

# 西伯利亚鲟源嗜水气单胞菌致病菌的分离及其全菌苗的免疫效果

李圆圆 曹海鹏 邓璐 杨先乐\*

(上海海洋大学 农业部渔业动植物病原库 上海 200090)

**摘要:** 从患细菌性败血症的西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*) 的体内分离到一株致病菌株 X1, 其对西伯利亚鲟的半数致死浓度 ( $LC_{50}$ ) 为  $5.62 \times 10^5$  cfu/ml, 具有较强毒力; 经 ATB 细菌鉴定仪生理生化鉴定和 16S rDNA 序列分析, 菌株 X1 为嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*); 其系统发育分析表明, 菌株 X1 与嗜水气单胞菌 ATCC35654 (登录号: X74676.1) 的亲缘关系最近, 其同源率为 99%。用 0.30% 福尔马林灭活, 将菌株 X1 制成灭活全菌苗, 对西伯利亚鲟进行注射免疫。研究结果表明, 嗜水气单胞菌 X1 全菌苗能够明显提高西伯利亚鲟的血清抗体水平及总蛋白、免疫球蛋白、溶菌酶含量, 而且在嗜水气单胞菌 X1 全菌苗中加入弗氏不完全佐剂, 有利于进一步增强西伯利亚鲟血清抗体水平及总蛋白、免疫球蛋白、溶菌酶含量。此外, 嗜水气单胞菌 X1 全菌苗对西伯利亚鲟抗嗜水气单胞菌 X1 人工感染也具有较好的免疫保护作用, 其对西伯利亚鲟的免疫保护率为 50%, 而且在嗜水气单胞菌 X1 全菌苗中加入弗氏不完全佐剂, 嗜水气单胞菌 X1 全菌苗对西伯利亚鲟抗嗜水气单胞菌 X1 人工感染的免疫保护作用更好, 其对西伯利亚鲟的免疫保护率为 70%。因此, 将嗜水气单胞菌 X1 全菌苗用于西伯利亚鲟细菌性败血症的防治具有广阔的发展前景。

**关键词:** 西伯利亚鲟; 嗜水气单胞菌; 全菌苗; 免疫效果

**中图分类号:** S941.41; S942.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2008)06-01-09

## Isolation of Pathogenic Bacteria *Aeromonas hydrophila* from *Acipenser baerii* and Immune Effect of Its whole Cell Vaccine

LI Yuan-Yuan CAO Hai-Peng DENG Lu YANG Xian-Le\*

(Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** A pathogenic strain X1 was isolated from Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*) suffering with bacterial septicaemia. The median lethal concentration ( $LC_{50}$ ) of strain X1 was  $5.62 \times 10^5$  cfu/ml to healthy Siberian Sturgeon, which showed that strain X1 had rather strong virulence. Strain X1 was identified as *Aeromonas hydrophila* by physiological and biological studies and 16S rDNA sequence analysis, which indicates that it had close relativity with *A. hydrophila* strain ATCC35654 (locus number: X74676.1), with a high homology of 99%. Strain X1 was inactivated by 0.30% formalin and its whole cell vaccine was made to immune Siberian Sturgeon with injection. The experiment results showed that whole cell vaccine of *A. hydrophila* strain X1 could obviously enhance the level of serum anti-A.

**基金项目** 国家科技支撑计划资助项目 (No. 2006BAD03B0506), 上海市优秀青年教师科研专项基金项目 (No. B-8101-08-0017), 上海海洋大学青年科研基金项目 (No. 6690107251), 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室开放课题基金 (KFT2008-5);

\*通讯作者, E-mail: xlyang@shfu.edu.cn;

**第一作者介绍** 李圆圆, 女, 硕士研究生; 研究方向: 水产动物病害; E-mail: jjiedaoqingmei@eyou.com。

**收稿日期:** 2008-05-29, **修回日期:** 2008-09-01

*hydrophila* antibodies - and the total counts of immunoglobulin ,total proteins ,as well as lysozyme. In addition ,whole cell vaccine effectively prevented Siberian Sturgeon from being infected by *A. hydrophila*. The relative survival percent of Siberian Sturgeon was 50 % . Further ,whole cell vaccine with FIA improved relative survival percent to 70 % , showing more effective immunity effect. Therefore ,there is a potential to apply whole cell bacteria *A. hydrophila* strain XI to prevention and cure of Siberian Sturgeon suffering with bacterial septicaemia.

**Key words:** *Acipenser baerii* ; *Aeromonas hydrophila* ; Whole cell vaccine ; Immune effect

西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*) 隶属于鲟科 (Acipenseridae) 鲟属,是现存 26 种鲟类中的一种,主要分布于俄罗斯西部的鄂毕河至东部的科雷马河之间的西伯利亚各河流之中<sup>[1]</sup>。西伯利亚鲟自 1996 年首次被中国引进,至目前其养殖量仅次于施氏鲟 (*A. schrenckii*),居中国鲟鱼养殖产量的第 2 位<sup>[2]</sup>。然而,近年来由于各种疾病的发生给西伯利亚鲟养殖造成灾难性危害。这就使免疫防治技术在鲟病防治中具有了广阔的应用前景。因此,关于鲟病病原的分离鉴定及疫苗防治效果的研究得到了广泛的关注。

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 是我国主要淡水鱼类出血性败血症的主要病原菌<sup>[3]</sup>,国内已有学者对嗜水气单胞菌疫苗研制及免疫途径进行了研究和探索,并取得了一定成绩<sup>[4-6]</sup>。其免疫防治研究对象以硬骨鱼类为主。对属于软骨鱼类的鲟免疫防治未见报道。关于鲟免疫系统的研究还处于起步阶段。另外,由于水产动物本身及其栖息环境的特殊性,及嗜水气单胞菌不同菌株间又存在着血清型差异,因此,鲟细菌病致病菌的分离是有效开展免疫防治研究的关键。本实验从养殖条件下发病的西伯利亚鲟体内分离得到一株毒力较强的致病菌 X1,经人工感染证实,发病鲟有明显的败血症症状:肉、肾、性腺、肠道充血及出血,肝有出血点,肛门红肿并伴有血水流出。将致病菌株 X1 制备成全菌疫苗,定期采集免疫鲟和未免疫鲟的血清,分析其特异性免疫指标的动态变化规律及注射免疫的效果,以得出最佳免疫途径及方案。同时结合血清中溶菌酶的动态变化对其非特异性免疫作了初步研究。以期为生实践及相关研究打下理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 养殖条件下患病和健康的西伯利亚鲟,体重 50 ~ 70 g,体长 13 ~ 16 cm,均由浙江省千岛湖鲟鱼养殖基地提供。弗氏不完全佐剂 (Freund 's adjuvant incomplete, FIA),购于国药集团化学试剂有限公司;溶菌酶检测试剂盒、蛋白定量 (双缩脲法) 测试盒,购于南京建成生物工程研究所第一分所。

### 1.2 致病菌的分离与鉴定

**1.2.1 致病菌的分离** 养殖条件下患病西伯利亚鲟主要症状为肉、肾、性腺、肠道充血、出血,肝有出血点,肛门红肿并伴有血水流出。选取具有典型发病症状的濒死西伯利亚鲟,用 75 % 的酒精棉反复擦拭病鱼体表后,无菌操作取病鱼的肝、肾等病灶组织以及少量腹水,分别于胰蛋白胨大豆琼脂 (tryptose soya agar, TSA) 培养基平板上划线分离,于 28 ℃ 下培养 24 h 后,挑取优势单菌落划线纯化,并接种于 TSA 培养基斜面上,于 4 ℃ 冰箱保存。

**1.2.2 致病菌的人工回归感染试验** 用无菌生理盐水分别刮下斜面保藏的各分离菌株的菌苔,并将其菌悬液稀释为  $2.2 \times 10^7$  cfu/ml 浓度,然后分别对健康的西伯利亚鲟进行胸鳍基部注射感染,每尾注射剂量为 0.2 ml。以注射等量无菌生理盐水的健康西伯利亚鲟作为对照。每注射组实验鱼各 8 尾,水温为 19 ~ 22 ℃。连续 7 d 观察并记录实验鱼的病症及死亡数目,同时对人工回归感染发病濒死的实验鱼进行病原菌再分离,观察再分离的菌株与原分离菌株在形态与理化特性等方面是否一致。

**1.2.3 致病菌株毒力测定** 将分离的原致病菌株菌悬液分别稀释成  $2.2 \times 10^4$  cfu/ml、 $2.2 \times$

$10^5$  cfu/ml、 $2.2 \times 10^6$  cfu/ml、 $2.2 \times 10^7$  cfu/ml,然后分别对健康的西伯利亚鲟进行胸鳍基部注射感染,每尾注射剂量为 0.2 ml。以注射等量无菌生理盐水的健康西伯利亚鲟作为对照。每注射组实验鱼各 8 尾,水温为 19~22。连续 7 d 观察并记录实验鱼的死亡数目,并用概率单位图解法<sup>[7]</sup>计算半数致死浓度(LC<sub>50</sub>)。

**1.2.4 致病菌株的鉴定** 将新鲜培养的致病菌株进行革兰染色,测定其 16S rDNA 序列,在 NCBI 中利用 BLASTN 软件与 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 基因库中已知的 16S rDNA 序列进行同源性比较,选取同源性较高的序列并利用 BioEdit 7.0 和 Mega 4.0 软件进行多重比较后构建系统发育树;同时用 ATB 细菌鉴定仪进一步对其进行生理生化鉴定。

**1.3 致病菌全菌苗的制备** 将分离的原致病菌接种于无菌营养肉汤中,于 30 恒温振荡培养 24 h 后调节其培养液浓度为  $6.0 \times 10^9$  cfu/ml,然后在致病菌培养液中加入福尔马林至终浓度为 0.30% (根据预实验结果),置于 30 下灭活,经检测 24 h 后培养液中致病菌完全灭活,并经人工感染试验证实其对西伯利亚鲟无致病力。

**1.4 致病菌全菌苗免疫效果的测定** 随机选取健康西伯利亚鲟 300 尾,随机分成 3 组,即全菌苗组、全菌苗 + FIA 组、对照组,每组各设 3 个平行。其中,全菌苗组西伯利亚鲟腹腔注射  $6.0 \times 10^7$  cfu/ml 的全菌苗 0.2 ml,全菌苗 + FIA 组西伯利亚鲟腹腔注射以 1:1 比例 FIA 乳化后的全菌苗 0.2 ml。7 d 后全菌苗组、全菌苗 + FIA 组再加强免疫一次,方法同初次免疫,对照组注射等量的生理盐水。实验期间连续充氧,温度控制在 20~21。

**1.4.1 疫苗免疫原性的测定<sup>[8]</sup>** 分别于加强免疫后的第 0、7、14、28、35、42、49、56 d 从全菌苗组、全菌苗 + FIA 组、对照组中各取 5 尾西伯利亚鲟,用无菌注射器尾部静脉采血后收集于离心管中,室温静置 2 h 后 4 过夜。然后于 4 5 000 r/min 条件下离心 15 min 后取上清,采用微量滴定凝集法<sup>[9]</sup>进行抗体凝集效价测定。

**1.4.2 总蛋白、免疫球蛋白的测定** 分别于加强免疫后的第 0、7、14、21、28、35、42、49、56 d 从全菌苗组、全菌苗 + FIA 组、对照组中各取 5 尾西伯利亚鲟,用无菌注射器尾部静脉采血后收集于离心管中,室温静置 2 h 后 4 过夜,然后于 4 5 000 r/min 条件下离心 15 min 后取上清,于 -20 保存,备用。采用饱和硫酸铵分步盐析法<sup>[10]</sup>提取免疫球蛋白,于 -20 保存,备用。用蛋白定量(双缩脲法)测试盒测定血清中总蛋白和免疫球蛋白的含量。以对照组西伯利亚鲟血清作为对照。

**1.4.3 血清溶菌酶的测定** 分别于加强免疫后的第 0、1、2、3、7、14、28、42 d 从全菌苗组、全菌苗 + FIA 组、对照组中各取 5 尾西伯利亚鲟,用无菌注射器尾部静脉采血后收集于离心管中,室温静置 2 h 后 4 过夜,然后于 4 5 000 r/min 条件下离心 15 min 后取上清,用溶菌酶检测试剂盒测定血清中溶菌酶的含量。以对照组西伯利亚鲟血清作为对照。

**1.4.4 免疫保护率的测定** 分别于加强免疫后第 35 d 从全菌苗组、全菌苗 + FIA 组中各取 10 尾西伯利亚鲟,用终浓度为  $1.0 \times 10^6$  cfu/ml 的致病菌菌液进行胸鳍基部注射感染,每尾注射剂量为 0.2 ml,对照组注射等量的生理盐水。连续观察 7 d,记录各组西伯利亚鲟的死亡数目,计算相对免疫保护率(relative percent survival, RPS):  $RPS = (1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$

**1.5 实验数据处理方法** 所有数据通过 SPSS 11.5 软件用 ANOVA 进行方差分析, Duncan's 进行多重比较。

## 2 结果

**2.1 致病菌的分离** 从自然发病的西伯利亚鲟体内分离到 4 株优势菌株,分别暂命名为 X1、X2、X3、X4,经过人工回归感染试验,仅菌株 X1 对西伯利亚鲟具有致病性,人工注射感染西伯利亚鲟后 7 d,西伯利亚鲟的死亡率高达 100% (表 1),实验病鱼也表现出肛门红肿,腹部充满血水,肠道充血、出血等病症,而且从人

工回归感染濒死的病鱼体内又可分离到与菌株 X1 形态特征及理化特性一致的菌株。根据建立的实验鱼死亡率 (%) 与菌液浓度对数 (log (cfu/ml)) 的关系曲线:  $y = 36.25x - 158.58$  (图

1), 菌株 X1 对西伯利亚鲟的半数致死浓度 (LC<sub>50</sub>) 为  $5.62 \times 10^5$  cfu/ml, 根据 Devesa 对鱼类致病菌毒力的划分标准<sup>[11]</sup>, 可判定菌株 X1 对西伯利亚鲟具有较强的毒力。

表 1 分离菌株对西伯利亚鲟的人工回归感染试验结果

Table 1 Results of artificial infection test of isolated strain

菌株 Bacteria strain	注射浓度 Injection concentration (cfu/ml)	鱼数 Number of fish (尾)	死亡数目 Number of fish died (尾)							死亡率 Mortality (%)
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	
X1	$2.2 \times 10^7$	8	2	4	6	6	7	8	8	100
X2	$2.2 \times 10^7$	8	0	0	0	0	0	0	0	0
X3	$2.2 \times 10^7$	8	0	0	0	0	0	0	0	0
X4	$2.2 \times 10^7$	8	0	0	0	0	0	0	0	0

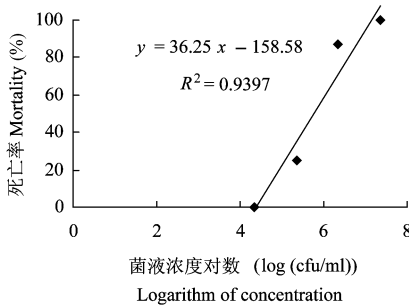


图 1 鲟死亡率与菌液浓度对数的关系曲线

Fig. 1 The relation curve of sturgeon mortality with logarithm of bacterial concentration

2.2 致病菌的鉴定 将菌株 X1 的 16S rDNA 序列在 NCBI 网站进行同源性检索, 结果其与气单胞菌 (*Aeromonas* sp.) 的 16S rDNA 序列自然聚类, 同源性为 98 % 和 99 %。构建的系统发育树进一步表明, 菌株 X1 与嗜水气单胞菌 ATCC35654 (登录号: X74676. 1) 的亲缘关系最近 (图 2)。此外, ATB 细菌鉴定仪对菌株 X1 的生理生化鉴定结果表明, 菌株 X1 为嗜水气单胞菌, 鉴定结果的可信度为 99 % (表 2)。综合 16S rDNA 序列分析结果与生理生化特性鉴定结果, 菌株 X1 可鉴定为嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)。

表 2 ATB 细菌鉴定仪对菌株 X1 的生理生化鉴定结果

Table 2 The identification of strain X1 by ATB bacteria identification instrument

测定项目 Test item	结果 Result	测定项目 Test item	结果 Result	测定项目 Test item	结果 Result
氧化酶 Oxidase	+	柠檬酸盐 Citrate	-	蔗糖 Saccharose	+
D-葡萄糖 D-glucose	+	组氨酸 Histidine	+	麦芽糖 Maltitol	+
水杨素 Salicin	+	2-酮葡萄糖酸盐 2-Ketogenic substance	-	衣康酸 Itaconic acid	-
D-蜜二糖 D-melibiose	-	3-羟基-丁酸盐 3-Oxyhydril-butyrate	-	辛二酸盐 Suberate	-
L-岩藻糖 L-fucose	-	5-酮基-葡萄糖酸盐 5-Keto-gluconate	-	丙二酸盐 Malonate	-
D-山梨醇 D-sorbierite	-	3-羟基-苯甲酸盐 3-Oxyhydril-benzoas	-	乙酸盐 Acetas	-
L-阿拉伯糖 L-arabinose	+	鼠李糖 Rhamnose	+	DL-乳酸盐 DL-lactate	+
丙酸盐 Propionate	-	N-乙酰葡萄糖胺 N-acetyl glucosamine	+	L-丙氨酸 L-alanine	+
癸酸盐 Caprate	-	L-脯氨酸 L-proline	+	糖原 Glycogen	+
戊酸盐 Valerate	+	肌醇 Inositol	-		
甘露醇 Mannitol	+	L-丝氨酸 L-serine	+		

“+”表示阳性; “-”表示阴性。“+”Denotes positivity; “-”Denotes negativity.

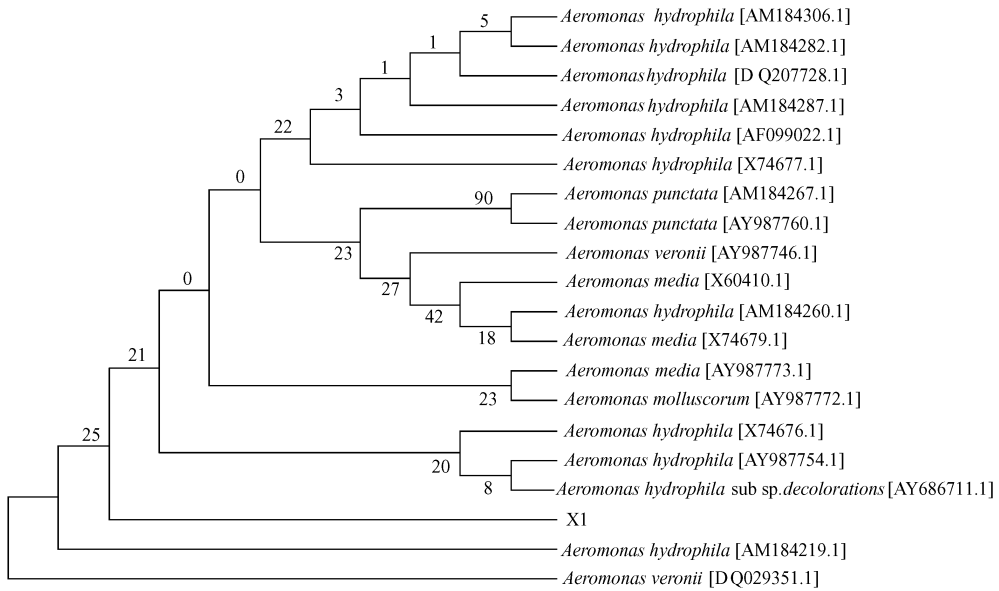


图 2 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence

利用最大似然法构建此图; 枝上数字为自举置信水平值; 种名后的数值表示登录号; *Aeromonas hydrophila*:嗜水气单胞菌; *Aeromonas punctata*:斑点气单胞菌; *Aeromonas media*:中间气单胞菌; *Aeromonas veronii*:凡隆气单胞菌; *Aeromonas molluscorum* 与 *Aeromonas hydrophila* sub sp. *decolorations*: 未命中文名; X1: 嗜水气单胞菌[ EU669667 ]。

The figure is constructed by maximum likelihood method; The value of bootstrap confidence level of nodes are indicated above the branch; The numbers behind the species denote locus number. X1. *Aeromonas hydrophila*[ EU669667 ].

**2.3 血清中抗体效价变化 实验结果(图 3)**  
表明,嗜水气单胞菌 X1 全菌苗能够明显提高西伯利亚鲟的血清抗体水平。加强免疫后 35 d,全菌苗组西伯利亚鲟血清抗体凝集效价达到最大值,为  $4.77 \pm 0.70$ ,较对照组西伯利亚鲟血清抗体凝集效价高 42.5 % ( $P < 0.05$ )。此外,在嗜水气单胞菌 X1 全菌苗中加入弗氏不完全佐剂,有利于进一步增强西伯利亚鲟血清抗体水平。在加强免疫后 42 d,全菌苗 + FIA 组西伯利亚鲟血清抗体凝集效价达到最大值,为  $5.71 \pm 0.50$ ,较全菌苗组西伯利亚鲟血清抗体凝集效价最大值高 19.71 % ( $P > 0.05$ )。

**2.4 血清总蛋白含量变化 实验结果(图 4)**  
表明,嗜水气单胞菌 X1 全菌苗能够明显提高西伯利亚鲟的血清总蛋白含量。具体表现为加强免疫后 35 d,全菌苗组西伯利亚鲟血清总蛋白含量达到最大值,为  $(25.0 \pm 0.7) \text{ g/L}$ ,较对照组西伯利亚鲟血清总蛋白含量高 20 % ( $P <$

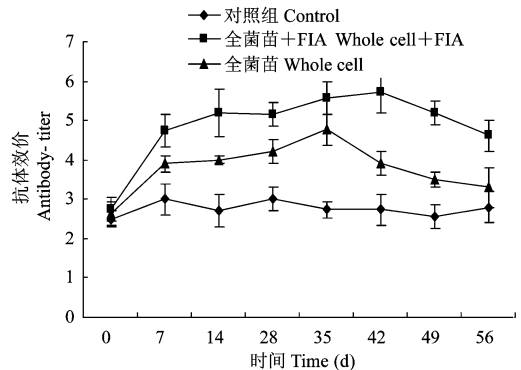


图 3 各实验组西伯利亚鲟的血清抗体效价随时间的变化曲线

Fig. 3 Changes of antibody titer with time in serum of Siberian Sturgeon

0.05)。此外,加强免疫后 35 d,全菌苗 + FIA 组西伯利亚鲟血清总蛋白含量达到最大值,为  $(31.3 \pm 0.9) \text{ g/L}$ ,较全菌苗组西伯利亚鲟血清总蛋白含量最大值高 25.2 % ( $P < 0.05$ )。表明

在嗜水气单胞菌 X1 全菌苗中加入弗氏不完全佐剂,有利于进一步提高西伯利亚鲟血清总蛋白含量。

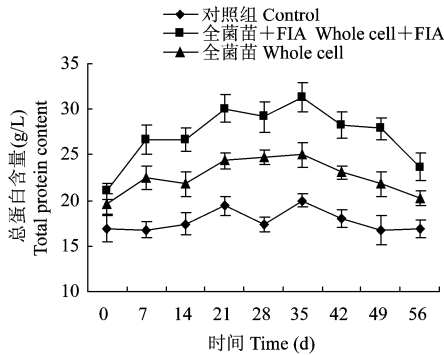


图 4 各实验组西伯利亚鲟的血清总蛋白含量随时间的变化曲线

Fig. 4 Changes of total protein with time in blood serum of Siberian Sturgeon

2.5 血清免疫球蛋白含量变化 实验结果(图 5)表明,嗜水气单胞菌 X1 全菌苗能够明显提高西伯利亚鲟的血清免疫球蛋白含量。具体表现为加强免疫后 28 d,全菌苗组西伯利亚鲟血清免疫球蛋白含量达到最大值,为(5.48 ± 0.50) g/L,较对照组西伯利亚鲟血清免疫球蛋白含量高 36 % (P < 0.05)。此外,在嗜水气单胞菌 X1 全菌苗中加入弗氏不完全佐剂,有利于进一步提高西伯利亚鲟血清免疫球蛋白含量。具体表现为加强免疫后 28 d,全菌苗 + FIA 组西伯利亚鲟血清免疫球蛋白含量达到最大值,为(6.42 ± 0.30) g/L,较全菌苗组西伯利亚鲟血清免疫球蛋白含量最大值高 17.15 % (P < 0.05)。

2.6 血清溶菌酶含量变化 实验结果(图 6)表明,嗜水气单胞菌 X1 全菌苗能够明显提高西伯利亚鲟的血清溶菌酶含量。具体表现为加强免疫后 7 d,全菌苗组西伯利亚鲟血清溶菌酶含量达到最大值,为(171.1 ± 5.9) U/ml,较对照组西伯利亚鲟血清溶菌酶含量高 44.4 % (P < 0.05)。此外,在嗜水气单胞菌 X1 全菌苗中加入弗氏不完全佐剂,有利于进一步提高西伯利亚鲟血清溶菌酶含量。具体表现为加强免疫后

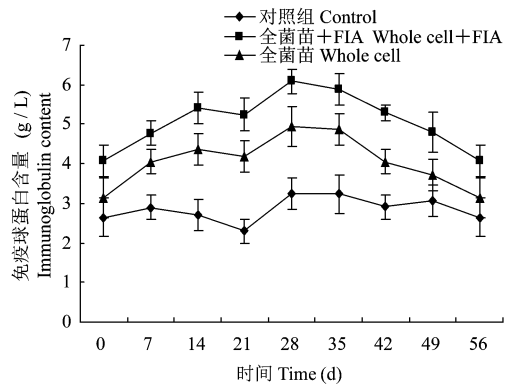


图 5 各实验组西伯利亚鲟的血清免疫球蛋白含量随时间的变化曲线

Fig. 5 Changes of immunoglobulin with time in blood serum of Siberian Sturgeon

7 d,全菌苗 + FIA 组西伯利亚鲟血清溶菌酶含量达到最大值,为(192.0 ± 3.2) U/ml,较全菌苗组西伯利亚鲟血清溶菌酶含量最大值高 12.22 % (P < 0.05)。

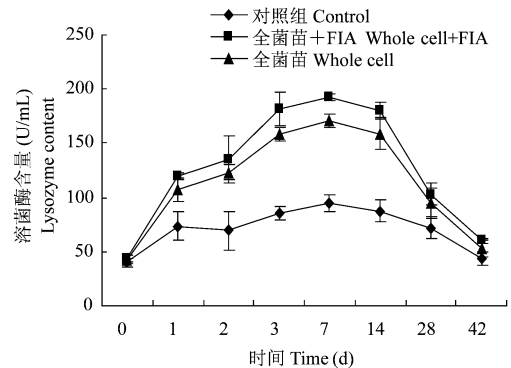


图 6 各实验组西伯利亚鲟的血清溶菌酶含量随时间的变化曲线

Fig. 6 Changes of lysozyme content with time in serum of Siberian Sturgeon

2.7 免疫保护率测定结果 实验结果(表 3)表明,嗜水气单胞菌 X1 全菌苗对西伯利亚鲟抗嗜水气单胞菌 X1 人工感染具有较好的免疫保护作用,其对西伯利亚鲟的免疫保护率为 50 %,而且在嗜水气单胞菌 X1 全菌苗中加入弗氏不完全佐剂,嗜水气单胞菌 X1 全菌苗对西伯利亚鲟抗嗜水气单胞菌 X1 人工感染的免疫

表 3 全菌苗对西伯利亚鲟的免疫保护率

Table 3 The relative survival percent of Siberian Sturgeon infected with whole cell vaccine

组别 Group	浓度 Concentration (cfu/ml)	死亡数目 Number of fish died							死亡率 Mortality (%)	相对免疫保护率 Relative survival percent (%)
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d		
对照 Control	$1.0 \times 10^6$	2	5	7	8	10	10	10	100	0
全菌苗 + FIA Whole cell + FIA	$1.0 \times 10^6$	0	0	0	1	1	2	3	30	70
全菌苗 Whole cell	$1.0 \times 10^6$	0	0	1	2	4	4	5	50	50

保护作用更好,其对西伯利亚鲟的免疫保护率为 70%。

### 3 讨论

自 20 世纪 90 年代以来,鲟养殖业发展迅猛,至目前,鲟养殖范围几乎遍及全国各省份。西伯利亚鲟具有适温范围广、生长快、饲料来源广等养殖优点,具有极高的研究及经济价值,西伯利亚鲟在我国鲟养殖量上占绝对优势,已成为我国鲟养殖产业主导养殖品种。由于养殖密度过大,养殖水温过高等原因,致使鲟病害呈大幅度上升趋势,给养殖户和鲟养殖产业带来严重危害。西伯利亚鲟病害多发生于苗种时期,主要由气单胞菌感染引起败血症、肠炎等疾病。

目前国内关于鲟鱼细菌性病害的报道不多,仅杨治国、储卫华、曹海鹏等先后对俄罗斯鲟(*A. gueldenstaeti*)、杂交鲟(*Huso huso* × *A. ruthenus*)和达氏鳇(*H. dauricus*)的败血症进行过报道,其主要病原为嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌(*A. caviae*)以及类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)<sup>[12-14]</sup>。从现有文献资料来看,国内尚无关于西伯利亚鲟细菌性病害的报道。本实验从患细菌性败血症的西伯利亚鲟体内分离得到致病菌株 X1,经人工回归感染试验证实其对西伯利亚鲟具有极高的致死率,LC<sub>50</sub>为  $5.62 \times 10^5$  cfu/ml,并经生理生化鉴定及 16S rDNA 序列分析佐证,证实该菌株为嗜水气单胞菌。本实验再次证实了嗜水气单胞菌在鲟人工养殖中的巨大危害性。

目前在细菌分类鉴定方法上,基于细菌生理生化特性的 ATB 细菌鉴定系统操作方便,结果准确,但数据库中模式菌种数量有限,部分细

菌只能鉴定到属,对革兰阳性菌和厌氧菌的鉴定效果较差。分子遗传学鉴定虽然可从本质上阐述细菌间的亲缘关系,但专业性强,鉴定时间长<sup>[15]</sup>。因此,本实验对菌株 X1 分类鉴定时,将生理生化特性测定与 16S rDNA 序列分析鉴定相结合,使鉴定方法更科学,鉴定结果更可靠、更准确。本实验发现,嗜水气单胞菌 X1 与沈锦玉等分离的嗜水气单胞菌 TS6-2 以及张晓君等分离的嗜水气单胞菌菌株在鼠李糖等生化特性方面有所差异<sup>[16,17]</sup>。出现这些差异,可能是由于从不同地区和寄主体内分离到的菌株由于地区、气候、水质条件及实验室培养条件等方面的不同<sup>[18]</sup>。

近年来,国内学者较多研究嗜水气单胞菌疫苗对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲫(*Carassius auratus*)、鳊(*Siniperca chuatsi*)等硬骨鱼类的非特异性免疫的影响。例如:罗霞<sup>[4]</sup>等研究了嗜水气单胞菌全菌苗对鳊血清中溶菌酶含量影响,免疫后鳊血清溶菌酶含量明显提高,第 3 d 达到峰值,但第 7 d 后下降到原来水平。安利国<sup>[8]</sup>等研究表明鲤注射免疫嗜水气单胞菌全菌疫苗后,血清中溶菌酶含量第 3 d 达到峰值,一周后下降至原来水平。本实验研究了嗜水气单胞菌对西伯利亚鲟非特异性免疫,发现嗜水气单胞菌 X1 菌苗能明显提高西伯利亚鲟血清溶菌酶含量。免疫后血清中溶菌酶含量到第 7 d 达到峰值,直到 6 周后其含量下降到免疫前水平。由此可见,免疫后西伯利亚鲟血清中溶菌酶含量在一段时间里处于较高水平,其非特异性免疫作用持续时间较长且此时血清抗体水平也有所提高。这与罗霞<sup>[4]</sup>、安利国<sup>[8]</sup>等对硬骨鱼类的研究结果不同。此外,本实验还

发现,在嗜水气单胞菌 X1 灭活全菌苗中加入弗氏不完全佐剂有利于进一步提高西伯利亚鲟血清溶菌酶含量,这与罗霞等<sup>[4]</sup>关于佐剂有利于提高鱼体溶菌酶含量的观点是相同的。

国外关于细菌疫苗对鲟非特异性免疫的研究报道也极少,只有杀鲑气单胞菌 (*A. salmonicida*) 全菌苗等。例如, Kolman 等<sup>[19,20]</sup>研究发现,西伯利亚鲟注射免疫杀鲑气单胞菌全菌苗后血清溶菌酶含量明显提高,并持续 6 周后下降到原来水平,这与本实验结果一致。

血清抗体水平是鱼类特异性免疫的重要指标<sup>[21]</sup>。Kolman 等<sup>[19,20]</sup>研究发现,杀鲑气单胞菌全菌苗能够使西伯利亚鲟的血清抗体效价由 (2.9 ± 0.5) 提高到 (7.0 ± 2.0)。血清免疫球蛋白的含量由 (6.04 ± 1.31) g/L 提高到 (10.03 ± 2.51) g/L。本实验发现,嗜水气单胞菌 X1 灭活全菌苗也能够明显提高西伯利亚鲟的血清抗体水平及免疫球蛋白含量。免疫球蛋白作为鱼类特异性体液免疫应答中最主要的免疫介质<sup>[22]</sup>,主要以可溶性的抗体形式分泌于血液和其他体液中,其含量变化与机体健康、营养和疾病等状况有着密切的关系,可以反映机体的病理状态和免疫功能。免疫球蛋白同血清抗体一样可作为鲟体液免疫评价指标<sup>[23]</sup>。

在我国,对疫苗特异性免疫效果主要从抗体效价来研究,少有对血清免疫球蛋白进行测定。本实验结果表明,抗体效价变化随免疫球蛋白含量产生相应变化。这与 Kolman、Lukyanenko 等<sup>[19,20,23]</sup>所得结果一致。此外,本实验还发现,在嗜水气单胞菌 X1 灭活全菌苗中加入弗氏不完全佐剂有利于进一步提高西伯利亚鲟血清抗体水平及免疫球蛋白含量。这可能是因为佐剂能使抗原在鱼体内缓慢释放,增强巨嗜细胞和浆细胞的活性,加快抗体的生成<sup>[4]</sup>。

此外,本实验发现,虽然注射嗜水气单胞菌 X1 灭活全菌苗后,西伯利亚鲟的血清抗体水平只有 (4.77 ± 0.70),但嗜水气单胞菌 X1 灭活全菌苗对西伯利亚鲟具有良好的免疫保护效力。安利国等<sup>[8]</sup>、耿晓修等<sup>[24]</sup>也曾发现这种免疫保护效力与血清抗体水平并不完全一致的现象,

并认为抗体水平的高低不足以说明免疫保护力的强弱。产生这种现象可能是因为注射疫苗后,西伯利亚鲟血清溶菌酶增强,溶菌酶进而作用于病原细菌的细胞壁,使病原细菌细胞裂解并同时刺激机体内吞噬细胞的吞噬作用<sup>[25]</sup>。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Ruban G I. Species structure, contemporary distribution and status of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii*. *Environ Biol Fishes*, 1997, **48**: 221 ~ 230.
- [ 2 ] 曲秋芝,高艳丽. 西伯利亚鲟的人工繁殖. *中国水产科学*, 2005, **12**(4): 492 ~ 495.
- [ 3 ] 于学辉,王远微. 嗜水气单胞菌的研究进展. *西南民族大学学报*, 2007, **3**(33): 509 ~ 514.
- [ 4 ] 罗霞,潘厚军,巩华等. 鳃浸泡嗜水气单胞菌全菌疫苗后皮肤黏液抗体的变化. *中国水产科学*, 2007, **14**(5): 823 ~ 828.
- [ 5 ] 李新华,沈锦玉,尹文林等. 银鲫口服嗜水气单胞菌疫苗的免疫和免疫组化研究. *水生生物学报*, 2007, **31**(1): 125 ~ 130.
- [ 6 ] 张吉红,储卫华,陆承平. 口服嗜水气单胞菌生物被膜疫苗的动物免疫实验. *中国水产科学*, 2004, **5**(11): 404 ~ 407.
- [ 7 ] 徐叔云,卞如濂,陈修. *药理实验方法学*. 北京:人民卫生出版社, 2002, 1 651 ~ 1 654.
- [ 8 ] 安利国,冯程强,邢维贤等. 灭活疫苗对鲤鱼血清溶菌酶和腹腔吞噬细胞活性的作用. *山东师大学报(自然科学版)*, 1999, **14**(2): 175 ~ 179.
- [ 9 ] 沈萍,范秀容,李广武. *微生物学实验(第三版)*. 北京:高等教育出版社, 1999, 165 ~ 167.
- [ 10 ] 刘红柏,张颖,杨雨辉等. 中华鲟、史氏鲟及达氏鳊血清免疫球蛋白的纯化及部分特性分析. *水产学报*, 2006, **30**(4): 531 ~ 537.
- [ 11 ] Devesa S. First Report of Vibriosis in Turbot (*Scophthalmus maximus*) Cultured in Northwestern Spain: Fish and Shellfish Pathology. New York: Academic Press, 1985, 131 ~ 140.
- [ 12 ] 杨治国. 鲟鱼嗜水气单胞菌的分离. *淡水渔业*, 2001, **31**(5): 40 ~ 41.
- [ 13 ] 储卫华,于勇. 鲟鱼嗜水气单胞菌的分离与鉴定. *淡水渔业*, 2003, **33**(2): 16 ~ 17.
- [ 14 ] 曹海鹏,杨先乐,高鹏等. 鲟细菌性败血症综合征致病菌的初步研究. *淡水渔业*, 2007, **37**(2): 53 ~ 56.
- [ 15 ] 李琳,李瑾年,余为一. 细菌分类鉴定方法的研究概况. *安徽农业科学*, 2004, **32**(3): 549 ~ 551.
- [ 16 ] 沈锦玉,潘晓艺,余旭平等. 中华鳖白底板病原的分析. *中国水产科学*, 2007, **14**(5): 815 ~ 822.



- [17] 张晓君,陈翠珍,房海. 草鱼肠炎嗜水气单胞菌分离株的主要特性及系统发育学分析. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(4): 334 ~ 337.
- [18] 李小波,黄文芳. 丰产鲫细菌性败血病的研究——病原分离与鉴定. 微生物学通报, 2003, 30(5): 56 ~ 61.
- [19] Kolman H, Siwicki A K, Kolman R. Influence of O-antigen *Aeromonas salmonicida* on non-specific and specific immune responses in Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* Brandt. *Arch Polish Fish*, 1999, 7(1): 93 ~ 102.
- [20] Kolman H. Primary humoral response in Siberian sturgeon after exposure to anti-furunculosis bacterin. *Czech J Anim Sci*, 2002, 47(5): 183 ~ 188.
- [21] 林娟娟,杨金先. 欧洲鳗鲡血清免疫球蛋白纯化及其结构分析. 水产学报, 2006, 30(6): 806 ~ 811.
- [22] 张永安,聂品,朱作言. 鱼类免疫球蛋白研究进展. 鱼类病害研究, 2001, 23(3,4): 1 ~ 17.
- [23] Lukyanenko V I. *Immunologiya Ryb: Vrozhdjonnyj Immunitet*. Mbscow: Agropromizdat, 1989, 272 ~ 277.
- [24] 耿晓修,丁诗华. 荧光假单胞菌灭活疫苗对草鱼的免疫保护效应. 西南农业大学学报, 2006, 28(1): 120 ~ 123.
- [25] 华育平,刘红柏. 温度、疾病感染对史氏鲟血清和各组织中溶菌酶水平的影响. 东北林业大学学报, 2005, 33(3): 63 ~ 66.

## 诚邀各界保护生物学人士参加第 23 届国际保护生物学大会

中国科学院动物研究所与国际保护生物学会 (Society for Conservation Biology, SCB) 诚挚邀请您参加于 2009 年 7 月 11 ~ 16 日在北京召开的第 23 届国际保护生物学大会。

国际保护生物学大会每年举办一届,是保护科学领域标志性的国际学术会议。会议作为全球保护生物学研究专业人士的聚集地,展示及讨论保护科学研究和实践方面的前沿与进展。最为重要的是,大会将全球保护研究的专家学者联系在一起,并作为保护研究信息的重要平台,吸引全球保护生物学、社会学、政治经济学等相关领域的专家学者和学生、各级自然保护区管理人士及决策制定者、作家及其他保护专家参加。

本届大会是该会议首次在亚洲地区举办,无疑对展示中国的生态建设和环境保护措施及成就、提高我国公民生态与环境保护素质、推动我国保护生物学研究和实践的发展、增强我国在国际保护生物学界的话语权和影响力,都具有十分重要的意义。

改革开放 30 年,中国向世界展现了一个经济发展的奇迹。然而,庞大的人口数量与迅猛的经济发展,使中国在空气、土地、淡水、海洋和生物多样性方面承载了比其他任何国家更加巨大的环境挑战。面对任重而道远的自然与社会可持续发展之路,中国政府以科学发展观为指导,提出了行之有效的发展战略,使中国在生物多样性保护方面取得了令人瞩目的成绩,包括自然保护区建设,大熊猫、朱鹮等濒危物种的保护等。然而不可否认的是,我国在保护研究领域与国际先进水平还存在较大差距,公众的保护意识还有待进一步增强。

参与本届大会,将使您有机会在这个国际平台上展示工作成果,并直接与全球顶尖的保护生物学家交流,体验与学习大会各项报告所反映的世界最前沿的保护生物学研究和实践工作,以及目前世界自然保护所面临的最新挑战、问题和解决途径。亲临大会,必将促进您掌握国际先进的研究方法、理论与措施,全面更新保护理念,提高研究与管理水平。

大会官方语言为英语,为方便中国代表参加本届大会,大会设立了专门的中文网站; <http://scb2009.ioz.ac.cn/Cnindex.asp>,请随时关注中文网站了解有关信息。大会期间,将提供中文版会议日程,对与我国保护研究密切相关的内容将提供中文服务。大会提交论文摘要的截至时间为 2009 年 1 月 21 日。如您需要大会主办方提供会议邀请函,或您在提交论文摘要过程中需要英文帮助,请与组委会联系。大会为您提供了展示您单位保护工作成就及与保护工作相关的产品的展台,具体信息亦请与组委会联系。

地址:北京市朝阳区大屯路中国科学院动物研究所 SCB2009 组委会秘书处(邮编:100101),电话:010-64807093, 64807716,传真:010-64807577, E-mail: [scb2009@ioz.ac.cn](mailto:scb2009@ioz.ac.cn)。

期待与您相会在北京!