



甲型肉毒杆菌活菌计数方法

董奎微 傅香莲 温肇荣

(中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所)

文献中有关厌氧菌的活菌计数方法报道较少,而肉毒杆菌(*Clostridium botulinus*)繁殖体的活菌计数方法,文献中未见介绍。我们参考Anderson^[1]的方法,以肉毒杆菌繁殖体为对象,对食品及饮水中厌氧菌含量进行了活菌计数试验。现将方法介绍如下。

一、材料

1. 菌种: 甲型肉毒杆菌 61A01 和 61A07 菌株。

2. 培养基^[1]: 在 5% 的玉米浆中分别加入各种成分配成不同用途的培养基。培养用培养基中加入蛋白胨 0.5%, 胰胨 0.16%, 硫乙醇酸钠 0.05% 和琼脂 2%; 覆盖用培养基中不加蛋白胨和胰胨, 其它成分相同; 液体培养基是在 5% 玉米浆中加入脱脂乳粉 0.3% 和葡萄糖 1.5%。各种培养基均用 NaOH 调 pH 至 7.2, 120℃ 高压蒸汽灭菌 30 分钟。

二、操作

1. 菌液的稀释: 参考培养时间和菌体浓度, 用生理盐水稀释(10 倍系列稀释), 稀释前须将内容物充分混匀(剧烈摇动试管, 再用移液管吹打菌液 10 次)。在用移液管吹打或吸取菌液时, 液体不得超过所要吸取量刻度以上过多, 以免增加操作误差。

2. 活菌平板计数: 从系列稀释液中选取 2—3 个不同稀释度的菌液, 准确吸取 0.5 毫升, 点滴散布在灭菌培养皿底部, 加入融化并冷到 48℃ 左右的培养用培养基约 20 毫升, 转动培养皿使菌液与培养基充分混合, 平放, 待琼脂凝固后, 再加入 20 毫升相同的培养基, 冷却凝固后, 再加入一定量覆盖用培养基(亦可用焦性没食

子酸除氧装置密封), 以保证必要的厌氧条件。

3. 活菌试管计数: 取稀释液 0.5 毫升加入融化并冷至 46—48℃ 的盛有培养用培养基的试管中(每管 20 毫升), 反复转动试管使之混匀, 并尽量避免产生气泡。然后将试管浸入冷水中, 使培养基迅速凝固, 再在上面加入一定量覆盖琼脂培养基, 以保证厌氧条件。

4. 计数: 平板或试管计数时, 每种稀释液各做三分。在 35℃ 培养 24—30 小时, 计算长出的菌落数, 求出平均数及平均偏差, 再计算各平板(或试管)间的偏差及稀释偏差和每毫升菌原液的含菌量。各项偏差不应超过 ±10%。

三、关于方法中的几个问题

1. 平板计数和试管计数的比较: 如表 1 所示, 试管中计数的菌落较多, 但在试管中菌落超过 500 个时计数困难。

表 1 在平板上或试管中计数结果(61A07 菌株)

| 菌液稀释倍数 | 平板上 | | | | 试管中 | | | |
|------------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 平均 | 1 | 2 | 3 | 平均 |
| 10 ⁻⁵ | 402 | 534 | 515 | 484 | >500 | | | |
| 10 ⁻⁶ | 69 | 125 | 48 | 81 | 365 | 396 | 396 | 386 |

2. 厌氧条件对计数的影响: 比较了覆盖琼脂或用焦性没食子酸除氧法提供厌氧条件所得计数结果。发现覆盖琼脂时, 菌数比用焦性没食子酸除氧时, 计数更高。同时, 覆盖琼脂的厚度应在 2 厘米以上。以上结果说明, 厌氧条件对菌落计数有直接的影响。

3. NaHCO₃ 的作用: Anderson 十分强调 NaHCO₃ 在培养基中的作用^[1]。我们的发现 NaHCO₃ 的作用并不明显, 故培养基中不用。

(下转第 293 页)

(上接第 280 页)

4. 菌液稀释度对计数的影响: 菌液稀释太少, 菌落在培养基中生长得过多, 便过密过小, 而且在培养早期就产气, 会影响计数结果。最好稀释到每个平板上 100—500 个菌落, 每个试管中 100—300 个。如果采用相同的培养基, 控制接种量及培养时间, 同时参考菌液的光密度, 选择合适的稀释度并不困难。

5. 计数菌落的时间: 计数菌落要选择合适时间, 培养时间太短, 菌落过小不易计数; 时间

过长, 各个菌落连在一起, 或产气而影响计数。对不同菌株, 应通过试验确定最适计数时间。

活菌计数是细菌学中的常规方法, 但不同细菌具有不同特性, 因此必须就不同计数对象来建立方法。肉毒杆菌既是厌氧菌, 又是自溶菌, 它所要求的条件就比一般需氧菌复杂。我们改进了 Anderson 氏的方法, 可以用于肉毒杆菌繁殖体的活菌计数。

参 考 文 献

[1] Anderson, A. A.: *J. Bact.*, **62**: 425—432, 1951.