

鸡大肠杆菌生长曲线的研究

林维庆 杨 浩* 薛义山**

(兽医系)

摘要 用改良肉汤 5, 50, 750 ml 连续继代培养鸡大肠杆菌 074, 0107 和 078 三个血清型菌株。在最终使用的肉汤预热至 37℃ 条件下, 测定各菌株不同培养时间的菌落形成单位。以菌数的对数作纵坐标, 培养时间作横坐标, 绘制出各菌株的生长曲线。在本试验条件下, 3 个血清型菌株具有相似的生长模式, 均可划分为 3 个时期, 即速生期、高峰期和稳定期; 各菌株每个生长期所持续的时间大致相同; 在肉汤预热至 37℃ 条件下, 接入经两次继代培养的菌种, 6 h 即达生长高峰。

关键词 生长曲线; 大肠埃希氏杆菌; 鸡

近年来, 鸡的大肠杆菌病在我国广为流行, 给养鸡业造成巨大的经济损失。由于大肠杆菌容易产生抗药性, 给临床用药带来很大困难。作者从 1985 年开始研制灭活菌苗, 用以防制本病。这种灭活菌苗几年来在广东省使用效果良好, 近来广西、浙江和天津等地亦相继使用, 取得较好的社会效益和经济效益。

在灭活菌苗制造过程中, 必须了解大肠杆菌生长繁殖的特点, 何时到达生长的高峰期。只有在高峰期进行灭活, 才能使菌苗含有最高的菌数, 菌苗的质量才有保证。本研究的目的是为最佳灭活时间的确定提供客观的科学依据。

1 材料与方法

1.1 鸡大肠杆菌 074, 0107 和 078 菌株

是作者从广东省的一些鸡场所分离和保存, 血清型经中国兽药监察所鉴定。

1.2 培养基

1.2.1 改良肉汤 在牛肉浸液培养基(制法见参考文献 3 第 30 页)中加入肉汤量 0.1% 的磷酸氢二钾 (K_2HPO_4), 接入菌种前在培养箱中预热至 37℃, 并按肉汤量的 1% 加入浓度为 20% 的灭菌乳糖溶液和肉汤量 0.1% 的市售复合维生素 B 溶液(注射剂)。

1.2.2 普通琼脂平板 制法见文献 3 第 32 页。

1.3 方法

将一接种环的菌种接入 5 ml 肉汤中, 37℃ 培养 24 h 后, 倾入 50 ml 肉汤中, 培养一天后倾入 750 ml 肉汤中, 此一时间为 0。分别于接种后不同时间, 抽取菌液以生理盐溶液作连续 10 倍稀释, 每一稀释度用两个普通琼脂平板测定其菌落形成单位(colony forming unit, 简称 CFU), 每一平板接入 0.1 ml, 37℃ 培养 24 h 计算菌数, 取两个平板的平均值。

* 现在广东省饲料牧草公司工作

** 现在深圳市养鸡公司工作

1991-07-19 收稿

2 试验结果

2.1 074, 0107 和 078 三个血清型菌株不同生长时间的 CFU 测定结果如表 1 所示。

表 1 三个菌株不同生长时间的 CFU 值 (单位: 亿菌/ml)

生长时间 (h)	0	2	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15	17	19	21	23	24
074	2.5	3.5	10.5	ND	20	7.5	7	5.5	8	8.5	ND	8	7	3.5	5.5	3	5
0107	10	5.5	7	9	21.5	10	11	8	8	7.0	8.5	9.5	12	11.5	9	12	11.5
078	ND	8	22	22	39	26	22	25	27	23	23	22.5	20.5	23	24	25	25

ND: 未做

2.2 以 CFU 的对数作纵坐标、生长时间作横坐标, 画出 074, 0107 和 078 三个血清型菌株的生长曲线, 如图 1 所示。

2.3 在培养肉汤预热至 37℃ 条件下, 本试验所用大肠杆菌 074, 0107 和 078 三个血清型菌株的生长曲线可划分为 3 个时期, 即速生期、高峰期和稳定期。各个生长期的 CFU 值及持续时间如表 2 所示。

表 2 三个菌株各个生长期的 CFU 值 (亿菌/ml) 及持续时间 (h)

菌株及持续时间	074	0107	078	持续时间 (h)
速生期	2.5~20	5.5~21.5	8~39	6
高峰期	20	21.5	39	1~2
稳定期	3~8.5	7~12	20.5~26	18

3 讨论

3.1 细菌生长的测定方法有直接测定法和间接测定法两种, 每种方法中又有若干不同的具体方法^[4,6]。本试验采用平皿法直接计算活菌, 由于每一活菌生成一个菌落, 故 CFU 代表了单位容量菌液中所含有的活菌数, 这是较为简便、准确的一种测定法。

3.2 一定数量的细菌, 接种于合适的液体培养基中, 在适宜的温度下培养时, 其生长过程具有一定的规律性。以菌数的对数作纵坐

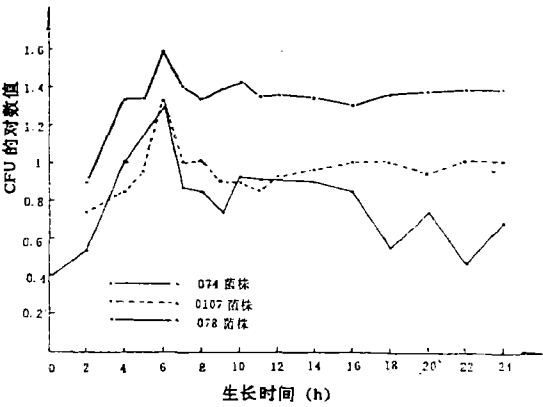


图 1 074, 0107, 078 菌株的生长曲线

标, 生长时间作横坐标, 画得的曲线即为生长曲线。对细菌生长规律的了解和认识。可以用以指导生产实践, 本试验的目的主要是通过对生长曲线的研究, 了解大肠杆菌的生长何时达到高峰期, 以确定最佳的灭活时间, 使菌液中含有最高菌数, 从而使制造出来的菌苗含有最高的抗原量, 菌苗的质量更有保证。

3.3 有关细菌生长的分期,各家学者主张不同。如有主张分为最初静止期、缓慢生长期、对数繁殖期、静止期(或成熟期)和老年期(或衰落期)5个期的^[2],有分为适应期(或停滞期)、对数期、稳定期和衰落期4个期的^[1],或分为滞留适应期、对数生长期、最高生长期和衰亡期4个期的^[4],更有分为潜伏期(或原始稳定期)、迟滞期、对数生长期、负增殖期、平衡期、死亡增长期和对数死亡期7个期的^[6],甚或分为诱导期、加速增殖期、对数期、增殖下降期、静止期、加速死亡期、死亡期和存活期8个期的^[3]。我们认为以划分为4个时期的较为恰当。

3.4 从接种细菌起至细菌分裂达到恒定的最高速度止,一般称之为调整期。影响调整期长短的因素除接种细菌的数量外,还与细菌本身的性质有关,例如大肠杆菌比其它如棒状杆菌和分枝杆菌的调整期要短,又细菌被接种至适宜的培养基,能迅速适应新的环境,调整期因而缩短^[4]。本试验因所用的细菌为大肠杆菌,肉汤配方经改良更适宜细菌生长,以及肉汤已预热等,使生长曲线的初始阶段即滞留适应期大为缩短,且表现不明显。

3.5 在本试验的条件即培养肉汤预热至37℃的情况下,大肠杆菌的生长曲线可分为速生期、高峰期和稳定期,其持续时间速生期为6h,高峰期为1~2h,稳定期为18h;因本试验主要目的是测定大肠杆菌生长至高峰期所需的时间,故未测至衰落期;又本试验使用3个不同血清型菌株,但其生长曲线基本相似,即大肠杆菌并不因菌株的不同而生长模式有异。

3.6 大肠杆菌的生长繁殖速度较快,约17 min^[4]至20 min^[1,2]或30 min^[2]即可繁殖一代,故生长至高峰期所需时间亦较其它一些细菌为短。本试验表明,在培养肉汤预热至37℃的条件下,接入的大肠杆菌可于6h生长至高峰,此时加入灭活剂进行灭活可使菌液中含有最高的细菌数,这样制造出来的菌苗,其质量就有保证。此外,灭活最佳时间的确定,还可大大缩短菌苗制造周期,加速菌苗生产,从而提供更多的菌苗供防治本病使用。

3.7 为了能培养出更多的大肠杆菌,几年来通过不断试验对肉汤成分作了一些改进。本试验所测得的CFU值较日常制苗测得者为低,其原因可能是此次所用肉汤的高压时间较一般长,影响了其中的营养成分所致,但对生长曲线的测定则影响不大。

致谢 本文承广东省畜牧兽医学会畜禽疾病防治研究会理事长黄引贤教授审阅,谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 甘肃农业大学主编. 兽医微生物学. 北京: 农业出版社, 1980. 33~35
- 2 华南农学院、内蒙古农牧学院主编. 畜牧微生物学(第二版). 北京: 农业出版社, 1985. 24~26
- 3 汪诚天等编著. 兽医实验检验手册. 上海: 科技出版社, 1984. 30, 32
- 4 陈华葵, 樊庆笙主编. 微生物学. 北京: 农业出版社, 1979. 88~92
- 5 尾形学等合著, 龚人雄译. 家畜微生物学(新版). 北京: 农业出版社, 1982. 18~21
- 6 张宽厚主编. 细菌生理学. 北京: 人民卫生出版社, 1962. 64~73

STUDY ON GROWTH CURVE OF ESCHERICHIA COLI OF CHICKEN

Lin Weiqing Yang Hao Xue Yishan

(Department of Veterinary Medicine)

Abstract Three serotype strains (074, 078 and 0107) were serially cultured in 5, 50 and 750 ml of modified broth. With the final broth prewarmed to 37℃, the colony forming units of each strain were determined at different intervals after inoculation. Using the logarithm of bacteria number as ordinate and culture time as abscissa, growth curves were drawn. Under these experimental conditions, the three serotypes showed the same growth mode, with accelerated growth phase, peak phase and stationary phase, the time being about same for each phase of the different strains. Escherichia coli serially subcultured two times grew to peak at 6 hours when it was inoculated in broth prewarmed to 37℃.

Key words Growth curve; Escherichia coli; Chicken