

皱纹盘鲍对河流弧菌—II 苗免疫的研究*

李太武

丁明进

(辽宁师范大学生物系, 大连 116029) (大连水产养殖公司, 大连 116023)

相建海 刘瑞玉

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 于1993—1995年, 用免疫法防治皱纹盘鲍脓疱病。河流弧菌—II分离自大连水产养殖公司、太平洋海珍品养殖公司的患脓疱病的皱纹盘鲍; 健康皱纹盘鲍, 由大连水产养殖公司石庙苗种厂提供。鲍血淋巴细胞的体外吞噬实验: 取健康皱纹盘鲍的血淋巴与肝素和菌液按一定比例混合后, 置湿盒内37℃培养30min, 取一滴涂片, 吕氏液染色后观察。用该病原菌制做菌苗, 大量扩增病原菌, 用0.1%—1.0%的甲醛洗下菌苔, 处理24—120h, 用生理盐水反复清洗, 除掉甲醛; 再用生理盐水稀释到所需浓度。通过反复传代降低毒性, 制成活菌苗。用两种菌苗在稚鲍、一龄鲍(2—3cm)和成鲍(6—8cm)上实验。结果表明, 鲍的血淋巴细胞约有三种, 三种细胞都有吞噬细菌的能力, 有的细胞象变形虫样变形, 在细胞膜上吸附着很多细菌, 有的细菌已被吞到细胞内; 该病原菌可同鲍的血清发生凝集反应; 菌苗的效果明显, 可提高成活率约50%以上。由上述结果可见, 皱纹盘鲍的血淋巴细胞具有吞噬细菌的能力, 在菌苗的作用下, 血淋巴细胞增殖并活跃地吞噬异源致病菌, 同时鲍血液中的免疫因子也被激活, 参与免疫的过程, 使皱纹盘鲍成活率明显提高。

关键词 皱纹盘鲍 免疫学 河流弧菌—II 脓疱病

从1993年9月开始, 大连地区养殖和天然鲍(壳长3—8cm)都得了脓疱病, 症状是腹足上出现一个至十余个白色脓疱, 使鲍足的组织溃烂, 溶解消失, 造成高达60%以上的死亡率。用抗生素虽然可暂时控制住病情, 但长时间使用单一的药物很容易使病原菌产生抗药性(李太武等, 1996)¹⁾。鲍病的研究报道很少, 其免疫学方面的研究尚未见报道。本文研究了皱纹盘鲍对脓疱病病原菌河流弧菌—II的免疫反应, 并初步探讨了皱纹盘鲍的免疫机制, 以期防治皱纹盘鲍的细菌病找到一种更有效的途径和方法。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)于1993年取自大连水产养殖公司石庙苗种

* 大连市科委重大资助项目, 1994年44号: 李太武, 男, 1955年12月出生, 副教授。

1) 李太武等, 1996, 皱纹盘鲍脓疱病病原菌——河流弧菌—II的抗药机制的初步研究。海洋与湖沼, 27卷。(待发表)

收稿日期: 1996年2月11日, 接受日期: 1996年7月17日。

厂,其规格为壳长 1.0cm 以下、1.0cm、1.5cm、2cm、一龄鲍(3cm 左右)、二龄鲍(4—5cm)以及成鲍(6cm 以上)。河流弧菌-Ⅱ(*Vibrio fluvialis*-Ⅱ)是作者从病鲍体内分离、纯化出来的(刘金屏等,1995)。文中数据系三次以上重复实验结果。所用试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 皱纹盘鲍和细菌凝集性的实验

体外吞噬实验 为探讨皱纹盘鲍的免疫机制,进行皱纹盘鲍血淋巴细胞体外吞噬河流弧菌-Ⅱ的实验,取在肉汤琼脂斜面上经 17—37℃ 培养的病原菌,用生理盐水洗下菌苔,制成 3×10^8 cell/ml 菌液。取 40 μ l 正常鲍的血淋巴、20 μ l 肝素、20 μ l 菌液混匀,置 37℃ 湿盒内 35min(经常摇动),取一滴涂片,并进行吕氏染色和显微拍照。

细菌抗原性的实验 为了证明能否采用免疫方法来防治皱纹盘鲍的脓疱病,进行病原菌是否具有抗原性试验。采用上述方法制成 1×10^9 cell/ml 菌液,用 0.2% 的甲醛灭活 48—72h,给成鲍按下述方法进行足肌肉、外套膜注射。第 1d, 0.01ml; 第 2d, 0.02ml; 第 3d, 0.04ml; 第 4d, 0.08ml; 第 6d, 0.16ml; 第 14d, 0.4ml; 第 16d, 取鲍的血淋巴作为凝集素,细菌作为凝集原作环状沉淀,取 12 支小试管,从第 2 支管开始,每管中加入 2% 生理盐水 60 μ l,在第 1 管中加入 120 μ l 3×10^8 cell/ml 河流弧菌-Ⅱ液(抗原)。用倍比稀释法将该菌液稀释成 2 倍、4 倍……1 024 倍(见表 1),即从 1 号管中取出 60 μ l 菌液加入 2 号管;混匀后取出 60 μ l 加入 3 号管;混匀,从 3 号管中取出 60 μ l 加入 4 号管,以此类推。

另取 13 支小试管(沉淀管),每管内加入皱纹盘鲍血清 60 μ l,加入沉淀管的底部。吸取上述已稀释好的抗原,从最高稀释度加起,加入时,沿管壁徐徐加入,使之与下层鲍血清之间形成界面,切勿摇动,第 13 号管加入生理盐水 60 μ l 作为对照。于室温中静置 15—30min 后,观察在两液面交界处有否白色环状沉淀出现。在最大稀释度的抗原与抗体之间出现沉淀环者,此管的稀释度即为皱纹盘鲍血清的效价。

1.2.2 皱纹盘鲍人工免疫物质的制备

死菌苗注射液及菌饵的制备 将从病鲍中分离的河流弧菌-Ⅱ的病原菌接种于肉汤蛋白胨的培养基上,经 6—10h 培养,用自制的接种棒接种于胰蛋白胨、琼脂培养基中,于 20—37℃ 培养 12—26h。用 0.1%—1.0% 的甲醛洗下菌苔,处理 24—120h,以 3000—4000r/min 离心 5min;用无菌生理盐水(含 2%NaCl)洗 2—3 次,洗后以 3000—4000r/min 离心 5min;然后再用无菌生理盐水稀释成 10^4 — 10^{11} cell/ml 的菌苗注射液,再将这种菌液喷洒到饵料上制成 0.5 — 1.5×10^8 cell/g 的菌饵。菌的计数用血球计数法、平皿计数法和比浊法(张颖悟等,1990)。

活菌苗注射液及菌饵的制备 将经过 30 次连续传代的菌种,从皮下、腹腔注射进兔子和鲍的体内检查毒性。确认毒性很小后采用上述方法培养。用无菌生理盐水稀释成 0.1×10^4 — 10^8 cell/ml 的菌苗注射液,再将这种菌液喷洒到饵料上,制成 0.1×10^6 — 10^{10} cell/g 的菌饵。

1.2.3 皱纹盘鲍人工免疫实验步骤

取 36 只成鲍(雌雄各半)分成三组 第一组为对照组,注射无菌的生理盐水;第二组为菌苗组,注射死菌苗的量为 1.94×10^9 cell/鲍,分 5 次注射共 21d;第三组为弱毒活菌苗

组, 注射量为 $0.3 \times 10^8 \text{cell} / \text{鲍}$, 同样分 5 次注射。第 25d 进行人工感染, 注射活菌 $0.2 \times 10^8 \text{cell} / \text{鲍}$ 。同时将免疫的成鲍雌雄交配, 其稚鲍作为母体免疫样品, 目的是检测鲍的免疫力能否传代。

取一龄鲍(壳长 2—4cm) 90 个, 分成三组 第一组为对照组, 注射同体积的生理盐水; 第二组为菌苗组, 分 5 次注射 $6.4 \times 10^8 \text{cell} / \text{鲍}$ 死菌苗, 第三组为弱毒菌苗组, 用 21d 分 5 次注射 $0.2 \times 10^8 \text{cell} / \text{鲍}$ 活菌苗。从第 25d 开始注射活菌进行人工感染, 菌量为 $0.2 \times 10^8 \text{cell} / \text{鲍}$ 。

取刚剥离正常投饵, 死亡情况正常的 18 块板稚鲍(每块板上平均有稚鲍约 500 个), 分三组 第一组为对照组, 投喂对照饵料; 第二组为菌苗组; 第三组为母体免疫组。向第二、第三组的稚鲍投喂 $0.3 - 6 \times 10^8 \text{cell} / \text{g}$ 饵料的菌饵 30d, 海水温度在 $23 - 28 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

2 结果

2.1 皱纹盘鲍和细菌凝集性的证明

为了探讨鲍的免疫机制以及能否采用免疫方法来防治皱纹盘鲍的脓疱病, 进行了体外吞噬和凝集反应实验。

2.1.1 血淋巴细胞具吞噬功能 皱纹盘鲍血淋巴细胞体外吞噬脓疱病病原菌(河流弧菌-Ⅱ)的实验结果表明, 杆状和短杆状的病原菌数量很多, 特别是在血淋巴细胞的周围, 细菌更多。血淋巴细胞有三种, 且均具有吞噬的功能。有的血淋巴细胞伸出伪足样结构吞噬病原菌, 有的细菌已被吞到血细胞内(图版 I:1—4)。

2.1.2 河流弧菌-Ⅱ具抗原性 病原菌的抗原性实验结果显示, 皱纹盘鲍血淋巴可与河流弧菌-Ⅱ产生环状沉淀, 即可以产生凝集反应, 说明该病原菌具有抗原性(见表 1)。

表 1 河流弧菌-Ⅱ与皱纹盘鲍血清的凝集反应结果

Tab.1 The result of agglutinin of *Haliotis discus hannai* serum mixed with *Vibrio fluvialis*-Ⅱ

试管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	对照
鲍血清(μl)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
抗 稀释倍数	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	生理盐水(2%)
原 用量(μl)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
结 果	++++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

鲍血清的效价为 16。++++, 沉淀环极明显; +++, 沉淀环很明显; ++, 沉淀环较明显; +, 沉淀环明显; -, 无沉淀环。

2.2 皱纹盘鲍人工免疫结果

通过对一龄鲍和稚鲍的免疫实验发现, 弱毒苗组的效果比菌苗组的效果好, 可提高存活率 6%—20%。成鲍组中两种菌苗的效果无差别。成鲍、一龄鲍、稚鲍免疫实验后存活率见表 2。

3 讨论与结论

3.1 免疫法可防治皱纹盘鲍的细菌病

根据作者多年来对鲍养殖的实际考察, 病原菌最多的是夏季, 其在水中的浓度为 $10^2 -$

10^4 cell / ml, 而本实验细菌感染数量为 0.2×10^8 cell / 鲍, 相当于 0.5×10^9 cell / ml, 这个数字远远大于自然界中鲍病原菌数的几万到十几万倍, 在这样多的病原菌存在的情况下, 鲍都有良好的免疫力, 在生产实际中免疫效果会更好。由此可见, 用免疫法防治皱纹盘鲍的细菌病是可行的。

表 2 皱纹盘鲍免疫实验后的存活率 (%)

Tab.2 The survival rate of *Haliotis discus hannai* after immune experiment with *Vibrio fluvialis*-II

组 别		天 数				
		1	2	3	5	7
成 鲍	对照组	80	80	80	70	50
	菌苗组	100	100	100	100	100
	弱毒苗组	100	100	100	100	100
一 龄 鲍	对照组	80	70	50	30	20
	菌苗组	100	100	100	80	80
	弱毒苗组	100	100	100	100	100
稚 鲍	对照组	88	67	52	31	20
	菌苗组	100	97	90	86	84
	弱毒苗组	100	100	100	97	90

3.2 经过免疫的稚鲍可明显提高成活率

在稚鲍的免疫研究中, 第三组稚鲍是来自母体免疫的, 即亲鲍经过菌苗的注射(见成鲍免疫组)后正常产卵, 排精并结合而发育成稚鲍。经过口服 30d 菌饵后, 本应继续投喂活菌饵来检验免疫力增强情况。但在做人工感染实验时发现, 口服活菌饵不能使正常鲍患脓疱病而死亡(李太武等, 1997)¹⁾。故表内的统计数字是未投活菌饵而大批死亡时的记录(时值稚鲍死亡高峰期)。从表 2 结果可见, 经过免疫的稚鲍(7d)可提高成活率 64%—70% (用实验组成活率减去对照组成活率之差为免疫后提高的成活率)。而母体免疫几乎没有效果, 这说明鲍类的免疫系统是低等的。从实验结果可看出, 免疫法明显降低稚鲍的死亡率, 应大面积推广应用。

3.3 皱纹盘鲍的免疫机理研究

对无脊椎动物免疫机理的研究很少, 而鲍免疫的研究至今未见报道。一般认为无脊椎动物不产生抗体, 对抗原的刺激主要表现为吞噬及炎症反应(叶孝经, 1990; 杨廷彬, 1994)。对虾无抗体, 鲍是比对虾低等的动物, 只能用血淋巴细胞的吞噬作用和排除抗原作用的非特异性免疫。从体外吞噬的血涂片和常规血涂片上可以确定, 鲍的血淋巴细胞有三种, 都有吞噬细菌的能力。为此可以说明, 鲍的血淋巴细胞有吞噬外来抗原的作用, 同时也证明了该病原菌具有免疫原性和反应原性。以它作为抗原同已注射菌苗和正常非注射的鲍的血清产生了凝集反应, 非注射的只在未稀释的抗原反应组内产生了环状沉淀, 而注射的鲍血清效价为 16, 比非注射的高了 5 个数量级(Fu Lin et al., 1993;

1) 李太武等, 1997, 大连地区脓疱病的研究, 水产学报。(待发表)

Marnita et al., 1994)。可见在外源抗原的诱导下, 鲍的血清内产生了更多的凝集因子(凝集素)(高健等, 1992), 这类凝集素无疑有助于机体消灭来自血淋巴系统的入侵生物体。这类凝集素的结构及其形成过程正在研究之中。凝集反应也说明鲍类具有体液免疫因子(王亚辉, 1982; 王雷等, 1992), 鲍类的体液免疫有待进一步的研究探讨。鲍类血液是否也产生抗菌肽类物质(姜玉香, 1988; 梁世德, 1994), 正在研究之中。软体动物内部防御或称为免疫系统是由细胞免疫和体液免疫两部分构成的。在四种防御细胞类型中, 血细胞是最重要的。体液免疫部分是由多因子构成的, 大多因子都由血细胞产生。软体动物以分解酶作为细胞毒素去降解(在细胞外或吞噬小体内)侵入体内的外源生物(Adema et al., 1991)。

参 考 文 献

- 王亚辉, 1982, 分子免疫学, 科学出版社(北京), 511—512。
王雷等, 1992, 海洋科学, 3: 18—19。
叶孝经, 1990, 海洋水产研究丛刊, 32: 13—18。
刘金屏等, 1995, 中国水产科学, 2(2): 78—84。
张颖悟, 1990, 临床微生物学(下), 大连出版社(大连), 558—572。
杨廷彬等, 1994, 实用免疫学, 长春出版社(长春), 7—29。
姜玉香, 1988, 海洋科学, 6: 67—68。
高 健等, 1992, 水产养殖, 6: 21—23。
梁世德等, 1994, 海洋科学, 6: 30—31。
Adema, C. M., Knaap, W. P. W. van der, Sminia, T., 1991, *Rev. Aquat. Sci.* 4(2—3): 201—223。
Fu Lin Chu, E. and Peyer, J. F., 1993, *J. Shellfish Research*, 12(1): 21—27。
Marnita, M., Chintala, Susan E. et al., 1994, *J. Shellfish Research*, 13(1): 115—121。

IMMUNOLOGICAL STUDIES ON *HALIOTIS DISCUS HANNAI* WITH *VIBRIO FLUVIALIS*—II

Li Taiwu

(Department of Biology, Liaoning Normal University, Dalian 116029)

Ding Mingjin

(Aquacultural Company of Dalian, Dalian 116023)

Xiang Jianhai, Liu Ruiyu

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract Various anti-fibrosis vaccines for cultured abalone were examined in these studies on the immune response of abalone *Haliotis discus hannai* against *Vibrio fluvialis*—II by phagocytosis *in vitro*, agglutination reaction. Experimental abalones were obtained in 1993 from the farm of the Aquacultural Company of Dalian. *Vibrio fluvialis*—II strain was used to prepare immunogen and reactive antigen. The strain was originally isolated from the diseased abalone supplied by the Aquacultural Company of Dalian and Aquacultural Company of the Pacific Ocean from 1993 to 1995. The strain was incubated at 37 °C for 12—16h in medium of sea water and tryptone (SWT) supplemented with 2% NaCl. Hemolymph (40 μ l) from (an aperture made by a sterile needle in the abalone) heart was mixed with 20 μ l heparin and 20 μ l *Vibrio fluvialis*—II, incubated in a moist box at 37 °C for 35min, and then stained for taking photographs of the agglutination reaction, the diluted to twice the volume *Vibrio fluvialis*—II solution was put into 12 glass tubes respectively. A 13th tube held physiological saline (2% NaCl) solution for producing the interface between the abalone serum and the bacteria solution. The tube in which the interface produced a white precipitation ring showed agglutination reaction. The vaccine (the above—obtained *Vibrio fluvialis*—II) washed down from the medium with the use of 0.1%—1.0% formalin for 24—120h was centrifuged at 3 000—4 000r /min for 5min, then washed another 2—3 times with physiological saline (PS) and centrifuged as above. The precipitated bacteria were suspended in the PS at a concentration of 10⁴—10¹¹cell /ml. The results showed after oral ingestion (0.3—6 \times 10⁸cell /g) or injection (6.4—19.4 \times 10⁸cell /each abalone) of the vaccine, the survival rate of the juvenile, one-year-old, and adult abalone could reach to 70%, 80% and 50% respectively. The abalone had three kinds of leucocytes, or cells phagocytototic to *Vibrio fluvialis*—II. The serum of the abalone have more agglutinin (1 /16) after the abalone was injected with vaccine made from *Vibrio fluvialis*—II.

Key words *Haliotis discus hannai* Immunology *Vibrio fluvialis*—II Pustule disease