



逗点生物
biocomma

Aiculture®
让微生物检测更省时

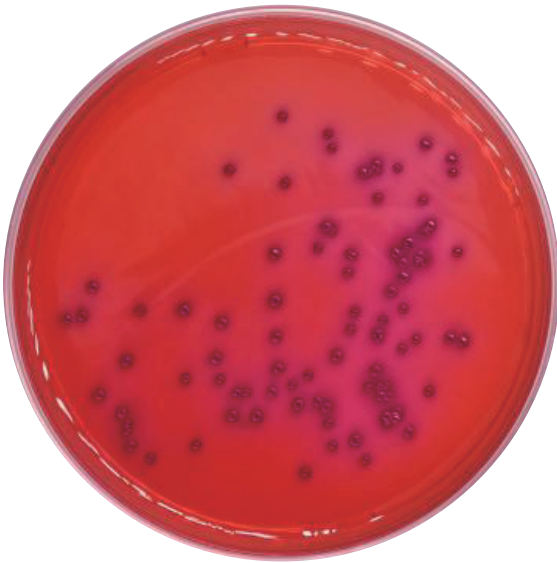
版本号
PCR-13-1CH

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）和等。

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。

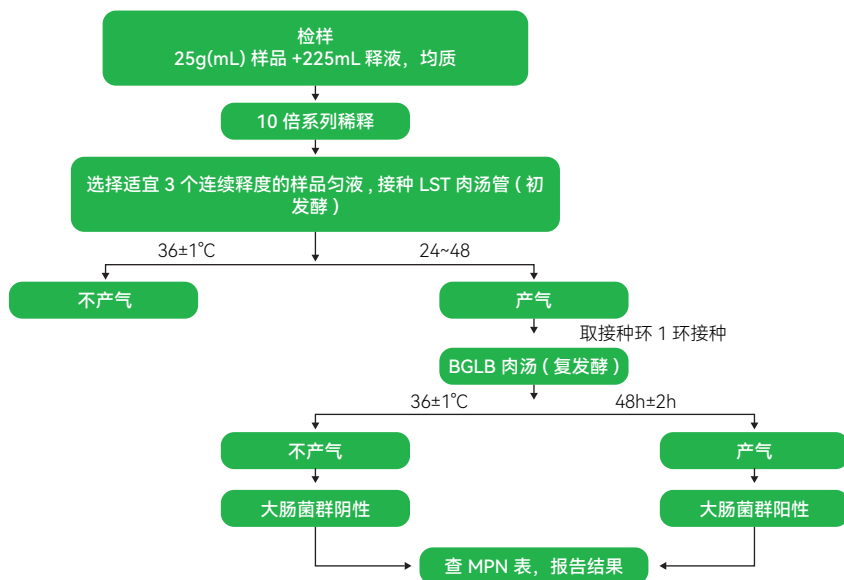


二、GB4789.3-2016 大肠菌群 MPN 法

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. 大肠菌群 MPN 计数的检验操作



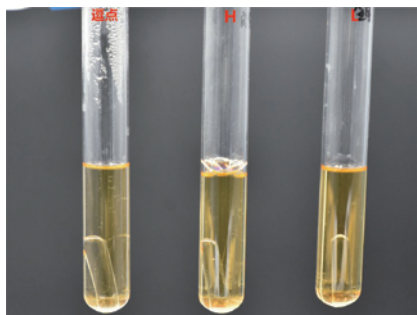
操作注意事项

- 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。

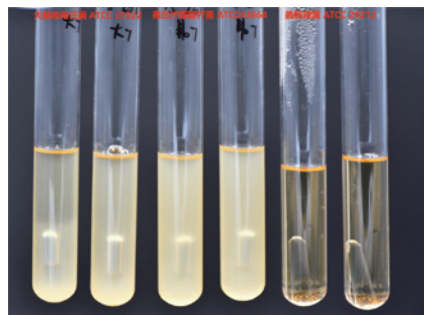
3. 培养基原理解析

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。



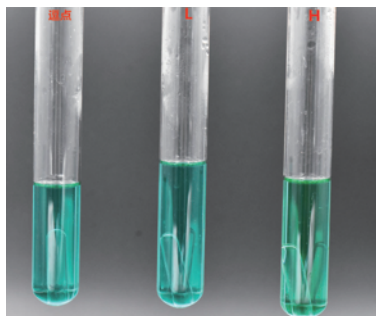
月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST) 竞品空白对比



逗点 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST) 生长现象

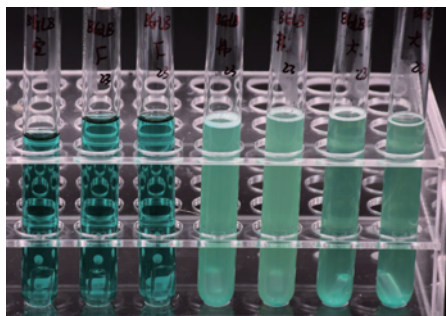
煌绿乳糖胆盐肉汤 (BGLB)

- 胆盐与煌绿均能抑制革兰氏阳性菌生长。
- 培养基配方当中含有胆盐，大肠菌群发酵乳糖所产生的酸会与胆盐发生反应，形成胆酸沉淀。培养基可由原来的绿色变为黄色。



煌绿乳糖胆盐肉汤 (BGLB)

逗点、L 品牌、K 品牌竞品空白对比



阴性

阳性

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。

表：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	1 000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1 000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2 000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1 100	180	4 100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	> 1 100	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。

三、GB4789.3-2016 大肠菌群平板计数法

1. 大肠菌群平板计数法流程图



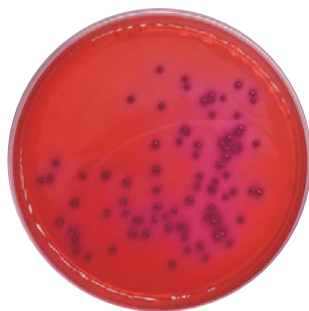
操作注意事项

- 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。
- 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。

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生的酸与胆盐结合，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。

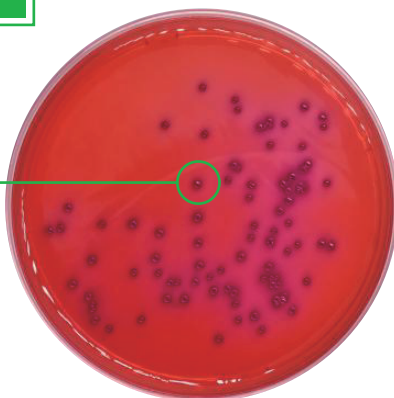


大肠埃希氏菌 ATCC25922
在 VRBA 上的菌落形态

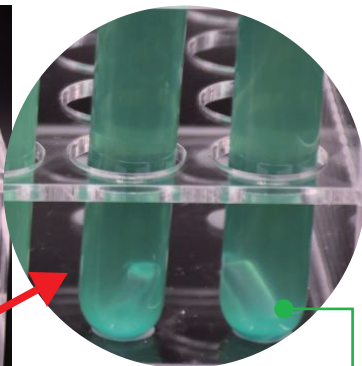
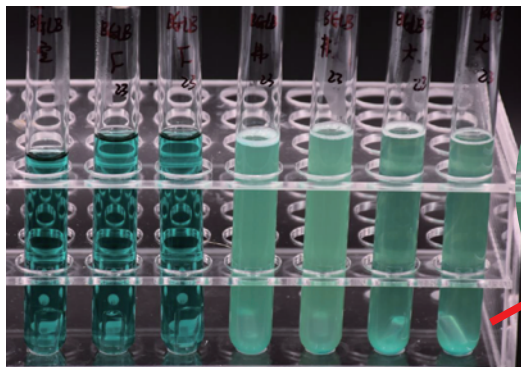
3. 计数典型和可疑菌落数

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。

典型大肠菌群菌落：
紫红色，菌落周围有
红色的胆盐沉淀环



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。



BGLB 肉汤试管中的
小导管有气泡，大肠
菌群阳性。

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^{-4} 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 : $100 \times 6 / 10 \times 10^4 / \text{g(mL)} = 6.0 \times 10^5 \text{CFU/g(mL)}$ 。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

1. 实验过程中, 每批样品稀释液都要做空白对照。

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。

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。

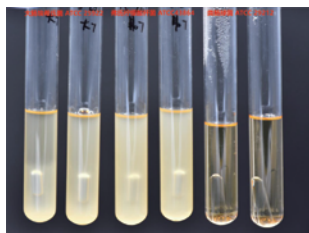
月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST)



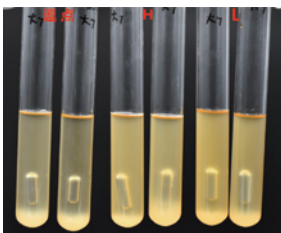
- 1、产品用途：月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤用于多管发酵法测定大肠菌群和粪大肠菌群。
- 2、检验原理：胰蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；乳糖是大肠菌群可发酵的糖类；磷酸二氢钾和磷酸氢二钾是缓冲剂；月桂基硫酸钠可抑制非大肠菌群细菌的生长。
- 3、月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST) 验证数据

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	符合
		L 品牌					符合
		H 品牌					符合

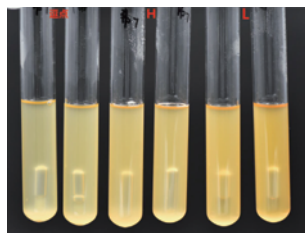
4、典型特征图片：



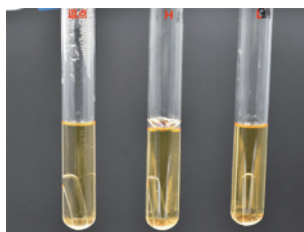
逗点 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST) 生长现象



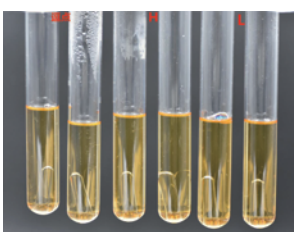
大肠埃希氏菌 ATCC 25922 LST 竞品比对



弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864 LST 竞品比对



粪肠球菌 ATCC 29212 LST 竞品对比



月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST) 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

5、验证结果小结:

- 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;
- 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;
- 3、感观: 逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。

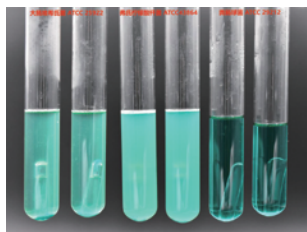
煌绿乳糖胆盐肉汤 (BGLB)



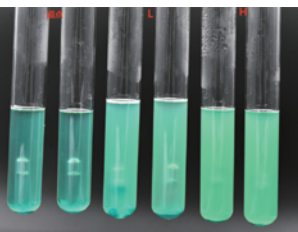
- 1、产品用途：用于多管发酵法测定大肠菌群的确证试验。
- 2、检验原理：蛋白胨提供碳氮源；乳糖是可发酵的糖类；牛胆粉和煌绿抑制非肠杆菌科细菌。
- 3、煌绿乳糖胆盐肉汤 (BGLB) 验证数据

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		
		K 品牌				符合		
	弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864	逗点	41			符合		
		L 品牌				符合		
		K 品牌				符合		
	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	2118			未生长	混浊度 0 (不生长) 或混浊度 1 (微弱生长)， 不产气	符合
		L 品牌						符合
		K 品牌						符合

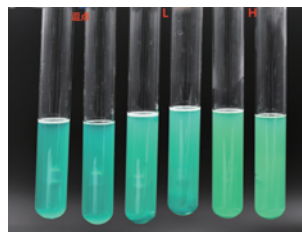
4、典型特征图片：



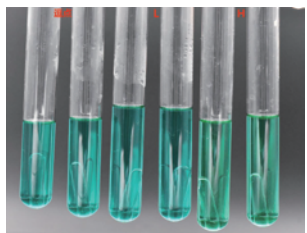
逗点煌绿乳糖胆盐肉汤 (BGLB) 生长现象



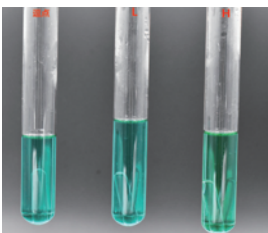
大肠埃希氏菌 ATCC 25922 BGLB 逗点、L 品牌、K 品牌竞品比对



弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864 BGLB 逗点、L 品牌、K 品牌竞品比对



粪肠球菌 ATCC 29212 BGLB 逗点、L 品牌、K 品牌竞品比对



煌绿乳糖胆盐肉汤 (BGLB) 逗点、L 品牌、K 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

5、验证结果小结:

- 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、K 品牌的混浊度、产气均满足要求;
- 2、选择性: 粪肠球菌 ATCC29212, 逗点、L 品牌、K 品牌均满足不生长、不产气的要求;
- 3、感观: 逗点、L 品牌煌绿乳糖胆盐肉汤颜色为蓝绿色, K 品牌煌绿乳糖胆盐肉汤颜色为青绿色。

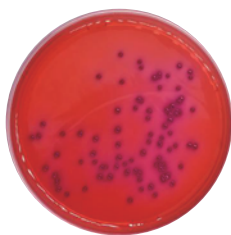
结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA)



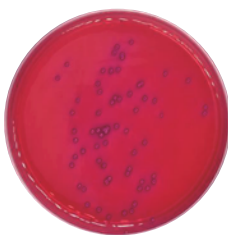
1. 产品用途：用于水或食品中大肠菌群平板菌落计数。
2. 检验原理：蛋白胨和酵母膏粉提供碳氮源和微量元素；乳糖是可发酵的糖类；氯化钠可维持均衡的渗透压；3号胆盐和结晶紫抑制革兰氏阳性菌，特别抑制革兰氏阳性杆菌和粪链球菌；中性红为 pH 指示剂。

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

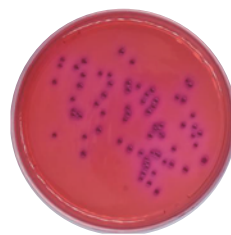
1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 VRBA 板上的菌落特征：有或无沉淀环的紫红色或红色菌落；
2. 弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864 在 VRBA 板上的菌落特征：有或无沉淀环的紫红色或红色菌落；
3. 粪肠球菌 ATCC 29212 在 VRBA 板上的菌落特征：选择性 G<5；



逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



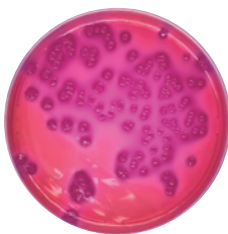
L 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



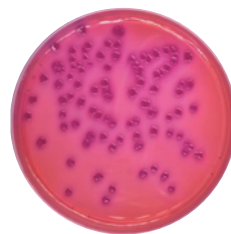
H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864



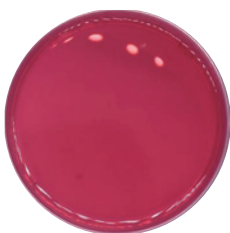
L 品牌弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864



H 品牌弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864



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



逗点结晶紫中性红胆盐琼脂
(VRBA) 空白



L 品牌结晶紫中性红胆盐琼脂
(VRBA) 空白



H 品牌结晶紫中性红胆盐琼脂
(VRBA) 空白

验证结果小结

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。
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。
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。其中逗点颜色最深，H 品牌颜色最浅，L 品牌在两者之间。