

**MM2 (MicrobMonitor® 2) 测试结果解读
技术指南**

Distributed by:

ECHA Microbiology Ltd.
www.echamicrobiology.com
☎ +44 29 2036 5930 ☎ +44 29 2036 1195
sales@echamicrobiology.com
Cardiff, United Kingdom

EP157.060313_V3_CN.120913.011117

MM2 测试结果解读技术指南

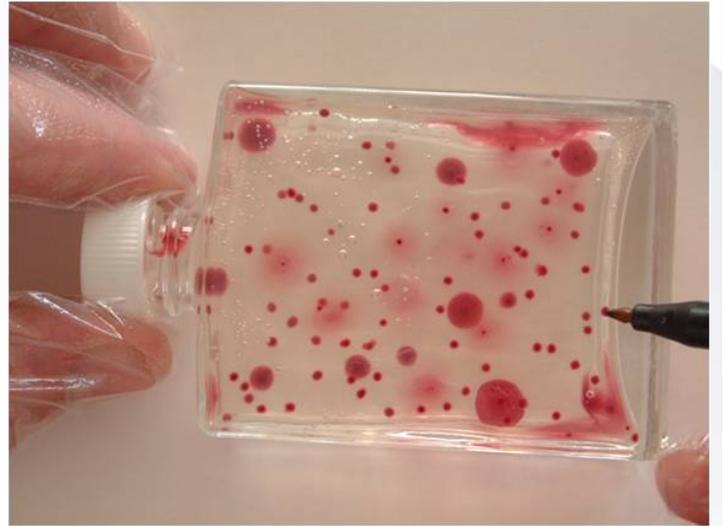
通常情况下，MM2 测试结果能够让人对样品的微生物污染程度有一个很清晰的直观印象。在做 MM2 测试时，能够很容易数出菌落的数量，但如果数量太多难以计数，则可以对照产品使用指南中的图表来进行估算。不过，有时候用 MM2 培养微生物时，试剂瓶中的微生物繁殖也会呈现出异常的外观，或者菌落颜色会干扰对微生物污染状况的判断。本技术指南就如何解读这些异常结果进行了详细说明。

典型的微生物菌落外观

MM2 测试中的微生物繁殖通常以紫色斑点（菌落）的形式呈现，如图 1。典型的菌落通常呈圆形，但可能会有不规则的锯齿状边缘。不同类型的微生物在 MM2 凝胶中繁殖速度不同，导致它们形成的斑点（菌落）大小也会不同。在考虑微生物污染程度时，菌落的大小并不重要。有经验的用户能够将霉菌菌落与酵母菌菌落、细菌菌落区分开来。霉菌繁殖很慢，但最终会形成个头较大的表面呈白色、灰色、绿色或者褐色的粉状或毛茸状的菌落。细菌和酵母菌的菌落生长迅速，通常在 1 到 2 天就能形成，但即使成形后也很小，即使经过长时间的培养，直径也只有几毫米。

通常来说，测试中出现的菌落个数越多，菌落呈现出来的尺寸就会越小。当微生物污染非常严重的时候，可能由于有太多的小菌落以致于凝胶整体呈紫色。有些情况下，根据测试结果很难区分到底是重度污染还是颜色干扰。

Fig. 1 MicrobMonitor2 with typical colonies
图 1: 呈现典型菌落的 MM2 凝胶



颜色干扰

如下几方面的原因可能导致颜色干扰

- 非典型繁殖：“活性”细菌在凝胶中快速扩散 形成带状或片状的紫色斑块。
- 燃烧氧化剂的影响：燃烧氧化剂能与微生物生长显示剂发生一些反应，在凝胶中产生桃色、浅红色、粉色或橙色的颜色。
- 曝光影响：正在培养微生物的 MM2 试剂瓶暴露于强光下的话会导致凝胶中形成粉色，尤其是在试剂瓶的角落处会更明显。
- 长时间储存：在使用前，如果凝胶的储存时间过长，会导致凝胶变暗，形成棕色或暗紫色。

区分到底是微生物繁殖还是颜色干扰的关键在于颜色出现的时间和速度以及颜色的强弱程度。微生物繁殖总是呈紫色或暗红色，任何其他色彩都很有可能是颜色干扰。如果在样品注入试剂瓶中几个小时内就出现了颜色，那这颜色极有可能不是微生物繁殖。但片状的颜色很有可能是由于“活性”细菌的扩散而产生。

关于颜色干扰的种类，以及对解读测试结果和避免此类问题出现的建议，在接下来有更详细的描述。

在对样品进行微生物培养后，凝胶中出现红色或紫色的带状或片状，如何解读这样的结果？

Fig. 2 **MicrobMonitor2** with spreading colonies
图 2: 菌落呈扩散状的 MM2 凝胶



解读

有些细菌活性非常强，能在凝胶中游泳，形成个头很大的紫色或红色片状或带状斑块，且这些斑块往往颜色分布不均。通常来说，只有在测试水样或者含悬浮自由水的油样时，才会出现这种问题。

对菌落呈扩散状的测试结果进行解读

培养 1 天或 2 天后，在斑点扩散之前，对测试瓶进行观测，数一下菌落的数量并用毡尖笔将它们标记出来。如果再次观测时（例如培养 4 天后），出现有扩散的斑点，那么这个斑点的扩散应该被忽略，不应该计入菌落总数，只有新出现的正常菌落才需要计入菌落总数中。图 3 展示了一个油样和一个水样在连续几天的微生物培养过程中所呈现出的状况，可以看到第 4 天时扩散的菌落（斑块）已经形成，在计数时可以忽略这些菌落的扩散。

Fig. 3 **MicrobMonitor2** Tests showing development of spreading colonies over time
图 3: 菌落扩散随时间推移的发展情况

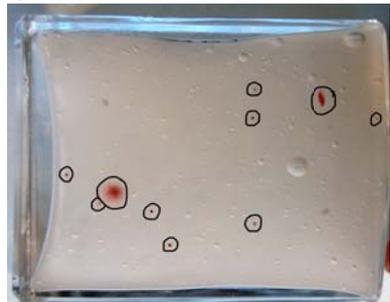
对燃油箱水分进行测试

第 1 天



对燃油箱进行测试

第 1 天



数出有 10 个菌落（画圈处）

第 1 天



第 1 天



菌落生长后，有一个菌落开始扩散，总的菌落数仍然是 10 个

第 4 天

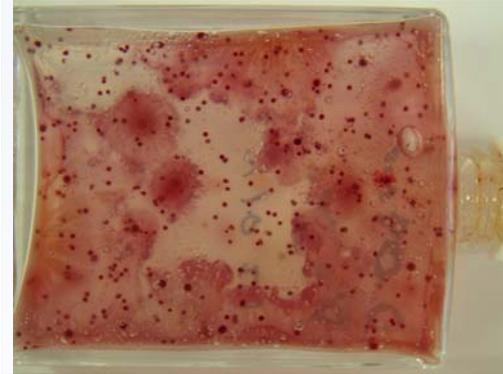


扩散的那个菌落开始掩盖其他菌落，使得很难对菌落总数进行计数。

- 如果无法在这些斑点扩散之前对 MM2 测试瓶进行观测，我们还是能够透过这些片状的扩散的菌落区分出正常菌落并像往常一样计算菌落的个数（见图 4）。片状斑块比正常菌落颜色要浅并且没有清晰的界线。每一个片状斑块都应算作 1 个菌落计入正常菌落总数。如果很难确定一个斑块的界线，则对一个片状或带状的斑块记为“1”个菌落，计入正常菌落的总数中。

Fig. 4 MicrobMonitor2 with normal colonies visible through the spreading colony (patch)

图 4: 透过扩散的菌落（斑块），能观察到正常菌落



- 如果无法透过片状斑块区分出正常菌落并计数，则可以只对未受影响的凝胶区域的正常菌落数量进行计数，并将计数结果乘以适当的倍数来得出整个样品的菌落数（比如说，如果只数了一半的凝胶中的菌落数，则总菌落数为计算出的菌落数乘以 2）。
- 如果对照解读表来估算菌落总数，那么可以尽量忽略其中的片状斑块，只估算正常菌落的数量。必要时，可以估算未受片状影响的部分凝胶中所含的菌落数。
- 如果上述情况都不符合，可能需要在做好以下预防措施的情况下重新做一次测试，也可以将异常结果的照片发送到邮箱 support@echamicrobiology.com，我们会尽最大努力来为您解读测试结果。

避免出现菌落扩散问题

- 对燃油进行微生物检测时，在从油样瓶中提取小份油样测试之前，要使水分沉淀到油样瓶的底部。我们建议，在对既含燃油也含水分的燃油系统样品进行测试时，要使测试程序标准化。将样品上下倒置 3 次，然后静置数分钟（理想情况下，样品中每厘米的油层高度对应静置时间 2 分钟），使水分沉淀下来，从油层的中间高度提取小份油样做测试（航空燃油的话，提取 0.5 毫升；其他油料的话，提取 0.25 毫升），避免将能观察到的粒子、水滴或乳状物移入试剂瓶中。如果需要的话，水层或油水两相界面的样品可以分别再做测试（建议取 0.01 毫升）。
- 对水分进行微生物检测时，使用套环吸水器只提取 0.01 毫升的水分来做测试，可以降低细菌扩散的可能，提高各菌落个体的可辨识度。
- 使用恒温培养箱，这样可以保持温度恒定并降低凝胶凝固的几率。
- 将样品注入试剂瓶后，一定要对试剂瓶以正确的方式进行摇晃。如果没有正确地摇晃，那么本来应该在凝胶中呈现出红色或紫色的微生物重度污染，将会呈现出变色的片状。如果没有正确地摇晃，凝胶仍处于块状，其中带状或片状的微生物繁殖也更难以解读。所以，要确保凝胶已经打碎，然后将注入了样品的试剂瓶摇晃 30 秒。如果想了解更多关于摇晃样品的信息，可以登录网站 www.echamicrobiology.com 并参其中的 AQ 部分的“要点和技巧”。

使用 MM2 测试时，整个凝胶呈粉色或橙红色。这是微生物繁殖吗？

Fig. 5 **MicrobMonitor2** with colour interference due to anti-oxidant in B100
图 5: 由于 B100 中的抗氧化剂导致的颜色干扰



解读

燃油和润滑油，特别是那些含有生物成分的，通常是添加了抗氧化剂来提高其稳定性。抗氧化剂会和 MM2 中的微生物繁殖显示剂发生化学反应，形成浅粉或橙红色背景。燃油中的有些杀菌剂能增强抗氧化剂的颜色干扰，这种干扰主要发生在 B100 或者高 FAME 浓度 (>10%) 汽车燃油的测试时，但有时候也会出现在其他燃油和滑油的测试中。

这样的颜色干扰通常在 24 小时内发生，并随着时间的推移会逐渐变深，但它并不会发展到影响正常培养期间的测试结果的解读。另外，这样的颜色干扰不会影响样品中的微生物繁殖，但会使人更难区分哪些是微生物繁殖，尤其是对于没有经验的用户。测试结果中的菌落数量有限的话，随着进一步生长它们会呈现深红色或紫色，我们能很容易地将它们与背景颜色区分开来。但是，如果测试结果是凝胶中出现粉色、红色、橙色或紫色的变色，那么就很难判断是重度污染还是颜色干扰。

如果培养中的 MM2 试剂瓶曝光，也会产生一种类似的颜色干扰。如果曝光是在正常日光或室内光线下，这种颜色干扰会在 24 小时内发生，但如果是在强光下（如阳光下的窗台），则可能在 1 小时内颜色就开始变化。在正常光线下观察测试结果时，颜色不会受到影响，但是测试瓶应该放在黑暗的环境中培养。

如果培养中的 MM2 试剂瓶曝光，也会产生一种类似的颜色干扰。如果曝光是在正常日光或室内光线下，这种颜色干扰会在 24 小时内发生，但如果是在强光下（如阳光下的窗台），则可能在 1 小时内颜色就开始变化。在正常光线下观察测试结果时，颜色不会受到影响，但是测试瓶应该放在黑暗的环境中培养。

对培养后发生变色的测试结果的解读

- 通常我们都能区分重度污染（菌落数 10,000 或以上）和颜色干扰。可以忽略均匀分布的浅粉色或橙色变色，因为它们不太可能是微生物繁殖（见如下左图）。
- 如果在背景色下可以观察到正常的深红色或紫色菌落，那么可以忽略背景色并像往常一样计算菌落的数量（见下面中图和右图）。

Fig. 6 **MicrobMonitor2** tests showing colour interference (with and without growth)

图 6: 颜色干扰（有微生物污染/无微生物污染两种情况下）

无微生物污染（应忽略均匀分布的背景色）



有微生物污染（能识别并数出菌落；应忽略背景色）



- 菌落数超过10000个，测试结果呈现均匀分布的红色或紫色（见下图7左图）
- 如果测试结果呈现深粉色或橙色，则需仔细观察，看是否呈现散斑状（见下图7右图）。如果是，则很可能是由于有大量的个体非常小的微生物菌落（超过10000个菌落）；如果不是，则很可能是由于很强的颜色干扰。

Fig. 7 MicrobMonitor2 tests showing heavy microbial growth

图7：微生物重度污染

MM2 凝胶由于微生物重度污染（超过1000个菌落数）而呈现紫色



MM2 凝胶呈现橙色，散斑状表明这是由于微生物重度污染（超过10000个菌落数）而不是由于颜色干扰



- 2天之内观察测试瓶；在这个阶段，重度污染的凝胶通常显现为暗粉、红色或紫色，但颜色干扰的话，通常只有在将样品注入试剂瓶很多天之后颜色才会变深。不要超出建议的最长培养时间范围之后再解读测试结果（如果在25摄氏度左右，培养4天；如果培养箱温度低于25摄氏度，培养6-7天）。
- 当测试时凝胶中呈现出颜色但又无法识别出菌落时，在微生物培养方面有经验的用户可以用一个很简单的试验来确定这颜色是由于背景色的干扰还是由于微生物繁殖。打开测试瓶，将套环吸取器刺入凝胶中，然后将套环取出来后刺入另外一个新的MM2测试瓶中，接下来的步骤就和正常情况下一样，对新的测试瓶进行摇晃、培养等。（套环要被作为生物危险品弃置，如用消毒剂处理）。如果原先的测试瓶中的颜色是由于微生物繁殖才出现的，那么微生物也会转移入新的测试瓶中，并在新的测试瓶中继续繁殖，呈现深红色或紫色（菌落数超过10000个）。如果新的测试瓶中颜色没有进一步变化，那就说明原先的测试瓶中的颜色不是由于微生物繁殖才出现的。需要注意的是，如果要打开正在培养中的测试瓶的话，操作者必须是接受过相关培训的，并且在操作之前与之后都要洗手。
- 斑点/斑块的出现可能是因为细菌扩散（见第3页）
- 如果在考虑了以上各种情况之后还是无法判断测试结果中呈现的颜色是由于微生物重度污染还是颜色干扰导致，那么可能需要在做好以下预防措施的情况下重新做一次测试，也可以将异常结果的图片发送到邮箱 support@echamicrobiology.com，我们会尽最大努力来为您解读测试结果。

避免出现菌落扩散问题

- 如果可能的话，对于已知会造成颜色干扰问题的样品，可以测试更小的量。例如测试燃油的时候可以选用0.1毫升而不是0.25毫升样品，测试滑油的时候可以选用0.01毫升而不是0.1毫升样品，这样可以减弱背景色的强度。要对照解读图表中的相关部分来解读测试结果。需要记住的是测试更小的样本量时会降低微生物检测的最低限值，但是如果原先的颜色是由于重度微生物污染，这就不会是一个问题。如果只对最低检测量的样本进行测试，为了消除对整个样品测试结果的影响，可以对每份样品同时做几个测试，将所有测试结果中的菌落数量相加来判断整个样品的污染程度。
- 不要超出建议的培养时间后再来观察测试结果。
- 培养始终在黑暗环境中进行，只允许在使用和观察测试瓶的时候才暴露于光下。

测试之前就发现凝胶呈现粉红、橙红或者棕色，还能继续使用这个测试包吗？

Fig. 8 **MicrobMonitor2** showing discolouration due to age (exceeded shelf life).

图 8: 由于产品老化（超出有效期）导致变色



解读

MM2 中的有些成分是天然的，无可避免会存在细小的差异，导致产品颜色也会出现轻微差异。这种情况是正常的，不会影响测试包的功能。在产品的有效期范围内，尤其是没有冷藏保存的情况下，凝胶颜色略微变深是很正常的。测试包快到寿命期时，里面的凝胶会呈现浅棕色或暗粉色，这样的测试包仍然是可以使用的。另外，MM2 凝胶对光线也很敏感，尤其是直接的日光照射，将测试包暴露于光线下几天就会导致凝胶中出现粉色。

判断变色的测试包是否可以继续使用

- 如果使用者能够将微生物菌落与背景色干扰区分开来，即使测试包变色了，仍然可以使用

Fig. 9 Darkening of **MicrobMonitor2** Tests with age

图 9: 伴随着寿命期的变化发生的测试包颜色变深

A 与 B: 在产品生产时出现的正常颜色差异		C: 典型的产品临近寿命期的变色	D: 超出寿命期 2 年的测试包
可以使用			不要使用

- 在上图 9 中，测试包 A、B 和 C 都是可以使用的，我们可以忽略这样的背景色，并且正常使用这些产品。
- 如果测试包呈现的颜色如图 D，我们建议不要使用，因为会很难来辨认其中的微生物菌落（尽管微生物在这样的测试包中仍能繁殖）
- 如果您的测试包呈现出类似 D 的外观，但产品仍在有效期范围内（自生产日期起一年），请通过 support@echamicrobiology.com 与我们联系。（注意：由于我们无法核实客户的储存温度，我们只对有效期范围内的产品提供质保）

<p>Fig. 10 Discolouration of MicrobMonitor2 Tests due to light exposure 图 10: 由于曝光导致的 MM2 测试包变色</p>	
<p>图 E: 测试包暴露于强光下直射 5 分钟, 呈现出轻微的变色, 尤其是在玻璃瓶的角落处。</p>	<p>图 F: 测试包暴露于强光下直射 2 小时</p>
 <p style="text-align: center;">E</p>	 <p style="text-align: center;">F</p>
<p>可以使用</p>	<p>不要使用</p>

避免使用产品变色:

- 将微生物测试包存储在阴凉处。
- 存储期间避免测试包曝光。
- 存储、操作、运输期间避免测试包暴露于高温下。
- ~~将测试包存储于冰箱中, 可以使测试包的寿命延长一年。~~
- 不要让从盒子中取出来的测试包暴露于日光直射下, 即使时间很短也不行。

想要获取更新的技术指南, 请登陆 www.echamicrobiology.com 或发送邮件至 support@echamicrobiology.com

- 对飞机燃油的样本测试结果的解读, 可以参见手册 EP096 《如何依照 IATA 飞机排油点样品指南解读 MM2 测试结果》
- 对航空燃油供应配送体系的样本测试结果的解读, 可以参见手册 EP119 《如何解读航空燃油供应系统样品的 MM2 测试结果》。
- 对柴油供应配送体系的样本测试结果的解读, 可以参见手册 EP132 《使用 MM2 对柴油储油罐和配送体系进行日常监控》。

ECHA Microbiology Ltd. 对任何基于测试结果作出或者采纳的决定或者评估不承担任何责任。请参见 MM2 使用指南中的产品使用条款。