

# 国家细菌浊度标准的改进

## ——一种新型细菌浊度标准的研究

薛平 黄建 乔莱艳 许红李

(中国药品生物制品检定所,北京)

**摘要** 本文报道了一种新研制的细菌浊度标准(简称新制标准),并对新制标准和现用国家细菌浊度标准(简称现用标准)的稳定性进行了比较。结果表明以丙二酸二乙酯(DM)-玻璃粉制成的新制标准的稳定性明显高于以水-玻璃粉制成的传统的现用标准。经 15 磅、30 分钟热处理后,现用标准的 O.D 值(425nm)变化是新制标准的 4.5 倍,浊度(H)值的变化是 2.2 倍。放置 2 年后,现用标准的浊度值降低 12.4%,而新制标准仅降低 2.7%。用新制标准测定 33 种细菌的标准菌数与现用标准测定的相同。由此说明新制标准完全可以替代现用标准。本文还对细菌浊度标准稳定性的机理进行了探讨。

**关键词** 新型细菌浊度标准;丙二酸二乙酯(DM)-玻璃粉

细菌浊度标准是一种通过肉眼来测定细菌浓度的工具,因具有快速、简便、较为准确等特点而被广泛应用于许多领域<sup>[1]</sup>,在中国、美国、苏联、丹麦、日本等国所用的标准均采用水-玻璃粉体系,而水对玻璃粉有较大的侵蚀作用<sup>[2]</sup>,故其稳定性较差,有效期短。如中国常用的细菌浊度标准有效期仅一年。所以寻找一种稳定的标准就成为国内外从事标准化研究的一项重要课题。早在 1972 年 Perkins 等<sup>[3]</sup>曾用有机玻璃制成了固体的细菌浊度标准,其稳定性得到了提高。但该固相标准用于测定液相的细菌悬液时,由于物相的不同,二者的折光率和透光率都有极为显著的差异。而且固相标准还出现放大现象,使测定结果发生较大的误差<sup>[4]</sup>。本文以丙二酸二乙酯(DM)代替水,建立了 DM-玻璃粉体系,不仅使细菌浊度标准的稳定性有了明显提高,同时还弥补了固相细菌浊度标准的不足。

### 材料和方法

1. 丙二酸二乙酯(Diethyl Malonate, DM): 北京化工厂产品,批号 860224。无色透明液体,比重 1.055,折光率 1.4062,熔点 -51.5℃,沸点 199.3℃,无毒。

2. 高硼硅 17 仪器玻璃(GG-17): 上海玻

璃仪器厂生产。抗水、抗酸、抗碱性能达到 I 级。

3. 国家细菌浊度标准(现用标准): 采用双蒸馏水-GG-17 玻璃粉悬液,由中国药品生物制品检定所制造。

4. 改进的细菌浊度标准(新制标准): 新制标准的制备,参照了黄建<sup>[4]</sup>、Seligmann<sup>[5]</sup>、陈宗淇<sup>[6]</sup>、Maaloe<sup>[7]</sup>和 Spaun<sup>[8]</sup>等方法进行的。制备过程如下:称取 200g GG-17 玻璃块,经蒸馏水洗净,烘干(105℃,1 小时),乳钵捣碎,放入 3000ml 立瓶中,同时注入 500ml DM,振荡(振幅 35mm,频率 200 次/min)20 小时,4℃静置过夜,装入滤柱(30 × 80mm),室温过夜,使其自然沉降 DM-GG-17 玻璃悬液中的玻璃大颗粒(直径 > 3μm)沉在下层,微小颗粒(直径 < 1μm)存留在最上层。弃去上下层的颗粒,取其颗粒大小如同细菌的中层悬液(下称母液),参照 Fischer<sup>[9]</sup>和 Dixon<sup>[10]</sup>的方法,利用显微镜测量其中颗粒的大小(近于细菌大小),共测量颗粒 300 个以上。再用 DM 对母液进行稀释(1:1.90),直至目测比浊与现用标准相同,最后分装于 60 支比浊管(10 × 140mm)内,每支装量 4mm,熔封。即制成新制标准管。

5. 新制标准和现用标准的稳定性比较:

(1) 新制标准管和现用标准管各取 10 支

经 15 磅 30 分钟热处理后, 进行分光测定和浊度测定。再各取一支作为对照。

(2) 将新制标准管和现用标准管置 4℃ 保存 2 年后, 测定其浊度变化。

(3) 用显微镜计数法检验用两种浊度标准测定的 33 种细菌的标准菌数。

结果和讨论

(一) 新制标准母液中玻璃粉颗粒的组织分布(图 1)

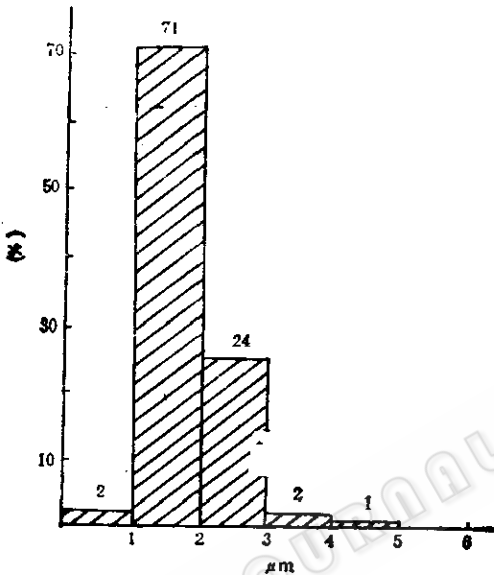


图 1 玻璃粉颗粒组织分布图  
(颗粒平均直径  $\bar{x} = 1.87\mu\text{m}$ , 标准差  $\sigma_s = 0.89$ , 颗粒数  $n = 318$ )

图 1 结果说明, 经显微镜测量筛选后的玻璃粉颗粒大小基本同于细菌, 分布是集中的离散程度很低。由于细菌浊度标准是测定细菌浓度的工具, 因此要求母液中玻璃粉颗粒大小和组织分布都必须近似于细菌, 而且颗粒的大小均匀和集中分布是决定细菌浊度标准稳定性的基本条件。由此看来, 将待测样品装入滤柱, 再用显微镜测量筛选所要求的颗粒, 这一方法是较好可行的。

(二) 新制标准和现用标准的比较

1. 热处理对两种标准 OD 值的影响(表 1)  
对表 1 结果进行 t 测验:

表 1 热处理对新制标准和现用标准 O. D 425nm 的影响

样品号	现用标准			新制标准		
	处理前 (对照)	处理后	降低值*	处理前 (对照)	处理后	降低值*
1		0.668	0.074		0.676	0.017
2		0.684	0.058		0.675	0.018
3		0.678	0.064		0.676	0.017
4		0.675	0.067		0.682	0.011
5		0.685	0.057		0.681	0.012
6	0.742	0.676	0.066	0.693	0.684	0.009
7		0.672	0.070		0.686	0.007
8		0.684	0.058		0.671	0.022
9		0.674	0.068		0.680	0.013
10		0.671	0.071		0.675	0.018
平均 ( $\bar{x}$ )			0.0653			0.0144

标准误  $S\bar{d} = 0.00270596$

\* 降低值=处理前-处理后

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S\bar{d}} = \frac{0.0653 - 0.0144}{0.00270596} = 18.81$$

查 t 表,  $t = 18.81 > t_{0.01} = 3.25$ , 这一结果说明两种标准经同一条件 (15 磅 30 分钟) 处理后有极显著差异。现用标准的 O. D 值平均降低 0.0653, 而新制标准的 O. D 值平均降低 0.0144。现用标准的 O. D 值变化是新制标准的

表 2 浊度计测定 15 磅 30 分钟热处理对新制标准、现用标准浊度 (H) 值的影响

样品号	现用标准			新制标准		
	处理前 (对照)	处理后	降低值*	处理前 (对照)	处理后	降低值*
1		13.8	1.5		17.7	1.0
2		14.1	1.2		18.2	0.5
3		13.6	1.7		18.4	0.3
4		14.1	1.2		17.3	1.4
5		14.2	1.1		18.0	0.7
6	15.3	13.5	1.8	18.7	18.6	0.1
7		14.0	1.3		18.0	0.7
8		14.1	1.2		18.1	0.6
9		13.5	1.8		18.0	0.7
10		13.9	1.4		18.3	0.4
平均 ( $\bar{x}$ )			1.42			0.64

标准误  $S\bar{d} = 0.17$

\* 降低值=处理前-处理后

4.5 倍。说明新制标准比现用标准稳定。

2. 热处理对两种标准浊度 (H) 值的影响  
(表 2)

对表 2 结果进行 t 测验:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s\bar{d}} = \frac{1.42 - 0.64}{0.17} = 4.588$$

查 t 表,  $t = 4.588 > t_{0.01} = 3.25$ , 说明两种标准经同一条件 (15 磅 30 分钟) 热处理后, 有极显著差异。现用标准的浊度 (H) 值平均降低 14.2, 而新制标准平均降低 0.64, 现用标准经处

表 3 两种标准保存 2 年后浊度 (H) 值  
变化情况

样 品	初始H值	2 年后H值	H 值下降率(%)
现用标准	15.3	13.4	12.4
新制标准	18.7	18.2	2.7

理后的浊度 (H) 值变化是新制标准的 2.2 倍, 也说明新制标准比现用标准稳定。

3. 保存 2 年后的两种标准浊度 (H) 值变化  
比较(表 3)

从表 3 结果看, 两种标准管保存 2 年后, 新

表 4 各种细菌用新制标准和现用标准测定的标准菌数

菌 名	标准菌数 (10 <sup>8</sup> /ml)
<i>Azotobacter</i> sp. 固氮菌	0.4
<i>Bacillus anthracis</i> Cohn 炭疽芽孢杆菌	0.5
<i>Bacillus mycoides</i> Flugge 芽状芽孢杆菌	1
<i>Bacillus megatherium</i> phosphaticum 解磷巨大芽孢杆菌	0.6
<i>Bacillus subtilis</i> Cohn 枯草芽孢杆菌	2
<i>Bordetella pertussis</i> 百日咳杆菌	20
<i>Brucella abortus</i> 牛种布鲁氏菌	25
<i>Brucella melitensis</i> 羊种布鲁氏菌	30
<i>Brucella suis</i> 猪种布鲁氏菌	20
<i>Campylobacter jejuni</i> 空肠弯曲菌	25
<i>Clostridium tetani</i> 破伤风梭菌	1
<i>Corynebacterium anaerobium</i> Prevot 厌氧棒杆菌	4
<i>Corynebacterium muris</i> Hauduroy 鼠棒杆菌	1
<i>Diplococcus pneumoniae</i> 肺炎双球菌	3
<i>Escherichia coli</i> 埃希氏大肠杆菌	8
<i>Francisella tularensis</i> 土拉热弗朗西丝氏菌	30
<i>Haemophilus influenzae</i> 流感嗜血杆菌	23
<i>Malleomyces mallei</i> 鼻疽杆菌	8
<i>Neisseria meningitidis</i> 脑膜炎双球菌	8
<i>Pasteurella pestis</i> Holland 鼠疫巴斯德杆菌	7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Migula 铜绿假单孢菌	10
<i>Pseudomonas pseudomallei</i> 类鼻疽假单孢菌	9
<i>Salmonella paratyphi</i> A 甲型副伤寒沙门氏菌	10
<i>Salmonella paratyphi</i> B 乙型副伤寒沙门氏菌	10
<i>Salmonella paratyphi</i> C 丙型副伤寒沙门氏菌	10
<i>Salmonella typhi</i> 伤寒沙门氏菌	10
<i>Shigella dysenteriae</i> 痢疾志贺氏菌	8
<i>Shigella flexneri</i> 福氏志贺氏菌	8
<i>Shigella sonnei</i> 宋内氏志贺氏菌	8
$\alpha$ - <i>Streptococcus hemolyticus</i> 甲型溶血性链球菌	2
<i>Vibrio cholerae</i> Pacini 霍乱弧菌	18
<i>Vibrio cholerae</i> biovar El-Tor O1 群霍乱弧菌 El-Tor 生物学变种	18
<i>Yersinia enterocolitica</i> 小肠结肠炎耶尔森氏菌	11

制标准浊度仅下降 2.7%，而现用标准下降了 12.4%，由此说明，新制标准比现用标准稳定。

#### 4. 两种标准测定的细菌菌数比较 (表 4)

由表 4 结果看出，用新制标准和现用标准测定的 33 种细菌的标准菌数完全相同。

从以上试验结果可以看出，以 DM-GG-17 玻璃粉制成的新制标准稳定性明显大于以水-GG-17 玻璃粉制成的现用标准。其根本原因是存在于玻璃网络结构 ( $\equiv \text{Si}-\text{O}-\text{Si} \equiv$ ) 空穴中的碱金属离子与水的  $\text{H}^+$  离子发生离子交换，结果水的  $\text{H}^+$  离子减少， $\text{OH}^-$  离子增多。 $\text{OH}^-$  离子则使玻璃网络结构解体： $\equiv \text{Si}-\text{O}-\text{Si} \equiv + \text{OH}^- \longrightarrow \equiv \text{Si}-\text{O}^- + \text{HO}-\text{Si} \equiv$  使玻璃受到水的浸蚀，玻璃的颗粒越细小 ( $1.87 \mu\text{m}$ ) 这种作用越明显。而 DM 是一种有机物质，无水解离出  $\text{OH}^-$  离子的特性，故 DM 对玻璃粉不会有浸蚀作用。DM 的折光率 (1.4062) 和用于制造细菌悬液的生理盐水折光率 (1.5000) 近似，用肉眼观察二者难以分辨。所以新制标准

的折光效果和透光效果 (用肉眼观察) 与待测细菌悬液是一致的，而且无放大或缩小比浊图片的现象。

由此看来，用 DM-GG-17 玻璃粉制成的新制标准完全可以代替水-GG-17 玻璃粉制成的现用标准。

#### 参 考 文 献

- [1] 伊孝沅等：微生物学通报，12: 232—233, 1985。
- [2] 舒尔兹 H: 《玻璃的本质结构和性质》，黄照柏译，中国建筑工业出版社，1984 年。
- [3] Perkins F T: Journal of Biological Standardization, 1: 1—10, 1973。
- [4] 黄建等：生物制品通讯，6: 191—197, 1965。
- [5] Seligmann E B et al: Journal of Biological Standardization 4: 127—130, 1976。
- [6] 陈宗淇等：《胶体化学》，高等教育出版社，1984 年。
- [7] Maaloe O: Bulletin of the World Health Organization 12: 769—775, 1955。
- [8] Spaun J: Bulletin of the World Health Organization: 26 213—217, 1962。
- [9] Fischer E K et al: J. Phys. Chem. 36: 98, 1932。
- [10] Dixon W J: McGraw-Hill Book Co., Inc., 292, 1957。