



逗点生物  
biocomma

Aiculture®  
让微生物检测更省时

版本号  
PCR-40-1CH

# 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 0.1g。
- 2.1.5 均质器。
- 2.1.6 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 容量 500ml。
- 2.2.3 无菌培养皿 直径 90mm。
- 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

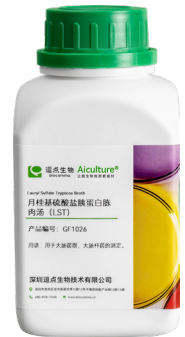
- 3.2.1 1mol/L NaOH。
- 3.2.2 1mol/L HCl。

## 四、检验过程

### 粪大肠菌群检验程序见流程图 14-1

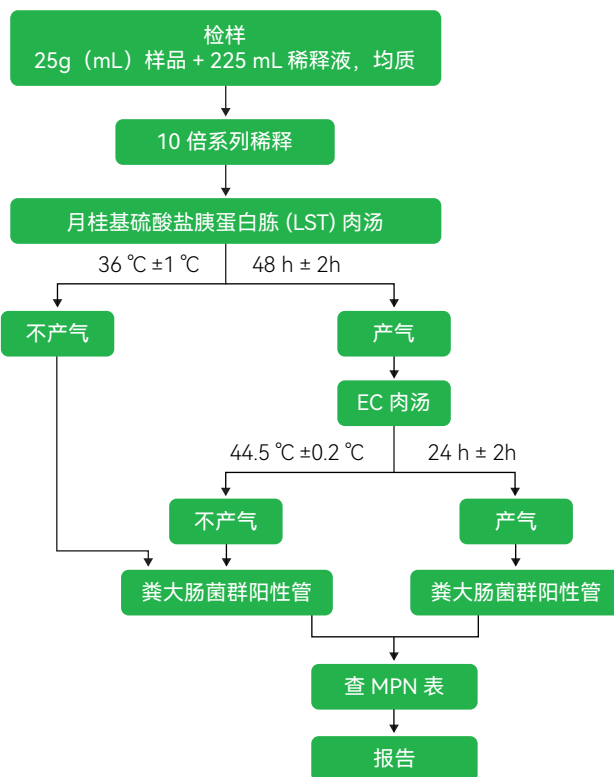
#### 4.1 样品的稀释

- 4.1.1 固体和半固体样品 称取 25g 样品，置盛有 225ml 磷酸盐缓冲液或 0.85% 的无菌生理盐水的无菌均质杯内，8000~10000r/min 均质 1~2 分钟，制成 1:10 样品匀液，或置 225ml 稀释液的无菌均质袋中，用拍打式均质器拍打 1~2 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 25ml 置盛有 225ml 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 6.5~7.5 之间，必要时分别用 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 调节。
- 4.1.4 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 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 1ml 无菌吸管反复吹打，使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。
- 4.1.5 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 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。



#### 4.2 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1ml（如接种量需要超过1ml，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。



流程图 14-1 粪大肠菌群 MPN 计数法检验程序

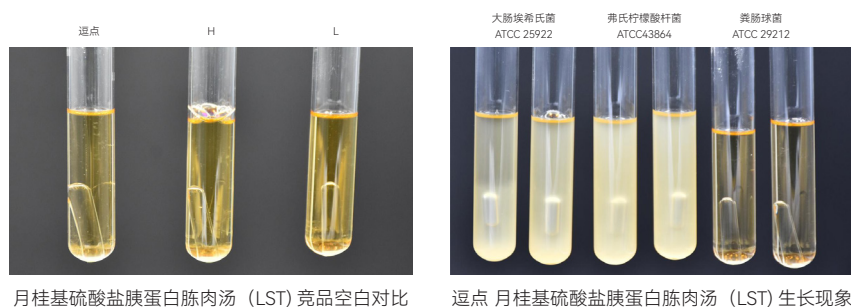


图 14-1

#### 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。

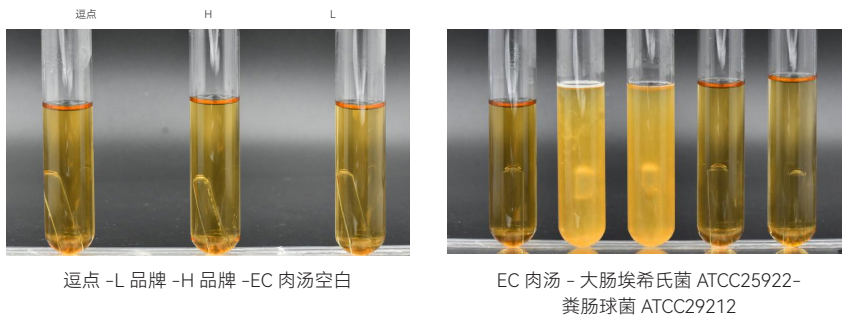


图 14-2

#### 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洗涤干净，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试验的检验。如果两平行样之间的对数差值大于之前获得的精密度值则表示精密度失去控制，应查找原因，予以消除，并重新进行精密度值的测定。

附录 A

# 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST)

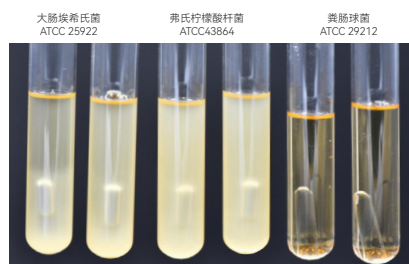


- 1、产品用途：月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤用于多管发酵法测定大肠菌群和粪大肠菌群。
- 2、检验原理：胰蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；乳糖是大肠菌群可发酵的糖类；磷酸二氢钾和磷酸氢二钾是缓冲剂；月桂基硫酸盐钠可抑制非大肠菌群细菌的生长。

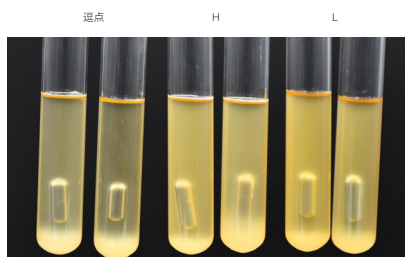
表 13-2：月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST) 验证数据

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

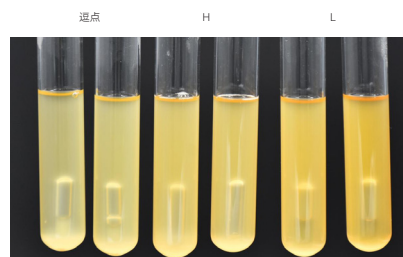
3、典型特征图片：



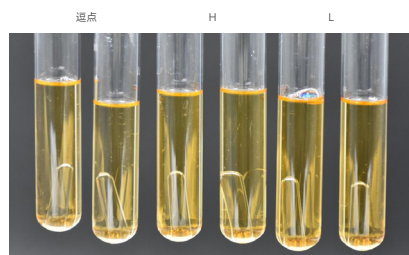
逗点 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST) 生长现象



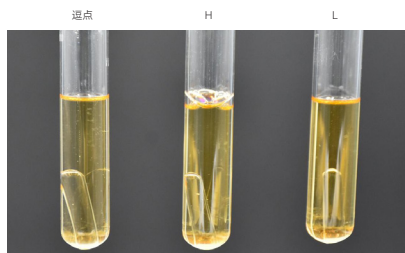
大肠埃希氏菌 ATCC 25922 LST 竞品比对



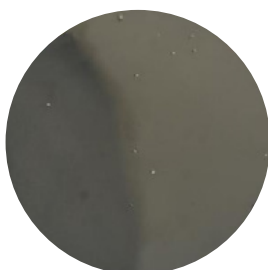
弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864 LST 竞品比对



粪肠球菌 ATCC 29212 LST 竞品比对



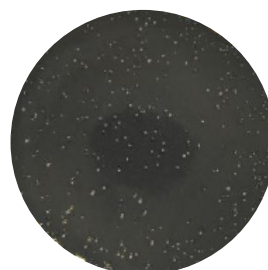
月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST) 竞品空白对比



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

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。

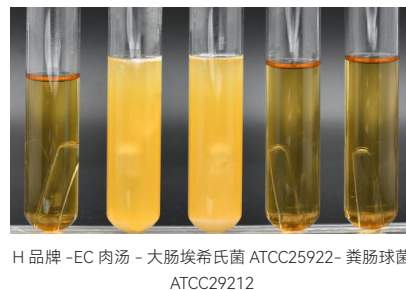
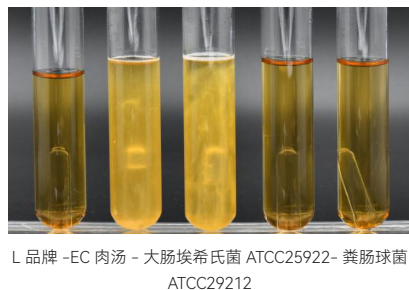
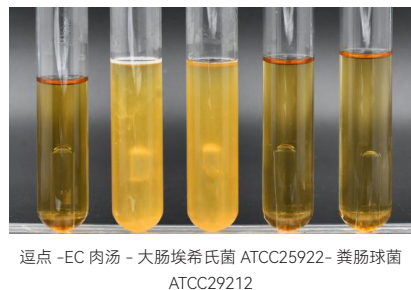
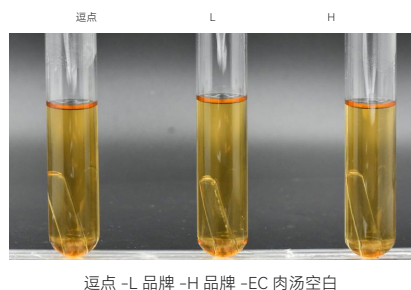


表 13-4：EC 肉汤验证

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：





菌液计数 - 大肠埃希氏菌



菌液计数 - 粪肠球菌

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。

Aiculture®  
让微生物检测更省时



让微生物检测更省时



官方公众号



逗点商城



逗点 1688



逗点锐竞



逗点喀斯玛

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