[19]中华人民共和国专利局

[11] 公开号 CN 1123561A

[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94192108.5

[51]Int.Cl[6]
C12Q 1/04

[43]公开日 1996 年 5 月 29 日

[22]申请日 94.4.5

[30]优先权

[32]93.5.14 [33]US[31]08/062,311

[86]国际申请 PCT/US94/03762 94.4.5

[87]国际公布 WO94/26926 英 94.11.24

[85]进入国家阶段日期 95.11.14

[71]申请人 美国3M公司

地址 美国明尼苏达州

[72]发明人 P·A·马赫 K·E·赫塞尔罗思
C·A·亚当斯 D·A·施瓦布

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 白益华

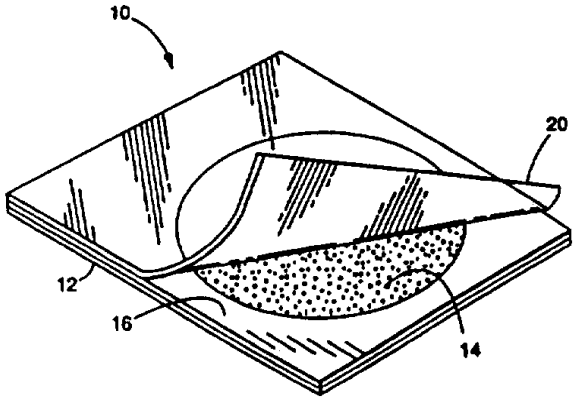
C12M 1/16 C12N 1/20

权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 用于快速计数大肠杆菌类细菌的培养基

[57]摘要

本发明主要涉及检测样品含菌的产品与方法，尤其涉及这些产品和方法中可对大肠杆菌类细菌进行早期检测和计数的培养基。上述细菌培养基是下列成分的混合物：胰蛋白胨，乳糖，NaCl，胆盐和为在 12 小时内检测和计数活菌而要求生长菌周围有高浓度足够反应的过量酚红。



权 利 要 求 书

1. 便于生长于其中大肠杆菌类细菌早期检测和计数的细菌培养基，其特征在于，它含有胰蛋白胨，乳糖，NaCl，胆盐，瓜耳树胶和为在12小时内检测和计数活菌，生长菌周围必需的高浓度过量酚红。

2. 根据权利要求1所述的培养基，其特征在于，其中的酚红浓度大于160mg/l。

3. 根据权利要求1所述的培养基，其特征在于，其中的酚红浓度大于1000mg/l。

4. 根据权利要求1所述的培养基，其特征在于，其中含有10～20g/l胰蛋白胨，2.5～7.5g/l乳糖，2.5～7.5g/l NaCl，1.35～1.65g/l胆盐，2.5～7.5g/l瓜耳树胶，0.025～0.120g/l氯化三苯基四唑鎓和0.16～5.0g/l酚红。

5. 一种检测样品中大肠杆菌类细菌的方法，其特征在于，它包含如下步骤：含大肠杆菌类细菌的液体的样品加入培养基中，其中含有胰蛋白胨，乳糖，NaCl，胆盐，瓜耳树胶和能在细菌周围提供浓度足够高的过量酚红；在培养基中培养细菌；在12小时内检测由于细菌代谢而发生的酚红颜色变化。

6. 根据权利要求5所述的方法，其特征还在于，其中的细菌在含培养基的琼脂中生长。

7. 根据权利要求5所述的方法，其特征还在于，其中的细菌在含培养基的悬浊液中生长。

8. 一种检测样品中大肠杆菌类细菌的设备，其特征在于，它含有：不易变形防水基材，泡沫塑料垫片和透明盖片，其中含有胰蛋白胨，乳糖，NaCl，胆盐，瓜耳树胶和过量酚红的培养基被涂在不易变

形防水基材上使生长菌周围有高浓度酚红以便在12小时内检测和计数活菌。

9. 根据权利要求8所述的设备，其特征还在于，其中酚红由红变黄，而这一颜色变化由仪器检测。

10. 根据权利要求8所述的设备，其特征还在于，24小时后氯化三苯基四唑鎓会因大肠杆菌类细菌的存在而发生颜色变化。

说　明　书

用于快速计数大肠杆菌类细菌的培养基

本发明主要涉及用于检测样品中大肠杆菌类细菌的产品和方法，尤其涉及这些产品和工艺中使用的可快速计数大肠杆菌类细菌的培养基。

发明背景

检测样品中细菌的存在及数量的传统方法耗时枯燥而且费力。通常，技术人员必需制备试剂和营养基质，将营养基质与琼脂混合，然后加热，再将其注入培养皿中待其凝固，采样后稀释样品，取稀释样品接种入琼脂培养基，将已接种平皿培养 24～48 小时，最后计数培养皿上长成的菌落。本发明的产品和方法减少了试剂制备时间，可提前并快速的进行细菌计数，这些特点必将受到此领域工作人员的欢迎。

一个可大大简化上述试剂制备时间的产品实例是 Hansen 等的美国专利 4,565,783 所述的可供微生物生长的干培养设备。在 Hansen 等报导的典型设备中，将一种含有凝固剂和可供微生物生长的营养基质、且可溶于冷水的干粉涂在一种防水基材上。把含指示染料和粉状凝固剂剂的丙烯酸酯粘合剂涂在透明可见的片的一面，此盖片固定在包被好的基质层上。

使用时，把事先定好量的水性样品与含涂层的基材接触，盖片放在样品和基材之上。水性样品润湿了可溶性的干粉，由此形成可支持微生物生长的固态培养基。生长期间，粘附于盖片上的指示染料在微生物活性存在时发生反应，由此可见培养设备中长出的菌落。以 Hansen 等的报导为根据的干培养装置，有可购得的 PETRIFILM

板(目录号 6400,3M,St. Paul,MN)。

Hansen 等的干培养设备与常规的琼脂固体培养基/培养皿方法相比简单得多,因为使用者无需将培养基,琼脂和其它试剂混合,加热,倒平皿,涂平皿,而且,Hansen 等的装置结构紧凑而且易于处理,所以使用安全而方便。

尽管与常规的培养方法相比,Hansen 等的装置有许多优点,接种后的薄膜板仍需在细菌计数前培养 24～48 小时。在许多情况下,早期检测出细菌的存在或计数是很有价值的。例如,对食品工业来说,细菌的早期检定和快速计数是十分重要的。现在,必须在 24～48 小时后才检定细菌将导致生产者推迟食品的应市,导致大量的被污染产品出产。对食品中细菌的早期检定,由于提前确定有无污染,可使食品生产者将食品提前应市。而且,生产者可找到并去除细菌污染源,无需丢弃大量被污染产品。所以,在少于 24～48 小时的时间内检定染菌,对食品生产者十分有利。

除了食品工业将由因染菌的早期检定而明显受益,其它产业也将大为欢迎。因此需要有早期检定和快速计数大肠杆菌类细菌的产品和方法。

发明概要

本发明因提供了可早期检定和快速计数大肠杆菌的产品和方法而克服了上述现有产品和方法的不足。本发明的一个实施例是一种可快速检定和计数生长于其上的大肠杆菌类细菌的细菌培养基。该培养基由胰蛋白胨,乳糖,氯化钠,胆盐,瓜耳树胶和过量的酚红,其量应足以使生长菌周围高浓度的酚红发生反应,以便在 12 小时内能检定并计数长出的细菌。

优选液体培养基含有约:10～20g/l 的胰蛋白胨,2.5～7.5g/l 乳糖,2.5～7.5g/l NaCl,1.35～1.65g/l 胆盐,2.5～7.5g/l 瓜耳树胶和 0.16～5.0g/l 酚红。更可取的液体培养基含有约:15g/l 胰蛋白

胨，5g/l 乳糖，5g/l NaCl，1.5g/l 胆盐，5g/l 瓜耳树胶和 1.25g/l 酚红。

本发明培养基可用于液体，固体琼脂培养基或 PETRIFILM 板之类的薄膜设备。当用 PETRIFILM 板时，将培养基涂在设备表面一起干燥。当培养基在一层薄膜上干燥后，它含有 4.8mg/in² 胰蛋白胨，1.6mg/in² 乳糖，1.6mg/in² NaCl，0.5mg/in² 胆盐，1.6mg/in² 瓜耳树胶和 0.4mg/in² 的酚红。当干燥的培养基被润湿后，其中上述成分的浓度与优选液体培养基中的相同。

本发明的另一实施例是检定样品中大肠杆菌类细菌的方法。使用此法时，取少量含有大肠杆菌的样品加入含有胰蛋白胨，乳糖、NaCl，胆盐和菌落周围足够反应的过量酚红的培养基中。于是，细菌在培养基中生长，检定细菌代射导致的酚红变色来确认检定细菌的存在。使用此法，检定与计数可在 12 小时完成，甚至可在 8 小时内。

检定培养基中的大肠杆菌可以目测也可以借助于仪器。适用仪器可见于 1993 年 5 月 14 日申请的相关美国专利 08/061,678。

本发明的另一实施例是探测样品中长菌的设备。优选设备包括一个不易变形的防水基材和一个透明盖片。将本发明培养基涂于不易变形的防水基材上，将它干燥以使生长菌周围酚红浓度足够高，从而可在 12 小时内探测出并计数活菌，大肠杆菌的酸性代谢物使培养基由红转黄，由此可简单地在该设备上探测出大肠杆菌类细菌的存在(目测或使用仪器)。

在另一个有所改动的实施例中，本发明培养基还含有一种次级指示剂，氯化三苯基四唑鎓。在培养基中使用次级指示剂，可对细菌的早期探测和计数作出确定。具体说，由酚红的变色探测出大肠杆菌类细菌的存在后，活菌继续产酸。当充分生长的产酸菌落形成后，培养基最终完全由红向黄转变。24 小时后，且培养基由红转黄后，可以检测出由菌落生长导致的氯化三苯基四唑鎓的变色。如有大肠杆菌

类细菌，氯化三苯基四唑鎓变成红色。氯化三苯基四唑鎓的这一颜色变化证实了与酚红色变有关的早期计数。这一后期证明，同样是因为于大肠杆菌类细菌周围产生的气泡。

氯化三苯基四唑鎓在培养基的使用浓度以 0.025～0.120g/l 为佳，0.050g/l 更佳。当氯化三苯基四唑鎓用于薄膜设备，干燥后的培养基约含 0.02mg/in^2 的氯化三苯基四唑鎓。

附图简述

图 1 所示为一含有本发明培养基的装置。

发明详细说明

本发明提供了用于在 12 小时内检测样品中有无大肠杆菌类细菌(大肠杆菌包括那些乳糖发酵，革兰氏阴性杆菌)的产品和方法。虽然已有许多用于检测大肠杆菌的产品与方法，但在 12 小时内完成检测与计数比常规产品与方法的所需时间要短得多。

由于各种原因，曾经很难早期检测和计数许多样品中的大肠杆菌类细菌。大多数情况下，样品中的大肠杆菌类细菌生长受抑制，生长水平不理想。为了获得理想的生长状态(这一点使早期检测成为可能)受抑制细菌必需一段时间来从抑制状态复苏过来。本发明提供了一种被确信可使大肠杆菌类细菌快速复苏的培养基。这一培养基中含有可购得的已知试剂和营养基质。这些试剂和营养基质包括：胰蛋白胨，乳糖，NaCl，和胆盐，这些均可由 Acumedia Inc.，Baltimore，MD 购得。该培养基还含有可购自 Rhone－Poulenc，Inc.，Kreuzlinger，Switzerland 的瓜耳树胶，购自 Sigma－Aldrich Corp.，Milwaukee，WI 的酚红，和购自 AMRESCO，Solon，OH 的氯化三苯基四唑鎓。这些优选的试剂与原料称重后用常规无菌操作程序混合。

本发明培养基中含有一种 pH 指示剂，酚红。已知酚红遇酸可由红转黄。随菌落的生长，代谢产生的酸与指示剂反应后在菌落周围显

示黄色。该指示剂已被用于其它培养基中，但用量很少，通常少于10～30mg/l（Manual of Nethods of General Bacteriology，440页(1981)）。特别是，已有报告，酚红在有些培养基中的含量为18～24mg/l(BBL Manual of Produts and Laboratory Procedures，131页(1973))。但是根据本发明，本培养基中的酚红量远大于报导过的酚红或其它指示剂的常用量。例如，使用比常规培养基中过量10倍的酚红，大于160mg/l，就具有了早期检测与快速计数的优点。而且，酚红用量比常规培养基中过量1,000倍即1000mg/L可加强颜色对比度，是本发明的优选用量。

奇怪的是，在含有如此多过量酚红的培养基中，大肠杆菌类细菌复苏与生长得极好，这些浓度显然对大肠杆菌类细菌无毒性作用。多至5000mg/l的酚红，酚红在水中溶解度的上限，也被证明对大肠杆菌类细菌无毒性作用。这可能是因为，大量的过量酚红在培养基中起着缓冲剂的作用，由此促进了被认为对pH敏感的大肠杆菌类细菌的复苏和/或生长。在培养基中使用大量酚红起缓冲作用在实践中是不被认可的，因为指示剂的选择与用量一般不用于对溶液起缓冲作用。

利用过量酚红在培养基中起一定的缓冲作用的另一优点是避免了代谢酸在培养基中的扩散。酸在培养基中的无止境扩散会使生长菌落周围的黄色区域交迭或混在一起。这样难以计数或准确计数。

使用过量酚红的另一料想之外的优点是加大于酚红在中性或碱性环境中的红色与酸性环境中黄色之间的对比。生长中的大肠杆菌周围的黄色区与红色培养基之间的最大色差可使目测大肠杆菌类细菌的时间大大早于用常规产品或方法的测定时间。

本发明中，“为在12小时内检测和计数活菌而要求生长菌周围酚红浓度足够多以至过量”指酚红浓度大于160mg/l，由此可由大肠杆菌类细菌代射而导致的由红转黄的颜色变化来目测或用仪器检测

活菌。

图1所示为可使用本发明的培养基的薄膜型设备。简而言之，该设备的描述可见于为了说明此类设备的制造与使用，而在申请中参考的美国专利4,565,783。

薄膜型装置10具有一主体，主体具有一不易变形防水基材12。基材12最好是由不吸水的防水材料制成的较硬的物质，这些材料如聚酯、聚丙烯，或聚苯乙烯。其它防水材料还包括涂有一层防水聚乙烯的纸质基材等。基材12的上表面涂以培养基14，并将其干燥成基材12上的干培养基。或者，可在基材12上涂一层粘附剂来粘附粉状培养基。该粘附剂在润湿后必须足够透明，从而可透过涂层看得见生长于基材表面的菌落。以粘附剂的厚度必须可使干培养基均匀涂于其上而不会将培养基完全包埋在内。

如果本发明液体培养基的使用时是干燥态或做成干粉状，试剂，营养基质和酚红将被干燥。本发明培养基的干燥可方便地在220°F烘箱中进行，直至其中的水基本蒸发掉。但是，如果水蒸干后继续加热培养基，培养基将变质。

在基材12的涂层表面上固定一个带圆形开孔的泡沫塑料垫片16。该塑料垫片覆盖了基材12的周边并界定了一块样品接种区。同时可防止样品从基材上流失。在有所改动的实施方法中，装置中可以不含盛样品的泡沫塑料层。在此装置中，样品仅由培养基组份固定在基材上。

盖片20固定于垫片16上表面的一缘。盖片20最好由透明的薄膜或板材制成，从而便于计数基材上的菌落。而且，为了防止组分的污染和变质，盖片20最好能防止细菌和水汽透过。盖片20的一种优选材料是双轴取向聚丙烯。

使用中，拉开盖片20，将事先定量的接种物(一般为1ml的接种物)加在图1所示装置基材12的中间。将盖片重新覆盖在基材12

上，令接种物在基材上均匀散开。为此有一简便工具，是将接种物限定在基材12上某一特定区域的具一定重量的圆形模板。当接种物与基材12接触并在其上散开时，基材12上的培养基被润湿形成促进生长的营养凝胶。然后将接种后的装置培养一段预定时间，然后可透过透明盖片20计数基材上长出的菌落。

虽然以上描述了本发明培养基在薄膜型装置上的使用，一般技术人员均应认识到，此培养基还可以用于其它专利人员已知的培养设备。例如，该培养基可做成液体用于细菌悬浊液培养，或者用于已知的琼脂平皿的培养。

以下实施例是为进一步说明本发明的有关细节与实施方法。这些实施例仅用于说明，而不应被视为限定了由后继权利要求中定义的本发明范围。

实施例1 一大肠杆菌类细菌在其快速计数培养基上的生长

本实施例说明本发明的优选液体培养基(大肠杆菌类细菌快速计数培养基，RCCM)可用于液体，琼脂，或薄膜板中大肠杆菌类细菌的生长。本实施例所用培养基含15g/l胰蛋白胨，5g/l乳糖，5g/l NaCl，1.5g/l胆盐，5g/l瓜耳树胶，0.050g/l氯化三苯基四唑鎓和1.25g/l酚红(所有组分的购买来源如前所述)，但是在液态时不用氯化三苯基四唑鎓。

下文表1中所列的各种菌，先在胰蛋白酶黄豆发酵液中(Difco Laboratories，Inc.，detroit，MI)35℃生长18～23小时。表1中的菌购自Silliaker laboratories，Chicago，IL(在菌名后以"S"表示)，或是3M Microbiology Products Laboratory，St. Paul，MN所用的质量控制分离菌。一般技术人员应当认识到，可以选购或以已知方法分离而得到与此相当的菌株或菌种。

在胰蛋白酶发酵液中生长24小时后，在Butterfilds标准法缓冲液(SMB，Fisher Scientific Minneapolis，MN)中将菌浓约为10^8

～10^9 个/ml 的培养物顺次稀释 10^6～10^7 倍。取少量稀释后的培养物，接种入含 RCCM 的培养皿，带旋盖的玻璃试管，或 PETRIFILM 板。

苦生长于琼脂培养基，先将少量培养物加入培养皿，再铺以 RCCM 和琼脂(约 12ml 含 1%(体积与重量百分比)琼脂的培养基)，然后 35℃培养 24 小时。

若在液态中生长，将少量培养物加入装有 RCCM(约 10ml)和一支杜汉氏管的带旋盖试管中。然后加盖，于 35℃培养 24 小时。

若在薄膜上生长，常温下，用一支小吸管在一张 7.5mil 厚的聚酯薄膜基材(Imperial Chemical industries, Willmington, DE)上铺一层 RCCM。将涂布后的聚酯膜在 200～250°F 干燥 1～20 分钟。剪一张带圆孔的 18mil 厚苯乙烯泡沫塑料填片盖在聚酯膜上。在垫片的一侧表面涂一层丙烯酸异辛酯/丙烯酰胺压合胶粘剂(丙烯酸酯/丙烯酰胺的重量比 96/4)，然后固定于聚酯膜的涂层表面。

剪一张透明聚丙烯膜盖在聚酯/苯乙烯塑料层合膜上。在聚丙烯膜(1.6mil，3M，St. Panl, MN)的一侧表面涂一层丙烯酸异辛酯/丙烯酰胺压合胶粘剂(丙烯酸酯/丙烯酰胺的重量比为 96/4)和一层瓜耳树胶(Rhone—Poulenc, Inc., Kreuzlinger, Switzerland)。在苯乙烯泡沫塑料垫片的一缘放一张双面胶带(3M，St. Paul, NM)，沿此缘将聚丙烯膜的含树胶表面与苯垫片粘连。

将培养物(1ml)加入垫片开孔区，用聚丙烯膜盖在接种物上，此薄膜在 35℃培养 24 小时。

培养 24 小时后，检测培养皿，玻璃试管和薄膜板中，板或培养皿的红色背景上有无黄色含酸区，和/或有无汽泡。检测液体培养物是否由红变黄，及杜汉氏管中有无气泡。

表 1 中的数据表明 RCCM 对大肠杆菌类细菌具有选择性。

表 1

菌种	接种物（菌落形成单位/胰蛋白酶大豆琼脂培养皿）	RCCM-液体		RCCM-琼脂		RCCM-薄膜		PETRIFILM 大肠杆菌类细菌计数盘	
		生长状况	产酸/产气	生长状况	产酸	生长状况	产酸/产气	生产状况	产酸/产气
E. coli 565s	30	G	(+/+)	G	(+)	–		–	
E. coli 471s	66	G	(+/+)	G	(+)	–		–	
S. sap. 789s	43	NG	(–/–)	NG	(–)	NG		NG	
B. perm 1212s	10	NG	(–/–)	NG	(–)	NG		NG	
E. fecaelis En1904	43	NG	(–/–)	NG	(–)	NG		NG	
S. aureus 50s	41	NG	(–/–)	NG	(–)	NG		NG	
E. fecaelis SF	39	NG	(–/–)	NG	(–)	NG		NG	
E. fecaelis 3M	37	NG	(–/–)	NG	(–)	NG		NG	
S. aureus 48s	117	NG	(–/–)	NG	(–)	NG		NG	
L. dulbreckii 914s	40	NG	(–/–)	NG	(–)	NG	(–/–)	NG	(–/–)
S. typhimurium 451s	95	G	(–/–)	G	(–)	G	(+/–)	G	(–/–)
Y. ent 572s	93	G	(+/+)	G	(+)	G		G	
L. monocytog 23s	70	G	(–/–)	G	(–)	NG		NG	
E. fecaelis 732s	20	NG	(–/–)	NG	(–)	NG		NG	
S. saintpaul 373s	49	G	(+/–)	G	(–)	ND	(–/–)	ND	(–/–)
P. vulgaris 760s	60	G	(+/–)	G	(–)	G		G	
E. coli 503s	42	G	(+/+)	G	(+)	ND		ND	
C. freundii 614s	29	G	(+/+)	G	(+)	ND		ND	
C. freundii 433s	27	G	(+/+)	G	(+)	ND		ND	

E. coli 563s	53	G	(+/+)	G	(+)	ND		ND	
K. pneu 26	49	G	(+/+)	G	(+)	ND		ND	
E. aerog 39	95	G	(+/+)	G	(+)	ND		ND	
E. agglomerans 44s	41	G	(+/+)	G	(+)	ND		ND	
E. coli 555s	94	G	(+/+)	G	(+)	ND	(+/+)	ND	(+/+)
E. cloacae C5	98	G	(+/+)	G	(+)	G		G	
S. newport 347s	92	G	(+/−)	G	(+)	ND	(+/+)	ND	(+/+)
E. sakazaki C3	73	G	(+/+)	G	(+)	G	(+/+)	G	(+/+)
K. oxytoca C4	48	G	(+/+)	G	(+)	G	(+/+)	G	(+/+)
H. alvei C2	80	G	(+/+)	G	(+)	G	(+/+)	G	(+/+)
S. liquefaciens C1	75	G	(+/+)	G	(+)	G		G	
E. coli 561s	76	G	(+/+)	G	(+)	ND		ND	
C. freundii 17	96	G	(+/+)	G	(+)	ND		ND	
K. oxytoca 33	97	G	(+/+)	G	(+)	ND	(+/+)	ND	(+/+)
E. coli 149	80	G	(+/+)	NG	(−)	G		G	
E. fecaelis EN1062	70	NG	(−/−)	G	(+)	NG		NG	
E. coli 627s	86	G	(+/+)	G	(+)	ND		ND	
E. aggl 611s	136	G	(+/−)	G	(+)	ND		ND	
E. coli 633s	71	G	(+/+)	NG	(−)	ND		ND	
Blank	0	G	(−/−)	NG	(−)	NG		NG	

G　　—生长
NG　　—不生长
ND　　未测得
产气　　—(—)无气泡,(+)有气泡
产酸　　—(—)无酸性区,(+)有酸性区

实施例 2—酚红浓度效应

本实施例表明，使用过量酚红，即大于 160mg/l 可进行大肠杆菌的早期检测与计数。在本例中，各种细胞是 3M Microbiology Products Laboratory, St. Paul, MN 所用的质量控制分离菌。这些细菌是Serratia liquefaciens(C_1，具有 3 种稀释液：25 个/ml，50 个/ml，75 个/ml)，Hafina alvei (C2)，Enterobacter sakazaki (C3)，klebsiella oxytoca (C4)，Enterobacter cloace (C5) 和 Escherichia coli(149，3 种稀释液：25 个/ml，50g/ml，75 个/ml)。一般专业人士容易识别相当的菌株或菌种。菌的培养与稀释如例 1 所述，如例 1 所述在薄膜板上加样，但涂在聚酯膜上培养基中的酚红浓度为 0.04～2.5g/l。

下文表 2 所列根据，12 小时后点出的菌落数比 24 小时后的百分比。24 小时后的计数为由氯化三苯基四唑鎓的颜色变化来验证产气菌落。这些数据表明，使用 160mg/l 的过量酚红可进行结果一致性良好的早期检测与快速计数，和产酸菌的快速定量。

表 2

酚红浓度效应

菌株 酚红(g/l)	C1 25 个/ml	C1 50 个/ml	C1 75 个/ml	C2	C3	C4	C5	149 25g/ml	149 50 个/ml	149 75个/ml
2.50	96.30	110.0	95.56	97.16	97.50	97.92	105.8	----	----	88.55 9 hr
1.25	97.06	103.5	95.83	94.07	106.0	97.22	57.59	----	107.8 10 hr	97.27 9 hr
0.63	118.8	107.7	102.6	98.79	102.2	95.28	100.0	101.2	----	106.8 9 hr
0.31	103.7	126.1	95.00	83.54	93.18	----	100.0	----	----	94.74 9 hr
0.16	97.22	107.4	88.70	----	----	----	100.0	100.0	----	----
0.08	103.6	----	93.06	----	96.00	----	100.0	----	----	----
0.04	100.0	----	71.88	----	104.8	----	93.62	----	----	----

实施例 3——比较实施例

在一个实施例中，以含有本发明培养基(RCCM)的薄膜板与购得 PETRIFILM 大肠杆菌类细菌计数盘(3M，St. panl，MN)和常规紫红胆盐琼脂平皿比较。

如实施例 1 所述制备 RCCM 薄膜板。

向乳品质量控制研究所(Dairy Quality Control Institute，Minneapolis，MN)求购牛奶样品，如实施例 1 所述进行稀释后用于这些薄膜板的接种。每一种不同的样品加(1nl)在三个含不同培养基的板中，然后在 35℃培养。对接种盘每小时目测一次。

另外，对 RCCM 和 PETRIFILM 薄膜板每隔 30 分钟用照相机摄取其两个不同波长处影像，进行检测。将两个波长处的影像信号数字化并电子储存。然后将储存的两个波长处的影像信号分开减去从 30 分钟前摄取的影像计算出的分离的信号值。此影像分析法的描述可参见相关的 1993 年 5 月 14 申请的美国专利 08/061,678。

目测三种培养基形成的菌落数。

上述比较所得的数据列于下文表 3。该数据表明，与另两种培养基相比，利用本发明培养基可进行早期检测与计数。

表 3

培养基	菌落形成单位/ml (平行试验板)	时间 (小时)
紫红胆盐琼脂	41/31	24
PETRIFILM 大肠杆菌类细菌计数板	15/15	24
RCCM(目测)	31/39	10
RCCM(仪器测定)	36/35	8

在另一个实施例中，被比较的板为：含本发明培养基的薄膜板，购得的 PETRIFILM 大肠杆菌类细菌计数板(PCC)，含酚红的 PCC，含中性红(Sigma-Aldrich Corp.，Milwaukee，WI 出品的另一种常用指示剂)的改良 PCC，和一个除以中性红取代酚红外，所含培养基与 RCCM 相同的薄膜板。

如实施例 1 所述制备各种含不同培养基和指示剂的薄膜板，并接种含表 4 所列菌种的稀释样品。本实施例所用菌种与前文实施例 2 中的相同。数据还列出计算出数量与 24 小时由氯化三苯基四唑鎓的色变与气泡形成来检测的菌落数一致所需的时间。

表 4

获取与 24 小时后计数结果相同的所需时间

菌种 培养基-指示剂	C1	C2	C3	C4	C5	149
RCCM 酚红	9 hr	11 hr	12 hr	9 hr	12 hr	10 hr
RCCM 中性红	CNR	CNR	CNR	CNR	CNR	CNR
PCC 酚红	10 hr	10 hr	12 hr	8 hr	12 hr	9 hr
PCC 中性红	CNR	CNR	13 hr	CNR	CNR	CNR
PCC	CNR	CNR	CNR	CNR	CNR	CNR

CNR-不可计数

24 小时后由气泡形成和氯化三苯基四唑锎检测

说　明　书　附　图

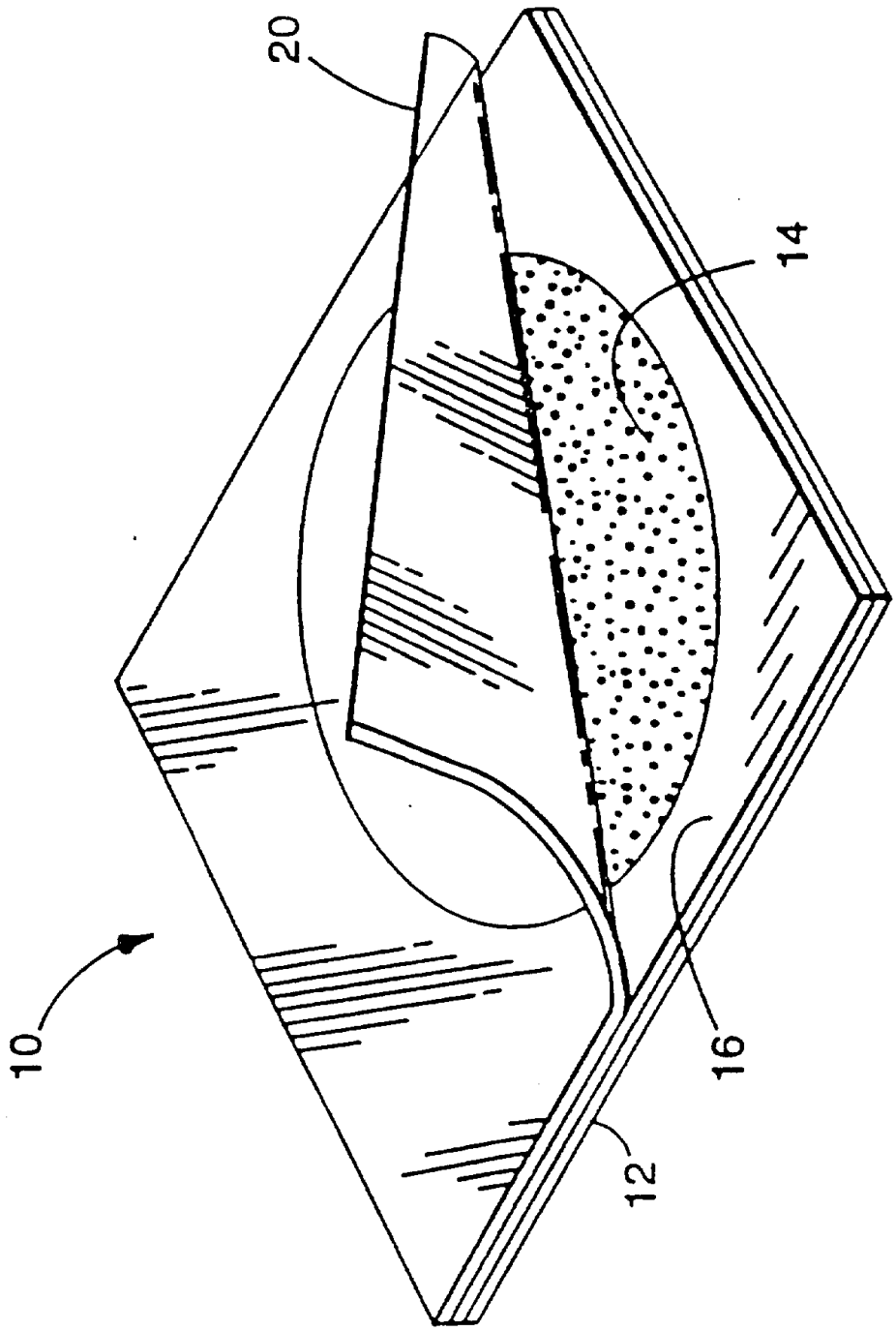


图 1