

# 菌落总数检测胶膜的制备与应用

张澜 徐迪诚 姜远珠 赵卓

杜淑芬 刘晓龙 纪奎滨 于振喜

(哈尔滨市卫生防疫站)

王子文 许德春 孟丽芬 赵晓南

(黑龙江省农业科学院原子能研究所)

**摘要** 本文应用胶膜法和平板倾注法,检验省内外14个单位的食品、水、化妆品等10种2445份样品的菌落总数,经符号秩和统计,  $P > 0.05$ ,结果无显著差异,胶膜法操作简便,成本低廉、结果准确、运输和保存方便,对基层检验单位有广泛的应用价值。

**关键词** 菌落总数;胶膜检测法

菌落总数是卫生细菌学的重要指标,它与大肠菌群共同做为样品细菌污染指标,世界各国基本相同。国标法是平板倾注法,该法操作程序多,并需要各类器材、设备和场地。我国《食品卫生管理条例》规定,生产厂家要做到:“批批检验合格出厂”。本文报道的胶膜是为适应上述需要而研制的一次性产品。

1987年以来,我们在对外环境细菌特性研究基础上,采用大孔径纤维载体,筛选了营养配方,测试并选定了指示剂的种类和浓度,寻找到指示剂的增强剂,筛选了吸附剂、填充剂;摸索出一整套合理的生产工艺流程,最终将胶膜制备成功。经过应用考核,达到了平板倾注法的效能和应用范围,现将该胶膜的研制与应用情况报告如下:

## 材料与方 法

### (一) 材料

1. 供试样品:餐具942份、食品类985份、饮用水299份、化妆品115份,手术台、墙壁等物体表面104份共2445份,由中国科学院微生物研究所、北京市食品卫生监督检验所、黑龙江省环境卫生监测所、海拉尔市卫生防疫站、哈尔滨市南岗区卫生防疫站等14个单位提供并验证考核。

2. 供试菌株:大肠埃希氏菌、金黄色葡萄

球菌和枯草芽孢杆菌短亚种由中国人民解放军军事医学科学院供给;节杆菌、假丝酵母和炭黑霉菌由中国科学院微生物研究所供给;参考菌株中的普通变形杆菌、奇异变形杆菌、费氏柠檬酸杆菌、粘质沙雷氏菌、臭鼻克雷伯氏菌、迟缓爱德华氏菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、铜绿假单胞菌、洋葱假单胞菌、产碱假单胞菌、蜡样芽孢杆菌及白色假丝酵母均为哈尔滨市卫生防疫站保存菌株。

3. 纤维载体为杭州新华造纸厂生产的增强II型纸。

4. 普通营养琼脂由哈尔滨市卫生防疫站配制;卵磷脂吐温80琼脂由上海市云岭化工厂生产。

### (二) 方法

1. 胶膜的制作:将纤维载体裁成 $6 \times 4$ cm大小,在营养液中浸沾,于消化液中再浸一次,排在尼龙网上,40℃烘干,装入聚苯乙烯塑料袋, $^{60}\text{Co}200-250\text{rad}$ 照射备用。

(1) 营养液的配制(g):蛋白胨15,磷酸氢二钾2.6,大豆胨5,可溶性淀粉3,氯化钠5,葡萄糖3,酵母浸出物1,琼脂8,明胶2,加水至

此项研究承中国科学院微生物研究所蔡妙英,哈尔滨医科大学公卫学院杨瑞章、北京市食品卫生监督检验所刘以贤、哈尔滨市化工局陈公振等同志指导。在技术考核中,得到中国科学院微生物研究所、北京市食品卫生监督检验所、黑龙江省环境卫生监测所等14个单位大力支持,在此一并致谢。

1000ml, pH 7.3。复合指示剂 3ml, 0.7kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 30 分钟。

肉血消化液 200ml (单独留用)。

(2) 消化液的制备: 牛肉、血清各 500g, 自来水 2000ml, 煮沸 20 分钟, 加胰酶 60ml, 无水碳酸钠 5g, pH 8.5, 氯仿 30—60ml, 消化开始, 每 4 小时调 pH, 使保持 pH 8.5, 以后每天调一次, 48 小时进行蛋白定性, 合格后停止消化, 取出消化液, 加纯盐酸调 pH 至 5.5, 放室温备用。临用前取上清 200ml 煮 2—3 分钟驱除氯仿, 调 pH 7.3, 倒入第二杯, 同时加入一半培养基和指示剂。

(3) 指示剂的配制: 每 100ml 培养基中加入 1% TTC 0.2ml, 1% 中性红 0.1ml。

2. 平板倾注法: 按文献[1,2]进行。

3. 稳定性试验: 一份样品根据污染程度, 按国标法稀释, 选取菌落数在 30—300 之间的一个稀释度接种 30 张胶膜, 37℃ 24 小时计数。同时接种平板, 对比两者稳定性差别。

4. 样品接种法: 一份样品根据污染程度按国标法稀释 2—3 个稀释度, 选取菌落数在 30—300 个的稀释度作为计数的稀释度, 每个稀释度接种 2 片胶膜, 每片 1ml, 滴入膜的中央, 样品扩散后, 闭合塑料袋, 送 37℃ 培养。

5. 样品保存期试验: 取室温下保存 6 和 8 个月同一批号样品, 接种于胶膜, 与平板倾注法做计数对比。

6. 生长试验: 用革兰氏阳性球菌、杆菌; 革

兰氏阴性杆菌; 假丝酵母和霉菌等部份菌株做成菌悬液, 分别接种胶膜。

## 结 果

### (一) 细菌生长试验

大肠埃希氏菌、普通变形杆菌、奇异变形杆菌、费氏柠檬酸杆菌、粘质沙雷氏菌, 臭鼻克雷伯氏菌、迟缓爱德华氏菌、铜绿假单胞菌、洋葱假单胞菌和产碱假单胞菌于胶膜上, 经 37℃ 24 小时培养生长良好, 菌落红色、孤立; 变形杆菌在胶膜上生长无迁徙现象。节杆菌、假丝酵母、炭黑霉菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌在胶膜上生长良好, 菌落呈淡红色, 形成芽孢多的杆菌为淡粉色。

### (二) 稳定试验

将一个样品的同一个稀释度接种 30 个胶膜与 30 个平板。胶膜的平均菌落数为 134 个, 最高为 149, 最低为 117, 与平均数相差 11%。平板法平均数为 149 个, 最高 163, 最低 134, 与平均数相差 10%。

### (三) 产品保存期试验

室温下保温 6 个月和 8 个月的产品(批号: 88-12), 两次做样品计数检查, 胶膜法与平板倾注法对比结果。胶膜法: 平板倾注法 6 个月, 为 154:161; 8 个月为 107:93, 胶膜上的红点仍清晰可见。

### (四) 胶膜法与平板倾注法符合率 (表 1)

表 1 胶膜法与平板倾注法检查样品的结果

样 品	份数	两法相等数	两法不相等频数	符号秩和检验结果	平板法平行样间大于 50% 误差率 (%)	两法大于 50% 误差率 (%)	两误差率 X <sup>2</sup> 检验
餐具	942	154	788	不显著	42.0	40.0	不显著
冷饮*	234	69	165	不显著			
肉制品*	203	36	167	不显著			
豆制品	237	79	153	不显著	15.0	12.0	不显著
奶制品	198	17	181	不显著	8.6	10.1	不显著
糕点	113	28	85	不显著	30.0	22.0	不显著
饮用水	299	115	184	不显著	33.0	31.0	不显著
化妆品	115	72	43	不显著	17.0	22.0	不显著
物体表面*	104	43	61	不显著			
总计	2445	613	1832	不显著			

\* 考核中, 有的单位平板倾注法未做平行样

表2 胶膜法和平板倾注法检查样品合格率

样品	份数	胶膜法		平板倾注法		两法合格率 X <sup>2</sup> 检验
		合格数	合格率(%)	合格数	合格率(%)	
餐具	942	611	64.8	697	73.9	不显著
冷饮	234	221	94.4	212	90.6	不显著
肉制品	203	203	100.0	203	100.0	
豆制品	237	237	100.0	237	100.0	
奶制品	198	198	100.0	198	100.0	
糕点	113	113	100.0	113	100.0	
饮用水	299	276	92.3	274	91.7	不显著
化妆品	115	101	87.8	99	86.1	不显著

## 讨 论

本胶膜的研究在思路与国内已有产品利用除菌滤膜自然孔隙小堵塞细菌的传统想法不同,我们是采用了大孔径纤维载体,利用胶膜的吸收作用,使细菌被吸在表面上,致使本膜具有新的特点:

1. 能够检验带渣子的固相样品,这是本膜最主要的特点。食品类、化妆品、餐具等都属于含渣样品,它与国内已有的水和水样样品滤膜检测器相比<sup>[3]</sup>,检验范围大20倍。美国的饮用水、空气检测器和日本的物体表面检测板<sup>[4]</sup>都属于单相、无渣样品的检测器。所以本膜可算功能多的一种检测器。

2. 本产品膜面积大,正反两面计数面积达48cm<sup>2</sup>,国内产品为10cm<sup>2</sup>和7cm<sup>2</sup>,美国饮用水检测器为1.5cm<sup>2</sup>。而且本膜滤水快,样品扩

散均匀,菌落分散度好,可容纳2000个细菌生长,并可分辨出来。

3. 生产工艺简单,膜装在塑料袋内,无任何附加材料,加样量易于准确掌握,操作简便。

4. 成本低廉,比国内类似产品单价低1/5至2.5倍,比美国低25倍。

5. 在膜上一部份芽孢菌的菌点周围有淡红色扩散圈,是本产品极待解决的缺点。载体的选择不当、生产工艺的疏漏都会使产品质量下降,这是质量控制的重要环节。

## 参 考 文 献

1. 中华人民共和国卫生部: 食品卫生检验方法(微生物学部分),7-11页,1985。
2. 中华人民共和国卫生部: 化妆品卫生标准,3-5页,1987。
3. 黄成昌等: 重庆医药,3: 1-4,1986。
4. 管原和行: *Medical Technology*. 17(6): 529-536, 1989。