



# 微生物培养基应用手册

第六版

逗点商城  
机构客户服务商城

[www.commashop.cn](http://www.commashop.cn)



400-878-7248

## CONTENTS

### 目录

<b>01</b>	<b>食品微生物检验 GB4789.2-2022 菌落总数测定及注意事项</b>	
	食品微生物检验 GB4789.2-2022 菌落总数测定及注意事项 平板计数琼脂 (PCA)	02 04
<b>02</b>	<b>食品微生物检验 GB4789.3-2016 大肠菌群计数及注意事项</b>	
	食品微生物检验 GB4789.3-2016 大肠菌群计数及注意事项 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST) 煌绿乳糖胆盐肉汤 (BGLB) 结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA)	05 07 07 08
<b>03</b>	<b>食品微生物检验 GB 4789.15-2016 霉菌酵母计数</b>	
	食品微生物检验 GB 4789.15-2016 霉菌酵母计数 马铃薯葡萄糖琼脂PDA(含氯霉素) 验证 孟加拉红 (虎红) 琼脂验证	10 11 13
<b>04</b>	<b>食品微生物检验 GB4789.4-2016 沙门氏菌检验及注意事项</b>	
	食品微生物检验 GB4789.4-2016 沙门氏菌检验及注意事项 缓冲蛋白胨水 (BPW) 产品验证 四硫磺酸钠煌绿 (TTB) 增菌验证 亚硒酸盐胱氨酸增菌液 (SC) 验证 亚硫酸铋琼脂基础 (BS) 验证 HE 琼脂验证 木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 验证 沙门氏菌显色培养基验证 三糖铁琼脂 (TSI) 验证	15 18 18 20 22 23 25 27 28
<b>05</b>	<b>食品微生物检验 GB4789.10-2016 金黄色葡萄球菌的检验及注意事项</b>	
	食品微生物检验GB4789.10-2016 金黄色葡萄球菌的检验及注意事项 7.5%氯化钠肉汤验证 Baird-Parker琼脂验证 血液琼脂基础验证 脑心浸出液肉汤 (BHI)	29 32 33 34 35
<b>06</b>	<b>食品微生物检验 GB4789-30-2016 单核细胞增生李斯特氏菌检验及注意事项</b>	
	食品微生物检验 GB4789-30-2016单核细胞增生李斯特氏菌检验及注意 李氏增菌肉汤基础 (LB1) 验证 李斯特氏菌显色培养基验证 PALCAM 琼脂基础培养基验证 含 0.6% 酵母浸粉的胰酪胨大豆琼脂(TSA-YE) 验证 含 0.6% 酵母浸粉的胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE) 验证	36 39 40 41 42 43

<b>07</b>	<b>食品微生物检验志贺氏菌检验及注意事项 GB 4789.5-2012</b>		<b>14</b>	<b>食品微生物学检验粪大肠菌群计数 GB 4789.39-2013</b>	
	食品微生物检验志贺氏菌检验及注意事项 GB 4789.5-2012	44		食品微生物学检验 粪大肠菌群计数 GB 4789.39-2013	90
	志贺氏菌增菌肉汤验证	45		月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST)	91
	木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 验证	46		EC 肉汤验证	92
	麦康凯琼脂 (MAC) 验证	47			
	志贺氏菌显色培养基验证	48			
	三糖铁琼脂 (TSI) 验证	49			
<b>08</b>	<b>食品微生物副溶血性弧菌检验及注意事项 GB 4789.7-2013</b>		<b>15</b>	<b>食品微生物学检验 肠杆菌科检验 GB 4789.41-2016</b>	
	食品微生物副溶血性弧菌检验及注意事项 GB 4789.7-2013	50		食品微生物学检验 肠杆菌科检验 GB 4789.41-2016	93
	3% 氯化钠碱性蛋白胨水验证	52		缓冲蛋白胨水 (BPW) 产品验证	96
	弧菌显色培养基验证	53		缓冲葡萄糖煌绿胆盐肉汤 (EE 肉汤) 验证	96
	3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂培养基验证	54		结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂 (VRBGA) 验证	97
				葡萄糖琼脂验证	99
<b>09</b>	<b>食品微生物致泻大肠埃希氏菌检验及注意事项 GB 4789.6-2016</b>		<b>16</b>	<b>食品微生物学检验大肠埃希菌 0157:H7/NM 检验 GB 4789.36-2016)</b>	
	食品微生物致泻大肠埃希氏菌检验及注意事项 GB 4789.6-2016	55		食品微生物学检验大肠埃希菌 0157:H7/NM 检验 GB 4789.36-2016)	100
	营养肉汤 (NB)	59		0157 显色培养基验证	102
	肠道增菌肉汤	59			
	伊红美蓝 (EMB) 琼脂培养基验证	60			
	麦康凯琼脂 (MAC) 验证	61			
<b>10</b>	<b>食品微生物学检验小肠结肠炎耶尔森菌检验 GB 4789.8-2016</b>		<b>17</b>	<b>食品微生物学检验克罗诺杆菌属 (阪崎肠杆菌) 检验 GB4789.40-2016</b>	
	食品微生物学检验小肠结肠炎耶尔森菌检验 GB 4789.8-2016	63		食品微生物学检验克罗诺杆菌属 (阪崎肠杆菌) 检验 GB4789.40-2016	104
	改良磷酸盐缓冲液验证	66		缓冲蛋白胨水 (BPW) 产品验证	106
	CIN-1 培养基验证	67		改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨 (mLST) 肉汤验证	107
	改良 Y 培养基验证	68		阪崎肠杆菌显色培养基验证	108
	改良克氏双糖铁琼脂验证	70			
<b>11</b>	<b>食品微生物学检验 β 型溶血性链球菌检验 GB 4789.11-2014</b>		<b>18</b>	<b>食品安全国家标准饮用天然矿泉水检验微生物部 分 GB 8538-2022</b>	
	食品微生物学检验 β 型溶血性链球菌检验 GB 4789.11-2014	71		食品安全国家标准饮用天然矿泉水检验微生物部分 GB 8538-2022	110
	胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB)	73		乳糖胆盐发酵培养基验证	117
	哥伦比亚 CNA 血琼脂	74		亮绿乳糖胆盐培养液	118
	哥伦比亚血琼脂验证	75		远藤琼脂培养基验证	119
				脑心浸液液态培养基验证	120
				脑心浸液琼脂培养基验证	121
				胆汁液态培养基验证	122
				假单胞菌琼脂基础培养基 (CN 琼脂) 验证	123
				乙酰胺肉汤培养基验证	124
				液体硫乙醇酸盐培养基 (FT)	124
				含铁牛奶培养基验证	125
				KF 链球菌琼脂培养基验证	125
<b>12</b>	<b>食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验 GB 4789.14-2014</b>				
	食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验 GB 4789.14-2014	77			
	胰酪胨大豆多粘菌素肉汤验证	80			
	甘露醇卵黄多粘菌素琼脂 (MYP) 验证	81			
<b>13</b>	<b>食品微生物学检验大肠埃希氏菌计数 GB 4789.38-2012</b>				
	食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数 GB 4789.38-2012	83			
	月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST)	86			
	伊红美蓝 (EMB) 琼脂培养基验证	86			
	EC 肉汤验证	88			
	结晶紫中性红胆盐 MUG 琼脂培养基 (VRBA-MUG) 验证	88			

# 01 食品微生物检验 GB4789.2-2022 菌落总数测定及注意事项

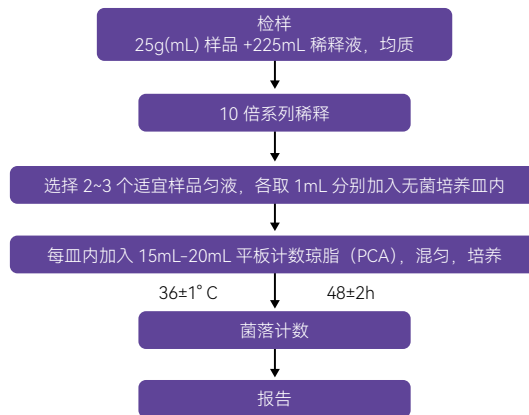
## 一、菌落总数定义和卫生学意义

菌落总数定义：指在一定条件下（如需氧情况、营养条件、pH、培养温度和时间等）每克（每毫升）检样所生长出来的菌落数。

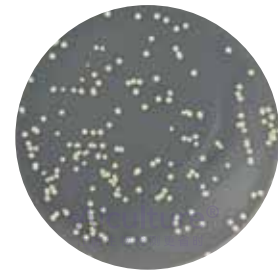
卫生学意义：菌落总数测定是用来判定食品被细菌污染的程度及卫生质量，它反映食品在生产过程中是否符合卫生要求，以便对被检样品做出适当的卫生学评价。菌落总数的多少在一定程度上标志着食品卫生质量的优劣。

## 二、GB4789.2-2022 菌落总数测定（平板法）

### 2.1 菌落总数检验流程图



流程图 1-1 菌落总数检验程序



点 PCA 平板

图 1-1

### 操作注意事项

- 1：从样品的均质到倾注琼脂，应在 15 分钟内完成；
- 2：检验所有物品需无菌和无残留的抑菌物质；
- 3：建议用磷酸盐缓冲液作为稀释液，因为磷酸盐缓冲液能更好地纠正食品样品中 pH 变化，对细菌具有保护作用。
- 4：对易产生较大颗粒的样品（如肉类）进行检测时，建议使用带滤网均质袋，以便均质后用吸管吸取匀液；
- 5：高压灭菌后，培养基的琼脂会分层在底部，应摇匀后使用；
- 6：当样品中含有吸水性物质（如淀粉、面粉等），应以最快速度进行琼脂倾注；
- 7：在培养箱中倒置培养，为防止中间平皿过热，堆叠高度建议不超过 5 个平皿。

### 2.2 结果计数

- 可用肉眼观察，必要时用放大镜或菌落计数器，记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落数以菌落形成单位 (colony-forming units, CFU) 表示。
- 选取菌落数在 30CFU~300CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于 30CFU 的平板记录具体菌落数，大于 300CFU 的可记录为多不可计。每个稀释度的菌落数应采用两个平板的平均数。
- 其中一个平板有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数；若片状菌落不到平板的一半，而其余一半中菌落分布又很均匀，即可计算半个平板后乘以 2，代表一个平板菌落数。
- 当平板上出现菌落间无明显界线的链状生长时，则将每条单链作为一个菌落计数。

### 2.3 结果计算

- 若只有一个稀释度平板上的菌落数在 30~300CFU 之间，计算两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数，作为每 g(mL) 样品中菌落总数结果。
- 若所有稀释度的平板上菌落数均大于 300CFU，则对稀释度最高的平板进行计数，其他平板可记录为多不可计，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。
- 若所有稀释度的平板菌落数均小于 30CFU，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。
- 若所有稀释度（包括液体样品原液）平板均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。
- 若所有稀释度的平板菌落数均不在 30CFU~300CFU 之间，其中一部分小于 30CFU 或大于 300CFU 时，则以最接近 30CFU 或 300CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

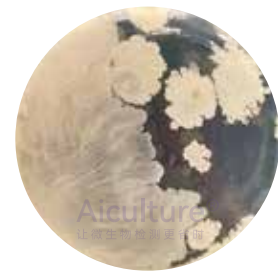


图 1-2

- 若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时,按式(1)计算:

式中

N——样品中菌落数;

$\Sigma c$ ——平板(含适宜范围菌落数的平板)菌落数之和;

$n_1$ ——第一稀释度(低稀释倍数)平板个数;

$n_2$ ——第二稀释度(高稀释倍数)平板个数;

d——稀释因子(第一稀释度)。

$$N = \frac{\Sigma c}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

## 2.4 结果报告

- 菌落数小于 100CFU 时,按“四舍五入”原则修约,以整数报告。
- 菌落数大于或等于 100CFU 时,第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后,取前 2 位数字,后面用 0 代替位数;也可用 10 的指数形式来表示,按“四舍五入”原则修约后,采用两位有效数字。
- 若所有平板上为蔓延菌落而无法计数,则报告菌落蔓延。
- 若空白对照上有菌落生长,则此次检测结果无效。
- 称重取样以 CFU/g 为单位报告,体积取样以 CFU/mL 为单位报告。

表 1-1: 菌落总数结果计算与报告方式实例

编号	稀释倍数及菌落数						菌落总数 (CFU/g 或 CFU/mL)	报告方式 (CFU/g 或 CFU/mL)
	$10^{-1}$		$10^{-2}$		$10^{-3}$			
	平皿 1	平皿 2	平皿 1	平皿 2	平皿 1	平皿 2		
1	0	0	0	0	0	0	< 1×10	< 10
2	24	26	5	7	0	0	250	250 或 2.5×10 <sup>2</sup>
3	多不可计	多不可计	150	160	15	20	15500	16000 或 1.6×10 <sup>4</sup>
4	多不可计	多不可计	236	245	35	33	24955	25000 或 2.5×10 <sup>4</sup>
5	多不可计	多不可计	236	245	25	33	24476	24000 或 2.4×10 <sup>4</sup>
6	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	320	330	325000	330000 或 3.3×10 <sup>5</sup>
7	多不可计	多不可计	310	320	28	26	27000	27000 或 2.7×10 <sup>4</sup>
8	多不可计	多不可计	295	325	22	20	29500	30000 或 3.0×10 <sup>4</sup>
9	菌落蔓延	菌落蔓延	菌落蔓延	菌落蔓延	菌落蔓延	菌落蔓延	菌落蔓延	菌落蔓延

## 三、质量控制和疑难解析

### 3.1 质量控制

- 实验室过程中,每批样品稀释液都要做空白对照。
- 为了控制环境污染,每次检验过程中,于检验台上打开两块计数琼脂平板,并在检验环境中暴露不少于 15 分钟,将此平板与本批次样品同时进行培养,以掌握检验过程中是否存在来自检验环境的污染。
- 定期使用大肠埃希氏菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC6538 和枯草芽孢杆菌 ATCC6633 或相应定量活菌参考品,在 P2 实验室或阳性对照实验室内,用适当的食品样品进行阳性实验验证,并进行记录,次验证实验至少每 2 个月进行 1 次。

### 3.2 疑难解析

1: 为什么水产品与其他食品中菌落总数检测时所采用的培养条件不同?

水产品产自海水或淡水,其温度较低,因而在制定水产品的食品安全检验时选择了 30±1℃进行培养,培养时间为 72±3h。

2: 当高稀释度平板上的菌落数反而比低稀释度平板上菌落数高时,如何处理?

首先结果不能直接记录报告。应针对此结果进行原因分析,并对剩余样品进行重复实验,如确认结果如此,则表示样品中可能有影响菌落计数结果的抑菌物质,应使用稀释、中和剂、过滤等方式去除样品中的抑菌物质再进行检测、报告。

3: 当所有平板上都菌落密布时,结果如何报告?

不应报告多不可计,应在稀释度最高的两个平板上,分别任意取 2cm<sup>2</sup>,计数其中的菌落数,计算每 2cm<sup>2</sup> 的平均菌落数,乘以平皿面积(如平皿直径为 90mm,则乘以平皿面积 63.6cm<sup>2</sup>),再乘以稀释倍数报告。

表 1-2: 所需培养基试剂

用图	货号	名称	规格
样品稀释	DZ1000.225	生理盐水	盒(袋装) 225 mL×10 袋
	PZ1000.225	0.85% 生理盐水(瓶装即用型)	225mL/ 瓶 ×10
	GZ1011.9	磷酸盐缓冲液(PBS)	盒(管装) 9 mL×20 支
	GZ1011.10	磷酸盐缓冲液(PBS)	盒(管装) 10 mL×20 支
	GF1011	磷酸盐缓冲液(PBS)	瓶(干粉) 250 g
平板计数	GZ1000.9	生理盐水	盒(管装) 9 mL×20 支
	GF1001	平板计数琼脂(PCA)	瓶(干粉) 250 g
	GF1001-1KG	平板计数琼脂(PCA)	瓶(干粉) 1000g
	KL1001	平板计数琼脂(颗粒型)(PCA)	瓶(颗粒) 250 g
微生物测试片	KL1001-1KG	板计数琼脂(颗粒型)(PCA)	瓶(颗粒) 1000 g
	TS001	菌落总数测试片	25 片/包

附录 A

# 平板计数琼脂 (PCA)



- 1、产品用途：用于菌落总数测定。
- 2、检验原理：胰蛋白胨提供碳源和氮源；酵母膏粉提供 B 族维生素；葡萄糖提供能源；琼脂是培养基的凝固剂。

表 1-3：平板计数琼脂 (PCA) 验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
平板计数琼脂 (PCA)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	115	142	0.8	逗点	符合
		L 品牌	138		0.9	L 品牌	符合
		H 品牌	121		0.8	H 品牌	符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	202	155	1.3	逗点	符合
		L 品牌	180		1.1	L 品牌	符合
		H 品牌	131		0.8	H 品牌	符合
	枯草芽孢杆菌 ATCC6633	逗点	219	187	1.1	逗点	符合
		L 品牌	281		1.5	L 品牌	符合
		H 品牌	230		1.2	H 品牌	符合

3、典型特征图片：

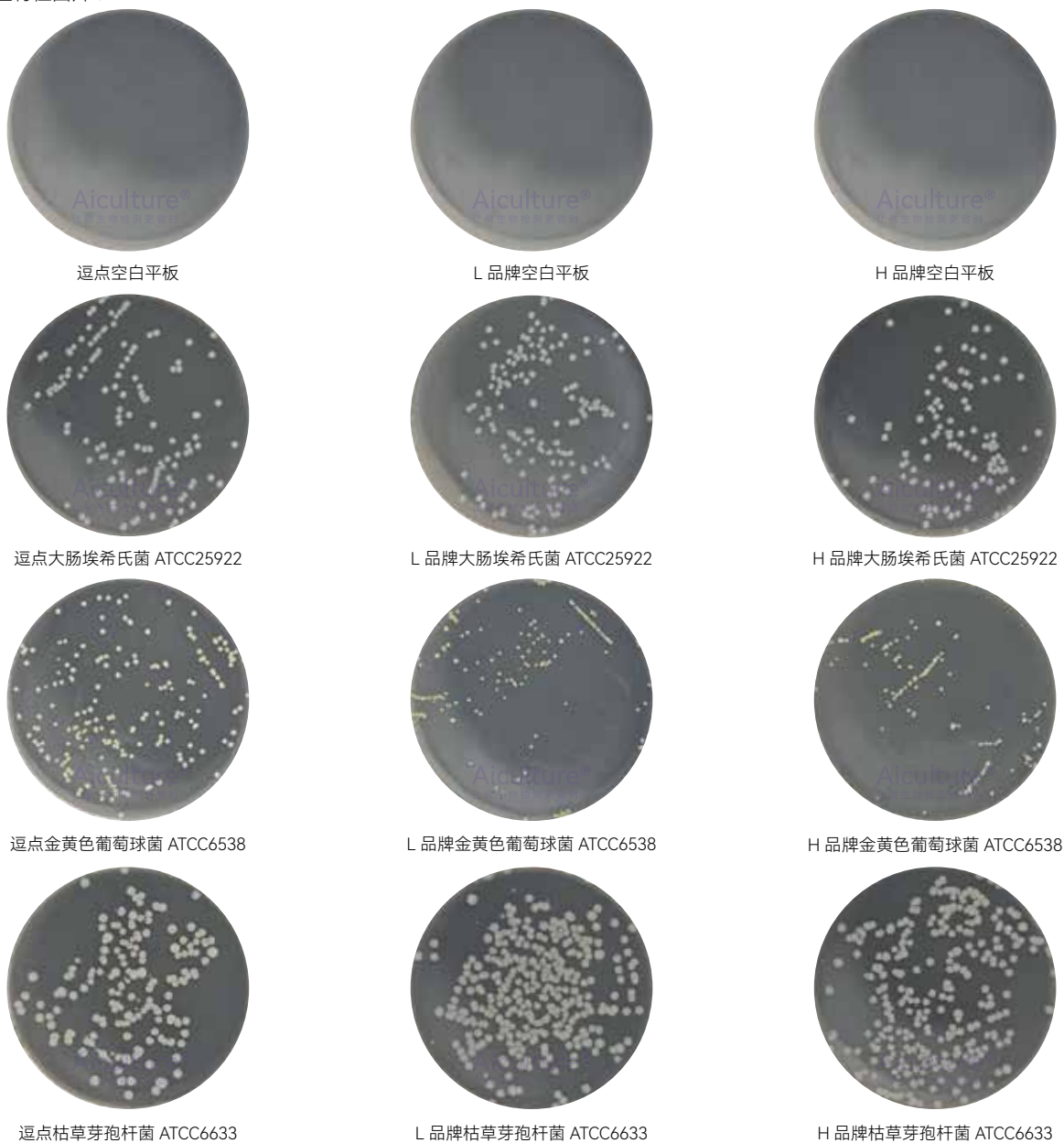


图 1-3

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、枯草芽孢杆菌 ATCC6633，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $PR \geq 0.7$  的要求。
- 4.2 感观：三家平板颜色无显著差异。

# 02 食品微生物检验 GB4789.3-2016 大肠菌群计数及注意事项

## 一、大肠菌群定义和卫生学意义

大肠菌群定义：在一定培养条件下能发酵乳糖、产酸产气的需氧和兼性厌氧革兰氏阴性无芽孢杆菌。大肠菌群不是细菌学上分类命名，它不代表某一种或某一属的细菌，而是一组与粪便污染有关的细菌。这群细菌包括：埃希氏菌属、柠檬酸杆菌属、产气克雷伯氏菌属、肠杆菌属（又叫产气杆菌属，包括阴沟肠杆菌和产气肠杆菌）等。

卫生学意义：大肠菌群作为粪便污染的指标菌评价样品中是否受到粪便的污染。表示了对人体健康是否具有潜在的危险性。直接反映了样品受粪便污染的程度。

## 二、GB4789.3-2016 大肠菌群 MPN 法

### 2.1 什么是 MPN 法？

· MPN 法是统计学和微生物学结合的一种定量检测法。待测样品经系列稀释并培养后，根据其未生长的最低稀释度与生长的最高稀释度，应用统计学概率论推算出待测样品中大肠菌群的最大可能数。

· MPN 值并不能表示实际菌落数，实际菌落数有可能落在置信区间内的任何一点，MPN 值是落在这个置信区间内概率最大的一点。

· 灵敏度较高，适用于污染菌落较少的样品。

### 2.2 大肠菌群 MPN 计数的检验操作

#### 操作注意事项

1：建议用磷酸盐缓冲液作为稀释液，因为磷酸盐缓冲液能更好地纠正食品样品中 pH 变化，对细菌具有保护作用。

2：初发酵接种量超过 1mL，则用双料 LST 肉汤。

3：培养基检测。加入样品前应观察导管内是否有气泡，若有，应适当倾斜试管，让气体排出。

4：结果观察。某些食品样品可能会堵塞小导管底部，影响导管内气泡的观察，可将试管微微倾斜，用手指轻弹管壁，观察是否有一串小气泡沿管壁升起，若有，则判定产气。

### 2.3 培养基原理解析

月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST)

· 月桂基硫酸盐能抑制革兰氏阳性菌生长，胰蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；乳糖是大肠菌群可发酵的糖类；磷酸二氢钾和磷酸氢二钾是缓冲剂。

· 36±1°C 培养 24h 后若已产气，则可停止培养。如果没有观察到有产气的现象，则继续培养至 48±2h。

· 如接种量超过 1mL，则用双料 LST 肉汤。

### 2.4 大肠菌群最大可能数 (MPN) 报告

· 确证的大肠菌群 BGLB 阳性管数，检索 MPN 表，报告每 1g(mL) 样品中大肠菌群的 MPN 值。

· 当实验结果在 MPN 表中无法查找到 MPN 值时，如：阳性管数为 122, 123, 232, 233 等时，建议增加稀释度（可做 4~5 个稀释度），使样品最高稀释度能达到阴性终点（如果污染程度不能判定，则多加一稀释度），然后再遵循相关的规则进行查找，最终确定 MPN 值。

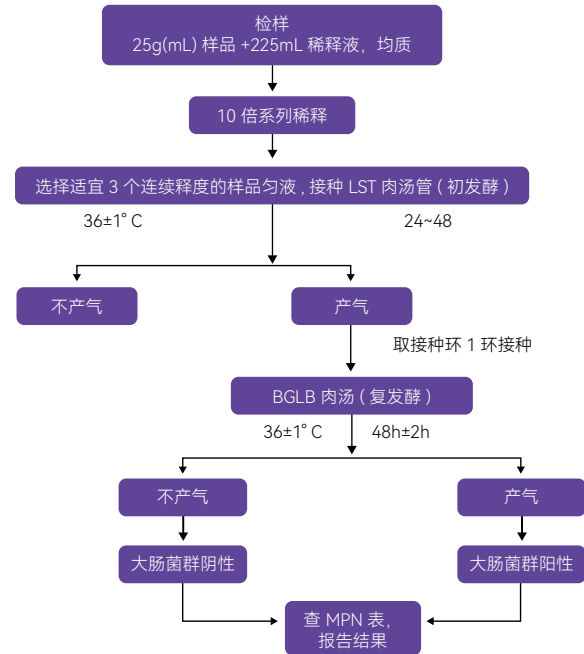
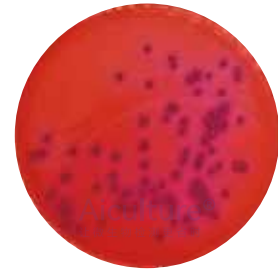
见表 2-1：大肠菌群最可能数 (MPN) 检索表

## 三、GB4789.3-2016 大肠菌群平板计数法

### 3.1 大肠菌群平板计数法流程图

#### 操作注意事项

1：平板法相对 MPN 法来说，结果更加直观精准。长成的一个单菌落也可能来自样品中的 2~3 或更多个细胞。因此平板菌落计数的结果往往偏低。适用与污染较为严重的样品。



流程图 2-1 大肠菌群检验程序

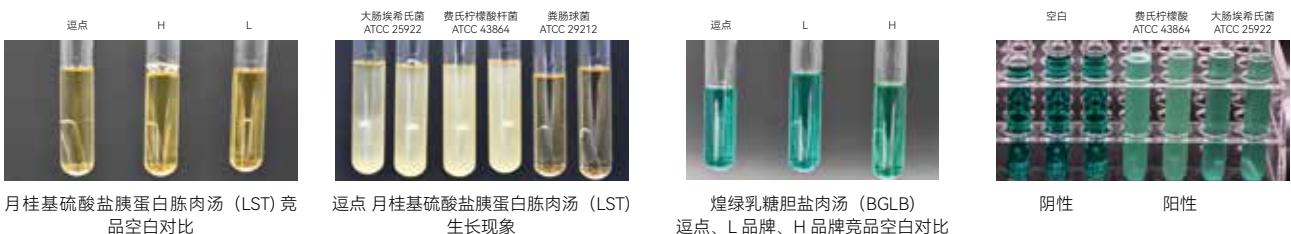


图 2-1

表 2-1：大肠菌群最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN	95% 可信限		阳性管数			MPN	95% 可信限	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	< 3.0	-	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	> 1100	420	-

注 1: 本表采用 3 个稀释度 [0.1g(mL)、0.01g(mL)、0.001g(mL)], 每个稀释度接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1g(mL)、0.1g(mL) 和 0.01g(mL) 时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 0.01g(mL)、0.001g(mL) 和 0.0001g(mL) 时, 则表内数字应相应增高 10 倍, 其余类推。

2: 从一个样品取样到倾注琼脂平板, 应在 15 分钟内完成。

3: 检验所用物品应无菌, 无抑菌残留物。

4: BGLB 确证试验需从 VRBA 平板上挑起至少 10 个典型和可疑菌落进行, 如平板上菌落数少于 10 个, 则挑取全部典型和可疑菌落进行确证。

### 3.2 培养基原理解析

#### 结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA)

- 配方中胆盐和结晶紫抑制革兰氏阳性菌, 中性红作为指示剂, 在酸性条件下为紫红色。
- 大肠菌群分解乳糖所产的酸与胆盐结合, 可形成粉红色菌落, 菌落周围有胆酸盐沉淀环。
- 该培养基无需高温高压灭菌, 现配现用。

### 3.3 计数典型和可疑菌落数

结果判读: 选取菌落数在 15 CFU ~ 150 CFU 之间的平板, 分别计数平板上出现的典型和可疑大肠菌群菌落。典型菌落为紫红色, 菌落周围有红色的胆盐沉淀环, 菌落直径为 0.5 mm 或更大。

**证实试验:** 从接种同一样品浓度的 VRBA 平板上共挑取 10 个不同类型的典型和可疑菌落, 分别移种于 BGLB 肉汤管内, 36°C ± 1°C 培养 24 h ~ 48 h, 观察产气情况。凡 BGLB 肉汤管产气, 即可报告为大肠菌群阳性。

### 3.4 大肠菌群平板计数的报告

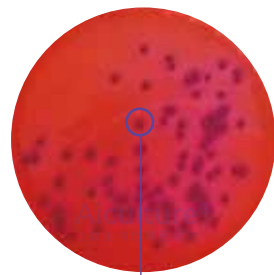
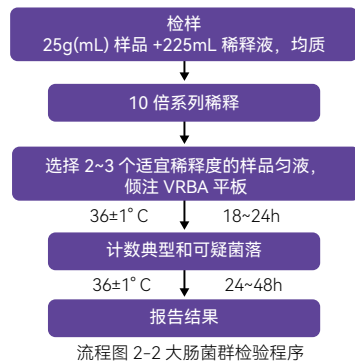
- 经最后证实为大肠菌群阳性的试管比例乘以计数的平板菌落数, 再乘以稀释倍数, 即为每 g(mL) 样品中大肠菌群数。例: 10<sup>-4</sup> 样品稀释液 1mL, 在 VRBA 平板上有 100 个典型和可疑菌落, 挑取其中 10 个接种 BGLB 肉汤管, 证实有 6 个阳性管, 则该样品的大肠菌群数为: 100 × 6 / 10 × 10<sup>4</sup> / g(mL) = 6.0 × 10<sup>5</sup> CFU/g(mL)。若所有稀释度 (包括液体样品原液) 平板均无菌落生长, 则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。
- 若所有稀释度 (包括液体样品原液) 平板均无菌落生长, 则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

## 四、质量控制

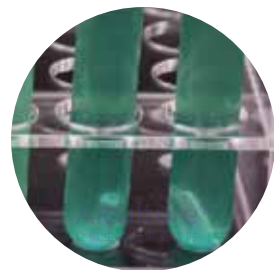
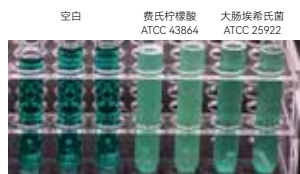
4.1 实验过程中, 每批样品稀释液都要做空白对照。

4.2 为了控制环境污染, 每次检验过程中, 于检验台上打开两块计数琼脂平板, 并在检验环境中暴露不少于 15 分钟, 将此平板与本批次样品同时进行培养, 以掌握检验过程中是否存在来自检验环境的污染。

4.3 定期使用大肠埃希氏菌 ATCC25922 或相应定量活菌参考品, 在 P2 实验室或阳性对照实验室内, 用适当的食品样品进行阳性实验验证, 并进行记录, 此次验证实验至少每 2 个月进行 1 次。



典型大肠菌群菌落: 紫红色, 菌落周围有红色的胆盐沉淀环



BGLB 肉汤试管中的小导管有气泡, 大肠菌群阳性。  
图 2-2

## 附录 A

# 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST)



- 1、产品用途：月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤用于多管发酵法测定大肠菌群和粪大肠菌群。
- 2、检验原理：胰蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；乳糖是大肠菌群可发酵的糖类；磷酸二氢钾和磷酸氢二钾是缓冲剂；月桂基硫酸钠可抑制非大肠菌群细菌的生长。

表 2-2：月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST) 验证数据

样品名称	质控菌株	厂家	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	26	液体混浊且产气	混浊度 2， 且气体充满管内 1/3	符合
		L 品牌				符合
		H 品牌				符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	41			符合
		L 品牌				符合
		H 品牌				符合
枯草芽孢杆菌 ATCC6633	逗点	2118	未生长	混浊度 0 (不生长)	符合	
	L 品牌			符合		
	H 品牌			符合		

### 3、典型特征图片：

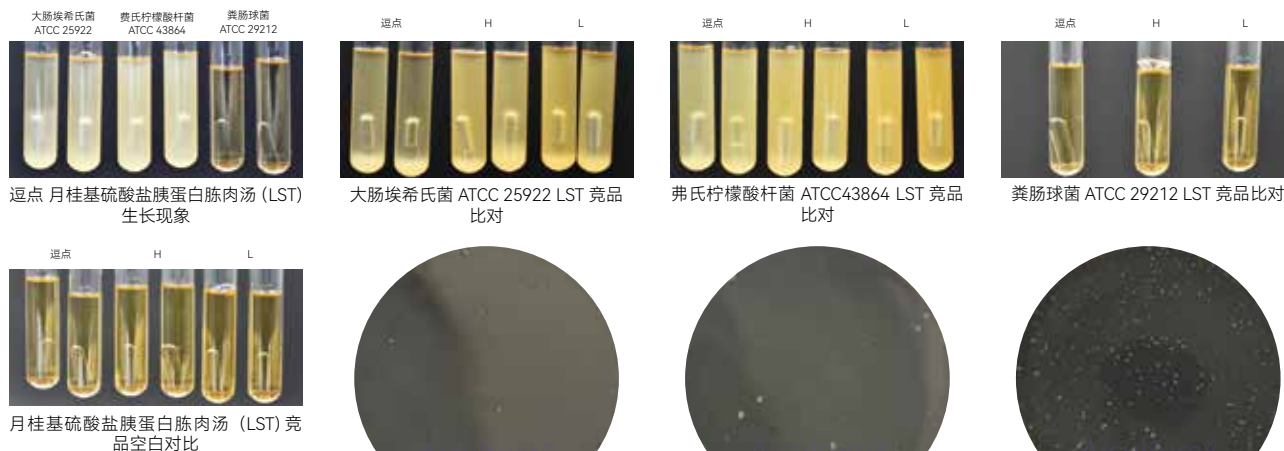


图 2-3

计数大肠埃希氏菌 ATCC25922

计数弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864

计数粪肠球菌 ATCC29212

### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922、弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864、逗点、L 品牌、H 品牌的混浊度、产气均满足要求；
- 4.2 选择性：粪肠球菌 ATCC29212，逗点、L 品牌、H 品牌均满足不生长、不产气的要求；
- 4.3 观感：逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。

## 附录 B

# 煌绿乳糖胆盐肉汤 (BGLB)

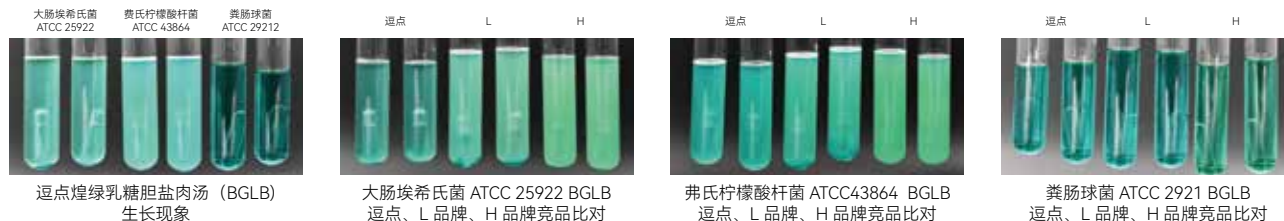


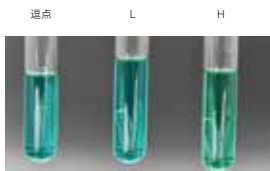
- 1、产品用途：用于多管发酵法测定大肠菌群的确证试验。
- 2、检验原理：蛋白胨提供碳氮源；乳糖是可发酵的糖类；牛胆粉和煌绿抑制非肠杆菌科细菌。

表 2-3：煌绿乳糖胆盐肉汤 (BGLB) 验证数据

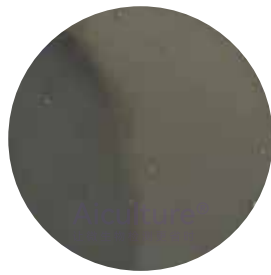
样品名称	质控菌株	厂家	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
煌绿乳糖胆盐肉汤 (BGLB)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	26	液体混浊且产气	混浊度 2， 且气体充满管内 1/3	符合
		L 品牌				符合
		H 品牌				符合
	弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864	逗点	41			符合
		L 品牌				符合
		H 品牌				符合
粪肠球菌 ATCC29212	逗点	2118	未生长	混浊度 0 (不生长)	符合	
	L 品牌			或混浊度 1 (微弱生长)， 不产气	符合	
	H 品牌			符合		

### 3、典型特征图片：

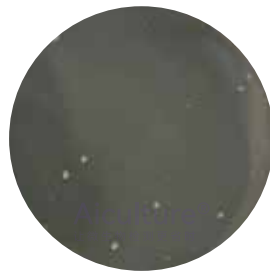




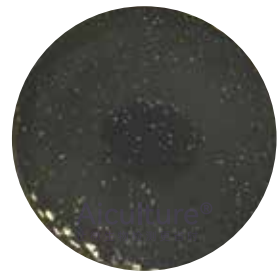
煌绿乳糖胆盐肉汤 (BGLB)  
逗点、L 品牌、H 品牌竞品空白对比



计数大肠埃希氏菌 ATCC25922



计数弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864



计数粪肠球菌 ATCC29212

图 2-4

#### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922、弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864、逗点、L 品牌、H 品牌的混浊度、产气均满足要求；
- 4.2 选择性：粪肠球菌 ATCC29212，逗点、L 品牌、H 品牌均满足不生长、不产气的要求；
- 4.3 感观：逗点、L 品牌煌绿乳糖胆盐肉汤颜色为蓝绿色，H 品牌煌绿乳糖胆盐肉汤颜色为青绿色。

### 附录 C

## 结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA)

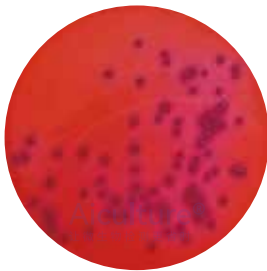


- 1. 产品用途：用于水或食品中大肠菌群平板菌落计数。
- 2. 检验原理：蛋白胨和酵母膏粉提供碳氮源和微量元素；乳糖是可发酵的糖类；氯化钠可维持均衡的渗透压；3 号胆盐和结晶紫抑制革兰氏阳性菌，特别抑制革兰氏阳性杆菌和粪链球菌；中性红为 pH 指示剂。

表 2-4：结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA) 验证数据

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
结晶紫 中性红 胆盐琼脂 (VRBA)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	79	60	PR=1.3	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	72		PR=1.2		符合
		H 品牌	71		PR=1.2		符合
	弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864	逗点	76	115	PR=0.7	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	113		PR=1.0		符合
		H 品牌	85		PR=0.7		符合
粪肠球菌 ATCC29212	逗点	/	/	G=0	G < 5	符合	
	L 品牌	/	/	G=0		符合	
	H 品牌	/	/	G=0		符合	

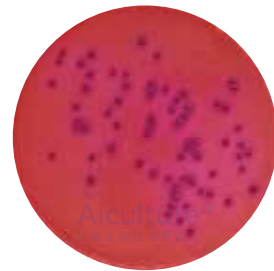
#### 3、典型特征图片：



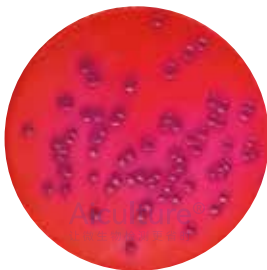
逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



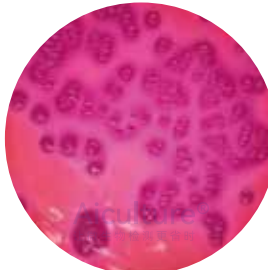
L 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



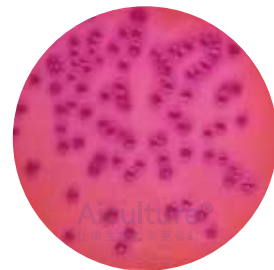
H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864



L 品牌弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864



H 品牌弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864

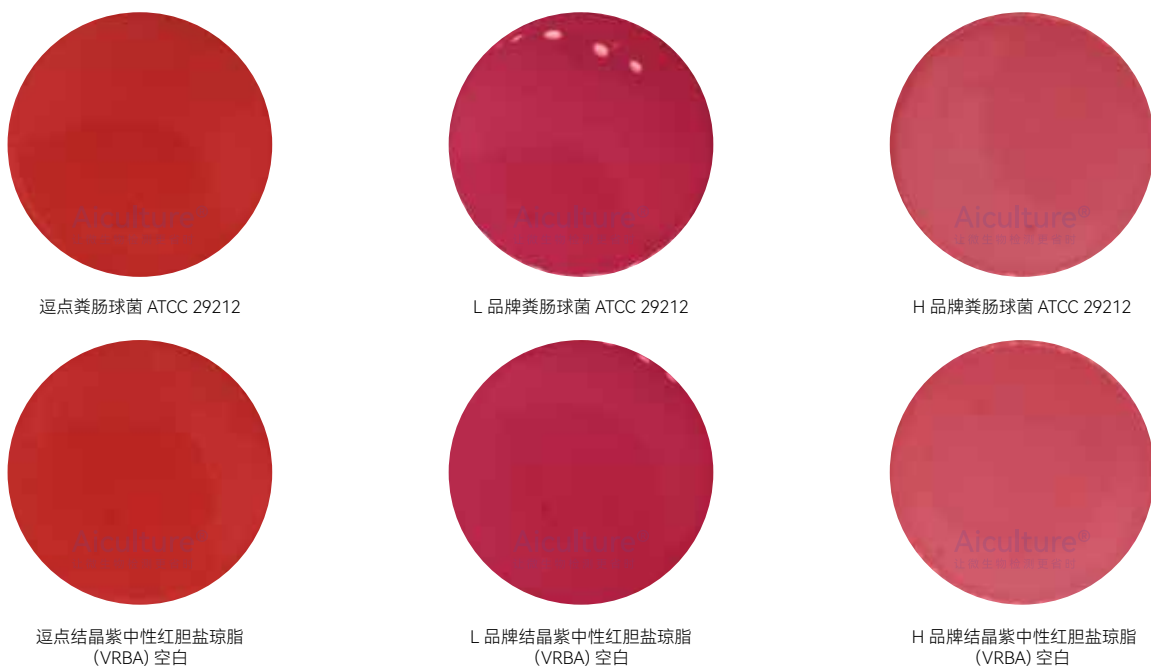


图 2-5

#### 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922、弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $PR \geq 0.7$  的要求，逗点、H 品牌、L 品牌都有明显胆酸盐沉淀。

4.2 选择性：粪肠球菌 ATCC 29212，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $G \leq 1$  的要求。

4.3 感观：H 品牌平板颜色为紫红色偏粉，L 品牌平板颜色为紫红色偏紫，逗点颜色为紫红偏红色。



# 03 食品微生物检验 GB 4789.15-2016 霉菌酵母计数

## 一、霉菌、酵母简介

霉菌和酵母广泛分布于自然界，并可作为食品中正常菌相的一部分。某些霉菌和酵母被用来加工食品，但在特定情况下，它们又可造成食品的腐败变质，使食品失去色、香、味等。例如，霉菌可以引起鱼肉的腐败、油脂的酸败、果蔬的腐烂和粮食的霉变等，某些霉菌还会在特定条件下产生对人体具有毒性作用的次级代谢产物—真菌毒素，通过食品进入人体后，可引起急性或慢性中毒，损害机体的肝脏、肾脏、神经系统和造血系统等。酵母在新鲜或加工过的食品中繁殖时，可使食品产生难闻的异味，还可使液体食品变混浊，产生气泡，形成薄膜和改变颜色等。因此霉菌和酵母被作为评价食品卫生质量的指示菌，并以霉菌和酵母数来判定食品被霉菌和酵母污染的程度。

## 二、霉菌和酵母计数

### GB 4789.15-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验霉菌和酵母计数》

#### 2.1 适用范围

本标准第一法适用于各类食品中霉菌和酵母的计数，第二法适用于番茄酱罐头、番茄汁中的霉菌计数，本文主要针对第一法。

#### 2.2 基本要求

##### 2.2.1 检验环境要求

霉菌和酵母计数工作应在二级生物安全实验室进行。样品检验在洁净工作区进行，出入洁净工作区应登记，洁净工作区和二级生物安全实验室的器具应严格分开。

##### 2.2.2 检验人员要求

检验人员应具备生物安全上岗证，压力容器上岗证，微生物检验人员上岗证。进入洁净工作区前，检验人员需要二次更衣，佩戴帽子、口罩、一次性无菌手套，换鞋。

##### 2.2.3 检验设备要求

使用仪器需要定期进行检定与校准，每次使用仪器前需填写使用记录，开生物安全柜，紫外线照射 20 分钟后，酒精消毒台面。

##### 2.2.4 检验用培养基和试剂

马铃薯葡萄糖琼脂培养基最为常用，配制过程中应添加 0.1g/L 的氯霉素。检验用培养基和试剂均应符合 GB 4789.28-2013《食品安全国家标准食品微生物学检验培养基和试剂的质量要求》。除非特别说明，培养基和稀释剂预处理过程均使用分析纯试剂。

##### 2.2.4.1 马铃薯葡萄糖琼脂培养基的配制

称取培养基于蒸馏水中，加热煮沸至完全溶解，121℃高压灭菌 15 分钟，冷却至 46℃左右，或放置于 46℃±1℃恒温水浴箱中保温，备用。

##### 2.2.4.2 孟加拉红琼脂培养基的配制

称取培养基于蒸馏水中，加热煮沸至完全溶解，121℃高压灭菌 15 分钟，冷却至 46℃左右，或放置于 46℃±1℃恒温水浴箱中保温，备用。

##### 2.2.4.3 生理盐水的配制

称取氯化钠 8.5g，于蒸馏水中，反复搅拌至完全溶解，加水至 1000mL，分装至试管或三角瓶中，121℃高压灭菌 15 分钟，于 2℃-8℃保存，在一个月内使用。

##### 2.2.4.4 磷酸盐缓冲液的配制

###### a) 贮存液的配制

称取磷酸二氢钾 34g 于蒸馏水中，反复搅拌至完全溶解，并用 1mol/L 的氢氧化钠调节 pH 至 7.2±0.1，蒸馏水稀释至 1000mL，于 2℃-8℃保存，在一个月内使用。

###### b) 稀释液的配制

取贮存液 1.25mL，用蒸馏水稀释至 1000mL，分装至试管或三角瓶中，121℃高压灭菌 15 分钟，于 2℃-8℃保存，在一个月内使用。

##### 2.2.15 生物垃圾的处理

所有生物垃圾应经 121℃高压灭菌 30min 后，方可运离实验室。

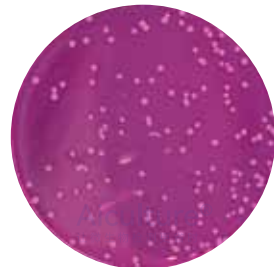
## 3 检验程序

按下图霉菌和酵母的平板计数法的检验程序进行食品中霉菌和酵母的计数。

### 3.1 样品的稀释

#### 3.1.1 固体和半固体样品

用天平无菌称取 25g±0.1g 样品。如使用锥形瓶或试管或三角瓶中，则将已称取的样品置于有 225mL 无菌稀释液的锥形瓶或试管或三角瓶中，无菌稀释液可以根据实际情况选择蒸馏水或生理盐水或磷酸盐缓冲液，充分振摇，即为 1:10 稀释液。如使用均质袋，则将已称取的样品放入盛有 225mL 无菌稀释液的均质袋中，用拍击式均质器拍打 1-2 分钟，制成 1:10 的样品匀液。



逗点酿酒酵母 ATCC9763



逗点黑曲霉 ATCC16404



逗点黑曲霉 ATCC16404



逗点酿酒酵母 ATCC9763

图 3-1

### 3.1.2 液体样品

以无菌吸管吸取 25mL 样品。如使用锥形瓶或试管或三角瓶中，则将已量取的样品置于有 225mL 无菌稀释液的锥形瓶或盐水罐中，无菌稀释液可以根据实际情况选择蒸馏水或生理盐水或磷酸盐缓冲液，充分混匀，即为 1:10 的样品匀液。如使用均质袋，则将已量取的样品放入盛有 225mL 无菌稀释液的均质袋中，用拍击式均质器拍打 1-2 分钟，制成 1:10 的样品匀液。

3.1.3 取 1mL 1 : 10 样品匀液注入含有 9mL 无菌稀释液的试管中，并换一支 1mL 无菌吸管反复吹吸，或在涡旋混合器上混匀，此液为 1:100 的样品匀液。制备 10 倍递增系列稀释样品匀液，每递增稀释一次，换用一次 1mL 无菌吸管。根据对样品污染状况的估计，选择 2 个 ~ 3 个适宜稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），在进行 10 倍递增稀释的同时，每个稀释度分别吸取 1mL 样品匀液加入 2 个无菌平皿内。同时分别取 1mL 无菌稀释液加入 2 个无菌平皿做空白对照。

3.1.4 可提前将制备好的培养基放置于 46°C ±1°C 恒温水浴箱中保温，

或及时将 20mL ~ 25mL 冷却至 46°C 的马铃薯葡萄糖琼脂或孟加拉红培养基倾注到平皿中。转动平皿使其混合均匀，置水平台面待培养基完全凝固。

### 3.2 培养

琼脂凝固后，正置平板，置 28°C ±1°C 培养箱中培养，观察并记录培养至第 5 天的结果。

### 3.3 菌落计数

首先用肉眼观察，必要时可用放大镜或低倍镜，记录稀释倍数和相应的霉菌和酵母菌落数。以菌落形成单位 CFU 表示。选取菌落数在 10CFU ~ 150CFU 的平板，根据菌落形态分别计数霉菌和酵母菌落数。霉菌蔓延生长覆盖整个平板的可记录为菌落蔓延。

### 4 结果报告

4.1 计算同一个稀释度的两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数计算；

4.2 若有两个稀释度平板上菌落数均在 10CFU ~ 150CFU 之间，则按照 GB 4789.2 的相应规定进行计算；

4.3 若所有平板上菌落数均大于 150CFU，则对稀释度最高的平板进行计数，其他平板可记录为多不可计，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算；

4.4 若所有平板上的菌落数均小于 10CFU，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算；

4.5 若所有稀释度（包括液体样品原液）平板均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算；

4.6 若所有稀释度的平板菌落数均不在 10CFU ~ 150CFU 之间，其中一部分小于 10CFU 或大于 150CFU 时，则以最接近 10CFU 或 150CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算；

4.7 菌落数按“四舍五入”原则修约。菌落数在 10 以内时，采用一位有效数字报告；菌落数在 10 ~ 100 之间时，采用两位有效数字报告。

4.8 菌落数大于或等于 100 时，前 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数来表示结果，也可用 10 的指数形式来表示，此时也按“四舍五入”原则修约，采用两位有效数字；

4.9 若空白对照平板上有菌落出现，则此次检验结果无效；

4.10 称量取样以 CFU/g 为单位报告，体积取样以 CFU/mL 为单位报告，报告或分别报告霉菌和或酵母数。



流程图 3-1 霉菌和酵母的平板计数法的检验程序

## 附录 A

# 马铃薯葡萄糖琼脂 PDA(含氯霉素) 验证

1. 产品用途：供霉菌和酵母的计数、分离和培养用。

2. 检验原理：马铃薯浸出粉有助于各种霉菌的生长；葡萄糖提供能源；琼脂是培养基的凝固剂；氯霉素可抑制细菌的生长。

表 3-1：马铃薯葡萄糖琼脂 PDA(含氯霉素) 验证数据

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定	
马铃薯葡萄糖琼脂 PDA (含氯霉素)	酿酒酵母 ATCC9763	逗点	147	162	PR=0.9	PR ≥ 0.7	符合	
		L 品牌	133		PR=0.8		符合	
		H 品牌	103		PR=0.6		符合	
	黑曲霉 ATCC16404	逗点	55	154	PR=1	PR ≥ 0.7	符合	
		L 品牌	65		PR=1.2		符合	
		H 品牌	34		PR=0.6		符合	
大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合		
	L 品牌	/	/	G=0		符合		
	H 品牌	/	/	G=0		符合		
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/		G=0	G ≤ 1	符合
	L 品牌	/	/	G=0		符合		
	H 品牌	/	/	G=0		符合		

- 酿酒酵母 ATCC9763 在马铃薯葡萄糖琼脂 PDA(含氯霉素) 板上的菌落特征：菌落奶油色；
- 黑曲霉 ATCC16404 在马铃薯葡萄糖琼脂 PDA(含氯霉素) 板上的菌落特征：白色菌丝，黑色孢子；
- 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在马铃薯葡萄糖琼脂 PDA(含氯霉素) 板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；
- 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在马铃薯葡萄糖琼脂 PDA(含氯霉素) 板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1。



3、典型特征图片：

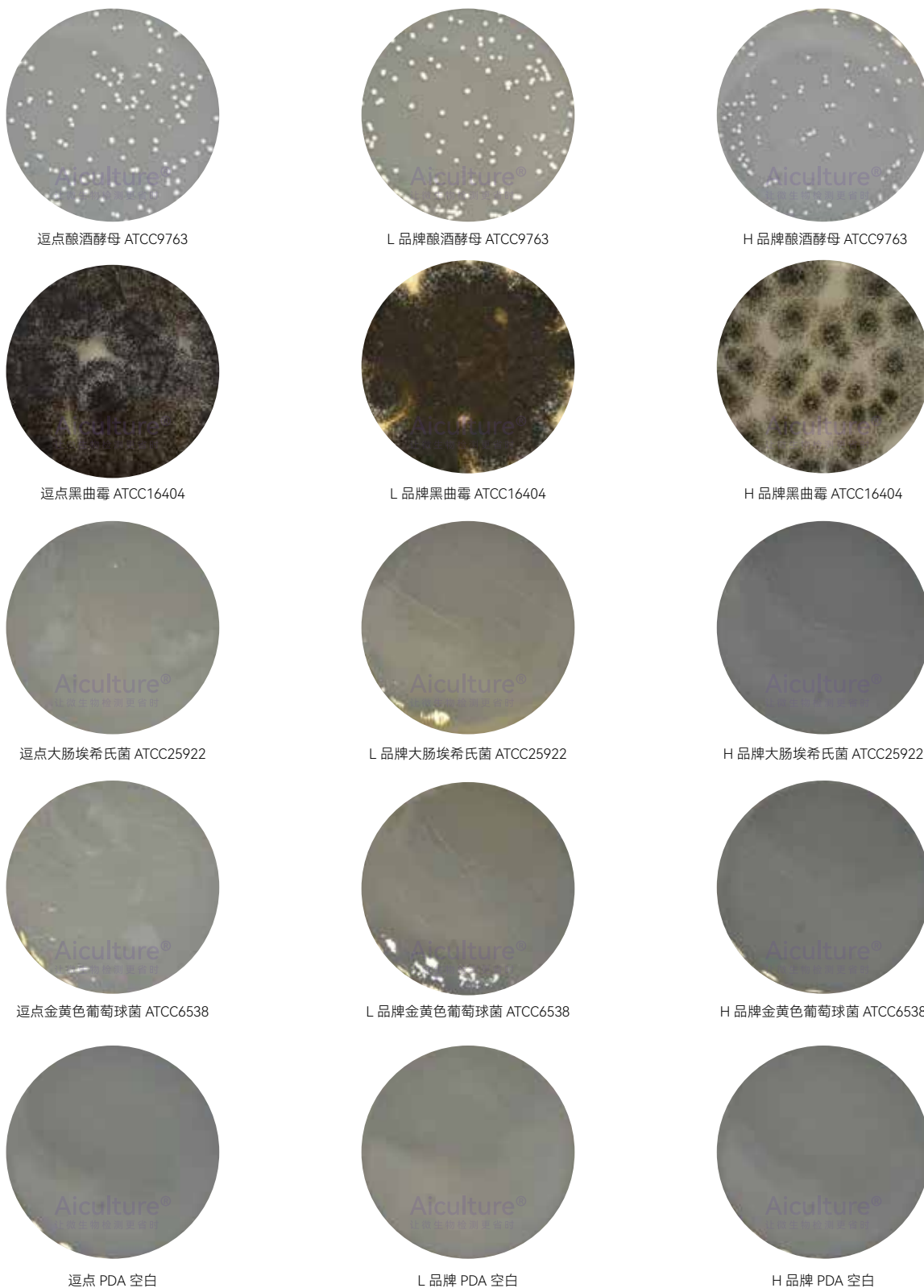


图 3-2

4. 验证结果小结

4.1 生长率：目标菌酿酒酵母 ATCC9763 逗点、L 品牌均满足国标  $PR \geq 0.7$  的要求，H 品牌  $PR=0.6$  不满足国标  $PR \geq 0.7$  的要求；黑曲霉 ATCC16404，逗点、L 品牌、满足国标  $PR \geq 0.7$  的要求，H 品牌不满足国标  $PR \geq 0.7$  的要求，逗点、H 品牌、L 品牌都有产白色菌丝，黑色孢子，无明显差异。

4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC6538 逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $G \leq 1$  的要求。

4.3 感官：逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。

附录 B

# 孟加拉红（虎红）琼脂验证



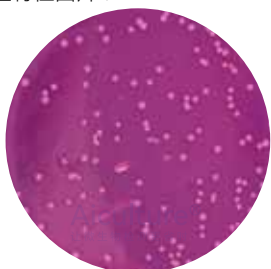
1. 产品用途：供霉菌和酵母的计数、分离和培养用。
2. 检验原理：蛋白胨提供碳源和氮源；葡萄糖提供能源；磷酸二氢钾为缓冲剂；硫酸镁提供必须的微量元素；琼脂是培养基的凝固剂；氯霉素可抑制细菌的生长；孟加拉红作为选择性抑菌剂可抑制细菌的生长，并可减缓某些霉菌因生长过快而导致菌落漫延生长。

表 3-2：孟加拉红（虎红）琼脂验证数据

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
孟加拉红 (虎红) 琼脂	酿酒酵母 ATCC9763	逗点	142	162	PR=0.9	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	72		PR=0.4		不符合
		H 品牌	136		PR=0.8		符合
	黑曲霉 ATCC16404	逗点	84	55	PR=1.6	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	94		PR=1.7		符合
		H 品牌	86		PR=1.6		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/	/	G=0		符合
		H 品牌	/	/	G=0		符合
金黄色 葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合	
	L 品牌	/	/	G=0		符合	
	H 品牌	/	/	G=0		符合	

1. 酿酒酵母 ATCC9763 在孟加拉红（虎红）琼脂板上的菌落特征：菌落奶油色；
2. 黑曲霉 ATCC16404 在孟加拉红（虎红）琼脂板上的菌落特征：白色菌丝，黑色孢子；
3. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在孟加拉红（虎红）琼脂板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；
4. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在孟加拉红（虎红）琼脂板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1。

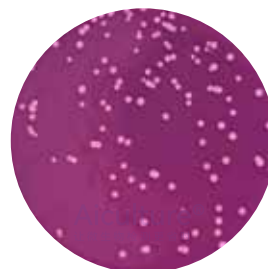
3、典型特征图片：



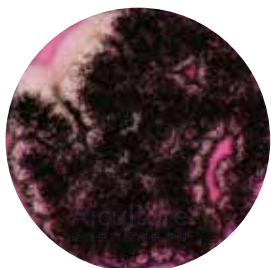
逗点酿酒酵母 ATCC9763



L 品牌酿酒酵母 ATCC9763



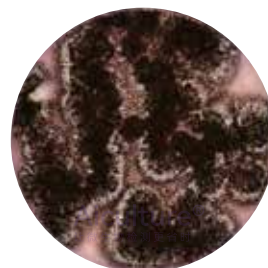
H 品牌酿酒酵母 ATCC9763



逗点黑曲霉 ATCC16404



L 品牌黑曲霉 ATCC16404



H 品牌黑曲霉 ATCC16404



逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



L 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点金黄色葡萄球菌 ATCC6538



L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



逗点孟加拉红 (虎红) 琼脂空白



L 品牌孟加拉红 (虎红) 琼脂空白



H 品牌孟加拉红 (虎红) 琼脂空白

图 3-3

#### 4、验证结果小结

4.1 生长率：目标菌酿酒酵母 ATCC9763 逗点、H 品牌均满足国标  $PR \geq 0.7$  的要求，L 品牌  $PR=0.4$  不满足国标  $PR \geq 0.7$  的要求，且生长速度缓慢，菌落较小。黑曲霉 ATCC16404，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $PR \geq 0.7$  的要求，逗点、H 品牌、L 品牌都有产白色菌丝，黑色孢子，其中逗点、H 品牌黑色孢子生长现象明显。

4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $G \leq 1$  的要求。

4.3 感观：逗点、L 品牌颜色为紫红色，颜色较深；H 品牌颜色为粉红色，颜色较浅。



# 04 食品微生物检验 GB4789.4-2016 沙门氏菌检验及注意事项

## 一、沙门氏菌生物学特性

生物学特性：沙门氏菌属是食源性细菌性肠胃炎的首要病原菌，属于肠杆菌科，革兰氏阴性无芽孢杆菌，营养需求不高，需氧或兼性厌氧。典型菌株多具有周生鞭毛、能运动（除鸡瘟沙门菌和鸡沙门菌外）、大部分菌株产 H<sub>2</sub>S、能分解葡萄糖并产气，最适培养温度为 37℃，最适 pH 7.2 ~ 7.6。耐受胆盐，在粪便、土壤、食品、水中可生存 5 个月至二年之久。血清型：沙门氏菌属由两个种组成：肠道沙门菌 (S. enterica) 和邦哥沙门氏菌 (S. bongori)。目前已知沙门氏菌血清型有 2500 多种。

流行病学特征：引起食物中毒最常见的沙门氏菌包括鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌。而易引起沙门氏菌中毒的食品则有肉、蛋、乳类等。

## 二、沙门氏菌的检验

### 操作注意事项

- 1：对易产生较大颗粒的样品（如肉类）进行检测时，建议使用带滤网均质袋，以便均质后用吸管吸取匀液；
- 2：预增菌时间与样品种类、目标菌和杂菌的含量及状态等因素有关。一般菌相比复杂的高污染样品，如果增菌时间过长会导致杂菌生长过多，目标菌可能就会被另一种优势菌所取代，这种情况下，增菌时间不宜过长。低污染样品的增菌时间可以适当延迟。由于本标准适用的样品种类众多，预增菌的时间范围设置的较宽（8h~18h），应根据实际情况和经验进行具体选择。建议 BPW 发生浑浊时停止预增菌。
3. 分离划线用直径 3mm 的接种环（1 环约 10 微升）。
4. 在 TSI 培养时。应将试管口松开，保存管内有充足的氧气，否则会产生过量 H<sub>2</sub>S，导致整管变黑。
5. 血清学鉴定中的多价菌体（O）和多价鞭毛抗原鉴定是沙门氏菌的必做项目，血清学分型为选作试验。实验室必须配备沙门氏菌的多价菌体（O）和多价鞭毛（H）诊断血清。

## 三、培养基原理解析

### 3.1 缓冲蛋白胨水 (BPW)

- 其成分中含有磷酸二氢钾和磷酸氢二钠，起缓冲液的作用；
- 蛋白胨提供生长营养，有利于损伤沙门氏菌的复苏。

### 3.2 四硫磺酸钠煌绿增菌液 (TTB)

- 配方中硫代硫酸钠和碘经氧化生成四硫磺酸钠，它对大肠菌群有抑制作用，对沙门氏菌无影响（因沙门氏菌具有四硫磺酸钠酶，能分解四硫磺酸钠，而大肠菌群没有这种酶，故生长受抑制）；
- 碳酸钙为缓冲剂，可使沙门氏菌不致因酸碱度改变而死亡。
- 由于配方含碳酸钙，因此，该培养基配置后的最终 pH 不在 7.0±0.2，而是偏碱性。

### 3.3 亚硒酸盐胱氨酸增菌液 (SC)

- 蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求；乳糖是可发酵的糖类；亚硒酸钠抑制革兰氏阳性菌和非沙门氏菌的大多数革兰氏阴性肠道菌；磷酸盐是缓冲剂；L-胱氨酸为还原剂。
- 使用过程中要注意 SC 培养基不稳定，配置时避免过度加热。

### 3.4 亚硫酸铋琼脂培养基 (BS)

- 配方中亚硫酸钠可与柠檬酸铋铵生成亚硫酸铋，抑制革兰氏阳性菌和大肠菌群；硫酸亚铁可产生硫化氢，并与铁反应生成黑色沉淀。
- 沙门氏菌在 BS 上的典型菌落特征：具有金属光泽的棕色或黑色菌落。但有些菌株形成非典型菌落特征：灰绿色的菌落，周围培养基不变。
- BS 平板应制备后避光常温保存，并在 24h 内使用。

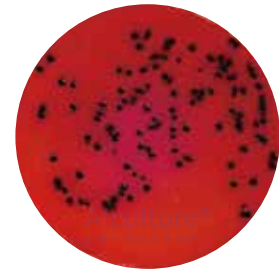
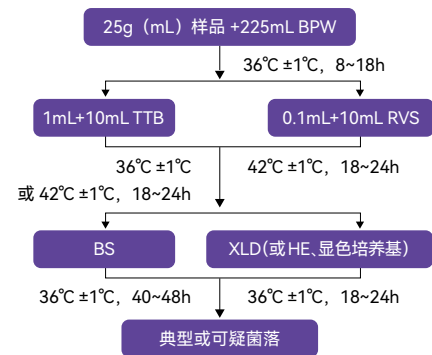


图 4-1



流程图 4-1 沙门氏菌检验程序

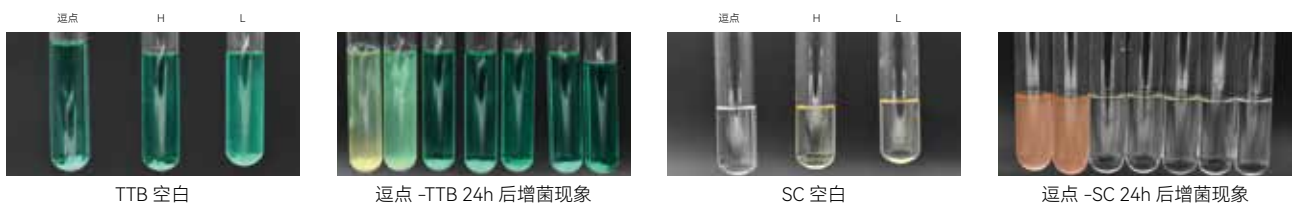


图 4-2

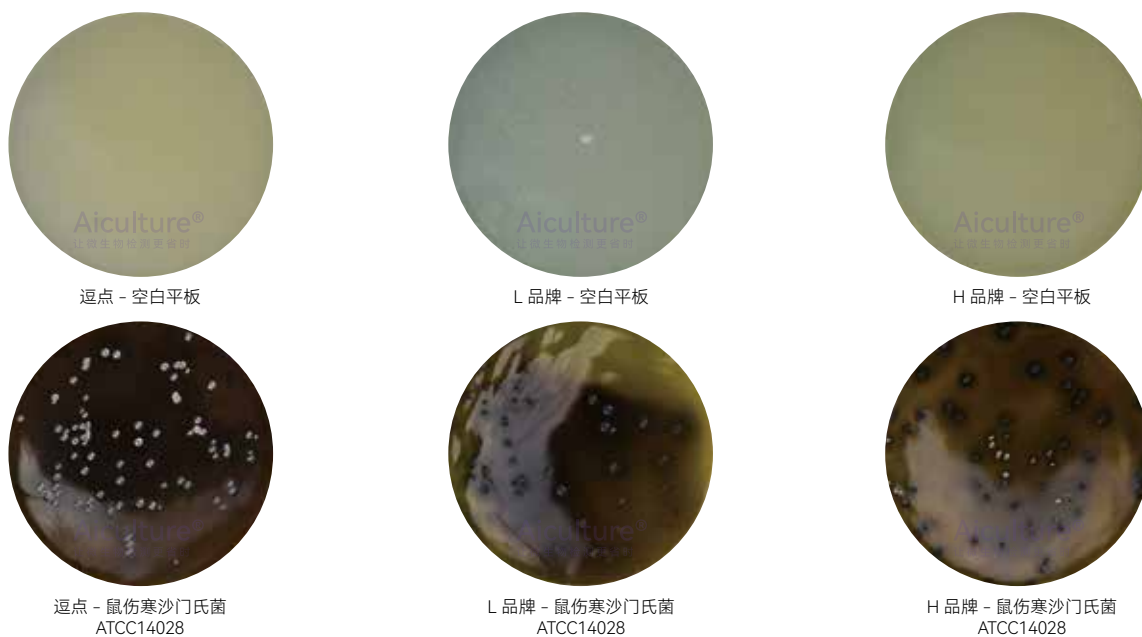


图 4-3

### 3.5 HE 琼脂培养基

· 配方中胆盐、去氧胆酸钠、溴麝香草酚兰等成分可抑制革兰氏阳性菌生长；酸性复红作为酸碱指示剂的同时，也可抑制阳性菌，但对阴性肠道菌无抑制作用，选择性较弱。硫代硫酸钠可被细菌还原产生硫化氢，与柠檬酸铁铵反应生成黑色硫化亚铁。

· 菌落特征：蓝绿色或蓝色，多数菌落中心黑色或几乎全黑色；有些菌株为黄色，中心黑色或几乎全黑色。

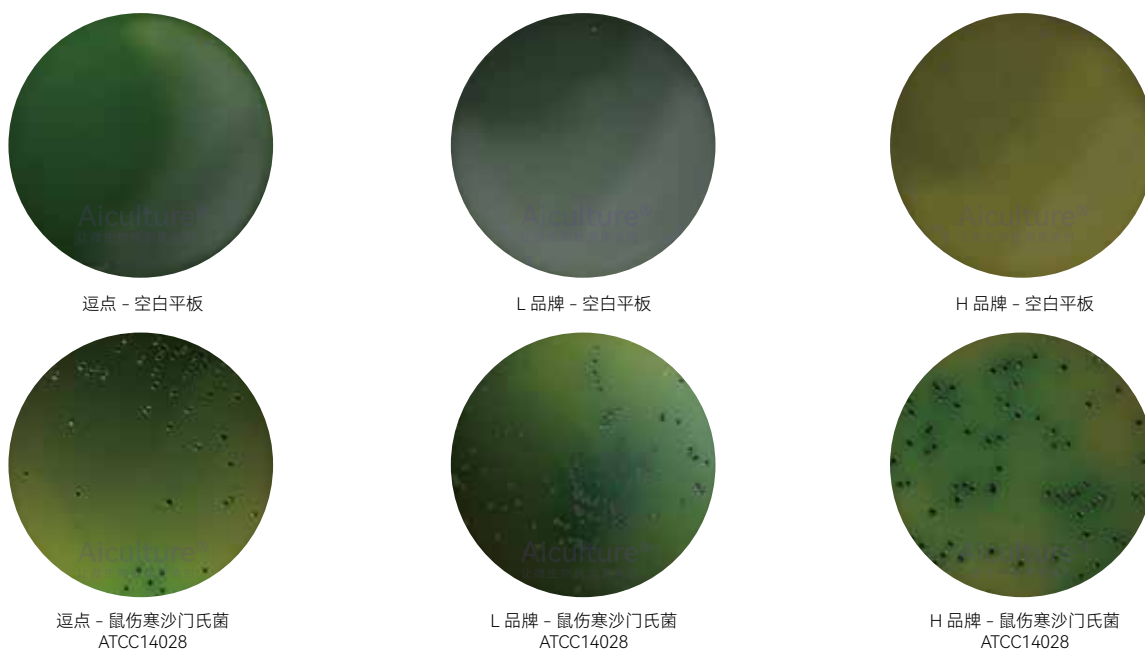


图 4-4

### 3.6 XLD 琼脂培养基

· 配方中木糖、乳糖和蔗糖成分作为可发酵的碳源，除志贺氏菌外，其他大多数肠杆菌均能发酵木糖；沙门氏菌发酵木糖产酸，形成酸性环境有利于产生脱羧酶使赖氨酸脱羧，从而使培养基的 pH 值升高向碱性转变；在碱性条件下，硫代硫酸钠及柠檬酸铁铵成分与沙门氏菌产生的硫化氢反应菌落的颜色呈黑色；去氧胆酸盐成分可抑制革兰氏阳性菌的生长。

· 菌落特征：菌落呈粉红色，带或不带黑色中心，有些菌株可呈现大的带光泽的黑色中心，或呈现全部黑色的菌落；有些菌株为黄色菌落，带或不带黑色中心。

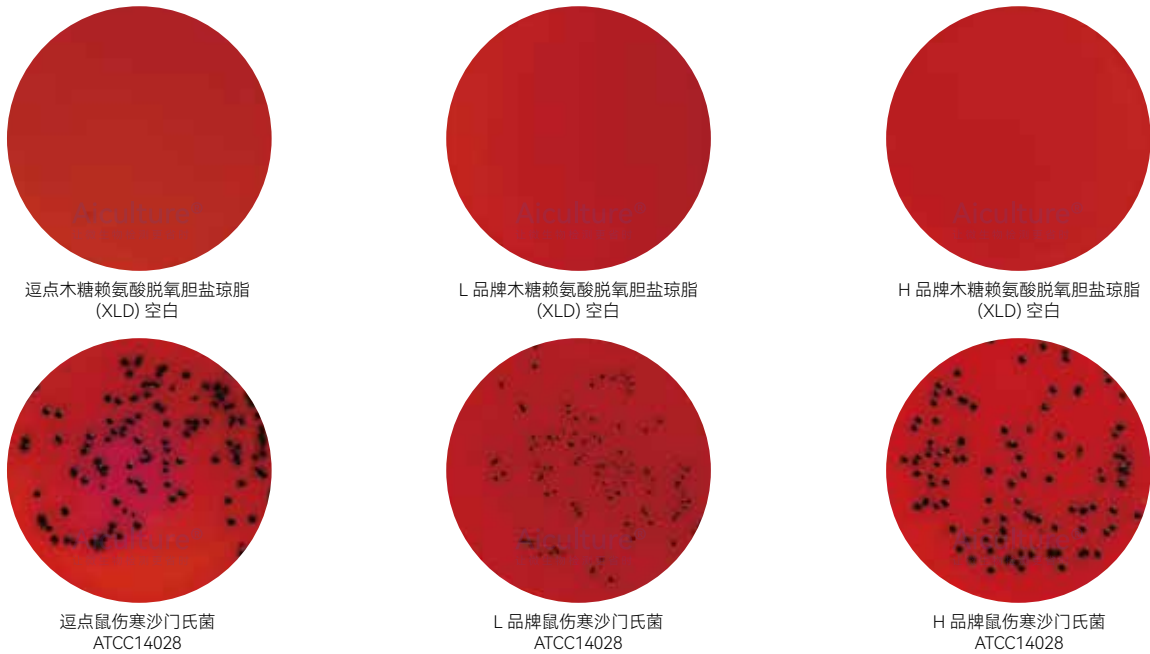


图 4-5

### 3.7 沙门氏菌显色培养基

· 蛋白胨和酵母膏粉提供碳氮源和微量元素；氯化钠可维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂；胆盐抑制革兰氏阳性菌；选择性添加剂增强培养基的抑制杂菌的能力；混合色素分别与沙门氏菌和大肠菌群所对应的酶发生特异性反应，水解底物，释放出显色基团，在淡黄色平板上沙门氏菌产生品红色的菌落，大肠菌群产生蓝绿色的菌落。

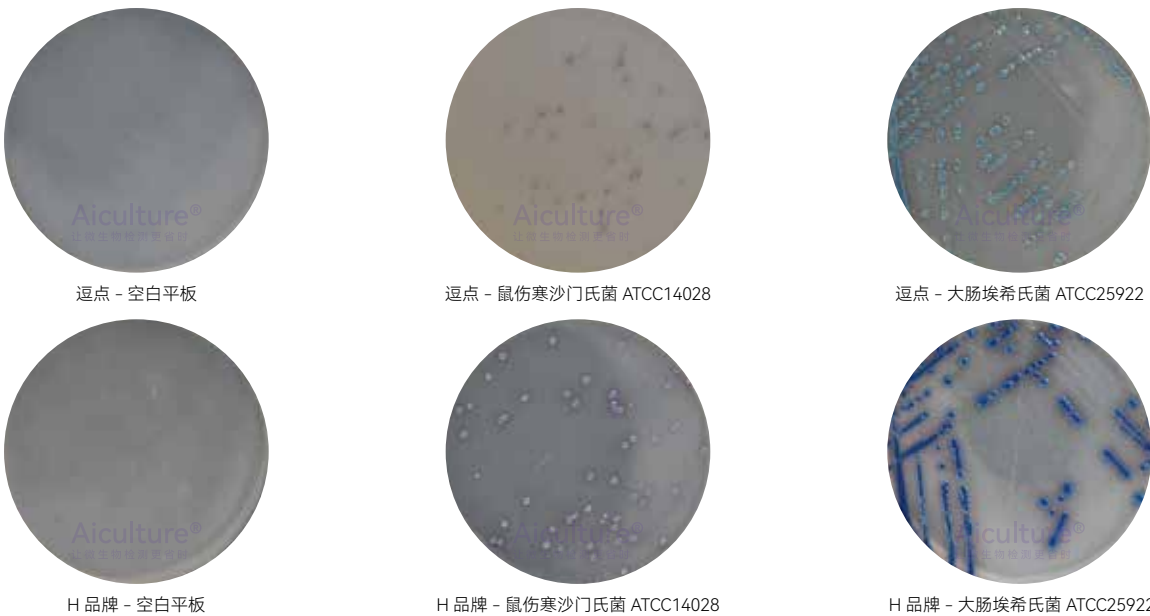


图 4-6

### 3.8 三糖铁琼脂培养基

· 蛋白胨、牛肉膏粉提供氮源、维生素、矿物质；乳糖、葡萄糖、蔗糖为可发酵糖类，其产酸时通过酚红指示剂测出，酸性呈黄色，碱性呈红色；硫代硫酸钠可被某些细菌还原为硫化氢，与硫酸亚铁铵中的铁盐生成黑色硫化铁；氯化钠维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂。

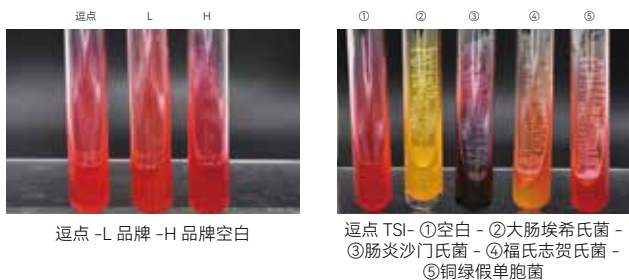


图 4-7

## 附录 A

# 缓冲蛋白胨水 (BPW) 产品验证



- 1、产品用途：用于食品中沙门氏菌和阪崎肠杆菌的前增菌培养。
- 2、检验原理：蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；磷酸二氢钾和磷酸氢二钠是缓冲剂。

表 4-1：缓冲蛋白胨水 (BPW) 验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	菌液浓度计数 (TSA)	评定标准	结果判定
缓冲蛋白胨水	鼠伤寒沙门氏菌 (BPW)	ATCC14028	逗点 L 品牌 H 品牌	820 2291 1905	取 10 $\mu$ L 增菌液倾注 TSA 平板 36 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 培养 18h ~ 24h, 在 TSA 上 > 100CFU	符合 符合 符合

### 3、典型特征图片：

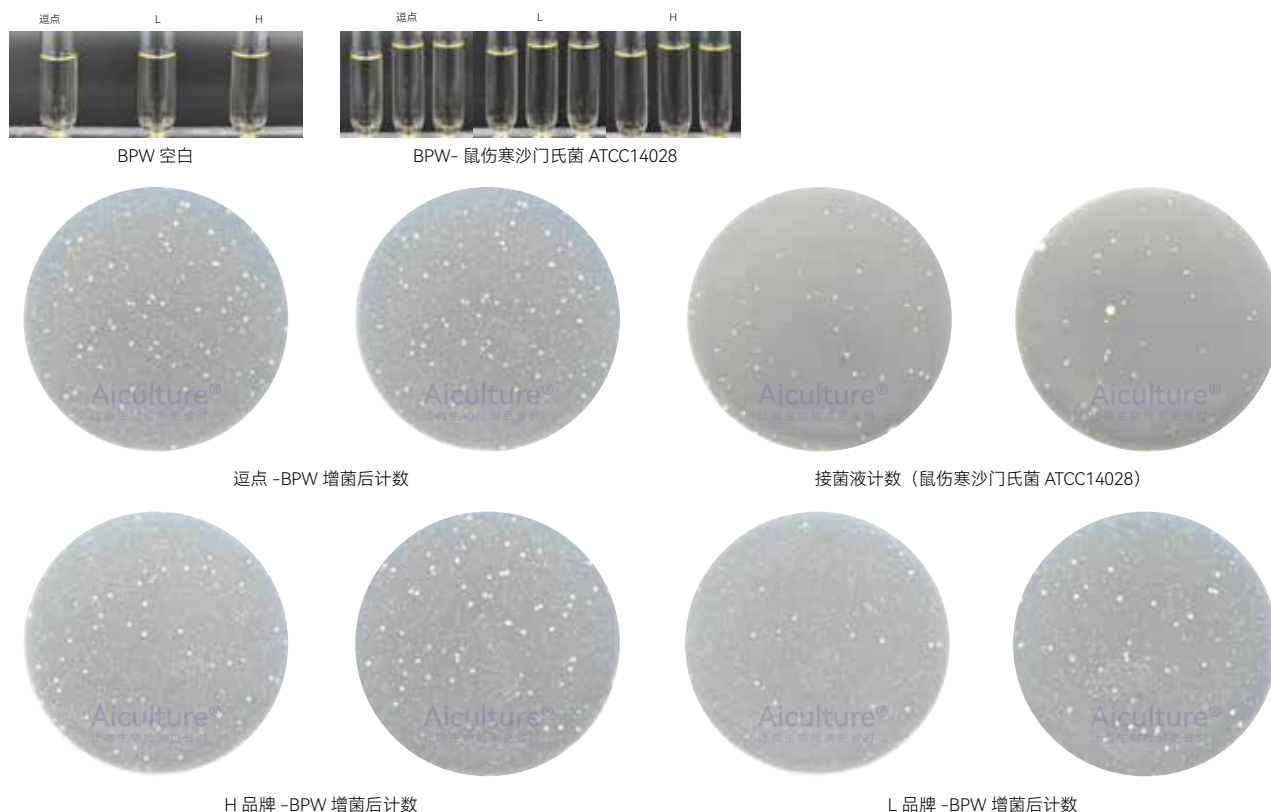


图 4-8

### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028：逗点鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 增菌后菌落数优于 L 品牌、H 品牌；
- 4.2 观感：三家空白试管 L 品牌颜色较淡，逗点和 H 品牌颜色无显著差异。

## 附录 B

# 四硫磺酸钠煌绿 (TTB) 增菌验证



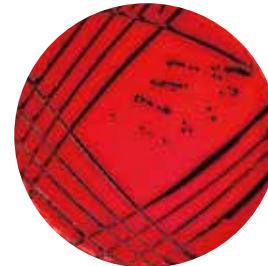
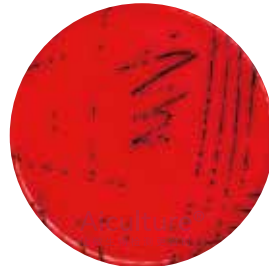
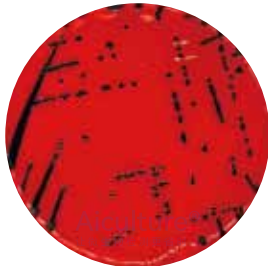
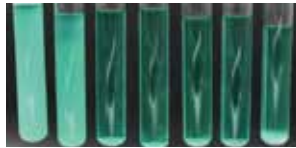
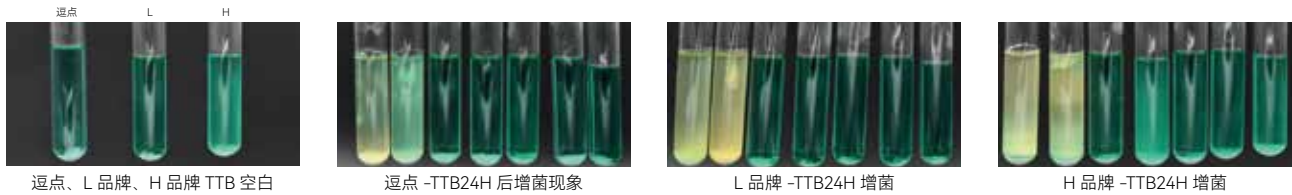
- 1、产品用途：用于沙门氏菌选择性增菌培养。
- 2、检验原理：蛋白胨和牛肉膏粉提供碳源、氮源和维生素满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；碳酸钙能中和细菌产酸及吸收有毒的代谢产物；硫代硫酸钠和四硫磺酸钠结合可抑制肠道共生菌（四硫磺酸钠是在培养基加入碘和碘化钾时形成），而具有四硫磺酸钠还原酶的细菌能在此培养基中繁殖；胆盐和煌绿可抑制大肠杆菌和其它革兰氏阳性细菌。

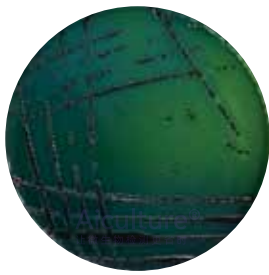
表 4-2：四硫磺酸钠煌绿 (TTB) 增菌验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
四硫磺酸钠煌绿 (TTB) 增菌	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	/	88	在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明, 有黑心	在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明, 有黑心	符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	L 品牌	/		在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明, 有黑心		符合
	铜绿假单胞菌 ATCC27853	H 品牌	/		在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明, 有黑心		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	0	多不可计	< 100	在 TSA 上 < 100CFU	符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	L 品牌	0		< 100		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	H 品牌	0		< 100		符合
	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	0	多不可计	< 100	在 TSA 上 < 100CFU	符合
	粪肠球菌 ATCC29212	L 品牌	0		< 100		符合
	粪肠球菌 ATCC29212	H 品牌	0		< 100		符合

- 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922 + 铜绿假单胞菌 ATCC27853 在四硫磺酸钠煌绿 (TTB) 增菌上的菌落特征: 菌落无色半透明, 有黑心;
- 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在四硫磺酸钠煌绿 (TTB) 增菌上的菌落特征: 在 TSA 上 < 100CFU;
- 粪肠球菌 ATCC29212 在四硫磺酸钠煌绿 (TTB) 增菌上的菌落特征: 在 TSA 上 < 100CFU。

### 3、典型特征图片：

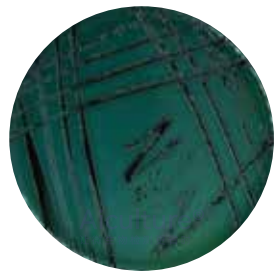




逗点 TTB 混菌划线 HE



L 品牌 TTB 混菌划线 HE



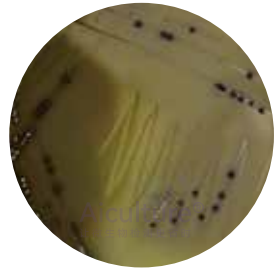
H 品牌 TTB 混菌划线 HE



逗点 TTB 混菌划线 BS



L 品牌 TTB 混菌划线 BS



H 品牌 TTB 混菌划线 BS



逗点 TTB 混菌划线沙门显色培养基



H 品牌 TTB 混菌划线沙门显色培养基

图 4-9

#### 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922+ 铜绿假单胞菌 ATCC27853，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标在 XLD 上 > 10CFU，菌落无色半透明，有黑心的要求；

4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922：逗点、L 品牌、H 品牌均无菌落生长，满足国标在 TSA 上 < 100CFU 的要求；

粪肠球菌 ATCC29212：逗点、L 品牌、H 品牌均无菌落生长，满足国标在 TSA 上 < 100CFU 的要求；

4.3 观感：逗点、H 品牌空白管无明显差异，L 品牌颜色偏深一些。

## 附录 C

# 亚硒酸盐胱氨酸增菌液 (SC) 验证

1、产品用途：用于沙门氏菌选择性增菌培养。

2、检验原理：蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求；乳糖是可发酵的糖类；亚硒酸钠抑制革兰氏阳性菌和非沙门氏菌的大多数革兰氏阴性肠道菌；磷酸盐是缓冲剂；L- 胱氨酸为还原剂。

表 4-3：亚硒酸盐胱氨酸增菌液 (SC) 验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
亚硒酸盐胱氨酸增菌液 (SC)	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	58	76	在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明，有黑心	在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明，有黑心	符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	L 品牌	81		在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明，有黑心		符合
	铜绿假单胞菌 ATCC27853	H 品牌	56		在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明，有黑心		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	8	多不可计	< 100	在 TSA 上	符合
		L 品牌	9575		> 100	< 100CFU	不符合
	H 品牌	5394	> 100			不符合	

1. 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922 + 铜绿假单胞菌 ATCC27853 在亚硒酸盐胱氨酸增菌液 (SC) 上的菌落特征：菌落无色半透明，有黑心；

2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在亚硒酸盐胱氨酸增菌液 (SC) 上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；

3. 粪肠球菌 ATCC29212 在亚硒酸盐胱氨酸增菌液 (SC) 上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU。

3、典型特征图片：



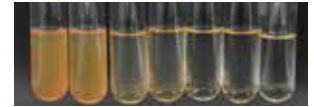
空白



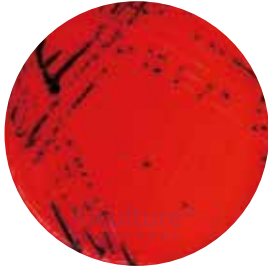
逗点 -SC 增菌后现象



L 品牌 -SC 增菌后现象



H 品牌 -SC 增菌后现象



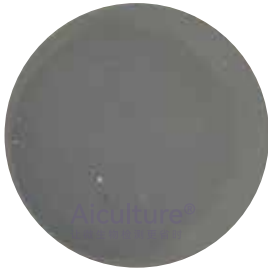
逗点 SC 混菌划线 XLD



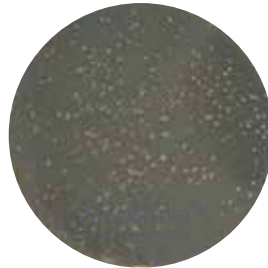
L 品牌 SC 混菌划线 XLD



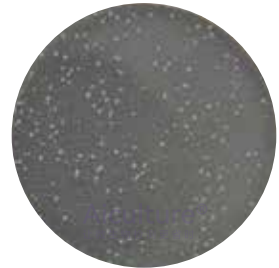
H 品牌 SC 混菌划线 XLD



逗点 - 大肠埃希氏菌  
ATCC25922



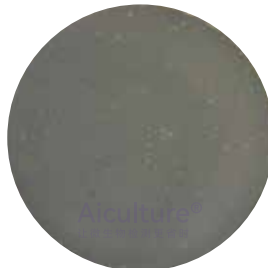
逗点 - 大肠埃希氏菌  
ATCC25922



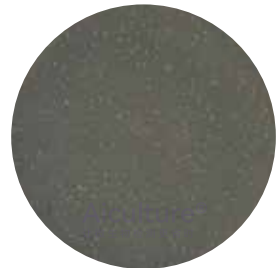
H 品牌 - 大肠埃希氏菌  
ATCC25922



逗点 - 粪肠球菌 ATCC29212



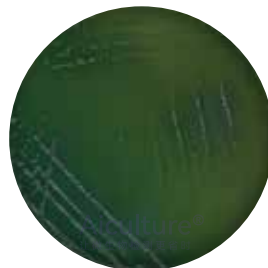
L 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



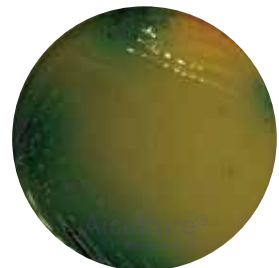
H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



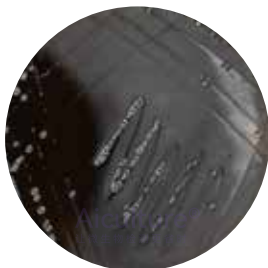
逗点 SC 混菌划线 HE



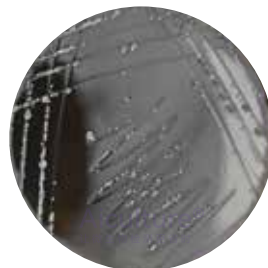
L 品牌 SC 混菌划线 HE



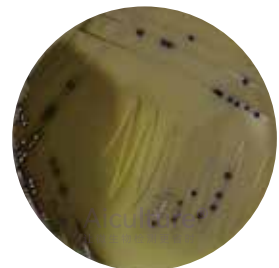
H 品牌 SC 混菌划线 HE



逗点 SC 混菌划线 BS



L 品牌 SC 混菌划线 BS



H 品牌 SC 混菌划线 BS



逗点 TTB 混菌划线沙门显色培养基



H 品牌 TTB 混菌划线沙门显色培养基

图 4-10

#### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标在 XLD 上 > 10CFU，菌落无色半透明，有黑心的要求；
- 4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点符合国标在 TSA 上 < 100CFU 要求，L 品牌、H 品牌均不符合国标在 TSA 上 < 100CFU 要求；逗点大肠埃希氏菌选择性比 L 品牌、H 品牌好；
- 4.3 观感：逗点空白液体呈透明色，L 品牌、H 品牌空白液体呈淡黄色；
- 4.4 该产品仅煮沸溶解，在验证过程中易污染，造成结果异常，经多次验证和确认，逗点的产品在抑制性上做的最好。

### 附录 D

## 亚硫酸铋琼脂基础 (BS) 验证



- 1、产品用途：用于沙门氏菌特别是伤寒沙门氏菌的选择性分离培养。
- 2、蛋白胨、牛肉膏粉提供碳源、氮源、维生素和矿物质；葡萄糖提供能源；亚硫酸铋指示剂抑制革兰氏阳性菌和大肠菌群，但不影响沙门氏菌的生长；磷酸氢二钠是缓冲剂；硫酸亚铁用于产生硫化氢，并与铁产生沉淀，使阳性培养物为具有金属光泽的棕色到黑色菌落；琼脂是培养基的凝固剂。

表 4-4：亚硫酸铋琼脂基础 (BS) 验证

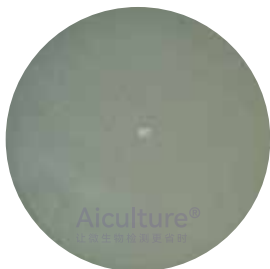
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
亚硫酸铋琼脂基础 (BS)	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	90	81	1.1	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	110		1.3		符合
		H 品牌	84		1.0		符合
	伤寒沙门氏菌 CMCC50071	逗点	98	124	0.7	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	121		0.9		符合
		H 品牌	109		0.8		符合
大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G < 1	G ≤ 1	符合	
	L 品牌	/	/	G=1		符合	
	H 品牌	/	/	G=4		不符合	
粪肠球菌 ATCC29212	逗点	/	/	G < 1	G ≤ 1	符合	
	L 品牌	/	/	G < 1		符合	
	H 品牌	/	/	G < 1		符合	

- 1. 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 在 BS 板上的菌落特征：黑色或灰绿色菌落，有金属光泽；
- 2. 伤寒沙门氏菌 CMCC50071 在 BS 板上的菌落特征：黑色菌落，有金属光泽；
- 3. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 BS 板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；
- 4. 粪肠球菌 ATCC29212 在 BS 板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1。

#### 3、典型特征图片：



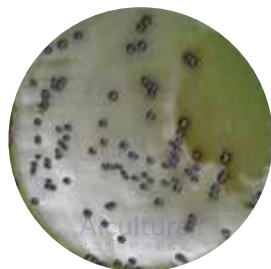
逗点 - 空白平板



L 品牌 - 空白平板



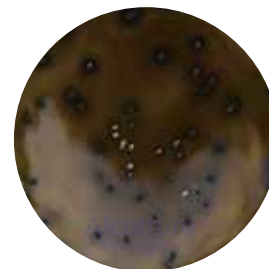
H 品牌 - 空白平板



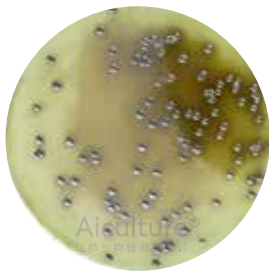
逗点 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



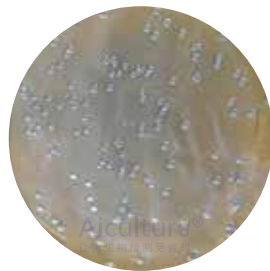
L 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



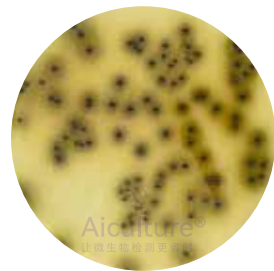
H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



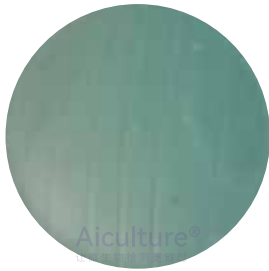
逗点 - 伤寒沙门氏菌 CMCC50071



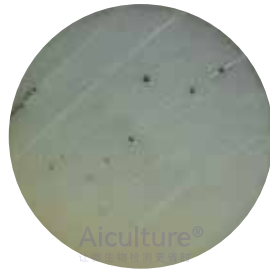
L 品牌 - 伤寒沙门氏菌 CMCC50071



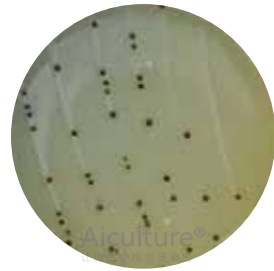
H 品牌 - 伤寒沙门氏菌 CMCC50071



逗点 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



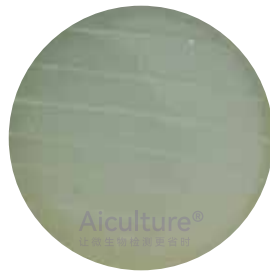
L 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



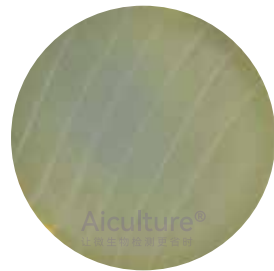
H 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点 - 粪肠球菌 ATCC29212



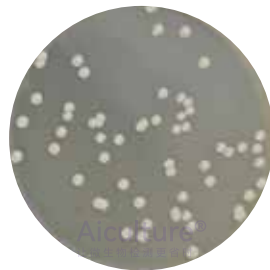
L 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



参比 - 鼠伤寒沙门氏菌



参比 - 伤寒沙门氏菌

图 4-11

#### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028：逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $PR \geq 0.5$  的要求，黑色或灰绿色菌落，有金属光泽；伤寒沙门氏菌 CMCC50071，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $PR \geq 0.5$  的要求，黑色菌落，有金属光泽；
- 4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922：逗点满足国标  $G \leq 1$  的要求，L 品牌、H 品牌平板均有菌落生长，L 品牌  $G=1$ ，选择性满足国标  $G \leq 1$  的要求，H 品牌  $G=4$ ，选择性不满足国标  $G \leq 1$  的要求，三家相比较 H 品牌大肠埃希氏菌选择性最差；粪肠球菌 ATCC29212：逗点、L 品牌、H 品牌未生长，都满足国标  $G \leq 1$  的要求；
- 4.3 感观：逗点、L 品牌、H 品牌空白平板颜色淡黄色，L 品牌空白颜色较浅色。

## 附录 E

### HE 琼脂验证

- 1、产品用途：用于肠道致病菌特别是沙门氏菌和志贺氏菌的选择性分离培养。
- 2、检验原理：蛋白胨、牛肉膏粉提供碳源、氮源、维生素和矿物质；乳糖、蔗糖和水杨素为可发酵的糖类；胆盐、去氧胆酸钠、溴麝香草酚兰和酸性复红抑制革兰氏阳性菌；氯化钠维持均衡的渗透压；硫代硫酸钠和柠檬酸铁铵用于检测硫化氢的产生，使菌落中心呈黑色；琼脂是培养基的凝固剂；溴麝香草酚兰和酸性复红为 pH 指示剂，发酵糖产酸的菌落呈橙 - 黄色，不发酵糖的菌落为蓝绿色。



表 4-5 : HE 琼脂验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
HE 琼脂	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	58	76	0.7	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	81		1.0		符合
		H 品牌	56		0.7		符合
	福氏志 贺氏菌 ATCC12022	逗点	117	142	0.8	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	135		0.9		符合
		H 品牌	142		1.0		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G=0	G ≤ 5	符合
		L 品牌	/	/	G=3		符合
		H 品牌	/	/	G=1		符合
	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	/	/	0.5	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/	/	G=0		符合
		H 品牌	/	/	G=0		符合

1. 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 在 HE 琼脂板上的菌落特征: 绿 - 蓝色菌落, 有黑心;
2. 福氏志贺氏菌 ATCC12022 在 HE 琼脂板上的菌落特征: 绿 - 蓝色菌落
3. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 HE 琼脂板上的菌落特征: 选择性 G < 5, 橙红色菌落, 可有胆酸沉淀;
4. 粪肠球菌 ATCC29212 在 HE 琼脂板上的菌落特征: 选择性 G ≤ 1.

3、典型特征图片：



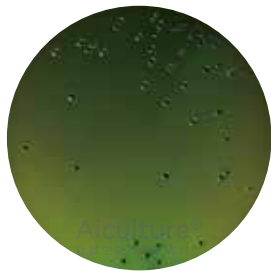
逗点 - 空白平板



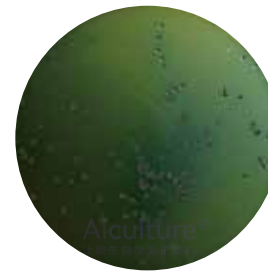
L 品牌 - 空白平板



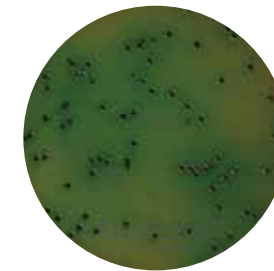
H 品牌 - 空白平板



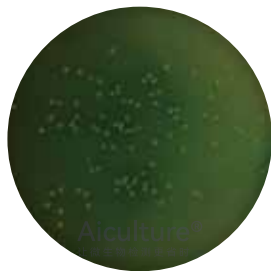
逗点 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



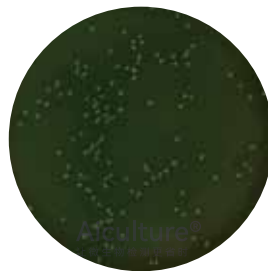
L 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



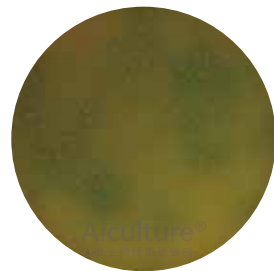
H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



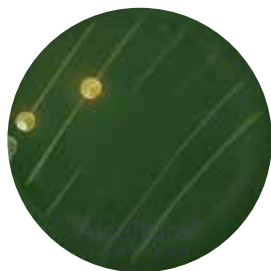
逗点 - 福氏志贺氏菌 ATCC12022



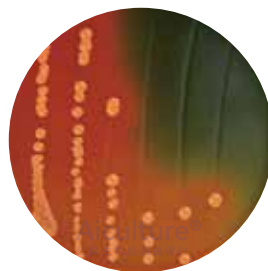
L 品牌 - 福氏志贺氏菌 ATCC12022



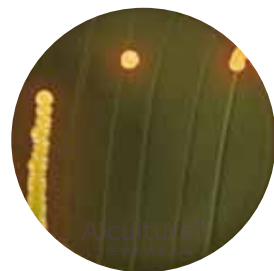
H 品牌 - 福氏志贺氏菌 ATCC12022



逗点 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



L 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



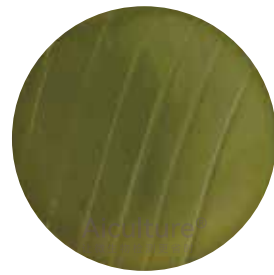
H 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点 - 粪肠球菌 ATCC29212



L 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212

图 4-12

#### 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、福氏志贺氏菌 ATCC12022，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $PR \geq 0.5$  的要求，鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、福氏志贺氏菌 ATCC12022L 品牌生长率均比逗点高。

4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌平板均有菌落生长，逗点相比其他两家选择性较强，都满足国标  $G < 5$  的要求，粪肠球菌 ATCC29212，逗点平板上有微弱生长，L 品牌、H 品牌未生长，都满足国标  $G \leq 1$  的要求；

4.3 观感：L 品牌平板颜色较深，H 品牌平板颜色偏淡绿，逗点颜色在两家之间；

## 附录 F

# 木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 验证



1. 产品用途：用于沙门氏菌、志贺氏菌的分离培养。

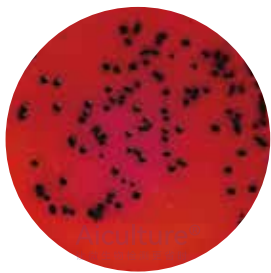
2. 检验原理：酵母膏粉提供氮源、维生素、生长因子；氯化钠维持均衡的渗透压；木糖、乳糖、蔗糖为可发酵糖类，产酸使酚红指示剂变黄；去氧胆酸钠抑制革兰氏阳性菌，但不影响沙门氏菌的生长；硫代硫酸钠可被某些细菌还原硫化氢，与柠檬酸铁铵中的铁盐生成黑色硫化铁；琼脂是培养基的凝固剂；酚红为 pH 指示剂。

表 4-6：木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 验证

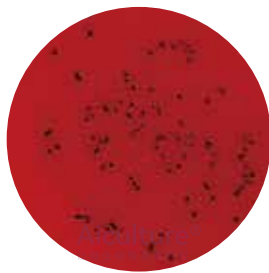
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD)	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	125	102	PR=1.2	$PR \geq 0.5$	符合
		L 品牌	84		PR=0.8		符合
		H 品牌	139		PR=1.4		符合
	福氏志贺氏菌 ATCC12022	逗点	209	203	PR=1.1	$PR \geq 0.5$	符合
		L 品牌	172		PR=0.8		符合
		H 品牌	193		PR=0.9		符合
大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G=3.5	$G \leq 5$	符合	
	L 品牌	/	/	G=1		符合	
	H 品牌	/	/	G=5.5		不符合	
金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/	G=0	$G \leq 1$	符合	
	L 品牌	/	/	G=0		符合	
	H 品牌	/	/	G=0		符合	

- 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 在 XLD 板上的菌落特征：黑色菌落；
- 福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572 在 XLD 板上的菌落特征：无色菌落，无黑心；
- 大肠埃希氏菌 ATCC 25922 在 XLD 板上的菌落特征：黄色菌落，选择性  $G < 5$
- 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在 XLD 上的菌落特征：选择性  $G \leq 1$ 。

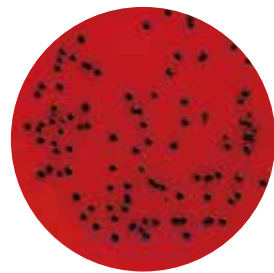
#### 3、典型特征图片：



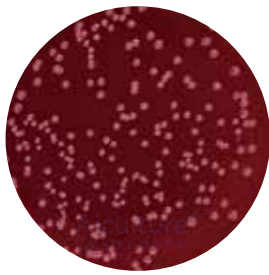
逗点鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



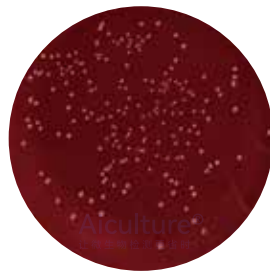
L 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



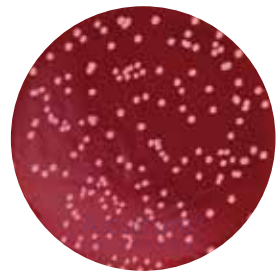
H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



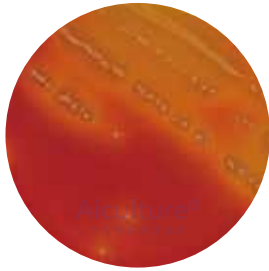
逗点福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



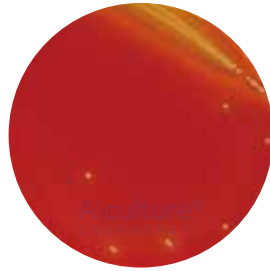
L 品牌 - 福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



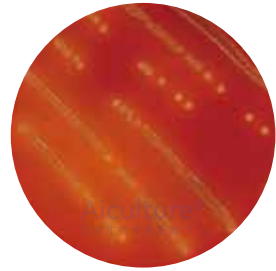
H 品牌 - 福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



逗点大肠埃希氏菌 ATCC 25922



L 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC 25922



H 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC 25922



逗点金黄色葡萄球菌 ATCC6538



L 品牌 - 黄色葡萄球菌 ATCC6538



H 品牌 - 黄色葡萄球菌 ATCC6538



逗点木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 空白



L 品牌 - 木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 空白



H 品牌 - 木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 空白

图 4-13

#### 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $PR \geq 0.7$  的要求。H 品牌菌落生长速度更快，菌落特征更明显，L 品牌生长速度较缓慢；

4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC 25922，逗点、L 品牌均满足国标  $G < 5$  的要求，H 品牌  $G=5.5$ ，不满足国标要求；金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $G \leq 1$  的要求；

4.3 感观：三家平板颜色无显著差异。

4.4 生长性能，逗点和 L 品牌优于 H 品牌。特异性上（特别是对大肠的抑制）L 品牌更好。

## 附录 G

# 沙门氏菌显色培养基验证



- 1、产品用途：用于沙门氏菌的分离和初步鉴定。
- 2、检验原理：蛋白胨和酵母膏粉提供氮源和微量元素，氯化钠可维持均衡的渗透压，抑菌剂抑制革兰氏阳性菌，琼脂是培养基凝固剂；混合色素分别与沙门氏菌和大肠菌群所对应的酶发生特异性反应，水解底物，释放出显色基团，在淡黄色平板上沙门氏菌产生品红色的菌落，大肠菌群产生蓝绿色的菌落。

表 4-7：沙门氏菌显色培养基验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
沙门氏菌显色培养基	鼠伤寒沙门氏菌	逗点	45	76	0.5	PR ≥ 0.5	符合
	ATCC14028	H 品牌	64		0.8	PR ≥ 0.5	符合
	大肠埃希氏菌	逗点	/	/	蓝色菌落	蓝色菌落	符合
	ATCC25922	H 品牌	/	/	蓝色菌落	蓝绿色菌落	符合
	奇异变形杆菌	逗点	/	/	无色, 淡紫色	无色, 淡褐色菌落	符合
	CMCC(B)49005	H 品牌	/	/	无色菌落	无色菌落	符合
	粪肠球菌	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
	ATCC29212	H 品牌	/	/	G=0		符合

1. 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 在沙门氏菌显色培养基上的菌落特征：品（紫）红色菌落；
2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在沙门氏菌显色培养基上的菌落特征：按说明书判定；
3. 奇异变形杆菌 CMCC(B)49005 在沙门氏菌显色培养基上的菌落特征：按说明书判定；
4. 粪肠球菌 ATCC29212 在沙门氏菌显色培养基上的菌落特征：选择性 G ≤ 1。

### 3、典型特征图片：

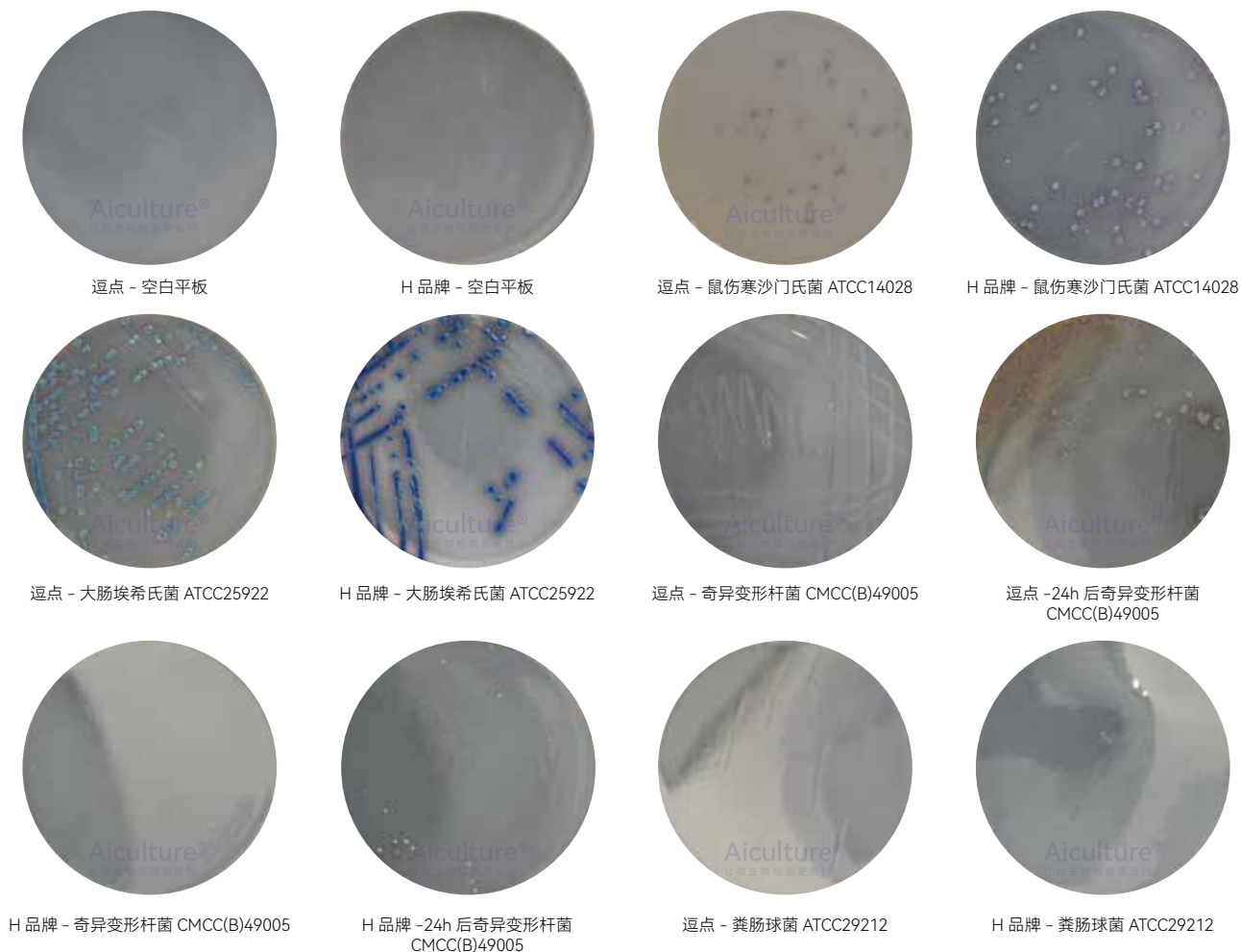


图 4-14

### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028，逗点满足国标 PR ≥ 0.5 的要求，H 品牌满足说明书 ≥ 0.7 的要求；
- 4.2 特异性：大肠埃希氏菌 ATCC25922 逗点颜色浅蓝色，H 品牌颜色深蓝色；  
奇异变形杆菌 CMCC(B)49005：逗点菌落无色，符合说明书要求，H 品牌菌落无色，符合说明书要求，生长较慢，逗点比 H 品牌生长较明显；
- 4.3 选择性：粪肠球菌 ATCC29212：逗点、H 品牌都满足国标 G ≤ 1 的要求；
- 4.4 感观：逗点、H 品牌空白平板颜色无显著差异。

附录 H

# 三糖铁琼脂 (TSI) 验证



- 1、产品用途：用于鉴别肠道菌发酵蔗糖、乳糖、葡萄糖及产生硫化氢的生化反应。
- 2、检验原理：胨、牛肉浸出粉提供氮源、维生素、矿物质；乳糖、葡萄糖、蔗糖为可发酵糖类，其产酸时通过酚磺酞指示剂测出，酸性呈黄色，碱性呈红色；硫代硫酸钠可被某些细菌还原为硫化氢，与硫酸亚铁中的铁盐生成黑色硫化铁；氯化钠维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂。

表 4-8 三糖铁琼脂 (TSI) 验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
三糖铁琼脂 (TSI)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢	符合
		L 品牌	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢		符合
		H 品牌	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢		符合
	肺炎沙门氏菌 CMCC(B)50335	逗点	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢	符合
		L 品牌	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢		符合
		H 品牌	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢		符合
	福氏志贺氏菌 ATCC12022	逗点	/	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢	符合
		L 品牌	/	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢		符合
		H 品牌	/	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢		符合
	铜绿假单胞菌 ATCC27853	逗点	/	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢	符合
		L 品牌	/	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢		符合
		H 品牌	/	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢		符合

1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在三糖铁琼脂 (TSI) 上生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢;
2. 肺炎沙门氏菌 CMCC(B)50335 生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢;
3. 福氏志贺氏菌 ATCC12022 生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢;
4. 铜绿假单胞菌 ATCC27853 生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢。

3、典型特征图片：

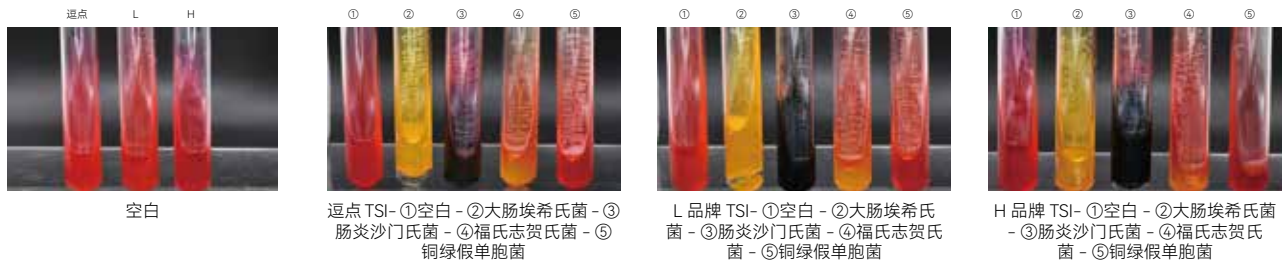


图 4-17

4、验证结果小结：

- 4.1 生化特性：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922、肺炎沙门氏菌 CMCC (B) 50335、福氏志贺氏菌 ATCC12022、铜绿假单胞 ATCC27853 生长特性均符合国标要求；
- 4.2 观感：逗点、L 品牌、H 品牌空白管无明显差异。
- 4.3 三家产品无明显差别。



# 05 食品微生物检验 GB4789.10-2016 金黄色葡萄球菌的检验及注意事项

## 一、金黄色葡萄球菌的意义

生物学特性：金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 是一种重要的病原菌，隶属于葡萄球菌属，有“嗜肉菌”别称，是革兰氏阳性菌的代表，可引起许多严重的感染。金黄色葡萄球菌形态为球形，在培养基中菌落特征表现为圆形，菌落表面光滑，颜色为无色或者金黄色，金黄色葡萄球菌在显微镜下排列成葡萄串状，金黄色葡萄球菌无芽孢、鞭毛，大多数无荚膜。该菌最适宜生长温度为 37℃，pH 值为 7.4，耐高盐，可在盐浓度接近 10% 的环境中生长。

## 二、GB4789.10-2016 金黄色葡萄球菌的检验

### 2.1 第一法 定性检验法

#### 2.1.1 操作步骤

##### 2.1.1.1 样品的处理

称取 25g 样品至盛有 225mL 7.5% 氯化钠肉汤无菌均质杯内，8000r/min~10000r/min 均质 1min~2min，或放入盛有 225mL 7.5% 氯化钠肉汤无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1min~2min。若样品为液态，吸取 25mL 样品至盛有 225mL 7.5% 氯化钠肉汤的无菌锥形瓶（瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠）中，振荡混匀。

##### · 增菌

将上述样品匀液于 36℃ ± 1℃ 培养 18h~24h。金黄色葡萄球菌在 7.5% 氯化钠肉汤中呈混浊生长。

##### · 分离

将增菌后的培养物，分别划线接种到 Baird-Parker 平板和血平板，血平板 36℃ ± 1℃ 培养 18h~24h。Baird-Parker 平板 36℃ ± 1℃ 培养 24h~48h。

##### 2.1.1.2 初步鉴定

金黄色葡萄球菌在 Baird-Parker 平板上呈圆形，表面光滑、凸起、湿润、菌落直径为 2mm~3mm，颜色呈灰黑色至黑色，有光泽，常有浅色（非白色）的边缘，周围以不透明圈（沉淀），其外常有一清晰带。当用接种针触及菌落时具有黄油样黏稠感。有时可见到不分解脂肪的菌株，除没有不透明圈和清晰带外，其他外观基本相同。从长期贮存的冷冻或脱水食品中分离的菌落，其黑色常较典型菌落浅些，且外观可能较粗糙，质地较干燥。

在血平板上，形成菌落较大，圆形、光滑凸起、湿润、金黄色（有时为白色），菌落周围可见完全透明溶血圈。挑取上述可疑菌落进行革兰氏染色镜检及血浆凝固酶试验。

##### 2.1.1.3 确证鉴定

2.1.1.3.1. 染色镜检：金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性球菌，排列呈葡萄球状，无芽孢，无荚膜，直径约为 0.5μm~1.5 μm。

2.1.1.3.2. 血浆凝固酶试验：挑取 Baird-Parker 平板或血平板上至少 5 个可疑菌落（小于 5 个全选），分别接种到 5mL BHI 和营养琼脂小斜面，36℃ ± 1℃ 培养 18h~24h。

取新鲜配制兔血浆 0.5 mL，放入小试管中，再加入 BHI 培养物 0.2 mL~0.3 mL，振荡摇匀，置 36℃ ± 1℃ 温箱或水浴箱内，每半小时观察一次，观察 6h，如呈现凝固（即将试管倾斜或倒置时，呈现凝块）或凝固体积大于原体积的一半，被判定为阳性结果。同时以血浆凝固酶试验阳性和阴性葡萄球菌菌株的肉汤培养物作为对照。也可用商品化的试剂，按说明书操作，进行血浆凝固酶试验。结果如可疑，挑取营养琼脂小斜面的菌落到 5mL BHI，36℃ ± 1℃ 培养 18h~48h，重复试验。

### 注意要点

1.7.5% 氯化钠肉汤增菌培养：

(1) 若样品本身在均质后清澈，培养 18h 观察呈现一定程度的浑浊（与培养前相比），则接种平板；若 18h 后仍无变化，继续培养至 24h 后无论浑浊与否都接种至平板；

##### 2.1.1.4 接种原则：

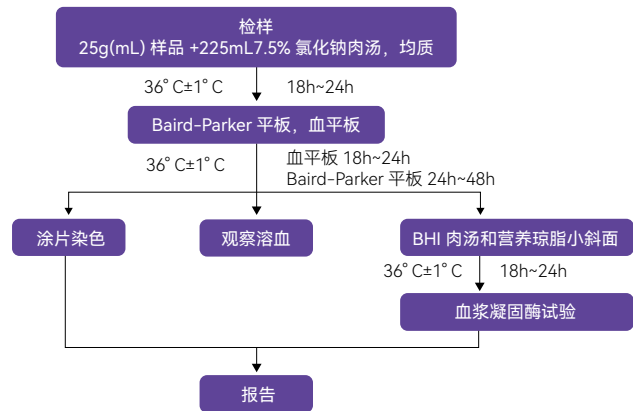
2.1.1.4.1 革兰氏染色后还剩余 10 个或 10 个以上菌落，则 NA、BHI 分别接种 5 管；

2.1.1.4.2 若多于 5 个（不包括 5 个）不足 10 个，则 BHI 接种 5 管，剩余的接种 NA；

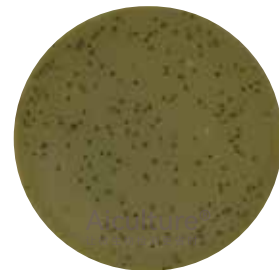
2.1.1.4.3 5 个及以下则全部接种 BHI，不接种 NA。

2.1.1.4.4. Baird-Parker 平板：

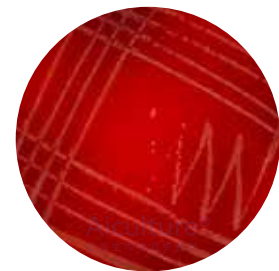
36±1℃ 培养 24h 后观察，有菌落生长则取出，无菌落生长则继续培养至 48h 后再观察。若血平板已挑取菌落进行证实试验，则不必再挑取 Baird-Parker 平板上的菌落进行实验。



流程图 5-1 金黄色葡萄球菌检验程序



金黄色葡萄球菌 ATCC12228



金黄色葡萄球菌 ATCC 6538

图 5-1

若血平板上无菌落生长，则应在 24h ~ 48h 内逐步观察 Baird-Parker 平板是否长菌或有无长菌迹象，有则需配置 BHI 及 NA，挑取 Baird-Parker 平板上的菌落进行纯化、增菌，36±1℃培养 24h。

#### 2.1.1.4.5. 血浆凝固酶试验：

(1) 根据 BHI 管数，取冻干血浆粉，每瓶用移液枪加入 0.5mL 生理盐水，使其充分溶解，再换移液枪枪头取 0.3mLBHI 培养物加入其中（每管 BHI 用 1 个枪头），振荡摇匀后于 36±1℃培养，计时，每 30min 观察一次，如呈现凝固（将试管倾斜或倒置时出现凝块）或半凝固（一般的液体呈现凝固）则判定为阳性。若一直不凝固，则一直观察，直至观察至 6h（查看 12 次）还未凝固，则试验终止，判定为阴性结果；若中途出现完全凝固或半凝固，则试验终止，判定为阳性结果。

(2) 同时取金黄色葡萄球菌标准菌株（ATCC 6538 以及 CMCC (B) 26003 各一支）制成菌悬液后作为阳性对照、以灭菌生理盐水为阴性对照，分别接种至 BHI 中同步培养后进行血浆凝固酶试验。

(3) 若血浆凝固酶试验结果可疑，则挑取 NA 上的菌落接种 BHI 再次进行试验。

#### 2.1.1.5 结果报告

结果判定：符合可判定为金黄色葡萄球菌。

结果报告：在 25g(mL) 样品中检出或未检出金黄色葡萄球菌。

## 2.2 第二法 金黄色葡萄球菌平板计数法

金黄色葡萄球菌平板计数法检验程序见流程图 5-2。

### 2.2.1 操作步骤

#### 2.2.1.1 样品的稀释

1. 固体和半固体样品：称取 25g 样品置于盛有 225mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内，8000r/min~10000r/min 均质 1min~2min，或置于盛有 225mL 稀释液的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1min~2min，制成 1 : 10 的样品匀液。

2. 液体样品：以无菌吸管吸取 25mL 样品置于盛有 225mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶（瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分混匀，制成 1 : 10 的样品匀液。

3. 用 1mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1 : 10 样品匀液 1mL，沿管壁缓慢注于盛有 9mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振荡试管或换用 1 支 1mL 无菌吸管反复吹打使其混合均匀，制成 1 : 100 的样品匀液。

4. 按 3 操作程序，制备 10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释一次，换用 1 次 1mL 无菌吸管或吸头。

#### 2.2.1.2 样品的接种

根据对样品污染状况的估计，选择 2 个 ~3 个适宜稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），在进行 10 倍递增稀释的同时，每个稀释度分别吸取 1mL 样品匀液以 0.3mL、0.3mL、0.4mL 接种量分别加入三块 Baird-Parker 平板，然后用无菌涂布棒涂布整个平板，注意不要触及平板边缘。使用前，如 Baird-Parker 平板表面有水珠，可放在 25℃~50℃的培养箱里干燥，直到平板表面的水珠消失。

#### 2.2.1.3 培养

培养 在通常情况下，涂布后，将平板静置 10min，如样液不易吸收，可将平板放在培养箱 36℃±1℃培养 1h；等样品匀液吸收后翻转平板，倒置后于 36℃±1℃培养 24h~48h。

#### 2.2.2 典型菌落计数和确认

1. 金黄色葡萄球菌在 Baird-Parker 平板上呈圆形，表面光滑、凸起、湿润、菌落直径为 2 mm~ 3mm，颜色呈灰黑色至黑色，有光泽，常有浅色（非白色）的边缘，周围以不透明圈（沉淀），其外常有一清晰带。当用接种针触及菌落时具有黄油样黏稠感。有时可见到不分解脂肪的菌株，除没有不透明圈和清晰带外，其他外观基本相同。从长期贮存的冷冻或脱水食品中分离的菌落，其黑色常较典型菌落浅些，且外观可能较粗糙，质地较干燥。

2. 选择有典型的金黄色葡萄球菌菌落的平板，且同一稀释度 3 个平板所有菌落数合计在 20CFU~ 200CFU 之间的平板，计数典型菌落数。

3. 从典型菌落中至少选 5 个可疑菌落（小于 5 个全选）进行鉴定试验。分别做染色镜检，血浆凝固酶试验；同时划线接种到血平板 36℃±1℃培养 18h~24h 后观察菌落形态，金黄色葡萄球菌菌落较大，圆形、光滑凸起、湿润、金黄色（有时为白色），菌落周围可见完全透明溶血圈。

#### 2.2.3 结果计数

1. 若只有一个稀释度平板的典型菌落数在 20CFU~200CFU 之间，计数该稀释度平板上的典型菌落，按式 (1) 计算。

2. 若最低稀释度平板的典型菌落数小于 20CFU，计数该稀释度平板上的典型菌落，按式 (1) 计算。

3. 若某一稀释度平板的典型菌落数大于 200CFU，但下一稀释度平板上没有典型菌落，计数该稀释度平板上的典型菌落，按式 (1) 计算。

4. 若某一稀释度平板的典型菌落数大于 200CFU，而下一稀释度平板上虽有典型菌落但不在 20CFU~200CFU 范围内，应计数该稀释度平板上的典型菌落，按式 (1) 计算。

5. 若 2 个连续稀释度的平板典型菌落数均在 20CFU~200CFU 之间，按式 (2) 计算。

#### 式中 (1):

T——样品中金黄色葡萄球菌菌落数；

A——某一稀释度典型菌落的总数；

B——某一稀释度鉴定为阳性的菌落数；

C——某一稀释度用于鉴定试验的菌落数；

d——稀释因子。

$$T = \frac{AB}{Cd}$$

#### 式中 (2):

T——样品中金黄色葡萄球菌菌落数；

A<sub>1</sub>——第一稀释度（低稀释倍数）典型菌落的总数；

B<sub>1</sub>——第一稀释度（低稀释倍数）鉴定为阳性的菌落数；

C<sub>1</sub>——第一稀释度（低稀释倍数）用于鉴定试验的菌落数；

A<sub>2</sub>——第二稀释度（高稀释倍数）典型菌落的总数；

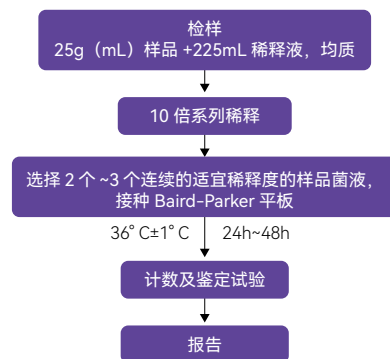
B<sub>2</sub>——第二稀释度（高稀释倍数）鉴定为阳性的菌落数；

C<sub>2</sub>——第二稀释度（高稀释倍数）用于鉴定试验的菌落数；

1.1——计算系数；

d——稀释因子（第一稀释度）。

$$T = \frac{A_1 B_1 / C_1 + A_2 B_2 / C_2}{1.1d}$$



流程图 5-2 金黄色葡萄球菌平板计数法检验程序

## 2.2.4 结果报告

根据上面的公式计算结果,报告每 g(mL) 样品中金黄色葡萄球菌数,以 CFU/g(mL) 表示;如 T 值为 0,则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。

### 注意要点

1. 取 1mL 样品稀释匀液接种 3 个 Baird-Parker 平板 (此处并未严格按照标准中 0.3mL、0.3mL、0.4mL 精确取样,由于如此操作会增加试验时间,无法在 15min 内完成试验)。
2. 涂布时不要触及平板边缘 (会导致样液涂抹不均匀,大部分汇集于边缘)。
3. 可用同一根涂布棒从低稀释度到高稀释度进行涂布 (不用换涂布棒)。
4. 涂布完成后应稍微放置一段时间使培养基吸收样品匀液。
5. 若水珠较多,可正置于培养箱中 1 ~ 2h 后再倒置培养。
6.  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 24h 后观察,有典型菌落生长则进行证实试验 (革兰氏染色镜检、血浆凝固酶试验、划线血平板)。若无菌落生长则继续培养至 48h 后再观察,有典型菌落生长则进行证实试验,无典型菌落生长则试验终止。

## 2.3 第三法 金黄色葡萄球菌 MPN 计数

### 2.3.1 操作步骤

同第二法

### 2.3.2 接种培养

1. 根据对样品污染状况的估计,选择 3 个适宜稀释度的样品匀液 (液体样品可包括原液),在进行 10 倍递增稀释的同时,每个稀释度分别接种 1 mL 样品匀液至 7.5% 氯化钠肉汤管 (如接种量超过 1mL,则用双料 7.5% 氯化钠肉汤),每个稀释度接种 3 管,将上述接种物  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养,18h~24h。
2. 用接种环从培养后的 7.5% 氯化钠肉汤管中分别取培养物 1 环,移种于 Baird-Parker 平板  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养,24h~48h。

### 2.3.3 典型菌落确认

同第二法

### 2.3.4 结果报告

根据证实为金黄色葡萄球菌阳性的试管管数,查 MPN 检索表,报告每 g(mL) 样品中金黄色葡萄球菌的最可能数,以 MPN/g(mL) 表示。

### 注意要点

1. 样品稀释同菌落总数,取 3 个连续稀释度稀释液 (或包括液体样品原液),每个稀释度接种 3 管 7.5% 氯化钠肉汤,每管接种 1mL,  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 18h 后观察,若出现浑浊则接种至 Baird-Parker 平板,若无变化则继续培养至 24h 后再接种至 Baird-Parker 平板。
2. 划线接种至 Baird-Parker 平板,  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 24h 后观察,有典型菌落生长则进行证实试验 (革兰氏染色镜检、血浆凝固酶试验、划线血平板)。若无菌落生长则继续培养至 48h 后再观察,有典型菌落生长则进行证实试验,无典型菌落生长则试验终止。
3. 根据证实后的阳性管数查 MPN 表得出结果。

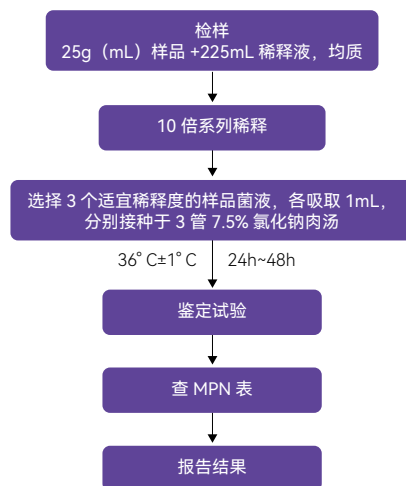
## 三、培养基原理解析

### 3.1 7.5% 氯化钠肉汤

蛋白胨和牛肉膏粉提供碳源、氮源、维生素和矿物质;较高含量的氯化钠提供较高的渗透压,抑制大多数非葡萄球菌的微生物。

### 3.2 Baird-Parker 琼脂基础

胰蛋白胨、牛肉膏粉和酵母膏粉提供碳氮源、维生素和生长因子;丙酮酸钠和甘氨酸刺激葡萄球菌的生长;氯化锂和亚碲酸钾抑制非葡萄球菌的微生物;含有卵磷脂酶的葡萄球菌降解卵黄使菌落产生透明圈,而脂酶作用则产生不透明的沉淀环;凝固酶阳性的葡萄球菌还能还原亚碲酸钾而产生黑色菌落;琼脂是培养基的凝固剂。

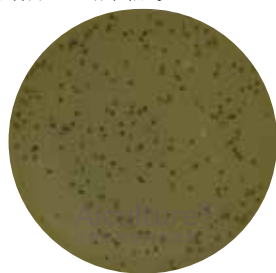


流程图 5-3 金黄色葡萄球菌 MPN 法检验程序

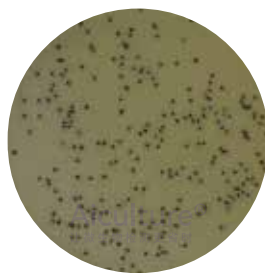


7.5% 氯化钠肉汤空白竞品比对

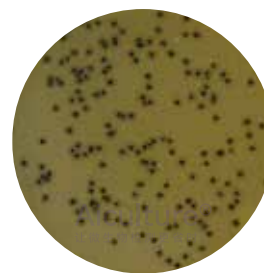
图 5-2



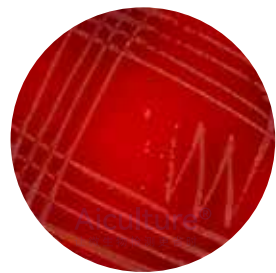
豆点金黄色葡萄球菌 ATCC6538



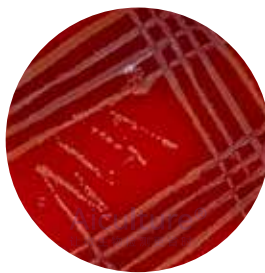
L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



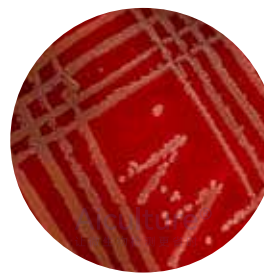
H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



豆点金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538

图 5-4

### 3.3 血琼脂平板

酪蛋白胰酶消化物、胰酶消化物、肉胃酶消化物、酵母浸出粉、可溶性淀粉提供碳氮源、维生素和生长因子；羊血是细菌生长繁殖的良好营养物质。在 45 ~ 50℃的基础培养基中加入血液可以保存血液中某些不耐热的生长因子，同时血球不被破坏。

### 3.4 脑心浸出液肉汤 (BHI)

胰蛋白胍和牛心浸出液提供氮源、维生素和生长因子；葡萄糖可为多种细菌提供能源；氯化钠维持均衡的渗透压；磷酸氢二钠为缓冲剂。



金黄色葡萄球菌 ATCC6538 BHI 竞品对比

图 5-5

## 附录 A

# 7.5% 氯化钠肉汤验证

- 1、产品用途：用于金黄色葡萄球菌和其它耐盐菌的选择性增菌培养。
- 2、检验原理：蛋白胍和牛肉膏粉提供碳源、氮源、维生素和矿物质；较高含量的氯化钠提供较高的渗透压，抑制大多数非葡萄球菌的微生物。

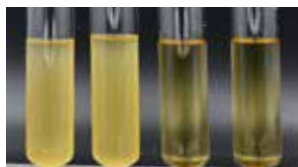


表 5-1：7.5% 氯化钠肉汤验证

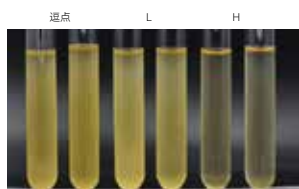
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	接种计数培养基 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
7.5% 氯化钠肉汤	金黄色葡萄球菌 ATCC6538 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	26	26CFU (金黄色葡萄球菌 ATCC6538) + 2135CFU (大肠埃希氏菌 ATCC25922)	在 Baird-Parker 上 > 10CFU 菌落黑色凸起，周围有一混浊带，在其外层有一透明圈	在 Baird-Parker 上 > 10CFU 菌落黑色凸起，周围有一混浊带，在其外层有一透明圈	符合
		L 品牌			在 Baird-Parker 上 > 10CFU 菌落黑色凸起，周围有一混浊带，在其外层有一透明圈		符合
		H 品牌			在 Baird-Parker 上 > 10CFU 菌落黑色凸起，周围有一混浊带，在其外层有一透明圈		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	0	2135CFU	< 100	在 TSA 上 < 100CFU	符合
		L 品牌	0		< 100		符合
		H 品牌	0		< 100		符合

1. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 7.5% 氯化钠肉汤上的菌落特征：菌落黑色凸起，周围有一混浊带，在其外层有一透明圈；
2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 7.5% 氯化钠肉汤上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；

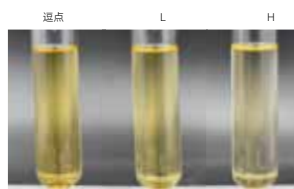
### 3、典型特征图片：



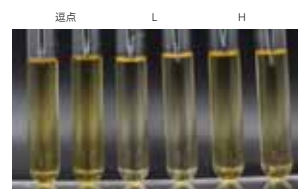
逗点 7.5% 氯化钠肉汤增菌后现象



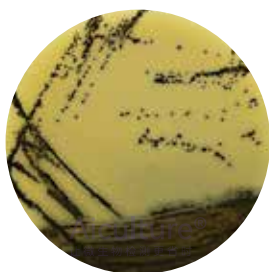
金黄色葡萄球菌 ATCC6538+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922 7.5% 氯化钠肉汤竞品对比



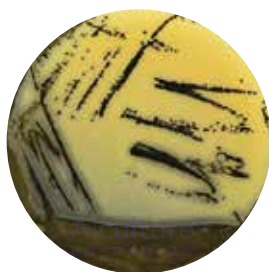
7.5% 氯化钠肉汤空白竞品对比



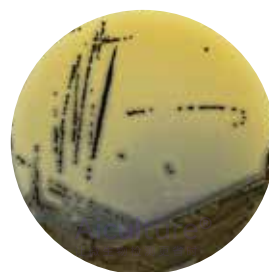
大肠埃希氏菌 ATCC25922 7.5% 氯化钠肉汤竞品对比



逗点混菌划线 BP



L 品牌混菌划线 BP



H 品牌混菌划线 BP



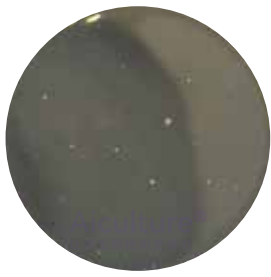
逗点大肠埃希氏菌倾注 TSA



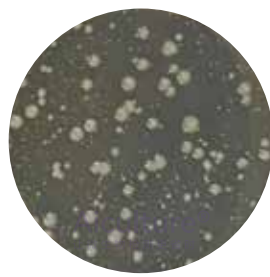
L 品牌大肠埃希氏菌倾注 TSA



H 品牌大肠埃希氏菌倾注 TSA



金黄色葡萄球菌 ATCC6538 计数 TSA



大肠埃希氏菌 ATCC25922 计数 TSA

图 5-5

4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌金黄色葡萄球菌 ATCC6538, L 品牌、H 品牌、逗点均满足国标在 Baird-Parker 上 > 10CFU, 菌落黑色凸起, 周围有一混浊带, 在其外层有一透明圈的要求

4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922, L 品牌、H 品牌、逗点均符合国标在 TSA 上 < 100CFU 要求。

4.3 感观：三家产品外观颜色无明显差异。

附录 B

## Baird-Parker 琼脂验证



1、产品用途：用于凝固酶阳性葡萄球菌的选择性分离培养和计数。

2、检验原理：胰蛋白胨、牛肉膏粉和酵母膏粉提供碳氮源、维生素和生长因子；丙酮酸钠和甘氨酸刺激葡萄球菌的生长；氯化锂和亚碲酸钾抑制非葡萄球菌的微生物；含有卵磷脂酶的葡萄球菌降解卵黄使菌落产生透明圈，而脂酶作用则产生不透明的沉淀环；凝固酶阳性的葡萄球菌还能还原亚碲酸钾而产生黑色菌落；琼脂是培养基的凝固剂。

表 5-2：Baird-Parker 琼脂验证

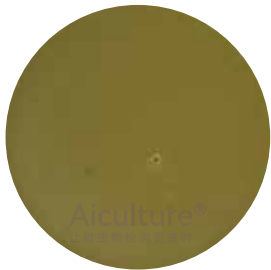
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
Baird-Parker 琼脂	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	215	155	1.3	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	218		1.4		符合
		H 品牌	244		1.5		符合
	表皮葡萄球菌 ATCC12228	逗点	/	/	黑色菌落, 无混浊带, 无透明圈	黑色菌落, 无混浊带和透明圈。	符合
		L 品牌	/	/	黑色菌落, 无混浊带和透明圈		符合
		H 品牌	/	/	黑色菌落, 无混浊带, 无透明圈		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G < 1	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/	/	G < 1		符合
		H 品牌	/	/	G < 1		符合

1. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在 Baird-Parker 板上的菌落特征：菌落黑色凸起, 周围有一混浊带, 在其外层有一透明圈;

2. 表皮葡萄球菌 ATCC12228 在 Baird-Parker 板上的菌落特征：黑色菌落, 无混浊带和透明圈;

3. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 Baird-Parker 上的菌落特征：选择性 G ≤ 1;

3、典型特征图片：



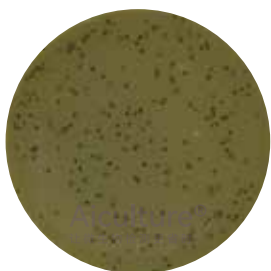
逗点空白平板



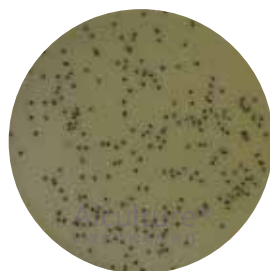
L 品牌空白平板



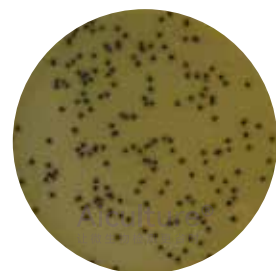
H 品牌空白平板



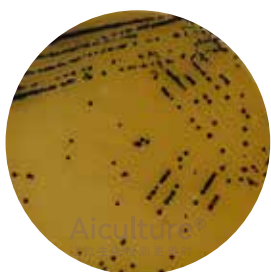
逗点金黄色葡萄球菌 ATCC6538



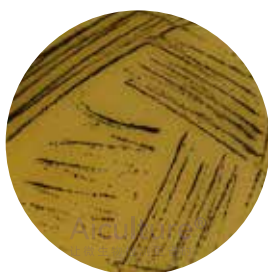
L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



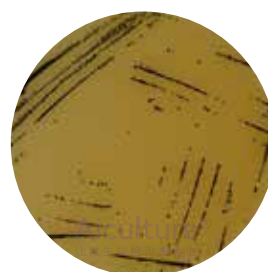
H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



逗点表皮葡萄球菌 ATCC12228



L 品牌表皮葡萄球菌 ATCC12228



H 品牌表皮葡萄球菌 ATCC12228



逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



L 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922

图 5-6

#### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均满足  $PR \geq 0.7$  的要求；
- 4.2 特异性：表皮葡萄球菌 ATCC12228，逗点、H 品牌、L 品牌符合黑色菌落，无混浊带和透明圈的要求；
- 4.3 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌符合  $G \leq 1$  的要求；
- 4.4 感观：三家平板颜色无显著差异。

### 附录 C

## 血液琼脂基础验证

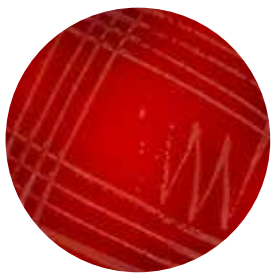
- 1. 产品用途：加入脱纤维羊血或兔血，制成血液琼脂培养基，用于营养要求较高的细菌的培养及溶血试验。
- 2. 检验原理：蛋白胨提供碳氮源、维生素和生长因子；氯化钠维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂。



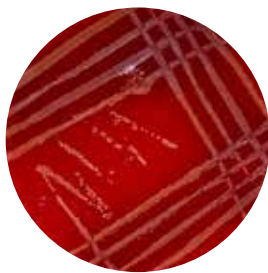
表 5-3：血液琼脂基础验证

样品名称	质控菌株	厂家	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
血液琼脂基础	金黄色葡萄球菌 ATCC 6538	逗点	菌落周围有 $\beta$ 溶血环	菌落周围有 $\beta$ 溶血环	符合
		L 品牌	菌落周围有 $\beta$ 溶血环		符合
		H 品牌	菌落周围有 $\beta$ 溶血环		符合
	蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303	逗点	菌落周围有 $\alpha$ 溶血环	菌落周围有 $\alpha$ 溶血环	符合
		L 品牌	菌落周围有 $\alpha$ 溶血环		符合
		H 品牌	菌落周围有 $\alpha$ 溶血环		符合

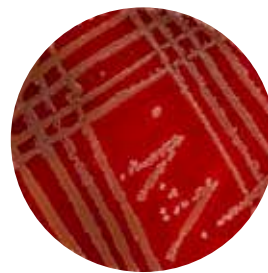
#### 3、典型特征图片：



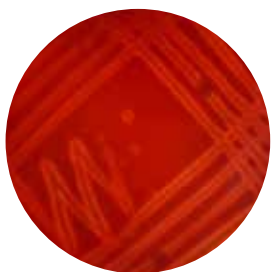
逗点金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



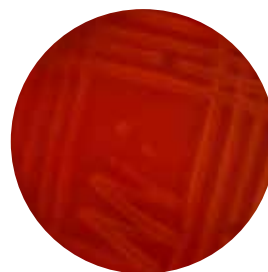
H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



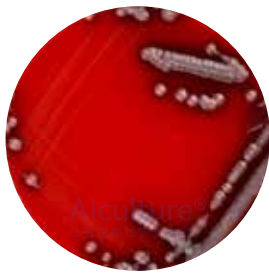
逗点金黄色葡萄球菌 ATCC 6538  
(反面)



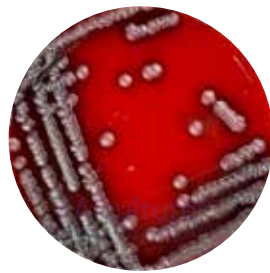
L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538  
(反面)



H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538  
(反面)



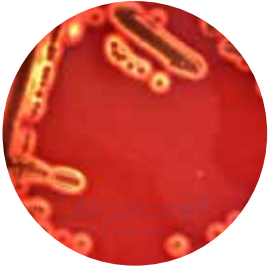
逗点蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303



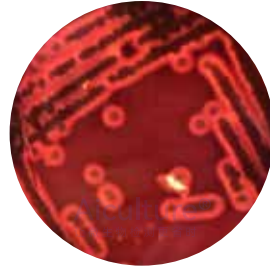
L 品牌蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303



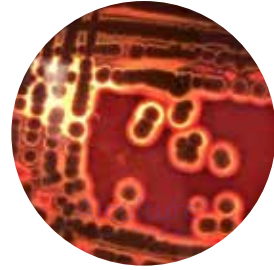
H 品牌蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303



逗点蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303 (反面)



L 品牌蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303 (反面)



H 品牌蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303 (反面)



逗点血液琼脂基础空白



L 品牌血液琼脂基础空白



H 品牌血液琼脂基础空白

图 5-7

#### 4、验证结果小结

4.1 特异性：目标菌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标生长特性溶血现象的要求，逗点、H 品牌溶血现象明显，L 品牌溶血现象较弱。逗点生长速度较缓慢。

4.2 感观：逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。

### 附录 D

## 脑心浸出液肉汤 (BHI)

1、产品用途：用于霉菌、酵母、细菌的培养，包括营养要求较高的微生物的培养，特别用于食品微生物检验中金黄色葡萄球菌的纯培养。

2、检验原理：胰蛋白胍和牛心浸出液提供氮源、维生素和生长因子；葡萄糖可为多种细菌提供能源；氯化钠维持均衡的渗透压；磷酸氢二钠为缓冲剂。

表 5-4：脑心浸出液肉汤 (BHI) 验证数据

样品名称	质控菌株	厂家	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
脑心浸出液肉汤 (BHI)	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	61	混浊度 2	混浊度 2	符合
		L 品牌		混浊度 2		符合
		H 品牌		混浊度 2		符合

#### 3、典型特征图片：

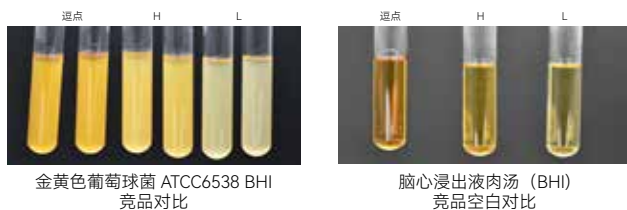
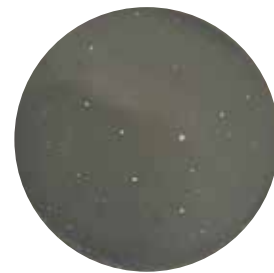


图 5-8



计数金黄色葡萄球菌 ATCC 6538

#### 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌金黄色葡萄球菌 ATCC6538 逗点、L 品牌、H 品牌的混浊度满足要求；

4.2 感观：逗点的液体颜色较深，L 品牌颜色较淡，H 品牌颜色在两家之间。

4.3 都满足标准，液体增菌仅看外观，并不能发现明显差别。

# 06 食品微生物检验 GB4789.30-2016 单核细胞增生李斯特氏菌检验及注意事项

## 一、单核细胞增生李斯特氏菌的生物学特性

生物学特性：单核细胞增生李斯特氏菌为革兰氏阳性短杆菌，营养需求不高，兼性厌氧。该菌触酶阳性，有动力，具有溶血反应、能发酵葡萄糖、麦芽糖、鼠李糖和七叶苷，不能发酵甘露醇和木糖，MR-VP 阳性。

流行病学特征：单核细胞增生李斯特菌是一种人畜共患病原菌，它的临床症状为菌血症、脑膜炎及导致孕妇流产。单核细胞增生李斯特菌广泛分布存在于自然界，可以加热杀死，但是对高浓度盐和酸相对不敏感。它还能在冰箱温度和真空包装内增殖，特别有风险的材料包括生加工肉类、生牛奶产品、生熏鱼、预制沙拉和长期真空储存的包装食物。

## 二、单核细胞增生李斯特氏菌的国标检验方法

### 2.1 第一法定性检验

#### 2.1.1 操作步骤

##### 2.1.1.1 增菌

以无菌操作取样品 25g(mL) 加入到含有 225mL LB<sub>1</sub> 增菌液的均质袋中，在拍击式均质器上连续均质 1min~2min；或放入盛有 225mL LB<sub>1</sub> 增菌液的均质杯中，以 8000r/min~10000r/min 均质 1min~2min。于 30℃ ±1℃ 培养 24h±2h，移取 0.1mL，转种于 10mL LB<sub>2</sub> 增菌液内，于 30℃ ±1℃ 培养 24h±2h。

##### 2.1.1.2 分离

取 LB<sub>2</sub> 二次增菌液划线接种于李斯特氏菌显色平板和 PALCAM 琼脂平板，于 36℃ ±1℃ 培养 24h~48h，观察各个平板上生长的菌落。典型菌落在 PALCAM 琼脂平板上为小的圆形灰绿色菌落，周围有棕黑色水解圈，有些菌落有黑色凹陷；在李斯特氏菌显色平板上的菌落特征，参照产品说明进行判定

##### 2.1.1.3 初筛

自选择性琼脂平板上分别挑取 3 个~5 个典型或可疑菌落，分别接种木糖、鼠李糖发酵管，于 36℃ ±1℃ 培养 24h±2h，同时在 TSA-YE 平板上划线，于 36℃ ±1℃ 培养 18h~24h，然后选择木糖阴性、鼠李糖阳性的纯培养物继续进行鉴定。

### 2.2 第二法 单核细胞增生李斯特氏菌平板计数法

#### 2.2.1 样品的稀释

2.2.1.1 以无菌操作称取样品 25g(mL)，放入盛有 225mL 缓冲蛋白胨水或无添加剂的 LB 肉汤的无菌均质袋内（或均质杯）内，在拍击式均质器上连续均质 1min~2min 或以 8000r/min~10000r/min 均质 1min~2min。液体样品，振荡混匀，制成 1 : 10 的样品匀液。

2.2.1.2 用 1mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1 : 10 样品匀液 1mL，沿管壁缓慢注于盛有 9mL 缓冲蛋白胨水或无添加剂的 LB 肉汤的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振荡试管或换用 1 支 1mL 无菌吸管反复吹打使其混合均匀，制成 1 : 100 的样品匀液。

2.2.1.3 按 2.2.1.2 操作程序，制备 10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释 1 次，换用 1 支 1mL 无菌吸管或吸头。

#### 2.2.2 样品的接种

根据对样品污染状况的估计，选择 2~3 个适宜连续稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），每个稀释度的样品匀液分别吸取 1mL 以 0.3mL、0.3mL、0.4mL 的接种量分别加入 3 块李斯特氏菌显色平板，用无菌 L 棒涂布整个平板，注意不要触及平板边缘。使用前，如琼脂平板表面有水珠，可放在 25℃~50℃ 的培养箱里干燥，直到平板表面的水珠消失。

#### 2.2.3 培养

在通常情况下，涂布后，将平板静置 10min，如样液不易吸收，可将平板放在培养箱 36℃ ±1℃ 培养 1h；等样品匀液吸收后翻转平皿，倒置于培养箱，36℃ ±1℃ 培养 24h~48h。

#### 2.2.4 典型菌落计数和确认

2.2.4.1 单核细胞增生李斯特氏菌在李斯特氏菌显色平板上的菌落特征以产品说明为准。

2.2.4.2 选择有典型单核细胞增生李斯特氏菌菌落的平板，且同一稀释度 3 个平板所有菌落数合计在 15CFU~150CFU 之间的平板，计数典型菌落数。如果：

- a) 只有一个稀释度的平板菌落数在 15CFU~150CFU 之间且有典型菌落，计数该稀释度平板上的典型菌落；
- b) 所有稀释度的平板菌落数均小于 15CFU 且有典型菌落，应计数最低稀释度平板上的典型菌落；
- c) 某一稀释度的平板菌落数大于 150CFU 且有典型菌落，但下一稀释度平板上没有典型菌落，应计数该稀释度平板上的典型菌落；

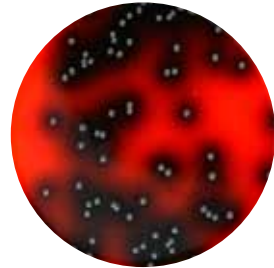
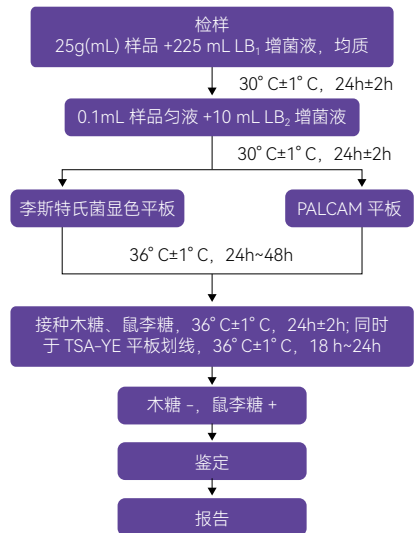
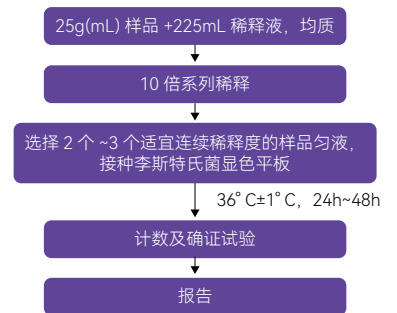


图 6-1



流程图 6-1 单核细胞增生李斯特氏菌定性检验程序



流程图 6-2 单核细胞增生李斯特氏菌平板计数程序

- d) 所有稀释度的平板菌落数大于 150CFU 且有典型菌落，应计数最高稀释度平板上的典型菌落；  
 e) 所有稀释度的平板菌落数均不在 15CFU~150CFU 之间且有典型菌落，其中一部分小于 15CFU 或大于 150CFU 时，应计数最接近 15CFU 或 150CFU 的稀释度平板上的典型菌落。

以上按式 (1) 计算。

- f) 2 个连续稀释度的平板菌落数均在 15CFU~150CFU 之间，按式 (2) 计算。

式中：

T——样品中单核细胞增生李斯特氏菌菌落数；

A——某一稀释度典型菌落的总数；

B——某一稀释度确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数；

C——某一稀释度用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数；

d——稀释因子。

$$T = \frac{AB}{Cd}$$

式中：

T——样品中单核细胞增生李斯特氏菌菌落数；

A1——第一稀释度（低稀释倍数）典型菌落的总数；

B1——第一稀释度（低稀释倍数）确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数；

C1——第一稀释度（低稀释倍数）用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数；

A2——第二稀释度（高稀释倍数）典型菌落的总数；

B2——第二稀释度（高稀释倍数）确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数；

C2——第二稀释度（高稀释倍数）用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数；

1.1——计算系数；

d——稀释因子（第一稀释度）。

$$T = \frac{A_1B_1/C_1 + A_2B_2/C_2}{1.1d}$$

## 2.2.5 结果报告

报告每 g(mL) 样品中单核细胞增生李斯特氏菌菌数，以 CFU/g(mL) 表示；如 T 值为 0，则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。

## 2.3 第三法 单核细胞增生李斯特氏菌 MPN 计数法

### 2.3.1 检验程序

#### 2.3.2 操作步骤

##### 2.3.2.1 样品的稀释

按 2.2.1 进行。

##### 2.3.2.2 接种和培养

·根据对样品污染状况的估计，选取 3 个适宜连续稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），接种于 10mL LB<sub>1</sub> 肉汤，每一稀释度接种 3 管，每管接种 1mL（如果接种量需要超过 1mL，则用双料 LB<sub>1</sub> 增菌液）于 30℃ ± 1℃ 培养 24h ± 2h。每管各移取 0.1mL，转种于 10mL LB<sub>2</sub> 增菌液内，于 30℃ ± 1℃ 培养 24h ± 2h。

·用接种环从各管中移取 1 环，接种李斯特氏菌显色平板，36℃ ± 1℃ 培养 24h~48h。

##### 2.3.2.3 确证试验

自每块平板上挑取 5 个典型菌落（5 个以下全选），按照 2.2.4 进行鉴定。

##### 2.3.2.4 结果与报告

根据证实为单核细胞增生李斯特氏菌阳性的试管管数，查 MPN 检索表（见附录 B），报告每 g(mL) 样品中单核细胞增生李斯特氏菌的最可能数，以 MPN/g(mL) 表示。

### 操作注意事项

1：对易产生较大颗粒的样品（如肉类）进行检测时，建议使用带滤网均质袋，以便均质后用吸管吸取匀液；

2：预增菌时间与样品种类、目标菌和杂菌的含量及状态等因素有关。一般菌相比较复杂的高污染样品，如果增菌时间过长会导致杂菌生长过多，目标菌可能就会被另一种优势菌所取代，这种情况下，增菌时间不宜过长。低污染样品的增菌时间可以适当延长。由于本标准适用的样品种类众多，预增菌的时间应根据实际情况和经验进行具体选择。建议增菌液发生混浊时停止预增菌。

3：分离划线用直径 3mm 的接种环（1 环约 10 微升）。

4：动力试验的培养温度不能超过 30℃。

## 三、培养基原理解析

### 3.1 李氏增菌肉汤 (LB<sub>1</sub>, LB<sub>2</sub>) 基础

李氏增菌肉汤检验原理：蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；磷酸二氢钾和磷酸氢二钠是缓冲剂。

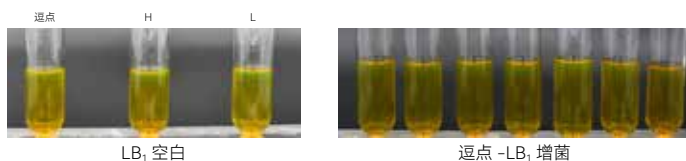
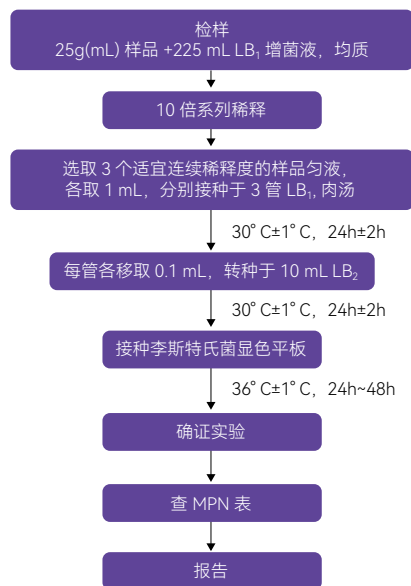


图 6-2



流程图 6-3 单核细胞增生李斯特氏菌 MPN 计数程序

表 6-1：单核细胞增生李斯特氏菌最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN	95% 可信限			阳性管数			MPN	95% 可信限		
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001	下限		上限		
0	0	0	< 3.0	-	9.5	2	2	0	21	4.5	42		
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94		
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94		
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94		
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94		
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94		
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110		
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180		
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180		
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200		
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420		
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420		
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420		
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420		
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430		
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000		
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000		
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000		
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100		
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	> 1100	420	-		

注 1: 本表采用 3 个稀释度 [0.1g(mL)、0.01g(mL)、0.001g(mL)], 每个稀释度接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1g(mL)、0.1g(mL) 和 0.01g(mL) 时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 0.01g(mL)、0.001g(mL) 和 0.0001g(mL) 时, 则表内数字应相应增高 10 倍, 其余类推。

### 3.2 PALCAM 培养基

PALCAM 琼脂检验原理: 蛋白胨提供生长必须的碳氮源; 酵母膏粉和淀粉提供碳氮源、维生素和生长因子; 氯化钠可维持均衡的渗透压; 葡萄糖提供碳源; 李斯特氏菌水解七叶苷与铁离子反应形成黑色的 6,7- 二羟基香豆素; 甘露醇是可发酵的糖, 酚红是 pH 指示剂; 氯化锂和别的抗生素能抑制革兰氏阴性菌和大多数革兰氏阳性菌; 琼脂是培养基的凝固剂。

可疑菌落特征: 在 PALCAM 琼脂平板上为小的圆形灰绿色菌落, 周围有棕黑色水解圈, 有些菌落有黑色凹陷。

疑点: 单核细胞增生李斯特氏菌与属内其他李斯特氏菌菌落特征无明显差别, 可疑菌落多, 后续确证工作量大。

### 3.3 李斯特显色培养基

可疑菌落特征: 单核细胞增生李斯特氏菌形成蓝绿色规则光滑的小菌落, 周围有乳白色脂肪沉淀环; 其他李斯特氏菌为蓝绿色无晕圈菌落; 杂菌被抑制或显示其他颜色。

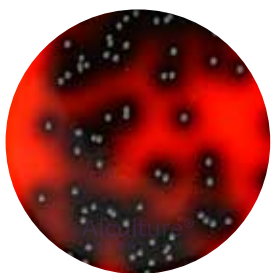
疑点: 乳白色脂肪沉淀环扩散覆盖其他菌落时极易引起假阳性。

### 3.4 含 0.6% 酵母浸膏的胰酪胨大豆琼脂 (TSA-YE)

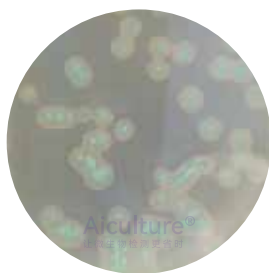
TSA-YE 培养基检验原理: 胰酪、多价胨和酵母膏粉提供氮源、维生素和生长因子; 氯化钠维持均衡的渗透压; 葡萄糖提供碳源; 磷酸氢二钾为缓冲剂; 琼脂是培养基的凝固剂。

### 3.5 含 0.6% 酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤 (TSB-YE)(EB 增菌液基础)

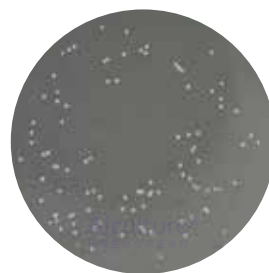
含 0.6% 酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤 (TSB-YE) 培养基检验原理: 胰酪、多价胨和酵母膏粉提供氮源、维生素和生长因子; 氯化钠维持均衡的渗透压; 葡萄糖提供碳源; 磷酸氢二钾为缓冲剂; 萘啶酮酸和盐酸吡啶黄为选择性抑菌剂, 抑制非李斯特氏菌生长。



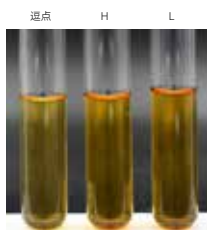
单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115



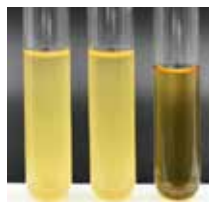
逗点 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115



单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115



逗点 -L 品牌 -H 品牌 - 空白肉汤



单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115

图 6-3

#### 四. 质量控制及疑难解析

##### 4.1 质量控制

4.1.1 实验室过程中，每批预增菌液、选择性增菌液、分离平板等都要做空白对照。以掌握检验过程中是否存在来自检验环境的污染。

4.1.2 定期使用单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115 菌种或等效的其他标准株，在 P2 实验室或阳性对照实验室内，用适当的食品样品进行阳性对照实验验证，污染剂量应控制在 10-100CFU/25g，并进行记录，验证实验至少每 2 个月进行 1 次。

4.1.3 要求对使用的培养基和生化试剂每批均用 GB4789.30-2016 推荐的阳性和阴性对照标准菌种进行验证，并做好记录。

##### 4.2 疑难解析

**Q1：为什么在没有典型菌落时仍要挑取非典型菌落进行鉴定？**

根据经验，有少数单核细胞增生李斯特氏菌在李斯特显色平板上呈现非典型菌落。

**Q2：为什么在 PALCAM 选择性平板上挑取典型菌落，鉴定后非单核细胞增生李斯特菌的概率较高？**

PALCAM 是李斯特菌属的选择性平板，根据经验，环境存在较多的英诺克李斯特菌，应结合显色平板，挑取较多的典型菌落鉴定。

**Q3：当 3 个及以上连续稀释度的结果均为阳性时，如何选择？**

选择原则参考 Bacteriological Analytical Manual Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions.

**Q4：如果前增菌或选择性增菌结束后，肉汤中未见微生物生长，是否可以终止实验？**

不可以，因为肉眼可见的细菌浓度为 10<sup>7</sup>CFU/mL，在此浓度以下，肉眼不能发现。

#### 附录 A

### 李氏增菌肉汤基础 (LB<sub>1</sub>) 验证



1、产品用途：用于李斯特氏菌的选择性增菌培养。

2、检验原理：蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；磷酸二氢钾和磷酸氢二钠是缓冲剂。

表 6-2：LB<sub>1</sub> 验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	接种计数培养基 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
LB <sub>1</sub>	单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922+ 粪肠球菌 ATCC29212	逗点	/	多不可计	在 PALCAM 上 > 10CFU，培养基变黑色	在 PALCAM 上 > 10CFU，培养基变黑色	符合
		L 品牌	/		在 PALCAM 上 > 10CFU，培养基变黑色		符合
		H 品牌	/		在 PALCAM 上 > 10CFU，培养基变黑色		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	0	3980	< 100	在 TSA 上 < 100CFU	符合
		L 品牌	0		< 100		符合
		H 品牌	0		< 100		符合
	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	0	2050	< 100	在 TSA 上 < 100CFU	符合
		L 品牌	124		> 100		不符合
		H 品牌	187		> 100		不符合

1. 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115 在 LB<sub>1</sub> 增菌上的菌落特征：在 PALCAM 上 > 10CFU，培养基变黑色；

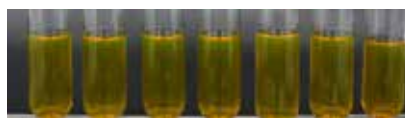
2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 LB<sub>1</sub> 增菌上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；

3. 粪肠球菌 ATCC 29212 在 LB<sub>1</sub> 增菌上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；

3、典型特征图片：



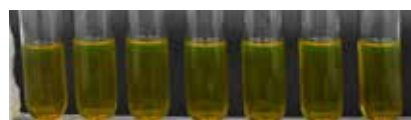
LB<sub>1</sub> 增菌



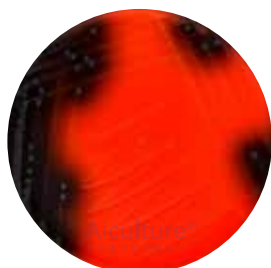
逗点 - LB<sub>1</sub> 增菌



L 品牌 - LB<sub>1</sub> 增菌



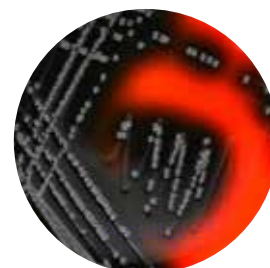
H 品牌 - LB<sub>1</sub> 增菌



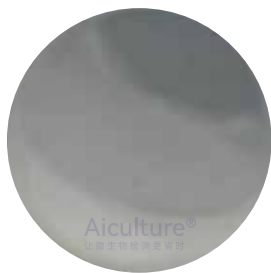
逗点 - 混菌划线 PALCAM



L 品牌 - 混菌划线 PALCAM



H 品牌 - 混菌划线 PALCAM



逗点 - 大肠埃希氏菌 ATCC 25922



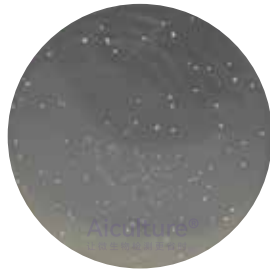
L 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC 25922



H 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC 25922



逗点 - 粪肠球菌 ATCC 29212



L 品牌 - 粪肠球菌 ATCC 29212



H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC 29212

图 6-4

#### 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922+ 粪肠球菌 ATCC29212，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标在 PALCAM 上 > 10CFU，培养基变黑色的要求；

4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922 逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标在 TSA 上 < 100CFU 的要求；

粪肠球菌 ATCC 29212，逗点满足国标在 TSA 上 < 100CFU 的要求，L 品牌、H 品牌不满足国标在 TSA 上 < 100CFU 的要求，逗点选择性优于 L 品牌、H 品牌；

4.3 感观：逗点、L 品牌、H 品牌空白液体颜色无差异。

## 附录 B

### 李斯特氏菌显色培养基验证

1、产品用途：用于单增李斯特菌的分离和初步鉴别。

2、检验原理：蛋白胨、大豆胨和酵母粉提供氮源和微量元素；葡萄糖提供碳源；丙酮酸钠、甘油磷酸镁、硫酸镁、氯化锂促进菌体细胞生长，调节酶活；氯化钠维持均衡的渗透压；磷酸氢二钠为缓冲剂；琼脂是培养基的凝固剂；5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶 -β-D- 葡萄糖苷为显色底物，与李斯特氏菌的 β- 葡萄糖苷酶发生特异性水解反应，释放出显色基团，使李斯特氏菌属细菌形成绿色菌落；而李斯特氏菌显色培养基配套试剂含卵磷脂和抗生素，可抑制杂菌生长，使具有卵磷脂酶的单增李斯特氏菌在绿色菌落周围形成乳白色脂肪沉淀环。



表 6-3：李斯特氏菌显色培养基验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	接种计数培养基 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
李斯特氏菌显色培养基	单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115	逗点	73	75	0.9	PR ≥ 0.5	符合
	英诺克李斯特氏菌 ATCC33090	逗点	/	/	蓝绿色菌落，无白色晕环	蓝绿色菌落，无白色晕环	符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G < 1	G ≤ 1	符合
	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	/	/	G < 1	G ≤ 1	符合

1. 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115 在李斯特氏菌显色培养基上的菌落特征：蓝绿色菌落，带白色晕环；

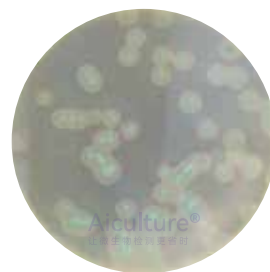
2. 英诺克李斯特氏菌 ATCC33090 在李斯特氏菌显色培养基上的菌落特征：蓝绿色菌落，无白色晕环

3. 大肠埃希氏菌 ATCC25922、粪肠球菌 ATCC29212 在李斯特氏菌显色培养基上的菌落特征：G ≤ 1。

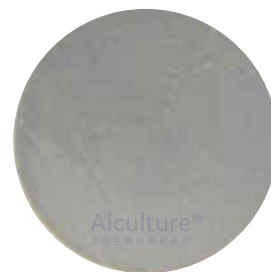
#### 3、典型特征图片：



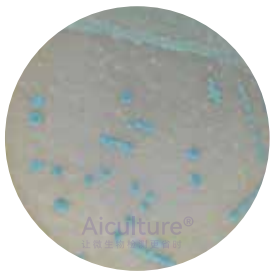
逗点 - 空白平板



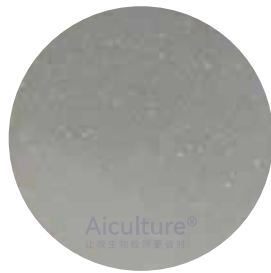
逗点 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115



逗点 - 粪肠球菌 ATCC29212



逗点 - 英诺克李斯特氏菌 ATCC33090



逗点 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922

图 6-5

4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115，逗点均满足国标 PR ≥ 0.5 的要求，逗点菌落蓝绿色菌落，带白色晕环；

4.2 特异性：英诺克李斯特氏菌 ATCC33090，逗点满足国标菌落为蓝绿色菌落，无白色晕环；

4.3 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922、粪肠球菌 ATCC29212，逗点满足国标 G ≤ 1 的要求；

附录 C

**PALCAM 琼脂基础培养基验证**



1、产品用途：用于单核细胞增生李斯特氏菌的选择性分离培养。

2、检验原理：蛋白胨提供生长必须的碳氮源；酵母膏粉和淀粉提供碳氮源、维生素和生长因子；氯化钠可维持均衡的渗透压；葡萄糖提供碳源；李斯特氏菌水解七叶苷与铁离子反应形成黑色的 6,7-二羟基香豆素；甘露醇是可发酵的糖，酚红是 pH 指示剂；氯化锂和其它的抗生素能抑制革兰氏阴性菌和大多数革兰氏阳性菌；琼脂是培养基的凝固剂。

表 6-4：PALCAM 验证

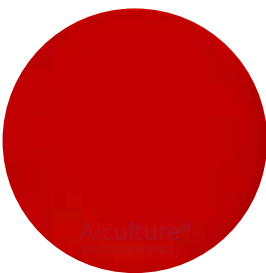
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
PALCAM	单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115	逗点	104	104	1.0	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	95		0.9		符合
		B 品牌	100		0.9		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G < 1	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/		G < 1		符合
		B 品牌	/		G < 1		符合
粪肠球菌 ATCC29212	逗点	/	/	G < 1	G ≤ 1	符合	
	L 品牌	/		G < 1		符合	
	B 品牌	/		G < 1		符合	

1. 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115 在 PALCAM 板上的菌落特征：灰绿色菌落，中心凹陷黑色，周围有黑色；

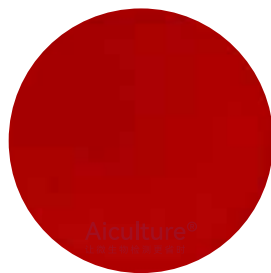
2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 PALCAM 板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；

3. 粪肠球菌 ATCC 29212 在 PALCAM 板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；

3、典型特征图片：



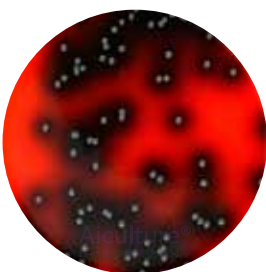
逗点 - 空白平板



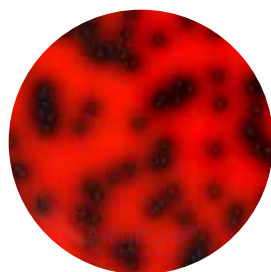
L 品牌 - 空白平板



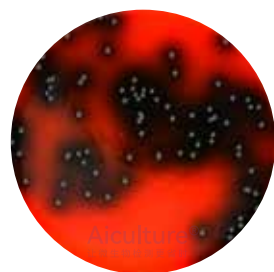
B 品牌 - 空白平板



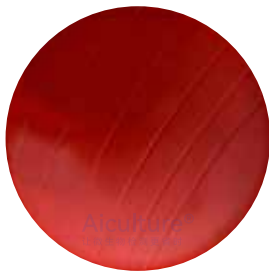
逗点 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115



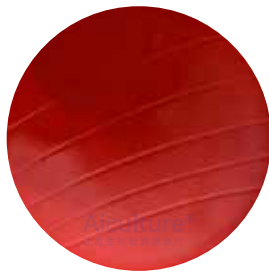
L 品牌 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115



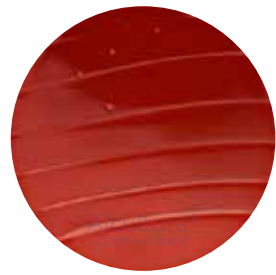
B 品牌 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115



逗点 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



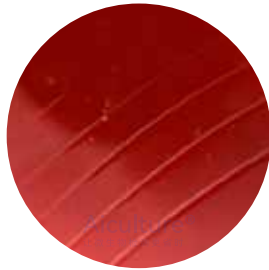
L 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



B 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点 - 粪肠球菌 ATCC 29212



L 品牌 - 粪肠球菌 ATCC 29212



B 品牌 - 粪肠球菌 ATCC 29212

图 6-6

#### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115，逗点、L 品牌、B 品牌均满足国标  $PR \geq 0.5$  的要求，逗点生长率优于 L 品牌、B 品牌；  
 4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922、粪肠球菌 ATCC 29212，逗点、L 品牌、B 品牌均满足国标  $G \leq 1$  的要求；  
 4.3 感观：逗点、L 品牌、B 品牌平板颜色无显著差异。

### 附录 D

## 含 0.6% 酵母浸粉的胰酪胨大豆琼脂 (TSA-YE) 验证



- 1、产品用途：广泛用于细菌的培养，特别用于食品中李斯特氏菌的培养。  
 2、检验原理：胰酪、多价胨和酵母膏粉提供氮源、维生素和生长因子；氯化钠维持均衡的渗透压；葡萄糖提供碳源；磷酸氢二钾为缓冲剂；琼脂是培养基的凝固剂。

表 6-5：TSA-YE 验证

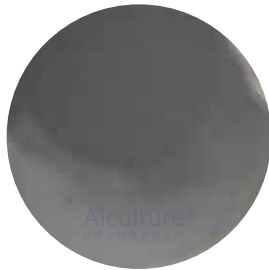
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
TSA-YE	单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115	逗点	104	104	1.0	$PR \geq 0.7$	符合
		L 品牌	95		0.9		符合
		H 品牌	100		0.9		符合

1. 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115 在 TSA-YE 板上的菌落特征：

#### 3、典型特征图片：



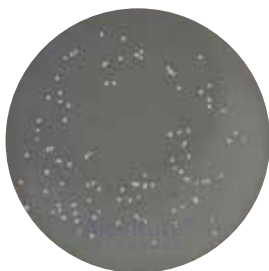
逗点 - 空白平板



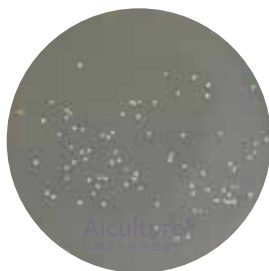
L 品牌 - 空白平板



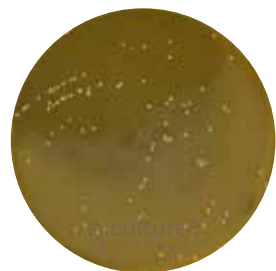
H 品牌 - 空白平板



逗点 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115



L 品牌 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115



H 品牌 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115

图 6-7

4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 PR ≥ 0.7 的要求，逗点生长率性能优于 L 品牌、H 品牌；

4.2 感观：H 品牌平板颜色较深，逗点与 L 品牌无显著差异。

附录 E

## 含 0.6% 酵母浸粉的胰酪胨大豆肉汤 (TSB-YE) 验证



1、产品用途：广泛用于细菌的培养，特别用于食品中李斯特氏菌的增菌培养。

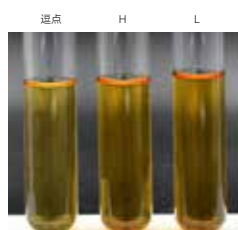
2、检验原理：胰胨、多价胨和酵母膏粉提供氮源、维生素和生长因子；氯化钠维持均衡的渗透压；葡萄糖提供碳源；磷酸氢二钾为缓冲剂；萘啶酮酸和盐酸吡啶黄为选择性抑制剂，抑制非李斯特氏菌生长。

表 6-6：TSB-YE 验证

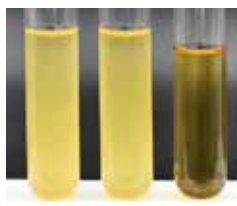
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
TSB-YE	单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115	逗点	/	89	混浊度 2	混浊度 2	符合
		L 品牌	/		混浊度 2		符合
		H 品牌	/		混浊度 2		符合

1. 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115 在 TSB-YE 板上的菌落特征：混浊度 2；

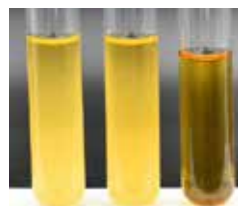
3、典型特征图片：



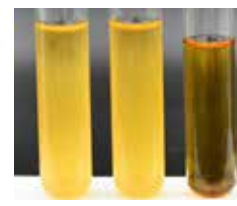
空白肉汤



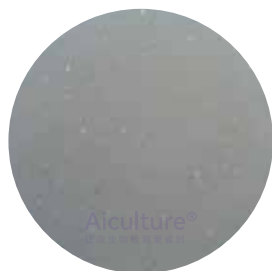
逗点 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115



L 品牌 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115



H 品牌 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115



菌液计数 - 单核细胞增生李斯特氏菌

图 6-8

4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标混浊度 2；

4.2 感观：逗点空白肉汤颜色较浅，L 品牌、H 品牌空白肉汤颜色无显著差异。



# 07 食品微生物检验志贺氏菌检验及注意事项 GB 4789.5-2012

## 一、志贺氏菌的生物学特性

志贺菌属 (*Shigella*) 是人类细菌性痢疾最为常见的病原菌, 通称痢疾杆菌, 属肠杆菌科, 革兰阴性无芽孢杆菌, 无动力, 无荚膜、无鞭毛、有菌毛, 在营养培养基上生长良好。志贺菌常寄居在人及较高等猿类的肠道里, 根据宿主的健康状况和年龄, 一般只要 10 个菌体以上就能使人致病, 其致病因素主要是侵袭力 (菌毛) 菌体内毒素以及个别菌株产生的外毒素。食品接触人员个人卫生差、从事食品加工行业人员患病或带菌者污染食品、存放已污染的食品温度不适当等是食源性志贺菌流行的最主要原因。

志贺菌属共有 A、B、C、D 四个亚群, 分别是痢疾志贺菌、福氏志贺菌、鲍氏志贺菌和宋氏志贺菌, 结合生化和血清上的各个特征可以区别四个亚群。A 群主要由不发酵甘露醇的菌组成 (有些菌株例外), 其他三个亚群的菌都发酵甘露醇。B 群中的菌在血清学上有内在联系, C 群中的菌彼此之间或与其他亚群血清上是无关的, D 群中的菌培养几天后一般能发酵乳糖和蔗糖。

## 二、检验步骤 流程图 7-1

### 三、样品处理及增菌

#### 3.1 样品的处理

以无菌操作取样 25g (mL) 加入装有灭菌 225mL 志贺氏菌增菌肉汤的均质容器中, 常用均质容器有均质杯、锥形瓶、均质袋。

均质杯: 多用于不易溶解的固体样品均质, 可将固体样品切割搅拌均匀;

均质袋: 可置于拍击式均质器中均质固体, 常用于液体的均质;

锥形瓶: 可置于摇床中, 常用于液体的均质。

#### 3.2 增菌

均质后的样品置于 41.5°C ±1°C, 厌氧培养 16h~20h。厌氧培养可使用厌氧培养箱、厌氧培养盒和厌氧培养袋等, 志贺氏菌在志贺氏菌增菌肉汤中生长浑浊。

## 四、志贺氏菌的分离

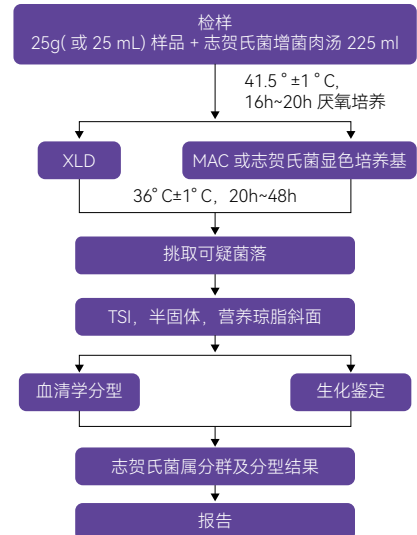
取增菌后的志贺氏菌增菌液分别划线接种于 XLD 琼脂平板和 MAC 琼脂平板或志贺氏菌显色培养基平板上, 于 36°C ±1°C 需氧培养 20h~24h。若出现的菌落不典型或菌落较小不易观察, 则继续培养至 48h 再进行观察。

#### 4.1 XLD 琼脂平板

志贺氏菌在 XLD 琼脂平板上的菌落特征为粉色至无色, 半透明、光滑、湿润、圆形、边缘整齐或不齐菌落。志贺氏菌大多不发酵木糖、乳糖和蔗糖, 可与发酵此三种糖类的细菌 (如大肠黄色菌落) 区分; 志贺氏菌不产硫化氢, 可与产硫化氢的细菌 (如大部分沙门等) 区分。

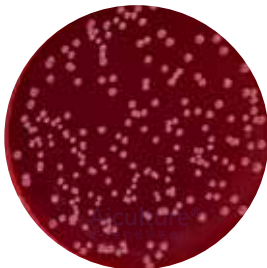
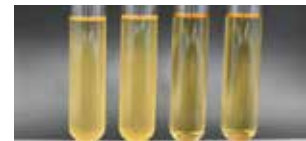
#### 4.2 MAC 或志贺氏菌显色培养基

志贺氏菌在 MAC 琼脂平板上的菌落特征为无色至浅粉红色, 半透明、光滑、湿润、圆形、边缘整齐或不齐菌落。志贺氏菌大多不发酵乳糖产碱, 故菌落颜色为红色, 可与发酵乳糖产酸 (菌落颜色为黄色, 或有胆盐沉淀环) 的细菌区分。部分宋内志贺氏菌迟缓发酵乳糖, 若培养时间过长会产生粉色菌落, 混淆结果。

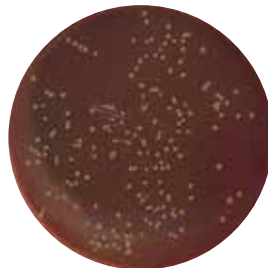


流程图 7-1 志贺氏菌检验程序

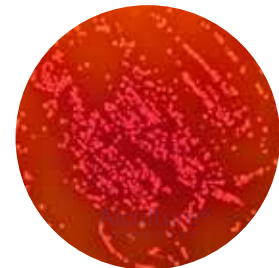
福氏志贺氏菌  
CMCC (B) 51572  
金黄色葡萄球菌  
ATCC6538



XLD 福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



逗点 MAC 福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



逗点 志贺氏菌显色培养基 痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105

图 7-1

## 五、初步生化试验

自上述选择性平板上分别挑取 2 个以上典型或可疑菌落, 分别接种三糖铁琼脂 (TSI)、半固体和营养琼脂斜面一管, 置于 36°C ±1°C 需氧培养 20h~24h。

#### 5.1 三糖铁琼脂

志贺氏菌在三糖铁琼脂 TSI 中:

- ① 斜面产碱呈红色且底层产酸呈黄色 (发酵葡萄糖, 不发酵乳糖、蔗糖);
- ② 不产气 (福氏志贺氏菌 6 型可产生少量气体);
- ③ 不产硫化氢。



逗点 TSI- ①空白 - ②大肠埃希氏菌 - ③ 肠炎沙门氏菌 - ④福氏志贺氏菌 - ⑤ 铜绿假单胞菌

## 附录 A

# 志贺氏菌增菌肉汤验证



1、产品用途：用于志贺氏菌的选择性分离和初步鉴别。

2、检验原理：胰蛋白胨提供氮源，葡萄糖提供碳源满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；

磷酸二氢钾和磷酸氢二钾是缓冲剂；吐温 80 是中和剂；新生霉素可抑制革兰氏阳性菌生长。

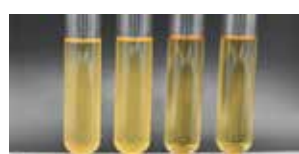
表 7-1：志贺氏菌增菌肉汤验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
志贺氏菌增菌肉汤	福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572	逗点	/	134CFU(福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572)	在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色, 半透明菌落	在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色, 半透明菌落	符合
	+ 金黄色葡萄球菌 ATCC6538	L 品牌	/	+1124CFU(金黄色葡萄球菌 ATCC6538)	在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色, 半透明菌落		符合
		H 品牌	/		在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色, 半透明菌落		符合
		逗点	/		< 1CFU	符合	
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	L 品牌	/	1124CFU	< 1CFU	在 TSA 上 < 100CFU	符合
		H 品牌	/		< 1CFU	符合	

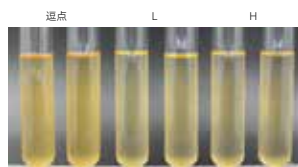
1. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在志贺氏菌增菌肉汤上的菌落特征：在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色, 半透明菌落；

2. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在志贺氏菌增菌肉汤上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；

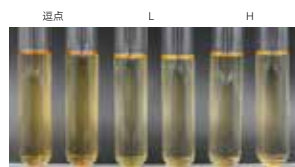
### 3、典型特征图片：



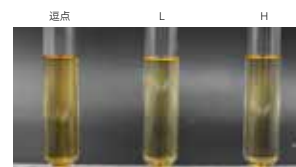
逗点志贺氏菌增菌肉汤增菌后现象



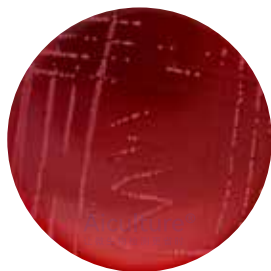
福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572+ 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 志贺氏菌增菌肉汤竞品比对



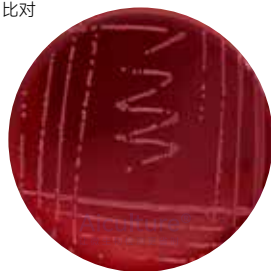
金黄色葡萄球菌 ATCC6538 志贺氏菌增菌肉汤竞品比对



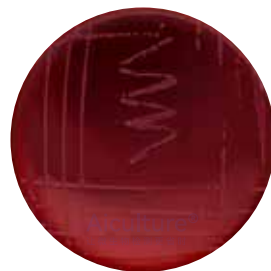
志贺氏菌增菌肉汤空白竞品比对



逗点志贺氏菌增菌肉汤混菌划线 XLD



L 品牌志贺氏菌增菌肉汤混菌划线 XLD



H 品牌志贺氏菌增菌肉汤混菌划线 XLD



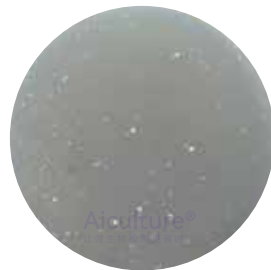
逗点 金黄色葡萄球菌倾注 TSA



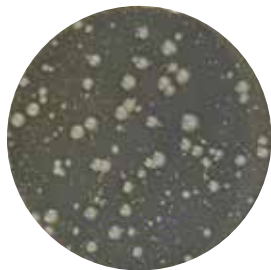
L 品牌金黄色葡萄球菌倾注 TSA



H 品牌金黄色葡萄球菌倾注 TSA



福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572 计数 TSA



金黄色葡萄球菌 ATCC6538 计数 TSA

图 7-4

### 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572+ 金黄色葡萄球菌 ATCC6538, 逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色, 半透明菌落的要求；

4.2 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC6538, 逗点、L 品牌、H 品牌均符合国标在 TSA 上 < 100CFU 要求；

4.3 外观：逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。

# 木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 验证



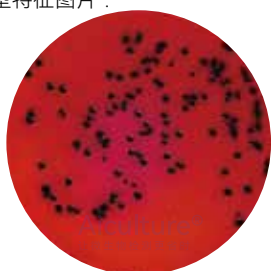
1. 产品用途：用于沙门氏菌、志贺氏菌的分离培养。
2. 检验原理：酵母膏粉提供氮源、维生素、生长因子；氯化钠维持均衡的渗透压；木糖、乳糖、蔗糖为可发酵糖类，产酸使酚红指示剂变黄；去氧胆酸钠抑制革兰氏阳性菌，但不影响沙门氏菌的生长；硫代硫酸钠可被某些细菌还原硫化氢，与柠檬酸铁铵中的铁盐生成黑色硫化铁；琼脂是培养基的凝固剂；酚红为 pH 指示剂。

表 7-2：木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 验证

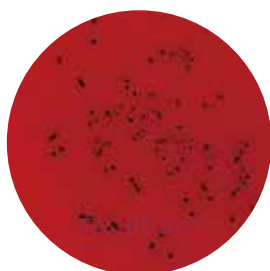
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD)	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	125	102	PR=1.2	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	84		PR=0.8		符合
		H 品牌	139		PR=1.4		符合
	福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572	逗点	209	203	PR=1.1	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	172		PR=0.8		符合
		H 品牌	193		PR=0.9		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC 25922	逗点	/	/	G=3.5	G < 5	符合
		L 品牌	/	/	G=1		符合
		H 品牌	/	/	G=5.5		不符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/	/	G=0		符合
		H 品牌	/	/	G=0		符合

1. 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 在 XLD 板上的菌落特征：黑色菌落；
2. 福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572 在 XLD 板上的菌落特征：无色菌落，无黑心；
3. 大肠埃希氏菌 ATCC 25922 在 XLD 板上的菌落特征：黄色菌落，选择性 G < 5
4. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在 XLD 上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；

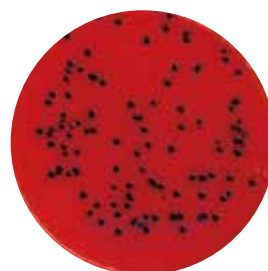
3、典型特征图片：



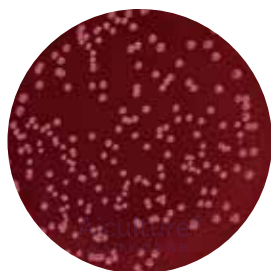
逗点鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



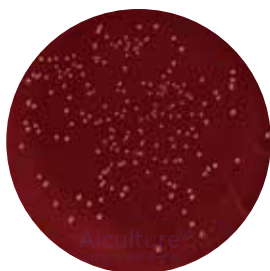
L 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



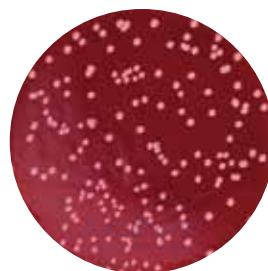
H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



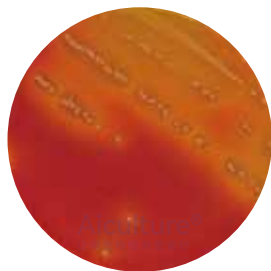
逗点福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



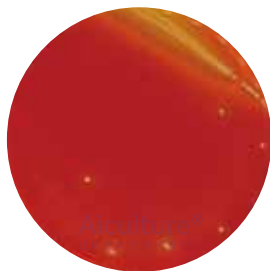
L 品牌 - 福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



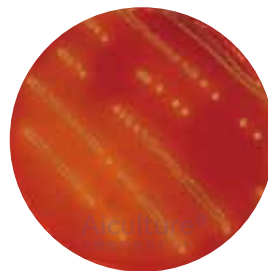
H 品牌 - 福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



逗点大肠埃希氏菌 ATCC 25922



L 品牌 - 肠埃希氏菌 ATCC 25922



H 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC 25922



逗点金黄色葡萄球菌 ATCC6538



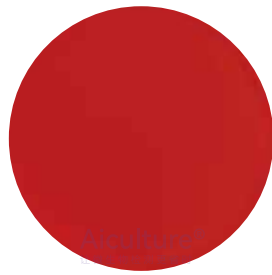
L 品牌 - 黄色葡萄球菌 ATCC6538



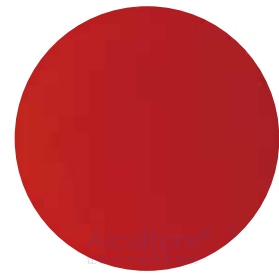
H 品牌 - 黄色葡萄球菌 ATCC653



逗点木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 空白



L 品牌 - 木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 空白



H 品牌 - 木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 空白

图 7-5

#### 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 PR ≥ 0.7 的要求。H 品牌菌落生长速度更快，菌落特征更明显，L 品牌生长速度较缓慢；

4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC 25922，逗点、L 品牌均满足国标 G < 5 的要求，H 品牌 G=5.5，不满足国标要求；金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 G ≤ 1 的要求；

4.3 感官：三家平板颜色无显著差异。

4.4 生长性能，逗点和 H 品牌优于 L 品牌。特异性上（特别是对大肠的抑制）L 品牌更好。

### 附录 C

## 麦康凯琼脂 (MAC) 验证



1. 产品用途：用于志贺氏菌的选择性分离

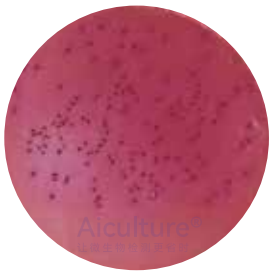
2. 检验原理：蛋白胨提供碳氮源；乳糖为可发酵的糖类；3 号胆盐和结晶紫可抑制革兰氏阳性菌的生长；氯化钠维持均衡的渗透压；中性红是 pH 指示剂，细菌发酵乳糖产酸时菌落呈粉红色，并在菌落周围出现胆盐沉淀的浑浊圈。琼脂是培养基的凝固剂。

表 7-3：麦康凯琼脂 (MAC) 验证

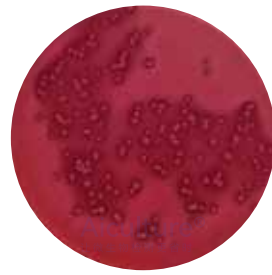
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
麦康凯琼脂 (MAC)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	170	142	PR=1.2	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	158		PR=1.1		符合
		H 品牌	111		PR=0.8		符合
	福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572	逗点	216	203	PR=1.2	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	265		PR=1.3		符合
		H 品牌	234		PR=1.1		符合
金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合	
	L 品牌	/	/	G=0		符合	
	H 品牌	/	/	G=0		符合	

1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 MAC 板上的菌落特征：鲜桃红色或粉红色，可有胆酸沉淀；
2. 福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572 在 MAC 板上的菌落特征：无色至浅粉红色，半透明棕色或绿色菌落；
3. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在 MAC 板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；

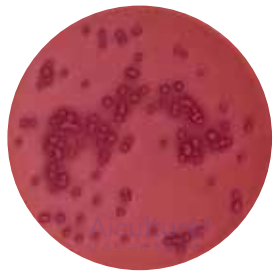
#### 3、典型特征图片：



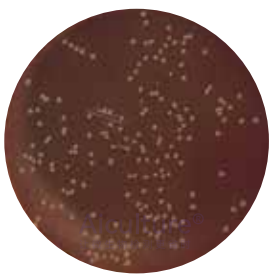
逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



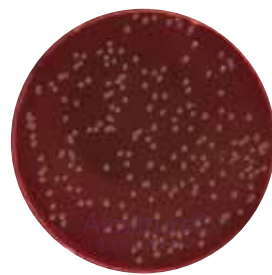
L 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



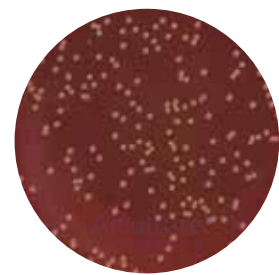
H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



L 品牌福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



H 品牌福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572

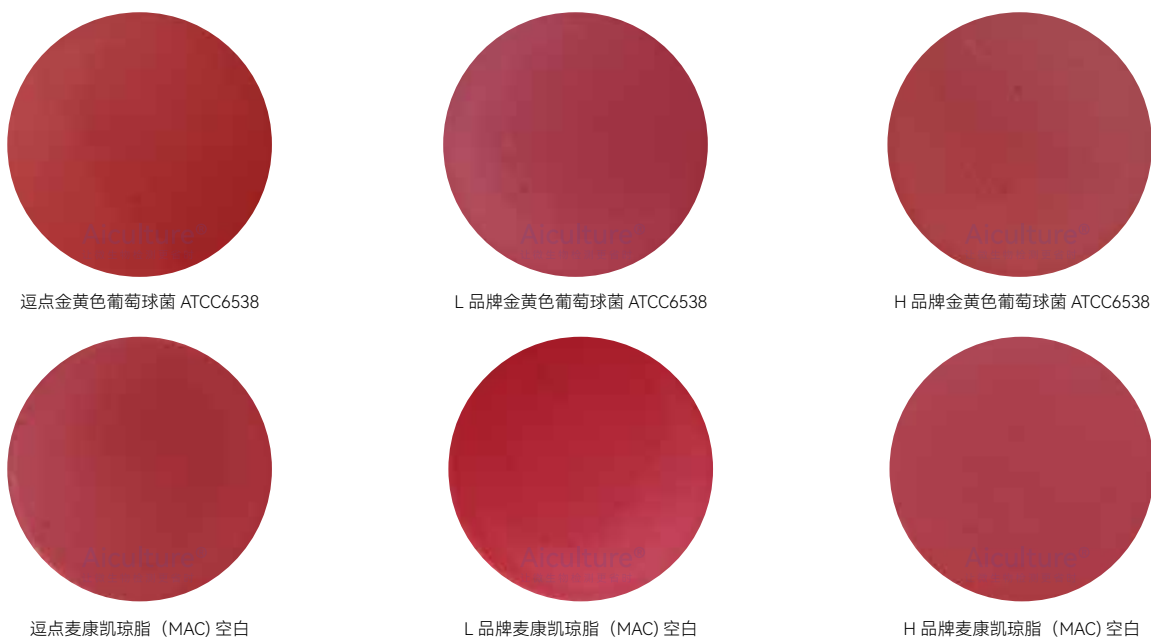


图 7-6

#### 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 PR ≥ 0.5 的要求，H 品牌、L 品牌有明显胆酸盐沉淀，目标菌落较大，逗点无胆酸盐沉淀，标菌落较小；福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572，逗点、品牌、H 品牌均满足国标 PR ≥ 0.5 的要求。

4.2 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、品牌、H 品牌均满足国标 G ≤ 1 的要求。

4.3 感观：三家平板颜色无显著差异。

## 附录 D

### 志贺氏菌显色培养基验证



1. 产品用途：用于志贺氏菌的选择性分离和初步鉴别。

2. 检验原理：蛋白胨和酵母膏粉提供碳氮源和微量元素；氯化钠可维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂；抑制剂抑制杂菌的生长；酚红是 pH 指示剂，发酵糖产酸的菌呈黄色；混合色素对应的酶发生特异性反应，水解底物，释放出显色基团。

表 7-4：志贺氏菌显色培养基验证

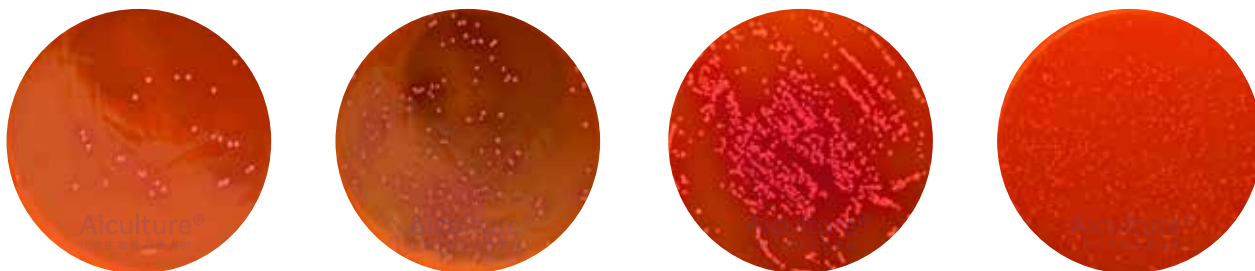
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
志贺氏菌显色培养基	福氏志贺氏菌	逗点	32	67	PR=0.5	PR ≥ 0.5	符合
	CMCC(B)51572	H 品牌	136		PR=2.0	PR ≥ 0.5	符合
	痢疾志贺氏菌	逗点	264		PR=1.3	PR ≥ 0.5	符合
	CMCC(B)51105	H 品牌	431	233	PR=1.8	PR ≥ 0.5	符合
	产气肠杆菌	逗点	/	/	蓝绿色菌落，周围培养基变黄	蓝绿色菌落，周围培养基变黄	符合
	ATCC13048	H 品牌	/	/	绿色菌落，无环和沉淀圈	绿色菌落，无环和沉淀圈	符合
	大肠埃希氏菌	逗点	/	/	蓝绿色菌落，周围培养基变黄	蓝绿色菌落，周围培养基变黄	符合
	ATCC25922	H 品牌	/	/	黄色菌落，有清晰环，无色素沉淀圈	黄色菌落，有清晰环，无色素沉淀圈	符合
	金黄色葡萄球菌	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
	ATCC 6538	H 品牌	/	/	G=0	G ≤ 1	符合

1. 生长率：逗点福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572、痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105 在志贺氏菌显色板上的菌落特征：白色菌落，周围培养基紫红色；H 品牌福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572、痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105 在志贺氏菌显色板上的菌落特征：白色至粉红色的菌落，周围培养基变为红色；

2. 特异性：逗点产气肠杆菌 ATCC13048、大肠埃希氏菌 ATCC25922 在志贺氏菌显色板上的菌落特征：蓝绿色菌落，周围培养基变黄；H 品牌产气肠杆菌 ATCC13048 在志贺氏菌显色板上的菌落特征：绿色菌落，无环和沉淀圈；H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922 在志贺氏菌显色板上的菌落特征黄色菌落，有清晰环，无色素沉淀圈；

3. 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 在志贺氏菌显色板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；

#### 3、典型特征图片：

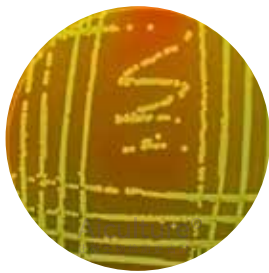


逗点福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572

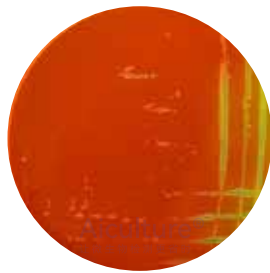
H 品牌福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572

逗点痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105

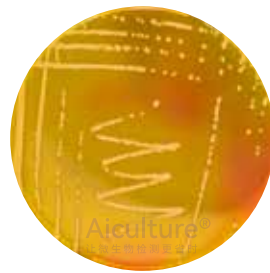
H 品牌痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105



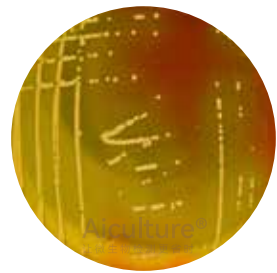
逗点产气肠杆菌 ATCC13048



H 品牌产气肠杆菌 ATCC13048



逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



逗点志贺氏菌显色培养基空白



H 品牌志贺氏菌显色培养基空白

图 7-7

#### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572、痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105 逗点、H 品牌均满足国标 PR ≥ 0.5 的要求。H 品牌菌落生长速度更快；
- 4.2 选择性：逗点、H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538，逗点、H 品牌均满足国标 G ≤ 1 的要求；
- 4.3 特异性：产气肠杆菌 ATCC13048、痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105 逗点、H 品牌均满足菌落颜色特征要求。
- 4.4 感观：两家平板颜色无显著差异。
- 4.5 2 家产品无明显差异，都满足国标。

### 附录 E

## 三糖铁琼脂 (TSI) 验证



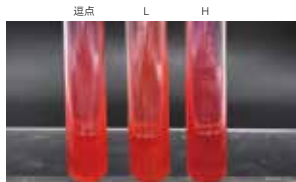
- 1、产品用途：用于鉴别肠道菌发酵蔗糖、乳糖、葡萄糖及产生硫化氢的生化反应。
- 2、检验原理：胨、牛肉浸出粉提供氮源、维生素、矿物质；乳糖、葡萄糖、蔗糖为可发酵糖类，其产酸时通过酚磺酞指示剂测出，酸性呈黄色，碱性呈红色；硫代硫酸钠可被某些细菌还原为硫化氢，与硫酸亚铁中的铁盐生成黑色硫化铁；氯化钠维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂。

表 7-5：三糖铁琼脂 (TSI) 验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢	生长良好, A/A 产气 不产硫化氢	符合
	L 品牌	/	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢		符合
	H 品牌	/	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢		符合
肠炎沙门氏菌 CMCC (B) 50335	逗点	/	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢	生长良好, K/A 产气 产硫化氢	符合
	L 品牌	/	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢		符合
	H 品牌	/	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢		符合
福氏志贺氏菌 ATCC12022	逗点	/	/	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢	生长良好, K/A; 不 产气; 不产硫化氢	符合
	L 品牌	/	/	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢		符合
	H 品牌	/	/	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢		符合
铜绿假单胞菌 ATCC27853	逗点	/	/	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢	生长良好, K/K; 不 产气; 不产硫化氢	符合
	L 品牌	/	/	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢		符合
	H 品牌	/	/	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢		符合

- 1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在三糖铁琼脂 (TSI) 上生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢; 2. 肠炎沙门氏菌 CMCC (B) 50335 生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢;
- 3. 福氏志贺氏菌 ATCC12022 生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢; 4. 铜绿假单胞菌 ATCC27853 生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢;

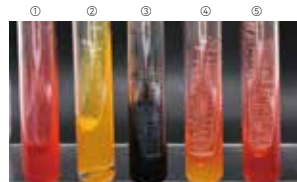
#### 3、典型特征图片：



空白



逗点 TSI-①空白-②大肠埃希氏菌-③肠炎沙门氏菌-④福氏志贺氏菌-⑤铜绿假单胞菌



L 品牌 TSI-①空白-②大肠埃希氏菌-③肠炎沙门氏菌-④福氏志贺氏菌-⑤铜绿假单胞菌



H 品牌 TSI-①空白-②大肠埃希氏菌-③肠炎沙门氏菌-④福氏志贺氏菌-⑤铜绿假单胞菌

图 7-8

#### 4、验证结果小结：

- 4.1 生化特性：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922、肠炎沙门氏菌 CMCC (B) 50335、福氏志贺氏菌 ATCC12022、铜绿假单胞菌 ATCC27853 生长特性均符合国标要求；
- 4.2 感观：逗点、L 品牌、H 品牌空白管无明显差异。
- 4.3 三家产品无明显差别，在肠炎沙门氏菌上，L 品牌更优秀 - 黑色菌更明显。

# 08 食品微生物副溶血性弧菌检验及注意事项 GB 4789.7-2013

## 一、副溶血性弧菌的生物学特性

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 属于弧菌科弧菌属, 革兰氏阴性, 无芽孢, 呈弧状、杆状、卵圆状等多种形态, 单端鞭毛; 兼性厌氧菌, 嗜盐、对葡萄糖、甘露醇、麦芽糖等发酵产酸。

### 流行病学特征

主要存在于温带地区海水、海水沉积物和鱼虾、贝类等海产品中, 是沿海国家及地区食品中毒的主要致病菌, 主要污染水产制品或交叉污染肉制品等其他食品, 人食用这些生、半生或交叉污染的海产品可能导致急性肠胃炎、关节炎等, 有时甚至引起原发性败血症。

## 二、检验步骤

### 三、操作步骤

#### 3.1 样品制备

3.1.1 非冷冻样品采集后应立即置 7℃~10℃冰箱保存, 尽可能及早检验; 冷冻样品应在 45℃以下不超过 15 min 或在 2℃~5℃不超过 18 h 解冻。

3.1.2 鱼类和头足类动物取表面组织、肠或鳃。贝类取全部内容物, 包括贝肉和体液; 甲壳类取整个动物, 或者动物的中心部分, 包括肠和鳃。如为带壳贝类或甲壳类, 则应先在自来水中洗刷外壳并用干表面水分, 然后以无菌操作打开外壳, 按上述要求取相应部分。

3.1.3 以无菌操作取样品 25 g (mL), 加入 3% 氯化钠碱性蛋白胨水 225 mL, 用旋转刀片式均质器以 8 000 r/min 均质 1 min, 或拍击式均质器拍击 2 min, 制备成 1:10 的样品匀液。如无均质器, 则将样品放入无菌乳钵, 自 225 mL 3% 氯化钠碱性蛋白胨水中取少量稀释液加入无菌乳钵, 样品磨碎后放入 500 mL 无菌锥形瓶, 再用少量稀释液冲洗乳钵中的残留样品 1~2 次, 洗液放入锥形瓶, 最后将剩余稀释液全部放入锥形瓶, 充分振荡, 制备 1:10 的样品匀液。

### 三、操作步骤

#### 3.1 样品制备

3.1.1 非冷冻样品采集后应立即置 7℃~10℃冰箱保存, 尽可能及早检验; 冷冻样品应在 45℃以下不超过 15 min 或在 2℃~5℃不超过 18 h 解冻。

3.1.2 鱼类和头足类动物取表面组织、肠或鳃。贝类取全部内容物, 包括贝肉和体液; 甲壳类取整个动物, 或者动物的中心部分, 包括肠和鳃。如为带壳贝类或甲壳类, 则应先在自来水中洗刷外壳并用干表面水分, 然后以无菌操作打开外壳, 按上述要求取相应部分。

3.1.3 以无菌操作取样品 25 g (mL), 加入 3% 氯化钠碱性蛋白胨水 225 mL, 用旋转刀片式均质器以 8 000 r/min 均质 1 min, 或拍击式均质器拍击 2 min, 制备成 1:10 的样品匀液。如无均质器, 则将样品放入无菌乳钵, 自 225 mL 3% 氯化钠碱性蛋白胨水中取少量稀释液加入无菌乳钵, 样品磨碎后放入 500 mL 无菌锥形瓶, 再用少量稀释液冲洗乳钵中的残留样品 1~2 次, 洗液放入锥形瓶, 最后将剩余稀释液全部放入锥形瓶, 充分振荡, 制备 1:10 的样品匀液。

#### 3.2 增菌

##### 3.2.1 定性检测

将 3.1.3 制备的 1:10 样品匀液于 36℃±1℃培养 8 h~18 h。

##### 3.2.2 定量检测

3.2.2.1 用无菌吸管吸取 1:10 样品匀液 1 mL, 注入含有 9 mL 3% 氯化钠碱性蛋白胨水的试管内, 振摇试管混匀, 制备 1:100 的样品匀液。

3.2.2.2 另取 1 mL 无菌吸管, 按 5.2.2.1 操作程序, 依次制备 10 倍系列稀释样品匀液, 每递增稀释一次, 换用一支 1 mL 无菌吸管。

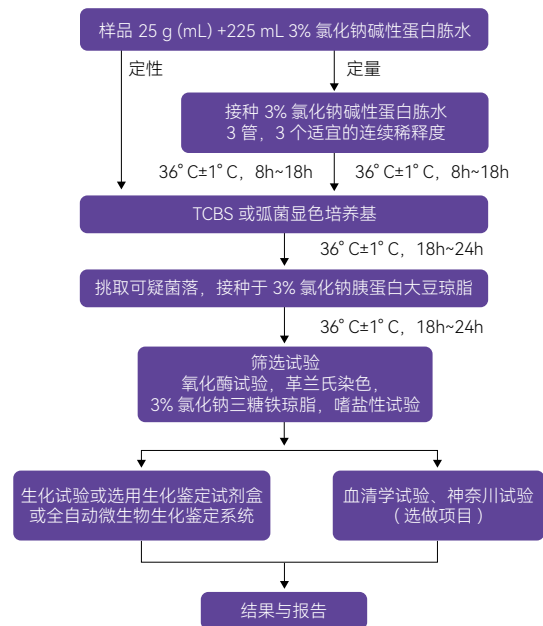
3.2.2.3 根据对检样污染情况的估计, 选择 3 个适宜连续稀释度, 每个稀释度接种 3 支含有 9 mL 3% 氯化钠碱性蛋白胨水的试管, 每管接种 1 mL。置 36℃±1℃恒温箱内, 培养 8 h~18 h。

##### 3.3、分离培养

对所有显示生长的增菌液, 用接种环在距离液面以下 1cm 内沾取一环增菌液, 于 TCBS 平板或弧菌显色培养基平板上划线分离。一支试管划线一块平板。于 36℃±1℃培养 18 h~24 h。典型的副溶血性弧菌在 TCBS 上呈圆形、半透明、表面光滑的绿色菌落, 用接种环轻触, 有类似口香糖的质感, 直径 2mm~3mm。从培养箱取出 TCBS 平板后, 应尽快 (不超过 1h) 挑取菌落或标记要挑取的菌落。典型的副溶血性弧菌在弧菌显色培养基上的特征按照产品说明进行判定。

3.3.1、氧化酶试验: 挑选纯培养的单个菌落进行氧化酶试验, 副溶血性弧菌为氧化酶阳性。

3.3.2、涂片镜检: 将可疑菌落涂片, 进行革兰氏染色, 镜检观察形态。副溶血性弧菌为革兰氏阴性, 呈棒状、弧状、卵圆状等多种形态, 无芽孢, 有鞭毛。



流程图 8-1 副溶血性弧菌检验程序

3.3.3、挑取纯培养的单个可疑菌落，转种 3% 氯化钠三糖铁琼脂斜面并穿刺底层，36°C ±1°C 培养 24h 观察结果。副溶血性弧菌在 3% 氯化钠三糖铁琼脂中的反应为底层变黄不变黑，无气泡，斜面颜色不变或红色加深，有动力。

3.3.4、嗜盐性试验：挑取纯培养的单个可疑菌落，分别接种 0%、6%、8% 和 10% 不同氯化钠浓度的胰胨水，36°C ±1°C 培养 24h，观察液体混浊情况。副溶血性弧菌在无氯化钠和 10% 氯化钠的胰胨水中不生长或微弱生长，在 6% 氯化钠和 8% 氯化钠的胰胨水中生长旺盛，继续进行下列有关试验。

3.3.5、生化试验：取纯培养物分别接种含 3% 氯化钠的甘露醇试验培养基、赖氨酸脱羧酶试验培养基、MR-VP 培养基，36°C ±1°C 培养 24h ~ 48h 后观察结果；3% 氯化钠三糖铁琼脂隔夜培养物进行 ONPG 试验。

#### 操作注意事项

- 1、样本在收集后应该立即被冷却 (7~10°C)，然后尽快检验，
- 2、带贝壳类或甲壳类样品前处理时，应先在符合生活饮用水卫生标准的流水中洗刷外壳并甩干表面水分，然后以无菌操作打开外壳后取样；
- 3、注意分离时所选增菌液的部分，副溶血性弧菌在 3% 氯化钠碱性蛋白胨水中增菌后呈均匀混浊生长，培养基表面容易形成菌膜，分离时，要求“液面以下 1cm 内”在这个范围内，应该目标菌最多、没有干扰的区域；
- 4、一般样品中含有多种弧菌比较常见，分离时一定要在平板上多级稀释划线，不要一条线划线到底，培养出来发现没有分开。

#### 3.4 培养基原理解析

##### 3% 氯化钠碱性蛋白胨水

蛋白胨提供碳源、氮源、维生素、生长因子；高含量氯化钠和高 pH 值可以抑制非弧菌类细菌生长，不影响副溶血性弧菌生长。

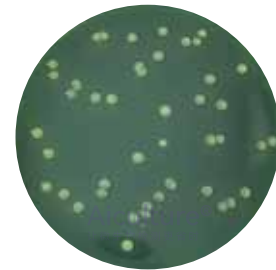
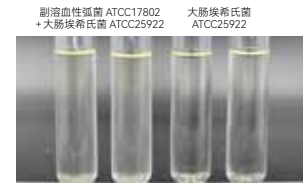
##### 3.5 硫代硫酸盐 - 柠檬酸盐 - 胆盐 - 蔗糖 (TCBS) 琼脂

· 配方中多价蛋白胨、酵母膏粉提供碳氮源、维生素和生长因子；氯化钠可刺激弧菌的生长；蔗糖是可发酵的糖类；胆酸钠、牛胆汁粉、硫代硫酸钠和柠檬酸钠及较高的 pH 可抑制革兰氏阳性菌和大肠菌群；硫代硫酸钠与柠檬酸铁反应作为检测硫化氢产生的指示剂；溴麝香草酚蓝和麝香草酚蓝是 pH 指示剂；琼脂是培养基的凝固剂。

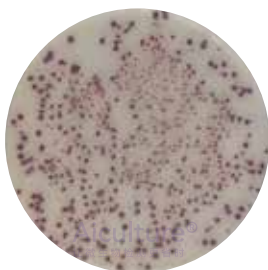
· 副溶血性弧菌不发酵蔗糖，不会使培养基 pH 降低，因而在该培养基上为绿色菌落，创伤和拟态弧菌都不发酵蔗糖，需进一步确证鉴定，霍乱弧菌发酵蔗糖为黄色。

##### 3.6 弧菌显色培养基

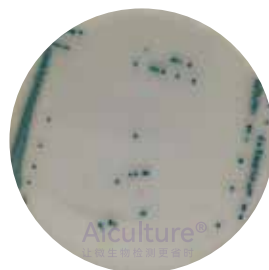
· 配方中蛋白胨和酵母膏粉提供氮源、维生素、氨基酸和碳源；蔗糖为可发酵的糖类；抑菌剂抑制大部分非弧菌细菌，氯化钠可维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂；混合色素与副溶血性弧菌、霍乱弧菌和创伤弧菌所对应的酶发生特异性反应，水解底物，释放出显色基团，在淡黄色平板上产生品红色菌落（副溶血性弧菌）和绿 - 蓝绿色的菌落（霍乱弧菌和创伤弧菌）。



副溶血性弧菌 - 蓝绿色呈圆形、半透明、表面光滑的绿色菌落，H<sub>2</sub>S 阴性



副溶血性弧菌 ATCC17802



霍乱弧菌 VbO



副溶血性弧菌 ATCC17802

图 8-1

##### 3.7 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂

· 胰蛋白胨、大豆蛋白胨提供氮源、维生素、生长因子；高含量氯化钠可以抑制非弧菌类细菌生长，不影响副溶血性弧菌生长；琼脂为凝固剂。

##### 3.8 氧化酶试验

原理：氧化酶使细胞色素 C 氧化，氧化型细胞色素 C 再氧化对苯二胺试剂形成紫色复合物，产生颜色反应。

操作：滴加 1 滴氧化酶试剂到一小块洁净滤纸上，用玻棒或接种环（铂或塑料）挑取适量新鲜菌苔涂在试剂润湿的纸片上；30 秒内出现蓝紫色为阳性，延迟反应或无颜色变化为阴性

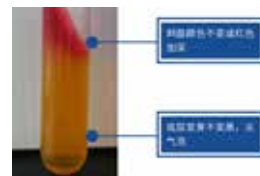


阳性

阴性

### 3.9 3%氯化钠三糖铁琼脂

· 蛋白胨、牛肉膏粉提供氮源、维生素、矿物质；乳糖、葡萄糖、蔗糖为可发酵糖类，其产酸时通过酚红指示剂测出，酸性呈黄色，碱性呈红色；硫代硫酸钠可被某些细菌还原为硫化氢，与硫酸亚铁中的铁盐生成黑色硫化铁；较高含量的氯化钠维持弧菌均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂。



副溶血性弧菌在 3%氯化钠三糖铁琼脂上的特征  
图 8-4

## 附录 A

# 3% 氯化钠碱性蛋白胨水验证

- 1、产品用途：用于副溶血性弧菌增菌培养。
- 2、检验原理：蛋白胨提供碳源、氮源、维生素、生长因子；高含量氯化钠和高 pH 值可以抑制非弧菌类细菌生长，不影响副溶血性弧菌生长。



表 8-1：3% 氯化钠碱性蛋白胨水验证。

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
3% 氯化钠碱性蛋白胨水	副溶血性弧菌 ATCC17802 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	113CFU(副溶血性弧菌 ATCC17802)	在弧菌显色培养基平板上 > 10CFU, 品红色菌落	在弧菌显色培养基平板上 > 10CFU, 品红色菌落	符合
		L 品牌	/	+2367CFU(大肠埃希氏菌 ATCC25922)	在弧菌显色培养基平板上 > 10CFU, 品红色菌落		符合
		H 品牌	/		在弧菌显色培养基平板上 > 10CFU, 品红色菌落		符合
		逗点	/		5CFU		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	L 品牌	/	2367CFU	多不可计	在 TSA 上 < 100CFU	不符合
		H 品牌	/		多不可计		不符合

1. 副溶血性弧菌 ATCC17802 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 3% 氯化钠碱性蛋白胨水上的菌落特征：品红色菌落；
2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 3% 氯化钠碱性蛋白胨水上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；

### 3、典型特征图片：

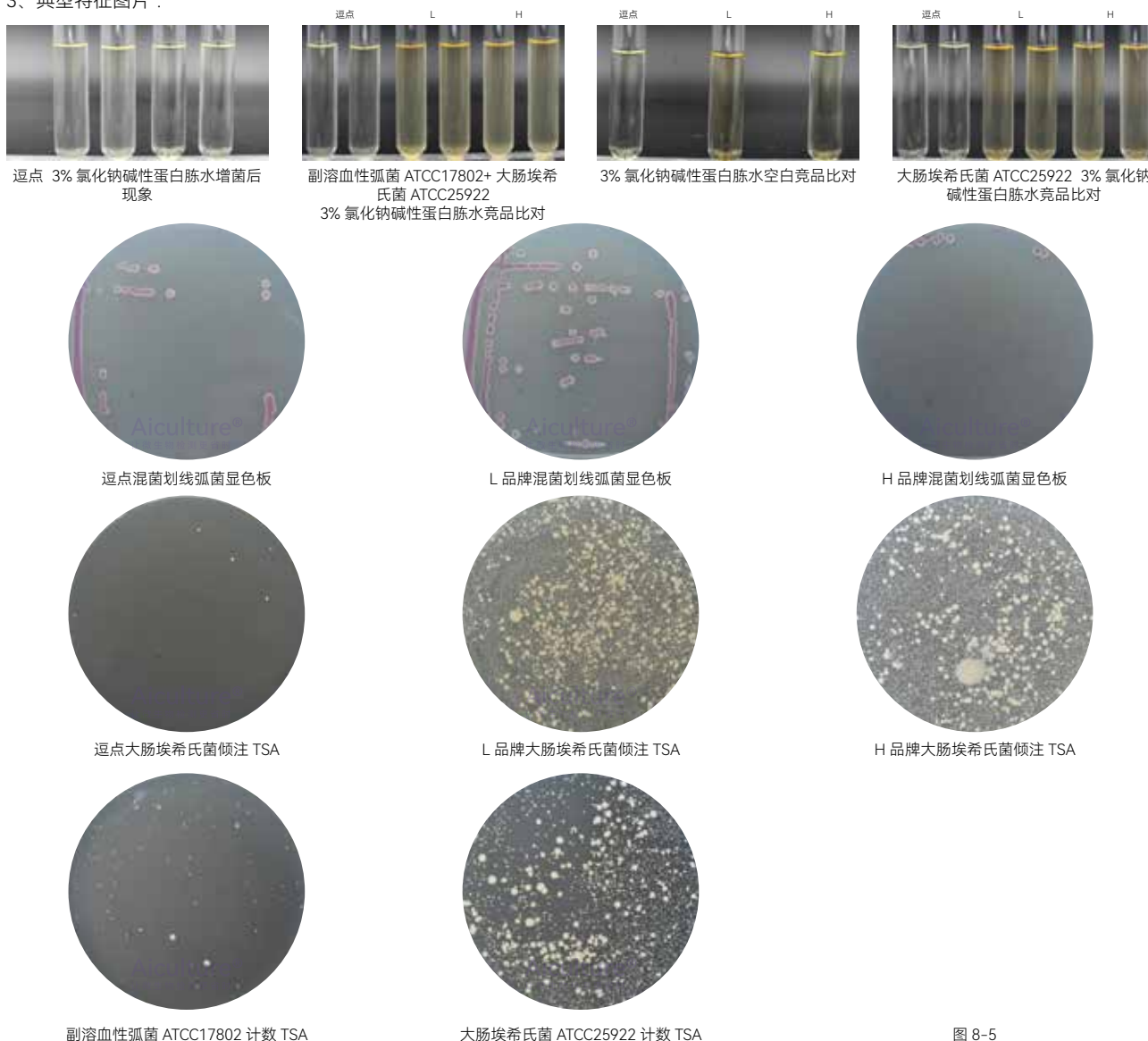


图 8-5

#### 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌副溶血性弧菌 ATCC17802，L 品牌、H 品牌、逗点均满足国标在弧菌显色培养基平板上 > 10CFU，品红色菌落。L 品牌目标菌生长率最好，H 品牌最差，逗点生长率在 L 品牌、H 品牌之间。

4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点均符合国标在 TSA 上 < 100CFU 要求，L 品牌、H 品牌不符合国标在 TSA 上 < 100CFU 要求。

## 附录 B

# 弧菌显色培养基验证



1. 产品用途：用于弧菌特别是副溶血性弧菌的分离和初步鉴定。

2. 检验原理：蛋白胨和酵母膏粉提供氮源、维生素、氨基酸和碳源；蔗糖为可发酵的糖类；抑菌剂抑制大部分非弧菌细菌，氯化钠可维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂；混合色素与副溶血性弧菌、霍乱弧菌和创伤弧菌所对应的酶发生特异性反应，水解底物，释放出显色基团，在淡黄色平板上产生品红色菌落（副溶血性弧菌）和绿 - 蓝绿色的菌落（霍乱弧菌和创伤弧菌）。

表 8-2：弧菌显色培养基验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定	
弧菌显色培养基	副溶血性弧菌 ATCC17802	逗点	442	308	PR=1.4	PR ≥ 0.5	符合	
		H 品牌	389		PR=1.3		符合	
		霍乱弧菌 VbO	逗点	/	/	蓝绿色菌落	/	符合
			H 品牌	/	/	蓝色菌落	/	符合
		溶藻弧菌	逗点	/	/	白色菌落	/	符合
		ATCC33787	H 品牌	/	/	无色，不扩散	/	符合
		大肠埃希氏菌	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		ATCC25922	H 品牌	/	/	G=0		符合

1. 逗点副溶血性弧菌 ATCC17802 在弧菌显色板上的菌落特征：呈紫红色菌落，生长良好；H 品牌副溶血性弧菌 ATCC17802 在弧菌显色板上的菌落特征：品红色菌落；

2. 逗点霍乱弧菌 VbO 在弧菌显色板上的菌落特征：蓝绿色菌落；H 品牌霍乱弧菌 VbO 在弧菌显色板上的菌落特征：蓝色菌落；

3. 逗点溶藻弧菌 ATCC33787 在弧菌显色板上的菌落特征：白色菌落；H 品牌溶藻弧菌 ATCC33787 在弧菌显色板上的菌落特征：无色，不扩散；

4. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在弧菌显色板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；

#### 3、典型特征图片：

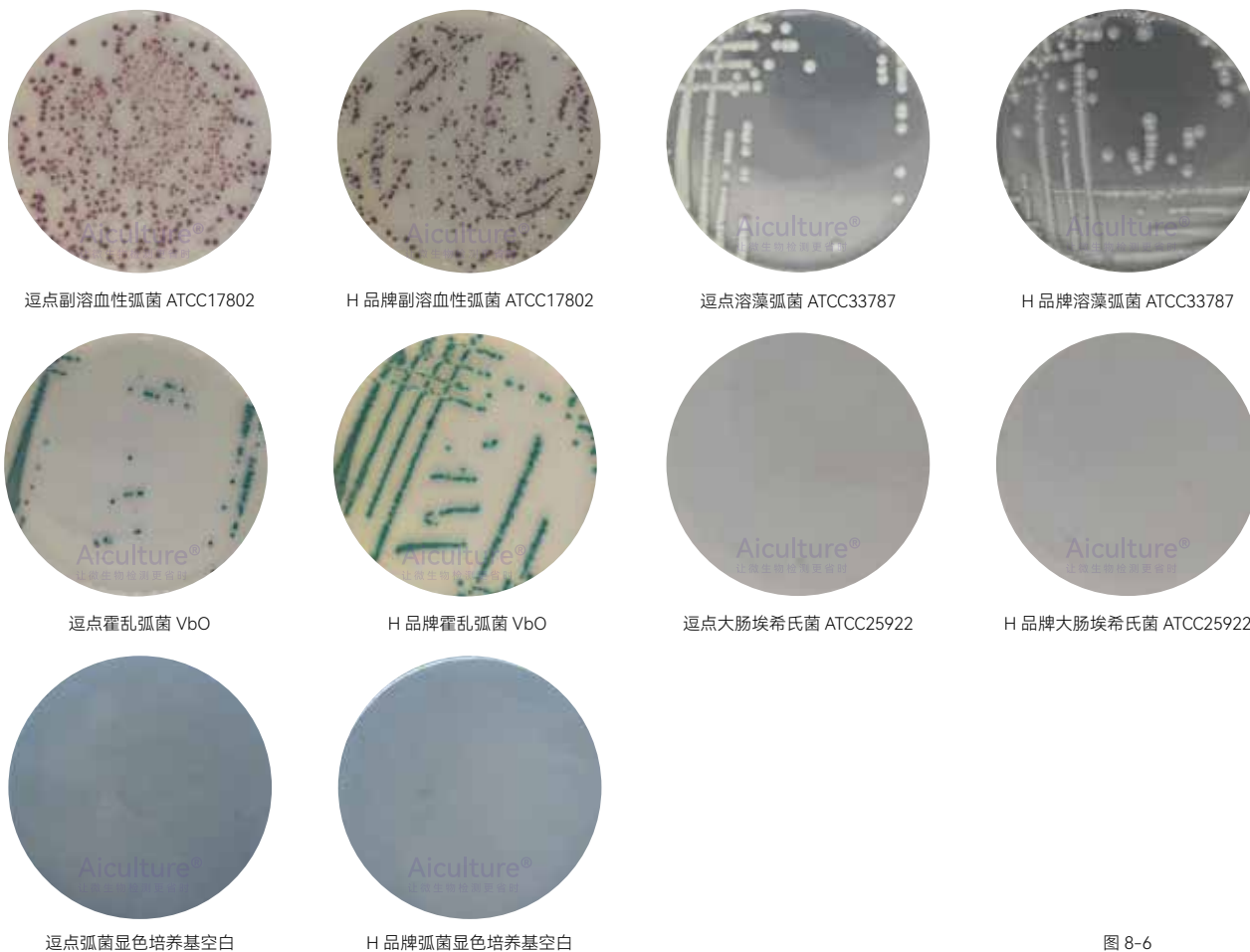


图 8-6

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌副溶血性弧菌 ATCC17802、逗点、H 品牌均满足国标 PR ≥ 0.7 的要求。H 品牌菌落生长速度更快；
- 4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、H 品牌均满足国标 G ≤ 1 的要求；
- 4.3 特异性：霍乱弧菌 VbO、溶藻弧菌 ATCC33787 逗点、H 品牌均满足菌落颜色特征要求
- 4.4 感观：两家平板颜色无显著差异。

附录 C

## 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂培养基验证



- 1. 产品用途：用于副溶血性弧菌的培养。
- 2. 检验原理：胰蛋白胨、大豆蛋白胨提供氮源、维生素、生长因子；高含量氯化钠可以抑制非弧菌类细菌生长，不影响副溶血性弧菌生长；琼脂为凝固剂。

表 8-3：3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂培养基验证

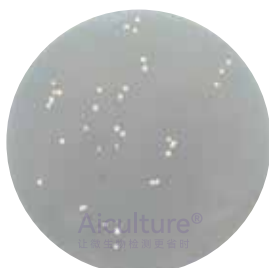
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂培养基	副溶血性弧菌 ATCC17802	逗点	79	62	PR=1.3	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	44		PR=0.7		符合
		H 品牌	92		PR=1.5		符合
	创伤弧菌落 ATCC 27562	逗点	312	370	PR=0.8	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	490		PR=1.3		符合
		H 品牌	450		PR=1.2		符合

- 1. 副溶血性弧菌 ATCC17802 在 3%TSA 板上的菌落特征：生长率 PR ≥ 0.7；
- 2. 创伤弧菌落 ATCC 27562 在 3%TSA 板上的菌落特征：生长率 PR ≥ 0.7；

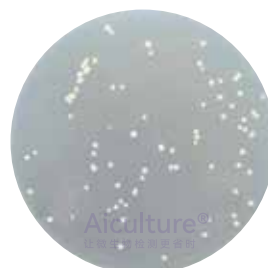
3、典型特征图片：



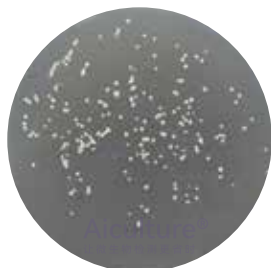
逗点副溶血性弧菌 ATCC17802



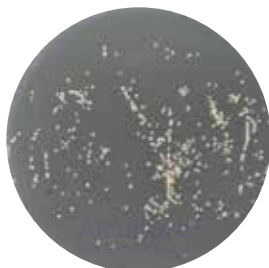
L 品牌副溶血性弧菌 ATCC17802



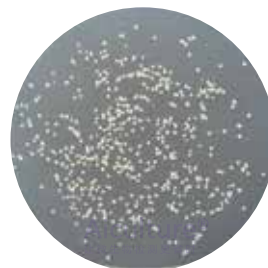
H 品牌副溶血性弧菌 ATCC17802



逗点创伤弧菌落 ATCC 27562



L 品牌创伤弧菌落 ATCC 27562



H 品牌创伤弧菌落 ATCC 27562



逗点 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂空白



L 品牌 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂空白



H 品牌 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂空白

图 8-7

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌副溶血性弧菌 ATCC17802、创伤弧菌落 ATCC 27562，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 PR ≥ 0.7 的要求；
- 4.2 感观：三家平板颜色无显著差异。

# 09 食品微生物致泻大肠埃希氏菌检验及注意事项 GB 4789.6-2016

## 一、概述

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 隶属于肠杆菌科, 为革兰阴性短小杆菌, 多数菌株具有周生鞭毛, 能运动, 无芽胞, 兼性厌氧。能发酵多种糖类, 产酸、产气。大肠埃希菌是人类和动物肠道中的正常栖居菌, 其代谢活动能够抑制肠道内分解蛋白质的微生物的生长, 减少蛋白质分解产物对人体的危害, 还能够合成维生素 B 和维生素 K 供机体利用, 同时也能够合成具有杀菌作用的大肠杆菌素, 抑制腐败菌、致病菌和真菌的增殖。20 世纪中叶, 人们发现大肠埃希菌中的一些特殊血清型能够引起人类和动物疾病, 尤其是对于免疫力低下者, 常引起严重腹泻、败血症和溶血性尿毒综合征 (HUS) 等疾病, 这类大肠埃希菌统称为致泻大肠埃希菌 (又称致病性大肠埃希菌)。根据毒力因子、致病机制和流行病学特征, 世界上公认的致泻大肠埃希菌致病型别主要分为 5 类: 肠道致病性大肠埃希菌 (Enteropathogenic *E.coli*, EPEC)、肠道侵袭性大肠埃希菌 (Enteroinvasive *E.coli*, EIEC)、产肠毒素大肠埃希菌 (Enterotoxigenic *E.coli*, ETEC)、产志贺毒素大肠埃希菌 (Shigatoxin-producing *E.coli*, STEC) 和肠道集聚性大肠埃希菌 (Enterotoxigenic *E.coli*, EAEC)。

EPEC 是指能够引起宿主肠黏膜上皮细胞黏附及擦拭性损伤, 且不产生志贺毒素的大肠埃希菌。该菌是婴幼儿腹泻的主要病原菌, 有高度传染性, 严重者可致死。EPEC 的致病机制包括局限性黏附、信号传导和紧密黏附。其中, 局限性黏附由存在于 EAF 质粒上的束状菌毛基因 *bfp* 介导; 位于 LEE 毒力岛上的 III 型分泌系统编码基因 *esc* 参与信号传导, 引起微绒毛结构消失; 而紧密黏附由外膜蛋白紧密素介导, 紧密素由 *eae* 基因编码。

EIEC 是指能够侵入肠道上皮细胞而引起痢疾样腹泻的大肠埃希菌。该菌不像典型的大肠埃希菌, 无动力、不发生赖氨酸脱羧反应、不发酵乳糖, 生化反应和抗原结构均近似痢疾志贺菌。侵入上皮细胞的关键基因是侵袭性质粒上的抗原编码基因及其调控基因, 如 *ipaH* 基因、*ipaR* 基因 (又称为 *invE* 基因)。

ETEC 是指能够分泌热稳定性肠毒素或 (和) 热不稳定性肠毒素的大肠埃希菌。热稳定性肠毒素按照来源不同分为猪源热稳定性肠毒素和人类热稳定性肠毒素, 编码基因分别为 *stp* (又称为 *stla*) 和 *sth* (又称为 *stlb*); 热不稳定性肠毒素编码基因为 *lt*。两种肠毒素基因在 ETEC 中可单独存在, 也可同时存在。该菌可引起婴幼儿和旅游者腹泻, 一般呈轻度水样腹泻, 也可呈严重的霍乱样症状, 低热或不发热。腹泻常为自限性, 一般 2~3 天即自愈。

STEC 是指能够产生志贺毒素的大肠埃希菌。志贺毒素的编码基因为 *stx*, 志贺毒素分为两种类型, 其编码基因分别为 *stx1* 和 *stx2*, 两者之间无免疫交叉反应。*stx1* 和 *stx2* 在 STEC 中可单独存在, 也可同时存在。目前, STEC 包含的血清型有 400 种以上, 其中一些血清型在临床上能够引起人类出血性结肠炎 (HC) 或出血性腹泻, 并可进一步发展为溶血性尿毒综合征 (HUS), 这类 STEC 称为肠道出血性大肠埃希菌 (Enterohemorrhagic *E.coli*, EHEC)。EHEC 可引起宿主肠黏膜上皮细胞黏附及擦拭性损伤, 表现为微绒毛结构消失和紧密黏附, 分别由 *esc* 编码的 III 型分泌系统和 *eae* 编码的紧密素介导。其中, 大肠埃希菌 O157:H7 是最主要、引起暴发最常见 EHEC 血清型。

## 二、检验程序

### 致泻大肠埃希氏菌检验程序

#### 2.1 样品的检验前准备

##### 2.1.1 冷冻样品

检验前应先解冻, 应保持原包装在 45℃ 以下不超过 15 分钟或在 2~5℃ 不超过 18 小时解冻。解冻后应立即进行检验, 一旦解冻就不可再次冷冻。

##### 2.1.2 液体或半固体样品

取样前应先将其充分摇匀。

##### 2.1.3 干燥粉状或颗粒状样品

取样前应先混合均匀。

##### 2.1.4 固体样品

可用无菌镊子或剪刀剪碎, 将样品搅拌均匀。应取样品的可食用部分进行检测, 如是动物性样品, 应避免取骨头作为检样。

#### 2.2 样品的制备

##### 2.2.1 固体和半固体样品

###### 2.2.1.1 取样

以无菌操作用天平称取 25g 混合均匀的样品, 加入盛有 225mL 灭菌营养肉汤的无菌均质杯或均质袋中。

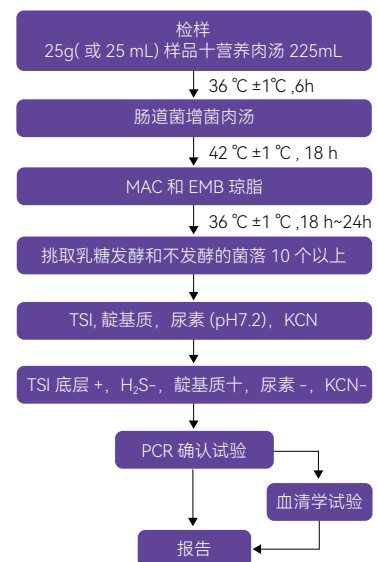
###### 2.2.1.2 均质

如使用无菌均质杯, 则用旋转刀片式均质器以 8000~10000r/min 均质 1~2 分钟; 如使用无菌均质袋, 则用拍击式均质器均质 1~2 分钟, 制成 1:10 的样品匀液。注: 如使用旋转刀片式均质器, 样品均质时间超过 2 分钟, 应在均质杯外加冰水冷却。

##### 2.2.2 液体样品

###### 2.2.2.1 非黏性液体样品 (黏度不大于牛乳)

用无菌吸管吸取 25mL 混合均匀的样品, 加入盛有 225mL 灭菌营养肉汤的无菌锥形瓶 (瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠)



流程图 9-1 致泻大肠埃希菌检验程序

或均质袋 (或其他适宜的无菌容器) 中, 振荡混匀, 制成 1:10 的样品匀液。

### 2.2.2.2 黏性液体样品

以无菌操作用天平称取 25g 混合均匀的样品, 加入盛有 225ml 灭菌营养肉汤的无菌锥形瓶 (瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠) 或均质袋 (或其他适宜的无菌容器) 中, 振荡混匀, 制成 1:10 的样品匀液。

## 2.3 增菌

将上述制备好的样品匀液于 36°C ±1°C 培养 6 小时, 进行预增菌。无菌操作取预增菌液 10μL, 接种于 30mL 肠道菌增菌肉汤管内, 涡旋或振荡混匀, 于 42°C ±1°C 培养 18 小时。

## 2.4 分离

2.4.1 使用直径 3mm (约 10μL) 的接种环, 分别取肠道菌增菌肉汤管内的增菌液 1 环, 划线接种于 MAC 和 EMB 琼脂平板, 于 36°C ±1°C 培养 18~24 小时。

2.4.2 培养结束后, 观察菌落特征。在 MAC 琼脂平板上, 分解乳糖的典型菌落为砖红色至桃红色, 不分解乳糖的菌落为无色或淡粉色; 在 EMB 琼脂平板上, 分解乳糖的典型菌落为中心紫黑色带或不带金属光泽, 不分解乳糖的菌落为无色或淡粉色。

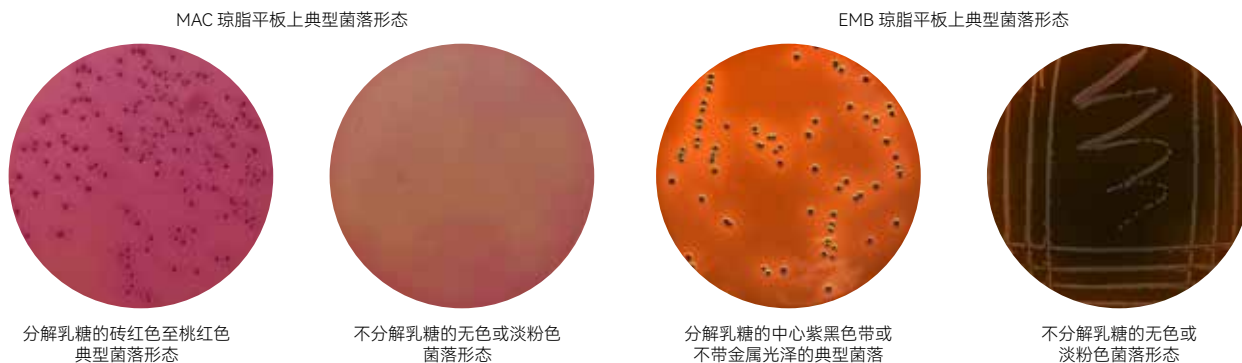


图 9-1

## 2.5 生化试验

2.5.1 如果 MAC 和 (或) EMB 琼脂平板上有致泻大肠埃希菌的典型或可疑菌落 (发酵乳糖和不发酵乳糖的菌落均可能为目标菌), 应从每个琼脂平板上挑取 10~20 个 (10 个以下全选) 可疑菌落, 不但要挑取乳糖发酵的菌落, 同时也要挑取乳糖不发酵和迟缓发酵的菌落。使用接种针自单个菌落中心挑取可疑菌落, 接种 TSI 琼脂斜面培养基 (先在 TSI 琼脂斜面划线, 再于底层穿刺), 接种针不要灭菌, 直接接种营养琼脂平板, 于 36°C ±1°C 培养 18~24 小时。

2.5.2 对于 TSI 斜面上生长现象初步判断为疑似大肠埃希菌的可疑菌落, 从营养琼脂平板上挑取其纯培养物, 按照所使用的生化试剂盒说明书, 分别接种蛋白胨水 (脲基质试验)、尿素琼脂 (pH7.2) 和 KCN 肉汤 (包括试验管和对照管), 于 36°C ±1°C 培养 18~24 小时。

2.5.3 TSI 斜面产酸或不产酸, 底层产酸, 脲基质阳性, H<sub>2</sub>S 阴性和尿素酶阴性的培养物为大肠埃希菌。TSI 斜面底层不产酸, 或 H<sub>2</sub>S、KCN、尿素有一项为阳性的培养物, 均非大肠埃希菌。必要时做革兰染色和氧化酶试验。大肠埃希菌为革兰阴性杆菌, 氧化酶阴性。参照图对 TSI、脲基质、尿素、KCN 和氧化酶试验的结果进行判定。

三糖铁试验典型反应



大肠埃希菌 ATCC 25922  
(三糖铁斜面产酸变黄, 底层产酸变黄, 不产硫化氢, 产气)

福氏志贺菌 CMCC (B) 51572  
(三糖铁斜面产碱, 底层产酸, 不产硫化氢)

鼠伤寒沙门菌 ATCC 14028  
(三糖铁斜面产碱, 底层产酸, 产硫化氢)

脲基质试验结果



空白对照 阴性对应 阳性反应

尿素试验结果



阴性对应 阳性反应

氰化钾试验结果



氰化钾试验阳性  
(试验管和对照管浑浊)



氰化钾试验阴性  
(试验管澄清, 对照管浑浊)

氧化酶试验结果

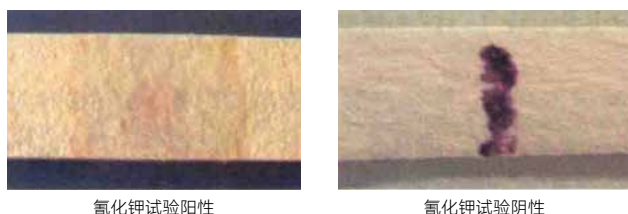


图 9-2

2.5.4 如选择生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统，可从营养琼脂平板上挑取可疑菌落的纯培养物，按照生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统配套试剂盒的说明书，对可疑菌落进行鉴定。

## 2.6 PCR 确认试验（略）

### 三、检验注意事项

#### 3.1 质量控制

3.1.1 实验中使用的培养基和试剂每批次均应按照 CB4789.28 的规定进行验收和性能测试，并做好相关记录。

3.1.2 实验过程中，增菌、分离、生化鉴定等各个环节均应对培养基和试剂做空白对照。若空白对照出现微生物生长，本次实验结果无效，应立即分析原因，对实验环境、培养基、试剂、取样器具、吸管、平皿等耗材进行检查处理。

3.1.3 每次 PCR 反应使用 EPEC、EIEC、ETEC、STEC/EHEC、EAEC 标准菌株基因组 DNA 作为阳性对照，使用大肠埃希菌 ATCC 25922 或等效标准菌株基因组 DNA 作为阴性对照，以灭菌去离子水作为空白对照，监控 PCR 反应的有效性以及体系是否存在污染。

3.1.4 EPEC、EIEC、ETEC、STEC/EHEC、EAEC 标准菌株应从专业微生物保藏机构、同行认可的专业权威机构或有资质的商业派生菌株生产厂家等认可的途径获得，菌株应经过验证后方可保存使用。

3.1.5 定期使用致泻大肠埃希菌标准菌株污染样品，作为阳性对照进行质控，一般每 25g(mL) 样品的人工污染致病菌量应控制在 10~100CFU 之间。分析结果并做好记录，质控频次建议每月一次。

#### 3.2 操作要点和注意事项

3.2.1 对易产生较大颗粒的样品和吸水后易膨胀的样品进行检测时，建议使用带滤网的均质袋，以方便后续实验过程中吸取样品增菌液。

3.2.2 增菌后的所有操作均应在生物安全二级实验室进行，操作时应有相应的防污染措施，在进行可能产生气溶胶的操作时，应在生物安全柜内完成。菌液若有溢撒，应先用纱布轻轻覆盖溢撒处，由周边向溢撒中心喷洒或倾倒消毒剂（如 75% 乙醇，碘伏、1% 次氯酸钠等），作用 30 分钟以上再进行后续处理。

3.2.3 实验过程中应尽量使用移液管进行移液操作，因移液器枪头较短，枪体容易沾染菌液，导致交叉污染。必须使用微量移液器时，应慢慢吸取，并使用带有滤芯的吸头，防止增菌液对移液器的污染。移液管顶端应加塞棉花，防止液体倒吸进入洗耳球或配套的电动移液器，一旦进入，应立即进行清洁和消毒，防止交叉污染。

3.2.4 在培养箱中进行培养时，平皿的堆叠高度不应超过 6 皿，以防止中间平皿温度偏高和形成厌氧微环境，影响微生物的生长。

3.2.5 生化试验和 PCR 确认试验，均应使用单个可疑菌落的纯培养物。必要时可使用 MAC 琼脂平板或 EMB 琼脂平板对可疑菌落进行二次纯化，再划线于营养琼脂平板培养，以保证试验结果的准确和可靠。

3.2.6 基于三糖铁试验的原理，配制三糖铁琼脂斜面培养基时，要保证斜面部分和管下部琼脂的长度，以保证两部分相对应的有氧和厌氧环境，一般要求琼脂底部与斜面最低点的距离应不少于 4cm；用接种针刺刺时，宜穿刺至距培养基底部 3~5mm 处；培养时，应将试管口适当松开，保持管内有充足的氧气，避免由于氧气的不足导致斜面酸性产物不能氧化而出现假阳性现象（黄色）以及产生过量的  $H_2S$  影响结果的观察和判断。

3.2.7 PCR 确认试验的实验环境和实验操作应符合食品分子生物学检测的要求，注意预防污染。使用和处理溴化乙锭染料等有毒有害物质时，应注意实验人员的安全防护和对环境的保护。

3.2.8 血清学试验时，首先要进行菌体的自凝性检查，自凝的菌株不能直接做血清凝集实验，需要转种几代，如果仍然自凝，可放弃血清凝集；大肠埃希菌的 H 抗原在传代过程中容易丢失或发育不良，可用半固体琼脂培养基 3 次传代培养，并观察生长情况，若扩散生长，可进行血清凝集试验；若不扩散生长，则表示 H 抗原丢失，可不再进行血清凝集试验。

3.2.9 所有实验废弃物均应进行无害化处理，带菌废弃物一般采用高压蒸汽灭菌（121℃,30 分钟）处理。

### 四、疑难解析

#### 4.1 食品微生物检验中“重量和容量”的精确度要求？

GB4789 系列食品微生物检验标准中未对重量和容量的精确度进行规定，可参考美国农业部食品安全检查局《微生物实验室指南》(Microbiology Laboratory Guidebook,MLG) 和 ISO 标准中的相关规定。MLG “General Considerations” 中规定“重量和容量的波动范围为  $\pm 1\%$ ”；ISO7218:2007 中规定“除另有说明，取样时允许的最大误差应为 1% 或更低”。

#### 4.2 大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希菌和致泻大肠埃希菌的区别？

大肠菌群，是指在 36℃ 培养条件下能发酵乳糖、产酸产气的需氧和兼性厌氧革兰阴性无芽胞杆菌，其可能来自人类和温血动物的肠道及自然环境，包括埃希菌属、柠檬酸菌属、克雷伯菌属和肠杆菌属等；粪大肠菌群，又称耐热大肠菌群，是一群在 44.5℃ 培养 24~48 小时能发酵乳糖、产酸产气的需氧和兼性厌氧革兰阴性无芽胞杆菌，主要由大肠埃希菌组成，还包括与粪便污染无直接相关性的其他菌株，如肺炎克雷伯菌；大肠埃希菌隶属肠杆菌科埃希菌属，其广泛存在于人和温血动物的肠道中，是革兰阴性无芽胞杆菌，能够在 44.5℃ 发酵乳糖产酸产气，IMViC 生化试验结果为“++-”或“-+-”；致泻大肠埃希菌是一类能引起人体以腹泻症状为主的大肠埃希菌，主要包括肠道致病性大肠埃希菌、肠道侵袭性大肠埃希菌、产肠毒素大肠埃希菌、产志贺毒素大肠埃希菌（包括肠道出血性大肠埃希菌）和肠道集聚性大肠埃希菌。下图显示了大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希菌和致泻大肠埃希菌的分类关系。

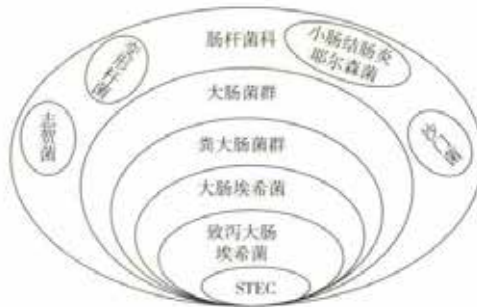


图 9-3 大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希菌和致泻大肠埃希菌分类关系示例

### 4.3 挑取致泻大肠埃希菌可疑菌落时，为什么“不但要挑取乳糖发酵的菌落，同时也要挑取乳糖不发酵和迟缓发酵的菌落”？

绝大部分大肠埃希菌为乳糖发酵菌株，但致泻大肠埃希菌中的 EIEC 不像典型的大肠埃希菌，其生化反应和抗原结构近似痢疾志贺菌，不发酵乳糖。

### 4.4 致泻大肠埃希菌检验涉及的生化试验原理是什么？

4.4.1 三糖铁试验 广泛用于肠杆菌科细菌的鉴定，通过观察细菌对糖的利用和硫化氢的产生，获得对细菌种属的初步判断。三糖铁琼脂培养基含有乳糖、蔗糖和葡萄糖的比例为 10:10:1。如细菌只利用葡萄糖，葡萄糖被分解后产酸可使斜面先呈黄色，但因葡萄糖量少，生成的少量酸可因接触空气而氧化，加之细菌生长繁殖利用培养基中的含氮物质生成碱性化合物，使斜面部分后来又变成红色；底层由于处于缺氧状态，生成的酸类不被氧化而仍保持黄色。如细菌能够利用乳糖或蔗糖，产生大量的酸，使培养基斜面与底层均呈现黄色；同时也会产气，使培养基出现气泡或断层。某些细菌能分解含硫氨基酸，生成硫化氢，硫化氢和培养基中的铁盐反应，生成黑色的硫化亚铁沉淀，使培养基呈现黑色。常见的三糖铁试验有以下几种反应：a. 斜面产碱 / 底层产碱：不发酵葡萄糖、乳糖和蔗糖，是非发酵型细菌的特征，如铜绿假单胞菌；b. 斜面产碱 / 底层产酸：发酵葡萄糖、不发酵乳糖和蔗糖，是不发酵乳糖型细菌的特征，如志贺菌；c. 斜面产碱 / 底层产酸（黑色）：发酵葡萄糖、不发酵乳糖和蔗糖、产生硫化氢，是产硫化氢不发酵乳糖型细菌的特征，如大多数的沙门菌、柠檬酸杆菌和变形杆菌等；d. 斜面产酸 / 底层产酸：发酵葡萄糖、乳糖、蔗糖，是发酵乳糖型细菌的特征，如大肠埃希菌、克雷伯菌属和肠杆菌属等。

4.4.2 靛基质试验 某些细菌（如大肠埃希菌）可分解蛋白质中的色氨酸，产生靛基质（吲哚），靛基质与试剂中的二甲氨基苯甲醛结合，生成玫瑰色的靛基质。两层液体交界处出现红色为阳性，无色为阴性。

4.4.3 尿素试验 某些细菌能产生尿素酶，将培养基中的尿素分解并产生氨，使培养基变为碱性，培养基中的指示剂酚红在碱性条件下由黄色变为粉红色。尿素酶的最适 pH 为 7.0。

4.4.4 氰化钾试验 氰化钾是细菌呼吸链末端的抑制剂，可与呼吸酶作用使酶失去活性，抑制细菌的生长，但有的细菌在一定浓度的氰化钾存在时仍能生长，以此对细菌进行鉴别。

4.4.5 氧化酶试验 氧化酶即细胞色素氧化酶，是细胞色素呼吸酶系统的终末呼吸酶。氧化酶先使细胞色素 C 氧化，然后氧化型的细胞色素 C 再使对氨基二甲苯胺氧化，产生颜色反应。如使用 Kowacs 试剂，阳性反应呈粉红色至深紫色；使用 Ewing 改进试剂，阳性反应呈蓝色；阴性反应不发生颜色变化。氧化酶试验用于区分不发酵的革兰阴性杆菌（氧化酶阳性）和肠道菌（氧化酶阴性）。

### 4.5 是否可以不进行生化试验，根据特征毒力基因检测结果对致泻大肠埃希菌的型别进行判定？

按照 GB4789.6—2016 的规定，需要先对可疑菌落进行生化试验，生化试验符合大肠埃希菌特征后，再进行毒力基因的检测，从而判定致泻大肠埃希菌的型别。在肠杆菌科中，其他一些致病菌也存在相同的毒力基因。因此，需先通过生化试验排除这类细菌，再进行毒力基因检测，以确认致泻大肠埃希菌型别。

### 4.6 escV 和 ere 等效基因是同时存在吗？在 PCR 确认试验过程中选做其中一个即可吗？

GB4789.6—2016 规定：“escV 和 eae 基因选做其中一个”“在判定 EPEC 或 SETC/EHEC 时，escV 和 eae 基因等效效果”。escV 和 eae 基因是 EPEC 和 STEC/EHEC 的特征毒力基因。escV 基因位于 LEE 毒力岛，负责编码 III 型分泌系统的功能基因；eae 基因位于染色体上，负责细菌和肠黏膜细胞的紧密黏附，二者在致病不同阶段起重要作用。两个基因在试验过程中选做其中一个即可。一般情况下，两个基因同时存在，但不排除传代过程中基因丢失，或试验条件不符合导致其中一个基因检测不出等特殊情况。

### 4.7 血清学试验在何种情况下需要进行？

一般情况下，根据特征毒力基因检测结果可确认样品中致泻大肠埃希菌型别，不需要进行血清学试验。在食源性疾病暴发溯源调查时，血清学分型简便易行，在确定了致泻大肠埃希菌型别后，可以快速对不同来源菌株的同源性进行初步判断，利于溯源调查。

### 4.8 如何看待不同致病型别致泻大肠埃希菌血清型别对照表中抗原相互交叉的情况？

过去，人类对致泻大肠埃希菌致病机制研究不足，致泻大肠埃希菌的鉴定和不同致病型别的区分只能依据生化和血清型别进行判断。根据不同临床症状划分出致泻大肠埃希菌的致病型别后，再分析相对应的血清型别，形成了当前广泛应用的五种致病型别致泻大肠埃希菌与血清型别的对照表。随着分子生物学的快速发展，人类对致泻大肠埃希菌的致病机制有了充分的认识，并明确了不同致病型别致泻大肠埃希菌的特征毒力基因，也逐渐发现了血清型别鉴定致泻大肠埃希菌致病型别的不足之处。血清型判定依据是菌体抗原（O 抗原、H 抗原和 K 抗原），这些抗原并不是致泻大肠埃希菌发病的根本原因。因此，根据血清型别判定的致泻大肠埃希菌并非都有致病力，也出现了相同“血清型”归属于不同致病型别的情况，即对照表中 O 抗原存在交叉的情况。有数据显示在研究 EPEC 时，血清型别与致病型别的一致性最高为 78.4%，最低仅为 3%。

### 参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理总局科技和标准司. 微生物检验方法食品安全国家标准实操指南 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2017.
- [2] 刘云国. 食品卫生微生物学标准鉴定图谱 [M]. 北京：科学出版社，2009.

## 附录 A

# 营养肉汤 (NB)



- 1、产品用途：用于一般细菌培养、复壮、增菌等，也可用于消毒剂定性消毒效果测定。
- 2、检验原理：蛋白胨和牛肉膏粉提供氮源、维生素、氨基酸和碳源；氯化钠能维持均衡的渗透压。

表 9-1：营养肉汤 (NB) 验证数据

样品名称	质控菌株	厂家	接种计数培养基 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
营养肉汤 (NB)	大肠埃希氏菌 ATCC 25922	逗点	88CFU	生长良好，浑浊	生长良好，浑浊	符合
		H 品牌				符合
		L 品牌				符合
	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	79CFU			符合
		H 品牌				符合
		L 品牌				符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	66CFU			符合
		H 品牌				符合
		L 品牌				符合

### 3、典型特征图片：

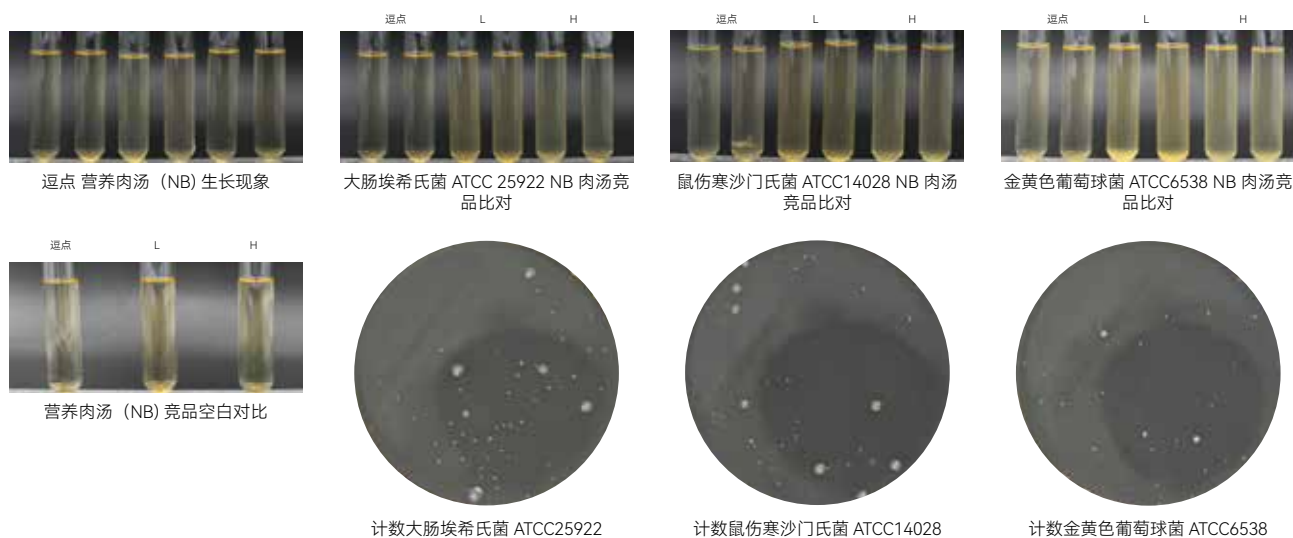


图 9-4

### 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌的混浊度、生长现象均满足要求；24±2h 培养后浑浊度均达到 2。

4.2 感观：逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。

## 附录 B

# 肠道增菌肉汤



- 1、产品用途：用于肠道菌的增菌培养。
- 2、检验原理：蛋白胨提供蛋白质、维生素和氨基酸；葡萄糖提供碳源；磷酸氢二钠和磷酸二氢钾为缓冲剂；牛胆盐和煌绿为选择性抑菌剂，抑制非肠杆菌科细菌的生长。

表 9-2：肠道增菌肉汤验证数据

样品名称	质控菌株	厂家	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
肠道增菌肉汤	大肠埃希氏菌 ATCC 25922	逗点	83CFU	生长良好，培养基溶液颜色变为黄绿色	生长良好，培养基溶液颜色变为黄绿色	符合
		H 品牌			生长良好，培养基溶液颜色变为黄绿色	符合
		L 品牌			生长良好，培养基溶液颜色变为黄绿色	符合
	阪崎肠杆菌 ATCC29544	逗点	73CFU		生长良好，培养基溶液颜色变为黄色	符合
		H 品牌			生长良好，培养基溶液颜色变为黄绿色	符合
		L 品牌			生长良好，培养基溶液颜色变为黄绿色	符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	1153CFU		抑制	符合
		H 品牌			抑制	符合
		L 品牌			抑制	符合

3、典型特征图片：

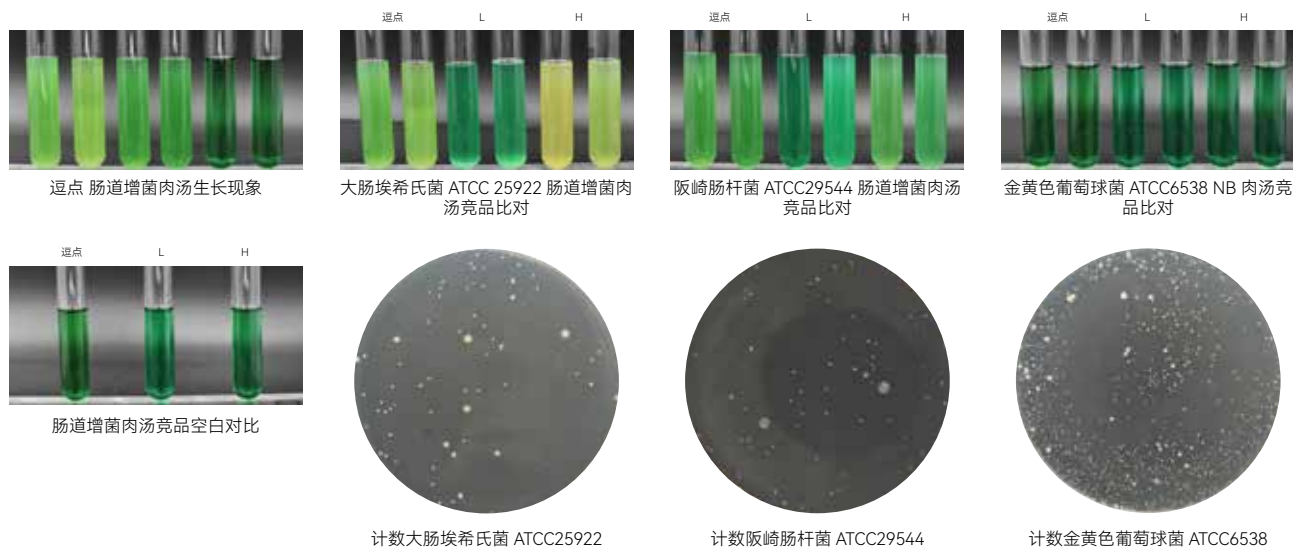


图 9-5

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922、阪崎肠杆菌 ATCC29544、，逗点、L 品牌、H 品牌的混浊度均满足要求；
- 4.2 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌满足不生长、抑制的要求；
- 4.3 感观：逗点、L 品牌、H 品牌并无明显差异。

附录 C

## 伊红美蓝 (EMB) 琼脂培养基验证



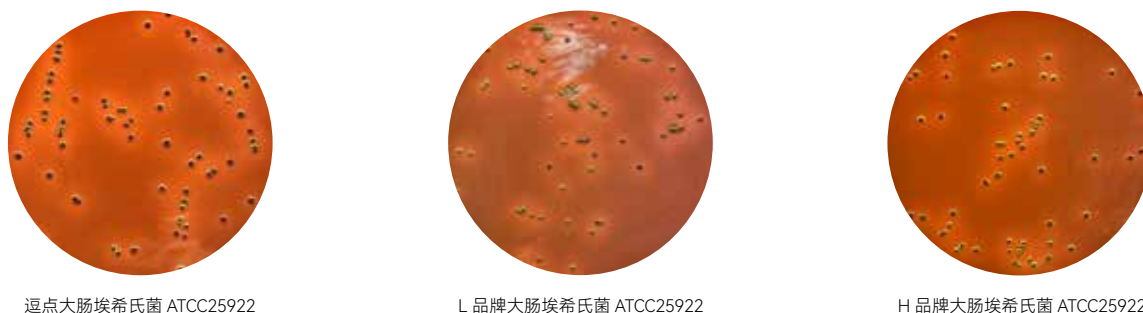
- 1、产品用途：用于分离革兰氏阴性肠道菌特别是大肠菌群和粪大肠菌群。
- 2、检验原理：蛋白胨提供碳源和氮源；乳糖是大肠菌群可发酵的糖类；磷酸氢二钾是缓冲剂；琼脂是培养基凝固剂；伊红和美蓝是抑菌剂和 pH 指示剂，可抑制革兰氏阳性菌，在酸性条件下产生沉淀，形成紫黑色菌落或具黑色中心的外围无色透明的菌落。

表 9-3：伊红美蓝 (EMB) 琼脂培养基验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
伊红美蓝 (EMB) 琼脂培养基	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	69	82	PR=0.8	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	63		PR=0.8		符合
		H 品牌	60		PR=0.8		符合
伊红美蓝 (EMB) 琼脂培养基	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	/	/	菌落呈无色、半透明	菌落呈无色、半透明	符合
		L 品牌	/		菌落呈无色、半透明		符合
		H 品牌	/		菌落呈无色、半透明		符合
伊红美蓝 (EMB) 琼脂培养基	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/	G=0	G < 5	符合
		L 品牌	/		G=0		符合
		H 品牌	/		G=0		符合

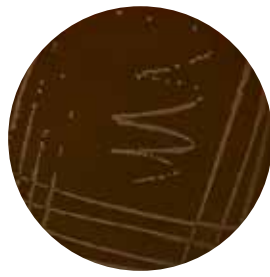
- 1. 生长率：大肠埃希氏菌 ATCC25922 在伊红美蓝 (EMB) 琼脂培养基上的菌落特征：黑色菌落，具金属光泽；
- 2. 特异性：鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 在伊红美蓝 (EMB) 琼脂培养基上的菌落特征：菌落呈无色、半透明；
- 3. 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在伊红美蓝 (EMB) 琼脂培养基上的菌落特征：选择性 G < 5；

3、典型特征图片：





逗点鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



L 品牌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



H 品牌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



逗点金黄色葡萄球菌 ATCC6538



L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



逗点伊红美蓝 (EMB) 琼脂空白



L 品牌伊红美蓝 (EMB) 琼脂空白



H 品牌伊红美蓝 (EMB) 琼脂空白

图 9-6

#### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $PR \geq 0.5$ ；黑色菌落，具金属光泽的要求；且三家无明显差异。
- 4.2 特异性：鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标菌落呈无色、半透明；且三家无明显差异。
- 4.3 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $G < 5$  的要求；且三家无明显差异。
- 4.4 观感：逗点、H 品牌平板颜色无明显差异，L 品牌平板颜色稍微深一点。

## 附录 D

### 麦康凯琼脂 (MAC) 验证



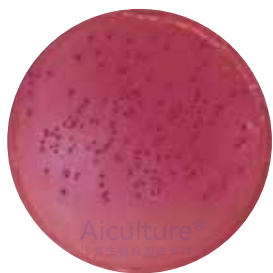
1. 产品用途：用于肠道致病菌的选择性分离培养。
2. 检验原理：蛋白胨提供碳氮源；乳糖为可发酵的糖类；3 号胆盐和结晶紫可抑制革兰氏阳性菌的生长；氯化钠维持均衡的渗透压；中性红是 pH 指示剂，细菌发酵乳糖产酸时菌落呈粉红色，并在菌落周围出现胆盐沉淀的浑浊圈。琼脂是培养基的凝固剂。

表 9-4：麦康凯琼脂 (MAC) 验证

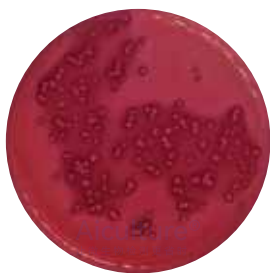
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
麦康凯琼脂 (MAC)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	170	142	PR=1.2	$PR \geq 0.5$	符合
		L 品牌	158		PR=1.1		符合
		H 品牌	111		PR=0.8		符合
	福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572	逗点	216	203	PR=1.2	$PR \geq 0.5$	符合
		L 品牌	265		PR=1.3		符合
		H 品牌	234		PR=1.1		符合
金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/	G=0	$G \leq 1$	符合	
	L 品牌	/	/	G=0		符合	
	H 品牌	/	/	G=0		符合	

1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 MAC 板上的菌落特征：鲜桃红色或粉红色，可有胆酸沉淀；
2. 福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572 在 MAC 板上的菌落特征：无色至浅粉红色，半透明棕色或绿色菌落；
3. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在 MAC 板上的菌落特征：选择性  $G \leq 1$ ；

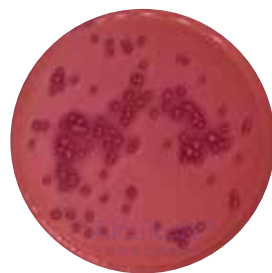
3、典型特征图片：



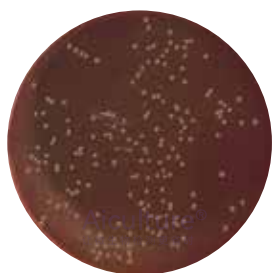
逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



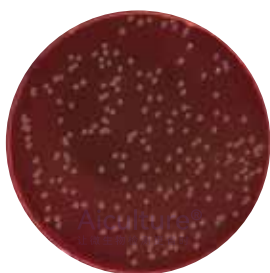
L 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



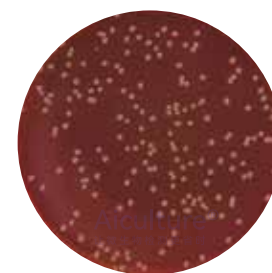
H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



L 品牌福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



H 品牌福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



逗点金黄色葡萄球菌 ATCC6538



L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



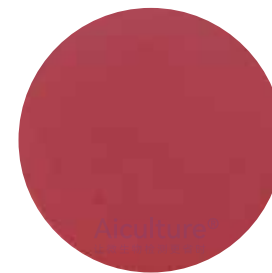
H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



逗点麦康凯琼脂 (MAC) 空白



L 品牌麦康凯琼脂 (MAC) 空白



H 品牌麦康凯琼脂 (MAC) 空白

图 9-7

4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $PR \geq 0.5$  的要求；福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $PR \geq 0.5$  的要求。

4.2 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $G \leq 1$  的要求。

4.3 感观：三家平板颜色无显著差异。

# 10 食品微生物学检验小肠结肠炎耶尔森菌检验 GB 4789.8—2016

## 一、概述

### 1.1 适用范围

本标准规定了食品中小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*) 的检验方法。本标准适用于食品中小肠结肠炎耶尔森菌的检验。

### 1.2 检测原理

小肠结肠炎耶尔森菌革兰染色为阴性，菌体呈杆状或球杆状，大小为 (0.8~3.0) $\mu\text{m}$ ×0.8 $\mu\text{m}$ ，不形成芽孢；在 22~30℃ 培养时周身可形成丰富鞭毛；在各种非选择性培养基及多数选择性培养基上、需氧或厌氧条件下均可生长，生长温度范围为 0~45℃，最佳生长温度为 26℃。本方法对食品中可能存在的小肠结肠炎耶尔森菌通过增菌、分离培养、生化鉴定、血清分型等过程进行检验，从而鉴定出食品中是否含有小肠结肠炎耶尔森菌。



## 二、设备与耗材

### 2.1 设备

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备如下。

2.1.1 冰箱 0~4℃。

2.1.2 恒温培养箱 26℃±1℃、36℃±1℃。

2.1.3 显微镜 10~100 倍。

2.1.4 均质器。

2.1.5 天平 感量 0.1g。

2.1.6 微生物生化鉴定试剂盒或微生物生化鉴定系统。

### 2.2 耗材

2.2.1 灭菌试管 16mm×160mm、15mm×100mm。

2.2.2 灭菌吸管 1mL (具有 0.01mL 刻度)、10mL (具有 0.1mL 刻度)。

2.2.3 锥形瓶 200mL、500mL。

2.2.4 灭菌平皿 直径 90mm。

## 三、培养基与试剂

### 3.1 培养基

3.1.1 改良磷酸盐缓冲液。

3.1.2 CIN-1 培养基。

3.1.3 改良 Y 培养基。

3.1.4 改良克氏双糖培养基。

3.1.5 鸟氨酸脱羧酶试验培养基。

3.1.6 半固体琼脂。

3.1.7 尿素培养基。

3.1.8 营养琼脂。

### 3.2 试剂

3.2.1 糖发酵管。

3.2.2 缓冲葡萄糖蛋白胨水 [ 甲基红 (MR) 和 V-P 试验用 ]。

3.2.3 碱处理液。

3.2.4 甲基红 (MR) 和 V-P 试剂。

3.2.5 小肠结肠炎耶尔森菌诊断血清 ( 选做项目 )。

## 四、检验过程

### 4.1 检验程序

小肠结肠炎耶尔森菌检验程序

### 4.2 检验步骤

#### 4.2.1 样品前处理

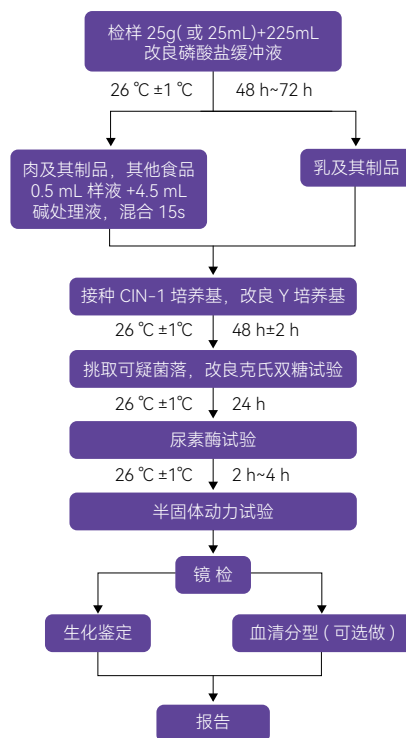
##### 4.2.1.1 固体和半固体样品

用天平无菌称取 25g 样品。如使用刀头式均质器，可将样品加入盛有 225mL 改良磷酸盐缓冲液增菌液的无菌均质杯内，8000~10000r/min 均质 1 分钟，制成 1:10 的样品匀液。如使用拍打式均质器，可将样品加入盛有 225mL 改良磷酸盐缓冲液增菌液的无菌均质袋中，拍打 1~2 分钟，制成 1:10 的样品匀液。

##### 4.2.1.2 液体样品

用无菌吸管吸取 25mL 样品。如使用锥形瓶，可将样品加入盛有 225mL 改良磷酸盐缓冲液增菌液的无菌锥形瓶中，充分混匀。如使用均质袋，可将样品放入盛有 225mL 改良磷酸盐缓冲液增菌液的无菌均质袋中，充分混匀。

##### 4.2.1.3 冷冻产品



流程图 10-1 小肠结肠炎耶尔森氏菌检验程序

应先在 45℃以下（如水浴中）不超过 15 分钟解冻，或冷藏冰箱中不超过 18 小时解冻。如冷冻样品为固体和半固体样品，参照 4.2.1.1 程序进行前处理；如冷冻样品为液体样品，参照 4.2.1.2 程序进行前处理。

4.2.2 增菌 将样品匀液于 26℃ ±1℃培养 48~72 小时，进行增菌。增菌时间长短可根据对样品污染程度的估计来确定。

4.2.3 碱处理

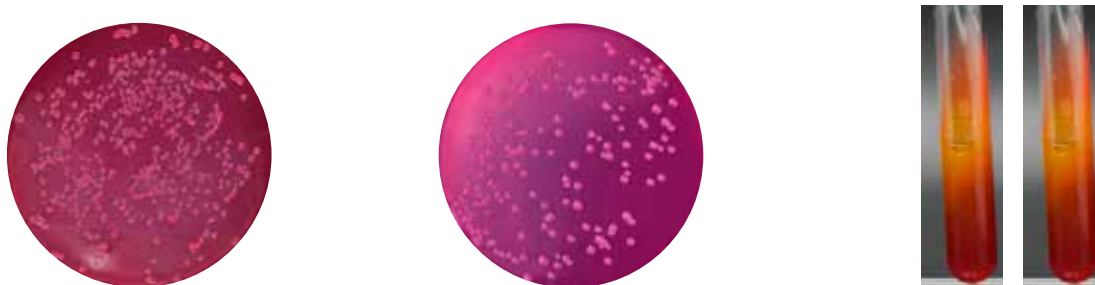
4.2.3.1 乳与乳制品 不需要进行碱处理。

4.2.3.2 其他食品（包括固体食品和液体食品）吸取培养后的改良磷酸盐缓冲液增菌液 0.5mL 与碱处理液 4.5mL 充分混合 15 秒。

4.2.4 分离

将乳与乳制品增菌液或经过碱处理的其他食品增菌液分别划线接种于 CIN-1 琼脂平板和改良 Y 琼脂平板。将接种后的平板于 26℃ ±1℃培养（48±2）小时。

观察各个平板上生长的菌落，典型小肠结肠炎耶尔森菌菌落在 CIN-1 琼脂平板上为深红色中心，周围具有无色透明圈（红色牛眼状菌落），菌落大小为 1~2mm；在改良 Y 琼脂平板上为无色、透明、不黏稠的菌落。



典型小肠结肠炎耶尔森菌在 CIN-1 琼脂平板上的形态特征

典型小肠结肠炎耶尔森菌在改良 Y 琼脂平板上的形态特征

典型小肠结肠炎耶尔森菌在改良克氏双糖上的形态特征

图 10-1

4.2.5 改良克氏双糖试验 分别挑取 CIN-1 琼脂平板和改良 Y 琼脂平板上可疑菌落 3~5 个，分别接种于改良克氏双糖铁琼脂，接种时先在斜面划线，再从斜面到底层穿刺，于 26℃ ±1℃培养 24 小时。将斜面和底部皆变黄且不产气的培养物做进一步的生化鉴定。

4.2.6 尿素酶试验用接种环挑取一满环经改良克氏双糖试验检验得到的可疑培养物，接种到尿素培养基中，接种量应足够大，振荡几秒钟，26℃ ±1℃培养 2~4 小时，观察尿素培养基是否变为粉红色或红色。若阳性结果不明显，可继续培养到 24 小时后再观察。

4.2.7 动力观察 将尿素酶试验阳性菌落分别接种于两管半固体培养基中，分别于 26℃ ±1℃和 36℃ ±1℃培养 24 小时。将 26℃有动力而 36℃无动力的可疑菌培养物划线接种营养琼脂平板，进行纯化培养，用纯培养物进行革兰染色镜检和生化试验。

4.2.8 革兰染色镜检 将纯化的可疑菌培养物进行革兰染色镜检，小肠结肠炎耶尔森菌为革兰阴性球杆菌，有时呈椭圆状，有时呈杆状，菌体大小为 (0.8~3.0)μm×0.8μm。

4.2.9 生化鉴定 从 4.2.7 营养琼脂平板上挑取单个菌落进行生化鉴定，生化反应在 26℃ ±1℃进行，小肠结肠炎耶尔森菌的主要生化特征以及与其他相似菌的区别。见表 10-1

表 10-1：小肠结肠炎耶尔森氏菌与其他相似菌的生化性状鉴别表

项目	小肠结肠炎耶尔森氏菌 Yersinia enterocolitica	中间型耶尔森氏菌 Yersinia intermedia	弗耶尔森氏菌 Yersinia frederiksenii	克氏耶尔森氏菌 Yersinia kirstensenii	假结核耶尔森氏菌 Yersinia pseudotuberculosis	鼠疫耶尔森氏菌 Yersinia pestis
动力 (26℃)	+	+	+	+	+	-
尿素酶	+	+	+	+	+	-
V-P 试验 (26℃)	+	+	+	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶	+	+	+	+	-	-
蔗糖	d	+	+	-	-	-
棉子糖	-	+	-	-	-	d
山梨醇	+	+	+	+	-	-
甘露醇	+	+	+	+	+	+
鼠李糖	-	+	+	-	-	-

注：+ 阳性；- 阴性；d 有不同生化型。

## 五、结果与报告

综合以上生化试验和血清学鉴定结果撰写报告。

如所有选择性平板中均未分离到小肠结肠炎耶尔森菌，则报告“25g(mL) 样品中未检出小肠结肠炎耶尔森菌”。

如任意选择性平板中分离到小肠结肠炎耶尔森菌，则报告“25g(mL) 样品中检出小肠结肠炎耶尔森菌”。

## 六、检验注意事项

### 6.1 设备与耗材的控制与使用

6.1.1 实验室的设备和耗材入库时，应该对产品的质量进行验收，确保产品内外密封性、无潮湿、完好无损，产品规格、型号相符，且在有效期内。

6.1.2 为保证实验结果的准确性，每批次一次性耗材均应进行无菌性和性能验收，同时实验室应定期对洁净区、生物安全柜、超净工作台等进行环境监测和检定校准。

6.1.3 实验用的一次性无菌耗材应存放于阴凉干燥、通风良好的物架上，常温区域为 10~30℃，阴凉区域为 10~20℃，相对湿度为 40%~65%。按失效期的先后顺序码放，禁止与其他物品混放，不得使用标识不清、包装破损、失效、霉变的耗材。

### 6.2 培养基与试剂的控制与使用

6.2.1 定期用国家标准《食品安全国家标准食品微生物学检验培养基和试剂的质量要求》(GB4789.28) 推荐的阳性和阴性对照标准菌种，

对所使用的每批次培养基和生化试剂进行验证，并进行记录。

6.2.2 实验过程中，每批样品的选择性增菌液、分离平板等都要做空白对照。如果空白对照平板上出现小肠结肠炎耶尔森菌可疑菌落时，应废弃本次实验结果，并对增菌液、吸管、平皿、培养基、实验环境等进行污染来源分析。

6.2.3 定期使用小肠结肠炎耶尔森菌标准菌株或相应定量活菌质控品，在 BSL- II 生物安全实验室或阳性对照实验室内，用适当的食品样品进行阳性对照试验验证，染菌剂量应控制在每 25g 样品 10~100CFU，并进行记录。

6.2.4 CIN-1 琼脂平板和改良 Y 琼脂平板制备后应避光冷藏保存，并尽快使用。

### 6.3 样品前处理

由于小肠结肠炎耶尔森菌相对耐碱，所以用碱处理可以降低杂菌干扰，提高目的菌的检出率。但乳与乳制品加碱后蛋白会变性成团，增加该菌的检出难度，所以乳与乳制品不需加碱处理。

### 6.4 增菌培养

6.4.1 小肠结肠炎耶尔森菌比其他革兰阴性细菌生长慢，其生长往往易被掩盖。经弱碱液处理，并立即接种选择性平板进行分离，可以提高小肠结肠炎耶尔森菌的检出率。

6.4.2 由于小肠结肠炎耶尔森菌动力及许多生化反应的结果与培养温度有关，譬如在 37℃ 时动力为阴性，VP 试验也为阴性，但在 26℃ 是则均为阳性。故该菌增菌和生化鉴定温度都设置为 26℃ ±1℃，而不是 36℃ ±1℃。

6.4.3 当样品为易产生较大颗粒的样品（譬如肉与肉制品）时，可使用带滤网无菌均质袋，以方便均质后用吸管吸取匀液。

### 6.5 菌落特征

6.5.1 CIN-1 琼脂平板是一种对耶尔森菌选择性较强的培养基，胰蛋白胍和酵母浸膏提供氮源和微量元素；甘露醇为可发酵糖；去氧胆酸钠和结晶紫抑制革兰阳性菌；中性红是 pH 指示剂。小肠结肠炎耶尔森菌在 CIN-1 琼脂平板上生长良好，发酵甘露醇产酸能使指示剂变红，所以菌落呈现红色。但是不同型的菌株，菌落大小可能会有不同。

6.5.2 改良 Y 琼脂中蛋白胍和水解酪蛋白提供氮源和微量元素；乳糖用于糖发酵试验；氯化钠维持正常的渗透压；去氧胆酸钠和三号胆盐抑制革兰阳性菌；丙酮酸钠刺激目标菌的生长；琼脂是培养基的凝固剂。小肠结肠炎耶尔森菌不分解乳糖，所以在改良 Y 琼脂上不产酸，不能使指示剂孟加拉红变红，细菌不着色，故小肠结肠炎耶尔森菌在改良 Y 琼脂平板上为无色透明菌落。

6.5.3 在 CIN-1 琼脂平板和改良 Y 琼脂平板上分离目标菌时，应分区划线，且线条应稀疏不宜过密，以免杂菌生长旺盛而掩盖小肠结肠炎耶尔森菌的检出。

### 6.6 异常结果处理

如果生化鉴定为小肠结肠炎耶尔森菌，但 O 因子血清不凝集，依旧可以判定为小肠结肠炎耶尔森菌。这是因为小肠结肠炎耶尔森菌目前发现了 84 个 O 抗原因子和 19 个 H 抗原，但几个较大血清生产商的产品都不全，如日本生研有 01,02,03,05,08,09 等血清型，丹麦 SSI 只有 03,09 等主要致病型的血清，因此会存在生化鉴定符合但 O 因子血清均不凝集的现象。

### 6.7 其他注意事项

6.7.1 改良克氏双糖试验中，应先在斜面划线，再于底层穿刺。由于培养 36~48 小时后小肠结肠炎耶尔森菌会产碱，造成斜面变红，因此应注意培养时效，在培养 24 小时观察结果。

6.7.2 小肠结肠炎耶尔森菌在肉汤中生长呈均匀浑浊，一般不形成菌膜。

## 七、疑难解析

7.1 小肠结肠炎耶尔森菌在哪些食品样品中容易检出？

小肠结肠炎耶尔森菌作为重要的食源性致病菌，在生的蔬菜、乳和乳制品、肉类、豆制品、沙拉、牡蛎、虾等食物中分布很广，很多国家都已将该菌列为进出口食品的常规检测项目。

7.2 小肠结肠炎耶尔森菌的流行特征？

小肠结肠炎耶尔森菌在一年四季均可以发病，但以冬春季发病率明显升高，这与耶尔森菌的嗜冷特性有关。该病菌在全球范围内均有发现，目前日本是世界上报告小肠结肠炎耶尔森菌暴发疫情最多的国家，其次为美国，比利时、丹麦等欧洲国家也有该菌的报道。在我国，小肠结肠炎耶尔森菌呈现散发状态，部分地区有暴发流行的报告。

7.3 小肠结肠炎耶尔森菌除了血清分型还有哪几种方法可以分型？

目前我国小肠结肠炎耶尔森菌的分型有血清分型、生物分型、噬菌体分型、分子分型等分型方法。

7.4 是否所有小肠结肠炎耶尔森菌均有致病力？

小肠结肠炎耶尔森菌并非都有致病力，其可分为 1A、1B、2、3、4、5、6 型 7 个生物型，生物 1A 型中的菌株均属于非致病型菌株，而生物 1B、2、3、4、5 型中大多数为致病型菌株。1B、2、3、4、5 生物型和第 6 生物型不能快速水解七叶苷和发酵水杨苷。生物型 6 相当少，可以通过微弱发酵蔗糖加以区别，并且吡嗪酰胺酶均为阳性反应。目前，从血清型上来说，致病菌 O:1,2a,3;O:2a,3;O:3;O:8;O:9;O:4,3 2;O:5,27;O:12,25;O:13a,13b;O:19;O:20;O:21。引起人类疾病的主要血清群是 O:3,0:8;O:9 和 O:5,27。

7.5 为什么增菌时间长短可根据对样品污染程度的估计来确定？

某些样品中小肠结肠炎耶尔森菌含量较低，26℃ ±1℃ 培养 48~72 小时时增菌液中的小肠结肠炎耶尔森菌的增菌量难以达到检出水平，在此情况下可适当延长增菌时间，以提高检验的准确性。

7.6 是否所有培养状态下小肠结肠炎耶尔森菌都有动力？

不是。小肠结肠炎耶尔森菌在 22~30℃ 培养条件下形成丰富鞭毛，33℃ 仅形成少量鞭毛，35℃ 以上培养时则无鞭毛形成。

7.7 如果在前增菌或选择增菌结束后，肉汤中未见微生物生长，是否可以终止实验？

不可以。因为肉眼可见的细菌浓度为 10<sup>7</sup>CFU/ml，在此浓度以下，肉眼虽不能发现微生物生长，但实际上溶液中已经有微生物生长。

7.8 为什么使用 VITEK 2 Compact 全自动微生物生化鉴定系统不能准确鉴定出小肠结肠炎耶尔森菌？

用 VITEK 2 Compact 全自动微生物生化鉴定系统可以将小肠结肠炎耶尔森菌鉴定到属，但不能鉴定到种，还需结合其他生化反应进一步鉴定到种。

7.9 使用微生物生化鉴定试剂盒鉴定小肠结肠炎耶尔森菌，生化反应应于多少度下进行？

由于小肠结肠炎耶尔森菌的最佳生长代谢温度为 25~28℃，在此温度下生长的小肠结肠炎耶尔森菌方能表现出某些生化特性，因此使用微生物生化鉴定试剂盒应于 26℃进行反应。

参考文献

[1] 中国工业微生物菌种保藏管理中心. 食品安全国家标准食品微生物检验标准菌株图鉴 [M]. 北京：中国轻工业出版社，2014.

[2] 孟昭赫，刘宏道，何晓青，等. 食品卫生检验方法注解（微生物学部分）[M]. 北京：人民卫生出版社，1990:211.

## 附录 A

# 改良磷酸盐缓冲液验证



1、产品用途：用于小肠结肠炎耶尔森氏菌的增菌培养。

2、检验原理：山梨醇提供碳氮源，磷酸氢二钠和磷酸二氢钠为缓冲液，胆盐抑制革兰氏阳性菌，氯化钠提供细胞所需要的渗透压。

表 10-2：改良磷酸盐缓冲液验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
改良磷酸盐缓冲液	小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC (B) 52204+ 粪肠球菌 ATCC29212+ 铜绿假单胞菌 ATCC27853	逗点	/	27	在改良 Y 平板上 > 10CFU，菌落圆形、无色透明，不黏稠	在改良 Y 平板上 > 10CFU，菌落圆形、无色透明，不黏稠	符合
		L 品牌	/		在改良 Y 平板上 > 10CFU，菌落圆形、无色透明，不黏稠		符合
		H 品牌	/		在改良 Y 平板上 > 10CFU，菌落圆形、无色透明，不黏稠		符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	0	2010	< 100CFU	在 TSA 上 < 100CFU	符合
		L 品牌	0		< 100CFU		符合
		H 品牌	0		< 100CFU		符合
	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	0	1664	< 100CFU	在 TSA 上 < 100CFU	符合
		L 品牌	29		< 100CFU		符合
		H 品牌	0		< 100CFU		符合

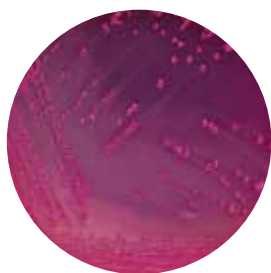
1. 小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC (B) 52204+ 粪肠球菌 ATCC29212+ 铜绿假单胞菌 ATCC27853 在改良磷酸盐缓冲液上的菌落特征：在改良 Y 平板上 > 10CFU，菌落圆形、无色透明，不黏稠；

2. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在改良磷酸盐缓冲液上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；

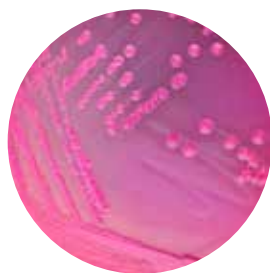
3. 粪肠球菌 ATCC 29212 在改良磷酸盐缓冲液上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；

### 3、典型特征图片：

	空白	肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC (B) 52204+ 粪肠球菌 ATCC29212+ 铜绿假单胞菌 ATCC27853	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	粪肠球菌 ATCC29212
逗点				
L 品牌				
H 品牌				



逗点 - 混菌划线改良 Y 平板



L 品牌 - 混菌划线改良 Y 平板



H 品牌 - 混菌划线改良 Y 平板



逗点 - 金黄色葡萄球菌 ATCC6538



L 品牌 - 金黄色葡萄球菌 ATCC6538



H 品牌 - 金黄色葡萄球菌 ATCC6538



逗点 - 粪肠球菌 ATCC29212



L 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212

图 10-1

#### 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC (B) 52204+ 粪肠球菌 ATCC29212+ 铜绿假单胞菌 ATCC27853，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标在改良 Y 平板上 > 10CFU，菌落圆形、无色透明，不黏稠；

4.2 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC6538、粪肠球菌 ATCC 29212，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标在 TSA 上 < 100CFU 的要求，L 品牌粪肠球菌 ATCC 29212 有菌落生长；

4.3 感观：逗点、L 品牌、H 品牌空白管颜色无显著差异。

## 附录 B

### CIN-1 培养基验证



1、产品用途：用于小肠结肠炎耶尔森氏菌的选择性分离和培养。

2、检验原理：蛋白胨和水解酪蛋白提供氮源和微量元素；乳糖用于糖发酵试验；氯化钠维持正常的渗透压，去氧胆酸钠和三号胆盐抑制革兰氏阳性菌；丙酮酸钠刺激目标菌的生长；琼脂是培养基的凝固剂。

表 10-3：CIN-1 培养基验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
CIN-1 培养基	小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC (B) 52204	逗点	700	750	0.9	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	690		0.9		符合
		H 品牌	740		0.9		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/		G=0		符合
		H 品牌	/		G=0		符合
金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合	
	L 品牌	/		G=0		符合	
	H 品牌	/		G=0		符合	

1. 小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC (B) 52204 在 CIN-1 培养基上的菌落特征：红色牛眼状菌落；

2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 CIN-1 培养基上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；

3. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在 CIN-1 培养基上的菌落特征：选择性 G ≤ 1。

#### 3、典型特征图片：



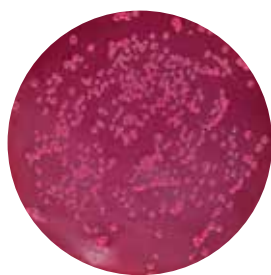
逗点 - 空白平板



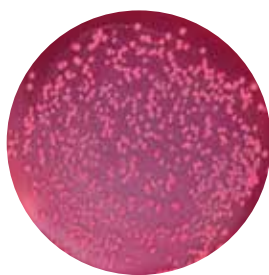
L 品牌 - 空白平板



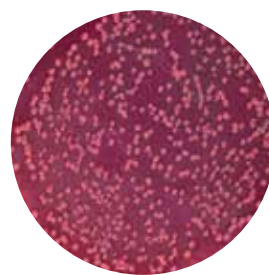
H 品牌 - 空白平板



逗点 - 小肠结肠炎耶尔森氏菌  
CMCC (B) 52204



L 品牌 - 小肠结肠炎耶尔森氏菌  
CMCC (B) 52204



H 品牌 - 小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC (B) 52204



逗点 - 大肠埃希氏菌  
ATCC25922



L 品牌 - 大肠埃希氏菌  
ATCC25922



H 品牌 - 大肠埃希氏菌  
ATCC25922



逗点 - 金黄色葡萄球菌  
ATCC6538



L 品牌 - 金黄色葡萄球菌  
ATCC6538



H 品牌 - 金黄色葡萄球菌  
ATCC6538

图 10-2

#### 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC (B) 52204，国标 PR ≥ 0.5 的要求，L 品牌、H 品牌满足国标 PR ≥ 0.5 的要求，红色牛眼状菌落；

4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 G ≤ 1 的要求；金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 G ≤ 1 的要求；

4.3 感观：逗点、L 品牌、H 品牌空白平板颜色无显著差异。

## 附录 C

### 改良 Y 培养基验证



1、产品用途：用于小肠结肠炎耶尔森氏菌的选择性分离和培养。

2、检验原理：蛋白胨和水解酪蛋白提供氮源和微量元素；乳糖用于糖发酵试验；氯化钠维持正常的渗透压，去氧胆酸钠和三号胆盐抑制革兰氏阳性菌；丙酮酸钠刺激目标菌的生长；琼脂是培养基的凝固剂。

表 10-4：改良 Y 培养基验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
改良 Y 培养基	小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC (B) 52204	逗点	365	688	0.5	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	362		0.5		符合
		H 品牌	370		0.5		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	粉红色菌落	粉红色菌落	符合
		L 品牌	/		粉红色菌落		符合
		H 品牌	/		粉红色菌落		符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/		G=0		符合
		H 品牌	/		G=0		符合

1. 小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC (B) 52204 在改良 Y 培养基上的菌落特征：无色透明不黏稠菌落；

2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在改良 Y 培养基上的菌落特征：粉红色菌落；

3. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在改良 Y 培养基上的菌落特征：选择性 G ≤ 1。

3、典型特征图片：

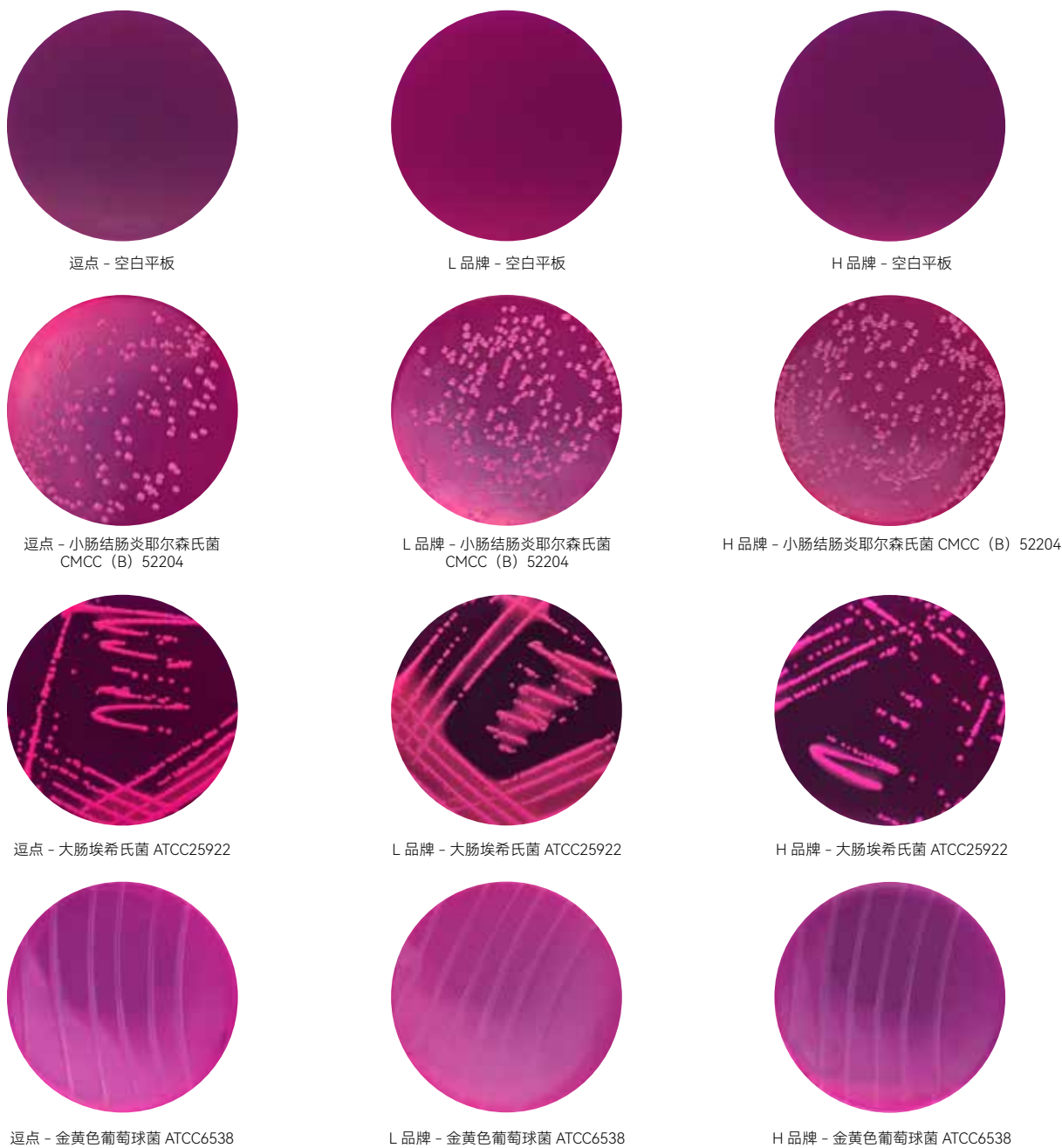


图 10-3

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC (B) 52204，逗点，L 品牌、H 品牌满足国标  $PR \geq 0.5$  的要求，无色透明不黏稠菌落；
- 4.2 特异性：大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标粉红色菌落的要求；
- 4.3 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $G \leq 1$  的要求；
- 4.4 感观：逗点、L 品牌、H 品牌平板颜色无显著差异。

附录 D

# 改良克氏双糖铁琼脂验证



- 1、产品用途：用于小肠结肠炎耶尔森氏菌的鉴定。
- 2、检验原理：蛋白胨、酵母浸膏、牛肉膏提供氮源、维生素、矿物质；山梨醇、葡萄糖提供可发酵糖类；硫代硫酸钠可被某些细菌还原成 H<sub>2</sub>S，与铁离子生成黑色硫化铁；酚红是 pH 指示剂，发酵糖产酸变黄，产碱变红；氯化钠维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂。

表 10-5：改良克氏双糖铁琼脂验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC (B) 52204	逗点	/	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢	生长良好, A/A; 不产气; 不产硫化氢	符合
	L 品牌	/	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢		符合
	H 品牌	/	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢		符合
鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	/	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢	符合
	L 品牌	/	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢		符合
	H 品牌	/	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢		符合
福氏志贺氏菌 ATCC12022	逗点	/	/	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢	符合
	L 品牌	/	/	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢		符合
	H 品牌	/	/	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢		符合
粪产碱杆菌 BNCC336452	逗点	/	/	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢	符合
	L 品牌	/	/	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢		符合
	H 品牌	/	/	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢		符合

1. 小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC (B) 52204 在改良克氏双糖铁琼脂上生长良好, A/A; 不产气; 不产硫化氢;
2. 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢;
3. 福氏志贺氏菌 ATCC12022 生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢;
4. 粪产碱杆菌 BNCC336452 生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢;

3、典型特征图片：

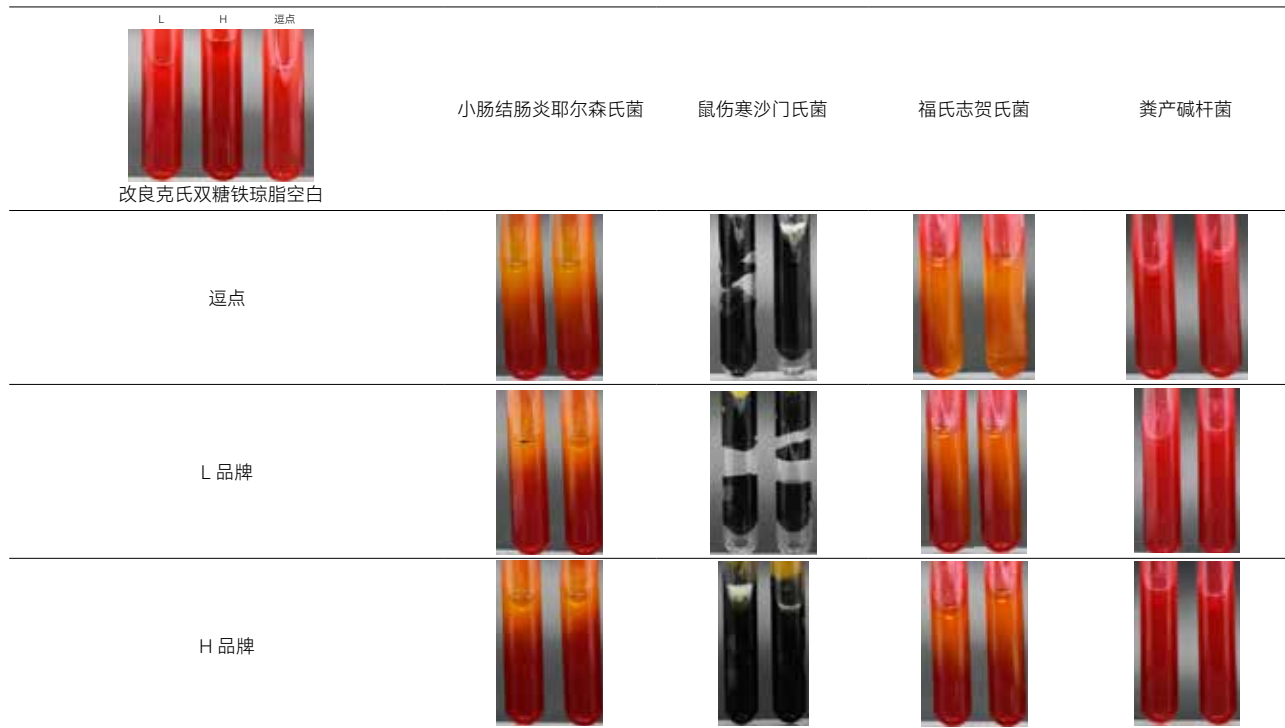


图 10-4

4、验证结果小结：

- 4.1 生化特性：目标菌小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC (B) 52204、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、福氏志贺氏菌 ATCC12022、粪产碱杆菌 BNCC336452 生长特性逗点、L 品牌、H 品牌均符合国标要求，L 品牌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 产气最明显，逗点鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 性能与 L 品牌较一致，H 品牌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 产气不明显；
- 4.2 感官：逗点、L 品牌、H 品牌空白管无明显差异。
- 4.3 都满足标准，逗点和 L 性能略好于 H。

# 11 食品微生物学检验 β 型溶血性链球菌检验 GB 4789.11—2014

## 一、概述

### 1.1 适用范围

本标准规定了食品中 β 型溶血性链球菌 (*Streptococcus*) 检验的检验方法。本标准适用于食品中 β 型溶血性链球菌的检验。

### 1.2 检测原理

β 型溶血性链球菌呈球形或卵圆形, 直径 0.6~1.0μm, 呈链状排列, 长短不一, 由 4~8 个至 20~30 个细胞组成不等, 需氧或兼性厌氧菌, 营养要求较高, 普通培养基上生长不良, 需补充血清、血液等生长因子。最适生长温度为 37℃, 在 20~42℃能生长, 最适 pH 为 7.4~7.6。在血清肉汤中易成长链, 管底呈絮状或颗粒状沉淀生长。在血平板上形成灰白色、半透明、表面光滑、边缘整齐、直径 0.5~0.75mm 的细小菌落, 能产生链球菌溶血素 O/S, 所以能在血平板上出现溶血环。该菌具有过氧化氢酶, 能催化过氧化氢成为水和原子态氧, 继而形成氧分子, 出现气泡。β 型溶血性链球菌在代谢过程中, 产生链激酶, 能激活血液中的纤维蛋白酶原为溶纤维蛋白酶, 促使纤维蛋白凝块溶解。

## 二、设备与耗材

### 2.1 设备

- 2.1.1 恒温培养箱 36℃ ±1℃。
- 2.1.2 冰箱 2~5℃。
- 2.1.3 厌氧培养装置。
- 2.1.4 天平 感量 0.1g。
- 2.1.5 均质器。
- 2.1.6 显微镜 100~1000 倍。
- 2.1.7 无菌吸管 1ml(具 0.01mL 刻度)、10mL(具 0.1mL 刻度)或微量移液器及吸头。
- 2.1.8 无菌锥形瓶 容量 100mL、200mL、2000mL。
- 2.1.9 无菌培养皿 直径 90mm。
- 2.1.10 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。
- 2.1.11 水浴装置 36℃ ±1℃。
- 2.1.12 微生物生化鉴定系统。
- 2.1.13 涡旋混匀仪。

### 2.2 耗材

- 2.2.1 均质袋。
- 2.2.2 生化鉴定试剂盒或生化鉴定卡。
- 2.2.3 厌氧产气袋。
- 2.2.4 均质杯。
- 2.2.5 接种环。
- 2.2.6 载玻片。

## 三、培养基与试剂

### 3.1 培养基

- 3.1.1 改良胰蛋白胨大豆肉汤 (Modified tryptone soybean broth, mTSB)。
- 3.1.2 哥伦比亚 CNA 血琼脂 (Columbia CNA blood agar)。
- 3.1.3 哥伦比亚血琼脂 (Columbia blood agar)。
- 3.1.4 胰蛋白胨大豆肉汤 (Tryptone soybean broth, TSB)。

### 3.2 试剂

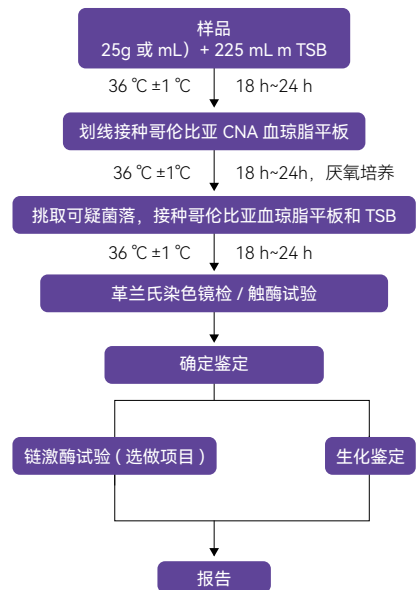
- 3.2.1 革兰染色液。
- 3.2.2 草酸钾血浆。
- 3.2.3 0.25% 氯化钙 (CaCl<sub>2</sub>) 溶液。
- 3.2.4 3% 过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 溶液。

## 四、检验过程

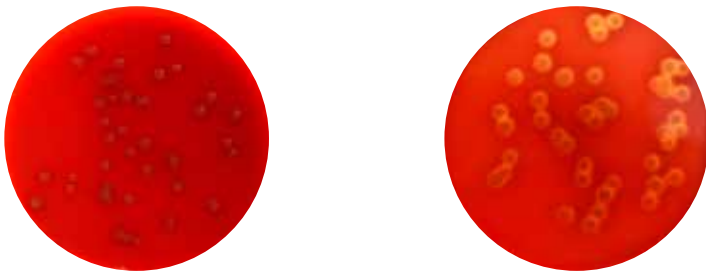
### 4.1 检验程序

### 4.2 检验步骤

- 4.2.1 样品前处理及增菌 按无菌操作称取检样 25g(mL), 加入盛有 225mL mTSB 的均质袋中, 用拍击式均质器均质 1~2 分钟; 或加入盛有 225mL mTSB 的均质杯中, 以 8000~10000r/min 均质 1~2 分钟。若样品为液态, 振荡均匀即可。36℃ ±1℃培养 18~24 小时。
- 4.2.2 分离 将增菌液划线接种于哥伦比亚 CNA 血琼脂平板, 36℃ ±1℃厌氧培养 18~24 小时, 观察菌落形态。溶血性链球菌在哥伦比亚 CNA 血琼脂平板上的典型菌落形态为直径 2~3mm, 灰白色、半透明、光滑、表面突起、圆形、边缘整齐, 并产生 β 型溶血。



流程图 11-1 溶血性链球菌检验程序



β型溶血性链球菌在哥伦比亚 CNA 血琼脂平板上的典型菌落 (正反面)

图 11-1

#### 4.2.3 鉴定

4.2.3.1 分纯培养 挑取 5 个 (如小于 5 个则全选) 可疑菌落分别接种哥伦比亚血琼脂平板和 TSB 增菌液, 36°C ± 1°C 培养 18~24 小时。

4.2.3.2 革兰染色镜检 挑取可疑菌落染色镜检。β 型溶血性链球菌为革兰染色阳性, 球形或卵圆形, 常排列成短链状。

4.2.3.3 触酶试验 挑取可疑菌落于洁净的载玻片上, 滴加适量 3% 过氧化氢溶液, 立即产生气泡者为阳性。β 型溶血性链球菌触酶为阴性 (见右图)。



触酶试验

图 11-2

4.2.3.4 链激酶试验 (选做项目) 吸取草酸钾血浆 0.2mL 于 0.8mL 0.85% 无菌生理盐水中混匀, 再加入经 36°C ± 1°C 培养 18~24 小时的可疑菌的 TSB 培养液 0.5mL 及 0.25% 氯化钙溶液 0.25mL, 振荡摇匀, 置于 36°C ± 1°C 水浴中 10 分钟, 血浆混合物自行凝固 (凝固程度至试管倒置, 内容物不流动)。继续 36°C ± 1°C 培养 24 小时, 凝固块重新完全溶解为阳性, 不溶解为阴性, β 型溶血性链球菌为阳性。

4.2.3.5 其他检验 使用生化鉴定试剂盒或生化鉴定卡对可疑菌落进行鉴定。

链激酶试验



a. 凝固

h. 溶解

图 11-3

### 4.3 结果与报告

综合以上试验结果, 报告每 25g(mL) 检样中检出或未检出溶血性链球菌。

## 五、检验注意事项

### 5.1 设备与耗材的控制与使用

5.1.1 实验室的设备和耗材入库时, 应该对产品的质量进行验收, 确保产品内外密封性、无潮湿、完好无损, 产品规格、型号相符, 且在有效期内。

5.1.2 为了保证试验结果的准确性, 每批次一次性耗材均应进行无菌性和性能验收。同时实验室应定期对洁净区、生物安全柜、超净工作台等进行环境监测。

5.1.3 实验用的一次性无菌耗材应存放于阴凉干燥、通风良好的物架上, 常温区域为 10~30°C, 阴凉区域为不高于 20°C, 相对湿度为 40%~65%。按失效期的先后顺序码放, 禁止与其他物品混放, 不得使用标识不清、包装破损、失效、霉变的耗材。

5.1.4 为了控制环境污染, 可在每次检验过程中, 于检验工作台上打开两块 TSA 平板, 并在检验环境中暴露不少于 15 分钟, 将此平板与本批次样品同时进行培养, 以掌握检验过程中是否存在来自检验环境的污染。

### 5.2 培养基与试剂的控制与使用

5.2.1 定期用 GB4789.28 推荐的阳性和阴性对照标准菌种, 对所使用的每批次培养基和生化试剂进行验证, 并进行记录。

5.2.2 实验过程中, 每批样品选择性增菌液、哥伦比亚 CNA 血琼脂平板等都要做空白对照。如果空白对照平板上出现 β 型溶血性链球菌菌落时, 应废弃本次实验结果, 并对增菌液、吸管、平皿、培养基、实验环境等进行污染来源分析。

5.2.3 定期使用 β 型溶血性链球菌标准菌株或相应定量活菌质控品, 在 BSL-II 生物安全实验室或阳性对照实验室内, 用适当的食品样品进行阳性对照试验验证, 染菌剂量应控制在每 25g 样品 10~100CFU, 并进行记录。

5.2.4 哥伦比亚 CNA 血琼脂平板应 2~8°C 冷藏保存, 开封后尽快使用完毕。

### 5.3 样品前处理

液体样品先用 NaOH 或 HCl 调节 pH 至 6.5~7.5。

### 5.4 增菌培养

5.4.1 使用均质袋进行增菌培养时, 应使用带有底托的均质袋架子, 防止培养过程中前增菌液泄露污染培养箱。

5.4.2 当样品为易产生较大颗粒的样品 (譬如肉与肉制品) 时, 可使用带滤网无菌均质袋, 以方便均质后用吸管吸取匀液。

### 5.5 菌落特征

哥伦比亚 CNA 血琼脂平板上如有 β 型溶血性链球菌落出现, 应与金黄色葡萄球菌区别。后者在哥伦比亚 CNA 血琼脂平板上, 菌落较大, 呈金黄色 (有时为白色), 菌落周围可见完全透明溶血圈。β 型溶血性链球菌在哥伦比亚 CNA 血琼脂平板上呈灰白色、半透明或不透明、光滑、表面突起、边缘整齐, 周围有无色透明溶血圈。

### 5.6 其他注意事项

5.6.1 厌氧环境下 (10% 二氧化碳和 90% 氮气), 哥伦比亚 CNA 血琼脂平板比普通血琼脂平板更适合 β 型溶血性链球菌的分离培养, 主要表现为菌落形态典型、溶血显现更为明显, 同时抑制了需氧菌及干扰菌的生长, 从而提高辨别率, 利于该菌的分离和筛选。

5.6.2 触酶实验中的 3% 过氧化氢溶液应现配现用; 用一次性塑料接种环挑取菌落; 不宜用血琼脂平板上生长的菌落, 因红细胞含有触酶,

可致假阳性反应。

5.6.3 因  $\beta$  型溶血性链球菌对消毒剂的抵抗力较低，远低于大肠杆菌对消毒剂的抵抗力。因此，培养室应尽量减少消毒剂残留对  $\beta$  型溶血性链球菌的生长影响（尽量选用一次性培养皿）。

5.6.4 在使用 VITEK2 Compact 全自动微生物分析系统进行鉴定时，应结合其他生物学特性综合评价后判断结果。如遇待检菌鉴定评分过低、多个生化反应结果不符或 48 小时生化反应仍不明显的情况，应考虑与链球菌乳化程度不够、呈颗粒状，不能形成均匀的菌悬液有关，此时应重复试验或改用其他方法鉴定，如 API20STREP 快速生化鉴定系统。

5.6.5 本方法移液时可使用可连接吸管的电动移液器，在使用过程中，一旦液体进入电动移液器滤膜中，应立即对滤膜进行更换，以防止交叉污染。

5.6.6 鉴于微量移液器移液头较短，为控制污染，在本方法移液过程中不建议使用。

## 六、疑难解析

6.1  $\beta$  型溶血与  $\alpha$  型溶血在观察时有什么区别？

$\beta$  型溶血：菌落周围出现较宽的透明溶血环； $\alpha$  型溶血：菌落周围出现较窄的草绿色溶血环。

6.2  $\beta$  型溶血性链球菌和乙型溶血性链球菌是一种菌吗？是的，同一种菌的不同名称。

6.3 为什么  $\beta$  型溶血性链球菌实验要在生物安全柜中操作？

$\beta$  型溶血性链球菌可通过直接接触、空气飞沫传播或通过皮肤、黏膜伤口感染，被污染的食品如奶、肉、蛋及其制品也可能会感染人，且该菌致病力强，应做好相应的个人防护，在生物安全柜中进行实验操作。

6.4 在医院抽了自己的血做链激酶试验，血浆无法凝固？医院用来抽血的小试管中已经有抗凝剂，一般是 EDTA，这个不能做链激酶试验。

6.5 草酸钾血浆该怎么配制？

直接有商品化的购买，如果买不到，由现在医院抽血加入到含 0.01g 草酸钾的真空试管，然后上下振摇使其混合均匀。

## 参考文献

[1] 张焕春. 临床微生物学和微生物检验 [M]. 北京：人民卫生出版社，2017.

## 附录 A

# 胰蛋白胍大豆肉汤 (TSB)



1、产品用途：可广泛应用于细菌的培养，特别用于消毒剂消毒效果的测试、蜡芽孢杆菌的多管发酵法测定、溶血性链球菌选择性增菌培养。

2、检验原理：胰蛋白胍、植物蛋白胍提供氮源、维生素和生长因子；葡萄糖提供碳源；磷酸氢二钾为缓冲剂；氯化钠维持均衡的渗透压。

表 11-1：胰蛋白胍大豆肉汤 (TSB) 验证数据

样品名称	质控菌株	厂家	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
胰蛋白胍大豆肉汤 (TSB)	$\beta$ -溶血性链球菌 CMCC(B)32210	逗点	88	生长良好 (浑浊度 2)	生长良好 (浑浊度 2)	符合
		H 品牌				符合
		L 品牌				符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	79	生长良好 (浑浊度 2)	生长良好 (浑浊度 2)	符合
		H 品牌				符合
		L 品牌				符合

## 3、典型特征图片：

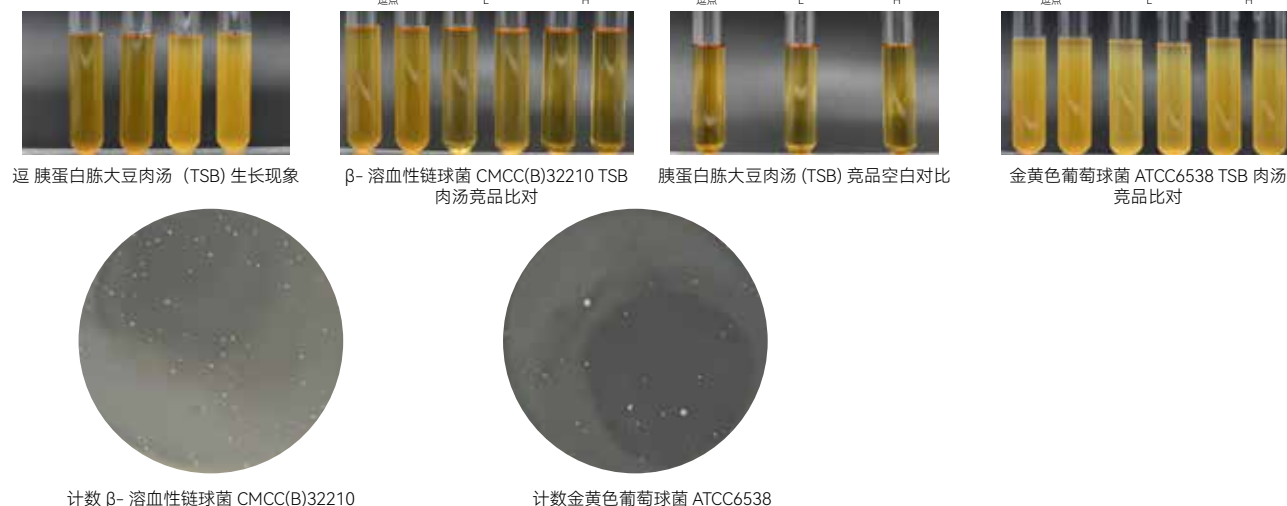


图 11-4

## 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌  $\beta$ -溶血性链球菌 CMCC(B)32210、金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌的混浊度、生长现象均满足要求；

4.2 观感：逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。

## 附录 B

# 哥伦比亚 CNA 血琼脂



1. 产品用途：用于溶血性链球菌的选择性分离。

2. 检验原理：胰酪蛋白胨、动物组织蛋白酶消化液、酵母提取粉、牛肉提取粉、淀粉提供碳氮源、维生素和生长因子；琼脂是凝固剂。配制添加羊血是细菌生长繁殖的良好营养物质。在 45 ~ 50°C 的基础培养基中加入血液可以保存血液中某些不耐热的生长因子，同时血球不被破坏。多粘菌素 B、萘啶酸能抑制杂菌生长。

表 11-2：哥伦比亚 CNA 血琼脂验证

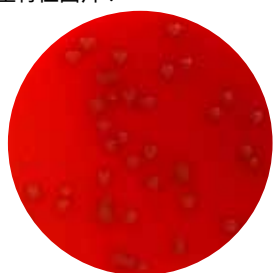
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
	化脓性链球菌 ATCC19615	逗点	40	46	PR=0.9	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	51		PR=1.1		符合
		H 品牌	46		PR=1		符合
哥伦比亚 CNA 血琼脂	普通变形杆菌 CMCC(B)49027	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/	/	G=0		符合
		H 品牌	/	/	G=0		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/	/	G=0		符合
		H 品牌	/	/	G=0		符合

1. 化脓性链球菌 ATCC19615 在哥伦比亚 CNA 血板上的菌落特征：灰白色菌落，产生 β 型溶血；

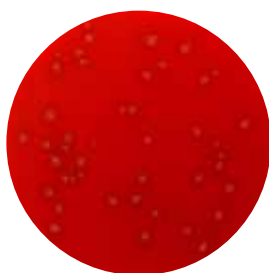
2. 普通变形杆菌 CMCC(B)49027 在哥伦比亚 CNA 血板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；

3. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在哥伦比亚 CNA 血板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；

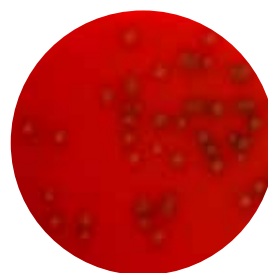
### 3、典型特征图片：



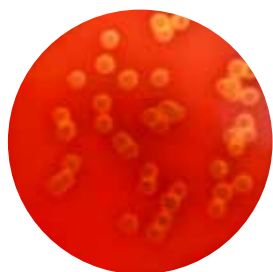
逗点化脓性链球菌 ATCC19615 (正面)



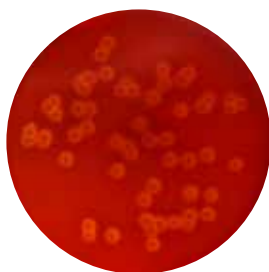
L 品牌化脓性链球菌 ATCC19615 (正面)



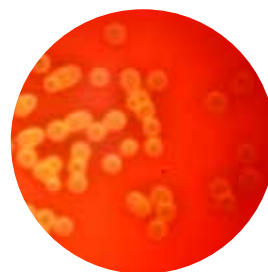
H 品牌化脓性链球菌 ATCC19615 (正面)



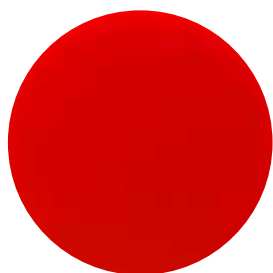
逗点化脓性链球菌 ATCC19615 (背面)



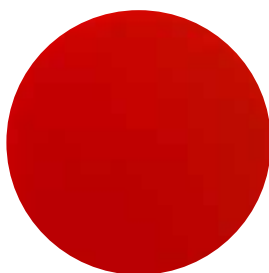
L 品牌化脓性链球菌 ATCC19615 (背面)



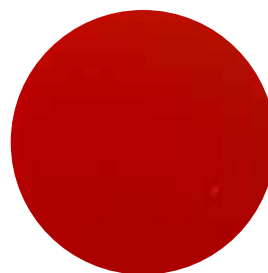
H 品牌化脓性链球菌 ATCC19615 (背面)



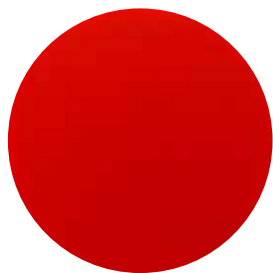
逗点普通变形杆菌 CMCC(B)49027



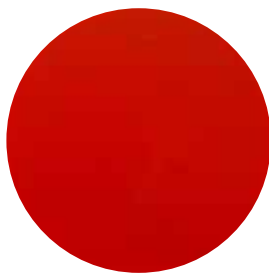
L 品牌普通变形杆菌 CMCC(B)49027



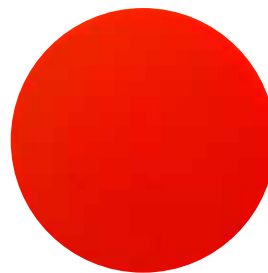
H 品牌普通变形杆菌 CMCC(B)49027



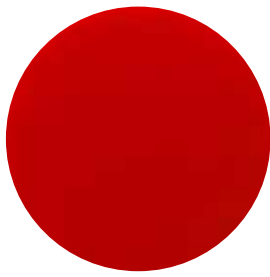
逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



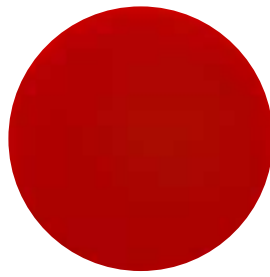
L 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



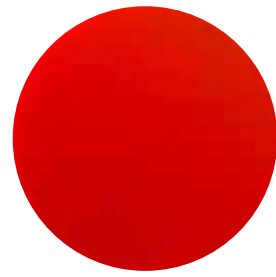
H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点哥伦比亚 CNA 血琼脂空白



L 品牌哥伦比亚 CNA 血琼脂空白



H 品牌哥伦比亚 CNA 血琼脂空白

图 11-5

#### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌化脓性链球菌 ATCC19615，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 PR ≥ 0.5 的要求，逗点、H 品牌、L 品牌都有产生 β 型溶血。
- 4.2 选择性：普通变形杆菌 CMCC(B)49027、大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 G ≤ 1 的要求。
- 4.3 感观：三家外观暂无明显差异。

### 附录 C

## 哥伦比亚血琼脂验证



- 1. 产品用途：用于苛养和非苛养型细菌的培养，以及溶血性细菌的鉴别
- 2. 检验原理：酪蛋白胰酶消化物、心胰酶消化物、肉胃酶消化物、酵母浸出粉、可溶性淀粉提供碳氮源、维生素和生长因子；羊血是细菌生长繁殖的良好营养物质。在 45 ~ 50°C 的基础培养基中加入血液可以保存血液中某些不耐热的生长因子，同时血球不被破坏。

表 11-3：哥伦比亚血琼脂验证

样品名称	质控菌株	厂家	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
哥伦比亚血琼脂	金黄色葡萄球菌 ATCC 6538	逗点	菌落周围有 β 溶血环	菌落周围有 β 溶血环	符合
		L 品牌	菌落周围有 β 溶血环		符合
		H 品牌	菌落周围有 β 溶血环		符合
	蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303	逗点	菌落周围有 α 溶血环	菌落周围有 α 溶血环	符合
		L 品牌	菌落周围有 α 溶血环		符合
		H 品牌	菌落周围有 α 溶血环		符合

#### 3、典型特征图片：



逗点金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 (正面)



L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 (正面)



H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 (正面)



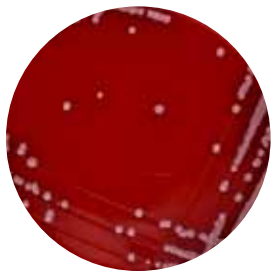
逗点金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 (反面)



L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 (反面)



H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 (反面)



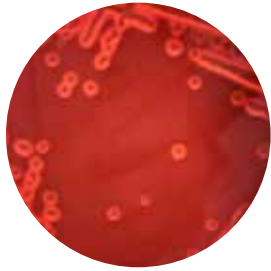
逗点蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303 (正面)



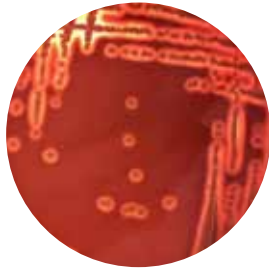
L 品牌蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303 (正面)



H 品牌蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303 (正面)



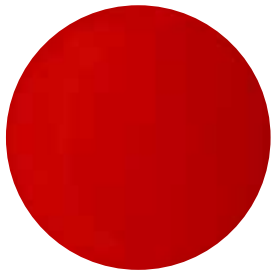
逗点蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303 (反面)



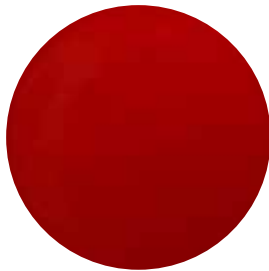
L 品牌蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303 (反面)



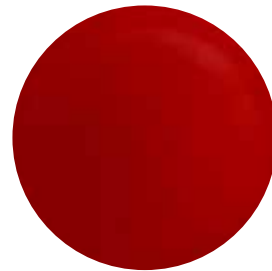
H 品牌蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303 (反面)



逗点哥伦比亚血琼脂空白



L 品牌哥伦比亚血琼脂空白



H 品牌哥伦比亚血琼脂空白

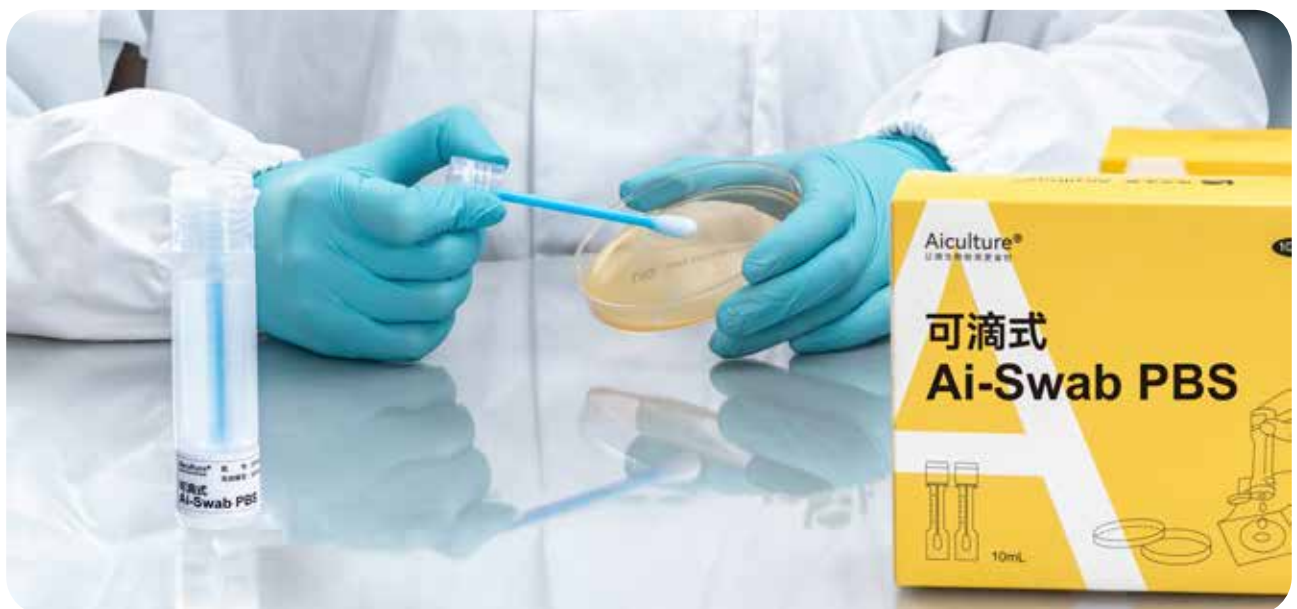
图 11-6

#### 4、验证结果小结：

4.1 特异性：目标菌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标生长特性溶血现象的要求，逗点、H 品牌溶血现象明显，L 品牌溶血现象较弱。逗点生长速度较缓慢。

4.2 感观：逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。

4.3 三家产品无明显差距。



# 12 食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验 GB 4789.14—2014

## 一、概述

蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*) 属于芽胞杆菌属 (*Bacillus*) 中的一种革兰阳性芽胞杆菌, 其广泛分布于灰尘、土壤、生活污水及动物肠道之中, 在许多植物性食品和生熟食品中也十分常见。该菌最适生长温度为 28~35℃, 最低生长温度 4~5℃, 最高生长温度 48~50℃, 65~70℃ 菌体易失去活性; 该菌对 pH 值耐受较强, 在 pH 1~2 不生长, pH 2~11 可以生长, 其中在 pH 4.9~9.3 之间时可迅速繁殖; 最适生长氯化钠浓度为 1%、当生长环境中含有 8% 氯化钠时对其生长有抑制作用, 无盐情况下生长良好。该菌大小为 (1~1.3) μm×(3~5) μm, 在营养条件缺乏时能形成芽胞, 其芽胞呈椭圆形, 位于菌体中央稍偏一端。与蜡样芽胞杆菌生化反应相似的菌株包括蕈状芽胞杆菌、苏云金芽胞杆菌、炭疽芽胞杆菌及巨大芽胞杆菌。它们的形态特征、生理生化特征非常相似, 而且有着极高的 DNA 同源性。通过常规生化试验也无法进行有效区分, 还需进一步借助根状生长实验和蛋白质毒素结晶实验来鉴别。

蜡样芽胞杆菌是一种条件致病菌, 研究发现当食品中菌体浓度达到  $10^5 \sim 10^8$  CFU/g 时即可导致食物中毒。一般通过产生腹泻毒素和呕吐毒素导致食物中毒, 偶尔发现其通过菌体感染引起人的心内膜炎、脑膜炎和细菌性败血症等疾病。腹泻毒素是一种不耐热的蛋白质, 理化性状不稳定, 80℃ 加热 10 分钟, 其活性完全消失, 4℃ 冰箱放置 30 天活力消失, 胰蛋白酶和胃蛋白酶可将其灭活, 因此腹泻型肠毒素往往是由于食物中未被杀灭的蜡样芽胞杆菌孢子在小肠中萌发繁殖产生而引起人类食物中毒。生活中常引起腹泻型食物中毒的食物有肉类、乳制品和蔬菜等, 通常在进食污染食品 6~15 小时后发病, 主要症状为水样腹泻、腹部痉挛和疼痛, 少见呕吐。呕吐型毒素常常在米饭、土豆等淀粉类食物中产生, 是一种耐热的非核糖体合成的小肽, 进入人体后在胃中与其受体 5-HT<sub>2</sub> 结合, 导致呕吐。该毒素分子活力较稳定, 在 126℃ 作用 90 分钟才能被破坏, 短时间加热无法破坏其毒性。蜡样芽胞杆菌导致呕吐型胃肠炎往往不是由于进食污染食品后该菌在人体内繁殖并产生毒素所致, 而是污染食品在食用前已经产生了致吐毒素, 致吐毒素导致发病的潜伏期较短, 一般仅为 0.5~6 小时, 以恶心和呕吐为主要症状, 并有头晕、四肢无力等症状。与金黄色葡萄球菌引发的食物中毒症状相似。

食品中的蜡样芽胞杆菌检验应按照《食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验》(GB 4789.14) 开展。本标准对食品中可能存在的蜡样芽胞杆菌通过平板计数法及 MPN 法进行定量检测。

## 二、设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外, 其他设备和材料如下。

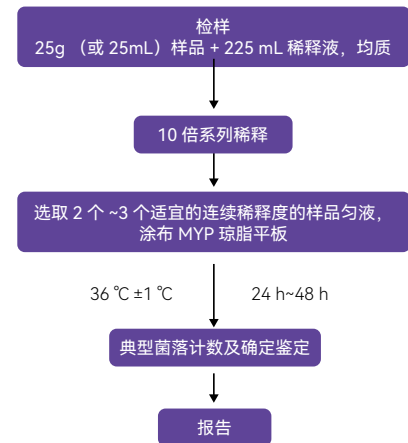
- 2.1 冰箱 2~5℃。
- 2.2 恒温培养箱 30℃ ±1℃、36℃ ±1℃。
- 2.3 均质器。
- 2.4 电子天平 感量 0.1g。
- 2.5 无菌锥形瓶 100mL、500mL。
- 2.6 无菌吸管 1mL (具 0.01mL 刻度)、10mL (具 0.1mL 刻度) 或微量移液器及吸头。
- 2.7 无菌平皿 直径 90mm。
- 2.8 无菌试管 18mm×180mm。
- 2.9 显微镜 10 ~ 100 倍 (油镜)。
- 2.10 L 涂布棒。

## 三、培养基和试剂

- 3.1 磷酸盐缓冲液 (PBS)。
- 3.2 甘露醇卵黄多黏菌素 (MYP) 琼脂。
- 3.3 胰酪胨大豆多黏菌素肉汤。
- 3.4 营养琼脂。
- 3.5 过氧化氢溶液。
- 3.6 动力培养基。
- 3.7 硝酸盐肉汤。
- 3.8 酪蛋白琼脂。
- 3.9 硫酸锰营养琼脂培养基。
- 3.10 0.5% 碱性复红。
- 3.11 动力培养基。
- 3.12 糖发酵管。
- 3.13 V-P 培养基。
- 3.14 胰酪胨大豆羊血 (TSSB) 琼脂。
- 3.15 溶菌酶营养肉汤。
- 3.16 西蒙柠檬酸盐培养基。
- 3.17 明胶培养基。

## 四、蜡样芽胞杆菌平板计数法 (第一法)

本方法适用于被检样品中蜡样芽胞杆菌污染量较高且杂菌较少的情况。



流程图 12-1 蜡样芽胞杆菌平板计数法检验程序

#### 4.1 检验流程

蜡样芽胞杆菌平板计数法检验程序见流程图 12-1。

#### 4.2 操作步骤

4.2.1 样品处理 冷冻样品应在 45℃以下不超过 15 分钟或在 2~5℃不超过 18 小时解冻，若不能及时检验，应放于 -20~-10℃保存；非冷冻而易腐的样品应尽可能及时检验，若不能及时检验，应置于 2~5℃冰箱保存，24 小时内检验。

4.2.2 样品制备 固体和半固体食品样品：无菌操作称取样品 25g，放入盛有 225mL PBS 或 0.85% 无菌生理盐水的无菌均质杯内，用旋转刀片式均质器以 8000~10000r/min 均质 1~2 分钟，或放入盛有 225mL PBS 或 0.85% 无菌生理盐水的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1~2 分钟，均质器拍击时应防止坚硬样品将均质袋刺穿造成供试品泄露。

液态样品：无菌操作吸取 25mL 样品至盛有 225mL PBS 或 0.85% 无菌生理盐水的无菌锥形瓶（瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠）或无菌均质袋中，振荡或拍击混匀，作为 1:10 的样品匀液。

4.2.3 样品稀释 吸取 1:10 的样品匀液 1mL 加入装有 9mL PBS 或 0.85% 无菌生理盐水的稀释管中，充分混匀制成 1:100 的样品匀液。根据对样品污染状况的估计，按上述操作，依次十倍递增稀释。每递增稀释 1 次，换用 1 支无菌吸管或吸头。

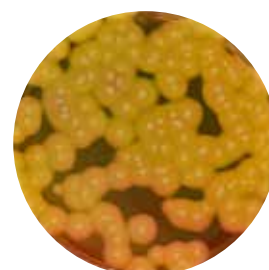
4.2.4 样品接种 根据对样品污染状况的估计，选择 2~3 个适宜稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），以 0.3mL、0.3mL、0.4mL 接种量分别接入三块 MYP 琼脂平板，然后用无菌 L 棒涂布整个平皿，注意不要触及平皿边缘。使用前，如 MYP 琼脂平皿表面有水珠，可放在 25~50℃的培养箱里干燥，直到平皿表面的水珠消失。

4.2.5 培养 样品涂布后，将平板正置静置 10 分钟待平板充分吸收样品匀液。如样液不易吸收，可将平板正置放在培养箱 30℃±1℃培养 1 小时，等样品匀液吸收后翻转平板，倒置于培养箱，30℃±1℃培养 (24±2) 小时。如果菌落不典型，可继续培养 (24±2) 小时再观察。在 MYP 琼脂平板上，典型菌落为微粉红色（表示不发酵甘露醇），周围有白色至淡粉红色沉淀环（表示产卵磷脂酶）。

4.2.6 可疑菌株分离、纯化，从每个平板中挑取至少 5 个典型菌落（小于 5 个全选），分别划线接种于营养琼脂平板做纯培养（如杂菌较多可能干扰典型菌落挑取，可将典型菌落挑出划线于 MYP 平板纯化后再转接营养琼脂平板），30℃±1℃培养 (24±2) 小时，进行确证实验。在营养琼脂平板上，典型菌落为灰白色，偶有黄绿色，不透明，表面粗糙似毛玻璃状或融蜡状，边缘常呈扩展状，直径为 4~10mm。

4.2.7 染色镜检 挑取纯培养的单个菌落，革兰染色镜检。蜡样芽胞杆菌为革兰阳性芽胞杆菌，大小为 (1~1.3)μm×(3~5)μm，芽胞呈椭圆形位于菌体中央或偏端，不膨大于菌体，菌体两端较平整，多呈短链或长链状排列。

4.2.8 生化鉴定 挑取纯培养的单个菌落，进行过氧化氢酶试验、动力试验、硝酸盐还原试验、酪蛋白分解试验、溶菌酶耐性试验、V-P 试验、葡萄糖利用（厌氧）试验、根状生长试验、溶血试验、蛋白质毒素结晶试验。



蜡样芽胞杆菌 CMCC (B) 63303  
图 12-1

表 12-1 结果判定表

项目	蜡样芽胞杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	苏云金芽胞杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	蕈状芽胞杆菌 <i>Bacillus mycoides</i>	炭疽芽胞杆菌 <i>Bacillus anthracis</i>	巨大芽胞杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>
革兰氏染色	+	+	+	+	+
过氧化氢酶	+	+	+	+	+
动力	+/-	+/-	-	-	+/-
硝酸盐还原	+	+/-	+	+	-/+
酪蛋白分解	+	+	+/-	-/+	+/-
溶菌酶耐性	+	+	+	+	-
卵黄反应	+	+	+	+	-
葡萄糖利用（厌氧）	+	+	+	+	-
V-P 试验	+	+	+	+	-
甘露醇产酸	-	-	-	-	+
溶血（羊红细胞）	+	+	+	-/+	-
根状生长	-	-	+	-	-
蛋白质毒素晶体	-	+	-	-	-

注：+ 表示 90%~100% 的菌株阳性；- 表示 90%~100% 的菌株阴性；+/- 表示大多数的菌株阳性；-/+ 表示大多数的菌株阴性。

#### 4.3 结果计算与报告

4.3.1 典型菌落计数和确认 选择有典型蜡样芽胞杆菌菌落的平板，且同一稀释度 3 个平板所有菌落数合计在 20~200CFU 之间的平板，计数典型菌落数。

如果出现下列现象按 4.3.2 中公式 (1) 计算。

- 只有一个稀释度的平板菌落数在 20 ~ 200 CFU 之间且有典型菌落，计数该稀释度平板上的典型菌落；
- 2 个连续稀释度的平板菌落数均在 20 ~ 200 CFU 之间，但只有一个稀释度的平板有典型菌落，应计数该稀释度平板上的典型菌落；
- 所有稀释度的平板菌落数均小于 20CFU 且有典型菌落，应计数最低稀释度平板上的典型菌落；
- 某一稀释度的平板菌落数大于 200CFU 且有典型菌落，但下一稀释度平板上没有典型菌落，应计数该稀释度平板上的典型菌落；
- 所有稀释度的平板菌落数均大于 200 CFU 且有典型菌落，应计数最高稀释度平板上的典型菌落；
- 所有稀释度的平板菌落数均不在 20 ~ 200CFU 之间且有典型菌落，其中一部分小于 20CFU 或大于 200CFU 时，应计数最接近 20CFU 或 200CFU 的稀释度平板上的典型菌落。
- 2 个连续稀释度的平板菌落数均在 20 ~ 200 CFU 之间且均有典型菌落，则按 4.3.2 中公式 (2) 计算。

#### 4.3.2 计算公式

##### 4.3.2.1 菌落计算公式 (1)

式中：

- T-- 样品中蜡样芽胞杆菌菌落数；
- A-- 某一稀释度蜡样芽胞杆菌典型菌落的总数；
- B-- 鉴定结果为蜡样芽胞杆菌的菌落数；
- C-- 用于蜡样芽胞杆菌鉴定的菌落数；
- d-- 稀释因子。

$$T = \frac{AB}{Cd} \dots \dots \dots (1)$$

#### 4.3.2.2 菌落计算公式 (2)

式中：

- T-- 样品中蜡样芽胞杆菌菌落数；
- A<sub>1</sub>-- 第一稀释度 (低稀释倍数) 蜡样芽胞杆菌典型菌落的总数；
- A<sub>2</sub>-- 第二稀释度 (高稀释倍数) 蜡样芽胞杆菌典型菌落的总数；
- B<sub>1</sub>-- 第一稀释度 (低稀释倍数) 鉴定结果为蜡样芽胞杆菌的菌落数；
- B<sub>2</sub>-- 第二稀释度 (高稀释倍数) 鉴定结果为蜡样芽胞杆菌的菌落数；
- C<sub>1</sub>-- 第一稀释度 (低稀释倍数) 用于蜡样芽胞杆菌鉴定的菌落数；
- C<sub>2</sub>-- 第二稀释度 (高稀释倍数) 用于蜡样芽胞杆菌鉴定的菌落数；
- 1.1-- 计算系数 (如果第二稀释度蜡样芽胞杆菌鉴定结果为 0, 计算系数采用 1)；
- d-- 稀释因子 (第一稀释度)。

$$T = \frac{A_1 B_1 / C_1 + A_2 B_2 / C_2}{1.1d} \dots \dots \dots (2)$$

4.3.3 报告 根据 MYP 平板上蜡样芽胞杆菌的典型菌落数, 按 4.3.2 中公式 (1)、公式 (2) 计算, 报告每 1g(mL) 样品中蜡样芽胞杆菌菌数, 以 CFU/g(mL) 表示; 如 T 值为 0, 则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。

必要时报告蜡样芽胞杆菌生化分型结果。

### 5 蜡样芽胞杆菌 MPN 计数法 (第二法)

此方法适用于待测样品中蜡样芽胞杆菌污染量低且杂菌较多的情况。

#### 5.1 检验流程

蜡样芽胞杆菌 MPN 计数法检验程序见流程图 12-2

#### 5.2 操作步骤

5.2.1 样品处理、制备及稀释 同 4.2.1~4.2.3。

5.2.2 样品接种 取 3 个适宜的连续稀释度的样品匀液 (液体样品可包括原液), 接种于 10mL 胰酪胨大豆多黏菌素肉汤中, 每一稀释度接种 3 管, 每管接种 1mL (如果接种量需要超过 1mL, 则用双料胰酪胨大豆多黏菌素肉汤)。于 30℃ ±1℃ 培养 (48±2) 小时。

5.2.3 培养 用接种环从各管中分别移取 1 环, 划线接种到 MYP 琼脂平板上, 30℃ ±1℃ 培养 (24±2) 小时。如果菌落不典型, 可继续培养 (24±2) 小时再观察。剩余纯培养及鉴定操作同平板法 (第一法)。

#### 5.3 结果与报告

根据证实为蜡样芽胞杆菌阳性的试管管数, 查 MPN 表记录结果。报告每 1g(mL) 样品中蜡样芽胞杆菌的最可能数, 以 MPN/g(mL) 表示。

### 六、质量控制

6.1 实验所需培养基应在入库前按照 GB4789.28 及产品相关规定进行验收, 合格后方可入库。

6.2 实验过程中使用的培养基、增菌液应做空白对照组, 如空白对照组有阳性菌株生长, 应废弃本次实验结果, 并对实验过程中每一步进行污染来源分析, 采取相关控制措施防止再次发生污染事件。

6.3 试验时应定期使用标准阳性菌株或者购买质控样进行阳性对照实验, 考察试验室检验能力, 发现问题及时内部整改。

### 七、操作要点与注意事项

7.1 均质袋盛装样品拍击均质时, 应防止坚硬样品刺穿均质袋, 造成样品泄露污染。

7.2 配制 MYP 培养基时, 应按照产品说明添加相应添加剂, 温度不宜过高以免添加剂高温变性影响实验结果。

7.3 倾注 MYP 平板时, 应防止剧烈摇动培养基, 以免产生气泡, 影响实验结果计数。工作台面应提前用水平尺调平, 防止 MYP 平板倾斜造成样品匀液往低处流动聚集影响计数。往 MYP 平板加样时, 每次加样前样品匀液应充分振荡均匀, 防止菌体沉降, 同时样品匀液加于平板中间应马上涂布, 涂布时不要将样品匀液接触到平板壁, 待样液充分吸收后再倒置培养。

7.4 同时进行多个样品检验时, 应注意手套及用具消毒避免样品间的交叉污染。

7.5 自然界中, 很多野生型菌株可能存在生化反应弱阳性情况, 为避免漏检, 在生化反应出现弱阳性时, 应进行重复试验。

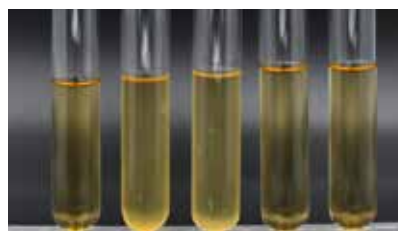
7.6 检验中应不定期观察平板, 提前在 MYP 平板上做好可疑菌株标记, 防止干扰菌株在培养后期干扰目标菌株挑选。如杂菌较多可能干扰典型菌落挑取, 可将典型菌落挑出划线于 MYP 平板纯化后再转接营养琼脂平板进行生化鉴定试验。

7.7 进行根状生长试验时, 可疑菌株和蕈状芽胞杆菌划线距离应间隔 2~3cm。

7.8 进行蛋白质毒素结晶试验时芽胞形成量直接影响试验结果, 试验时应用显微镜观察芽胞形成情况, 如芽胞形成较少应继续培养待芽胞



流程图 12-2 蜡样芽胞杆菌 MPN 计数法检验程序



胰酪胨大豆多黏菌素肉汤 - 蜡样芽胞杆菌 CMCC (B) 63303+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922- 大肠埃希氏菌 ATCC25922  
图 12-2

充分形成以后再行蛋白质毒素结晶试验。

7.9 平板重叠放置培养时，为保证不同平板温湿度均匀性，重叠培养高度不应超过 6 个平板。

7.10 试验中建议采用吸管进行样品转移操作，吸管上口部应放置脱脂棉，有条件的实验室采用带有细菌过滤膜的电动移液器时，如发生样液进入移液器，应立即消毒移液器并更换细菌过滤膜，以防止交叉污染。鉴于微量移液器移液头较短，为控制污染，本方法移液过程中不推荐使用微量移液器，如条件限制一定要使用，建议使用带滤芯的一次性无菌移液枪头。

7.11 对一些样品均质后仍有较大颗粒的样品，建议使用带滤网的均质袋，以方便吸取及涂布。

## 八、疑难解析

8.1 蜡样芽胞杆菌检测中如何正确选择第一法及第二法？

在实验开始之前可查询相关资料，对待测样品蜡样芽胞杆菌污染程度及背景菌种类及数量进行预估，蜡样芽胞杆菌污染量较高且杂菌较少适于第一法；蜡样芽胞杆菌污染量低且杂菌较多适用于第二法。如无法预估，在条件允许之下可两种实验方法同时进行，试验时两种方法样品匀液应多做几个稀释级，防止实验结果落到合适的稀释级。

8.2 试验中怎么防止 MYP 平板计数数量出现较大偏差？

涂布法计数法除了对培养基营养成分要求很高之外，还对平板干燥程度和平整程度要求很高，平板含水太多造成样品匀液无法及时吸收，从而容易造成样液流动聚集影响后续计数。平板不够平整容易造成样品匀液向平板低洼处流动汇集，造成菌落生长成团无法计数，或造成样品匀液靠壁从而引发目标菌株数量偏低。因此实验中在倾倒 MYP 平板前应将试验台调至水平，涂布前仔细挑选比较平整的平板进行试验。

8.4 怎么判断菌液浓度达到了试剂盒规定的麦氏浓度？

当前市场上有很多成品的蜡样芽胞杆菌鉴定试剂盒，很多实验室也会购买成品试剂盒进行菌株鉴定。通常在做生化鉴定之前，需将菌液浓度调节到试剂盒规定的麦氏浓度。因判断菌液浓度我们只能凭借肉眼进行对比，为减少实验误差，我们建议在 A4 纸上打印一条黑色的线，将调节好的菌液瓶和标准麦氏浓度瓶放在该线上方，透过瓶内菌液黑色色度一致便可认为试验瓶麦氏浓度和标准瓶一致。

8.5 哪类食品中容易检出蜡样芽胞杆菌？

蜡样芽胞杆菌是主要的食源性条件致病菌，根据《美国 FDA 细菌学分析手册》（第八版）和其他文献记载，该菌广泛存在于米、蒸熟的米饭和炒饭、肉制品、海鲜、乳品、豆类食品、蔬菜中，当食品中蜡样芽胞杆菌数量超过  $10^5 \sim 10^6$  CFU/mL，即可引起腹泻和呕吐。

8.6 蛋白质毒素结晶试验有哪些注意事项？

蛋白质毒素结晶的形成与芽胞形成是否丰富有很大的关系，故试验前应观察可疑菌株芽胞形成是否丰富，如发现游离芽胞形成的不丰富，应再将培养物置室温 2~3 天后进行检查。同时由于蛋白质毒素结晶观察可能不是很明显，故实验应接种苏云金芽胞杆菌做同步对比实验，以进行对比观察。

参考文献：< 食品检验操作技术规范（微生物检验）> 中国食品药品检定研究院

## 附录 A

# 胰酪胨大豆多粘菌素肉汤验证



1、产品用途：用于蜡样芽胞杆菌选择性的增菌培养。

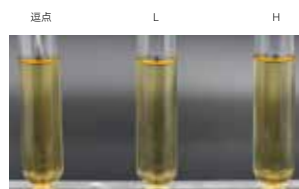
2、检验原理：胰酪胨、植物胨提供氮源、维生素和生长因子；葡萄糖提供碳源；磷酸氢二钾为缓冲剂；氯化钠维持均衡的渗透压；多粘菌素 B 可抑制杂菌的生长。

表 12-2：胰酪胨大豆多粘菌素肉汤验证数据

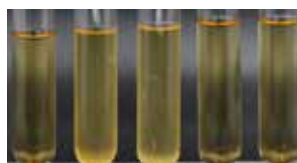
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
胰酪胨大豆多粘菌素肉汤	蜡样芽胞杆菌 CMCC (B) 63303+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	120	在 MYP 上 > 10CFU	在 MYP 上 > 10CFU，菌落为微粉红色，周围有淡粉红色沉淀环	符合
		H 品牌	/		在 MYP 上 > 10CFU		符合
		L 品牌	/		在 MYP 上 > 10CFU		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	0	2860	< 100CFU	在 TSA < 100CFU	符合
		H 品牌	0		< 100CFU		符合
		L 品牌	0		< 100CFU		符合

1. 蜡样芽胞杆菌 CMCC (B) 63303+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在胰酪胨大豆多粘菌素肉汤上的菌落特征：在 MYP 上 > 10CFU，菌落为微粉红色，周围有淡粉红色沉淀环；  
2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在胰酪胨大豆多粘菌素肉汤上的菌落特征：在 TSA < 100CFU；

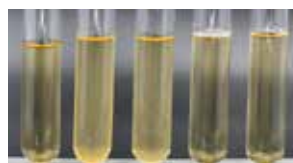
3、典型特征图片：



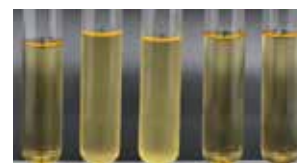
逗点 -L 品牌 -H 品牌 - 胰酪胨大豆多粘菌素肉汤空白



逗点 - 胰酪胨大豆多粘菌素肉汤 - 蜡样芽胞杆菌 CMCC (B) 63303+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



L 品牌 - 胰酪胨大豆多粘菌素肉汤 - 蜡样芽胞杆菌 CMCC (B) 63303+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌 - 胰酪胨大豆多粘菌素肉汤 - 蜡样芽胞杆菌 CMCC (B) 63303+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点 - 胰酪胨大豆多粘菌素肉汤划线 MYP



L 品牌 - 胰酪胨大豆多粘菌素肉汤划线 MYP



H 品牌 - 胰酪胨大豆多粘菌素肉汤划线 MYP



逗点 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



L 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922

图 12-3

#### 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌蜡样芽孢杆菌 CMCC(B)63303+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922, 逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标在 MYP 上 > 10CFU 的要求, 菌落周围有沉淀环；

4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922, 逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标在 TSA < 100CFU 的要求；

4.3 感观：逗点、L 品牌、H 品牌空白肉汤颜色无显著差异。

## 附录 B

# 甘露醇卵黄多粘菌素琼脂 (MYP) 验证



1、产品用途：用于蜡样芽孢杆菌的菌数测定及分离培养。

2、检验原理：蛋白胨和牛肉膏粉提供氮源、维生素和生长因子；D-甘露醇为可发酵糖类；氯化钠维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂；酚红为 pH 指示剂；卵黄含有卵磷脂，蜡样芽孢杆菌产生卵磷脂酶，在菌落周围产生沉淀环；并发酵 D-甘露醇产酸使菌落显黄色；多粘菌素 B 可抑制杂菌的生长。

表 12-3：甘露醇卵黄多粘菌素琼脂 (MYP) 验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
甘露醇卵黄多粘菌素琼脂 (MYP)	蜡样芽孢杆菌 CMCC (B) 63303	逗点	151	120	1.2	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	164		1.3		符合
		H 品牌	184		1.5		符合
	枯草芽孢杆菌 ATCC6633	逗点	/	/	黄色菌落, 无沉淀环	黄色菌落, 无沉淀环	符合
		L 品牌	/		黄色菌落, 无沉淀环		符合
		H 品牌	/		黄色菌落, 无沉淀环		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/		G=0		符合
		H 品牌	/		G=0		符合

1. 蜡样芽孢杆菌 CMCC (B) 63303 在甘露醇卵黄多粘菌素琼脂 (MYP) 板上的菌落特征：菌落为微粉红色，周围有淡粉红色沉淀环；

2. 枯草芽孢杆菌 ATCC6633 在甘露醇卵黄多粘菌素琼脂 (MYP) 板上的菌落特征：黄色菌落，无沉淀环；

3. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在甘露醇卵黄多粘菌素琼脂 (MYP) 板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；

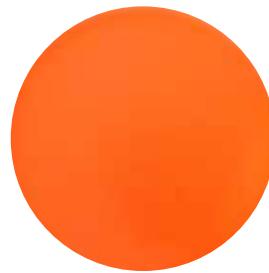
#### 3、典型特征图片：



逗点 - 空白平板



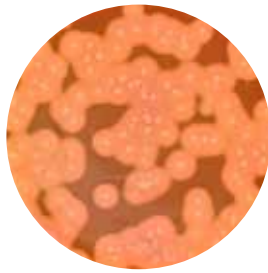
L 品牌 - 空白平板



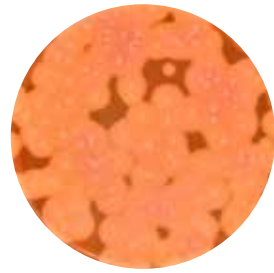
H 品牌 - 空白平板



逗点 - 蜡样芽胞杆菌 CMCC (B) 63303



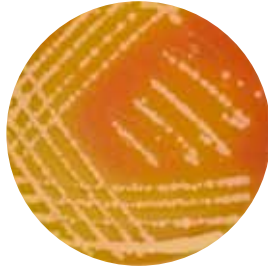
L 品牌 - 蜡样芽胞杆菌 CMCC (B) 63303



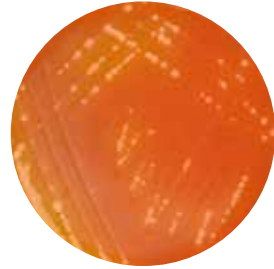
H 品牌 - 蜡样芽胞杆菌 CMCC (B) 63303



逗点 - 枯草芽胞杆菌 ATCC6633



L 品牌 - 枯草芽胞杆菌 ATCC6633



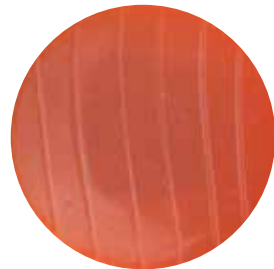
H 品牌 - 枯草芽胞杆菌 ATCC6633



逗点 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



L 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922

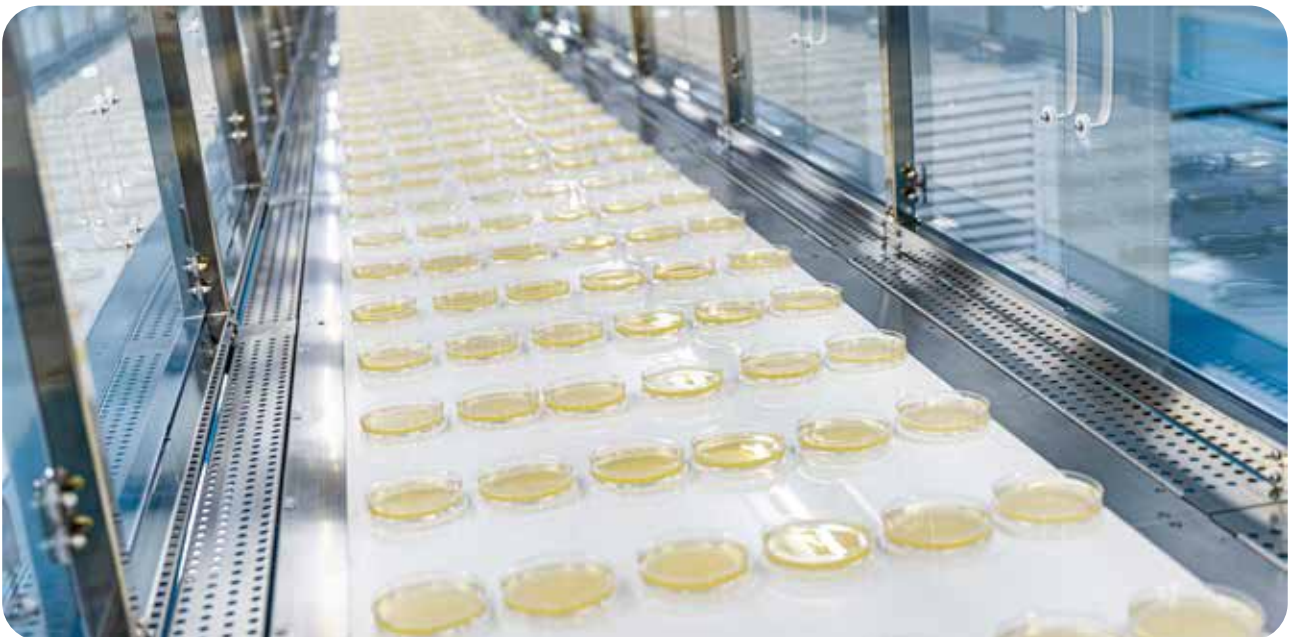


H 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922

图 12-4

#### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌蜡样芽胞杆菌 CMCC (B) 63303，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 PR ≥ 0.7 的要求；
- 4.2 特异性：枯草芽胞杆菌 ATCC6633，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标黄色菌落，无沉淀环的要求；
- 4.3 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 G ≤ 1 的要求；
- 4.4 感观：逗点、L 品牌、H 品牌平板颜色无显著差异。



# 13 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数 GB 4789.38—2012

## 一、概述

### 1.1 适用范围

本标准规定了食品中大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 计数的方法。

本标准适用于食品中大肠埃希菌的计数，其中大肠埃希菌平板计数法(第二法)不适用于贝类产品。

### 1.2 检测原理

大肠埃希菌广泛存在于人和温血动物的肠道中，是革兰阴性杆菌，无芽胞，能够在 44.5℃ 发酵乳糖产酸产气，IMViC(靛基质、甲基红、VP 试验、柠檬酸盐)生化试验为 ++- 或 -+- 的革兰阴性杆菌。以此作为粪便污染指标来评价食品的卫生状况，推断食品中肠道致病菌污染的可能性。

## 二、设备与耗材

### 2.1 设备

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备如下：

2.1.1 恒温培养箱 36℃±1℃。

2.1.2 冰箱 2~5℃。

2.1.3 恒温水浴箱 44.5℃±0.2℃。

2.1.4 天平 感量为 0.1g。

2.1.5 拍打式均质器或刀头式均质器。

2.1.6 涡旋混匀器。

2.1.7 菌落计数器。

2.1.8 pH 计或 pH 比色管。

2.1.9 紫外灯波长 360~366 nm，功率≤6W。

### 2.2 耗材

2.2.1 无菌吸管 1mL(具 0.01mL 刻度)、10mL(具 0.1mL 刻度)或微量移液器及吸头。

2.2.2 接种针。

2.2.3 接种环(10μL)。

2.2.4 精密 pH 试纸。

2.2.5 无菌锥形瓶 容量 500mL。

2.2.6 无菌培养皿 直径 90mm。

## 三、培养基与试剂

### 3.1 培养基

3.1.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤。

3.1.2 EC 肉汤(E.coli broth)。

3.1.3 蛋白胨水。

3.1.4 缓冲葡萄糖蛋白胨水[甲基红(MR)和 V-P 试验用]。

3.1.5 西蒙柠檬酸盐培养基。

3.1.6 磷酸盐缓冲液。

3.1.7 伊红美蓝(EMB)琼脂。

3.1.8 营养琼脂斜面。

3.1.9 结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)。

3.1.10 结晶紫中性红胆盐-4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖苷琼脂(VRBA-MUG)。

### 3.2 试剂

3.2.1 革兰染色液。

3.2.2 Kovacs 靛基质试剂。

3.2.3 无菌 1mol/LNaOH。

3.2.4 无菌 1mol/LHCl。

## 四、检验过程

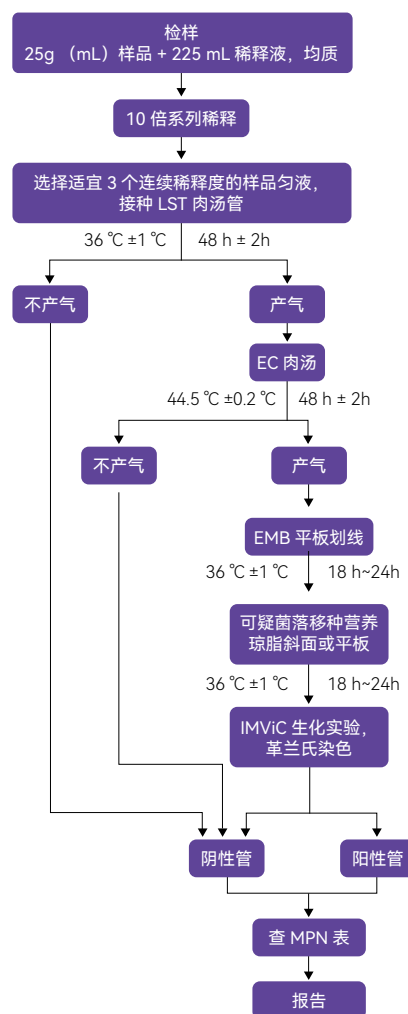
### 4.1 大肠埃希菌 MPN 法(第一法)

#### 4.1.1 检验程序

大肠埃希菌 MPN 计数的检验程序见流程图 13-1

#### 4.1.2 操作步骤

4.1.2.1 样品的稀释 固体和半固体样品：用天平无菌称取 25g 样品；如使用刀头式均质器，可将样品加入盛有 225mL 磷酸盐缓冲液的无菌均质杯内，8000~10000r/min 均质 1~2 分钟，制成 1:10 的样品匀液；如使用拍打式均质器，可将样品加入盛有 225mL 磷酸盐缓冲液的无菌均质袋中，拍打 1~2 分钟，制成 1:10 的样品匀液。



流程图 13-1 大肠埃希菌 MPN 计数法检验程序

液体样品：用无菌吸管吸取 25mL 样品；如使用锥形瓶，可将样品加入盛有 225mL 磷酸盐缓冲液的无菌锥形瓶（瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分混匀，制成 1:10 的样品匀液；如使用均质袋，可将样品放入盛有 225mL 磷酸盐缓冲液的无菌均质袋中，拍打 1~2 分钟，制成 1:10 的样品匀液。

如为冷冻产品，应在 45℃ 以下（如水浴中）不超过 15 分钟解冻，或 2~5℃ 冰箱中不超过 18 小时解冻。

样品匀液的 pH 值应在 6.5~7.5 之间，必要时分别用 1mol/LNaOH 或 1mol/LHCl 调节。

用 1mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1mL，沿管壁缓缓注入 9mL 磷酸盐缓冲液的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振摇试管或换用 1 支 1mL 无菌吸管或吸头反复吹打，使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

根据对样品污染状况的估计，按上述操作，依次制成 10 倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释 1 次，换用 1 支 1mL 无菌吸管或吸头。从制备样品匀液至样品接种完毕，全过程不得超过 15 分钟。

4.1.2.2 初发酵试验 根据样品污染状况或产品限量标准要求，选择 3 个适宜的连续稀释度的样品匀液（液体样品可以选择原液），每个稀释度接种 3 管月桂基硫酸盐胰蛋白胨（LST）肉汤，每管接种 1mL（如接种量超过 1mL，则用双料 LST 肉汤）（注意：如果样品匀液静置超过 3 分钟应重新混匀后再接种），36℃ ±1℃ 培养（24±2）小时，观察小倒管内是否有气泡产生，（24±2）小时产气者进行复发酵试验，如未产气则继续培养至（48±2）小时。产气者进行复发酵试验。如所有 LST 肉汤管均未产气，即可报告大肠埃希菌 MPN 结果。

4.1.2.3 复发酵试验 用接种环从产气的 LST 肉汤管中分别取培养物 1 环（约 10μL），移种于已提前预温至 45℃ 的 EC 肉汤管中，放入带盖的 44.5℃ ±0.2℃ 水浴箱内。注意水浴的水面应高于肉汤培养基液面，培养（24±2）小时，检查小倒管内是否有气泡产生，如未有产气则继续

培养至（48±2）小时。记录在 24 小时和 48 小时内产气的 EC 肉汤管数。如所有 EC 肉汤管均未产气，即可报告大肠埃希菌 MPN 结果；如有产气者，则进行 EMB 平板分离培养。

4.1.2.4 伊红美蓝平板分离培养 轻轻振摇各产气管，用接种环取培养物分别划线接种于 EMB 平板，36℃ ±1℃ 培养 18~24 小时。观察平板上有无具黑色中心有光泽或无光泽的典型菌落。典型菌落为具有黑色中心，有或无金属光泽的菌落。非典型的可疑菌落为粉红色、无黑心的菌落。

4.1.2.5 营养琼脂斜面或平板培养 从每个平板上挑 5 个典型菌落，如无典型菌落则挑取可疑菌落。用接种针接触菌落中心部位，移种到营养琼脂斜面或平板上，36℃ ±1℃ 培养 18~24 小时。

4.1.2.6 鉴定 取营养琼脂培养基上的纯培养物进行革兰染色、靛基质试验、MR-VP 试验和柠檬酸盐利用试验。生化鉴定可选择生化鉴定管、生化鉴定试剂条或全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定。

大肠埃希菌与非大肠埃希菌的生化鉴别。

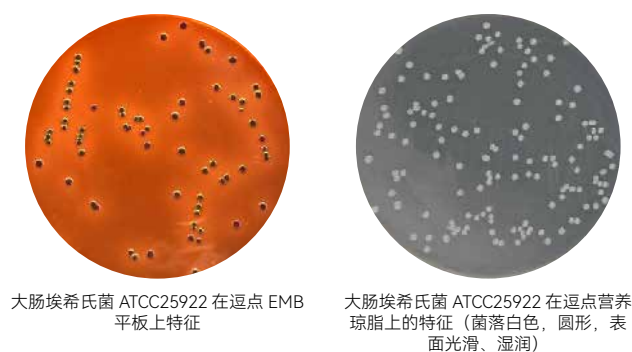
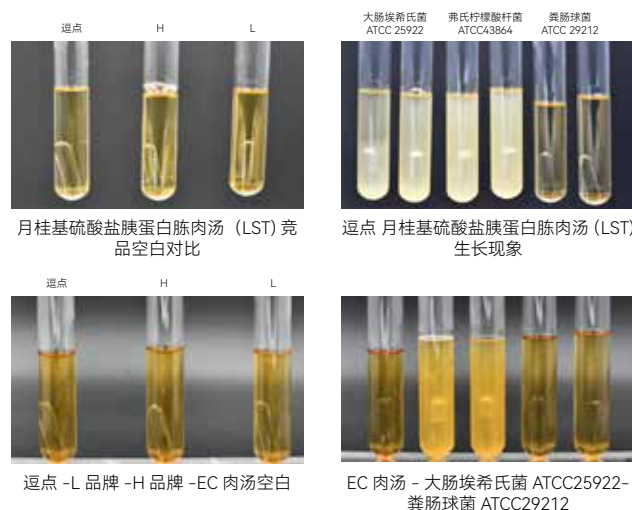


图 13-1

试验项目	结果判定		大肠埃希氏菌生化现象	培养时间	说明
	阴性结果	阳性结果			
靛基质	黄色	玫瑰红色	阳性	18h-24h	培养后滴加 2-3 滴靛基质试剂，即刻观察结果。 MR: 培养后滴加 2-3 滴甲基红试剂，即刻观察结果。 VP: 培养后依次滴加 VP 甲液 3 滴、乙液 1 滴，10-30min 内观察结果，如为阴性应放在 36℃ ±1℃ 继续培养 4h 后再观察。
MR	不变色	红色	阳性	18h-24h	
VP			阴性	18h-24h	
西蒙氏柠檬酸盐	浅绿色	蓝色	阴性	18h-24h	

注：菌悬液浓度不宜过大，否则可能产生假阳性结果。

4.1.2.6.1 革兰染色 用 10μL 接种环挑取 0.85% 的无菌生理盐水 1 环在载玻片中央，挑取可疑单菌落涂布成一均匀的薄层，手持载玻片一端，标本向上，待菌液干燥后，在酒精灯上加热固定，温度不宜过烫，放置待冷后进行染色。结晶紫初染 1 分钟，碘液 1 分钟，乙醇脱色 30 秒，复染 1 分钟。

注意：每步染色后，需斜置载玻片，用小水流冲洗，直至洗下的水呈无色为止，注意冲洗时不要直接冲洗涂层表面。待标本干后置显微镜油镜下观察。

染色结果：大肠埃希菌为革兰阴性杆菌，长度为 1~3μm，无芽胞。



大肠埃希菌 CICC 10305(ATCC 25922) 革兰阴性图 13-2

4.1.2.6.2 靛基质试验挑取适量营养琼脂培养物，接种于蛋白胨水试管中，于 36℃ ±1℃ 培养（24±2）小时。取出试管后滴加 Kovacs 靛基质试剂，阳性结果为接触面呈红色，阴性结果为接触面呈黄色。典型大肠埃希菌为阳性，非典型为阴性。

4.1.2.6.3 甲基红试验 挑取适量营养琼脂培养物，接种于缓冲葡萄糖蛋白胨水试管中，于 36℃ ±1℃ 培养 2~5 天。取出试管后滴加甲基红试剂，阳性结果为红色，阴性结果为黄色。大肠埃希菌为阳性反应。

4.1.2.6.4 VP 试验 挑取适量营养琼脂培养物，接种于缓冲葡萄糖蛋白胨水试管中，于 36℃ ±1℃ 培养 2~4 天。取出试管后滴加 VP1 试剂 1 滴和 VP2 试剂 1 滴，观察结果，阳性反应立刻或于数分钟内出现红色，阴性结果为黄色。如为阴性，应放在 36℃ ±1℃ 继续培养 4 小时再进行观察。大肠埃希菌为阴性。

4.1.2.6.5 柠檬酸盐利用试验 挑取适量营养琼脂培养物，接种于西蒙柠檬酸盐培养基中，于 36℃ ±1℃ 培养（24±2）小时。观察结果，阳性

结果为培养基变蓝色，阴性结果为绿色不变色。大肠埃希菌为阴性。

4.1.3 大肠埃希菌 MPN 计数 大肠埃希菌为革兰阴性无芽胞杆菌，发酵乳糖、产酸、产气，IMViC 生化试验为 ++- 或 -+。只要有 1 个菌落鉴定为大肠埃希菌，其所代表的 LST 肉汤管即为大肠埃希菌阳性。依据 LST 肉汤阳性管数查 MPN 表。

4.1.4 结果报告 报告每 g(ml) 样品中大肠埃希菌的 MPN 值，以 MPN/g(ml) 表示。

## 4.2 大肠埃希菌平板计数法（第二法）

4.2.1 检验程序 大肠埃希菌平板计数法的检验程序。

4.2.2 操作步骤

4.2.2.1 样品的稀释 按 4.1.2.1 进行。

4.2.2.2 平板计数

4.2.2.2.1 选取 2~3 个适宜的连续稀释度的样品匀液，每个稀释度接种 2 个无菌平皿，每皿 1mL。同时取 1mL 稀释液加入无菌平皿做空白对照。

4.2.2.2.2 将 10~15mL 冷至 45℃±0.5℃的结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA) 倾注于每个平皿中。小心旋转平皿，将培养基与样品匀液充分混匀。待琼脂凝固后，再加 3~4mL VRBA-MUG 覆盖平板表层。凝固后翻转平板，36℃±1℃培养 18~24 小时。

4.2.2.3 平板菌落数的选择 选择菌落数在 10~100CFU 之间的平板，暗室中 360~366nm 波长紫外灯照射下，计数平板上发浅蓝色荧光的菌落。

检验时用已知 MUG 阳性菌株（如大肠埃希菌 ATCC 25922）和产气肠杆菌（如 ATCC 13048）做阳性和阴性对照。

4.2.3 大肠埃希菌平板计数的报告 两个平板上发荧光菌落数的平均数乘以稀释倍数，报告每 g(mL) 样品中大肠埃希菌数，以 CFU/g(mL) 表示。若所有稀释度（包括液体样品原液）平板均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。

## 五、检验注意事项

5.1 实验过程中，每批样品稀释液都要做空白对照。如果空白对照肉汤管中或平板上出现菌落时，应废弃本次实验结果，并对稀释液、吸管、培养皿、培养基、实验环境等进行污染源分析。

5.2 初发酵实验时用磷酸盐缓冲液分别加入 LST 肉汤单料和双料中作为空白对照。

5.3 检验时定期使用大肠埃希菌 ATCC 25922 菌株或等效菌株和产气肠杆菌 ATCC 13048 或等效菌株，在 BSL-2 实验室或阳性对照实验室内，用适当的食品样品进行阳性对照和阴性对照实验验证，染菌剂量应控制在 10~100CFU/25g 样品，并进行记录。

5.4 每批所使用的培养基和生化试剂进行质量性能测试，质控方法见 GB 4789.28—2013，并记录测试结果。

5.5 检验中所使用的试验耗材，如培养基、稀释液、培养皿、吸管等必须是无菌的，重复使用的耗材应彻底洗涤干净，不得残留抑菌物质。

5.6 对含有较大颗粒残渣的样品（如肉类）进行检测时，建议使用带滤网均质袋，以方便均质后用吸管吸取匀液。

5.7 应用本检验方法对食品样品进行大肠埃希菌计数检验时，从制备一个样品匀液至样品接种完毕，全过程不得超过 15 分钟。

5.8 在进行样品的 10 倍稀释过程中，吸管应插入检样稀释液液面 2.5cm 以下，取液应先高于 1mL，而后将吸管尖端贴于试管内壁调整至 1ml，这样操作不会有过多的液体黏附于管外。将 1mL 液体加入另一 9mL 试管内时应沿管壁加入，不要触及管内稀释液，以防吸管外部黏附的液体混入其中影响检测结果。

5.9 本方法移液时可使用能连接吸管的电动移液器，在使用过程中，一旦液体进入电动移液器滤膜中，应立即对滤膜进行更换，以防止交叉污染。鉴于微量移液器移液头较短，为控制污染，在本方法移液过程中不应使用。

5.10 结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA) 和 VRBA-MUG 琼脂使用前临时制备，煮沸灭菌后保存时间不得超过 3 小时。

5.11 在使用 MUG 测定法之前，检查所使用的培养皿是否自带荧光。培养皿直径应不低于 90mm，倾注琼脂厚度应不低于 3mm。

5.12 倾注培养基后，可将培养皿底在平面上先向一个方向旋转 3~5 次，然后再向反方向旋转 3~5 次，以充分混匀。旋转过程中不应力度过大，避免琼脂飞溅到培养皿上方。混匀过程也可使用自动培养皿旋转仪进行。

5.13 当样品中含有吸水性物质（如淀粉、面粉等）时，应以最快速度进行琼脂倾碟，以防凝块产生。

5.14 在培养箱中，为防止中间培养皿过热，平板的叠放高度不得超过 6 个培养皿。

5.15 当使用功率较大的紫外灯时，如 15W 紫外灯，应带上防紫外线的眼镜和手套。

## 六、疑难解析

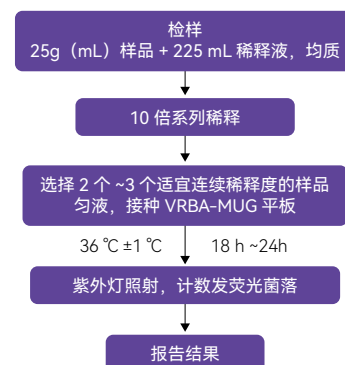
6.1 大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希菌的区别是什么？

大肠菌群，是指在一定培养条件下能发酵乳糖、产酸产气的需氧和兼性厌氧革兰阴性无芽胞杆菌，培养温度为 36℃±1℃，其可能来自人类和温血动物的肠道及自然环境，包括埃希菌属、柠檬酸菌属、克雷伯菌属和肠杆菌属等。

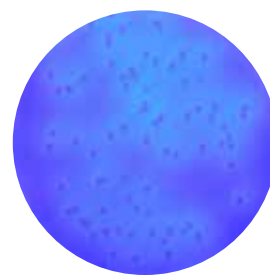
粪大肠菌群，又称为耐热大肠菌群，是一群在 44.5℃培养 24~48 小时能发酵乳糖、产酸产气的需氧和兼性厌氧革兰阴性无芽胞杆菌，主要由大肠埃希菌组成，还包括与粪便污染无直接相关性的其他菌株，例如肺炎克雷伯菌。

大肠埃希菌，属于肠杆菌科埃希菌属，其广泛存在于人和温血动物的肠道中，是革兰阴性杆菌，无芽胞，能够在 44.5℃发酵乳糖产酸产气，LMVLC 生化试验结果为“++-”或“-+”。因此，相对于大肠菌群和粪大肠菌群，大肠埃希菌与粪便污染的相关性最好，故以此作为粪便污染指标来评价食品的卫生状况，推断食品中肠道致病菌污染的可能性。

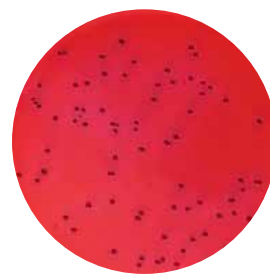
6.2 大肠埃希菌计数的两种方法检验原理及适用范围是什么？



流程图 13-2 大肠埃希菌平板计数法检验程序



紫外光下 逗点 -VRBA-MUG- 大肠埃希氏菌  
ATCC25922



正常光下 逗点 -VRBA-MUG- 大肠埃希氏菌  
ATCC25922

图 13-3

我国食品中大肠埃希菌的检验依据是《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希菌计数》(GB4789.38—2012),共有两个方法：第一法大肠埃希菌 MPN 计数：主要利用大肠埃希菌可以在 44.5℃±0.2℃发酵乳糖产酸产气的原理进行检测，样品经系列稀释并在 44.5℃±0.2℃培养后，根据其未生长的最低稀释度与生长的最高稀释度，应用统计学概率论推算出待测样品中大肠埃希菌的最大可能数。此方法适用于污染菌量较少的食品。

## 附录 A

# 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST)

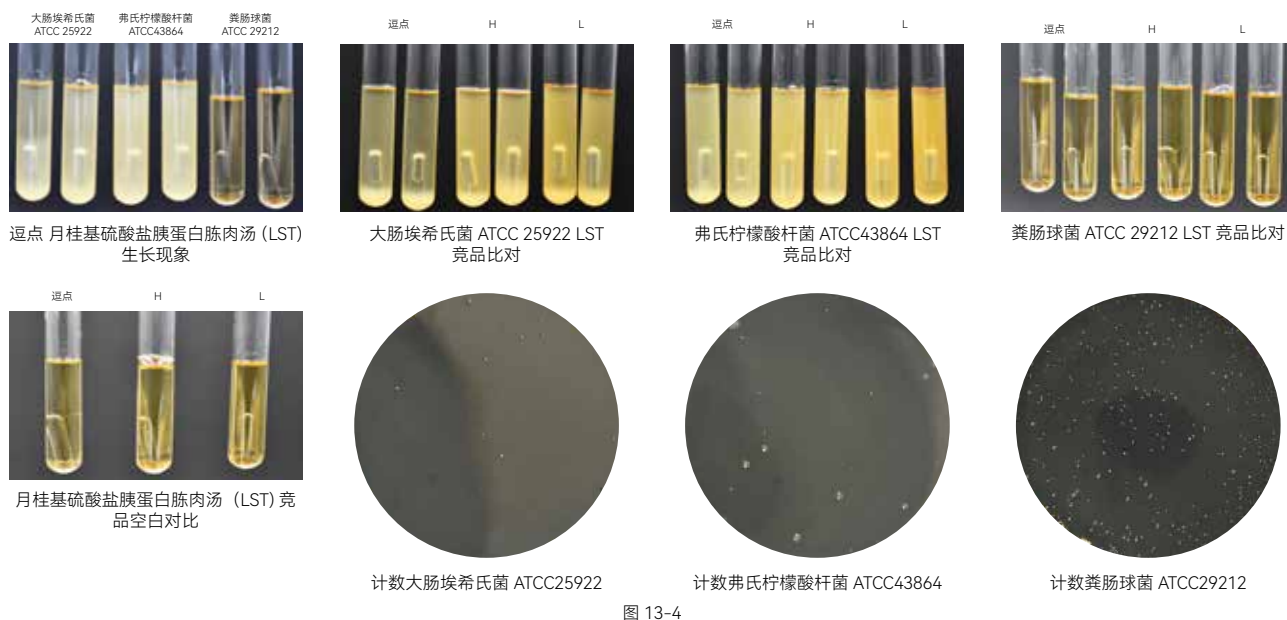


- 1、产品用途：月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤用于多管发酵法测定大肠菌群和粪大肠菌群。
- 2、检验原理：胰蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；乳糖是大肠菌群可发酵的糖类；磷酸二氢钾和磷酸氢二钾是缓冲剂；月桂基硫酸盐钠可抑制非大肠菌群细菌的生长。

表 13-2：月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST) 验证数据

样品名称	质控菌株	厂家	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定		
月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST)	大肠埃希氏菌 ATCC 25922	逗点	26	混浊度 2, 且气体充满管内 1/3	混浊度 2, 且气体充满管内 1/3	符合		
		H 品牌				符合		
		L 品牌				符合		
	弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864	逗点	41			符合		
		H 品牌				符合		
		L 品牌				符合		
	粪肠球菌 ATCC 29212	逗点	2118			混浊度 0 (不生长)	混浊度 0 (不生长)	符合
		H 品牌						符合
		L 品牌						符合

### 3、典型特征图片：



### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922、弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864、逗点、陆桥、环凯的混浊度、产气均满足要求；
- 4.2 选择性：粪肠球菌 ATCC29212, 逗点、陆桥、环凯均满足不生长、不产气的要求；
- 4.3 感官：逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。

## 附录 B

# 伊红美蓝 (EMB) 琼脂培养基验证



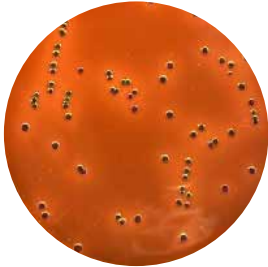
- 1、产品用途：用于分离革兰氏阴性肠道菌特别是大肠菌群和粪大肠菌群。
- 2、检验原理：蛋白胨提供碳源和氮源；乳糖是大肠菌群可发酵的糖类；磷酸氢二钾是缓冲剂；琼脂是培养基凝固剂；伊红和美蓝是抑菌剂和 pH 指示剂，可抑制革兰氏阳性菌，在酸性条件下产生沉淀，形成紫黑色菌落或具黑色中心的外围无色透明的菌落。

表 13-3：红美蓝 (EMB) 琼脂培养基验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
伊红美蓝 (EMB) 琼脂培养基)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	69	82	PR=0.8	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	63		PR=0.8		符合
		H 品牌	60		PR=0.8		符合
	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	/	/	菌落呈无色、半透明	菌落呈无色、半透明	符合
		L 品牌	/		菌落呈无色、半透明		符合
		H 品牌	/		菌落呈无色、半透明		符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/	G=0	G < 5	符合
		L 品牌	/		G=0		符合
		H 品牌	/		G=0		符合

1. 生长率: 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在伊红美蓝 (EMB) 琼脂培养基上的菌落特征: 黑色菌落, 具金属光泽;  
2. 特异性: 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 在伊红美蓝 (EMB) 琼脂培养基上的菌落特征: 菌落呈无色、半透明;  
3. 选择性: 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在伊红美蓝 (EMB) 琼脂培养基上的菌落特征: 选择性 G < 5 ;

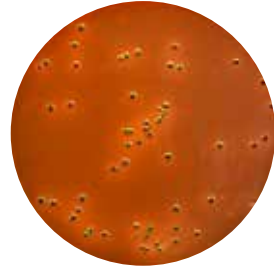
3、典型特征图片：



逗点 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



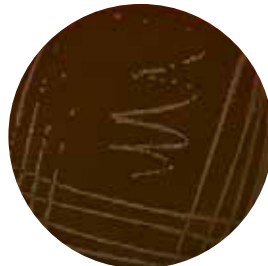
L 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



L 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



逗点 - 金黄色葡萄球菌 ATCC6538



L 品牌 - 金黄色葡萄球菌 ATCC6538



H 品牌 - 金黄色葡萄球菌 ATCC6538



逗点 - 伊红美蓝 (EMB) 琼脂空白



L 品牌 - 伊红美蓝 (EMB) 琼脂空白



H 品牌 - 伊红美蓝 (EMB) 琼脂空白

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率: 目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922, 逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 PR ≥ 0.5; 黑色菌落, 具金属光泽的要求; 且三家无明显差异。
- 4.2 特异性: 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028, 逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标菌落呈无色、半透明; 且三家无明显差异。
- 4.3 选择性: 金黄色葡萄球菌 ATCC6538, 逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 G < 5 的要求; 且三家无明显差异。
- 4.4 观感: 逗点、H 品牌平板颜色无明显差异, L 品牌平板颜色稍微深一点。

## 附录 C

# EC 肉汤验证



- 1、产品用途：用于多管发酵法测定粪大肠菌群和大肠杆菌的确证试验。
- 2、检验原理：胰蛋白胨提供碳氮源；3号胆盐抑制革兰氏阳性菌；乳糖是可发酵的糖类；磷酸氢二钾和磷酸二氢钾为缓冲剂；氯化钠可维持均衡的渗透压。

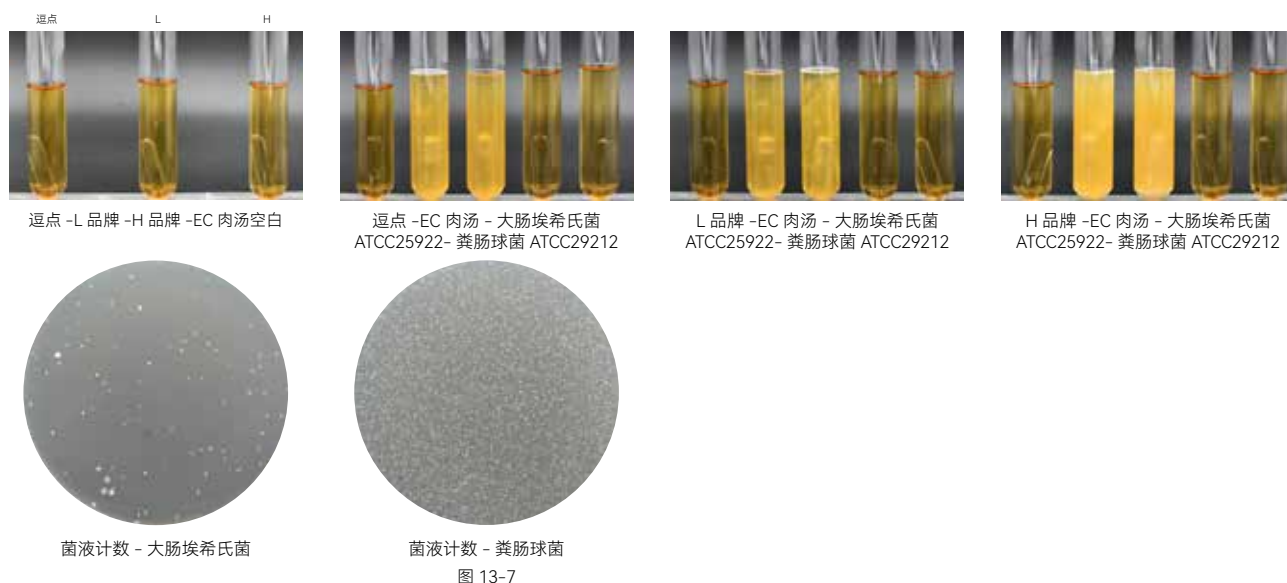
表 13-4：EC 肉汤验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
EC 肉汤	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	89	混浊度 2, 且气体充满管内 1/3	混浊度 2, 且气体 充满管内 1/3	符合
		L 品牌	/		混浊度 2, 且气体充满管内 1/3		符合
		H 品牌	/		混浊度 2, 且气体充满管内 1/3		符合
	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	/	4885	混浊度 0(不生长)	混浊度 0(不生长)	符合
		L 品牌	/		混浊度 0(不生长)		符合
		H 品牌	/		混浊度 0(不生长)		符合

1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 EC 肉汤上的菌落特征：混浊度 2, 且气体充满管内 1/3;

2. 粪肠球菌 ATCC29212 在 EC 肉汤上的菌落特征：混浊度 0(不生长)。

### 3、典型特征图片：



### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922, 逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标混浊度 2, 且气体充满管内 1/3 的要求, H 品牌混浊度最明显；
- 4.2 选择性：粪肠球菌 ATCC29212, 逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标混浊度 0(不生长) 的要求；
- 4.3 观感：逗点、L 品牌、H 品牌空白肉汤颜色无显著差异。

## 附录 D

# 结晶紫中性红胆盐 MUG 琼脂培养基 (VRBA-MUG) 验证



- 1、产品用途：用于食品中大肠埃希氏菌的平板法计数。
- 2、检验原理：蛋白胨和酵母膏粉提供碳氮源和微量元素；乳糖是可发酵的糖类；氯化钠可维持均衡的渗透压；
- 3号胆盐和结晶紫抑制革兰氏阳性菌，特别抑制革兰氏阳性杆菌和粪链球菌；中性红为 pH 指示剂；琼脂为凝固剂；大肠埃希菌含有的葡萄糖醛酸苷酶作用于 4- 甲基伞形酮-β-D 葡萄糖醛酸苷 (4-Methylumbellifery-β-D-Glucuronide 简称 MUG) 的 β 糖苷酸苷键, 使其水解, 释放的 4- 甲基伞形酮在 366nm 紫外灯下产生蓝白色荧光。97% 的大肠埃希菌、10% 的沙门氏菌以及少量的志贺氏菌具有葡萄糖醛酸苷酶。

表 13-5：结晶紫中性红胆盐 MUG 琼脂培养基 (VRBA-MUG) 验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
结晶紫中性 红胆盐 MUG 琼脂培养 基 (VRBA- MUG)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	87	56	1.5	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	63		1.1		符合
		H 品牌	83		1.4		符合
弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864	逗点	/	/	带有沉淀环的红色菌落, 无荧光	可带有沉淀环的红色 菌落, 无荧光	符合	
	L 品牌	/		带有沉淀环的红色菌落, 无荧光		符合	
	H 品牌	/		带有沉淀环的红色菌落, 无荧光		符合	

1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在结晶紫中性红胆盐 MUG 琼脂培养基 (VRBA-MUG) 板上的菌落特征：PR ≥ 0.7, 带有沉淀环的紫红色或红色菌落, 有荧光；

2. 弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864 在结晶紫中性红胆盐 MUG 琼脂培养基 (VRBA-MUG) 板上的菌落特征：可带有沉淀环的红色菌落, 无荧光；

3. 粪肠球菌 ATCC29212 在结晶紫中性红胆盐 MUG 琼脂培养基 (VRBA-MUG) 板上的菌落特征：G < 5；

3、典型特征图片：

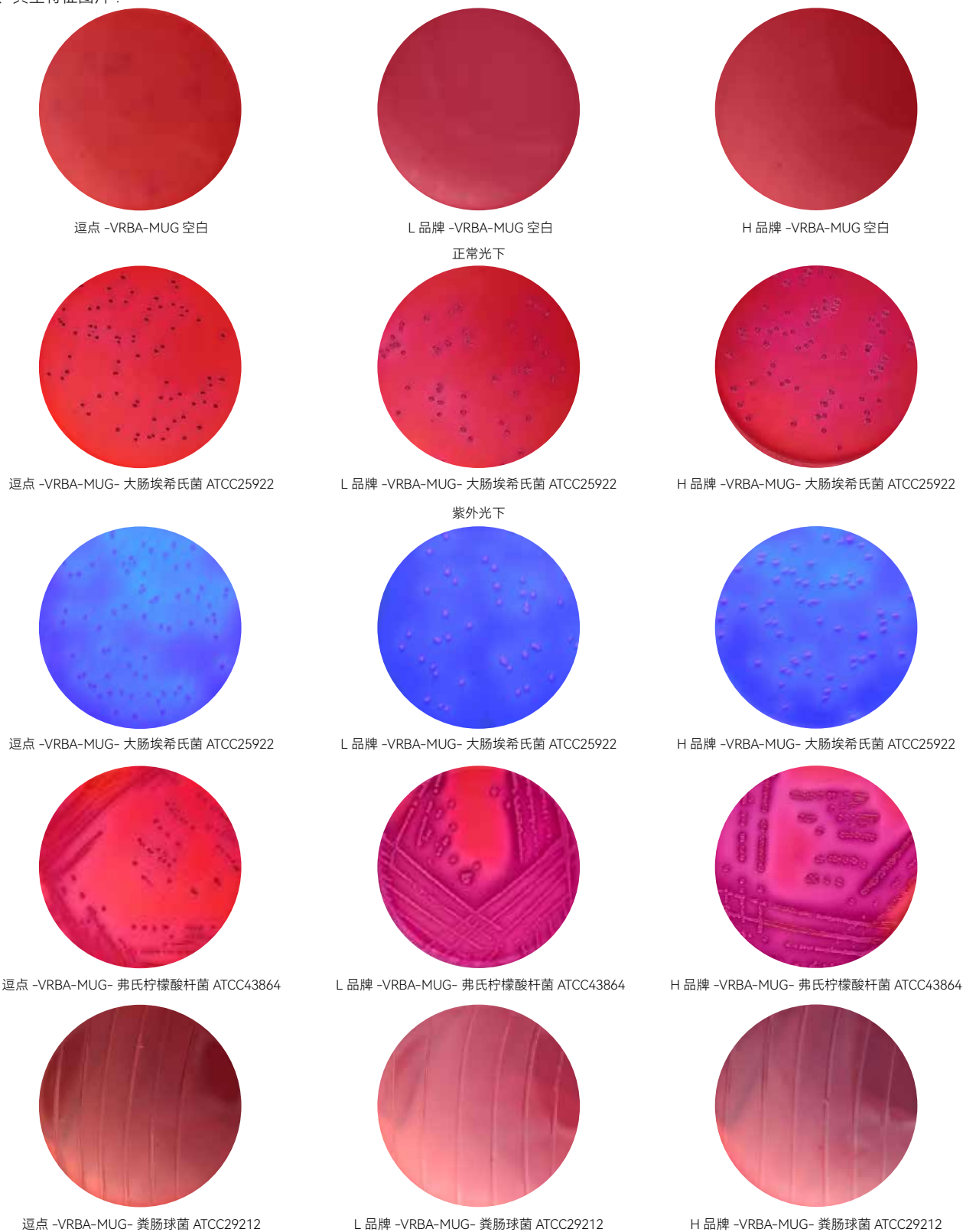


图 13-8

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $PR \geq 0.7$ ，带有沉淀环的紫红色或红色菌落，有荧光的要求，逗点生长率最好，菌落比 L 品牌、H 品牌偏小；
- 4.2 选择性：弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标可带有沉淀环的红色菌落，无荧光的要求；
- 4.3 选择性：粪肠球菌 ATCC29212，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $G < 5$  的要求；
- 4.4 感观：逗点空白平板颜色较鲜红，L 品牌、H 品牌空白平板颜色无显著差异。

# 14 食品微生物学检验 粪大肠菌群计数 GB 4789.39—2013

## 一、概述

### 1.1 适用范围

本标准规定了食品中粪大肠菌群计数的方法。本标准适用于各类食品中粪大肠菌群的计数。

### 1.2 检测原理

乳糖蛋白胨多管发酵法是开展粪大肠菌群检测的一个重要方法，该方法所采用的原理为：大肠菌群繁殖时使乳糖发酵，并能使乳糖蛋白胨培养液变黄，同时产生气泡。

## 二、设备与耗材

### 2.1 设备

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- 2.1.1 恒温培养箱  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 2.1.2 冰箱  $2\sim 5^{\circ}\text{C}$ 。
- 2.1.3 恒温水浴箱  $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 。
- 2.1.4 天平 感量  $0.1\text{g}$ 。
- 2.1.5 均质器。
- 2.1.6 振荡器。

### 2.2 耗材

- 2.2.1 无菌吸管  $1\text{mL}$  (具  $0.01\text{mL}$  刻度)、 $10\text{mL}$  (具  $0.1\text{mL}$  刻度) 或微量移液器及吸头。
- 2.2.2 无菌锥形瓶 容量  $500\text{mL}$ 。
- 2.2.3 无菌培养皿 直径  $90\text{mm}$ 。
- 2.2.4 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

## 三、培养基与试剂

### 3.1 培养基

- 3.1.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨 (lauryl sulfate tryptose, LST) 肉汤。
- 3.1.2 EC 肉汤 (E.coli broth)。
- 3.1.3 0.85% 的无菌生理盐水。

### 3.2 试剂

- 3.2.1  $1\text{mol/L NaOH}$ 。
- 3.2.2  $1\text{mol/L HCl}$ 。

## 四、检验过程

### 粪大肠菌群检验程序见流程图 14-1

#### 4.1 样品的稀释

4.1.1 固体和半固体样品 称取  $25\text{g}$  样品，置盛有  $225\text{mL}$  磷酸盐缓冲液或  $0.85\%$  的无菌生理盐水的无菌均质杯内， $8000\sim 10000\text{r/min}$  均质  $1\sim 2$  分钟，制成  $1:10$  样品匀液，或置  $225\text{mL}$  稀释液的无菌均质袋中，用拍打式均质器拍打  $1\sim 2$  分钟，制成  $1:10$  的样品匀液。

4.1.2 液体样品 以无菌吸管吸取样品  $25\text{mL}$  置盛有  $225\text{mL}$  磷酸盐缓冲液或  $0.85\%$  的无菌生理盐水的无菌锥形瓶 (瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠) 中，充分混匀，制成  $1:10$  的样品匀液。

4.1.3 样品匀液的 pH 值应在  $6.5\sim 7.5$  之间，必要时分别用  $1\text{mol/L NaOH}$  或  $1\text{mol/L HCl}$  调节。

4.1.4 用  $1\text{mL}$  无菌吸管或微量移液器吸取  $1:10$  样品匀液  $1\text{mL}$ ，沿管壁缓缓注入盛有  $9\text{mL}$  磷酸盐缓冲液或  $0.85\%$  的无菌生理盐水的无菌试管中 (注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面)，振荡试管或换用  $1$  支  $1\text{mL}$  无菌吸管反复吹打，使其混合均匀，制成  $1:100$  的样品匀液。

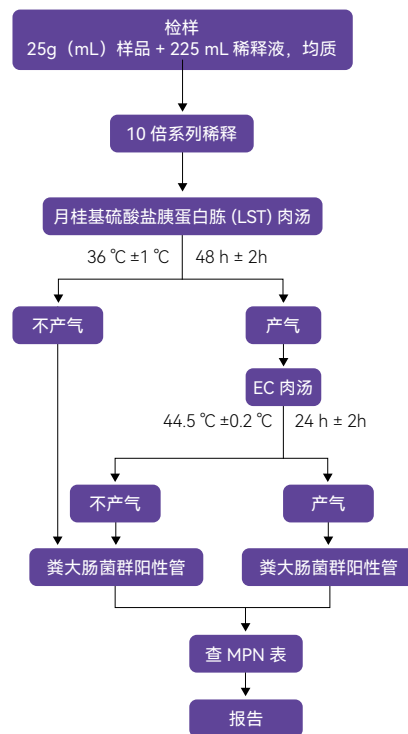
4.1.5 根据对样品污染状况的估计，依次制成十倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释  $1$  次，换用  $1$  支  $1\text{mL}$  无菌吸管或吸头。从制备样品匀液至样品接种完毕，全过程不得超过  $15$  分钟。

#### 4.2 初发酵试验

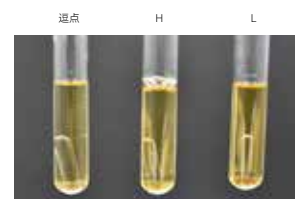
每个样品，选择  $3$  个适宜的连续稀释度的样品匀液 (液体样品可以选择原液)，每个稀释度接种  $3$  管月桂基硫酸盐胰蛋白胨 (LST) 肉汤，每管接种  $1\text{mL}$  (如接种量需要超过  $1\text{mL}$ ，则用双料 LST 肉汤)， $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养  $(24 \pm 2)$  小时，观察倒管内是否有气泡产生， $24$  小时产气者进行复发酵试验，如未产气则继续培养至  $(48 \pm 2)$  小时。记录在  $24$  小时和  $48$  小时内产气的 LST 肉汤管数。未产气者为粪大肠菌群阴性，产气者则进行复发酵试验。

#### 4.3 复发酵试验

用接种环从产气的 LST 肉汤管中分别取培养物  $1$  环，移种于预先升温至  $44.5^{\circ}\text{C}$  的 EC 肉汤管中。将所有接种的 EC 肉汤管放入带盖的  $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  恒温水浴箱内，培养  $(24 \pm 2)$  小时，水浴箱的水面应高于肉汤培养基液面，记录 EC 肉汤管的产气情况。产气管为粪大肠菌群阳性，不产气为粪大肠菌群阴性。定期以已知为  $44.5^{\circ}\text{C}$  产气阳性的大肠杆菌和  $44.5^{\circ}\text{C}$  不产气的产气肠杆菌或其他大肠菌群细菌作阳性和阴性对照。



流程图 14-1 粪大肠菌群 MPN 计数法检验程序



月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST) 竞品空白对比

大肠埃希氏菌 ATCC 25922 弗氏柠檬酸杆菌 ATCC 43864 粪肠球菌 ATCC 29212



混点 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST) 生长现象

图 14-1

#### 4.4 粪大肠菌群 MPN 计数的报告

根据证实为粪大肠菌群的阳性管数，查粪大肠菌群最可能数 (MPN) 检索表，报告每 g(ml) 粪大肠菌群的 MPN 值。

#### 五、检验注意事项

##### 5.1 设备与耗材的控制与使用

检验中所使用的设备，必须是经过计量检定的设备。检验中所使用的实验耗材，如培养基、稀释液、平皿、吸管等必须是完全灭菌的，如重复使用的耗材应彻底清洗干净，不得残留有抑菌物质。

恒温培养箱：需每天检查 2 次，记录培养架上使用区的温度是否准确和稳定，温度变化不可超过  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

高压蒸汽灭菌器：应能提供均匀的高达  $121^{\circ}\text{C}$  的高压灭菌温度，每月用热变色滤纸条检查灭菌效果。

紫外灭菌灯：每月用浸有乙醇的湿布擦拭 1 次，每季用紫外光度计测量紫外灯光强度不少于初始值的 70% 或用生长有 200~250 个细菌菌落的琼脂平皿暴露于紫外灯下 2 分钟，99% 的菌数被杀灭，否则，即应更换新灯。

##### 5.2 培养基与试剂的控制与使用

每一批次的培养基，要用阴、阳性菌株验证其有效性；培养基溶解后和灭菌后分别测量 pH 值，以保证细菌生长所需的 pH 值；配制后的培养基，要尽快分装到试管中进行灭菌，以免细菌繁殖破坏培养基的营养成分；培养基在高压灭菌器灭菌结束后，当气压降至 0 后，应立即从灭菌器中取出培养基，使之冷却；振动可能在内置倒管内产生气泡从而产生假阳性结果，因此在使用之前要检查试管，试管中不要含有气泡；配制好的培养基，不宜保存过久，且每批应注明配制日期。已灭菌的培养基可在  $4\sim 10^{\circ}\text{C}$  存放 7 天；存放时应避免阳光直射，且要避免液体蒸发和杂菌侵入；当培养液颜色变化，或体积变化明显时废弃不用。肉汤管水分散失的简单检查方法是标记每一批次的几根管的原始水平，如果估算的水分散失超过 10%，应废弃肉汤管。

##### 5.3 样品前处理

在进行样品的 10 倍稀释过程中，吸管应插入检样稀释液液面 2.5cm 以下，取液应先高于 1ml，而后将吸管尖端贴于试管内壁调整至 1mL，这样操作不会有过多的液体黏附于管外。将 1mL 液体加入另一 9mL 试管内时应沿管壁加入，不要触及管内稀释液，以防吸管外部黏附的液体混入其中影响检测结果。

##### 5.4 增菌培养

样品在接种前，应充分振摇，使菌落尽可能分散分布，保证结果的可靠性。

##### 5.5 菌落特征

粪大肠菌群菌落在培养基上成蓝色或蓝绿色，浅蓝色菌落或浅蓝色菌落中心较深的菌落有时也是。

##### 5.6 计数方法

根据证实为粪大肠菌群的阳性管数，查粪大肠菌群最可能数 (MPN) 检索表，报告每 g(mL) 粪大肠菌群的 MPN 值。

##### 5.7 异常结果处理

初发酵与复发酵符合率不同时，也就是说初发酵有假阳性，根据检验过程分析，造成此问题的原因是：在检测中初发酵发现只产酸或只产气管数，又不可排除的再做复发酵证实试验，这样就可弥补初发酵的不足，杜绝假阳性出现。这样可使大多数样品能尽快报出结果。

##### 5.8 其他注意事项

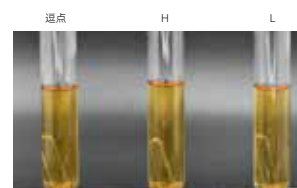
5.8.1 每次实验必须以无菌水做全程空白测定后不得呈阳性，以保证灭菌效果。

5.8.2 灭菌设备（如高压蒸汽灭菌器、恒温干燥箱）要保证对需要使用的无菌工具和器皿能正确实施灭菌；无菌工具应在专门的区域暂时存放，并要有明确标识以与非无菌物品区别。

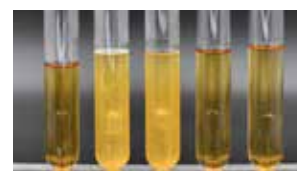
5.8.3 采样时已灭菌和封好包的采样瓶，要小心开启包装纸和瓶盖，避免瓶盖及瓶子颈部受到杂菌污染。

5.8.4 每次新配置培养基，或更换配置培养基的试剂或蒸馏水后，都要进行培养基的验证试验，至少要做阳性菌株培养试验。配制后的培养基，要尽快分装到试管中，在 2 小时之内灭菌。不能存放未灭菌的培养基。培养基应在高压灭菌器内于  $115^{\circ}\text{C}$  灭菌，并持续 15 分钟，当气压降至 0 后，应立即从高压灭菌器中取出培养基，使之冷却，以免过长的受热使糖类分解。

5.8.5 对每一批不同类型的样品和不同的实验者，都要进行操作精密度的检验。如果两平行样之间的对数差值大于之前获得的精密度的值则表示精密度的控制，应查找原因，予以消除，并重新进行精密度的测定。



混浊点 -L 品牌 -H 品牌 -EC 肉汤空白



EC 肉汤 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922 - 粪肠球菌 ATCC29212

图 14-2

## 附录 A

### 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST)

1、产品用途：月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤用于多管发酵法测定大肠菌群和粪大肠菌群。

2、检验原理：胰蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；乳糖是大肠菌群可发酵的糖类；磷酸二氢钾和磷酸氢二钾是缓冲剂；月桂基硫酸盐钠可抑制非大肠菌群细菌的生长。



表 13-2：月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST) 验证数据

样品名称	质控菌株	厂家	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定		
月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST)	大肠埃希氏菌 ATCC 25922	混浊点	26	混浊度 2，且气体充满管内 1/3	混浊度 2，且气体充满管内 1/3	符合		
		H 品牌				符合		
		L 品牌				符合		
	弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864	混浊点	41			符合		
		H 品牌				符合		
		L 品牌				符合		
	粪肠球菌 ATCC 29212	混浊点	2118			混浊度 0 (不生长)	混浊度 0 (不生长)	符合
		H 品牌						符合
		L 品牌						符合

### 3、典型特征图片：

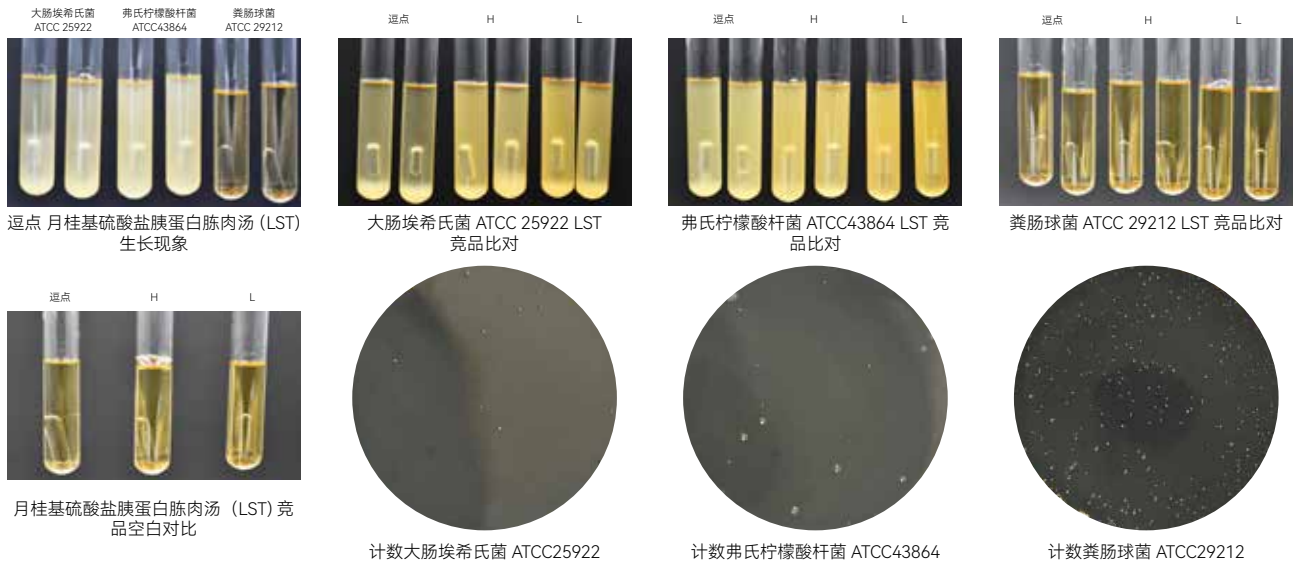


图 14-3

### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922、弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864、逗点、L 品牌、H 品牌的混浊度、产气均满足要求；
- 4.2 选择性：粪肠球菌 ATCC29212，逗点、L 品牌、H 品牌均满足不生长、不产气的要求；
- 4.3 感观：逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。

## 附录 B

### EC 肉汤验证

- 1、产品用途：用于多管发酵法定测定粪大肠菌群和大肠杆菌的确认试验。
- 2、检验原理：胰蛋白胨提供碳氮源；3号胆盐抑制革兰氏阳性菌；乳糖是可发酵的糖类；磷酸氢二钾和磷酸二氢钾为缓冲剂；氯化钠可维持均衡的渗透压。



表 13-4：EC 肉汤验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
EC 肉汤	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	89	混浊度 2, 且气体充满管内 1/3	混浊度 2, 且气体充满管内 1/3	符合
		L 品牌	/		混浊度 2, 且气体充满管内 1/3		符合
		H 品牌	/		混浊度 2, 且气体充满管内 1/3		符合
	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	/	4885	混浊度 0(不生长)	混浊度 0(不生长)	符合
		L 品牌	/		混浊度 0(不生长)		符合
		H 品牌	/		混浊度 0(不生长)		符合

- 1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 EC 肉汤上的菌落特征：混浊度 2, 且气体充满管内 1/3;
- 2. 粪肠球菌 ATCC29212 在 EC 肉汤上的菌落特征：混浊度 0(不生长)。

### 3、典型特征图片：

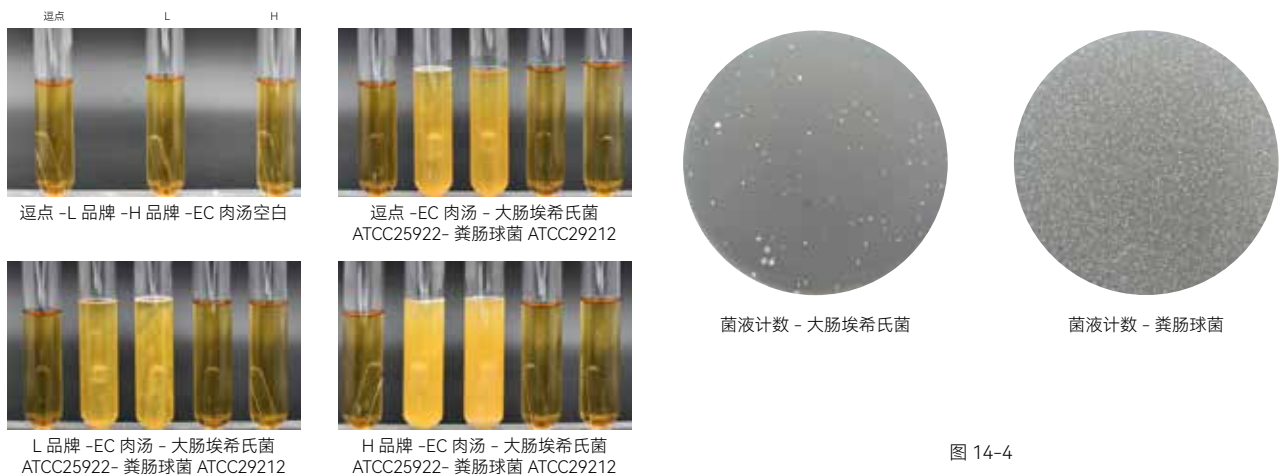


图 14-4

### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标混浊度 2, 且气体充满管内 1/3 的要求, H 品牌混浊度最明显；
- 4.2 选择性：粪肠球菌 ATCC29212，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标混浊度 0(不生长) 的要求；
- 4.3 感观：逗点、L 品牌、H 品牌空白肉汤颜色无显著差异。

# 15 食品微生物学检验 肠杆菌科检验 GB 4789.41—2016

## 一、概述

### 1.1 适用范围

本标准规定了食品中肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 的测定方法。

本标准第一法适用于肠杆菌科含量较高的食品中肠杆菌科的计数；第二法适用于肠杆菌科含量较低的食品中肠杆菌科的计数。

### 1.2 检测原理

1.2.1 平板计数法肠杆菌科为革兰阴性无芽胞杆菌，发酵葡萄糖产酸、氧化酶阴性。肠杆菌科在固体培养基中发酵葡萄糖产酸，在指示剂的作用下形成可计数的粉红色至红色或紫色的有或无沉淀环的菌落。

1.2.2 MPN 法是统计学和微生物学结合的一种定量检测方法。待测样品经系列稀释并培养后，根据其未生长的最低稀释度与生长的最高稀释度，应用统计学概率论推算出待测样品中肠杆菌科的最大可能数。

## 二、设备和耗材

### 2.1 设备

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备如下：

2.1.1 恒温培养箱  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

2.1.2 冰箱  $2\text{--}5^{\circ}\text{C}$ 。

2.1.3 水浴箱  $46^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

2.1.4 天平感量 0.1g。

2.1.5 显微镜 10–100 倍。

2.1.6 均质器。

2.1.7 振荡器。

### 2.2 耗材

2.2.1 无菌吸管 1mL(具 0.01mL 刻度)、10mL(具 0.1mL 刻度) 或微量移液器及吸头。

2.2.2 无菌锥形瓶或等效容器容量 150mL、500mL。

2.2.3 无菌培养皿直径 90mm。

2.2.4 无菌试管 18mm×180mm、15mm×150mm。

2.2.5 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

## 3 培养基与试剂

### 3.1 培养基

3.1.1 缓冲蛋白胨水 (BPW)。

3.1.2 缓冲葡萄糖煌绿胆盐肉汤 (EE 肉汤)。

3.1.3 结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂 (VRBGA)。

3.1.4 营养琼脂 (NA)。

3.1.5 葡萄糖琼脂。

### 3.2 试剂

3.2.1 革兰染色液。

3.2.2 氧化酶试剂。

3.2.3 无菌 1mol/L NaOH。

3.2.4 无菌 1mol/L HCl。

## 4 检验过程

### 4.1 第一法肠杆菌科平板计数法

4.1.1 检验程序 肠杆菌科平板计数法检验程序见流程图 15-1。

#### 4.1.2 检验步骤

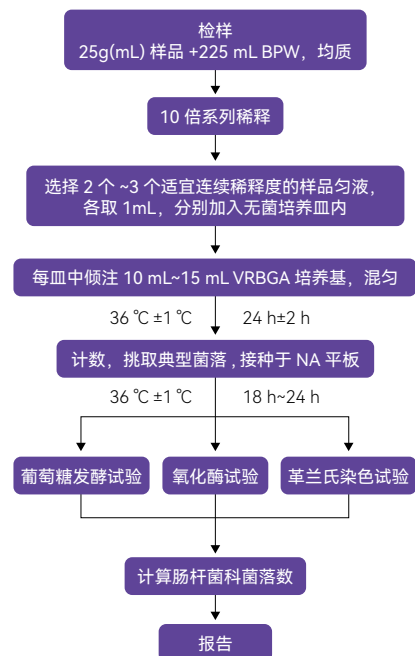
##### 4.1.2.1 样品前处理

4.1.2.1.1 固体和半固体样品称取 25g 样品，放入盛有 225ml BPW 的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1~2 分钟，或放入盛有 225mL BPW 的无菌均质杯中，8000~10000r/min 均质 1~2 分钟，制成 1:10 的样品匀液。

4.1.2.1.2 液体样品，以无菌吸管吸取 25mL 样品放入盛有 225mL BPW 的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1~2 分钟，或放入盛有 225mL BPW 的其他无菌容器中充分振摇或置于机械振荡器中振摇，充分混匀，制成 1:10 的样品匀液。

4.1.2.1.3 用 1mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1mL，沿管壁缓缓注入盛有 9mL BPW 的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不应触及稀释液面），振摇试管或换用 1 支 1mL 无菌吸管反复吹打，使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

4.1.2.1.4 根据对样品污染状况的估计，按 4.1.2.1.3 操作程序，依次制成 10 倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释 1 次，换用 1 支 1mL 无菌吸管或吸头。从制备样品匀液至样品接种完毕，全过程不得超过 15 分钟。



流程图 15-1 肠杆菌科平板计数法检验程序

#### 4.1.2.2 培养

4.1.2.2.1 每个样品, 选择 2~3 个适宜连续稀释度的样品匀液(液体样品可以选择原液), 每个稀释度接种 2 个无菌平皿。同时, 分别吸取 1ml BPW 加入两个无菌平皿内作为空白对照。

4.1.2.2.2 及时将 10~15mL 融化并恒温至 46°C 的 VRBGA(可放置于 46°C ±1°C 恒温水浴箱中保温) 倾注于每个平皿中, 小心旋转平皿, 使样液与培养基充分混匀。

4.1.2.2.3 待琼脂凝固后, 再倾注 3~4mL VRBGA 覆盖平板表层。防止蔓延生长并使菌落特征更为明显。

4.1.2.2.4 待上层琼脂凝固后, 翻转平板, 36°C ±1°C 培养 18~24 小时。

#### 4.1.2.3 菌落计数

4.1.2.3.1 肠杆菌科典型菌落为有或无沉淀环的粉红色至红色或紫色菌落。选取典型菌落数在 15~150CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板, 只计数典型菌落数。菌落数以菌落形成单位(colony-forming units, CFU) 表示。

4.1.2.3.2 其中一个平板有较大片状菌落生长时, 则不宜采用, 而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数; 若片状菌落不到平板的一半, 而其余一半中菌落分布又很均匀, 即可计算半个平板后乘以 2, 代表一个平板菌落数。

4.1.2.3.3 当平板上出现菌落间无明显界线的链状生长时, 则将每条单链作为一个菌落计数。

4.1.2.3.4 从每个平板上至少挑取 5 个(小于 5 个全选) 典型菌落进行确认; 如果有不同形态的典型菌落, 则每种形态分别至少挑取 1 个菌落进行确认。

#### 4.1.2.3.3 典型菌落的确认

a. 分别将所挑选的每一个菌落, 划线于营养琼脂平板, 36°C ±1°C 培养 18~24 小时, 挑取平板上的菌落进行革兰染色镜检、氧化酶试验及葡萄糖发酵试验。

b. 革兰染色镜检: 肠杆菌科为革兰阴性杆菌, 无芽胞, 大小为 (0.3~1.0)μm × (1.0~6.0)μm。

c. 氧化酶试验: 用铂/铈接种环或玻璃棒(不要用镍铬接种环) 挑取单个菌落涂于浸湿氧化酶试剂的滤纸上, 滤纸的颜色在 10 秒内变成蓝紫色, 判为阳性反应。

d. 葡萄糖发酵试验: 用接种针挑取少许氧化酶阴性的同一个菌落, 穿刺于葡萄糖琼脂内, 于 36°C ±1°C 培养 (24±2) 小时, 若试管内的内容物变为黄色, 判为阳性反应。

#### 4.1.2.4 结果与报告

##### 4.1.2.4.1 结果

a. 一般原则: 若有两个连续稀释度的平板典型菌落数在适宜计数范围内, 按式 (1) 计算:

式中:

N —— 样品中肠杆菌科菌落数;

Σ a —— 确证的肠杆菌科菌落数之和;

n<sub>1</sub> —— 第一稀释度(低稀释倍数) 平板个数(含确证的肠杆菌科菌落);

n<sub>2</sub> —— 第二稀释度(高稀释倍数) 平板个数(含确证的肠杆菌科菌落);

d —— 稀释因子(第一稀释度)。

$$N = \frac{\sum a}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots (1)$$

其中, a 按式 (2) 计算:

式中:

a 为确证的肠杆菌科菌落数;

b 为某一平板中 A 个菌落中被确证为肠杆菌科的菌落数, b ≤ A;

A 为某一平板中用于确认试验的菌落数;

C 为某一平板中典型菌落总数。

$$a = \frac{b}{A} \times C \dots\dots\dots (2)$$

b. 低菌落数: 若最低稀释度(包括液体样品原液) 平板的典型菌落数均小于 15CFU, 具有确证的肠杆菌科菌落, 则以确证的菌落数乘以最低稀释倍数计算。

若最低稀释度(包括液体样品原液) 平板均无菌落生长, 或典型菌落数均小于 15CFU, 且无确证的肠杆菌科菌落, 则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

c. 特殊情况: 第一稀释度平板上的典型菌落数均大于 150CFU, 且有确证的肠杆菌科菌落, 以及第二稀释度平板上无确证的肠杆菌科菌落或典型菌落数不在 15~150CFU 之间, 则以确证的菌落数乘以第一稀释倍数计算。

若所有稀释度的平板上典型菌落数均不在适宜计数范围内, 且无确证的肠杆菌科菌落, 则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

##### 4.1.2.4.2 报告

菌落数小于 100 时, 以整数报告。

菌落数大于或等于 100 时, 对第 3 位数字进行修约后, 取前 2 位数字, 后面用 0 代替位数; 也可用 10 的指数形式来表示, 采用两位有效数字。数字修约按“四舍五入”原则进行。

若所有平板上为蔓延菌落而无法计数, 则报告菌落蔓延。若空白对照上有菌落生长, 则此次检测结果无效。称重取样以 CFU/g 为单位报告, 体积取样以 CFU/ml 为单位报告。

#### 4.2 第二法肠杆菌科 MPN 计数法

4.2.1 检验程序肠杆菌科 MPN 计数法检验程序见流程图 15-2。

##### 4.2.2 检验步骤

4.2.2.1 样品前处理按 4.1.2.1 进行。

##### 4.2.2.2 培养

#### 4.2.2.2.1 非选择性前增菌

根据对样品污染状况的估计及相关限量要求，选择 3 个适宜连续稀释度的样品匀液，每个稀释度 3 管，共 9 管 BPW 于  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养  $(18 \pm 2)$  小时。

#### 4.2.2.2.2 选择性增菌

从 BPW 各培养管中，分别移取 1ml 培养物，接种于 10mL 的 EE 肉汤中， $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养  $(24 \pm 2)$  小时。

#### 4.2.2.2.3 分离

用接种环从 EE 各肉汤管中分别取培养物 1 环，划线接种于 VRBGA 平板， $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养  $(24 \pm 2)$  小时，观察平板上有无典型菌落。

#### 4.2.2.3 菌落计数

典型菌落确认见 4.1.2.3.3。

#### 4.2.2.4 结果与报告

肠杆菌科为革兰阴性无芽孢杆菌，发酵葡萄糖产酸、氧化酶阴性。只要有 1 个菌落确认为肠杆菌科，其所代表的 EE 管即为肠杆菌科阳性，依据 EE 阳性管数查 MPN 表，报告每 g(mL) 样品中肠杆菌科的 MPN 值。称重取样以 MPN/g 为单位报告，体积取样以 MPN/mL 为单位报告。

### 5 检验注意事项

#### 5.1 设备与耗材的控制与使用

检验所用设备与耗材必须满足实验所需的精度与要求，定期检定校准。检验所用耗材，如吸管、稀释液、培养基、平皿等必须完全灭菌，重复使用的耗材应彻底清洗干净，不得残留有抑菌物质。

#### 5.2 培养基与试剂的控制与使用

培养基和试剂的制备和质量要求按照 GB 4789.28 的规定执行，定期进行实验室内的质量验证和评定。

#### 5.3 样品前处理

5.3.1 在进行样品的 10 倍稀释过程中，吸管应插入样品稀释液液面 2.5cm 以下，取液应先稍多于 1mL，而后将吸管尖端贴于试管内壁调整至 1mL，避免有液体黏附于管外。而后将此 1mL 液体移入另一 9mL 试管内时应沿管壁加入，不要触及管内稀释液，以防吸管外部黏附的液体混入其中影响检测结果。

5.3.2 将 1ml 样品匀液或稀释液加入平皿内时应从平皿的侧面加入，不要将整个皿盖揭去，以防污染。

5.3.3 本方法移液时可使用能连接吸管的电动移液器，在使用过程中，一旦液体进入电动移液器滤膜就应立即更换滤膜，以防污染。

5.3.4 对易产生较大颗粒或较黏稠的样品（如肉类、米粉等）进行检测时，应使用带滤网均质袋，以免均质后用堵塞吸取匀液的吸管。

5.3.5 鉴于微量移液器移液头较短，为避免污染，在样品匀液移液过程中避免使用。

#### 5.4 增菌培养

5.4.1 MPN 法在加入样品前应观察倒管内是否有气泡，若有，应适当倾斜试管，让气体释放出来。

5.4.2 为保证计数培养基高压灭菌的效果，建议每瓶培养基高压时，体积不宜超过 400mL。

5.4.3 高压灭菌后，培养基中的琼脂往往会分层在底部，应摇匀后使用。

5.4.4 应用本方法对食品样品进行肠杆菌科检验时，从一个样品的均质到倾注琼脂平板，应在 15 分钟内完成，故此，同时进行多个检样操作时应进行统筹安排。

5.4.5 当样品中含有吸水性物质（如淀粉、面粉等）时，应以最快速度进行琼脂倾注平板，以防凝块产生。

5.4.6 倾注平板后将检样与琼脂混合时，可将平皿底在平面上先向一个方向旋转 3~5 次，然后再向反方向旋转 3~5 次，以充分混匀。旋转过程中不应力度过大，避免琼脂飞溅到平皿上方。混匀过程也可使用自动平皿旋转仪进行。

5.4.7 实验过程中，每批样品稀释液都要做空白对照。如果空白对照平板上出现菌落时，应废弃本次实验结果，并对稀释液、吸管、平皿、培养基、实验环境等进行污染来源分析。

5.4.8 为了控制环境污染，在每次检验过程中，于检验工作台上打开两块计数琼脂平板，并在检验环境中暴露不少于 15 分钟，将此平板与本批次样品同时进行培养，以掌握检验过程中是否存在来自检验环境的污染。

5.4.9 在检测食品样品稀释液中有颗粒的样品时，为了避免菌落计数时食品颗粒与细菌菌落发生混淆，可将样品稀释液与计数琼脂混合，放置于  $4^{\circ}\text{C}$  环境中，以便在计数菌落时用作对照。

5.4.10 在培养箱中，为防止中间平皿过热，高度不得超过 6 个平皿。

#### 5.5 菌落特征

肠杆菌科典型菌落为有或无沉淀环的粉红色至红色或紫色菌落。

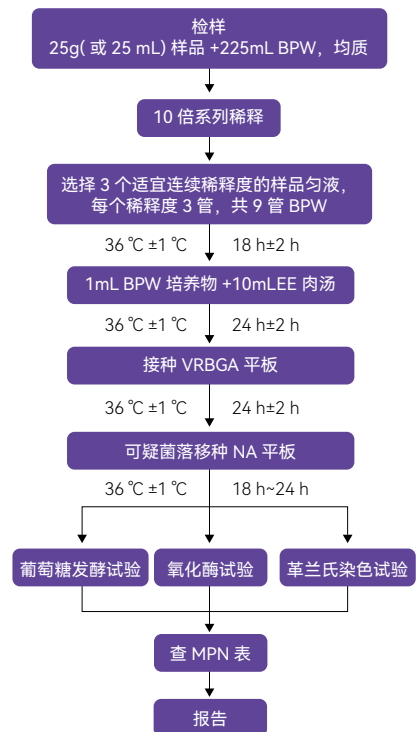
形态与染色：革兰阴性杆菌，其菌体大小为  $(1.0\sim 6.0)\mu\text{m} \times (0.3\sim 1.0)\mu\text{m}$ ，多数有周鞭毛，除外志贺菌属、克雷伯菌属、鼠疫耶尔森菌和 EIEC 无鞭毛。均不形成芽胞，少数菌属细菌可形成荚膜。

#### 5.6 异常结果处理

部分实验结果在 MPN 表中无法查找到 MPN 值，如阳性管数为 122、123、232、233，可增加稀释度（可做 4~5 个稀释度），使样品的最高稀释度能达到获得阴性终点（如果污染程度不能判定，则多加一稀释度），然后再遵循相关的规则进行查找，最终确定 MPN。

#### 5.7 其他注意事项

增菌培养基灵敏度高，分离培养目标菌的概率就大，结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂培养基是 VRBA 改良而来（以葡萄糖取代原配方中的乳糖），适宜于进行肠杆菌科的检验。在胆盐葡萄糖琼脂培养基上除肠杆菌科细菌外，偶尔也可见气单胞菌和假单胞菌能够长出红色菌落，这些假阳性菌落可经氧化酶试验予以区分。



流程图 15-2 肠杆菌科 MPN 计数法检验程序

## 6 疑难解析

6.1 方法中规定，每个平皿平板计数培养基的使用体积是 15~20mL 培养基体积的变化是否会影响计数结果？

经过实验室验证，培养基体积在 15~20mL 范围内变化不会影响计数结果。

6.2 如何进行肠杆菌科与其他科属细菌的鉴别？

革兰阴性杆菌除了肠杆菌科外，还有弧菌科和非发酵菌。所以，肠杆菌科的鉴定首先应注意与这些菌的鉴别。可用形态、葡萄糖氧化或发酵、氧化酶、鞭毛等特性加以区别。见下表 15-1

试验	肠杆菌科	弧菌科	非发酵菌
葡萄糖	F	F	0/
氧化酶	+	+	+
形态	杆状	弧形	杆状
鞭毛	周毛或无	单毛	单、丛毛、周毛、无

注：\*，不动杆菌、嗜麦芽黄单胞菌除外。F，发酵型，细菌在有氧、无氧条件下均可分解葡萄糖。0，氧化型，细菌在有氧条件下才能分解葡萄糖。+，产碱型，细菌不分解葡萄糖。

## 附录 A

# 缓冲蛋白胨水 (BPW) 产品验证



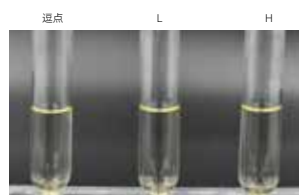
1、产品用途：用于食品中沙门氏菌和阪崎肠杆菌的前增菌培养。

2、检验原理：蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；磷酸二氢钾和磷酸氢二钠是缓冲剂。

表 15-2：缓冲蛋白胨水 (BPW) 验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数, CFU	菌液浓度计数 (TSA), CFU	评定标准	结果判定
缓冲蛋白胨水 (BPW)	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	5216	64	取 10μl 增菌液倾注 TSA 平板 36°C ±1°C 培养 18h ~ 24h, 在 TSA 上 > 100CFU	符合
		L 品牌	1279			符合
		H 品牌	1778			符合

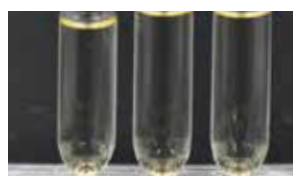
3、典型特征图片：



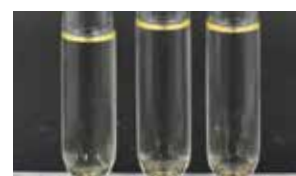
逗点 -L 品牌 -H 品牌 -BPW 空白



逗点 -BPW 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



L 品牌 -BPW 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



H 品牌 -BPW 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



菌液计数鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



逗点 -BPW 增菌液计数



L 品牌 -BPW 增菌液计数



H 品牌 -BPW 增菌液计数

图 15-1

4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028：逗点鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 增菌后菌落数优于 L 品牌、H 品牌；

4.2 感观：三家空白试管 L 品牌颜色较淡，逗点和 H 品牌颜色无显著差异。

4.3 逗点增菌效果优于 L 品牌和 H 品牌。

## 附录 B

# 缓冲葡萄糖煌绿胆盐肉汤 (EE 肉汤) 验证



1、产品用途：用于肠道菌检验选择性增菌培养。

2、检验原理：蛋白胨提供蛋白质、维生素和氨基酸；葡萄糖提供碳源；磷酸氢二钠和磷酸二氢钾为缓冲剂；牛胆盐和煌绿为选择性抑菌剂，抑制非肠杆菌科细菌的生长。

表 15-3：缓冲葡萄糖煌绿胆盐肉汤 (EE 肉汤) 验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
缓冲葡萄糖 煌绿胆盐肉 汤 (EE 肉汤)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	80	生长良好 (混浊度 2)	生长良好 (混浊度 2)	符合
		L 品牌	/		生长良好 (混浊度 2)		符合
		H 品牌	/		生长良好 (混浊度 2)		符合
	弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864	逗点	/	10	生长良好 (混浊度 2)	生长良好 (混浊度 2)	符合
		L 品牌	/		生长良好 (混浊度 2)		符合
		H 品牌	/		生长良好 (混浊度 2)		符合
	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	/	60	生长良好 (混浊度 2)	生长良好 (混浊度 2)	符合
		L 品牌	/		生长良好 (混浊度 2)		符合
		H 品牌	/		生长良好 (混浊度 2)		符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	4495	抑制	抑制	符合
		L 品牌	/		抑制		符合
		H 品牌	/		抑制		符合

1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在缓冲葡萄糖煌绿胆盐肉汤 (EE 肉汤) 上的特征性反应: 生长良好 (混浊度 2);
2. 弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864 在缓冲葡萄糖煌绿胆盐肉汤 (EE 肉汤) 上的特征性反应: 生长良好 (混浊度 2);
3. 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 在缓冲葡萄糖煌绿胆盐肉汤 (EE 肉汤) 上的特征性反应: 生长良好 (混浊度 2);
4. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在缓冲葡萄糖煌绿胆盐肉汤 (EE 肉汤) 上的特征性反应: 抑制。

### 3、典型特征图片：

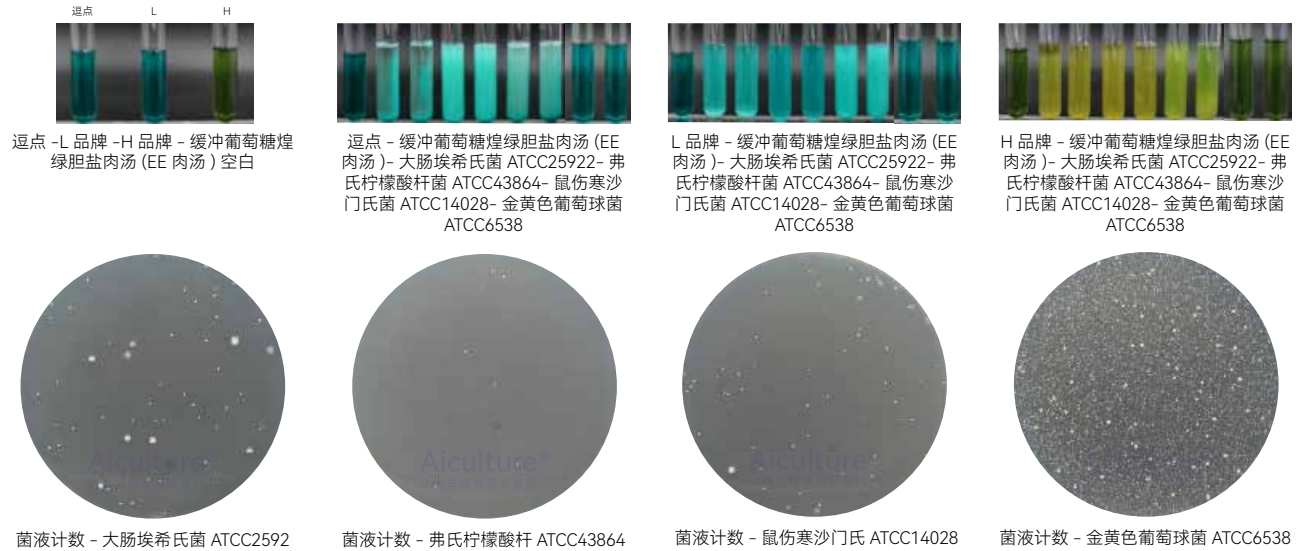


图 15-3

### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922、弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028，逗点、L 品牌、H 品牌均满足生长良好 (混浊度 2)，逗点增菌效果最好；金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均被抑制，满足要求；
- 4.2 感官：逗点、L 品牌空白肉汤颜色为蓝绿色无显著差异，H 品牌空白肉汤颜色草绿色。

## 附录 C

# 结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂 (VRBGA) 验证



- 1、产品用途：用于肠杆菌科细菌的分离。
- 2、检验原理：蛋白胨和酵母膏粉提供碳氮源和微量元素；乳糖是可发酵的糖类；氯化钠可维持均衡的渗透压；3 号胆盐和结晶紫抑制革兰氏阳性菌，特别抑制革兰氏阳性杆菌和粪链球菌；中性红为 pH 指示剂。

表 15-4：结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂 (VRBGA) 验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
结晶紫中 性红胆盐 葡萄糖琼脂 (VRBGA)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	80	104	0.7	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	106		1.0		符合
		H 品牌	82		0.7		符合
	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	65	70	0.9	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	55		0.7		符合
		H 品牌	70		1.0		符合
福氏志贺氏菌 ATCC12022	逗点	251	244	1.0	PR ≥ 0.7	符合	
	L 品牌	244		1.0		符合	
	H 品牌	280		1.1		符合	
金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合	
	L 品牌	/		G=0		符合	
	H 品牌	/		G=0		符合	

1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂 (VRBGA) 板上的菌落特征: 紫红色菌落, 周围有胆盐沉淀环;
2. 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 在结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂 (VRBGA) 板上的菌落特征: 紫红色菌落, 周围有胆盐沉淀环;
3. 福氏志贺氏菌 ATCC12022 在结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂 (VRBGA) 板上的菌落特征: 紫红色菌落, 周围有胆盐沉淀环;
4. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂 (VRBGA) 板上的菌落特征: G = 1。

3、典型特征图片：



逗点 VRBGA 空白



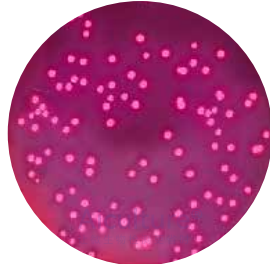
L 品牌 VRBGA 空白



H 品牌 VRBGA 空白



逗点 -VRBGA- 大肠埃希氏菌 ATCC25922



L 品牌 -VRBGA- 大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌 -VRBGA- 大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点 -VRBGA- 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



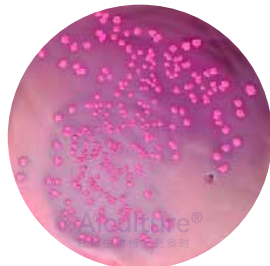
L 品牌 -VRBGA- 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



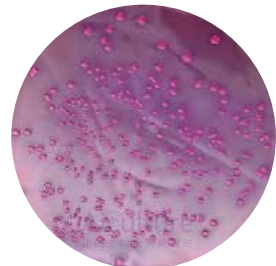
H 品牌 -VRBGA- 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



逗点 -VRBGA- 福氏志贺氏菌 ATCC12022



L 品牌 -VRBGA- 福氏志贺氏菌 ATCC12022



H 品牌 -VRBGA- 福氏志贺氏菌 ATCC12022



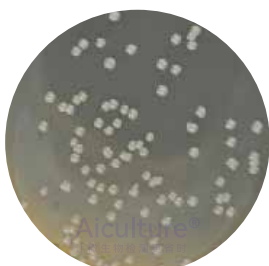
逗点 -VRBGA- 金黄色葡萄球菌 ATCC6538



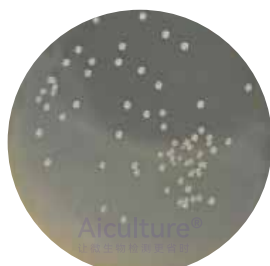
L 品牌 -VRBGA- 金黄色葡萄球菌 ATCC6538



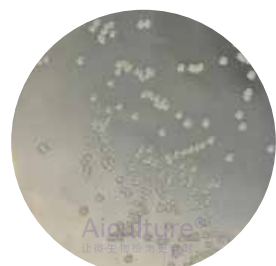
H 品牌 -VRBGA- 金黄色葡萄球菌 ATCC6538



参比 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



参比 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



参比 - 福氏志贺氏菌 ATCC12022

图 15-4

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均满足  $PR \geq 0.7$  的要求，紫红色菌落，周围有胆盐沉淀环；鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028，逗点、L 品牌、H 品牌均满足  $PR \geq 0.7$  的要求，紫红色菌落，周围有胆盐沉淀环；福氏志贺氏菌 ATCC12022，逗点、L 品牌、H 品牌满足  $PR \geq 0.7$  的要求，紫红色菌落，周围有胆盐沉淀环；
- 4.2 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $G < 1$  的要求；
- 4.3 感观：L 品牌空白板颜色紫红色，逗点颜色比 L 品牌偏淡，H 品牌颜色比 L 品牌偏深。

附录 D

## 葡萄糖琼脂验证



- 1、产品用途：用于肠杆菌科细菌的葡萄糖发酵试验。
- 2、检验原理：胰蛋白胨、酵母粉提供氮源和生长因子；葡萄糖为可发酵糖，提供碳源；氯化钠维持稳定的渗透压；溴甲酚紫是指示剂；琼脂是培养基的凝固剂。

表 15-5：葡萄糖琼脂验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
葡萄糖琼脂	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	生长良好，培养基变黄；产气	生长良好，培养基变黄；产气	符合
		L 品牌	/	生长良好，培养基变黄；产气		符合
		H 品牌	/	生长良好，培养基变黄；产气		符合
	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	/	生长良好，培养基变黄；产气	生长良好，培养基变黄；产气	符合
		L 品牌	/	生长良好，培养基变黄；产气		符合
		H 品牌	/	生长良好，培养基变黄；产气		符合
	福氏志贺氏菌 ATCC12022	逗点	/	生长良好，培养基变黄；不产气	生长良好，培养基变黄；不产气	符合
		L 品牌	/	生长良好，培养基变黄；不产气		符合
		H 品牌	/	生长良好，培养基变黄；不产气		符合
	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	/	生长良好，培养基变黄；不产气	生长良好，培养基变黄；不产气	符合
		L 品牌	/	生长良好，培养基变黄；不产气		符合
		H 品牌	/	生长良好，培养基变黄；不产气		符合

1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在葡萄糖琼脂上：生长良好，培养基变黄；产气；
2. 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 在葡萄糖琼脂上：生长良好，培养基变黄；产气；
3. 福氏志贺氏菌 ATCC12022 在葡萄糖琼脂上：生长良好，培养基变黄；不产气；
4. 粪肠球菌 ATCC29212 在葡萄糖琼脂上：生长良好，培养基变黄；不产气。

3、典型特征图片：

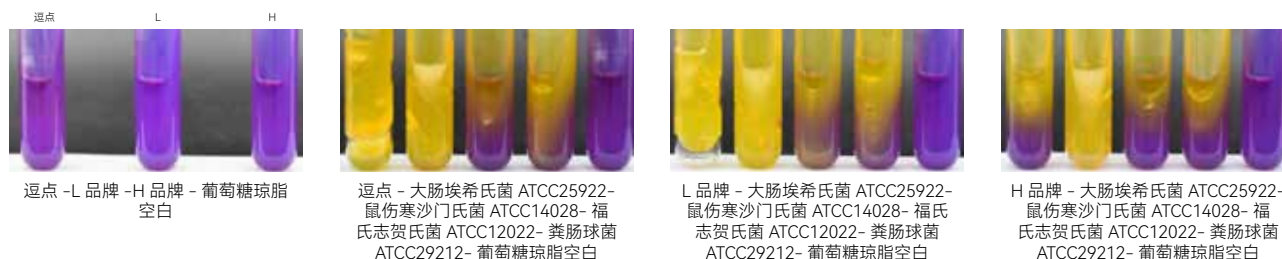


图 15-5

4、验证结果小结：

- 4.1 生化特性：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028，逗点、L 品牌、H 品牌均满足生长良好、培养基变黄、产气的要求，H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922 产气不明显；福氏志贺氏菌 ATCC12022、粪肠球菌 ATCC29212 逗点、L 品牌、H 品牌均满足生长良好、培养基变黄、不产气的要求；
- 4.2 感观：逗点、L 品牌、H 品牌空白斜面颜色无显著差异。



# 16 食品微生物学检验

## 大肠埃希菌 0157:H7/NM 检验 GB 4789.36-2016)

### 一、概述

#### 1.1 适用范围

本标准规定了食品中大肠埃希菌 0157:H7/NM(*Escherichia coli* 0157:H7/NM) 的检验方法。

本标准适用于食品中大肠埃希菌 0157:H7/NM 的检验。

#### 1.2 检测原理

大肠埃希菌 0157:H7/NM(Non-motile, 意为无动力) 属肠杆菌科埃希菌属, 是引起人类疾病的肠出血性大肠埃希菌 (Enterohemorrhage *E. coli*, EHEC) 最常见的血清型, 具有一般大肠埃希菌的形态特征, 为革兰阴性、无芽胞的直杆菌, 两端钝圆, 散在或成对, 大多数菌株以周生鞭毛运动, 但也有无鞭毛或鞭毛丢失的无动力变异株。其最适生长温度为 37℃, 44~45℃ 时生长不良。对热敏感, 在 60℃ 30 分钟或 75℃ 1 分钟可被杀死。相对耐酸和耐冷, 能在 pH 值为 2 和温度低于 5℃ 的环境中生存, 在 -20℃ 可存活 9 个月。

0157:H7/NM 与一般大肠埃希菌的基本生化特性相符, 发酵多种碳水化合物, 但不发酵或迟缓发酵山梨糖醇, 不能分解 4- 甲基伞形酮 -B-D- 葡萄糖醛酸苷 (MUG) 产生荧光, 由此可与其他大肠埃希菌进行鉴别。0157:H7/NM 可产生大量的 Vero 毒素 (VT), 也称作类志贺毒素 (SLT), 是其致病的主要因素, 大约 10~100 个 0157:H7/NM 菌体即能引发感染。它是一种人畜共患的食源性致病菌, 其宿主主要是牛。pH 值较低的食物 (如牛肉、牛奶、面食、菠菜和生菜等) 是大肠埃希菌 0157:H7/NM 感染的来源。

本方法通过细菌的形态特征、培养特性、生理生化特征来鉴定, 包括增菌培养、分离纯化、染色镜检、生化鉴定及血清分型等过程, 对食品中可能存在的大肠埃希菌 0157:H7/NM 进行定性检验。



### 二、设备和耗材

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外, 其他设备和材料如下。

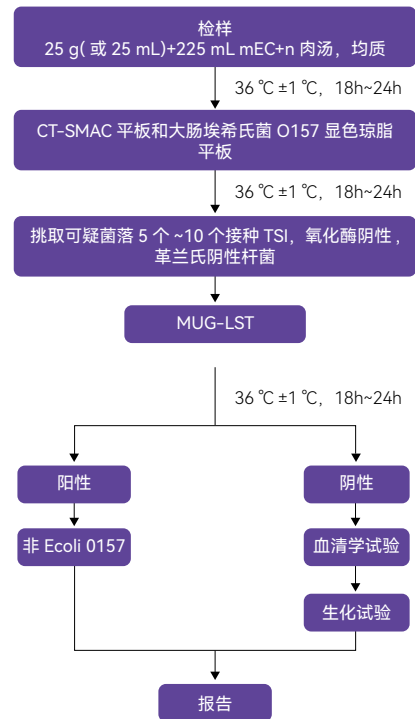
- 2.1 恒温培养箱 36℃ ±1℃。
- 2.2 冰箱 2~5℃, 7~10℃。
- 2.3 恒温水浴箱 46℃ ±1℃。
- 2.4 天平感量 0.1g、0.01g。
- 2.5 刀头式均质器或拍打式均质器。
- 2.6 显微镜 10~100 倍。
- 2.7 无菌吸管 1mL (具 0.01mL 刻度)、10mL (具 0.1mL 刻度) 或移液器及吸头。
- 2.8 无菌均质杯或无菌均质袋容量 500mL。
- 2.9 无菌培养皿直径 90mm。
- 2.10 pH 计或精密 pH 试纸。
- 2.11 长波紫外光灯 365 nm, 功率 ≤ 6W。
- 2.12 微量离心管 1.5mL 或 2.0mL。
- 2.13 磁板、磁板架、样品混合器。
- 2.14 微生物鉴定系统。
- 2.15 漩涡混匀器。
- 2.16 接种针、接种环。

### 3 培养基与试剂

- 3.1 改良 EC 肉汤 (mEC+n)。
- 3.2 改良山梨醇麦康凯琼脂 (CT-SMAC)。
- 3.3 三糖铁琼脂 (TSI)。
- 3.4 营养琼脂。
- 3.5 半固体琼脂。
- 3.6 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 -MUG(MUG-LST)。
- 3.7 氧化酶试剂。
- 3.8 革兰染色液。
- 3.9 PBS-Tween 20 洗液。
- 3.10 亚碲酸钾 (AR 级)。
- 3.11 头孢克肟 (Cefixime)。
- 3.12 大肠埃希菌 0157 显色培养基。
- 3.13 大肠埃希菌 0157 和 H7 诊断血清或 0157 乳胶凝集试剂。
- 3.14 鉴定试剂盒。
- 3.15 抗 -*E. coli* 0157 免疫磁珠。

### 4 检验程序

大肠埃希菌 0157:H7/NM 常规培养法检验程序见流程图 16-1。



流程图 16-1 大肠埃希菌 0157:H7/NM 常规培养法检验程序

## 5 检验步骤

### 5.1 增菌

5.1.1 固体和半固体样品：以无菌操作称取样品 25g 加入到含有 225mL mEC+n 肉汤的均质袋中，在拍击式均质器上连续均质 1~2 分钟；或放入盛有 225mL mEC+n 肉汤的均质杯中，8000~10000r/min 均质 1~2 分钟。

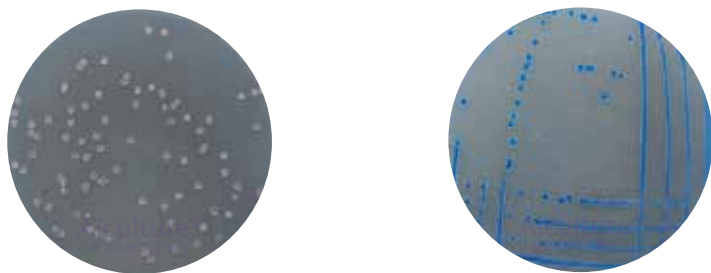
5.1.2 液体样品：以无菌操作量取样品 25mL，加入到含有 225mL mEC+n 肉汤的均质袋中，或放入盛有 225mL mEC+n 肉汤的均质杯或锥形瓶中，充分混匀。

5.1.3 非冷冻样品采集后应立即置规定温度保存，尽可能及早检验；冷冻样品应在 45℃ 以下不超过 15 分钟或在 2~5℃ 不超过 18 小时解冻。

5.1.4 将上述 1:10 样品匀液于 36℃ ±1℃ 培养 18~24 小时。

### 5.2 分离

取增菌后的 mEC+n 肉汤一环（约 10μL），划线接种于 CT-SMAC 平板和大肠埃希菌 0157 显色琼脂平板上，36℃ ±1℃ 培养 18~24 小时，观察各个平板上生长的菌落。在 CT-SMAC 平板上，典型菌落为圆形、光滑、较小的无色菌落，中心呈现较暗的灰褐色；在大肠埃希菌 0157 显色琼脂平板上的菌落特征按产品说明书进行判定。



逗点大肠埃希氏菌 O157: H7NCTC12900

逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922

图 16-1

### 5.3 初步生化反应

如果在平板上有可疑菌落，应在 CT-SMAC 和大肠埃希菌 0157 显色琼脂平板上分别用接种针自菌落中心挑取 5~10 个可疑菌落，分别接种 TSI 琼脂（接种针先在 TSI 斜面上划线，再于底层穿刺），同时用上述接种针直接接种 MUG-LST 肉汤。用大肠埃希菌株（ATCC 25922 或等效标准菌株）做阳性对照，用大肠埃希菌 0157:H7(NCTC 12900 或等效标准菌株）做阴性对照，于 36℃ ±1℃ 培养 18~24 小时。必要时进行氧化酶试验和革兰染色镜检。

典型菌株在 TSI 琼脂中的生化反应现象为斜面与底层均呈黄色，产气或不产气，不产生硫化氢（H<sub>2</sub>S）。培养后的 MUG-LST 肉汤管置于长波紫外灯 365nm 下观察，MUG 试验阳性的菌株应有荧光产生；MUG 试验阴性菌株应无荧光产生，大肠埃希菌 0157:H7/NM 为 MUG 试验阴性，即无荧光产生。

挑取可疑菌落，在营养琼脂平板上分离纯化，于 36℃ ±1℃ 培养 18~24 小时，并进行下列鉴定。

### 5.4 鉴定

#### 5.4.1 血清学试验

5.4.1.1 检查培养物有无自凝性 在营养琼脂平板上挑取经分离纯化的菌落，在洁净的玻璃片上滴加一滴 0.85% 无菌生理盐水，将待试培养物混合于 0.85% 无菌生理盐水的液滴内，使其成为均一的浑浊悬液，将玻片轻轻摇动 30~60 秒，在黑色背景下观察反应（必要时用放大镜观察），若出现可见的菌体凝集，即认为有自凝性，反之无自凝性。对无自凝的培养物参照下面方法进行血清学鉴定。对于自凝的培养物用 3% 血清肉汤返祖传代，再划线到营养琼脂平板上进行鉴定。

5.4.1.2 O 抗原鉴定 在营养琼脂平板上挑取经分离纯化的菌落，用 0157 诊断血清或 0157 乳胶凝集试剂作玻片凝集试验。在玻片上划出 2 个约 1cm×2cm 的区域，挑取 1 环待测菌体，各放 1/2 环于玻片上的每一区域上部，在其中一个区域下部加 1 滴 0157 诊断血清或 0157 乳胶凝集试剂，在另一区域下部加入 1 滴 0.85% 无菌生理盐水，作为对照。再用无菌的接种环或针分别将两个区域内的菌苔研成乳状液。将玻片倾斜摇动混合 1 分钟，并对着黑暗背景进行观察，任何程度的凝集现象皆为阳性反应（乳胶凝集试剂应为明显凝集）。

5.4.1.3 H 抗原鉴定 在营养琼脂平板上挑取经分离纯化的菌落，用 H7 诊断血清做玻片凝集试验。H 抗原发育不良时，将菌株接种在 0.55%~0.65% 半固体琼脂平板的中央，待菌落蔓延生长时，在其边缘部分取菌检查。对于 H7 因子血清不凝集者，应穿刺接种半固体琼脂，检查动力，如仅沿穿刺线生长而无扩散，则应再次穿刺接种半固体琼脂，经连续传代 3 次，动力试验均阴性，确定为无动力株（NM）。

#### 5.4.2 生化试验

自营养琼脂平板上挑取菌落，进行生化试验。

## 6 结果报告

综合生化和血清学试验结果，当检出的可疑菌落的生化性状与大肠埃希菌 0157:H7/NM 相符，则报告 25g（或 25ml）样品中检出大肠埃希菌 0157:H7 或 0157:NM；如未分离到可疑菌株或可疑菌株的生化性状与大肠埃希菌 0157:H7/NM 不相符，则报告 25g（或 25ml）样品中未检出大肠埃希菌 0157:H7 或 0157:NM。

## 7 菌种保存

将确认为大肠埃希菌 0157:H7/NM 的菌落从营养琼脂平板上刮取，加入 50% 甘油 -BHI 肉汤中，标识清晰，低温冷冻（-80℃）长期保存备查。

## 8 检验注意事项

### 8.1 设备与耗材的控制与使用

8.1.1 建议使用带滤芯的移液头或移液管，防止交叉污染。

8.1.2 可使用一次性的 10 $\mu$ l 接种环进行划线操作。

8.2 培养基与试剂的控制与使用

8.2.1 培养基和试剂应按照《食品安全国家标准食品微生物学检验培养基和试剂的质量要求》(GB 4789.28) 进行验收, 合格后方可进行相应的试验。

8.2.2 试验过程中, 应在样品增菌、分离等操作中设置空白对照。如果空白对照液体培养基出现浑浊, 或空白琼脂培养基上出现可疑菌落, 则本次试验无效。实验室应从试验方法、试验操作、试验设备、试验耗材和试验环境等方面进行偏差调查。

8.2.3 定期使用大肠埃希菌 0157:H7/NM 的标准菌株或相应的定量活菌参考品, 在 BSL- II 级生物安全实验室区域内进行试验。选取适宜的食品样品, 通过添加阳性质控的方式, 进行阳性对照试验。一般每 25g(mL) 样品的人工污染致病菌量应控制在 10~100CFU 之间。

8.3 样品前处理

若样品可能产生较大的颗粒干扰样品检测, 可采用带滤网的均质袋, 或者将无菌滤网置于均质杯中, 吸取样品匀液。

8.4 增菌培养

8.4.1 如使用均质袋进行液体的增菌培养, 可使用带有底托的均质袋架子等, 防止增菌液泄露造成交叉污染。

8.4.2 三糖铁 (TSI) 应采用高层斜面, 以保证底部糖分解反应需要的厌氧环境。培养时, 应将试管口松开, 保持管内有充足的氧气, 以免产生过量的 H<sub>2</sub>S。

8.4.3 为防止中间培养皿过热, 培养时, 堆叠高度不宜超过 6 个平皿。

8.5 菌落特征

使用 CT-SMAC 琼脂平板时要注意区分典型菌落和可疑菌落, 虽然大部分 0157 大肠埃希菌不发酵或迟缓发酵山梨醇, 还有一些其他血清型的 0157、变形菌属、毗邻单胞菌属、摩根菌属和爱德华菌属等革兰阴性菌也不发酵山梨醇, 需要进一步的鉴定试验才能与大肠埃希菌 0157:H7/NM 区分。

8.5 其他注意事项

挑取菌落时, 建议采用接种针自菌落中心挑取进行相关操作。

## 9 疑难解析

9.1 大肠埃希菌、致泻大肠埃希菌和大肠埃希菌 0157:H7/NM 的关系是什么? 为何要单独进行大肠埃希菌 0157:H7/NM 的检测?

大肠埃希菌是寄居肠道的优势菌群之一。致泻大肠埃希菌是一类能引起人体以腹泻症状为主的大肠埃希菌, 可经过污染食物引起人类发病。常见的致泻大肠埃希菌主要包括肠道致病性大肠埃希菌、肠道侵袭性大肠埃希菌、产肠毒素大肠埃希菌、产志贺毒素大肠埃希菌 (包括肠道出血性大肠埃希菌) 和肠道集聚性大肠埃希菌。大肠埃希菌 0157:H7/NM 是肠道出血性大肠埃希菌的一种血清型。

大肠埃希菌 0157:H7/NM 是一种重要的人畜共患的食源性病原菌, 近年来在世界各地的流行范围不断扩大。1982 年, 该菌在美国被首先发现, 此后在世界各地暴发或流行。1996 年在日本大阪地区发生流行, 患者逾万、死亡 11 人。1999~2000 年在中国江苏、安徽等地发生了多起食源性感染 0157:H7 事件, 导致 177 人死亡。大肠埃希菌 0157:H7/NM 的感染具有暴发流行、强烈的致病性与致死性, 通过抗生素治疗可能会加剧病情及预后不良等特点, 已成为全球性的公共卫生问题。因此对大肠埃希菌 0157:H7/NM 进行有效的防控, 建立检测方法十分有必要。

9.2 大肠埃希菌 0157:H7/NM 迟缓发酵山梨醇是什么意思?

一般细菌对糖的发酵会在 24~48 小时内进行, 而大肠埃希菌 0157:H7/NM 对山梨醇的发酵可能会延迟至 48 小时后, 一般将 48 小时后的发酵定义为“迟缓发酵”。

9.3 大肠埃希菌 0157:H7/NM 在血清凝集时有何注意事项?

如果分离到的菌株 0157 抗原和 H7 抗原均凝集, 则该分离株的血清型为 0157:H7。但是, 如果分离到的菌株 0157 抗原凝集而 H7 抗原不凝集, 该菌株可能是非动力株 0157:NM。必要时, 应检测其毒力基因。该菌株可同时接种至血琼脂平板进行 H 抗原诱导, 并重新进行 H7 抗原测定。在进行血清凝集时, 需要排除自凝, 同时应增加阳性对照试验。应当先进行 0157 抗原的凝集, 如 0157 抗原凝集, 再进行 H7 抗原的凝集试验。因为有些非 0157 抗原的大肠埃希菌也会使 H7 凝集。

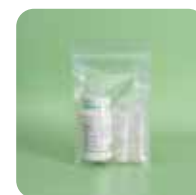
## 附录 A

# O157 显色培养基验证

1. 产品用途: 用于大肠杆菌 O157:H7 的快速分离和鉴定。

2. 检验原理: 蛋白胨、酵母膏粉提供碳源和氮源; 氯化钠可维持均衡的渗透压; 琼脂是培养基的凝固剂; 亚碲酸钾抑制非大肠杆菌 O157:H7 菌的生长; 混合色素与大肠杆菌 O157:H7 所具有的酶发生特异性反应, 水解底物, 释放出显色基团, 产生紫红色的菌落。

表 16-2: O157 显色培养基验证



3、典型特征图片：

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
O157 显色培养基	大肠埃希氏菌 O157: H7NCTC12900	逗点	79	68	PR=1.2	PR ≥ 0.5	符合
		H 品牌	96		PR=1.4		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	金属蓝色菌落	/	符合
		H 品牌	/	/	蓝绿色菌落	/	符合
	粪肠球菌 ATCC 29212	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		H 品牌	/	/	G=0		符合
	奇异变形杆菌 CMCC(B)49005	逗点	/	/	G=1	G ≤ 1	符合
		H 品牌	/	/	G=0		符合

1. 生长率：逗点大肠埃希氏菌 O157: H7NCTC12900 在 O157 显色板上的菌落特征：淡紫色菌落；H 品牌大肠埃希氏菌 O157: H7NCTC12900 在 O157 显色板上的菌落特征：品紫色菌落；  
 2 特异性：逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 O157 显色板上的菌落特征：金属蓝色菌落；H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 O157 显色板上的菌落特征：蓝绿色菌落；  
 3. 选择性：粪肠球菌 ATCC 29212、奇异变形杆菌 CMCC(B)49005 在 O157 显色板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1。

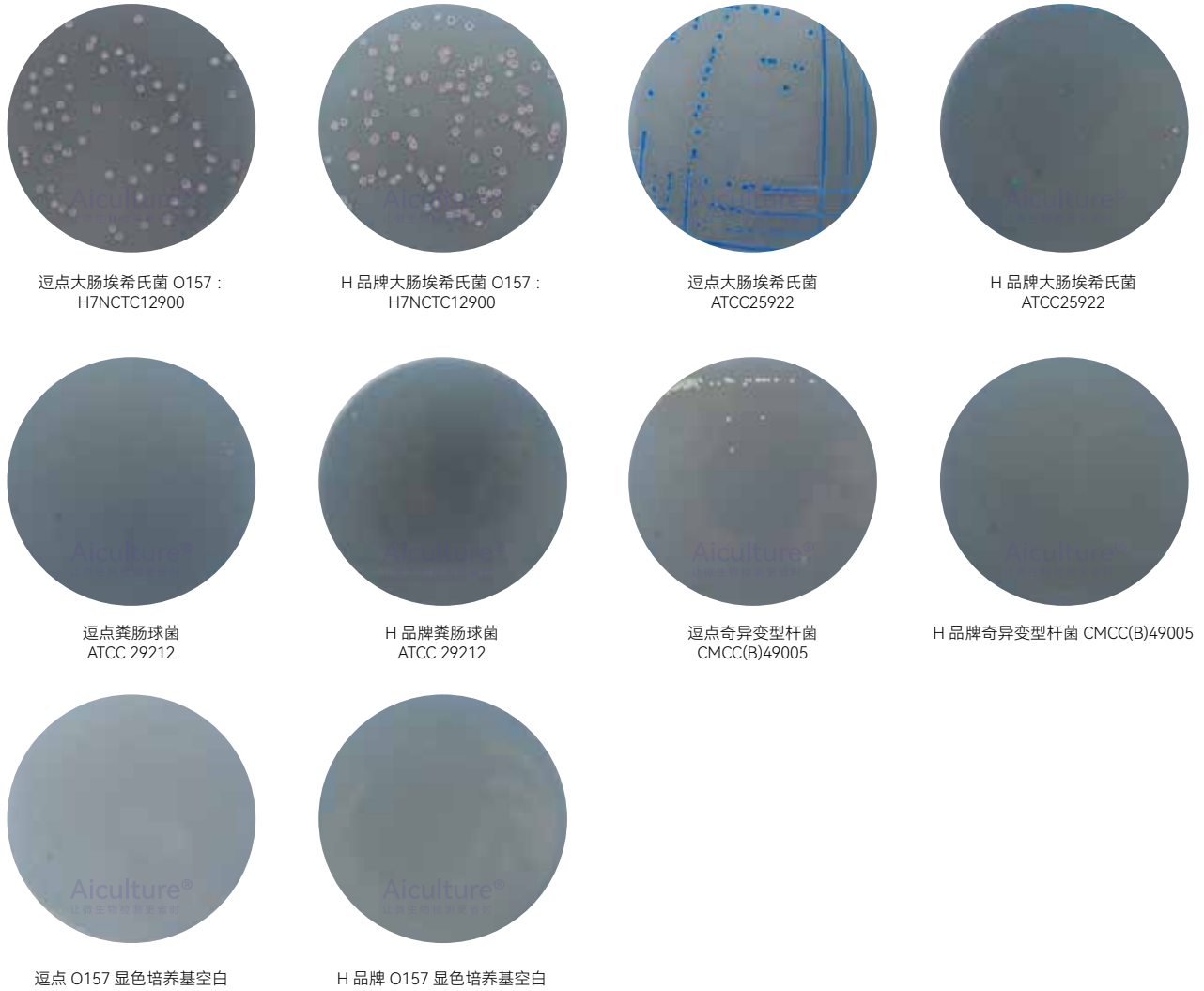


图 16-2

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 O157：H7NCTC12900、逗点、H 品牌、均满足国标 PR ≥ 0.5 的要求。
- 4.2 选择性：逗点、H 品牌奇异变形杆菌 CMCC(B)49005、粪肠球菌 ATCC 29212，逗点、H 品牌均满足国标 G ≤ 1 的要求；
- 4.3 特异性：大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、H 品牌均满足菌落颜色特征要求；逗点的生长现象更好。
- 4.4 感观：两家平板颜色无显著差异。

# 17 食品微生物学检验

## 克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）检验 GB4789.40—2016

### 一、概述

克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌），广泛分布于食品和环境，是一种条件致病菌，偶尔可引起菌血症、脑膜炎、大脑炎和坏死性小肠结肠炎。克罗诺杆菌属对各年龄段的人群都有可能产生感染，但根据以往的报道来看，其感染的高危人群主要集中在婴儿（即 <1 岁的儿童），尤其是那些免疫力低下的婴儿和新生儿（≤ 28 天）以及出生体重偏低（<2500g）的新生儿。虽然未研究出克罗诺杆菌属的宿主，但大量研究发现配方奶粉是婴幼儿感染的主要途径，婴儿配方奶粉中微量的克罗诺杆菌属（每 100g<3CFU）污染也能导致感染的发生。

克罗诺杆菌属检验方法主要是依据克罗诺杆菌属特有的生化特征，如黄色素的产生和 α-葡萄糖苷酶活性等进行鉴定。整个实验包括前增菌、选择性增菌、选择性分离培养、生化鉴定共 4 个步骤，定量检测采用 100g、10g 和 1g 三个样本量的最可能数（MPN）法，产品中数量极少的微生物也可以被检测和定量。

### 二、设备和耗材

2.1 恒温培养箱 25℃ ±1℃, 36℃ ±1℃, 44℃ ±0.5℃。

2.2 冰箱 2~5℃。

2.3 恒温水箱 44℃ ±0.5℃。

2.4 天平感量 0.1g。

2.5 均质器。

2.6 振荡器。

2.7 无菌吸管 1mL（具 0.01mL 刻度）、10mL（具 0.1mL 刻度）或微量移液器及吸头。

2.8 无菌锥形瓶容量 100mL、200mL、2000mL。

2.9 无菌培养皿直径 90mm。

2.10 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

### 3 培养基和试剂

3.1 缓冲蛋白胨水（buffer peptone water, BPW）。

3.2 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨汤 - 万古霉素（modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium, mLST-Vm）。

3.3 阪崎肠杆菌显色培养基。

3.4 胰蛋白胨大豆琼脂（tryptic soy agar, TSA）。

3.5 生化鉴定试剂盒。

3.6 氧化酶试剂。

3.7 L-赖氨酸脱羧酶培养基。

3.8 L-鸟氨酸脱羧酶培养基。

3.9 L-精氨酸双水解酶培养基。

3.10 糖类发酵培养基。

3.11 西蒙柠檬酸盐培养基。

以上仅列出实验中所需培养基与试剂，具体配制方法见 GB4789.40—2016。

### 第一法 克罗诺杆菌属定性检验

#### 4 检验过程

##### 4.1 检验程序

克罗诺杆菌属的检验程序见流程图 17-1。

##### 4.2 定性检验

###### 4.2.1 前增菌和增菌

取检样 100g(mL) 置灭菌锥形瓶中。加入 900mL 已预热至 44℃ 的缓冲蛋白胨水，缓慢摇动至充分溶解，36℃ ±1℃ 培养（18±2）小时。移取 1mL 转种于 10mL mLST-Vm 肉汤。44℃ ±0.5℃ 培养（24±2）小时。

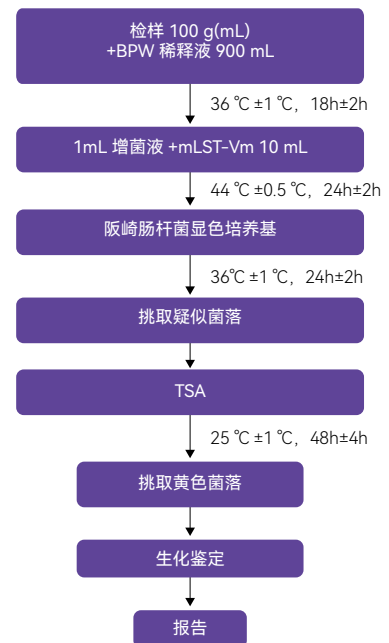
###### 4.2.2 分离

充分混匀 mLST-Vm 肉汤培养物，各取增菌培养物 1 环，分别划线接种于两个阪崎肠杆菌显色培养基平板，36℃ ±1℃ 培养（24±2）小时（或按培养基要求条件培养）。

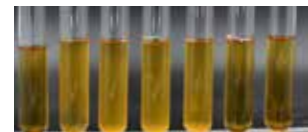
挑取至少 5 个可疑菌落，不足 5 个时挑取全部可疑菌落，可疑菌落呈蓝色，圆形、表面光滑湿润，边缘整齐（图 28-2）或者符合显色培养基应有的特征，划线接种于 TSA 平板，25℃ ±1℃ 培养（48±4）小时。

###### 4.2.3 鉴定

自 TSA 平板上直接挑取黄色、圆形、表面光滑湿润、边缘整齐的可疑菌落（下表 17-1），进行生化鉴定。



流程图 17-1 克罗诺杆菌属检验程序



逗点 mLST- 阪崎肠杆菌 ATCC29544+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922+ 粪肠球菌 ATCC29212- 大肠埃希氏菌 ATCC25922- 粪肠球菌 ATCC29212

图 17-1

生化试验		特征
黄色素产生		+
氧化酶		-
L- 赖氨酸脱羧酶		-
L- 鸟氨酸脱羧酶		(+)
L- 精氨酸双水解酶		+
柠檬酸水解		(+)
发酵	D- 山梨醇	(-)
	L- 鼠李糖	+
	D- 蔗糖	+
	D- 蜜二糖	+
	苦杏仁甙	+

4.2.4 结果与报告综合菌落形态和生化特征, 报告每 100g(ml) 样品中检出或未检出克罗诺杆菌属。

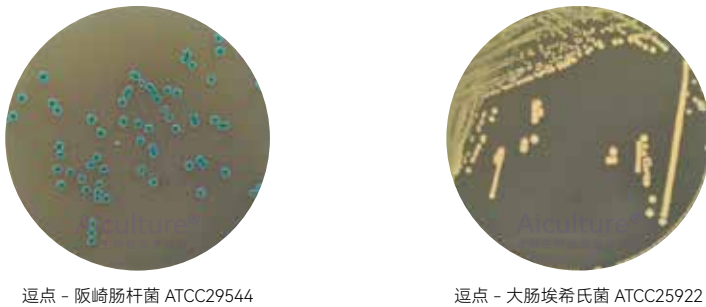


图 17-2

第二法克罗诺杆菌属的计数

4.3 定量检验 (MPN 法)

4.3.1 样品的稀释

固体和半固体样品: 无菌称取样品 100g、10g、1g 各三份, 分别加入 900mL、90mL、9mL 已预热至 44°C 的 BPW, 轻轻振荡使充分溶解, 制成 1:10 样品匀液, 置 36°C ±1°C 培养 (18±2) 小时。分别移取 1mL 转种于 10mL mLST-Vm 肉汤, 44°C ±0.5°C 培养 (24±2) 小时。

液体样品: 以无菌吸管分别取样品 100mL、10mL、1mL 各三份, 分别加入 900mL、90mL、9mL 已预热至 44°C 的 BPW, 轻轻振荡使充分混匀, 制成 1:10 样品匀液, 置 36°C ±1°C 培养 (18±2) 小时。分别移取 1mL 转种于 10mL mLST-Vm 肉汤, 44°C ±0.5°C 培养 (24±2) 小时。

4.3.2 分离

轻轻混匀 mLST-Vm 肉汤培养物, 各取增菌培养物 1 环, 分别划线接种于两个阪崎肠杆菌显色培养基平板, 36°C ±1°C 培养 (24±2) 小时 (或按培养基要求条件培养)。挑取至少 5 个可疑菌落, 不足 5 个时挑取全部可疑菌落, 划线接种于 TSA 平板 25°C ±1°C 培养 (48±4) 小时。

4.3.3 鉴定

自 TSA 平板上直接挑取黄色可疑菌落, 进行生化鉴定

4.3.4 结果与报告

综合菌落形态、生化特征, 根据证实为克罗诺杆菌属的阳性管数, 查 MPN 检索表 17-2, 报告每 100g(mL) 样品中克罗诺杆菌属的 MPN 值。

## 5 质量控制

5.1 实验过程中, 每次实验都要做空白对照。若空白对照平板上出现可疑菌落, 应废弃本次实验结果, 并对稀释液、吸管、平皿、培养基、实验环境等进行污染来源分析。

5.2 为了控制环境污染, 在每次检验过程中, 于检验工作台上打开两块阪崎肠杆菌显色培养基平板, 并在检验环境中暴露不少于 15 分钟, 将此平板与本批次样品同时进行培养, 以掌握检验过程中是否存在来自检验环境的污染。

5.3 培养基须符合 GB4789.28 的要求, 并对每批次的培养基划线接种标准菌株, 以观察菌落的生长特征是否正常。

## 6 操作技术要点

6.1 检验中所使用的实验耗材, 如培养基、稀释液、平皿、吸管、三角瓶等必须是完全灭菌的, 如重复使用的耗材应彻底清洗干净, 不得残留有抑菌物质。

6.2 为保证显色培养基高压灭菌的效果, 建议每瓶培养基高压灭菌时, 体积不宜超过 400mL。显色培养基灭菌冷却至适宜温度后, 应立即倒平板, 勿反复加热造成显色物质损坏。

6.3 显色培养基配制煮沸溶解时, 应避免长时间加热。

6.4 增菌培养后的 BPW 和 mLST-Vm 肉汤必须充分混匀后, 再进行下一步的操作。

6.5 mLST-Vm 要求在 44°C ±0.5°C 培养箱中培养, 也可放入恒温水浴锅培养, 其温度波动范围应 <0.5°C, 水面必须没过试管液面。

6.6 每个样品必须同时分别划线接种于两个阪崎肠杆菌显色培养基平板, 以免漏检。

## 7. 疑难解析

7.1 通常情况下, 每个平皿中培养基的体积是 15~20mL, 培养基体积的变化是否会影响检测结果?

TSA 平板需要在 25°C ±1°C 培养 (48±4) 小时, 建议培养基使用体积 20mL 左右, 以避免培养 48 小时后, 培养基干燥, 抑制菌落生长, 影响鉴定结果。

7.2 是否可以直接使用商品化的 mLST-Vm?

可以。但需注意万古霉素溶液运输过程的保存条件, 以免其生物活性降低, 甚至丧失。

7.3 不同品牌显色培养基的使用是否影响检验结果?

目前我国市场上常见显色培养基品牌较多, 质量参差不齐, 建议实验室依照 GB4789.28 的要求做好验收工作。

7.4 检测标准中 44°C 预热 BPW 的目的是什么?

主要目的是促进样品快速溶解, 保证培养基温度尽快达到培养温度。

阳性管数			MPN	95% 可信限		阳性管数			MPN	95% 可信限	
100	10	0		下限	上限	100	10	0		下限	上限
0	0	0	< 3.0	-	0.95	2	2	0	2.1	0.45	4.2
0	0	1	0.3	0.015	0.96	2	2	1	2.8	0.87	9.4
0	1	0	0.3	0.015	1.1	2	2	2	3.5	0.87	9.4
0	1	1	0.61	0.12	1.8	2	3	0	2.9	0.87	9.4
0	2	0	0.62	0.12	1.8	2	3	1	3.6	0.87	9.4
0	3	0	0.94	0.36	3.8	3	0	0	2.3	0.46	9.4
1	0	0	0.36	0.017	1.8	3	0	1	3.8	0.87	11
1	0	1	0.72	0.13	1.8	3	0	2	6.4	1.7	18
1	0	2	1.1	0.36	3.8	3	1	0	4.3	0.9	18
1	1	0	0.74	0.13	2	3	1	1	7.5	1.7	20
1	1	1	1.1	0.36	3.8	3	1	2	12	3.7	42
1	2	0	1.1	0.36	4.2	3	1	3	16	4	42
1	2	1	1.5	0.45	4.2	3	2	0	9.3	1.8	42
1	3	0	1.6	0.45	4.2	3	2	1	15	3.7	42
2	0	0	0.92	0.14	3.8	3	2	2	21	4	43
2	0	1	1.4	0.36	4.2	3	2	3	29	9	100
2	0	2	2	0.45	4.2	3	3	0	24	4.2	100
2	1	0	1.5	0.37	4.2	3	3	1	46	9	200
2	1	1	2	0.45	4.2	3	3	2	110	18	410
2	1	2	2.7	0.87	9.4	3	3	3	> 110	42	-

注 1: 本表采用 3 个检样量 [100g(mL)、10g(mL) 和 1g(mL)], 每个检样量接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1000g(mL)、100g(mL) 和 10g(mL) 时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 10g(mL)、1g(mL) 和 0.1g(mL) 时, 则表内数字应相应增高 10 倍, 其余类推。

## 附录 A

# 缓冲蛋白胨水 (BPW) 产品验证



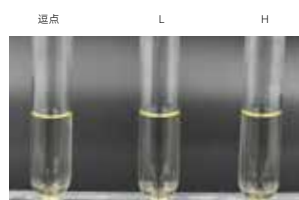
1、产品用途: 用于食品中沙门氏菌和阪崎肠杆菌的前增菌培养。

2、检验原理: 蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求; 氯化钠可维持均衡的渗透压; 磷酸二氢钾和磷酸氢二钠是缓冲剂。

表 17-3: 缓冲蛋白胨水 (BPW) 验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	菌液浓度计数 (TSA)	评定标准	结果判定
缓冲蛋白胨水 (BPW)	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	5216	64	取 10μl 增菌液倾注 TSA 平板 36°C ± 1°C 培养 18h ~ 24h, 在 TSA 上 > 100Cfu	符合
		L 品牌	1279			符合
		H 品牌	1778			符合

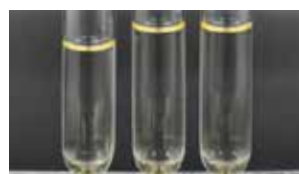
3、典型特征图片:



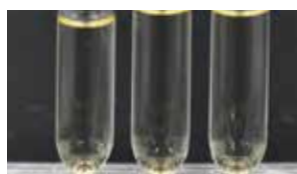
逗点 -L 品牌 -H 品牌 -BPW 空白



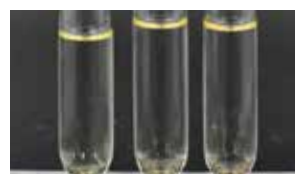
菌液计数鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



逗点 -BPW 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



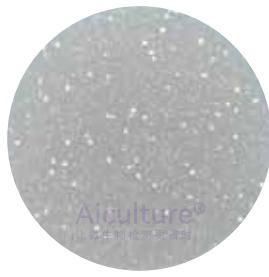
L 品牌 -BPW 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



H 品牌 -BPW 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



逗点 -BPW 增菌液计数



L 品牌 -BPW 增菌液计数



H 品牌 -BPW 增菌液计数



#### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028：逗点鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 增菌后菌落数优于 L 品牌、H 品牌；
- 4.2 感观：三家空白试管 L 品牌颜色较淡，逗点和 H 品牌颜色无显著差异。
- 4.3 逗点增菌效果优于 L 品牌和 H 品牌。

## 附录 B

# 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨 (mLST) 肉汤验证



- 1、产品用途：用于阪崎肠杆菌检验的选择性增菌培养。
- 2、检验原理：胰蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；乳糖是大肠菌群可发酵的糖类；磷酸二氢钾和磷酸氢二钾是缓冲剂；月桂基硫酸钠和万古霉素可抑制革兰氏阳性细菌的生长。

表 17-4：改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨 (mLST) 肉汤验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨 (mLST) 肉汤	阪崎肠杆菌 ATCC29544+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922+ 粪肠球菌 ATCC29212	逗点	/	15	在阪崎肠杆菌显色培养基上 > 10CFU, 绿 - 蓝色菌落	在阪崎肠杆菌显色培养基上 > 10CFU, 绿 - 蓝色菌落	符合
		L 品牌	/		在阪崎肠杆菌显色培养基上 > 10CFU, 绿 - 蓝色菌落		符合
		H 品牌	/		在阪崎肠杆菌显色培养基上 > 10CFU, 绿 - 蓝色菌落		符合
	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	0	1038	< 100CFU	在 TSA 上 < 100CFU	符合
		L 品牌	0		< 100CFU		符合
		H 品牌	0		< 100CFU		符合

1. 阪崎肠杆菌 ATCC29544+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922+ 粪肠球菌 ATCC29212 在改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨 (mLST) 肉汤上的菌落特征：在阪崎肠杆菌显色培养基上 > 10CFU, 绿 - 蓝色菌落；

2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨 (mLST) 肉汤上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；

3. 粪肠球菌 ATCC29212 在改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨 (mLST) 肉汤上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU。

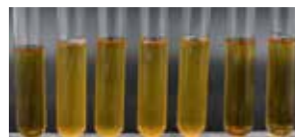
#### 3、典型特征图片：



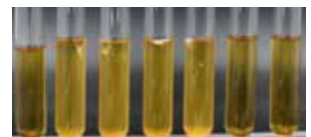
逗点 -L 品牌 -H 品牌 -mLST 空白



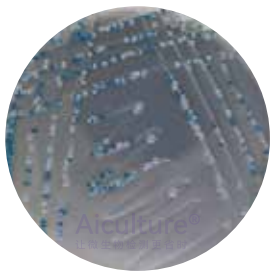
逗点 mLST- 阪崎肠杆菌 ATCC29544+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922+ 粪肠球菌 ATCC29212- 大肠埃希氏菌 ATCC25922- 粪肠球菌 ATCC29212



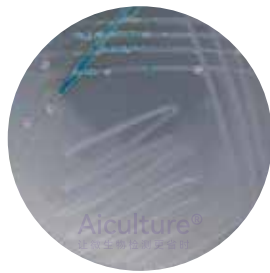
L 品牌 mLST- 阪崎肠杆菌 ATCC29544+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922+ 粪肠球菌 ATCC29212- 大肠埃希氏菌 ATCC25922- 粪肠球菌 ATCC29212



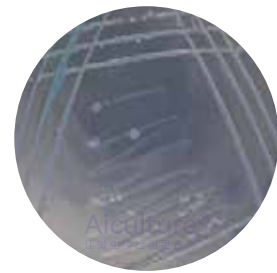
H 品牌 mLST- 阪崎肠杆菌 ATCC29544+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922+ 粪肠球菌 ATCC29212- 大肠埃希氏菌 ATCC25922- 粪肠球菌 ATCC29212



逗点 - 混菌划线阪崎肠杆菌显色培养基



L 品牌 - 混菌划线阪崎肠杆菌显色培养基



H 品牌 - 混菌划线阪崎肠杆菌显色培养基



逗点 - 粪肠球菌 ATCC29212



L 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212

图 17-4

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌阪崎肠杆菌 ATCC29544+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922+ 粪肠球菌 ATCC29212，逗点、L 品牌、H 品牌均满足在阪崎肠杆菌显色培养基上 > 10CFU 的要求，绿 - 蓝色菌落，但平板上有两种菌落形态；
- 4.2 选择性：粪肠球菌 ATCC29212，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标在 TSA 上 < 100CFU 的要求；
- 4.3 感观：逗点、L 品牌、H 品牌空白试管颜色无显著差异。

附录 C

阪崎肠杆菌显色培养基验证



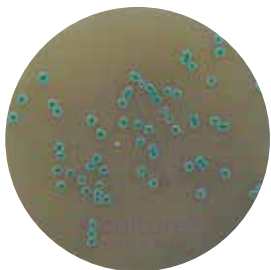
- 1、产品用途：主要用于婴儿奶粉以及其他食品中的阪崎肠杆菌的快速鉴定和计数。
- 2、检验原理：蛋白胨和牛肉膏粉提供氮源、维生素、氨基酸和碳源；胆盐抑制革兰氏阳性菌，氯化钠可维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂；硫代硫酸钠和柠檬酸铁铵用于检测硫化氢的产生；显色底物 5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶基 - $\alpha$ -D 葡萄糖苷与阪崎肠杆菌中的  $\alpha$ - 葡萄糖苷酶发生反应，水解底物，释放出 5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶基显色基团，在淡黄色平板上产生绿 - 蓝绿色的菌落。

表 17-5：阪崎肠杆菌显色培养基验证

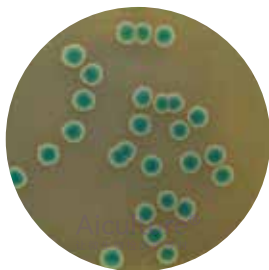
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
阪崎肠杆菌显色培养基	阪崎肠杆菌 ATCC29544	逗点	71	80	0.8	PR $\geq$ 0.5	符合
		L 品牌	40		0.5		符合
		H 品牌	46		0.5		符合
	普通变形杆菌 CMCC (B) 49027	逗点	/	/	无色菌落	无色菌落	符合
		L 品牌	/		黑色菌落	乳白色菌落，有或无白色沉淀	不符合
		H 品牌	/		黑色菌落	灰黑色菌落	符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	无色菌落	无色菌落	符合
		L 品牌	/		乳白色菌落	乳白色菌落，有或无白色沉淀	符合
		H 品牌	/		无色菌落	无色菌落	符合
	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	/	/	G=0	G $\leq$ 1	符合
		L 品牌	/		G=0		符合
		H 品牌	/		G=0		符合

- 1. 阪崎肠杆菌 ATCC29544 在阪崎肠杆菌显色培养基上的菌落特征：蓝 - 绿色菌落；
- 2. 普通变形杆菌 CMCC (B) 49027 在阪崎肠杆菌显色培养基上的菌落特征：无色菌落，灰黑色菌落；大肠埃希氏菌 ATCC25922 在阪崎肠杆菌显色培养基上的菌落特征：无色菌落；
- 3. 粪肠球菌 ATCC29212 在阪崎肠杆菌显色培养基上的菌落特征：G  $\leq$  1。

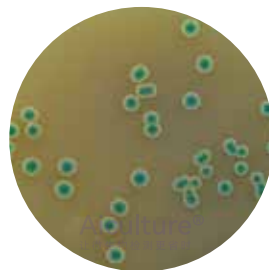
3、典型特征图片：



逗点 - 阪崎肠杆菌 ATCC29544



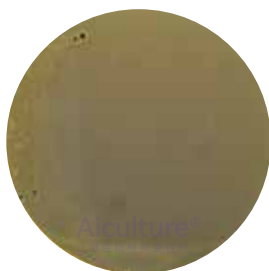
L 品牌 - 阪崎肠杆菌 ATCC29544



H 品牌 - 阪崎肠杆菌 ATCC29544



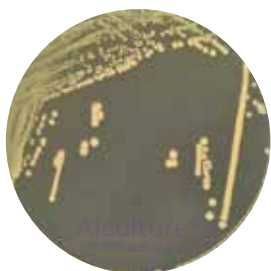
逗点 - 普通变形杆菌 CMCC (B) 49027



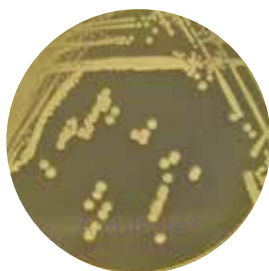
L 品牌 - 普通变形杆菌 CMCC (B) 49027



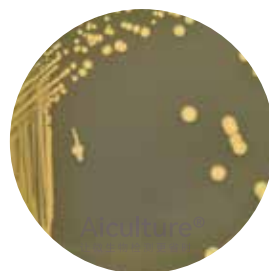
H 品牌 - 普通变形杆菌 CMCC (B) 49027



逗点 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



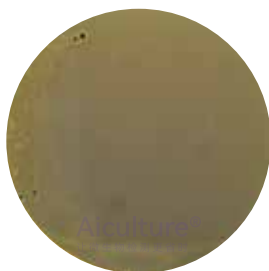
L 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



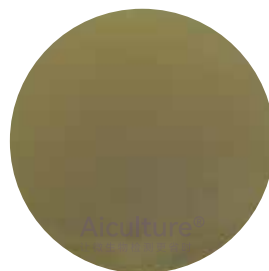
H 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点 - 粪肠球菌 ATCC29212



L 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212

图 17-5

4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌阪崎肠杆菌 ATCC29544，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $PR \geq 0.5$  的要求，菌落特征为蓝 - 绿色；

4.2 特异性：普通变形杆菌 CMCC (B) 49027，逗点菌落特征为无色菌落，L 品牌菌落特征为黑色，不符合说明书描述特征，H 品牌菌落特征为灰黑色菌落；

大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均符合菌落特征为无色菌落；

4.3 选择性：粪肠球菌 ATCC29212，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $G \leq 1$  的要求。

# 18 食品安全国家标准饮用天然矿泉水检验微生物部分 GB 8538—2022

## 一、大肠菌群定义和卫生学意义

### 1.1 概述

大肠菌群，并非细菌学上的分类命名，而是在一定培养条件下能够发酵乳糖产酸产气的需氧或兼性厌氧的革兰阴性无芽胞杆菌，主要包括埃希菌属、柠檬酸杆菌属、克雷伯菌属和肠杆菌属（又叫产气杆菌属，包括阴沟肠杆菌和产气肠杆菌）等。

多管发酵法是根据大肠菌群细菌具有的生物特性，将不同量的水样接种到含乳糖的培养基中，经培养后根据阳性反应结果可推测出原水样中大肠菌群的数量。

滤膜法则采用孔径为 0.45 $\mu\text{m}$  水相微孔薄膜，将水中所含的微生物截留在滤膜上，然后将滤膜贴在选择性鉴别培养基上，经 36 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 (24 $\pm 2$ ) 小时后，大肠菌群细菌在滤膜上长出具有特征性的菌落，直接计数典型菌落数，计算出每 100mL 水样中所含的大肠菌群数。

### 1.2 主要设备与耗材

1.2.1 培养箱 36 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 无菌滤器。

1.2.3 无菌水相滤膜直径 47mm，微孔径为 0.45  $\mu\text{m}$ 。

1.2.4 抽滤设备。

### 1.3 培养基与试剂

1.3.1 乳糖胆盐发酵培养液。

1.3.2 亮绿乳糖胆盐培养液 (BGLB)。

1.3.3 远藤 (品红亚硫酸钠) 琼脂培养基。

1.3.4 乳糖蛋白胨培养液。

1.3.5 革兰染色液。

### 1.4 检验过程

1.4.1 多管发酵法——15 管发酵法 (第一法)

1.4.1.1 多管发酵法检验程序见流程图 18-1

1.4.1.2 初发酵试验

1.4.1.2.1 吸取 10 mL 水样接种到 10 mL 双料乳糖胆盐发酵培养液中，共接种 5 份；

1.4.1.2.2 吸取 1 mL 水样接种到 10 mL 单料乳糖胆盐发酵培养液中，共接种 5 份；

1.4.1.2.3 吸取 1 mL 水样接种到 9 mL 无菌生理盐水或无菌磷酸盐缓冲液中，混匀，从中吸取 1 mL 稀释液到 10 mL 单料乳糖胆盐发酵培养液中，共接种 5 份；

1.4.1.2.4 轻摇试管 (避免小倒管中产生气泡)，使液体充分混合，置 36 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养箱内培养 24 h $\pm 2$  h。观察每管是否产气，如有气体产生则为初发酵试验阳性，如不产气则为大肠菌群阴性。

1.4.1.3 确证试验

初发酵试验阳性管中培养液充分摇匀后，取一接种环培养液，接种到 10 mL 亮绿乳糖胆盐培养液中，置 36 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 48 h $\pm 2$  h。

观察亮绿乳糖胆盐培养液中小倒管内的产气情况，如有气体产生，就可确定为大肠菌群阳性，记下产气的阳性试管数，查表 18-1 可得出水样中大肠菌群的 MPN 值；如无气体产生则为大肠菌群阴性。

1.4.1.4 MPN 值的计算

如水样含菌量少，可按 100 mL、10 mL、1 mL 接种，实际 MPN 值应为表中的 MPN 值除以 10；如水样含菌量多，可按 1 mL、0.1 mL、0.01 mL 接种，实际 MPN 值应为表中的 MPN 值乘以 10，以此类推。

1.4.1.5 列举说明

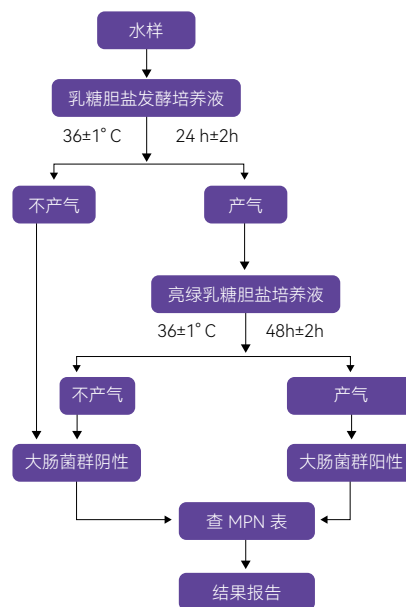
假设初发酵试验 15 支试管中的阳性管数如下：

在接种量为 10 mL 的管中有 5 支管阳性；

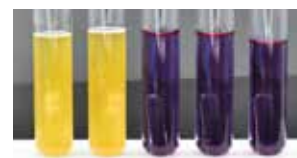
在接种量为 1 mL 的管中有 4 支管阳性；

在接种量为 0.1 mL 的管中有 2 支管阳性；

作为初发酵试验结果为 5-4-2。当把以上阳性管接种到亮绿乳糖胆盐培养液管里，经培养后，若确证试验所给的结果为 5-3-1，那么查表 18-1，可得出每 100 mL 水样中大肠菌群的 MPN 值为 110。接种量为 100 mL、10 mL、1 mL 时，MPN 值为 11；接种量为 1 mL、0.1 mL、0.01 mL 时，MPN 值为 1100。



流程图 18-1 大肠菌群多管发酵法检验程序



逗点乳糖胆盐发酵培养基 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922-金黄色葡萄球菌 ATCC6538-空白对照  
图 18-1

表 18-1：大肠菌群 15 管发酵法最可能数 (MPN) 检索表

	接种量 /mL			MPN/100mL	接种量 /mL			MPN/100mL
	10	1	0.1		10	1	0.1	
0	0	0	0	<2	0	5	3	15
0	0	0	1	2	0	5	4	17
0	0	0	2	4	0	5	5	19
0	0	0	3	5	1	0	0	2
0	0	0	4	7	1	0	1	4
0	0	0	5	9	1	0	2	6
0	1	0	0	2	1	0	3	8
0	1	1	1	4	1	0	4	10
0	1	2	2	6	1	0	5	12
0	1	3	3	7	1	1	0	4
0	1	4	4	9	1	1	1	6
0	1	5	5	11	1	1	2	8
0	2	0	0	4	1	1	3	10
0	2	1	1	6	1	1	4	12
0	2	2	2	7	1	1	5	14
0	2	3	3	9	1	2	0	6
0	2	4	4	11	1	2	1	8
0	2	5	5	13	1	2	2	10
0	3	0	0	6	1	2	3	12
0	3	1	1	7	1	2	4	15
0	3	2	2	9	1	2	5	17
0	3	3	3	11	1	3	0	8
0	3	4	4	13	1	3	1	10
0	3	5	5	15	1	3	2	12
0	4	0	0	8	1	3	3	15
0	4	1	1	9	1	3	4	17
0	4	2	2	11	1	3	5	19
0	4	3	3	13	1	4	0	11
0	4	4	4	15	1	4	1	13
0	4	5	5	17	1	4	2	15
0	5	0	0	9	1	4	3	17
0	5	1	1	11	1	4	4	19
0	5	2	2	13	1	4	5	22
1	5	0	0	13	2	5	2	23
1	5	1	1	15	2	5	3	26
1	5	2	2	17	2	5	4	29
1	5	3	3	19	2	5	5	32
1	5	4	4	22	3	0	0	8
1	5	5	5	24	3	0	1	11
2	0	0	0	5	3	0	2	13
2	0	1	1	7	3	0	3	16
2	0	2	2	9	3	0	4	20
2	0	3	3	12	3	0	5	23
2	0	4	4	14	3	1	0	11
2	0	5	5	16	3	1	1	14
2	1	0	0	7	3	1	2	17
2	1	1	1	9	3	1	3	20
2	1	2	2	12	3	1	4	23
2	1	3	3	14	3	1	5	27
2	1	4	4	17	3	2	0	14
2	1	5	5	19	3	2	1	17
2	2	0	0	9	3	2	2	20
2	2	1	1	12	3	2	3	24
2	2	2	2	14	3	2	4	27
2	2	3	3	17	3	2	5	31
2	2	4	4	19	3	3	0	17
2	2	5	5	22	3	3	1	21
2	3	0	0	12	3	3	2	24
2	3	1	1	14	3	3	3	28
2	3	2	2	17	3	3	4	32
2	3	3	3	20	3	3	5	36
2	3	4	4	22	3	4	0	21
2	3	5	5	25	3	4	1	24
2	4	0	0	15	3	4	2	28
2	4	1	1	17	3	4	3	32
2	4	2	2	20	3	4	4	36
2	4	3	3	23	3	4	5	40
2	4	4	4	25	3	5	0	25
2	4	5	5	28	3	5	1	29
2	5	0	0	17	3	5	2	32
2	5	1	1	20	3	5	3	37
3	5	4	4	41	4	5	5	81
3	5	5	5	45	5	0	0	23
4	0	0	0	13	5	0	1	31
4	0	1	1	17	5	0	2	43
4	0	2	2	21	5	0	3	58
4	0	3	3	25	5	0	4	76
4	0	4	4	30	5	0	5	95
4	0	5	5	36	5	1	0	33
4	1	0	0	17	5	1	1	46
4	1	1	1	21	5	1	2	63
4	1	2	2	26	5	1	3	84
4	1	3	3	31	5	1	4	110
4	1	5	5	42	5	1	5	130

表 18-1 续

	接种量 /mL			MPN/100mL	接种量 /mL			MPN/100mL
	10	1	0.1		10	1	0.1	
4	2	0		22	5	2	0	49
4	2	1		26	5	2	1	70
4	2	2		32	5	2	2	94
4	1	4		36	5	2	3	120
4	2	3		38	5	2	4	150
4	2	4		44	5	2	5	180
4	2	5		50	5	3	0	79
4	3	0		27	5	3	1	110
4	3	1		33	5	3	2	140
4	3	2		39	5	3	3	180
4	3	3		45	5	3	4	210
4	3	4		56	5	3	5	250
4	3	5		59	5	4	0	130
4	4	0		34	5	4	1	170
4	4	1		40	5	4	2	220
4	4	2		47	5	4	3	280
4	4	3		54	5	4	4	350
4	4	4		62	5	4	5	430
4	4	5		69	5	5	0	240
4	5	0		41	5	5	1	350
4	5	1		48	5	5	2	540
4	5	2		56	5	5	3	920
4	5	3		64	5	5	4	1600
4	5	4		72	5	5	5	>1600

1.4.2 6管发酵法(第二法)

1.4.2.1 初发酵试验

1.4.2.1.1 吸取 50 mL 水样接种到 50 mL 双料乳糖胆盐发酵培养液中, 共接种 1 份;

1.4.2.1.2 吸取 10 mL 水样接种到 10 mL 双料乳糖胆盐发酵培养液中, 共接种 5 份;

1.4.2.1.3 置 36°C ±1°C 培养箱中培养 24 h ± 2 h, 观察每支管的产气情况, 如有气体产生, 则认为初发酵试验阳性。

1.4.2.2 确证试验

操作步骤同 15 管发酵法(第一法)。

1.4.2.3 MPN 值的计算

当经过确证试验后, 1 管 50 mL 水样和 5 管 10 mL 水样结果中, 阳性反应的管数对应的 MPN 值及其 95% 的可信限范围见表 18-2。

表 18-2: 大肠菌群 6 管发酵法最可能数 (MPN) 检索表

阳性反应管数		MPN/100 mL	95% 可信限	
1 × 50 mL	5 × 10 mL		下限	上限
0	0	<1	-	-
0	1	1	0.5	4
0	2	2	0.5	6
0	3	4	0.5	11
0	4	5	1	13
0	5	7	2	17
1	0	2	0.5	6
1	1	3	0.5	9
1	2	6	1	15
1	3	9	2	21
1	4	16	4	40
1	5	>18	-	-

1.4.3 结果与报告

根据确证试验证实的乳糖胆盐发酵管反应阳性管数, 检索方法对应的 MPN 表(表 18-1 或表 18-2), 报告每 100 mL 样品中大肠菌群的 MPN 值, 以 MPN/100 mL 表示。当所有接种水样的乳糖胆盐发酵管均为阴性反应, 可报告 100 mL 水样中未检出大肠菌群。

1.4.4 滤膜法

1.4.4.1 大肠菌群滤膜法检验程序见流程图 18-2

1.4.4.2 操作步骤

1.4.4.2.1 水样过滤

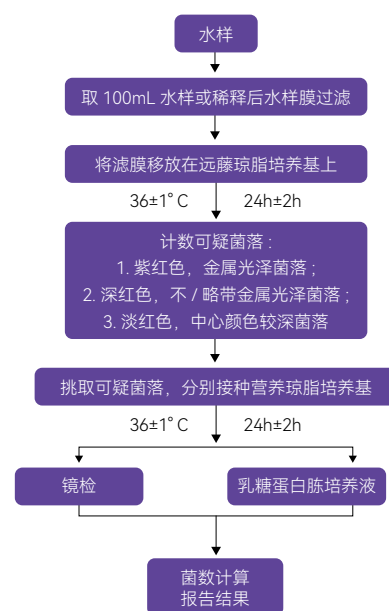
用无菌镊子夹取无菌滤膜边缘部分, 贴在已灭菌的滤头上, 固定好过滤器, 将 100 mL 水样或稀释后的水样(用无菌生理盐水或无菌磷酸盐缓冲液稀释)通过孔径 0.45 μm 的滤膜过滤。

1.4.4.2.2 培养

将过滤后的滤膜贴在远藤琼脂培养基平板上, 滤膜截留细菌面向上, 平铺并避免在滤膜和培养基之间夹留着气泡。然后将平板倒置, 36°C ±1°C 培养 24 h ± 2 h。

1.4.4.2.3 结果观察与计数

观察滤膜上面的菌落特征, 并计数可疑菌落。大肠菌群典型菌落在远藤琼脂培养基上具有以下特征之一:



流程图 18-2 大肠菌群滤膜法检验程序

a) 紫红色，具有金属光泽；b) 深红色，不带或略带金属光泽；c) 淡红色，中心颜色较深。

#### 1.4.4.2.4 确证试验

1.4.4.2.4.1 按比例挑取 10 个不同形态的可疑菌落（不足 10 个则全挑），分别接种到营养琼脂培养基平板上，36℃ ±1℃培养 24 h±2 h。

1.4.4.2.4.2 从营养琼脂培养基平板上挑取单菌落进行革兰氏染色镜检观察；同时接种乳糖蛋白胨培养液，经 36℃ ±1℃培养 24 h±2 h。可疑菌落为革兰氏阴性无芽孢杆菌，使接种的乳糖蛋白胨培养液变黄并产气，则判定为大肠菌群阳性。

#### 1.4.4.3 结果与报告

大肠菌群菌落数按下式计算，报告每 100 mL 水样中的大肠菌群菌数，以 CFU/100 mL 表示；当 d 值为 1，且 T 值为 0 时，可报告 100 mL 水样中未检出大肠菌群：

式中：

T — 每 100 mL 水样中大肠菌群的菌落数；

A — 某一稀释度可疑菌落的总数；

B — 某一稀释度确证为阳性的菌落数；

C — 某一稀释度用于确证性试验的菌落数；

d — 稀释因子。

$$T = \frac{AB}{Cd}$$

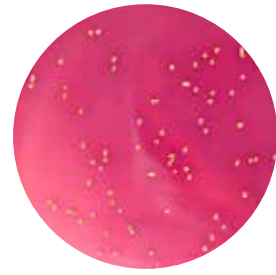


图 18-2

## 二、粪链球菌

### 2.1 概述

粪链球菌是属于肠球菌属的种，为兼性厌氧的革兰阳性球菌。将 250mL 水样用孔径为 0.45μm 的滤膜过滤，并将滤膜移至 KF 链球菌琼脂培养基上，于 36℃ ±1℃恒温箱中培养 (48±2) 小时，如果有红色或粉红色菌落生长，并经革兰染色、过氧化氢酶反应、脑心浸液液态培养基生长试验和胆汁液态培养基生长试验确认后，实现粪链球菌的检测。

### 2.2 主要设备与耗材

2.2.1 培养箱 36℃ ±1℃、45℃ ±1℃。

2.2.2 无菌滤器。

2.2.3 无菌水相滤膜直径 47mm，微孔径为 0.45μm。

2.2.4 抽滤设备。

### 2.3 培养基与试剂

2.3.1 KF 链球菌琼脂培养基。

2.3.2 脑心浸液液态培养基。

2.3.3 脑心浸液琼脂培养基。

2.3.4 胆汁液态培养基。

2.3.5 3% 过氧化氢溶液。

2.3.6 革兰染色液。

### 2.4 检验过程

2.4.1 检验程序 粪链球菌检验程序，见流程图 18-3

#### 2.4.2 检验步骤

##### 2.4.2.1 水样过滤

用无菌镊子夹取灭菌滤膜边缘部分，将粗糙面向上，贴放在已灭菌的滤床上，固定好滤器。将 250mL 水样或稀释液（水样中菌含量高时，根据水质污染情况确定水样的稀释倍数，滤膜上能产生 20~100 个菌落为宜）通过孔径 0.45μm 的滤膜过滤。

##### 2.4.2.2 培养

用无菌镊子夹取滤膜边缘部分，转移到 KF 链球菌琼脂培养基上，将培养皿倒置，在 36℃ ±1℃培养 (48±2) 小时。

##### 2.4.2.3 结果观察与计数

粪链球菌菌落在滤膜上呈现大小不等的红色或粉红色菌落。根据菌落特征符合情况计数每 250mL 水样中的典型菌落数。

##### 2.4.2.4 确证性试验

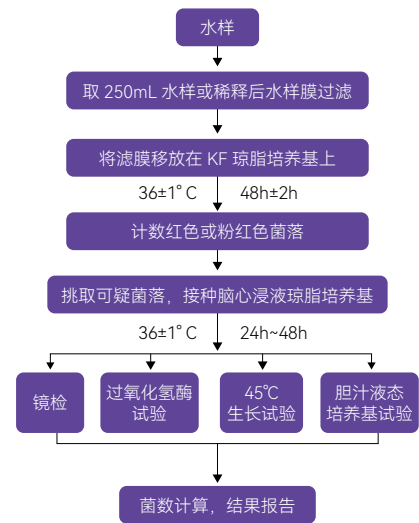
从滤膜上挑取不少于 10 个（不足 10 个则全挑）可疑菌落，进行革兰染色。镜检观察，粪链球菌应为革兰染色阳性球菌，常排列成短链状。同时接种到脑心浸液琼脂培养基斜面上，在 36℃ ±1℃培养 24~48 小时。如果有菌落生长，则继续按以下步骤进行。

2.4.2.4.1 用接种环从脑心浸液琼脂培养基斜面上挑取典型培养物到一片清洁的载玻片上，加几滴新鲜配制的 3% 过氧化氢到载玻片的涂抹菌苔上，如果没有气泡产生，就显示过氧化氢酶反应为阴性，则菌落可视为可疑粪链球菌，需继续步骤 2.4.2.4.2 的确证过程。如果有气泡产生，则过氧化氢酶反应为阳性，则菌落不属于粪链球菌。

2.4.2.4.2 用接种环从脑心浸液琼脂培养基上转移一环培养物到脑心浸液液态培养基内，45℃ ±1℃培养 (48±2) 小时。同时转移一环培养物到胆汁液态培养基中，在 36℃ ±1℃培养 3 天。若均能够生长繁殖，则结果表示为阳性，证实为粪链球菌。

##### 2.4.2.5 结果与报告

滤膜上的粪链球菌菌落数按下式计算，以每 250mL 水样中的粪链球菌数报告结果：



流程图 18-3 粪链球菌检验程序

式中：

- T— 每 250 mL 水中粪链球菌的菌落数；
- A— 某一稀释度可疑菌落的总数；
- B— 某一稀释度确证为阳性的菌落数；
- C— 某一稀释度用于确证性试验的菌落数；
- d— 稀释因子。

$$T = \frac{AB}{Cd}$$

### 2.4.3 质量控制

实验室应根据需要设置阳性对照、阴性对照和空白对照，定期对检验过程进行质量控制。宜选用粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 标准菌株 [CMCC(B)32482 或等效标准菌株] 作为阳性对照菌株，以大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 标准菌株 [CMCC(B)43201 或等效标准菌株] 作为阴性对照菌株。

## 三、铜绿假单胞菌

### 3.1 概述

铜绿假单胞菌，又称绿脓杆菌，是专性需氧的革兰阴性无芽胞杆菌。一定培养条件下，能够产生绿脓菌素、青脓菌素或红脓菌素三种水溶性色素。

检测时采用孔径为 0.45 μm 亲水性微孔滤膜，将水中所含的细菌截留在滤膜上，然后将滤膜移至 CN 琼脂培养基上，36°C ±1°C 培养 20 h ~ 48 h。菌落在 CN 琼脂上产绿脓菌素并呈蓝色或绿色；菌落在 CN 琼脂上呈非蓝色且非绿色，但发荧光，并能够利用乙酰胺产氨，42°C 生长；菌落在 CN 琼脂上呈红褐色不发荧光，但在金氏 B 培养基上生长发荧光，氧化酶反应阳性，能够利用乙酰胺产氨。符合上述三类现象之一均可确证为铜绿假单胞菌，报告每 250 mL 水样中铜绿假单胞菌数。

### 3.2 主要设备与耗材

3.2.1 培养箱 36°C ±1°C。

3.2.2 紫外灯波长 360nm±20nm。

3.2.3 无菌滤器。

3.2.4 无菌水相滤膜直径 47mm，微孔径为 0.45μm。

3.2.5 抽滤设备。

### 3.3 培养试剂

3.3.1 假单胞菌琼脂基础培养基 /CN 琼脂。

3.3.2 金氏 B 培养基。

3.3.3 乙酰胺液体培养基。

3.3.4 绿脓菌素测定培养基。

3.3.5 营养琼脂。

3.3.6 氧化酶试剂。

3.3.7 钠氏试剂。

### 3.4 检验过程

3.4.1 铜绿假单胞菌检验程序，见流程图 18-4

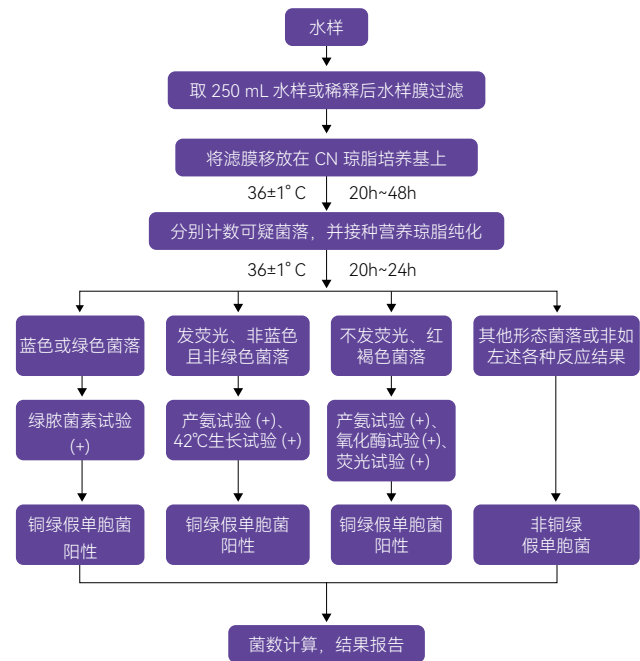
### 3.4.2 检验步骤

#### 3.4.2.1 水样过滤

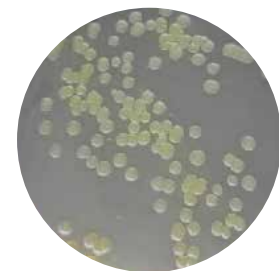
用无菌镊子夹取灭菌滤膜边缘部分，将粗糙面向上，贴放在已灭菌的滤架上，固定好滤器。将 250mL 水样或稀释液（水样中菌含量高时，根据水质污染情况确定水样的稀释倍数）通过孔径 0.45μm 的滤膜过滤。

#### 3.4.2.2 培养

用灭菌镊子夹取滤膜边缘部分，转移到 CN 琼脂培养基上，将平板倒置于 36°C ±1°C 培养 20~48 小时，并防止干燥。



流程图 18-4 铜绿假单胞菌检验程序



逗点假单胞菌琼脂基础培养基 (CN 琼脂) - 铜绿假单胞菌 ATCC27853  
图 18-3

表 18-3 在 CN 琼脂上生长的菌落选择和确证

CN 琼脂上生长的菌落形态	绿脓菌素试验	产氨试验	42 °C 生长试验	氧化酶试验	金氏 B 培养基产荧光试验	判定为铜绿假单胞菌
蓝色或绿色	+	NT <sup>a</sup>	NT	NT	NT	是
发荧光、非蓝色且非绿色	NT	+	+	NT	NT	是
不发荧光、红褐色	NT	+	NT	+	+	是
不发荧光、其他颜色	NT	NT	NT	NT	NT	否

<sup>a</sup>NT 表示不用试验。

#### 3.4.2.3 菌落计数

在培养 20~24h 和 40~48h 后观察滤膜上菌落的生长情况，并计数典型菌落特征如图 18-3 所示：

3.4.2.3.1 对所有显蓝色或绿色的菌落进行计数，并进行绿脓菌素确证性试验。

3.4.2.3.2 在紫外灯下检查并计数滤膜上所有发荧光且不产绿脓菌素的菌落，并进行乙酰胺肉汤确证性试验。

3.4.2.3.3 将其它所有红褐色不发荧光的菌落进行氧化酶试验、乙酰胺产氨试验和金氏 B 培养基产荧光试验，进行确证。

3.4.2.3.4 若滤膜上的菌落无上述三种现象的则判定为非铜绿假单胞菌。

#### 3.4.2.4 确证性试验

尽可能将所有经滤膜过滤后，在 36℃ ±1℃培养 20~24 小时，将需确证的可疑菌落划线接种营养琼脂培养基，于 36℃ ±1℃培养 20~24 小时。检查再次纯化的菌落。

根据 3.4.2.3 菌落特征观察结果进行相应的确证性试验。

#### 3.4.2.4.1 42℃生长试验

将 3.4.2.3 中在 CN 琼脂上发荧光、非蓝色且非绿色菌落的纯培养物接种营养琼脂平板上，42℃ ± 1℃ 培养 24 h~48 h，能生长的为阳性结果，否则为阴性。

#### 3.4.2.4.2 氧化酶试验

取 2~3 滴新鲜配制的氧化酶试剂滴到放于平皿里的洁净滤纸上，用铂金丝接种环或玻璃棒，将适量的纯种培养物涂布在预备好的滤纸上，在 10 秒内显深蓝紫色的视为阳性反应。

#### 3.4.2.4.3 金氏 B 培养基产荧光试验

将上述呈红褐色的且氧化酶反应呈阳性的培养物接种于金氏 B 培养基上，于 36℃ ±1℃恒温箱培养 1~5 天。每天需取出在紫外灯下检查其是否产生荧光将 5 天内产生荧光的菌落记录为阳性。

#### 3.4.2.4.4 绿脓菌素试验

取可疑菌落 2~3 个，分别接种在绿脓菌素测定培养基上，置 36℃ ±1℃培养 (24±2) 小时，加入三氯甲烷 3~5mL，充分振荡使培养物中的绿脓菌素溶解于三氯甲烷液内，待三氯甲烷提取液呈蓝色时，用吸管将三氯甲烷移到另一试管中并加入 1mol/L 的盐酸 1mL 左右，振荡后，静置片刻。如上层盐酸液内出现粉红色到紫红色视为阳性，表示被检物中有绿脓菌素存在。

#### 3.4.2.4.5 乙酰胺产氨试验

将纯培养物接种到装有乙酰胺液体培养基的试管中，在 36℃ ±1℃下培养 20~24 小时。然后向每支试管培养物加入 1~2 滴纳氏试剂，检查各试管的产氨情况，如表现出从深黄色到砖红色的颜色变化，则为阳性结果，否则为阴性。

#### 3.4.2.5 结果与报告

铜绿假单胞菌菌落数按式 (1) 进行计算，报告每 250mL 水样中的铜绿假单胞菌数，以 CFU/250mL 表示；当 d 值为 1，且 N 值为 0 时，可报告 250mL 水样中未检出铜绿假单胞菌：

式 (1) 中：

N—每 250mL 水样中铜绿假单胞菌的菌落数；

P—蓝色和绿色的菌落数；

°P—绿脓菌素试验阳性的菌落数；

°P—进行绿脓菌素试验的蓝色和绿色菌落数；

F—发荧光、非蓝色且非绿色的菌落数；

°F—产氨阳性和 42℃生长的菌落数；

°F—进行产氨和 42℃生长试验的发荧光、非蓝色且非绿色的菌落数；

R—不发荧光、红褐色的菌落数；

°R—产氨、氧化酶、金氏 B 培养基上产荧光试验均呈阳性的菌落数；

°R—进行产氨、氧化酶、金氏 B 培养基上产荧光试验的不发荧光、红褐色菌落数；

d—稀释因子。

$$N = \frac{P_{cp}}{npd} + \frac{F_{CF}}{n_F d} + \frac{R_{CR}}{n_R d}$$

#### 质量控制

实验室应根据需要设置阳性对照、阴性对照和空白对照，定期对检验过程进行质量控制。宜选用铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 标准菌株 [CMCC(B)10282 或等效标准菌株] 作为阳性对照菌株，恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 标准菌株 [CMCC(B)10283 或等效标准菌株] 作为阴性对照菌株。

## 四、产气荚膜梭菌

### 4.1 概述

产气荚膜梭菌是一类革兰阳性，粗大芽胞杆菌，属非专性厌氧菌。检测时取 50mL 的水样用孔径为 0.45μm 的滤膜过滤，然后将滤膜移至 TSC 琼脂培养基上，倒置于 36℃ ±1℃厌氧培养 (24±2) 小时，计数黑色菌落，任意挑取 3~5 个在滤膜上生长的黑色菌落，分别接种 FT 培养基，于 36℃ ±1℃培养 24±2 小时后，将培养物做确证试验，根据试验结果确证产气荚膜梭菌的存在。

### 4.2 主要设备与耗材

4.2.1 培养箱 36℃ ±1℃。

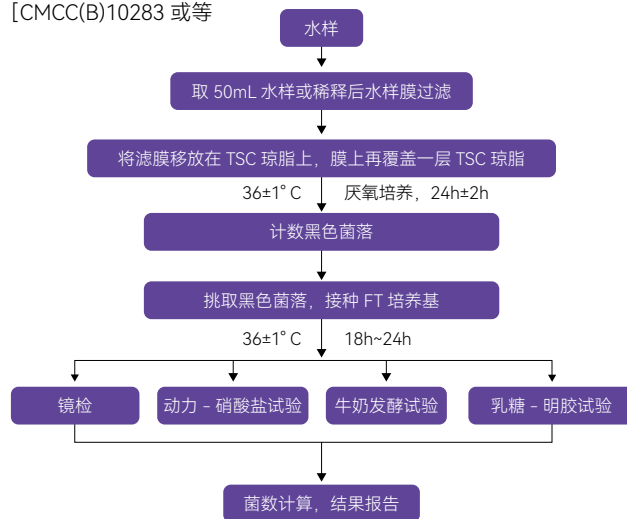
4.2.2 厌氧培养装置。

4.2.3 无菌滤器。

4.2.4 无菌水相滤膜直径 47mm，微孔径为 0.45μm。

4.2.5 抽滤设备。

4.3 培养试剂



流程图 18-5 产气荚膜梭菌检验程序

4.3.1 胰胨 - 亚硫酸盐 - 环丝氨酸 (tryptose-sulfite- cycloserine,TSC) 琼脂。

4.3.2 液体硫乙醇酸盐培养基 (FT)。

4.3.3 动力 - 硝酸盐培养基。

4.3.4 含铁牛奶培养基。

4.3.5 乳糖 - 明胶培养基。

4.3.6 0.1% 蛋白胨水。

4.3.7 硝酸盐还原试剂。

4.3.8 革兰染色液。

4.4 检验过程

4.4.1 检验程序产气荚膜梭菌检验程序, 见流程图 18-5

4.4.2 检验步骤

4.4.2.1 过滤水样

用无菌镊子夹取灭菌滤膜边缘部分, 将粗糙面向上, 贴放在已灭菌的滤床上, 固定好滤器, 将 50mL 水样 (如水样含菌数较多, 可用 0.1% 蛋白胨水将水样按比例稀释后进行检测) 通过孔径 0.45 $\mu$ m 的滤膜过滤。

4.4.2.2 培养

用无菌镊子夹取滤膜边缘部分, 移放在 TSC 琼脂培养基上, 倾注 5 mL~10 mL, 冷却至 50 $^{\circ}$ C 的 TSC 琼脂均匀覆盖滤膜表面, 倒置于厌氧培养装置内, 于 36 $^{\circ}$ C  $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 厌氧培养 (24 $\pm$ 2) 小时。

4. 硝酸盐还原阳性

4.4.2.3 菌落计数

计数滤膜上的黑色菌落数。

4.4.2.4 确证性试验

按比例挑取 10 个不同形态的可疑菌落 (不足 10 个则全挑), 分别接种 FT 培养基, 于 36 $^{\circ}$ C  $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 培养 18~24 小时。

4.4.2.4.1 用上述培养液涂片, 革兰染色镜检。产气荚膜梭菌为革兰阳性粗大杆菌, 其耐热菌株可能形成卵形芽胞, 位于菌体中央或近端, 其宽度一般不大于菌体。

4.4.2.4.2 用接种针穿刺接种缓冲动力 - 硝酸盐培养基, 36 $^{\circ}$ C  $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 厌氧培养 24 h $\pm$ 2h, 观察穿刺线的生长情况, 判断有无动力。有动力的菌株沿穿刺线呈扩散生长, 无动力的菌株只沿穿刺线生长。然后, 滴加硝酸盐还原试剂甲液 0.5mL 和硝酸盐还原试剂乙液 0.2 mL, 观察硝酸盐是否被还原。15 min 内出现红色者, 表明硝酸盐被还原为亚硝酸盐; 如果不出现颜色变化, 则加少许锌粉, 放置 10 min, 出现红色者, 表明该菌株不能还原硝酸盐。产气荚膜梭菌无动力, 能将硝酸盐还原为亚硝酸盐。

4.4.2.4.3 取生长旺盛的 FT 培养液 1mL 接种于含铁牛奶培养基, 在 46 $^{\circ}$ C  $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C 水浴中培养 2 小时后观察有无“暴烈发酵”现象发生, 在 5 小时内不发酵者为阴性。产气荚膜梭菌能发酵乳糖, 凝固酪蛋白并大量产气, 呈“暴烈发酵”现象, 但培养基不变黑。

4.4.2.4.4 用接种环 (针) 取 FT 培养液穿刺或用无菌吸管移取 0.2mL FT 培养液接种乳糖 - 明胶培养基, 于 36 $^{\circ}$ C  $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 厌氧培养 24 h $\pm$ 2 h, 观察结果。如发现产气和培养基由红变黄, 表明乳糖被发酵并产酸。将该含乳糖 - 明胶培养基的试管于 5 $^{\circ}$ C  $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 放置 1h, 检查明胶液化情况。如果培养基是固态。于 36 $^{\circ}$ C  $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 再厌氧培养 24 h $\pm$ 2h, 重复检查明胶是否液化。产气荚膜梭菌能发酵乳糖, 使明胶液化。

4.4.2.5 结果与报告

根据黑色菌落的计数和确证性试验的结果, 按下式计算每 50mL 水样中的产气荚膜梭菌数量, 结果以 CFU/50mL 计。; 当 d 值为 1, 且 T 值为 0 时, 可报告 50mL 水样中未检出产气荚膜梭菌:

式中:

T—每 50mL 水中产气荚膜梭菌的菌落数;

A—某一稀释度可疑菌落的总数;

B—某一稀释度确证为阳性的菌落数;

C—某一稀释度用于确证性试验的菌落数;

d—稀释因子。

$$T = \frac{AB}{Cd}$$

质量控制

实验室应根据需要设置阳性对照、阴性对照和空白对照, 定期对检验过程进行质量控制。宜选用产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 标准菌株 [CMCC (B) 64602 或等效标准菌株] 作为阳性对照菌株, 以艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 标准菌株 [CMCC (B) 64967 或等效标准菌株] 作为阴性对照菌株。

## 五、检验注意事项

5.1 膜过滤方法检测微生物时, 滤膜截留细菌面向上, 滤膜应与培养基完全贴紧, 两者间不得留有气泡。

5.2 采用膜过滤法时应在水样滤完后, 再抽滤约 5 秒, 去除滤膜表面多余水分。

5.3 配制好的远藤 (品红亚硫酸钠) 琼脂平板不可放置太久, 2~8 $^{\circ}$ C 冰箱内保存不宜超过 2 周, 如培养基已由淡粉色变成深红色, 则不能再用。

5.4 铜绿假单胞菌污染严重或培养时间过长时, 菌落可能蔓延而影响计数。应培养 20~24 小时先观察结果、计数, 防止因为培养 40~48 小时导致菌落过分生长而出现菌落融合。

5.5 铜绿假单胞菌检测时, 培养过程应注意保湿, 防止干燥, 有利于目标菌的典型菌落特征的形成。

5.6 乙酰胺产氨试验中, 加入钠氏试剂后, 应尽快观察结果, 一般宜在反应后 10 秒内观察完毕, 否则容易出现假阳性结果。

5.7 乙酰胺产氨试验中, 乙酰胺具有刺激性, 钠氏试剂含汞, 汞为危险品, 注意使用安全。

5.8 TSC 琼脂培养基上除了黑色菌落, 生长的灰色和接近棕黄色的菌落也应该进行产气荚膜梭菌确证性试验。

5.9 产气荚膜梭菌检验过程中, 当硝酸盐还原试验结果阴性时, 可再加少许锌粉, 放置 10 分钟, 出现红色者, 确证该菌株不能还原硝酸盐。

5.10 检验过程中应注意质量控制，粪链球菌检验及计数过程中应以粪链球菌标准菌株作为阳性对照菌株，以大肠埃希菌标准菌株作为阴性对照菌株；铜绿假单胞菌检验及计数过程中应以铜绿假单胞菌标准菌株作为阳性对照菌株，以荧光假单胞菌标准菌株作为阴性对照菌株；产气荚膜梭菌试验过程中可以用产气荚膜梭菌标准菌株作为阳性对照，用绝对厌氧菌标准菌株作为阴性对照。

## 六、疑难解析

天然饮用矿泉水中微生物检测时，涉及的几种主要培养基原理总结。

### 6.1 远藤（品红亚硫酸钠）琼脂培养基

亚硫酸钠及品红可抑制革兰阳性菌，大肠菌群内的菌代谢乳糖产生醛（乙醛）和酸类物质，醛可使品红亚硫酸盐复合物分解，释放品红使菌落呈红色。快速发酵乳糖的细菌其菌落还可见金属光泽，这是由于反应急速致使局部品红浓度过高结晶所致。

### 6.2 KF 链球菌琼脂培养基

叠氮化钠是选择性的抑制剂，可以抑制非粪链球菌类的其他大部分细菌。链球菌在该培养基上生长时，还原 TTC 使得菌落着色变红；同时利用麦芽糖和乳糖产酸使得酸碱指示剂颜色发生变化，从而使培养基的颜色由紫色变成黄色。

### 6.3 假单胞菌 CN 琼脂培养基

硫酸钾和氯化镁可促进绿脓色素的产生。溴化十六烷基三甲基铵属阳离子表面活性剂，有强选择性，可抑制大肠杆菌生长，并使革兰阳性菌生长变差。萘啶酮酸抑制除假单胞菌外的其他革兰阴性菌。

### 6.4 胰胨-亚硫酸盐-环丝氨酸 (TSC) 琼脂

胰胨-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂 TSC 检验原理：胰蛋白胨、大豆蛋白胨和酵母膏粉提供碳氮源、维生素和生长因子；葡萄糖和乳糖为可发酵糖类提供碳源；偏亚硫酸氢钠和柠檬酸铁铵用于检测硫化氢的产生，使菌落中心呈黑色；卵黄含有卵磷脂，可检测某些含卵磷脂酶的梭菌；琼脂是培养基的凝固剂；D-环丝氨酸抑制非梭菌的细菌。

## 附录 A

# 乳糖胆盐发酵培养基验证



- 1、产品用途：用于多管发酵法测定食品、药品、纯净水和一次性使用卫生用品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌。
- 2、检验原理：胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求；牛胆盐可抑制革兰氏阳性细菌的生长；乳糖是大肠菌群可发酵的糖类；溴甲酚紫是 pH 指示剂，酸性呈黄色，碱性呈紫色。

表 18-4：乳糖胆盐发酵培养基验证

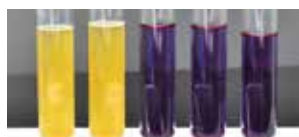
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
乳糖胆盐发酵培养基	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	95	混浊度 2，且气体充满管内 1/3	混浊度 2，产酸产气且混浊	符合
		L 品牌	/		混浊度 2，且气体充满管内 1/3		符合
		H 品牌	/		混浊度 2，且气体充满管内 1/3		符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	1392	混浊度 0 (不生长)	混浊度 0，澄清不产气	符合
		L 品牌	/		混浊度 0 (不生长)		符合
		H 品牌	/		混浊度 0 (不生长)		符合

1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在乳糖胆盐发酵培养基上的菌落特征：混浊度 2，产酸产气且混浊；
2. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在乳糖胆盐发酵培养基上的菌落特征：混浊度 0，澄清不产气。

### 4、典型特征图片：



逗点-L 品牌-H 品牌-乳糖胆盐发酵培养基空白



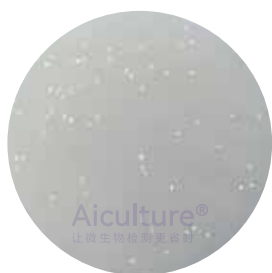
逗点乳糖胆盐发酵培养基-大肠埃希氏菌 ATCC25922-金黄色葡萄球菌 ATCC6538-空白对照



L 品牌乳糖胆盐发酵培养基-大肠埃希氏菌 ATCC25922-金黄色葡萄球菌 ATCC6538-空白对照



H 品牌乳糖胆盐发酵培养基-大肠埃希氏菌 ATCC25922-金黄色葡萄球菌 ATCC6538-空白对照



菌液计数-大肠埃希氏菌 ATCC25922



菌液计数-金黄色葡萄球菌 ATCC6538

图 18-4

### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均满足混浊度 2，且气体充满管内 1/3，产酸产气且混浊的要求；
- 4.2 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均满足混浊度 0，澄清不产气的要求；
- 4.3 感观：逗点、L 品牌、H 品牌空白肉汤颜色无显著差异。

## 附录 B

# 亮绿乳糖胆盐培养液



- 1、产品用途：用于多管发酵法测定饮用矿泉水中大肠菌群的确证试验。
- 2、检验原理：蛋白胨提供碳氮源；乳糖是可发酵的糖类；牛胆盐和亮绿抑制非肠杆菌科细菌。

表 18-5：亮绿乳糖胆盐培养液验证数据

样品名称	质控菌株	厂家	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
亮绿乳糖胆盐培养液	大肠埃希氏菌 ATCC 25922	逗点	93	浑浊产气	浑浊产气	符合
		L 品牌				符合
		H 品牌				符合
	弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864	逗点	82	浑浊产气	浑浊产气	符合
		L 品牌				符合
		H 品牌				符合
	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	1864	浑浊不产气	浑浊不产气	符合
		L 品牌				符合
		H 品牌				符合
	粪肠球菌 ATCC 29212	逗点	3537	抑制	抑制	符合
		L 品牌				符合
		H 品牌				符合

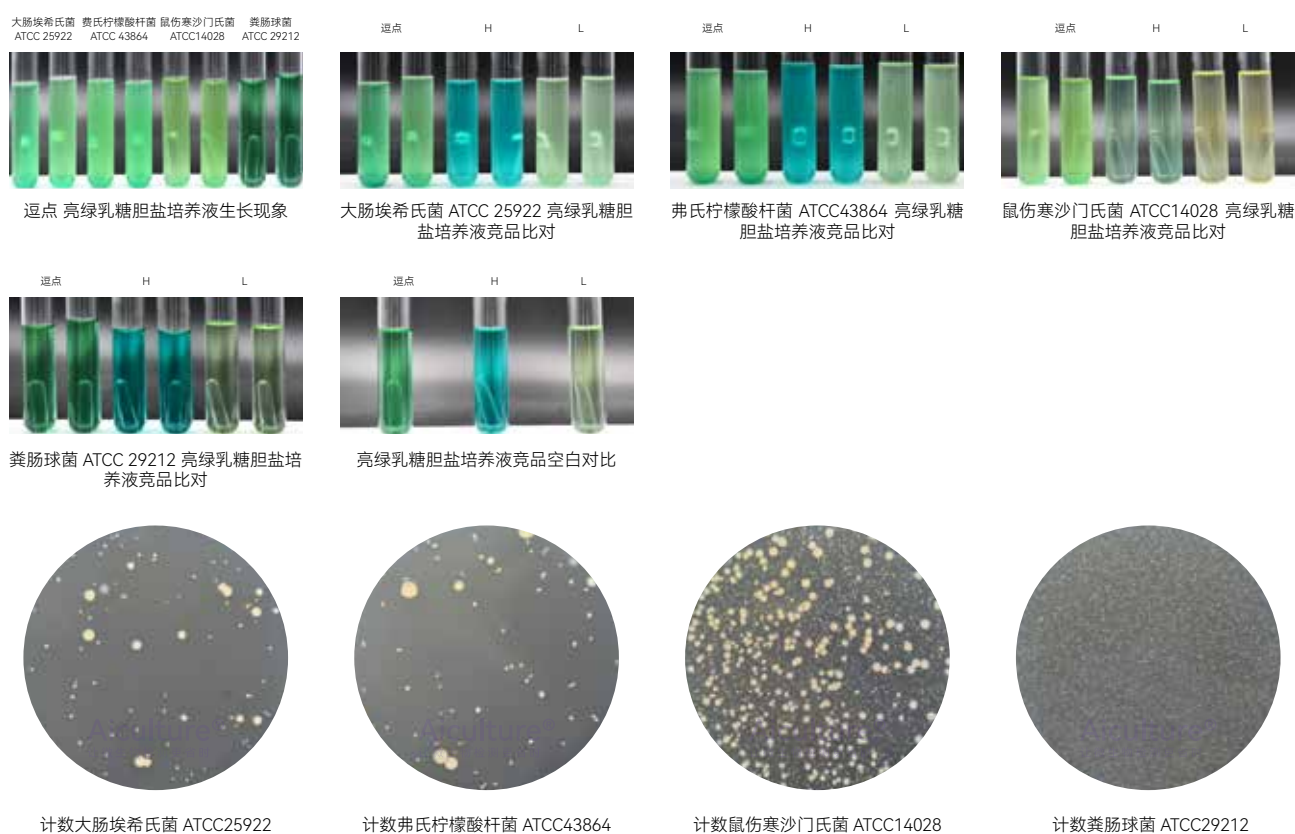


图 18-5

### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922、弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864、逗点、L 品牌、H 品牌的混浊度、产气均满足要求。
- 4.2 特异性：目标菌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 逗点、L 品牌、H 品牌的混浊度均满足要求；
- 4.3 选择性：粪肠球菌 ATCC29212，逗点、L 品牌、H 品牌均满足抑制生长的要求；
- 4.4 感观：逗点液体培养基颜色为亮绿色、L 品牌液体培养基颜色为蓝绿色、H 品牌液体培养基颜色为青绿色；其中 L 品牌液体培养基颜色为最深，H 品牌液体培养基颜色最浅，逗点液体培养基颜色在两者之间。

## 附录 C

# 远藤琼脂培养基验证



- 1、产品用途：用于饮用水、水源水中总大肠菌群的选择性分离或确证。
- 2、检验原理：蛋白胨、酵母膏粉、牛肉膏粉提供碳氮源、维生素和矿物质；乳糖为可发酵的糖类；琼脂是培养基的凝固剂；磷酸氢二钾为缓冲剂；亚硫酸钠能将碱性品红还原，使其褪色，发酵乳糖的细菌产生乙酰，与亚硫酸钠和碱性品红生成红色菌落，不发酵乳糖的细菌形成无色透明的菌落。

表 18-6：远藤琼脂培养基验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点		84	64	1.3	PR ≥ 0.7	符合
	L 品牌		95		1.4		符合
	B 品牌		31		0.5		不符合
弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864	逗点		200	204	0.9	PR ≥ 0.7	符合
	L 品牌		225		1.1		符合
	B 品牌		182		0.8		符合
远藤琼脂培养基	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	/	/	淡粉色菌落，无金属光泽	淡粉色菌落 无金属光泽	符合
		L 品牌	/		淡粉色菌落，无金属光泽		符合
		B 品牌	/		淡粉色菌落，无金属光泽		符合
金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点		/	/	G=0	G ≤ 1	符合
	L 品牌		/		G=0		符合
	B 品牌		/		G=0		符合
粪肠球菌 ATCC29212	逗点		/	/	G=0	G ≤ 1	符合
	L 品牌		/		G=0		符合
	B 品牌		/		G=0		符合

1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在远藤琼脂培养基上的菌落特征：红色菌落，有金属光泽；
2. 弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864 在远藤琼脂培养基上的菌落特征：红色菌落，有金属光泽；
3. 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 在远藤琼脂培养基上的菌落特征：淡粉色菌落，无金属光泽；
4. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在远藤琼脂培养基上的特征反应：G ≤ 1；
5. 粪肠球菌 ATCC29212 在远藤琼脂培养基上的特征反应：G ≤ 1。

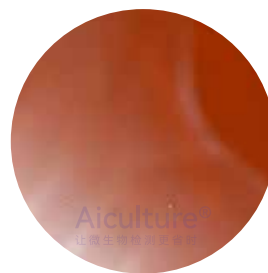
### 3、典型特征图片：



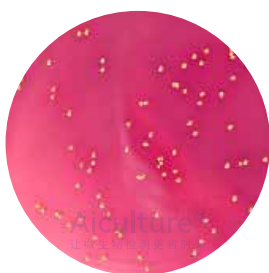
逗点远藤琼脂培养基空白



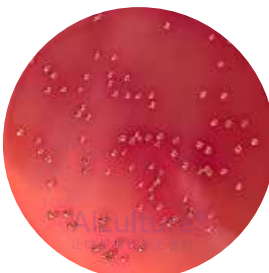
L 品牌远藤琼脂培养基空白



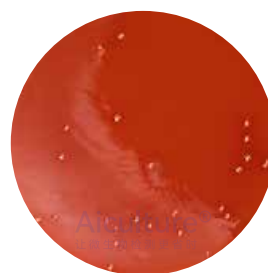
B 品牌远藤琼脂培养基空白



逗点远藤琼脂培养基 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



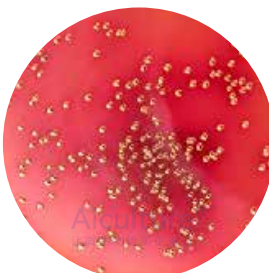
L 品牌远藤琼脂培养基 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



B 品牌远藤琼脂培养基 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



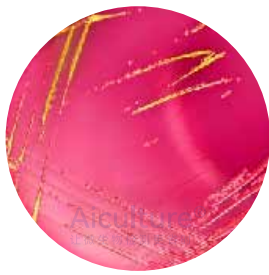
逗点远藤琼脂培养基 - 弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864



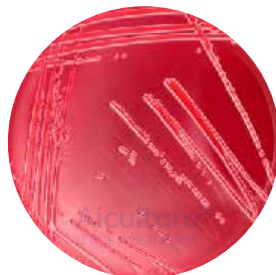
L 品牌远藤琼脂培养基 - 弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864



B 品牌远藤琼脂培养基 - 弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864



逗点远藤琼脂培养基 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



L 品牌远藤琼脂培养基 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



B 品牌远藤琼脂培养基 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



逗点远藤琼脂培养基 - 金黄色葡萄球菌 ATCC6538



L 品牌远藤琼脂培养基 - 金黄色葡萄球菌 ATCC6538



B 品牌远藤琼脂培养基 - 金黄色葡萄球菌 ATCC6538



逗点远藤琼脂培养基 - 粪肠球菌 ATCC29212



L 品牌远藤琼脂培养基 - 粪肠球菌 ATCC29212



B 品牌远藤琼脂培养基 - 粪肠球菌 ATCC29212

图 18-6

#### 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌均满足  $PR \geq 0.7$  的要求，红色菌落，有金属光泽，B 品牌不满足  $PR \geq 0.7$  的要求，红色菌落，有金属光泽；

弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864，逗点、L 品牌、B 品牌均满足  $PR \geq 0.7$  的要求，红色菌落，有金属光泽；

4.2 特异性：鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028，L 品牌、B 品牌均满足淡粉色菌落，无金属光泽；

4.3 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC6538、粪肠球菌 ATCC29212，逗点、L 品牌、B 品牌均满足国标  $G \leq 1$  的要求。

4.4 感观：L 品牌空白板颜色为浅橙色，B 品牌比 L 品牌颜色稍微深一点，逗点空白板颜色为淡粉色。

### 附录 D

## 脑心浸液液态培养基验证

1、产品用途：用于饮用天然矿泉水中粪链球菌 45°C 生长试验。

2、检验原理：胰蛋白胍和牛心粉提供细菌生长所需的碳源、氮源等营养元素；葡萄糖作为可发酵的碳源；氯化钠维持正常的渗透压；磷酸氢二钠作为体系的缓冲剂。



表 18-7：脑心浸液液态培养基验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
脑心浸液 态培养基	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	/	85	肉汤浑浊	生长良好，浑浊	符合
		L 品牌	/		肉汤浑浊		符合
		H 品牌	/		肉汤不浑浊		不符合
	乙型溶血性链球菌 CMCC (B) 32210	逗点	/	2345	不生长	不生长	符合
		L 品牌	/		不生长		符合
		H 品牌	/		不生长		符合

1. 粪肠球菌 ATCC29212 在脑心浸液液态培养基上的特征性反应：生长良好，浑浊；

2. 乙型溶血性链球菌 CMCC (B) 32210 在脑心浸液液态培养基上的特征性反应：不生长。

### 3、典型特征图片：

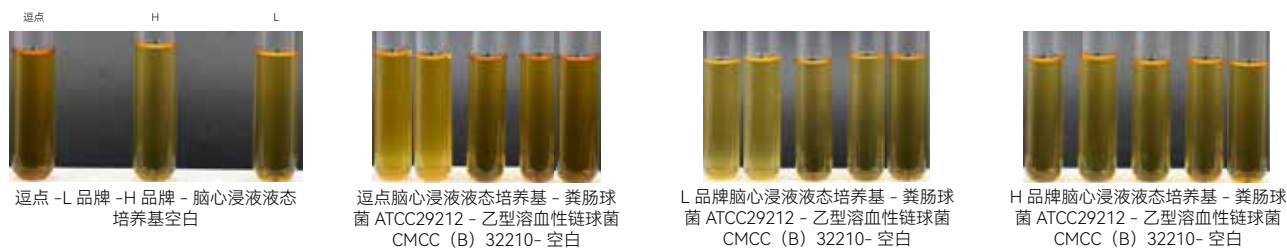


图 18-7

### 4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌粪肠球菌 ATCC29212，逗点、L 品牌均满足生长良好、肉汤浑浊的要求，H 品牌不满足生长良好、肉汤浑浊的要求；
- 4.2 乙型溶血性链球菌 CMCC (B) 32210，逗点、L 品牌、H 品牌均满足肉汤不生长要求；
- 4.3 感官：L 品牌、H 品牌空白肉汤颜色无显著差异，逗点空白肉汤颜色较深。

## 附录 E

### 脑心浸液琼脂培养基验证



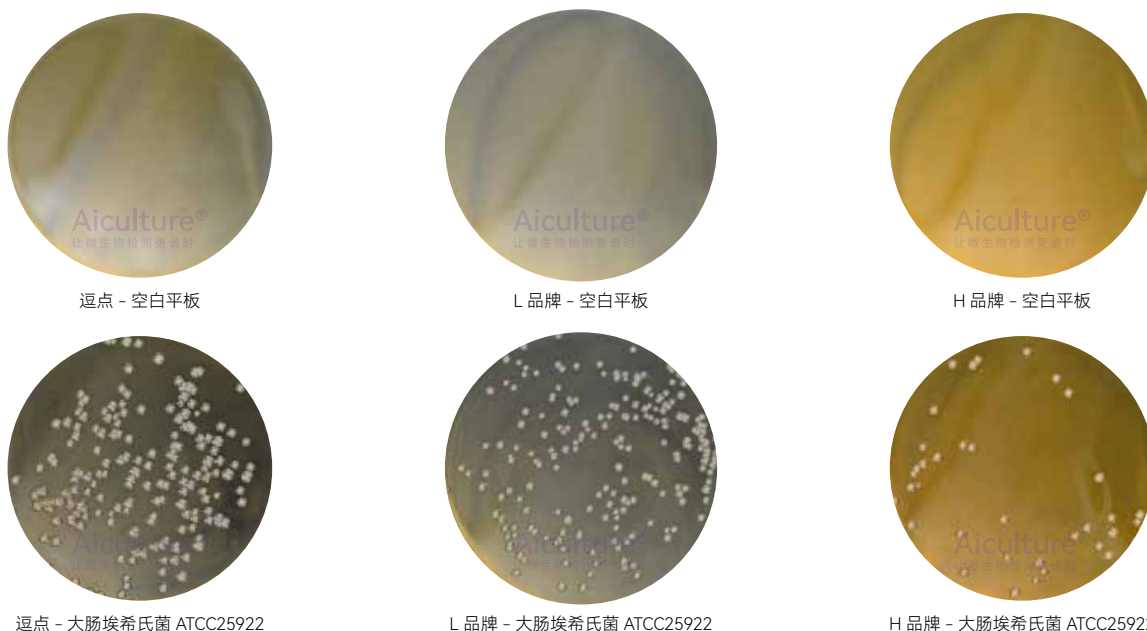
- 1、产品用途：广泛用于霉菌、酵母、细菌的培养，包括营养要求较高的微生物的培养，特别用于矿泉水和城市供水中粪性链球菌滤膜法的确证性实验。
- 2、检验原理：月示脉和脑一心浸粉提供氮源、维生素和生长因子；葡萄糖可为多种细菌提供能源；氯化钠维持均衡的渗透压；磷酸氢二钠为缓冲剂。

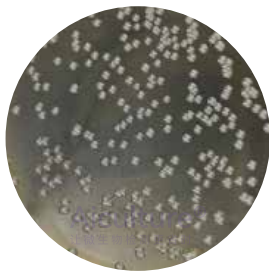
表 18-8：脑心浸液琼脂培养基验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
脑心浸液琼脂培养基	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	168	189	0.8	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	175		0.9		符合
		H 品牌	53		0.2		不符合
	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	208	259	0.8	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	258		0.9		符合
		H 品牌	163		0.6		不符合
粪肠球菌 ATCC29212	逗点	88	108	0.8	PR ≥ 0.7	符合	
	L 品牌	93		0.8		符合	
	H 品牌	92		0.8		符合	

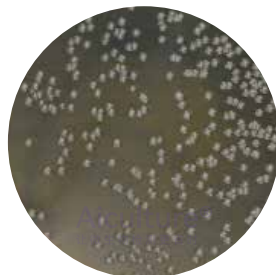
- 1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在脑心浸液琼脂培养基板上的菌落特征：灰白色菌落；
- 2. 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 在脑心浸液琼脂培养基板上的菌落特征：灰白色菌落；
- 3. 粪肠球菌 ATCC29212 在脑心浸液琼脂培养基板上的菌落特征：灰白色菌落。

### 3、典型特征图片：

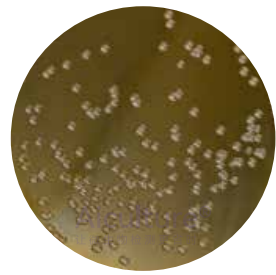




逗点 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



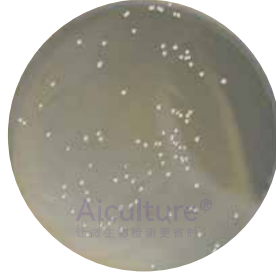
L 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



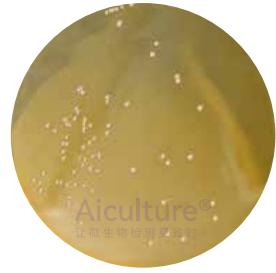
H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



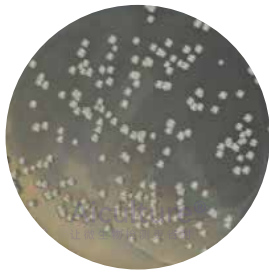
逗点 - 粪肠球菌 ATCC29212



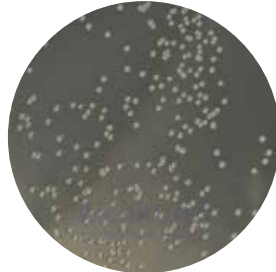
L 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



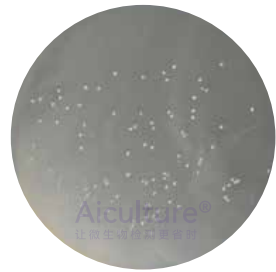
H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



参比 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



参比 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



参比 - 粪肠球菌 ATCC29212

图 18-8

#### 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、粪肠球菌 ATCC29212，逗点、L 品牌生长率满足  $PR \geq 0.7$  的要求，H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 不满足  $PR \geq 0.7$  的要求；

4.2 观感：L 品牌空白平板颜色淡黄色、逗点空白平板颜色比 L 品牌稍微深一点，H 品牌空白平板颜色深黄色。

## 附录 F

# 胆汁液态培养基验证

1、产品用途：用于饮用水粪性链球菌滤膜法的确证实验。

2、检验原理：月示豚和脑一心浸粉提供氮源、维生素和生长因子；葡萄糖可为多种细菌提供能源；氯化钠维持均衡的渗透压；磷酸氢二钠为缓冲剂。



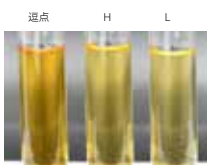
表 18-9：胆汁液态培养基验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
胆汁液态培养基	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	/	63	生长良好，培养基混浊	生长良好，培养基混浊	符合
		B 品牌	/		生长良好，培养基混浊		符合
		H 品牌	/		生长良好，培养基混浊		符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	1863	生长受抑制，培养基澄清	生长受抑制，培养基澄清	符合
		B 品牌	/		生长受抑制，培养基澄清		符合
		H 品牌	/		生长受抑制，培养基澄清		符合

1. 粪肠球菌 ATCC29212 在胆汁液态培养基上的特征性反应：生长良好，培养基混浊；

2. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在胆汁液态培养基上的特征性反应：生长受抑制，培养基澄清。

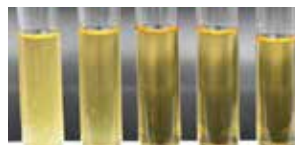
#### 3、典型特征图片：



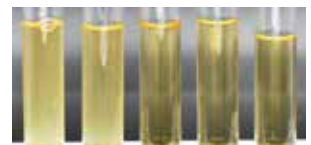
逗点 - B 品牌 - H 品牌 - 胆汁液态培养基空白



逗点胆汁液态培养基 - 粪肠球菌 ATCC29212- 金黄色葡萄球菌 ATCC6538- 空白对照



B 品牌胆汁液态培养基 - 粪肠球菌 ATCC29212- 金黄色葡萄球菌 ATCC6538- 空白对照



H 品牌胆汁液态培养基 - 粪肠球菌 ATCC29212- 金黄色葡萄球菌 ATCC6538- 空白对照



菌液计数 - 粪肠球菌 ATCC29212



菌液计数 - 金黄色葡萄球菌 ATCC6538

图 18-9

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌粪肠球菌 ATCC29212，逗点、B 品牌、H 品牌均满足生长良好，培养基混浊；
- 4.2 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、B 品牌、H 品牌均满足生长受抑制，培养基澄清；
- 4.3 观感：B 品牌、H 品牌空白肉汤颜色无显著差异，逗点空白肉汤颜色较深。

附录 G

## 假单胞菌琼脂基础培养基（CN 琼脂）验证



- 1、产品用途：用于铜绿假单胞菌的选择性分离和培养。
- 2、检验原理：明胶胨和胰蛋白胨提供氮源；甘油提供碳源；硫酸钾和氯化镁可促进绿脓色素的产生；琼脂是培养基的凝固剂；萘啶酮酸抑制非假单胞菌的革兰氏阴性杆菌。

表 18-10：假单胞菌琼脂基础培养基（CN 琼脂）验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
假单胞菌琼脂基础培养基 (CN 琼脂)	铜绿假单胞菌 ATCC27853	逗点	147	214	0.6	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	159		0.7		符合
		H 品牌	153		0.7		符合
假单胞菌琼脂基础培养基 (CN 琼脂)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/		G=6		不符合
		H 品牌	/		G=0		符合

- 1. 铜绿假单胞菌 ATCC27853 在假单胞菌琼脂基础培养基（CN 琼脂）上的菌落特征：黄绿色菌落；
- 2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在假单胞菌琼脂基础培养基（CN 琼脂）上的特征性反应：G ≤ 1；

3、典型特征图片：



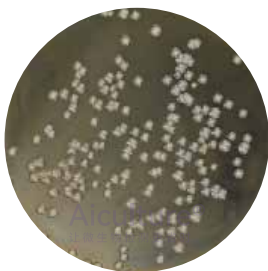
逗点假单胞菌琼脂基础培养基（CN 琼脂）空白



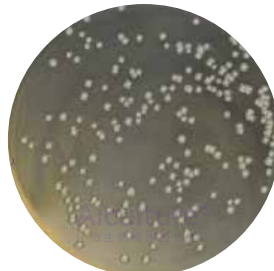
L 品牌假单胞菌琼脂基础培养基（CN 琼脂）空白



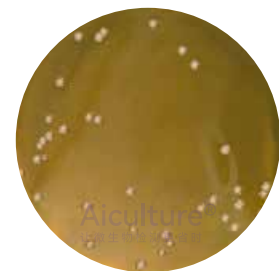
H 品牌 - 假单胞菌琼脂基础培养基（CN 琼脂）空白



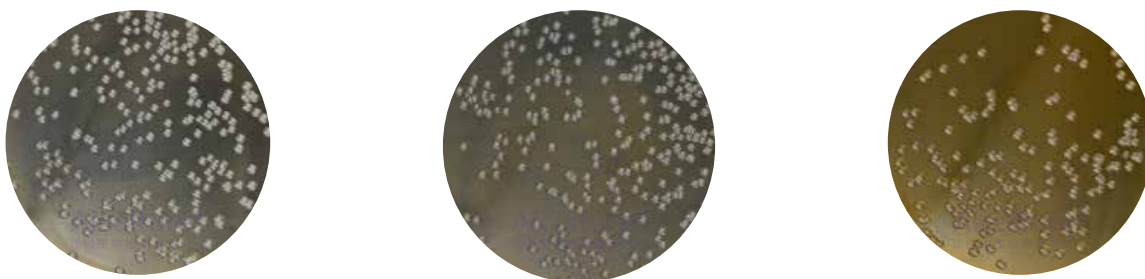
逗点假单胞菌琼脂基础培养基（CN 琼脂）- 铜绿假单胞菌 ATCC27853



L 品牌假单胞菌琼脂基础培养基（CN 琼脂）- 铜绿假单胞菌 ATCC27853



H 品牌假单胞菌琼脂基础培养基（CN 琼脂）- 铜绿假单胞菌 ATCC27853



逗点假单胞菌琼脂基础培养基 (CN 琼脂) - 大肠埃希氏菌 ATCC25922

L 品牌假单胞菌琼脂基础培养基 (CN 琼脂) - 大肠埃希氏菌 ATCC25922

H 品牌假单胞菌琼脂基础培养基 (CN 琼脂) - 大肠埃希氏菌 ATCC25922

图 18-10

#### 4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌铜绿假单胞菌 ATCC27853，逗点、H 品牌均满足  $PR \geq 0.5$  菌落绿色的要求，L 品牌菌落特征为白色菌落，不满足标准要求；

4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、H 品牌满足  $G \leq 1$  的要求，L 品牌不满足  $G \leq 1$  的要求；

4.3 观感：逗点、L 品牌、H 品牌空白平板颜色无显著差异。

## 附录 H

### 乙酰胺肉汤培养基验证



1、产品用途：用于铜绿假单胞菌的生长试验。

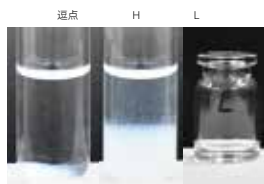
2、检验原理：具有乙酰胺酶的微生物能够利用乙酰胺为碳源；并分解乙酰胺产碱；氯化钠维持均衡的渗透压；磷酸二氢钾为缓冲剂；钼酸钠、硫酸亚铁和硫酸镁提供必需的生长离子；铵盐与钠氏试剂在碱性条件下生成砖红色的沉淀。

表 18-11：乙酰胺肉汤培养基验证数据

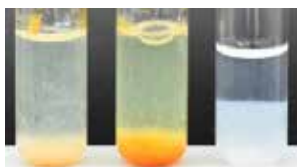
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
乙酰胺肉汤培养基	铜绿假单胞菌 ATCC27853	逗点	/	> 5000	滴加钠氏试剂后呈砖红色	滴加钠氏试剂后呈砖红色	符合
		L 品牌	/		滴加钠氏试剂后呈砖红色		符合
		B 品牌	/		滴加钠氏试剂后呈砖红色		符合

1. 铜绿假单胞菌 ATCC27853 在乙酰胺肉汤培养基上的特征性反应：滴加钠氏试剂后呈砖红色。

#### 3、典型特征图片：



逗点 - B 品牌 - L 品牌 - 乙酰胺肉汤空白



逗点乙酰胺肉汤 - 铜绿假单胞菌 ATCC27853- 阴性



B 品牌乙酰胺肉汤 - 铜绿假单胞菌 ATCC27853- 阴性



L 品牌乙酰胺肉汤 - 铜绿假单胞菌 ATCC27853- 阴性

图 18-11

#### 4、验证结果小结：

4.1 生长特征：目标菌铜绿假单胞菌 ATCC27853，逗点、B 品牌、L 品牌均满足滴加钠氏试剂后呈砖红色的要求；

4.2 观感：逗点空白肉汤颜色透明有沉淀物，B 品牌空白肉汤颜色透明，有沉淀物，L 品牌空白肉汤澄清无沉淀。

## 附录 I

### 液体硫乙醇酸盐培养基 (FT)



1、产品用途：用于培养需氧菌、微需氧菌和厌氧菌，还用于药品生物制品的无菌试验。

2、检验原理：胰酪胨和酵母膏粉提供碳氮源、维生素和生长因子；葡萄糖提供可发酵糖类更利于生长；氯化钠维持均衡的渗透压；硫乙醇酸钠和 L-胱氨酸能有效降低氧化还原电位，防止过氧化物的积累对某些菌产生毒性，同时其硫氢基团有钝化砷、汞及其它重金属防腐剂的抑菌作用；少量琼脂的凝固作用可防止二氧化碳、氧气和还原产物的扩散；刃天青是氧化还原指示剂，氧化状态呈粉红色，还原状态无色。

表 18-12：液体硫乙醇酸盐培养基 (FT) 验证数据

样品名称	质控菌株	厂家	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
液体硫乙醇酸盐培养基 (FTG)	产气荚膜梭菌 ATCC13124	逗点	172	生长良好	混浊度 2	符合
		L 品牌				符合
		H 品牌				符合

3、典型特征图片：

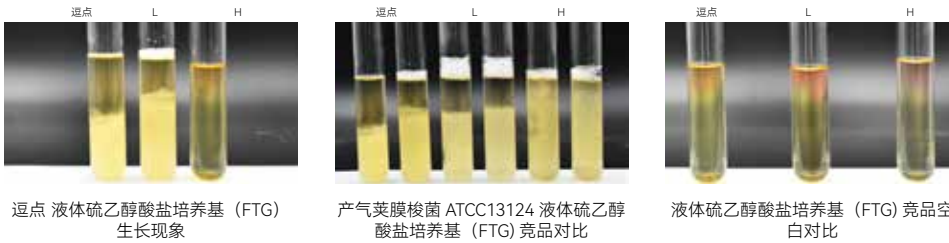
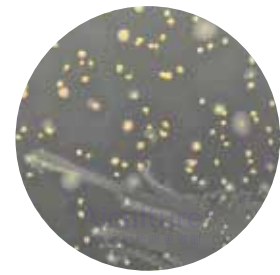


图 18-12



计数产气荚膜梭菌 ATCC13124

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌产气荚膜梭菌 ATCC13124 逗点、H 品牌、L 品牌的生长现象、混浊度满足要求；
- 4.2 感观：三家产品外观无明显差异。

附录 J

## 含铁牛奶培养基验证

- 1、产品用途：用于产气荚膜梭菌的鉴定。
- 2、检验原理：产气荚膜梭菌能发酵乳糖，凝固酪蛋白并大量产气，呈“暴烈发酵”现象。



表 18-13：含铁牛奶培养基验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
含铁牛奶培养基	产气荚膜梭菌 ATCC13124	逗点	/	> 5000	暴烈发酵	有暴烈发酵	符合
		H 品牌	/		微弱暴烈发酵		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	> 5000	无暴烈发酵	无暴烈发酵	符合
		H 品牌	/		无暴烈发酵		符合

- 1. 产气荚膜梭菌 ATCC13124 在含铁牛奶培养基上的生化特征：有暴烈发酵；
- 2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在含铁牛奶培养基上的生化特征：无暴烈发酵。

3、典型特征图片：



图 18-13

4、验证结果小结：

- 4.1 生化特征反应：目标菌产气荚膜梭菌 ATCC13124，逗点满足生长良好要求，呈“暴烈发酵”生化特征；H 品牌暴烈现象较微弱，逗点暴烈现象明显优于 H 品牌；
- 大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、H 品牌均满足“不发酵”生化特征；
- 4.2 感观：逗点空白管颜色乳白色，H 品牌空白管颜色稍微偏黄。

附录 I

## KF 链球菌琼脂培养基验证

- 1、产品用途：用于粪性链球菌选择性培养和计数。
- 2、检验原理：胨蛋白胨和酵母浸粉提供氮源、维生素和生长因子；麦芽糖和乳糖为可发酵糖类；氯化钠维持均衡的渗透压；甘油磷酸钠作为缓冲剂和碳源；叠氮化钠可抑制革兰氏阴性菌；琼脂是培养基的凝固剂；粪链球菌能将氯化三苯基四氮唑还原成一种酸性的偶氮染料，显示为深红色菌落。



表 18-14：KF 链球菌琼脂培养基验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
KF 链球菌琼脂培养基	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	160	200	0.8	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	140		0.7		符合
		H 品牌	180		0.9		符合
KF 链球菌琼脂培养基	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/		G=0		符合
		H 品牌	/		G=0		符合
KF 链球菌琼脂培养基	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/		G=0		符合
		H 品牌	/		G=0		符合

- 1. 粪肠球菌 ATCC29212 在 KF 链球菌琼脂培养基上的菌落特征：PR ≥ 0.7，红色菌落；
- 2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 KF 链球菌琼脂培养基上的菌落特征：G ≤ 1；
- 3. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在 KF 链球菌琼脂培养基上的菌落特征：G ≤ 1。

3、典型特征图片：



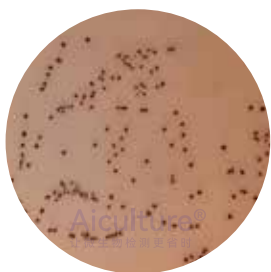
逗点 - 空白平板



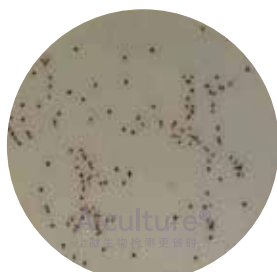
L 品牌 - 空白平板



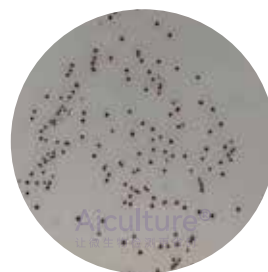
H 品牌 - 空白平板



逗点 KF 链球菌琼脂培养基 - 粪肠球菌 ATCC29212



L 品牌 KF 链球菌琼脂培养基 - 粪肠球菌 ATCC29212



H 品牌 KF 链球菌琼脂培养基 - 粪肠球菌 ATCC29212



逗点 KF 链球菌琼脂培养基 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



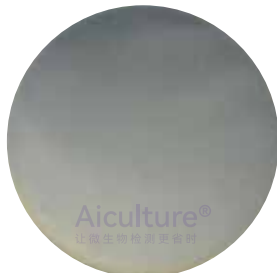
L 品牌 KF 链球菌琼脂培养基 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌 KF 链球菌琼脂培养基 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点 KF 链球菌琼脂培养基 - 金黄色葡萄球菌 ATCC6538



L 品牌 KF 链球菌琼脂培养基 - 金黄色葡萄球菌 ATCC6538



H 品牌 KF 链球菌琼脂培养基 - 金黄色葡萄球菌 ATCC6538

图 18-14

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌粪肠球菌 ATCC29212，逗点、L 品牌、H 品牌生长率满足  $PR \geq 0.7$ 、红色菌落的要求；
- 4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均满足  $G \leq 1$  的要求；金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均满足  $G \leq 1$  的要求；
- 4.3 感观：逗点空白平板颜色淡红色，L 品牌比 H 品牌空白平板颜色深一点。

# BRAND PROFILE

## 品牌简介



Aiculture® 是国际化的品牌，在新加坡和深圳，两地经营。

Aiculture® 的品牌使命是：更快更好更可靠。

我们在培养基制造中引入制药 GMP 管理体系，不断提高产品质量。

我们通过提供方便快捷的培养基和无菌耗材，提高微生物检测效率，节约检测专家的时间。

他们用来配制培养基的时间，可以做更有价值的事情。

深圳制造·服务全球·支持定制



逗点生物公众号



逗点商城



逗点 1688



逗点锐竞



逗点喀斯玛

WSW-01-006CH

深圳逗点生物技术有限公司  
Biocomma Limited

地址：深圳市龙岗区吉华街道甘坑社区甘李六路 12 号中海信创新产业城 12 栋 14 楼 1401-1406

TEL: 400-878-7248 WEB: www.biocomma.cn EMAIL: info@biocomma.com