

杨 猛,黄亚东,伏 阳. 复方中草药肉鸡饲料添加剂的抑菌及毒理学试验[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):223-225.

复方中草药肉鸡饲料添加剂的抑菌及毒理学试验

杨 猛,黄亚东,伏 阳

(江苏食品药品职业技术学院,江苏淮安 223005)

摘要:依据单味中草药对肉鸡规模化养殖常见病原菌的抑菌效果和饲喂效果,结合中医药理论,配制出 3 剂中草药复方制剂,研究 3 剂中草药复方制剂的体外抑菌效果和毒理试验,以期为复方中草药肉鸡饲料添加剂的研制奠定安全性基础。结果表明,配制的 3 剂中草药复方制剂都有较好的抑菌和杀菌效果,并且是一种无毒副作用的纯天然绿色药物。综合抑菌试验和毒理学试验结果,复方制剂Ⅲ效果最佳。

关键词:中草药;饲料添加剂;安全性;复方制剂配方

中图分类号: S816.75 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0223-03

随着肉鸡饲养方式从散养型向规模化转变,其密度增加了 1 倍,密度的增加使发病率增加 4 倍以上。为保障肉鸡的存活率,饲料添加剂的使用量逐渐增加,为肉鸡养殖业的健康发展做出巨大贡献的同时,也衍生出不少问题。饲料添加剂含有抗生素类药物,可以提高肉鸡的存活率和产量,但鸡肉中药物残留的提高,直接危害了人类健康^[1-3]。随着人民生活水平的提高,人民的健康保健意识显著增强,消费者对鸡肉的品质和安全性等方面的要求越来越高,低脂药残少的鸡肉成为消费者的首选。基于上述需求,开发一种既能提高肉鸡存活率和产量,又能改善鸡肉品质的饲料添加剂迫在眉睫,中草药无毒副作用、无抗药性、无污染、无残留,且多为常见药物,价格低廉,优于抗生素,因而成为人们研究开发的首选对象^[4-8]。本研究在单味中草药对肉鸡养殖常见菌抑菌和饲喂研究的基础上,依据中药配伍的原理,配制 3 剂中草药复方制剂,并对其进行抑菌试验、毒理试验,筛选出效果最好的中草药复方制剂,进行饲喂试验,旨在为研制应用于实际肉鸡养殖业的复方中草药肉鸡饲料添加剂奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验试剂

根据单味中草药的抑菌效果和病原菌种类,结合中医药理论,配制出 3 剂中草药复方制剂,分别为制剂Ⅰ、制剂Ⅱ、制剂Ⅲ^[9],配方如下。

制剂Ⅰ:桂皮 40%、小茴香 30%、肉桂 10%、陈皮 10%、甘草 10%,水煎取汁;制剂Ⅱ:黄芪 40%、肉桂 30%、贯众 10%、何首乌 10%、甘草 10%,水煎取汁;制剂Ⅲ:金银花 40%、黄芪 30%、茯苓 10%、陈皮 10%、甘草 10%,水煎取汁。

其他试剂有:琼脂培养基、鲜血琼脂培养基、无菌营养肉汤、抗鸡红细胞抗体、蒸馏水、无菌生理盐水、小牛血清淋巴细胞分层液、0.8%戊二醛溶液、苏木精和伊红染色液。

1.2 试验动物

试验动物为昆明种小白鼠。

1.3 试验仪器

试验用仪器主要有:牛津杯、培养皿、TDL-40B 低速台式水平离心机、低温冰箱、电热恒温水浴箱、OLYMPUS 显微镜等。

1.4 抑菌试验方法

1.4.1 药敏性试验 采用牛津杯加注药液的体外抑菌法。将 12 cm 灭菌培养皿分成 6 个扇区。将琼脂培养基和鲜血琼脂培养基倒平板,在每个平皿内均匀加入 0.5 mL 已制备的病原菌稀释菌液。将牛津杯按顺序放入 6 个扇区中央,杯内加入 100 μ L 药液,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,观察结果,并测量抑菌直径。中草药及复方的醇提物按同样方法进行体外抑菌试验^[10]。

1.4.2 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定

根据水提物、醇提物抑菌结果,采用 10 倍稀释法及 2 倍稀释法,测定 MIC 和 MBC。(1)10 倍稀释法:用无菌营养肉汤倍比稀释药液(终体积 5 mL),使药液浓度分别为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 等 4 个梯度(同时以无菌生理盐水作空白对照,不接种菌液作阴性对照);接种病原菌稀释菌液 20 μ L,摇匀;37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。以不显示浊度、细菌未生长时的药物浓度作为 MIC,并取该管中 0.05 mL 肉汤,接种于营养琼脂平板;37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,平板上无菌落或菌落生长数 ≤ 10 的药物浓度为 MBC^[10]。(2)2 倍稀释法:根据 10 倍稀释法结果,进一步确定 MIC 和 MBC。无菌营养肉汤倍比稀释药液,浓度梯度为 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512;MIC 和 MBC 判定同 10 倍稀释法^[10]。

1.5 毒理学试验方法

1.5.1 急性毒性试验(LD₅₀的测定) 根据此前预试验结果,设 20 000、30 000、45 000、67 500 mg/kg 4 个剂量组(等比级数 1.5)和 1 个空白对照组。取 18~22 g 小白鼠,每组 10 只,雌雄各半,连续给药 7 d,每天观察小白鼠精神、食欲、饮水、活动及中毒情况,并记录小白鼠的死亡数目^[11-12]。

1.5.2 蓄积毒性试验(20 d 蓄积试验法) 取体重 15~18 g 的小白鼠,每组 10 只,雌雄各半,设 4 个剂量组和 1 个对照组,按 1 000、2 000、4 000、8 000 mg/kg 的剂量进行灌胃给药,连续给药 20 d,在给药期间观察小白鼠的精神、食欲、饮水、死亡情况和有无异常反应。给药停止后观察 7 d 内小白鼠的死亡情况及体重的变化^[11,13]。

收稿日期:2013-09-26

作者简介:杨 猛(1980—),男,江苏滨海人,硕士,讲师,主要研究方向生物药物。E-mail:spxyym80@163.com。

1.5.3 微核试验 取体重为 18~22 g 的成年小白鼠,每组 10 只,雌雄各半,设 3 个试验组,1 个阳性对照组和 1 个阴性对照组。试验组按 1%、2%、3% 的剂量将中草药饲料添加剂混入饲料中饲喂,阳性组用环磷酰胺 100 mg/kg 腹腔注射。试验组和对照组均采用 2 次染毒法,间隔时间为 24 h,于第 2 次染毒后 6 h 将各组小白鼠全部采用颈椎脱位处死法,取股骨制骨髓涂片,每个小白鼠计数 1 000 个 PCE (polychromatic erythrocytes,嗜多染红细胞),微核率以‰表示^[11]。

1.5.4 精子畸形试验 取体重 20~25 g 的雄性小白鼠,每组 10 只,设 3 个试验组、1 个阳性对照组和 1 个阴性对照组。试验组按 1%、2%、3% 的剂量将中草药饲料添加剂混入饲料中饲喂,每日染毒 1 次,连续 5 d,阳性组用环磷酰胺 50 mg/kg 腹腔注射,每日 1 次,连续 5 d。各组小白鼠于第 35 天处死,取附睾精子涂片,每只小白鼠计数 1 000 个完整精子,畸形率以‰表示^[14-15]。

1.5.5 数据统计分析 试验值以“平均数±标准差”表示,并采用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 抑菌试验结果

2.1.1 3 剂中草药复方制剂水提物对 6 种相关病原菌的抑菌直径 由表 1 看出,3 剂中草药复方制剂水提物对 6 种相

表 1 3 剂中草药复方制剂水提物对 6 种病原菌的抑菌效果的比较

中草药	病原菌的抑菌直径(mm)					
	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌	副嗜血杆菌	巴氏杆菌	大肠杆菌	化脓棒状杆菌
制剂 I	28.20	20.85	15.60	14.40	14.10	11.10
制剂 II	22.60	17.90	17.10	16.90	11.90	10.10
制剂 III	29.10	21.15	18.85	18.30	14.80	11.40

关病原菌的抑菌效果存在一定差异,但不是很明显。

2.1.2 中草药复方制剂水提物对 6 种病原菌的 MIC 和 MBC

由表 1、表 2 数据可知,3 剂中草药复方制剂都有较好的抑菌和杀菌效果,并且复方制剂抑菌和杀菌效果均优于单味中草药(单株中草药试验结果未在此处列出,为笔者前期研究结果),综合考虑对 6 种菌的抑菌和杀菌效果,制剂 III 优于制剂 I、制剂 II。

2.2 毒理学试验结果

2.2.1 急性毒性试验 观察 7 d 发现,小白鼠的食欲、精神、饮水等情况与对照组相比均无异常。小白鼠在灌服 67 500 mg/kg 中草药饲料添加剂后,没有出现中毒死亡。按毒理学评价标准,无需测定半数致死量(LD₅₀),即 LD₅₀>67 500 mg/kg。急性毒性结果表明,中草药饲料添加剂是无毒类物质。

表 2 3 剂中草药复方制剂的水浸提物对 6 种病原菌的 MIC 和 MBC

中草药	浓度(mg/mL)											
	金黄色葡萄球菌		沙门氏菌		副嗜血杆菌		巴氏杆菌		大肠杆菌		化脓棒状杆菌	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
制剂 I	0.50	0.70	0.60	0.80	0.70	0.90	0.80	1.00	0.90	1.10	0.95	1.15
制剂 II	0.60	0.80	0.65	0.85	0.60	0.80	0.70	0.90	1.00	1.15	1.05	1.25
制剂 III	0.45	0.65	0.55	0.72	0.60	0.80	0.65	0.83	0.80	1.00	0.90	1.10

2.2.2 蓄积毒性试验 3 剂中草药饲料添加剂在不同给药量下对小白鼠饲料消耗量和体重变化的影响见表 3、表 4、表 5。给药 20 d 后,不同剂量组小白鼠的食欲、精神、饮水等均未出现异常表现,也未出现死亡,停止给药 7 d 后,小白鼠仍未出现死亡;由表 3、表 4、表 5 可知,给药 20 d 后,不同剂量组

小白鼠的平均体重与对照组差异均不显著。

2.2.3 微核试验 由微核试验结果(表 6)可知,各试验组小白鼠与阴性组小白鼠相比差异均不显著;各试验组之间差异也均不显著;各试验组与阳性对照组相比差异极显著($P<0.01$)。

表 3 灌胃制剂 I 的小白鼠蓄积毒性试验

给药剂量 (mg/kg)	始质量 (g)	末质量 (g)	平均增质量 (g)	耗料 (g/只)
1 000	16.14±1.20a	29.36±1.27a	13.22±2.28a	41.2
2 000	16.16±1.32a	29.16±1.30a	13.00±2.12a	41.5
4 000	16.38±1.42a	28.96±1.29a	12.58±2.16a	41.6
8 000	16.36±1.26a	28.89±1.26a	12.53±2.10a	41.8
空白对照组	16.28±1.36a	29.42±1.33a	13.14±2.17a	41.3

表 4 灌胃制剂 II 的小白鼠蓄积毒性试验

给药剂量 (mg/kg)	始质量 (g)	末质量 (g)	平均增质量 (g)	耗料 (g/只)
1 000	16.22±1.23a	29.48±1.27a	13.26±2.23a	41.3
2 000	16.19±1.29a	29.18±1.30a	12.99±2.18a	41.6
4 000	16.18±1.32a	28.86±1.29a	12.68±2.13a	41.8
8 000	16.26±1.16a	28.93±1.26a	12.67±2.20a	41.9
空白对照组	16.28±1.36a	29.42±1.33a	13.14±2.17a	41.3

表 5 灌胃制剂Ⅲ的小白鼠蓄积毒性试验

给药剂量 (mg/kg)	始质量 (g)	末质量 (g)	平均增质量 (g)	耗料 (g/只)
1 000	16.10 ± 1.21a	29.42 ± 1.27a	13.32 ± 2.23a	41.0
2 000	16.12 ± 1.27a	29.24 ± 1.30a	13.12 ± 2.15a	40.4
4 000	16.32 ± 1.33a	29.06 ± 1.29a	12.74 ± 2.06a	41.6
8 000	16.35 ± 1.31a	29.12 ± 1.26a	12.77 ± 2.13a	41.7
空白对照组	16.28 ± 1.36a	29.42 ± 1.33a	13.14 ± 2.17a	41.3

表 6 饲喂制剂的小白鼠微核试验结果

组别	剂量 (mg/kg)	微核率(‰)		
		制剂Ⅰ	制剂Ⅱ	制剂Ⅲ
1% 试验组	300	1.9	2.0	1.8
2% 试验组	600	2.1	2.2	2.0
3% 试验组	900	2.9	2.8	2.6
阴性组	0	1.7	1.7	1.7
阳性组	100	26.6 **	26.6 **	26.6 **

注：“**”表示差异极显著($P<0.01$)。下同。

2.2.4 精子畸形试验 各组小鼠精子的畸形率结果见表 7 至表 9。由表 7 至表 9 可知,各试验组精子畸形率与阴性组相比差异不显著;各试验组之间差异也均不显著;各试验组精子的畸形率与阳性对照组相比差异极显著($P<0.01$)。

表 7 饲喂制剂Ⅰ的小白鼠精子畸形试验结果

组别	剂量 (mg/kg)	精子数 (个)	畸形精子数 (个)	畸形率 (‰)
1% 试验组	300	1 000	19	19
2% 试验组	600	1 000	21	21
3% 试验组	900	1 000	23	23
阴性组	0	1 000	18	18
阳性组	100	1 000	72	72 **

表 8 饲喂制剂Ⅱ的小白鼠精子畸形试验结果

组别	剂量 (mg/kg)	精子数 (个)	畸形精子数 (个)	畸形率 (‰)
1% 试验组	300	1 000	20	20
2% 试验组	600	1 000	22	22
3% 试验组	900	1 000	24	24
阴性组	0	1 000	18	18
阳性组	100	1 000	72	72 **

表 9 饲喂制剂Ⅲ的小白鼠精子畸形试验结果

组别	剂量 (mg/kg)	精子数 (个)	畸形精子数 (个)	畸形率 (‰)
1% 试验组	300	1 000	18	18
2% 试验组	600	1 000	20	20
3% 试验组	900	1 000	21	21
阴性组	0	1 000	18	18
阳性组	100	1 000	72	72 **

3 结论

3 剂中草药复方制剂都有较好的抑菌和杀菌效果,并且复方制剂抑菌和杀菌效果均优于单味中草药,综合考虑对 6 种菌的抑菌和杀菌效果,制剂Ⅲ优于制剂Ⅰ、制剂Ⅱ。
急性毒理学试验、蓄积毒性试验、微核试验和精子畸形试验的试验结果显示,复方中草药饲料添加剂是一种无毒副作用的纯天然的绿色药物。

参考文献:

[1]尹绪贵. 当前养殖业中抗生素的应用情况[J]. 兽医导刊,2013 (2):44-45.
[2]刘世刚,丁景华. 饲料中添加金霉素和喹乙醇使用现状的分析[J]. 现代畜牧兽医,2012(11):41-42.
[3]林云. 饲料抗生素的应用及面临的问题[J]. 饲料研究,2001 (4):25-26.
[4]李喆,郑家明,张勇,等. 复合中草药饲料添加剂改善蛋鸡蛋品质的试验研究[J]. 中国畜牧杂志,2011,47(16):59-61.
[5]吴汉东. 中草药添加剂对蛋鸡生产性能及蛋品质的影响[J]. 饲料研究,2013(3):80-82.
[6]王改琴,王恬. 中草药饲料添加剂的功能及其在蛋鸡生产中的应用[J]. 饲料博览,2010(10):37-39.
[7]彭玉麟,参木有. 中草药饲料添加剂开发中存在的问题及对策[J]. 中国饲料,2001(8):31-33.
[8]马玉敏. 中草药饲料添加剂研究综述[J]. 乳业科学与技术, 2001,24(1):22-24.
[9]黄亚东,孔庆新,王仁雷,等. 复方中草药治疗奶牛隐性乳腺炎试验[J]. 中国乳品工业,2007,35(8):39-41.
[10]黄亚东,王仁雷,孔庆新,等. 奶牛乳腺炎病原菌的中草药体外抑菌试验[J]. 中国乳品工业,2005,33(11):27-29.
[11]杨猛,王仁雷,黄亚东. 中草药饲料添加剂对小白鼠的毒理作用[J]. 江苏农业科学,2010(2):227-228.
[12]关立增,鞠玉琳. “壮阳促孕散”的急性毒性与蓄积毒性试验研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2005(2):68-68.
[13]潘玉善,苑丽,胡功政,等. 肉鸡大肠杆菌产超广谱β-内酰胺酶的检测与药敏分析[J]. 江苏农业科学,2010(2):225-227.
[14]黄亚东,杨猛,王仁雷. 中草药饲料添加剂对小白鼠的特殊致变作用的影响[J]. 中国乳品工业,2009,37(12):19-20.
[15]沈建忠. 动物毒理学[M]. 北京:中国农业出版社,2002:227-234.