

文章编号: 1004-7271(2008)06-0757-04

· 研究简报 ·

地衣芽孢杆菌和荚膜红假单胞菌对异育银鲫 鱼种非特异性免疫机能的影响

赵卫红^{1,2}, 陈立侨², 刘晓利², 黄金田¹, 於叶兵¹, 何植楠¹

(1. 盐城工学院化学与生物工程学院, 江苏 盐城 224003;

2. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要: 本试验主要研究芽孢杆菌和光合细菌对异育银鲫鱼种血液白细胞数量、白细胞吞噬活性及血清溶菌酶活性的影响。600尾异育银鲫鱼种, 随机分成9个试验组, 一个对照组, 每组设一平行。试验组在水中添加不同浓度(5×10^8 、 5×10^9 、 5×10^{10} CFU/m³)的芽孢杆菌和光合细菌及两种菌1:1的混合制剂, 饲养49 d后, 测定异育银鲫血液白细胞数目、白细胞的吞噬活性、血清溶菌酶活性等各项免疫指标。试验结果表明: 光合细菌、芽孢杆菌及其1:1的混合制剂均能提高异育银鲫鱼种血液中白细胞的免疫机能, 其中混合制剂作用效果最佳, 其次芽孢杆菌, 效果最差的是光合细菌, 且在 5×10^8 、 5×10^9 、 5×10^{10} CFU/m³浓度范围内, 微生态制剂的作用效果随着添加量的增加而增加。

关键词: 芽孢杆菌; 光合细菌; 非特异性免疫; 异育银鲫

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Effects of *Bacillus licheniformis* and *Rhodospseudomonas capsulata* on the non-specific immune function of *Allogynogenetic crucian carp*

ZHAO Wei-hong^{1,2}, CHEN Li-qiao², LIU Xiao-li², HUANG Jin-tian¹, YU Ye-bin¹, HE Zhi-nan¹

(1. Department of Chemistry and Bioengineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224003, China;

2. College of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The effects of *Bacillus* sp. and photosynthesis bacteria on white cell number in the blood, phagocytes activities and the serum lysozyme activities in *Allogynogenetic crucian carp* were studied in the experiment. 600 *Allogynogenetic crucian* carps were divided randomly into 9 treated groups and a control with a paralleled team. Different concentrations (5×10^8 , 5×10^9 , 5×10^{10} cfu/m³) of *Bacillus* sp., photosynthesis bacteria or mixture agent of *Bacillus* sp. and photosynthesis bacteria (1:1) in the water were prepared for treated groups. After 49 days feeding, white cell number, phagocytes activities and serum lysozyme activities in the tested fish were measured. The experimental results showed that *Bacillus* sp., the mixture agent and photosynthesis bacteria could strengthen the non-specificity immune function of *Allogynogenetic crucian carp*. The effect of mixture agent was the best, the second was *Bacillus* sp. and the last was photosynthesis bacteria.

收稿日期: 2008-02-18

基金项目: 盐城市科技计划发展项目(2006234); 盐城工学院科技处项目(XKY2006041)

作者简介: 赵卫红(1973-), 女, 江苏盐城人, 博士研究生, 研究方向为水产动物营养与种质资源。E-mail: misszwh@163.com

The effect of the microecological agent increases with the rise of its concentration.

Key words: *Bacillus* sp. ; photosynthesis bacteria; non-specificity immunity; *Allogynogenetic crucian carp*

随着水产养殖业的迅速发展,集约式养殖规模日益扩大,大量的工业、农业废水任意排放,养殖生态环境日益恶化,各种疾病频繁暴发。采用微生态制剂增强水产养殖对象的免疫力与抵抗力,减少渔业病害的发生,正逐渐成为控制渔业疾病、保证养殖效益的关键措施,因而在水产养殖水体或饵料中添加微生态制剂成为国内外学者研究的热点^[1-8]。吴志新等^[9]报道,饲料中添加微生态制剂能增强银鲫成鱼的免疫机能。本试验通过在水体中添加不同浓度的芽孢杆菌、光合细菌,研究其对异育银鲫鱼种养殖水体水质、鱼体肠道结构和肠道菌群、消化酶的活性及血液免疫机能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

异育银鲫鱼种,体长 7~10 cm,体重 18~22 g,2007 年 3 月购自盐都楼王养殖场。

1.2 微生态制剂

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),粉末状,活菌量为 2×10^9 CFU/g,光合细菌(photosynthetic bacteria),荚膜红假单胞菌(*Rhodospseudomonas capsulata*),液体状,活菌量为 5×10^8 CFU/mL。2 种有益菌均由中国水产科学研究院南海水产研究所友情提供。

1.3 测定试剂盒

溶菌酶测定试剂盒购自南京建成生物研究所。

1.4 试验方案

参照微生态制剂产品说明书和文献[10]设定试验芽孢杆菌、光合细菌的浓度,具体见下表 1,每组设一平行。

1.5 饲养管理

异育银鲫鱼种食盐水消毒后,室内暂养 18 d,随机分为 20 组。水族箱规格 70 cm × 40 cm × 45 cm,注水量 80 L。按照表 1 添加微生态制剂。实验期间投喂鱼体重 2%~4% 的异育银鲫鱼种饲料(大丰明天开发有限公司)。投饵 1 h 后吸取残饵和粪便。每周彻底换水一次,换水的同时添加微生态制剂。实验期间充氧。饲养 49 d 后,每组随机取 6 条实验鱼,测定血液中白细胞数量、白细胞吞噬活性和血清溶菌酶的活性。

1.6 采血方式

断尾采血,不加抗凝剂。

1.7 测定方法

1.7.1 白细胞计数

白细胞计数参照参考文献[11]。用微量采血管取 10 μ L 的全血,加入 0.19 mL 白细胞稀释液混匀,取一滴混合液于血球计数板上,在高倍镜下计数,每个样重复三次。

表 1 实验分组情况

Tab.1 Conditions of the test groups

组别	投放菌种	浓度(CFU/m ³)
Y1	芽孢杆菌	5×10^8
Y2	芽孢杆菌	5×10^9
Y3	芽孢杆菌	5×10^{10}
YG1	芽孢杆菌 + 光合细菌	$2.5 \times 10^8 + 2.5 \times 10^8$
YG2	芽孢杆菌 + 光合细菌	$2.5 \times 10^9 + 2.5 \times 10^9$
YG3	芽孢杆菌 + 光合细菌	$2.5 \times 10^{10} + 2.5 \times 10^{10}$
G1	光合细菌	5×10^8
G2	光合细菌	5×10^9
G3	光合细菌	5×10^{10}
K	无	-

1.7.2 金黄色葡萄球菌悬液的制备

金黄色葡萄球菌接种于琼脂培养基上,37℃下培养24 h^[12]。用0.65%生理盐水洗下菌落,加入0.5%的福尔马林,100℃水浴10 min,用生理盐水稀释至 30.0×10^8 cells/mL,4℃冰箱中保存备用。

1.7.3 白细胞吞噬活性的测定

取40 μL全血与20 μL金黄色葡萄球菌悬液混匀,25℃水浴1 h,涂片,甲醇固定,瑞氏染色,每个血样涂5片。观察100个吞噬细胞并记录吞噬指数和吞噬百分比^[13]。

吞噬指数 PI = 吞噬细胞内的细菌总数/参与吞噬的吞噬细胞数

吞噬百分比 PP = (100个吞噬细胞中参与吞噬的细胞数/100) × 100%

1.7.4 溶菌酶活性的测定

血样于4℃下离心(8 000 r/min)10 min,得上清液即血清。采用溶菌酶试剂盒测定血清溶菌酶活性,每个样重复两次。

1.8 数据处理

试验数据用SAS进行单因子方差分析(One-way ANOVY)进行HSD法多重比较, $P > 0.05$ 差异不显著, $P < 0.05$ 差异显著。

2 结果

2.1 芽孢杆菌和光合细菌对异育银鲫白细胞数量及其吞噬活性的影响

本试验通过白细胞数量、白细胞的吞噬百分比和吞噬指数三者的乘积综合考察微生态制剂对异育银鲫白细胞免疫性能的影响。光合细菌、芽孢杆菌及两者的混合制剂均能提高异育银鲫的白细胞的免疫性能,其作用效果均随着添加量的增加而增加,其中混合制剂的作用效果最强,具体见表2。

表2 芽孢杆菌和光合细菌对异育银鲫种血液白细胞数量及其吞噬活性的影响(n=12)

Tab.2 Effects of *Bacillus* sp. and photosynthesis bacteria on white cell number and phagocyte activity in *Allogynogenetic crucian carp*(n=12)

组号	白细胞数量 WBC(×10 ⁹ CFU/L)	吞噬百分比 PP(%)	吞噬指数 PI	WBC×PP×PI
Y1	3.21±0.38 ^{bc}	28.33±1.93 ^c	2.34±0.33 ^a	212.80
Y2	3.50±0.35 ^{abc}	37.50±6.87 ^{abc}	2.48±0.29 ^a	325.50
Y3	4.01±0.15 ^a	42.50±4.19 ^{ab}	2.41±0.32 ^a	410.72
YG1	3.10±0.42 ^{bc}	35.00±4.30 ^{bc}	2.25±0.16 ^a	244.13
YG2	3.35±0.18 ^{abc}	41.66±4.30 ^{ab}	2.34±0.27 ^a	326.57
YG3	3.83±0.33 ^{ab}	48.33±4.30 ^a	2.48±0.07 ^a	459.06
G1	3.31±0.30 ^{abc}	29.16±3.19 ^c	2.53±0.22 ^a	244.19
G2	3.43±0.21 ^{abc}	33.33±4.71 ^{bc}	2.53±0.42 ^a	289.23
G3	3.73±0.31 ^{abc}	41.66±5.77 ^{ab}	2.58±0.28 ^a	400.91
K	2.97±0.35 ^c	29.17±4.19 ^c	2.33±0.19 ^a	201.86

注:表中同一列相同字母表示差异不显著($P > 0.05$),同一列不同字母差异显著($P < 0.05$)

2.2 芽孢杆菌和光合细菌对异育银鲫血清溶菌酶活性的影响

芽孢杆菌和光合细菌(5×10^8 、 5×10^9 、 5×10^{10} CFU/m³)不能提高异育银鲫血清中的溶菌酶的活性,但混合微生态制剂具有一定的效果,且其作用随着使用剂量的增加而增加(图1)。

3 讨论

本次试验结果显示,光合细菌、芽孢杆菌以及两者的混合制剂均能提高异育银鲫的免疫机能。这和吴志新等^[9]、吴垠^[7]的研究结果一致。吴志新等^[9]研究发现添加不同剂量的微生态制剂可以显著提高

实验鱼体血液中白细胞的吞噬活性和血清溶菌酶活性。吴垠^[7]研究发现微生态制剂能够提高对虾的生长速度和抗病力。本试验结果表明芽孢杆菌和光合细菌 1:1 的混合制剂作用效果优于单独使用光合细菌或芽孢杆菌。但是刘小刚等^[14]在研究饲料中添加芽孢杆菌和硒酵母对异育银鲫生长及抗病力的实验结果发现:混合使用芽孢杆菌和硒酵母对异育银鲫抗病力的影响要低于单独使用芽孢杆菌。这表明光合细菌对芽孢杆菌的作用具有促进作用,而硒酵母对芽孢杆菌的作用具有抑制作用。因此在异育银鲫养殖水体中添加一定浓度的芽孢杆菌和光合细菌混合制剂可以提高鱼体的非特异性免疫机能,减少鱼体疾病的发生,值得在异育银鲫水产养殖中大力推广。

有关微生态制剂提高水生生物免疫机能方面学者们已开展了部分工作进行了总结^[15-16]。关于芽孢杆菌促进动物机体免疫功能的作用机理,一些学者认为是与菌体结构、代谢产物以及调整微生物群有关。潘康成等^[16]认为地衣芽孢杆菌的免疫促进作用的机理是由于口服芽孢杆菌后,作用于肠道集合淋巴结的抗原结合位点或通过调整动物的微生物群尤其是双歧杆菌菌群起主导间接地发挥免疫赋活的作用,提高机体的局部或全部防御功能,从而达到防病、抗病,提高增重的作用。

参考文献:

- [1] 王 刚. 微生态制剂在水产养殖上的应用[J]. 水产科学, 2002, 21(3): 34-36.
- [2] 李桂杰, 张钧利. 动物微生态制剂的研究进展[J]. 饲料工业, 2000, (11): 16-181.
- [3] 毕永红, 王 武. 微生态制剂及其在集约化水产养殖业中的应用[J]. 水产科技情报, 2001, 28(1): 15-17.
- [4] 朱后华. 光合细菌的培养及其在水产中的应用[J]. 水产养殖, 1997(5): 25-27.
- [5] 刘 淇. 复合型活菌生物净水剂在南美白对虾养殖中的应用试验[J]. 水产科技情报, 2003, 30(3): 136-138.
- [6] 伍 莉, 陈鹏飞. EM 对鲫鱼生长和血液生理指标的影响[J]. 饲料工业, 2006, 27(14): 23-26.
- [7] 吴 垠. 微生态调节剂对提高中国对虾抗病力的研究[J]. 中国微生态杂志, 1996, 8(1): 28-31.
- [8] 黄永春, 王盛伦, 王全英, 等. EM 对建鲤血液指标及耗氧率的影响[J]. 福建畜牧兽医, 1997, (5): 3-5.
- [9] 吴志新, 陈孝焯, 李丽鹃, 等. 微生态制剂对银鲫免疫机能的影响[J]. 水利渔业, 2004, 24(6): 67-68.
- [10] 罗勇胜, 李卓佳, 杨莺莺, 等. 光合细菌与芽孢杆菌协同净化养殖水体的研究[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(增刊): 206-210.
- [11] 杨秀平. 动物生理学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 91-94.
- [12] 刘 勇, 贾永红. 免疫增强剂对河鲫鱼白细胞吞噬和溶菌酶活性的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(1): 111-113.
- [13] 陈昌福, 邹华君, 史维舟, 等. *Aeromonas punctata* 菌体 LPS 的化学成分分析及其对草鱼的免疫原性[C]//中国科学院水生生物研究所鱼病学研究室编. 鱼病学研究论文集, 北京: 海洋出版社, 1995.
- [14] 刘小刚, 曹 丹, 周洪琪, 等. 饲料中添加芽孢杆菌和硒酵母对异育银鲫的生长及抗病力的影响[J]. 水产学报, 2001, 25(3): 448-453.
- [15] 罗 辉, 潘康成, 倪学勤. 微生态制剂对水生动物免疫功能的影响[J]. 饲料工业, 2005, 26(4): 26-30.
- [16] 潘康成, 杨汉博. 饲用芽孢菌作用机理的研究进展[J]. 饲料工业, 1997, 18(9): 32-34.

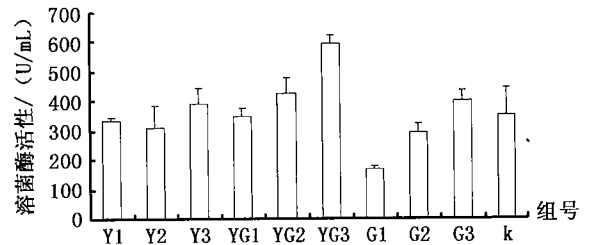


图1 芽孢杆菌和光合细菌对异育银鲫血清溶菌酶活性的影响(n=12)

Fig. 1 The effect of *Bacillus* sp. and Photosynthesis bacteria on serum lysozyme activity in *Allogynogenetic crucian carp* (n=12)