

溶藻弧菌疫苗对黑鲷的免疫效果研究

王海芳¹, 孙际佳¹, 赵典惠¹, 赵会宏¹, 刘丽¹, 檀永利¹, 李桂峰²

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 中山大学 生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要:用溶藻弧菌 1.1587 制备全细胞、全细胞 + 弗氏完全佐剂 (FCA)、脂多糖 (LPS) 3 种疫苗, 疫苗经腹腔对黑鲷进行免疫注射, 分别在第 7、14、28、56 d 采鱼血, 检测抗体效价、白细胞吞噬活力、溶菌酶活力、SOD 活力和抗菌活力; 第 28 d 用 5.5×10^8 cfu/mL 的溶藻弧菌悬液进行攻毒试验来比较疫苗的免疫效果。结果表明: 抗体凝集效价在 28 d 达到最高值, 免疫组 2 显著高于免疫组 1 和免疫组 3 ($P < 0.05$); 白细胞吞噬百分数和吞噬指数 28 d 达到最高值, 3 个免疫组都显著高于对照组 ($P < 0.05$); 免疫组 1 和免疫组 2 溶菌酶活力在 28 d 达到最高值, 显著高于对照组 ($P < 0.05$); SOD 活力在 28 d 达到最高值, 免疫组 1 和免疫组 2 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。3 种疫苗对黑鲷攻毒后 20 d 的免疫保护率分别为 71.4%、85.7%、71.4%。全细胞 - FCA 疫苗对黑鲷的免疫效果最好。

关键词:溶藻弧菌; 疫苗; 黑鲷; 免疫保护率

中图分类号: S942.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)01-0097-04

Studies on the Vaccination Against *Vibrio alginolyticus* in Farmed Marine *Sparus macrocephalus*

WANG Hai-fang¹, SUN Ji-jia¹, ZHAO Dian-hui¹, ZHAO Hui-hong¹, LIU Li¹, TAN Yong-li¹, LI Gui-feng²

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: *Sparus macrocephalus* were vaccinated with a formalin-killed whole-cell vaccine, a whole-cell with Freund's Complete Adjuvant (FCA) vaccine and a lipopolysaccharide vaccine (LPS) isolated from *Vibrio alginolyticus* via intraperitoneal injection, respectively. Antibody titers, leucocyte phagocytosis, lysozymes, superoxide dismutase and bactericidal activity were examined on 7th, 14th, 28th, 56th d after first-vaccination. A dosage of 0.2 mL of *Vibrio alginolyticus* 5.5×10^8 cfu/mL was intraperitoneally injected to the vaccinated fish to evaluate the protective efficiency of the vaccine. The results indicated that: the antibody titers was the highest on 28 d, immunized group 2 was higher significantly than immunized group 1 and 3 ($P < 0.05$); The phagocytic percentage (PP) and phagocytic index (PI) were highest on 28 d, and three immunized groups showed significant difference when compared with the control group ($P < 0.05$); Lysozyme of immunization groups 1 and 2 were the highest on 28 d, and showed significant difference compared with control group ($P < 0.05$); SOD was the highest on 28 d, and immunization groups 1 and 2 were higher significantly than the control group ($P < 0.05$). 20 d after challenge with *Vibrio alginolyticus*, the relative percentage survival (RPS) values were 71.4%, 85.7%, 71.4%, respectively. It showed that the vaccination of a whole-cell with FCA vaccine was the best of all.

Key words: *Vibrio alginolyticus*; vaccination; *Sparus macrocephalus*; relative percentage survival

在我国乃至全球大多数国家的水产养殖中, 对养殖生物病害防治所采用的主要手段仍然是抗生素等化学药物, 这些化学药物既严重影响了养殖鱼类

的产品质量, 又对养殖水域的生态环境造成了严重污染。因此, 开展水产养殖动物免疫防病的研究, 以及通过研究开发预防水产病害的相关疫苗产品, 在

养殖生产中具有十分重大的意义. 黑鲷 *Sparus macrocephalus*, 属杂食性, 生命力强, 对盐度和温度的适应范围较广, 是海水养殖的优良品种之一. 近年来, 随着其养殖规模和数量的不断增加, 黑鲷的发病率也越来越高^[1-2]. 溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus* 是海水鱼类弧菌病中危害最大的病原菌之一, 常给水产养殖业造成巨大的经济损失. 已有一些学者利用溶藻弧菌疫苗接种海水鱼, 从而达到防治疾病的目的^[3-5]. 本试验研究了黑鲷对溶藻弧菌全细胞疫苗、全细胞 + 弗氏完全佐剂 (FCA) 疫苗和脂多糖 (LPS) 疫苗的免疫应答, 从黑鲷的非特异性和特异性免疫功能及对人工攻毒的免疫保护率等方面对疫苗的免疫效果进行评价, 旨在为溶藻弧菌疫苗的开发和应用提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 试验鱼及饲养条件

试验鱼: 黑鲷, 取自广东省阳江港口海水鱼排. 体长 8 ~ 10 cm, 体质量 18 ~ 25 g. 于饲养池中正常饲养, 每天投喂 2 次. 连续饲养 1 周后选择健康、无病患体征的鱼进行试验. 海水密度为 3.0×10^4 kg/L.

1.2 疫苗的制备

1.2.1 细胞疫苗制备 将溶藻弧菌 1.1587 (购自中国科学院微生物研究所) 接种在 2216E 固体培养基上, 28 °C 培养 24 h, 以灭菌生理盐水洗脱, 加入等体积的福尔马林 (5 mL/L) 于 28 °C 灭活 48 h, 离心收集沉淀, 灭菌生理盐水洗 3 次, 最后用生理盐水制备成全细胞灭活疫苗. 疫苗 A: 细菌浓度为 3×10^8 cfu/mL; 疫苗 B: 细菌浓度为 3×10^8 cfu/mL, 加 FCA (Sigma 公司). 分别做灭活检验和安全性检验.

1.2.2 脂多糖疫苗制备 溶藻弧菌 LPS 的提取按照 Westphal 等^[6]的方法进行.

疫苗 C: 用灭菌生理盐水配制 3 mg/mL LPS 疫苗并于 65 °C 水浴 30 min, 去除其毒性.

1.3 黑鲷的免疫和血清的制备

试验鱼随机分为 4 组. 免疫组分别接种疫苗 A、疫苗 B 和疫苗 C, 注射剂量为 0.2 mL/尾; 对照组注射相同剂量的灭菌生理盐水. 1 周后, 各试验组同法加强免疫 1 次, 其中组 2 只注射疫苗 A, 不加佐剂. 分别于首次免疫后的第 7、14、28、56 d 各取 5 尾, 进行尾静脉采血. 每尾鱼采集的血液分成 2 份, 一份用柠檬酸三钠 (32 g/L, $V_{\text{柠檬酸三钠}}:V_{\text{血液}} = 1:9$) 抗凝, 用于检测白细胞吞噬活力; 另一份室温下静置 2 ~ 3 h 后, 再于 4 °C 静置 3 h, 离心收集血清, 分装, -20 °C 保存. 用于凝集抗体效价和非特异性免疫指标的测定.

1.4 免疫指标的测定

1.4.1 血清凝集抗体效价测定 采用 96 孔血凝板, 用微量凝集反应测定抗体效价, 抗原采用灭活的 10×10^9 cfu/mL 溶藻弧菌菌悬液.

1.4.2 血液白细胞吞噬功能测定 取 0.1 mL 抗凝血, 加 30 μ L 1×10^9 cfu/mL 的热灭活嗜水气单胞菌, 室温下放置 1 h, 期间每隔 10 min 摇动混合液 1 次. 吸取混合液制成血涂片, 自然风干, 甲醇固定, 吉姆萨染色, 油镜观察计数, 数 100 个吞噬白细胞. 计算吞噬百分数 (PP) 和吞噬指数 (PI).

$$PP = 100 \text{ 个白细胞内参与吞噬的细胞数} / 100 \times 100\%;$$

$$PI = 100 \text{ 个白细胞内吞噬细菌的总数} / 100 \times 100\%.$$

1.4.3 血清溶菌酶活力测定 根据王雷等^[7]的方法. 在 37 °C, 波长为 576 nm 下, 每分钟光密度下降 0.001 个单位的酶量定为 1 个活力单位 U.

1.4.4 血清 SOD 活力的测定 采用南京建成生物工程研究所的试剂盒进行测定. 在波长为 550 nm 下, SOD 抑制氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 光还原相对百分率为 50% 时的酶量作为 1 个酶活力单位 (U), 结果用 U/mL 表示.

1.4.5 血清抗菌活力测定 根据王雷等^[7]的方法. 在 37 °C, 波长为 576 nm 下, 每分钟光密度下降 0.001 个单位的酶量定为 1 个活力单位 U.

1.5 免疫保护力的测定

在第 1 次免疫接种后的第 28 d, 各组分别取试验鱼 10 尾, 腹腔注射培养 24 h 新的鲜活菌液 0.2 mL/尾 (5.5×10^8 cfu/mL). 攻毒后正常饲养, 连续观察 20 d, 统计死亡率. 按下式计算溶藻弧菌疫苗对黑鲷的相对免疫保护率 (RPS).

$$RPS = \left(1 - \frac{\text{免疫组死亡率}}{\text{对照组死亡率}}\right) \times 100\%.$$

1.6 数据的统计分析

除凝集抗体效价和攻毒试验数据外, 其他数据均采用 SPSS13.0 进行邓肯氏检验, 用平均数 $\pm$ 标准误差表示.

2 结果与分析

2.1 黑鲷的血清凝集抗体效价测定结果

表 1 显示, 血清凝集抗体效价在注射免疫后 8 周内, 免疫组呈现先上升然后又下降的趋势, 其中免疫组 2 在加强免疫后, 产生抗体最快, 在 28 d 达到了最高值, 显著高于免疫组 1 和免疫组 3 ($P < 0.05$). 而对照组在整个试验期内始终维持在 4 的水平.

表 1 溶藻弧菌免疫黑鲷后血清凝集抗体效价的变化¹⁾Tab.1 Comparison of antibody titer after immunization by *Vibrio alginolyticus* on *Sparus macrocephalus*

免疫组 immunization group	7 d	14 d	28 d	56 d
1	16a	55.7b	147b	97b
2	24.2b	114.2b	337.8c	168.9b
3	18.4a	73.5b	168.9b	84.4b
对照 control	<4a	<4a	<4a	4a

1) 同列数据后,具不同字母者,示差异显著($P < 0.05$, 邓肯氏检验)

2.2 黑鲷血液白细胞吞噬功能结果

表 2 显示,初次免疫后前 4 周,免疫组 2 和免疫组 3 的 PP 和 IP 始终维持在一个较高水平,显著高于对照组($P < 0.05$);第 56 d 时,各试验组差异不显著($P > 0.05$).

分析各组在整个试验期内白细胞吞噬功能的变化趋势,都表现出一个先上升然后下降的过程.其中,免疫组 2 和免疫组 3 表现了比免疫组 1 更高的吞噬能力,但 2 组无显著性差异.

表 2 溶藻弧菌免疫黑鲷后血液白细胞吞噬分数(PP)和吞噬指数(IP)的比较¹⁾Tab.2 Comparison of phagocytic percentage(PP) and phagocytic index (PI) after immunization by *Vibrio alginolyticus* on *Sparus macrocephalus*

免疫组 immunization group	PP				IP			
	7 d	14 d	28 d	56 d	7 d	14 d	28 d	56 d
1	28.0 ± 2.73a	31.4 ± 2.20ab	35.8 ± 1.56b	27.2 ± 2.25a	0.57 ± 1.78a	0.63 ± 1.43b	0.71 ± 1.36b	0.54 ± 1.30a
2	28.2 ± 1.76a	32.4 ± 2.44b	37.6 ± 1.91b	27.2 ± 2.27a	0.62 ± 1.16b	0.70 ± 1.83bc	0.76 ± 1.77b	0.56 ± 1.59a
3	26.4 ± 3.41a	34.4 ± 2.36b	34.8 ± 2.62b	25.8 ± 2.22a	0.59 ± 1.14b	0.73 ± 1.56c	0.68 ± 1.44b	0.56 ± 2.20a
对照 control	24.2 ± 1.77a	25.8 ± 1.98a	26.2 ± 1.59a	24.8 ± 1.93a	0.52 ± 1.83a	0.55 ± 1.38a	0.57 ± 1.36a	0.53 ± 1.86a

1) 表中数据为平均数 ± 标准误,同列数据后,具不同字母者,示差异显著($P < 0.05$, 邓肯氏检验)

2.3 黑鲷血清溶菌酶活力测定结果

表 3 显示,第 14、28 d 时,3 个免疫组显著高于对照组($P < 0.05$);第 56 d 时,无显著性差异($P >$

0.05). 整个试验期内,免疫组 3 上升最快,下降也最快;免疫组 1 和免疫组 2 在整个试验期和对照组相比,溶菌活力较高而且稳定.

表 3 溶藻弧菌免疫黑鲷后血清溶菌酶活力和 SOD 活力的比较¹⁾Tab.3 Comparison of lysozyme and superoxide dismutase activity after immunization by *Vibrio alginolyticus* on *Sparus macrocephalus*

免疫组 immunization group	溶菌酶活力 lysozyme activity/U				SOD 活力 SOD activity/(U · L ⁻¹)			
	7 d	14 d	28 d	56 d	7 d	14 d	28 d	56 d
1	2.73 ± 0.27a	2.87 ± 0.35b	3.12 ± 0.25b	2.50 ± 0.72a	203.39 ± 6.65ab	218.45 ± 5.26ab	232.19 ± 6.97b	181.67 ± 2.66b
2	2.94 ± 0.38a	3.07 ± 0.03b	3.25 ± 0.06b	2.72 ± 0.63a	221.12 ± 2.36b	234.40 ± 9.94b	276.06 ± 9.94c	160.85 ± 11.71ab
3	2.22 ± 0.43a	3.60 ± 0.38b	3.03 ± 0.22b	2.27 ± 0.40a	192.31 ± 13.3ab	268.63 ± 7.83c	182.12 ± 10.19a	144.90 ± 7.92a
对照 control	1.99 ± 0.20a	1.55 ± 0.12a	2.33 ± 0.13a	2.09 ± 0.32a	189.21 ± 3.11a	191.86 ± 8.64a	180.79 ± 9.75a	152.87 ± 4.62ab

1) 表中数据为平均数 ± 标准误,同列数据后,具不同字母者,示差异显著($P < 0.05$, 邓肯氏检验)

2.4 黑鲷血清超氧化物歧化酶活力测定结果

表 3 显示,第 28 d,免疫组 1 和免疫组 2 的 SOD 活力达到最高值($P < 0.05$);第 56 d,免疫组 1 仍保持较高水平($P < 0.05$). 结果表明,免疫组 1 的 SOD 活力比较稳定而且持久,免疫组 2 的 SOD 活力在试验期前 4 周都保持较高的水平,2 个免疫组表现了较免疫组 3 更高的活力($P < 0.05$).

2.5 黑鲷血清抗菌活力测定结果

表 4 显示,第 14 d,免疫组 2 显著高于对照组($P < 0.05$);第 28 d,免疫组 3 显著高于对照组($P < 0.05$). 结果表明,各试验组抗菌活力的变动幅度较大,注射疫苗后各免疫组抗菌活力有一定程度的提高,但持续时间较短. 加强免疫对抗菌活力无明显影响.

显影响.

表 4 溶藻弧菌免疫黑鲷后血清抗菌活力的比较¹⁾Tab.4 Comparison of bactericidal activity after immunization by *Vibrio alginolyticus* on *Sparus macrocephalus*

免疫组 immunization group	7 d	14 d	28 d	56 d
1	0.71 ± 0.16a	0.58 ± 0.05ab	0.39 ± 0.02a	0.36 ± 0.01a
2	0.77 ± 0.09a	0.83 ± 0.06b	0.38 ± 0.02a	0.37 ± 0.02a
3	0.70 ± 0.18a	0.60 ± 0.20ab	0.41 ± 0.01b	0.36 ± 0.01a
对照 control	0.51 ± 0.03a	0.42 ± 0.05a	0.35 ± 0.02a	0.35 ± 0.01a

1) 表中数据为平均数 ± 标准误,同列数据后,具不同字母者,示差异显著($P < 0.05$, 邓肯氏检验)

2.6 疫苗对黑鲷的免疫保护力

3 种疫苗对黑鲷进行腹腔免疫后都能产生一定

的免疫保护力. 从表5可知,全细胞疫苗、全细胞+FCA疫苗、LPS疫苗的相对免疫保护力分别为71.4%、85.7%、71.4%.

表5 溶藻弧菌攻毒黑鲷20 d后的免疫保护率¹⁾

Tab.5 Relative percentage survival rate 20 after challenge with *Vibrio alginolyticus*

免疫组 immunization group	死亡数 dead no./尾	死亡率 mortality/%	保护率 protective rate/%
1	2	20	71.4
2	1	10	85.7
3	2	20	71.4
对照 control	7	70	—

1) $n=10$ 尾,细菌浓度 $=5.5 \times 10^8$ cfu $\cdot$ mL⁻¹,注射剂量 $=0.2$ mL⁻¹

3 讨论

从本试验的结果来看,试验鱼血清抗体效价呈现一个先上升然后又下降的趋势,第4周,各免疫组达到了试验期内的最大值;到第8周和对照组相比,各免疫组仍然处于一个较高的水平,这与一些研究者的结果有相似性^[8-11]. 本试验中LPS疫苗的注射剂量为0.6 mg,虽然检测到鱼血清的抗体效价比对照组高,但低于全细胞+FCA疫苗组,与周晓杨^[4]的研究结果相一致. 原因可能有二:一是LPS注射剂量太少,二是全细胞疫苗成分比较复杂,与可溶性的LPS抗原相比,可能更能诱导鱼类的免疫应答.

许多研究表明鱼类的吞噬细胞有潜在的杀菌和杀幼虫的活力,但其杀伤机制还不太清楚^[5]. 本试验研究了溶藻弧菌3种疫苗对黑鲷血细胞的吞噬百分比和吞噬指数的影响,结果发现3个免疫组的吞噬百分比和吞噬指数都有明显增强,与有关学者的研究结果一致^[3-4,10]. 在血涂片下,观察到黑鲷一个吞噬细胞能吞噬多个嗜水气单胞菌,这些结果表明黑鲷的吞噬细胞也具备吞噬功能.

目前已经发现虹鳟^[12]、石斑鱼^[13]、和鲑类^[14-15]经过细菌疫苗免疫后溶菌酶活力有明显的增强. 但黄鳍鲷经免疫后血清中的溶菌酶活性却无明显增强^[16]. 本试验结果表明溶藻弧菌LPS疫苗可以在较短时间内使受免鱼血清中的溶菌酶活力快速升高,但持续时间不长,与简纪常等^[13]的研究结果不一样. 全细胞疫苗和全细胞+FCA疫苗虽然作用效果没有LPS疫苗那么迅速,但持续时间比较长.

SOD对于增强吞噬细胞的防御能力和整个机体的免疫功能有重要作用. 试验结果表明,溶藻弧菌全细胞疫苗和全细胞+FCA疫苗能够提高机体的抗氧化能力;加强免疫LPS疫苗后,SOD活力迅速上升,

但下降也快. 原因可能是因为注射LPS的剂量太少的缘故. 但是,也有研究者得出了不同的结论^[17],这可能是由于鱼类本身的免疫机制不同有关.

有学者研究表明,牙鲆^[3]和石斑鱼^[11]经疫苗免疫后,可显著提高其抗菌活力. 本试验结果显示,各试验组抗菌活力的变动幅度较大,注射疫苗后各免疫组血清抗菌活力有一定程度的提高,但持续时间比较短. 由此可见,在细菌进入到机体后,血液能够在短时间内清除细菌而使自身免于受侵害,血清的杀菌因子在其免疫反应中起到了积极的作用.

试验结果表明,溶藻弧菌3种疫苗以腹腔注射方式免疫试验鱼黑鲷,均能提高其免疫保护力. 与有关学者研究结果一致^[16]. 大多数免疫试验都证实了抗体效价与免疫保护率之间呈正相关的结论,本试验也同样如此. 但也有某些疫苗虽然可以产生较高的保护率,其抗体效价却很低^[18]. 在关于鱼类免疫的研究中,类似这种抗体产生的量很少或检测不到抗体产生却成功获得免疫保护力的现象比较普遍,其原因可能与不同的菌苗所特有的抗原性质以及由其引发的鱼类特有的免疫保护机制有关.

参考文献:

- [1] 常传珠,蔡子超,郭获玲. 黑鲷人工养殖中的几种疾病及其防治[J]. 海洋科学,1990,6:60-62.
- [2] 梁德海. 黑鲷育苗期间的几种病害与防治[J]. 海洋科学,1997,3:5-8.
- [3] 高冬梅. 鳗弧菌疫苗对牙鲆和鲈鱼免疫效果研究[D]. 青岛:中国海洋大学海洋生命学院,2003.
- [4] 周晓杨. 南方鲈出血性败血症的病原、病理及免疫预防研究[D]. 重庆:西南师范大学生命科学学院,2004.
- [5] 刘毅,张元柱,陈昌福,等. 翘嘴鲈肝肾坏死症免疫预防的研究[J]. 江西科学,2000,6:90-93.
- [6] WESTPHAL O, JANN K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure [J]. Methods in Carbohydrate Chemistry,1965,5:83-96.
- [7] 王雷,李光友,毛远兴. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究[J]. 海洋与湖沼,1995,26(2):179-185.
- [8] 曹宏梅,李健,战文斌,等. 鳗弧菌和溶藻弧菌二联疫苗对大菱鲆的免疫效果[J]. 中国水产科学,2006,13(3):397-402.
- [9] 莫照兰,徐永立,张培军. 养殖牙鲆鳗弧菌疫苗的研究[J]. 海洋科学,2002,26(4):63-66.
- [10] 张建设. 致病性副溶血弧菌脂多糖对牙鲆的免疫效应及其抗原性研究[D]. 青岛:中国海洋大学水产学院,2004.

(下转第104页)

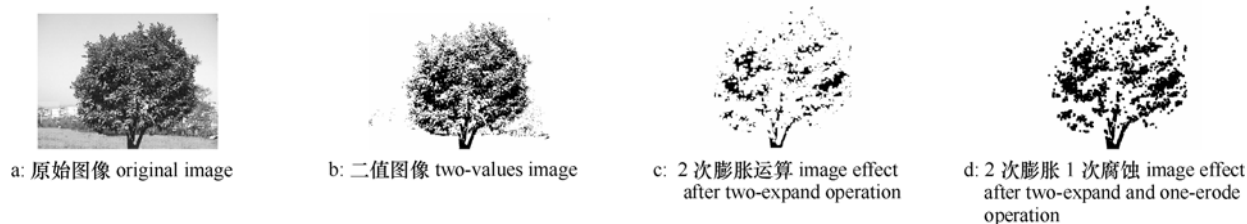


图5 果树图像各阶段的处理效果

Fig.5 The effect of fruit-tree image processing in different steps

4 结束语

果树形态参数或作物信息的采集对实现精确喷雾和变量喷雾有重要意义,而图像处理技术是目前常用的一种方法.本文开发的基于DSP的果树形态参数检测系统,利用DSP快速处理图像的能力,提高了果树图像处理的实时性,加快了果树形态结构参数的计算速度.试验结果表明,检测系统检测的果树最大冠幅相对误差在 $-2.51\% \sim 0$ 范围内,树高的相对误差在 $-3.0\% \sim 1.7\%$ 范围内,郁密度检测结果也能够反映出果树的实际稀密程度变化.

参考文献:

- [1] HOLOWNICK R, DORUCHOWSKI G, GODYN A, et al. Variation of spray deposit and loss with air-jet direction applied in orchards[J]. J Agric Engng Res, 2000, 77(2): 129-136.
- [2] 傅泽田,祁力均. 国内外农药使用状况及解决农药超量使用问题的途径[J]. 农业工程学报, 1998, 14(2): 7-12.
- [3] 王贵恩. 果树仿形喷雾机理及其关键技术[D]. 广州: 华南农业大学工程学院, 2003.
- [4] 王贵恩,洪添胜,李捷,等. 果树施药仿形喷雾的位置控制系统[J]. 农业工程学报, 2004, 20(3): 81-84.
- [5] 洪添胜,王贵恩,陈羽白,等. 果树施药仿行喷雾关键参数的模拟试验研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(4): 104-107.
- [6] 王万章,洪添胜,李捷,等. 果树农业精确喷雾技术[J]. 农业工程学报. 2004, 20(6): 98-101.
- [7] 王万章,洪添胜,陆永超,等. 基于超声波传感器和DGPS的果树冠径检测[J]. 农业工程学报, 2006, 22(8): 158-161.
- [8] MOLTO E, MARTIN B, GUTIERREZ A. Design and testing of an automatic machine for spraying at a constant distance from the tree canopy[J]. J Agric Engng Res, 2000, 77(4): 379-384.
- [9] MOLTO E, MARTIN B, GUTIERREZ A. Pesticide loss reduction automatic spraying on globular tree[J]. J Agric Engng Res, 2001, 78(1): 35-41.
- [10] 孙宏祥. 红外光电探测器在静电对靶喷雾中的应用[J]. 电子产品世界, 2002, 14: 34-35.
- [11] 陈峰. Blackfin 系列 DSP 原理与系统设计[M]. 北京: 电子工业出版社, 2004.
- [12] 简纪常,叶剑敏,吴灶和. 溶藻弧菌脂多糖对石斑鱼免疫功能的影响[J]. 水生生物学报, 2004, 28(1): 103-105.
- [13] ACKERMAN P A, IWAMA G K, THORNTON J C. Physiological and immunological effects of adjuvanted *Aeromonas salmonicida* vaccines on juvenile rainbow trout[J]. Aquatic Animal Health, 2000, 12: 157-164.
- [14] 简纪常,叶剑敏,吴灶和. 溶藻弧菌脂多糖对石斑鱼免疫功能的影响[J]. 水生生物学报, 2004, 28(1): 103-105.
- [15] JOKINEN E I, VIEHAN J, AALTONEN T M, et al. The effect of dietary phosphorus deficiency on the immune responds of European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 15: 159-168.
- [16] VIVAS J, RIAÑO J, CARRACEDO B, et al. The auxotrophic aroA mutant of *Aeromonas hydrophila* as a live attenuated vaccine against *A. salmonicida* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 16: 193-206.
- [17] 丁蹯,徐刚. 黄鳍鲷弧菌病原特性及其全菌苗的研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 1-5.
- [18] 曹剑香,简纪常,吴灶和. 溶藻弧菌疫苗对凡纳滨对虾免疫功能的影响[J]. 湛江海洋大学学报, 2004, 24(6): 11-17.
- [19] 李爱华,吴玉深,蔡桃珍,等. 嗜水气单胞菌和河弧菌二联疫苗对鲫的免疫效果[J]. 水生生物学报, 2002, 26(1): 52-56.

【责任编辑 周志红】

【责任编辑 柴 焰】

(上接第100页)