

培養基配製與菌株定量

台灣東洋藥品工業股份有限公司六堵廠 微生物課

白正康 副理

April 2023

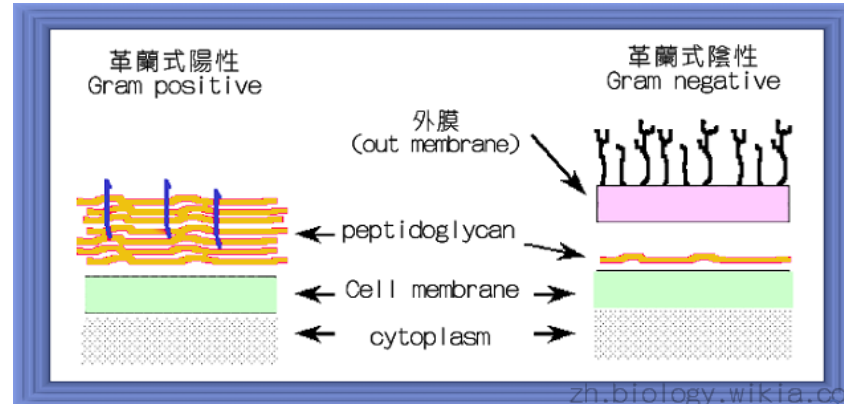
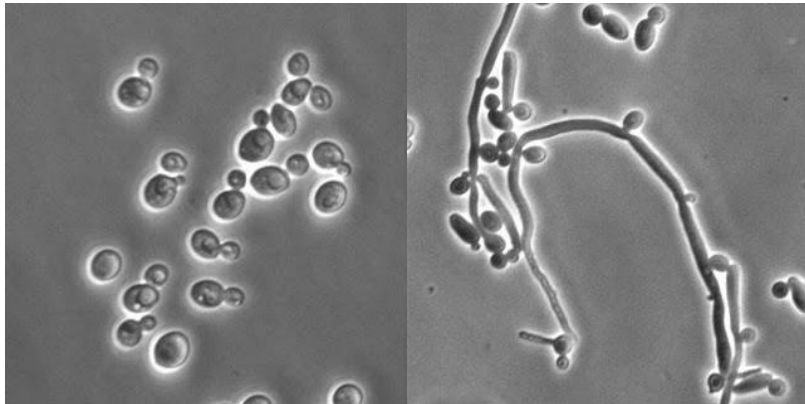
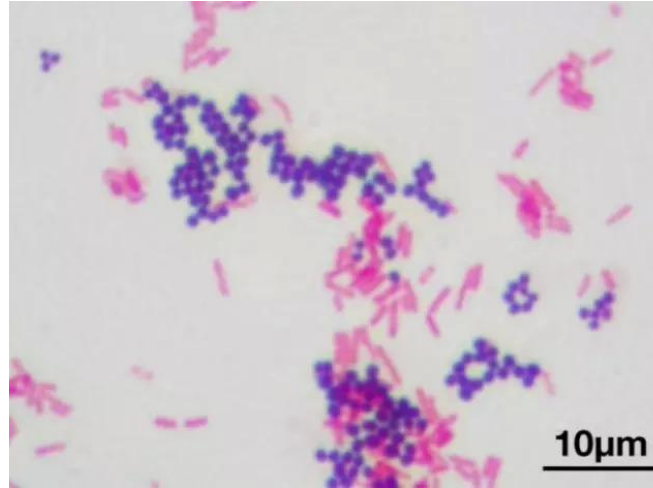
藥廠監控的微生物

◆ 細菌

- ▶ 革蘭氏陽性
- ▶ 革蘭氏陰性

◆ 真菌

- ▶ 單細胞(酵母菌型)
- ▶ 多細胞(菌絲型)



Agenda

- ✓ 微生物常用培養基配製
- ✓ 菌株定量



- ✓ 微生物常用培養基配製
- ✓ 菌株定量



生物試驗常用培養基

- ◆ SCDB: Soybean-Casein Digest Broth (TSB: Tryptone Soy Broth)

- ▶ 富含營養，適合培養多種微生物，包含細菌與真菌。
- ▶ 用在總生菌試驗及負荷菌試驗，或一般菌種保存方法。

- ◆ SCDA: Soybean-Casein Digest Agar (TSA: Tryptone Soy Agar)

- ▶ 富含營養，適合培養多種微生物，包含細菌與真菌。
- ▶ 常用在總生菌試驗、負荷菌試驗、環境監測、或水質檢測。

微生物試驗常用培養基

▶ 選擇性培養基(真菌)

◆ SDB: Sabouraud Dextrose Broth

- ▶ 培養真菌(包含黴菌及酵母菌)使用。
- ▶ Peptic digest of animal tissues/casein提供真菌生長所需的氮源，Dextrose提供碳源。
- ▶ 低pH值(5.6)可促使真菌生長並抑制細菌。

◆ SDA: Sabouraud Dextrose Agar

- ▶ 同樣有Peptic digest of animal tissues/casein及dextrose，加入Agar形成固態培養基
- ▶ 低pH值(5.6)可促使真菌生長並抑制細菌。

微生物試驗常用培養基

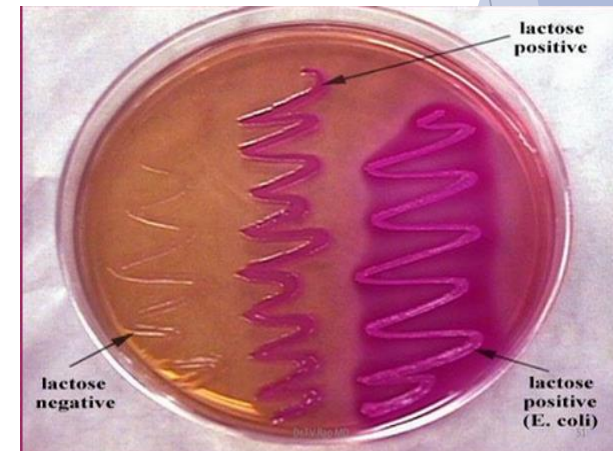
- ◆ 選擇性培養基 (格蘭氏陰性細菌– *E. coli* USP <62>)
- ◆ MCB: MacConkey Broth
 - ▶ Gelatin peptone提供營養源。Lactose做為可發酵的碳源。
 - ▶ Dehydrated bile抑制革蘭氏陽性菌。
 - ▶ Bromocresol purple做為酸鹼指示劑，當乳糖發酵後培養基酸化時呈黃色。
 - ▶ 乳糖發酵菌會使MCB變黃，沙門氏菌及志賀氏菌不會發酵乳糖，不影響培養基顏色。

微生物試驗常用培養基

◆ 選擇性培養基 (格蘭氏陰性細菌- *E. coli* USP <62>)

◆ MCA: MacConkey Agar

- ▶ 同樣有 Gelatin peptone、Lactose、bile salt，增加 **crystal violet** 抑制革蘭氏陽性菌。
- ▶ 大部分的革蘭氏陰性菌在MCA上都可以良好生長，但只有乳糖發酵菌會呈**紅色**或粉紅色或被紅色的圈圈圍住。

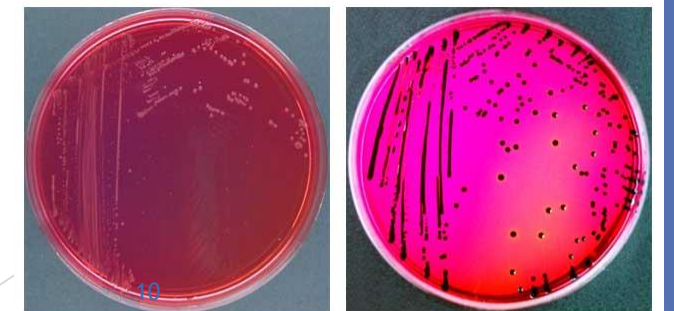


微生物試驗常用培養基

- ◆ 選擇性培養基 (格蘭氏陰性細菌– *Salmonella spp.* USP <62>)
- ◆ RPB: Rappaport Vassiliadis Salmonella Enrichment Broth
 - ▶ 增殖沙門氏菌。
 - ▶ Soya peptone做為營養源
 - ▶ 沙門氏菌可生長在較高滲透壓、故增加Magnesium chloride提高滲透壓
 - ▶ 沙門氏菌可耐受較酸性的環境，故phosphate buffer將pH穩定在5.2左右
 - ▶ 沙門氏菌可耐受Malachite green，Malachite green可抑制革蘭氏陽性菌

微生物試驗常用培養基

- ◆ 選擇性培養基 (格蘭氏陰性細菌– *Salmonella* spp. USP <62>)
- ◆ XLDA: Xylose Lysine Deoxycholate Agar
 - ▶ Yeast extract做為營養源，Deoxycholate、ferric ammonium citrate
 - ▶ Sodium thiosulphate可抑制革蘭氏陽性菌。
 - ▶ Xylose、Sucrose、Lactose做為三種可發酵的碳源，可用於區分志賀氏菌和大腸桿菌群
 - ▶ Lysine decarboxylate配合ferric ammonium citrate、sodium thiosulphate會產生H₂S，使得沙門氏菌呈紅色並有黑色中心。



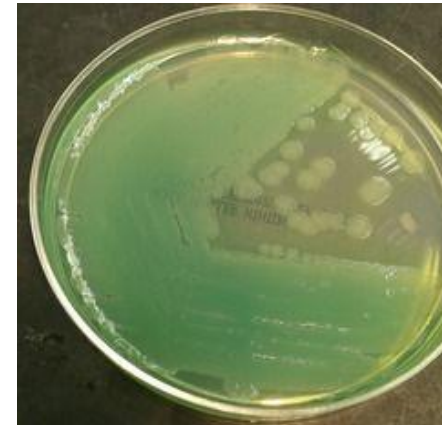
***Shigella* on XLD.**

***Salmonella* on XLD.**

Image Source: Faculty of Health and Medical Sciences - University of Copenhagen, Denmark

微生物試驗常用培養基

- ◆ 選擇性培養基 (格蘭氏陰性細菌– *Pseudomonas aeruginosa* USP <62>)
- ◆ CA: Cetrимide Agar
 - ▶ **Cetrimide** 是一種四級銨鹽，會破壞細菌細胞膜蛋白。此作用會抑制大部分的細菌，除了 *Pseudomonas aeruginosa*。
 - ▶ *P. aeruginosa* 會分泌一種藍色色素 pyocyanin，Magnesium chloride、dipotassium sulfate 會促使 pyocyanin 分泌，使菌落呈現 **藍綠色**。

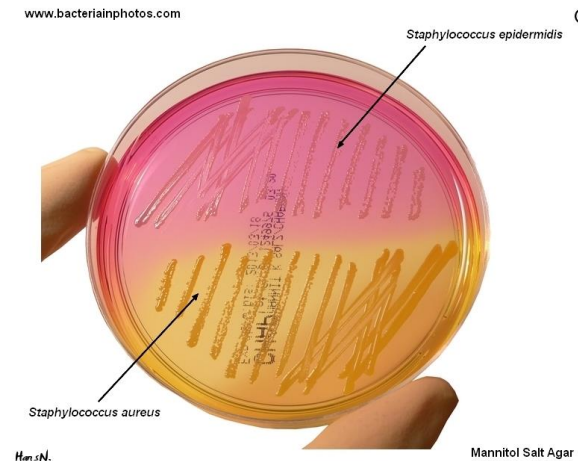


微生物試驗常用培養基

- ◆ 選擇性培養基 (格蘭氏陰性細菌- 膽鹽耐受菌 USP <62>)
- ◆ EEB: Enterobacteria Enrichment Broth Mossel
 - ▶ 增殖腸內菌，包含沙門氏菌及志賀氏桿菌。
 - ▶ Gelatin peptone與glucose monohydrate做為腸內菌的營養源。
 - ▶ Brilliant green與dehydrated bile做為革蘭氏陽性菌的抑制劑。
- ◆ VRBGA: Violet Red Bile Glucose Agar
 - ▶ Pancreatic digest of gelatin及yeast extract提供營養源。
 - ▶ bile salts及crystal violet抑制革蘭氏陽性菌的生長，Neutral Red使葡萄糖發酵菌呈紅色。

微生物試驗常用培養基

- ◆ 選擇性培養基 (格蘭氏陽性細菌–*Staphylococcus aureus* USP <62>)
- ◆ MSA: Mannitol Salt Agar
 - ▶ 葡萄球菌可生長在**高鹽的環境**，故此培養基中含有高達7.5% NaCl。
 - ▶ Pancreatic digest of casein /animal tissue與beef extract做為營養源，Mannitol做為碳源。
 - ▶ 金黃色葡萄球菌代謝mannitol後產生酸性，使菌落**呈黃色**。



1995 - 2006	
Yeast / Mold	26%
<i>Burkholderia cepacia</i>	26%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16%
Other <i>Pseudomonas</i>	11%
<i>Enterobacteriaceae</i>	7%
<i>Salmonella spp.</i>	5%
<i>Staphylococcus</i>	2%

2004 - 2011	
<i>Burkholderia cepacia</i>	33%
Yeast / Mold	20%
<i>Enterobacteriaceae</i>	10%
<i>Bacillus cereus</i>	9%
Other <i>Pseudomonas</i>	8%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7%
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	6%

Microbial Diversity in Pharmaceutical Product Recalls and Environments
(PDA J Pharm Sci and Tech, 2007)

微生物試驗常用培養基

◆ 選擇性培養基 (格蘭氏陰性細菌–*Burkholderia cepacia* USP <60>)

◆ BCSA: *Burkholderia cepacia* selective agar

- ▶ 用於培養洋蔥伯克氏菌複合群 (*Burkholderia cepacia* complex, BCC)。
- ▶ 內含**抗生素**，可抑制大部分微生物生長。
- ▶ **菌落呈綠色-棕色，並具有黃色暈環，或於粉紅色區域中呈現白色菌落。**



http://www.medixcorp.com/catalog/detail.asp?item_id=6508

BCSA組成 (USP<60>)

Casein peptone	10.0 g
Lactose	10.0 g
Sucrose	10.0 g
NaCl	5.0 g
Yeast extract	1.5 g
Phenol red	0.08 g
Gentamicin	10.0 g
Vancomycin	2.5 mg
Crystal violet	2.0 mg
Polymyxin B	600,000 U
Agar	14.0 g

微生物試驗常用培養基

- ◆ 其他培養基 (製藥用水檢驗 USP <1231>)
- ◆ Low nutrient medium (R2A)
 - ▶ 培養基以casein、beef extract、yeast extract為營養源，dextrose為能量源。
 - ▶ 此培養基為美國公共衛生協會(American Public Health Association，APHA)推薦用於水質檢驗之寡營養培養基，有助於受壓力或受傷之微生物增生，需較長的培養時間。
- ◆ High nutrient medium
 - ▶ Plate Count Agar (TGYA), Soybean Casein Digest Agar (SCDA or TSA), and m-HPC Agar (formerly m-SPC Agar)

培養基配製方法 (USP <60> <61> <62>)

- ◆ 充分溶解各個組成份，必要時可加熱溶解
- ◆ 依藥典規範進行滅菌
 - ▶ 一般多為濕熱滅菌，滅菌程序需經確效
 - ▶ RPB 滅菌溫度不超過115°C
 - ▶ EEB以100°C加熱30分鐘，不可使用滅菌釜
 - ▶ VRBGA和XLDA煮沸滅菌，不可使用滅菌釜
- ◆ 滅菌後添加不耐熱物質(例如抗生素)
- ◆ 降溫後量測pH值
 - ▶ 固態培養基須等固化後，以平面電極量測
- ◆ 進行培養基性能試驗
- ◆ 進行效期驗證

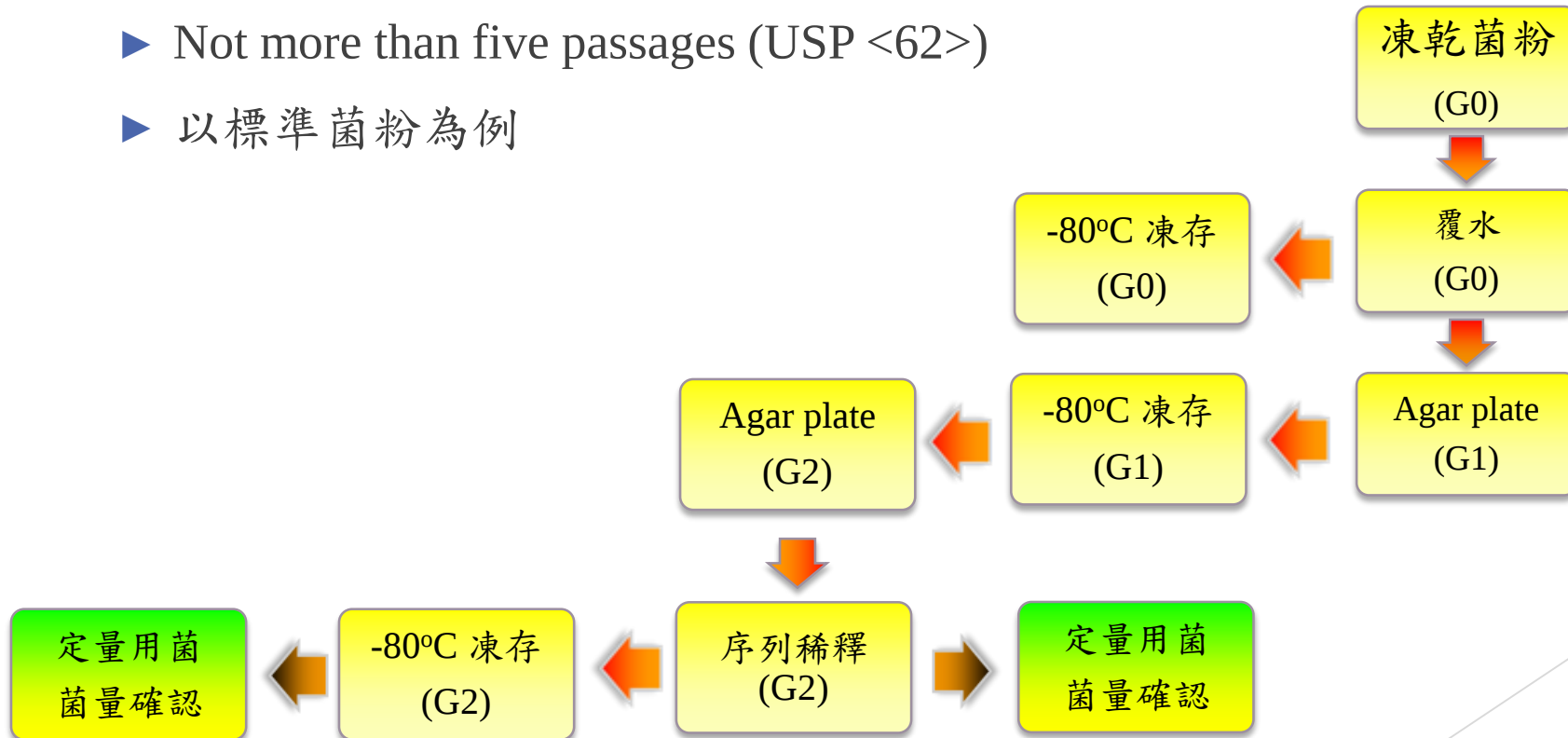
- ✓ 微生物常用培養基配製
- ✓ 菌株定量



標準菌株定量

◆ Seed-lot systems

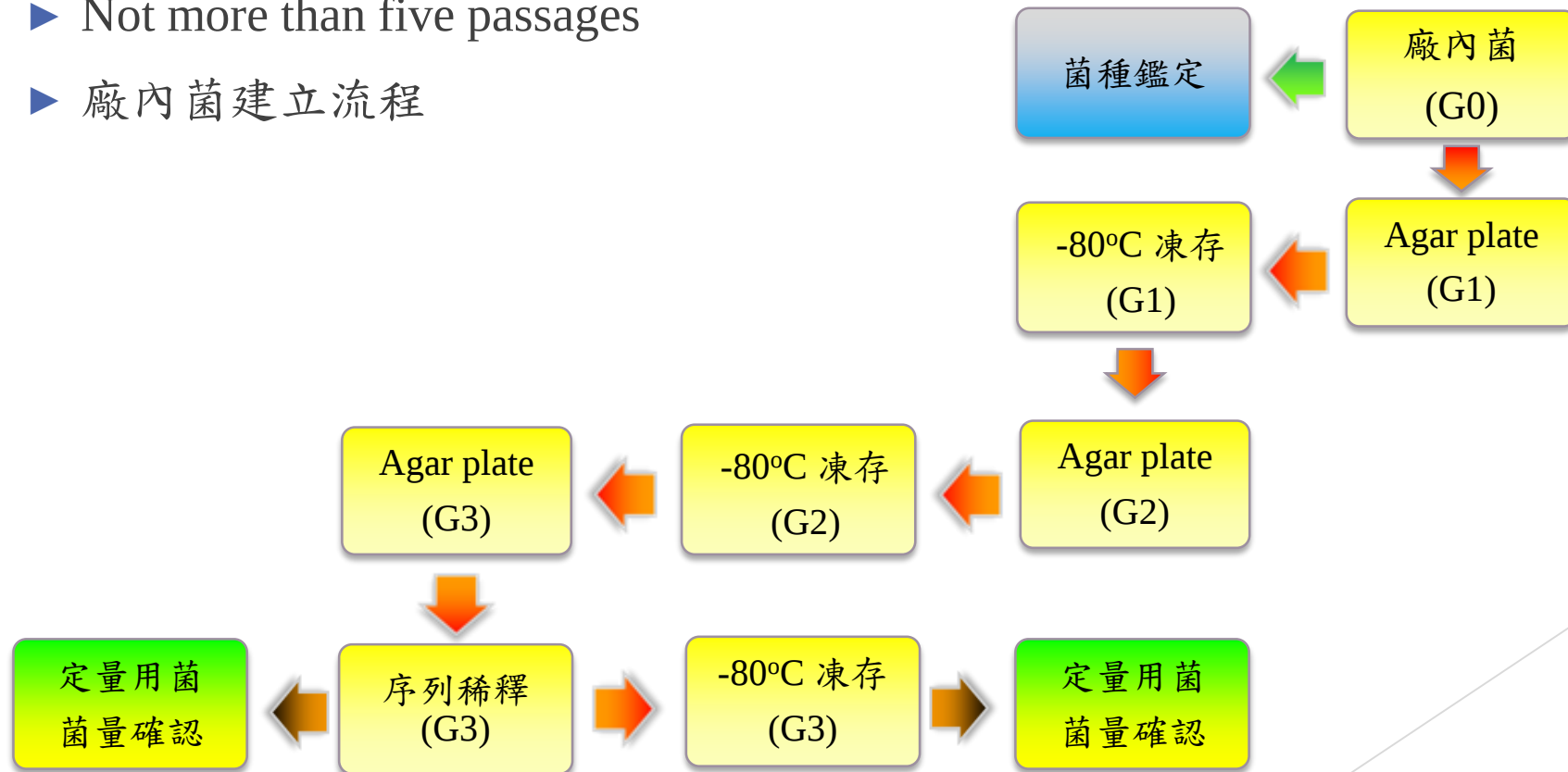
- ▶ Master seed-lot: Reconstituted microbial solution (Generation 0)
- ▶ Every passage as next generation (whether solid or liquid culture)
- ▶ Not more than five passages (USP <62>)
- ▶ 以標準菌粉為例



廠內菌株定量

◆ Seed-lot systems

- ▶ Master seed-lot : Identified microbial solution (Generation 0)
- ▶ Every passage as next generation (whether solid or liquid culture)
- ▶ Not more than five passages
- ▶ 廠內菌建立流程



菌株定量

◆ 塗盤計數

- 以經過性能確認的固態培養基進行培養計數

◆ McFarland 濁度法

- 以600 nm透光度及菌落數繪製關係曲線
- 依濁度估算稀釋倍率

◆ 商業化定量菌粉



~ Thanks for your attention ~