

9种细菌成分及其代谢产物 对鲫鱼免疫功能的影响

王高学, 白 冰

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 将9种细菌细胞成分及其代谢产物分别添加入饵料投喂鲫鱼, 连续投喂35 d, 每隔7 d检测鲫鱼白细胞吞噬活性(phagocytic activity)、吞噬细胞杀菌活性(bactericidal activity)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性、溶菌酶(lysozyme)活性和血清凝集抗体效价(agglutinating antibody titer), 以研究这9种细菌细胞成分及其代谢产物对鲫鱼免疫功能的影响。结果表明, 蜡状芽孢杆菌草状亚种组(*Bacillus cereus* subsp. *mycoides*)、噬菌蛭弧菌组(*Bdellovibrio bacteriovorus*)、皮杆菌组(*Dermabacter* sp.)和蜂房芽孢杆菌组(*Bacillus alvei*)鲫鱼的吞噬活性、吞噬细胞的杀菌活性、SOD酶活性、溶菌酶活性与对照组相比, 均呈极显著性差异($P < 0.01$), 这4种细菌的细胞成分及其代谢产物均能增强鲫鱼的细胞和体液免疫功能。此外, 血清凝集抗体效价的测定结果表明, 蜡状芽孢杆菌草状亚种组效价最高, 为1:256, 噬菌蛭弧菌组、皮杆菌组和蜂房芽孢杆菌组最高效价分别为1:128, 1:64和1:64。在以上4种细菌中, 除蜂房芽孢杆菌组血清凝集抗体效价峰值出现在第14天外, 其余3组各项检测指标的峰值均出现在第21天。

[关键词] 细菌细胞成分; 代谢产物; 免疫功能; 鲫鱼

[中图分类号] S965.117

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)02-0039-06

微生物及其代谢产物中的生物活性物质, 如多糖、肽类、核苷酸等, 能够增强动物的免疫功能已经被大量试验研究所证实。在水产上, 据近年来国内外研究报道, 细菌性脂多糖(LPS)^[1], α -甘露聚糖肽(Mannatide)^[2], 酵母聚糖以及真菌多糖^[3], 如 β -葡聚糖(β -Glucan)、肽聚糖(Peptidoglycan, PG)、虫草多糖等微生物产生的生物活性物质, 均能提高水产动物的免疫功能, 起到防病、抗病的作用, 并且无残留、无污染, 可促进水产动物健康生长。因此, 使用微生物及其代谢产物中的活性物质, 作为水产动物免疫增强剂是实现健康养殖、生产无公害水产品的有效途径, 也是当前水产养殖研究的热点之一。在本试验选用的9种细菌中, 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和噬菌蛭弧菌(*Bdellovibrio bacteriovorus*)在水产养殖中主要应用于水质改良^[3-6], 而其菌体成分及代谢产物对水产动物免疫功能的影响尚未见报道; 其他7种细菌细胞成分及其代谢产物对动物及人是否具有增强免疫功能的作用, 目前也尚未见报道。本研究通过对这9种细菌进行了培养、破碎、浓缩、制

剂, 并对鲫鱼制饵投喂, 检测鲫鱼的体液和细胞免疫应答水平, 以期从中筛选出有效细菌, 为今后进一步分离、纯化生物活性物质的理论研究和通过发酵工程生产新的水产动物免疫增强剂提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜂房芽孢杆菌(*Bacillus alvei*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、蜡状芽孢杆菌草状亚种(*Bacillus cereus* subsp. *mycoides*)、皮杆菌(*Dermabacter* sp.)、噬菌蛭弧菌(*Bdellovibrio bacteriovorus*)、溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*), 均由西北农林科技大学水产实验室提供; 鲫鱼(*Carassius auratus*), 由陕西水产研究所渔场提供, 平均体重为 (65.3 ± 5.2) g; 肠形点状气单胞菌(*Aeromonas punctata* f. *interinalis*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*), 均由中国科学院水生生物研究所提

[收稿日期] 2005-06-06

[基金项目] 杨凌示范区科研基金项目(2000J-10)

[作者简介] 王高学(1965—), 男, 陕西富平人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事生物工程制药研究。

供;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),由本实验室保存。MEM培养基,购于Gibco公司;MTT和溶菌酶,购于Sigma公司;SOD试剂盒,购于南京建成生物工程研究所;淋巴细胞分离液,由上海华精高科有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 供试菌饵料制作 分别将9种细菌接种于1 000 mL普通肉汤中,其中巨大芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、蜂房芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌蕈状亚种、皮杆菌和溶壁微球菌置于37℃摇床培养3 d;噬菌蛭弧菌置于25℃摇床培养3 d。采用平板计数法计数。当每种细菌的细胞浓度均达到 1×10^{12} mL⁻¹时,用功率为450 W的超声波作用10 min,将细菌细胞破碎,并浓缩细胞悬液后制作成饵料。

1.2.2 供试鱼饲养 选择健康无病、体重相当的鲫鱼,经过30 d饲养消除干扰因素后,分10组进行试验。每组15尾,置于相同水族箱中,控制水温为 (25 ± 1) ℃。其中1~9组为试验组,投喂添加细菌及其代谢产物的饵料,10组为对照组。投饵率为10 g/kg,每日换一定量的新水,连续饲养35 d。1~9组依次为巨大芽孢杆菌组、蜡状芽孢杆菌组、枯草芽孢杆菌组、蜂房芽孢杆菌组、苏云金芽孢杆菌组、蜡状芽孢杆菌蕈状亚种组、皮杆菌组、噬菌蛭弧菌组和溶壁微球菌组。

1.2.3 菌悬液制备 对试验使用的肠形点状气单胞菌、鳃弧菌、金黄色葡萄球菌分别接种于普通肉汤中培养,平板计数法计数后再用生理盐水稀释至浓度为 1×10^8 mL⁻¹。于金黄色葡萄球菌、鳃弧菌菌悬液中加入福尔马林灭活24 h。均置4℃冰箱保存备用。

1.2.4 采血 分别在投喂饵料后的第0,7,14,21,28,35天取样,各试验组中随机取样3尾,尾静脉采血,每尾鱼采血样1.5 mL。

1.2.5 血清抗体效价及SOD酶活性测定 取0.5 mL上述血样置于1.5 mL离心管中,2 000 r/min离心10 min,分离血清。一部分血清用灭活的金黄色葡萄球菌、鳃弧菌为反应抗原,采用血清凝集试验,测定抗体效价;另一部分血清按SOD检测试剂盒说明的方法,用紫外分光光度计测定SOD酶活性。

1.2.6 溶菌酶活性测定 将经过2次活化的溶壁微球菌接种于液体培养基^[7]中,摇床培养48 h,取出后2 000 r/min离心10 min,收集菌体。用0.1

mol/L pH 6.4的磷酸钾盐缓冲液(PBS)配成底物悬液($OD_{570} \approx 0.3$),按照文献[8]的方法进行测定。取3 mL该悬液,与50 μL待测血清于试管中混合,测其 A_0 值。然后将试液移入37℃水浴中保温30 min。取出后立刻置于冰浴中10 min,以终止反应,测其 A 值。溶菌酶活力按下式计算: $U = (A_0 - A) / A$,式中, U 为溶菌酶活力; A_0 为反应前光密度; A 为反应后光密度。

1.2.7 白细胞悬液制备 另取1 mL用肝素钠抗凝的血样置于含0.8 mL淋巴细胞分离液的离心管中,按照文献[9]的方法,2 500 r/min离心15 min,分离白细胞,调整细胞浓度为 1×10^7 mL⁻¹后,按照文献[10]的方法检测白细胞活率,活细胞不得少于90%。

1.2.8 鲫鱼白细胞吞噬活性的测定 取制备的100 μL白细胞悬液,参照文献[11]的方法进行吞噬活性的测定。

1.2.9 鲫鱼吞噬细胞杀菌活性的测定 取400 μL白细胞悬液,参照文献[12]的方法进行杀菌活性的测定。

2 结果与分析

2.1 9种细菌对鲫鱼血清凝集抗体效价的影响

由表1可见,在饵料投喂期,第4,6,7,8组,即蜂房芽孢杆菌组、蜡状芽孢杆菌蕈状亚种组、皮杆菌组和噬菌蛭弧菌组的血清抗体效价从第7天开始均明显提高,除了蜂房芽孢杆菌组的峰值出现在第14天,其余各组的峰值均出现于第21天;随时间的推移,这4组的抗体水平均呈下降的趋势,其中抗体水平以第6组最高,可达1:256,第4,7和8组次之,其最高抗体水平分别为1:64,1:64和1:128。第10组作为对照组在投喂第7天即产生稍高的抗体水平,并随时间推移一直维持在该水平。

2.2 9种细菌对鲫鱼SOD活性的影响

由表2可见,试验组中第4,6,7,8组,即蜂房芽孢杆菌组、蜡状芽孢杆菌蕈状亚种组、皮杆菌组和噬菌蛭弧菌组鲫鱼的SOD活性很强,与对照组相比,均呈极显著性差异($P < 0.01$),且在投喂的第21天出现峰值,蜂房芽孢杆菌组峰值为 (85.43 ± 0.26) U/mL、蜡状芽孢杆菌蕈状亚种组峰值为 (98.67 ± 0.65) U/mL、皮杆菌组峰值为 (85.64 ± 0.38) U/mL、噬菌蛭弧菌组峰值为 (87.59 ± 0.43) U/mL,随后平缓下降。其他组的SOD活性无明显变化。

表 1 投喂饵料后不同时间各组鲫鱼的血清抗体效价

Table 1 Changes of agglutinating antibody titer of immunized *Carassius auratus*

组别 Group		投喂后时间/d Time					
		0	7	14	21	28	35
1	J	2.5(2~4)	5.1(4~8)	8.0(4~16)	5.9(4~8)	5.3(2~8)	3.7(2~4)
	M	3.0(2~4)	5.9(4~8)	5.1(4~8)	4.0(2~8)	2.5(2~4)	3.0(2~4)
2	J	2.0(2~2)	2.5(2~4)	6.7(4~8)	3.0(2~4)	4.0(2~8)	2.5(2~4)
	M	2.5(2~4)	3.0(2~4)	4.0(2~8)	5.9(4~8)	3.7(2~4)	3.0(2~4)
3	J	2.6(2~4)	2.5(2~4)	5.9(2~4)	2.3(2~4)	2.6(2~4)	3.0(2~4)
	M	2.0(2~2)	2.3(2~4)	5.1(2~4)	2.6(2~4)	2.3(2~4)	2.6(2~4)
4	J	2.5(2~4)	40.5(32~64)	59.0(32~64)	53.5(32~64)	32.0(32~32)	29.5(16~32)
	M	3.0(2~4)	47.5(32~64)	55.7(32~64)	64.0(64~64)	53.5(32~64)	29.5(16~32)
5	J	2.6(2~4)	2.5(2~4)	4.0(2~8)	4.6(2~8)	4.0(2~8)	3.0(2~4)
	M	2.3(2~4)	2.5(2~4)	3.0(2~4)	4.0(2~8)	2.3(2~4)	2.6(2~4)
6	J	2.3(2~4)	14.8(8~16)	84.7(32~128)	94.6(64~128)	59.0(32~64)	28.2(8~32)
	M	2.6(2~4)	29.5(16~32)	59.0(32~64)	161.9(128~256)	57.7(16~64)	29.5(16~32)
7	J	2.5(2~4)	29.5(16~32)	53.5(32~64)	57.7(16~64)	14.8(8~16)	13.4(8~16)
	M	2.6(2~4)	28.8(8~32)	50.6(16~64)	57.4(32~64)	53.5(8~64)	29.5(16~32)
8	J	2.5(2~4)	50.6(16~64)	59.0(32~64)	94.6(64~128)	59.0(32~64)	28.8(8~32)
	M	2.3(2~4)	14.8(8~16)	53.5(32~64)	57.7(16~64)	29.5(16~32)	28.2(8~32)
9	J	2.3(2~4)	2.3(2~4)	4.0(2~8)	13.4(8~16)	2.5(2~4)	2.3(2~4)
	M	2.3(2~4)	2.6(2~4)	5.3(4~8)	7.2(2~8)	3.0(2~4)	2.6(2~4)
10	J	2.6(2~4)	3.0(2~4)	3.5(2~4)	3.0(2~4)	2.6(2~4)	3.0(2~4)
	M	2.3(2~4)	5.3(2~4)	4.0(2~8)	3.5(2~4)	2.6(2~4)	2.6(2~4)

注:J.金黄色葡萄球菌;M.鳃弧菌;表中数据为几何平均值。
Note:J. *Staphylococcus aureus*;M. *Vibrio anguillarum*;geometric average value.

表 2 投喂饵料后不同时间各组鲫鱼的 SOD 活性

Table 2 Changes of SOD activity of immunized *Carassius auratus* U/mL

组别 Group		投喂后时间/d Time					
		0	7	14	21	28	35
1		25.34±0.24	42.27±0.19	39.59±0.38	44.46±0.63	40.16±0.51	32.04±0.42
2		25.18±0.43	29.34±0.37	35.28±0.69	40.21±0.41	38.55±0.71	31.25±0.35
3		26.32±0.27	28.57±0.18	31.64±0.50	34.41±0.36	30.23±0.61	28.54±0.48
4		26.42±0.25	67.59±0.53*	78.69±0.19**	85.43±0.26**	76.36±0.35**	69.58±0.43*
5		26.64±0.39	37.76±0.40	39.65±0.47	43.38±0.55	40.17±0.66	28.83±0.65
6		25.59±0.35	75.34±0.29**	86.67±0.26**	98.67±0.65**	81.14±0.48**	73.48±0.56**
7		26.34±0.41	69.54±0.14*	77.49±0.47**	85.64±0.38**	72.52±0.21**	66.73±0.37*
8		26.31±0.28	65.42±0.39*	74.81±0.32**	87.59±0.43**	74.41±0.18**	67.56±0.44*
9		26.52±0.34	39.23±0.68	40.13±0.43	42.17±0.37	41.21±0.63	31.24±0.36
10		26.49±0.63	38.39±0.54	39.43±0.24	41.83±0.64	40.32±0.051	29.61±0.41

注:与 10 组相比,*表示差异达显著水平($P<0.05$),**表示差异达极显著水平($P<0.01$)。下表同。
Note:Compared with group ten,* stands for difference ($P<0.05$),** stand for significant various differences ($P<0.01$). Same with the following tables.

2.3 9 种细菌对鲫鱼溶菌酶活性的影响

由表 3 可见,从第 7 天开始,第 4,6,7,8 组,即蜂房芽孢杆菌组、蜡状芽孢杆菌草状亚种组、皮杆菌组和噬菌蛭弧菌组鲫鱼的溶菌酶活性较强,与对照组相比,均表现出显著性差异($P<0.05$);且在第 21 天时出现了峰值,与对照组相比,均达极显著性变化($P<0.01$)。其他组溶菌酶活性无明显变化。

2.4 9 种细菌对鲫鱼白细胞吞噬活性的影响

由表 4 可见,从第 7 天开始,第 4,6,7,8 组,即蜂房芽孢杆菌组、蜡状芽孢杆菌草状亚种组、皮杆菌组和噬菌蛭弧菌组鲫鱼的白细胞吞噬活性增强,其吞噬活性与对照组相比,均呈极显著性差异($P<0.01$),并在第 21 天出现峰值。其他组的白细胞吞噬活性无明显变化。

表 3 投喂饵料后不同时间各组鲫鱼的溶菌酶活性
Table 3 Changes of lysozyme activity of immunized *Carassius auratus*

组别 Group	投饵后时间/d Time					
	0	7	14	21	28	35
1	0.015	0.023	0.027	0.019	0.020	0.017
2	0.014	0.018	0.021	0.015	0.023	0.022
3	0.014	0.011	0.013	0.014	0.009	0.015
4	0.014	0.035 [*]	0.051 ^{**}	0.082 ^{**}	0.074 ^{**}	0.043 [*]
5	0.015	0.016	0.020	0.017	0.014	0.012
6	0.014	0.041 [*]	0.069 ^{**}	0.093 ^{**}	0.085 ^{**}	0.072 ^{**}
7	0.015	0.033 [*]	0.048 [*]	0.079 ^{**}	0.056 ^{**}	0.044 [*]
8	0.015	0.038 [*]	0.054 [*]	0.076 ^{**}	0.062 ^{**}	0.045 [*]
9	0.015	0.021	0.018	0.023	0.016	0.014
10	0.014	0.015	0.015	0.017	0.014	0.018

表 4 投喂饵料后不同时间各组鲫鱼的离体白细胞吞噬活性
Table 4 Changes of phagocytic activity of leucocytes of immunized *Carassius auratus*

组别 Group	投饵后时间/d Time					
	0	7	14	21	28	35
1	0.151±0.003	0.171±0.005	0.160±0.026	0.170±0.056	0.149±0.015	0.153±0.027
2	0.152±0.002	0.156±0.010	0.157±0.008	0.156±0.012	0.148±0.024	0.156±0.015
3	0.150±0.011	0.151±0.012	0.146±0.028	0.152±0.003	0.148±0.021	0.151±0.005
4	0.153±0.046	0.181±0.011 [*]	0.191±0.022 ^{**}	0.203±0.026 ^{**}	0.192±0.012 ^{**}	0.176±0.017 [*]
5	0.152±0.010	0.148±0.021	0.149±0.007	0.156±0.011	0.153±0.013	0.152±0.009
6	0.148±0.011	0.198±0.019 ^{**}	0.211±0.008 ^{**}	0.223±0.020 ^{**}	0.203±0.008 ^{**}	0.188±0.026 [*]
7	0.149±0.002	0.184±0.007 [*]	0.204±0.010 ^{**}	0.220±0.027 ^{**}	0.199±0.013 ^{**}	0.179±0.023 [*]
8	0.152±0.001	0.187±0.015 [*]	0.198±0.018 ^{**}	0.211±0.035 ^{**}	0.193±0.015 ^{**}	0.162±0.011
9	0.151±0.003	0.152±0.006	0.149±0.012	0.159±0.006	0.150±0.017	0.152±0.026
10	0.157±0.009	0.167±0.014	0.155±0.025	0.163±0.014	0.156±0.027	0.157±0.007

2.5 9 种细菌对鲫鱼吞噬细胞杀菌活性的影响 其杀菌活性与对照组相比,均呈极显著性差异
由表 5 可见,从第 7 天开始,第 4,6,7,8 组,即 (P<0.01),在第 21 天出现峰值,其他组的吞噬细
蜂房芽孢杆菌组、蜡状芽孢杆菌草状亚种组、皮杆菌 胞杀菌活性无明显变化。
组和噬菌蛭弧菌组鲫鱼的吞噬细胞杀菌活性增强,

表 5 投喂饵料后不同时间各组鲫鱼的吞噬细胞杀菌活性
Table 5 Changes of bactericidal activity of phagocytes of immunized *Carassius auratus*

组别 Group	投饵后时间/d Time					
	0	7	14	21	28	35
1	0.995±0.036	0.982±0.016	0.986±0.015	0.979±0.027	0.982±0.013	0.986±0.012
2	0.996±0.005	0.981±0.038	0.976±0.021	0.983±0.044	0.978±0.007	0.973±0.035
3	0.996±0.013	0.985±0.018	0.968±0.050	0.977±0.053	0.957±0.061	0.980±0.047
4	0.995±0.024	0.813±0.053 ^{**}	0.785±0.019 ^{**}	0.652±0.026 ^{**}	0.766±0.035 ^{**}	0.859±0.015 ^{**}
5	0.997±0.017	0.976±0.010	0.966±0.007	0.976±0.055	0.972±0.066	0.959±0.015
6	0.995±0.015	0.812±0.020 ^{**}	0.732±0.016 ^{**}	0.590±0.065 ^{**}	0.658±0.048 ^{**}	0.695±0.016 ^{**}
7	0.994±0.027	0.839±0.014 ^{**}	0.764±0.047 ^{**}	0.713±0.068 ^{**}	0.726±0.021 ^{**}	0.765±0.037 ^{**}
8	0.996±0.012	0.873±0.009 ^{**}	0.748±0.032 ^{**}	0.715±0.008 ^{**}	0.734±0.018 ^{**}	0.787±0.014 ^{**}
9	0.995±0.001	0.981±0.009	0.975±0.012	0.967±0.010	0.989±0.003	0.990±0.006
10	0.996±0.011	0.986±0.006	0.993±0.004	0.992±0.014	0.993±0.005	0.993±0.013

3 讨论

近年来,国内外对水产养殖病害的研究主要集中在疾病的种类、诊断、病理、致病菌的致病性及对疾病的控制方面^[13],而在预防方面的研究相对较少。同时,微生物在畜禽饲料中应用较多,在水产养殖中主要起水质改良等作用^[14]。作为细菌细胞壁的葡聚糖(Glucan)、脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)、肽聚糖(Peptidoglycan, PG)等可诱导人与动物提高自身免疫力,具有激活水产动物非特异性免疫系统的能力^[15],细菌的代谢产物 α -甘露聚糖肽(Mannatide)也能提高鲫鱼的免疫应答^[2]。在本试验所选的9种细菌中,蜂房芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌草状亚种、皮杆菌和噬菌蛭弧菌4种细菌的细胞成分及其代谢产物的活性物质均能提高鲫鱼免疫应答水平,而巨大芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、溶壁微球菌均无明显作用。据文献^[16]报道,芽孢杆菌属(*Bacillus*)的细胞壁成分复杂,有的菌体含有伴孢晶体,其是一种蛋白晶体,具有很强的毒性。芽孢杆菌属的代谢产物中含有肽类物质,细菌产生的抗菌肽具有抑菌功能;皮杆菌是从人皮肤上分离得到的一种新菌,细胞壁中的夹膜多糖具有较强的毒性,也许可以作为激活水产动物免疫功能的物质;噬菌蛭弧菌是一种有噬菌性质的细菌,在水产养殖上对很多致病菌有溶菌作用。有研究^[17]表明,将噬菌蛭弧菌应用于防治鸡大肠杆菌病,能起到明显的效果。在以往的研究中,应用于水产养殖的细菌除灭活菌苗外,大多以活菌为主。作者认为,4种细菌细胞组成成分和细菌代谢产物中的某些物质能够增强鲫鱼的免疫功能,可能是蜂房芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌草状亚种代谢产物中的肽类活性物质,皮杆菌的细胞壁成分——夹膜多糖和噬菌蛭弧菌产生大量的溶菌酶等产生作用的结果,具体是哪种活性物质还有待于进一步研究。本试验结果也表明,蜡状芽孢杆菌草状亚种、蜂房芽孢杆菌、皮杆菌和噬菌蛭弧菌的细胞成分及其代谢产物能有效提高鲫鱼的血清凝集抗体效价、SOD活性、溶菌酶活性、白细胞吞噬活性和吞噬细胞杀菌活性。

蜂房芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌草状亚种、皮杆菌和噬菌蛭弧菌均能使鲫鱼的血清凝集抗体效价从第7天开始上升,第4组峰值出现在第14天,第6,7,8组峰值均出现在第21天,这有可能是细菌脂多糖(LPS)在短时间内刺激鲫鱼产生较强的体液及细胞免疫应答,激活免疫系统使机体的非特异性免疫在

短时间内达到较高水平造成的。

研究^[18-20]发现,超氧化物歧化酶(SOD)活性与生物体的免疫水平密切相关,对增强巨噬细胞的防御能力和整个机体的免疫功能有重要作用,用来评判免疫调节剂对机体非特异性免疫力的影响。投喂蜂房芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌草状亚种、皮杆菌和噬菌蛭弧菌试验组的SOD活性增强,而其他试验组和对照组的SOD活性无明显变化,这可能是蜂房芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌草状亚种、皮杆菌和噬菌蛭弧菌细胞成分或其代谢产物中的活性物质刺激了鲫鱼,从而使鲫鱼体内SOD活性增强。但具体是细胞成分还是代谢产物起作用,则有待于进一步的研究。

溶菌酶(lysozyme)是一种呈抗生性的、由淋巴细胞分泌的溶解性酶,主要作用于革兰氏阳性菌(G^+ 菌)及某些特定的细菌,其主要作用方式之一是溶解细菌胞壁中的粘多糖。Hansen于1974年报道,鱼体中溶菌酶的产生与哺乳动物相似,主要由嗜中性粒细胞和单核细胞产生,少量由巨噬细胞生成^[21]。作者认为,可能是蜂房芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌草状亚种、皮杆菌和噬菌蛭弧菌细胞成分或代谢产物中的生物活性物质,刺激了鲫鱼的非特异性免疫应答,由此产生了更多的嗜中性粒细胞和单核细胞,进而产生了更多的溶菌酶,同时使溶菌酶活性增强。而其他试验组的细菌及其代谢产物则不能刺激机体产生更多的吞噬细胞,因而就不能产生更多的溶菌酶,使其活性也不能增强。然而,细菌细胞成分及代谢产物中的活性物质如何刺激机体的非特异性免疫应答,其机理尚不清楚,还有待进一步的研究。

白细胞吞噬活性、吞噬细胞杀菌活性是反映动物免疫功能的重要指标之一。本试验中4,6,7,8组鲫鱼白细胞吞噬活性、吞噬细胞杀菌活性增强,作者认为可能是蜂房芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌草状亚种、皮杆菌和噬菌蛭弧菌的细胞成分或其代谢产物中的生物活性物质刺激机体免疫系统,从而产生更多的白细胞和吞噬细胞,并且这两种细胞的活性均增强。

本试验所筛选出这4种细菌的细胞成份与其代谢产物,均能有效增强鲫鱼的免疫功能,用量较少且效果较明显,且作用时间快并能维持一定的时间。本试验中细菌培养方法简便、成本低、周期短,虽然试验未能确定有效成分的具体部位及具体化学成分,以及最佳投喂量,但为今后筛选此类微生物,确定有效成分的位置和种类及分离、纯化工作的开展提供了依据,也为用生物工程方法生产水产动物免疫增强剂奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 陈昌福,李 静.翘嘴鲃细菌性败血症病原菌的分离及其致病力的研究[J].华中农业大学学报,1995,15(4):370-373.
- [2] 王高学,徐 翔. α -甘露聚糖肽对鲫鱼免疫应答强度影响的研究[J].黑龙江畜牧兽医,2005(3):53-54.
- [3] 陈秋红.复合微生态制剂对水产养殖水体净化作用的研究[J].生物技术,2004,14(4):63-64.
- [4] Liu F,Han W Y. Reuse strategy of wastewater in prawn nursery by microbial remediation[J]. Aquaculture, 2004, 230(1):281.
- [5] 曾地刚,雷爱莹,彭 敏,等.噬菌蛭弧菌对池塘水中细菌总数的影响[J].广西农业科学,2004,35(5):399-400.
- [6] Tian B F,Zhao M S. Application of *Bdellovibrio bacteriovorus* on aquaculture[J]. Fisheries Science & Technolog Information, 2001, 28(4): 171-175.
- [7] 沈 萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2002.
- [8] 朱忠勇.实用医学检验学[M].北京:人民军医出版社,1997:795-805.
- [9] 余 滨.医学微生物学[M].北京:人民卫生出版社,1983.
- [10] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版公司,1996.
- [11] Chen C F,Li J,Kusuda R. A preliminary study on the adjuvanticity of henbane in oral vaccination of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Huazhong Agr Uni, 1996, 15(2):157-162.
- [12] 李 静,陈昌福.草鱼白细胞对福建爱德华氏菌(*Edwardsiella fujianensis*)杀菌活性的研究[J].四川大学学报:自然科学版,1998,35(4):619-623.
- [13] 周 进,黄 捷,宋晓玲.免疫增强剂在水产养殖中的应用[J].海洋水产研究,2003,24(4):70-79.
- [14] 祁 真,杨京平.几种微生物制剂和微藻在水产养殖中的应用[J].水生生物学报,2004,28(1):85-89.
- [15] 温周瑞.微生物多糖对水产动物免疫作用研究进展[J].水利渔业,2004,24(4):1-3.
- [16] 李 琴,董在杰.芽孢杆菌及其在水产养殖中的应用[J].科学养鱼,2004(8):44-45.
- [17] 候 军,冯晓英.应用噬菌蛭弧菌生态制剂防治鸡大肠杆菌病[J].中国家禽,1997(6):18.
- [18] E 雷,李光友,毛远新,等.口服免疫性药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究[J].海洋与湖沼,1994,25(5):481-486.
- [19] 刘 恒,李光友.免疫多糖对养殖南美白对虾体内外环境的影响研究[J].海洋与湖沼,1998,29(2):113-118.
- [20] 丁美丽,林 林,李光友,等.泥鳅体表粘液超氧化物歧化酶的发现[J].西南农业学报,1999,12(4):120-121.
- [21] 徐延震,王震龙,宋憬愚.鱼类的免疫机制[J].中国兽药杂志,1995,29(4):57-60.

Effect of nine kinds of bacteria and their metabolites on the immune function of *Carassius auratus*

WANG Gao-xue, BAI Bing

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shanxi 712100, China)

Abstract: Nine kinds of bacterium and their metabolites were used to feed the *Carassius auratus* for 35 days. The phagocytic activity, bactericidal activity, SOD activity, lysozyme activity and agglutinating anti-body titer were detected every 7 days to study the effect of nine kinds of bacteria and their metabolites on the immune function of *Carassius auratus*. The result shows that, compared with the control group, the group of *Bacillus cereus* subsp. *mycoides*, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Dermabacter* sp. and *Bacillus alvei* had more significant differences in phagocytic activity, bactericidal activity, SOD activity and lysozyme activity ($P < 0.01$). The immune function of *Carassius auratus* could be enhanced by the *Bacillus cereus* subsp. *mycoides*, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Dermabacter* sp. and *Bacillus alvei* and their metabolites. The maximum agglutinating anti body titer of *Bacillus cereus* subsp. *mycoides*, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Dermabacter* sp. and *Bacillus alvei* were 1 : 256, 1 : 128, 1 : 64 and 1 : 64. The maximum agglutinating anti body titer of *Bacillus alvei* appeared on the 14th day. Other indexes were detected on the 21st day.

Key words: bacterium; metabolites; immune function; *Carassius auratus*