

健康与子宫内膜炎奶牛生殖道需氧及兼性厌氧细菌研究

李炳志,赵献军,马治宇,邹克庆

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘要】 【目的】探讨健康奶牛与患子宫内膜炎奶牛生殖道需氧及兼性厌氧细菌的差异。【方法】选择 20 头健康奶牛和 20 头患子宫内膜炎奶牛,采用常规生理生化方法对其生殖道样品进行细菌的分离鉴定,比较其菌群差异。【结果】健康奶牛乳酸杆菌、产乳酸球菌和表皮葡萄球菌的分离率明显高于患病奶牛,且差异达显著水平($P<0.05$);大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌及链球菌的分离率均显著低于患病奶牛,其差异也达显著水平($P<0.05$)。【结论】健康奶牛和患子宫内膜炎奶牛生殖道需氧及兼性厌氧细菌差异明显,乳酸细菌减少引起的生殖道内菌群紊乱是奶牛子宫内膜炎发病的重要诱因。

【关键词】 健康奶牛;子宫内膜炎;生殖道;需氧及兼性厌氧细菌

【中图分类号】 S858.237.2⁺3 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)11-0057-04

Difference of aerobic and facultative anaerobic bacteria in vagina of postpartum healthy cows and endometritis cows

LI Bing-zhi, ZHAO Xian-jun, MA Zhi-yu, ZOU Ke-qing

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study discussed the difference of facultative anaerobic bacteria in vagina of postpartum healthy cows and endometritis cows. 【Method】 20 vaginal samples of healthy cows and 20 vaginal samples of endometritis cows were selected. Routine methods of classification and determination of bacterium were taken and the microflora differences of the two groups were compared. 【Result】 The results of the experiment indicated that the most frequently isolated bacteria were *Lactobacillus*, *Lactococcus* *S. epidermidis* in healthy cows and the ratio of isolation was obviously higher than that from endometritis cow ($P<0.05$). But the ratio of isolation of *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli* were lower than that from endometritis cows ($P<0.05$). 【Conclusion】 There are obvious differences in aerobic and facultative anaerobic bacteria between healthy cows and endometritis cows. The decrease of lactic acid bacillus and the increase of condition pathogen bacillus are the most important inducement of cows' endometritis.

Keywords: healthy cow; endometritis; vagina; aerobic and facultative anaerobic bacteria

探讨健康奶牛和患子宫内膜炎奶牛生殖道微生物区系的差异,对研发微生态制剂来防治奶牛子宫

* [收稿日期] 2007-11-19
[基金项目] 国家科技支撑计划项目“奶业发展重大关键技术研究” (2006BAD04A11); 陕西省农业攻关项目 (2007K02-03-01)
[作者简介] 李炳志(1982—),男,山东烟台人,在读硕士,主要从事动物中毒性与营养代谢性疾病研究。
E-mail: bingzhi-521@163.com
[通讯作者] 赵献军(1961—),男,陕西蒲城人,教授,主要从事动物中毒性与营养代谢性疾病研究。
E-mail: zhaoxianjun458@sina.com

内膜炎有重要的指导意义。健康奶牛生殖道内存在的乳酸菌、葡萄球菌、大肠埃希菌和链球菌等正常细菌构成了微生态区系,在正常情况下,相对稳定的微生物菌群可以保护机体免受致病菌的侵入,从而有效避免了产道的感染^[1]。当奶牛因体质差、防卫能力下降或污染严重时,条件致病菌大量繁殖,进而引发子宫内膜炎等生殖系统疾病,而这些条件致病菌主要有大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌及链球菌等^[2]。目前对奶牛子宫内膜炎的研究,主要集中在致病菌的分离和鉴定方面,而有关两者之间菌群变化关系的研究较少。为此,本试验对分离自健康奶牛和患子宫内膜炎奶牛生殖道内需氧及兼性厌氧细菌进行了比较,阐述了其在健康奶牛和患子宫内膜炎奶牛生殖道内的变化情况,以期防治奶牛子宫内膜炎的微生态制剂的开发研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物分组

分别从陕西宝鸡某奶牛场和某养殖小区,选择产后 7~60 d 的 20 头健康奶牛和 20 头患子宫内膜炎奶牛,分为试验 I 组和 II 组。

1.2 培养基的制备

营养肉汤、体积分数 5% 的绵羊血琼脂培养基、伊红美蓝琼脂培养基、普通琼脂培养基、三糖铁琼脂、蛋白胨水、葡萄糖蛋白胨水、硝基蛋白胨水、枸橼酸盐培养基、糖发酵试验培养基、明胶、O/F 培养基、MRS 琼脂培养基(含质量 2% CaCO_3)、MRS 肉汤培养基、麦康凯琼脂培养基等,均参照文献^[3-4]的方法配制。

1.3 健康奶牛和患子宫内膜炎奶牛生殖道细菌的分离培养

先掏空奶牛宿粪,用新洁尔灭溶液清洗肛门部及外阴周围后,再用体积分数 75% 的酒精棉球对阴道边缘及内侧进行消毒,将灭菌的棉拭子插入阴道深部达子宫颈口处采集其分泌物后,立即投入高压灭菌的含有硫乙醇酸钠的营养肉汤内,4 ℃ 送检。

1.4 细菌的分离鉴定

将样品分别接种到普通琼脂平板、体积分数 5% 绵羊血琼脂平板、麦康凯平板、伊红美蓝琼脂平板及含质量分数 2% CaCO_3 的 MRS 琼脂培养基上,培养 24~36 h 后,根据细菌在培养基上的菌落形态及革兰氏染色后的镜检结果,初步归类后进行生化试验鉴定,确定所分离细菌的种类和株数,按“细菌分离率/%=每种细菌分离的株数/奶牛数×

100%”计算细菌分离率。

2 结果与分析

2.1 健康奶牛与患子宫内膜炎奶牛生殖道内细菌的分离

无论是健康奶牛,还是患子宫内膜炎奶牛,生殖道均有细菌存在(100%)。20 头健康奶牛共分离到 9 种 57 株细菌,其中乳酸杆菌 15 株,产乳酸球菌 7 株,大肠埃希菌 8 株,表皮葡萄球菌 13 株,金黄色葡萄球菌 5 株,链球菌 4 株,芽孢杆菌 2 株,棒状杆菌 1 株,微球菌 2 株。20 头患子宫内膜炎奶牛共分离到 10 种 62 株细菌,其中乳酸杆菌 7 株,产乳酸球菌 3 株,大肠埃希菌 14 株,表皮葡萄球菌 3 株,金黄色葡萄球菌 11 株,链球菌 9 株,芽孢杆菌 5 株,棒状杆菌 4 株,微球菌 4 株,沙门氏菌 2 株;20 头患病奶牛均为混合感染。

2.2 健康奶牛与患子宫内膜炎奶牛生殖道内细菌的比较

健康奶牛和患子宫内膜炎奶牛生殖道内细菌的分离率见表 1。由表 1 可见,健康奶牛生殖道内存在乳酸杆菌、产乳酸球菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、链球菌、芽孢杆菌、棒状杆菌和微球菌;患子宫内膜炎奶牛生殖道内除以上细菌外还分离到了沙门氏菌。健康奶牛乳酸杆菌的分离率为 75%,高于其他细菌的分离率,且差异极显著($P<0.01$),表皮葡萄球菌的分离率为 65%,也高于其他细菌,差异达显著水平($P<0.05$)。另外,还分离到产乳酸球菌(分离率为 35%)。患子宫内膜炎奶牛大肠埃希菌的分离率最高,为 70%,其次为金黄色葡萄球菌(55%)和链球菌属(45%),均高于其他细菌的分离率。

健康奶牛乳酸杆菌(75%)、表皮葡萄球菌(65%)的分离率均极显著高于患子宫内膜炎奶牛($P<0.01$);产乳酸球菌的分离率(35%)也显著高于患子宫内膜炎奶牛(15%)($P<0.05$)。而患子宫内膜炎奶牛生殖道内大肠埃希菌的分离率为 70%,极显著高于健康奶牛;其金黄色葡萄球菌(55%)和链球菌(45%)的分离率也显著高于健康奶牛($P<0.05$)。

由表 1 还可以看出,患子宫内膜炎奶牛生殖道内除乳酸杆菌、产乳酸球菌、大肠埃希菌、葡萄球菌属(包括表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌)和链球菌属细菌外,其他细菌占分离细菌总数的比率(24.19%)高于健康奶牛(8.77%),且差异显著

($P<0.05$)。

表 1 健康奶牛和患子宫内膜炎奶牛生殖道内细菌的分离率及其占细菌总数的比率
Table 1 The percentage of bacteria isolated from vagina of the two groups of cows

细菌种类 Bacterium species	I 组 Group I			II 组 Group II		
	株数 Strain	分离率/% Isolation	占细菌 总数比率% Ratio	株数 Strain	分离率/% Isolation	占细菌 总数比率% Ratio
乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i>	15	75 bB	26.32	7	35	11.29
产乳酸球菌 <i>Lactococcus</i>	7	35 A	12.28	3	15	4.84
大肠埃希菌 <i>Escherichia. coli</i>	8	40 B	14.03	14	70 b	22.50
表皮葡萄球菌 <i>S. epidermidis</i>	13	65 aB	22.81 B	3	15	4.84
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	5	25 A	8.77 A	11	55 a	17.70
链球菌属 <i>Streptococcus</i>	4	20 A	7.01	9	45	14.52
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	2	10	3.51	5	25	8.06
棒状杆菌属 <i>Corynebacterium</i>	1	5	1.75	4	20	6.45
微球菌 <i>Micrococcus</i>	2	10	3.51	4	20	6.45
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	—	—	—	2	10	3.23
细菌总数 <i>Total</i>	57	—	100.00	62	—	100.00

注:数据后的大写字母表示组间比较,小写字母表示组内比较,标“a”、“A”者表示差异显著($P<0.05$),标“b”、“B”者表示差异极显著($P<0.01$)。

Note:The capital letters are comparisons between group I and group II. Lowercases are comparisons in group. The “a” “A”are significantly different($P<0.05$);The “b” “B” are extremely different($P<0.01$).

3 讨 论

生殖道内的微生物区系是微生物与机体在长期的历史进化过程中形成的微生态平衡,其生理功能是机体生理功能的一部分^[5]。本试验通过对健康奶牛生殖道内需氧及兼性厌氧细菌的研究证实,产乳酸细菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌等是健康奶牛生殖道内常见的菌属,这与以往的报道一致^[1,6]。这些细菌在生殖道内与宿主的组织和其他酶分解糖原、蛋白等物质产生乳酸、乙酸等代谢产物,来维持生殖道的低 pH 环境,共同形成一种稳定的共生关系,有序地定植在生殖道黏膜上皮,形成生物屏障,阻止了病原菌的侵入和感染。同时,生殖道正常菌群对宿主的体液免疫和细胞免疫的形成有一定的影响^[7-8]。

健康奶牛生殖道内微生物是随着环境和机体的变化而不断变化的,这种变化是正常生理范围内的动态平衡。在环境改变、分娩、大量使用抗生素、卵巢功能不全等因素的作用下,生殖道内正常的微生物菌群平衡被破坏,生理性的微生物菌群就会演替为病理性的菌群。国内外许多学者对阴道感染妇女阴道病原菌的研究表明,与健康妇女相比,其阴道乳酸杆菌分离率降低,而类杆菌、葡萄球菌、肠杆菌、支原体、棒状杆菌等厌氧、兼性厌氧和需氧菌的分离率增高,成为阴道的优势菌群^[9-11];但并未在阴道炎患者的分泌物中分离出特定的致病菌^[8]。国内外学者对患子宫内膜炎奶牛生殖道内病原菌的研究发现,

引起奶牛子宫内膜炎的细菌以链球菌、葡萄球菌、大肠埃希菌为主,此外还有绿脓杆菌、变形杆菌、克雷伯氏菌等^[12-14],但这些细菌在产后健康奶牛的生殖道内均可分离到,没有发现特定的致病菌。本试验通过对健康奶牛和患子宫内膜炎奶牛生殖道需氧及兼性厌氧细菌的系统研究,也未发现奶牛子宫内膜炎的特定病原菌。笔者认为,奶牛子宫内膜炎的发生是由于产乳酸细菌减少,生殖道内的微生态平衡被破坏,各种微生物之间的正常菌群关系被打破,由几种条件致病菌共同作用的结果。因此,生殖道微生物菌群紊乱,可能是奶牛子宫内膜炎发病的重要诱因。

目前,对于奶牛子宫内膜炎的治疗主要是应用抗生素,而抗生素的副作用较大,药物残留严重并且能够抑制或扰乱子宫局部免疫系统^[15]。国内外已经用乳酸杆菌、双歧杆菌及链球菌进行处理并制成悬剂来治疗奶牛的子宫内膜炎,且取得了良好的效果^[16-17]。随着人们对绿色食品的关注,利用微生态制剂治疗奶牛子宫内膜炎已成为一种发展趋势。本试验揭示了健康奶牛和患子宫内膜炎奶牛生殖道内需氧及兼性厌氧细菌的差异,为研究利用微生态制剂治疗子宫内膜炎提供了理论依据。

〔参考文献〕

[1] 张维军,马广强,林树乾,等. 健康奶牛产道内正常菌群的研究[J]. 家畜生态报,2006,27(4):94-97.
Zhang W J, Ma G Q, Lin S Q, et al. Study on the normal bacte-

- rial microflora in heathy cows’ vagina [J]. *Acta Ecologiae Animalis Domastic*, 2006, 27(4): 94-97. (in Chinese)
- [2] 王国卿, 田文儒, 段晓坤, 等. 产后奶牛子宫内细菌的研究进展 [J]. *黑龙江动物繁殖*, 2001, 9(1): 11-14.
Wang G Q, Tian W R, Duan X K, et al. Study progression on bacteria in uterus of postpartum cows [J]. *Heilongjiang Journal of Animal Reproductio*, 2001, 9(1): 11-14. (in Chinese)
- [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: 156-167
Li J Q, Li L J. Experimental instruction of veterinary microbiology [M]. Xi’an: Shaanxi Science and Technology Press, 1999: 156-167. (in Chinese)
- [4] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
Ling D W. Experimental methods of classification and determination of lactic acid bacterium [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999. (in Chinese)
- [5] 康白. 正常微生物群是一个新的人体生理学系统 [J]. *中国微生态学杂志*, 2003, 15(2): 63-65.
Kang B. Normal microbiotia is a new somat-physiological system [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2003, 15(2): 63-65. (in Chinese)
- [6] 王良娟, 李跃民, 马勋, 等. 产后母牛阴道微生物区系研究 [J]. *中国兽医科技*, 1995, 25(5): 26-27.
Wang L J, Li Y M, Ma X, et al. Microflora in vagina of postpartum cows [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 1995, 25(5): 26-27. (in Chinese)
- [7] 王海珍, 王加启, 黄庆生. 乳酸菌类微生物制剂的作用机理及其应用 [J]. *饲料与营养*, 2005(3): 9-11.
Wang H Z, Wang J Q, Huang Q S. The mechanism and applications of preparation microbiological of lacto acid bacteria [J]. *Feed and Nutrition*, 2005(3): 9-11. (in Chinese)
- [8] 李兰娟. 感染微生态学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 427.
Li L J. Infectious Microecology [M]. Beijing: People Heath Press, 2002: 427. (in Chinese)
- [9] 赵广明, 赵连华, 张秀荣, 等. 妇女外生殖道感染与乳酸杆菌的相关性 [J]. *中国微生态学杂志*, 1999, 11(4): 215-216.
Zhao G M, Zhao L H, Zhang X R, et al. The relativity of pudendum infections of women and *Lactobacillus* [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 1999, 11(4): 215-216. (in Chinese)
- [10] 张振, 游上游, 郭建, 等. 细菌性阴道病妇女阴道乳酸杆菌属细菌缺乏的分析 [J]. *中国妇幼保健*, 2007, 22(24): 3364-3366.
Zhang Z, You S Y, Guo J, et al. Analysis of short lactobacillus for children’s bacterial vaginosis [J]. *Chinese Journal of Heath Care of Women and Children*, 2007, 22(24): 3364-3366. (in Chinese)
- [11] Sharon L. The relationship of hydrogen peroxide-producing lactobacilli to bacterial vaginosis and genital microflora in pregnant women [J]. *Obstet Gynecol*, 1992, 79: 369-373.
- [12] 许微微, 侯振中, 王海峰. 奶牛子宫内膜炎厌氧菌的分离鉴定 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2006(6): 73-74.
Xu W W, Hou Z Z, Wang H F. Isolation and identification of anaerobic bacterium of endometritis in cows [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2006(6): 73-74. (in Chinese)
- [13] 杨克礼, 潘玲, 章孝荣. 奶牛子宫内膜炎病原菌分离试验 [J]. *中国奶牛*, 2006(8): 39-41.
Yang K L, Pan L, Zhang X R. Isolation of pathogenic bacterium of endometritis in cows [J]. *Chinese Cattle Journal*, 2006(8): 39-41. (in Chinese)
- [14] 孔祥峰, 胡元亮, 杨龙圣, 等. 奶牛子宫内膜炎病原菌的分离鉴定及中药的抑菌作用 [J]. *畜牧与兽医*, 2005, 37(9): 15-18.
Kou X F, Hu Y L, Yang L J, et al. Isolation and identification of pathogenic bacteria from endometritis in dairy cows and bacteriostasis of Chinese herbal medicine [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2005, 37(9): 15-18. (in Chinese)
- [15] Silva-Ruiz C, Lopez-Bocanera M E, Nader-Macias M E, et al. Effect of lactobacilli and antibiotics on *E. coli* urinary infection in mice [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 1996, 19: 88-93.
- [16] Silva-Ruiz C, Rey M R, Ruiz Holgado A P, et al. *Lactobacillus fermentum* administered in suspensions and agarose beads to mice: a comparative study [J]. *Microbiologie Aliments Nutrition*, 1993, 11: 391-397.
- [17] 徐耀基, 苏乔, 黄引贤. 微生态制剂治疗奶牛子宫内膜炎 [J]. *动物医学进展*, 1998, 19(2): 35-36.
Xu Y J, Su Q, Huang Y X. Preparation microbiological treated endometritis of cows [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 1998, 19(2): 35-36. (in Chinese)