

“威特四联”中需气菌活菌计数用培养基的改进

张秋实 孙菊英 于波(兰州 730000 甘肃省药品检验所)

“威特四联”属微生态制剂。含厌气菌双歧杆菌、嗜酸乳杆菌和需气菌粪链球菌、蜡样芽孢杆菌。在该制剂的质量标准中,四种菌的活菌计数采用四种不同的培养基,且培养基配制过程中需加入多种添加剂,工作量巨大且繁琐,同时原有需气菌培养基对计数也有影响。我们根据细菌的生长特性,对该制剂中需气菌粪链球菌和蜡样芽孢杆菌的活菌计数所用培养基作了改进,取得了较满意的效果。

1 实验材料

1.1 药品

“威特四联”,送检样品。

1.2 培养基

EC培养基:胰蛋白胨 2g,酵母粉 5g,葡萄糖 2g,氯化钠 5g,琼脂 20g,蒸馏水 1000 ml。

将上述成份溶于蒸馏水中,加热溶解,调节 pH 至 7.4,121 °C 灭菌 30 min,冷却至 50 °C 左右,加入灭菌的 Na_2N_2 600 mg,2,3,5-氯化三苯基四氮唑(以下称 TTC) 150 mg 振摇,溶解。

用途:测定粪链球菌活菌数。

ECG培养基:蛋白胨 2g,酵母粉 5g,葡萄糖 2g,氯化钠 5g,琼脂 20g,蒸馏水 1000 ml。

将上述成份溶于蒸馏水中,调 pH 至 7.4,121 °C 灭菌 30 min。临用前每 100 ml 加入 1%亚硝酸钠(钾) 0.2 ml[注亚硝酸钠(钾)临用现配,不可久存]。

用途:测定粪链球菌活菌数。

BA培养基:蛋白胨 10g,牛肉膏 3g,葡萄糖 10g,氯化钠 5g,琼脂 20g,蒸馏水 1000 ml。

将上述成份溶于蒸馏水中,调节 pH 至 7.4,121 °C 灭菌 30 min,冷却至 50 °C 左右,加入青霉素 50 万单位,振摇溶解。

用途:蜡样芽孢活菌计数用。

RMS培养基:牛肉浸液 1000 ml,氯化钠 5g,胨 10g,乳糖 20g。

将上述成份溶于牛肉浸液中,调节 pH 值使灭菌后为 6.0,115 °C 灭菌 20 min。

临用前每 100 ml 培养基加入已灭菌的 20%碳酸钙混悬液 5 ml。

用途:乳酸菌活菌计数用。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 供试液的制备 按质量标准制备,10 倍稀释法稀释至适宜的稀释级备用。

2.1.2 接种 采用适宜的 3 个稀释级供试液接种平皿,每个稀释级接种 2~3 个平皿,每皿接种 1 ml,共接种 4 套,分别用 EC、ECG、RMS、BA 培养基浇碟,37 °C 培养 36~48h 计数。

2.2 结果

2.2.1 实验结果表明,用 EC、RMS、ECG 培养基计数粪链球菌,同一批样品,结果基本一致。用 BA 培养基计数蜡样芽孢杆菌,无菌落生长;RMS 培养基有两种菌落生长。一种菌落形态为圆形或梭形,周围有透明环,革兰氏染色呈阳性球菌,为粪链球菌。另一种菌落形态不规则,周围无透明环,表面干燥似蜡样,革兰氏染色呈阳性芽孢杆菌,为蜡样芽孢杆菌。结果见表 1。

2.2.2 EC 与 ECG 培养基的对比试验 用含粪链球菌 96 个/ml(CFu)的菌液接种平皿,每皿接种 1 ml,分别用 EC、ECG 培养基浇碟,37 °C 培养 36~48h 计数。EC 培养基五平皿活菌数平均为 95 个,ECG 为 96 个,二者结果相符。

2.2.3 蜡样芽孢杆菌在 RMS 平板上的回收试验 用

表 1 10 批样品测定结果

样品编号	培养基			
	EC	ECG	RMS	BA
粪链球菌(个/g)				
1	1.1×10^8	1.5×10^8	2.6×10^8	
2	1.2×10^8	1.4×10^8	1.9×10^8	
3	1.1×10^8	1.2×10^8	1.6×10^8	
4	1.2×10^8	1.3×10^8	2.3×10^8	
5	9.6×10^7	1.0×10^8	1.5×10^8	
6	8.8×10^7	9.8×10^7	1.0×10^8	
7	1.0×10^8	1.1×10^8	1.3×10^8	
8	1.5×10^8	1.9×10^8	2.3×10^8	
9	9.3×10^8	9.9×10^7	1.2×10^8	
10	1.3×10^8	1.5×10^8	1.8×10^8	
蜡样芽孢杆菌(个/g)				
1			2.0×10^6	0
2			1.5×10^6	0
3			1.9×10^6	0
4			2.7×10^6	0
5			1.8×10^6	0
6			1.3×10^6	0
7			9.8×10^5	0
8			2.1×10^6	0
9			1.6×10^6	0
10			3.1×10^6	0

含蜡样芽孢杆菌 57 个/ml(CFu)的菌液接种平皿,用 RMS 培养基浇碟,37℃培养 24h 计数,五平皿平均菌落数为 55 个,回收率为 96.49%。

5 讨论

5.1 “威特四联”质量标准中,粪链球菌活菌计数用 EC 培养基以叠氮钠来抑制革兰氏阳性杆菌的生长,加入 TTC 使菌落显红色,便于计数。TTC 具有抑菌作用,用量一般为十万分之一^[1],过大则可抑制细菌生长。EC 培养基中 TTC 的用量为十万分之十五,因此抑制了粪链球菌的生长,使菌落似针尖样大小,不易计数。同时叠氮钠为进口试剂,价格昂贵,一般实验室不易得到。我们改进后的 ECG 培养基以亚碲酸钠(钾)代替叠氮钠,同样可以抑制革兰氏阳性杆菌的生长^[1],平板上菌落大且显黑色,不需加入 TTC,非常易于计数。

5.2 “威特四联”质量标准中,用 BA 培养基计数蜡样芽孢杆菌。我们用此培养基经数次培养均无菌落生长。乳酶生是我国较早应用于临床的微生态制剂,其活菌(粪链球菌)计数用培养基(RMS)配制简单,试剂便宜。我们利用粪链球菌可分解 RMS 培养基中的乳糖,使碳酸钙生成可溶于水的乳酸钙而使菌落周围有透明环,蜡样芽孢杆菌不能分解乳糖,菌落周围无透明环的特性及两种菌落形态的差异,在 RMS 培养基上同时计数“威特四联”中的粪链球菌和蜡样芽孢杆菌,不仅大大提高了蜡样芽孢杆菌的活菌检出率,而且节省人力、物力、财力。

参考文献

- 1 郑钧镛,王光宝主编.药品微生物学及检验技术.北京:人民卫生出版社,1989:268.
- 2 张秋实,滕宝霞.枯草杆菌对金黄色葡萄球菌检出影响的实验观察.甘肃药学,1996:18.