

# 三种抗生素替代物的研究进展

周芷锦\* 穆琳

浙江省动物疫病预防控制中心, 杭州 310020

**摘要** 抗生素的使用极大地提高了人类和动物的健康。作为促生长剂,在养殖业上发挥了巨大的作用。但随着抗生素的大量使用,细菌耐药性问题日益严重,为了遏制细菌耐药性问题,养殖场抗生素减量化势在必行。本文对微生态制剂、中药、噬菌体 3 种作为养殖业中抗生素替代物的研究进展进行总结,为进一步深入研究提供参考。

**关键词** 抗生素;耐药性;微生态制剂;中药;噬菌体

1929 年英国科学家在培养细菌时无意中发现了青霉素的存在,自此抗生素出现在人类历史上,帮助人类和动物战胜了很多疾病。20 世纪 50 年代前后,抗生素促进动物生长和预防疾病的作用在养殖中被发现,自此抗生素作为促生长剂在养殖业中大量使用。据 Thomas 等<sup>[1]</sup>估计,2010 年全球每年生产牛、鸡、猪产品所消耗抗生素的用量为 45 mg/kg, 148 mg/kg 和 172 mg/kg,到 2030 年,这一数据将会增加 67%。而在我国,据中科院公布的数据,2013 年我国的抗生素总使用量为 16.2 万 t,居世界第一,远超第二位的美国,其中兽用抗生素占 52%。抗生素的使用极大提高了人类生存率和养殖业生产效能,但其大量使用导致的细菌耐药性的问题日趋严重,已成为威胁公共卫生的国际问题。为了遏制耐药性进一步发展,结合抗生素使用分布现实,兽用抗生素的减量化,特别是抗生素促生长剂的减量化甚至禁用成为了必然。1986 年瑞典率先禁用了抗生素促生长剂,随后欧盟各国开始对抗生素促生长剂进行不同程度的限制<sup>[2]</sup>,到 2006 年 1 月 1 日欧盟撤销了所有抗生素的促生长用途。面对我国细菌耐药性的问题,特别是我国动物源细菌耐药性的不断发展,根据农业农村部 194 号公告,到 2020 年年底,我国将退出除中药外的所有促生长药物饲料添加剂。根据丹麦的国家猪生产委员会(NCPP)的监测发现,促

生长药物饲料添加剂禁用后,猪体内的潜在病原菌出现耐药性的概率的确下降了,但猪的生产性能在不同生长阶段同样出现不同程度的下降,对于断奶仔猪的影响较大,生产速率下降了 18 g/d,断奶后死亡率也较禁用前提高 0.6%,同时腹泻和感染其他疾病的发生率也有明显提高<sup>[2]</sup>。在这一形势下,为了促进养殖业的健康高效有序的发展,养殖业中抗生素替代物的研究,包括微生态制剂、中草药等成为了研究热点。

## 1 微生态制剂(益生菌)替代抗生素的研究

微生态制剂,又叫活菌制剂、益生菌、益生菌等,最早在 1974 年由 Parker 提出与“抗生素”相对的新概念<sup>[3]</sup>,1989 年 Fuller<sup>[4]</sup>对微生态制剂做了具体的定义,定义微生态制剂是一类能够促进肠道内微生物平衡,对宿主产生有益作用的活的微生物添加剂。1994 年在德国召开的国际会议上,对微生态制剂的定义进一步完善,定义微生态制剂是指含活菌或死菌,包括其组分和产物的细菌制品,经口或其他黏膜途径投入,旨在改善黏膜表面微生物或酶的平衡,或者刺激特异性或非特异性免疫机制<sup>[5]</sup>。国外早在 20 世纪 20 年代就开始研究微生态制剂。目前,美国允许直接饲喂动物的微生物制剂有 43 种,

收稿日期:2020-04-03

\* 通讯作者

周芷锦,女,1985 年生,兽医师。

包括嗜酸乳杆菌、粪肠球菌、枯草芽孢杆菌等。日本主要采用枯草芽孢杆菌、纳豆芽孢杆菌、乳酸杆菌等作为微生态制剂。我国微生态制剂的研究起步于 20 世纪 70 年代<sup>[6]</sup>。经过不断地发展和增补,2013 年底我国农业部发布了 2045 号公告(饲料添加剂品种目录(2013)),按照该目录我国目前可用的微生物添加剂一共有 34 种,包括地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、两歧双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、嗜热链球菌、粪肠球菌、屎肠球菌、酿酒酵母等<sup>[7]</sup>。在使用量上,20 世纪 70 年代,美国微生态制剂的年产量已在 8 000 t 以上。近年来已经达到约 5 万 t/年。我国这方面发展较晚,但 2010 年微生态制剂也达到 4 万 t<sup>[8]</sup>。

### 1.1 微生态制剂的促生长、提高生产性能作用研究

动物的胃肠道是一个微生态系统,本身存在大量的微生物,形成一个动态平衡。微生态制剂的活菌作为肠道的有益菌,在进入肠道后,增加了肠道有益菌总量,与肠道内源的有益菌形成优势菌群,改善肠道环境,如调节肠道 pH 值,维持肠道厌氧环境等,对动物消化道系统的发育和生理功能、免疫器官的发育等产生重要影响,同时对动物的应激反应起到一定的缓和作用。李雪莉等<sup>[9]</sup>设计以对照组、抗生素组和微生态制剂组来研究植物乳杆菌为主的微生态制剂对断奶仔猪的生长性能、器官的重量和胃肠道发育的影响,试验结果表明:在生产性能上,微生态制剂可显著提高断奶仔猪平均日增重和平均日采食量,降低料重比;在器官重量上,微生态制剂显著提高断奶仔猪脾脏相对重量,对胃、十二指肠、肝脏等器官的重量也有增加的趋势;在肠道形态发育上,显著增加断奶仔猪十二指肠绒毛高度,显著降低十二指肠、空肠、回肠绒毛隐比。该试验同样表明抗生素组与微生态制剂组在促生长和提高断奶仔猪的生产性能上无显著差异。钟光等<sup>[10]</sup>通过对雄性肉仔鸡注射地塞米松应激,研究微生态制剂对其生产性能和肠道健康影响。研究发现:应激能破坏肠道微环境,降低生产性能,抑制免疫器官发育;微生态制剂能使死淘率显著降低,29 日龄胸腺指数、脾脏指数和法氏囊指数分别提高 14.29%、16.67%和 20.00%,29 日肠道绒毛高度增加 33.3%,微生态制剂能显著缓解应激对肠道绒毛的损伤。另外有益菌定植在肠道内,其代谢产酸、产维生素、产氨基酸等影响肠道内容物化学成分组成,影响或参

与动物体内的代谢途径,其自身会分泌产生包括蛋白酶在内的各种消化酶,有利于提高动物的采食效率,蛋白的转化率等,提高动物的生产性能。崔闯飞等<sup>[11]</sup>研究发现,在产蛋后期的蛋鸡饲料中添加  $8 \times 10^9$  cfu/g 的枯草芽孢杆菌时,显著降低了平均日采食量和料蛋比;显著增加了蛋壳厚度、强度和壳重比,显著降低了破、软蛋率,增加了蛋壳中钙含量,但对产蛋率和平均蛋重无显著影响。王晓峰等<sup>[12]</sup>研究发现,在海兰褐蛋鸡的饲料中添加 0.05% 以枯草芽孢杆菌为主的微生态制剂,蛋鸡的产蛋率提高 10.2%,降低了料蛋比和不合格蛋率,提升了 A 级蛋的比例,从 49.54% 到 59.35%。张进红等<sup>[13]</sup>研究发现,在荷斯坦奶牛饲料中按 1.0 g/kg 比例添加乳酸菌、芽孢杆菌等组成的复合微生态制剂,平均日产奶量提高 1.9 kg,降低料奶比,改善奶牛泌乳性能;乳脂率提高 0.18%,乳蛋白率提高 0.16%,显著改善奶牛的乳品质。

### 1.2 微生态制剂的预防疾病作用研究

抗生素在畜禽养殖业中大量使用除了用于治疗具体动物疾病以外,另一个重要原因是长期低剂量的饲喂抗生素可以预防疫病的发生,降低养殖损耗率。微生态制剂如要代替抗生素在饲料中大量添加使用,则同样需要有保护动物健康,减低疫病发生概率的作用。目前关于微生态制剂预防疾病,起健康保护作用的表现主要包括保护肠道上皮细胞和加强上皮细胞间紧密度的机械屏障;对肠道黏膜占位保护,分泌有机酸等抑制致病菌的生物屏障;改善上皮细胞免疫功能和调节肠道免疫细胞的免疫屏障;产生各种代谢产物和酶形成的化学屏障<sup>[14]</sup>。魏银萍等<sup>[15]</sup>研究比较了嗜酸乳杆菌、长双歧杆菌和粪肠球菌在致病菌对 HT-29 细胞和粘蛋白粘附作用方面的抑制效果,试验证明:三者分别可使致病性大肠杆菌粘附率由 6.7% 下降到 2.85%、0.214%、1.9%;使伤寒沙门氏菌粘附率由 32.49% 下降到 16.95%、12.93%、20.33%,具有较好的抑制作用。张丹等<sup>[16]</sup>研究发现侧孢短芽孢杆菌 S62—9 利用其自身的营养竞争机制和产生抗菌肽的拮抗作用,对试验的 27 株细菌中大多数致病性细菌及部分真菌产生抑菌作用。对革兰氏阳性菌的效果好于革兰氏阴性菌,尤其对致病性金黄色葡萄球菌、链球菌、单增李斯特氏菌的抑菌效果最明显。Baron 等<sup>[17]</sup>研究发现,凝结芽孢杆菌 GBI-30 能够提高 T 细胞中肿瘤坏死

因子的含量,可用来防治腺病毒和甲型流感病毒等特定病毒感染。目前微生态制剂已经应用在畜禽养殖业中,在预防疾病,提高动物机体免疫力方面有一定的成效。陈西凤等<sup>[18]</sup>对金霉素和复合微生态制剂对肉仔鸡肠道菌群和免疫功能影响的研究发现,微生态制剂可显著增加胸腺指数、脾脏指数、法氏囊指数、IgA 含量和 IgG 含量,显著降低肠道内大肠杆菌和沙门氏菌数,当添加量在 0.1%、0.2% 时,与添加量 0.05% 金霉素比较,效果更优于金霉素。薛俊龙等<sup>[19]</sup>对 1~5 日龄的雏鸡饲喂微生态制剂,在 6 日龄进行鸡白痢沙门氏菌攻毒实验,微生态制剂的保护率为 94%,攻毒对照组保护率为 76%,早期雏鸡饲喂微生态制剂能有效预防鸡白痢。

### 1.3 微生态制剂替代抗生素存在的问题与展望

目前研究中微生态制剂存在的问题与研究方向:有益菌菌种的选择:目前可应用于生产微生态制剂的菌株很多,菌株的抑菌效果也屡见报道<sup>[15-17]</sup>,但菌株进入肠道的定植效果仍需进一步研究,有些菌株在进入肠道后因为肠道本身的环境并不能形成优势菌群,怎么选择培育优势菌种是微生态制剂生产的关键环节。有效活菌数的保持:微生态制剂要起到良好的效果需要达到一定的活菌数<sup>[20]</sup>。影响活菌数主要包括了 2 个方面:一方面日前有报道不同的生产工艺对活菌存活率有很大影响<sup>[21]</sup>,怎样改进生产工艺是微生态制剂厂家未来研究的重点;另一方面活菌制剂从出厂到养殖场的运输过程以及在养殖场保藏期间怎么做到活菌数的保持,活菌制剂在使用时是否还具有有效性的相关研究还较少。此外,活菌制剂在与抗生素同时使用后是否还能保持肠道内的益生菌数量也需要进一步研究。活菌制剂的耐药性:活菌制剂本身是利用有益菌在动物肠道内与致病菌竞争,以达到抑制致病菌的作用,从而替代抗生素使用,减少细菌耐药性的产生。但活菌制剂中的菌株,如粪肠球菌等,是否会与耐药菌株发生耐药基因的传递,反而增加耐药菌株是未来需要研究的问题。

## 2 中药替代抗生素的研究

中药是我国传统医药的宝贵财富,相比抗生素,中药有副作用相对较小,不易产生耐药性等特点,同时中药也可以很好地避免养殖业抗菌药物应用导致动物产品药物残留的问题。随着抗生素耐药

性问题的发生,社会对无抗动物产品的呼声不断提高,养殖业的抗生素使用量必将大幅度降低。在这个背景下,中药作为我国的传统药物,其在养殖业中抗生素替代物的研究以及应用上可发挥的作用更为值得关注。近年来,我国的中兽药整体规模在不断扩大,2016 年我国中兽药生产企业有 1 313 家,实现总产值 45.45 亿元,占化药企业总产值的 12.80%,是 2008 年的近 3 倍。中兽药的剂型包括有散剂、片剂、注射剂、颗粒剂和合剂(含口服液)。除此之外,中兽药在养殖业上的应用还有作为饲料添加剂、中药提取物等<sup>[22]</sup>。随着医药生产工艺的不断进步,还出现了中药超微粉<sup>[23]</sup>等新中兽药产品。

### 2.1 中药对提高动物生长性能作用的研究

各项研究证明,中药作为饲料添加剂添加到饲喂日粮中可以显著提高畜禽的生长性能,包括提高日增重、日采食量、降低其料重比,效果与抗生素相当<sup>[24-25]</sup>。可以提高饲料养分的消化率,李丽等<sup>[26]</sup>对比了金霉素组和中药组(黄芪、陈皮、苍术等)与对照组对饲料养分的消化率,2 组粗蛋白、粗纤维、粗脂肪的表观消化率分别比对照组提高了 4.43%、10.27%、5.36% 和 4.65%、8.82%、4.86%,中药组与金霉素组的效果无显著差异。此外,中药对于畜禽的应激反应有很好的缓解保护作用。武果桃等<sup>[27]</sup>研究发现,以刺五加、黄芪、元胡、党参、五味子、山楂、甘草等药物按一定比例组方的中药可以使高温应激鸡的肝脏中 HSP70 mRNA 表达显著增加,HSP70 热休克蛋白在细胞内的合成,可以抵抗应激造成的组织细胞损伤,提高机体热耐受水平,达到保护细胞作用。

目前,对于中药促生长的机制研究相对较少,主要包括中药对肠道健康保护作用,提高机体抗氧化能力的作用,对血清激素水平的作用等。张伟等<sup>[28]</sup>通过研究猪血清中抗氧化酶活性、丙二醛和肠道菌群变化以探索中药对猪促生长的机制,结果表明添加中药饲喂后猪血清中还原性谷胱甘肽过氧化物酶的活性显著提高,丙二醛的含量显著降低,并显著改善猪肠道的微生物多样性,提高了有益菌,特别是乳酸菌的丰度比例。胡丹等<sup>[29]</sup>研究同样证明了中药能提高肥育猪的总抗氧化能力,显著降低血清中的丙二醛浓度,90 日龄、110 日龄、130 日龄较对照组血清 MDA 浓度分别降低了 35.2%、39.4%、37.0%。霍书英等<sup>[30]</sup>以肉仔鸡为实验对象,研究中药

对血清中激素水平的影响。研究表明:中药使促进器官组织分化的甲状腺素 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 的水平显著提高,且 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 水平高的中药组增重速度也较快;中药组血清中 GH 的水平显著低于对照组,与生长速率成反比。另外该研究发现中药组的尿酸、尿素氮水平显著低于对照组,证明了中药可以改善蛋白质的代谢情况,促进蛋白质的吸收、代谢和沉积。

## 2.2 中药抗菌作用的研究

1) 中药抑菌作用。中药作为传统药物,其抗菌作用得到广泛的认可,研究发现,中药的抗菌作用主要来源其生物活性成分,目前认为中药的抗菌活性成分包括黄酮类、生物碱类、有机酸类、挥发油类、多糖类、皂苷类、蒽醌类、萜类等<sup>[31]</sup>。从中药的抑菌机制来分,主要包括破坏细菌的生物被膜改变细胞的通透性、抑制菌体内酶的活性、影响细菌蛋白质核酸的合成以及提高机体的免疫作用<sup>[32]</sup>。从中药制剂来看,中药有单方和复方之分,在抑菌作用上不只是某一种有效成分,还存在多种成分协同作用的效果。李美发等<sup>[33]</sup>通过研究黄芪、何首乌、黄连、金银花、大黄、白头翁、五倍子、葛根等 8 种中草药的提取液对猪肠道大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的体外抑菌作用来探究中药组方对抑菌效果的影响。实验结果表明:单方添加黄连、金银花和五倍子对大肠杆菌抑菌效果较好;单方添加黄芪、黄连和大黄对金黄色葡萄球菌抑菌效果较好;单方添加黄连和大黄对沙门氏菌抑菌效果较好。复方添加以黄芪 0.25 mg/mL+黄连 0.5 mg/mL+大黄 0.25 mg/mL 体外抑菌效果最好,对 3 种菌均有抑制作用。智晓艳等<sup>[34]</sup>研究发现黄连、黄芩、丹参和连翘对链球菌具有较好抑菌作用,最小抑菌浓度(MIC 值)分别为 32.0、32.0、16.0 和 125.0 g/L,最小杀菌质量浓度(MBC 值)分别为 32.0、64.0、32.0 和 125.0 g/L,以其为主药组成的复方呈现协同抗菌作用。

2) 中药的耐药性消除作用。研究发现,中药除了本身具有抑菌作用外,对耐药菌株的耐药性也具有一定的消除作用。韦嫔等<sup>[35]</sup>对猪源致病性大肠杆菌的抑菌效果以及对庆大霉素耐药性消除情况的研究表明除鱼腥草外,黄连、金银花、艾叶、五倍子表现出明显的抑菌效果,五倍子的抑菌效果最好;对庆大霉素耐药性消除方面,黄连、金银花、艾叶和五倍子均能消除致病性大肠杆菌对庆大霉素的耐药

性,其中五倍子对菌株耐药性的平均消除率最高,作用 24 h 后,平均消除率为 12.53%,其最高消除率可达 22.33%;作用 48 h 后其平均消除率为 13.68%,最高消除率可达 24.41%。中药消除耐药性的机制主要有以下几个方面:消除耐药 R 质粒、抑制耐药菌的抗生素主动外排泵机制、抑制耐药基因的表达。郭威等<sup>[36]</sup>研究发现穿心莲内酯对铜绿假单胞菌外排泵 MexAB-OprM 转录表达的抑制作用使其可恢复部分抗菌药物的敏感性,实验证明头孢他啶、头孢匹罗、左氧氟沙星、美罗培南对 PAO1、Mex1、Mex2、Mex3 菌株的最小抑菌浓度(MIC 值)分别降低 50%、75%、75%和 50%~75%。蒋加进等<sup>[37]</sup>以煎煮法制备的黄连提取液,进行了耐药质粒(R 质粒)消除试验,结果表明,黄连提取液对鸡源多重耐药大肠杆菌耐药性有一定的消除作用,其消除率跟作用时间有一定关系,24 h 和 48 h 的耐药性消除率分别达到 4.5%和 13.25%。任玲玲等<sup>[38]</sup>研究发现连翘作用后多重耐药大肠埃希菌编码主动外排泵系统的 AcrA 基因发生了 24 个碱基突变,改变了 AcrA 基因的编码序列,从而有效抑制多重耐药大肠埃希菌的生长,减弱其耐药性。

## 2.3 中药替代抗生素存在的问题与展望

根据目前的研究报道,中药在替代抗生素应用中存在的问题:中药成分不明确在应用上讲究的是君臣佐使的配伍,复方药剂的效果往往好于单一药剂<sup>[33-34]</sup>。目前研究中从中药提取到了一部分具有抑菌作用的活性成分,如黄酮类,但对于药材中其他成分在抗菌治疗中的效果不明确,对复方药剂成分的相互作用不明确,对成分是否有毒副作用不明确。中药提取方式对抑菌效果的影响:中药提取方式包括了干燥,粉碎,醇提,超声等。据报道,不同的提取方式对抑菌效果影响极大,单一的提取方式的抑菌效果不如多方式结合的抑菌效果,甚至会得出相反的结果<sup>[33,39-40]</sup>。另外,目前研究报道的中药抑菌作用的研究对象基本为中药的提取物,对于直接使用中药材添加到养殖动物的饲料中能否起到抑菌作用尚不明确。中药抑菌作用研究大多还局限在体外试验,对于中药在动物体内作用的研究还比较少。基于上述原因,中药要替代抗生素在养殖业上的应用还不成熟,中药的抑菌作用还需进一步研究,特别是中药如何在动物体内达到体外试验效果的研究还需大量的试验证明。

### 3 噬菌体替代抗生药的研究

噬菌体是一类广泛存在于自然界中,能感染细菌、真菌类、放线菌或螺旋体等微生物的病毒的总称。1915 年英国微生物学家 Twort<sup>[41]</sup>首次报道了其在葡萄球菌培养物的滤液中发现了可裂解葡萄球菌的物质,观察到了清晰的裂菌斑。随后,1917 年法籍加拿大微生物学家 D'Herelle<sup>[42]</sup>正式提出了“噬菌体”这一概念。噬菌体自发现就被应用于人体治疗包括痢疾、霍乱等由细菌感染造成的疾病<sup>[43]</sup>。20 世纪 70、80 年代,Smith 等<sup>[44]</sup>经过大量实验研究报道了噬菌体对小牛、仔猪和羊羔大肠杆菌感染的治疗作用。研究表明噬菌体可以显著减少肠道内致病性大肠杆菌的数量,有效防治大肠杆菌感染导致的腹泻,降低死亡率。但随着抗生素时代的到来,抗生素大规模的工业化生产和其广谱的抗菌效果,成为了时代的主导,关于噬菌体的研究逐步停滞。近年来,抗生素大量使用造成了细菌耐药的问题,噬菌体因其特异性强,不会产生明显的毒副作用,且不会破坏机体正常的菌群、引发严重的内毒血症等特点<sup>[45]</sup>,被认为是一类重要的抗生素替代物,特别是针对耐药菌株的抗生素替代物,得到了重新重视。

#### 3.1 噬菌体的分类

自然界中噬菌体的种类繁多,目前已发现的噬菌体超过 5 100 种。按其形态结构特征分为有尾结构的噬菌体、立方体结构的噬菌体、丝状结构的噬菌体、多形结构的噬菌体,其中有尾结构的噬菌体最多,占 96%。在有尾结构的噬菌体中,长尾噬菌体又占 61%<sup>[46]</sup>。按照噬菌体对宿主的作用方式的不同,可分为两大类,即烈性噬菌体和温和型噬菌体<sup>[47]</sup>。烈性噬菌体感染宿主菌后,会在宿主菌细胞内迅速大量繁殖,进而裂解宿主菌并释放,进一步侵染其他宿主菌。温和型噬菌体在侵染宿主菌细胞后,噬菌体本身的遗传物质与宿主的核染色体会整合到一起,随着宿主细胞遗传物质的复制而复制,正常情况下噬菌体不会大量增殖,也不会裂解宿主菌<sup>[48]</sup>。

#### 3.2 噬菌体对动物抗细菌感染的应用研究

目前噬菌体对抗动物源细菌感染的研究主要包括致病性大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌等。Sheng 等<sup>[49]</sup>以小鼠为模型,饲喂噬菌体/细菌比率为 2:102 的特异性噬菌体 SH1 或 SH1 与 KH1 的混合物,结果表明噬菌体组小鼠在饲喂 2-6 d

后,粪便中无法检出大肠杆菌 O157:117,而对照组小鼠在 10 d 后仍检出大肠杆菌。随后,将该噬菌体应用于荷斯坦奶牛,实验证明,噬菌体同样可以减少奶牛肠道内的大肠杆菌 O157:117,但不能完全消除。孙宇杰等<sup>[50]</sup>研究发现噬菌体 SYJ4 对痢疾志贺菌 (*S.dysenteriae*)CMCC(B)51105 引起的鸡痢疾有一定的治疗效果,在灌服噬菌体 11 h 后,鸡粪便中的志贺氏菌数就降到喂菌前 103 CFU/g 水平,与链霉素的效果相当,并在控制鸡肠道志贺氏菌群数量上优于链霉素。Atterbury 等<sup>[51]</sup>从 2004-2005 年分离到的 232 株沙门氏菌噬菌体中挑选了 3 株具有较宽噬菌谱的噬菌体进行了抑制鸡体内的 3 种血清型沙门氏菌 (*Salmonella enterica serotypes* Enteritidis, Hadar, and Typhimurium) 的试验,结果显示 3 株噬菌体可有效地清除鸡体内的沙门氏菌 (*Salmonella enterica serotypes* Enteritidis, Hadar, and Typhimurium), 试验同时提示选择合适的噬菌体、优化给药时机和给药方式是获得抑菌效果的关键因素。李跃等<sup>[52]</sup>在患乳腺炎的奶牛中分离得到金黄色葡萄球菌 4P-1, 并利用 4P-1 建立小鼠乳腺炎模型。通过灌乳的方式用噬菌体 2Y-10 对该模型进行了治疗,结果表明噬菌体可以使乳腺组织内细菌数量显著下降,缓解乳腺组织病变,有效地降低炎症反应。

#### 3.3 噬菌体对耐药菌株的抑菌作用研究

噬菌体对于耐药菌株同样拥有有效的杀菌作用。闫李侠等<sup>[53]</sup>以 SPF 级昆明小鼠建立小鼠感染泛耐药鲍氏不动杆菌的模型,分为试验组和对照组,试验组使用噬菌体 AB46 治疗,对照组给同等体积的肉汤治疗。结果显示:泛耐药鲍氏不动杆菌 1:10 稀释试验组与对照组,有统计学差异;1:2、1:5 稀释组无统计学差异;1:50 稀释的试验组与对照组均无小鼠死亡,脾菌数计数结果  $P=0.026$ ,有统计学差异。证明,噬菌体可有效地治疗泛耐药鲍氏不动杆菌重症感染的小鼠,明显提高小鼠的生存率,在感染较轻的情况下则可以明显降低小鼠的脾菌数。Biswas 等<sup>[54]</sup>利用噬菌体对耐万古霉素肠球菌 (*antimycin-resistant enterococci*, VRE) 进行治疗试验发现,当给试验小鼠腹腔注射  $10^9$ CFU VRE 48 h 后,小鼠全部死亡;但当在感染后,仅给小鼠一次性注射  $3 \times 10^8$ PFU 噬菌体即可 100% 存活;即使当感染发生 24 h 后,小鼠濒临死亡,噬菌体治疗也可获得 50% 的生存率。

### 3.4 噬菌体的制剂研究

目前研究噬菌体制剂的方向主要包括全菌噬菌体制剂、遗传学改造的噬菌体制剂和噬菌体裂解酶制剂等。

全菌噬菌体制剂包括单一噬菌体制剂和鸡尾酒制剂。由于噬菌体的高宿主特异性,单一的噬菌体制剂在临床应用上有很大的局限性,将具有不同噬菌谱的多种噬菌体制成混合制剂,称为鸡尾酒,且因其具有广谱性、可降低耐受细菌出现的频率,是全菌噬菌体制剂的主要研究方向<sup>[43]</sup>。2006年,美国FDA批准了首个噬菌体鸡尾酒制剂 Lis-texTMP100(Microes 公司生产),用作食品添加剂<sup>[55]</sup>。

遗传学改造的噬菌体制剂是旨在通过分子生物学的手段,对噬菌体的基因进行编辑,以期能改变或扩展噬菌体的宿主谱,延缓免疫系统对噬菌体的清除速度,减少内毒素的释放以及增强抗生素的疗效,使其能更有效地应用于临床治疗<sup>[56]</sup>。

噬菌体裂解酶制剂中的裂解酶是噬菌体编码的产物,噬菌体通过裂解酶裂解宿主细胞完成杀菌作用。裂解酶主要作用于宿主的细胞壁,按作用于细胞壁肽聚糖共价键位点的不同,可将噬菌体裂解酶分为葡糖苷酶、酰胺酶、内肽酶和转糖基酶。裂解酶制剂具有特异性、高效性、较高的稳定性、安全性以及潜在的广谱杀菌性能,在特异性杀死宿主菌的同时,不易产生耐药性<sup>[57]</sup>。

### 3.5 噬菌体替代抗生素存在的问题与展望

噬菌体在替代抗生素的应用研究中存在的主要问题:噬菌体的安全性评价。噬菌体作为一种细菌病毒,其病毒的本质是其作为治疗药物的障碍,噬菌体是否能感染机体正常细胞,免疫系统对噬菌体的应答反应,噬菌体在裂解宿主菌时是否会释放大量内毒素和释放的内毒素对机体的影响,是否会导致内毒血症等疑虑一直存在,虽然目前已开始有大量安全性评价研究<sup>[45]</sup>,但其在制成制剂应用于养殖业上的安全性仍需进一步研究;噬菌体的选择:噬菌体的高特异性是优点也是缺点,作为替代抗生素的制剂,相对于抗生素的广谱抗菌性,其噬菌谱较窄,单一噬菌体制剂难以起到很好的效果,噬菌体鸡尾酒制剂虽然在一定程度上可以解决这个问题,但是鸡尾酒制剂仍需及时更新和进行不同的组合<sup>[43]</sup>,其应用于大规模养殖业的路还有很长距离;噬菌体制剂给药剂量、给药方式和给药时间的把握

是噬菌体治疗效果的关键因素<sup>[49,51]</sup>,给养殖业具体操作者构成了使用障碍;噬菌体的抗性问题:实验发现单一培养的菌株可在数小时或数天内发展产生噬菌体抗性<sup>[58]</sup>。面对上述问题,未来随着分子生物学的发展,对噬菌体遗传物质的研究,如基因改造等以及噬菌体杀菌机制的研究等方面将是未来研究的重要方向<sup>[59]</sup>。

## 4 结语

随着耐药细菌的不断发现,甚至是“超级细菌”的出现,人类对于抗生素使用量的控制会越来越严格,落实到养殖业上,抗生素作为促生长剂和预防疾病用药的时代必将过去。在此形势下,涌现出了包括微生态制剂、中草药制剂、噬菌体制剂等抗生素替代物,其各有优点,但完全替代抗生素还存在很多问题,需要各国科学工作者进一步研究。

## 参考文献

- [1] THOMAS P, VAN B, CHARLES B, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals[J]. Proceeding of the national academy of science, 2009, 112(18): 5649-5654.
- [2] TAYLOR-PICKARD J A. 禁用抗生素促生长剂(AGPs)对畜禽的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(2): 71-72.
- [3] 郑志强, 徐建, 张永红. 微生态制剂的研究进展与应用前景[C]// 会务组. 第五届京津冀畜牧兽医科技创新研讨会暨北京畜牧兽医学会“瑞普杯”新思想、新观点、新方法演讲论文集. 北京: 会务组, 2016: 433-436.
- [4] FULLER R. Probiotics in man and animals [J]. Appl Bacteriol, 1989, 66(5): 365-378.
- [5] ARUNACHALAM K D. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology [J]. Nut res, 1999, 19(10): 1559-1597.
- [6] 宾冬梅, 杨灿. 微生态制剂在畜禽饲料中的应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(25): 111-113, 121.
- [7] 中华人民共和国农业农村部. 中华人民共和国农业部公告第2045号 [EB/OL]. (2017-12-04). [http://www.moa.gov.cn/nybg/2014/dyq/201712/t20171219\\_6104350.htm](http://www.moa.gov.cn/nybg/2014/dyq/201712/t20171219_6104350.htm).
- [8] 王际辉, 刘诗文, 肖珊, 等. 现代生物技术与饲用微生态制剂[J]. 微生物学杂志, 2015, 35(2): 1-8.
- [9] 李雪莉, 王超, 虞德夫, 等. 微生态制剂对断奶仔猪生长性能、器官重及其胃肠道发育的影响[J]. 草业学报, 2017, 26(8): 192-199.
- [10] 钟光, 王进圣, 王炎辉, 等. 微生态制剂对对应激雄性肉仔鸡生长性能和肠道健康的影响[J]. 动物营养学报, 2017, 29(11): 4123-4130.
- [11] 崔闯飞, 王晶, 齐广海, 等. 枯草芽孢杆菌对产蛋后期鸡蛋生产性能和蛋壳品质的影响[J]. 动物营养学报, 2018, 30(4): 1481-1488.
- [12] 王晓峰, 严敏, 蒋岩, 等. 微生态制剂对海兰褐蛋鸡生产性能和蛋品质的影响[J]. 中国家禽, 2017, 39(23): 73-75.

- [13] 张进红,王桂柱,王洁.复合微生态制剂对奶牛泌乳性能和乳品质的影响[J].畜牧与兽医,2017,49(3):39-42.
- [14] 张日俊,隋雯丽,廖秀东.饲用益生菌(微生态制剂)与益生元的研究进展[C]//会务组.第二届中国生物饲料科技大会论文集.杭州:会务组,2014:30-43.
- [15] 魏银萍,王斌,魏泓.益生菌株对 HT-29 细胞的粘附及对致病菌的粘附抑制性能研究[J].中国药业,2006,15(8):7-8.
- [16] 张丹,王志新,李兴峰,等.侧孢短芽孢杆菌 S62-9 对常见微生物的体外抑菌作用[J].中国食品学报,2017,17(1):55-61.
- [17] BARON M A.patented strain of *Bacillus coagulans* increased immune responses to viral challenge [J].Postgraduate medicine, 2009,121(2):114-118.
- [18] 陈西风,周颖,刘维平.复合微生态制剂对肉仔鸡生长性能、肠道菌群和免疫功能的影响[J].畜牧与兽医,2019,51(7):55-59.
- [19] 薛俊龙,王国艳,张伟业,等.微生态制剂预防鸡白痢沙门氏菌感染的应用技术研究[J].中国动物检疫,2011,28(9):38-41.
- [20] 吕远蓉,王怀禹.复合微生态制剂对肉鸡免疫器官指数和血清免疫指标的影响[J].畜牧与兽医,2017,49(9):49-52.
- [21] 葛春雨,李军国,段海涛,等.饲料加工工艺与复合微生态制剂对肉鸡生长性能与免疫功能的影响 [J]. 动物营养学报,2018,30(9):3681-1692.
- [22] 王鹤佳,秦玉明,安洪泽,等.我国中兽药供给侧结构调整调查分析[J].中国兽药杂志,2018,52(2):7-11.
- [23] 马绍伟,邓文琼,马玉芳,等.复方中药超微粉对河田鸡生长性能、屠宰性能及肉品质的影响[J].中国畜牧兽医,2016,43(1):114-120.
- [24] 刘显军,刘晓辉,陈静.苍术等中草药复方添加剂对断奶仔猪生长性能的影响[J].中国兽医杂志,2012,48(1):45-47.
- [25] 张晓菊,王友明,陶志伦,等.中药饲料添加剂对长金猪生长性能和饲料养分消化率的影响[J].中国畜牧杂志,2004,40(6):30-31.
- [26] 李丽,崔明昊,董子诚,等.复方杨树花素预混剂对肉仔鸡抗病和促生长作用研究[J].畜牧与兽医,2013,45(3):35-37.
- [27] 武果桃,姜俊兵,牛国庆,等. 中药复方应激康对热应激肉鸡 HSP70m RNA 表达影响的研究[J].中国兽医杂志,2014,50(9):50-53.
- [28] 张伟,张义,张超,等.中药复方对育肥猪血清氧化指标及肠道菌群的影响[J].中国兽医学报,2015,35(12):2008-2013.
- [29] 胡丹,王巧红,顾建明,等.不同剂量复方中药超微粉对育肥猪生长性能及抗氧化能力的影响[J].畜牧与兽医,2015,47(9):107-110.
- [30] 霍书英,李呈敏,王淑荣,等.纯中药饲料添加剂对肉仔鸡增重血清激素水平以及尿酸尿素氮的影响[J].中国兽医杂志,2001,37(10):26-28.
- [31] 刘云宁,李小凤,班旭霞,等.中药抗菌成分及其抗菌机制的研究进展[J].环球中医药,2015(8):1012-1017.
- [32] 朴喜航,艾红佳.中药抗菌成分及其抗菌机制的研究进展[J].吉林医药学院学报,2017,38(6):445-447.
- [33] 李美发,陈作栋,梁欢,等.单一中草药以及复方中草药体外抑菌效果研究[J].饲料工业,2019,40(12):22-26.
- [34] 智晓艳,崔慧慧,范云鹏,等.14 种中药及其复方的体外抗菌活性[J].西北农业学报,2014,23(7):114-119.
- [35] 韦嫔,谭艾娟,吕世明,等.中药消除致病性大肠杆菌耐药性的研究[J].江苏农业科学,2017,45(11):127-129.
- [36] 郭威,周莹,叶露,等.穿心莲内酯抑制铜绿假单胞菌外排泵 MexAB-OprM 的作用 [J]. 中国医院药学杂志,2010,30(16):1343-1347.
- [37] 蒋加进,朱卫,庄禧懿,等.黄连对鸡源大肠杆菌质粒消除作用的研究[J].畜牧与兽医,2013,45(11):79-81.
- [38] 任玲玲,关立增.连翘对大肠埃希菌多重耐药基因 *AcrA* 的影响研究[J].动物医学进展,2008,29(5):43-45.
- [39] 陈希文,赖守勋,尹苗,等.22 种中药多糖对猪源金黄色葡萄球菌的体外抑菌活性[J].江苏农业科学,2016(9):264-267.
- [40] 杨闻,段玉峰,王蓓蓓,等.首乌藤总黄酮的抑菌活性研究[J].食品工业科技,2012(9):111-113.
- [41] TWOR F W.An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses[J].Lancet,1915(11):1241-1243.
- [42] HERELLE F.On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli [J].Comptes Rendus Acad Des Sci,1917,165 (3):373-375.
- [43] 李刚,胡福泉.噬菌体治疗的研究历程和发展方向[J].中国抗生素杂志,2017,42(10):807-812.
- [44] SMITH H W,HUGGINS M B .Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs [J].Journal of medical microbiology,1983,129(8):2659-2675.
- [45] 韩晗,李雪敏,王爽,等.噬菌体作抗菌剂使用的安全性评价研究进展[J].江苏农业科学,2017,45(22):18-23.
- [46] ACKERMANN H W.Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000 [J].Archives of virology,2001,146(5):843-857.
- [47] LENSKI R E .Dynamics of interactions between bacteria and virulent bacteriophage[J].Adv Microb Ecol,1988(10):1-44.
- [48] 朱育玮,李玉保,王守荣,等.噬菌体及其治疗细菌感染的研究进展[J].中国畜牧兽医,2015,42(3):769-773.
- [49] SHENG H Q,KNECHT H J,KUDVA I T,et al.Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants[J].Applied and environmental microbiology, 2006,72(8):5359-5366.
- [50] 孙宇杰,柳佳志,王智柔,等.噬菌体 SYJ4 及其对肉鸡痢疾治疗效果初步探究[J].农业现代化研究,2016,37(3):601-605.
- [51] ATTERBURW R J,VANBERGEN M A P,ORTIZ F,et al.Bacteriophage therapy to reduce salmonella colonization of broiler chickens[J].Appl Environ Microbiol,2007,73(14):4543-4549.
- [52] 李跃.金黄色葡萄球菌裂解性噬菌体治疗乳房炎的实验研究[D].吉林:吉林大学,2014.
- [53] 闫李侠,黄至澄,任应鹏,等.噬菌体治疗泛耐药鲍氏不动杆菌重症感染小鼠的研究[J].中国人兽共患病学报,2017,33(10):920-922.
- [54] BISWAS B,ADHVA S,WASHART P,et al.Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolation of van-