复合抗菌肽在中华鳖养殖生产中的应用研究

刘　康[1]　陈春山[2]　许赞焕[2]　高姗姗[3,4]　赵宝华[4]　何宏轩[3]

1.北京市畜牧总站（100101）；2.北京市水生野生动物救治中心（102100）

3.中国科学院动物研究所（北京 100101）；4.河北师范大学（石家庄 050024）

中图分类号：S966.5，S852.6　　文献标识码：B　　文章编号：1002-2996(2014)09-0040-04

摘要：抗菌肽又称抗微生物肽(antimicrobial peptide)或肽抗生素(Peptide antibiotics)，是生物体内存在的一种具有抗菌活性的小分子多肽，是机体固有免疫系统中的重要效应分子，具有广谱杀菌、抗真菌、病毒、肿瘤以及消除体内突变细胞的作用。为研究复合抗菌肽对动物细菌病的防治效果，笔者采用3种不同药物即抗生素、灭活疫苗和抗菌肽对中华鳖进行试验。通过测定不同组中华鳖的血细胞吞噬功能、血清凝集效价和血清杀菌活力，比较3种药物对中华鳖的免疫力和抗病能力的效果。试验结果表明，3种药物的相对保护率介于80%～95%之间，均能有效地保护中华鳖。其中灭活疫苗的效果最为显著，但是该灭活的鳗氏气单胞菌疫苗只能针对该菌导致的中华鳖疾病起到预防作用。抗生素具有广谱抗菌性，但用药结束10 d之后在中华鳖体内仍有残留。抗菌肽的预防效果虽然没有抗生素和疫苗的效果好，但其不会产生耐药性，在预防细菌性疾病方面有着广阔的应用前景。

关键词：抗菌肽，抗生素，灭活疫苗，鳗氏气单胞菌

动物的集约化养殖带来了一系列的问题，主要包括应激反应加强、机体免疫力下降、发病率上升。腐皮病是当前出现较多，危害较大的中华鳖疾病之一。目前，中华鳖细菌性疾病常用抗生素药物进行预防和治疗，但是随着抗生素药物的大量使用，产生了一系列严重问题，如病原菌产生抗药性、养殖水质恶化和药物残留等。近些年，其他抗微生物药物使用较多，但对这些药物的选用主要是套用鱼类用药的使用标准，效果往往不理想。不同药物对中华鳖的预防及治疗效果的研究较少。

为了找到抗生素药物的替代品，研究人员把目光转向免疫防治方向。免疫防治是通过激发机体自身的免疫防御系统来提高机体对病害的抵抗能力，从而使机体免受外来病原生物的侵扰。鱼类疫苗的研究近年来有显著发展，欧、美、日等国家研制了气单胞菌和爱德华菌等系列疫苗共30多种。我国水产病害免疫的防治重心在水产动物免疫增强剂、微生态制剂和鱼类疫苗等方面，并得到一些成果。其中，水产动物免疫增强制剂和微生态制剂方面的研究和技术应用较多。有研究证明，在饲料中添加免疫增强剂可以增强鳖的非特异性免疫功能。与国外相比，我

(接上页)

表6　仔猪回肠和盲肠微生物菌群的变化(log CFU/g 湿重)

	对照组		试验组		P值		
	不攻毒	攻毒	不攻毒	攻毒	对照vs乳酸菌	攻毒vs不攻毒	两者互作
回肠							
乳酸菌	6.32	5.83	7.51	6.78	0.07	0.28	0.83
总厌氧菌	6.90	6.83	7.22	6.61	0.92	0.48	0.56
大肠杆菌	4.00	4.35	3.36	4.13	0.39	0.66	0.27
耗氧菌	7.86	7.66	8.88	7.85	0.58	0.56	0.81
盲肠							
乳酸菌	6.62	6.45	7.21	6.59	0.38	0.59	0.35
总厌氧菌	6.75	6.89	7.03	7.02	0.64	0.89	0.86
大肠杆菌	4.16	4.85	3.99	4.34	0.32	0.60	0.13
耗氧菌	8.00	7.74	7.87	7.22	0.50	0.36	0.69

显著提高仔猪小肠(回肠)乳酸菌(优势菌群)的数量达到消化道微生态平衡，显著改善仔猪对饲料的消化与吸收能力，提高仔猪的料肉比；同时对大肠杆菌具有抑制作用，可降低腹泻发病率和死亡率；试验组仔猪在大肠杆菌攻毒后7天除血浆低密度脂蛋白胆固醇含量极显著地升高($P<0.01$)外，其他血液生化指标没有变化，而且显著地降低了血浆谷丙转氨酶的活性。

参考文献

1　谢红兵，常新耀，王永强.乳酸菌制剂对断奶仔猪生产性能的影响[J].安徽农业科学，2008(24):10468-10469.

2　陆克文.新型猪用复合益生菌制剂的研制与开发[D].南京农业大学，2011.

3　王兆风，吕刚.微生态制剂的作用机理及在养猪生产中应用现状[J].科技广角，2010(12):23-25.

4　李小飞，王为民，郑秋红，等.微生态制剂替代抗生素对猪生产性能和胃肠道微生物数量的影响[J].畜牧与兽医，2008(10):55-57.

5　黄兴国，杨承剑，王超，等.微生态制剂对猪生产性能及粪中微生物的影响[J].家畜生态学报，2009(02):67-71.

6　杨静，唐志如.乳酸菌的益生作用机制及其在仔猪生产中的应用[J].饲料研究，2012(12):20-22.

作者简介：张社民，高级兽医师，主要从事动物健康养殖技术研究工作。

通讯作者：张勇飞，教授。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

国水产动物疫苗应用范围和效果有很大差距。水产养殖质量安全管理制度不完善和疫苗应用途径的机理不明是影响水产动物疫苗应用范围的主要因素。

除此之外，抗菌肽(antibacterial peptides)的开发和应用已成为研究的热点，它是生物体抵御外源性病原微生物的入侵而产生的一类小分子碱性多肽，与传统的抗生素相比具有分子量小、强碱性、热稳定和广谱杀菌等特点。抗菌肽具有抗革兰氏阳性菌和(或)革兰氏阴性菌的作用，并且一些阳离子抗菌肽对于肿瘤细胞和病毒具有细胞毒性，而对于正常的真核细胞不具毒性。在脊椎动物中，抗菌肽不仅是特异性免疫系统快速、稳定的第一道防线，还在特异性免疫和获得性免疫中起到传递信息到细胞的信号分子作用。利用抗菌肽替代传统抗生素，对提高水产品品质、推动绿色水产业发展有着非常重要的意义。

本研究采用抗生素、灭活疫苗和抗菌肽3种药物来预防中华鳖细菌性疾病。通过测定中华鳖细胞的吞噬活性、血清溶菌酶活力、血清凝集效价和相对保护能力等免疫学指标，从而探讨不同药物对中华鳖的保护效果。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 中华鳖为200±50 g幼鳖，购自北京上庄某养殖场。放入实验室水箱中驯养，水温适宜即可。驯养时间为1周以上，使中华鳖完全适应实验环境后开始正式试验。

1.1.2 细菌制备 用接种环将鳗氏气单胞菌Genbank (NR_041962.1)(中国科学院动物研究所野生动物疫病研究实验室从腐皮病中华鳖组织中分离鉴定并保存)加入LB培养液，37℃摇床180 r/min培养过夜。

1.1.3 灭活疫苗制备 以终浓度为0.4%福尔马林作为化学灭活剂，对病原菌鳗氏气单胞菌液进行灭活，制备灭活疫苗菌液。

1.1.4 抗生素和抗菌肽 马盖宁(Magainin)由中国科学院动物研究所野生动物疫病研究实验室提供；庆大霉素购自兽药市场。

1.1.5 主要试剂 庆大霉素酶联免疫试剂盒购自研域(上海)化学试剂有限公司；TTC还原剂、Hank's液和Wright's染液购自北京乾明基因技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 试验动物分组及预防试验 选取145只体重为200±50 g的健康中华鳖，分为5组。第1组为空白对照组，第2组为感染对照组，第3组为灭活疫苗组，第4组为抗菌肽组，第5组为抗生素组。1～4组每组25只中华鳖，5组为45只中华鳖。确保养殖环境光照通风良好，温度31～33 ℃，饲料为专用中华鳖饵料。采用水上"贴饼子式"投喂，每天6:00和16:00各投喂1次。养殖1周后，第1组每只中华鳖腹腔注射200 μL生理盐水；第2组每只中华鳖腹腔注射200 μL生理盐水；第3组每只中华鳖腹腔注射200 μL (10 mg/kg)鳗氏气单胞菌灭活疫苗，2周后进行第2次同等剂量的灭活疫苗腹腔注射；第4组每只中华鳖在后腿内侧肌肉注射200 μL抗菌肽，早上9:00和下午17:00各注射1次，连续注射7 d；第5组每只中华鳖用硫酸庆大霉素4万IU/kg进行后腿肌肉注射，早上9:00和下午17:00各注射1次，连续预防7 d。

1.2.2 数据和标本采集 在各组用药结束后，从第2～4组的水箱中各选取5只中华鳖，断头法采血。第1组和第5组从抗生素组用药结束后第2天开始每隔2d采1次血样。将每只鳖的血液分为2份，其中1份用EDTA抗凝剂制备抗凝血；另1份血液于4℃下、4000 r/min离心10 min，制备血清，保存至-20℃备用。

1.2.3 相对保护率测定 将鳗氏气单胞菌制成浓度10^8 cfu/mL的菌悬液备用。然后在各试验组用药结束后，在2～5组剩余的每组20只实验鳖腹腔注射200 μL的活菌悬液，放回实验室水箱中饲养。20d后统计死亡个数，计算死亡率和相对保护率。

相对保护率 (Relative percent survival, RPS)=[(对照组死亡率 - 实验组死亡率) / 对照组死亡率)]×100%。

1.2.4 中华鳖血细胞吞噬功能的测定 血细胞中吞噬细胞的基本功能是吞噬微生物并把它们消灭。血细胞的吞噬功能是中华鳖机体最重要的非特异性的细胞免疫，本试验使用TTC还原法测定血细胞的吞噬功能。

将TTC(氯化三苯四氮唑蓝)用Hank's液配成0.01%的溶液，取TTC 0.5 mL与抗凝血0.5 mL混匀后共同孵育(28℃，1 h)，常规涂片后用甲醇固定，用Wright's液染色5 min，油镜下观察吞噬结果。

吞噬细胞8%(PP)=100个血细胞中吞噬有细菌的细胞数。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

吞噬指数(PI)=100 个血细胞所吞噬的细菌总数除以 100。

1.2.5　中华鳖血清凝集效价的测定　凝集试验采用玻片凝集法。中华鳖待测血清的血凝效价按倍比稀释法进行测定,在 96 孔板中取不同稀释度的血清 25 μL,分别加入 25 μL 的鸡血细胞悬液(2%),混合均匀,室温 30 min 后观察,看有无凝集现象发生。对照组以 PBS 代替待测血清样品，以发生凝集的血清最高稀释度作为血清的凝集效价。

1.2.6　中华鳖血清杀菌活力的测定　用中华鳖敏感的致病菌金黄色葡萄球菌(V.Harveyi)为底物,测定各组中华鳖的血清杀菌活力(U)。将底物用 0.1 mol/L 且 pH 值为 6.4 的磷酸钾盐缓冲液配成一定浓度的悬液(OD_{570}=0.35～0.50)。取 3.0 mL 该悬液与 0.05 mL 待测血清于试管中混匀,测其在 570 nm 处的光密度值(A0),然后置于 37℃水浴保温 30 min,取出后立刻置于冰浴中,10 min 后终止反应，测其光密度值(A)。溶菌活力按下式计算 1U=[(A0－A)/A]1/2,比较各组的杀菌活力大小。

1.2.7　药物残留测定试验　在用药结束后的第 2、4、6、8、10 天,选取第 1 组和第 5 组中的中华鳖各 5只,断头法采血,血液于 4℃下、4000 r/min 离心 10 min,制备血清,使用庆大霉素酶联免疫分析(ELISA)试剂盒按 GB-T 21329-2007 动物源性食品中庆大霉素残留量检验方法—酶联免疫法测定庆大霉素的残留量。

2　结果

2.1　相对保护率(RPS)

试验各组均获得较高的 RPS，而在使用了抗生素的第 5 组、抗菌肽进行预防的第 4 组和灭活疫苗预防的第 3 组中华鳖死亡率明显低于第 2 组感染对照组。其中，灭活疫苗预防试验的第 3 组相对保护率(RPS)最高为 95%,使用抗菌肽预防试验的第 4 组的 RPS 为 80%，略低于疫苗预防的第 3 组及抗生素预防的试验第 5 组,第 5 组的 RPS 为 85%。经卡方检验分析表明,3 种药物试验组死亡中华鳖的数量与对照组死亡中华鳖的数量存在显著性差异 (P<0.05)，但各试验组之间不存在显著性差异(χ^2=4.538，df=3,P>0.05)。

2.2　中华鳖血细胞吞噬功能测定结果

表 2 为 3 种药物实验组和对照组血液白细胞的 PI 和 PP 的测定结果。结果表明,试验组中华鳖血细胞的 PI 和 PP 都显著高于对照组中华鳖血细胞的 PI 和 PP,试验组中 PI 和 PP 最高的是第 3 组使用灭活疫苗进行预防的组。经显著性分析表明，试验组中华鳖血液中白细胞的 PI 和 PP 与对照组存在显著性差异 (t 检验,χ^2=44.495,F=5.713,df=5,P<0.05)，但各试验组之间不存在显著性差异(t 检验,P>0.05)。

表 1　3 种药物对中华鳖的相对保护率

组别	试验鳖数量 / 只	死亡鳖数量 / 只	死亡率 /%	相对免疫保护率 /%
对照(生理盐水)	20	1	5	-
感染对照	20	20	100	-
灭活疫苗预防	20	1	5**	95
抗菌肽预防	20	4	20**	80
抗生素预防	20	3	15**	85

注:**,P <0.01。

表 2　3 种药物对血细胞吞噬活性的影响

组别	吞噬细胞 /%	吞噬指数
对照(生理盐水)	2.62±0.77	19.00±2.13
灭活疫苗预防	7.56±0.21**	69.00±4.36**
抗菌肽预防	6.23±1.85	48.74±9.43*
抗生素预防	6.37±0.74*	46.23±7.58*

注:*,P<0.05;**,P<0.01。

表 3　3 种药物对血清凝集效价的影响

组别	血清凝集效价
对照(生理盐水)	1:1
灭活疫苗预防	1:8
抗菌肽预防	1:8
抗生素预防	1:4

表 4　3 种药物对杀菌活力的影响

组别	血清杀菌活力
对照(生理盐水)	0.212±0.007
灭活疫苗预防	0.523±0.013**
抗菌肽预防	0.315±0.025**
抗生素预防	0.400±0.022**

注:**，P<0.01。

2.3　中华鳖血清凝集效价测定结果

表 3 所示为试验组和对照组血清凝集效价的测定结果。结果表明,各试验组中华鳖的血清凝集效价均显著高于对照组,而第 3 组灭活疫苗预防和第 4组抗菌肽预防血清凝集效价最高。

2.4　中华鳖血清杀菌活力测定结果

表 4 所示为试验组和对照组血清溶菌酶活力的测定结果。结果显示，各试验组中华鳖血清杀菌活力均显著高于对照组，而以第 3 组灭活疫苗预防杀菌活力最高。显著性分析结果表明，各试验组的中华鳖血清杀菌活力与对照组之间有显著性差异(t检验，χ^2=0.032，F=60.468,df=5,P<0.05)；第 3 组灭活疫苗预防组与其它各试验组存在显著性差异,其余各试验组之间不存在显著性差异(t 检验,P>0.05)。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表5 抗生素药物残留

天数	抗生素药物残留量(μg/mL)
2	0.326±0.011
4	0.279±0.004
6	0.223±0.012
8	0.160±0.022
10	0.112±0.027

2.5 药物残留测定试验结果

表5所示为中华鳖硫酸庆大霉素抗生素药物残留测定结果。可以看出:在停药后的第2~10天,硫酸庆大霉素在中华鳖的血液中仍有残留。

3 讨论

虽然各种抗生素被作为目前防治中华鳖的细菌传染性疾病的主要防治对策,但由于抗生素类药物的滥用,药物残留和细菌耐药性等问题日渐严重,从而引发了人们对食品安全的关注,越来越多的国家开始呼吁禁用抗生素。因此,正确使用疫苗或免疫增强剂来提高中华鳖自身的抗病能力,是今后预防中华鳖传染性疾病发生的主要途径。因此,研究选择合适的疫苗或免疫增强剂来提高龟鳖的免疫防病功能,是中华鳖疾病免疫防治的一个重要方向。

本试验的药物预防试验结果表明,抗生素、抗菌肽和灭活疫苗均能有效保护中华鳖。通过测定中华鳖血细胞吞噬功能、血清凝集效价和血清杀菌活力表明,抗生素、抗菌肽和灭活疫苗均能显著提高中华鳖的免疫力,增强中华鳖的抗病能力,灭活疫苗的效果最为显著。使用抗生素进行预防对于增强中华鳖血细胞吞噬功能的效果比使用抗菌肽的效果要显著,使用抗生素进行治疗对于增强中华鳖血细胞吞噬功能的效果并没有使用抗菌肽效果显著。有研究证明,马盖宁在对好氧菌和厌氧菌的抑制效果研究中,显示出与诺氟沙星相当的抗菌活性,且马盖宁作用机制不同于其它的抗生素,主要通过攻击微生物的细胞膜来杀菌,而大多数其它的抗生素则是使细菌关键蛋白失去功能。抗菌肽和抗生素均没有使用灭活疫苗的效果好。使用抗生素进预防时,中华鳖的血清凝集效价比使用抗菌肽和灭火疫苗中华鳖的血清凝集效价低。使用抗生素和抗菌肽进行预防对于中华鳖的血清杀菌活力提高的效果一致,均没有使用灭活疫苗的效果好。但是该灭活的鳗氏气单胞菌疫苗只能针对该菌导致的中华鳖该种疾病起到预防作用,且不能用于治疗,所以还需要广谱的抗菌药物。从上述试验结果可以看出,抗生素具有明显的预防和治疗效果,但是其在用药结束10 d之后在中华鳖体内仍有残留,对中华鳖机体有一定的损伤,被人食用后对人体也有不利的影响。所有的常规抗生素都出现了相应的抗药性致病株系,致病菌的抗药性问题已经严重威胁着人们的健康。

抗菌肽作为19世纪80年代发现的具有抗菌活性的多肽,从上述试验结果可以看出,预防效果虽然没有抗生素和疫苗好,但仍有明显保护的效果,而且抗菌肽被分解后的产物是氨基酸,能够被机体利用,没有有害残留物质。抗菌肽具有广谱抗菌、提高机体免疫力、加速伤口愈合过程,靶菌株不易产生抗性突变等优点,在中华鳖细菌性疾病预防方面有着广阔的应用前景。

基金项目:北京市农业局科技项目(20110821)。

作者简介:刘康,1987年出生,男,本科学历,主要从事畜牧生产方面的研究工作。

★短讯★

河南信阳市家庭农场稻田养殖泥鳅搅活稻田水

稻田养鱼鳖,稻田种莲藕,稻田里的花样还真多。这不,信阳市平桥区明港工业区就在稻田里面养起了泥鳅。日前,在该管理区王寨村村民徐具良的家庭农场,笔者看到,40hm² 连片的水稻长势喜人,放养的泥鳅欢快地窜动觅食,不停地搅动着水体,翻动着泥土。

徐具良今年39岁,2013年秋天结束了打工生涯回乡创业,通过土地流转,创办了明港工业管理区宏润家庭农场。今年,他的家庭农场承包土地147hm²。为了增加效益,夺得高产,徐具良在他的家庭农场不断应用新技术,推广新品种。今年,徐具良专门开辟出40hm² 的绿色水稻种植区域,不打农药,不施化肥,还放养了3000kg的泥鳅,一时间引来不少取经的庄稼汉。

徐具良给笔者算了一笔账:泥鳅苗投了6万元。泥鳅可以吃水中的害虫,还可以疏松土壤,促进水稻增产。他初步估算,养殖泥鳅的稻田至少可以增产水稻5%以上。"养殖的泥鳅还有笔不小的收入。今年如果成功,明年要扩大面积。"徐具良信心十足。

(文章来源:新农网)

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net