

微生物培养基质量控制技术和标准*

吴清平¹ 孟凡亚^{1,2,3} 蔡芷荷⁴ 刘秀梅⁵ 杨宁⁴

(广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)¹

(中国科学院南海海洋研究所 广州 510301)² (中国科学院研究生院 北京 100049)³

(广东环凯微生物科技有限公司 广州 510070)⁴

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全研究所 北京 100050)⁵

摘要: 微生物培养基的酸碱度、凝胶强度和选择性等直接影响到培养基的质量,在理化试验方法中采用连接可渗透陶器型液体接头的电极和平头电极或者连接微型探头的电极可分别测定液体和固体培养基的 pH 值,而采用 Gelometer 和 the LFRA Texture Analyser 可测定固体培养基的凝胶强度。在微生物学方法中固体培养基采用倾注平板法、涂布法、划线法(半定量法)、改良的 Miles-Misra 法等测定生长情况,液体培养基采用稀释法测定生长率,用目标菌和杂菌的混合菌株评价选择性增菌培养基的选择性,利用 OD 值评价液体培养基生长率等。ICFMH (国际食品微生物学和卫生学委员会培养基工作组)、ISO、FDA 以及我国卫生部等相继制定了培养基质量控制的标准,但目前还没有一个系统的适合我国国情的培养基质量控制国家标准,以致各相关单位采用的标准不一致,所以制定培养基质量控制国家标准非常关键。

关键词: 培养基, 质量控制, 标准

中图分类号: Q93-335 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-00-0

Techniques and Standards for Quality Control of Microbial Culture Media*

WU Qing-Ping¹ MENG Fan-Ya^{1,2,3} CAI Zhi-He⁴ LIU Xiu-Mei⁵ YANG Ning⁴

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)¹

(South China Sea Institute of Oceanology, CAS, Guangzhou 510301)²

(Graduate University of Chinese Academy of Sciences, GUCAS, Beijing 100049)³

(Guangdong Huankai Microbial Sci. & Tech. Co., Ltd, Guangzhou 510070)⁴

(Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050)⁵

Abstract: The quality of media can be directly influenced by pH value, gel consistency and selectivity of media. The pH of liquid media should be checked by electrodes with a porous ceramic type of liquid junction, and the pH of gels may be tested using either a flat-head electrode or a micro probe combination electrode. Gel strength of agar can be checked by Gelometer and the LFRA Texture Analyser. Solid media can be checked by methods such as pour or spread plate counts, streaking method and modified Miles-Misra method, liquid media can be checked by dilution, with mixed cultures of wanted and unwanted microorganism and based on OD measurements. ICFMH, ISO, FDA and the Ministry of Health of China have established some standards for culture media. But there are no systematic standards for China. Standards corresponding with the situation of our country must be established in the near future.

Key words: Culture media, Quality control, Standards

* 广东省科技计划项目资助 (No. 2004B80502003)

通讯作者 Tel: 020-87688132, E-mail: wuqp@gdas.ac.cn

收稿日期: 2006-01-16, 修回日期: 2006-02-28

我国生产培养基已有相当长的历史,因为培养基种类繁多,生产培养基的厂家也有很多,虽然很多相关单位都有自己的质量控制标准,但到目前还没有一个系统全面适合我国国情的国家标准,以致培养基的质量参差不齐,直接影响到很多微生物学实验结果,所以制定微生物培养基的国家标准非常关键。培养基质量控制方法包括理化试验方法和微生物学试验方法,其中理化试验方法包括 pH 值的测定、凝胶强度的测定等,微生物学试验方法分固体和液体培养基的定量和半定量以及定性试验。本文就培养基的质量控制做一综述,为制定培养基质量控制国家标准提供参考。

1 培养基质量控制方法

1.1 理化试验方法^[1]

1.1.1 pH 值测定:灭菌前后都应该测定 pH 值,采用连接可渗透陶器型液体接头的电极测定液体培养基的 pH,固体培养基可用平头电极(Radiometer A/S, DK-2400 Copenhagen NV, Denmark)或者连接微型探头的电极(Microelectrodes Inc., NH 03053, U. S. A.)测定 pH。pH 值在灭菌前后均需测定,测量时尽量使培养基温度降到 20℃ ~ 25℃,校正通常用接近 40g/L 的 NaOH 或者接近 36.5g/L (约 1mol/L) HCl。

1.1.2 凝胶强度测定:凝胶强度也是一个重要指标,灭菌条件特别是 pH 会影响凝胶强度。Gelometer (Marine Colloids Inc., 2, Edison Place, Springfield, NJ 07081, U. S. A.) 和 the LFRA Texture Analyser (C. S. Stevens & Son Ltd. Dolphin Yard, Holywell Hill, St. Albans, Herts, U. K.) 均能提供良好的测量性能。这种仪器利用直径为 10mm ~ 25mm 的圆柱形金属探头测量压破琼脂表面时所需的压力。

一般理化试验可迅速测出配方中存在的错误,而不需等待微生物培养试验,因此理化试验是培养基质控的有效手段。

1.2 微生物学试验方法

1.2.1 质控菌株的保存:一般细菌保存菌种的制备可从质控菌株接种于含 5% 羊血的胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)上,在合适的环境和温度下孵育 18 ~ 24h,接种以后,通过菌落形态检查纯度和验证一致性。必要时实施生化试验。然后制成冻干菌种,或制成含有 10% 到 15% 甘油的防冷冻培养物置于 -50℃ 或更低的温度保存备用。在低于 -70℃ 的温度下菌株可以无限期保存,在 -50℃ ~ -70℃ 仅能保存 1 年,通常不应在 -50℃ 以上的温度保存^[2]。真菌可用特别制备的马铃薯冷冻琼脂制成斜面,培养后至 -20℃ 能保存 1 年^[3]。

1.2.2 固体培养基的试验方法:(1) 改良的 Miles-Misra 法^[4]:将新鲜菌种用蛋白胨水稀释;将试验和对照培养基做成 4mm 厚的平板并使平板表面干燥;对试验和对照培养基进行系列稀释度接种,每稀释度各取 4 滴分别加入 4 个试验和对照培养基;每 1 滴的涂布超过 1/4 平板,并用涂布器从高稀释度开始涂布;培养平板并对数量和菌落形态进行评价。

评价方法:生长率(productivity ratios, P_R) = N_s/N_0 , N_0 = 对照培养基的菌落数, N_s = 试验培养基的菌落数; m 和 M : m 表示 80% 的菌株需要符合的生长率, M 表示 100% 的菌株需要符合的生长率,满意的生长率见表 1。

表 1 满意的生长率

培养基种类	满意的生长率
非选择性培养基	$m < 0.9$ $M < 0.7$
选择性培养基—目标菌 (包括非常敏感的菌株)	$m < 0.7$ $M < 0.3$
- 杂菌	$m \geq 0.00001M$ ≥ 0.001

(2) 划线法 (半定量)^[5]: 平板如图 1 所示, A、B、C 区中 4 条平行线大概相隔 0.5cm, 正常情况下, 一环从 A 区划到 D 区。

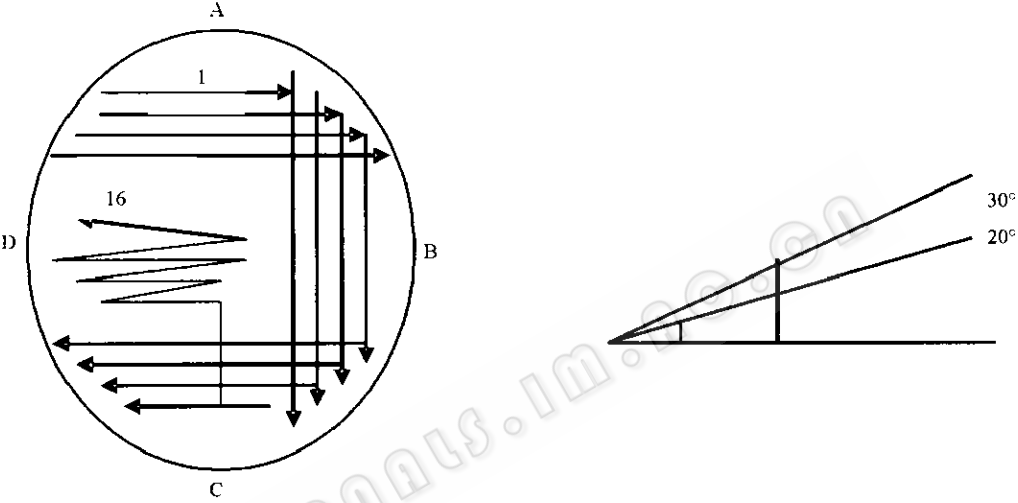


图 1 划线的方法示意图和接种环的角度

评价方法: 接种以后, 评定菌落形态、菌落大小、生长强度和计算生长指数 G_1 。每条线都表示 1 个分数。最大分数是 16。如果只生长到线的一半就认为数值是 0.5。没有生长或者只有很少量 (少于一半) 的生长, 分数是 0。分数加起来得到 G_1 。例如, 如果生长到 A 区, B 区, C 区的一半, 那么生长分数 G_1 就是 10。目标菌株的生长指数应该至少是 6。如果是非选择培养基 G_1 就应该是更高。另外, 目标菌株的生长应该是典型的, 非目标菌株应该部分或全部被抑制。

(3) 定性质控方法^[5]: 用 1 μ L 的接种环在试验培养基表面上划平行线, 接种试验微生物。可以在同一个培养基上不交叉地接种几种不同的试验微生物。

评价方法: 接种以后的生长情况: 0 相当于不生长; 1 相当于弱生长; 2 相当于强生长。目标微生物的分数应该是 2 并且要有典型的特征, 大小和菌落形态。非目标微生物的生长应该被部分或全部抑制 (0 或 1)。

1.2.3 液体培养基的试验方法: (1) 目标和非目标微生物的定量稀释方法^[5]: 选择液体培养基 10mL/管待检; 目标微生物的接种: 将少量的 (如 10 ~ 100cfu/管) 试验菌株接种到试验和对照肉汤, 并混匀; 非目标微生物的接种: 将大量的 (>1,000 cfu/管) 试验菌株接种到试验和对照肉汤, 并混匀; 接种目标和非目标微生物作为混合菌种: 为了得到混合菌种在选择培养基上的生长情况, 接种少量的目标微生物 (如 10 ~

100cfu/管)到试验肉汤和对照肉汤,并且接种更大量(>1,000cfu/管)的非目标微生物到相同的管中,并混匀;每种肉汤接种培养后涂布到非抑制性培养基平板上。

评价方法:计算目标和非目标微生物的菌落数,用 P_R 和 S_F 进行结果的解释。

P_R (同前所述):目标微生物的 P_R 应该不小于0.1。

S_F (选择性因子)的计算如下: $S_F = D_0 - D_S$

这里 D_0 是对照培养基上至少10个菌落的最高稀释度, D_S 是试验培养基上至少10个菌落的最高稀释度。 S_F , D_0 和 D_S 采用 $\log_{10}$ 为单位来表示。例如:如果 $D_0 10^{-4} = \log_{10} 4 = 4$,而 $D_S 10^{-3} = \log_{10} 3.0 = 3$,那么选择性因子就是 $S_F = 1.0$ 。非目标微生物的 S_F 至少应该是2。

在混合菌种中目标微生物不应被非目标微生物抑制,也就是说目标微生物应该是占多数。

(2) 利用OD值评价液体培养基生长率^[6]:一种自动微生物生长分析仪 Bioscreen microbiological growth analyzer (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) 用于比较试验液体培养基和对照液体培养基培养后微生物的数量,动态测量OD值,并将数据转换成生长曲线,该OD值与微生物数量有极好的相关性。这种方法不需作系列稀释,并且减少试验材料的需要,是一种便宜、快速和可靠的方法。

2 培养基质量控制标准

2.1 国外培养基质量控制标准 1984年,国际食品微生物学和卫生学委员会培养基工作组(The International Committee for Food Microbiology and Hygiene, Working Party for Culture Media)(ICFMH, WPCM)提出了微生物培养基质量控制的标准方案^[7],制定了检验培养基质量的导则和标准,其后又补充了工作组发表过的一些专题论文和试验方法。

美国食品与药品管理局(FDA)早在80年代就对培养基制造商建立了生产条例。美国国家临床实验室标准委员会培养基质量控制委员会(The National Committee for Clinical Laboratory Standards, Subcommittee on Media Quality Control)(NCCLS)在1985年提出并在1990年通过了导则“M22-A 商品微生物培养基质量控制”的标准,1996年修改第二版,2001年修改第三版^[8]。

ISO在2000年制定了一份技术规格标准:“ISO/TS 11133-1 食品和动物饲料微生物学——制备和生产培养基的导则——第一部分:实验室制备培养基质量控制的一般导则”^[9]。2003年又制定了“ISO/TS 11133-2 食品和动物饲料微生物学——制备和生产培养基的导则——第二部分:培养基检验规程的应用导则”^[5]。

美国药典和欧洲药典均对液体硫乙醇酸盐和胰蛋白胨大豆肉汤两种无菌检查培养基进行促菌生长试验,规定两种培养基在质控菌少量接种(10-100cfu)的情况下必须生长良好。但没有对其它培养基进行质控要求,而且质控要求也不够系统。

2.2 我国培养基质量控制标准 中国微生物学会培养基学组1990年以来对培养基的原材料和部分商品培养基相继提出了质控标准^[10]。我国卫生部1993年制定了“食品卫生微生物检验用干燥培养基生产质控和质量标准”;2002年卫生部医政司参考NCCLS

标准制定了卫生行业标准:“WS/T232-2002 商业性微生物培养基质量检验规程”,紧接着2005年中华人民共和国药典^[11]规定了对需气菌、厌氧菌培养基和真菌培养基3种无菌检查培养基进行促菌生长试验。

3 讨论

我国卫生行业标准“WS/T232-2002 商业性微生物培养基质量检验规程”微生物生长试验为定性结果,结果的判断可操作性需进一步提高。美国国家临床实验室标准委员会制定的“M22-A 商品微生物培养基质量控制”的标准也有类似情况。而 WPCM 将培养基的质控结果定量并分为5个级别,使结果易于判断,因此建立的质控标准应该尽可能定量。2001年加拿大对 Ontario^[12]的124个实验室进行考查,得出的结果是大多数实验室不能完全达到 NCCLS 标准的要求,表现为一些培养基根本没有进行质控,另外一些问题是:没有采用要求指定的 ATCC 菌株、培养的温度和时间不适宜、成品培养基没有物理特性的检查记录、大多数实验室没有供应商的控制报告等。因此制定的试验方法在可得出可靠结果的同时,应考虑我国国情,尽量简单易行,如果要求较高的操作技术水平或昂贵的设备仪器,则标准难以普及执行。此外,质控菌株的选用还应侧重考虑我国食品卫生细菌污染的实际状况。质控标准的试验方法均需要对照培养基进行评价,在我国卫生部1993年制定了“食品卫生微生物检验用干燥培养基生产质控和质量标准”中采取自配的新鲜培养基为对照培养基尚需进一步斟酌,因自配培养基本身不定因素很多,而选用合适的培养基作对照相当关键。

由于食品微生物培养基品种较多,而国内可参考的资料不多,国外的一些标准起点可能较高,不一定完全适合我国情况,因此标准和试验方法的制定工作量较大,可以参考 ISO 标准,将制定标准分为两步,首先制定一般导则,再制定标准和试验方法。ISO 标准的一般导则较为系统,从生产商的产品供应到实验室制备、产品使用、产品销毁和最终产品的质量控制等各方面和各环节均作出了详细规定,可作为我国制定微生物培养基质控标准的重要参考。

参考文献

- [1] Curtis G D W. *International Journal of Food Microbiology*, 1985, 2: 13 ~ 20.
- [2] NCCLS. NCCLS document M22-A2 (ISBN 56238-316-7), 1996, 16 (16) .
- [3] Otto V. *American Journal of Medical Technology*, 1977, 43 (4): 345 ~ 348.
- [4] Appendix A. *International Journal of Food Microbiology*, 1985, 2: 133 ~ 136.
- [5] The International Organization for Standardization. ISO/TS 11133-2, 2003.
- [6] Johnston M D. *Journal of Microbiological Methods*, 1998, 32: 37 ~ 43.
- [7] International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH) . *Quality Assurance and Quality Control of Microbiological Culture Media*, 1984.
- [8] NCCLS. NCCLS document M22-A3 (ISBN 1-56238-536-4), 2004, 24 (19) .
- [9] The International Organization for Standardization. ISO/TS 11133-1, 2000.
- [10] 陈天寿. 微生物培养的制造与应用. 北京: 中国农业出版社, 1995. 8 ~ 143.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典第三册. 北京: 化学工业出版社, 2005. 附录 73 ~ 75.
- [12] Zoutman D, Fleming C, Richardson H. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2002, 42: 29 ~ 34.