

鸡大肠杆菌计数方法研究

陶海静 (郑州牧业工程高等专科学校生物工程系, 河南郑州450011)

摘要 寻求一种简单、快捷的大肠杆菌计数方法。采用分光光度计测定经鉴定的大肠杆菌悬液的 OD 值, 同时通过直接涂片计数法计算大肠杆菌数。细菌悬液经适当浓度稀释后 OD 值在 0.1 ~ 1.0 范围内, 细菌悬液的 OD 值与活菌数之间成直线关系。利用 OD 值测定大肠杆菌数目是一种简单、快捷的细菌计数方法。

关键词 大肠杆菌; OD 值; 计数法

中图分类号 S858.31 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)27-08504-01

Study on the Counting Method of *E. coli* in Chicken

TAO Hai-jing (Department of Biological Engineering, Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou, Henan 450011)

Abstract The objective of the research was to seek a simple and rapid counting method of *E. coli*. The OD value of *E. coli* suspension that was identified was determined by spectrophotometer and *E. coli* number was calculated by direct smear counting method. When the OD value of bacteria suspension diluted by appropriate concentration was in the range of 0.1 ~ 1.0, the OD value of bacteria suspension and living bacteria number were in linear relation. Determining *E. coli* number by using OD value was a simple and rapid bacteria counting method.

Key words *E. coli*; OD value; Counting method

在养鸡生产实践中, 大肠杆菌病已成为威胁养禽业的主要细菌性疾病之一^[1-2]。由于大肠杆菌的血清型较多^[3], 目前预防大肠杆菌病最有效的方法是制备鸡大肠杆菌自家苗^[4]。在制备大肠杆菌自家苗时, 须进行大肠杆菌计数。用计数器计数时, 需稀释染色且时间长。为寻求一种简单、快捷的计数方法, 笔者尝试利用 OD 值进行细菌数目的测定。结果表明, 利用 OD 值计数法, 只要提前将其标定便可长期使用, 不受时间和其他因素的限制, 因此不失为一种简单、快捷的细菌计数方法。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

1.1.1 鸡大肠杆菌增菌培养基制作。葡萄糖 3 g, 磷酸氢二钾 2 g, 磷酸二氢钾 1 g, 氯化钠 5 g, 蛋白胨 5 g, 酵母膏 5 g, 蒸馏水 1 000 ml, 调 pH 值为 7.4, 放入高压灭菌锅 105 ℃ 灭菌 30 min。

1.1.2 鸡大肠杆菌分离鉴别^[5]。无菌采集剖检大肠杆菌病典型病变鸡肝脏, 用无菌刀片划开, 触片革兰氏染色镜检, 见阴性两端稍深染的杆菌, 同时用接种环沾取切面划线接种于麦康凯鉴别培养基上, 37 ℃ 培养 24 h, 在麦康凯培养基上形成 3 mm 左右, 红色, 光滑湿润圆形隆起小菌落, 挑取红色单个菌落接种于普通肉汤培养基纯化培养, 37 ℃ 培养 24 h, 肉汤浑浊, 管底有沉淀物, 将培养物涂片革兰氏染色镜检, 同组织触片, 但菌体着色均匀, 单个或偶有 2 ~ 3 个相连。

1.1.3 生化鉴定^[6]。将纯化后的细菌培养物进行乳糖、甘露醇、麦芽糖、葡萄糖和蔗糖发酵试验。该细菌能够分解利用乳糖、葡萄糖和麦芽糖, 其中以乳糖产酸产气最多, 但不能分解利用甘露醇和蔗糖, 也不分解肌醇。

1.1.4 动物攻毒试验。取 40 只 3 周龄非免疫健康小鸡平均分成两组, 一组为试验组, 另一组为对照组。试验组 20 只接种普通肉汤培养基纯化培养的培养物, 肌肉注射 0.5 ml/只; 对照组 10 只接种普通肉汤培养基, 肌肉注射 0.5 ml/只。接种 5 h 后, 试验组的小鸡出现羽毛蓬松、精神沉郁、双腿无力、

缩颈闭目、挤堆等症^[7]; 接种 9 h 后, 小鸡开始出现死亡, 至 72 h 死亡 13 只。对死亡小鸡进行剖检, 见其气管及支气管轻微出血, 肝脏、肺脏出血, 十二指肠、小肠及盲肠扁桃体出血, 腺胃乳头有脓性液体流出; 从死亡鸡肝、脾均回收到试验菌。对照组 5 d 后仍健活。

经鉴定确定为致病性大肠杆菌后按 5% 的量接种于鸡大肠杆菌增菌培养基上, 37 ℃ 培养 16 h, 置 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2 供试仪器 显微镜、722 分光光度计。

1.3 试验方法

1.3.1 细菌悬浮液的配制。取 5 ml 培养 16 h 的菌液, 用 45 ml 灭菌大肠杆菌液体培养基稀释, 充分振荡摇匀, 使细菌充分分散。然后用移液管依次取 10、9、8、7、6 ml, 分别放入 5 个试管中编号为 1、2、3、4、5。在这 5 个试管中分别加入大肠杆菌增菌培养基, 使其悬浮液均达到 10 ml, 充分摇匀, 制成一组浓度梯度的细菌悬液, 待测。

1.3.2 分光光度计测量方法。用大肠杆菌增菌培养基作为对照, 其他 5 个试管细菌悬液作为待测液。移入 0.5 cm × 1.0 cm 规格比色槽中, 在 722 分光光度计上进行测定。所用波长为 450 nm。每个样重复测定 3 次, 记下吸光度的平均值。

1.3.3 直接涂片计数法。用测微器测出油镜的视野半径, 然后计算视野的面积^[2]。

涂片的制作: 以灭菌微量吸管吸取充分混合的被测菌液 0.01 ml, 滴加于清洁的划有 100 mm² 方格的载玻片上。将玻片标本固定, 以碱性美蓝染色 5 min, 水洗, 干燥后即可镜检。

镜检和计数: 将涂片置于已测知视野面积的油镜下观察, 检查 x 个视野(按菌数决定), 计算每个视野中所见的细菌数, 假设其总数为 n, 则平均每视野具有 n/x 个细菌, 故 1 ml 被检菌液中的细菌总数 = 100 × 100 mm² r² × nx。

2 结果与分析

用 722 分光光度计测得灭菌大肠杆菌培养液(对照)及 5 个试管悬浮液(待测)的 OD 值(吸光度), 见表 1。将表 1 数值绘图显示, 细菌悬液与吸光度之间呈直线相关。笔者对此试验做了大量的工作, 如把大肠杆菌多次培养, 稀释一定倍数后测 OD 值及菌数, 结果

作者简介 陶海静(1972-), 女, 河南中牟人, 硕士, 讲师, 从事动物生物技术研究。

(上接第8504页)

落在该线附近或落在该线上,并且还得知,其他微生物在悬浮液中的数目与OD值也呈直线相关,但其大小与大肠杆菌差别越大,它们在坐标上对应的直线偏离大肠杆菌菌数与OD值在坐标上对应的直线越大。由此可以把该图保存起来,当测量大肠杆菌菌数时,只要测出OD值,便可在图纸上查出对应的菌数;制备鸡大肠杆菌自家苗时所需大肠杆菌菌液浓度为 4.8×10^8 个/ml^[4],那么在坐标上查出其对应的OD值。只需配成该OD值细菌悬浮液,便可用来制苗。

表1 大肠杆菌不同稀释度的OD值和细菌数的对应值

试管号	OD值	细菌数 $\times 10^8$ 个
1	0.408	5.0
2	0.340	4.4
3	0.273	3.8
4	0.206	2.6
5	0.136	2.0

3 讨论

(1) OD值计数法是运用光度计测定细菌悬浮液的OD值,然后与标准曲线比较后确定细菌数目。标准曲线上细菌的数目是通过直接涂片计数法获得,数字比较准确。该试验

发现细菌悬液经适当浓度稀释后,其OD值与细菌数目之间呈直线关系,为利用OD值测定细菌数目提供理论依据。

(2) 由于细菌悬液配制、稀释过程,特别是计数过程的染色、计数等,都可能产生误差。因此,方程的系数就不可避免地存在试验误差。通过3次试验,结果趋于一致,说明利用OD值计数法测定大肠杆菌菌液浓度,不失为一种快捷而有效的计数方法。

(3) 根据比耳定律,溶液的浓度过高或过低,均能影响测量结果的准确性,因此笔者选择OD值在0.1~1.0。结果表明,在此OD值范围内,细菌菌液的OD值与细菌活菌数之间成直线关系。

参考文献

- [1] 尹秀玲,牛发良. 大肠杆菌耐药机制的研究进展[J]. 河北北方学院学报:自然科学版,2007,23(1):36-39.
- [2] 王春华,袁建伟,韩喜彬.TMP与氟苯尼考配伍应用对鸡大肠杆菌病的疗效试验[J]. 饲料工业,2007,28(2):60-61.
- [3] 哈尔滨兽医研究所. 兽医微生物学[M]. 北京:中国农业出版社,1990.
- [4] 王海珍,郑明学,李赞. 鸡致病性大肠杆菌油乳剂灭活苗的制备[J]. 兽医研究,2007,23(1):10-11.
- [5] 郭振环,孔祥峰,黄小燕,等. 鸡大肠杆菌病的病原菌分离鉴定和药敏试验[J]. 安徽农业科学,2007,35(2):442-443.
- [6] 管远志,王艾琳,李坚. 细菌的生化鉴定[M]// 医学微生物学实验技术. 北京:化学工业出版社,2006.
- [7] 施汉忠,潘汉江. 鸡大肠杆菌脑炎的诊治[J]. 浙江畜牧兽医,2007(1):32-33.