



饲用微生物制剂枯草芽孢杆菌计数检测方法的探讨

孙笑非¹ 孙冬岩^{1,2} 潘宝海^{1,2} 王文娟¹

1. 北京都润科技有限公司
2. 国家饲料工程技术研究中心

在当前集约化养殖条件下,动物大多处于高度应激状态,肠道菌群容易紊乱,对食品安全和绿色环保的强烈诉求使国家加强了对于饲料行业安全的监管力度,各大中型饲料企业也在试图找寻能够替代抗生素的安全绿色产品。微生物制剂有助于维持肠道免疫屏障的完整并协助动物抵抗病原微生物的入侵,降低免疫营养的消耗,越来越多地应用到饲料中。其中枯草芽孢杆菌由于其具备生物夺氧和营养等功能,且芽孢耐受性强,受到重视。

目前市场上微生物制剂产品参差不齐,有些微生物制剂产品存在菌种和主要成分标示不清且检测结果不确定等现象,难以进行质量监督和检验。产品中枯草芽孢杆菌含菌量作为评定产品质量的重要指标,其检测方法的准确性关乎饲料产品的质量和效果。现在,关于饲料微生物制剂中枯草芽孢杆菌的计数检测,有中华人民共和国国标 GB/T 26428 - 2010 作为参考。但在实际检测过程中,常常会遇到不同的厂家和人员检测结果存在较大差异的情况,如何选择合适的方法进行枯草芽孢杆菌的计数,文章针对此问题,结合检测室的实际情况,对几种检测方法进行比对,以期寻求更加快速准确的检测方法,对饲料厂菌含量检测方法的选择具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料和器材

超净工作台: 工作台放置于清洁且光线充足的地方,普通营养琼脂平板在工作台上暴露 30 min,每平板不得超过 3 个菌落。

恒温培养箱 (36 ± 1) °C、高压灭菌锅、均质

器、摇床、磁力搅拌器、天平(感量 0.1 g)、显微镜、平皿、250 mL 三角烧瓶、10 mL 无菌吸管、无菌试管和涂布棒。

试剂: 营养琼脂和革兰染色剂等。

菌种: 市售枯草芽孢杆菌样品 3 个,标示含菌量分别为 A: 20、B: 100 和 C: 2 000 亿 CFU/g。

1.2 试验方法

1.2.1 国标法 (GB/T 26428 - 2010)

以无菌操作称取 10.0 g 试样,加入 90 mL 0.85 % 灭菌氯化钠注射液,均质 1~2 min,制成 1:10 初始悬浮液,吸取 1 mL 1:10 初始悬浮液,加入 9 mL 0.85 % 灭菌氯化钠注射液,经充分混匀后制成 1:100 的稀释液,根据样品含菌量,做进一步的 10 倍系列递增稀释。

1.2.2 摇床法

精确称取 10.0 g 试样,加入已灭菌的 250 mL 锥形瓶(带约 100 个玻璃珠)中,加入 30 mL 灭菌氯化钠注射液,在摇床上 200 r/min 摇动 20 min,再加入 65 mL 灭菌氯化钠注射液,在摇床上 200 r/min 摇动 5 min,即成母液的菌悬液。

1.2.3 磁力搅拌法

称取 10.0 g 试样,放入含有 90 mL 灭菌氯化钠注射液的 250 mL 玻璃三角瓶中,置于振荡器上(震荡物料充分翻滚),振荡 45 min,即为 1:10 的稀释液。

每个样品的每个稀释度做 3 个平行,倒置于培养箱中,37 °C 培养 24~48 h。

1.3 计数

经培养适当时间后,取出平皿,计数平板上出现的菌落(每平皿上含 30~300 个菌落数为有效计数板)。按下述公式计算样品含活菌数:

原样品液含活菌数 = (同一稀释度的菌落平均数 + 对照平板菌落) × 稀释倍数

收稿日期: 2012 - 09 - 11

1.4 形态观察

肉眼观察菌落形态，并挑取特征菌落做革兰染色镜检。

2 结果与分析

针对 3 种市售枯草芽孢杆菌的含菌量进行测定，由其平板上的菌落形态和挑取特征菌落进行的显微形态观察表明：3 种产品均为含有枯草芽孢杆菌的单一菌种产品，结果见表 1。

表 1 不同样品的菌落形态和显微形态观察

样品	外观	显微形态	形态描述
样品 A	黄色，粉状	短椭圆形芽孢状 (0.7~0.8) μm × (2~3) μm	菌落表面干燥形状不规则， 上面有伞状的皱褶，直径 3 ~5 mm，革兰阳性。
样品 B	浅黄色，粉状	短椭圆形芽孢状 (0.7~0.8) μm × (2~3) μm	菌落表面干燥形状不规则，有 皱褶但较小，直径 2~3 mm， 革兰阳性。
样品 C	褐色，粉末状	椭圆形芽孢状 (0.7~0.8) μm × (2~3) μm	菌落表面干燥形状不规则， 上有皱褶，直径 2~4 mm， 革兰阳性。

同一产品但不同方法下测定芽孢杆菌的含量结果不一致，见表 2。

从表 2 可见：样品 A 标示含量为 20 亿 CFU/g，摇床法和磁力搅拌方法测得的结果均达到或超过标示含量，国标法仅为标示含量的 55 %；样品 B 标示含量为 100 亿 CFU/g，摇床法与标示含量相同，磁力搅拌测定值在误差范围（10 %）内，国标法是标示的 82 %；样品 C 标示 2 000 亿 CFU/g，国标法是标示含量的 48 %。

表 2 不同方法下检测的样品含菌量 CFU/g

样品	试验方法	含菌量
样品 A	国标法	11 亿
	摇床法	23 亿
	磁力搅拌法	21 亿
样品 B	国标法	82 亿
	摇床法	100 亿
	磁力搅拌法	98 亿
样品 C	国标法	970 亿
	摇床法	2 500 亿
	磁力搅拌法	2 100 亿

从表 2 可见：用国标法测定的 3 种产品，芽孢杆菌检测的含量明显低于标示含量及其他检测方法。可能是由于前处理方法的不同造成的，国标方法预处理采用均质机，且均质时间仅 1~2 min，未能使菌体全部分散到溶液中。另外，不同样品间差异较大，可能是由于产品含量不同和生产工艺不同。高含菌量产品的生产工艺一般为将菌体发酵液

喷雾干燥成菌粉，而后根据菌粉质量浓度混合相应比例的载体后得到高含菌量成品；而低含菌量的产品一般采用发酵液混合载体后再干燥的方法得到成品。由于干燥工序可以将菌种固定到载体上，相对而言，高含菌量的产品更容易通过前处理，解离到溶液中从而方便含菌量的检测。

从表 2 可见：摇床法和磁力搅拌法检测的样品含菌量差别不大，但磁力搅拌法测定值一般比摇床法低约 10 %，这可能是磁力搅拌的力度较摇床法小，菌体未能充分分散造成的。

3 讨论

试验用国标法、摇床法和磁力搅拌法，针对市售 3 种枯草芽孢杆菌制剂进行检测，通过显微镜染色和菌落形态观察发现，均符合枯草芽孢杆菌菌种特性，但不同的方法测定的枯草芽孢杆菌数量差异显著，以国标法前处理时间最短但测定值最低，明显偏离样品中实际含量；摇床法前处理相对复杂，测定值最高；磁力搅拌法与标示含量差异最小。试验结果表明：不同的前处理对结果影响显著，相对于以摇床法和均质器进行样品前处理，磁力搅拌方法相对简单且结果更接近于标示含量。

一些厂家的微生态产品的标示值与实际含量不符。国外产品也有类似的问题，如南非的 Elliot 和 Tever-sham (2004) 评价了 9 个从美国和欧洲进口的益生菌产品，结果发现仅有九分之五产品的标示值与实测值相符，九分之三的产品标示的菌种与实际相符。排除了产品质量问题后，产品检测方法的选择也是至关重要。不同产品应根据其产品生产工艺和菌种特性进行检测，结合实验室实际选取最有效的方法。

现在，作为微生态制剂品质控制的手段，菌含量检测方法的选择至关重要。微生态产品菌含量检测方法一般采用平板计数法。其他的检测方法有血球平板显微镜镜检法和分子生物学的方法，其中，显微镜检测速度快，但不精确，且无法区分活菌与死菌。近些年，生物学方法发展较快，有些快速测定微生物菌数的方法，如：ATP 法（生物化学发光检测方法）、免疫法和显色培养基法等，受到仪器设备和检测条件的限制，还没有普及，可能是今后微生物定量检测的方向。

通信地址：北京市海淀区中关村南大街 12 号
中国农科院饲料研究所科研辅助楼
505 室 100081