

不同中药对奶牛乳房炎病原菌抑菌效果的观察

张少华,孙丹丹,史万玉,秦建华,钟秀会,包永占,任丽琴
(河北农业大学动物科技学院,河北保定 071001)

摘要:试验采用琼脂平板扩散法(打孔法),研究了黄芩等21种中药对从乳房炎奶牛乳汁中分离出的3种主要致病菌的体外抑菌情况。结果发现,大肠杆菌对黄芩高度敏感,对丹参、青翘属中度敏感;金黄色葡萄球菌对黄芩、青翘、丹参、地榆、红花、蒲公英高度敏感,对枳壳、忍冬藤、蒲公英、苦地丁、蟾酥、木通中度敏感;无乳链球菌对地榆、当归属高度敏感,对青翘、黄芩、蒲公英、丹参、苦地丁、红花、川芎、枳壳中度敏感。为防治奶牛乳房炎有效中药复方的筛选提供了理论依据。

关键词:中药;奶牛;乳房炎;病原菌;抑杀效果

中图分类号:S853.74 **文献标识码:**A

Observation of the *In Vitro* bacteriostasis Effects of Chinese Herbal Medicine on the Major Pathogenic Bacteria Causing Mastitis

Zhang Shaohua, Sun Dandan, Shi Wanyu, Qin Jianhua, Zhong Xiuhui, Bao Yongzhan, Ren liqin
(College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding Hebei 071001)

Abstract: Three kinds of major pathogenic microorganisms that cause mastitis of dairy cows were selected and the *in vitro* antibiosis effects of 21 kinds of Chinese medicinal herbs such as *Radix Scutellariae* et al. Were tested through the method of stiletto. Twenty four nutrient agar medium were divided into there groups. Smear *Escherichia Coli* on A1toA8 nutrient agar medium homogeneous. Smear *S. aurous* on B1 to B8 nutrient agar medium homogeneous. Smear *Streptococcus agalactiae* on C1toC8 nutrient agar medium homogeneous. Then slotting uniform upon the nutrient agar medium, respectively, each plate six hole. Add 20 μ l of every medical solution into each hole, and two holes were made to parallel samples. Add 21 chinese medicine to A1toA7, B1toB7, C1toC7, respectively, and A8,B8,C8 were the normal control which were added deionized water only. These nutrient agar medium were incubated at 37 $^{\circ}$ C for 24 h. Bacterial existence and antibacterial circle diameter were observed. We found that different medicine for different strains produce different effects. The experiment results showed above supplied the scientific evidence for filtering Chinese medicinal herbs to prevent and cure the mastitis.

Key words: chinese herbal medicine, cow, mastitis, pathogenic bacteria, bacteriostasis effects *in vitro*

0 前言

奶牛乳房炎是最常见、多发的奶牛疾病之一。随着奶牛饲养业和乳品工业的发展,奶牛乳房炎的危害已引起人们的高度重视。该病的发生不仅使得奶牛的

产奶量降低,影响牛奶的营养成分^[1]。诱发奶牛乳腺炎的病原菌很多,主要是由大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌和停乳链球菌引起的,占发病牛的90%以上^[2]。

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划“华北农区高产奶牛良种繁育体系建立与奶业规模化生产技术研究-第四子课题-华北农区奶牛疾病综合防治技术应用与示范”(2006BAD04A10-4);河北省重大技术创新专项计划项目“河北省奶业规模化生产技术与产业化示范-第四子课题-奶牛疾病综合防治技术的研究与开发”(07227146Z-4)。

第一作者简介:张少华,男,1983年出生,河北邯郸人,临床兽医学在读硕士,研究方向:中药药理研究。通信地址:071001 河北省保定市建设南路215号河北农业大学动物科技学院中兽医实验室, Tel: 0312-7528355, E-mail: zhangshaohua0824@126.com。

通讯作者:史万玉,博士,教授, E-mail: shwybyzh@vip.sina.com。

收稿日期:2009-02-17, **修回日期:**2009-03-26

抗生素在畜禽饲料中的广泛使用,尤其是超标使用,会引起各种病原微生物产生抗药性,并在畜禽产品中残留,严重影响畜禽产品的质量安全性,严重影响中国畜禽产品质量的提高和产品出口^[3]。

中草药为天然药物,包括动物,植物和矿物质,不仅含有生物碱、多糖、皂甙、挥发油、萜类和有机酸等有效生物活性物质,而且含有矿物质、维生素及未知的营养因子,兼有预防、治疗和营养的多重作用。中草药可通过调动动物自身免疫力,达到防治疾病的目的^[4-5]。中草药毒性低,对动物及人类毒副作用小,且不易产生抗药性,药残留相对低等特点^[6]。

研究和开发抗菌中药对解决耐药菌株的产生^[7]和抗生素残留问题具有重要意义,且研究中药费用低廉。筛选对病原微生物敏感、抑菌强度大、特异性高、对环境稳定的中草药来防治奶牛乳房炎,是发展奶牛业的一个重要课题。

笔者作者所在实验室从邢台某奶牛场乳房炎病牛的乳样中分离到了大肠杆菌,金黄色葡萄球菌及停乳链球菌3株致病菌。试验通过观察不同中药对该3株致病菌的抑菌情况,对草药的体外抑菌活性进行了定性、定量分析,以便筛选出对奶牛乳房炎病原菌敏感的中药,为研制防治奶牛乳腺炎中草药制剂的科学组方提供理论依据,对临床治奶牛乳房炎的防治方法作出重大贡献。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 中药 当归,益母草,忍冬藤,蒲公英,苦地丁,瓜蒌,红花,青翘,枳壳,牛蒡子,黄芩,川芎,青皮,木通,王不留行,丹参,冰片,蟾酥,通草,蒺藜,地榆,均购于河北省安国市药材市场。

1.1.2 试验菌种 均由邢台市某奶牛场患有乳腺炎的奶牛乳汁中分离得到,经纯化,鉴定,保存的大肠杆菌,金黄色葡萄球菌,牛无乳链球菌置于4℃冰箱内保存备用。

1.1.3 主要试剂 营养琼脂(北京双旋微生物培养基制品厂),无水乙醇,8%兔血清,血清肉汤培养基

1.2 方法

1.2.1 药液制备 19种中药(蟾酥,冰片除外)各称取10g,100ml去离子水浸泡30min后煎煮,武火加热至沸后文火维持30min,8层纱布过滤。滤渣加8倍去离子水按上述方法再煎煮1次,合并2次滤液,浓缩至10ml,使其终浓度为1g/ml。精确称取蟾酥和冰片各1g,用10ml无水乙醇浸泡至完全溶解。浓缩后的水煎液分别装入10ml无菌离心管中,密封后做好标记,煮沸

30min后放入4℃冰箱保存待用^[8-10]。

1.2.2 药敏试验 取8个直径12cm灭菌营养琼脂培养基接种500倍稀释的大肠杆菌菌液,用无菌棉签蘸取菌液均匀涂在营养琼脂培养基表面,编号为A1~A8。取8个直径12cm灭菌营养琼脂培养基接种500倍稀释的金黄色葡萄球菌菌液,用无菌棉签蘸取菌液均匀涂在营养琼脂培养基表面,编号为B1~B8。取8个直径12cm灭菌血清营养琼脂培养基接种500倍稀释的牛无乳链球菌菌液,用无菌棉签蘸取菌液均匀涂在营养琼脂培养基表面,编号为C1~C8。

用直径5mm的打孔器在涂菌的琼脂培养基上均匀打孔,每个平皿上打6个孔,排列呈正六边形。孔径大小、深度保持均匀。打好的孔在酒精灯火焰上略微加热,使局部培养基熔化重新凝固与平皿底壁紧密结合,防止加入的药液从底部的缝隙流出,影响实验结果。

将21种制备好的中药用移液枪加入接种有大肠杆菌菌种的A1~A7培养基中,每种药液加两孔作为平行样,每孔加20μl药液,注意将平皿平放防止药液溢出影响试验结果准确性。同上述操作,将21种制备好的中药也分别加入金黄色葡萄球菌培养基B1~B7和牛无乳链球菌培养基C1~C7中。A8,B8,C8平板内每个孔均加20μl去离子水,做空白对照。

在加药前对应每个孔在平皿底部做好1-21(加入相同药液时记重复数字)数字标记后,对应如下安排加入药液:1当归、2益母草、3忍冬藤、4蒲公英、5苦地丁、6瓜蒌、7红花、8青翘、9枳壳、10牛蒡子、11黄芩、12川芎、13青皮、14木通、15炒王不留行、16丹参、17通草、18蒺藜、19蟾酥、20地榆、21冰片。

加药完毕后,将培养皿置于37℃培养箱培养24h^[11]。

1.2.3 观察并记录结果 分别观察并测量抑菌圈直径大小(mm),每孔取不同方向测量两次,最终求取两孔共四次测量结果的平均值。

1.2.4 结果判断标准 用无抑菌圈为耐药;抑菌圈直径6~8mm为低度敏感;9~15mm为中度敏感;16mm以上为高度敏感^[12]。

2 试验结果

2.1 中药对大肠杆菌抑菌效果

由表1可以看出,大多数受试中药对大肠杆菌均有一定的抑杀作用,其中黄芩为高度敏感;丹参,青翘为中度敏感;青皮,地榆,忍冬藤,冰片,通草,益母草,蒺藜为低度敏感;当归、红花、牛蒡子、川芎、炒王不留行无任何抑菌作用。

表1 不同中药对大肠杆菌的抑菌圈直径影响 (mm)

中药种类	抑菌圈直径	中药种类	抑菌圈直径
1 当归	0	12 川芎	0
2 益母草	7	13 青皮	8.5
3 忍冬藤	7.5	14 木通	6.5
4 蒲公英	6	15 炒王不留行	0
5 苦地丁	6.5	16 丹参	12
6 瓜蒌	6	17 通草	7.5
7 红花	0	18 蒺藜	7
8 青翘	11	19 蟾酥	6
9 枳壳	6	20 地榆	8
10 牛蒡子	0	21 冰片	7.5
11 黄芩	16.5	22 去离子水	0

表2 不同中药对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径影响 (mm)

中药种类	抑菌圈直径	中药种类	抑菌圈直径
1 当归	7	12 川芎	8.5
2 益母草	6	13 青皮	9
3 忍冬藤	12	14 木通	10
4 蒲公英	17	15 炒王不留行	0
5 苦地丁	11	16 丹参	19
6 瓜蒌	8	17 通草	0
7 红花	18	18 蒺藜	11
8 青翘	20	19 蟾酥	0
9 枳壳	12.5	20 地榆	19
10 牛蒡子	7.5	21 冰片	0
11 黄芩	23	22 去离子水	0

2.2 中药对金黄色葡萄球菌抑菌效果

由表2可以看出,各中草药对金黄色葡萄球菌抑菌效果依次为:黄芩,青翘,丹参,地榆,红花,蒲公英属高度敏感;枳壳,忍冬藤,蒺藜,苦地丁,蟾酥,木通属中度敏感;青皮,川芎,瓜蒌,牛蒡子,当归属低度敏感;炒王不留行、通草、蟾酥、冰片无任何抑菌作用。

表3 不同中药对无乳链球菌的抑菌圈直径影响 (mm)

中药种类	抑菌圈直径	中药种类	抑菌圈直径
1 当归	20	12 川芎	11
2 益母草	9	13 青皮	7
3 忍冬藤	9	14 木通	0
4 蒲公英	13	15 炒王不留行	0
5 苦地丁	12	16 丹参	12
6 瓜蒌	8	17 通草	0
7 红花	12	18 蒺藜	7
8 青翘	15	19 蟾酥	0
9 枳壳	10	20 地榆	20
10 牛蒡子	0	21 冰片	0
11 黄芩	13	22 去离子水	0

2.3 中药对无乳链球菌抑菌效果

由表3可以看出,各中草药对无乳链球菌抑菌效果依次为:地榆,当归属高度敏感;青翘,黄芩,蒲公英,丹参,苦地丁,红花,川芎,枳壳属中度敏感;益母草,忍冬藤,瓜蒌,蒺藜,青皮属低度敏感;牛蒡子、木通、炒王不留行、通草、蟾酥、冰片无任何抑菌作用。

3 分析与讨论

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^[13]。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^[14]。

3种菌性对多种中药存在耐药性,他们对菌株的抑菌圈为零。这种情况可能是药物本身的特性决定的,但也不排除试验方法与操作过程对结果的影响。首先,由于中药与抗生素相比,其抗菌活性较低,需要用较大的药量才能达到相同效果^[15]。中草药的提取方法决定了药液的成分和含量,提取剂的选择直接影响药物有效成分的含量,从而影响药物的作用效果^[16]。此试验采用的提取液浓度为1 g/ml,可能对于个别中药抑菌量不够,而未能表现出良好的抑菌效果。其次,中草药提取液普遍为悬浊液,成分复杂,其中有大量化学成分具有挥发性或对热敏感,在煎煮过程中,可能挥发或失效,同时中药中有些成分不溶于水,水煮液不能完全提取出有效成分,而影响抑菌效果。例如在提取王不留行时,因其煎煮后成糊状用8层纱布过滤时,有效成分未被过滤,则煎液中含有效成份少,或许因此而不能显出抑菌效果。

中草药的抑菌浓度是抗生素的1000倍^[17],在目前的提取与使用情况下,很难达到如此高的体内浓度,单味中药难以达到抗生素的疗效。应当在复方中药以及中药与抗生素配合使用上加强研究,以期取得良好效果^[18]。

中药抑菌的有效成分在体内和体外的作用环境相差甚大。一方面由于体内消化液及各种酶、激素等化学成分的影响,其作用效果或许存有差异,另一方面中草药为天然药物,不仅含有生物碱、多糖、皂甙、挥发油、萜类和有机酸等有效生物活性物质,而且含有矿物质、维生素及未知的营养因子,兼有预防、治疗和营养

的多重作用。中草药可通过调动动物自身免疫力,达到防治疾病的目的。因此中药抑菌在体内试验部分还需进一步研究。

试验结果还表明,在临床上用中草药对奶牛乳房炎进行预防和治疗时,黄芩,地榆,青翘,丹参,蒲公英中草药可作为首选药进行配伍组方。此试验进一步还可做药物配伍试验,将两种或两种以上的药物配伍,看其是否存在协同作用或拮抗作用,若存在协同作用,则在治疗奶牛乳房炎方面可能获得更满意的治疗效果。

如李少基^[9]用黄芩、野菊花等 12 种中草药,研究其对金黄色葡萄球菌的抑菌效果,发现大部分药物在一起具有协同作用,其中黄芩和松针等 4 种配伍药物对金黄色葡萄球菌抑杀作用明显强于单味中药。

采用水煎液的提取方式,方法简便易行,成本低。在相同条件下进行比较筛选时,容易控制试验条件,故较为可取。常规的高压灭菌法,会因温度过高造成中药药理活性降低,在试验中采用了煮沸灭菌方法从而避免了这一缺点。在操作过程中对各种操作细节严格加以控制,定量准确,故其结果相对较为可靠,可以作为进一步进行筛选的参考资料。但其具体的作用效果有待于深入研究,以便使中草药在防治奶牛乳房炎的生产实践中得到广泛应用。

4 结论

试验主要观察了大肠杆菌,无乳链球菌,金黄色葡萄球菌在中药煎液影响下的生长情况及测量了中药抑菌圈的直径,得到初步结论:

各中草药对大肠杆菌抑菌效果依次为:黄芩属高度敏感;丹参,青翘属中度敏感;青皮,地榆,忍冬藤,冰片,通草,益母草,篇蓄属低度敏感;

各中草药对金黄色葡萄球菌抑菌效果依次为:黄芩,青翘,丹参,地榆,红花,蒲公英属高度敏感;枳壳,忍冬藤,篇蓄,苦地丁,蟾酥,木通属中度敏感;青皮,川芎,瓜蒌,牛蒡子,当归属低度敏感;

各中草药对无乳链球菌抑菌效果依次为:地榆,当归属高度敏感;青翘,黄芩,蒲公英,丹参,苦地丁,红花,川芎,枳壳属中度敏感;益母草,忍冬藤,瓜蒌,篇

蓄,青皮属低度敏感。

参考文献

- [1] 孔雪旺,陈功义.奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定及药敏试验[J].中国奶牛,2007(1):43-44.
- [2] 刘杜华,自翠华,孔翔云,等.当归与自芷水煎提取液杀菌效果的试验观察[J].中国消毒学杂志,2007,17(1):36-37.
- [3] Ankr Serge. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect*, 1999, 1(2):125
- [4] 甘志华.复方丹参液治疗奶牛隐性乳房炎试验[J].湖南农学院学报,1995(1):84-88.
- [5] 张乃峰,刁其玉,张从娥.中草药添加剂对奶牛乳房炎及生产性能的影响[J].中国奶牛,2007(2):2-3.
- [6] 丁月云.21种中药对奶牛乳房炎3种病原菌的体外试验[J].畜牧与兽医,2004,(12):5-7.
- [7] Calander A M, Joueson , Kanth M, et al. Impace of staphylococcal protease expression on the outcome of infectious arthritis[J]. *Microbes and Infectioun*. 2004, 6:202-206.
- [8] 罗庆华,卢成英,李立君,等.10种中草药的体外抑菌试验[J].中国兽医科技,2002,32(3):38-39.
- [9] 苑丽,胡功政.11种中草药对常见病原菌的体外抑菌试验[J].兽药与饲料添加剂,2001,(6):20.
- [10] 付秀花,王恬.中草药对奶牛乳房炎病原菌的体外抑菌试验[J].动物科学与动物医学,2002,19(5):16-18.
- [11] 刘富来,玛翠兰.中草药对猪大肠杆菌的体外抑菌试验[J].动物医学与动物科学,2002,19(11):23-24.
- [12] 夏稷子,丁里光.五种中草药的体外抑菌试验[J].中国微生态学杂志,1997,9(4):50-51.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Laidler kJ, Bunting PS. The chemical kinetics of enzyme action [M].2 nd ed. London Oxford University Press, 1973:342.
- [16] 赵瑛.鱼腥草等中药注射液体外抗菌活性测定方法的初步探讨[J].重庆师范学院学报:自然科学版.1998,15(1):79-82.
- [17] 刘玉庆,李晔,车程川,等.大肠杆菌对中草药敏感性试验及其方法研究[J].中兽医医药杂志.2003,(1):3-5.
- [18] 高微微,李展.中草药提取物的抑菌实验[J].中国饲料,1999,(12):12.
- [19] 李少基,陈武,陈足金.12种中药的体外抑菌试验[J].中兽医医学杂志,2004,(1):44.