

3M

Petrifilm™

Rapid Coliform Count Plates

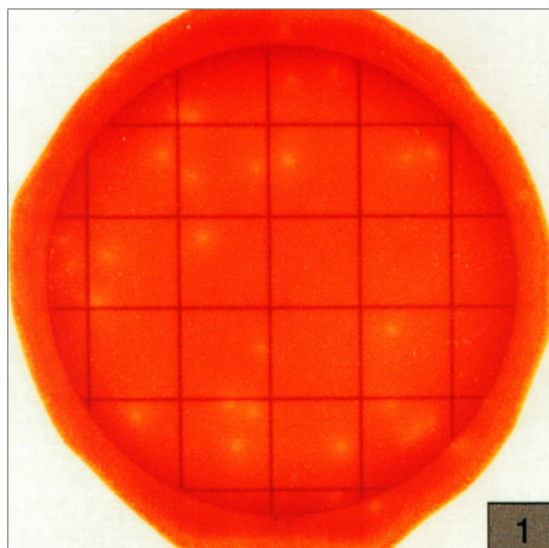
快速大肠菌群测试片

AOAC和FDA细菌学分析手册(BAM)规定大肠菌群为革兰氏阴性杆菌，能发酵乳糖产酸和产气，大肠菌群菌落在 Petrifilm™ 快速大肠菌群测试片上生长产酸，pH指示剂使培养基颜色从桔红色到黄色，推测有大肠菌群，在大肠菌群菌落周围有气泡的可证实为大肠菌群。

ISO使根据菌落由特定方法在选择性培养基上的生长特性来定义大肠菌群的。

ISO方法 4832，根据菌落直接计数的方法，通过大肠菌群在带有乳糖的 VRB (Violet Red Bile)琼脂培养基上的菌落大小及产酸能力来定义。在Petrifilm™ 快速大肠菌群测试片上，这些具有产酸能力的大肠菌群能通过黄色酸环或红色菌落带(或环带)气泡被指示出来。

ISO方法4831，则是用MPN的方法来计数大肠菌群，通过它们在含有乳糖的选择性肉汤培养基上生长并产气的特性来定义。在Petrifilm™ 快速大肠菌群测试片上，大肠菌群显示为红色带气泡的菌落。AFNOR则是在与 ISO方法 4831 和 ISO 方法 4832 相比较的基础上认证Petrifilm™ 快速大肠菌群测试片法的。



6小时培养

6-14小时培养大肠菌群计数看产酸环多少

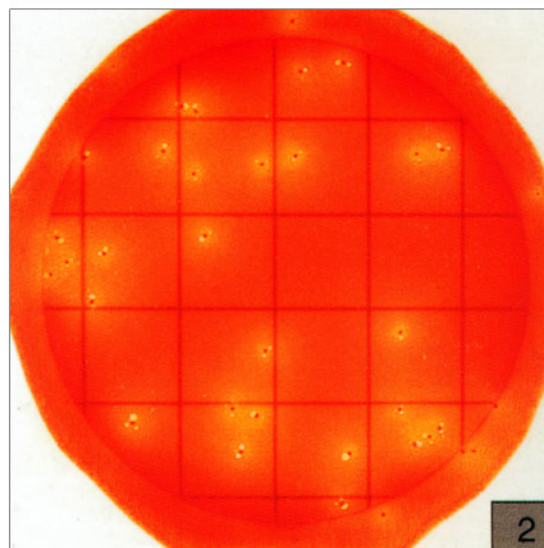
黄色的酸环带可能在培养6小时后即开始出现。如果存在大肠菌群，黄色的环带就会在培养期间出现并扩散开。

按AOAC / BAM方法判读

- 计数黄色酸环数带或不带有红色中心，推测为大肠菌群。

按ISO4832 (VRBL) 方法判读

- 计数黄色酸环数带或不带有红色中心可认为是大肠菌群。
- 以14小时培养计数作最后结果 (AFNOR认可)。



14小时培养

8-24小时培养大肠菌群菌落计数

红色带或不带气泡的菌落可能在8小时开始出现，通过培养将继续生长。

按AOAC / BAM方法判读

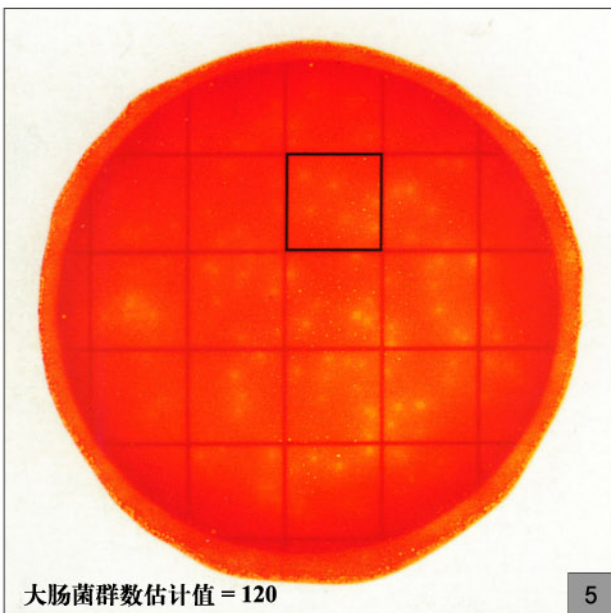
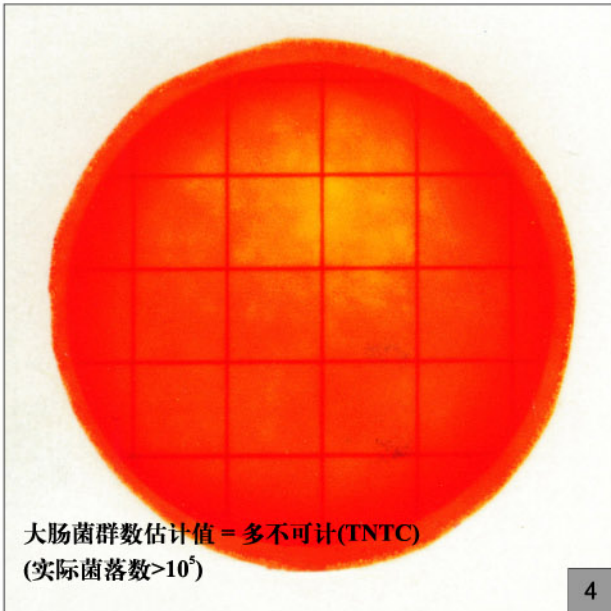
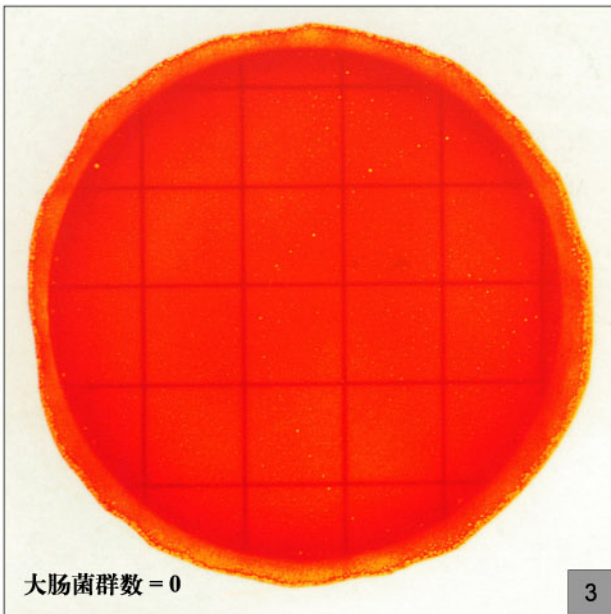
- 计算红色带有气泡的菌落，当一出现就可确认为大肠菌群。

按ISO 4831 (MPN) 方法判读

- 红色有气泡的菌落，计数为大肠菌群。
- 以 24 ± 2 小时培养计数作最后结果 (AFNOR认可)，但加工的猪肉除外。

按ISO 4832 (VRBL) 方法判读

- 计数红色带有或不带有气泡的菌落，作为大肠菌群。
- 以 24 ± 2 小时培养基数作最后结果 (AFNOR认可)。



6-14小时培养计数产酸环数

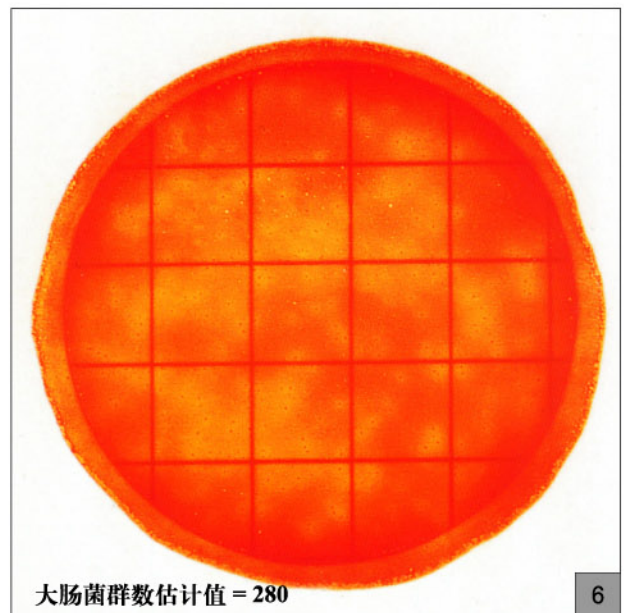
注意图3-图10培养基颜色的变化，随着大肠菌群产酸增多，培养基颜色由桔红色到桔黄色。

高浓度的大肠菌群（在测试片上超过1000个菌落），4小时培养后可使整个生长区变黄，见图4。这种情况，需进一步稀释样品，方可得到准确计数。

有些大肠菌群可产生大量的酸，在测试片上有少数融合的酸环(带)像似有20个菌落，估计含有50个以上酸环(带)。

Petrifilm™快速大肠菌群测试片圆形生长区面积约为 20cm^2 ，为了估计产酸环数，可选择一个或几个有代表性酸环的小方格(1cm^2)，计算平均酸环数，再乘以20可得到整个测试片上的酸环数(即大肠菌群数)。图5中，每个小方格平均有6个酸环。

随着大肠菌群继续生长，在酸环内红色菌落开始出现，见图6。



细菌，这依赖于细菌的类别、代谢状况和浓度。

8-24小时培养计数菌落和产气状况

图7和图8所示，同一浓度的不同细菌在同一培养时间内，在两个测试片上出现不同带酸环的红色菌落。图8的细菌发酵乳糖产气比图7的细菌更迅速。

计算菌落是否带有气泡依据下面的方法。

如果气泡距离该菌落在一个菌落直径范围内或是气泡围绕菌落成一环状都可被认为是菌落带有气泡，分别如图7中的圆圈1和圆圈2所示。

图9示为计数带和不带气泡菌落的另一个例子，计数依据下面方法：

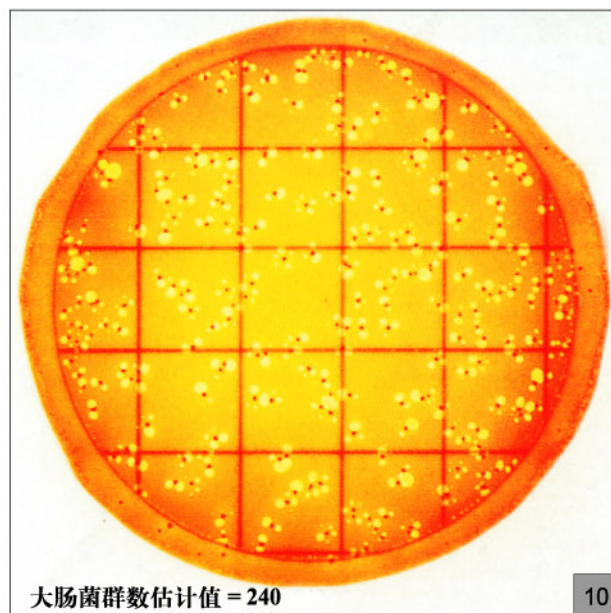
- 按AOAC/BAM方法判读
证实为带气泡的大肠菌群菌落 = 72

- 按ISO 4831方法
带气泡的大肠菌群菌落 = 72

- 按ISO 4832方法
带和不带气泡的大肠菌群菌落 = 128

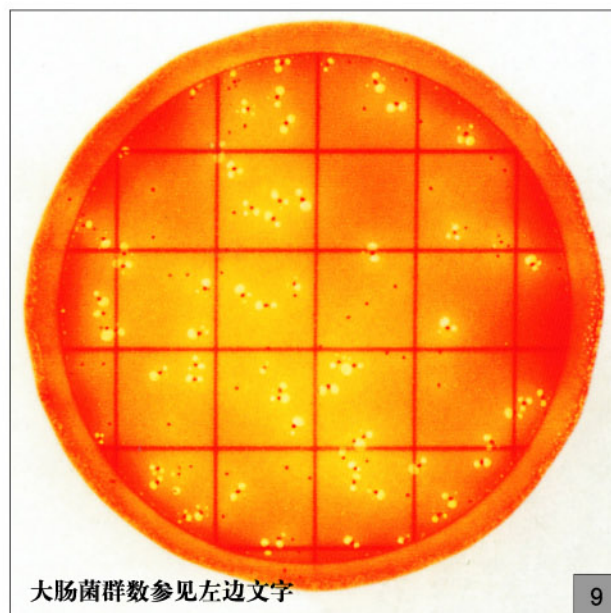
当测试片上菌落数超过150个时，为估计计数。

不要计算圆形培养基外的菌落，因为泡棉上已不含选择性培养基，见图7-10



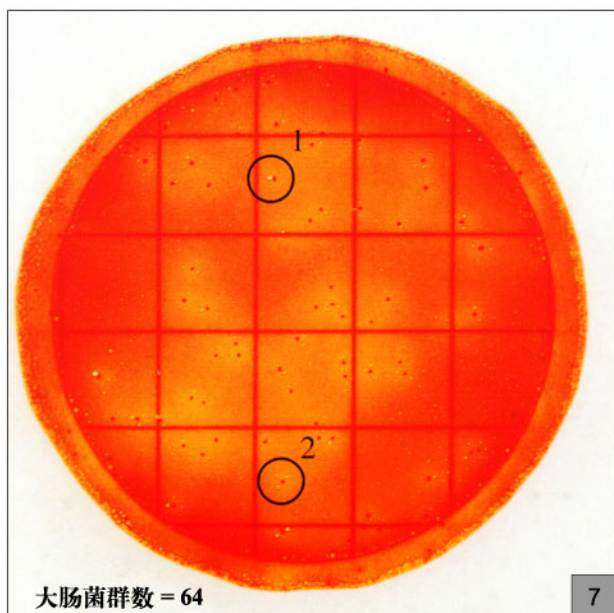
大肠菌群数估计值 = 240

10



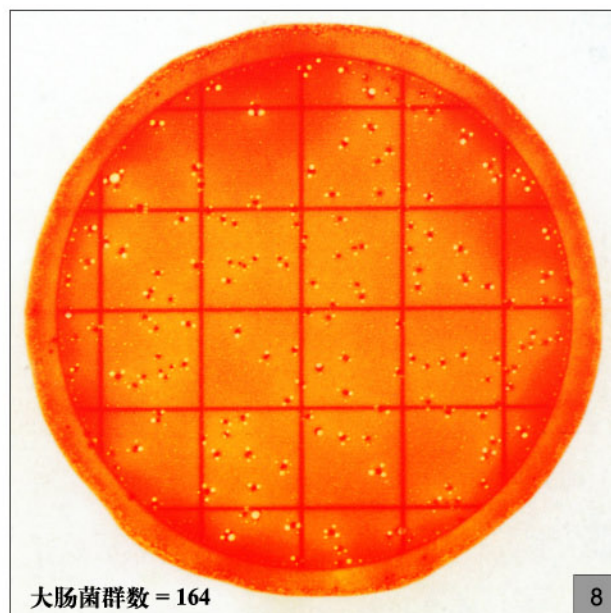
大肠菌群数参见左边文字

9



大肠菌群数 = 64

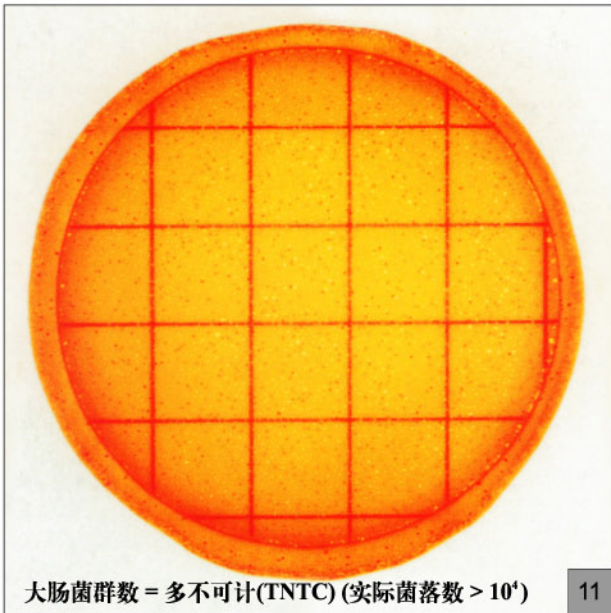
7



大肠菌群数 = 164

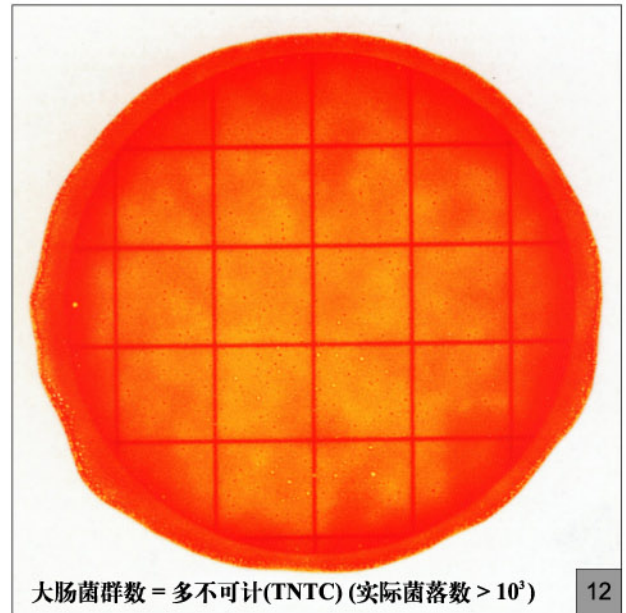
8

菌落数多不可计 (Too Numerous To Count, TNTC)



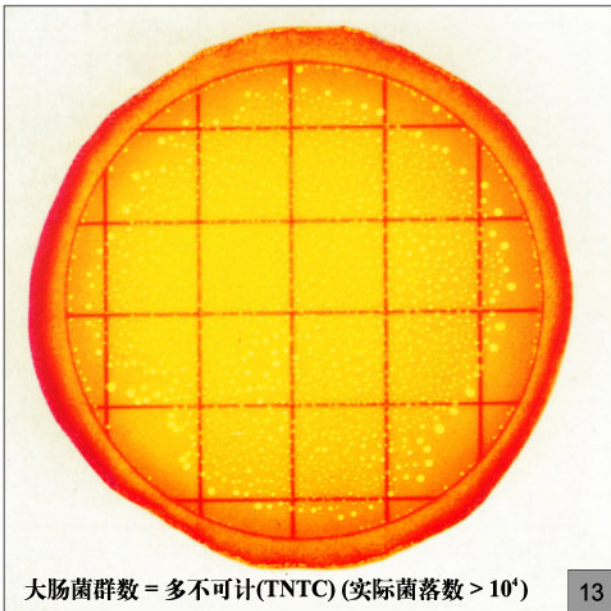
在Petrifilm™快速大肠菌群测试片上菌落无法计数时，至少有下列一种或多种现象：

- (1) 培养基颜色变化，由桔红色到桔黄色
- (2) 有许多气泡
- (3) 有许多小菌落 见图11



如图12所示，在Petrifilm™快速大肠菌群测试片上有两种特征指示多不可计(TNTC)菌落：

- (1) 培养基颜色的变化
- (2) 有许多小菌落



如图13所示，菌数太多，不能计算单个菌落，培养基颜色变黄和有许多气泡，记为多不可计(TNTC)。

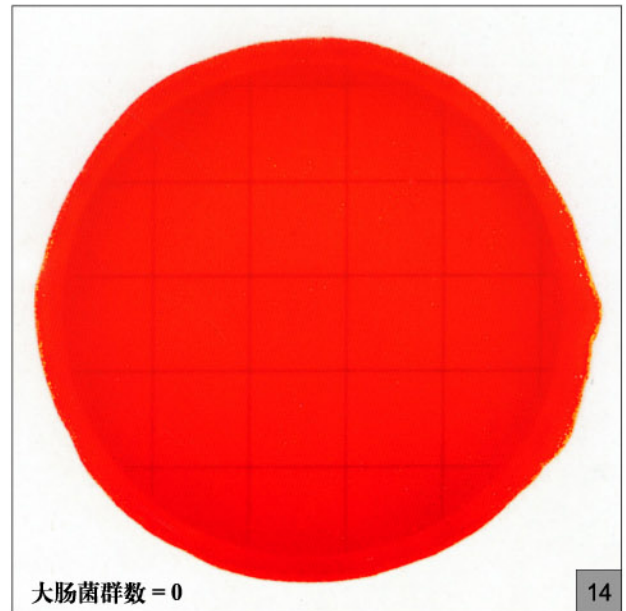
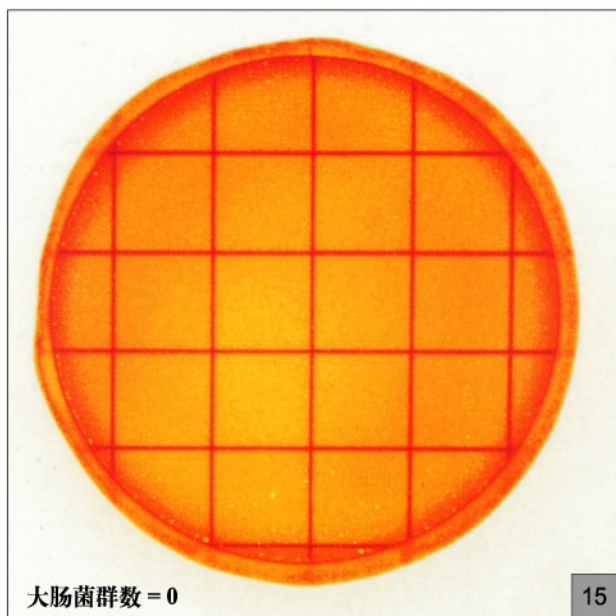


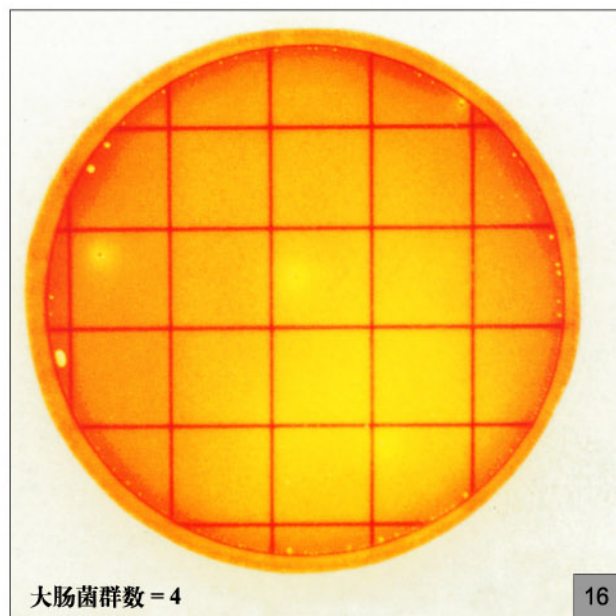
图14所示，Petrifilm™快速大肠菌群测试片上有很多革兰氏阴性非大肠菌群菌落，它们不能发酵乳糖，培养基可呈暗红色。

pH 绝大多数细菌最适生长环境的pH值为7.0左右， pH值较低的样品在接种到测试片上前，需将pH值调至6.5~7.5。

图15和图16为调pH后的新鲜酸奶接种到测试片上的例子，培养基中的抑制剂可阻止革兰氏阳性菌的生长，但早期生长的细菌产生的酸可能会改变培养基背景颜色由桔红到桔黄色。可继续培养，进一步监测是否为多不可计(TNTC)。



这阴性测试片同上述的多不可计(TNTC)测试片比较，注意到没有菌落和气泡存在，应记为多不可计(TNTC)。



尽管培养基颜色有变化，但大肠菌群产酸仍能很容易被识别，如图16所示。

产品食物颗粒通常为不规则形状，且不与气泡相连接。

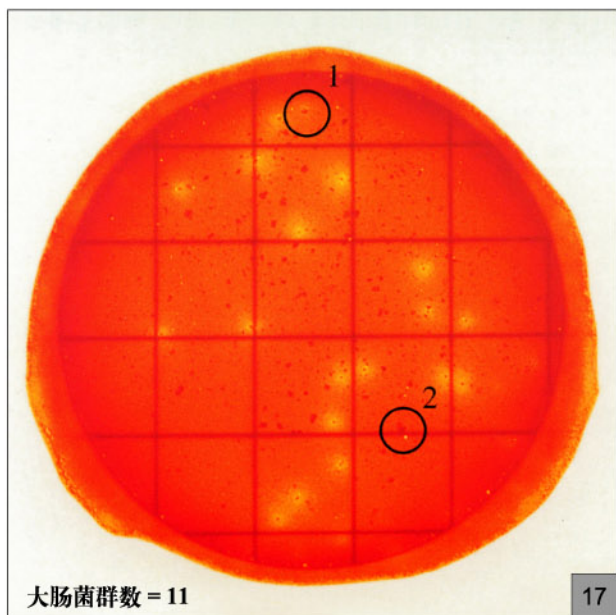


图17是一个容易判读的干辣椒粉稀释样，圆圈1为一个酸环围绕着一个红色不规则形状的食物颗粒，某些食品可能含有酸性颗粒会同pH指示剂反应。

圆圈2示为一个气泡接近一个红色有不规则形状的食物颗粒，但没有酸环。上述情况两者都不作为一个菌落计数。

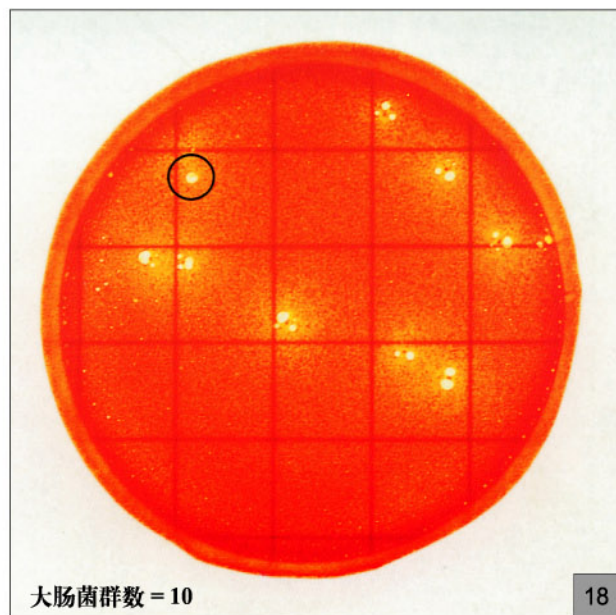
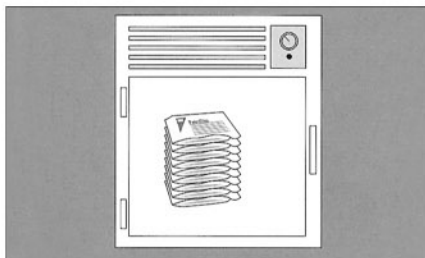


图18是巧克力的一种稀释液，同菌落相连接的酸环在培养期间将继续扩展。同菌落相连接的气泡是另一种评判标准，有助于大肠菌群的鉴别。气泡可能恰好包围着菌落，如图中圆圈所示。

如前所述，是否将不带气泡的菌落计数，应依据参照方法的不同而异。

贮藏



1 未开封时，冷藏于 $\leq 8^{\circ}\text{C}$ ($\leq 46^{\circ}\text{F}$)，并在保存期内用完。



2 已开封的袋，请将开口反折，并以胶带封好。

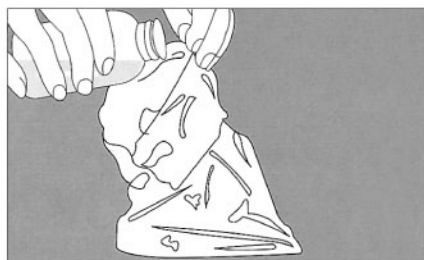


3 保存再封的袋于 $\leq 25^{\circ}\text{C}$ ($\leq 77^{\circ}\text{F}$) 和湿度 $\leq 50\%$ 。不要冷藏已启开的包装袋，并于一个月内使用完。

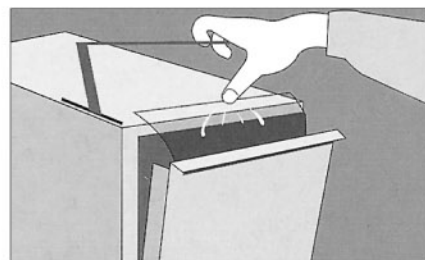
样品制备



4 高/低脂肪乳可以直接测试，对其它食物和乳制品至少制备1:10的样品稀释液。称取或吸取食物样品，置入适宜的无菌容器内，如均质袋、稀释瓶、Whirl-Pak® bag或其它无菌容器内。



5 加入适量的下述无菌稀释液的一种，包括Butterfield's 磷酸盐缓冲液 (IDF 磷酸盐缓冲液，用0.0425g/L的 KH_2PO_4 调pH7.2)、0.1%的蛋白胨水、蛋白胨盐水稀释液 (ISO方法6887)、盐溶液 (0.85-0.90%) 或蒸馏水。



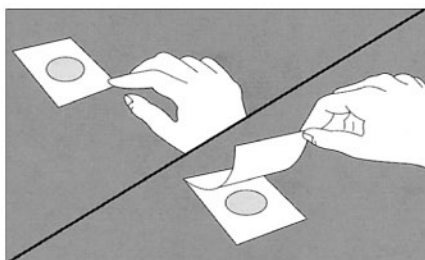
6 依照现行的操作程序进行样品的均质

将均质样品pH值调节为 6.5 - 7.5

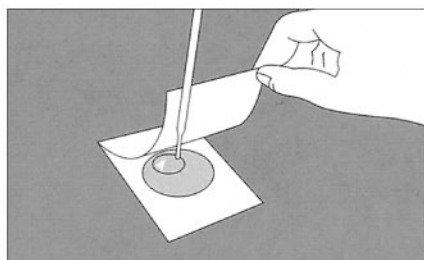
- 酸性样品，用1N NaOH
- 碱性样品，用1N HCL

不可使用含有柠檬酸盐，硫酸氢盐，硫代硫酸盐的缓冲液，因为它们会抑制菌的生长。

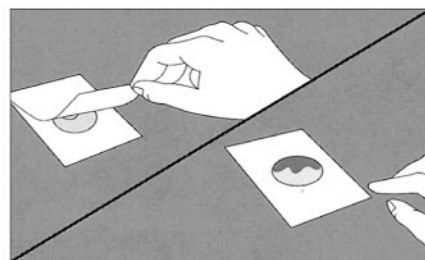
接种



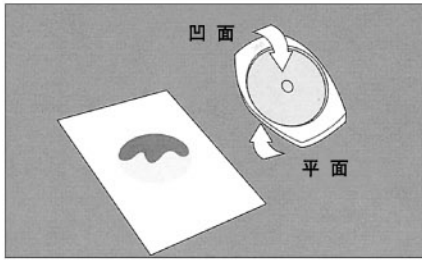
7 将测试片置于平坦表面处，揭开上层膜。



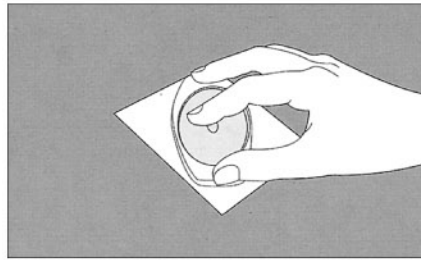
8 使用吸管将1mL样液垂直滴加在测试片中央处。



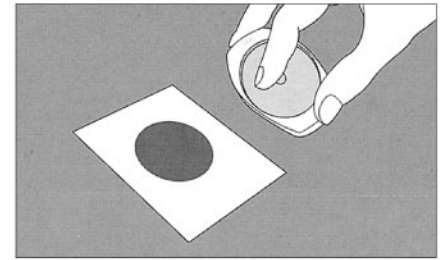
9 细心将上层膜缓慢盖下，避免有气泡产生，切勿使上层膜直接落下。



10 使用压板（平面底朝下）放置
在上层膜中央处。

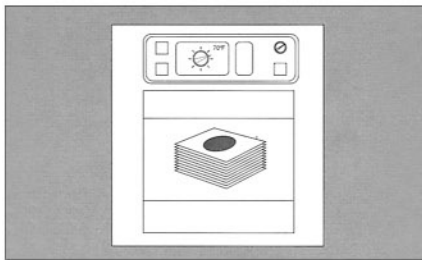


11 轻轻压下，使样液均匀覆盖于
圆形培养面积上，切勿扭转压
板。



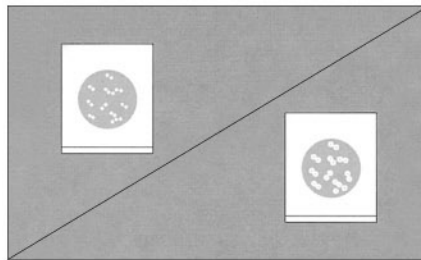
12 拿起压板，静置至少1分钟以使
培养基凝固。

培养

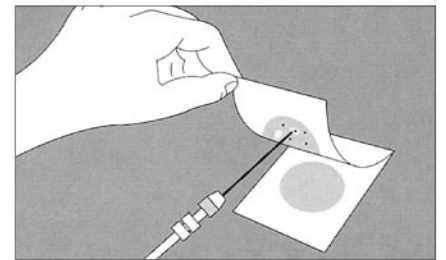


13 测试片透明面朝上，可堆叠至
20片， $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 $24 \pm 2\text{h}$ 。按
要求(参看包装内说明)定时检
查测试片。

判读



14 使用间接光进行早期判读，可
目视，用菌落计数器，或放大
镜来计数，并可参考判读计算
菌落数。



15 可以分离菌落作进一步鉴定，
即掀起上层膜，由培养胶上挑
取单个菌落。

培养时间和温度因方法而定，最通用
的认可方法是：

- AOAC官方方法 2000.15
 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 $24 \pm 2\text{h}$
- AFNOR认可方法 3M 01/5-03/97A,B
(与ISO 4832 VRBL方法等效)
AFNOR认可方法 3M 01/5-03/97C
(与ISO4831 MPN方法等效)
 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 $24 \pm 2\text{h}$



3M中国有限公司

总办事处

上海市兴义路8号
万都中心大厦38楼
邮编: 200336
电话: 86-21-62753535
传真: 86-21-62752343

北京办事处

北京市朝阳区光华路7号
汉威大厦20层东区
邮编: 100004
电话: 86-10-65613336
传真: 86-10-65610188

广州办事处

广州市天河路228号之一
广晟大厦25楼
邮编: 510620
电话: 86-20-38331238
传真: 86-20-38331234

青岛办事处

青岛市香港中路12号
丰合广场B座202室
邮编: 266071
电话: 86-532-85028845
传真: 86-532-85027848

沈阳办事处

沈阳市和平区南京北街206号
沈阳城市广场3-903室
邮编: 110001
电话: 86-24-23341158
传真: 86-24-23341859

郑州办事处

郑州市中原中路220号
裕达国际贸易中心A座22层2205室
邮编: 450007
电话: 86-371-67939335
传真: 86-371-67930388

研发中心

医疗产品部食品工业安全产品
上海市田林路222号
邮编: 200233
电话: 021-22105335
传真: 021-22105036

欢迎访问

英文网址: <http://www.mmm.com/microbiology>

中文网址: <http://FPS.3M.com.cn>