

DOI:10.16515/j.cnki.32-1722/n.2018.03.019

# 野生忍冬对奶牛乳房炎病原菌体外抑菌效果研究

金兰梅, 尹 康, 任同伟, 宋组晨, 蔡洋洋, 陈 楠

(金陵科技学院动物科学与技术学院, 江苏 南京 210038)

**摘 要:** 在不同的季节采集忍冬茎、叶应用传统的中药煎煮方法提取有效成份对奶牛乳房炎病原菌进行抑菌试验。结果显示: 1) 不同季节的忍冬茎、叶对奶牛乳房炎 3 种主要病原菌均有不同程度的抑制作用, 表现为夏季 > 秋季 > 冬季 > 春季, 且叶的效果较茎好。2) 茎与叶的提取物对病原菌抑菌效果也不同, 对引起乳房炎的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和链球菌能够起到较佳的抑制效果, 对链球菌作用最强, 其次是金黄色葡萄球菌和大肠杆菌。叶的效果较茎好。由此, 忍冬茎、叶可应用于临床上奶牛乳房炎的防治。

**关键词:** 忍冬; 奶牛乳房炎; 抑菌试验

中图分类号: S858.23; S857.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-755X(2018)03-0081-04

## Antibacterial Effect of Wild Honeysuckle on Dairy Cow Mastitis Pathogen in Vitro

JIN Lan-mei, YIN Kang, REN Tong-wei, SONG Zu-chen, CAI Yang-yang, CHEN Nan

(Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, China)

**Abstract:** Stems and leaves of Honeysuckle was collected in different seasons. The active ingredient was extracted using traditional decocting method to do bacteriostatic test. The result shows that stems and leaves on Honeysuckle in different seasons have different levels of bacteriostasis to three major bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus*) of cow mastitis. Comparison of antibacterial effects of stems and leaves of *Lonicera japonica* collected in spring, summer, autumn, winter and autumn seasons, summer > autumn > winter > spring; the effect of leaf is better than that of stem. The stems and leaves of *Lonicera japonica* that cause mastitis *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* can play a better inhibitory effect. It has the strongest effect on *Streptococcus*, followed by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Which can be used for the prevention and control of dairy of cow mastitis in clinic.

**Key words:** Honeysuckle; cow mastitis; bacteriostatic test

乳房炎是奶牛的一种常见多发性疾病, 它会使患病牛奶产量和质量降低, 最终会产生废乳房, 这直接影响着奶牛养殖业的经济效益, 并且影响公共食品卫生安全。引起奶牛乳房炎的主要致病菌为金黄色葡萄球菌、链球菌和大肠埃希菌。抗生素疗法是目前国内外治疗乳房炎最常用的方法, 由于长期使用, 使其使用时限越来越短, 导致致病微生物的耐药性也逐渐增强。因此, 开发和研制新的药物来防治奶牛乳房炎已成为降低奶牛场和牛乳生产业经济损失的一个突破方向。由于中药是纯天然的, 毒性低, 不易产生抗药性, 不仅可以治标, 还可治本, 注重整体观念, 因此有效地弥补了抗生素的一些缺点<sup>[1]</sup>。忍冬科植物忍冬是

收稿日期: 2018-06-01

基金项目: 江苏省大学生实践创新训练计划项目(201713573045X)

作者简介: 金兰梅(1956—), 女, 江苏泗洪人, 教授, 主要从事动物疾病防治教学和研究工作。

我国传统药用植物,含有挥发油、有机酸、环烯醚萜苷、黄酮等多类成份,具有抗菌、抗炎、调节免疫、抗氧化等生物学活性<sup>[2]</sup>。目前,中药中普遍使用忍冬花的部分,而其茎叶作为废品,通过整形修剪会有大量丢弃,产量数倍于花。为了利用忍冬茎叶资源,并为奶牛乳房炎的治疗寻找更安全有效的药物,本试验对某奶业集团4个规模化牧场267头患乳房炎奶牛的乳样进行细菌学检测,分离出大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和链球菌,在南京幕府山上采集不同季节的野生忍冬茎和叶,采用常规的煎煮法提取有效成份对引起奶牛乳房炎的病原菌进行抑菌试验,为防治奶牛乳房炎以及野生忍冬茎和叶的开发利用提供科学理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本来源

忍冬茎、叶来源于南京幕府山上生长的野生忍冬藤、叶,每季度的中间月份10日采摘。乳样来源于某奶业集团4个规模化牧场患临床乳房炎和隐性乳房炎(DHI检测乳汁中体细胞数大于 $5 \times 10^6$  cfu · mL<sup>-1</sup>)的奶牛。

### 1.2 细菌分离培养

取乳样500 μL,接种于5 mL血清肉汤中,置37 °C培养箱中培养24 h。将血清肉汤培养物分别接种于甘露醇、麦康凯、血琼脂培养基,置37 °C培养箱中培养24 h。在不同的培养基上挑取典型菌落涂片、革兰氏染色、镜检,初步鉴定葡萄球菌、链球菌和肠杆菌。再进行纯培养后进行生化鉴定,分离鉴定得到金黄色葡萄球菌、链球菌和大肠杆菌。将分离得到的细菌接入LB培养液中,37 °C摇床150 r · min<sup>-1</sup>,震荡培养5~6 h,细菌计数,使菌液浓度为 $10^7$  cfu · mL<sup>-1</sup>,4 °C冰箱保存备用。

### 1.3 忍冬茎、叶有效成份提取

经形态学鉴定确为忍冬后,采摘、洗净、晾干、干燥后,藤、叶分开储存于广口瓶中备用。应用传统的煎煮方法提取有效成份。参照马艳妮等<sup>[2]</sup>的方法进行煎煮得到含原药1 g · mL<sup>-1</sup>的水提物,进行水提醇沉后流通灭菌后放入4 °C冰箱备用。

### 1.4 忍冬茎、叶抑菌试验

采用平板打孔法:用无菌吸管吸取 $10^7$  cfu · mL<sup>-1</sup>菌悬液20 μL移至营养琼脂培养基上,再用无菌拐棒将菌液在平板上涂布均匀,待菌液干了后,用外径为6 mm的灭菌打孔器在培养基上打孔,用滴管吸取熔化了了的营养琼脂,每孔滴入一滴,作补孔用,以免底部漏药液。琼脂凝固后吸取50 μL药液分别加入各孔内,留一孔加入无菌生理盐水作对照试验,置4 °C冰箱正放过夜使药液充分渗透。再置37 °C培养箱培养18 h后,量取抑菌圈直径作为结果。每个试验平行做3次,以平均值记录抑菌圈直径<sup>[3]</sup>。抑菌效果判定标准按《中药药理学》标准,抑菌圈直径 $\geq 20$  mm为极敏,15~20 mm为高敏,10~14 mm为中敏, $\leq 10$  mm为低敏<sup>[4]</sup>。

### 1.5 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)测定

采用试管二倍稀释法,取灭菌试管9支,在每管中各加入无菌肉汤培养基1 mL,然后往第1管中加入1 g · mL<sup>-1</sup>的药液1 mL,混匀后取出1 mL加入第2管,依次类推,直到第8管中取1 mL弃去,第9管为空白对照管。然后1~9管加入菌液0.1 mL,摇匀,置37 °C恒温箱中培养18 h。以不发生混浊变化的最低药物浓度为该药物的MIC值<sup>[5]</sup>。将所有清澈无肉眼可见细菌生长的试管中的液体接种0.1 mL于营养琼脂培养基或血琼脂培养基上,培养24 h,菌落数少于5个视为无细菌生长,以无菌落生长的最低药物浓度为该药物的MBC值<sup>[4]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌分离

从4个奶牛场267头患乳房炎奶牛的乳样中,经细菌分离培养鉴定、血浆凝固酶试验和触酶试验共得到62株金黄色葡萄球菌、45株大肠杆菌、36株链球菌。

### 2.2 忍冬茎、叶抑菌试验

分别选择有代表性的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、链球菌(1~8号为无乳链球菌,9~15号为乳房链球菌)各15株,编号1~15,做抑菌试验。结果表明,忍冬茎、叶对3种病原菌均有不同程度的抑制作用。不

同季节的忍冬茎、叶对不同种类的病原菌抑菌效果不同。不同季节的忍冬茎、叶对同种病原菌的不同菌株抑菌效果差异极显著( $p < 0.01$ ),夏季忍冬茎、叶对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和链球菌的抑菌圈均高于春、秋、冬3个季节,差异极显著( $p < 0.01$ )。

对照判定标准,夏季的忍冬叶对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和链球菌均为高敏,茎对金黄色葡萄球菌、链球菌为高敏,对大肠杆菌为中敏;春、秋、冬季节野生忍冬的茎、叶对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌为中敏。链球菌对野生忍冬的茎、叶的提取物较为敏感,抑菌效果只有春季的茎是中敏,其余均是高敏(表1);同时得知野生忍冬茎、叶对链球菌1~8号菌株(无乳链球菌)效果优于9~15号菌株(乳房链球菌)。

表1 不同季节忍冬茎、叶对病原菌的抑菌圈直径

| 季节 | mm           |              |             |              |              |             |
|----|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
|    | 大肠杆菌         |              | 金黄色葡萄球菌     |              | 链球菌          |             |
|    | 叶            | 茎            | 叶           | 茎            | 叶            | 茎           |
| 春季 | 11.8±0.67Aa  | 10±0.59A     | 12.6±0.55A  | 10.27±0.41A  | 16.13±0.69Aa | 13.8±0.55Aa |
| 夏季 | 15.73±0.88B  | 13.73±0.88B  | 16.47±0.76B | 15±0.72B     | 19.6±0.65B   | 17.3±0.73Bb |
| 秋季 | 13.67±0.87Ab | 12.07±0.78Bb | 13.73±0.67A | 12.13±0.48Bb | 17.6±0.76A   | 15.53±0.77b |
| 冬季 | 13±0.7Ac     | 10.47±0.65Aa | 13.07±0.71A | 10.87±0.73Aa | 17±0.7Ab     | 15±0.47Ab   |

注:同列的小写字母不同表示差异在0.05水平上显著;大写字母不同表示差异在0.01水平上显著,下同。

### 2.3 忍冬茎、叶最小抑菌浓度(MIC)测定

不同季节的忍冬茎、叶对3种病原菌的最小抑制浓度均值如表2所示。不同季节的忍冬茎、叶对不同种类的病原菌抑菌浓度不同,不同季节的忍冬茎、叶对同种病原菌的不同菌株抑菌浓度也不同。夏季忍冬茎、叶对链球菌的最小抑菌浓度均值分别为22.92 mg·mL<sup>-1</sup>、19.8 mg·mL<sup>-1</sup>,对金黄色葡萄球菌分别为30.21 mg·mL<sup>-1</sup>、26.04 mg·mL<sup>-1</sup>,对大肠杆菌分别为42.71 mg·mL<sup>-1</sup>、29.17 mg·mL<sup>-1</sup>。夏季忍冬茎、叶对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和链球菌的抑菌浓度均小于春、秋、冬3个季节,其中忍冬叶对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,夏季与春季比较差异极显著( $p < 0.01$ ),春季与冬季比较差异显著( $p < 0.05$ )。

表2 不同季节忍冬茎、叶对病原菌的最小抑菌浓度

| 季节 | mg·mL <sup>-1</sup> |              |              |              |             |             |
|----|---------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
|    | 大肠杆菌                |              | 金黄色葡萄球菌      |              | 链球菌         |             |
|    | 叶                   | 茎            | 叶            | 茎            | 叶           | 茎           |
| 春季 | 45.83±4.17Aa        | 62.5±7.47Aa  | 39.58±3.69Ab | 54.17±3.69A  | 25±2.05a    | 31.25±2.64a |
| 夏季 | 29.17±4.79B         | 42.71±5.16B  | 26.04±3.29B  | 30.21±3.88Bb | 19.8±1.85a  | 22.92±2.08b |
| 秋季 | 35.42±4.69B         | 44.78±4.53B  | 33.35±4.28a  | 39.58±3.69Bb | 21.88±2.05a | 25±2.05ab   |
| 冬季 | 37.5±4.26b          | 52.08±6.58Ab | 33.33±4.28a  | 47.92±7.23a  | 22.92±2.08a | 28.13±1.67a |

### 2.4 忍冬茎、叶最小杀菌浓度(MBC)测定

使用平板倾注培养法在最小抑菌浓度的基础上测定最小杀菌浓度(MBC),结果如表3所示,不同季节的忍冬茎、叶提取物对三种病原菌均有杀菌作用。不同季节的忍冬茎、叶对不同种类的病原菌杀菌效果不同,不同季节的忍冬茎、叶对同种病原菌的不同菌株杀菌效果也不同。夏季忍冬茎、叶对链球菌杀菌效果最强。不同季节的忍冬茎、叶对同种病原菌的不同菌株杀菌效果也不同,春、夏季节对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的杀菌浓度比较,差异极显著( $p < 0.01$ );春、冬季节对大肠杆菌比较差异显著( $p < 0.05$ ),对金黄色葡萄球菌叶差异显著( $p < 0.05$ ),茎没有差异性( $p > 0.05$ )。

不同季节野生忍冬茎、叶提取物对三种病原菌均有杀菌作用,对链球菌作用最强,其次是金黄色葡萄球菌和大肠杆菌。此外,最小抑菌浓度均低于最小杀菌浓度的一个浓度梯度,说明野生忍冬茎、叶抑菌效果比较稳定。

表3 不同季节忍冬茎、叶对病原菌的最小杀菌浓度

| 季节 | mg · mL <sup>-1</sup> |             |              |              |             |              |
|----|-----------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
|    | 大肠杆菌                  |             | 金黄色葡萄球菌      |              | 链球菌         |              |
|    | 叶                     | 茎           | 叶            | 茎            | 叶           | 茎            |
| 春季 | 91.67±8.33Aa          | 125±14.94Aa | 79.17±7.39Aa | 108.33±7.39A | 50±4.09a    | 62.5±5.28a   |
| 夏季 | 58.33±9.58B           | 85.42±10.3B | 52.08±6.59B  | 60.42±7.76Bb | 39.58±3.69a | 45.83±4.17b  |
| 秋季 | 70.83±9.38B           | 89.58±9.08B | 66.67±8.55a  | 79.17±7.39Bb | 43.75±4.09a | 48.96±4.54ab |
| 冬季 | 75±8.52b              | 100±13.36Ab | 66.67±8.55a  | 95.83±14.46a | 45.83±4.17a | 56.25±3.34ab |

### 3 结论与讨论

1)四个季节采摘的忍冬茎、叶提取物对奶牛乳房炎的3种主要病原菌均有抑制和杀灭作用。不同季节的忍冬茎、叶对病原菌抑制效果不同,一年四季中夏季的效果最好,抑菌作用从强到弱排序依次为:夏季>秋季>冬季>春季。茎与叶的提取物对病原菌抑菌效果也不同,叶的效果较茎好。不同种类的病原菌对忍冬茎、叶提取物敏感性不同,链球菌对其有较强的敏感性,一年四季采摘的忍冬茎、叶对链球菌,特别是无乳链球菌抑菌效果最佳,其次是金黄色葡萄球菌和大肠杆菌。说明由链球菌引起奶牛乳房炎用野生忍冬茎、叶防治,可以取得较好的效果。

2)试验中忍冬茎、叶提取物对奶牛乳房炎主要3种病原菌的抑菌圈、最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)测定结果均是叶优于茎,与李健志等<sup>[6]</sup>用忍冬藤对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和乙型溶血性链球菌的抗菌作用研究结果相似,与梅林<sup>[7]</sup>应用金银花叶片提取液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的结果(MIC分别为150 mg · mL<sup>-1</sup>和37.5 mg · mL<sup>-1</sup>)较接近。夏季忍冬茎、叶的提取物抑菌效果最好,与吴丹丹等<sup>[8]</sup>研究不同生长期忍冬叶中活性成分的动态变化及抗菌作用得出结果相似,6月份所测各种活性成分含量均较高,且抑菌效果最好。

3)本试验的细菌是从4个奶牛场267头患乳房炎奶牛的乳样中分离得到,共62株金黄色葡萄球菌、45株大肠杆菌和36株链球菌。经过常用的抗生素药敏试验后,选择多耐药的菌株应用忍冬茎、叶提取物进行抑体外菌效果试验取得较好的效果。但是单纯的体外试验并不能真实地反映中药的抑菌效果,因为在兽医临床应用中,中药发挥作用是药物、细菌和机体三者间互相作用的结果。通过本试验希望能为今后的研究提供一些参考。忍冬茎、叶具有较好的广谱抗菌性,可以将其开发为抗畜禽病原菌药物或者饲料添加剂,这也为忍冬叶资源的合理开发利用奠定了坚实的基础。

#### 参考文献:

- [1] 金兰梅,伍清林,张越,等.紫花地丁对奶牛乳房炎主要病原菌体外抑菌试验[J].金陵科技学院学报,2015,31(2):79-84
- [2] 马艳妮,王志尧,郭展展,等.忍冬叶总黄酮的测定及其体外抗菌活性[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(6):55-59
- [3] 陈芳,冯丽娟.金银花叶和花蕾提取物的抑菌活性研究[J].食品工程,2013(3):36-38
- [4] 金兰梅,伍清林,马玉,等.4种植物对大肠杆菌抑菌试验研究[J].家畜生态学报,2012,33(6):72-77
- [5] 连学昭.防治奶牛乳房炎新型中药制剂的研究[D].大庆:黑龙江八一农垦大学,2006
- [6] 李健志,刘旭红,杨丽珍,等.11种中草药抗菌作用实验研究[J].中医药信息,2009,26(3):82-83
- [7] 梅林.秀山金银花叶、茎中绿原酸的检测及其抑菌作用研究[J].药物研究,2007,16(3):5-7
- [8] 吴丹丹,王悠悠,鲁义磊,等.不同生长期忍冬叶中活性成分的动态变化及抗菌作用研究[J].化学研究,2018,29(1):30-36

(责任编辑:谭彩霞)