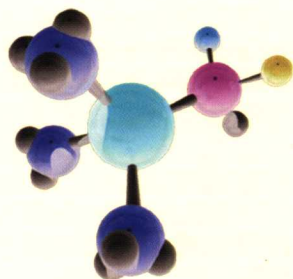
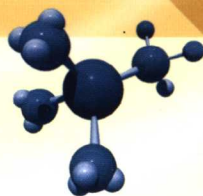


饶正华 编著

饲料微生物学

检测技术

*Siliao Weishengwuxue
Jiance Jishu*



 中国农业出版社

饲料微生物学检测技术

饶正华 编著

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

饲料微生物学检测技术 / 饶正华编著. —北京: 中国农业出版社, 2006. 3

ISBN 7-109-10708-6

I. 饲... II. 饶... III. 饲料—微生物学—检测
IV. S816.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 006243 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人: 傅玉祥

责任编辑 王华勇 张竞宇

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2006 年 3 月第 1 版 2006 年 3 月北京第 1 次印刷

开本: 850mm×1168mm 1/32 印张: 7.375

字数: 185 千字 印数: 1~1 000 册

定价: 28.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

序 言

随着人们对饲料安全的重视和生物饲料的普及，在饲料的微生物学检测上，一方面需要对饲料中更多种类的病原菌如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、弯曲杆菌、产气荚膜梭菌等进行检测，另一方面，也应对生物饲料中所用的一些有益菌如乳酸菌、地衣芽孢杆菌、酿酒酵母等进行检测，以利于质量控制和生产检验。但目前我国的国家标准中只规定了沙门氏菌、细菌总数、霉菌总数、大肠菌群这四项的检测方法，与我国饲料的发展相对滞后。

本书内容共分四章。第一章“饲料中的微生物”简要介绍了微生物的基本概念、命名、分类以及饲料中微生物的种群和类别。第二章“饲料微生物的检测要求”提出了建立微生物室的要求、对检测人员的要求、玻璃器皿的洗涤要求、灭菌与消毒要求以及微生物实验室常用仪器的维护与保养规定。第三章“微生物基本操作技术”，从无菌技术、培养基的配制、微生物计数技术、菌种保藏技术、微生物的分离与纯化技术、微生物接种技术、微生物的培养技术、制片技术、染色技术、制平板技术、微生物鉴定的生化方法、免疫学技术等多个方面详细讲述了微生物检测的操作技术。第四章“饲料中污染微生物的检测方法”，分别介绍了饲料中细菌总数、霉菌总数、酵母总数、沙门氏菌、大肠菌群、大肠杆菌、葡萄球菌、粪链球菌、耐寒微生物、耐热弯曲杆菌、 β -葡萄糖苷酸酶阳性大肠埃希氏菌、大肠埃希氏菌 O157、产气荚膜梭菌以及志贺氏菌等的特性和检测方法，并讲述了菌落计数方法及报告方式。第五章“饲料中有益微生物的检测方法”，

讲述了现在微生物饲料添加剂中常用的几种菌种地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、乳酸菌、酿酒酵母、产朊假丝酵母和沼泽红假单胞菌的检测方法。第六章“饲料中霉菌毒素的检测技术”，分薄层色谱法、荧光光度法、高效液相色谱法、酶联免疫吸附法来介绍了黄曲霉素 B₁、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A、伏马毒素 B₁ 这几种毒素的检测方法。第七章“饲料成分的微生物法检测技术”介绍了应用微生物法分别检测饲料中生物素、D-泛酸钙、叶酸、维生素 B₆、维生素 B₁₂、杆菌肽等含量的方法。

由于本书中讲述了微生物的基本知识和技能，介绍了饲料中微生物的检测方法，并对每种微生物的特性进行了阐述，也介绍了应用微生物法来检测饲料成分的方法。因此，本书不仅适用于质检机构，也适用于企业和科研院校，同时，也可为食品检测和医学检测提供参考。

本书是在查阅大量文献资料的基础上，结合编者在检测过程中的实际经验编著而成。在编著过程中，国家饲料质量监督检验中心（北京）苏晓欧主任给予指导，马东霞老师进行了审校，在此一并给予感谢！由于编者水平有限，在编写过程中难免有不妥之处，敬请读者指正。

编 者

国家饲料质量监督检验中心（北京）

2005 年 11 月 14 日

目 录

序言

第一章 饲料中的微生物	1
第二章 饲料微生物的检测要求	10
第一节 检测室要求	10
第二节 饲料微生物检测的人员要求	14
第三节 玻璃器皿的洗涤要求	16
第四节 灭菌与消毒要求	19
第五节 微生物实验室常用仪器的维护与保养	22
第三章 微生物基本操作技术	25
第四章 饲料中污染微生物的检测方法	42
第一节 饲料中细菌总数的测定	45
第二节 饲料中霉菌总数的测定	48
第三节 饲料中酵母总数的测定	50
第四节 饲料中沙门氏菌的测定	51
第五节 饲料中大肠菌群的测定	57
第六节 饲料中 β - 葡萄糖苷酸酶阳性大肠埃希 氏菌的测定	62
第七节 饲料中大肠埃希氏菌 O157 的微生物学检验	64
第八节 饲料中耐热弯曲杆菌的微生物学检验	69
第九节 饲料中产气荚膜梭菌的微生物学检验	74
第十节 饲料中凝固酶阳性葡萄球菌的微生物学检验	78
第十一节 饲料中粪链球菌的微生物学检验	83

第十二节	饲料中的耐寒微生物的测定	85
第十三节	饲料中志贺氏菌的测定	88
第十四节	菌落计数方法及报告	94
第五章	饲料中有益微生物的检测方法	96
第一节	地衣芽孢杆菌的测定	101
第二节	饲料中枯草芽孢杆菌的测定	102
第三节	饲料中乳酸菌的微生物学检验	106
第四节	饲料中酿酒酵母的微生物学检验	112
第五节	产朊假丝酵母的测定	115
第六节	沼泽红假单胞菌的测定	116
第六章	饲料中霉菌毒素的检测技术	119
第一节	混合饲料中黄曲霉毒素 B ₁ 含量的测定 ——高效液相色谱法 (HPLC)	121
第二节	饲料中玉米赤霉烯酮的测定——免疫亲和柱 ——荧光光度法	132
第三节	配合饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 ——薄层色谱法	135
第四节	饲料中赭曲霉毒素 A 的测定——免疫亲和柱 ——高效液相色谱法	140
第五节	伏马毒素 B ₁ 含量的测定 ——酶联免疫吸附检测法	144
第七章	饲料成分的微生物法检测技术	151
第一节	微生物法测定全价饲料和预混料中 生物素的含量	151
第二节	微生物法测定全价饲料和预混料中 D-泛酸钙的含量	155
第三节	微生物法测定全价饲料和预混料中 叶酸的含量	159
第四节	微生物法测定全价饲料和预混料中	

	维生素 B ₆ 的含量	162
第五节	微生物法测定全价饲料和预混料中 维生素 B ₁₂ 的含量	165
第六节	改良的 Grynnes 微生物学法测定成品 饲料中的杆菌肽	168
第七节	抗生素的微生物测定法	173
附录	稀释液和培养基制备	183
参考文献		227

第一章

饲料中的微生物

一、微生物基本概念

微生物是一群形体细小，结构简单，人肉眼看不见，必须借助于光学显微镜、电子显微镜放大几百倍、几千倍甚至几万倍才能看到的生物。

微生物的特点是个体微小，具有一定的形态、结构、生理功能，在适宜环境中生长繁殖迅速，易变异，在自然界中分布广泛，水、土壤、空气、饲料、物体表面、生物体的体表及内部均有微生物存在。微生物与人类的关系极为密切、复杂，大体上可分为可以引起人类或动物病害的病原微生物与非病原微生物，而病原微生物与非病原微生物之间有时不能截然划分，二者间还存在许多过渡形式，如强致病性、弱致病性、条件致病性等不同类别。如寄生在人体的正常菌群中的某些微生物，由于某种原因，如机体免疫功能低下时，也可致病，此类微生物统称条件致病菌（Opportunistic Bacteria）。

微生物学是研究微生物在一定条件下的形态、结构、生物活动的规律，研究微生物进化、分类以及与人类、动植物、自然界相互关系等问题的一门科学。随着微生物学研究的范围日益广泛深入，逐渐形成了许多分支。着重研究微生物学基础的可分为微生物形态学、微生物生理学、微生物生态学和分类学等等；按应用可分为农业微生物学、工业微生物学、医学微生物学、兽医微生物学等等。

二、微生物的命名与分类

微生物的命名国际上多采用双命名法。以细菌为例，如大肠杆菌国际的命名为 *Escherichia Coli Cmigula Castellani and Chalmere*，命名的书写应为斜体或加下划线，通常略去后人名，前为属名，后为种名，正规中文名为“大肠埃希氏菌”，通常称为大肠杆菌，略称 *E. coli*。

长期以来，人们将生物划分为动物界与植物界。1966 年 Heaker 提出将微生物分别从动物界、植物界划分出来列为原生生物界（不包括病毒）。1969 年 Witiaker 提出将具有细胞结构的生物划分为 5 个界，即原核细胞生物界、真核细胞生物界、真菌界、植物界与动物界。20 世纪 70 年代后增加病毒界。微生物就包括原核细胞生物界、真核细胞生物界、真菌界、和病毒界。

微生物的种类很多，按其结构、组成的差异，可分为 3 大类：

1. 非细胞型微生物

病毒属于此类微生物。体积小，能通过滤菌器，而且只能在活的细胞内生长繁殖。

2. 原核细胞型的微生物

核无核膜、核仁，仅有原始核；缺乏完整细胞器，这类微生物包括有细菌、衣原体、立克次氏体、支原体、螺旋体和放线菌。

3. 真核细胞型微生物

有核膜、核仁和染色体，胞浆内有完整的细胞器，真菌属之。

三、细 菌

1. 细菌的形态

细菌的基本形态有三类：即球菌、杆菌、螺形菌。

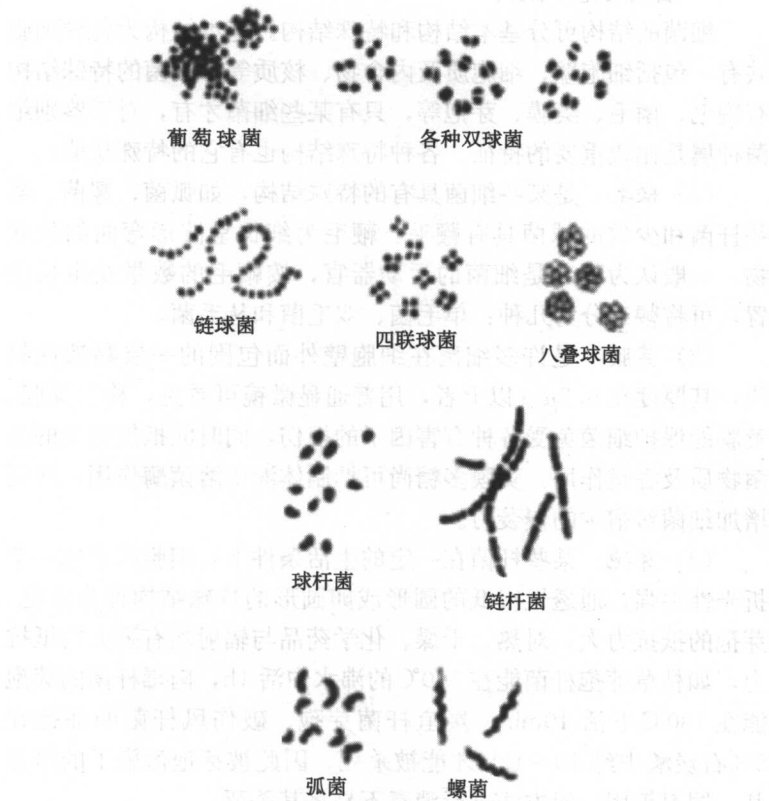


图 1-1 细菌各种形态

2. 细菌的大小

细菌个体微小，通常以微米 (μm) 为测量单位，各种细菌大小不一，同时细菌也因菌龄和环境影响有些差异。一般幼龄菌比成熟的或老龄的细菌大得多，主要是与代谢废物的积累及培养基中渗透压上升等因素有关；另外涂片、固定、染色时细菌收缩体积变小，如死的大肠埃希氏杆菌比活菌缩小 1/3。

3. 细菌的基本结构

细菌的结构可分基本结构和特殊结构。基本结构为各种细胞共有，包括细胞壁、细胞质及内含物、核质等。细菌的特殊结构有鞭毛、菌毛、荚膜、芽孢等，只有某些细菌才有，对于鉴别细菌种属是比较重要的特征。各种特殊结构也有它的特殊功能。

(1) 鞭毛 是某些细菌具有的特殊结构，如弧菌、螺菌、某些杆菌和少数的球菌具有鞭毛。鞭毛为细长呈波形弯曲的丝状物。一般认为鞭毛是细菌的运动器官，按鞭毛的数量及生长位置，可将鞭毛分为几种：单毛菌、双毛菌和丛毛菌。

(2) 荚膜 是许多细菌在细胞壁外面包围的一层黏液性物质，其厚度在 $0.2\mu\text{m}$ 以上者，用普通显微镜可看见，称为荚膜。荚膜能保护细菌免受各种有害因子的损伤，同时能抵抗宿主的杀菌物质及吞噬作用，荚膜多糖尚可抑制体液中溶菌酶作用，从而增加细菌对宿主的侵袭力。

(3) 芽孢 某些杆菌在一定的生活条件下，细胞内形成一个折光性很强，通透性很低的圆形或卵圆形的特殊结构称为芽孢。芽孢的抵抗力大，对热、干燥、化学药品与辐射均有强大的抵抗力，如枯草芽孢杆菌能在 100°C 的沸水中活 1h，肉毒杆菌的芽孢能在 180°C 下活 10min。炭疽杆菌芽孢、破伤风杆菌的芽孢在 5% 石炭酸中经 10~12h 才能被杀死，因此被芽孢污染了的培养基、饲料等用一般方法进行消毒不易将其杀死。

4. 细菌的鉴定生化实验

细菌的鉴定通常要利用菌体的生长特征、菌落的形态、染色镜检的结果，同时也常需要做一些生化实验才能最终得出结论。

(1) 糖发酵试验 常用于细菌的鉴定。如大肠杆菌能使丙酮酸生成甲酸，并由甲酸解氢酶生成 CO_2 和 H_2O ，所以大肠杆菌分解葡萄糖时产酸产气。而伤寒杆菌只有使丙酮酸生成甲酸的能力，它缺乏甲酸解氢酶，故后者分解葡萄糖时只能产酸不产气；又如大肠杆菌能分解乳糖，而伤寒杆菌则不能分解乳糖。

(2) V-P 试验 产气杆菌与大肠杆菌均能分解葡萄糖与乳糖产酸产气，二者不易区别，但产气杆菌能使丙酮酸脱羧，生成中性的乙酰甲基甲醇。乙酰甲基甲醇在碱性溶液中被大气中的氧分子所氧化，生成二乙酰，二乙酰与培养基中含有的胍基化合物发生化学反应，生成红色化合物，这一反应称为 V-P 试验阳性。大肠杆菌不生成乙酰甲基甲醇，故 V-P 试验为阴性。

(3) 甲基红试验 在上述产气杆菌培养液中，由于 2 个分子的丙酮酸已变为 1 个分子的中性乙酰甲基甲醇，生成的酸量就相应减少，故 pH 相应较高 (pH5.4 以上)，用甲基红作指示剂时，培养液呈现橘红色，称为甲基红试验阴性。相反，大肠杆菌因分解丙酮酸时不产生乙酰甲基甲醇，产生的酸较多，故培养液的 pH 下降到 4.5 或更低，因此甲基红指示剂呈红色反应，是为甲基红试验阳性。

此外，还有许多其他的生化试验，如氧化酶、过氧化氢的测定，对尿素的利用，对半胱氨酸利用产生 H_2S 试验，对色氨酸作用产生吲哚试验等。

5. 细菌在培养基上的生长现象

观察细菌在固体培养基表面的生长现象，一般是利用平板分离。如果接种的细菌能适当地分开，经一定时间培养后，便形成单一的肉眼可见的细菌集团，称为菌落。菌落的大小、形状、色泽、边缘、透明度、湿润度、溶血现象等特点，则因细菌的种类和所用培养基不同而异。菌落的这些特点是识别细菌的重要依据之一。有些细菌的菌落特征较突出，有些则不甚明显，所以根据菌落特征识别细菌，须经过工作中的反复实践。通常根据菌落表面的光滑程度将其分为 3 大类。①光滑型菌落：菌落表面光滑边缘整齐。②粗糙型菌落：表面粗糙，边缘不整齐。③黏液型菌落：表面光滑、湿润有黏液。

细菌在培养基上长成的菌落特征，其观察项目如下。

大小：以毫米表示其直径。

形状：斑点状（直径在 1mm 以下），圆形，丝状，不规则形，卷发状，阿米巴（变形虫）状，菌丝状，假根状，念珠状。

表面：光滑，粗糙，同心环状，辐射状，皱纹状，旋涡状，荷包蛋状。

高度：扩展，稍凸起，隆起，凸起，瘤形，垫状。

边缘：光滑整齐，缺刻状，圆锯齿形，波状，裂片状，丝状，卷发状，多枝状。

光学特征：透明，半透明，不透明。

当细菌在固体培养基表面密集生长时，多个菌落融合在一起，称为菌苔。

细菌在液体培养基中生长以后，不同的菌种可出现不同的生长现象，主要有以下几类。①混浊：细菌向四周均匀扩散，出现肉眼可见的不同程度的均匀混浊生长。②沉淀：少数排列成链状的细菌可呈沉淀生长，沉淀物上面的液体表现清澈。③菌膜：专性需氧菌多生长在液体表面，铺开成菌膜。

细菌在半固体培养基中生长时，无鞭毛的细菌，沿着穿刺线生长；有鞭毛的细菌，除沿穿刺线外，还可看到从穿刺线向外扩散生长的趋势。因此，以穿刺法将细菌接种于半固体培养基中，可有助于鉴别细菌是否具有运动（是否有鞭毛）。

四、真 菌

真菌是一大类不含叶绿素，无根、茎、叶，营腐生或寄生生活的真核微生物，仅少数类群为单细胞，其余为多细胞，大多数呈分枝或不分枝的丝状体，能进行有性和无性繁殖。存在或应用于饲料中的真菌主要有酵母菌（Yeasts）和霉菌（Molds）。

“霉菌”不是一个分类学上的名称，而是某些丝状真菌的俗称，指在基质上长成具有绒毛状、棉絮状或蜘蛛网状的菌丝体的真菌，一般泛指毛霉、根霉、曲霉、青霉、镰刀菌等属真菌。霉菌广泛分布于饲料中和动物体内外。根霉（*Rhizopus*）和曲霉

(*Aspergillus*) (如黑曲霉、米曲霉) 能产生糖化酶, 将淀粉分解成糖, 米曲霉还能将蛋白质分解成氨基酸; 链孢霉可以合成蛋白质; 木霉 (*Trichoderma*) 如康氏木霉 (*T. koningioud*)、绿色木霉 (*T. Viride*) 能够分解纤维素。链孢霉 (*Neurospora*) 菌体内含有丰富的维生素 B₁₂, 白地霉 (*Geotrichum candidum*) 细胞富含蛋白质、脂肪、维生素和核酸, 可作饲料。霉菌除能应用于饲料发酵外, 还广泛应用于其他领域。但是霉菌也有不利的一面, 它可以引起各种粮食、饲料发霉变质, 有的还能产生毒素, 如黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮等, 能危害人和动物的健康。

霉菌为需氧的喜酸性环境的微生物, 在青贮饲料中常见的有毛霉、青霉、曲霉和枝孢霉。由于青贮窖内严格的厌氧环境, 霉菌一般不易生长繁殖。若是青贮中水分不够或是踩压不紧时, 便会留下较多的空气, 霉菌能在其中生长繁殖, 分解利用乳酸、醋酸和其他有机酸, 降低青贮料的酸度, 为腐败菌的发育创造条件, 进而造成青贮料的败坏。青贮塔有裂缝漏气, 或者青贮料开后暴露空气太久, 也会造成同样的后果。

酵母菌在饲料中常用来作为发酵饲料、单细胞蛋白和酶制剂的生产菌株。由于酵母细胞含有丰富的蛋白质和维生素, 而且其蛋白质中含必须氨基酸指数都很高, 所以具有很高的饲用价值, 但也有些酵母菌能造成饲料的败坏, 少数种属于病原菌。

酵母菌是单细胞的微生物, 它们的形态取决于酵母菌的种属和培养条件, 在一定条件下, 都具有其相对稳定的状态, 这对菌种的鉴定有一定的帮助。大多数酵母菌是球形、卵形、椭圆形、圆筒形和胡瓜形, 少数为瓶形、柠檬形和假丝状等。酵母菌比细菌大得多, 其大小约为 $1\sim5\mu\text{m}\times5\sim30\mu\text{m}$ 或者更大, 在高倍镜下可清楚看到。

常应用于饲料中的酵母菌有: 酿酒酵母 (*Saccharmyces cerevisiae*)、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*)、解脂假丝酵母解脂变种 (*C. lipolitica* var. *lipolitica*)、热带假丝酵母 (*C. tropicalis*) 等。人

们常培养这些酵母来做饲料酵母。

五、饲料中的微生物

饲料是发展畜牧业的物质基础之一，畜禽生长需要多种营养，都是依赖含有丰富营养的饲料来供给的，而微生物已渗透到饲料生产、调制、贮存、运输、饲养等各个环节中。饲料中的微生物按其功能可分为：污染微生物和有益微生物。

污染微生物从卫生的角度可分为：①直接可以致病的如致病性细菌、人畜共患传染病病原菌、产毒霉菌与霉菌毒素。②相对致病菌，在通常情况下不致病，只有在一定的特殊条件下，才有致病力的一些细菌。③非致病性微生物，主要包括非致病菌、不产毒的霉菌与常见酵母。非致病菌按温度可分为嗜冷性菌、嗜温性菌和嗜热性菌 3 种。这些微生物一方面会影响动物乃至人类的健康，另一方面也会影响环境。因此，对饲料的污染微生物的检测具有十分重要的意义。

有益微生物是人们利用微生物在饲料原料中的生长繁殖和新陈代谢，积累有用的菌体、酶和中间代谢产物来生产加工和调制的饲料，即微生物饲料。微生物饲料大体可以分为以下四类：第一类是通常所说的微生物态制剂或益生菌，是用培养繁殖可以直接饲用的微生物制备的活菌制剂。第二类即是利用微生物在液态基质中大量生长繁殖的菌体以生产单细胞蛋白（SCP）如酵母饲料等，以及菌体蛋白（MBP）如丝状真菌菌体、食用菌菌丝体及光合细菌、螺旋藻饲料等。第三类是固态发酵饲料，就是利用微生物的发酵作用来改变饲料原料的理化性状，或提高消化吸收率，延长贮存期，或变废为宝，将秕壳残渣变为饲料，或解毒脱毒，将有毒的饼粕转变为无毒、低毒的饲料。这一类发酵饲料包括青贮、微贮、粗饲料与担子菌发酵、畜禽粪与动物性下脚料发酵、饼粕类发酵脱毒饲料以及固态发酵菌体蛋白饲料。第四类是利用现代化的微生物工程，发酵积累微生物有用的中间产物或特

殊代谢产物，以此生产饲用氨基酸、酶制剂以及抗生素、维生素等。由于微生物饲料的生产具有原料广泛、投资少、产出率高、有利于环境保护以及不受生产地区和气候条件的限制等优点，符合环境保护、节约能源等要求，因此，微生物饲料的研究与应用具有越来越重要的地位。为了确保微生物饲料所使用的菌株的安全性以及进行产品生产的质量控制，对菌株的检测和安全性评价也越来越重要。