

王改玲, 宋云杰, 高竞铎, 等. 畜牧业中 4 种常用有益菌浓度与吸光度的关系[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(7): 274–276.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.079

畜牧业中 4 种常用有益菌浓度与吸光度的关系

王改玲, 宋云杰, 高竞铎, 金宣讲, 王明成

(黄淮学院生物工程系, 河南驻马店 463000)

摘要:为探索一种简单、准确、实用的活菌计数方法, 通过分光光度计和平板计数法测定地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌 4 种菌的菌液吸光度和菌液浓度, 并建立两者的线性相关关系。将 4 种菌接种于营养肉汤培养基中, 培养 18 h, 每 1 h 取样 1 次, 每个样品设 3 个平行。采用分光光度计($\lambda = 600 \text{ nm}$)测定菌液吸光度(D 值), 同时采用 10 倍系列稀释法测定平皿菌落个数(CFU)。建立地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌指数期 CFU(y)与 D 值(x)的回归方程, 分别为 $y = 31.89x + 0.561$, $y = 17.71x - 0.507$, $y = 18.09x - 0.708$, $y = 15.12x - 0.270$ 。4 种菌稳定期的菌液浓度分别约为 54×10^8 、 29×10^8 、 30×10^8 、 25×10^8 CFU/mL。

关键词:分光光度计法; 有益菌; 活菌数; 吸光度; 回归方程

中图分类号: S816.73 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0274-02

微生态制剂(microecologics)即动物食入后在消化道中生长、发育或繁殖的活体微生物饲料添加剂, 具有增强免疫、提高营养的作用, 主要包括植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、乳酸菌、肠球菌、酵母菌等。微生态制剂具有防治消化道疾病、降低幼畜死亡率、提高饲料利用率、促进动物生长等作用, 并具有无毒副作用、无残留、不产生抗性等优点, 可作为安全性较好的饲料添加剂^[1]。由于微生物个体较小, 测量微生物生长应测量群体的增加量而不是细胞个体大小^[2], 从而导致其添加量不易控制。在生产应用中, 因添加量过多导致动物患病、添加量不足导致效果不佳的现象时有发生, 影响了养殖业使用微生态制剂的积极性。

本研究探索一种实用方法来判断微生物各阶段的数量, 建立快速、简单、准确的细菌浓度测定方法, 以便养殖场合理使用微生态制剂。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)购自国家菌种保藏中心, 编号为 29212。屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)均由河南省发酵工程实验教学示范中心分离, 由南京市金斯瑞生物科技有限公司测序鉴定。

1.2 试验方法

1.2.1 种子液的培养 将地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、屎肠球菌、粪肠球菌 4 种菌的单个菌落接种于装有 5 mL 营养肉汤的试管中, 置于 HWS-250 型培养箱, 于 37 °C 下恒温培养 18 h。

1.2.2 菌液 D 值的测定 分别将 2 mL 地衣芽孢杆菌、枯草

芽孢杆菌、屎肠球菌、粪肠球菌培养所得种子液接种于 98 mL 营养肉汤中, 摇匀后置于 37 °C 下恒温振荡培养 18 h。采用 721G 型可见分光光度计($\lambda = 600 \text{ nm}$)测定 4 种菌液的 D 值, 每 1 h 测定 1 次。

1.2.3 平皿菌落个数的测定 采用平板计数法测定平皿菌落个数。无菌操作取 1 mL 菌液加入装有 9 mL 已灭菌生理盐水的试管中, 混匀后再取 1 mL 加入下一支试管中, 重复以上操作将菌液稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、……、 10^{-9} 不同的稀释度。采用移液枪取 200 μL 菌液涂布于平板, 每个稀释度涂布 3 个平板作为平行对照。置于 37 °C 下恒温静置培养 12 h 后, 采用菌落计数法进行计数。

1.2.4 菌液浓度与吸光度关系的建立 以菌落浓度为纵坐标、 D 值为横坐标建立 4 种菌生长曲线, 并采用 Excel 2007 软件计算生成趋势线, 获得回归方程及其相关系数^[3]。

2 结果与分析

2.1 生长周期的测定

测定地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、屎肠球菌、粪肠球菌 18 h 内的 D 值, 利用 Excel 2007 软件绘制细菌的生长趋势曲线(图 1)。

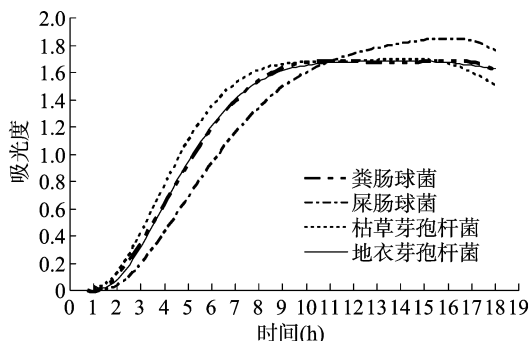


图1 4种菌的生长趋势曲线

由测得的 D 值并结合图 1 可得出以营养肉汤为培养基, 于 pH 值 7.2、温度 37 °C 条件下生长时, 细菌延滞期(lag

收稿日期: 2016-01-07

基金项目: 黄淮学院引进人才科研启动资金。

作者简介: 王改玲(1976—), 女, 陕西富平人, 博士, 讲师, 主要从事动物微生物与免疫研究。Tel: (0396) 2853880; E-mail: wgl939@126.com。

phase)、指数期(exponential phase)、稳定期(slationary phase)、 衰亡期(decline phase)时间与 D 值的关系(表 1)。

表 1 细菌各时期与时间的关系及各时期的 D 值范围

菌种	延滞期		指数期		稳定期		衰亡期	
	时间(h)	D 值	时间(h)	D 值	时间(h)	D 值	时间(h)	D 值
地衣芽孢杆菌	0~2	0.000~0.097	2~12	0.097~1.680	12~15	1.680~1.700	>15	>1.7
枯草芽孢杆菌	0~2	0.000~0.155	2~12	0.155~1.671	12~16	1.671~1.700	>16	>1.7
粪肠球菌	0~2	0.000~0.077	2~12	0.077~1.679	12~15	1.679~1.700	>15	>1.7
屎肠球菌	0~2	0.000~0.055	2~10	0.055~1.652	10~15	1.652~1.700	>15	>1.7

2.2 4 种菌指数期浓度与 D 值的关系

采用 Excel 2007 软件处理分析地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、屎肠球菌、粪肠球菌 4 种菌液指数期 D 值与活菌数的线性回归方程及相关性系数,绘制 4 种菌的活菌数与 D 值之间的线性关系。由图 2 可知,4 种菌的 CFU 与相应 D 值线性相关。

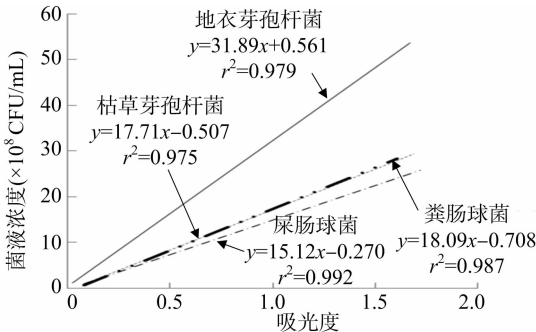


图2 4种菌的 D 值与菌液浓度的关系

由于细菌达到稳定期时活菌数基本保持不变,对稳定期的菌液进行抽检。经实际测定,稳定期的活菌数基本符合指数期活菌数的计算公式(表 2)。

表 2 4 种菌的指数期菌液浓度计算公式及稳定期活菌数

菌种	菌液浓度计算公式	稳定期活菌数 ($\times 10^8$ CFU/mL)
地衣芽孢杆菌	$y = 31.89x + 0.561 (r = 0.989)$	54.1~54.8
枯草芽孢杆菌	$y = 17.71x - 0.507 (r = 0.987)$	29.7~30.0
粪肠球菌	$y = 18.09x - 0.708 (r = 0.993)$	29.1~29.6
屎肠球菌	$y = 15.12x - 0.270 (r = 0.995)$	24.7~25.4

注: x 为 D 值, r 为指数期活菌数计算公式的相关系数。

3 结论与讨论

3.1 有益菌添加量的重要性

地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、屎肠球菌、粪肠球菌 4 种有益菌在生长过程中消耗畜禽胃肠道内的氧气,造成厌氧环境,促进有益菌群的繁殖;同时增加肠道内酸度,抑制病原菌(沙门氏菌、志贺氏菌、假单胞菌)生长,减少机体内条件致病菌的危害。另外,4 种有益菌在生长过程中产生多种营养物质和消化酶,为机体提供营养物质,改善动物消化道微生态平衡,修复强化肠道黏膜;降低血液和肠道中氨的浓度,并减少向体外生态环境的排泄量,改善饲养环境及生态环境^[4~8]。

目前,很多规模化养殖场已开始自己生产微生态制剂,但微生态制剂中每种菌的添加量均有一定标准,添加量过多或过少对动物具有极大影响。粪肠球菌添加量过多可能导致动物肠道内菌群的失衡,甚至导致动物死亡;添加量少则使产品的功能无法达到预期效果,从而影响了微生态制剂在畜牧

业生产中的推广。

3.2 菌液中活菌数与吸光度的线性关系

微生物在发酵过程中,指数期菌液的吸光度与细菌数表现为极显著的线性相关关系^[9],在本试验也可得到验证。由图 2 可知,在以营养肉汤为培养基的菌液中,地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、屎肠球菌、粪肠球菌 4 种菌的活菌数(y)与吸光度(x)的线性回归方程分别为 $y = 31.89x + 0.561 (r = 0.989)$ 、 $y = 17.71x - 0.507 (r = 0.987)$ 、 $y = 18.09x - 0.708 (r = 0.993)$ 、 $y = 15.12x - 0.270 (r = 0.995)$ 。4 种菌的相关系数 $r > 0.874$,表明以营养肉汤为培养基的 4 种菌液中,活菌数与吸光度的相关性极显著,两者间呈极显著的线性相关关系。可见,4 种菌处于指数期的菌液活菌数可用相应的吸光度来评定。

3.3 分光光度计法的应用

生产过程中使用的有益菌多数处于稳定期和指数期。在特定培养条件下,处于稳定期的活菌数是相对恒定的(表 2)。在实际生产过程中测量菌液浓度时,可通过分光光度计测量菌液的 D 值,再利用线性关系(表 2)计算菌液中的活菌数,从而准确、便捷地判断菌液中的活菌数。

3.4 本方法与传统方法的比较

在微生态制剂中,益生菌的添加量是至关重要的因素,因此菌液中活菌数的测定显得尤为重要。目前常用的细菌计数法主要有显微镜直接计数法、平板计数法、细菌计数仪法等。

显微镜直接计数操作繁琐,且包含死菌数,对试验人员的技术操作要求高,在生产中应用较少。平板计数法和细菌计数仪法对操作人员的技术水平要求较高,检测工作量大、周期长、成本高,在生产中不便于推广。

本试验采用的分光光度计法以平板计数法为基础,借助分光光度计测定菌液的 D 值,达到及时掌握菌液中活菌数(实时定量)的目的。本方法采用的 721G 型分光光度计造价低、操作简单、准确快捷,易于在畜牧业生产中推广使用。今后养殖场制作微生态制剂时,可通过 D 值确定菌液中的活菌数。

参考文献:

[1]李 杰,盖土其,刘志国. 微生态制剂及其发展前景[J]. 山东畜牧兽医,2006(5):50-53.
[2]杨柳燕,肖 琳. 环境微生物技术[M]. 北京:科学出版社,2003:36-37.
[3]高允彦. 正交及回归试验设计方法[M]. 北京:冶金工业出版社,1991.
[4]刘光辉. anpu01 屎肠球菌对肉鸡生产性能和免疫效果的影响[J]. 山东畜牧兽医,2013,34(4):14.
[5]杨晋青,梁全忠,罗惠娣,等. 日粮添加粪链球菌对山羊增质量速度的影响[J]. 山西农业科学,2012,40(6):675-676,681.

尹柏双,王秋竹,付连军,等. 隐性乳房炎奶牛乳清中部分酶活性变化[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):276-277.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.080

隐性乳房炎奶牛乳清中部分酶活性变化

尹柏双^{1,2}, 王秋竹¹, 付连军¹, 郝景锋¹, 沙万里¹, 王 奔¹

(1. 吉林农业科技学院动物科技学院, 吉林吉林 132101; 2. 长白山动植物资源利用与保护吉林省高校重点实验室, 吉林吉林 132101)

摘要:选取 18 头患不同程度隐性乳房炎奶牛和 6 头健康奶牛为试验动物,采集乳汁,分离乳清,利用比色法检测乳清中 LDH、NAG 活性,研究奶牛隐性乳房炎发病与乳清中 LDH、NAG 活性的关系。结果表明,随着隐性乳房炎病情加重,乳清中 LDH、NAG 活性呈升高的趋势。乳清中 LDH、NAG 活性与奶牛隐性乳房炎发病严重程度呈正相关性,随着体细胞数增加和乳腺炎症的加剧,乳清中 LDH、NAG 活性随之升高。

关键词:奶牛;隐性乳房炎;乳清;乳酸脱氢酶

中图分类号: S858.23 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0276-02

奶牛乳房炎是危害奶牛养殖业最严重的疾病之一,其中隐性乳房炎发生率最高。隐性乳房炎可引起泌乳奶牛产奶量下降、牛奶品质降低、养殖成本增加、产后发情延长、妊娠时间推迟,给奶牛养殖业带来巨大经济损失^[1]。乳酸脱氢酶(LDH)和 *N*-乙酰基- β -*D*-氨基葡萄糖苷酶(NAG)广泛存在于动物组织及体液中,白细胞和乳腺上皮细胞损伤会引起乳中 LDH 活性改变^[2],炎症时白细胞释放 NAG,病原菌破坏乳腺组织也可使 NAG 释放^[3]。研究表明,奶牛乳房炎发病时引起乳汁体细胞数(SCC)增加,SCC 作为监测奶牛乳房炎发病情况的可靠指标^[4],奶牛隐性乳房炎发病与乳中 LDH、NAG 酶活性相关,乳中 SCC 变化与乳酶活性呈正相关^[5-6]。本研究探讨不同发病阶段的奶牛隐性乳房炎与乳汁中 LDH、NAG 酶活性的关系,旨在为该病的临床诊断提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

乳汁体细胞计数监测后选择年龄、胎次、产奶量、泌乳期等指标相近的 6 头健康奶牛和 18 头患不同程度奶牛隐性乳房炎奶牛,由吉林市某奶牛场提供。

1.2 主要试剂与仪器

收稿日期:2015-05-17

基金项目:吉林省科技厅重点科技攻关项目(编号:20130206040NY);吉林省教育厅“十二五”科学技术项目(编号:吉教科合字 2013339);吉林市科技局杰出青年培育专项(编号:2013625019);吉林农业科技学院重点学科培育项目(编号:吉农科合字 2013X021)。

作者简介:尹柏双(1978—),男,黑龙江哈尔滨人,博士,副教授,从事奶牛乳腺疾病研究。E-mail:ybs3421@126.com。

LDH 检测试剂盒、NAG 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);Fossmatic 5000 体细胞计数仪(丹麦 FOSS 公司);Varioskan 酶标仪(美国 Thermo 公司);离心机(美国 Sigma 公司)。

1.3 试验动物分组

乳汁体细胞计数监测后将试验奶牛分成健康对照组(6 头, $SCC \leq 10 \times 10^4$ 个/mL)、轻度隐性乳房炎组(6 头, 50×10^4 个/mL $< SCC \leq 150 \times 10^4$ 个/mL)、中度隐性乳房炎组(6 头, 150×10^4 个/mL $< SCC \leq 500 \times 10^4$ 个/mL)、重度隐性乳房炎组(6 头, $SCC > 500 \times 10^4$ 个/mL)。

1.4 乳样采集

采集试验奶牛的乳汁,采样前对乳区进行清洗,用 75% 乙醇消毒乳区,弃掉头 3 把乳汁,分别采乳 10 mL 装入无菌试管中,将乳样放入冰盒中,带回实验室检测。

1.5 乳清制备

将采集的乳样 3 000 r/min 离心 5 min,除去上层乳脂,于 16 000 r/min 高速离心机中离心 10 min,去除沉淀,保留上清,4 ℃ 保存,待测。

1.6 检测方法

采用体细胞计数仪测定乳汁体细胞数,采用 LDH 试剂盒测定 LDH 活性,采用 NAG 试剂盒测定 NAG 活性,在酶标仪上 440 nm 处比色测定 *D* 值,根据试剂盒说明书计算酶活性。

1.7 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析,结果以“平均值 \pm 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 奶牛乳清中 LDH 活性变化

如表 1 所示,患轻度奶牛隐性乳房炎奶牛乳清中 LDH 活

[6] Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(4): 655-671.

[7] Kim Y, Cho J Y, Kuk J H, et al. Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by Bacillus licheniformis isolated from fermented soybean, Chungkook - Jang [J]. Current

Microbiology, 2004, 48(4): 312-317.

[8] Cavazzoni V. Adami and castrovilli performance of broiler chickens supplemented with bacillus coagulans as probiotic [J]. Br Poultry Sci, 1998, 39: 526-529.

[9] 严佩峰, 张孔海, 李建芳. 乳酸菌培养液中活菌数与吸光度的关系研究[J]. 信阳农业高等专科学校学报, 2012, 22(1): 110-112.