



饲料中微生物及其毒素的 检测与风险评估

饶正华 编著



中国质检出版社
中国标准出版社

饲料中微生物及其毒素的 检测与风险评估

饶正华 编著



中国质检出版社
中国标准出版社

图书在版编目(CIP)数据

饲料中微生物及其毒素的检测与风险评估/饶正华编著. —北京:中国标准出版社, 2013. 12

ISBN 978 - 7 - 5066 - 7398 - 3

I. ①饲… II. ①饶… III. ①饲料—微生物毒素—检测 ②饲料—微生物毒素—危险评估 IV. ①S816.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 273150 号

中国质检出版社 出版发行
中国标准出版社

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100013)

北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址:www. spc. net. cn

总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 787 × 1092 1/16 印张 13.75 字数 285 千字

2013 年 12 月第一版 2013 年 12 月第一次印刷

*

定价:45.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68510107

前 言

近年来,国外发生了一些与饲料安全有关的严重事件,如“疯牛病”、“二噁英”、“除草醚”、“甲孕酮”等事件,而国内“瘦肉精”、“三聚氰胺”等在饲料中的违规添加使用,也造成了多起致人中毒事件的发生。饲料微生物及其毒素,是影响饲料安全的重要物质,饲料中的微生物(如沙门氏菌、大肠杆菌、朊病毒等致病微生物)以及黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮等微生物毒素,可通过饲料使畜禽致病并严重威胁人类的健康。因此,饲料微生物及其毒素安全问题已成为关注的热点,需要从各个环节做好饲料中微生物卫生管理和生物安全检测工作。

本书内容共分为八章。第一章简要介绍了饲料安全、微生物基础知识以及饲料微生物安全的相关内容。第二章介绍了沙门氏菌、葡萄球菌等致病菌的生物学特性。第三章对饲料中主要的微生物毒素进行了阐述。第四章对饲料中微生物检测的实验室、人员、报告格式等提出了一些要求。第五章和第六章分别给出了影响饲料安全的微生物及微生物毒素中部分指标的检测方法。第七章从 HACCP、风险评估和预测微生物学三方面进行了介绍,旨在推动这三大安全管理模式在饲料微生物研究中的应用。第八章对致病微生物和毒素的预防和消除进行了简要阐述。

本书既讲述了关系饲料安全和微生物的基本知识和技能,又详细介绍了微生物的特性,还介绍了饲料中微生物及其毒素的检测方法和管理手段。因此,本书不仅适用于质检机构相关人员,也适用于企业和科研院所相关人员,同时,也可为政府管理部门相关人员提供参考。

编著者长期从事饲料中微生物及微生物毒素的检测与研究工作,并参与了大量饲料中微生物及微生物毒素标准的制修订。本书是在查阅

大量的国内外文献的基础之上,结合编著者长期的检测经验和科研成果,在中国农业科学院基本科研业务费增量项目“肉骨粉中沙门氏菌生长预测模型建立及风险分析”(项目编号:2013ZL005)的资金支持下,编著而成的。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。

编著者

2013年8月20日

目 录

第一章 微生物对饲料安全的影响	1
第一节 饲料安全与安全饲料	1
第二节 微生物的基础知识	4
第三节 饲料中的微生物	8
第四节 饲料中益生菌的安全性	10
第二章 饲料中微生物的特性	13
第一节 细菌总数	13
第二节 霉菌总数	14
第三节 大肠菌群	16
第四节 沙门氏菌	18
第五节 志贺氏菌	24
第六节 葡萄球菌	27
第七节 单核细胞增生李斯特氏菌	32
第八节 大肠埃希氏菌	35
第九节 弯曲菌	37
第十节 产气荚膜梭菌	38
第十一节 小肠结肠炎耶尔森氏菌	40
第十二节 副溶血弧菌	41
第十三节 蜡样芽胞杆菌	43
第十四节 肠球菌	44
第十五节 变形杆菌	45
第十六节 溶血性链球菌	46
第十七节 布鲁氏菌	48
第十八节 铜绿假单胞菌	49
第十九节 肉毒梭菌	50

第三章 饲料中的微生物毒素	52
第一节 细菌毒素	52
第二节 霉菌毒素概述	53
第三节 霉菌毒素对动物的危害	54
第四节 黄曲霉毒素	58
第五节 玉米赤霉烯酮	60
第六节 呕吐毒素	61
第七节 赭曲霉毒素	63
第八节 T-2 毒素	64
第九节 伏马毒素	65
第十节 杂色曲霉毒素	66
第十一节 麦角类生物碱	67
第十二节 展青霉素、橘青霉素和黄绿青霉素	70
第十三节 其他霉菌毒素	72
第十四节 霉菌毒素的互作效应	75
第四章 检测技术与要求	79
第一节 微生物检测技术发展趋势	79
第二节 饲料中霉菌毒素的检测技术	81
第三节 饲料微生物学标准及其编写规则	82
第四节 饲料微生物检测要求	86
第五节 饲料微生物检测的人员要求	89
第六节 玻璃器皿的洗涤要求	90
第七节 灭菌与消毒要求	92
第八节 微生物实验室常用仪器的维护与保养	93
第九节 微生物检测基本操作技术	95
第十节 菌落计数方法及报告	104
第十一节 饲料微生物样品抽取和制备	105
第十二节 PCR 技术在饲料微生物检测中的应用	106
第五章 饲料微生物检测技术	109
第一节 细菌总数的测定——平板计数法	109

第二节	霉菌总数的测定——平板计数法	110
第三节	沙门氏菌的检测——平板分离法	110
第四节	大肠菌群的测定——MPN 法	114
第五节	粪大肠菌群的测定——MPN 法	117
第六节	酵母数的测定——平板计数法	118
第七节	β -葡萄糖苷酸酶阳性大肠埃希氏菌的测定——平板计数法	118
第八节	副溶血性弧菌的检测——平板分离法	119
第九节	大肠埃希氏菌 O157 的检测——平板分离法	123
第十节	耐热弯曲杆菌的检测——平板分离法	126
第十一节	产气荚膜梭菌的测定——平板计数法	130
第十二节	凝固酶阳性葡萄球菌的测定——平板计数法	132
第十三节	粪链球菌的测定——平板计数法	135
第十四节	单核细胞增生李斯特氏菌的检测——平板分离法	136
第十五节	耐寒微生物的测定——平板计数法	138
第十六节	志贺氏菌的检测——平板分离法	141
第十七节	蜡样芽胞杆菌的测定——平板计数法	143
第十八节	溶血性链球菌的测定——平板分离法	145
第十九节	肉毒梭菌的测定——平板分离法	146
第二十节	铜绿假单胞菌的测定——平板分离法	147
第六章	饲料中微生物毒素检测技术	150
第一节	饲料中黄曲霉毒素总量的测定——高效液相色谱法	150
第二节	饲料中玉米赤霉烯酮的测定——荧光光度法	152
第三节	饲料中赭曲霉毒素 A 的测定——高效液相色谱法	154
第四节	伏马毒素 B ₁ 含量的测定——酶联免疫吸附法	157
第五节	饲料中玉米赤霉烯酮定性测定——二维薄层层析法	160
第六节	饲料中 T-2 毒素的测定——高效液相色谱法	164
第七节	饲料中脱氧腐镰刀菌烯醇(呕吐毒素)的测定——高效液相色谱法	167
第八节	肉毒毒素的测定——定性和中和试验	169
第七章	饲料微生物安全管理	170
第一节	HACCP	170

第二节	微生物风险分析	174
第三节	微生物风险评估的步骤	176
第四节	微生物风险评估的研究进展	178
第五节	风险评估的应用——饲料中沙门氏菌的风险评估	180
第六节	预测微生物学	183
第七节	微生物生长预测模型	184
第八节	预测微生物学、风险评估和 HACCP 之间的关系	187
第八章	饲料中微生物及其毒素的防范与消除	190
第一节	饲料中细菌防范措施	190
第二节	动物源性饲料中沙门氏菌的防范	191
第三节	饲料中霉菌污染防治措施与技术	192
第四节	真菌毒素的预防措施	194
第五节	霉菌毒素的解排毒技术	196
参考文献		202

第一章 微生物对饲料安全的影响

我国的饲料工业,从20世纪70年代末80年代初起步,90年代进入快速发展时期,进入21世纪,饲料工业步入了成熟发展期,仅仅用20多年的时间,就完成了国外发达国家50多年的发展道路,饲料工业取得了辉煌成就。多年来,从单一饲料到配合饲料,从钙、磷、维生素、微量元素、氨基酸的添加到酶制剂、抗氧化剂、防霉剂和益生菌等多种新型添加剂的应用,从饲料抗营养因子的控制、破坏和营养素的生物有效性考虑到计算机配方技术和制粒、挤压膨化工艺的运用,人们无一不是围绕提高饲料营养品质而努力。然而,从20世纪60年代起,随着一系列恶性事件的发生,如英格兰10万只火鸡因黄曲霉毒素中毒而死亡、英国的疯牛病、比利时的二噁英、西班牙等国发生的 β -体激动剂中毒,我国的瘦肉精中毒、红心鸭蛋等问题,使饲料安全越来越引起人们的关注。

第一节 饲料安全与安全饲料

一、饲料安全与安全饲料的概念

所谓饲料安全,是指饲料产品在生产、加工、运输及饲养动物转化为畜禽产品、水产品的过程中、对动物健康和正常生长、生态环境的可持续发展、人类健康和生活不会产生负面影响的特性。所以饲料安全有两方面的含义:a)饲料供给安全;b)饲料对人和动物机体的安全。

什么是安全饲料呢?饲料的安全性是指饲料中所含物质通过对畜禽的饲料转化为畜禽产品过程中对动物健康、正常生长、生态环境的可持续发展以及人类的正常生产、生活不会产生负面影响的特性。就其广义地说,安全饲料包括三层含义:a)对动物无毒害;b)在动物产品中无有害残留,对人类健康无危害;c)动物排泄物对环境无污染。同时符合这三个条件的,才是广义上的安全饲料。因此,安全饲料是指在合理使用下,对饲养动物、生产者、动物产品消费者和生态环境没有直接的或潜在的不良影响的饲料。

但什么样的影响属于不良影响,直接或潜在的危险因素包括哪些?这些问题本身就是随着科学发展而变化的,所以不同的人对于安全饲料有着多种不同的理解。普通消费者可能认为“安全”饲料即为零风险,而饲料生产企业则更关心“什么是可接受的风险?”但由于饲料生产、贮存、运输、销售、使用等环节的复杂性以及畜禽个体和人的差异,零风险的饲料是不可能存在的,只能通过一些过程控制将饲料出问题的风险降低为“可接受风险”。因此,绝对的安全饲料是不可能存在的,饲料安全只是个相对的概念,是在一定自然环境中,在一定科学技术水平下,人类在总结社会经验的基础上形成的一种社会规范,是一种要求、一种标准。

二、饲料安全的特性

饲料安全具有隐蔽性、累积性、复杂性和长期性的特性。

1. 隐蔽性

(1) 由于技术手段的限制,一些饲料原料在投入使用之初,其危害性并不能被充分地认识到;

(2) 对一些原料的毒副作用,利用常规的检测方法不能进行有效鉴别,对其影响程度,在一定时期内得不到有效鉴别;

(3) 在一般情况下,饲料产品或物质的危害性不能通过观察饲养动物及时发现,因为影响饲料安全的各种因素往往是潜移默化地进入养殖产品,并通过养殖产品转移到人体或环境中,对人体健康和环境造成危害。

2. 累积性

(1) 饲料中的不安全因素,如重金属等有毒、有害物质会通过被饲动物的产品或器官累积,人食用了这些动物产品或器官以后会影响人体健康甚至造成中毒或死亡;

(2) 会通过排泄物排到体外,污染周边环境,进而污染水源等,对人的健康造成危害。

3. 复杂性

(1) 造成饲料安全问题的因素数量多,其中,有些是人为因素,有些是非人为因素;

(2) 造成饲料安全问题的因素复杂多变,有些是偶然因素,有些则是长期累积的结果;在已有的问题逐步得到解决的同时,新的问题还在不断出现,这就决定了饲料安全问题的复杂性。如比利时发生的“二噁英”事件是工业污染造成的,英国的“疯牛病”事件是饲料原料使用不当造成的。所以,工业污染、农药污染、饲料原料保存不当发生霉变,饲料添加剂使用不当等都会造成饲料安全问题。

4. 长期性

(1) 饲料产品中的不安全因素是长期存在的,虽然通过加强监督管理和提高安全意识,危害发生的程度和范围会减小,但短时间内不可能被完全消除;

(2) 在使用饲料饲喂过程中蓄积在养殖动物体内的有毒、有害物质直接污染环境或通过人体蓄积所造成的影响是长期的。

三、引发饲料安全的主要因素

1. 饲料中人为添加、使用违禁药物

一些无知或见利忘义的饲料生产者和养殖生产者仍然使用国家明令禁止在饲料和动物饮水中使用的药品、兽药和化合物,具体包括:a) 肾上腺素受体激动剂,如:盐酸克仑特罗(俗称瘦肉精)、沙丁胺醇、莱克多巴胺、西马特罗等;b) 性激素,如:己烯雌酚、雌二醇、孕酮、甲孕酮等;c) 蛋白同化激素,如:碘化酪蛋白;d) 精神药品,如:盐酸氯丙嗪、地西洋(安定)、苯巴比妥、利血平、安眠酮等;e) 抗菌素类,如:氯霉素、氨苯砒、呋喃唑酮、甲硝唑等;f) 各种抗生素滤渣。抗生素滤渣是抗生素类产品生产过程中产生的工业三废,近年来以其高蛋白质含量和微量的抗生素成分,在饲料和饲养过程中使用,对动物有一定的促生长作用;但是由于其饲用的安全性没有得到证实,以及容易引起畜禽和人的耐药性,因此尚存在各种安全隐患,对养殖业的危害很大,也是国家明令禁止在饲料中添加使用的。

2. 超范围、超剂量、超时间、重复使用抗生素

抗生素在饲料中长期大量的使用,不仅加大了饲料成本而且使致病菌的耐药性增强,特别是人畜共用的抗生素,由于致病菌耐药性传递等问题,使人们的耐药性增强,从而大大降

低人类抵抗传染病的能力。畜产品中的抗生素残留对人类健康的危害很大。有些养殖场(户)或不按允许使用的范围使用兽药;有的擅自增大使用剂量、延长使用时间,不按规定的停药期和配伍禁忌使用药物添加剂;目前市场上经营的部分兽药是拌混在饲料中给药,且规定有预防量和治疗量,养殖生产中则按预防量长期添加使用;有一些加入药物添加剂的饲料产品不在标签上标识,或标识的药物添加剂品种和实际添加的不一样,有时造成养殖户重复用药,以致发生中毒。

3. 矿物质、植物原料和环境重金属等有害物质超标

某些植物和矿物中的铅、砷、氟、汞、镉等元素含量超标,使用这些原料生产饲料时,就会引起动物中毒或死亡。如铅中毒后,会对动物神经系统、造血系统和泌尿系统造成损害。饲料中高剂量铜、锌大部分通过粪便排出体外,长期过量,会加剧对环境的污染,造成土壤板结。高剂量铜、锌的粪便一旦污染水源,将产生巨大危害,可降低水体自净能力,使水质恶化,水生生物死亡。高铜还可造成动物肝脏铜蓄积,从而使其食用价值下降,甚至对人体产生毒害作用。饲料中铜、锌等矿物质过多,还将对维生素的稳定性产生负面影响,导致维生素的生物学效价下降。有机氯农药(如六六六、滴滴涕)的化学性质稳定,不易分解,残留期长,通过植物富集仍污染饲料原粮。污染了有机氯农药的饲料进入动物机体后,主要蓄积在脂肪、肝脏、肾脏、脑、血液等组织和器官中,最后使动物产品肉蛋奶中农药含量超标。氟是一种全身性的组织毒素,饲料中的氟进入机体后,主要与血液中的钙离子结合,引起机体钙代谢障碍。“二噁英”是由各种燃烧物燃烧以后所生成的一组包括 210 种组合的氯苯化合物,其中对人类有害的有十几种。这些燃烧包括森林大火、火山爆发、垃圾焚烧、汽车尾气、机油燃烧和化工产品的燃烧。自然界很难分解的“二噁英”却很容易溶解于脂肪中。因此饲用油脂产品易受“二噁英”污染。

4. 天然有毒有害物质

有些天然饲料原料中含有一定的有毒有害物质,如植物性饲料中的生物碱、动物性饲料中的组胺、抗硫胺素等,这些成分轻者可降低饲料的消化率,重者可引起急、慢性中毒,同时能进入产品中对人类造成潜在威胁。这些有害物质排放到环境中,对于环境中的许多生物都有毒害。如植物饼粕类本身固有的有害物质(如游离棉酚、抗胰蛋白酶因子、异硫氰酸酯等),会因脱毒工艺技术不过关,导致有害物质的含量超标,也可造成畜禽中毒。因此,在饲料中添加这类饲料原料时,如处理不好或使用不当,会影响动物发育。

5. 微生物污染

饲料中有毒有害微生物大量繁殖时,会产生各种毒素。如沙门氏菌通过饲料摄入后,在肠道繁殖并产生内毒素。内毒素对肠道产生刺激作用,引起肠道黏膜肿胀、渗出和坏死脱落,导致严重的胃肠炎。饲料霉变主要由曲霉属、青霉属、交链孢霉属、镰刀霉属等引起。霉变不仅仅会影响饲料质量,影响动物正常生长,最严重的是产生霉菌毒素,如黄曲霉毒素 B_1 , 这些毒素在动物体内蓄积会引起急性中毒和慢性中毒,影响动物产品的质量,并进一步危害人体健康。1986 年“疯牛病”首先在英国被发现,它是一种具有生物活性的蛋白质即朊病毒引起的,是牛的一种非炎性、变性型中枢神经系统疾病。潜伏期长(几个月至几年),病程较长,最终死亡。现有医学证明英国最早的“疯牛病”的病因是动物食用带有“羊痒病”的羊源性饲料而引起的。由于饲用动物源性饲料是“疯牛病”传播的主要途径,因此许多国家禁止在反刍动物饲料中添加使用动物源性饲料,特别是牛、羊肉骨粉。

6. 其他污染及其危害

美国自 1996 年第一批转基因西红柿上市以来,全球约有 2 亿多人食用过数千种转基因食品,尚未报道过一例食品安全事件。但据英国媒体报道,1998 年英国一位研究人员公布了他的试验成果:用转基因马铃薯饲养大鼠,引起了大鼠器官的生长异常,体重减轻,免疫系统遭到破坏。从而引起了人们对转基因食品的怀疑。目前,在没有确证转基因食品没有危害之前,大部分国家对其均采取了谨慎的态度,如对转基因食品加贴“转基因”标识,由消费者谨慎选择。

第二节 微生物的基础知识

一、微生物的基本概念

微生物是一群体形细小,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,此类微生物统称为条件致病菌(opportunistic bacteria)。

微生物学是研究微生物在一定条件下的形态、结构、生命活动规律、进化、分类以及与人类、动植物、自然界互相关系等问题的一门科学。随着微生物学研究范围的日益广泛深入,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;按应用领域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。

二、微生物的命名与分类

国际上微生物的命名多采用双命名法。以细菌为例,如大肠杆菌国际的命名为 *Escherichia coli* Cmigula Castellani and Chalmere(注:命名的书写规则为种属名为斜体,命名人为正体,通常略去命名人,*Escherichia* 为属名,*coli* 为种名),正规中文名称为“大肠埃希氏菌”,通常称为大肠杆菌,简称 *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。因此,微生物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,可分为以下三大类:

a) 非细胞型微生物:体积小,能通过滤菌器,而且只能在活的细胞内生长繁殖,病毒属于

此类微生物。

b) 原核细胞型微生物:核无核膜、核仁,仅有原始核;缺乏完整细胞器,这类微生物包括细菌、衣原体、立克次氏体、支原体、螺旋体和放线菌。

c) 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,真菌属于此类微生物。

三、细菌

1. 细菌的形态

细菌的基本形态有三类:球菌、杆菌、螺形菌。

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,同时会因为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、内含物和核质等。

细菌的特殊结构有鞭毛、菌毛、荚膜、芽胞等,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

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,可将细菌分为:单毛菌、双毛菌和丛毛菌。

(2) 荚膜

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。荚膜能保护细菌细胞壁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,荚膜多糖还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) 芽胞

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胞。芽胞的抵抗力强,对热、干燥、化学药品和辐射均有强大的抵抗力,如枯草芽胞杆菌能在 100°C 的沸水中活 1h,肉毒杆菌的芽胞能在 180°C 条件下活 10min。炭疽杆菌芽胞、破伤风杆菌的芽胞在 5% 石炭酸中经 10h ~ 12h 才能被杀死,因此被芽胞污染了的培养基、饲料等用一般方法进行消毒不易将其杀死。

4. 细菌的化学组成

细菌含有碳、氢、氧、氮、硫、钠、钾、钙、镁、磷等元素,主要化合物包括水、无机盐、蛋白质、糖类、脂类等。细菌体内还有一些细菌特有的化学物质,如胞壁酸、肽聚糖、吡啶二羧酸等。细菌的核酸有核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)两种,RNA 主要存在于细胞质和细胞膜上,一般占细菌干重的 10%;DNA 则主要存在于染色体和质粒中,占干重的 3% 左右。核酸与细菌的遗传、变异、蛋白质的合成有密切关系。

5. 细菌的主要物理性状

(1) 光学性质:细菌菌体呈半透明状态,光线照射菌体时,一部分光被吸收,一部分光发生散射,所以细菌悬液呈现混浊现象。可用浊度(OD)法对液体中的细菌数量进行估计。

(2) 布朗运动:无鞭毛的细菌在溶液中,因受分散媒介分子的撞击,发生不移动位置的颤动叫做布朗运动。这是一切胶体颗粒所共有的物理现象,它和细菌鞭毛运动完全不同,应注意区别。

(3) 带电现象:细菌蛋白质和其他蛋白质一样由许多氨基酸组成,是兼性离子,具有两性游离性质。在不同 pH 溶液中电离成带阳离子的氨基酸或带阴离子的羧基。细菌带电的性质可解释在做血清学试验时溶液 pH 过低则出现酸凝集(假阳性)的现象。

(4) 细菌体积小、单位体积表面积大,有利于细菌与外界物质交换。

(5) 细菌的细胞壁和细胞膜是半透性的,可允许水通过,而对其他物质则有选择性的通透作用。

6. 细菌的鉴定生化试验

细菌的鉴定通常要利用菌体生长特征、菌落形态、染色镜检的结果,同时也常需要做一些生化试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) VP 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 VP 试验阳性。大肠杆菌不生成乙酰甲基甲醇,故 VP 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。

7. 细菌在培养基上的生长现象

细菌在固体培养基表面生长现象,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,便形成单眼的肉眼可见的细菌集团,称为菌落。菌落具有大小、形状、色泽、边缘、透明度、湿润度、溶血现象等特点,因细菌的种类不同所用培养基相异。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。通常根据菌落的性状可分为 3 大类

型:a)光滑型菌落:菌落表面光滑边缘整齐。b)粗糙型菌落:表面粗糙,边缘不整齐。c)黏液型菌落:表面光滑、湿润有黏液。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,具体包括:a)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。b)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。c)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,还可从穿刺线向外扩散生长。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特性(是否有鞭毛)。

细菌在培养基上生长的菌落特征,其观察项目为:

- a)大小:以毫米(mm)表示其直径。
- b)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。
- c)表面:光滑、粗糙、同心环状、辐射状、皱纹状、旋涡状、荷包蛋状。
- d)高度:扩展、稍凸起、隆起、凸起、瘤形、垫状。
- e)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。
- f)光学特征:透明、半透明、不透明。

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。

真菌的基本结构为菌丝和孢子两部分。真菌在适宜环境中,由孢子生出芽管逐渐延长或呈丝状,称为菌丝。菌丝继续生长并向两侧分枝,交织成团,称为丝状体。孢子是真菌的繁殖结构,也是真菌鉴定和分类的重要依据。根据细胞核融合与否,分为有性孢子和无性孢子两类。病原性真菌多不形成有性孢子。

真菌的形态有单细胞和多细胞两种。单细胞真菌呈圆形或椭圆形,常见的有酵母菌和类酵母菌;多细胞真菌多呈丝状,分枝交织成丝状体,称为丝状菌,又称霉菌。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(*Neurospora*)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,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、乙酸和其他有机酸,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,或者青贮料开用后暴露空气太久,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需氨基酸指数很高,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,少数种属属于病原菌。

酵母菌是单细胞微生物,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 $(1\mu\text{m} \sim 5\mu\text{m}) \times (5\mu\text{m} \sim 30\mu\text{m})$ 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。

第三节 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,饲料生产是一个时间长、环节多的复杂过程。在整个过程中存在着许许多多被微生物污染的可能性,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。

一、饲料中微生物的种类

作为原料来源的活体就可能带有致病性微生物;在加工过程中原料之间的交叉污染;加工者携带的致病性微生物也可能进入饲料;在销售中会通过器具和其他途径污染致病性微生物。总之,与饲料有直接和间接关系的致病性微生物都可能污染饲料。饲料中的微生物按其功能可分为:致病微生物、有益微生物、相对致病微生物和非致病性微生物。

1. 致病微生物

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。饲料中的病原微生物种类很多,其中对动物及人致病力强的有沙门氏菌、志贺氏菌、肺炎克雷伯氏菌、阴沟肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌等。据路则庆等 2010 年报道,广州黄埔出入境检验检疫局 1995 年 9 月首次从秘鲁进口鱼粉中检出能引起细菌性痢疾的志贺氏菌;2003 年福建省福州市马尾出入境检验检疫局在 776 批进口鱼粉中,随机抽出 81 个样品进行病原菌分离,结果检出沙门氏菌、大肠杆菌、阴沟肠杆菌、柠檬酸杆菌、蜡样芽胞杆菌、凝结芽胞杆菌、球型芽胞杆菌、非脱羧勒克氏菌、肺炎克雷伯氏菌;2008 年,青岛出入境检验检疫局在对其进口的 87 批牛肉骨粉检验,发现其中有 14 批肉骨粉检出沙门氏菌,检出率高达 16.1%。

2. 有益微生物

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: