

奶牛舍环境中气载微生物含量的检测

刘敬博¹, 柴同杰¹, 苗增民¹, 周玉法², 刘东燕², 李明勇³

(1 山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271018; 2 泰安市岱岳区畜牧局, 山东 泰安, 271000;

3 青岛康大欧洲兔业育种有限公司, 山东 青岛, 266400)

【摘要】 【目的】准确地定量奶牛舍环境中气载微生物(细菌和真菌)的含量,并评估其健康风险。【方法】利用国际标准的 AGI-30 空气采样器,以无菌生理盐水为采样介质,收集奶牛舍空气样品,分别用培养计数法和 4,6-联脒-2-苯基吲哚(DAPI)染色法,对奶牛舍环境中气载微生物含量进行计数,比较两种方法的差异,并对气载微生物潜在危害进行评估。【结果】培养计数法测得奶牛舍内气载微生物含量为 $1.14 \times 10^5 \sim 8.32 \times 10^6$ CFU/m³,而 DAPI 染色法为 $9.3 \times 10^5 \sim 5.93 \times 10^7$ CFU/m³,DAPI 染色法所测气载微生物含量约是培养计数法的 7~733 倍。以染色法测得的奶牛舍内气载微生物含量计算,人与奶牛每 min 吸入的微生物量分别为 1.58×10^5 CFU 和 3.29×10^6 CFU。【结论】染色计数法更能客观地反映环境中的气载微生物含量,有助于对环境的健康风险进行科学评估。

【关键词】 奶牛舍;气载微生物;培养计数法;DAPI 染色法

【中图分类号】 S851.2⁺4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)05-0056-05

Concentration detection of airborne microbes in cow environments

LIU Jing-bo¹, CHAI Tong-jie¹, MIAO Zeng-min¹, ZHOU Yu-fa²,

LIU Dong-yan², LI Ming-yong³

(1 College of Animal Science, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China;

2 Farming Bureau of Daiyue District in Taian City, Tai'an, Shandong 271000, China; 3 Qingdao Kangda-Eurolap Rabbit

Selecion Limited Company, Qingdao, Shandong 266400, China)

Abstract: 【Objective】 The research was conducted to quantify the concentrations of airborne microbes (bacteria and fungi) in cow houses and assess health risks. 【Method】 Air samples of cow environments were collected by international AGI-30 using sterile saline water as sampling media; the concentrations of airborne microbes were counted by culture counting method and 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)-staining counting method, respectively. The differences between the two methods were compared. 【Result】 According to counting grown colonies, the concentrations of cow houses were within a range of $1.14 \times 10^5 - 8.32 \times 10^6$ CFU/m³. The direct counting concentrations were between $9.3 \times 10^5 - 5.93 \times 10^7$ CFU/m³. The results of DAPI-staining counting method were about 7—733 times higher than those of culture counting method. Based on the concentration of DAPI-staining counting method, the airborne microbes inhaled by a person and a cow were 1.58×10^5 CFU/min and 3.29×10^6 CFU/min, respectively. 【Conclusion】 DAPI-staining counting method could reflect the accurate concentrations of airborne microbes in the environment, and assess health risks scientifically.

Key words: cow house; airborne microbe; culture counting method; DAPI-staining method

* [收稿日期] 2009-11-09

[基金项目] 2009 年国家国际合作项目“动物疫源性人畜共患病的监测”(2009DFA32890)

[作者简介] 刘敬博(1983—),男,山东阳谷人,在读硕士,主要从事环境微生物学及其病原学研究。

E-mail: liujb19840202@163.com

[通信作者] 柴同杰(1957—),男,山东德州人,教授,博士生导师,主要从事环境微生物与分子细菌学研究。

E-mail: chaitj117@163.com

畜禽养殖环境中的微生物及其代谢产物形成的气溶胶不仅能导致环境污染,影响畜禽的健康及生产能力,而且还会导致气源性传染病的流行^[1]。随着养殖业的迅猛发展,越来越多的养殖场采用高密度的养殖模式,在这种高密度饲养环境下,空气微生物更容易蓄积,甚至导致疾病的发生和流行,特别是呼吸道感染^[2]。例如:1984 年北京某鸡场一次微生物气溶胶引起的呼吸道传染病致使 31 万只鸡发病,发病率达 41%,病死率 30%,产蛋率由 80%下降至 19%^[3];马舍环境中高浓度的真菌气溶胶会引起马的慢性阻塞性肺病(Chronic obstructive pulmonary disease,COPD),而且这种疾病会随着真菌气溶胶浓度的升高而加重^[4];同时高浓度的微生物气溶胶还与养殖人员的呼吸道过敏和哮喘症状相关^[5-6]。大量事实表明,不论是高浓度的细菌还是真菌气溶胶都会污染空气,直接或间接影响人和畜禽的健康。

目前,人们对环境微生物气溶胶的检测以培养计数法为主,以一些相关的分子生物学技术为辅,如荧光原位杂交(FISH),或更直接的定量 PCR 技术等^[7-10]。但这些方法都存在诸多不足,如培养计数法只能检测活的微生物,而且还会受到培养基种类、采样器类型以及采样时间等诸多因素的影响。研究表明,仅有 0.3%~10% 的微生物可被培养计数^[7,11-13];分子生物学的相关方法,由于其操作复杂,费用高昂而很难在生产实际中得到广泛应用。4,6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI)染色法被认为是一种标准的测定浮游细菌总生物量的方法,而且操作简便,计数准确^[14-16]。近年来,我国奶牛养殖业呈现高速增长的趋势,奶牛存栏量由 1978 年的 48 万头增加到 2000 年的 456.1 万头,2007 年达 1 470 万头^[17]。因此,准确监测奶牛养殖环境中气载微生物含量,对牛场的管理具有重要指导意义。本研究以山东省某大型奶牛场为研究对象,分别采用培养计数法和 DAPI 染色法测定奶牛场环境中气载微生物(细菌和真菌)的含量,并对其结果进行分析和评估,以期对奶牛场的日常管理提供参考。

1 材料与方法

1.1 奶牛舍情况

研究于 2009-03 在山东省某大型奶牛场随机选择 2 栋结构相同的奶牛舍(A 和 B)(200 m×30 m×3.5 m)进行空气样品采集。奶牛舍均以机械通风为主,每栋存养 400 头黑白花高产奶牛,每天进行 1

次粪便清理。

1.2 空气样品的采集

将国际标准的 AGI-30 空气采样器置于奶牛舍中央,距地面 1.4 m 左右,以 50 mL 的无菌生理盐水为采样介质采集空气样品,采样时气流速度为 12.5 L/min,驱动时间为 10 min^[18]。每栋奶牛舍采集 5 个样品,采样的同时记录舍内相关气象指标(表 1)。

表 1 采样时奶牛舍 A、B 的气象指标
Table 1 Meteorological indexes of cow houses A and B at sampling

奶牛舍 Cow house	温度/℃ Temperature	相对湿度/% Relative humidity	风速/(m·s ⁻¹) Wind speed
A	18	65	2.3
B	20	67	1.8

1.3 空气样品处理

1.3.1 培养法计数 取 25 mL 空气采样液轻轻摇匀,然后均匀分成 3 份,1 份以含体积分数 5% 绵羊血的营养琼脂为培养基,用于需氧细菌培养;另 1 份以含体积分数 5% 绵羊血的营养琼脂为培养基,用于厌氧细菌的培养;第 3 份以沙保弱为培养基,用于真菌培养,以上每个样品各重复 3 次。细菌在 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24~48 h 后计数,真菌在 25 ℃ 恒温培养箱中培养 3~7 d 后计数。校正后计算气载微生物(细菌和真菌)含量(CFU/m³)。

1.3.2 DAPI 染色法计数 将剩余的 25 mL 空气采样液放入 50 mL 玻璃瓶中(该瓶先经过铬酸浸泡,后经高压灭菌处理),随即加入 5 mL 福尔马林,再加入 7.5 mL DAPI 染液(20 μg/mL),然后置于暗室中染色 10 min,最后在小于 7 092.75 Pa 的条件下用硝酸纤维滤膜(经苏丹黑 B 染液浸泡 4 h 以上,使其变黑)对采样液进行抽滤。抽干后将硝酸纤维滤膜取出,置于滴有镜油的载玻片上进行计数,每 1 个细胞代表 1 个气载微生物(CFU/m³)^[19]。

1.4 气载微生物潜在危害的评估

气载微生物到达人和动物呼吸系统的含量,以每 min 吸入的气载微生物的量表示,即人或牛的呼吸量(m³/min)乘以奶牛舍内气载微生物含量的平均值。

1.5 数据分析

采用 SPSS11.5 软件和 Excel2007 对试验数据进行方差分析及差异性比较。

2 结果与分析

2.1 不同方法测得的奶牛舍内气载微生物含量

培养计数法所测的 A 和 B 奶牛舍内气载微生物

物(细菌和真菌)含量的平均值分别为 2.09×10^5 和 5.92×10^5 CFU/m³, 分别是 DAPI 染色计数法的 2.50% 和 1.59% (表 2)。统计学分析结果表明, DAPI 染色计数法测得的奶牛舍内气载微生物含量与培养计数法相比, 差异极显著 ($P < 0.01$)。

染色结果在荧光显微镜下观察, 每个视野中被

染色的微生物为 50~60 个(图 1), 符合荧光染色的计数要求(30~60, 微生物数量过多或过少都会造成计数的偏差)。DAPI 染色法所测的 A 和 B 奶牛舍内气载微生物含量的平均值分别为 8.36×10^6 和 3.73×10^7 CFU/m³ (表 2)。

表 2 不同方法测得的奶牛舍内气载微生物含量

Table 2 The concentrations of airborne microbes in two cow houses

奶牛舍 Cow house	培养计数法/($\times 10^5$ CFU $\cdot$ m ⁻³) Culture counting			DAPI 染色法/($\times 10^6$ CFU $\cdot$ m ⁻³) DAPI-staining		
	平均值 Mean	最大值 Max	最小值 Min	平均值 Mean	最大值 Max	最小值 Min
A	2.09	3.08	1.14	8.36	15.70	0.93
B	5.92	83.20	3.07	37.30	59.30	10.40

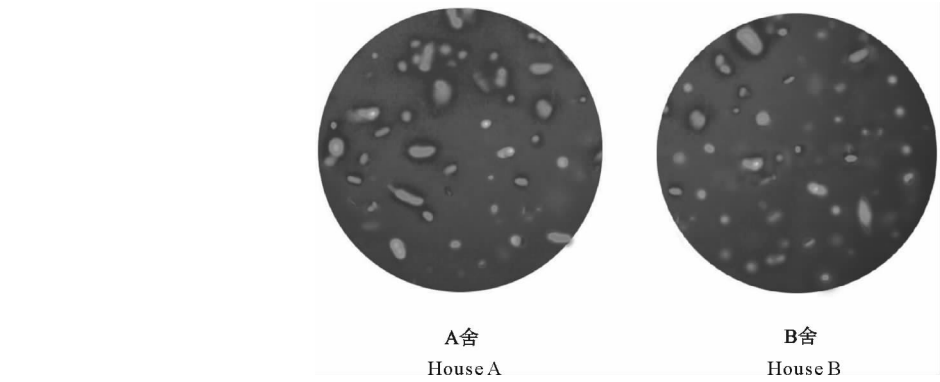


图 1 奶牛舍内气载微生物 DAPI 染色法的某个视野(1 000 $\times$)

DAPI 荧光染料在波长 $n=365$ nm 时的吸光值最大, 视野直径 $D=15$ μ m

Fig.1 The counting results of airborne microbes after DAPI-staining in two cow houses(1 000 $\times$)

Maximal absorbance of DAPI at the wavelength of 365 nm, vision diameter $D=15$ μ m

2.2 气载微生物的吸入量

以气载微生物含量的平均值为标准, 按照人的呼吸量 6.94×10^{-3} m³/min^[20], 牛的通气量 1.44×10^{-1} m³/min^[21] 计算, 人在奶牛舍中每 min 吸入的微生物量分别为 2.78×10^3 CFU(培养计数法)和 1.58×10^5 CFU(DAPI 染色法); 奶牛每 min 吸入的微生物量分别为 5.77×10^4 CFU(培养计数法)和 3.29×10^6 CFU(DAPI 染色法)。

3 讨 论

3.1 培养计数法与 DAPI 染色法的比较

培养计数法是目前国内外检测微生物气溶胶应用最广泛的方法。段会勇等^[22]对兔舍环境、柴同杰等^[23]对鸡舍环境气溶胶的研究均用培养计数法来测定气载需氧菌含量。但是培养计数法依赖于微生物的可培养性。首先, 不是所有的微生物都能够在培养基上生长, 且不同微生物有不同的生长要求, 例如国际上检测空气真菌的标准培养基 MEA(Malt

Extract Agar)就不适合于嗜干性真菌的生长^[24-25]; 其次, 微生物气溶胶在采样过程中很容易失活, 从而无法在培养基上形成菌落; 第三, 空气中许多微生物已经死亡, 但其细胞成分仍然能够导致过敏或引起中毒, 这部分气溶胶也无法通过培养计数法测定^[26]。所以培养计数法常常低估空气中生物气溶胶总量^[27]。

DAPI 染料能够特异性地结合到双链 DNA 上, 当其处在 365 nm 的紫外光下会发出蓝色荧光。依据此特性, Jeppe 等^[28]、Daniel 等^[29]、Kjell 等^[30] 在相关的研究中都以 DAPI 染色法测定微生物总含量。本试验经 DAPI 染色所测的 2 栋奶牛舍内气载微生物含量是培养法的 7~733 倍。这与 Andreas 等^[19]对垃圾场周围气载微生物含量的研究结果基本一致, 但远远高于室内、医院等公共场所^[31]。

3.2 奶牛舍内气载微生物吸入量的风险评估

气载微生物在空气中随着呼吸能进入人、动物的呼吸系统, 并在不同部位沉积, 在环境条件改变和

动物体抵抗力下降时,容易造成呼吸道感染,尤其在气载微生物含量高的环境中,更容易对人及动物健康构成威胁。研究人员一致认为,特定职业环境中高含量微生物气溶胶的长期暴露增加了呼吸道疾病的风险^[32-33]。在国外,关于畜禽舍环境与人类和动物健康方面的研究很多,如 Crowe 等^[34]、Urbain 等^[35]、Whyte 等^[36]都曾经指出,空气质量状况会影响人及动物的健康,空气质量状况很差会导致人和动物发生一些疾病,主要是呼吸道疾病、免疫力下降等,特别是空气中微生物及其代谢产物(内毒素、氨、硫化氢等),是影响人和动物健康的潜在因素,而国内的相关研究报道较少。因此,本研究根据人和奶牛的呼吸量以及奶牛舍内气载微生物含量的平均值,来估算人和奶牛每 min 吸入气载微生物量,从而为奶牛场的环境控制以及制订相应的消毒措施提供参考依据。

综上所述,与传统的培养计数法相比,DAPI 染色法更能准确客观地定量奶牛舍内气载微生物含量,为奶牛场的科学管理提供更准确的依据。尽管在采样过程中未观察到人和奶牛的异常表现,但是长期暴露于这种环境中无疑会给人和动物的健康构成威胁。因此,关注环境卫生是健康养殖的重要环节。

[参考文献]

- [1] Gross W B. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry [C]// Gyles C L. *Escherichia coli* in domestic animals and Humans. Wallingford: CAB International, 1994: 237-259.
- [2] Donaldson A. Airborne spread of foot-and-mouth disease [J]. *Microbiol Today*, 1999, 26: 118-119.
- [3] 赵红梅. 微生物气溶胶对畜牧业生产的影响 [J]. *畜牧兽医杂志*, 2001, 20(4): 16-28.
Zhao H M. Effect of microbiological aerosol on the production of animal husbandry [J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2001, 20(4): 16-18. (in Chinese)
- [4] Robinson N E, Derksen F J, Olzeweski M A, et al. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses [J]. *Br Vet*, 1996, 152(3): 283-306.
- [5] Ostro B, Lipsett M, Braxton H, et al. Air pollution and exacerbation of asthma in African-American children in Los Angeles [J]. *Epidemiology*, 2001, 12(2): 200-208.
- [6] Ross M A, Curtis L, Scheff P A, et al. Association of asthma symptoms and severity with indoor bioaerosols [J]. *Allergy*, 2000, 55(8): 705-711.
- [7] Kent A D, Triplett E W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2002, 56: 211-236.
- [8] Neef A, Schafer R, Beimfohr C, et al. Fluorescence based rRNA sensor system for detection of whole cells of *Saccharomonospora* spp. and *Thermoactinomyces* spp. [J]. *Biosens Bioelectron*, 2003, 18: 565-569.
- [9] Neef A, Amann R, Schleifer K H. Detection of microbial cells in aerosols using nucleic acid probes [J]. *Syst Appl Microbiol*, 1995, 18: 113-122.
- [10] Palmgeren U, Strom G, Blomquist G, et al. Collection of air-borne microorganisms on nucleopore filters, estimation and analysis-CAMNEA method [J]. *Appl Bacteriol*, 1986, 61: 401-406.
- [11] Amann R, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbial Rev*, 1995, 59: 143-169.
- [12] Horner M C, Carney K M, Bohannon B J. An ecological perspective on bacterial biodiversity [J]. *Proc R Soc Lond B*, 2004, 271: 113-122.
- [13] Kaeberlein T, Lewis K, Epstein S S. Isolating uncultivable microorganisms in pure culture in a simulated natural environment [J]. *Science*, 2002, 296: 1127-1129.
- [14] Kepner R L, Pratt J R. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present [J]. *Microbiol*, 1994, 58: 603-615.
- [15] Porter K G, Feig Y S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora [J]. *Limnol Oceanogr*, 1980, 25: 943-948.
- [16] Zimmermann R, Meyer R. A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters [J]. *Kiel Meeresforsch*, 1974, 30: 24-27.
- [17] 孙玉娟, 张会玲, 吴慧娟. 我国奶牛养殖业发展中存在的几个问题 [J]. *河北理工大学学报: 社会科学版*, 2009, 9(5): 59-62.
Sun Y J, Zhang H L, Wu H J. Problems exists in cow livestock-raising development in our country [J]. *Journal of Hebei Polytechnic University: Social Science Edition*, 2009, 9(5): 59-62. (in Chinese)
- [18] Lin X, Willeke K, Ulevicius V, et al. Effect of sampling time on the collection efficiency of all-glass impinge [J]. *AIHA J*, 1995, 58: 480-488.
- [19] Andreas A, Reinhard W, Bernzen U, et al. Detection of air-borne microbes in a composting facility by cultivation based and cultivation-independent methods [J]. *Ann Agric Environ Med*, 2007, 14: 81-85.
- [20] 车风翔, 于玺华. 空气微生物采样理论及其技术应用 [M]. 北京: 中国大百科全书出版社, 1998: 15.
Che F X, Yu X H. Sampling theory and application technology of air microbes [M]. Beijing: Chinese Encyclopedia Publishing Press, 1998: 15. (in Chinese)
- [21] 杨秀平, 肖向红, 周洪琪, 等. 动物生理学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 136.
Yang X P, Xiao X H, Zhou H Q, et al. Animal physiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2002: 136. (in Chinese)
- [22] 段会勇, 王磊, 柴同杰. 兔舍内气载需氧菌和气载葡萄球菌

- 的检测 [J]. 家畜生态学报, 2005, 26(4): 96-99.
- Duan H Y, Wang L, Chai T J. Detection of airborne aerobic bacterial and airborne staphylococcus in two rabbit stables [J]. Acta Ecologiae Animalis Domastici, 2005, 26(4): 96-99. (in Chinese)
- [23] 柴同杰, 赵云玲, 刘 辉, 等. 禽舍微生物气溶胶含量及其空气动力学研究 [J]. 中国兽医杂志, 2001, 37(3): 9-11.
- Chai T J, Zhao Y L, Liu H, et al. Studies on the concentration and aerodynamic diameters of microbiological aerosol in the poultry house [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2001, 37(3): 9-11. (in Chinese)
- [24] Crook B, Shewrood H L. Sampling and assay of bioaerosols in the work environment [J]. J Aerosol Sci, 1997, 28(3): 417-426.
- [25] Wu P C, Su H J, Ho H M. A comparison of sampling media for environmental viable fungi collected in a hospital environment [J]. Environ Res Section, 2000, A82: 253-257.
- [26] Dillon H K, Miller J D, Sorenson W G, et al. Review of methods applicable to the assessment of mold exposure to children [J]. Environ Health Persp, 1999, 107(Suppl 13): 473-480.
- [27] Sebastian A, Larsson L. Characterization of the microbial community in indoor environments: a chemical-analytical approach [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(6): 3103-3109.
- [28] Jeppe L N, Stefan J, Michael W, et al. Abundance and phylogenetic affiliation of iron reducers in activated sludge as assessed by fluorescence in situ hybridization and microautoradiography [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(9): 4629-4636.
- [29] Daniel P G, James C, Michael S, et al. New method for estimating bacterial cell abundances in natural samples by use of sublimation [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(10): 5923-5928.
- [30] Kjell A H. Rapid and simple method for double staining of bacteria with 4, 6-Diamidino-2-Phenylindole and fluorescein isothiocyanate-labeled antibodies [J]. Appl Environ Microbiol, 1988, 54(12): 2949-2952.
- [31] 徐幼云. 环境卫生工作手册 [M]. 修订版. 北京: 人民卫生出版社, 1992.
- Xu Y Y. Environmental workbook [M]. Rev ed. Beijing: People's Sanitary Press, 1992. (in Chinese)
- [32] Büniger J, Antlauf-Lammers M, Schulz T G, et al. Health complaints and immunological markers of exposure to bioaerosols among biowaste collectors and compost workers [J]. Occup Environ Med, 2000, 57: 458-464.
- [33] Mahmoudi M, Gershwin M E. Sick building syndrome III *Stachybotrys chartarum* [J]. Asthma, 2000, 37(2): 191-198.
- [34] Crowe C K, Harris D L, Elliott L P, et al. A possible relationship between low facility dust and endotoxin levels and improved growth rates in pigs reared by Isowean (SM) [J]. Swine Health and Production, 1996, 4(5): 231-236.
- [35] Urbain B, Prouvost J F, Beerens D, et al. Chronic exposure of pigs to airborne dust and endotoxins in an environmental chamber: technical note [J]. Vet Res, 1996, 27(6): 569-578.
- [36] Whyte T R, Williamson P A, Lacey J, et al. Air pollutant burdens and respiratory impairment of poultry house stockmen [C]. Coventry, UK: Livestock Environment IV Proceedings of a conference, 1993: 709-717.