

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.01.12

# 复方中草药与鼠李糖乳杆菌共发酵产物 对鸡球虫病的治疗效果研究

黄海斌,石昊林,杨文涛,姜延龙,王建忠,石春卫,  
康元环,曹欣,王春风\*,杨桂连\*

(吉林农业大学动物科学技术学院,吉林省动物微生态制剂工程研究中心,动物生产及产品质量安全教育部重点实验室,长春 130118)

[收稿日期] 2019-10-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 01-0067-06 [中图分类号] S858.31

**[摘要]** 为探究复方中草药与鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*, *L. rhamnosus*)共发酵产物对鸡球虫病的治疗效果,将复方中草药(青蒿、常山、白头翁、仙鹤草、槐花、黄芩、甘草)与 *L. rhamnosus* 共发酵 12 h,患球虫病雏鸡灌服共发酵产物,连续用药 5 d,观察雏鸡临床症状,并检测各组雏鸡的相对增重率,盲肠病变记分,制作盲肠病理切片,计算每克粪便卵囊值(OPG)及各组药物抗球虫指数(ACI)。结果表明,服用复方中药发酵制剂后的感染球虫的雏鸡体重显著高于对照组( $P < 0.05$ );发酵产物可以明显减轻盲肠病理变化,同时可以降低受感染雏鸡卵囊的排出量;发酵产物组的 ACI 为 130.59,达到中等抗球虫水平。复方中草药与 *L. rhamnosus* 共发酵提高了中药对鸡球虫病的治疗效果,为益生菌中药发酵治疗球虫病奠定了基础。

**[关键词]** 球虫病;鼠李糖乳杆菌;发酵;抗球虫指数;中药

## Study on the Therapeutic Effect of Chinese Herbal Formula and *Lactobacillus rhamnosus* Co-fermentation Product on Chicken Coccidiosis

HUANG Hai-bin, SHI Hao-lin, YANG Wen-tao, JIANG Yan-long, WANG Jian-zhong,  
SHI Chun-wei, KANG Yuan-huan, CAO Xin, WANG Chun-feng\*, YANG Gui-lian\*

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Jilin Provincial Engineering Research Center of Animal Probiotics,  
Key Laboratory of Animal Production and Quality Security Ministry of Education, Changchun 130118, China)

**Abstract:** In order to explore the therapeutic effect of the Chinese herbal formula and *L. rhamnosus* co-fermentation product on chicken coccidiosis, the Chinese herbal formula (*Artemisia annua*, *Dichroa febrifuga*,

基金项目:国家重点研发计划(2017YFD0501200,2017YFD0500400,2017YFD0501000);国家自然科学基金(31672528,31602092);吉林省科技发展计划(20180201040NY,20190301042NY);吉林省教育厅“十三五”科学技术(JJKH20180695KJ)

作者简介:黄海斌,助理实验师,从事动物寄生虫免疫与防治、动物微生态制剂创制。

通讯作者:杨桂连。E-mail:yangguilian@jlau.edu.cn;王春风。E-mail:wangchunfeng@jlau.edu.cn

*Pulsatilla chinensis*, *Agrimonia pilosa*, *Sophora japonica*, *Scutellaria baicalensis*, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch) and *L. rhamnosus* After 12 hours of fermentation, chicks suffering from coccidiosis were fed with co-fermentation products for 5 consecutive days. The clinical symptoms of chicks were observed, and the relative weight gain rate, cecal lesion scores, cecal pathological sections, oocysts per gram (OPG) per gram of chicks, and anticoccidial index (ACI) of each group were calculated. The results showed that the weight of the chicks infected with coccidia after taking the chinese herbal formula fermentation preparation increased significantly, and the difference was significant ( $P < 0.05$ ). In addition, the chinese herbal formula fermentation preparation can significantly reduce the pathological changes of the cecum, and at the same time reduce the discharge of the oocysts of the infected chicks. The ACI of the fermentation product group was 130.59, reaching a medium anticoccidial level. The co-fermentation of chinese herbal formula and *L. rhamnosus* improves the therapeutic effect of traditional Chinese medicine on chicken coccidiosis, and lays a foundation for the fermentation of probiotics to treat coccidiosis.

**Key words:** coccidiosis; *Lactobacillus rhamnosus*; ferment; ACI; herbal medicine

球虫病(coccidiosis)是鸡主要的寄生虫病,能够造成雏鸡死亡、吸收不良、饲料利用率低和生长迟缓<sup>[1]</sup>。目前,药物和活疫苗是控制球虫病的主要措施,但是,由于长期使用药物和疫苗费用高昂,需要研发更有效和更安全地控制鸡球虫病的策略<sup>[2]</sup>。中药具有无耐药性、成本低廉等优点,已经在多种原虫感染中发挥出较好的治疗作用,如利什曼原虫、阿米巴原虫、锥虫和隐孢子虫等。益生菌发酵中药一方面可以使中药释放出更多的有效成分,降低药物中原有的毒副作用,提高中药的适口性;另一方面益生菌也可以通过调节肠道环境、分泌活性分子、调节宿主免疫<sup>[3]</sup>等方式发挥抗寄生虫作用。本实验将具有抗球虫作用的复方中药与鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*, *L. rhamnosus*)共发酵,并评价发酵产物的抗球虫效果,旨在应用乳杆菌促进中药释放有效成分,提高中药抗球虫效果,为鸡球虫病提供新的治疗策略。

## 1 材料和方法

1.1 菌株、虫株 鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*) ATCC53103,由吉林农业大学动物科学技术学院动物微生态实验室保存,柔嫩艾美耳球虫(*E. tenella*)孢子化卵囊由吉林农业大学动物科学技术学院动物寄生虫实验室保存。

1.2 复方中药液的制备 本实验的中药方剂为:青蒿(20%)、常山(20%)、白头翁(15%)、仙鹤草

(15%)、槐花(10%)、黄芩(10%)、甘草(10%)。取复方中药 500 g,加入 5 倍体积蒸馏水进行煎煮 40 min,取出药液后再加入 5 倍体积蒸馏水煎煮 40 min 反复 3 次,将 3 次所得药液过滤后放入 80 °C 烘干箱内,将药物浓缩成 1.00 g/mL 药液,即每 mL 相当于生药 1 g,药液灭菌后放入 4 °C 冰箱保存备用。

### 1.3 制备复方中药与 *L. rhamnosus* 共发酵产物

250 mL 容量瓶加入 100 mL 复方中药液、4 mL *L. rhamnosus* 菌液( $5 \times 10^8$  CFU/mL)转速为 80 r/min、37 °C 条件下培养 12 h,获得共发酵产物。

1.4 实验动物分组及处理 将 30 只 1 日龄雏鸡随机分成 6 组,每组 5 只。雏鸡于 13 日龄经口接种  $5 \times 10^4$  个 *E. tenella* 孢子化卵囊。之后,每日观察雏鸡状态,当雏鸡出现精神不振、腹泻血便时按表 1 中处理方法进行治疗,每天给药一次,连续治疗 5 d,之后处死雏鸡检测各项指标。

表 1 实验处理与分组

Tab 1 Experimental processing and grouping

组别	攻虫(13 日龄)	治疗
空白对照组		
地克珠利组	<i>E. tenella</i> $5 \times 10^4$ 个/只	2% 饮水给药
发酵产物组	<i>E. tenella</i> $5 \times 10^4$ 个/只	发酵产物 200 $\mu$ L/只
复方中药组	<i>E. tenella</i> $5 \times 10^4$ 个/只	中药液 200 $\mu$ L/只
<i>L. rhamnosus</i> 组	<i>E. tenella</i> $5 \times 10^4$ 个/只	每只灌服 LGG $2 \times 10^8$ CFU
攻虫组	<i>E. tenella</i> $5 \times 10^4$ 个/只	PBS 200 $\mu$ L/只

1.5 体重 分别记录接种球虫卵囊时雏鸡体重作为初重,试验结束时雏鸡体重作为末重,二者相差体重数值与组内存活雏鸡数量比值为平均增重。

1.6 盲肠病变计分 试验计算盲肠病变记分方法采用 Reid 和 Johnson 计分法,该方法有 5 个等级的盲肠病变,其病变程度逐渐加深,分别用 0~4 分来对应,0 分:肉眼观察盲肠病理变化不明显;1 分:盲肠中内容物无血色出现,肠壁并没有增厚但可见少量出血点;2 分:盲肠中内容物带有血迹且肠壁出现增厚现象;3 分:盲肠中内容物带有明显血迹,肠壁水肿增厚,肠道严重臌气;4 分:可见盲肠芯,肠道肿胀严重,粪便为血红色呈结块状。

1.7 粪便内卵囊数(OPG 计数) 试验使用的是麦克马斯特的方法来进行粪便中卵囊值的计算。取各组雏鸡粪便 2 g,用 58 mL 饱和食盐水混匀,用麦克马斯特计数板在显微镜下记录卵囊数量。每克粪便卵囊数(OPG) = 显微镜下记录卵囊数量 × 100。

1.8 抗球虫指数(ACI) ACI 是评价各类物质抵抗艾美耳球虫能力的一项重要指标,ACI = (相对增重率 + 存活率) - (卵囊值 + 病变值)。相对增重率 = 各个试验组雏鸡增重/空白对照组雏鸡增重 × 100%;存活率 = 各组雏鸡的存活数/各组雏鸡总数 × 100%;病变值 = 雏鸡盲肠病变计分 × 10;卵囊值计算方法:雏鸡卵囊比数(%) = 空白对照组雏鸡 OPG/各个试验组雏鸡 OPG × 100%,卵囊值评价标准见表 2。

ACI 评价标准:(1)若 ACI < 120 时,说明达不到抗球虫的效果;(2)若 120 ≤ ACI < 160,说明能够达到中等抗球虫效果;(3)若 160 ≤ ACI < 180,说明能够达到良好抗球虫效果;(4)若 ACI > 180,说明达到优秀的抗球虫效果。

表 2 卵囊值计算方法

Tab 2 Oocysts value calculation method

卵囊比数	卵囊值
卵囊比数为 0% ~ 1%	卵囊值 0
卵囊比数为 1% ~ 25%	卵囊值 5
卵囊比数为 26% ~ 50%	卵囊值 10
卵囊比数为 51% ~ 75%	卵囊值 20
卵囊比数为 76% ~ 100%	卵囊值 40

1.9 病理组织学变化 处死雏鸡,分离盲肠,经 10% 甲醛固定、HE 染色后,用显微镜观察各组雏鸡盲肠病理组织学变化。

1.10 试验数据分析 将实验所得数据进行记录后,用 GraphPrism5.0 和 SPSS 11.5 软件分析处理。

## 2 结果与分析

2.1 体重变化 由表 3 可知,雏鸡 13 日龄攻虫后第五天临床症状明显,连续用药 5 d 后检测抗球虫各项指标。体重变化结果显示,地克珠利组雏鸡平均增重显著高于各处理组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。发酵产物组雏鸡与攻虫组相比平均增重显著升高( $P < 0.05$ ),但与复方中药组和 *L. rhamnosus* 相比差异不显著。

表 3 接种球虫后各组雏鸡的体重变化

Tab 3 Chinkens weight in each group after coccidiosis vaccination

组别	初重/g	末重/g	平均增重/g	相对增重率/%
空白对照组	100.80 ± 2.70	188.20 ± 8.84 <sup>a</sup>	87.40	100
地克珠利组	103.00 ± 1.00	177.60 ± 9.72 <sup>b</sup>	74.60	85.35
发酵产物组	99.20 ± 2.49	164.40 ± 9.84 <sup>c</sup>	65.20	74.59
复方中药组	101.20 ± 1.64	160.40 ± 7.89 <sup>c</sup>	59.20	67.73
<i>L. rhamnosus</i> 组	100.60 ± 0.89	155.75 ± 7.97 <sup>cd</sup>	55.15	63.10
攻虫组	101.40 ± 1.14	148.50 ± 12.28 <sup>d</sup>	47.10	53.89

2.2 盲肠病变计分 由表 4 和图 1 可知,处死雏鸡后分离盲肠,观察病变程度并计算出病变值。结

果显示,攻虫组盲肠肿胀,有血液凝块和栓塞的现象,发酵产物组、复方中药组、雏鸡盲肠壁出现少量

出血点,盲肠壁增厚,发酵产物组与攻虫组相比差异显著( $P < 0.05$ )。

表 4 盲肠病变记分

Tab 4 Cecal lesion scores

组别	盲肠病变记分	病变值
空白对照组	0	0
地克珠利组	1.80 ± 0.45 <sup>d</sup>	18
发酵产物组	2.40 ± 0.45 <sup>bc</sup>	24
复方中药组	3.00 ± 0.71 <sup>abc</sup>	30
<i>L. rhamnosus</i> 组	3.40 ± 0.55 <sup>ab</sup>	34
攻虫组	3.80 ± 0.45 <sup>a</sup>	38



(A: 发酵产物组; B: 复方中药组; C: *L. rhamnosus* 组;  
D: 攻虫组; E: 地克珠利组; F: 空白对照组)

图 1 盲肠病变对比

Fig 1 Cecal lesion contrast

2.3 GPG 结果 各组雏鸡 OPG 结果如表 5 所示。

地克珠利组卵囊值最少,发酵产物组卵囊比数明显低于复方中药组和 *L. rhamnosus* 组。

表 5 OPG 计数

Tab 5 The value of oocysts in cecum of each group chickens

组别	OPG 值(×10 <sup>5</sup> )	卵囊比数	卵囊值
空白对照组	0	0	0
地克珠利组	2.94	31.59	10
发酵产物组	5.24	56.95	20
复方中药组	5.85	63.58	20
<i>L. rhamnosus</i> 组	6.40	72.56	20
攻虫组	9.20	100	40

2.4 抗球虫指数(ACI) 由表 6 可知,计算各组抗球虫指数表明,发酵产物组的 ACI 高于复方中药组和 *L. rhamnosus* 组,其 ACI 可以达到中等抗球虫水平。

2.5 盲肠病理组织切片的观察 HE 染色结果显示,攻虫组雏鸡盲肠腺体消失,黏膜下层水肿,肠绒毛消失,肠腔内充满血栓;地克珠利治疗组雏鸡盲肠腺体界限清晰,绒毛完整;复方中药组和 *L. rhamnosus* 组雏鸡盲肠绒毛轻微断裂,肠腺组织结构破坏明显;发酵中药组雏鸡盲腺体清晰且绒毛相对完整。说明 *L. rhamnosus* 与复方中药的共发酵产物能降低球虫引起的盲肠病理变化(图 2)。

表 6 抗球虫指数

Tab 6 Anticoccidial index

组别	存活率/%	相对增重率/%	卵囊值	病变值	ACI
空白对照组	100	100	0	0	200
地克珠利组	100	85.35	10	18	157.35
发酵产物组	100	74.59	20	24	130.59
复方中药组	100	67.73	20	30	117.73
<i>L. rhamnosus</i> 组	80	63.10	20	34	89.10
攻虫组	80	53.89	40	38	55.89

### 3 讨论与结论

禽球虫病对禽类生产的经济影响最大,全世界每年控制球虫成本估计约为 8 亿美元,这些成本包括药物、疫苗、动物死亡、饲料消耗等<sup>[4]</sup>。按照中兽

医理论,鸡球虫病属于外感虫邪而引起的一类疾病,因虫邪会引起耗血伤津,体内湿热困脾,故鸡球虫病都会引起鸡的食欲不振,腹泻便血,口渴喜饮水,精神萎靡等特点<sup>[5]</sup>。治疗球虫病的方剂都以驱

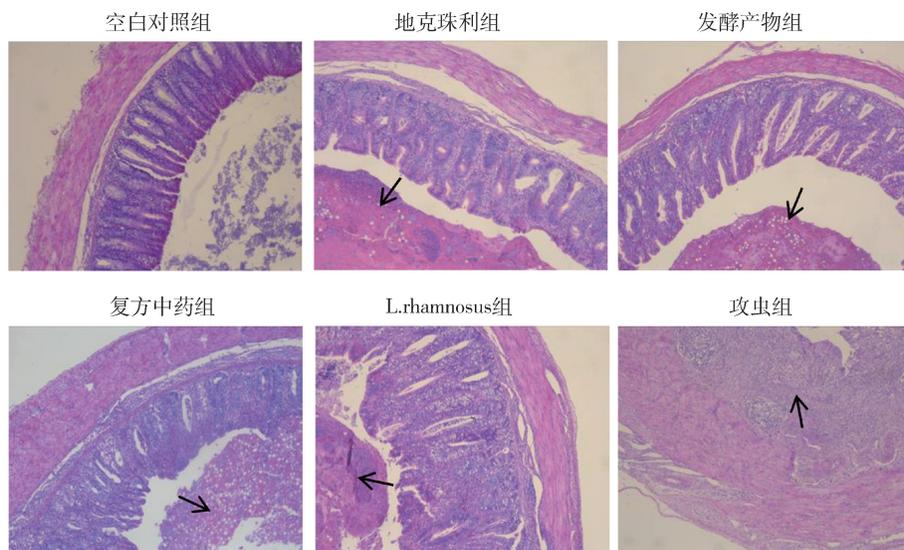


图 2 盲肠病理切片 (10 ×) (黑色箭头: 血栓)

Fig 2 Histopathologic analysis of Cecal (10 ×)

虫、清热燥湿为主,补益气血、凉血止血为辅<sup>[6]</sup>。本实验的中药复方选用具有驱虫作用的常山和清热燥湿的黄芩、白头翁为主药;辅以清热解毒的青蒿,止血的仙鹤草、槐花;佐以补益气血的甘草。研究显示,以常山为君药的复方中药对鸡球虫病有一定的治疗作用。梁剑平等用常山提取物对 *E. tenella* 感染的雏鸡进行治疗,结果显示中药常山能减轻盲肠病变,提高雏鸡增重率<sup>[7]</sup>。常山在球虫治疗中广泛应用,其活性成分常山碱、常山酮已经用于抗球虫、抗疟疾的研究中<sup>[8]</sup>。本研究中复方中药与 *L. rhamnosus* 共发酵产物对鸡球虫治疗效果优于复方中药,说明中药发酵能够促进中药有效成分的释放,提高复方中药的抗球虫效果。

益生菌对抗肠道病原的方式包括竞争性排斥和拮抗作用维持正常的肠道菌群;通过增加消化酶的活性和减少细菌酶的活性以及氨的产生来改变代谢;提高采食量和消化率;中和肠毒素并激活免疫系统<sup>[9]</sup>。通过拮抗作用、免疫调节作用和改变肠上皮组织通透性对抗病原,研究显示益生菌对多种肠道寄生虫有抑制作用,包括:艾美耳球虫 (*Eimeria*)、贾第虫 (*Giardia*)、隐孢子虫 (*Cryptosporidium*)、旋毛虫 (*Trichinella*)、蛔虫 (*Ascaris*) 等<sup>[3]</sup>。并且在饲料中添加益生菌可改善肉鸡的生长性能和饲料转化

率<sup>[10]</sup>。乳酸杆菌对堆型艾美球虫 (*Eimeria acervulina*) 引起的球虫病具有治疗作用,能减少雏鸡粪便中卵囊数量<sup>[11]</sup>。研究显示, *L. rhamnosus* 也可以对抗肠道病原,如轮状病毒的感染<sup>[12]</sup>。本研究中观察到 *L. rhamnosus* 能雏鸡提高增值率,减少 OPG,减轻盲肠病变。

益生菌发酵中药可利用其微生物改变中药化学成分,从而提高药效、降低药物毒副作用。秦波等以当归、苦参、马鞭草、常山作为主药,组成抗球虫复方中药,并分别与 *L. rhamnosus*、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) 等进行发酵处理,结果发现,经乳酸菌发酵后的复方中药发酵液不仅能够提高抗球虫效果,还可以提高雏鸡生长性能,增强机体的免疫水平<sup>[13]</sup>。陈雷等以马鞭草、黄柏、郁金作为主药组成抗球虫中药复方,并与乳酸菌进行固体发酵,结果发现,复方中药发酵产物对球虫病具有较好的治疗作用<sup>[14]</sup>。本研究选择中药复方以常山、仙鹤草、白头翁、青蒿为主要,复方中药与 *L. rhamnosus* 共发酵产物对 *E. tenella* 引起的球虫病显示出良好的治疗效果,雏鸡盲肠病理变化明显降低,ACI 达到 130.59。益生菌与中药协同发酵综合了二者的优势,对疾病的治疗效果明显增强,其在鸡球虫病的

治疗方面拥有广阔前景。

## 参考文献:

- [1] Lee, S. G. H, Lillehoj, H. S, Dalloul, R. A, *et al.* Influence of *Pediococcus* - based probiotic on coccidiosis in broiler chickens [J]. *Poultry Science*, 2007, 86(1): 63 - 66.
- [2] Dalloul R. A, Lillehoj H S. Poultry coccidiosis: Recent advancements in control measures and vaccine development [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2006, 5(1):143 - 163.
- [3] Travers Marie - Agnès, Isabelle F, Linda K, *et al.* Probiotics for the Control of Parasites: An Overview [J]. *Journal of Parasitology Research*, 2011, 2011:1 - 11.
- [4] Badran I, Lukesova D. Control of coccidiosis and different coccidia of chicken in selected technologies [J]. *Agricultura Tropica et Subtropica*, 2006, 39(1):39 - 43.
- [5] 林青, 李林海, 周宏超, 等. 中药复方制剂预防鸡巨型艾美耳球虫感染的效果观察 [J]. *中国兽医学报*, 2011, 31(2): 194 - 197.
- Lin Q, Li L H, Zhou H C, *et al.* Efficacy of recipe of traditional Chinese medicine on chickens infected with *Eimeria maxima* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2011, 31(2):194 - 197.
- [6] 孟新宇, 赵枝新, 赵其平, 等. 天然植物性抗柔嫩艾美耳球虫微粉制剂的效力试验 [J]. *中兽医医药杂志*, 2005 (3): 39 - 40.
- Meng X Y, Zhao Z X, Zhao Q P, *et al.* Efficacy test of natural plant - resistant anti - *Eimeria* microsphere powder preparation [J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2005 (3):39 - 40.
- [7] 郭志廷, 梁剑平, 韦旭斌, 等. 常山提取物对人工感染鸡柔嫩艾美耳球虫病疗效的观察 [J]. *中国兽医学报*, 2013, 33(7): 148 - 150.
- Guo Z T, Liang J P, Wie X B, *et al.* Curative effect of radix *dichroa* extractive on coccidiosis in chicken artificially infected by *Eimeria tenella* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2013, 33(7): 148 - 150.
- [8] 郭志廷, 梁剑平, 韦旭斌. 常山、常山碱及其衍生物防治鸡球虫病的研究进展 [J]. *中国兽医学报*, 2015(8).
- Guo Z T, Liang J P, Wie X B. Advances in research on prevention and treatment of coccidiosis by Changshan, Changshan and its derivatives [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2015, 35(08):1382 - 1386.
- [9] Jin L Z, Ho Y W, Abdullah N, *et al.* Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures [J]. *Poultry Science*, 1998, 77(9):1259 - 1265.
- [10] Mountzouris K C, Tsirosikos P, Kalamara E, *et al.* Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities [J]. *Poult Sci*, 2007, 86(2): 309 - 17.
- [11] Dalloul R A, Lillehoj H S, Shellem T A, *et al.* Enhanced mucosal immunity against *Eimeria acervulina* in broilers fed a *Lactobacillus* - based probiotic [J]. *Poultry Science*, 2003, 82(1): 62 - 66.
- [12] Szajewska H, Maciej Kołodziej, Dorota Gieruszczak - Białek, *et al.* Systematic review with meta - analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG for treating acute gastroenteritis in children - a 2019 update [J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2019, 49(11):1376 - 1384.
- [13] H. W. Peek, W. J. M. Landman. Coccidiosis in poultry: anti-coccidial products, vaccines and other prevention strategies [J]. *Veterinary Quarterly*, 2011, 31(3):143 - 161.
- [14] 陈光明, 于晨龙, 杨晓宇, 等. 乳酸菌对小鼠血清中 IL - 2, IFN -  $\gamma$  影响的研究 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2014, (13): 7 - 9.
- Chen G M, Yu C L, Yang X Y, *et al.* Study for the effects of lactic acid bacteria on the contents of IL - 2 and IFN -  $\gamma$  in blood serum of mice [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2014, (13):7 - 9.

(编辑:侯向辉)