

复合芽孢杆菌制剂对肉兔肠道发育和免疫功能的影响

任永军 雷 岷 邝良德 李丛艳 郑 洁 张翠霞 杨 超
李 勤 张翔宇 谢晓红 郭志强*
(四川省畜牧科学研究院, 成都 610066)

摘 要: 本试验旨在研究复合芽孢杆菌制剂对肉兔肠道发育和免疫功能的影响。选取体重相近、35日龄断奶的新西兰肉兔160只,随机分为5组,每组4个重复,每个重复8只(公母各占1/2)。对照组饲喂基础饲料,抗生素组饲喂在基础饲料中添加400 mg/kg 4%恩拉霉素的试验饲料,试验1、2、3组分别饲喂基础饲料中添加200、300和400 mg/kg复合芽孢杆菌制剂的试验饲料。复合芽孢杆菌组成为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*),二者各占1/2,总活菌数 $\geq 1.5 \times 10^{10}$ CFU/g。试验期8周。结果表明:试验1、2、3组均可降低肠道内容物pH,其中试验3组可显著降低小肠各段内容物pH($P < 0.05$);试验2、3组显著提高了小肠各段绒毛高度和隐窝深度比值($P < 0.05$);试验1、2、3组均显著降低了盲肠中大肠杆菌和总好氧菌数量($P < 0.05$),同时显著增加了乳酸杆菌、双歧杆菌及总厌氧菌数量($P < 0.05$);试验2、3组显著提高了血清中免疫球蛋白M、补体3、补体4的含量($P < 0.05$),试验1、2、3组肠黏膜分泌型免疫球蛋白A含量均显著高于对照组($P < 0.05$)。结果提示,在饲料中添加复合芽孢杆菌制剂可以促进肉兔肠道发育,刺激盲肠有益菌的增殖并抑制有害菌的增殖,同时还可提高机体的免疫功能。本试验条件下,该复合芽孢杆菌制剂在肉兔饲料中的适宜添加量为300~400 mg/kg。

关键词: 芽孢杆菌;肉兔;肠道发育;免疫功能

中图分类号: S829.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2014)01-0144-09

饲用抗生素应用于养殖生产中,在促进动物生产性能、预防疾病等方面取得了良好的效果,但由于饲用抗生素的使用不规范或滥用,导致了诸多问题,一是耐药性产生^[1-2],二是造成动物机体免疫力的下降^[3],三是动物源性食品中残留的抗生素可危害人类健康^[4],四是造成生态环境破坏^[5-6]。针对饲用抗生素导致的诸多问题,许多国家对抗生素作为饲料添加剂作出了明确的规定和限制,如欧盟在2006年就禁止在食用动物养殖中使用用于促进动物生长的抗生素。因此寻找高

效、无毒副作用、无残留、安全的新型饲用产品来有效替代抗生素已成为动物营养界研究的重点和热点之一。

微生态制剂(microecologics)是一种新型的功能性饲用添加剂,具有绿色安全、无毒副作用、无残留等特点,同时具备抗生素的许多功能,如防病、促生长等,有望成为饲用抗生素的有效替代品。芽孢杆菌是诸多微生态制剂中的一种,具有耐酸、耐盐、耐高温(85~100℃)、稳定性好等特点。芽孢杆菌生物学功能主要来源于菌体本身可

收稿日期:2013-08-21

基金项目:国家兔产业技术体系(CARS-44-B-4);公益性行业(农业)科研专项(201303143);优质家兔现代产业链关键技术研究与集成示范(2012NZ0005);优质肉兔配套系培育(SASA2009YZ005)

作者简介:任永军(1984—),男,四川眉山人,硕士,助理研究员,主要从事肉兔养殖技术研究。E-mail: renyj17513@126.com

* 通讯作者:郭志强,助理研究员,E-mail: ygzhq@126.com

产生多种蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶等生物活性物质^[7],同时还可产生多种抗菌物质,这些抗菌物质对细菌、病毒、真菌等都有抑制作用^[8-12]。芽孢杆菌是我国农业部现行规定可直接使用的微生态制剂,目前,该类制剂的应用效果在猪、牛、羊和家禽等动物上已经得到证实。肉兔消化系统和免疫系统既不同于猪、牛、羊、家禽,有它固有的消化生理特点和免疫特性,系统性地针对复合芽孢杆菌制剂在促进肉兔肠道发育的作用机理和提高免疫功能的作用途径等方面的研究还鲜有报道。本试验拟通过在新西兰肉兔饲料中添加地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌复合制剂,研究其对肉兔肠道发育和免疫功能的影响,为其进一步推广应用提供理论参考与科学数据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

复合芽孢杆菌制剂,由枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)复合而成,二者各占 1/2,由山东牧翔生物科技有限公司提供,总活菌数 $\geq 1.5 \times 10^{10}$ CFU/g。

1.2 试验设计

采用单因子试验设计,选用体重相近[(786 ± 26) g]的 35 日龄断奶新西兰肉兔 160 只,随机分成 5 个组,每组 4 个重复,每个重复 8 只(公母各占 1/2)。参照 NRC(1977)^[13]肉兔营养需要,结合新西兰肉兔生长发育特点,以及本地区饲料资源状况来设计基础饲料。基础饲料组成及营养水平见表 1。对照组饲喂基础饲料,抗生素组饲喂基础饲料中添加 400 mg/kg 4% 恩拉霉素(先灵葆雅公司)的试验饲料,试验 1、2、3 组分别饲喂在基础饲料中添加 200、300 和 400 mg/kg 复合芽孢杆菌制剂的试验饲料。

1.3 饲养管理

试验从 35 日龄开始,试验期 8 周。所有试验动物均饲养在四川省畜牧科学研究院科研基地,且统一封闭式兔舍内,每个兔笼(60 cm × 60 cm × 60 cm)饲养 2 只试验兔。试验前对兔舍以及配套设施进行严格的消毒处理。试验兔自由采食,自动饮水,定期打扫兔舍,疫苗免疫按常规进行。

表 1 基础饲料组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
苜蓿草粉 Alfalfa meal	30.00
玉米 Corn	21.00
豆粕 Soybean meal	10.70
小麦麸 Wheat bran	21.00
小麦 Wheat	7.00
蚕蛹 Silkworm chrysalis	3.00
菜籽粕 Rapeseed meal	4.00
磷酸氢钙 CaHPO ₄	0.90
石粉 Limestone	0.70
食盐 NaCl	0.50
赖氨酸 Lysine	0.20
预混料 Premix ¹⁾	1.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels ²⁾	
消化能 DE/(MJ/kg)	10.71
粗蛋白质 CP	16.02
粗纤维 CF	13.10
钙 Ca	0.90
磷 P	0.62

¹⁾ 预混料可为每千克饲料提供 Premix provides the following per kg of diet: Fe 100 mg, Cu 120 mg, Zn 90 mg, Mn 30 mg, Mg 150 mg, VA 4 000 IU, VD₃ 1 000 IU, VE 50 mg, 胆碱 choline 1 mg。

²⁾ 消化能为计算值,其余为实测值。DE is a calculated value, while the other nutrient levels are measured values.

1.4 指标测定及方法

1.4.1 肠道内容物 pH 测定

试验结束后,每组屠宰 6 只试验兔,分别挑取十二指肠、空肠、回肠、盲肠内容物 5 g,立即采用德图 TT205 pH 计进行 pH 的测定,每个内容物样测定 3 次,取平均值。

1.4.2 小肠黏膜形态测定

分别截取屠宰试验兔十二指肠、空肠、回肠 2 cm 长的正中部位,用生理盐水冲洗后迅速放入事先配制好的福尔马林溶液中固定。按常规方法制作石蜡切片,用苏木精-伊红染色,用纤维细度分析仪测定绒毛高度和隐窝深度^[14]。

1.4.3 盲肠菌群测定

采集屠宰试验兔盲肠食糜,用平板培养法^[15]测定其大肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌、总好氧菌

和总厌氧菌数量。数据采用 1 g 肠道内容物中的细菌数量的以 10 为底的对数 [$\lg(\text{CFU/g})$] 表示。大肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌、总好氧菌和总厌氧菌分别采用伊红美蓝培养基、乳酸细菌用 MRS 培养基、MRS + 5 - 溴 - 4 - 氯 - 3 - 吡啶 - β - D - 半乳糖苷培养基、大豆琼脂培养基和厌氧血琼脂培养基进行培养。

1.4.4 血清免疫指标和肠道黏膜分泌型免疫球蛋白 A (sIgA) 测定

对屠宰的 6 只试验兔,心脏采血,将采集的血液注入 5 mL 离心管中,3 000 r/min 离心 5 min,将离出的上清液转移至新的离心管中,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。采用血清免疫透射比浊法测定免疫球蛋白 G (IgG)、免疫球蛋白 M (IgM) 和补体 3 (C_3)、补体 4 (C_4) 含量^[16]。

对屠宰的 6 只试验兔,采用无菌蒸馏水冲洗掉小肠内容物,每只无菌刮取肠道黏膜组织 0.5 g,用灭菌磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 稀释 1 倍,8 000 r/min 离心 10 min,取上清保存。采用双抗体夹心法测定肠道黏膜 sIgA 含量^[17]。

1.5 数据处理与分析

试验数据用 Excel 2003 软件进行处理后,采

用 SPSS 14.0 统计软件,one-way ANOVA 进行方差分析,Duncan 氏法进行多重比较,以 $P < 0.05$ 为差异显著性判断标准,结果以“平均值 \pm 标准差”表示。

2 结果

2.1 复合芽孢杆菌制剂对肉兔肠道内容物 pH 的影响

由表 2 可知,抗生素对肠道内容物 pH 无显著影响 ($P > 0.05$)。试验 1、2、3 组十二指肠内容物 pH 显著低于对照组和抗生素组 ($P < 0.05$); 试验 2、3 组空肠内容物 pH 显著低于对照组和抗生素组 ($P < 0.05$), 试验 1 组空肠内容物 pH 低于对照组和抗生素组,但差异不显著 ($P > 0.05$); 对回肠内容物 pH 影响方面,试验 3 组最低,显著低于对照组和抗生素组 ($P < 0.05$), 试验 1 组与对照组相比有降低趋势,但差异不显著 ($P > 0.05$), 试验 2 组显著低于抗生素组 ($P < 0.05$); 试验 1、2、3 组盲肠 pH 均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 试验 3 组显著低于抗生素组 ($P < 0.05$)。

表 2 复合芽孢杆菌制剂对肉兔肠道内容物 pH 的影响

Table 2 Effects of composite bacillus preparation on intestinal content pH of meat rabbits

项目 Items	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotics group	试验 1 组 Test group 1	试验 2 组 Test group 2	试验 3 组 Test group 3
十二指肠 Duodenum	6.51 \pm 0.16 ^c	6.52 \pm 0.13 ^c	6.30 \pm 0.19 ^b	6.00 \pm 0.23 ^a	5.97 \pm 0.14 ^a
空肠 Jejunum	7.38 \pm 0.15 ^b	7.43 \pm 0.17 ^b	7.33 \pm 0.20 ^{ab}	7.16 \pm 0.13 ^a	7.13 \pm 0.12 ^a
回肠 Ileum	6.60 \pm 0.16 ^{bc}	6.68 \pm 0.15 ^c	6.54 \pm 0.16 ^{bc}	6.44 \pm 0.15 ^{ab}	6.40 \pm 0.14 ^a
盲肠 Cecum	6.25 \pm 0.18 ^c	6.20 \pm 0.16 ^{bc}	6.11 \pm 0.15 ^{ab}	6.01 \pm 0.19 ^{ab}	5.88 \pm 0.21 ^a

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同或无小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), while with the same or no small letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$). The same as below.

2.2 复合芽孢杆菌制剂对肉兔小肠黏膜形态的影响

由表 3 可知,抗生素组对小肠各段绒毛高度具有一定的提高作用,但影响不显著 ($P > 0.05$)。试验 1、3 组十二指肠绒毛高度显著高于对照组 ($P < 0.05$); 抗生素组空肠绒毛高度值最高,显著高于试验 3 组 ($P < 0.05$); 试验 1、2、3 组对回肠绒毛高度均具有一定的促进作用,其中试验 2 组显著高于其他各组 ($P < 0.05$)。

试验 2 组十二指肠隐窝深度显著低于对照组 ($P < 0.05$), 其他试验组也低于对照组,但差异不显著 ($P > 0.05$); 抗生素组和试验 1、2、3 组的空肠隐窝深度均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 同时试验 3 组显著低于抗生素组和试验 1、2 组 ($P < 0.05$); 对回肠隐窝深度的影响方面,抗生素组和试验 1、3 组显著低于对照组 ($P < 0.05$), 试验 2 组显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

对十二指肠绒毛高度和隐窝深度比值 (VCR)

的影响方面, 试验 2、3 组显著高于对照组和抗生素组 ($P < 0.05$); 抗生素组和试验 2、3 组的空肠 VCR 均显著高于对照组 ($P < 0.05$); 试验 3 组回

肠 VCR 最高, 显著高于其他各组 ($P < 0.05$), 抗生素组和试验 1、2 组显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

表 3 复合芽孢杆菌制剂对肉兔小肠黏膜形态的影响

Table 3 Effects of composite bacillus preparation on intestinal mucosa morphology of meat rabbits

项目 Items	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotics group	试验 1 组 Test group 1	试验 2 组 Test group 2	试验 3 组 Test group 3
绒毛高度 Villus height/ μm					
十二指肠 Duodenum	642.78 \pm 76.21 ^a	673.51 \pm 73.22 ^{ab}	770.19 \pm 92.44 ^c	671.32 \pm 68.16 ^{ab}	750.32 \pm 97.63 ^{bc}
空肠 Jejunum	695.22 \pm 82.54 ^{ab}	733.61 \pm 70.54 ^b	679.51 \pm 88.10 ^{ab}	696.69 \pm 59.35 ^{ab}	638.82 \pm 78.50 ^a
回肠 Ileum	557.16 \pm 68.16 ^a	599.35 \pm 58.32 ^a	565.11 \pm 75.94 ^a	664.91 \pm 82.18 ^b	601.90 \pm 60.78 ^a
隐窝深度 Crypt depth/ μm					
十二指肠 Duodenum	171.31 \pm 10.55 ^{bc}	166.28 \pm 9.68 ^{abc}	188.25 \pm 9.68 ^c	154.69 \pm 10.37 ^a	159.96 \pm 8.22 ^{ab}
空肠 Jejunum	163.83 \pm 12.35 ^d	140.92 \pm 7.62 ^b	153.08 \pm 10.19 ^c	143.86 \pm 9.78 ^b	129.11 \pm 8.09 ^a
回肠 Ileum	128.77 \pm 6.56 ^c	119.90 \pm 8.45 ^b	119.10 \pm 6.07 ^b	138.70 \pm 6.28 ^d	106.38 \pm 7.71 ^a
绒毛高度和隐窝深度比值 VCR					
十二指肠 Duodenum	3.75 \pm 0.54 ^a	4.05 \pm 0.66 ^a	4.09 \pm 0.56 ^{ab}	4.34 \pm 0.56 ^b	4.69 \pm 0.55 ^b
空肠 Jejunum	4.24 \pm 0.41 ^a	5.21 \pm 0.38 ^c	4.44 \pm 0.28 ^{ab}	4.84 \pm 0.44 ^{bc}	4.95 \pm 0.39 ^{bc}
回肠 Ileum	4.33 \pm 0.32 ^a	5.00 \pm 0.29 ^b	4.74 \pm 0.42 ^b	4.80 \pm 0.31 ^b	5.66 \pm 0.40 ^c

2.3 复合芽孢杆菌制剂对肉兔盲肠菌群的影响

由表 4 可知, 抗生素组和试验 1、2、3 组盲肠中大肠杆菌数量均显著低于对照组 ($P < 0.05$); 抗生素组显著降低了盲肠中乳酸杆菌、双歧杆菌的数量 ($P < 0.05$), 而试验 1、2、3 组均增加了盲肠中乳酸杆菌、双歧杆菌数量, 其中试验 2、3 组增加作

用最显著, 数量显著高于其他各组 ($P < 0.05$); 抗生素组和试验 1、2、3 组均显著降低了盲肠中总好氧菌数量 ($P < 0.05$), 其中试验 2、3 组的降低作用显著优于抗生素组和试验 1 组 ($P < 0.05$); 对照组总厌氧菌数量显著低于其他各组 ($P < 0.05$)。

表 4 复合芽孢杆菌制剂对肉兔盲肠菌群的影响

Table 4 Effects of composite bacillus preparation on caecal microflora of meat rabbits

项目 Items	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotics group	试验 1 组 Test group 1	试验 2 组 Test group 2	试验 3 组 Test group 3
大肠杆菌 <i>E. colibacillus</i>	5.19 \pm 0.14 ^c	4.21 \pm 0.16 ^a	4.93 \pm 0.09 ^b	4.22 \pm 0.20 ^a	4.21 \pm 0.12 ^a
乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i>	5.84 \pm 0.10 ^a	5.76 \pm 0.11 ^b	6.95 \pm 0.09 ^c	7.09 \pm 0.14 ^d	7.09 \pm 0.10 ^d
双歧杆菌 <i>Bifidobacillus</i>	5.74 \pm 0.18 ^a	5.56 \pm 0.19 ^b	5.97 \pm 0.14 ^c	6.09 \pm 0.10 ^d	6.17 \pm 0.13 ^d
总好氧菌 Total aerobic bacteria	6.98 \pm 0.23 ^c	6.22 \pm 0.17 ^b	6.16 \pm 0.19 ^b	5.46 \pm 0.26 ^a	5.43 \pm 0.23 ^a
总厌氧菌 Total anaerobic bacteria	8.97 \pm 0.07 ^a	9.03 \pm 0.12 ^b	9.20 \pm 0.10 ^c	9.39 \pm 0.09 ^d	9.40 \pm 0.08 ^d

2.4 复合芽孢杆菌制剂对肉兔免疫功能的影响

由表 5 可知, 各组血清 IgG 含量无显著变化 ($P > 0.05$); 试验 2、3 组的血清 IgM 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$); 试验 2、3 组的血清 C₃ 和 C₄ 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

抗生素对小肠黏膜 sIgA 含量无显著影响 ($P > 0.05$), 试验 1、2、3 组小肠黏膜 sIgA 含量均高于对照组和抗生素组, 且差异显著 ($P < 0.05$),

试验 1、2、3 组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 复合芽孢杆菌制剂对肉兔肠道内容物 pH 的影响

肠道内容物 pH 对维持肠道健康具有非常重要的作用。小肠环境中 pH 下降对激活或提高消

化酶体系会起到十分重要的作用,同时还可促进肠道发育以及机体对营养物质的吸收和利用。盲肠 pH 的降低虽并不直接影响肉兔消化系统的发育,但它的变化可引起盲肠挥发性脂肪酸比例的变化,挥发性脂肪酸能够刺激盲肠上皮的发育,可间接影响盲肠发育;同时对盲肠微生物区系的调节十分有利。芽孢杆菌类制剂调节动物肠道内容物 pH 主要通过直接或间接的作用帮助降解肠道中的粗纤维物质和糖酵解等方式产生更多的挥发性脂肪酸,从而降低动物肠道的 pH^[18],同时芽孢

杆菌制剂本身具有产酸物质的功能。本研究结果显示,芽孢杆菌制剂可以营造家兔十二指肠、空肠、回肠以及盲肠酸性环境,调节家兔肠道内容物 pH 是十分有效的。苏勇等^[19]报道芽孢杆菌可显著降低仔猪肠道内容物 pH,显著提高仔猪肠道中的挥发性脂肪酸浓度;张海涛等^[20]报道,给犊牛饲喂含芽孢杆菌饲料可降低十二指肠、空肠、回肠内容物的 pH;陈国营等^[21]研究发现,枯草芽孢杆菌可显著降低蛋鸡盲肠内容物以及新鲜粪便的 pH。

表 5 复合芽孢杆菌制剂对肉兔免疫功能的影响

Table 5 Effects of composite bacillus preparation on immune function of meat rabbits

项目 Items	对照组 Control group	抗生素组 Antibiotics group	试验 1 组 Test group 1	试验 2 组 Test group 2	试验 3 组 Test group 3
免疫球蛋白 G IgG/(mg/dL)	4.65 ± 1.05	4.75 ± 1.24	4.71 ± 0.40	4.93 ± 0.52	4.86 ± 0.49
免疫球蛋白 M IgM/(mg/dL)	0.28 ± 0.07 ^a	0.37 ± 0.10 ^{ab}	0.39 ± 0.19 ^{ab}	0.46 ± 0.08 ^b	0.46 ± 0.04 ^b
补体 3 C ₃ /(mg/dL)	0.14 ± 0.02 ^a	0.15 ± 0.06 ^a	0.15 ± 0.02 ^a	0.20 ± 0.03 ^b	0.20 ± 0.02 ^b
补体 4 C ₄ /(mg/dL)	0.02 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^{bc}	0.03 ± 0.01 ^{ab}	0.05 ± 0.01 ^c	0.05 ± 0.01 ^c
分泌型免疫球蛋白 A sIgA/(mg/L)	1.31 ± 0.09 ^a	1.37 ± 0.05 ^a	1.66 ± 0.06 ^b	1.72 ± 0.06 ^b	1.74 ± 0.10 ^b

3.2 复合芽孢杆菌制剂对肉兔小肠黏膜形态的影响

小肠是肉兔营养物质吸收的主要场所,小肠绒毛高度、隐窝深度及 VCR 是衡量小肠吸收功能的重要指标。小肠绒毛高度的增长可以增加与肠道内食糜的接触面积,从而增强小肠对营养物质的吸收能力;同时小肠绒毛的增长可以增加其摆动能力,更有利于防止有害菌在肠道的定植和改善家兔的肠道健康。隐窝深度反映的是细胞生成率,隐窝变浅,说明肠道成熟的上皮细胞数量上升,分泌能力增强,小肠化学消化功能得到提高;同时肠黏膜上皮细胞的生长加快,对肠道损伤的修复能力增强;反之,会导致肠道的营养物质吸收能力降低,影响其生产性能。VCR 可综合反映小肠的功能状况,当 VCR 增高时,肠绒毛对营养物质的吸收能力增强,反之亦反^[22]。

微生态制剂促进动物消化道小肠黏膜发育的作用机理主要为:微生物活性制剂进入消化道后,不断刺激肠道黏膜,促进小肠黏膜发育,绒毛高度增加,同时在不断的刺激作用下,肠道上皮细胞的生长发育和更新率增加,从而提高 VCR;另外,有益菌进入体内后通过竞争抑制、产生代谢产物等作用方式抑制有害菌在胃肠道内的定植,从而避

免有害菌对肠道黏膜的损害,间接地促进了肠道黏膜功能的发育和完善^[23]。景翠等^[24]报道,地衣芽孢杆菌对蛋鸡肠道 VCR 的促进作用显著;李树鹏等^[25]采用复合芽孢杆菌制剂饲喂仔鸡也得到了类似的试验结果。本研究证实了复合芽孢杆菌制剂对断奶肉兔小肠的发育有积极影响,特别对小肠各段(十二指肠、空肠、回肠)的 VCR 具有显著的促进作用。

3.3 复合芽孢杆菌制剂对肉兔盲肠菌群的影响

肠道正常菌群对动物消化系统具有非常重要的生物学意义,与其他畜种相比,家兔的盲肠在消化系统中有更为重要的地位^[26],特别是盲肠中的微生物活动对消化过程、营养物质的吸收以及对消化道疾病的防控都具有非常重要的作用,因此家兔盲肠微生物区系的稳定,在维持家兔肠道健康等方面具有重要作用与意义。牛钟相等^[27]研究发现,腹泻兔与健康兔相比,其肠道的总厌氧菌、双歧杆菌及乳杆菌等有益菌数量会明显减少,而总好氧菌及肠杆菌等有害菌数量会明显增加。

芽孢杆菌对动物肠道菌群结构的调节作用机理为:芽孢杆菌制剂进入肠道后被激活,开始产生生物学效应,其芽孢杆菌自身通过产生多种细菌素、抗菌肽等活性物质来抑制和阻止有害菌或致

病菌的定植,同时还可消耗肠道内多余的氧气,有利于厌氧菌等有益菌类的生长繁殖,减少好氧菌有害菌的吸附,以及营造盲肠酸性环境等,从而对维持肠道菌群区系的稳定和平衡起到关键作用。

Guo 等^[28]报道芽孢杆菌可降低仔猪肠道中大肠杆菌数量,增加其乳酸杆菌数量;王磊^[29]采用芽孢杆菌在断奶獭兔生产中的应用发现,芽孢杆菌制剂可使断奶獭兔肠道中的大肠杆菌数量降低 22.01%,乳酸菌和双歧杆菌分别提高了 7.59% 和 15.69%;潘康成等^[30]报道枯草芽孢杆菌喂服肉鸡后可提高肉鸡肠道菌群的数量和种群密度。

本研究结果显示,在肉兔饲料中添加一定剂量的复合芽孢杆菌制剂,可引起盲肠中乳酸杆菌、双歧杆菌及总好氧菌数量呈现不同程度的增加,而总好氧菌和大肠杆菌的数量呈现不同程度的下降。其中试验 3 组效果最显著,有益菌乳酸杆菌、双歧杆菌及总厌氧菌的数量最多,大肠杆菌和总好氧菌的数量最少,但试验 3 组与试验 2 组之间无显著差异。表明该复合芽孢杆菌制剂对肉兔盲肠菌群的影响存在量效关系,当剂量添加到一定量时,对盲肠菌群结构调整的作用效果趋于稳定。

3.4 复合芽孢杆菌制剂对肉兔免疫功能的影响

免疫球蛋白是动物体液免疫应答发挥免疫功能的主要免疫分子,在机体防御系统中发挥着重要功能,其中 IgG 是衡量机体总体体液免疫状况的重要指标。余东游等^[31]报道,枯草芽孢杆菌饲喂肉用仔鸡可显著提高血清中 IgG 含量,但对 IgM 含量无显著影响;Ducle 等^[32]报道,枯草芽孢杆菌孢子可显著提高小鼠体内 IgG 和 IgM 含量;杨玉荣等^[33]报道,复合芽孢杆菌制剂可显著提高仔鸡呼吸道和消化道局部的 IgG 和 IgM 含量;潘康成等^[34]证实了芽孢杆菌可通过提高家兔体内 5-羟色胺(5-HT)含量的方式来促进机体的免疫功能。本研究结果与上述报道的有所差异,可能是由于畜禽品种或微生态产品的不同所致,但是芽孢杆菌制剂对肉兔的体液免疫是具有一定促进作用的。

补体是机体免疫防御系统的重要组成成分,参与机体的防御反应及免疫调节,但是激活了补体才能表现其生物功能。 C_3 是在补体激活过程中起着关键作用, C_4 在补体的活化阶段起着重要的作用。因此,可用血清中 C_3 和 C_4 的含量来作为评价机体免疫力的指标之一。本研究结果显示,

高剂量的芽孢杆菌试验组(试验 2、3 组)可显著提高 C_3 、 C_4 的含量,与沈英文等^[35]报道的芽孢杆菌制剂可提高草鱼血清中 C_3 、 C_4 的含量是一致的。

sIgA 是肠道黏膜免疫的主要效应因子^[36],机体抗感染的第一道防线。目前认为,芽孢杆菌制剂发挥促进黏膜免疫的作用机理可能是:芽孢杆菌在肠道中的派伊尔氏结上发挥了免疫佐剂作用,提高其免疫识别力,同时活化肠系膜淋巴结、黏膜内和黏膜固有层等肠道相关淋巴组织,使 sIgA 抗体分泌增多^[37]。Vinderola 等^[38]报道,芽孢杆菌属微生态制剂对小鼠的 sIgA 的分泌有促进作用;Ducle 等^[32]等也报道,芽孢杆菌孢子能促进 sIgA 的分泌;李云锋等^[39]报道,枯草芽孢杆菌能刺激小肠黏膜细胞因子的表达以及小肠中 IgA 分泌细胞的数量等方式来提高 sIgA 含量。本研究结果表明芽孢杆菌对肉兔小肠黏膜 sIgA 分泌有显著的促进作用,这一研究结果与芽孢杆菌属微生态制剂在其他畜禽上应用的效果是相似的。

4 结 论

① 在饲料中添加复合芽孢杆菌制剂可以促进肉兔肠道发育,刺激盲肠有益菌的增殖并抑制有害菌的增殖,同时还可提高机体的免疫功能。

② 本试验条件下,该复合芽孢杆菌制剂在肉兔饲料中的适宜添加量为 300 ~ 400 mg/kg。

致谢:

感谢四川省畜牧科学研究院林毅研究员对文稿提供的宝贵意见!

参考文献:

- [1] WITTE W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture[J]. Science, 1998, 279: 996 - 997.
- [2] MELLON M, BENBROOK C, BENBROOK K. Hogging it: estimates of antimicrobial abuse in livestock [M]. Cambridge: Union of Concerned Scientists UCS Publications, 2001: 192 - 230.
- [3] 何利强. 浅谈畜牧业中抗生素的危害与控制[J]. 中国动物检疫, 2010, 27(4): 11 - 12.
- [4] 任春玲, 孙振均, 宋经元. 药物饲料添加剂对环境影响的研究进展[J]. 饲料工业, 2005, 26(20): 5 - 10.
- [5] MELLON M, BENBROOK C, BENBROOK K. Hogging it: estimates of antimicrobial abuse in livestock [M]. Washington, D. C.: Union of Concerned Sci-

- tists Publications, 2001: 7-9.
- [6] BALTER M. Scientific cross-claims fly in continuing beef war[J]. Science, 1999, 284: 1453-1455.
- [7] 顾真荣, 马承涛, 韩长安. 产几丁质酶芽孢杆菌的筛选鉴定和酶活力测定[J]. 上海农业学报, 2001, 17(3): 92-96.
- [8] TAMEHIRO N, OKAMOTO-HOSOYA Y, OKAMOTO S, et al. Bacteriolysin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168[J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2002, 46(2): 315-320.
- [9] FOLDES T, BANHEGYI I, HERPAI Z, et al. Isolation of *Bacillus strains* from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage microorganisms[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 89(5): 840-841.
- [10] WICHITRA L, SUPHAKUL P, SIVANUN S. Purification, characterization and synergistic activity of -1, 3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(7): 990-997.
- [11] WANG S L, WANG I L, WANG C H, et al. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(3): 321-328.
- [12] MENG M, SUN W Q, GEELHAAR L A, et al. Denitration of glycerol trinitrate by resting cells and cell extracts of *Bacillus thuringiensis cereus* and *Enterobacter agglomerans*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(7): 2548-2553.
- [13] NRC. Nutrient requirements of rabbits[S]. Washington, D. C.: National Academy of Sciences, 1977: 30.
- [14] SUN X, MCELROY A, WEBB K E, Jr. Boriler performance and intestinal alterations when fed drug-free diets[J]. Poultry Science, 2005, 84(8): 1294-1302.
- [15] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 1999.
- [16] 钟亮尹, 丁彩屏. 免疫比浊法测定免疫球蛋白[J]. 铁道医学, 1996, 24(2): 107.
- [17] WANG Y, CHOJ H, CHEN Y J, et al. The effect of probiotic Bio-Plus 2B[®] on growth performance, dry matter and nitrogen digestibility and slurry noxious gas emission in growing pigs[J]. Livestock Science, 2009, 120(1/2): 35-42.
- [18] PADIHA M T S, LICOIS D, GIDENNE T, et al. Relationships between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning[J]. Reproduction Nutrition Development, 1995, 35(4): 375-386.
- [19] 苏勇, 姚文, 黄瑞华, 等. 芽孢乳杆菌 S1 对断奶前后仔猪肠道乳酸菌、大肠杆菌和挥发性脂肪酸含量变化的影响[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2006, 35(1): 73-76.
- [20] 张海涛, 王加启, 卜登攀, 等. 日粮中添加纳豆枯草芽孢杆菌对犊牛消化道发育的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(1): 5-9.
- [21] 陈国营, 詹凯, 朱由彩, 等. 枯草芽孢杆菌及其发酵豆粕对蛋鸡肠道菌群和粪便中 N、S 含量的影响[J]. 中国家禽, 2012, 34(6): 10-15.
- [22] TOUCHETTE K J, CARROLL J A, ALLEE G L, et al. Effect of spray-dried plasma and lipopolysaccharide exposure on weaned Pigs: I. Effects on the immune axis of weaned Pigs[J]. Journal of Animal Science, 2002, 80(2): 494-501.
- [23] LETELLIER A, MESSIER S, LESSAND L. Assessment of various treatments to reduce carriage of *Salmonella* in swine[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2000, 64(1): 27-31.
- [24] 景翠, 李福彬, 赵驻军, 等. 日粮添加地衣芽孢杆菌对蛋鸡肠道菌群与形态结构的影响[J]. 中国家禽, 2012, 34(4): 18-20.
- [25] 李树鹏, 陈福星, 赵献军. 合生元对雏鸡肠道组织形态学的影响[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(1): 53-54.
- [26] HARESIGN W, SWAN H, LEWIS D. The nutrition of the rabbits[C]//Nutrition and the climatic environment. London: CABI Publishing, 1977: 93-111.
- [27] 牛钟相, 朱瑞良, 张绍学. 健康兔与腹泻病兔不同肠段正常菌群研究[J]. 山东农业大学学报, 1996, 27(3): 284-286.
- [28] GUO X H, LI D F, LU W Q, et al. Screening of *Bacillus strains* as potential probiotics and subsequent confirmation of the *in vivo* effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs[J]. Antonie Leonwenhoel, 2006, 90(2): 139-146.
- [29] 王磊. 蜡样芽孢杆菌制剂的研制及其在断乳兔生产中的应用效果研究[D]. 硕士学位论文. 泰安: 河北农业大学, 2007.
- [30] 潘康成, 陈正礼, 崔恒敏, 等. 利用 ERIC-PCR 和 PCR-DGGE 技术分析喂服枯草芽孢杆菌肉鸡肠道菌群的多样性[J]. 动物营养学报, 2010, 22(4): 985-991.
- [31] 余东游, 毛翔飞, 秦艳, 等. 枯草芽孢杆菌对肉鸡生长性能及其抗氧化和免疫功能的影响[J]. 中国畜

- 牧杂志,2010,46(3):22-25.
- [32] DUCLE J H, HONG H A, BARBOSA T M, et al. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use[J]. Applied and Environment Microbiology, 2004, 70(4):61-71.
- [33] 杨玉荣,郑世民,刘晶,等. 雏鸡服用益生菌后免疫器官指数及局部体液免疫球蛋白相对含量的动态变化[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(4):352-356.
- [34] 潘康成,冯轼,崔恒敏,等. 微生态制剂对幼兔生长及 HPA 轴 5-HT 能细胞的影响[J]. 动物营养学报, 2009, 21(6):945-952.
- [35] 沈英文,李卫芬,梁权,等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对草鱼生长性能、免疫和抗氧化功能的影响[J]. 动物营养学报, 2011, 23(5):881-886.
- [36] ROUND J L, MAZMANIAN S K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease [J]. Nature Reviews Immunology, 2009, 9(5):313-323.
- [37] YASUI H, NAGAOKA N, HAYAKAWA K. Augmentation of anti-influenza virus hemagglutinin antibody production by Peyer's patch cells with *Bifidobacterium breve* VIT4064 [J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 1994, 1(2):244-246.
- [38] VINDEROLA G, MATAR C, PERDIGON G. Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria: involvement to toll-like receptors [J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2005, 12(9):1075-1084.
- [39] 李云锋,邓军,张锦华,等. 枯草芽孢杆菌对仔猪小肠局部天然免疫及 TLR 表达的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(4):562-566.

A Composite Bacillus Preparation: Effects on Intestinal Development and Immune Function of Meat Rabbits

REN Yongjun LEI Min KUANG Liangde LI Congyan ZHENG Jie ZHANG Cuixia YANG Chao
LI Qin ZHANG Xiangyu XIE Xiaohong GUO Zhiqiang*
(Sichuan Animal Science Academy, Chengdu 610066, China)

Abstract: This study was conducted to investigate the effects of composite bacillus preparation (CBP) on intestinal development and immune function of meat rabbits. A total of 160 New Zealand meat rabbits aged 35 days were randomly assigned into five groups with 4 replicates in each group and 8 rabbits per replicate (half male and half female). Rabbits in control group were fed a basal diet, those in antibiotics group were fed the basal diet supplemented with 400 mg/kg enramycin (4%), while those in test groups 1, 2 and 3 were fed the basal diet supplemented with CBP at 200, 300 and 400 mg/kg, respectively. The CBP was consist of 50% *B. subtilis* and 50% *B. licheniformis*, and total live bacterial number of it was $\geq 1.5 \times 10^{10}$ CFU/g. The test lasted for 8 weeks. The results showed as follows: intestinal content pH in test groups 1, 2 and 3 were decreased, and whole intestinal content pH was significantly decrease in test group 3 ($P < 0.05$); villus height/crypt depth in test groups 2 and 3 was significantly increased ($P < 0.05$); the number of *E. coli* and total aerobic bacteria in cecum in test groups 1, 2 and 3 was significantly decreased, while that of *lactobacilli*, *bifidobacteria* and total anaerobic bacteria was significantly increased ($P < 0.05$); serum immunoglobulin M, complements 3 and 4 contents in test groups 2 and 3 were significantly increased ($P < 0.05$), meanwhile, intestinal mucosal secreted immunoglobulin A content in test groups 1, 2 and 3 was significantly increased ($P < 0.05$). It is concluded that supplementation of CBP can promote intestinal development, stimulate the proliferation of beneficial bacteria and inhibit the harmful ones in the cecum, as well as improve immune function. It is suggested that the optimal supplemental level in meat rabbit's diet is 300 to 400 mg/kg. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(1):144-152]

Key words: composite bacillus preparation; meat rabbit; intestinal development; immune function