



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102373263 A

(43) 申请公布日 2012.03.14

(21) 申请号 201010254568.8

(22) 申请日 2010.08.16

(71) 申请人 瑞普(天津)生物药业有限公司

地址 300300 天津市东丽开发区六经路6号

(72) 发明人 王伟颖 闫亮亮 刘莹 王小武

魏德宝

(51) Int. Cl.

C12Q 1/06 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

一种微生态制剂中枯草芽孢杆菌有效数量的检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种有效枯草芽孢杆菌数量检测方法,该方法的特点是将检测样品进行简便的物理方法处理后,按照常规方法吸取并计数,72h后平板上长出可见菌落,再进行常规的菌落计数和计算,获得该样品中纯枯草芽孢杆菌数。本发明提供的方法适用于采用枯草芽孢杆菌生产的微生态产品的质量检测。有利于指导生产,保证产品质量。与现有方法相比,本发明提供的检测方法简便,准确易行。

1. 一种微生态制剂中枯草芽孢杆菌有效数量的检测方法,其特征包括如下的步骤:
 - 1) 准备采样用的灭菌容器和采样工具,如试管、三角瓶和勺等;
 - 2) 采样,采用 1) 提供的灭菌工具采样,对于饲料多的采不同点的样品,充分混合,取 500g 左右检测,对于小量存贮的采取上、中、下各部位样品混合采样;
 - 3) 用无菌生理盐水对样品进行 10 倍系列稀释,根据饲料卫生标准要求或对试样估计,选择 2 ~ 3 个适宜稀释度进行下步试验;
 - 4) 将上述稀释液装入三角瓶或试管中,置于恒温水浴中进行高温处理 5 ~ 10 分钟;
 - 5) 采用与步骤 4) 中相同的三角瓶或试管,加入与步骤 3) 中的稀释样品同体积的生理水,作为温度处理的参照标准液,置于同一个水浴槽中进行高温处理 5 ~ 10 分钟;
 - 6) 取出经高温处理的样品稀释液,按照常规方法吸取 1ml 于灭菌平皿内,每个稀释度作 2 个平皿;
 - 7) 稀释液移入平皿后,应及时将凉至 $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的牛肉膏蛋白胨固体培养基(可放置水浴锅内保温)注入平皿约 15ml,小心转动平皿使试样与培养基充分混匀,从稀释试样到倾注培养基之间,时间不能超过 15min;
 - 8) 待培养基凝固后,倒置平皿于恒温培养箱内培养 $72 \pm 3\text{h}$ 取出,进行常规的菌落计数和计算,获得该样品中纯芽孢萌发形成的菌数,则可代表该样品的有效活菌数量。
2. 根据权利要求 1 所述的有效芽孢杆菌数量的检测方法,其特征在于:所述步骤 4) 的恒温水浴的温度为 $75 \sim 100^{\circ}\text{C}$ 。
3. 根据权利要求 1 所述的有效芽孢杆菌数量的检测方法,其特征在于:所述步骤 5) 的恒温水浴的温度为 $75 \sim 100^{\circ}\text{C}$ 。
4. 根据权利要求 1 所述的有效芽孢杆菌数量的检测方法,其特征在于:所述步骤 8) 的恒温培养箱温度为 $28 \sim 32^{\circ}\text{C}$ 。

一种微生物制剂中枯草芽孢杆菌有效数量的检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于兽用生物制品领域,具体地说是提供一种微生物数量检测方法,即涉及一种益生菌添加剂中有效枯草芽孢杆菌的检测方法。

背景技术

[0002] 微生态饲料添加剂是根据微生态学理论研制的含有对动物有益微生物的活菌制剂,它们通过维持动物肠道内微生态平衡而发挥作用,具有促进动物生长发育,提高动物机体免疫力等多种功能,且无污染、无残留、无耐药性和对环境无害等,是一类新型绿色环保饲料添加剂。这些禽畜用的益生菌制剂含有芽孢杆菌,乳酸杆菌,粪链球菌,双歧杆菌,酵母等,光合细菌和梭状芽孢杆菌属的部分菌株及噬菌蛭弧菌等也偶然被用做益生菌添加到仔猪和仔鸡饲料中。

[0003] 微生态饲料添加剂一种新型的农业生产资源,已在我国推广并展现出美好的应用前景。为了稳定微生态制剂的应用效果,必须首先保证微生态制剂的产品质量。微生态制剂中有效微生物的活菌数量,是产品的质量核心。因此有效微生物活菌数量检测方法的准确性,对指导生产、保证产品质量有着非常重要的意义。

[0004] 使用益生菌添加剂时,其活菌数是影响作用效果的主要因素之一。研究认为,要达到一定的作用效果,饲料中活菌数应不低于 1.0×10^6 cfu/g。在畜牧生产中常用的微生态添加剂是乳酸菌和芽孢杆菌类。与乳酸菌、双歧杆菌等相比,芽孢杆菌的优点在于它对外界不良环境有很强的抵抗力,能耐 60°C 以上高温,保存时间长(常温下 1 年以上),培养容易,便于加工制成各种制剂,效果稳定。而目前在微生态制剂产品中,有效微生物数量的稳定性(出厂检验至产品规定的有效期)是一个直接影响产品质量和应用效果的问题。由于大多数种类的微生物菌体,不能耐受高温和干燥的影响,因此在产品中经过一段时间就会丧失生活能力。即使选用具有抗高温、抗干燥的芽孢杆菌,也因力生产工艺不同,在大生产条件下,真正形成芽孢的数量和比例也存在很大差异。而现在在检测微生物制剂生产及产品中的芽孢杆菌时,使用常规的微生物稀释平板测定法进行检测,虽然可以相对准确的测出样品中的有效微生物活菌的总数,但却无法区分出不同菌体形态所形成的菌数,即无法分辨出菌落是由性状稳定的芽孢萌发而形成的,还是由形状不稳定的营养体直接生产形成的。所以,使用现有方法难以测出产品中具体稳定性的有效微生物数量,给评价产品的真正质量带来困难。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有检测方法的结果,不能反映出产品中有效活菌的真实数量,不能准确评价产品的真正质量的缺陷,从而在现有通用检测方法的基础上,根据芽孢杆菌的生物学特性,提供一种用于微生物制剂的有效芽孢杆菌数量的检测方法。

[0006] 本发明的目的是通过如下的技术方案实现的:

[0007] 本发明提供的微生物制剂中有效芽孢杆菌数量的检测方法,包括如下的步骤:

- [0008] (1) 准备采样用的灭菌容器和采样工具,如试管、三角瓶和勺等;
- [0009] (2) 采样,采用 1) 提供的灭菌工具采样。对于饲料多的采不同点的样品,充分混合,取 500g 左右检测,对于小量存贮的采取上、中、下各部位样品混合采样;
- [0010] (3) 用无菌生理盐水对样品进行 10 倍系列稀释,根据饲料卫生标准要求或对试样估计,选择 2 ~ 3 个适宜稀释度进行下步试验;
- [0011] (4) 将上述稀释液装入三角瓶或试管中,置于恒温水浴中进行高温处理 5 ~ 10 分钟;
- [0012] (5) 同时,采用与步骤 4) 中相同的三角瓶或试管,加入与步骤 3) 中的稀释样品同体积的生理水,作为温度处理的参照标准液,置于同一个水浴槽中进行高温处理 5 ~ 10 分钟;
- [0013] (6) 取出经高温处理的样品稀释液,按照常规方法吸取 1ml 于灭菌平皿内,每个稀释度作 2 个平皿;
- [0014] (7) 稀释液移入平皿后,应及时将凉至 $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的牛肉膏蛋白胨固体培养基(可放置水浴锅内保温)注入平皿约 15ml,小心转动平皿使试样与培养基充分混匀。从稀释试样到倾注培养基之间,时间不能超过 15min;
- [0015] (8) 待培养基凝固后,倒置平皿于恒温培养箱内培养 $72 \pm 3\text{h}$ 取出,进行常规的菌落计数和计算,获得该样品中纯芽孢萌发形成的菌数,则可代表该样品的有效活菌数量。
- [0016] 上述步骤 (4) 的恒温水浴的温度为 $75 \sim 100^{\circ}\text{C}$ 。
- [0017] 上述步骤 (5) 的恒温水浴的温度为 $75 \sim 100^{\circ}\text{C}$ 。
- [0018] 上述步骤 (8) 的恒温培养箱温度为 $28 \sim 32^{\circ}\text{C}$ 。
- [0019] 本发明的有益效果是:
- [0020] 1、本发明提供的枯草芽孢杆菌计数结果可代表该样品的有效活菌数量。
- [0021] 2、能保证有效期内产品的质量稳定,保证产品质量。

具体实施方式

- [0022] 下面结合实施例对本发明做进一步的描述。
- [0023] 实施例 1:地衣芽孢杆菌制剂的制备方法,包括下述步骤:
- [0024] (1) 准备采样用的灭菌容器和采样工具,如试管、三角瓶和勺等;
- [0025] (2) 采样,采用 1) 提供的灭菌工具采样。对于饲料多的采不同点的样品,充分混合,取 500g 左右检测,对于小量存贮的采取上、中、下各部位样品混合采样;
- [0026] (3) 用无菌生理盐水对样品进行 10 倍系列稀释,根据饲料卫生标准要求或对试样估计,选择 2 ~ 3 个适宜稀释度一部分进行下一步试验,一部分进行常规方法检测;
- [0027] (4) 将上述稀释液装入三角瓶或试管中,置于 75°C 恒温水浴中进行高温处理 10 分钟;
- [0028] (5) 同时,采用与步骤 4) 中相同的三角瓶或试管,加入与步骤 3) 中的稀释样品同体积的生理水,作为温度处理的参照标准液,置于同一个水浴槽中 75°C 高温处理 10 分钟;
- [0029] (6) 取出经高温处理的样品稀释液,按照常规方法吸取 1ml 于灭菌平皿内,每个稀释度作 2 个平皿;
- [0030] (7) 稀释液移入平皿后,应及时将凉至 $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的牛肉膏蛋白胨固体培养基(可放

置水浴锅内保温) 注入平皿约 15ml, 小心转动平皿使试样与培养基充分混匀。从稀释试样到倾注培养基之间, 时间不能超过 15min;

[0031] (8) 待培养基凝固后, 倒置平皿于 37℃ 恒温培养箱内培养 72±3h 取出, 进行常规的菌落计数和计算, 获得该样品中纯芽孢萌发形成的菌数, 则可代表该样品的有效活菌数量。结果见表 1

[0032] 表 1 两种方法的检测结果

[0033]

检测方法	产品出厂检测	产品储存 6 个月检测
常规方法	$9.51 \times 10^9 \text{cfu/g}$	$1.82 \times 10^9 \text{cfu/g}$
本发明方法	$1.84 \times 10^9 \text{cfu/g}$	$1.80 \times 10^9 \text{cfu/g}$

[0034] 由表 1 所列的结果可以看出:

[0035] 由于产品中含有大量营养体和少量芽孢, 因此在产品出厂时采用常规检测方法, 常测得较高数量的菌数。但是产品经室温保存 6 个月后, 再采用常规方法检测, 则由于产品中大量营养体死亡, 导致活菌数量大幅度下降。此时的检测结果仅为出厂检测结果的 19.14%。数量大幅度下降, 结果表明: 常规方法虽然可以相对测出产品中的活菌总数, 但对于活菌制剂及其制剂的检测, 则存在很大的误差和局限性, 不能真正反映出活菌制剂在有效期内的活菌数量, 会给产品的质量保证和应用带来麻烦, 造成混乱。

[0036] 而根据本发明所检测的结果, 采用高温处理, 提早杀死了产品中营养体, 保证出厂时的检测结果与产品保存 6 个月后的检测数据基本一致, 表明该项方法测定的结果更符合实际情况。

[0037] 根据微生物制剂的要求及枯草芽孢杆菌的生物特性, 采用本发明的检测方法, 可以排除样品内在的干扰, 测定结果更加符合实际情况, 更为准确, 更有得于保证产品的质量和应用效果。