

细菌菌壳作为免疫佐剂的研究进展

居自远^{1,2,3}, 钱晶^{2,3,4*}, 徐小洪^{2,3}, 卜朝阳², 郎需龙², 王兴龙² (1. 南通濠河旅游园景建设有限公司, 江苏南通 226001; 2. 军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林长春 130122; 3. 吉林大学动物医学学院, 吉林长春 130062; 4. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏南京 210014)

摘要 细菌菌壳(Bacterial ghosts, BGs)是一种不含细胞质和核酸成分的细菌空壳。近年来,研究证实 BGs 表面保留了大量完整的天然免疫模式识别受体的激动剂,可作为免疫佐剂诱导机体免疫或非免疫细胞分泌细胞因子,进而激活适应性免疫应答。除此之外,BGs 还可装配蛋白和核酸以提高外源抗原的免疫原性。主要介绍了 BGs 制备技术、佐剂效应机制以及应用潜能的最新研究进展。
关键词 细菌菌壳;制备技术;免疫佐剂;应用潜能
中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)31-0151-03

Advancement in Bacterial Ghost Application as Immune Adjuvants

JU Zi-yuan^{1,2,3}, QIAN Jing^{2,3,4*}, XU Xiao-hong^{2,3} et al (1. Nantong Hao River Tourism Landscape Construction Ltd, Nantong, Jiangsu 226001; 2. Institute of Military Veterinary Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Changchun, Jilin 130122; 3. College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun, Jilin 130062; 4. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014)

Abstract Bacterial ghosts (BGs) are a group of hollow bacterial envelopes containing neither cytoplasm nor nucleotide contents. BGs are proved to retain large amounts of intact ligands of pattern recognition receptors, which functions as adjuvants to induce proinflammatory cytokine production by immune and non-immune cell. These cytokines will further assist the activation of adaptive immune response. In addition, proteins and nucleotides can also be equipped into BGs to achieve elevated immunogenicity. In this review, recent advances in BGs production, adjuvant function mechanisms and new applications were discussed in detail.

Key words Bacterial ghosts;Preparation techniques;Immune adjuvants;Application potential

早在 1982 年, Henrich B 等^[1]就已经发现大肠杆菌噬菌体裂解酶可使大肠杆菌裂解死亡并且在电镜显示下呈现鬼影(Ghosts)模样,并进一步证实其中的裂解 E 蛋白具有在细菌细胞膜上打孔的功能,其被命名为 Bacterial Ghosts(BGs)。我国于 2004 年才开始有 BGs 的研究报道,有专家学者将其意译为细菌菌影、菌蛻或菌壳^[2-4]。如今的 BGs 是由噬菌体 phiX174 裂解 E 蛋白作用革兰氏阴性菌细胞膜后而形成的细菌空壳形态^[5]。电镜下的 BGs 展现了其完整结构,如外膜蛋白、黏附素、脂多糖和肽聚糖等^[6],保留了细菌表面的有效抗原表位,可作为新型灭活细菌预防细菌性传染病。目前,已制备了多种不同革兰氏阴性菌菌壳并证实其具有良好的免疫原性^[4,7-25],而随着 BGs 研究的深入,BGs 介导的免疫佐剂效应机制以及新型载体递送平台的应用也越来越受到研究人员的关注^[26]。该研究主要介绍了 BGs 的制备技术、佐剂效应机制以及应用潜能的最新研究进展。

1 细菌菌壳的制备技术

目前,BGs 的制备技术已应用于多种革兰氏阴性菌,如大肠杆菌^[7,14,23,27]、沙门氏菌^[12,18-19,25]、布鲁氏菌^[4,8,28-29]、维氏气单胞菌^[15]、霍乱弧菌^[20]、克雷伯氏菌^[13]、副猪嗜血杆菌^[13,17]、胸膜肺炎放线杆菌^[16,21]、迟缓爱德华菌^[24]、多杀性巴氏杆菌^[22]、柱状黄杆菌^[11]等,均可达到可观的裂解效果,通常再采取反复冻融或高渗溶液处理即可获得细菌菌壳,以

此作为非变性灭活菌苗相比传统甲醛灭活菌苗具有理想的免疫原性。

BGs 的制备主要基于噬菌体 phiX174 裂解 E 基因的表达,在细菌的两极或中部形成 1~2 个直径为 40~200 nm 的跨膜孔道^[5],通过温控敏感部件 *cI857* 阻遏蛋白在常温 28℃ 及以下可抑制 E 基因的表达,通过提高培养温度致使阻遏蛋白失活,进而促使裂解酶发挥活性。这通常依赖特定或广宿主重组质粒的导入进而诱导目的基因的表达。吴幼^[27]基于蓝白斑筛选技术将裂解 E 基因插入大肠杆菌 *LacZ* 序列中,利用菌落颜色筛选获得非智力依赖性的菌壳株。钱晶等^[4,30]采用同源重组技术经正、负向筛选后将温控裂解部件插入犬布鲁氏菌基因组中的 *B0419* 基因,通过 42℃ 诱导表达获得非质粒依赖型的布鲁氏菌菌壳;与此同时,付立霞^[10]采用同源重组技术制备获得嗜水气单胞菌菌壳。上述 2 种菌壳制备技术克服了过去依赖抗性标记质粒表达的局限性,如抗生素抗性基因的残留和重组质粒的遗传不稳定等因素。另外,管玲玉^[31]报道了一种营养诱导型的裂解系统,即通过限铁诱导启动子 *P_{vib}* 控制裂解 E 基因的表达效率,最终基于该系统制备了鳃弧菌菌壳。除了通过裂解 E 基因表达系统以外,胡本钢^[13]采用抗菌肽配合超高压装置,分别制备了副猪嗜血杆菌菌壳和肺炎克雷伯氏菌菌壳,其免疫原性均优于常规灭活菌苗。然而,无论是采用基因工程手段还是物理化学方法制备菌壳,其目的都是获得完整的细菌空壳,这是保证细菌本身的免疫原性及其表面免疫激动分子功能活性的重要前提。

2 细菌菌壳作为佐剂的作用机制

免疫佐剂通常是通过刺激宿主机体免疫细胞表面的天

基金项目 国家公益性行业(农业)科研专项“宠物疫病快速诊断与疫苗研究与示范”(201303042)。
作者简介 居自远(1986—),男,江苏南通人,助理兽医师,从事野生动物临床诊疗研究。*通讯作者,助理研究员,从事动物及人兽共患传染病研究。
收稿日期 2017-08-28

然免疫受体进而增强疫苗的免疫原性^[32]。其中,天然免疫细胞通过一系列模式识别受体,如 Toll 样受体(TLR)识别细菌、病毒、寄生虫以及霉菌感染等多种刺激进而介导免疫应答反应^[33]。例如 TLR2/4 识别细菌脂多糖(LPS)和脂磷壁酸质(TLR-2/4)、TLR9 识别 CpG DNA、TLR5 识别鞭毛蛋白等^[34-36]。近些年,细菌的某些成分具有增强弱抗原性疫苗的免疫应答能力,已经被应用到疫苗的研制当中。

BGs 的产生属于非变性,保留了完整的细胞膜和细胞壁结构,这其中包含已知的免疫刺激成分(LPS、鞭毛等),是一类十分有潜力的高效免疫佐剂^[6,37]。BGs 的这些胞外结构能够有效地被免疫细胞或非免疫细胞所识别与递呈^[38],主要通过 TLR2 和 TLR4 信号通路激活免疫细胞,包括诱导树突状细胞(Dendritic cells, DCs)的活化与成熟,进而促使其向淋巴器官 T 细胞区域的募集;BGs 通过 TLR2 和 TLR4 接头分子经依赖 MyD88 或 TRIF 途径(非依赖 MyD88)将信号传递给下游 MAPK 或 I κ B 级联分子,激活核内转录因子,如 NF- κ B、AP-1、IRF3/7,最终产生各种促炎细胞因子和趋化因子等^[39-41]。

DCs 作为专职的抗原递呈细胞,能有效摄取和加工 BGs,介导促炎细胞因子的产生,随后上调 DC 细胞的共刺激因子表达,进而有利于将外源抗原高效地递呈给未致敏 T 细胞^[42-43]。研究发现 BGs 能向 DCs 提供有效的早期成熟信号,大量分泌 Th1 细胞因子(特别是 IL-12),进而激活 NK 和 Th1 细胞^[43]。另外,在 DCs 接触 BGs 12 h 后,DCs 表面 MHC-II 的表达水平显著上调^[42-43],表明 BGs 具有激发早期免疫应答反应的潜力,这对于紧急免疫接种策略或许又是一个新发现。不仅如此,BGs 的 LPS 还能够增强 DCs 细胞 MHC-I 的表达,使 DCs 将抗原多肽交叉递呈给 CD8 + T 细胞,从而有助于诱导有效的细胞毒性 T 细胞应答^[44-45]。菌壳能够上调 DCs 表面细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的表达,这为激发高效 CD8 + T 细胞反应提供必要基础^[46]。研究发现沙门氏菌 BGs 和肠炎沙门氏菌 BGs 均引起有效的 CD8 + T 细胞应答,并保护免疫的禽免受致死性剂量强毒株的攻击^[18-19]。除了能够作用于 DC 细胞,BGs 也能有效地激活单核细胞和巨噬细胞,并且能促进免疫反应趋向 Th1 型应答发展^[47]。此外,BGs 诱导许多淋巴和非淋巴细胞产生细胞因子和趋化因子,促使 T、B 淋巴细胞和免疫细胞向淋巴结的回流和迁移,从而充分与同源抗原接触激发免疫应答。这些结果表明 BGs 的自身免疫佐剂效应使其能有效地诱导机体产生体液免疫及细胞免疫反应。

BGs 也可以刺激非专职抗原递呈细胞,如结膜上皮细胞、成纤维细胞、角蛋白细胞、黑色素瘤细胞等^[38,48-50]。因此,BGs 能够提供非特异性的抗病原微生物的能力,并且 BGs 也能利用 TLR5 分子(识别鞭毛)激活下游信号通路。Abtin 等发现野生型大肠杆菌(NK9373)的菌壳比突变的无鞭毛大肠杆菌菌壳更容易被角蛋白细胞所捕获^[48],这表明细菌鞭毛蛋白能够通过 TLR5 或炎症小体介导细胞活化途径进而激活任意一种信号通路^[51]。另外,BGs 还能作用于淋巴细胞。

利用放线杆菌 BGs 体外刺激 T 细胞以后,能够检测到特异性的 T 细胞应答反应。Felnerova 等^[52]研究结果也表明,BGs 能够诱导 T 细胞增殖,并且在抗原递呈细胞的辅助下其激活 T 细胞增殖能力强于单独 BGs 刺激组。因此,BGs 不仅可以由抗原递呈细胞活化 T 细胞,还可以通过 TLR 分子直接活化 T 细胞。

目前,BGs 作为免疫佐剂的最大原因主要是包含 LPS。Means 等^[53]研究发现,经过鞭毛处理的 DCs 相比 LPS 处理的 DCs 具有较弱的递呈 T 细胞能力,但也能介导 T 细胞分泌细胞因子。Jawale 等^[54]研究发现含有大肠杆菌热不稳定 B 亚基肠毒素的沙门氏菌 BGs 比单独 BGs 具有更有效地诱导体液和细胞免疫应答的能力。

3 细菌菌壳的应用潜能

大多免疫细胞或上皮细胞普遍表达 TLR4 和 TLR5,作为其配体的 LPS 和鞭毛在 BGs 上固有存在,这使得 BGs 能够有效地诱导黏膜免疫应答。BGs 本身的佐剂属性使之成为潜在的载体平台,可在其表面装配外源蛋白或在其内部装载 DNA 片段。另外,BGs 的靶向性也使其成为装载小分子药物的良好载体^[26]。

目前,已报道用于装载 DNA 疫苗的 BGs 有溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*, *M. haemolytica*)和伤寒沙门氏杆菌(*Salmonella typhi*, *S. typhi*)^[47]。Ebensen 等^[42]于 2004 年证明在 *M. haemolytica* BGs 中装载 DNA 可显著增强 APC 对 DNA 的摄取,且能诱导更强的特异性体液和细胞免疫反应,并使初始型 Th 细胞向 Th2 型细胞分化,这有利于机体消除持续性感染。另外 *S. typhi* Ty21a BGs 可以协助 HIV gp140 DNA 被小鼠巨噬细胞 RAW264.7 吞噬,在体内试验中诱导小鼠产生更好的黏膜免疫反应,这对 HIV 疫苗的研制具有重要的意义^[55]。

然而,BGs 作为蛋白载体平台的应用更为常见,Chan 等^[56]在 *S. typhi* BGs 表面分别表达产肠毒性大肠杆菌(enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)的菌毛蛋白 K88ab、K88ac、K99 和 FasA,该嵌合 BGs 免疫小鼠后 14 d,血清 IgG 和粪便 IgA 都有显著上升,且肠道抗原特异性 B 淋巴细胞、脾脏淋巴细胞均有显著上升。Cai 等^[57]在 *E. coli* 外膜表面表达线性 Stx2Am-Stx1B,该嵌合 BGs 不仅能诱导更高水平的血液 IgA 或 IgG,还较单独 BGs 组提供更好的免疫保护效果。

通过黏膜免疫途径对机体进行免疫是当前黏膜疫苗研究的热点,但由于缺乏通过此途径激发足够有效的免疫原,因此一直处于瓶颈阶段。BGs 作为候选疫苗的一大优势就在于其能够引起有效的抗原特异性黏膜免疫和系统性免疫反应^[26,57]。其中以幽门螺旋杆菌为载体的口服疫苗研究尤为突出,Talebkhani 等^[58]在幽门螺旋杆菌 BGs 表面装载了其自身的一种保护性抗原 Omp18 蛋白,经口服免疫小鼠后,小鼠产生高水平抗 Omp18 抗体,另外还发现活的幽门螺旋杆菌在胃部的数量也显著减少。

BGs 这类微小颗粒同样易于被抗原递呈细胞摄取,因此也常被用作装载酶类、抗生素、抗肿瘤药物^[26,37,42]。研究表

明, BGs 装载的酶类仍具有其酶活性, 通过装载特定的酶类, BGs 不但有助于治疗酶类缺失造成的代谢紊乱, 还能通过装载带有偏嗜性的酶类调节肠道菌群^[59]。除此之外, Paukner 等^[60]成功借助 *M. haemolytica* BGs 装载抗肿瘤因子 doxorubicin (DOX), 使其靶向人结肠腺癌细胞, 其抗癌效果显著优于单独使用 DOX, 并未对健康细胞造成病理性损伤。由此可见, 保留了细菌生物学活性的 BGs 的应用潜在在不断被挖掘。

4 展望

BGs 是一类具有良好安全性和免疫原性的新型灭活细菌, 完整保留了其表面结构, 使其具备自体免疫佐剂的特征, 基于 BGs 载体平台为开发多联嵌合疫苗、靶向疫苗以及肿瘤免疫治疗提供了新策略。

参考文献

- [1] HENRICH B, LUBITZ W, PLAPP R. Lysis of *Escherichia coli* by induction of cloned ϕ X174 genes[J]. Molecular & general genetics, 1982, 185(3): 493–497.
- [2] 蔡昆, 王慧. 细菌菌壳的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(3): 297–300.
- [3] 张瑞平, 张兆山. 细菌菌壳作为新颖药物递送体系的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(7): 622–626.
- [4] 钱昆. 犬布鲁氏菌菌壳疫苗株的构建及实验免疫研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- [5] WITTE A, WANNER G, HALFMANN G, et al. Endogenous transmembrane tunnel formation mediated by phi X174 lysis protein E[J]. Journal of bacteriology, 1990, 172(7): 4109–4114.
- [6] LUBITZ W, HUTER V. Bacterial ghosts as carrier and targeting vehicles[J]. Expert review of vaccines, 2003, 2(1): 45–51.
- [7] 王文东. 致病性大肠杆菌菌壳的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2010.
- [8] 刘爽. 布氏杆菌菌壳的制备及其特性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2011.
- [9] 钱昆, 尹秋丹, 卜昭阳, 等. 犬布鲁氏菌菌壳疫苗的制备[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(1): 38–43.
- [10] 付立霞. 嗜水气单胞菌非质粒依赖性菌壳疫苗的研制及评价[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [11] 祝文兴. 柱状杆菌(*Flavobacterium columnare*)菌壳疫苗的研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2012.
- [12] 温晶, 寇志华, 于虹, 等. 人伤寒沙门菌 Ty21a 菌壳的制备[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(6): 479–483.
- [13] 胡本钢. 应用抗菌肽—超高压制备肺炎克雷伯菌和副猪嗜血杆菌菌壳方法的建立[D]. 长春: 吉林大学, 2012.
- [14] 马跃. 大肠杆菌菌壳技术及其初步应用研究[D]. 广州: 中山大学, 2009.
- [15] 徐展. 维氏气单胞菌菌壳的构建及免疫效力评价[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- [16] 常月红. 胸膜肺炎放线杆菌菌影(Ghost)的制备及其免疫效力评价[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008.
- [17] 胡明明, 常月红, 张艳禾, 等. 副猪嗜血杆菌菌影的制备[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(1): 11–14.
- [18] JAWALE C V, JOHN HWA L. Comparative evaluation of *Salmonella* Enteritidis ghost vaccines with a commercial vaccine for protection against internal egg contamination with *Salmonella* [J]. Vaccine, 2014, 32(45): 5925–5930.
- [19] CHAUDHARI A A, JAWALE C V, WOONG K S, et al. Construction of a *Salmonella* Gallinarum ghost as a novel inactivated vaccine candidate and its protective efficacy against fowl typhoid in chickens[J]. Veterinary research, 2012, 43(1): 44.
- [20] EKO F O, LUBITZ W, MCMILLAN L, et al. Recombinant *Vibrio cholerae* ghosts as a delivery vehicle for vaccinating against *Chlamydia trachomatis* [J]. Vaccine, 2003, 21(15): 1694–1703.
- [21] HENSEL A, HUTER V, KATINGER A, et al. Intramuscular immunization with genetically inactivated (ghosts) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 protects pigs against homologous aerosol challenge and prevents carrier state[J]. Vaccine, 2000, 18(26): 2945–2955.
- [22] MARCHART J, DROPANN G, LECHLEITNER S, et al. *Pasteurella multocida*- and *Pasteurella haemolytica*-ghosts: New vaccine candidates[J]. Vaccine, 2003, 21(25/26): 3988–3997.
- [23] MAYR U B, HALLER C, HAIDINGER W, et al. Bacterial ghosts as an oral vaccine: A single dose of *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts protects mice against lethal challenge[J]. Infection & immunity, 2005, 73(8): 4810–4817.
- [24] KWON S R, NAM Y K, KIM S K, et al. Protection of tilapia (*Oreochromis mosambicus*) from edwardsielliosis by vaccination with *Edwardsiella tarda* ghosts[J]. Fish & shellfish immunology, 2006, 20(4): 621–626.
- [25] PENG W, SI W, YIN L, et al. *Salmonella enteritidis* ghost vaccine induces effective protection against lethal challenge in specific-pathogen-free chicks[J]. Immunobiology, 2011, 216(5): 558–565.
- [26] HAJAM I A, DAR P A, WON G, et al. Bacterial ghosts as adjuvants: Mechanisms and potential[J]. Veterinary research, 2017, 48(1): 37.
- [27] 吴幼. 非质粒依赖性菌壳疫苗及其中药免疫佐剂的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [28] 张瑞安. 粗糙型布氏菌菌壳的制备及其免疫学特性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.
- [29] 卜昭阳. 羊布鲁氏菌 UGPase 缺失株的构建及菌壳的免疫特性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
- [30] QIAN J, BU Z Y, LANG X L, et al. A safe and molecular-tagged *Brucella canis* ghosts confers protection against virulent challenge in mice[J]. Veterinary microbiology, 2017, 204: 121–128.
- [31] 管玲玉. 基于体内诱导裂解系统的大肠杆菌和鳃弧菌载体疫苗设计与构建[D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- [32] HAJAM I A, DAR P A, CHANDRASEKAR S, et al. Co-administration of flagellin augments immune responses to inactivated foot-and-mouth disease virus (FMDV) antigen[J]. Research in veterinary science, 2013, 95(3): 936–941.
- [33] KUMAR H, KAWAI T S. Toll-like receptors and innate immunity[J]. Journal of molecular medicine, 2009, 388(4): 621–625.
- [34] MEDZHITOV R, JANEWAY C Jr. Innate immune recognition: Mechanisms and pathways[J]. Immunological reviews, 2000, 173(1): 89–97.
- [35] KAWAI T, AKIRA S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity[J]. Immunity, 2011, 34(5): 637–650.
- [36] AKIRA S, HEMMI H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family[J]. Immunology letters, 2003, 85(2): 85–95.
- [37] MAYR U B, WALCHER P, AZIMPOUR C, et al. Bacterial ghosts as antigen delivery vehicles[J]. Advanced drug delivery reviews, 2005, 57(9): 1381–1391.
- [38] STEIN E, INICKANADA A, BELIJ S, et al. *In vitro* and *in vivo* uptake study of *Escherichia coli* Nissle 1917 bacterial ghosts: Cell-based delivery system to target ocular surface diseases[J]. Investigative ophthalmology & visual science, 2013, 54(9): 6326–6333.
- [39] BENKO S, MAGYARICS Z, SZAB A, et al. Dendritic cell subtypes as primary targets of vaccines: The emerging role and cross-talk of pattern recognition receptors[J]. Biological chemistry, 2008, 389(5): 469–485.
- [40] ADAM E, DELBRASSINNE L, BOUILLIOT C, et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 activates DC and prevents house dust mite allergy through a TLR4-dependent pathway[J]. European journal of immunology, 2010, 40(7): 1995–2005.
- [41] QUEVEDO-DIAZ M A, SONG C, XIONG Y, et al. Involvement of TLR2 and TLR4 in cell responses to *Rickettsia akari* [J]. Journal of leukocyte biology, 2010, 88(4): 675–685.
- [42] EBENSEN T, PAUKNER S, LINK C, et al. Bacterial ghosts are an efficient delivery system for DNA vaccines[J]. Journal of immunology, 2004, 172(11): 6858–6865.
- [43] AHMED H I, AHMAD D P, ELAMURUGAN A, et al. Bacterial ghosts of *Escherichia coli* drive efficient maturation of bovine monocyte-derived dendritic cells[J]. PLoS One, 2015, 10(12): 144397.
- [44] TROMBETTA E S, EBERSOLD M, GARRETT W, et al. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation[J]. Science, 2003, 299(5611): 1400–1403.
- [45] TROMBETTA E S, MELLMAN I. Cell biology of antigen processing *in vitro* and *in vivo* [J]. Annual review of immunology, 2005, 23: 975–1028.
- [46] LEFOR A T, FABIAN D F. Enhanced cytolytic activity of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) derived from an ICAM-1 transfected tumor in a murine model[J]. Journal of surgical research, 1998, 75(1): 49–53.

直把为农服务作为日常业务的重要部分,近年来,开通了气象为农服务快速直通方式,将种植户纳入到气象服务微信群中,及时发布最新重要天气预报信息。2017年7月1日的特大暴雨洪涝灾害过程,气象局提前通过微信群向种植户发送了重要服务信息,并指导做好防御措施。种植户们收到后非常关注,积极采取了挖好排、灌水沟等防范措施。气象局在微信群中随时更新预报及各地的降雨实况,过程结束后,在微信群内积极发送如何做好沃柑灾后补救工作的信息,并结合后续的天气预报,指导种植户对洪水浸损过的橘园及时进行全园喷药消毒,预防溃疡病、炭疽病的发生,为广大种植户有效避免或减轻洪水灾害发挥了重要的作用。

3.2 防冻措施 平时要加强栽培管理,提高果树本身抗冻性。关键期要多关注天气预报,在冷空气到来的凌晨,可在果园四周燃烧烟雾量较大的麦秸、锯末等物熏烟,以提高果园内的温度,也可起到减缓温度下降的作用。霜冻出现前要及时给果园内灌水,或者用水喷洒树体(冠)。及时喷洒生长调节剂,可减轻低温危害。寒害来临前以及寒害结束气温回升时,要及时进行树盘松土,并追施速效肥。及早清除树冠上的积雪(冰),以免嫩梢冻伤坏死;受冻害后果树易感病,需注意检查,及时喷药防治。

3.3 防高温措施 加强施药施肥,防止异常落果。适时做好树盘、树冠覆盖,防止水分快速蒸发造成树体缺水。高温来临前,适时对果园进行灌水,给果树淋水、喷水,以减轻高温天气带来的危害。

3.4 防旱措施 积极采用现代化灌溉技术,如喷灌、滴灌等,可有效抗旱。及早修缮蓄水、排灌设施,旱季来临前要抓住降雨时机多蓄水。清除杂草,用稻草、杂草等覆盖树盘,深翻填埋绿肥也可减轻干旱危害。适度喷施生长延缓剂、修剪多余的

枝、叶。注意防治病虫害,以提高树体自身的抗旱能力。

3.5 防涝措施 关注气象部门的暴雨预报,提前做好准备工作。提前挖好果园排、灌水沟,雨后要及时排水,防止积水。积水排除、土壤干爽后,要及时全园中耕,对树盘松土。对受涝严重的果树,要及时清除已溃烂的树根和坏死的枝梢,同时要及时清理树枝上的杂草淤泥等污物。洪水浸损过的果园,待雨停水退后,全园喷药消毒1~2次,预防溃疡病、炭疽病的发生。

3.6 防风雹措施 先调查了解当地实际情况,尽量不在常出现大风灾害的区域建园。根据地形在上风方向营造防护林,减轻大风危害。幼树要做支架固定。遭受风雹危害后,及时松土、追肥,天晴后要及早剪除残破枝条,并杀菌消毒,预防病虫害。

参考文献

- [1] 何江萍. 沃柑品种及其栽培技术探讨[J]. 自然科学(文摘版), 2017, 1(4): 346.
- [2] 黄永华. 沃柑早结丰产栽培技术要点[J]. 南方农业, 2016, 10(12): 22-23.
- [3] 阳艳华, 邓立宝, 刘翠燕, 等. 沃柑在广西桂林的种植表现[J]. 中国南方果树, 2017(3): 39-41.
- [4] 赵洪涛, 李果果, 刘要鑫, 等. 沃柑在广西发展的优劣分析及对策探讨[J]. 南方园艺, 2016, 27(3): 12-15.
- [5] 蒋运志, 熊英明, 白先达, 等. 罗汉果种植中的主要气象灾害及防御对策[J]. 南方园艺, 2009, 20(6): 26-28.
- [6] 李显信, 彭燕洁. 气象条件对金桔生长发育的影响[J]. 广西气象, 1991(4): 53-54.
- [7] 何琴. 优质沃柑品种简介及栽培技术要点[J]. 南方农业, 2016, 10(12): 44-45.
- [8] 周桂娃, 周艳霞, 孙玉勇, 等. 桂北沃柑幼树栽培技术[J]. 中国园艺文摘, 2017, 33(3): 192-193.
- [9] 黄家南. 防治沃柑溃疡病要选准施药时机[J]. 中国农资, 2017(4): 24.
- [10] 涂付生. 沃柑主要病虫害的防治措施分析[J]. 南方农业, 2016(32): 3-4.

(上接第153页)

- [47] TABRIZI C A, WALCHER P, MAYR U B, et al. Bacterial ghosts-biological particles as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs[J]. Current opinion in biotechnology, 2004, 15(6): 530-537.
- [48] ABTIN A, KUDELA P, MAYR U B, et al. *Escherichia coli* ghosts promote innate immune responses in human keratinocytes[J]. Biochemical & biophysical research communications, 2010, 400(1): 78-82.
- [49] KUDELA P, PAUKNER S, MAYR U B, et al. Effective gene transfer to melanoma cells using bacterial ghosts[J]. Cancer letters, 2008, 262(1): 54-63.
- [50] LANGEMANN T, KOLLER V J, MUHAMMAD A, et al. The bacterial ghost platform system: Production and applications[J]. Bioengineered bugs, 2010, 1(5): 326-336.
- [51] HYNES N. Bacterial flagellin: A novel adjuvant for vaccine strategies[M]. Troms; University of Troms, 2011.
- [52] FELNEROVA D, KUDELA P, BIZIK J, et al. T cell-specific immune response induced by bacterial ghosts[J]. Medical science monitor international medical journal of experimental & clinical research, 2004, 10(10): 362-370.
- [53] MEANS T K, HAYASHI F, SMITH K D, et al. The toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells[J]. Journal of immunology, 2003, 170(10): 5165-5175.
- [54] JAWALE C V, LEE J H. Salmonella enterica serovar enteritidis ghosts carrying the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit are capable of inducing enhanced protective immune responses[J]. Clinical & vaccine immunology, 2014, 21(6): 799-807.
- [55] WEN J, YANG Y, ZHAO G Y, et al. Salmonella typhi Ty21a bacterial ghost vector augments HIV-1 gp140 DNA vaccine-induced peripheral and mucosal antibody responses via TLR4 pathway[J]. Vaccine, 2012, 30(39): 5733-5739.
- [56] CHAN S K, JIN H, EO S K, et al. Generation of Salmonella ghost cells expressing fimbrial antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* and evaluation of their antigenicity in a murine model[J]. Canadian journal of veterinary research, 2016, 80(1): 40-48.
- [57] CAI K, WEI T, LIU Y N, et al. Novel fusion antigen displayed-bacterial ghosts vaccine candidate against infection of *Escherichia coli* O157: H7[J]. Scientific reports, 2015, 5: 17479.
- [58] TALEBKHAN Y, BABABEIK M, ESMAEILI M, et al. Helicobacter pylori bacterial ghost containing recombinant Omp18 as a putative vaccine[J]. Journal of microbiological methods, 2010, 82(3): 334-337.
- [59] WITTE A, WANNER G, SULZNER M, et al. Dynamics of PhiX174 protein E-mediated lysis of *Escherichia coli*[J]. Archives of microbiology, 1992, 157(4): 381-388.
- [60] PAUKNER S, KOHL G, LUBITZ W. Bacterial ghosts as novel advanced drug delivery systems: Antiproliferative activity of loaded doxorubicin in human Caco-2 cells[J]. Journal of controlled release, 2004, 94(1): 63-74.