

中药复方对奶牛隐性乳房炎病原菌 的体外抑菌试验*

丛日华¹, 王秋芳¹, 穆 杨¹, 赵 毅²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 陕西省农业厅, 陕西 西安 710014)

[摘 要] 取10头隐性乳房炎患牛乳汁, 采用北京亚临床乳房炎快速诊断液(BMT试剂), 对泌乳黑白花奶牛的乳汁进行了病原菌分离鉴定, 结果共分离出金黄色葡萄球菌、乳房链球菌和大肠杆菌3种病原菌。将蒲公英、王不留行等中药水煎、去渣、浓缩制成相当于2 g/mL的生药液, 然后稀释为1.5、1.0、0.5 g/mL 3种质量浓度, 用优质定性滤纸制成相应浓度的药敏片进行中药体外抑菌试验, 结果表明, 该中药对以上3种病原菌均有明显的抑制作用。

[关键词] 中药复方; 奶牛; 隐性乳房炎; 体外抑菌试验

[中图分类号] S858.237.2⁺6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)12-0084-03

乳房炎是奶牛最常见的疾病之一, 由于长期使用抗菌药物治疗, 使耐药菌株不断产生, 疗效降低, 随着用药量逐渐增大, 造成乳中药物残留超标, 影响人类健康, 从而严重阻碍了奶业生产的发展。因此, 用中药或中西药结合防治乳房炎的研究一直倍受关注。王秋芳等^[1]自拟中药复方进行了奶牛隐性乳房炎的防治试验, 取得了可喜的效果, 且用药后奶牛免疫功能增强^[1]。为进一步了解该方对病原菌有无直接抑制作用, 特对乳房炎病原菌进行了体外抑菌试验, 以期对中药复方的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 乳 样 采自西安市奶牛繁育中心和草滩农场牧二队隐性乳房炎患牛。

1.1.2 中 药 蒲公英、王不留行、黄芩、黄柏、益母草、党参、白芍等均购自扶风县药材公司, 按一定比例组成复方。

1.1.3 培养基 普通琼脂平板、绵羊鲜血琼脂平板、麦康凯平板、普通肉汤、犊牛血清肉汤、生化培养基等, 按常规方法自制^[2]。

1.1.4 试 剂 BMT试剂购自北京奶牛研究所新技术公司, 靛基质试剂、V-P试剂、M·R试剂、体积分数3% H₂O₂、兔血浆、革兰氏染液等按常规方法

自制^[2]。

1.1.5 小 鼠 西北农林科技大学动物科技学院实验动物中心提供。

1.1.6 仪 器 旋转蒸发器(RE-52A型, 上海亚荣生化仪器厂生产)、隔水式恒温培养箱(GHP-9160型, 上海恒科技术有限公司生产)、生物显微镜(重庆光学仪器厂生产)。

1.2 方 法

1.2.1 乳样的采集 用温水清洗乳房并擦干净, 用体积分数75%的酒精棉球乳头消毒, 挤去前两把奶, 取乳样约5 mL, 装入灭菌小瓶内, 置4℃冰箱保存备用。

1.2.2 中药液的制备 按复方比例称取蒲公英、王不留行等中药水煎30 min, 去渣, 用旋转蒸发器浓缩制成相当于2 g/mL的生药液, 再用蒸馏水稀释为1.5、1.0和0.5 g/mL 3种不同质量浓度, 121℃高压灭菌30 min后保存备用。

1.2.3 药敏片的制备 选用优质定性滤纸制成直径8 mm的圆形纸片, 121℃高压灭菌30 min, 烘干, 浸泡在不同质量浓度的中药液中, 置4℃冰箱24 h, 移入灭菌平皿烘干备用^[3]。

1.2.4 病原菌的分离与鉴定 将乳样接种于鲜血琼脂平板, 37℃培养24 h, 观察菌落的形态、大小、颜色、透明度、隆起度, 以及表面是否光滑、边缘是否

* [收稿日期] 2003-11-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39870582)

[作者简介] 丛日华(1973-), 男, 内蒙古通辽人, 讲师, 在职硕士, 主要从事动物生理学研究。

整齐及有无溶血性。挑取单个菌落涂片、染色、镜检。

将典型菌落接种于血清肉汤进行纯培养,再将血清肉汤培养物注射于小鼠腹腔进行致病性试验,24 h 后对小鼠进行剖检,取肝、脾涂片,染色镜检。

对有致病性的细菌作进一步的分离鉴定,取分离菌的纯培养物接种于普通琼脂平板、鲜血琼脂平板和麦康凯平板,进行生化试验。生化试验包括糖发酵试验、吲哚试验、M-R 试验、V-P 试验、接触酶试验、凝固酶试验以及 CAMP 试验^[4]。

1.2.5 中药抑菌试验 用灭菌棉签将分离到的致病菌肉汤培养物菌液,均匀涂于血平板和普通平板上,将 1.5,1.0 和 0.5 g/mL 不同质量浓度的药敏片贴在平板上,37℃ 培养 24 h 后进行观察。

2 结果与分析

2.1 分离鉴定结果

2.1.1 形态及培养特性 检测了 10 份乳样,共分

离到 3 组病原菌,其形态及生长状况表现如下:

菌组 1 在普通琼脂平板上生长为黄色,圆形,菌落中等大小,湿润,边缘整齐,表面光滑;在鲜血琼脂平板上产生溶血,革兰氏染色为阳性,呈葡萄串状排列;在普通肉汤中生长迅速,初期混浊,2~3 d 后表面有薄菌环,管底有多量粘稠沉淀。

菌组 2 在普通琼脂平板和鲜血琼脂平板上均可生长,为圆形、小菌落,灰白色,湿润,表面光滑,边缘整齐,在鲜血琼脂平板上产生溶血;在麦康凯平板上培养 1824 h 可形成红色菌落;革兰氏染色为阴性杆菌;普通肉汤培养物均匀、混浊,管底有粘性沉淀,液面管壁有菌环形成。

菌组 3 在普通琼脂平板上生长不良;在鲜血平板上生长为圆形小菌落,半透明、湿润如露珠样,表面光滑,边缘整齐,菌落周围呈溶血,革兰氏染色阳性,呈短链状排列;血清肉汤培养物均匀混浊。

2.1.2 生化试验 3 组病原菌的生化试验结果列于表 1。

表 1 3 组病原菌的生化试验结果

Table 1 Biochemical test results of the three pathogens

测定项目 Identification item	结果 Results			测定项目 Identification item	结果 Results		
	菌组 1 Group 1	菌组 2 Group 2	菌组 3 Group 3		菌组 1 Group 1	菌组 2 Group 2	菌组 3 Group 3
葡萄糖 Glucose	+	⊕	+	吲哚试验 Indole test	-	+	+
乳糖 Lactose	+	⊕	+	M-R 试验 Metthyl red test	/	+	+
麦芽糖 Maltose	+	⊕	+	V-P 试验 Voges-Proskauer test	/	-	-
蔗糖 Sucrose	+	+	-	过氧化氢酶 Catalase	+	+	-
菊糖 Chysantose	/	-	+	凝固酶 Coagulase	+	/	/
棉子糖 Raffinose	-	-	-	柠檬酸盐利用 Use citrate	/	-	/
甘露糖 Mannose	+	+	+	CAMP 试验 CAMP test	/	/	-
水杨苷 Salicin	-	/	+	硫化氢产生 Produce H ₂ S	-	+	-

注:“+”表示产酸不产气;“-”表示阴性;“⊕”表示产酸产气;“/”表示未做试验。

Notes:“+” means to produce acid but no gas;“-” means negative;“⊕” means to produce acid and gas;“/” means not tested.

由细菌形态、生长状况、染色特点及表 1 的生化试验结果,可以确定菌组 1 为金黄色葡萄球菌,菌组 2 为大肠杆菌,菌组 3 为乳房链球菌。

2.2 中药抑制试验结果

用中药复方药敏片对分离到的 3 种病原菌进行

体外抑菌试验,其结果列于表 2。从表 2 可以看出,中药复方对 3 种病原菌均有较强的抑制作用,尤其对大肠杆菌的抑菌作用最为明显,而且随着药液质量浓度的提高,其对 3 种病原菌的抑制作用也相应增强。

表 2 中药复方对 3 种病原菌及标准大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌效果

Table 2 Inhibition efficacy of Chinese herbs compound

病原菌类型 Pathogen type	药液质量浓度/(g·mL ⁻¹) Concentration			病原菌类型 Pathogen type	药液质量浓度/(g·mL ⁻¹) Concentration		
	1.5	1.0	0.5		1.5	1.0	0.5
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	13	11	8	标准大肠杆菌 (1 1000) <i>Standart Escherichia coli</i> (1 1000)	15	13	8
乳房链球菌 <i>Streptococcus uberis</i>	14	10	9	标准金黄色葡萄球菌 (1 1000) <i>Standart Staphylococcus aureus</i> (1 1000)	14	13	8
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	19	17	13				

3 讨 论

3.1 隐形乳房炎病原菌的研究

奶牛乳房炎病原菌种类复杂,各地区不同时期分离结果不尽相同,但以链球菌、葡萄球菌和大肠杆菌最为常见,由这 3 种细菌引起的乳房炎占 90 % 以上^[5]。本试验共从隐性乳房炎牛乳中分离出 3 种病原菌,分别为金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和乳房链球菌。其中金黄色葡萄球菌约为 35.8 %,大肠杆菌约为 21.0 %,乳房链球菌约为 43.2 %。金黄色葡萄球菌和链球菌是隐性乳房炎的主要致病菌,这与王志远等的报道一致^[6]。金黄色葡萄球菌为传染性致病菌;乳房链球菌及大肠杆菌为环境性致病菌。乳房链球菌及大肠杆菌在牛舍中普遍存在,一般不引起发病,但是当环境因素改变而使动物机体抵抗力下降,细菌就会乘虚而入引起动物发病^[7]。本试验表明,环境性致病菌是引起隐性乳房炎的主要因素。

3.2 中药复方对乳房炎的影响及其体外抑菌效果

乳房炎是胃热壅胜、气血凝滞、胃脉阻塞、乳房经脉阻塞或不畅造成的^[8]。针对奶牛产后多虚、易

感染、大量泌乳的特点,复方以健脾生津、补中益气、清热解毒、抗菌消炎、通经活络、消肿止痛、活络通乳为原则,选取蒲公英、王不留行、黄芩、黄柏、益母草、党参、白芍和鹿角胶等组方,对患牛进行饲喂效果较好,乳中体细胞数显著下降达 26.36 %,转阴率明显升高达 74.14 %。

据报道^[9],蒲公英只对大肠杆菌 O₁₄₁ 有抑制作用,黄芩仅对大肠杆菌 O₈ 和 O₁₄₁ 及金黄色葡萄球菌有抑制作用,黄柏仅对金黄色葡萄球菌和链球菌 C₅₅₉₀₁ 有抑制作用,可见单味药的抑制范围十分有限。本试验选用的中药复方对从隐性乳房炎牛乳中分离到的 3 种病原菌均有较强的抑制作用,尤其对大肠杆菌的抑制作用最好。这与临床上应用中药复方防治隐性乳房炎的效果高于单味药的结果相一致。但中药复方防治隐性乳房炎的作用机理与单味药物有何不同?是各味药物作用的叠加?还是有什么新物质生成?均有待于进一步研究。另外,试验结果还提示,在以后防治隐性乳房炎时,可采取多渠道给药的方法,如在口服给药的同时配合中药药浴或乳头灌注等疗法,以便更有效地发挥其药理作用。

[参考文献]

- [1] 王秋芳,张森涛,效梅,等. 中药对隐性乳房炎奶牛细胞免疫功能的影响[J]. 畜牧兽医学报,2002,(4):408-411.
- [2] 曹彭泽,郭玉璞. 兽医微生物学及免疫学技术[M]. 北京:北京农业大学出版社,1992.1-53.
- [3] 李健强,李六金. 兽医微生物学实验实习指导[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1999.156-181;30-31.
- [4] 甘肃农业大学. 兽医微生物学[M]. 北京:中国农业出版社,1999.
- [5] 卜化金,陈杖榴,冯淇辉. 奶牛乳房炎的抗菌药物防治[J]. 兽药与饲料添加剂,1999,(4):14-16.
- [6] 王志远,宋治萍. 青岛市奶牛乳房炎的病原菌分离与鉴定[J]. 畜牧与兽医,2002,(7):31.
- [7] 马保臣,李建基,刘锡武. 奶牛急性乳房炎病原菌的分离与鉴定研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2003,(1):35-36.
- [8] 赵喜桐,李瑞华,赵志军,等. 中医治疗奶牛乳房炎[J]. 黑龙江畜牧兽医,2002,(4):19.
- [9] 付秀花,王恬. 中草药对奶牛乳房炎的体外抑菌试验[J]. 动物科学与动物医学,2002,(5):16-19.

Inhibition to pathogens of cow recessive mastitis by Chinese herb compound prescription *in vitro*

CONG Ri-hua¹, WANG Qiu-fang¹, MU Yang¹, ZHAO Yi²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Agriculture Bureau of Shaanxi Provincial Government, Xi'an, Shaanxi 710014, China)

Abstract: The pathogens of milk from ten positive cows was separated and indentified, the fast diagnostic reagent of the sub-clinical mastitis from Beijing (BMT) was used to examine the white-black cow from The Cow Breeding Center in Xi'an and The Second Team in Cao-Tan Farm. The results indicated that there were three kinds of pathogens in the milk: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Escherichia coli*. Chinese herbs such as taraxacum, vaccaria segetalis and so on were made into medicative liquid, of which the concentration was 2 g/mL by decocting in water, eliminating lees and concentrating. After that, it was diluted into 1.5 g/mL, 1.0 g/mL and 0.5 g/mL respectively. Then, they were made into sensitive tablets using high quality filter papers correspondingly. Those tablets were used to test their inhibition against the isolated pathogens. The results showed that this compound prescription could inhibit the three pathogens obviously.

Key words: Chinese herbs compound prescription; cow; recessive mastitis; inhibition against pathogens *in vitro*