

改良細菌集落計數方法的實驗研究*

劉 远 光

(广州市卫生防疫站微生物檢驗科)

傾注平板培养法为应用最早亦最常用的測驗檢品中生活細菌数量的一个方法。在一般微生物学书籍虽有述及此种細菌集落計數的方法,惟对于細菌集落的某些現象很少述及,或見解謬誤。而通常应用的細菌集落計數器与規板(菌落計數板)設計亦欠完善,在实用上存在着缺陷。凡此种种,对于檢驗与研究工作的正确結果不无影响。作者从工作經驗与实验得以明瞭过去的謬誤与忽略的地方,对菌落計數工具亦加以改良,并冀引起同人們注意。

一、在傾注平板中細菌集落的某些情况

1. 平板底面的菌膜 在平板底面貼近平皿底部玻璃处往往出現絨薄的菌膜,作均一散布而輪廓无一定形态,在牠傍边常有同样膜状圓形小集落。这些菌膜曾被称为散布型菌落,每一散布者作一菌落計算^[1]。这种散布型菌落是否为某种細菌生长的固有形态呢?作者检查过多个平板的菌膜,发现有革兰氏阳性与阴性的桿菌以及球菌,不耐热(80℃半小时)。嗣后作者利用大腸桿菌,金黄色葡萄球菌,伤寒沙門氏菌和副伤寒沙門氏菌甲、乙等肉湯悬液作傾注平板培养,結果在平板底面也出現了菌膜,但在所有空白平皿的傾注平板均无菌膜出現。

下述实验显示此种菌膜和細菌集落数之間存在有一定的关系:取大腸桿菌的新鮮培养物稀释于一管肉湯中做成均匀菌悬液。用一个3毫米直径的接种环各采取同样一环肉湯菌悬液分別放在20个消毒平皿中作傾注培养。放加的方法是将这些平皿分为四組,每組5个。第一組是将菌悬液放入平皿(放置地点均預先在皿底外边記有标志)后立即注入肉湯琼脂迅速搖匀。第二組放入菌悬液后靜置3分钟,然后注入肉湯琼脂搖匀。第三組放入菌悬液后靜置5分钟(在10℃寒涼的室温5分钟時間,菌悬液未見发生变干迹象),然后注入肉湯琼脂搖匀。第四組是先注入肉湯琼脂,然后将菌悬液輕輕放入皿內培养基中,不使接种环触及平皿底部,将平皿立即旋轉搖匀(各組平皿均使用同样培养基,各平皿旋轉方式均一致)。所有平皿均放于37℃24小时后观察。培养結果:在第一組平板有两个平板底面产生輕微的痕跡的菌膜;在第二及第三組各平板底面均形成菌膜,但第二組所形成的顏色較淡薄;在第四組各平板底面均无菌膜形成。形成菌膜的地点与放置菌悬液地点是一致的。沒有菌膜的平板菌落数最多(第一及第四組),而形成菌膜的平板菌落数却大为減少。菌膜愈厚、愈大則平板菌落数愈少(图1)。

为进一步探究菌膜的各种性質,观察了在傾注平板所見的菌落的各种形式,并且作了

* 1958年8月27日收到。

一些实验,今合併用图說明如次(图2):

a. 为局限性菌落的細菌(例如大腸桿菌等)在平板底面所形成的圓形薄膜样菌落,形态稳定。

b. 为上述細菌所形成的菌膜,此种菌膜輪廓稳定,不会扩展和变化。

c. 为极接近平板底面的菌落形态,它达到平板底面处也发育成薄膜样菌落生长物。

d. 为在平板中的菌落,細小而紧密。

e. 为生长在平板表面上的菌落,发育良好。

f. 表示一个扩展性菌落在平板中发育不良的状态,它变成狭細的碎片样(但是它生长在平板表面的对照培养菌落却很快就盖过整个平板表面)。实验方法:取接种物放在平板上作点状接种一处,然后再将同样培养基(琼脂含量为2%)輕輕注入使盖过整个平板表面。等待琼脂凝固后,放在定温箱中培养,隔一两天即可观察。

g. 表示在平板中的細菌沿着盖片生长,最后将整块盖片包围着。实验方法:将接种物放在平板上作点状接种,然后将无菌清洁盖片盖在接种点表面使与平板表面密贴,再注入同样琼脂鋪过平板整个表面,待琼脂凝固后放在定温箱中培养。以扩展性菌落的細菌作此試驗,牠們也是沿着盖片发展,在平板中也不显现出扩展的特性,牠們局限在盖片边缘周围不超过1厘米距离的范围。

h. 表示生长在平板底面的扩展性菌落常沿着平皿底玻璃面的平行方向发展,经过平板的側緣折向平板表面生长。它們輪廓不稳定,个别細小菌膜(由单个个体发育而成,常呈不整形)由于繼續扩展而連成一片,并依照上述方式发展至平板表面。

前述各种菌落生长形式对于我們理解菌膜发展的性质是很有意义的,尤其对于菌落数字上的如何记录是很有帮助。

2. 成鏈菌落 在傾注平板中排列成鏈状的菌落并不常見。过去成鏈菌落的計数方法,认为如仅单鏈菌落,可以当作一菌落計,若形成数鏈,則計算它們的接近数目,而不能每一个体計算为一个菌落^[1]。经过充分搖旋的傾注培养,令它重复呈现成鏈菌落,頗不易于掌握。作者利用含糖炼乳(灭菌含糖炼乳稀释4倍)加入大腸桿菌培养物做成菌悬液。以此菌悬液少許放入消毒平皿中作傾注培养,将平皿充分旋轉,培养所見,平板中亦产生成鏈菌落,以及有很多单个局限性菌落。

3. 菌落密度 在生长多数(例如300个以上)細菌集落的傾注平板上,菌落分布的密

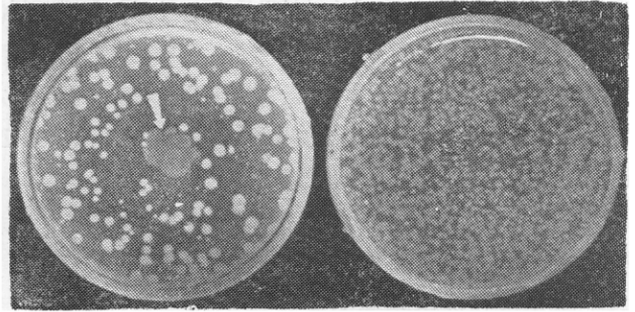


图1 同一检材,同样检量和在同一時間內操作的两个傾注平板在相同环境(37°C, 24小时)培养所得的結果:左,細菌集落数为420个,另在平板底面有由局限性菌落的細菌(大腸桿菌)所組成的菌膜;右,細菌集落数为11,200个(注意没有形成菌膜),細菌集落数极为悬殊,显示菌膜与細菌集落数的关系。

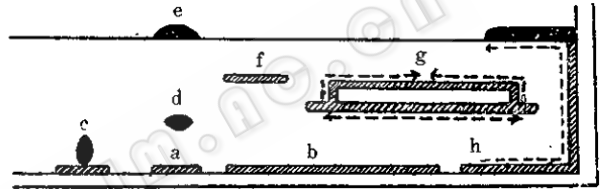


图2 細菌集落在傾注平板的生长形式(側剖面簡笔画,詳細說明見本文)。

度有的較為均匀；但亦有密度极不一致的。这种密度极不一致的形式大致可分成四类。1. 在平板中央部分菌落較多,形成中央地区密度最大；2. 在平板边缘部分菌落較多,形成边缘地区密度最大 3. 在平板中央与边缘之间的地区菌落密度較大；4. 在平板中有一个細小地区有成羣集簇的菌落。对菌落密度相差不大的平板,采用任何种类的規板帮助計算,所得結果均甚近似。但当菌落密度极不一致时,对于所采用規板及計数方法不可不加以注意,尤当采用人們所常用的鄔夫赫基尔 (Wolffhuegel) 氏規板及其計数方法时,常产生很大的差誤。

二、規板的改良設計

規板改良設計須符合以下的要求。1. 不論菌落疏密与任何分布形式,均能算出准确数字或最可靠的近似值；2. 便利于計算,使工作效率增进。

改良規板是由半圓与方格两部分所組成(图 3)。

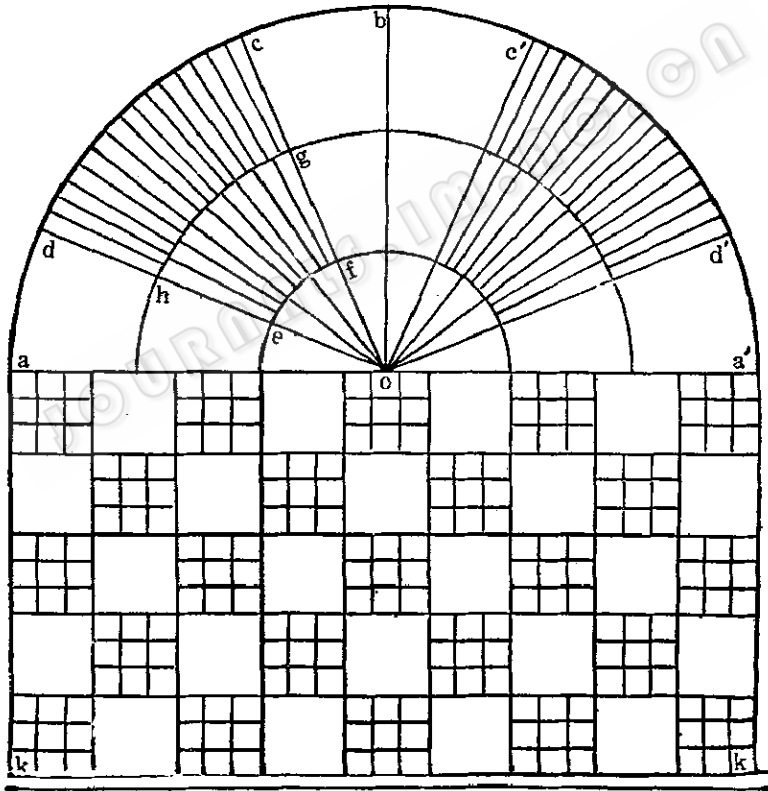


图 3 改良設計的規板(詳細說明見本文)

半圓部分划分法 圓 o 的直径 aa' 长 9 厘米,今将它的半径分成三等段,以 o 为圆心画成三个同心圓,将圓 o 划分成三个地段(中央、中間和边缘)。使半径 ob 垂直 aa' , 将半圓分成两个象限,在每个象限的中間各作一扇形,使 $\angle cod = \angle c'od' = 45^\circ$ 。又使 $\angle aod = \angle cob = \angle boc' = \angle d'oa' = 22.5^\circ$ 。将各扇形再作細格的划分:在中央部分(例如 eof 地区)依 15° 划分成三等份;在中間部分(例如 $efgh$ 地区)依 5° 划分成九等份;在边缘部

分(例如 *hgcd* 地区)依 3° 划分成十五等份。因为上述三个地区的面积比例(中央:中間:边緣)是 1:3:5, 所以在扇形內的各小分格的面积恰相等(均为 0.294 平方厘米)。

方格部分划分法: 将长方形 $aa'k'h'$ ($aa' = 9$ 厘米; $ak' = 5$ 厘米) 划分成 45 个正方形的方格, 每个方格的面积恰为 1 平方厘米; 每相隔一个方格均再等分成 9 个細网方格。

使用方法 平板中菌落数較多时可使用規板协助計算。菌落数尚不很多(例如 200—600 个)可以計算半个平板来推算; 菌落数很多(例如超过 600 个以上)可以計算 $1/4$ 的平板来进行推算。規板的半圓部分相当于半个平板的面积, 两个密分小格的扇形面积相当于 $1/4$ 的平板。半圓部分是規板的主要部分, 使用时令規板的圓心与平皿的圓心互相迭合即可进行計数。如果計算 $1/4$ 的平板面积, 則將所得数乘 4 倍, 再乘稀释倍数, 即得到該单位检量中的細菌总数量。

方格部分是主要协助計算平板中某局限地区的密集菌落羣用的。虽然亦可用以推算全平板中的菌落数, 但运算上不及利用半圓部分的便捷。計算方法: 如果平板的菌落密度大致一样, 則可計算 8—16 个方格中菌落数, 求得每个平方厘米面积里細菌集落数的平均值, 再以平板面积数及稀释倍数相乘即得; 但如平板中菌落密度不一致, 例如在边緣部分較多而在中央部分較少, 或則在中央部分較多而在边緣部分較少等情况, 則必須按照平板各部分面积的 1:3:5 的比例数去計算方格, 求得每平方厘米的菌落数平均值, 再乘平板面积及稀释倍数。例如在平板中央部分数取 1 个方格, 則在中間部分数取 3 个, 而在边緣部分数取 5 个, 余此类推。

三、細菌集落計數器的改良装置

这是针对魁北克式电光菌落計數器 (Quebec' colony counter) 的优缺点而改良設計的(图 4):

1. 放大鏡运轉灵活, 能作上下、左右、前后各方向調动, 放大倍数 (10—20 倍) 可以調节;
2. 采用前述改良規板, 刻划是白地黑綫, 此規板可以随意移动位置;
3. 放置平皿的座板能作适度的傾斜以便利观察, 平皿的圓心与規板的圓心能調整至互相迭合一致并加以固定;
4. 采光方面在白天光綫良好时利用自然光, 在阴天或晚上可用电光。电光是采用电光管的淡蓝白色的光綫从兩側方向投射, 尚有反射鏡供調节光綫用; 在兩光管之間相向着平皿底下的地方安置着黑色板; 这样子做成縱深的黑地作为背景, 以衬出菌落的輪廓;
5. 有捺式录数器协助記数。



图 4 改良設計的細菌集落計數器(詳細說明見本文)

总 結

1. 傾注平板底面由局限性菌落的細菌所形成的菌膜不是由单一个菌体所生成的。有此种菌膜存在, 无论牠大或小, 均不能准确的推算出細菌的数量。但若清楚的填写記錄, 对卫生細菌学的监督亦会有用处的。注意技术操作能够减少这类菌膜形成的机会。

2. 成鏈菌落不是某种細菌的固有生长形式, 而是和检品中的粘性物質有关, 不应作一

个菌体計算。

3. 几种不同情况的菌落密度在使用邬夫赫基尔氏規板协助推算时会发生差誤。
4. 介紹了一种新設計的規板和細菌集落計数器的使用方法及其优点。

参 考 文 献

- [1] 邓定华編:乳品細菌学檢驗法,人民卫生出版社,49:52,1954.
- [2] 子潛譯:食品微生物学檢驗法,人民卫生出版社,70,1956.
- [3] H. Л. 烏切斯基:医用微生物学及其技术綱要,人民卫生出版社,29,1957.
- [4] B. И. 切茨著:卫生細菌学,人民卫生出版社,61,1957.
- [5] 蔡宏道等:实用临床檢驗学,宏文书局,1908,1955.

STUDIES ON THE COLONY COUNTER

Liu Y. K.

(Sanitary Station, Canton)

The author undertook to make a careful study of the different types of colonies when melted agar containing bacteria suspension was poured into Petri dishes, and found that the spreading type of colony was not formed from a single colony (See accompanying photos and diagram). It is emphasized that such spreading type of colonies should be avoided as much as possible in order to secure more accurate colony counts. Also for more accurate enumeration, a new type of colony counter was introduced and its advantages discussed.

* 本文承广州市卫生防疫站微生物檢驗科主任张厚修先生以及孙任医师的校閱,謹此致謝。