

## 双歧杆菌和乳酸菌的一种简便快速计数法\*

马向前\*\* 周德庆

(复旦大学微生物学和微生物工程系 上海 200433)

当前,含双歧杆菌和乳酸菌的各种微生态调节剂正在国内外迅速发展<sup>[1]</sup>。为确保这类制剂的质量,活菌计数极其重要。可是,由于这两类细菌都是厌氧菌,在计数方法上需要特殊的设备和较复杂的操作技术,因此现有方法还很不理想。我们根据高层半固体琼脂培养基具有良好厌氧性能的原理<sup>[2]</sup>,在必要的条件试验基础上,提出了一种适用于双歧杆菌和乳酸菌等不产气厌氧菌的简便快速活菌计数法(下称“本法”),现简报如下。

## 1 材料和方法

## 1.1 菌种

两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*) ATCC29521 菌株(由美国 UMDNJ 的 J. Fu 教授惠赠);青春双歧杆菌(*B. adolescentis*) FTBI 菌株(由本实验室自国内纯菌产品中分得);嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*) FALA 菌株(由本实验室自国外纯菌胶囊中分离)。

## 1.2 培养基

VL 琼脂培养基:按文献[3]方法配制;MRS 培养基和 LAB 培养基:按文献[4]方法配制。

## 2 结果

## 2.1 本法的操作步骤和实验条件

操作步骤如图 1。

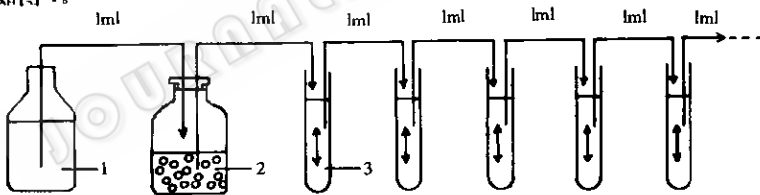


图 1 用高层半固体琼脂试管进行系列稀释

1. 试样; 2. 装有玻璃珠和 99ml 生理盐水的 250ml 血浆瓶(预先煮沸除氧);
3. 9ml 高层半固体培养基(未凝前)

经试验,本法的最适琼脂浓度为 0.3%~0.4%;稀释时,用吸管上下轻搅 3~5 次(不能产生气泡);培养温度为 37℃;培养时间一般为 16~24h(不超过 36h),稀释度以每管菌落数在 30~300 为宜

$$\text{计算公式为: 活菌数(个/ml)} = \frac{\left(\sum_{i=1}^n N_i\right) \times 10 / 9}{n} \times \text{稀释倍数}$$

$n$ : 用来计数的试管数;  $N_i$ : 不同试管中所长的菌落数。

\* 上海市高校科技发展基金项目。

微生物学专业 1995 届本科生严二平和孙刚曾参加部分实验。

\*\* 1996 届硕士研究生。

本文于 1995 年 7 月 26 日收到。

由于在此法中, 稀释管和计数管是同一试管, 所以计数时应注意两点, 一是因每支试管在混匀后都要吸出 1ml, 最后均为 9ml, 所以应乘以  $10/9$  才能表示每毫升菌液实际含菌落数; 二是后一稀释度的试管中长出的菌落数实为前一稀释度每毫升的活菌数, 所以在乘稀释倍数时切忌出错。

## 2.2 本法与其他方法的比较

本法与平板厌氧罐培养法<sup>[5]</sup>及通用乳酸菌计数法<sup>[4]</sup>比较的结果见表 1。

表 1 本法与其他两法的比较

菌种或 试样	平板厌氧罐培养法		通用乳酸菌计数法		本 法	
	培养时间 <i>t</i> / h	菌落数 / ml	培养时间 <i>t</i> / h	菌落数 / ml	培养时间 <i>t</i> / h	菌落数 / ml
ATCC29521	60	$1.1 \times 10^8$			36	$1.5 \times 10^8$
FTBI	72	$5.7 \times 10^8$			24	$6.5 \times 10^8$
FALA			48	$2.8 \times 10^7$	24	$5.4 \times 10^7$
酸奶 1			72	$1.2 \times 10^8$	17	$1.8 \times 10^8$
酸奶 2			一周	$7.1 \times 10^6$	20	$7.4 \times 10^6$

注: 双歧杆菌用 VL 琼脂培养基培养, 乳酸菌和酸奶样品用 MRS 培养基培养。

从表 1 可以看出, 本法与常规的两种计数方法相比, 既简便又快速, 而且活菌检出率也高, 所以在以下实验中, 均采用本法。

## 2.3 最适培养基的选择

对用于双歧杆菌或乳酸菌计数的三种培养基进行比较, 结果见表 2。

表 2 不同培养基对计数结果的影响

菌株或 试样	VL 琼脂		培 养 基 MRS		LAB	
	培养时间 <i>t</i> / h	菌落数 / ml	培养时间 <i>t</i> / h	菌落数 / ml	培养时间 <i>t</i> / h	菌落数 / ml
ATCC29521	36	$1.5 \times 10^8$	36	$1.3 \times 10^8$	36	$2.9 \times 10^8$
FTBI	24	$2.1 \times 10^8$	24	$3.5 \times 10^8$	24	$3.1 \times 10^9$
FALA	40	$3.8 \times 10^6$	24	$5.4 \times 10^7$	24	$2.0 \times 10^8$
酸奶 1	24	$2.0 \times 10^7$	17	$1.8 \times 10^7$	17	$2.5 \times 10^7$
酸奶 2	40	0	20	$7.4 \times 10^7$	20	$7.3 \times 10^7$

表 3 若干含双歧杆菌和乳酸菌商品中的活菌数

商品编号	生产日期	计数日期	活菌数	商标上的活菌数
B-1	1994.12	1995.6.1	$2.5 \times 10^9$ 个 / g	$3.6 \times 10^9$ 个 / g
L	1994.6	1995.2	$6.8 \times 10^7$ 个 / g	$1.0 \times 10^8$ 个 / g
J	1994.10.25	1995.6.2	$1.9 \times 10^7$ 个 / g	$1.0 \times 10^8$ 个 / g
P	1995.5.3	1995.6.28	$8.5 \times 10^6$ 个 / g	$2.0 \times 10^8$ 个 / g
N	1995.1	1995.6	$4.0 \times 10^6$ 个 / g	约 $10^7$ 个 / g
S-1	1995.3.25	1995.6.1	$2.0 \times 10^6$ 个 / ml	$1.0 \times 10^8$ 个 / ml
Y	1995.2.15	1995.6.1	$1.9 \times 10^4$ 个 / ml	$1.0 \times 10^6$ 个 / ml
M	1995.4.8	1995.7.14	$3.8 \times 10^4$ 个 / g	$1.0 \times 10^6$ 个 / g
H	1994.3.21	1995.6.1	$3.0 \times 10^5$ 个 / g	$1.0 \times 10^8$ 个 / g
A	1995.5.11	1995.7.14	$1.9 \times 10^3$ 个 / ml	$1.0 \times 10^6$ 个 / ml
S-2	1995.3	1995.7.14	$1.3 \times 10^3$ 个 / ml	$1.0 \times 10^6$ 个 / ml
B-2	1994.7	1995.6.20	$2.8 \times 10^7$ 个 / g	—
酸奶 3	1995.5.5	1995.5.5	$2.4 \times 10^8$ 个 / ml	—

从表 2 可以看出,无论对双歧杆菌(ATCC29521, FTBI),还是对乳酸菌(FALA, 酸奶中的乳酸菌),都以 LAB 的检出率为高,故在以下试验中均采用 LAB。

#### 2.4 各商品中所含双歧杆菌和乳酸菌数的检测

为检验本法的实际效果,我们对市售商品(包括国外产品)进行了活菌检测,结果见表 3。

### 3 讨论

双歧杆菌和乳酸菌的传统计数法主要包括“试样分散→系列稀释→涂布或倾注平板→厌氧培养→菌落计数”五步操作,由此必然带来设备特殊、操作繁琐和耗时费力等缺点。本文作者在验证了高层半固体琼脂培养基具有良好厌氧性能的基础上,提出了集稀释(凝固前)和计数(凝固后)于同一试管的设想,使活菌计数只需“试样分散→系列稀释+常规培养→菌落计数”三步。经试验,证明它不但可省略厌氧培养装置和简化许多操作,而且还有明显缩短培养时间等优点,因此,这是一种有较高应用价值的计数法。

### 参 考 文 献

- [1] 康白. 微生态学原理. 大连: 大连出版社, 1996. 131~144.
- [2] 周德庆. 微生物学教程. 北京: 高等教育出版社, 1993. 200.
- [3] Rasic J L, Kurmann J A. Bifidobacteria and Their Role. Birkhauser Verlag, Basel Boston Stuttgart, 1983. 144~158, 170~171.
- [4] 许本发, 李宏建, 柴金贞. 酸奶和乳酸菌饮料加工. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 167~169.
- [5] 赵国屏, 周德庆. 微生物学通报, 1984, 11(1): 26~29.

## A SIMPLER AND FASTER METHOD FOR ENUMERATING BIFIDOBACTERIA AND LACTIC ACID BACTERIA

Ma Xiangqian      Zhou Deqing

(Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Fudan University, Shanghai 200433)

**Abstract** A new method is reported for the enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria which don't produce gas. The advantages of this method are: (1) simplicity—the tube which contains high layer semi-solid has two functions: dilution and enumeration, so the overelaborate enumeration procedure by using plate can be abolished; the instrument for anaerobic cultivation and related operation can be omitted because of the good anaerobic property of high layer semi-solid agar tube. (2) rapidity—the counting of bifidobacteria and lactic acid bacteria can be done after incubation about 16~24h if we use this method, while in the traditional plate method, 48~72h are needed. (3) preciseness—counts of bifidobacteria or lactic acid bacteria are similar to or higher than that of the traditional plate method. We had measured the viable count of bifidobacteria and lactic acid bacteria in commercial probiotics and yogurts by using this method.

**Key words** Semi-solid agar medium, Enumeration, *Bifidobacterium*, Lactic acid bacteria