

养殖鱼类细菌性败血症的菌苗制备技术

陈月英 钱 冬 沈智华 沈锦玉 曹 铮 尹文林 张念慈

(浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001)

摘 要 选择对养殖鱼类致病的嗜水气单胞菌强毒株, 用福尔马林以 0.05% ~ 1.0% 的 6 个浓度及 4、25 和 63℃ 等 3 种温度灭活制成菌苗, 进行安全性和免疫保护试验。结果表明: 福尔马林的最佳灭活浓度为 0.05% ~ 0.2%, 浓度过高会影响菌苗的抗原性和对鲫的安全性; 灭活温度以 4℃ 明显优于 63℃。

用 0.15% 福尔马林灭活嗜水气单胞菌的胞外产物 (ECP), 25℃ 需 4 天以上, 4℃ 需 7 天以上, 62℃ 2 小时即可灭活, 不加福尔马林 62℃ 热处理 2 小时不能彻底灭活。

用嗜水气单胞菌全菌苗及菌体超声波破碎苗腹腔注射免疫鲫, 全菌苗免疫保护率为 100%, 破碎菌体保护率为 80%; 比较全菌苗、胞外产物苗和菌细胞苗的免疫效果, 以全菌苗最佳, 胞外产物苗腹腔注射免疫效果与菌细胞苗相近, 而浸泡免疫效果则优于菌细胞苗; 嗜水气单胞菌脂多糖 (LPS) 苗腹腔注射免疫保护率最高, 可达 100%。

全菌苗在 4℃ 保存 6 个月后, 含 0.15% 和 0.2% 福尔马林的制品免疫保护率分别降低 20.6% 和 26.2%, 而含 0.05% 及 0.1% 福尔马林的制品免疫保护率降低 50% 以上, 且 0.05% 组还出现少量絮状物, 表明过低的福尔马林浓度不利于菌苗的长期保存。

关键词 养殖鱼类, 细菌性败血症, 菌苗免疫, 制备技术

淡水养殖鱼类细菌性败血症主要危害对象是鲢、鳙、鲫和团头鲂等品种。从病鱼中已分离到多种强毒力菌株 [陈怀青等, 1991; 孙其焕等, 1991; 徐伯亥等, 1991、1993; 沈锦玉等, 1993; 何顺华等, 1993; 翟子玉等, 1993]。其中以嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 最为普遍, 该菌可引起鱼的败血症, 并且存在着不同的血清型。该病危害多种养殖鱼类, 特别是鲢和鳙等滤食性鱼类, 通常以浮游生物为食, 对人工投喂的饲料摄食不多, 加上湖泊和水库等大水体也普遍发生该病, 这给药物防治工作带来困难。因此, 菌苗免疫不失为预防或控制该病的发生或流行的有效途径。

关于鱼用菌苗的研制, 国外已有报道 [陈胜香, 1993; 徐海德等, 1992]。国内最早有草鱼细菌性肠炎、烂鳃和赤皮三种病的病鱼肝脾肾组织浆灭活苗 (又称土法疫苗) 的报道 [湖北省水生生物研究所鱼病研究室, 1975]。近年来又有这三种病原菌的三联苗 [郑国凤, 1993]。其他鱼用菌苗的报道不多。

菌苗通常由选定病原菌经扩大培养后灭活而成。菌株的选择、培养条件及菌苗的灭活对保证菌苗的有效性均很重要。随着细菌性败血症研究的深入, 对引起该病的嗜水气单胞菌的主要血清型及培养条件等均有报道 [钱 冬, 1995; 陈怀青, 1993]。本文着重报道病原菌的灭活方法、影响菌苗抗原性的因素、菌苗的安全性及保存期的研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种:选用对鱼体有较强毒力的嗜水气单胞菌等5个菌株。供试鱼:本所实验鱼场专塘培育的1~2龄健康鲫。

1.2 福尔马林最小抑菌浓度的测定

采用倍比稀释法。

1.3 细菌培养物的灭活

细菌接种于营养肉汤,30℃振荡培养24h,培养物中加入福尔马林使其浓度分别为0.05%、0.1%、0.15%、0.20%,置于4、25、63℃中灭活,定期取样接种培养液中测定细菌存活情况;另取培养物6000rpm离心30分钟取上清,为胞外产物(ECP),沉淀物为菌细胞。同上灭活,定期取样,腹腔注射健康鲫,检查上清对鱼体毒力。

1.4 菌苗的安全性试验

灭活菌苗以0.5ml/尾腹腔注射鲫或倍量浓度浸泡鲫、鲢等0.5~1小时,实验鱼暂养于水泥池中1周,观察鱼的存活情况。

1.5 菌苗免疫保护率的测定

不同方法灭活的菌苗,以0.5ml/尾腹腔注射免疫健康鲫,对照为培养液。水温20℃以上饲养观察3周左右,用活菌攻击,连续观察1周,记录死鱼数。

1.6 脂多糖(LPS)免疫保护率的测定

细菌培养物6000rpm离心30分钟,取菌体用酚-水法[Westphal等,1965]提取脂多糖粗提物。分别以0.2ml/尾腹腔接种及1:50浸泡免疫鲫,二周后以活菌攻击,测定免疫保护率。

1.7 菌体的破碎和免疫

用超声波(输出功率为50kW)处理细菌培养物15分钟,使培养物由混浊转为基本透明,用福尔马林灭活后浸泡免疫鲫,测定免疫保护率。

1.8 菌苗的保存期

将福尔马林浓度分别为0.05%、0.10%、0.15%和0.20%的菌苗保存于4℃和室温中,定期取样,测定免疫保护率。

2 实验结果

2.1 福尔马林的最小抑菌浓度(MIC)

5个菌株对福尔马林的敏感性见表1。由表可见,5个菌株对福尔马林的敏感性不尽相

同,其中以1号、2号、5号菌最为敏感, MIC为61mg/L;4号菌为61~244.2mg/L,3号菌为976.6mg/L,相当于0.1%。表明制备菌苗时,福尔马林浓度不宜低于0.1%。

表1 福尔马林的最小抑菌浓度(MIC)

Table 1 Minimum inhibitory concentration (MIC) of formalin to bacteria

菌株	福 尔 马 林 浓 度 (mg/L)						
	15625	3906.3	976.6	244.1	61.04	15.3	3.82
1	-	-	-	-	-	+	+
2	-	-	-	-	-	+	+
3	-	-	-	+	+	+	+
4	-	-	-	-	±	+	+
5	-	-	-	-	-	+	+

2.2 细菌培养物的灭活

以0.05%~0.2%的福尔马林灭活细菌培养物,检查细菌存活情况:细菌在63℃下1小时即可灭活;在25℃中需经24小时才能灭活;4℃24小时只有含0.2%福尔马林组被灭活,其余需经2天后才能灭活(表2)。由上表明,菌细胞的灭活时间和所处理温度与福尔马林浓度成反比。

表2 不同温度和福尔马林浓度对菌细胞的灭活

Table 2 Bacteria inactivation with series concentrations of formalin at different temperature

福尔马林 浓度(%)	63℃		25℃			4℃		
	1h	2h	1h	24h	48h	1d	2d	3d
0.05	-	-	+	-	-	+	-	-
0.10	-	-	+	-	-	+	-	-
0.15	-	-	+	-	-	+	-	-
0.20	-	-	+	-	-	-	-	-

细菌胞外产物(ECP)经0.15%福尔马林脱毒处理后腹腔注射接种健康鲫,结果见表3。由ECP对鱼体的毒力试验表明,ECP经62℃处理2小时可以灭活,25℃则需24小时,而4℃则需7天才能灭活。

表3 细菌胞外产物(ECP)的灭活(鱼体毒力%)*

Table 3 Virulence of ECP to fish after inactivation

灭活 时间	灭活温度(℃)				对照***
	63	63**	25	4	
2h	0.0	0.0	ND	ND	
1d	0.0	0.0	0.0	50.0	100.0
4d	ND	ND	0.0	30.0	66.7
7d	ND	ND	0.0	0.0	60.0

注:* ECP以0.5ml尾腹腔接种鱼体,以死亡率(%)表示毒力; ** 不加福尔马林对照; *** 不灭活对照;ND未做。

2.3 福尔马林对菌苗抗原性的影响

福尔马林不同浓度灭活的菌苗,腹腔注射免疫鲫,三周后用活菌攻击,测定免疫保护率;灭

活浓度为 0.05% 和 0.10% 的菌苗免疫保护率为 83.2% 和 80%；浓度为 0.15% 和 0.20% 保护率分别为 73.3% 和 60%。上述结果表明,福尔马林浓度较高会影响菌苗的抗原性(表 4)。灭活浓度为 0.5% 和 1.0% 的菌苗腹腔接种后,受试鱼均发生急性中毒死亡,在 24h 内的死亡率,前者为 90%,后者为 100%。表明福尔马林浓度过高还会影响鲫的安全性。

表 4 福尔马林对菌苗抗原性的影响

Table 4 Effects of formalin on bacterin immunogenicity

福尔马林浓度(%)*	0.05	0.10	0.15	0.20	对照
死亡鱼数/试验鱼数	3/17	3/15	4/15	6/15	15/15
免疫保护率(%)	82.3	80.0	73.3	60.0	-

注: * 灭活温度为 4℃

2.4 温度对菌苗抗原性的影响

用 0.15% 福尔马林和不同温度下的灭活菌苗,测定鱼的免疫保护率。结果如表 5 所示:不同温度灭活的菌苗免疫保护率不同,4℃ 为 82.3%,63℃ 灭活的菌苗保护率仅 29.4%。表明 63℃ 对菌苗的抗原性有影响,菌苗灭活温度以 4℃ 为好。

2.5 ECP 苗、菌细胞苗和全菌苗的免疫效果

将 ECP 苗、菌细胞苗和全菌苗分别以腹腔注射和浸泡 2 种途径接种免疫鲫。21 天后,用活菌腹腔接种攻击;ECP 苗 2 种免疫途径的保护率均为 60%;菌细胞苗腹腔接种的免疫保护率为 66.7%,而浸泡免疫则为 33.3%;全菌苗腹腔接种的免疫保护率为 80%,浸泡免疫 66.7% (表 6)。

表 5 温度对菌苗抗原性的影响

Table 5 Effects of temperature on bacterin immunogenicity

温度(℃)	4	25	63	对照
死亡鱼数/试验鱼数	3/17	5/17	12/17	17/17
免疫保护率(%)	82.3	70.6	29.4	-

表 6 ECP 苗、菌细胞苗和全菌苗的免疫效果比较

Table 6 Comparison of efficiency between ECP, whole-cell bacterin and ECP plus whole-cell bacterin

疫苗类别 免疫接种途径	ECP 苗		菌细胞苗		全菌苗		对 照
	浸泡	注射	浸泡	注射	浸泡	注射	
死亡鱼数/试验鱼数	6/15	6/15	10/15	5/15	5/15	3/15	15/15
免疫保护率(%)	60.0	60.0	33.3	66.7	66.7	80.0	0.0

2.6 脂多糖(LPS)的免疫效果

脂多糖粗提物 1:5 稀释后以 0.2ml/尾腹腔注射免疫鲫或 1:50 稀释浸泡免疫鲫,16 天后测免疫保护率;注射免疫组保护率为 100%;浸泡免疫组为 17%。

2.7 超声波破碎菌苗的免疫效果

将全菌培养物用超声波破碎处理 15 分钟后,制成福尔马林灭活苗,浸泡免疫鲫。21 天后测定免疫保护率;超声波破碎菌苗的免疫保护率为 80%,而未用超声波破碎的同批全菌苗免疫保护率为 100%。

2.8 菌苗的保存期

将菌苗分别于当月、第三个月和第六个月取样免疫鲫,测定免疫保护率,结果由表 7 可见:菌苗在 4℃ 保存一个月后,4 种菌苗的免疫保护率均为 80% 以上;在室温保存三个月后,福尔马林浓度为 0.15% 的菌苗免疫保护率为 75.0%;4℃ 保存 6 个月后,0.15% 和 0.2% 福尔马林的菌苗组免疫保护率分别为 72.7% 和 66.7%,0.05% 和 0.10% 福尔马林组均已明显失去抗原性,特别是含 0.05% 福尔马林的菌苗中已有少量絮状物出现;室温保存 6 个月的菌苗,免疫保护率仅为 20%。上述结果表明:0.15% ~ 0.20% 的福尔马林更有利于菌苗的长期稳定保存。

表 7 菌苗保存中的免疫保护率测定

Table 7 Tests of immunogenicity of bacterin after storage

温度	福尔马林 浓度(%)	免疫保护率		
		1个月	3个月	6个月
4℃	0.05	80.0	ND	28.6
	0.10	80.0	ND	30.0
	0.15	93.3	100	72.7
	0.20	92.9	ND	66.7
25℃(室温)	0.15	93.3	75.0	20.0

3 讨论

菌苗的灭活方法是影响菌苗有效性的一个重要因素,通常多采用 0.5% ~ 1.0% 福尔马林,63℃ 灭活菌苗。近年来有作者提出较为温和的灭活条件更利于抗原性得到保护[杨先乐, 1989]。作者选择养殖鱼类细菌性败血症的嗜水气单胞菌强毒株制备菌苗,研究了灭活方法的影响,结果表明:制备菌苗时,选择 0.15% ~ 0.2% 福尔马林(V/V)及 4℃ 灭活既能有效地灭活菌苗,又可使其免疫原性不受影响。过高的福尔马林浓度及灭活温度会破坏菌体的抗原性,影响菌苗的有效性,且过高的福尔马林也不利于菌苗的安全使用。菌体一般在 0.2% 福尔马林浓度下,4℃、24h 即可灭活,而 ECP 的灭活则需 1 周才能彻底脱毒。因此,全菌苗制备后,应在 4℃ 灭活一周以上再使用。目前这种方法已用于菌苗的制备中。

比较全菌苗、菌细胞苗和 ECP 苗对鲫的免疫效果,以全菌苗为最佳,注射和浸泡免疫保护率分别为 80% 和 66.7%,单纯 ECP 苗和菌细胞苗均有免疫保护作用,但不及全菌苗。嗜水气单胞菌 ECP 的主要成份是气溶素(又称 HEC 毒素[涂小林, 1992])和胞外蛋白酶等,这些成份在细菌对鱼的致病过程中起重要作用,此外,各种不同的气单胞菌产生的 ECP 抗原结构上有极大的同源性,因此,采用 ECP 和菌细胞的全菌苗,不但有利于鱼体产生更强的免疫力,还可使鱼获得对不同菌株的交叉抵抗力。这类菌苗在灭鲑气单胞菌引起的疔疮病菌苗制备中也有报导,并认为有较好的效果[Rodgers 等, 1985; Cipriano 等, 1983]。

作者还研究了菌苗的保存条件。菌苗中的福尔马林浓度及保存温度对菌苗的稳定保存有很大影响;过低的福尔马林浓度更易使菌苗的免疫原性在保存中逐步丧失,甚至还有絮状物出现,显然不利于菌苗的长期稳定保存;0.15%~0.2%的福尔马林,可使菌苗在室温中保存近三个月,4℃中保存半年。能否保存更长的时间,还在进一步实验中。作为浸泡免疫用的鱼用菌苗,由于其本身价格低廉,因此没有采用冻干等方法来获得更高的稳定性,这一点不同于人兽用的菌苗制备。

参 考 文 献

- [1] 孙其焕等,1991.异育银鲫溶血性腹水病病原的研究.水产学报,15(2):130~139.
- [2] 杨先乐,1989.鱼类免疫学研究的进展.水产学报,13(3):271~284.
- [3] 陈怀青等,1991.家养鲤科鱼暴发性传染病的病原研究.南京农业大学学报,14(4):87~91.
- [4] 陈怀青等,1993.培养条件对嗜水气单胞菌HEC毒素产量的影响.南京农业大学学报,16(增刊):85~87.
- [5] 何顺华等,1993.白鲢出血病病原菌的鉴定.水产科技情报,20(2):75~77.
- [6] 陈胜香,1993.水产用疫苗的使用情况与效果.养鱼世界(台湾),(8):59~63.
- [7] 沈锦玉等,1993.浙江省养殖鱼类暴发性流行病病原的研究;I.嗜水气单胞菌的分离、致病性及生理生化特性.科技通报,(6):397~401.
- [8] 郑国风等,1993.草鱼“三病”多联灭活疫苗注射防病试验报告.水利渔业,63(2):15~16.
- [9] 涂小林等,1992.嗜水气单胞菌毒素的提纯及其特性分析.微生物学报,32(6):432~438.
- [10] 徐伯亥等,1991.鲢、鳙鱼一种新的传染病——*Yersinia ruckeri*,一种新的鲢、鳙鱼病原菌.科学通报,(8):620~622.
- [11] 徐伯亥等,1993.淡水养殖鱼类暴发性传染病致病细菌的研究.水生生物学报,17(3):259~265.
- [12] 徐海德等,1992.国外鱼类疫苗研究进展.国外水产,(4):1~4.
- [13] 钱冬等,1995.引起鱼类暴发性流行病的嗜水气单胞菌的血清型、毒力及溶血性.微生物学报,35(6):460~464.
- [14] 湖北省水生生物研究所鱼病研究室,1995.鱼病防治手册,64~70.科学出版社(京).
- [15] 翟子玉等,1993.团头鲂、鲫鱼出血性败血病的研究.水产科技情报,20(3):105~108.
- [16] Cipriano, R. C. *et al.*, 1983. Immunization of salmonids against the fish pathogen, *Aeromonas salmonicida*. *J. World Maricul. Soc.*, 14:201~211.
- [17] Rodgers, C. J. *et al.*, 1985. *Fish Immunology*, ed. M. J. Manning *et al.*, London: Academic Press, PP. 185~194.
- [18] Westphal, O. *et al.*, 1965. Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure, 83~91. By R. L. WHISTLER *et al.*, “Methods in carbohydrate chemistry”, Vol. 5, Academic Press, New York.

PREPARATION OF BACTERIN FOR FISH BACTERIAL SEPTICEMIA

Chen Yueying, Qian Dong, Shen Zihua, Shen Jinyu, Cao Zhen, Yin Wenlin and Zhang Nianci
(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001)

ABSTRACT The virulent strains of *Aeromonas hydrophila* were inactivated with formalin at a series of concentrations ranged from 0.05% ~ 1.0% at 4°C, 25°C and 63°C. The safety and immunogenicity were tested by crucian carp immunized with the various formalin-treated bacterin. The results show that the optimal concentration of formalin is 0.05% ~ 0.2%. High concentrations of formalin would destroy the immunogenicity of bacterin and would also be dangerous to the fish. It is better to treat the bacterin at lower temperature. The ECP of Ah can be inactivated with 0.15% formalin in two hours at 62°C, or in two days at 25°C and seven days at 4°C.

The crucian carp was immunized with inactive bacterial cell, ECP or both of them, respectively. The relatively survival percent (RSP) was tested with immunized fish challenged with virulent Ah strain. The bacterin containing both is most effective either in injection immunization or in bath immunization. The ECP is as effective as the bacterial cell in injection but it is better than the later in bath. The RSP of crude LPS in injection immunization is 100%. The bacterin treated with ultrasonic wave is less effective than the whole cell.

The bacterin was tested for RSP after being stored for six months at different concentrations of formalin. The bacterin treated with 0.15% and 0.2% formalin lost 20.6% and 26.2% RSP, respectively during storage. And the bacterin with 0.05% and 0.1% formalin lost 50% RSP.

The results indicate that the immunogenicity of bacterin would be partly destroyed during storage at low formalin concentration.

KEYWORDS Fish bacterial septicemia, Immunization, Bacterin