

细菌总数测定方法的改进

李桂生 崔淑珍

王锡连 黄钟玉

(秦皇岛商品检验处,河北)

(秦皇岛市卫生防疫站,河北)

目前细菌总数测定一般采用常规平皿法,用肉眼观察计数。但深层的小菌落容易遗漏,易造成计数上的误差。由于多数细菌具有脱氢

酶,在培养基中能产生脱氢作用,当遇到氯化三苯基四氮唑(TTC)存在时会发生显色反应。但高浓度的 TTC 对细菌具有抑制作用。因此在

细菌总数测定中,为了考查 TTC 能否应用于减少细菌总数测定中的误差,我们观察了不同浓度 TTC 营养琼脂对食品中污染的各属细菌的显色作用,并试图找出适宜浓度的 TTC 用于细菌总数测定。现将结果报告如下。

材 料 和 方 法

一、材料

(一) 菌种

1. 国家标准菌株有: 大肠杆菌(菌号为 44336, 44149, 44462, 44473, 44497) 5 株, 柠檬酸杆菌(菌号为 2935, 2953, 2991, 2995) 4 株, 亚力桑那菌(菌号为 3183, 3184, 3185) 3 株, 沙门氏菌(菌号为 471, 315, 196, 3175, 209) 和鸭沙门氏菌。

2. 自己分离的菌株有: 柠檬酸杆菌 1 株, 柠檬酸杆菌 I 型 1 株; II 型 2 株, 副大肠杆菌 2 株, $O_{111}B_4$ (大肠杆菌) 1 株, 果胶杆菌 2 株, 变形杆菌 2 株, 大肠艾希氏菌 3 株, 革兰氏阳性球菌 (G^+C) 9 株, 球杆菌 1 株, 杆菌 4 株。从污水中分离的有污 15 (高褐抑欧文氏菌), 污 18 (蜡状短小芽孢杆菌), 污 19 (坚硬芽孢杆菌), 污 20 (酵母菌) 等菌株, 已由中国科学院微生物研究所鉴定。污 2、污 3、污 4、污 5、污 7、污 8、污 10、污 11、污 13、污 14、污 17 等菌株未经鉴定。

(二) 药品

氯化三苯基四氮唑 (TTC)。

二、方法

同常规法, 待培养基灭菌后降温至 40—50℃ 时, 在 100 毫升培养基中分别加入 1% TTC* 溶液 1、4、0.1、0.5 毫升, 配成含 TTC 浓度为 0.01%、0.04%、0.001%、0.005% 的四种培养基, 将各类菌分别接种在上述培养基平皿中, 经 37℃, 24 及 48 小时培养后, 观察其生长情况。

结 果 与 分 析

一、在含不同浓度 TTC 营养平皿中各类菌的生长情况

各类菌在不同浓度的 TTC 营养平皿中的生长情况见表 1。

由表 1 说明, 各类菌在 0.001% TTC 营养平皿中, 一般显微红色或不变色(即阴性), 不宜作细菌总数测定。各类菌在 0.01%、0.04%、0.005% TTC 浓度的营养平皿中, 以 100—500 个/毫升菌液试验, 均可见到红色菌落出现, 尤以 0.01%、0.04% TTC 浓度作细菌总数测定最好, 培养 24 小时或 48 小时, 结果无差别。供试的各球菌在 TTC 平皿中受到不同程度的抑制, 菌落微小。

二、菌的验证试验

(一) TTC 平皿中的微小红点是否为菌

1. 将菌号为 3185、3184、471、2991、44473、 $O_{111}B_4$ 、315、 G^+C 和 2 株副大肠杆菌等各菌在 TTC 平皿中呈现的微小红点, 接种到普通营养平皿中, 结果各菌均有生长, 经革兰氏染色均为 G^-B (其中一株为 G^+C 除外)。

2. 将菌号为 3184、3185、315、 $O_{111}B_4$ 、44473、2991 和副大肠杆菌等各菌在 TTC 平皿中呈现的微小红点再接种到 0.01%、0.04% TTC 平皿中, 亦均能长出紫红色菌落(37℃, 24 小时), 经染色均为 G^-B 。对照在 TTC 平皿中不变色。

由上述两项结果说明 TTC 平皿中的小红点是细菌而不是杂质。在细菌计数中不能忽视。

(二) TTC 平皿中红色片状物是否为菌

1. 将在 TTC 平皿中呈现红色片状物的各菌(菌号为 44149、2991、 $O_{111}B_4$ 、F、b、d) 接种到普通营养平皿中, 均能生长, 出现各种形态的菌落: F 菌为橙黄色光滑湿润突起。44149、

* 1%TTC 浓度的配制: 100 毫升蒸馏水中加 1 克 TTC, 高压灭菌或煮沸 10—20 分钟, 置冷暗处备用。

表 1 各类菌在不同浓度的 TTC 营养平皿中生长情况*

菌 种	试验项目	革兰氏染色	TTC 浓 度 (%)		
			0.01	0.001	0.005
44336		G-B	红色小菌落	培养基微红	同 0.01
44149		G-B	红色菌落	培养基微红	同 0.01
44473		G-B	红色大菌落	培养基微红	同 0.01
471		G-B	红色大菌落	培养基微红	同 0.01
315		G-B	红色小菌落	培养基微红	培养基微红
鸭沙门氏菌		G-B	红色中小菌落	培养基微红	同 0.01
3184		G-B	红色大菌落	培养基微红有紫心	同 0.01
2953		G-B	红色中菌落	培养基微红有紫心	同 0.01
2991		G-B	红色小菌落	培养基微红有紫心	同 0.01
果胶杆菌		G-B	红色菌落	—	培养基微红
柠檬酸杆菌		G-B	红色菌落	—	同 0.01
柠檬酸杆菌 I 型		G-B	红色菌落	—	同 0.01
柠檬酸杆菌 II 型		G-B	红色菌落	培养基微红	同 0.01
副大肠杆菌		G-B	红色中菌落	培养基微红有紫心	同 0.01
O ₁₁₁ B ₄		G-B	红色大菌落	培养基微红有紫心	同 0.01
变形杆菌		G-B	红色菌落	培养基微红	同 0.01
大肠艾希氏杆菌		G-B	红色菌落	培养基微红	同 0.01
污 10		G-B	红色菌落	培养基微红	同 0.01
污 15		G-B	红色菌落	—	同 0.01
污 19		G-B	未生长	—	—
污 18		G ⁺ 芽孢杆菌	红色菌落	—	同 0.01
污 20		G ⁺ B	—	—	同 0.01
污 17		G ⁺ C	红色小菌落	—	同 0.01
1		G ⁺ C	铜色微红小菌落	培养基微红	同 0.01
4		G ⁺ C(微球菌)	浅红色微小菌落	培养基微红	同 0.01
a		G ⁺ C(乳凸状)	红色小菌落	培养基微红	同 0.01
b		G ⁺ C(白色)	红色菌落	—	同 0.01
f		G ⁺ C(橙黄色)	培养基微红	—	同 0.01
d		G ⁺ C、B	红色菌落	培养基微红	同 0.01
g		G ⁺ B(黄色)	红色菌落	培养基微红	同 0.01

* 1. 各菌在 0.01% 营养平皿中一般长出紫、红、微红色菌落,是用标准比浊管比浊,菌液浓度为 100—500 个/毫升。其它 TTC 浓度,均用浓菌液试验,所以很少长出单个菌落,大多数呈片状菌苔,培养基显红色或微红色。

2. “—”示阴性。

3. 0.04% TTC 浓度的试验结果同于 0.01% TTC 浓度。

2991 及 O₁₁₁B₄ 菌均为无色半透明。b 菌为白色干枯状。d 菌为橙色白点。

2. 将 TTC 平皿中呈现红色片状物的两株球菌(菌号为 1、4)接种到 0.04% TTC 平皿中,其生长情况: 1 号菌为红色小球菌菌落,部分生长受到抑制; 4 号菌为浅红色微球菌菌落,有光泽,部分生长受到抑制,经染色均为阴性。

由上述两项结果说明, TTC 平皿中的红色片状物是细菌。只因菌液浓度大,故成片状菌苔。球菌在不同浓度的 TTC 平皿中,生长受到

一定程度的抑制,但在 0.04% TTC 平皿中生长较为适宜。

小 结

1. 从空气、污水、食品中分离到的各类菌,在菌液稀释到 100—500 个/毫升时,接种到含 0.01%、0.04%、0.005% TTC 浓度的平皿中,经 37℃、24 或 48 小时培养,可见到红色、浅红色或紫红色菌落。试验中以含 0.01% 和 0.04%

TTC 浓度的平皿中菌落显色最好。说明 0.01 % 和 0.04 % TTC 浓度用于细菌总数测定最适宜。

2. 试验中各球菌在不同浓度 TTC 平皿中，

生长受到不同程度的抑制，但仍能生长，菌落微小，在细菌总数测定时不能忽视。另外，在 TTC 营养平皿中，表层和深层的微小红点和红色片状物均为细菌，计数时也不能忽视。