

# 选择性计数双歧杆菌培养基的效果比较\*

孟祥晨 庞 睿

(乳品科学教育部重点实验室(东北农业大学), 东北农业大学食品学院, 哈尔滨, 150030)

**摘 要** 随着双歧杆菌基础研究和开发应用的迅速发展,双歧杆菌活菌计数方法越来越重要,实验目的是要选择1种适于选择性计数产品中双歧杆菌菌落数的培养基。主要采用菌落技术方法,比较了常用的8种选择性培养基对7种产品中双歧杆菌的选择性计数效果。结果表明,以改良MRS-X-Gal琼脂培养基上形成的双歧杆菌菌落数最高,且菌落特征明显,易于计数,是优选出的效果较好的选择性计数培养基。

**关键词** 选择性计数,双歧杆菌,培养基

在发酵乳中双歧杆菌通常与其他乳酸菌同时使用,大多数国家要求乳制品在贮藏中双歧杆菌的存活数量应大于 $10^6$  cfu/g(mL)。因此就需要有快速、可靠的方法对双歧杆菌进行计数。当制剂或食品中仅含有双歧杆菌时,其计数不存在问题,但在多数情况下,双歧杆菌总是与其他乳酸菌联合使用,如嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌及嗜热链球菌等,相近的生长特点使它们很难区分,这就给双歧杆菌的选择性计数带来了困难。近年来国外的研究主要集中在培养基的设计上,即利用选择性培养基,当双歧杆菌与其他菌在一起生长时,能表现出易于鉴别的特征,便于区分、计数。这些选择性鉴别培养基具有以下特点:双歧杆菌能较好生长,其他细菌则受到抑制;双歧杆菌在此培养基上形成菌落的形态、大小及颜色易与其他细菌区别<sup>[1]</sup>。

通过对MRS琼脂、双歧杆菌培养基、LBS琼脂、EG琼脂、GAM琼脂、普通营养琼脂计数比较,目前认为单菌培养时MRS琼脂对双歧杆菌检出率最高。根据双歧杆菌与其他细菌相比具有较高 $\alpha$ -半乳糖苷酶活性这一特点,在培养基中加入特异性底物——X- $\alpha$ -Gal,由于双歧杆菌的生长,使得这种底物分解,菌落成为蓝色,从而可以较明显地和其他乳酸菌分开<sup>[2,4]</sup>。

目前市场上销售的双歧杆菌产品品种繁多,但要发挥双歧杆菌正常的保健功效,需保证双歧杆菌活菌数达到 $10^6$  cfu/mL以上。为了确保双歧杆菌产品的质量,加强对该类产品的监督,有必要统一选择性计数双歧杆菌的培养基以及检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 实验材料

益生菌制剂1、益生菌制剂2、益生菌制剂3(市售);含双歧杆菌奶粉1、含双歧杆菌奶粉2、含双歧杆菌奶粉3(市售);双歧杆菌菌粉1、双歧杆菌菌粉2(自制);含双歧杆菌酸奶1、含双歧杆菌酸奶2(自制)。

#### 1.1.2 培养基材料

蛋白胨、胰蛋白胨、大豆蛋白胨、酪蛋白胨、酵母粉、琼脂粉、牛肉膏、L-半胱氨酸盐酸盐、葡萄糖、低聚糖等,均为国产,多肽为日本产。

#### 1.1.3 仪器与设备

电热蒸汽压力消毒器(上海三三医疗器械有限公司);无菌操作台(苏州医用器械厂);光学显微镜(OLYMPUS);精密电子天平(瑞士);梅特勒-托利多Delta320 pH计;厌氧培养箱(黑龙江省医院自制)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 含双歧杆菌酸奶的制作

准确称量脱脂乳粉27.5 g,加入250 mL蒸馏水,充分溶解,于115℃灭菌15 min,冷却到40℃左右,无菌操作,加入0.05 g(0.2%)罗地亚酸奶直投式发酵剂,放入42℃温箱内保温发酵2~4 h,直至乳凝固,取出冷却,放入4℃冰箱后熟,过夜,然后无菌操作加入25 g婴儿双歧杆菌菌粉或长双歧杆菌菌粉,混合均匀即可。

#### 1.2.2 样品稀释、涂布及厌氧培养

(1)双歧杆菌制剂:在无菌室内无菌称量3 g制剂,加入27 mL灭菌稀释液,充分摇匀,进行10倍梯度的稀释,取3个稀释梯度 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ ,然后取0.1 mL分别涂布于不同稀释梯度的培养基上,每个

第一作者:博士,副教授。

\* 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZJN03-3)·黑龙江省教育厅重大项目(105117003)共同资助

收稿日期:2005-02-25

稀释度做3个平行样,用灭菌的L棒均匀涂布,同时做稀释液的空白对照。然后放于厌氧培养箱内,37℃,80% N<sub>2</sub>、10% H<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>的条件下培养48 h。取出观察菌落形态,挑选特征菌落进行革兰氏染色,观察菌体形态。

(2)含双歧杆菌酸奶:在无菌室内,用灭菌移液管吸取25 mL酸奶,加入225 mL灭菌稀释液,充分摇匀,进行10倍梯度稀释,取3个稀释梯度10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>,然后取0.1 mL分别涂布于培养基上,每个梯度做3个平行样,用灭菌的L棒均匀涂布,同时做稀释液的空白对照。然后放于厌氧培养箱内,37℃,80% N<sub>2</sub>、10% H<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>的条件下培养48 h。取出观察菌落形态,挑特征菌落进行革兰氏染色,观察菌体形态。

(3)含双歧杆菌奶粉:在无菌室内,无菌称量25 g奶粉,加入225 mL灭菌稀释液,充分摇匀,用灭菌移液管吸取1 mL,加入9 mL灭菌稀释液,进行10倍梯度的稀释,取3个稀释梯度10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>,然后取0.1 mL分别涂布于上述培养基上,每个梯度做3个平行样,用灭菌的L棒均匀涂布,同时做稀释液的空白对照。然后放于厌氧培养箱内,37℃,80% N<sub>2</sub>、10% H<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>的条件下培养48 h。取出观察菌落形态,挑特征菌落进行革兰氏染色,观察菌体形态。

### 1.2.3 双歧杆菌菌落计数

选择菌落数在30~300之间的平板,计数具有双歧杆菌菌落特征的菌落,并随机挑取5个进行证实试验,计算双歧杆菌菌落数方法如下:

菌落数[cfu/g(mL)] = 平皿特征菌落数 × 10 × 稀释度 × X/5

X:表示证实后的双歧杆菌菌落数。

### 1.2.4 双歧杆菌的糖发酵试验

糖发酵培养基:多肽5 g,胰酶水解酪蛋白5 g,酵母粉10 g,刃天青1 mL,盐溶液40 mL,L-半胱氨酸盐酸盐0.5 g,牛肉浸汤1 000 mL,pH 7.0,115℃灭菌15 min。

盐溶液:CaCl<sub>2</sub> 0.2 g,MgSO<sub>4</sub> 0.2 g,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g,NaCl 2.0 g,蒸馏水1 000 mL。

试验方法:将上述培养基中除指示剂外的成分混合溶解,调节pH值至7.0,再加入指示剂混匀,分装于小试管中,每管3 mL,灭菌。将供试糖类配制成溶液灭菌后,取1 mL加入到灭菌的培养基中,充分混匀。从TPY琼脂平板挑取典型的双歧杆菌菌落接种于糖发酵管中,37℃厌氧培养24~72 h后观察并记

录结果。

### 1.2.5 数据处理方法

所获取的数据用SAS软件进行方差分析,并用邓肯氏极大复差法进行多重比较,检验误差水平为0.05水平。

## 2 实验结果

### 2.1 改良MRS培养基与改良TPY培养基对双歧杆菌培养效果的比较

3种产品同时采用改良MRS和改良TPY两种基础培养基进行菌落计数。经37℃,48 h厌氧培养后,3种产品在不同琼脂培养基上均有不同数量的菌落形成,且菌落特征较为明显。计数结果详见表1。

表1 3种检测样品在2种选择性培养基上形成的双歧杆菌菌落数(n=3) cfu/g(mL)

选择性培养基	所检测的产品		
	益生菌制剂1	双歧杆菌菌粉1	双歧杆菌菌粉2
改良MRS	(4.8±0.2)×10 <sup>5</sup> *	(3.8±0.3)×10 <sup>8</sup> *	(4.3±0.2)×10 <sup>8</sup> *
改良TPY	(4.3±0.4)×10 <sup>8</sup> *	(2.9±0.2)×10 <sup>8</sup> <sup>b</sup>	(4.1±0.4)×10 <sup>8</sup> *

注:同列数据角标不同表示差异显著(P<0.05)。

结果显示,3种产品在2种培养基上均能形成一定数量的菌落,双歧杆菌菌粉1在2种培养基上的计数结果差异显著(P<0.05),改良MRS的计数效果优于改良TPY;其他2种产品的计数结果无显著性差异(P>0.05)。从商业利用角度看,就培养基制备时间和原料成本而言,改良TPY琼脂培养基不及改良MRS培养基。因此,改良MRS培养基是较佳的选择。

### 2.2 八种选择性培养基对双歧杆菌选择性计数效果的比较

3种产品同时采用8种选择性培养基进行菌落计数,经37℃、48 h厌氧培养后,3种产品在不同培养基上均有不同数量的菌落形成。计数结果详见表2。

结果表明,在这8种选择性培养基中,改良MRS-X-Gal琼脂培养基上形成的菌落特征最为明显,双歧杆菌菌落为蓝色,其他乳酸菌生长基本受到抑制,数量较少,菌落为白色或浅蓝色,而且在改良MRS-X-Gal培养基上检测到的双歧杆菌数最高,与其他几个培养基相比,差异显著(P<0.05)。在BBL琼脂和改良MRS-LP琼脂上双歧杆菌菌落数高于乳酸菌菌落数,且菌落形态相近,不易计数。在改良MRS-NPNL琼脂培养基上,双歧杆菌菌落数与乳酸菌菌落数基本相近,且菌落形态相近,不易计数。在其他选择性培养基上,乳酸菌菌落数高于双歧杆菌菌

落数,计数效果不好。综上所述,以改良 MRS-X-Gal 琼脂培养基为最佳,但考虑到改良 MRS-LP 效果位

居第 2 位,其成本较低,因此在下面的试验中进一步对 2 者进行比较。

表 2 三种产品在八种选择性计数培养基上形成的双歧杆菌菌落数(n=3) cfu/g(mL)

选择性培养基	所检测的产品		
	益生菌制剂 1	双歧杆菌菌粉 1	双歧杆菌菌粉 2
改良 MRS-X-Gal	$(2.8 \pm 0.2) \times 10^5$ <sup>a</sup>	$(2.0 \pm 0.1) \times 10^8$ <sup>a</sup>	$(2.5 \pm 0.2) \times 10^8$ <sup>a</sup>
改良 MRS-LP	$(2.0 \pm 0.1) \times 10^5$ <sup>b</sup>	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^8$ <sup>b</sup>	$(2.0 \pm 0.1) \times 10^8$ <sup>b</sup>
BBL	$(2.7 \pm 0.1) \times 10^5$ <sup>a</sup>	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^8$ <sup>b</sup>	$(1.5 \pm 0.03) \times 10^8$ <sup>c</sup>
改良 MRS-NPNL	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^5$ <sup>c</sup>	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^8$ <sup>c</sup>	$(1.5 \pm 0.04) \times 10^8$ <sup>c</sup>
改良 MRS-刃天青	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^5$ <sup>c</sup>	$(8.5 \pm 0.4) \times 10^7$ <sup>c</sup>	$(6.3 \pm 0.2) \times 10^7$ <sup>d</sup>
BS	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^5$ <sup>c</sup>	$(8.7 \pm 0.3) \times 10^7$ <sup>c</sup>	$(7.2 \pm 0.3) \times 10^7$ <sup>d</sup>
GAM	$(3.0 \pm 0.1) \times 10^4$ <sup>d</sup>	$(5.4 \pm 0.3) \times 10^7$ <sup>d</sup>	$(5.8 \pm 0.4) \times 10^7$ <sup>e</sup>
EG	$(4.3 \pm 0.3) \times 10^4$ <sup>d</sup>	$(4.6 \pm 0.3) \times 10^7$ <sup>d</sup>	$(4.2 \pm 0.2) \times 10^7$ <sup>e</sup>

注:同列数据角标不同表示差异显著(P<0.05)。

2.3 改良 MRS-X-Gal 和改良 MRS-LP 培养基对市售产品中双歧杆菌的选择性计数结果

每种产品同时采用 2 种选择性培养基进行双歧杆菌菌落计数。经 37℃,48h 厌氧培养后,每种产品在不同琼脂培养基上均有不同数量的菌落形成,在改良 MRS-X-Gal 培养基上形成的双歧杆菌菌落特征较为明显,易于计数。在改良 MRS-LP 培养基上形成的双歧杆菌菌落与其他乳酸菌形成的菌落相近,不易计数。计数结果详见表 3。由表 3 可以看出,只有益生菌制剂 3 在 2 种培养基上的计数结果差异显著(P<0.05),其他几种产品的计数结果均无显著性差异,但对于不熟悉双歧杆菌菌落和菌体形态的检测人员而言,推荐采用改良 MRS-X-Gal 培养基,因为在该培养基上形成的双歧杆菌菌落特征较为明显,易于计

数。

表 3 五种产品在两种选择性培养基上形成的双歧杆菌菌落数(n=3) cfu/g

检测产品	改良 MRS-X-Gal	改良 MRS-LP
益生菌制剂 2	$(7.0 \pm 0.2) \times 10^8$ <sup>a</sup>	$(7.9 \pm 0.5) \times 10^8$ <sup>a</sup>
益生菌制剂 3	$(1.8 \pm 0.3) \times 10^3$ <sup>a</sup>	$(1.2 \pm 0.02) \times 10^3$ <sup>b</sup>
含双歧杆菌奶粉 1	$(8.2 \pm 0.3) \times 10^6$ <sup>a</sup>	$(8.4 \pm 0.2) \times 10^6$ <sup>a</sup>
含双歧杆菌奶粉 2	$(1.2 \pm 0.04) \times 10^6$ <sup>a</sup>	$(1.3 \pm 0.02) \times 10^6$ <sup>a</sup>
含双歧杆菌奶粉 3	$(5.3 \pm 0.4) \times 10^5$ <sup>a</sup>	$(4.8 \pm 0.3) \times 10^5$ <sup>a</sup>

注:同列数据角标不同表示差异显著(p<0.05)。

2.4 双歧杆菌糖发酵试验结果

将从益生菌制剂 1、含双歧杆菌奶粉 1 和含双歧杆菌酸奶 1 分离出的双歧杆菌进行糖发酵试验,将分离得到的双歧杆菌分别记作 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>。表 4 是所分离的双歧杆菌糖发酵结果。

表 4 双歧杆菌糖发酵试验结果<sup>1)</sup>

	葡萄糖	蔗糖	麦芽糖	乳糖	阿拉伯糖	棉籽糖	木糖	果糖	半乳糖	海藻糖	密二糖	甘露醇
B <sub>1</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
B <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
B <sub>3</sub>	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-

1)培养基颜色变黄为阳性,记作+;不变色为阴性,记作-。

通过此实验可以初步判定所分离的 3 株菌 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 分别是,长双歧杆菌、长双歧杆菌以及婴儿双歧杆菌。从分类学角度看,细菌鉴定不能只限于糖发酵试验,但这 3 株菌均是相应标定菌,因此试验结果具有可靠性。

3 讨 论

3.1 选择性培养基对双歧杆菌菌落计数的影响

实验中对市售益生菌制剂、含双歧杆菌奶粉、自制的含双歧杆菌酸奶,采用不同培养基对双歧杆菌进行选择计数,结果显示双歧杆菌在 8 种选择性培养

基(改良 MRS-LP、改良 MRS-NPNL、改良 MRS-X-Gal、改良 MRS-刃天青、GAM、EG、BS、BBL)上均能生长,但所形成的菌落数有显著差异,在改良 MRS-X-Gal 琼脂培养基上形成的数量为最多,而且在该培养基上形成的菌落特征明显,易于计数。

双歧杆菌和乳酸菌均含有半乳糖苷酶,在改良 MRS 中加入 X-Gal 作为底物,半乳糖苷酶可分解底物,释放出吲哚。由于双歧杆菌的半乳糖苷酶活性比乳酸菌及其他细菌高,吲哚释放的量不同,使双歧杆菌与乳酸菌和其他细菌菌落呈现不同深浅的颜色,培养基上双歧杆菌菌落呈蓝色,其他细菌一般为白色或

浅蓝色<sup>[2]</sup>。长双歧杆菌半乳糖苷酶在  $Mn^{2+}$  存在的条件下可被少量激活,因而在双歧杆菌培养基中应加入适量硫酸锰<sup>[3]</sup>。

在配制培养基时,抗生素、X-Gal、维生素等应该在灭菌后并冷却到 50~55℃ 再加入,否则将影响它们的选择性。加入的抗生素浓度要适量,否则不仅抑制其它菌的生长,也会抑制双歧杆菌的生长。对于改良 MRS-LP 培养基,只有当氯化锂为 2 g/L,丙酸钠为 3 g/L 时<sup>[2]</sup>,才能保证双歧杆菌生长良好,其他菌受到抑制。

与其他蛋白胨相比,胰蛋白胨由于富含双歧杆菌生长所需的鸟氨酸、瓜氨酸、谷氨酸、天门冬酰氨等,能明显提高双歧杆菌的活菌检出率。

### 3.2 乳酸菌的生长对双歧杆菌菌落计数的影响

在改良 MRS-X-Gal 培养基上,乳酸菌生长受到一定程度的抑制,菌落数较低,双歧杆菌菌落数较高,计数效果好。在改良 MRS-LP 和 BBL 培养基上双歧杆菌菌落数高于乳酸菌菌落数,但二者菌落形态相近,不易计数。在改良的 MRS-NPNL 琼脂培养基

上,双歧杆菌菌落数与乳酸菌菌落数基本相同,且菌落形态相近,不易计数。在其他选择性培养基上,乳酸菌菌落数高于双歧杆菌菌落数,不易于计数。

## 4 结 论

改良 MRS 培养基可以作为选择性计数双歧杆菌的基础培养基;所试验的 8 种选择性培养基,以改良 MRS-X-Gal 培养基上形成的菌落数最高,菌落特征明显,易于计数并且检出率也较高。

## 参 考 文 献

- 1 江 晓,贾力敏.双歧杆菌检测与鉴定技术进展[J].中国乳品工业,2002,1:19~21
- 2 刘 兰,曹郁生,黄筱萍.双歧杆菌选择性计数方法的研究进展[J].食品与发酵工业,1999,25(4):61~63
- 3 康 白主编.双歧杆菌[M].大连:大连海事大学出版社,1998,68~69
- 4 Pierre C, Denis R, Luc S. X- $\alpha$ -Gal-based medium for simultaneous numeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria in milk [J].Journal of Microbiological Methods, 1991,13:75~83

## The Comparison of Selective Enumeration Medium of *Bifidobacterium*

Meng Xiangchen Pang Rui

(Key Lab of Dairy Science, Northeast Agricultural University, Food Science & Technology of  
Northeast Agricultural University, Harbin, 150030, China)

**ABSTRACT** With the rapid development of basic research and application of *Bifidobacterium* in food, the method of selective enumeration of *Bifidobacterium* becomes very important. The aim of this study is to select a medium that can selectively enumerate *Bifidobacterium* in food. The comparison of selective enumeration for eight selective media was studied with colony enumeration method. The results showed that the bifidobacteria colony formed on modified MRS-X-Gal were highest among eight selective media, and the characteristics of colonies were obvious. Modified MRS-X-Gal was best for selective enumeration of *Bifidobacterium* among eight selective media.

**Key words** selective enumeration, *Bifidobacterium*, medium

### 信 息 窗

#### 德国科学家用转基因酵母菌酿造啤酒

德国科学家培育出一种转基因酵母菌,用它它可以酿造出泡沫丰富持久的啤酒。

据英国《新科学家》杂志报道,德国柏林技术大学的科学家乌尔夫·施塔尔说,啤酒产生泡沫的关键在于大麦中所含的 LTP1 基因。这种基因负责制造亲油、抗水的 LTP1 蛋白质。在大麦被磨碎用于酿酒的过程中,LTP1 蛋白质被压入水中。开瓶之后,气压减小,LTP1 蛋白质附着在  $CO_2$  气泡表面逸出,带有蛋白质薄膜的气泡不会立刻破裂,而是堆积在啤酒酒液表面,形成丰富的泡沫。大麦中所含的 LTP1 蛋白质越多,酿成的啤酒其泡沫就越多、越持久。但大麦中 LTP1 蛋白质的含量会受到气候的影响,例如夏季如果较为潮湿,这种蛋白质的含量就会明显减少。施塔尔等人将 LTP1 基因植入啤酒用酵母菌,使它产生大量 LTP1 蛋白质,这样即使大麦的质量不高,也能酿出泡沫丰富的啤酒。

施塔尔说,他计划于今年秋季尝试酿造第一批转基因啤酒,一些德国啤酒制造商已表示对这项技术感兴趣。不过,鉴于德国不少人对转基因食品持反对态度,有人认为这种啤酒短期内不太可能投入商业化生产。