

# 苏云金芽孢杆菌对黄河鲤白细胞吞噬和溶菌酶活性的影响

殷海成

(河南工业大学 生物工程学院, 河南 郑州 450001)

**摘要:** 为研究苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* Bt)对黄河鲤白细胞吞噬和溶菌酶活性的影响,将苏云金芽孢杆菌按  $1.0 \times 10^{11}$ 、 $3.0 \times 10^{11}$ 、 $5.0 \times 10^{11}$  cfu/kg 3 个浓度添加在鱼用全价颗粒饲料中,投喂经嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)疫苗免疫的 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub> 组和未免疫的 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 组黄河鲤鱼,分别于试验的第 1、15、30、40 天时检测各组鲤鱼白细胞吞噬活性和血清溶菌酶活性。结果表明,添加苏云金芽孢杆菌可显著提高黄河鲤血液中白细胞吞噬活性和血清溶菌酶活性 ( $P < 0.05$ ),且添加浓度越高,血液白细胞吞噬活性和溶菌酶活性越强。免疫组与未免疫组白细胞吞噬活性差异不显著 ( $P > 0.05$ ),溶菌酶活性差异显著 ( $P < 0.05$ )。在停止投喂后 10 d,白细胞吞噬活性、血清溶菌酶活性逐渐下降,但与停止投喂 Bt 前相比,差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

**关键词:** 苏云金芽孢杆菌; 黄河鲤鱼; 吞噬活性; 溶菌酶活性

**中图分类号:** S965.116    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1004-3268(2009)04-0115-04

## Effects of *Bacillus thuringiensis* as Food Additive on the Phagocytic Activity of Leucocytes and Lysozyme Activity of *Cyprinus carpio* in the Yellow River

YIN Hai-cheng

(College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** To study the effects of *Bacillus thuringiensis* (Bt) on the leucocyte and lysozyme activities of *Cyprinus carpio* in the Yellow River, the fishes of group A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub> immunized with *A. hydrophila* and the unimmunized fishes of group B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>3</sub> were feed with the forage added with Bt at the concentrations of  $1.0 \times 10^{11}$ ,  $3.0 \times 10^{11}$  and  $5.0 \times 10^{11}$  cfu/kg, respectively. The phagocytic activities of leucocytes and lysozyme activities were determined at 1, 15, 30 and 40 days post-feeding. The results showed that all the different concentrations of *Bacillus thuringiensis* enhanced the phagocytic activities of leukocytes and lysozyme activities of *Cyprinus carpio* in the Yellow River ( $P < 0.05$ ), but high dose groups showed higher effects than that of low dose groups. No obvious different phagocytic activities of leukocytes were observed among the immunized and unimmunized groups ( $P > 0.05$ ), but the lysozyme activities were significantly different ( $P < 0.05$ ). The phagocytic activities of leucocytes and lysozyme activities declined at 10 d after the stopping of feeding mixed diet, but no significant differences were observed compared to that of feeding mixed diet ( $P > 0.05$ ).

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*; *Cyprinus carpio* in the Yellow River; Phagocytic activity; Lysozyme activity

收稿日期: 2008-12-29

基金项目: 河南工业大学校基金 (06XJC024)

作者简介: 殷海成 (1964-), 男, 河南汝南人, 副教授, 硕士, 主要从事经济动物营养与发育方面的研究。

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)属于革兰氏阳性菌,其芽孢形成期间产生的杀虫晶体蛋白已广泛应用于防范作物、森林、果蔬虫害等,如杀灭寄生线虫、捻转血矛线虫、日本血吸虫等,在生物防治中占有极其重要的地位。随着对Bt结构、功能、遗传、工程菌构建、以及全基因组序列等深入研究,Bt的应用前景更加广阔。对于鱼类的免疫研究,主要体现在应用中草药<sup>[1]</sup>、免疫多糖<sup>[2]</sup>、肽类<sup>[3]</sup>、益生菌制剂<sup>[4]</sup>以及免疫增强剂<sup>[5]</sup>等。刘克林等<sup>[4]</sup>用益生芽孢杆菌投喂鲤鱼,可提高其免疫力。本试验在全价饲料中添加不同剂量的Bt,研究Bt对黄河鲤鱼血液白细胞吞噬活性、血清溶菌酶活性的影响,旨在探讨Bt对鲤鱼血液免疫效果以及其在水产动物养殖中的应用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试鲤鱼与饲料

试验用的黄河鲤鱼购自河南水产科学研究院养殖场,选择体质健壮、无伤残的黄河鲤400尾,体重( $55 \pm 0.52$ )g/尾,随机均分8组,每组50尾,编号分别为:A<sub>0</sub>(对照组)、A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>和B<sub>0</sub>(对照组)、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>,养于直径2m的专用箱。按照常规方法管理,充气泵充气,自然水温( $20 \pm 2$ )℃,饲养15d后开始试验。其中,A<sub>0</sub>、A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>4组分别于第7天和第14天注射含 $1 \times 10^8$  cells/mL的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)菌苗免疫,每尾每次注射0.2 mL。

基础饲料选用河南大德饲料科技开发有限公司生产的鲤鱼全价配合粉状饲料(粗蛋白34%、粗脂肪5.0%、粗纤维8.0%)。A<sub>0</sub>组和B<sub>0</sub>投喂基础饲料,A<sub>1</sub>和B<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>和B<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>和B<sub>3</sub>分别投喂基础饲料加 $1.0 \times 10^{11}$  cfu/kg、 $3.0 \times 10^{11}$  cfu/kg、 $5.0 \times 10^{11}$  cfu/kg的苏云金芽孢杆菌,所有饲料用小型制粒机(曲阜市应用科技研究所,93KWP-105)加工成直径为1.5 mm的颗粒。开始试验后,每天喂食2次(8:00、17:00),连续30d。30d之后改投相同的不含芽孢杆菌饲料。日投饵量为试验鱼体重的2.50%~4.50%。

### 1.2 抗原制备

嗜水气单胞菌购自武汉大学菌种保藏中心,接种于FWA培养基,28℃培养36h,洗涤后,离心集菌。然后加入浓度为0.5%的福尔马林,28℃灭活24h,测定菌液浓度,以0.65%的灭菌生理盐水将灭活的*A. hydrophila*用比浊法测定浓度并调整为 $1 \times 10^8$  cells/mL悬液;取少量接种于营养琼脂平板

以确保灭活,置4℃冰箱中保存备用。

### 1.3 采血及处理

试验的第1、15、30、40天(停喂后的第10天)上午进行血样采集,采用心脏采血和断尾采血2种方法,每组取5尾。取血后,将每尾鱼的血液样本分成2份,1份置室温下1h,再置冰箱内4h,然后以2000 r/min离心15min分离血清,供检测溶菌酶活性;另1份以肝素抗凝,供测定白细胞吞噬活性。

### 1.4 白细胞吞噬活性测定

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)购自武汉大学菌种保藏中心,接种在FWA培养基上,28℃培养36h,集菌,并用无菌生理盐水离心洗涤2次,制成金葡菌悬液。取金葡菌悬液,加入终浓度为0.5%的福尔马林,28℃灭活24h,用灭菌生理盐水清洗3次,并将其浓度调整为 $1 \times 10^8$  cells/mL,作为吞噬原。在0.25 mL抗凝血中加入0.1 mL吞噬原,摇匀后置于28℃恒温水浴锅中,孵育1h,每个血样做血涂片5张,自然晾干,甲醇固定,Giemsa染色,油镜观察并计数。计算吞噬百分比和吞噬指数。

吞噬百分比(PP)=(100个白细胞中参与吞噬的细胞数/100)×100%

吞噬指数(PI)=被吞噬的细菌数/吞噬细菌的细胞数。

### 1.5 血清溶菌酶活性测定

1.5.1 菌液的制备 以粉状溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)配成 $4 \times 10^6$  cfu/mL菌液,再用722型分光光度计于640 nm处测定并调整其浓度,使OD<sub>640</sub>=0.3。

1.5.2 溶菌酶活性的测定 取0.1 mL血清2份,1份于28℃水浴锅中预热5 min后加入1.8 mL菌液,2 min时加入2滴5 mol/L KOH溶液终止反应,测640 nm波长下透光率(T<sub>1</sub>%)。另1份重复上述步骤,测透光率(T<sub>0</sub>%)。T<sub>1</sub>%-T<sub>0</sub>%即溶菌酶所致透光率的变化。与标准曲线对比,查血清中溶菌酶活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 投喂芽孢杆菌对黄河鲤鱼血液白细胞吞噬活性的影响

投喂苏云金芽孢杆菌对受免和未免黄河鲤白细胞吞噬活性的影响见表1。

由表1可以看出,各试验组在投喂苏云金芽孢杆菌前,PP、PI均无显著性差异。投喂苏云金芽孢杆菌后,黄河鲤鱼血液白细胞吞噬活性明显增强,到第

表 1 投喂苏云金芽孢杆菌对受免和未免黄河鲤白细胞吞噬活性的影响

时间(d)	吞噬活性	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	B <sub>0</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>
1	PP(%)	32.91±3.08 <sup>a</sup>	31.88±2.29 <sup>a</sup>	32.30±2.51 <sup>a</sup>	33.12±2.44 <sup>a</sup>	32.45±3.14 <sup>a</sup>	31.72±1.86 <sup>a</sup>	32.21±2.25 <sup>a</sup>	33.41±2.51 <sup>a</sup>
	PI	1.16±0.19 <sup>a</sup>	1.41±0.11 <sup>a</sup>	1.34±0.07 <sup>a</sup>	1.36±0.19 <sup>a</sup>	1.15±0.07 <sup>a</sup>	1.32±0.31 <sup>a</sup>	1.08±0.14 <sup>a</sup>	1.12±0.30 <sup>a</sup>
15	PP(%)	38.8±13.06 <sup>b</sup>	60.81±2.54 <sup>c</sup>	64.67±5.12 <sup>c</sup>	63.15±4.23 <sup>c</sup>	32.15±3.37 <sup>a</sup>	55.03±2.05 <sup>c</sup>	58.48±1.58 <sup>c</sup>	58.83±3.21 <sup>c</sup>
	PI	1.26±0.16 <sup>b</sup>	3.45±0.22 <sup>c</sup>	2.60±0.11 <sup>c</sup>	3.27±0.32 <sup>c</sup>	1.22±0.41 <sup>a</sup>	2.18±0.81 <sup>c</sup>	2.35±0.15 <sup>c</sup>	3.01±0.26 <sup>c</sup>
30	PP(%)	38.24±2.09 <sup>b</sup>	58.67±2.15 <sup>c</sup>	62.52±1.23 <sup>c</sup>	60.23±4.14 <sup>c</sup>	34.80±3.04 <sup>a</sup>	57.28±1.05 <sup>c</sup>	59.12±1.82 <sup>c</sup>	58.67±3.08 <sup>c</sup>
	PI	1.47±0.16 <sup>b</sup>	3.02±0.11 <sup>c</sup>	2.46±0.18 <sup>c</sup>	2.45±0.25 <sup>c</sup>	1.28±0.14 <sup>a</sup>	3.36±0.24 <sup>c</sup>	3.51±0.33 <sup>c</sup>	3.74±0.24 <sup>c</sup>
40 *	PP(%)	39.80±3.01 <sup>b</sup>	59.62±3.44 <sup>c</sup>	60.45±1.83 <sup>c</sup>	61.45±2.20 <sup>c</sup>	34.24±2.18 <sup>a</sup>	51.48±1.42 <sup>c</sup>	53.80±3.44 <sup>c</sup>	52.35±3.19 <sup>c</sup>
	PI	1.58±0.11 <sup>b</sup>	3.96±0.34 <sup>c</sup>	4.15±0.30 <sup>c</sup>	4.28±0.21 <sup>c</sup>	1.33±0.23 <sup>a</sup>	3.44±0.23 <sup>c</sup>	3.72±0.11 <sup>c</sup>	3.57±0.48 <sup>c</sup>

注: \*表示停止投喂 Bt 后 10d; 同行肩标字母相同表示差异不显著(P> 0.05), 不同表示差异显著(P< 0.05)

15 天, 免疫组 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub> 组的吞噬活性达到最强, 其 PP 和 PI 分别为 (60.81±2.54)%、3.45±0.22, (64.67±5.12)%、2.60±0.11, (63.15±4.23)%、3.27±0.32, 对照组 A<sub>0</sub>为(38.81±3.06)%、1.26±0.16, 15d后, A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>组的 PP 和 PI 虽有不同程度的下降, 但仍显著高于 A<sub>0</sub>组。Duncan's 多重比较, A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>组间 PP 和 PI 无显著差异(P> 0.05), 与 A<sub>0</sub>组对比差异显著(P< 0.05)。对未受免组, 苏云金芽孢杆菌也能提高黄河鲤白细胞的吞噬活性, 表现和免疫组相似, 但白细胞的 PP 和 PI 均低于免疫组, 差异不显著(P> 0.05)。

2.2 投喂苏云金芽孢杆菌对黄河鲤血清溶菌酶活性的影响

投喂苏云金芽孢杆菌对鲤鱼血清溶菌酶活性的影响见表 2。各试验组在投喂苏云金芽孢杆菌前, 溶菌酶活性并无显著差异(P> 0.05)。投喂开始之后, 溶菌酶活性开始增大, 且投喂组随浓度梯度增加, 溶菌酶活性增加。到第 15 天, 免疫组 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>各组的溶菌酶活性显著增高, 且达到峰值, 分别为 (99.87±2.12) U/mL、(106.10±1.21) U/mL、(100.94±1.47) U/mL。而未经免疫各组同样增高, 但增速小于免疫组。Duncan's 多重比较, 各试

表 2 投喂苏云金芽孢杆菌对受免和未免黄河鲤血清溶菌酶活性的影响

(U/mL)

时间(d)	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	B <sub>0</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>
1	45.32±1.52 <sup>a</sup>	45.42±2.02 <sup>a</sup>	45.82±2.07 <sup>a</sup>	45.24±3.70 <sup>a</sup>	44.90±2.81 <sup>a</sup>	45.04±2.51 <sup>a</sup>	45.22±0.23 <sup>a</sup>	45.70±1.08 <sup>a</sup>
15	52.32±1.41 <sup>a</sup>	99.87±2.12 <sup>b</sup>	106.10±1.21 <sup>c</sup>	100.94±1.47 <sup>c</sup>	47.84±3.64 <sup>a</sup>	78.50±1.74 <sup>d</sup>	86.12±1.60 <sup>d</sup>	90.54±1.84 <sup>d</sup>
30	52.80±2.42 <sup>a</sup>	98.92±3.51 <sup>b</sup>	100.40±2.04 <sup>c</sup>	99.54±2.36 <sup>c</sup>	47.78±4.01 <sup>a</sup>	74.48±4.82 <sup>d</sup>	85.34±5.65 <sup>d</sup>	88.56±4.82 <sup>d</sup>
40 *	52.50±1.24 <sup>a</sup>	95.84±2.34 <sup>b</sup>	96.52±2.03 <sup>c</sup>	95.93±2.10 <sup>c</sup>	47.94±2.59 <sup>a</sup>	68.51±3.30 <sup>d</sup>	65.47±1.87 <sup>d</sup>	66.30±3.81 <sup>d</sup>

注: \*表示停止投喂 Bt 后 10d

验组与对照组差异显著(P< 0.05), A<sub>2</sub>组与 A<sub>3</sub>组无显著差异(P> 0.05), 但与 A<sub>1</sub>组间差异显著(P< 0.05), 免疫组与未免疫组差异显著(P< 0.05)。未免疫组内比较, 试验组与对照组差异显著(P< 0.05), 各试验组之间差异不显著(P> 0.05)。停止投喂后, 溶菌酶活性虽然稍有下降, 却仍显著高于对照组。

3 讨论

近年来, 鱼类用益生菌、免疫增强剂激发体液免疫和细胞免疫, 以提高其抗病原菌的能力。本试验结果表明: 饲料中添加苏云金芽孢杆菌能使黄河鲤白细胞吞噬活性显著提高, 吞噬百分比和吞噬指数与对照组差异显著(P< 0.05)。投放剂量越大、投喂时间越长, 吞噬活性越强, 其中当苏云金芽孢杆菌浓度为5.0×10<sup>11</sup> cfu/kg 时效果最好; 停止投喂则白

细胞吞噬活性降低, 但各对应试验组停止投喂前后, 差异不显著(P< 0.05)。这说明黄河鲤饲料中添加适量苏云金芽孢杆菌能有效提高其血液白细胞吞噬活性, 刺激免疫细胞激活, 增强免疫力。本试验结果和葛慕湘等<sup>[6]</sup>、刘克林等<sup>[4]</sup>研究结果相一致。可知益生菌能有效提高白细胞吞噬活性, 增强免疫机能。

血清溶菌酶活性的变化和白细胞吞噬活性表现一致, 但峰值出现在 15d。在投喂的整个期间, 溶菌酶活性增加, 尤其是免疫组更为明显, 试验组与对照组差异显著(P< 0.05), 免疫组和未免疫组差异显著(P< 0.05), 剂量较高的 A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>组与其他各组差异显著(P< 0.05), 但此两组之间差异不显著(P> 0.05)。本试验与张红梅等<sup>[7]</sup>研究结果一致, 饲料中添加 Bt 不仅增强白细胞吞噬活性而且显著增加血清溶菌酶活性; 同样, 与王雄等<sup>[8]</sup>研究 (下转第 122 页)

究表明, 饲料钙水平与血清钙呈负相关, 饲料磷水平与血清磷呈正相关; 而饲料磷与血清钙, 饲料钙与血清磷间无显著相关。本试验结果表明, 能量、蛋白质和钙磷对血清 Ca 和血清 P 均没有显著影响( $P>0.05$ ), 但是血清 Ca 随日粮 Ca 水平升高而降低, 血清随日粮 P 水平升高而升高, 与上述研究结果一致。

从生产性能、营养物质消化率、血清生化指标、环境保护及机体内环境稳定等方面综合考虑, 建议对于生长期新美系大约克夏原种猪, 饲料以消化能 14.23kJ/kg、粗蛋白质 21.5%、钙 0.8%、磷 0.8%为宜。

参考文献:

[ 1 ] 邢启银. 不同能量水平饲料对生长肥育猪生长性能的影响[ J ]. 养猪, 2006(1): 27—28.

[ 2 ] Pettigrew J E, Fsnola M A. Swine nutrition and pork quality: a review[ J ]. Anim Sci, 2001, (79): 316—342.

[ 3 ] De Silva S S, Perera M K. Digestibility in sarotherodon niloticus fry: effect of dietary protein level and salinity with further observations on variability in daily digestibility[ J ]. Aquaculture, 1984(38): 293—306.

[ 4 ] 王娟. 饲料能量和蛋白质水平对 CRP 配套系商品代生长猪生产性能、消化代谢和血清生化指标的影响[ D ].

重庆: 西南大学, 2007.

[ 5 ] Kornegay E T. Soybean hull digestibility by sows and feeding value for growing finishing swine[ J ]. J Anim Sci, 1981(53): 138—145.

[ 6 ] Powley J S. Performance of growing-finishing swine fed high level of alfalfa meal; effect of alfalfa level, dietary additives and antibiotics[ J ]. J Anim Sci, 1981(53): 308.

[ 7 ] Drewry K J. Postweaning performance of crossbred pigs fed normal and high fiber diets[ J ]. J Anim Sci, 1981(52): 197—209.

[ 8 ] Hesby S. Nitrogen balance and serum protein response of gestating swine fed *opaque-2* corn, normal corn and corn-soybean diets [ J ]. J Anim Sci, 1970, (31): 481—485.

[ 9 ] 陈金文, 杨山, 莫棣华, 等. 日粮能量和蛋白水平对肉鸡腹脂和血脂的影响[ J ]. 动物营养学报, 1998, 10(1): 20—28.

[ 10 ] 陈冬梅. 植酸酶和柠檬酸对肉鸡生产性能及钙磷利用率的影响[ J ]. 畜牧与兽医, 2003(4): 9—12.

[ 11 ] 李文立, 王宝维, 林英庭, 等. 不同蛋氨酸和赖氨酸添加水平对五龙鹅生产性能的影响[ J ]. 黑龙江畜牧兽医, 2004(1): 30—31.

(上接第 117 页) 结果相同; Marja 等<sup>[9]</sup>研究表明: 在一定程度上, 血浆中的溶菌酶水平变化是与循环系统中的白细胞数目变化一致的, 二者呈正相关。说明有益微生物对于鲤血清溶菌酶有明显的刺激作用, 并增强其活性。

然而, 本试验表明, 受免疫的试验组黄河鲤白细胞吞噬活性和血清溶菌酶活性明显高于未免疫试验组, 免疫的对照组也高于未免疫的对照组, 说明苏云金芽孢杆菌和嗜水气单胞菌存在交叉抗原, 至于是哪一种尚待进一步研究。

参考文献:

[ 1 ] 顾雪飞, 陈玉春, 刘敏. 中草药对鲤鱼非特异性免疫功能的影响[ J ]. 饲料工业, 2007, (28)8: 24—26.

[ 2 ] 李桂峰, 康裕财, 孙际佳, 等. 酵母多糖对赤眼鲮非特异性免疫机能的影响[ J ]. 中山大学学报, 2003, 42(4):

56—57.

[ 3 ] 李清, 毛华明, 肖调义. 小肽对鲤鱼免疫力的影响[ J ]. 饲料研究, 2005 (5): 1—3.

[ 4 ] 刘克林, 何明清. 益生菌对鲤鱼免疫器官功能影响的研究[ J ]. 饲料工业, 2000, 21(6): 24—25.

[ 5 ] 刘云, 孙峰, 王丹. 免疫增强剂对鲫鱼非特异性免疫功能的影响[ J ]. 海洋科学, 2004, 28(9): 42—45.

[ 6 ] 葛慕湘, 杨培培, 张文香, 等. 噬水气单胞菌对鲤鱼血液指标的影响[ J ]. 河北渔业, 2006(1): 8—10.

[ 7 ] 张红梅, 姜会民. MOS 对鲤鱼非特异性免疫的影响[ J ]. 饲料研究, 2006(10): 25—27.

[ 8 ] 王雄, 邓微, 陈孝煊. 微生态制剂对银鲫血清溶菌酶活性的影响[ J ]. 水利渔业, 2004, 24(3): 15—16.

[ 9 ] Marja M, Antti S. Changes in plasma lysozyme and blood leucocyte levels of hatcheryreared Atlantic salmon and sea trout (*Salmo trutta* L) during parr-smolt transformation[ J ]. Aquaculture, 1992, 106: 75—87.