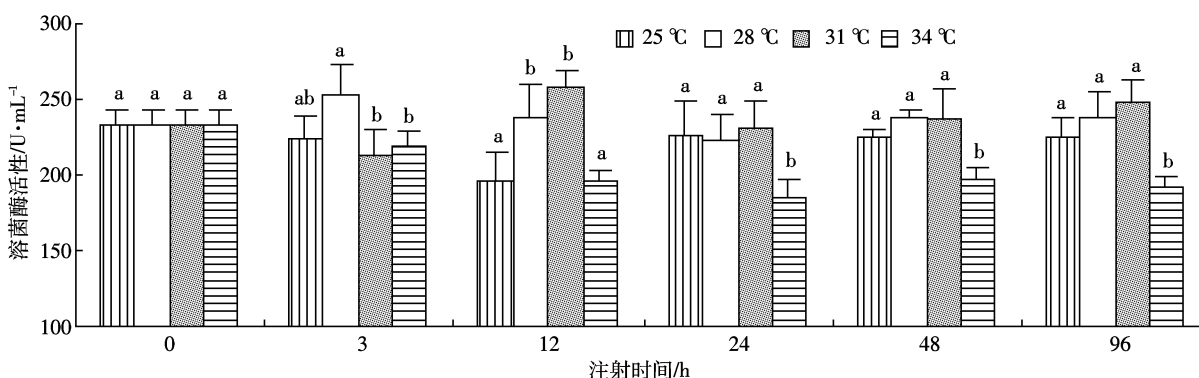
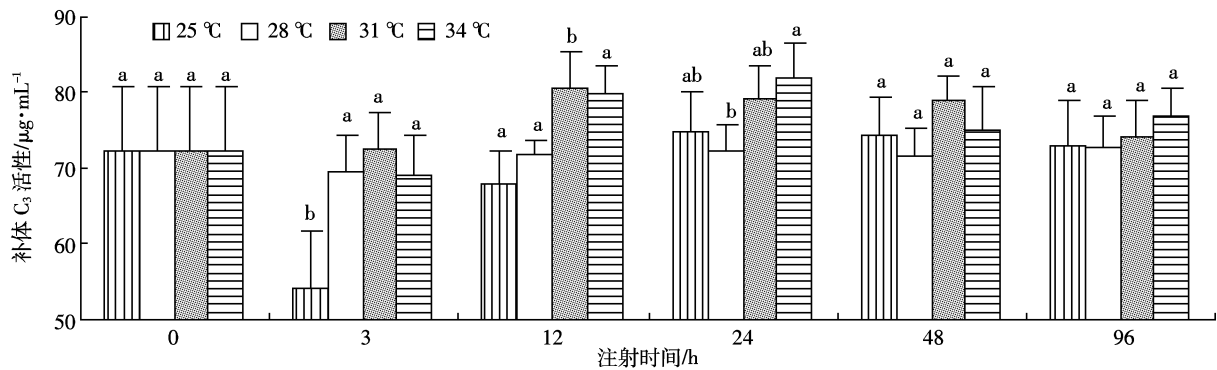


图4 不同水温下溶菌酶活性随时间的变化

Figure 4 Time-dependent alteration of LSZ when tilapia held at different temperatures

图 5 不同水温下补体 C₃ 活性随时间的变化Figure 5 Time-dependent alteration of complement C₃ when tilapia held at different temperatures

24 h 时, SOD 活性得到一定的诱导, 随着时间的延长, 机体适应了响应的温度条件, SOD 活性趋于稳定。

AKP 是生物体内巨噬细胞溶酶体的标志酶, 能够杀死入侵的病原菌, 其噬菌能力与血细胞数量及质量有很大关系, 同时 AKP 在体内直接参与磷酸基团的转移与代谢过程, 与 DNA、蛋白质及脂类的代谢和钙质的吸收、骨骼的形成有很大的关系, 是水产动物赖以生存、生长的重要调控酶之一。本研究发现, 25 °C 水温的应激会对 AKP 活性有一定的抑制作用, 但在 24 h 后趋于稳定; 31 °C 和 34 °C 的温度应激能够对 AKP 活性产生一定的诱导作用, 31 °C 实验组在 24 h 时恢复, 而 34 °C 实验组 AKP 活性则呈降低的趋势。这与支兵杰等研究发现的随着水温的增加, 怀头鲂血清中的 AKP 活性先升高再降低相类似^[15]。可能在温度升高的情况下, 罗非鱼代谢加快, ADP 磷酸化形成 ATP 提供所需的无机磷增多, 对 P 的利用率增加及磷酸基团的转移增多, 对 AKP 诱导并使其活性升高, 随着诱导时间的延长, 31 °C 实验组机体适应了相应水温, AKP 活性恢复到初始水平, 而持续的高温抑制了这种酶的合成和分泌, 也可能是高温直接作用于这种酶的活性中心而使其活性降低。25 °C 罗非鱼血清 AKP 活性在 12 h 时下降, 可能是因为低温应激, 罗非鱼代谢降低, 对磷的需求降低, 从而抑制了 AKP 活性, 但随着时间的延长, 机体适应了这种低温, AKP 活性得以恢复。

溶菌酶是一种水解酶, 能够水解细菌细胞壁, 导致细菌溶解死亡, 且具有抗感染、促进细胞吞噬活性等作用。鱼类溶菌酶活性的高低是衡量机体免疫状态的重要指标之一, Fevolden 认为溶菌酶活性可作为鱼类应激的信号, 其水平升高所持续的时间依胁迫的方法和强度而定^[16]。本研究发现, 25 °C 和 31 °C 实验组罗

非鱼血清溶菌酶活性呈先诱导后恢复的趋势, 而 34 °C 实验组在 3~96 h 的血清溶菌酶活性一直受到抑制, 并在 24 h 时达到最低值。Cheng 等研究发现, 将暂养在 27 °C 的点带石斑鱼转移到 35 °C 的海水中, 其溶菌酶的活性在 6、12、24、48 h 和 96 h 均下降, 这与本研究结果相一致^[4]。本研究表明在 25 °C 和 31 °C 的水温应激下, 短时间可能对罗非鱼血清溶菌酶活性产生影响, 但随着时间的延长, 罗非鱼依靠自身生理平衡调节机制, 血清溶菌酶活性能够逐渐恢复到正常水平。当罗非鱼转移到 34 °C 的水温下时, 由于高温应激, 其血清溶菌酶活性受到抑制, 免疫活性下降, 这种结果可能说明在高温应激的情况下, 机体免疫能力降低, 对致病菌的抵抗力降低。

补体系统是免疫系统中非常重要的组成部分, 包括 35 个单独的蛋白质, 可以通过经典和旁途径激活。在硬骨鱼类当中, 补体系统不仅起到免疫应答作用, 并且参与趋化作用, 调理作用及清除病原菌, 而 C₃ 是补体中最重要的部分。25、31 °C 和 34 °C 实验组补体 C₃ 活性均呈先诱导后恢复的趋势, 并且 34 °C 实验组补体 C₃ 在 24 h 时活性达到最高, 这与 Die-gane 等得到结果相似。说明罗非鱼在 25、31 °C 和 34 °C 温度应激下, 补体 C₃ 活性受到影响, 但在 24 h 后机体适应了相应温度, 补体 C₃ 活性恢复到正常水平, 34 °C 的胁迫作用对补体 C₃ 的活性影响较小^[17]。

在试验 1 中, 处理组罗非鱼感染海豚链球菌的死亡率与水温的变化呈现明显的正相关, 高温组 (31 °C 和 34 °C) 死亡率明显高于正常温度组 (25 °C) 和最适温度组 (28 °C)。结合不同温度的应激下罗非鱼非特异性免疫相关酶活性的急性变化情况, 试验结果表明温度变化特别是高温能够抑制罗非鱼的免疫活性, 并且导致机体对海豚链球菌的抵抗力降低, 增加了罗

非鱼对海豚链球菌的易感性。

4 结论

对于鱼类这种变温动物来说,温度是一项非常重要的理化因子,已有很多研究表明温度能够影响鱼类的免疫系统及对病原菌的易感性。本研究发现,罗非鱼感染海豚链球菌的死亡率与水温的变化呈现明显的正相关,特别是在高温(34℃)条件下,罗非鱼机体免疫力受到强烈抑制,降低了对海豚链球菌抵抗力。

本研究认为,在罗非鱼养殖过程中,在季节性高温时,应采取相关措施。避免因温度升高导致机体免疫力下降,从而有效防治因高温引发的海豚链球菌等疾病的大面积爆发。

参考文献:

- [1] 杨弘. 中国罗非鱼现状及发展趋势[J]. 中国渔业经济, 2010, 28: 5-8.
- [2] 卢迈新. 罗非鱼病害防治和养殖技术进展[J]. 科学养鱼, 2010(251): 110-112.
- [3] Roch P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrate[J]. *Aquaculture*, 1999, 172(1): 125-145.
- [4] Cheng A C, Cheng S A, Chen Y Y, et al. Effects of temperature change on the innate cellular and humoral immune responses of orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, 26(5): 768-772.
- [5] Jones S R M. The occurrence and mechanisms of innate immunity against Parasites in fish[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2001, 22(8): 841-852.
- [6] Munoz M, Cedeno R, Rodriguez J, et al. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2000, 191(1): 89-107.
- [7] Irwin Fridovich. Superoxide radical and superoxide dismutases[J]. *Accounts of Chemical Research*, 1995, 5(10): 97-112.
- [8] 赵龙飞, 徐亚军. 鸡蛋清中溶菌酶的应用性研究[J]. 食品工业, 2006(3): 19-20.
- [9] ZHAO Long-fei, XU Ya-jun. The application of lysozyme from hen egg white[J]. *Food Industry*, 2006(3): 19-20.
- [10] Dunier M, Siwicki A K, Demael. Effects of organophosphorus insecticides; Effects of trichlorfon and dichlorvos on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*): In vitro effects on lymphocyte proliferation and phagocytosis and in vivo effects on humoral response[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1991, 22(1): 79-87.
- [11] Sakai D K. The non-specific activation of rainbow trout, Salmon gardener Richardson, complement by *Aeromonas salmonicida* extracellular products and the correlation of complement activity with the inactivation of lethal toxicity products[J]. *Journal of Fish Diseases*, 1984, 7(5): 329-333.
- [12] Cheng T C. The role of lysosomal hydrolases in molluscan cellular response to immunologic challenge[J]. *Current Topic in Comparative Pathology*, 1978, 23(1): 59-71.
- [13] Hermes-Lima M, Storey J M, Storey K B. Antioxidant defenses and metabolic depression: The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 120(3): 437-448.
- [14] 戚兰, 柯惠芬, 郑春燕, 等. 日本沼虾和南美白对虾免疫因子的比较研究[J]. 绍兴文理学院学报, 2003, 23(10): 65-67.
- [15] QI Lan, KE Hui-fen, ZHENG Chun-yan, et al. Studies on immunological factors of macrobrachium *Nipponese* and *Penaeus vannamei*[J]. *Journal of Shaoxing University*, 2003, 23(10): 65-67.
- [16] 李大鹏, 刘松岩, 谢从新, 等. 水温对中华鲟血清活性氧含量及抗氧化防御系统的影响[J]. 水生生物学报, 2008, 32(3): 327-332.
- [17] LI Da-peng, LIU Song-yan, XIE Cong-xin, et al. Effects of water temperature on serum content of reactive oxygen species and antioxidant defense system in Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(3): 327-332.
- [18] 支兵杰, 刘伟, 王立波, 等. 水温对怀头鲇血液学指标的影响[J]. 水产学杂志, 2008, 21(2): 64-70.
- [19] ZHI Bing-jie, LIU Wei, WANG Li-bo, et al. The effect of water temperature on hematology indices of *Silurus soldatovi*[J]. *Chinese Journal Fisheries*, 2008, 21(2): 64-70.
- [20] Fevolden S E, Roed K H. Cortisol and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high or low tolerance to stress[J]. *Journal of Fish Biology*, 1993, 43(6): 919-930.
- [21] Diegane N, Chen Y Y, Lin Y H, et al. The immune response of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 22(6): 686-694.