



生物制品中常用细菌计数法

杨正时

(卫生部药品生物制品检定所,北京)

细菌计数是生物制品工作中常用到的一种方法。这种方法是细菌生物制品不可缺少的质量检验方法之一。而且是细菌生理学研究的重要手段。下面概要介绍生物制品中常用的细菌计数技术的一般原理与方法。

一、总菌数测定

(一) 称重法

这是一种计量菌数的简单方法。将菌体涂布接种在固体培养基上(常用柯氏瓶),经适当培养后,用金属刮棒收集菌苔,沾放在三角瓶中,称取重量,以重量估计菌数。

在需要菌量很大而不必十分精确测量时常用此法。例如生产诊断血清而制备的吸收菌,即以收集到的培养物配制成每毫升含湿菌体 100 毫克的菌液。又如卡介苗,由于有效期短,培养生长特性比较特殊,培养时间长,用培养法检定菌苗时,往往不能适应实际需要。因此传统地使用称重法,即用卡氏漏斗收集在苏通液体培养基上生长良好的菌膜,用人工加压挤去一定水分后,称重,配制菌液,由于加的压力不同,含水量不一致,因此各生产批次间的菌数有相当的差异。

(二) 直接数菌法

将适当浓度的细菌细胞悬液,滴在计数板上置显微镜下直接计算细菌细胞数。步骤如下:一般用 0.5—1.0% 甲醛将菌液灭活后,充分震荡,使细菌分散成单个菌体,适当稀释后,加 10—20 倍体积的 1% 美蓝酒精溶液,使细菌着色。同时,把盖玻片盖在计数板上,将稀释好的菌液摇匀,用 0.1 毫升吸管吸取菌液滴在计数板一边缘,让其自动吸入计数板;也可直接滴在计数板中央,轻轻盖上盖玻片(盖玻片下不可有气泡)。静置 5 分钟后开始计菌数。计数板内

分 25 个中格,计算右上、右下、左下、左上及中央五个中格(共 80 个小格)内的菌数(N),则每毫升细菌总数为 $250,000N \times$ 稀释倍数。

(三) 比浊法

细菌悬液的浊度与菌数成正比。比浊法是将菌悬液与标准浊度管进行浊度比较以推算其菌数的方法。

历史上最早广泛使用的首推硫酸钡比浊管比浊法,它是由 1% 硫酸加入不等量的氯化钡,生成不同量的硫酸钡,使成一系列(10 支)不同浊度。然后再定出各管浊度的相当菌数。目前国内使用玻璃粉悬液的细菌标准比浊管,是由一标准浊度管以及与该管质量相同,口径一致的若干空管组成,并附带有黑色条纹的相纸。比浊管内玻璃粉颗粒大小约为 1—2.8 微米。由于细菌浊度与细菌细胞大小有关,在同一浊度时细胞大者每毫升所含菌数少,小者菌数就多。经过反复数菌试验,已确定 17 种菌种标准浊度时的菌数。还未定出菌数的菌种可以参考和这些菌生物学特性相接近,细胞大小相仿的菌种菌数。近来国际上已开始应用有机玻璃棒固体浊度标准,国内也已试用。

比浊时,一般用肉眼观测。将标准浊度管与被测菌悬液并列,背景衬托相纸,正对光源比较透光程度,黑线清晰者,透光度大,则菌数少。采用比浊法应注意以下几点:

1. 被测菌液用生理盐水作适当倍数的稀释,使其浓度略高于标准管,但不要相差太大,若稀释过度而淡于标准管时,无法比浊而须重新稀释;若菌液过浓,比浊时加水量很多,菌液不易混匀而影响结果。被测菌液取 1 毫升为宜,取量太少,误差较大,太多则不易混匀。

2. 标准浊度管内是玻璃粉悬液,理化性质不够稳定,常因玻璃粉溶解、凝聚或粘附管壁而

使浊度下降变淡。发现有此类现象,不宜使用。比浊管可放置室温或冰箱,但不能冻结,有效期为一年。

3. 比浊操作在光线明亮处进行,但要避免阳光直射,加水稀释时吸量要精确,少量多次,不宜一次加足。在以相纸上黑线的清晰程度判断菌液浓淡时,以二管透明程度一致为浓度相等的标志,并应左右换置进行核对,每次检验样品不应过多和时间过长,以免导致视力疲劳,影响判断效果。

4. 菌液浓度计算与换算:
每毫升细菌原液菌数 = 标准菌数 × (1 + 加水量) × 稀释倍数。

二、活菌计数

由于细菌细胞在生长繁殖过程中不断死亡,新鲜培养物中必然存在一定数量的死菌体,在上述计数方法中均把未自溶的死细胞包括在内。除生物制品外,如对食品、水源、口服药剂等检验污染细菌的严重程度,临床上诊断感染疾患(常用于泌尿道感染)均以活菌数作为判断标准。活菌苗更是把活菌率作为一个重要的质量指标。

(一) 平皿培养计数法
将菌液作适当稀释后接种平皿,以一个细菌细胞生长为一个菌落计算每毫升中的活菌数。常用二种方法稀释菌液。一是将菌悬液比浊后稀释成每毫升 1 亿个细菌细胞,以此液开始 10 倍稀释,即取此液 1 毫升(或 0.5 毫升)加入 9 毫升(或 4.5 毫升)无菌盐水中,此为 10^{-1} ,如此连续稀释成 10^{-5} ,1 毫升 10^{-5} 菌液应含菌 1,000 个,因此 0.1 毫升的 10^{-5} 液滴于一个平皿中所长出的菌落数(或三个平皿上的菌落平均数)即为接种 100 个细菌所长出的活菌数,也即为活菌率。另一种是连续稀释法,将菌悬液比浊后作连续 10 倍稀释。作活菌计数时选用的稀释度可参考表 1。用此法作活菌计数时,活菌数变动范围较大,因此须取二个以上稀释度的菌液测定活菌数。

1. 表面涂布培养: 营养琼脂倾注平皿后,

表 1 活菌数测定时稀释度的选择

比浊浓度 (亿/毫升)	活菌计数 用最适稀 释度	活菌数理论 值(个/0.1 毫升)	计数时使用 稀释度		
10,000—3,000	10^{-9}	100—30	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}
3,000—1,000	10^{-8}	300—100	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}
1,000—300	10^{-8}	100—30	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}
300—100	10^{-7}	300—100	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}
100—30	10^{-7}	100—30	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}

在 37℃ 温箱中开盖烘烤 20 分钟,吸取稀释菌液 0.1 毫升,滴于平皿中央的表面,用灭菌的三角玻璃刮棒轻轻涂布整个平皿琼脂表面。一般细菌于 37℃ 培养 24 小时后检查结果,也可根据被试菌株的生物学特性要求应用适宜的培养基、温度和培养时间。这个方法适宜于生长快、培养时间短的好氧菌,菌落大、易于观察。

另外还有点种平皿法,它不用玻棒或其它的涂布工具,而是在烤得稍久而较干的营养琼脂平皿表面,定量滴菌液点种。用每滴等于 0.02 毫升的标准吸管,吸取稀释后的样品,距平皿培养基表面 2 厘米的高度,自然下流滴液,每滴落在培养基上后,能自然扩散为 1.5—2.0 厘米直径的斑点,并在 10 分钟左右时间内使之吸收。37℃ 培养 18—24 小时后,计算每个液滴斑之菌落数。也可以 0.1 毫升吸管做点种工具,每一稀释度滴四滴(0.08 毫升),经培养后计其菌落数。也可用 1 毫升吸管,1 毫升菌液为 20 滴,分散滴于三个平皿上,不使各菌斑融合,待菌液被平皿琼脂吸收后培养过夜。用此法测定活菌,活菌率较高。

2. 倾注培养: 取稀释菌液 1 毫升注于平皿中央,将融化而冷却到 40—50℃ 的营养琼脂倾注于平皿内,与菌液混合,轻轻摇匀,凝固后培养,计算菌落数,用这种方法时,菌数不受培养基量的影响,但培养时间应长些,否则菌落较小,不易计数。

活菌培养计数操作时必须注意每一个细小的环节,尽量避免实验技术和使用器械的误差,使被计数的细菌获得最适宜的生长条件,尽可能使任何一个活菌发育成一个可以计算出的菌落。为此要求:

(1) 吸量要精确,每一稀释度换一支吸管。

(2) 菌液必须充分震荡均匀,用吸管反复吹打 50—70 次,可以避免菌块和菌落生长成链状。用 10 毫升液体时,最好使用大试管稀释。

(3) 器皿应清洁,培养基必须适宜,不得有妨碍细菌生长的因子。倾注培养基时,琼脂必须完全融化,但使用时温度不得超过 50℃,在表面涂布培养前,平皿必须在 37℃ 温箱开盖烤 20 分钟。不同的计数用稀释液对活菌数有影响,营养肉汤作为稀释液较好。

(4) 点种时应不使菌液四溅或点斑融合。

(5) 必须识别不典型菌落,正确计数。在作倾注培养时,培养基表面的菌落数量很少,形态典型,而大多数菌落在琼脂内,因细菌分裂情况不同而形成不同形状,一般较小,成点状,致密不透明,有时上下二个重叠,少数菌落紧贴平皿玻底则呈扁平、菲薄、圆形、半透明,因此须仔细区分。培养 48 小时后较易计数。

(二) 生理-生化学方法

上述平皿培养计数法是最常用的活菌计数方法,但获得结果的时间较长,经常不能适应实际工作的需要。如卡介苗鉴定中应用骆氏鸡蛋培养基(中管斜面)计数菌落来测定活菌数,需二个月才能获得最终结果。且卡介苗内的菌团严重影响计数,一个活菌单细胞能长一个菌落,而菌团可能含有几百个细胞,也只能长一个菌

落。虽然菌团比单细胞长得快些,但不能增加菌落数。在其它活菌苗中也存在类似现象,由于这些原因,所以也常利用细菌的生理-生化变化来测定菌数。

常用的一种活体染色法,是在涂片上区别活菌和死菌,计算活菌率后得知活菌数。其原理是在中性和弱酸性时,活细胞的原生质不能着色,因此当原生质着色时,表示细胞已经死亡。常用的染料为美蓝、甲苯酚蓝、刚果红、中性红等。由于活体染色是以死细胞和活细胞吸收染料量的差异为根据,因此染色时应注意细胞数目、染料比例、染色时间等影响因素,以免判断错误。

另一类是根据细菌新陈代谢的产物与变化,最常用的有瓦勃氏呼吸器测定吸氧量法。其原理是活菌数与吸氧量二者之间有一定的正比关系。如还原四唑盐法,在这种方法中,氯化三苯四唑(TTC)的稀释液与活细胞作用后被还原生成红色的甲臌基,活细胞数与甲臌基含量成正比,因此可根据测定生成的甲臌基量来测定活细胞数;另一种是硝酸盐还原法:主要用来测定肠杆菌菌数。这是因为肠杆菌具有使硝酸盐还原为亚硝酸盐的能力,利用对氨基苯磺酸、 α -萘胺即可测出亚硝酸盐含量并推测出菌数。上述这些方法虽然未普遍应用,但由于具有快速的优点,值得今后进一步研究。