



EGGS  
PROGRAM

第9期/2013年6月

## 保障孵化厅质量的微生物学工具： 实验室方法

Vincent TURBLIN 博士，法国诗华动物保健公司亚太区家禽事业部市场副总监

多数情况下，监测分析着重于对细菌（如大肠杆菌群，假单胞菌和金黄色葡萄球菌）和霉菌（包括曲霉属）的监测。病毒分离和/或 PCR 对于常规检测来说的确复杂而且昂贵，在某种程度上，对细菌和真菌的检测已足以对卫生程序实施的效果进行评估。

根据采样样品的不同，有不同种类的检测程序，样品包括：空气，平地表面，蛋壳，液体，绒毛或雏鸡。根据检测程序的不同，选择培养细菌的材料和培养基将有所不同。



图 1: 肠杆菌科（透射电子显微镜法）

### 微生物学监测所需材料

根据实验室选择的程序选择材料，并依据材料采样。培养真菌或细菌可以选择不同种类的培养基：

或琼脂：一种固体培养基，其坚实均一胶状的性质可允许直接接种微生物，并在相同材料上进行繁殖。

或肉汤：一种液体培养基，适用于分离和鉴别在琼脂培养基上生长的特殊微生物。

琼脂培养基通常用于确定存在的微生物的种类和数量。为了随时间变化比较菌落数，重要的是总是使用相同种类的琼脂。琼脂培养基提供微生物生长所需的营养物质。不同类型的微生物具有不同的营养需求，根据其抑制性化合物的易感性，可以使用选择性琼脂以确定一个特定的位置中存在的微生物的数量和类型。

### 应该使用何种培养基？

应该根据监测的目的选择琼脂的类型：



## EGGS PROGRAM

- 对于解决疑难和帮助鉴定特定种类细菌时，应该选择特殊种类的培养基。用于鉴别特殊种类微生物如假单胞菌，葡萄球菌，链球菌以及曲霉菌的培养基已经被很多科研供应商家制成预先倒好的平板进行商业化出售。

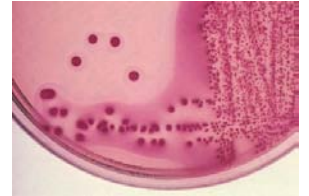


图2 大肠杆菌（麦康凯培养基）

- 但对于作为环境卫生和生物安全程序效率的追踪步骤，例行监测孵化场的微生物负荷总数来说，有三种类型的培养基常常用到：检测总菌群的 TSA 培养基，检测霉菌的 PDA 培养基，以及检测大肠杆菌群的酵母和麦康凯培养基。

首先，通用的细菌培养的培养基如**胰蛋白酶大豆琼脂**（TSA）或营养琼脂不含有任何抑制作用的化合物，并允许多种类型的细菌生长。TSA 可能是二者中更好的，因为它包含两种蛋白胨并被设计为支持各种各样脆弱或挑剔的微生物生长。非选择性培养基通常在计数前 37°C （98.6°F）培养 48 小时。

至于**麦康凯琼脂**（MA），它常用来检测大肠菌群。紫红胆汁琼脂（VRB），曙红亚甲基蓝琼脂培养基（EMB）也可以被使用，但麦康凯可能比其它两个培养基检测到略广泛的细菌种类。麦康凯琼脂通常在 37°C 培养 48 小时。大肠菌群（包括大肠杆菌）在麦康凯上产生菌落是红色的，但无色透明的也应计算在内，因为这些菌落表明存在其他有害细菌（如沙门氏菌）。

最后，**沙氏葡萄糖琼脂**或**马铃薯葡萄糖琼脂**是培养霉菌和酵母菌的通用培养基。对于培养霉菌来说，马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA）略优于沙氏葡萄糖琼脂培养基（SDA），可能是因为 SDA 最初是用来检测伴有皮肤感染的真菌（如指环虫）而被制作出来的。用于检测霉菌的培养基通常含有抗生素（如氯霉素 0.05 克/升）以抑制细菌的生长，并允许霉菌优先生长。为了防止失去活性，抗生素一般在培养基高压灭菌和冷却后添加。霉菌的生长速度比细菌慢。因此，通用的霉菌培养基一般是在室温下培养 3~5 天。

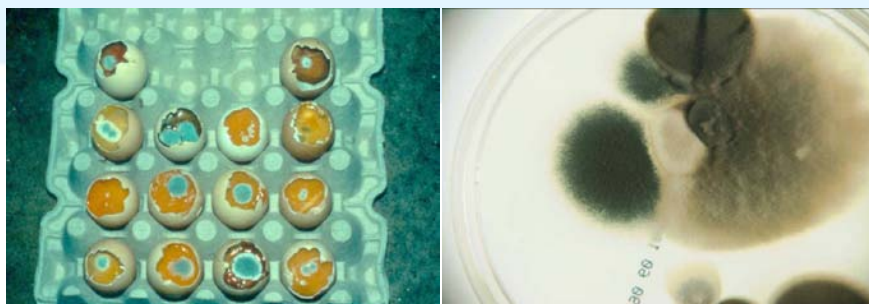


图3：蛋上生长（左）和土豆葡萄糖琼脂上（右）生长的曲霉菌



## EGGS PROGRAM

虽然预先倒好的培养基比在您的工厂中个人准备的脱水培养基更加昂贵，但制作这些培养基的公司能保证其质量和无菌。由于培养基质量和无菌会影响计数，在决定购买或制备您自己的培养基时应考虑质量和成本。

### 怎样制作孵化厅检测用培养基？



首先，用于制作培养基的地方是非常重要的：在孵化厅内找一个人员流动少和空气污染概率低的房间。例如，疫苗室可能是一个很好的制备培养基的场所。

然后，应根据培养基包装上的指示，使用钢化玻璃容器（如派热克斯玻璃）。用来混合的水的量要适当，并使用搅拌加热板进行加热。

在高压灭菌之前，培养基应完全溶解，即培养基澄清而非云雾状，应小心不要在澄清后过度加热。最终将培养基在高压灭菌器中以 15 磅的压力灭菌 15 分钟（121℃或 250°F）或根据包装的指示进行灭菌。



图 4 准备培养基用的钢化玻璃容器

注意：在高压灭菌时间过长的情况下，像其他对热敏感的培养基组分一样，培养基中的糖可能变焦，蛋白胨也可能会降解，因此过度加热的培养基应该丢弃。由于培养基在高压灭菌后非常热，所以应冷却到可以赤手处理的温度（大约 110°F 或 115°F）。



图 5 接触平板的凸面（RODAC 过程）

关于 RODAC 过程（琼脂直接接触微生物复制盘），盛放培养基的培养皿（15 × 100 毫米）应放置在一个水平的计数台面或桌子上。装有新的平皿的套管应在分装培养基后放置在平面储存装置中储存。每个平板倒入 16.5 ~ 17.5 毫升培养基（1/2 至 2/3）。浇板时，必须严格遵循无菌操作。应在凝固前小心操作以避免任何泄漏或气泡的形成（为了节省空间，可以在倒平板时将它们堆放起来）。浇注 RODAC 平板的目的是制作一个完美的琼脂凸面。因此，在水平表面上操作非常重要。

平板冷却至室温后，应在 37℃ 温育过夜，以检查是否无菌。温育后长出菌落的平板应弃用，而那些没有菌落的平板应存放在保存新平板的塑料套中。塑料套应标明日期并倒置，以防止凝结的水滴掉落在培养基表面，并放置在冰箱中以减少干燥。

如果您决定自己准备琼脂培养基，可从科学研究供应商处购买设备（加热板、高压灭菌器和微量天平）和用品（如玻璃器皿和平板）。





## EGGS PROGRAM

### 微生物学程序

#### 平板的培养:

显然应该遵循微生物学的通用规则。为了避免凝结的水滴影响生长，所有的平板都应将有培养基的一面置于上方培养。



图 6: RODAC 排列架

对于 RODAC 过程来说，大量接触培养皿的培养可以通过不同的方法来管理，例如特定的排列架。

对于细菌监测：可以使用一个微生物培养箱或孵化器（如果没有微生物培养箱）。培养箱的温度应在约 37°C (98.6°F)，时间应约为 48h。但是如果平板不得不在一个孵化器中培育，工作人员应该小心避免触碰它们。为达到这个目的，可以用塑料袋来保护它们（然而并非是完全密闭的）。

对于真菌监测：应在室温下培养 3-5 天。

#### 微生物生长鉴别:

总的来说，细菌菌落应是光滑、粘稠，直径 1-3mm。



图 7: 麦康凯琼脂上的大肠杆菌

真菌菌落在外观上呈丝状，且因培养周期较长而更大。

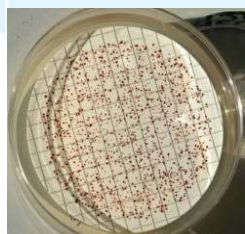


图 9: 培养后计数（液体样本）

空气平板、接触平板、液体扩散平板和条状拭子上的菌落应该进行计数并记录下来。如果在接种到平板前对样品进行了稀释，那么应根据稀释倍数（10，100，1000 等）来进行修正。

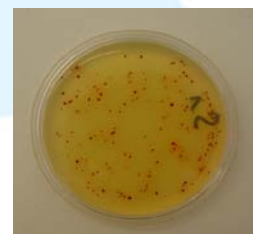


图 8: 培养后计数（表面/接触平板）



## EGGS PROGRAM

### 结论:

评判微生物监测项目是至关重要的步骤。所有结果应做好记录，及时发现异常的动态变化。在执行之前必须精心策划采样过程，遵守所有步骤并记录样本的相关鉴定结果。只有这样，每个监测项目的结果才能与家禽孵化率与雏鸡存活率数据进行比较。

本文中，我们讨论了微生物监测需要的材料和实验室程序。根据所监测孵化场的卫生情况和结构，设定一个理想目标，以循序渐进的方式来达成标准。过多的菌落提示卫生消毒程序存在不足或产蛋过程中出现了问题。

众所周知，越早发现污染就可以尽早采取措施，减少禽蛋孵化和雏鸡质量出现问题，这些问题的存在归根结底要反映在最终的肉鸡生产性能。