



逗点生物
biocomma

Aiculture®
让微生物检测更省时

更快·更好·更可靠
Faster & Purer & Safer



微生物培养基应用手册

第三版



www.commashop.cn



400-878-7248

BRAND PROFILE

品牌简介

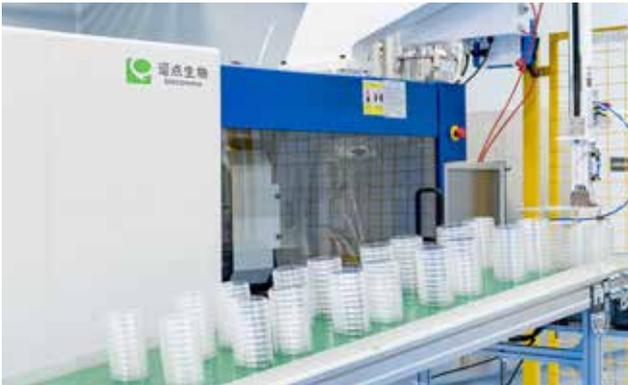


Aiculture® 是国际化的品牌，在新加坡和深圳，两地经营。

Aiculture® 的品牌使命是：让微生物检测更省时。

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。



CONTENTS

目录

01	食品微生物检验 GB4789.2-2022 菌落总数测定及注意事项	
	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)	01 03
02	食品微生物检验 GB4789.3-2016 大肠菌群计数及注意事项	
	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 08 09 10
03	食品微生物检验 GB 4789.15-2016 霉菌酵母计数	
	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	12 14 16
04	食品微生物检验 GB4789.4-2016 沙门氏菌检验及注意事项	
	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	18 22 23 25 28 30 32 34 35
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	
	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)	37 42 44 45 47
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	
	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	48 53 55 56 57 58



07	食品微生物检验志贺氏菌检验及注意事项 GB 4789.5-2012	
	食品微生物检验志贺氏菌检验及注意事项 GB 4789.5-2012	59
	志贺氏菌增菌肉汤验证	60
	木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 验证	52
	麦康凯琼脂 (MAC) 验证	64
	志贺氏菌显色培养基验证	65
	三糖铁琼脂 (TSI) 验证	67
08	食品微生物副溶血性弧菌检验及注意事项 GB 4789.7-2013	
	食品微生物副溶血性弧菌检验及注意事项 GB 4789.7-2013	68
	3% 氯化钠碱性蛋白胨水验证	71
	弧菌显色培养基验证	72
	3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂培养基验证	74
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	
	食品微生物致泻大肠埃希氏菌检验及注意事项 GB 4789.6-2016	75
	营养肉汤 (NB)	80
	肠道增菌肉汤	81
	伊红美蓝 (EMB) 琼脂培养基验证	82
	麦康凯琼脂 (MAC) 验证	83
10	食品微生物学检验小肠结肠炎耶尔森菌检验 GB 4789.8—2016	
	食品微生物学检验小肠结肠炎耶尔森菌检验 GB 4789.8—2016	85
	改良磷酸盐缓冲液验证	89
	CIN-1培养基验证	91
	改良Y培养基验证	92
	改良克氏双糖铁琼脂验证	94
11	食品微生物学检验β型溶血性链球菌检验 GB 4789.11—2014	
	食品微生物学检验β型溶血性链球菌检验 GB 4789.11—2014	95
	胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB)	98
	哥伦比亚CNA血琼脂	99
	哥伦比亚血琼脂验证	101

01 食品微生物检验 GB4789.2-2022 菌落总数测定及注意事项

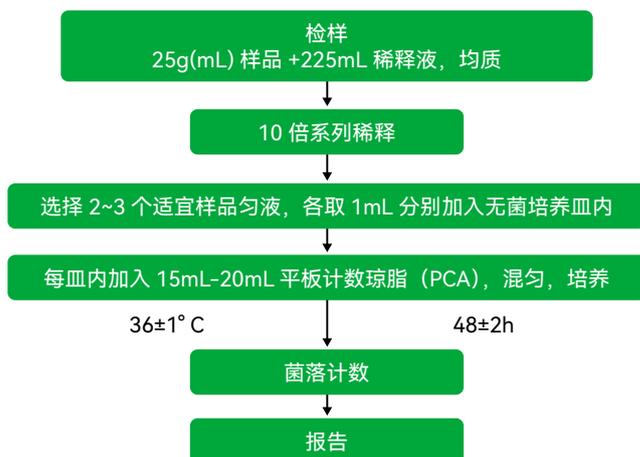
一、菌落总数定义和卫生学意义

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



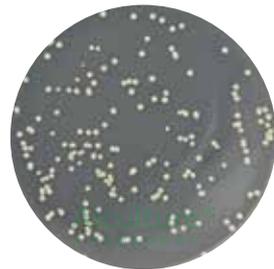
流程图 1-1 菌落总数检验程序

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。菌落计数以菌落形成单位(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。



逗点空白平板
图 1-1

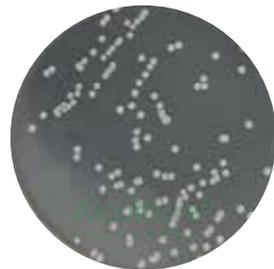


图 1-2

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。
- 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;

Σc ——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 ²
3	多不可计	多不可计	150	160	15	20	15500	16000 或 1.6×10 ⁴
4	多不可计	多不可计	236	245	35	33	24955	25000 或 2.5×10 ⁴
5	多不可计	多不可计	236	245	25	33	24476	24000 或 2.4×10 ⁴
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 ⁵
7	多不可计	多不可计	310	320	28	26	27000	27000 或 2.7×10 ⁴
8	多不可计	多不可计	295	325	22	20	29500	30000 或 3.0×10 ⁴
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 2cm²，计数其中的菌落数，计算每 2cm² 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 63.6cm²），再乘以稀释倍数报告。

表 1-2：所需培养基试剂

用途	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
	GZ1000.9	生理盐水	盒（管装）9 mL×20 支
平板计数	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
	KL1001-1KG	板计数琼脂（颗粒型）(PCA)	瓶（颗粒）1000 g
微生物测试片	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：

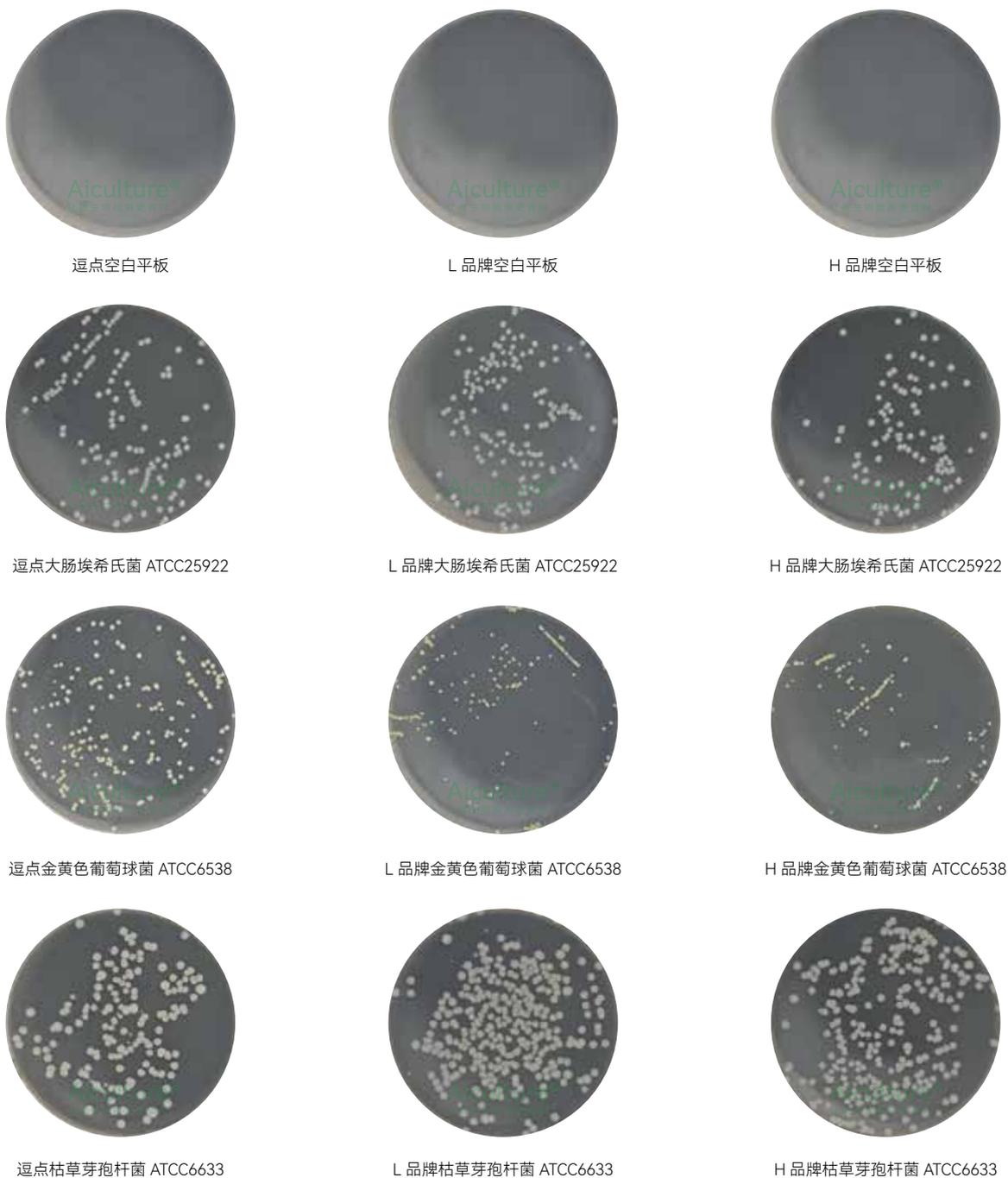


图 1-3

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

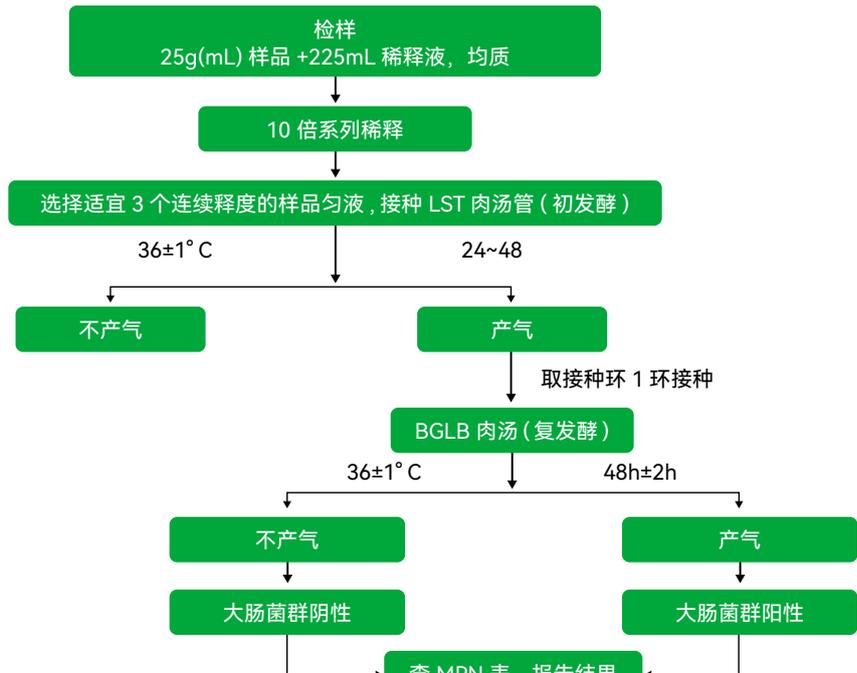
2.1 什么是 MPN 法？

- 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。



流程图 2-1 大肠菌群检验程序

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。

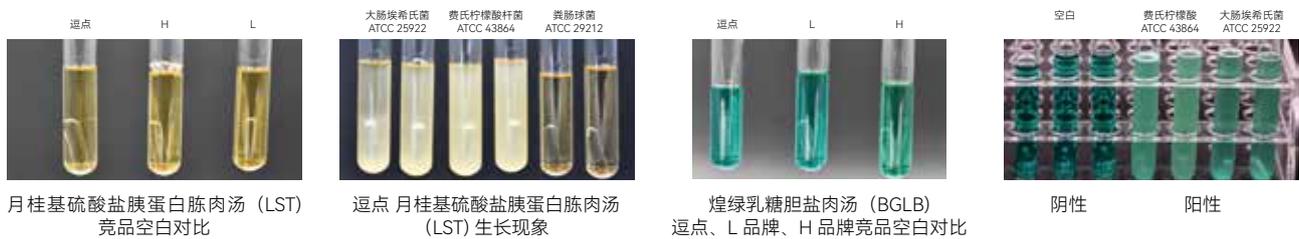


图 2-1

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。

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	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。

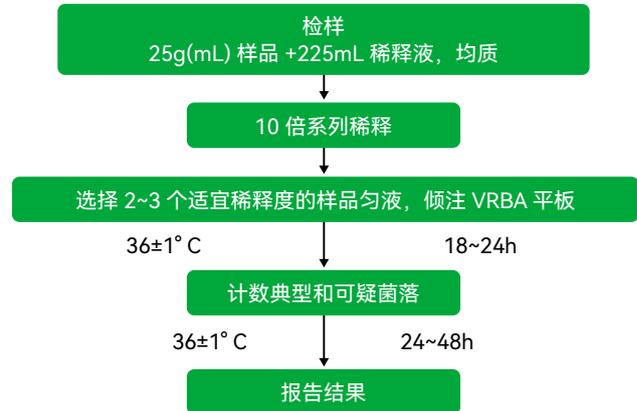
注 2: 表内所列检样量如改用 1g(mL)、0.1g(mL) 和 0.01g(mL) 时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 0.01g(mL)、0.001g(mL) 和 0.0001g(mL) 时, 则表内数字应相应增高 10 倍, 其余类推。

三、GB4789.3-2016 大肠菌群平板计数法

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。
- 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。



流程图 2-2 大肠菌群检验程序

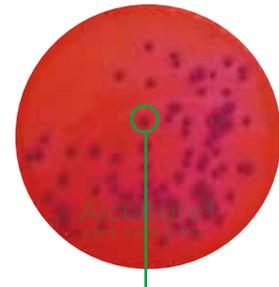
3.2 培养基原理解析

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。

3.3 计数典型和可疑菌落数

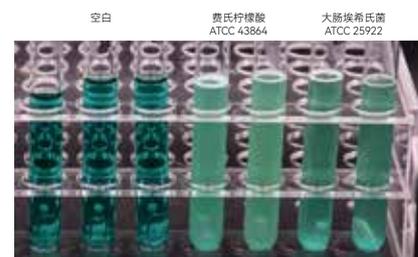
结果判读：选取菌落数在 15 CFU ~ 150 CFU 之间的平板，分别计数平板上出现的典型和可疑大肠菌群菌落。典型菌落为紫红色，菌落周围有红色的胆盐沉淀环，菌落直径为 0.5 mm 或更大。



典型大肠菌群菌落：
紫红色，菌落周围有红色的胆盐沉淀环

图 2-2

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。

图 2-3

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^{-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

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。

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

煌绿乳糖胆盐肉汤 (BGLB)

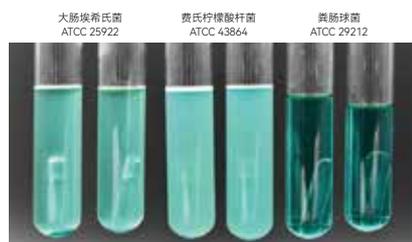


- 1、产品用途：用于多管发酵法测定大肠菌群的确证试验。
- 2、检验原理：蛋白胨提供碳氮源；乳糖是可发酵的糖类；牛胆粉和煌绿抑制非肠杆菌科细菌。

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
		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

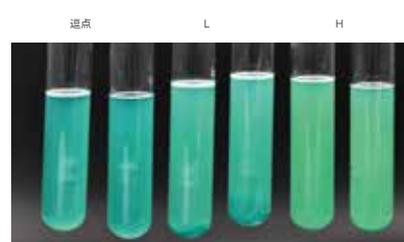
3、典型特征图片：



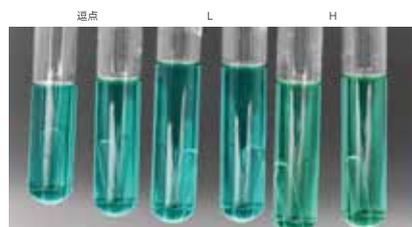
大肠埃希氏菌 ATCC 25922 逗点、L 品牌、H 品牌竞品对比



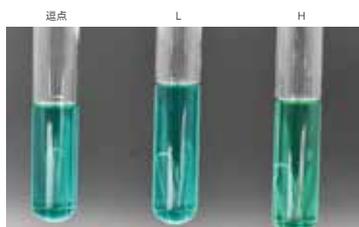
弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864 逗点、L 品牌、H 品牌竞品对比



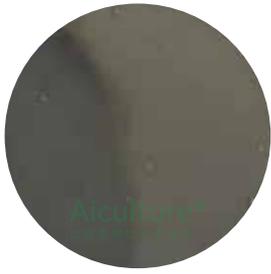
粪肠球菌 ATCC 29212 逗点、L 品牌、H 品牌竞品对比



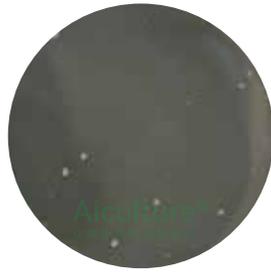
煌绿乳糖胆盐肉汤 (BGLB) 逗点、L 品牌、H 品牌竞品空白对比



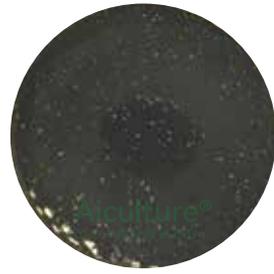
粪肠球菌 ATCC 29212 逗点、L 品牌、H 品牌竞品对比



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 2-5

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 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 感官：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。

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。

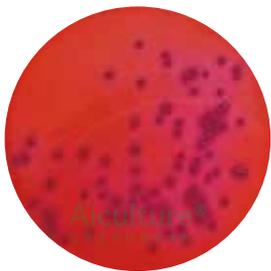


表 2-4：结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA) 验证数据

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

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；

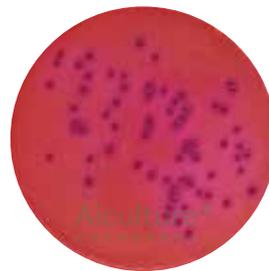
3、典型特征图片：



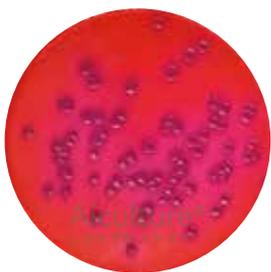
逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



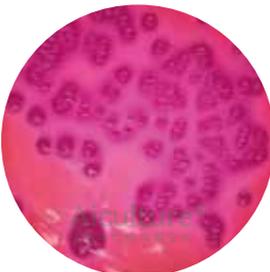
L 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



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



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

图 2-6

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。



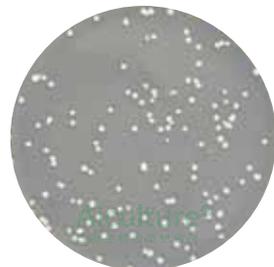
逗点酿酒酵母 ATCC9763



逗点黑曲霉 ATCC16404



逗点黑曲霉 ATCC16404



逗点酿酒酵母 ATCC9763

图 3-1

b) 稀释液的配制

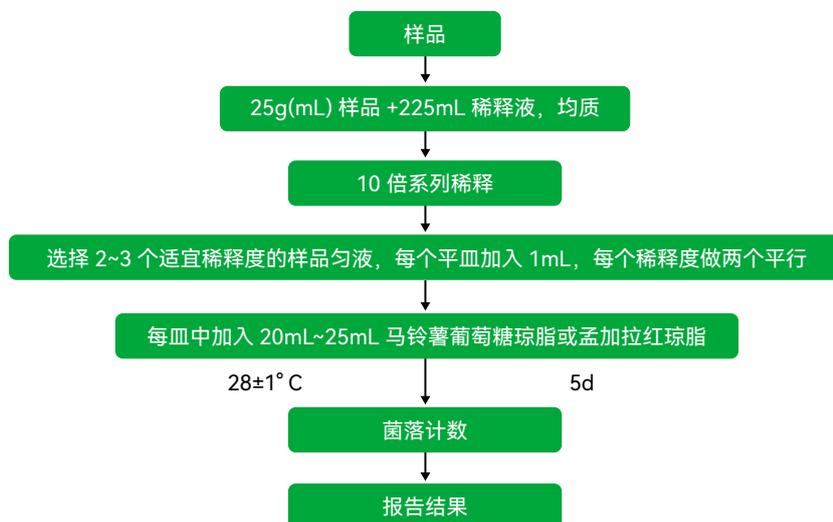
取贮存液 1.25mL，用蒸馏水稀释至 1000mL，分装至试管或三角瓶中，121°C高压灭菌 15 分钟，于 2°C -8°C保存，在一个月使用。

2.2.15 生物垃圾的处理

所有生物垃圾应经 121°C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。



流程图 3-1 霉菌和酵母的平板计数法的检验程序

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。

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 称重取样以 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。

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		不符合
	黑曲霉 ATCC16404	逗点	55	54	PR=1	PR≥0.7	符合
		L 品牌	65		PR=1.2		符合
		H 品牌	34		PR=0.6		不符合
	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；

2. 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；

3. 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；

4. 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：



逗点酿酒酵母 ATCC9763



L 品牌酿酒酵母 ATCC9763



H 品牌酿酒酵母 ATCC9763

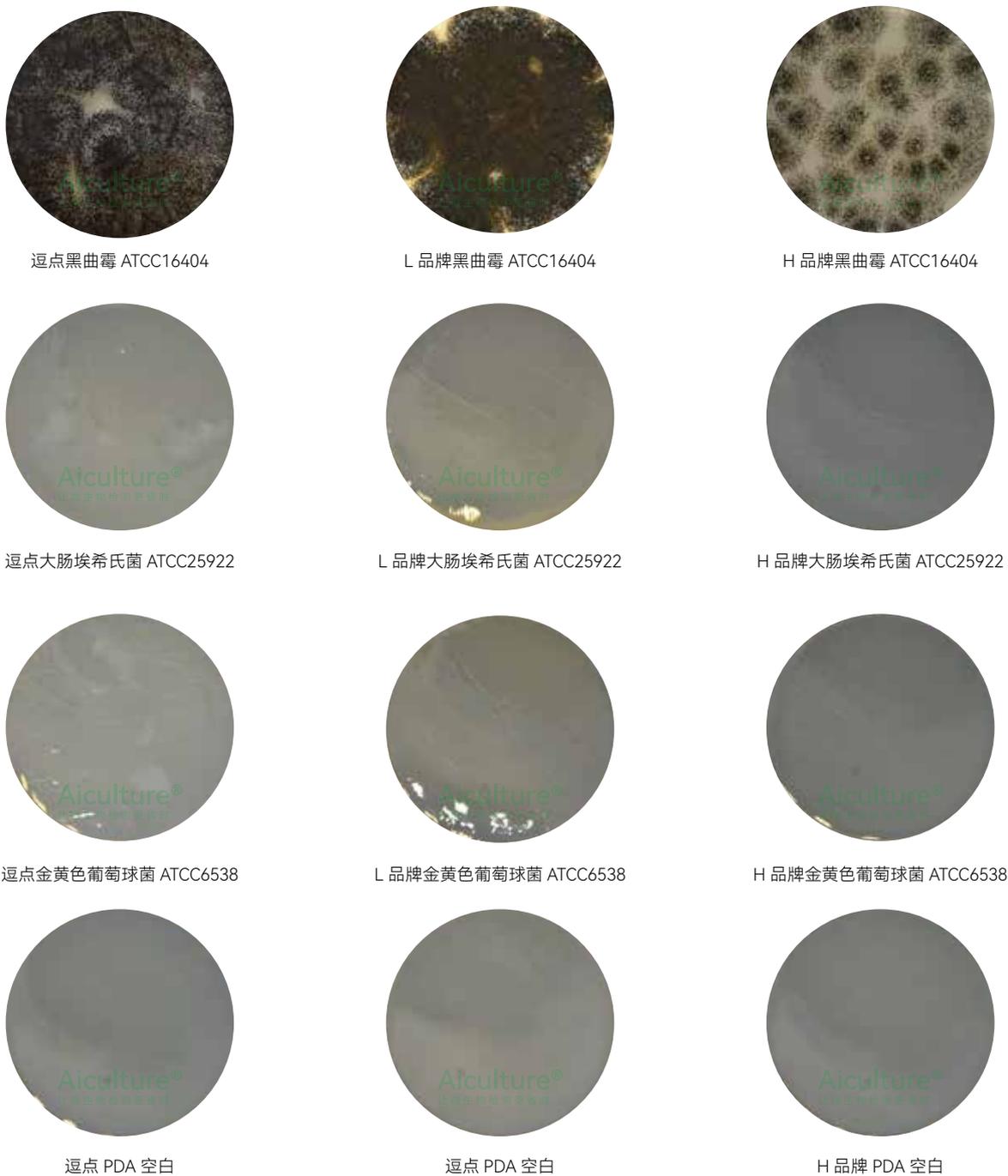


图 3-2

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 感观：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



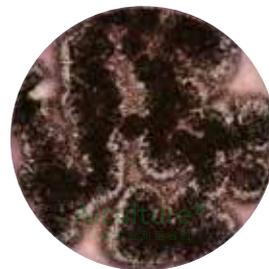
H 品牌酿酒酵母 ATCC9763



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。

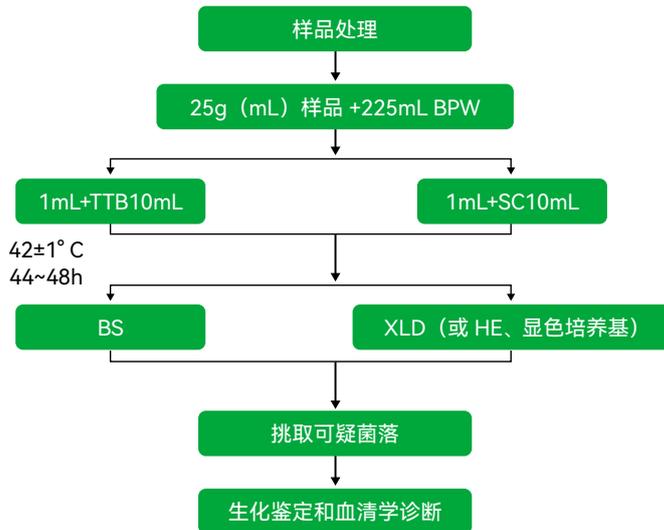
04 食品微生物检验 GB4789.4-2016 沙门氏菌检验及注意事项

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 H₂S、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



流程图 4-1 沙门氏菌检验程序

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 H₂S，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。

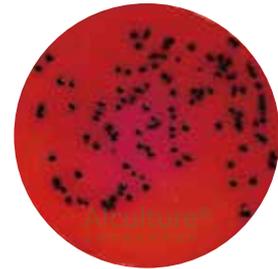
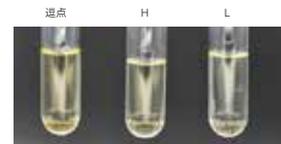
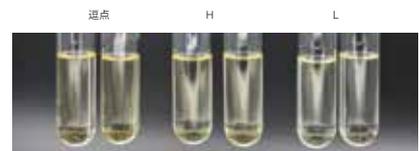


图 4-1



BPW 空白



鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028

图 4-2

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；亚硒酸氢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。

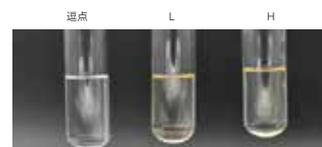


TTB 空白



逗点 - TTB 24h 后增菌现象

图 4-3

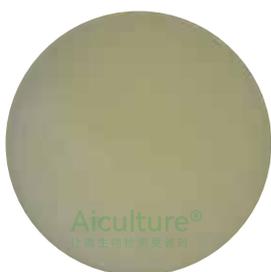


BS 空白



逗点 - BS 24h 后增菌现象

图 4-4



逗点 - 空白平板



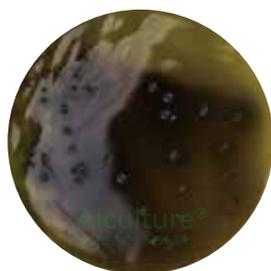
L 品牌 - 空白平板



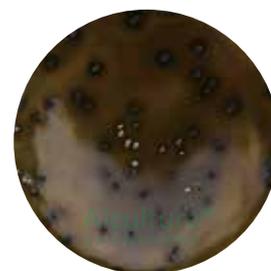
H 品牌 - 空白平板



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

图 4-5

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。

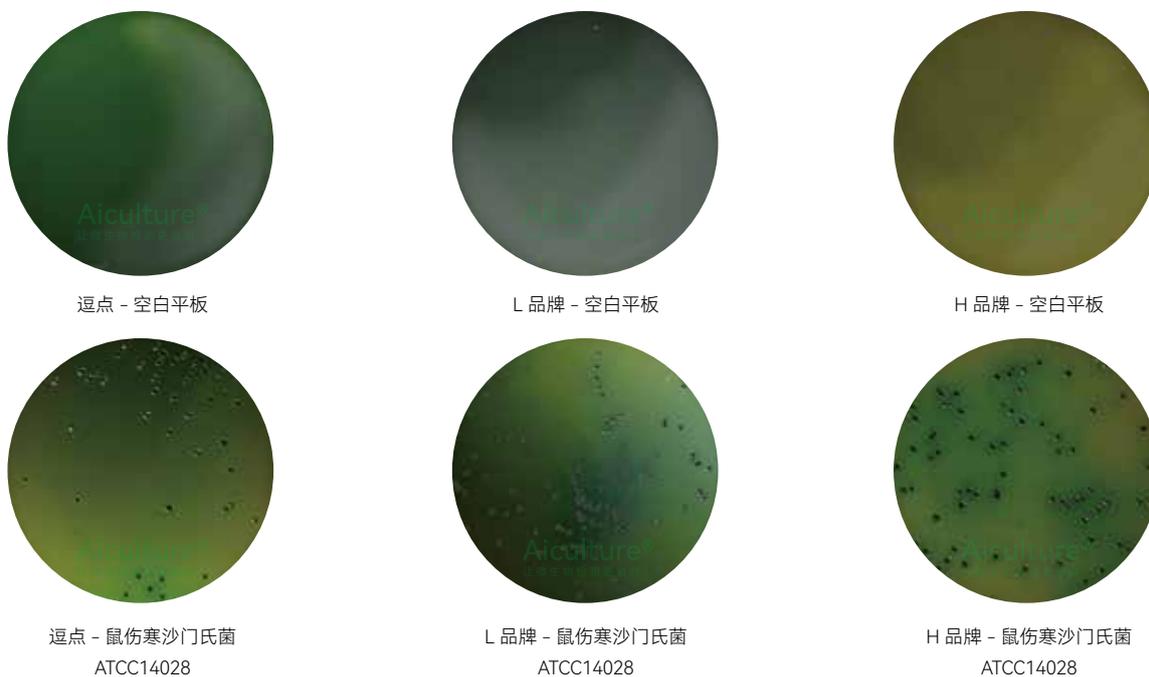


图 4-6

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。

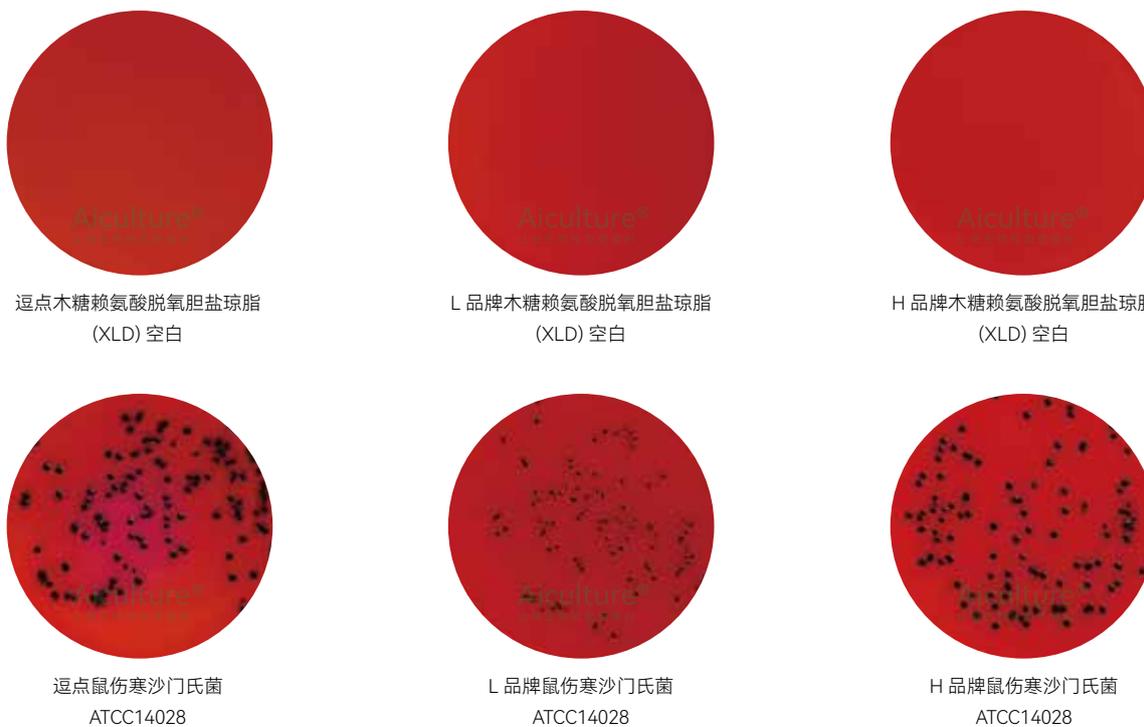


图 4-7

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。

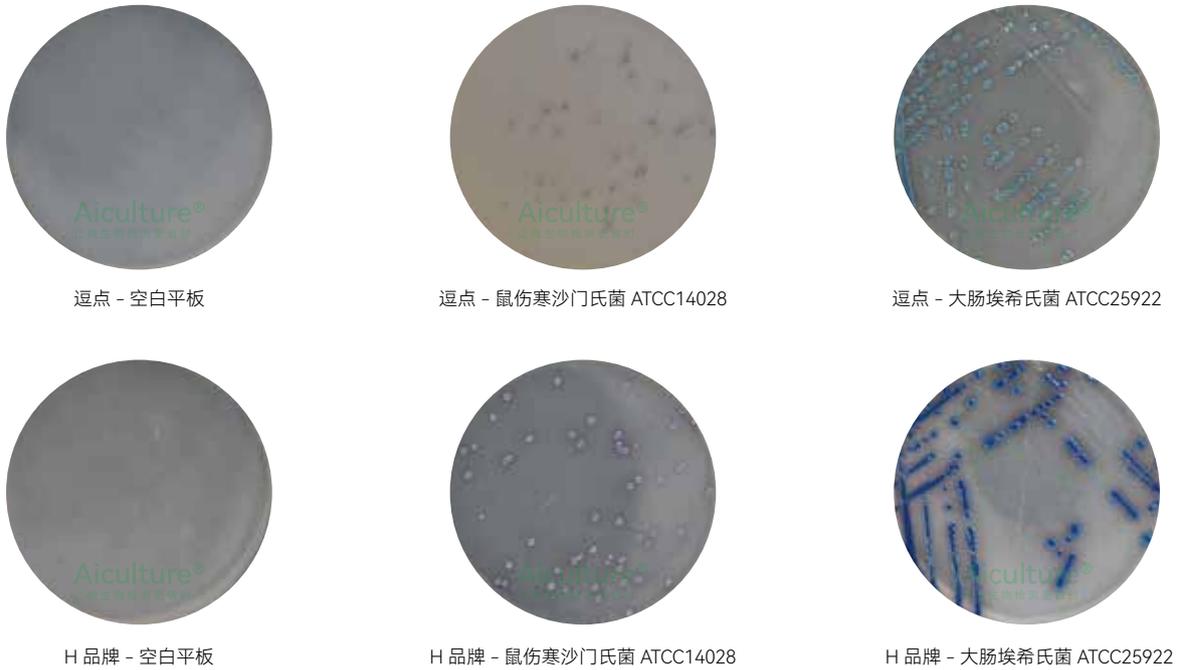


图 4-8

3.7 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。

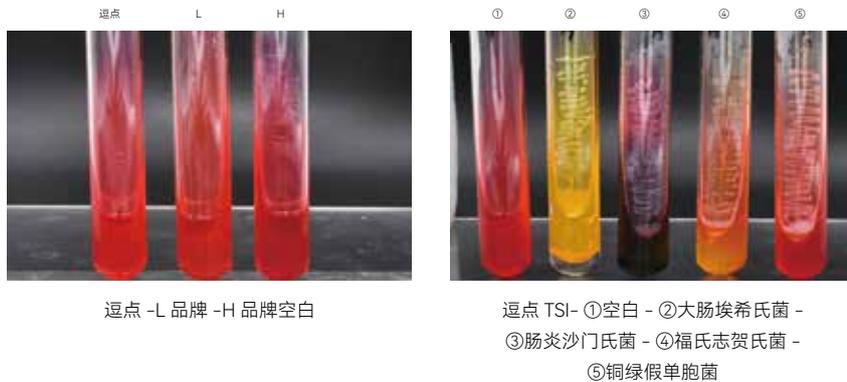


图 4-9

附录 A

缓冲蛋白胨水 (BPW) 产品验证

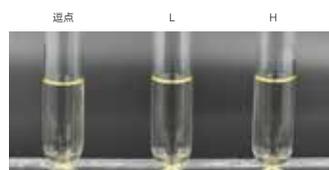


- 1、产品用途：用于食品中沙门氏菌和阪崎肠杆菌的前增菌培养。
- 2、检验原理：蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；磷酸二氢钾和磷酸氢二钠是缓冲剂。

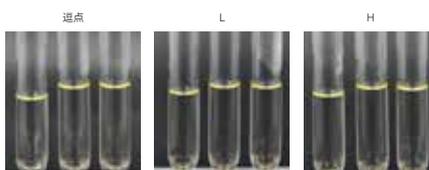
表 4-1：缓冲蛋白胨水 (BPW) 验证

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 (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：



BPW 空白



BPW- 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



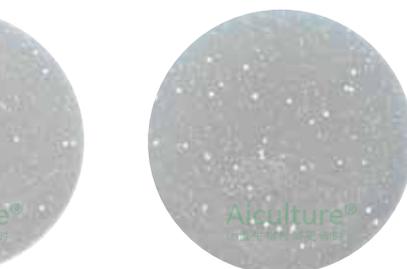
逗点 -BPW 增菌后计数



接菌液计数 (鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028)



H 品牌 -BPW 增菌后计数



L 品牌 -BPW 增菌后计数

图 4-10

4、验证结果小结：

- 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；
- 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。

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	菌液浓度计数 (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
		L 品牌	0		< 100		符合
		H 品牌	0		< 100		符合
	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	0	多不可计	< 100		符合
		L 品牌	0		< 100		符合
		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、L 品牌、H 品牌 TTB 空白



逗点 -TTB 增菌现象



逗点 -TTB24H 后增菌现象



L 品牌 -TTB24H 增菌



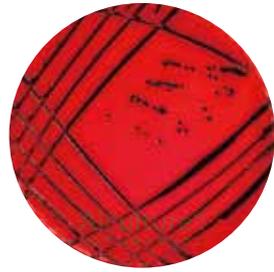
H 品牌 -TTB24H 增菌



逗点 TTB 混菌划线 XLD



L 品牌 TTB 混菌划线 XLD



H 品牌 TTB 混菌划线 XLD



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



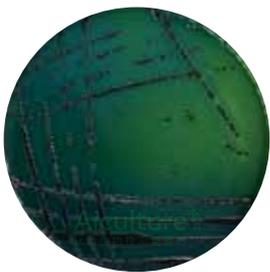
逗点 - 粪肠球菌 ATCC29212



L 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



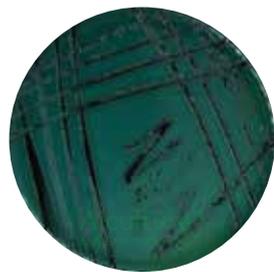
H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



逗点 TTB 混菌划线 HE



L 品牌 TTB 混菌划线 HE



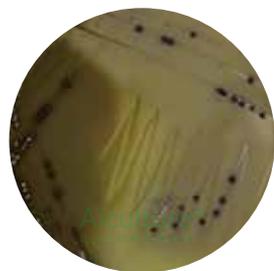
H 品牌 TTB 混菌划线 HE



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 4-11

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 感观：逗点、H 品牌空白管无明显差异，L 品牌颜色偏深一些。

4.4 三家产品无明显差距。

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	菌液浓度计数 (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 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922 + 铜绿假单胞菌 ATCC27853	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
		L 品牌	81		在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明，有黑心		符合
		H 品牌	56		在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明，有黑心		符合
		逗点	8	多不可计	< 100	在 TSA 上 < 100CFU	符合
		L 品牌	9575		> 100		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；

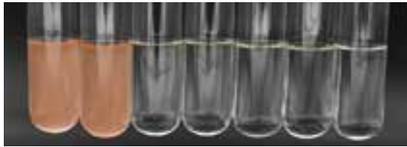
2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在亚硒酸盐胱氨酸增菌液 (SC) 上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；

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：



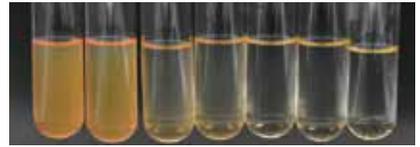
空白



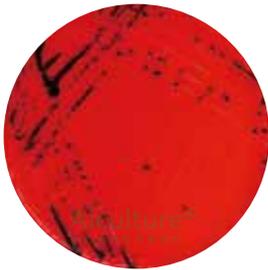
逗点 -SC 增菌后现象



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



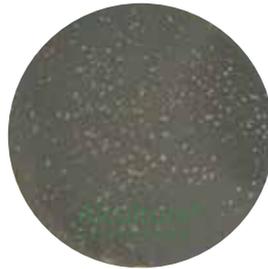
L 品牌 SC 混菌划线 XLD



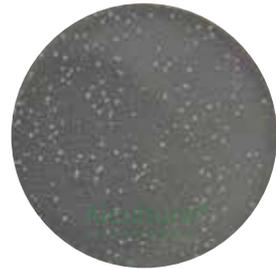
H 品牌 SC 混菌划线 XLD



逗点 - 大肠埃希氏菌
ATCC25922



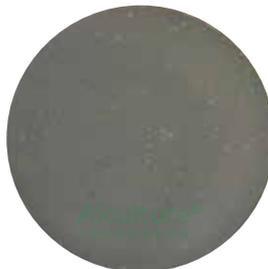
逗点 - 大肠埃希氏菌
ATCC25922



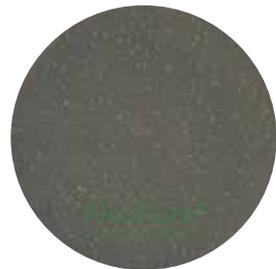
H 品牌 - 大肠埃希氏菌
ATCC25922



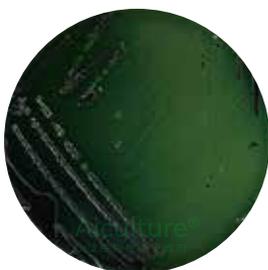
逗点 - 粪肠球菌 ATCC29212



L 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



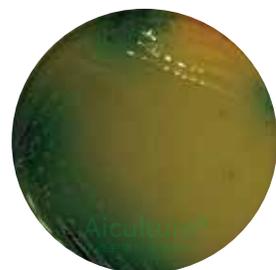
H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



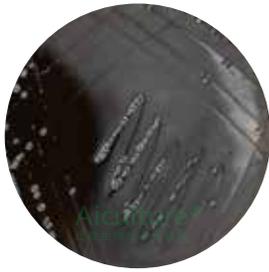
逗点 SC 混菌划线 HE



L 品牌 SC 混菌划线 HE



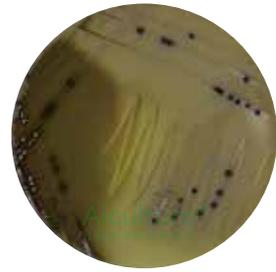
H 品牌 SC 混菌划线 HE



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 4-12

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 感观：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



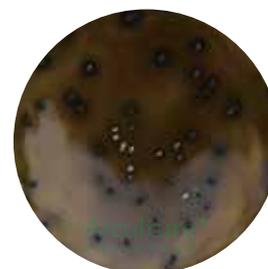
H 品牌 - 空白平板



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

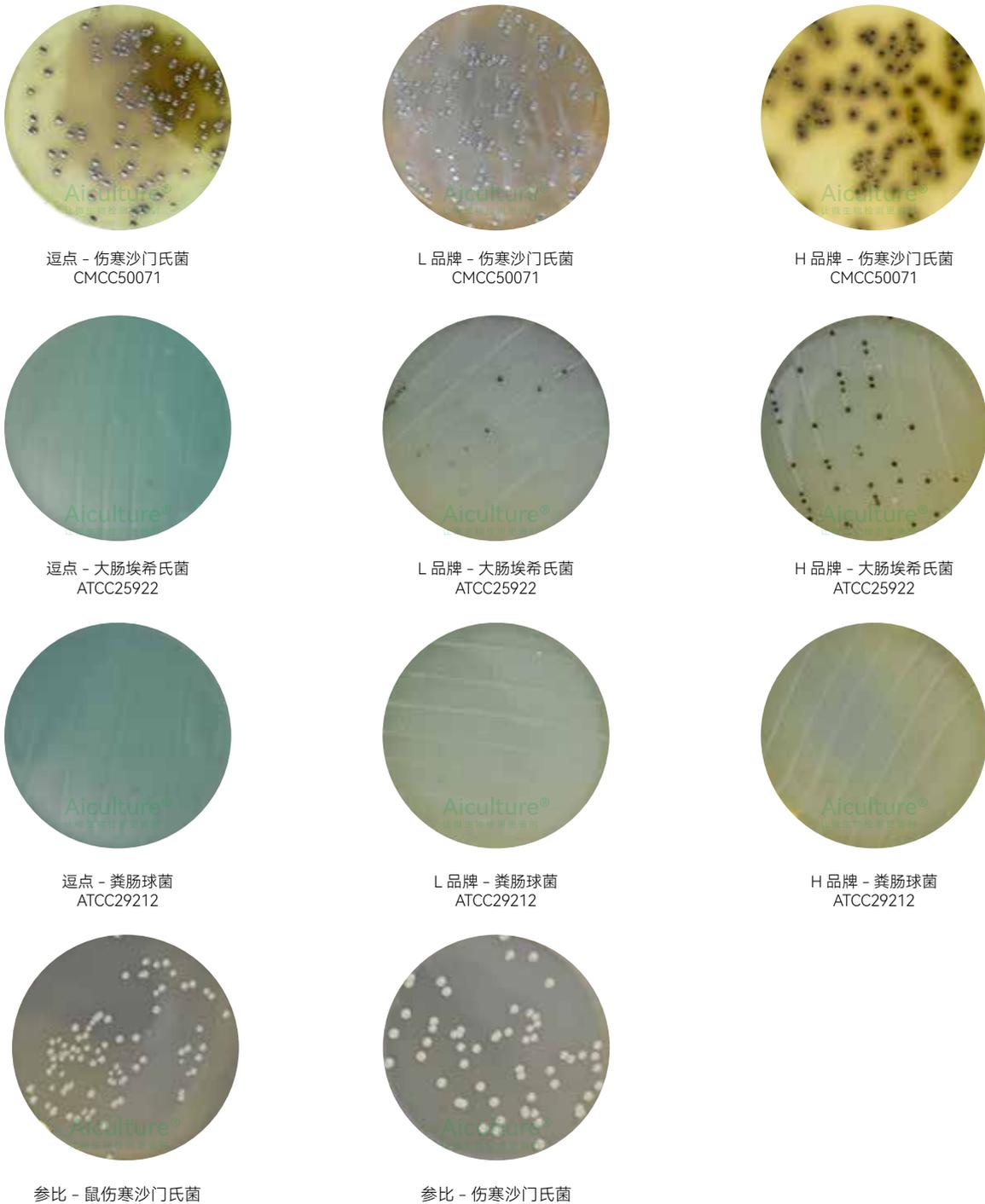


图 4-13

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028：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	菌液浓度计数 (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：



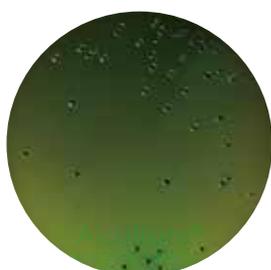
逗点 - 空白平板



L 品牌 - 空白平板



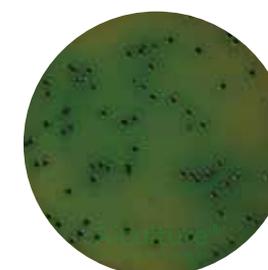
H 品牌 - 空白平板



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

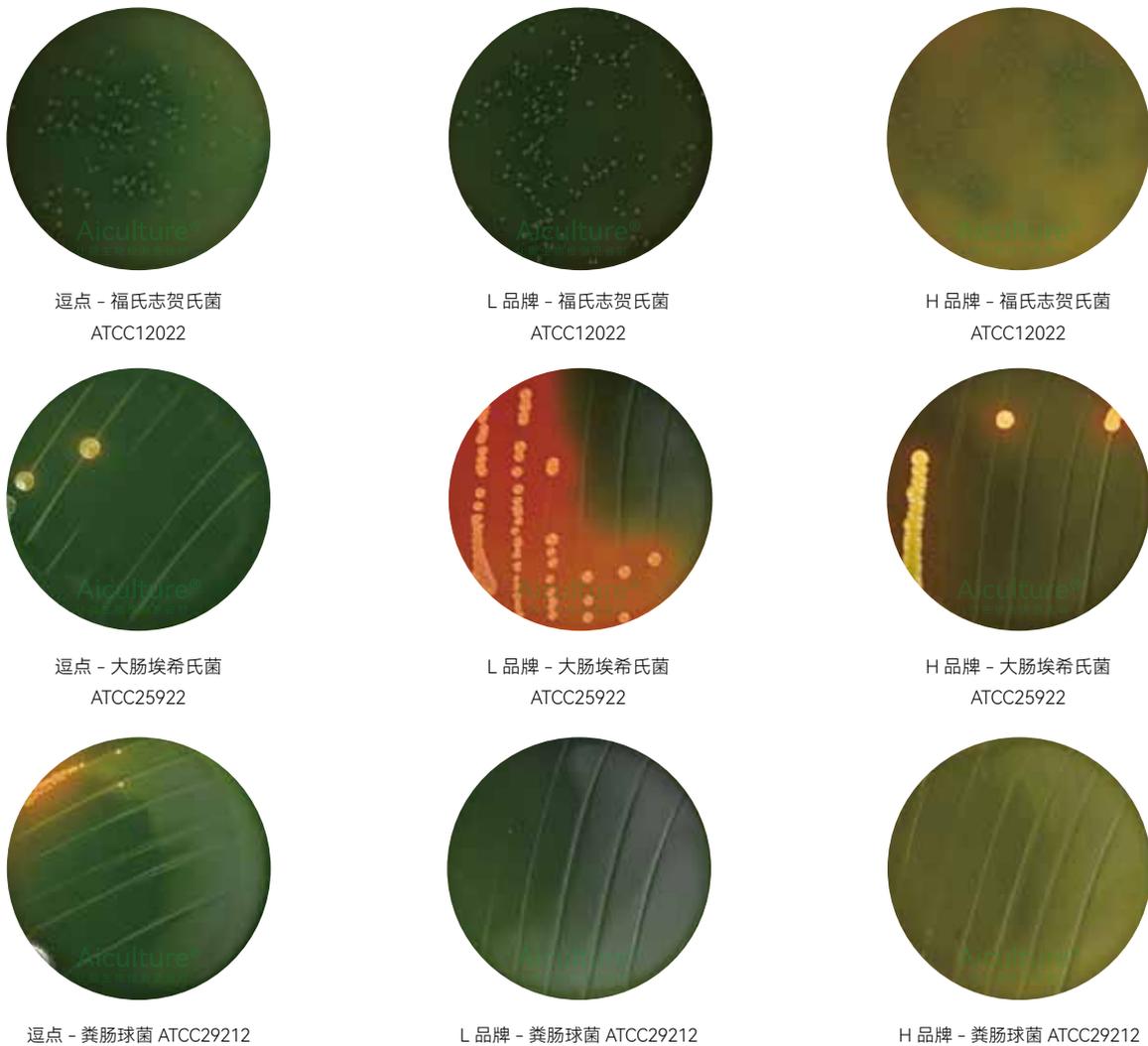


图 4-14

4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、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 感观：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	菌液浓度计数 (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 ATCC12022	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 ATCC25922	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；

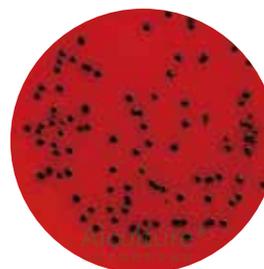
3、典型特征图片：



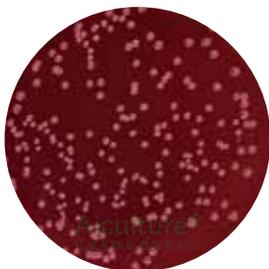
逗点鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



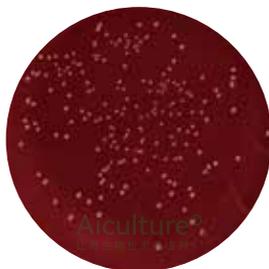
L 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



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

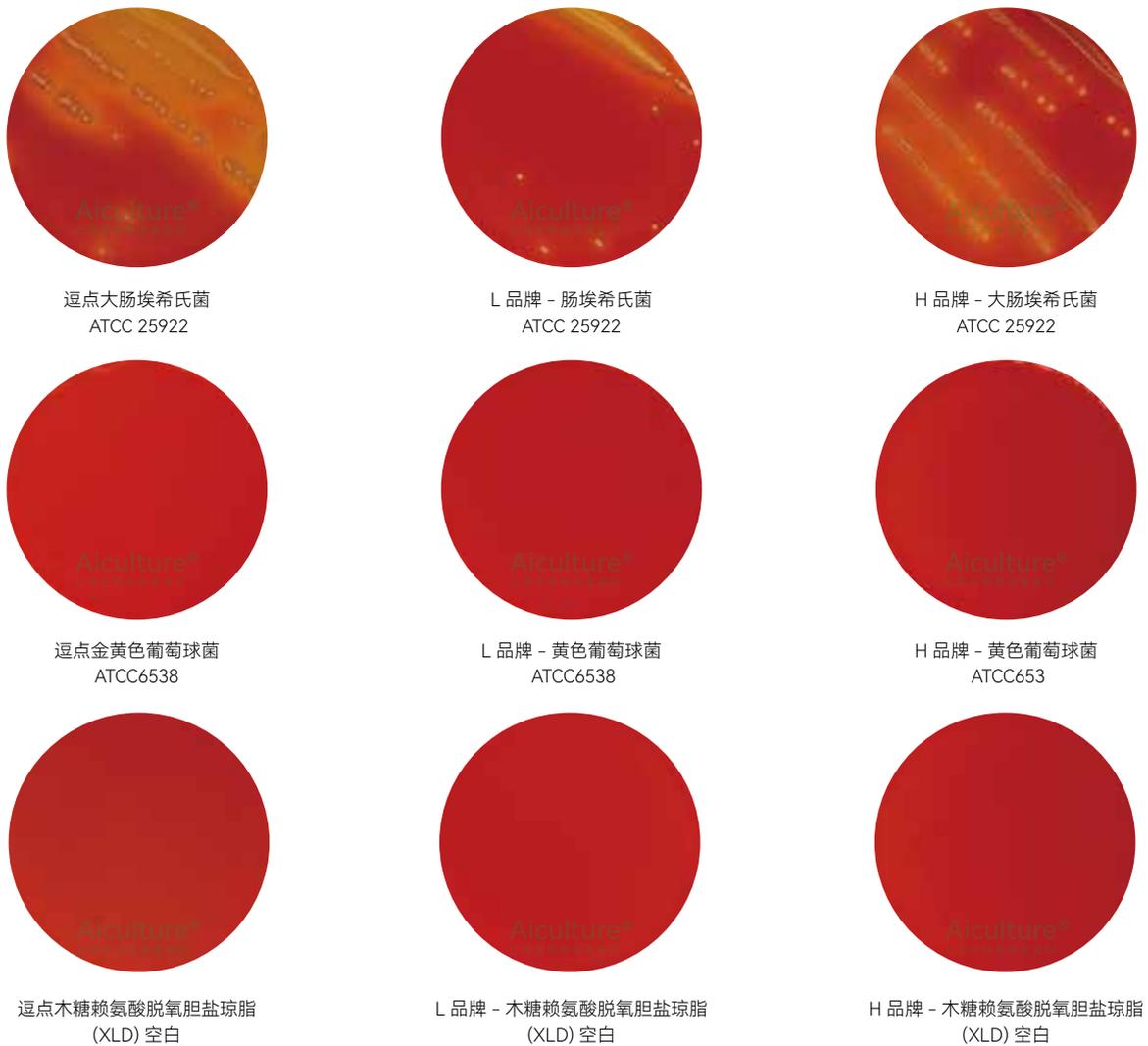


图 4-15

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	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 ATCC14028	逗点	45	76	0.5	PR≥0.5	符合
		H 品牌	64		0.8	PR≥0.5	符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	蓝色菌落	蓝色菌落	符合
		H 品牌	/		蓝色菌落	蓝绿色菌落	符合
	奇异变形杆菌 CMCC(B)49005	逗点	/	/	无色，淡紫色	无色，淡褐色菌落	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≤1	符合
		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；

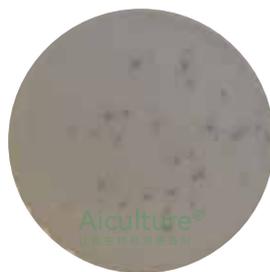
3、典型特征图片：



逗点 - 空白平板



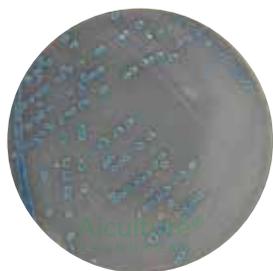
H 品牌 - 空白平板



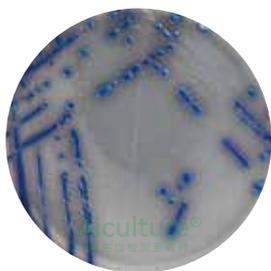
逗点 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



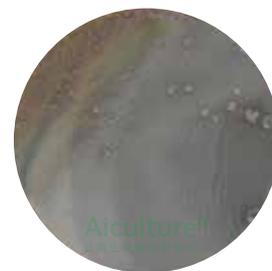
逗点 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点 - 奇异变形杆菌
CMCC(B)49005



逗点 -24h 后奇异变形杆菌
CMCC(B)49005

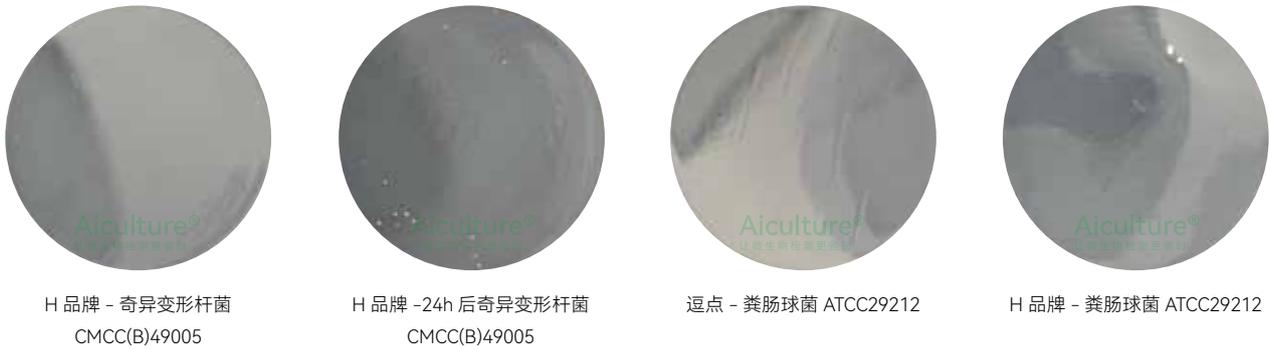


图 4-16

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

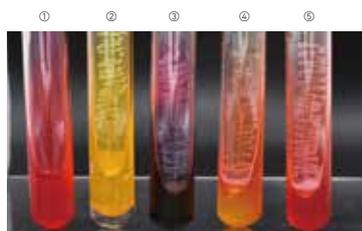
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
三糖铁琼脂 (TSI)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢	符合
		L 品牌	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢		符合
		H 品牌	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢		符合
	伤寒沙门氏菌 CMCC (B) 50335	逗点	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢;	符合
		L 品牌	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢		符合
		H 品牌	/	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. 伤寒沙门氏菌 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：



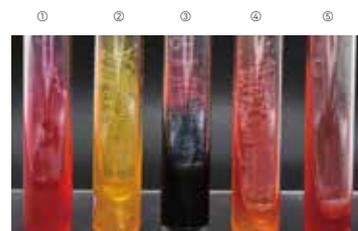
空白



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 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、肠炎沙门氏菌 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 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。

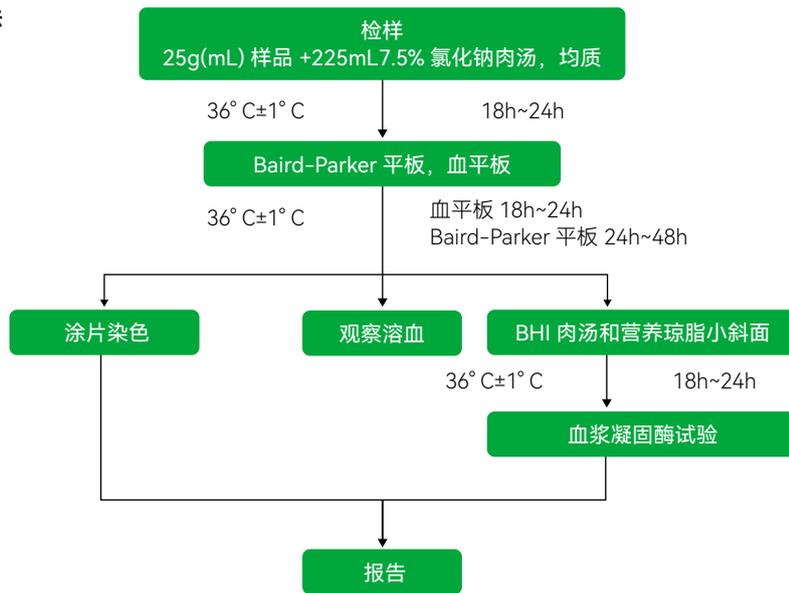
05 食品微生物检验 GB4789.10-2016 金黄色葡萄球菌的检验及注意事项

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*) 是人类一种重要的病原菌，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



流程图 5-1 金黄色葡萄球菌检验程序

2.1.1 操作步骤

2.1.1.1 样品的处理

称取 25g 样品至盛有 225mL7.5% 氯化钠肉汤无菌均质杯内，8000r/min~10000r/min 均质 1min~2min，或放入盛有 225mL7.5% 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 225mL7.5% 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

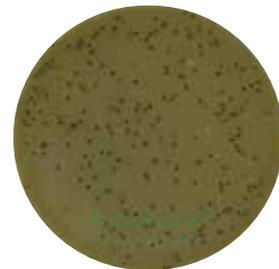
将上述样品匀液于 36℃ ± 1℃ 培养 18h~24h。金黄色葡萄球菌在 7.5% 氯化钠肉汤中呈混浊生长。

· 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。



金黄色葡萄球菌 ATCC12228

图 5-1

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,无芽胞,无荚膜,直径约为 $0.5\mu\text{m}\sim 15\mu\text{m}$ 。

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 5mLBHI 和营养琼脂小斜面, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 5mLBHI, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18h~48h,重复试验。



金黄色葡萄球菌 ATCC 6538

图 5-2

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:

$36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 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。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, $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 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 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 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。



流程图 5-2 金黄色葡萄球菌平板计数法检验程序

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. 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。

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

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。

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

式中 (2):

- T——样品中金黄色葡萄球菌菌落数；
- 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）鉴定为阳性的菌落数；
- C₁——第一稀释度（低稀释倍数）用于鉴定试验的菌落数；
- 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）鉴定为阳性的菌落数；
- C₂——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）。

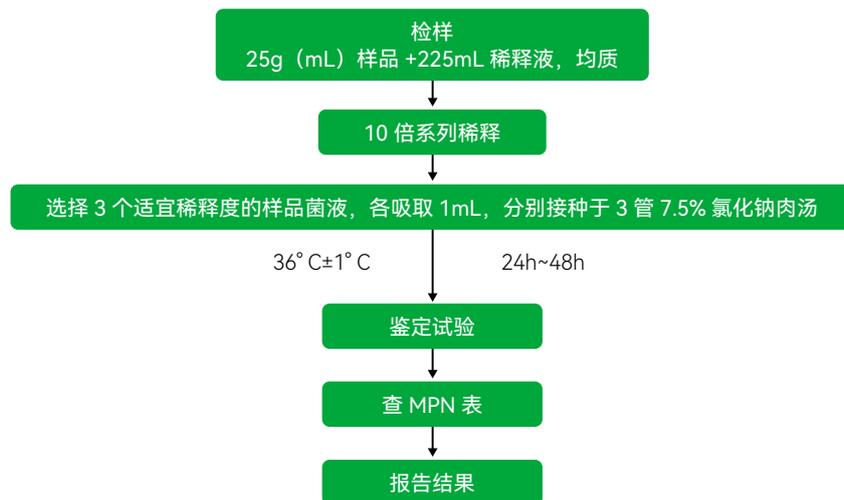
2.2.4 结果报告

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±1℃ 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



流程图 5-3 金黄色葡萄球菌 MPN 法检验程序

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1 mL,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1 mL, $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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差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。



7.5% 氯化钠肉汤空白竞品比对

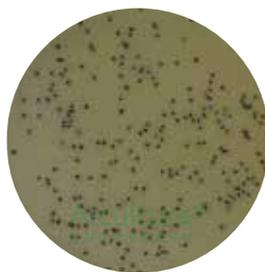
图 5-3

3.2 Baird-Parker 琼脂基础

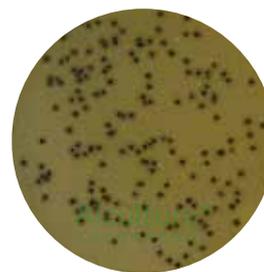
胰蛋白胨、牛肉膏粉和酵母膏粉提供碳氮源、维生素和生长因子;丙酮酸钠和甘氨酸刺激葡萄球菌的生长;氯化锂和亚碲酸钾抑制非葡萄球菌的微生物;含有卵磷脂酶的葡萄球菌降解卵黄使菌落产生透明圈,而脂酶作用则产生不透明的沉淀环;凝固酶阳性的葡萄球菌还能还原亚碲酸钾而产生黑色菌落;琼脂是培养基的凝固剂。



逗点金黄色葡萄球菌 ATCC12228



L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC12228

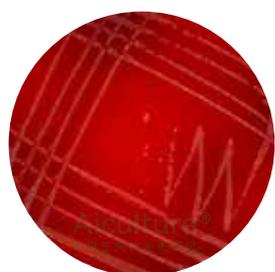


H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC12228

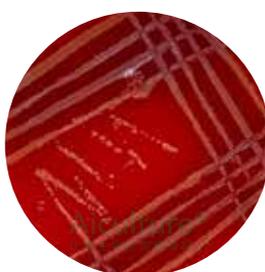
图 5-4

3.3 血琼脂平板

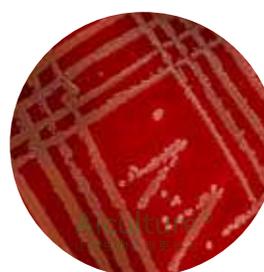
酪蛋白胰酶消化物、心胰酶消化物、肉胃酶消化物、酵母浸出粉、可溶性淀粉提供碳氮源、维生素和生长因子;羊血是细菌生长繁殖的良好营养物质。在 $45 \sim 50^{\circ}\text{C}$ 的基础培养基中加入血液可以保存血液中某些不耐热的生长因子,同时血球不被破坏。



逗点金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538

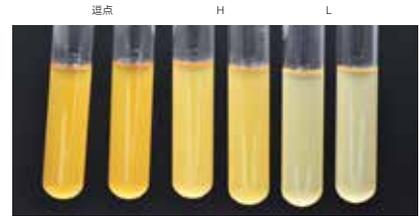


H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538

图 5-5

3.4 脑心浸出液肉汤 (BHI)

胰蛋白质胨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 5-6

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。



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

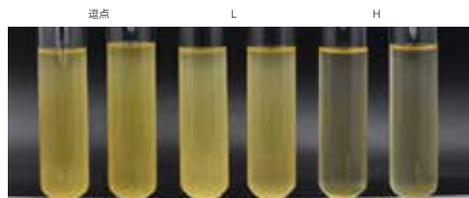
1. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 7.5% 氯化钠肉汤上的菌落特征：菌落黑色凸起，周围有一混浊带，在其外层有一透明圈；

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；

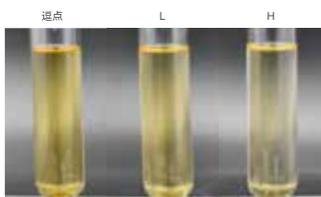
3、典型特征图片：



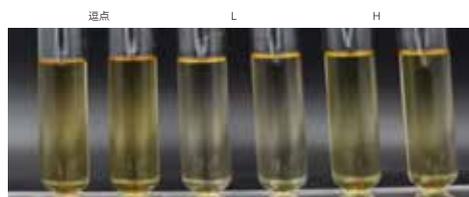
逗点 7.5% 氯化钠肉汤增菌后现象



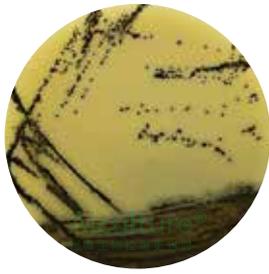
金黄色葡萄球菌 ATCC6538+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922 7.5% 氯化钠肉汤竞品对比



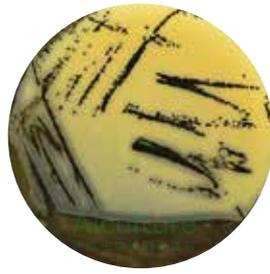
7.5% 氯化钠肉汤空白竞品对比



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



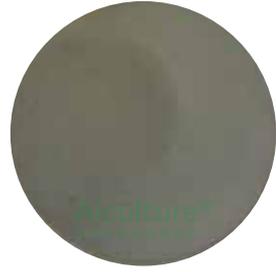
H 品牌混菌划线 BP



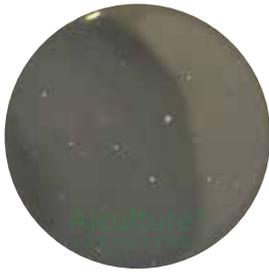
逗点大肠埃希氏菌倾注 TSA



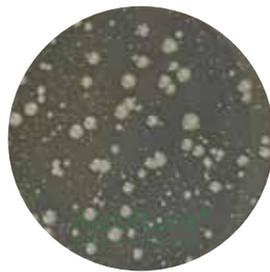
L 品牌大肠埃希氏菌倾注 TSA



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 5-7

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。

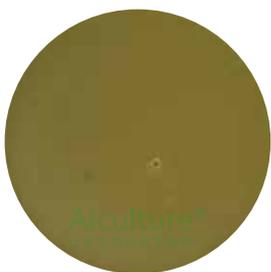


表 5-2：Baird-Parker 琼脂验证

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



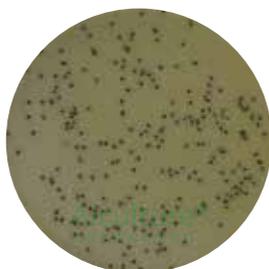
L 品牌空白平板



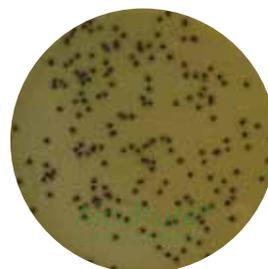
H 品牌空白平板



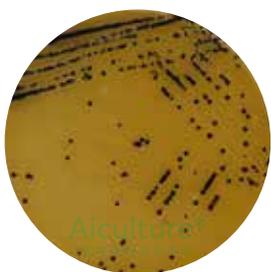
逗点金黄色葡萄球菌 ATCC12228



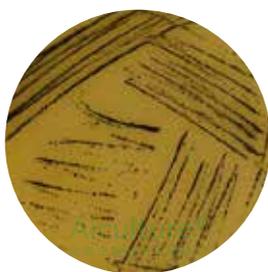
L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC12228



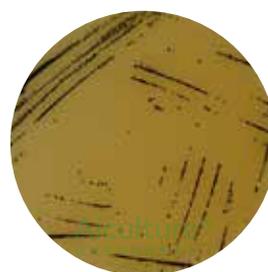
H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC12228



逗点表皮葡萄球菌 ATCC12228



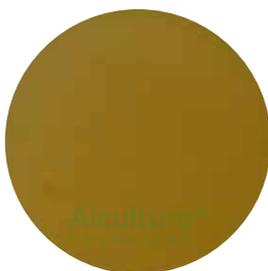
L 品牌表皮葡萄球菌 ATCC12228



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 5-8

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

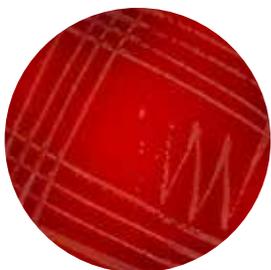
- 1. 产品用途：加入脱纤维羊血或兔血，制成血液琼脂培养基，用于营养要求较高的细菌的培养及溶血试验。
- 2. 检验原理：蛋白胨提供碳氮源、维生素和生长因子；氯化钠维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂。

表 5-3：血液琼脂基础验证

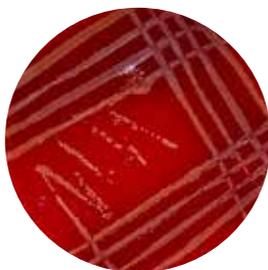


样品名称	质控菌株	厂家	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
血液琼脂基础	金黄色葡萄球菌 ATCC 6538	逗点	菌落周围有 β 溶血环	菌落周围有 β 溶血环	符合
		L 品牌	菌落周围有 β 溶血环		符合
		H 品牌	菌落周围有 β 溶血环		符合
	蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303	逗点	菌落周围有 α 溶血环	菌落周围有 α 溶血环	符合
		L 品牌	菌落周围有 α 溶血环		符合
		H 品牌	菌落周围有 α 溶血环		符合

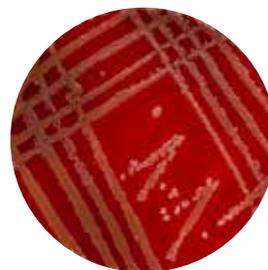
3、典型特征图片：



逗点金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



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)



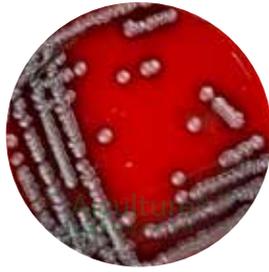
L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538
(反面)



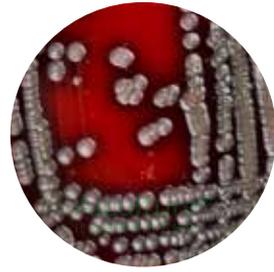
H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538
(反面)



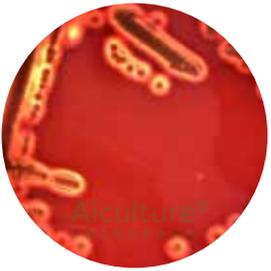
逗点蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303



L 品牌蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303



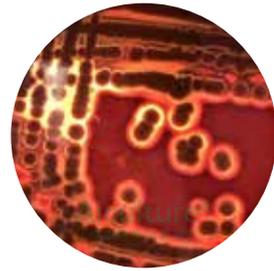
H 品牌蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303



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 5-9

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：胰蛋白质胨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。



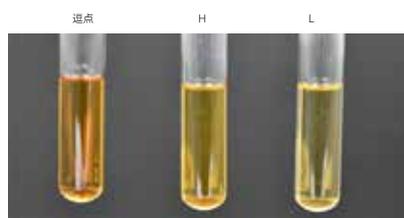
表 5-4：脑心浸出液肉汤 (BHI) 验证数据

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

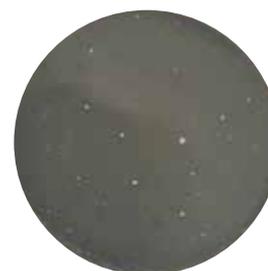
3、典型特征图片：



金黄色葡萄球菌 ATCC6538 BHI 竞品对比



脑心浸出液肉汤 (BHI) 竞品空白对比



计数金黄色葡萄球菌 ATCC 6538

图 5-10

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

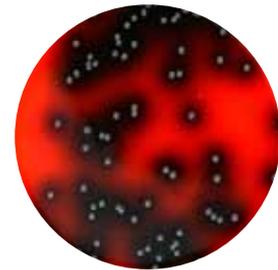
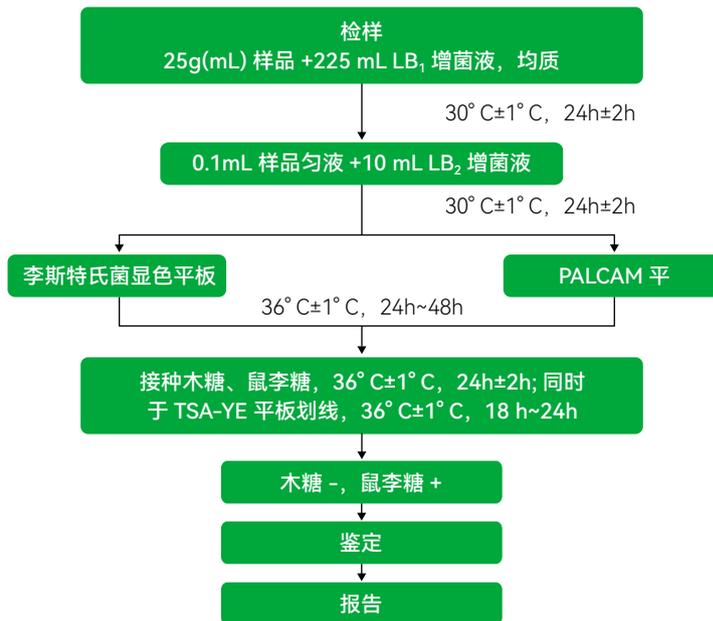


图 6-1

流程图 6-1 单核细胞增生李斯特氏菌定性检验程序

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 LB₁ 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 LB₁ 增菌液的均质杯中，以 8000r/min~10000r/min 均质 1min~2min。于 30 °C ±1 °C 培养 24h±2h，移取 0.1mL，转种于 10mL LB₂ 增菌液内，于 30 °C ±1 °C 培养 24h±2h。

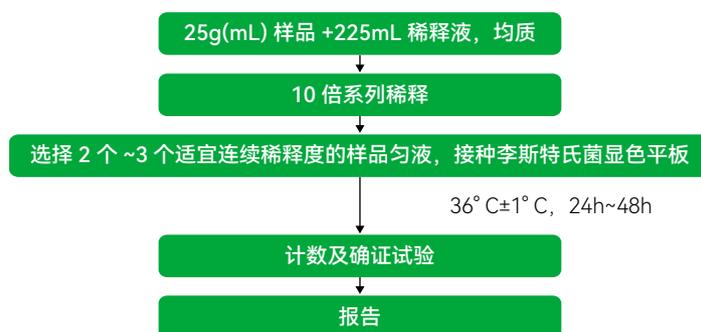
2.1.1.2 分离

取 LB₂ 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 °C ±1 °C 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 °C ±1 °C 培养 24h±2h，同时在 TSA-YE 平板上划线，于 36 °C ±1 °C 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



流程图 6-2 单核细胞增生李斯特氏菌平板计数程序

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 个 ~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°C ~50°C 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°C ±1°C 培养 1h; 等样品匀液吸收后翻转平皿, 倒置于培养箱, 36°C ±1°C 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:

- 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;
- 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;
- 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;
- 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;
- 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）。

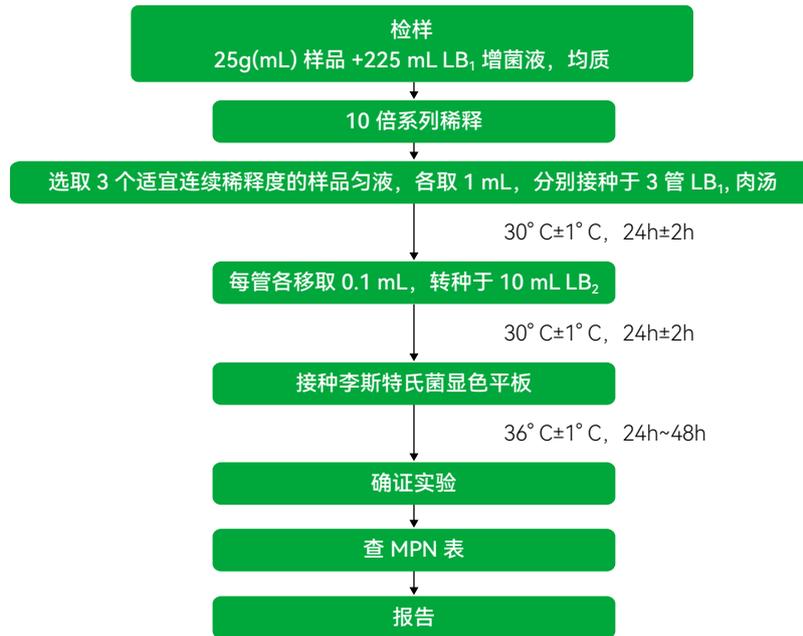
$$T = \frac{A_1 B_1 / C_1 + A_2 B_2 / C_2}{1.1d}$$

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



流程图 6-3 单核细胞增生李斯特氏菌 MPN 计数程序

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 LB₁ 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 LB₁ 增菌液）于 30℃ ±1℃ 培养 24h±2h。每管各移取 0.1mL，转种于 10mL LB₂ 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℃。

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% 置信区间		阳性管数			MPN	95% 置信区间	
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) 和 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)、0.0001g(mL) 时，则表内数字应相应增高 10 倍，其余类推。

三、培养基原理解析

3.1 李氏增菌肉汤 (LB₁, LB₂) 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。

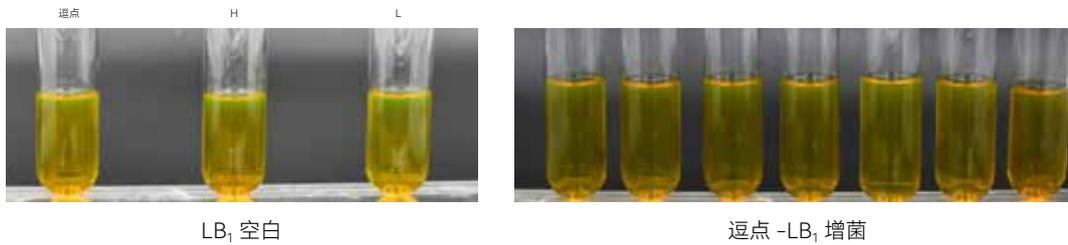


图 6-2

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。

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。

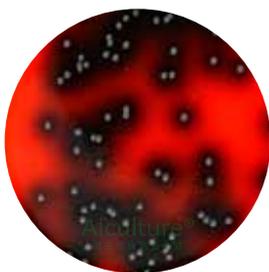
疑点：乳白色脂肪沉淀环扩散覆盖其他菌落时极易引起假阳性。

3.4 含 0.6% 酵母浸膏的胰酪胨大豆琼脂 (TSA-YE)

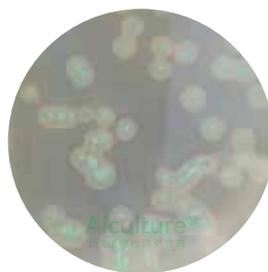
TSA-YE 培养基检验原理：胰胨、多价胨和酵母膏粉提供氮源、维生素和生长因子；氯化钠维持均衡的渗透压；葡萄糖提供碳源；磷酸氢二钾为缓冲剂；琼脂是培养基的凝固剂。

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)

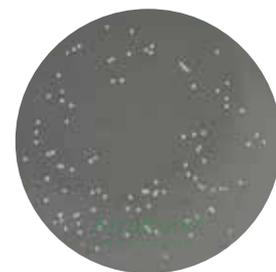
含 0.6% 酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤 (TSB-YE) 培养基检验原理：胰胨、多价胨和酵母膏粉提供氮源、维生素和生长因子；氯化钠维持均衡的渗透压；葡萄糖提供碳源；磷酸氢二钾为缓冲剂；萘啶酮酸和盐酸吡啶黄为选择性抑菌剂，抑制非李斯特氏菌生长。



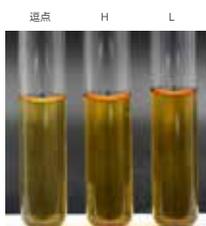
单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115



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 form 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 10^7 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 (LB₁) 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：LB₁ 验证

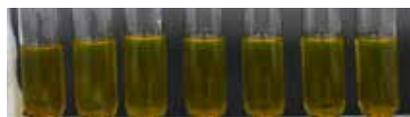
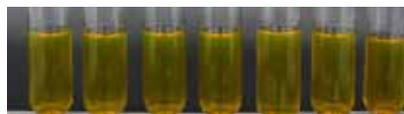
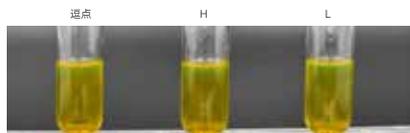
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	接种计数培养基 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
LB ₁	单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922+ 粪肠球菌 ATCC29212	逗点	/	多不可计	在 PALCAM 上 > 10CFU， 培养基变黑色	在 PALCAM 上 > 10CFU， 培养基变黑色	符合
		L 品牌	/		在 PALCAM 上 > 10CFU， 培养基变黑色		符合
		H 品牌	/		在 PALCAM 上 > 10CFU， 培养基变黑色		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	0	3980	< 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 LB₁ 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 LB₁ 增菌上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；

3. 粪肠球菌 ATCC 29212 在 LB₁ 增菌上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；

3、典型特征图片：



L 品牌 -LB₁ 增菌

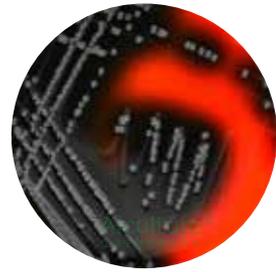
H 品牌 -LB₁ 增菌



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



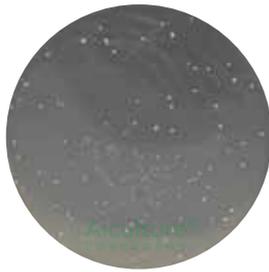
L 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC 25922



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 在李斯特菌显色培养基上的菌落特征：G ≤ 1。

3、典型特征图片：

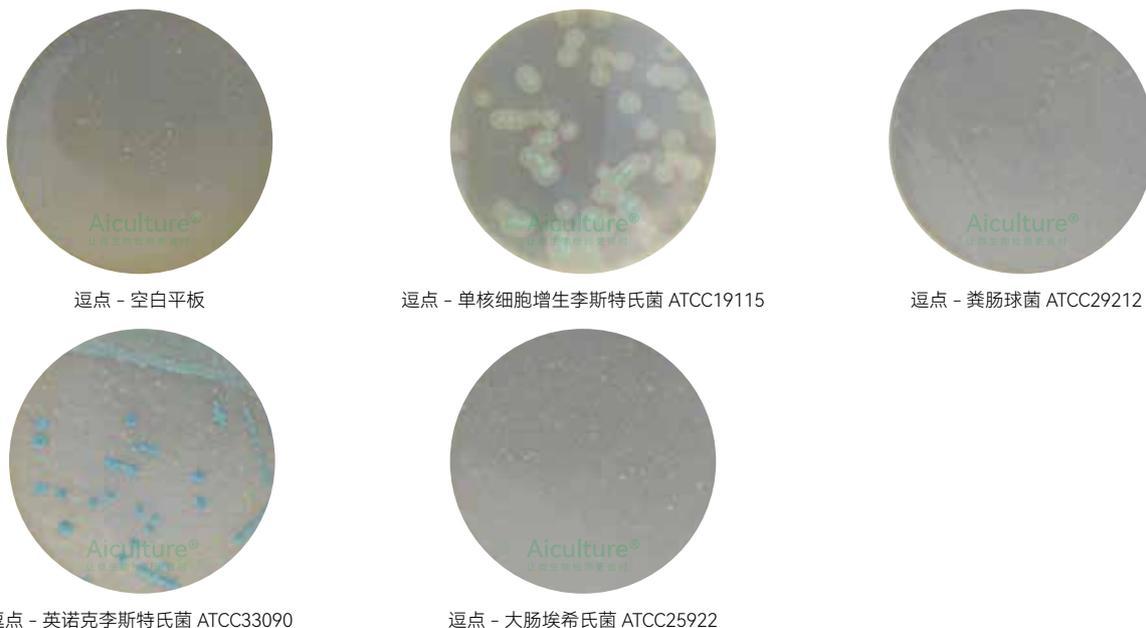


图 6-5

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标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



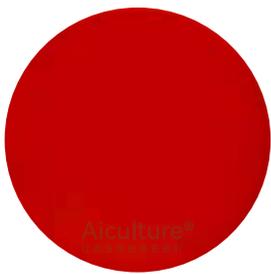
- 1、产品用途：用于单核细胞增生李斯特氏菌的选择性分离培养。
- 2、检验原理：蛋白胨提供生长必须的碳氮源；酵母膏粉和淀粉提供碳氮源、维生素和生长因子；氯化钠可维持均衡的渗透压；葡萄糖提供碳源；李斯特氏菌水解七叶苷与铁离子反应形成黑色的 6,7- 二羟基香豆素；甘露醇是可发酵的糖，酚红是 pH 指示剂；氯化锂和其它的抗生素能抑制革兰氏阴性菌和大多数革兰氏阳性菌；琼脂是培养基的凝固剂。

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：



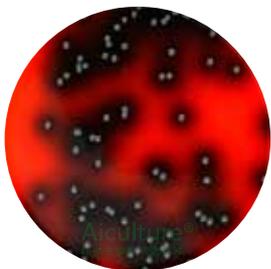
逗点 - 空白平板



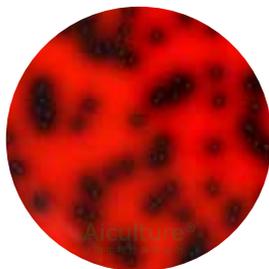
L 品牌 - 空白平板



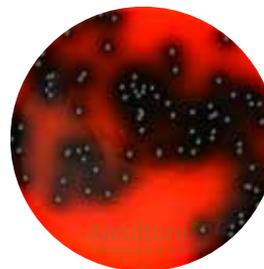
B 品牌 - 空白平板



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



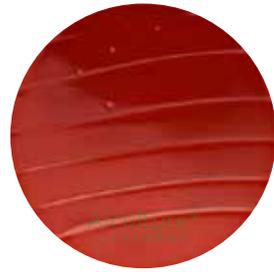
B 品牌 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115



逗点 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



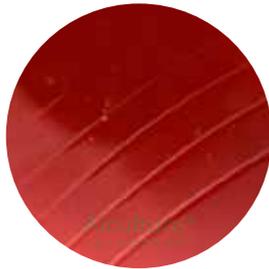
L 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



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；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
		B 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



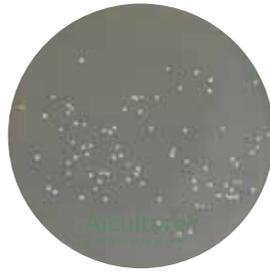
L 品牌 - 空白平板



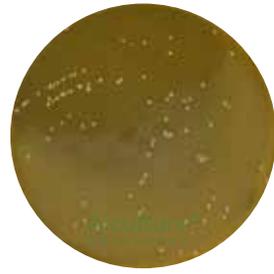
B 品牌 - 空白平板



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



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 观感：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。

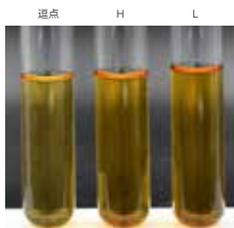
2、检验原理：胰酪、多价胨和酵母膏粉提供氮源、维生素和生长因子；氯化钠维持均衡的渗透压；葡萄糖提供碳源；磷酸氢二钾为缓冲剂；萘啶酮酸和盐酸吡啶黄为选择性抑菌剂，抑制非李斯特氏菌生长。

表 6-6：TSB-YE 验证

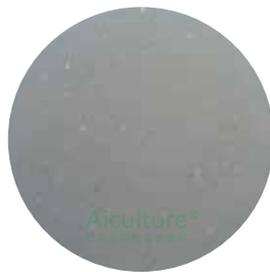
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
TSB-YE	单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115	逗点	/	89	混浊度 2	混浊度 2	符合
		L 品牌	/		混浊度 2		符合
		B 品牌	/		混浊度 2		符合

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；

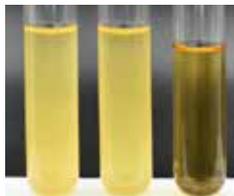
3、典型特征图片：



空白肉汤



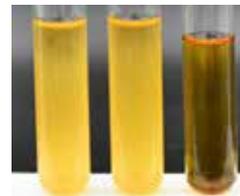
菌液计数 - 单核细胞增生李斯特氏菌



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 ATCC1911



H 品牌 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115

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 观感：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

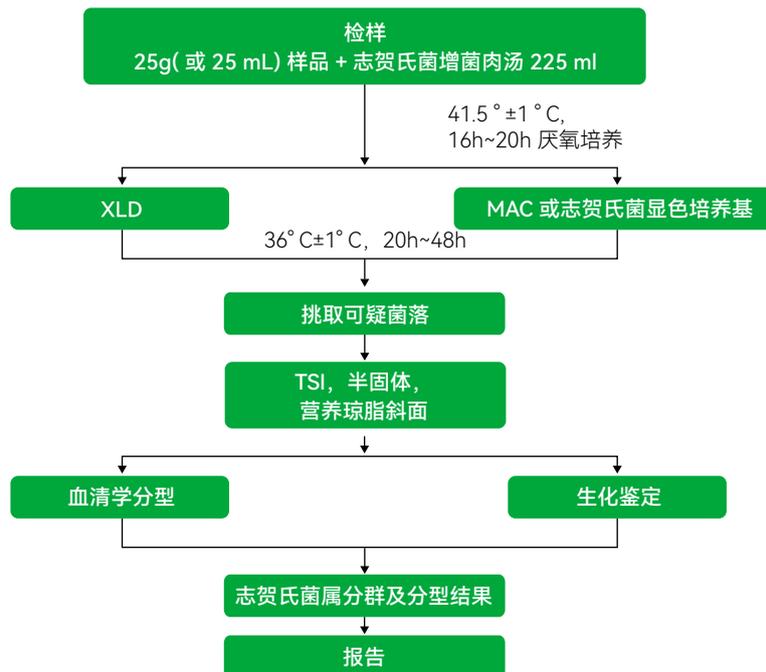
一、志贺氏菌的生物学特性

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 志贺氏菌检验程序

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, 志贺氏菌在志贺氏增菌肉汤中生长浑浊。

福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572 金黄色葡萄球菌 ATCC653
+ 金黄色葡萄球菌 ATCC653

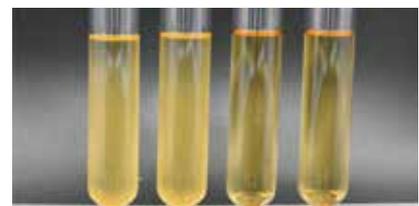


图 7-1

四、志贺氏菌的分离

取增菌后的志贺氏增菌液分别划线接种于 XLD 琼脂平板和 MAC 琼脂平板或志贺氏显色培养基平板上，于 36℃ ±1℃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

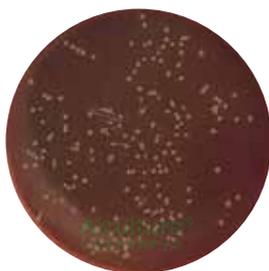
志贺氏菌在 XLD 琼脂平板上的菌落特征为粉色至无色，半透明、光滑、湿润、圆形、边缘整齐或不齐菌落。志贺氏菌大多不发酵木糖、乳糖和蔗糖，可与发酵此三种糖类的细菌（如大肠黄色菌落）区分；志贺氏菌不产硫化氢，可与产硫化氢的细菌（如大部分沙门等）区分。

4.2 MAC 或志贺显色培养基

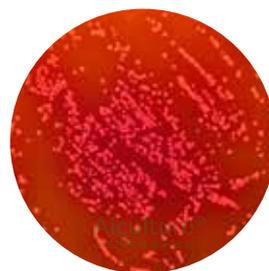
志贺氏菌在 MAC 琼脂平板上的菌落特征为无色至浅粉红色，半透明、光滑、湿润、圆形、边缘整齐或不齐菌落。志贺氏菌大多不发酵乳糖产碱，故菌落颜色为红色，可与发酵乳糖产酸（菌落颜色为黄色，或有胆盐沉淀环）的细菌区分。部分宋内志贺氏菌迟缓发酵乳糖，若培养时间过长会产生粉色菌落，混淆结果。



逗点福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



MAC 逗点福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



逗点显色培养基痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105

图 7-2

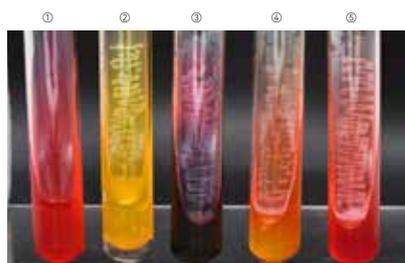
五、初步生化试验

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℃ ±1℃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

图 7-3

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

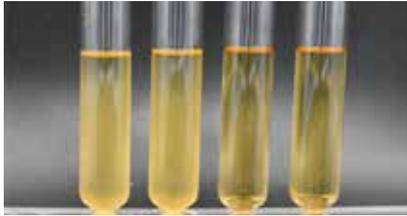
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
志贺氏菌增菌肉汤	福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572 + 金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	134CFU(福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572) +1124CFU(金黄色葡萄球菌 ATCC6538)	在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色, 半透明菌落	在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色, 半透明菌落	符合
		L 品牌	/		在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色, 半透明菌落		符合
		H 品牌	/		在 XLD 上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

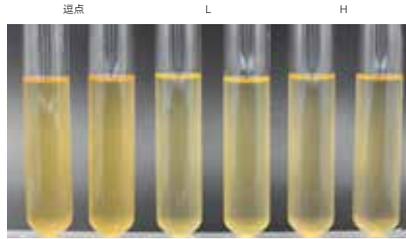
2. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在志贺氏菌增菌肉汤上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；



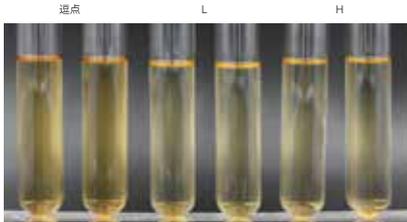
3、典型特征图片：



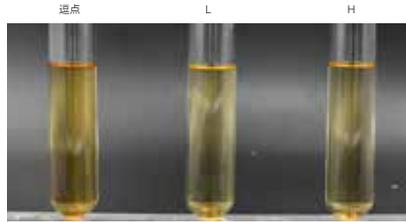
逗点志贺氏菌增菌肉汤增菌后现象



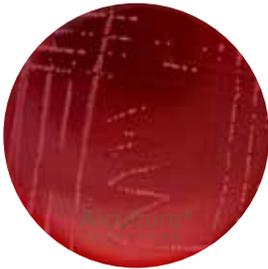
福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572+ 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 志贺氏菌增菌肉汤竞品比对



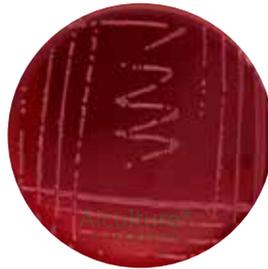
金黄色葡萄球菌 ATCC6538 志贺氏菌增菌肉汤竞品比对



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



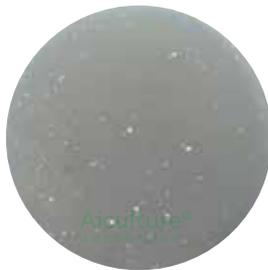
逗点 金黄色葡萄球菌倾注 TSA



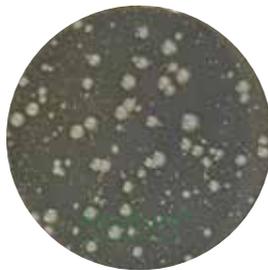
L 品牌金黄色葡萄球菌倾注 TSA



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 感官：感官：逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。

附录 B

木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 验证



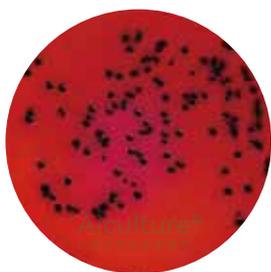
1. 产品用途：用于沙门氏菌、志贺氏菌的分离培养。
2. 检验原理：酵母膏提供氮源、维生素、生长因子；氯化钠维持均衡的渗透压；木糖、乳糖、蔗糖为可发酵糖类，产酸使酚红指示剂变黄；去氧胆酸钠抑制革兰氏阳性菌，但不影响沙门氏菌的生长；硫代硫酸钠可被某些细菌还原硫化氢，与柠檬酸铁铵中的铁盐生成黑色硫化铁；琼脂是培养基的凝固剂；酚红为 pH 指示剂。

表 7-2：木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 验证

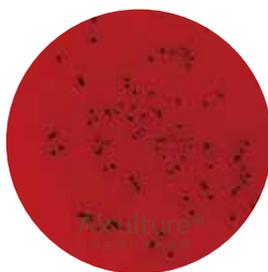
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD)	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	125	102	PR=1.2	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	84		PR=0.8		符合
		H 品牌	139		PR=1.4		符合
	福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572	逗点	209	203	PR=1.1	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	172		PR=0.8		符合
		H 品牌	193		PR=0.9		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC 25922	逗点	/	/	G=3.5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

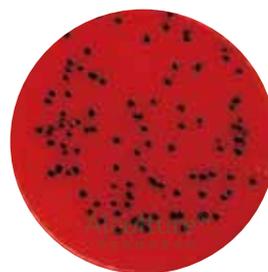
3、典型特征图片：



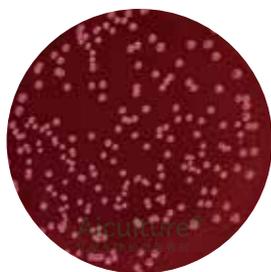
逗点鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



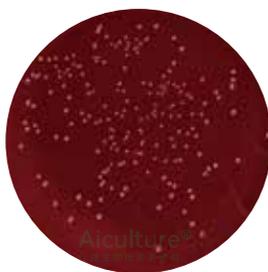
L 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



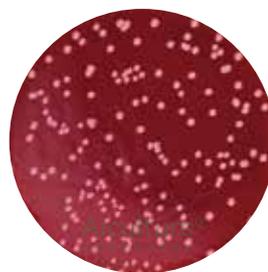
H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



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

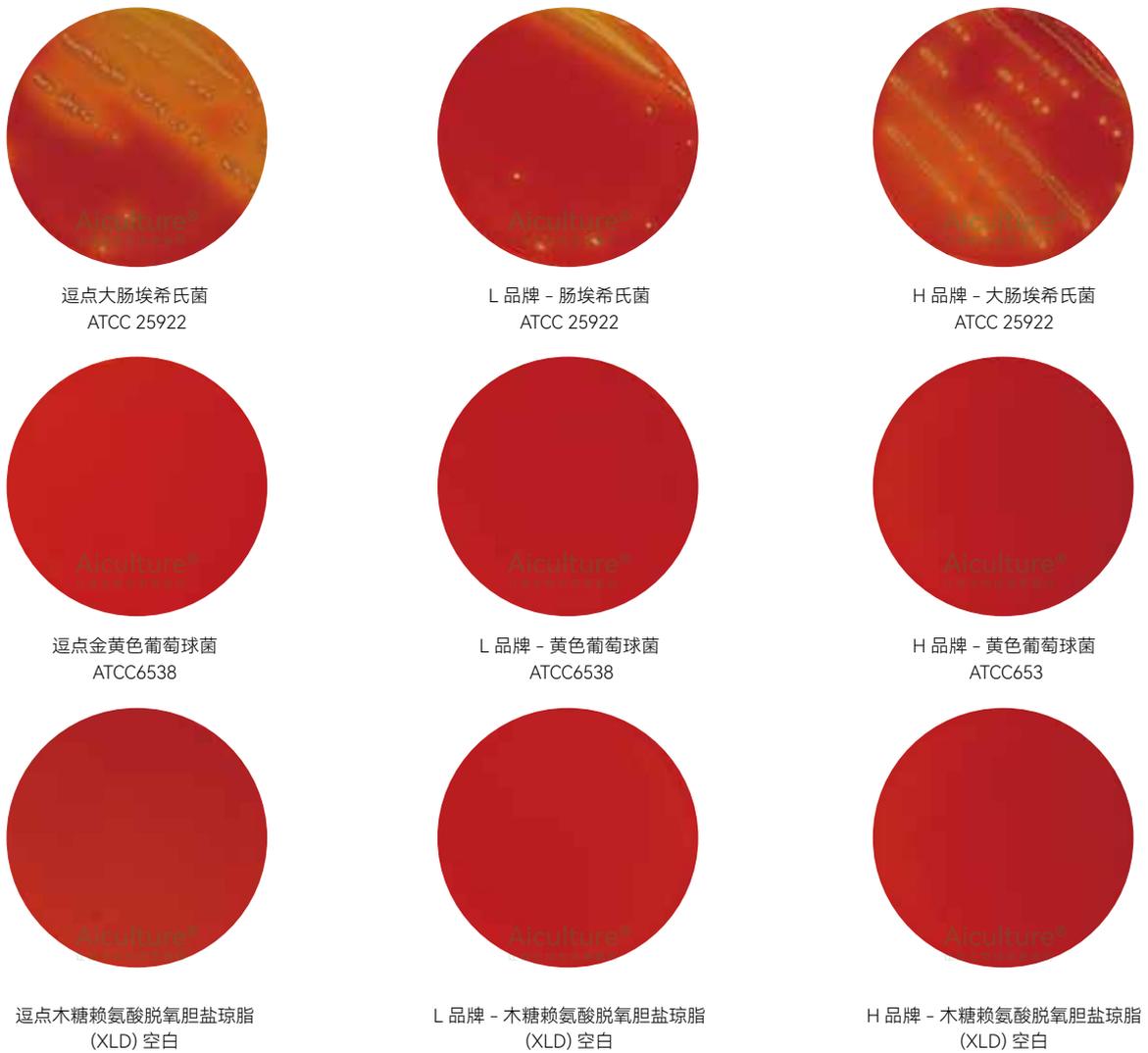


图 7-5

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 $PR \geq 0.7$ 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 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



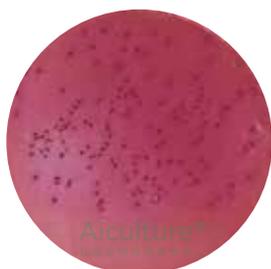
1. 产品用途：用于志贺氏菌的选择性分离
2. 检验原理：蛋白胨提供碳氮源；乳糖为可发酵的糖类；3号胆盐和结晶紫可抑制革兰氏阳性菌的生长；氯化钠维持均衡的渗透压；中性红是 pH 指示剂，细菌发酵乳糖产酸时菌落呈粉红色，并在菌落周围出现胆盐沉淀的浑浊圈。琼脂是培养基的凝固剂。

表 7-3：麦康凯琼脂 (MAC) 验证

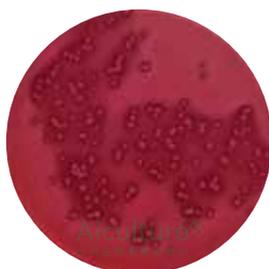
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
麦康凯琼脂 (MAC)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	170	142	PR=1.2	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	158		PR=1.1		符合
		H 品牌	111		PR=0.8		符合
	福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572	逗点	216	203	PR=1.2	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	265		PR=1.3		符合
		H 品牌	234		PR=1.1		符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合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



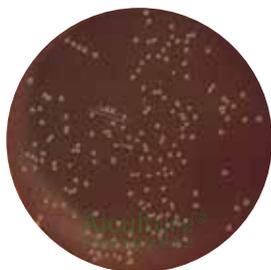
逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



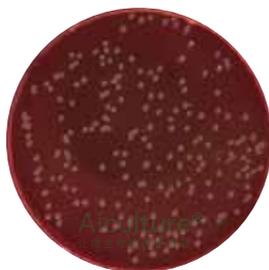
L 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



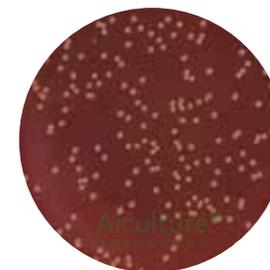
H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



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



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 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 $PR \geq 0.5$ 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 $PR \geq 0.5$ 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 $G \leq 1$ 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 CMCC(B)51572	逗点	32	67	PR=0.5	$PR \geq 0.5$	符合
		H 品牌	136		PR=2.0	$PR \geq 0.5$	符合
	痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105	逗点	264	233	PR=1.3	$PR \geq 0.5$	符合
		H 品牌	431		PR=1.8	$PR \geq 0.5$	符合
	产气肠杆菌 ATCC13048	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
		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 ATCC25922	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
		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 ATCC 6538	逗点	/	/	G=0	$G \leq 1$	符合
		H 品牌	/	/	G=0		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 $G \leq 1$ ；

3、典型特征图片：

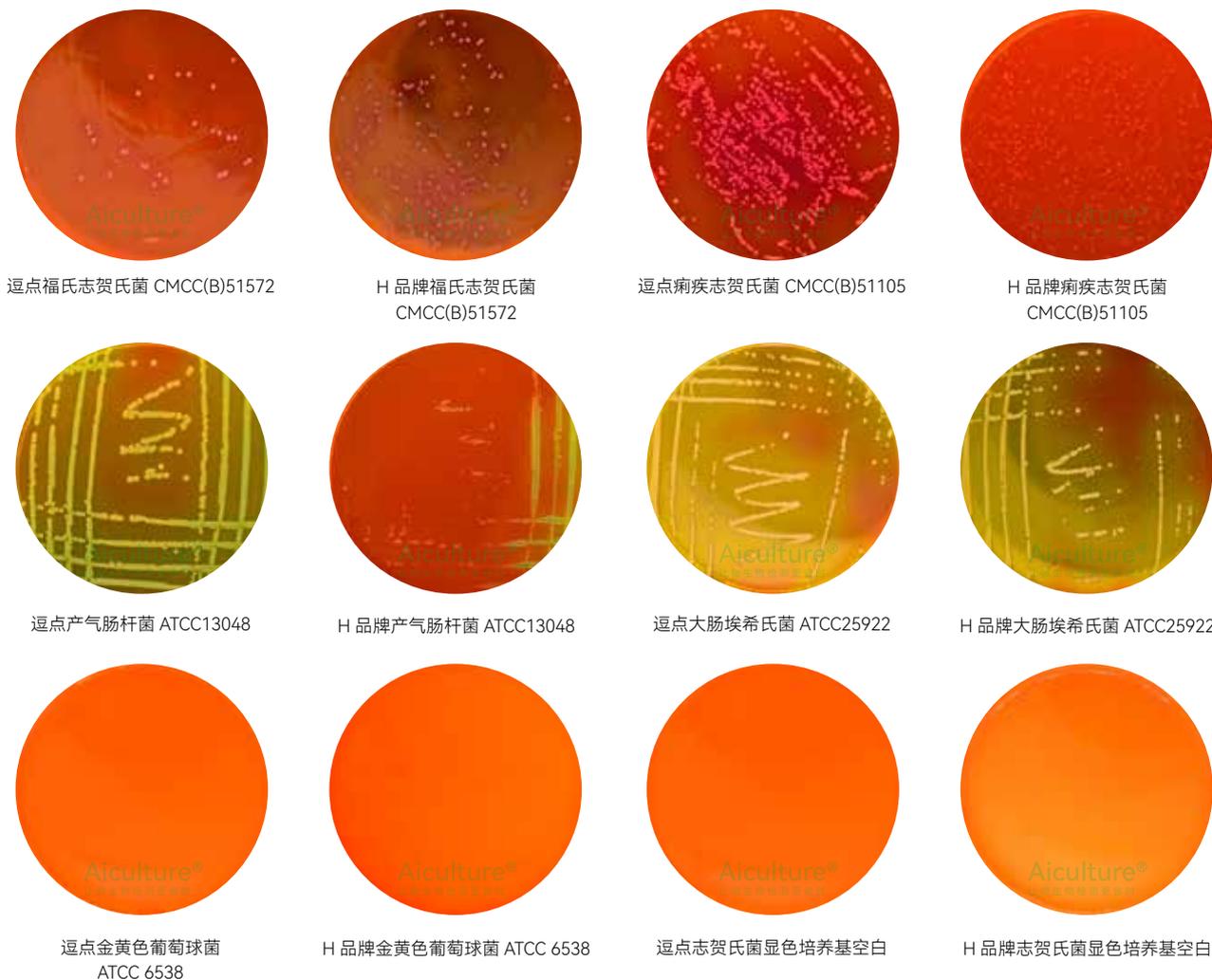


图 7-7

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 $PR \geq 0.5$ 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 $G \leq 1$ 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。

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。

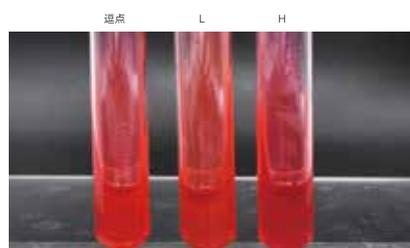


表 7-5：三糖铁琼脂 (TSI) 验证

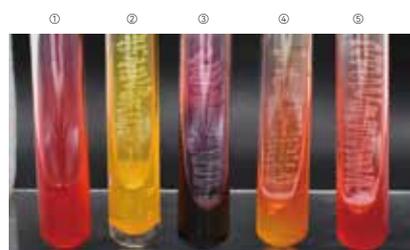
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
麦康凯琼脂 (MAC)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢	符合
		L 品牌	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢		符合
		H 品牌	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢		符合
	肠炎沙门氏菌 CMCC (B) 50335	逗点	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢	符合
		L 品牌	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢		符合
		H 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;

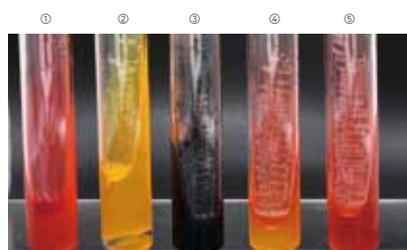
3、典型特征图片：



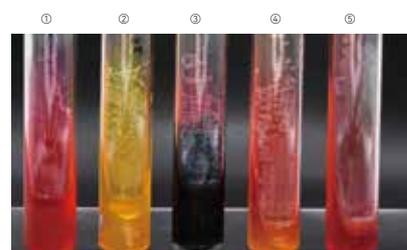
空白



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

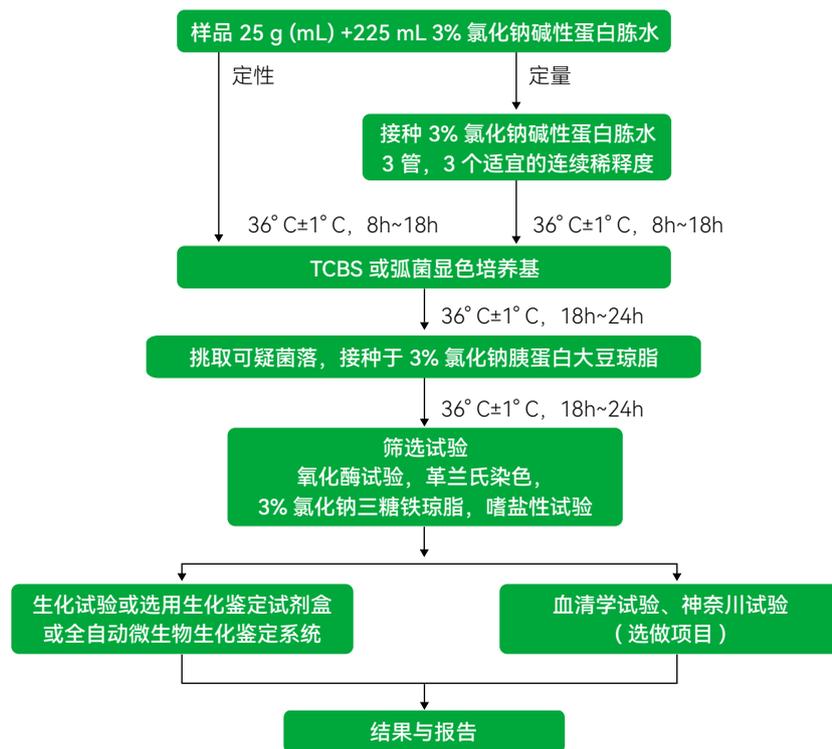
副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 属于弧菌科弧菌属, 革兰氏阴性, 无芽孢, 呈弧状、杆状、卵圆状等多种形态, 单端鞭毛; 兼性厌氧菌, 嗜盐、对葡萄糖、甘露醇、麦芽糖等发酵产酸。

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。

副溶血性弧菌的检验

二、检验步骤



流程图 8-1 副溶血性弧菌检验程序

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 $7^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 尽可能及早检验; 冷冻样品应在 45°C 以下不超过 15 min 或在 $2^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ 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甩干表面水分, 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 °C ±1 °C 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 个适宜的连续稀释度，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 °C ±1 °C 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 °C ±1 °C 培养 18h ~ 24h。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、卵圆状等多形态，无芽胞，有鞭毛。

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位，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

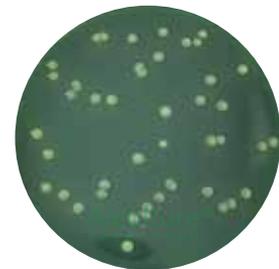
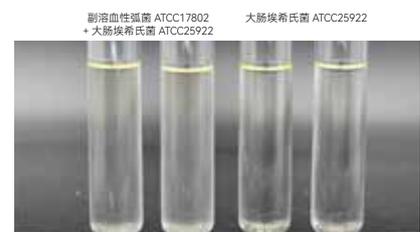
3% 氯化钠碱性蛋白胨水

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。

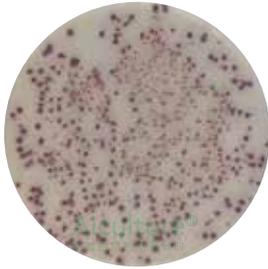


副溶血性弧菌
蓝绿色呈圆形、半透明、表面光滑的绿色菌落，
H₂S 阴性

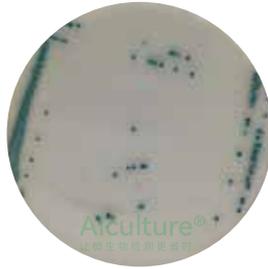
图 8-1

3.6 弧菌显色培养基

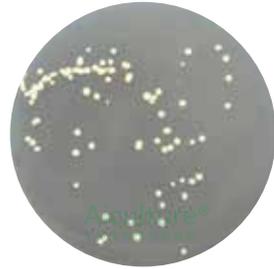
· 配方中蛋白胨和酵母膏粉提供氮源、维生素、氨基酸和碳源；蔗糖为可发酵的糖类；抑菌剂抑制大部分非弧菌细菌，氯化钠可维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂；混合色素与副溶血性弧菌、霍乱弧菌和创伤弧菌所对应的酶发生特异性反应，水解底物，释放出显色基团，在淡黄色平板上产生品红色菌落（副溶血性弧菌）和绿-蓝绿色的菌落（霍乱弧菌和创伤弧菌）。



副溶血性弧菌 ATCC17802



霍乱弧菌 VbO



副溶血性弧菌 ATCC17802

图 8-2

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



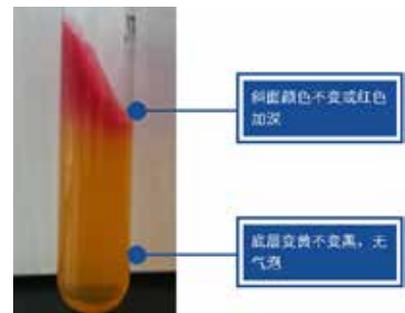
阳性

阴性

图 8-3

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



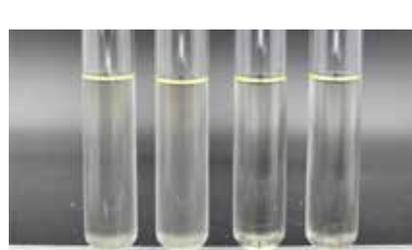
- 1、产品用途：用于副溶血性弧菌增菌培养。
- 2、检验原理：蛋白胨提供碳源、氮源、维生素、生长因子；高含量氯化钠和高 pH 值可以抑制非弧菌类细菌生长，不影响副溶血性弧菌生长。

表 8-1：3% 氯化钠碱性蛋白胨水验证。

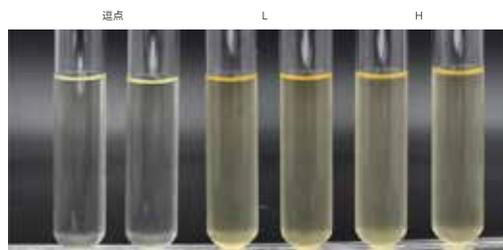
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
3% 氯化钠碱性蛋白胨水	副溶血性弧菌 ATCC17802 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	113CFU(副溶血性弧菌 ATCC17802) +2367CFU(大肠埃希氏菌 ATCC25922)	在弧菌显色培养基平板上 > 10CFU，品红色菌落	在弧菌显色培养基平板上 > 10CFU，品红色菌落	符合
		L 品牌	/		在弧菌显色培养基平板上 > 10CFU，品红色菌落		符合
		H 品牌	/		在弧菌显色培养基平板上 > 10CFU，品红色菌落		符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

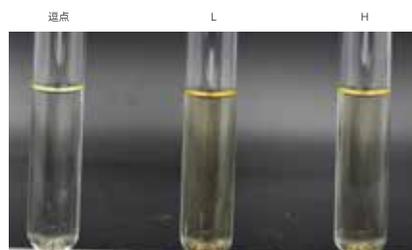
3、典型特征图片：



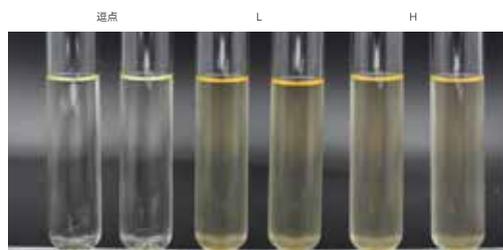
逗点 3% 氯化钠碱性蛋白胨水增菌后现象



副溶血性弧菌 ATCC17802+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922 3% 氯化钠碱性蛋白胨水竞品比对



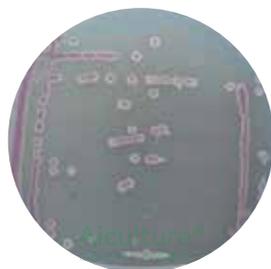
3% 氯化钠碱性蛋白胨水空白竞品比对



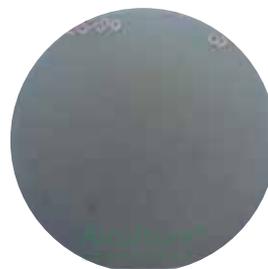
大肠埃希氏菌 ATCC25922 3% 氯化钠碱性蛋白胨水竞品比对



逗点混菌划线弧菌显色板



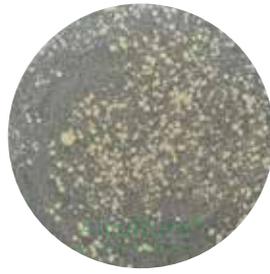
L 品牌混菌划线弧菌显色板



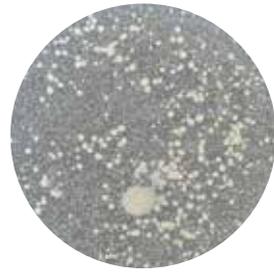
H 品牌混菌划线弧菌显色板



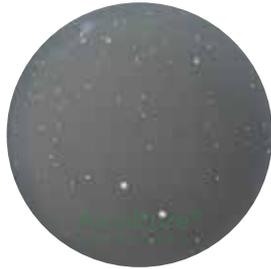
逗点大肠埃希氏菌倾注 TSA



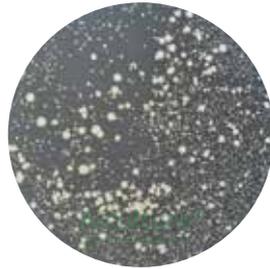
L 品牌大肠埃希氏菌倾注 TSA



H 品牌大肠埃希氏菌倾注 TSA



副溶血性弧菌 ATCC17802 计数 TSA



大肠埃希氏菌 ATCC25922 计数 TSA

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）。

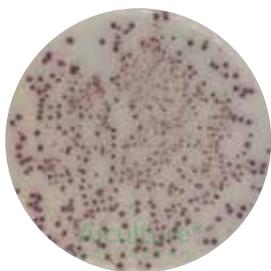
表 8-2：弧菌显色培养基验证



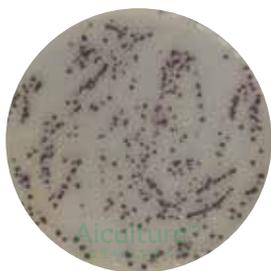
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
弧菌显色培养基	副溶血性弧菌 ATCC17802	逗点	442	308	PR=1.4	PR ≥ 0.5	符合
		H 品牌	389		PR=1.3		符合
	霍乱弧菌 VbO	逗点	/	/	蓝绿色菌落	/	符合
		H 品牌	/	/	蓝色菌落	/	符合
	溶藻弧菌 ATCC33787	逗点	/	/	白色菌落	/	符合
		H 品牌	/	/	无色，不扩散	/	符合
大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合	
	H 品牌	/	/	G=0		符合	

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：



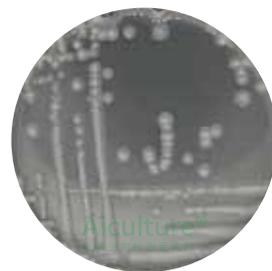
豆点副溶血性弧菌 ATCC17802



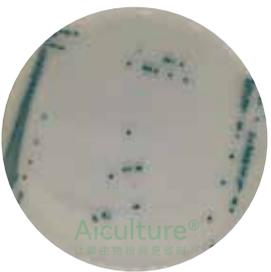
H 品牌副溶血性弧菌 ATCC17802



豆点溶藻弧菌 ATCC33787



H 品牌溶藻弧菌 ATCC33787



豆点霍乱弧菌 VbO



H 品牌霍乱弧菌 VbO



豆点大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌黄色葡萄球菌 ATCC6538



豆点弧菌显色培养基空白



H 品牌弧菌显色培养基空白

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、豆点、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；
- 4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922，豆点、H 品牌均满足国标 $G \leq 1$ 的要求；
- 4.3 特异性：霍乱弧菌 VbO、溶藻弧菌 ATCC33787 豆点、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：



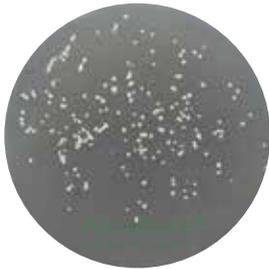
逗点副溶血性弧菌 ATCC17802



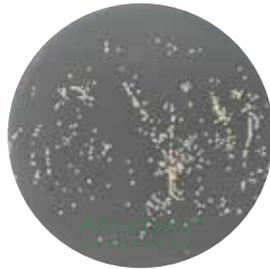
L 品牌副溶血性弧菌 ATCC17802



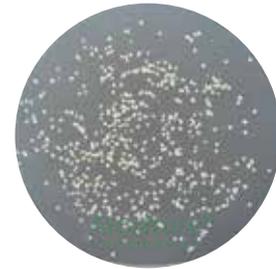
H 品牌副溶血性弧菌 ATCC17802



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(Enteraggative 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。

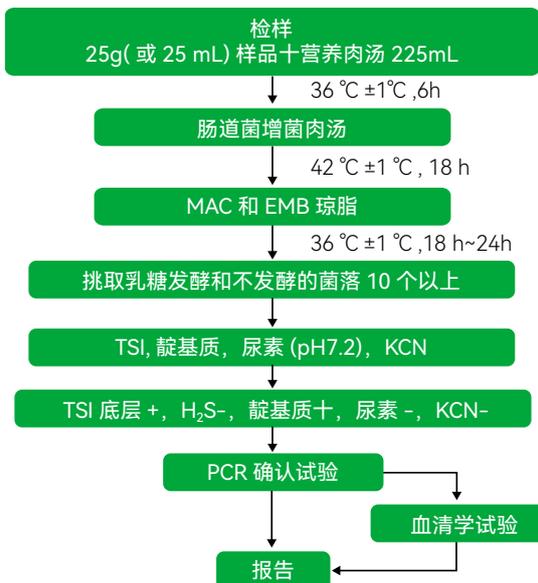
EIEC 是指能够侵入肠道上皮细胞而引起痢疾样腹泻的大肠埃希菌。该菌不像典型的大肠埃希菌,无动力、不发生赖氨酸脱羧反应、不发酵乳糖,生化反应和抗原结构均近似痢疾志贺菌。侵入上皮细胞的关键基因是侵袭性质粒上的抗原编码基因及其调控基因,如 *ipaH* 基因、*ipaR* 基因(又称为 *invE* 基因)。

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、引起暴发最常见的 EHEC 血清型。

二、检验程序

致泻大肠埃希氏菌检验程序



流程图 9-1 致泻大肠埃希菌检验程序

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)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℃±1℃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℃±1℃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℃±1℃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。

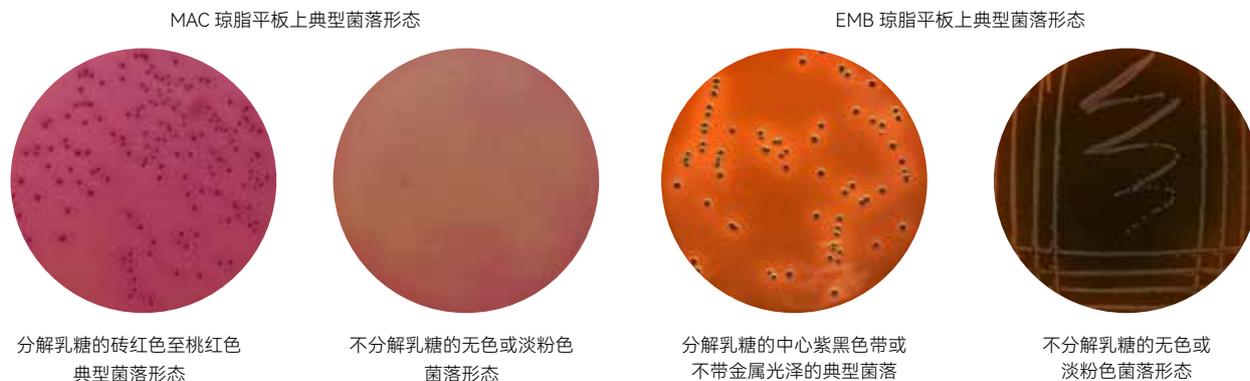


图 9-1

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℃±1℃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（靛基质试验）、尿素琼脂（pH7.2）和 KCN 肉汤（包括试验管和对照管），于 36℃ ±1℃ 培养 18~24 小时。

2.5.3 TSI 斜面产酸或不产酸，底层产酸，靛基质阳性，H₂S 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 H₂S、KCN、尿素有任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、靛基质、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)

靛基质试验结果



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



氰化钾试验阳性



氰化钾试验阴性

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 H₂S 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 ±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。

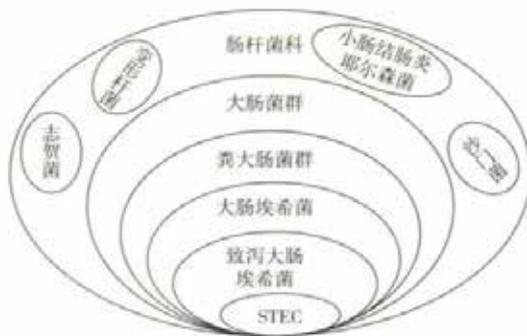


图 9-3 大肠菌群、粪大肠菌群、大肠埃希菌和致泻大肠埃希菌分类关系示例

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 O 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：

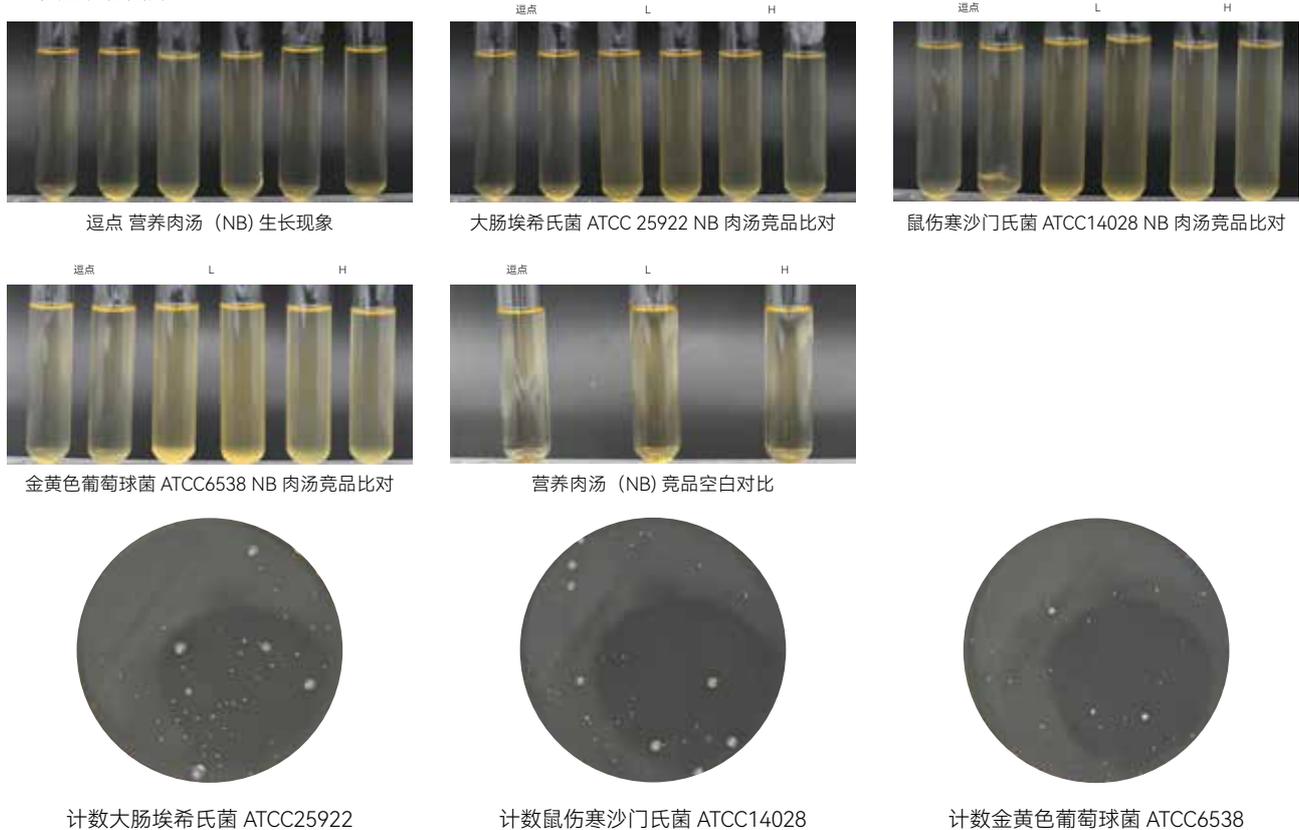


图 9-4

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：

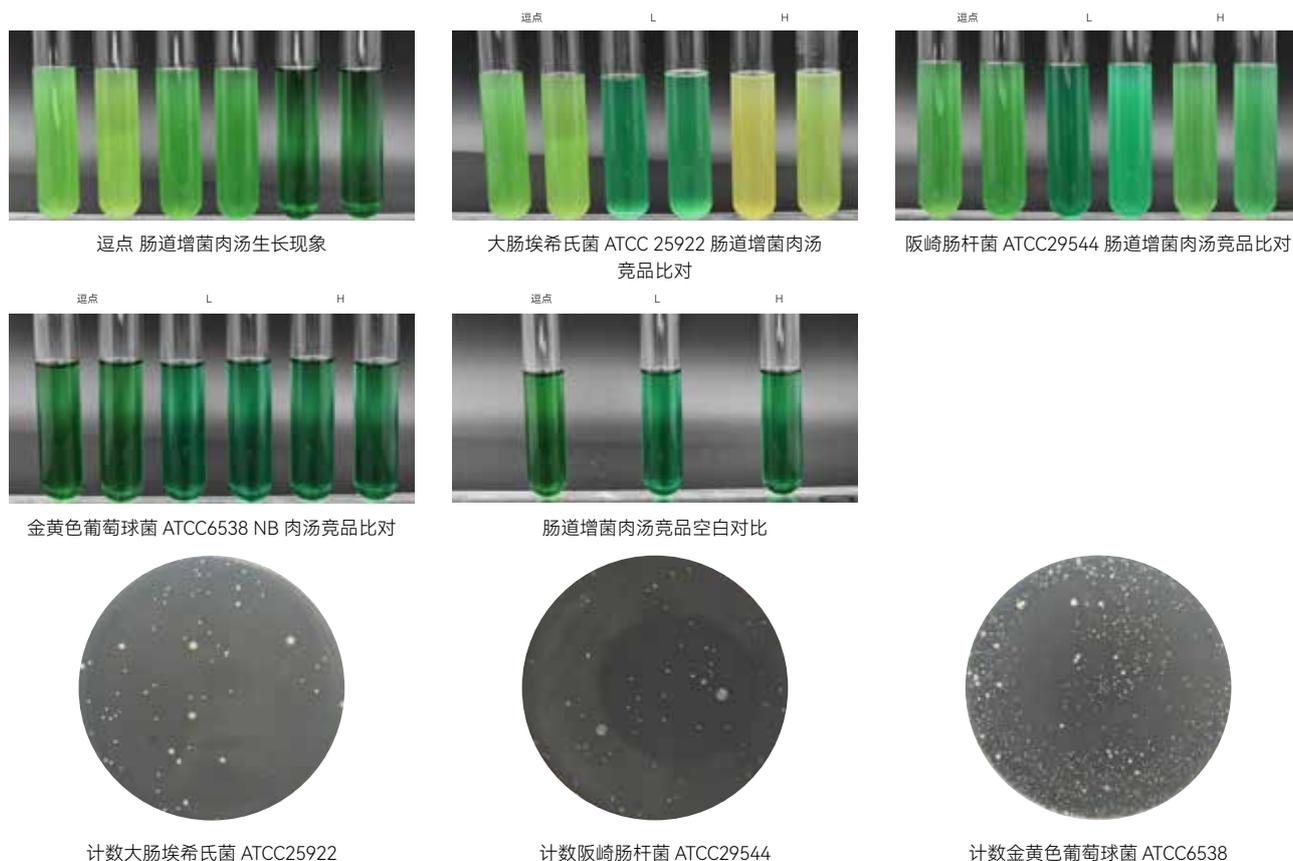


图 9-5

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。

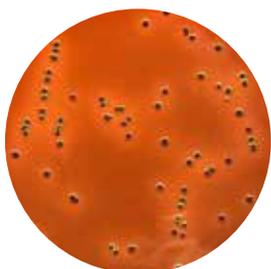


表 9-3：伊红美蓝 (EMB) 琼脂培养基验证

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
	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；

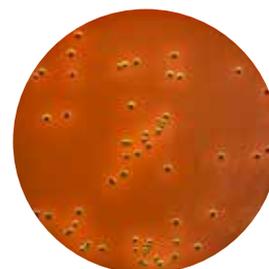
3、典型特征图片：



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

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：



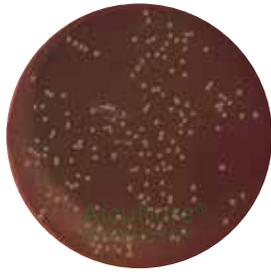
逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



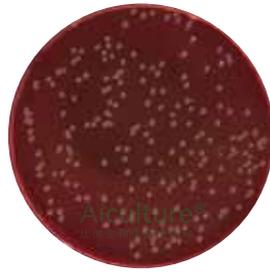
L 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



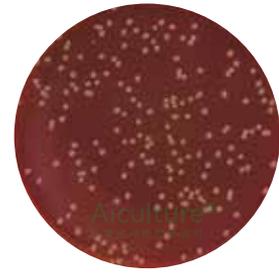
H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



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) μm \times 0.8 μm ，不形成芽胞；在 22~30 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ ，最佳生长温度为 26 $^{\circ}\text{C}$ 。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 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 2.1.2 恒温培养箱 26 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 、36 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 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 \times 160mm、15mm \times 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。

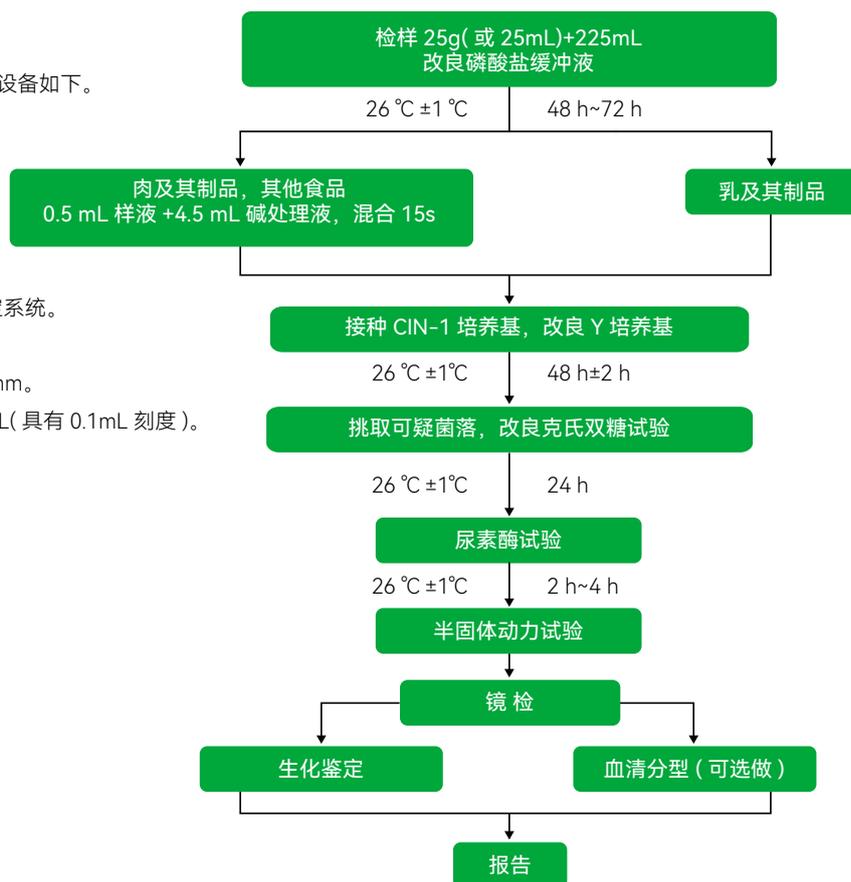
三、培养基与试剂

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)。



流程图 10-1 小肠结肠炎耶尔森菌检验程序

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

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

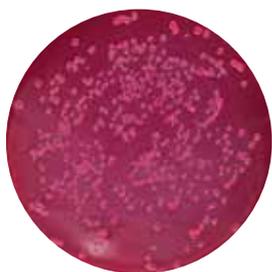
4.2.3.1 乳与乳制品 不需要进行碱处理。

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。

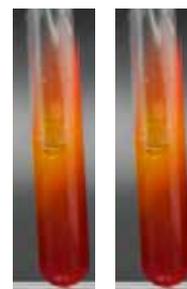
观察各个平板上生长的菌落，典型小肠结肠炎耶尔森菌菌落在 CIN-1 琼脂平板上为深红色中心，周围具有无色透明圈（红色牛眼状菌落），菌落大小为 1~2mm；在改良 Y 琼脂平板上为无色、透明、不黏稠的菌落。



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，振摇几秒钟，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，有时呈椭圆形，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 <i>Yersinia enterocolitica</i>	中间型耶尔森氏菌 <i>Yersinia intermedia</i>	弗氏耶尔森氏菌 <i>Yersinia frederiksenii</i>	克氏耶尔森氏菌 <i>Yersinia kristensenii</i>	假结核耶尔森氏菌 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	鼠疫耶尔森氏菌 <i>Yersinia pestis</i>
动力(26 °C)	+	+	+	+	+	-
尿素酶	+	+	+	+	+	-
V-P 试验(26 °C)	+	+	+	-	-	-
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，胰蛋白胨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 O3,09 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;0:2a,3;0:3;0:8;0:9;0:4,3 2;0:5,27;0:12,25;0:13a,13b;O:19;0:20;0:21。引起人类疾病的主要血清群是 O:3,0:8,0:9 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 10⁷CFU/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;

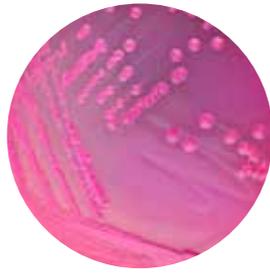
3、典型特征图片：

厂家	待测培养基	参比培养基	结果判定
L H 逗点		空白	
逗点		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
L 品牌		金黄色葡萄球菌 ATCC6538	粪肠球菌 ATCC29212
H 品牌		粪肠球菌 ATCC29212	

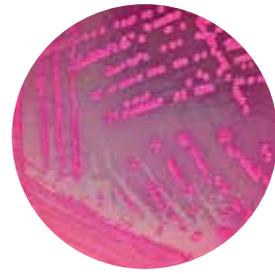
图 10-2



豆点 - 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



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 - 粪肠球菌 ATCC29212



L 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212

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+ 粪肠球菌 ATCC29212+ 铜绿假单胞菌 ATCC27853，豆点、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，豆点、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：豆点、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 培养基板上的菌落特征：红色牛眼状菌落；
2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 CIN-1 培养基板上的菌落特征：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：



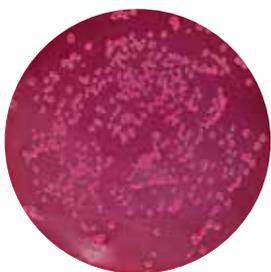
逗点 - 空白平板



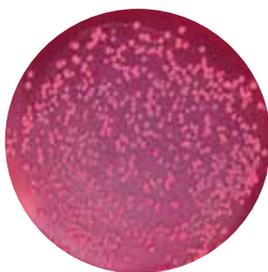
L 品牌 - 空白平板



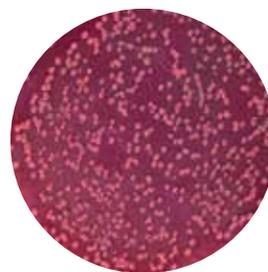
H 品牌 - 空白平板



逗点 - 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

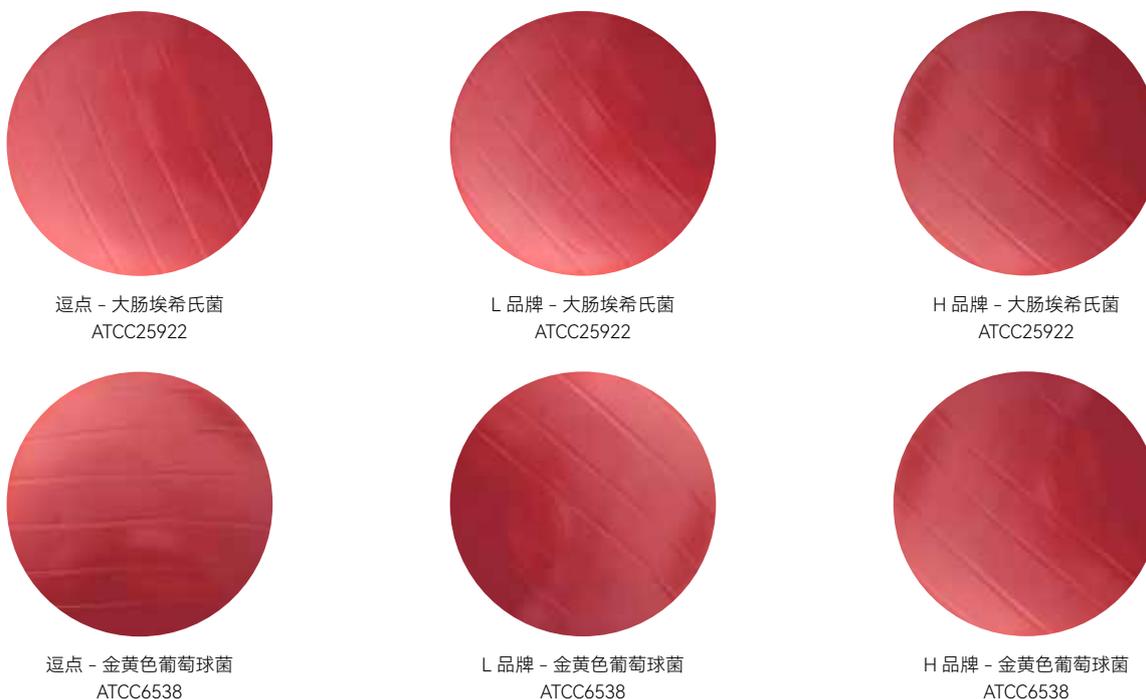


图 10-3

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，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

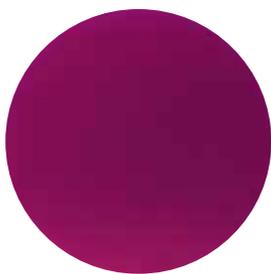
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
改良 Y 培养基	小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC (B) 52204	逗点	365	688	0.5	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	362		0.5		符合
		H 品牌	370		0.5		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	粉红色菌落	粉红色菌落	符合
		L 品牌	/		粉红色菌落		符合
		H 品牌	/		粉红色菌落		符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/		G=0		符合
	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



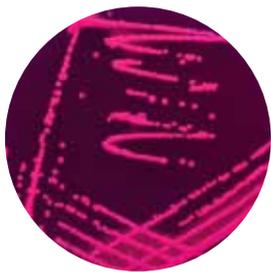
逗点 - 小肠结肠炎耶尔森氏菌
CMCC (B) 52204



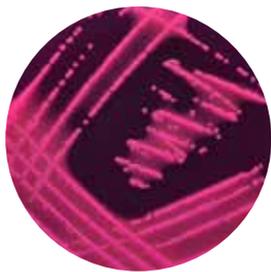
L 品牌 - 小肠结肠炎耶尔森氏菌
CMCC (B) 52204



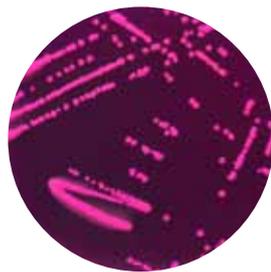
H 品牌 - 小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC (B)
52204



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 10-4

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 H₂S，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
改良克氏双糖铁琼脂	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：

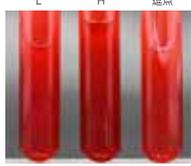
 改良克氏双糖铁琼脂空白	小肠结肠炎耶尔森氏菌	鼠伤寒沙门氏菌	福氏志贺氏菌	粪产碱杆菌
逗点				
L 品牌				
H 品牌				

图 10-5

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 感观：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。

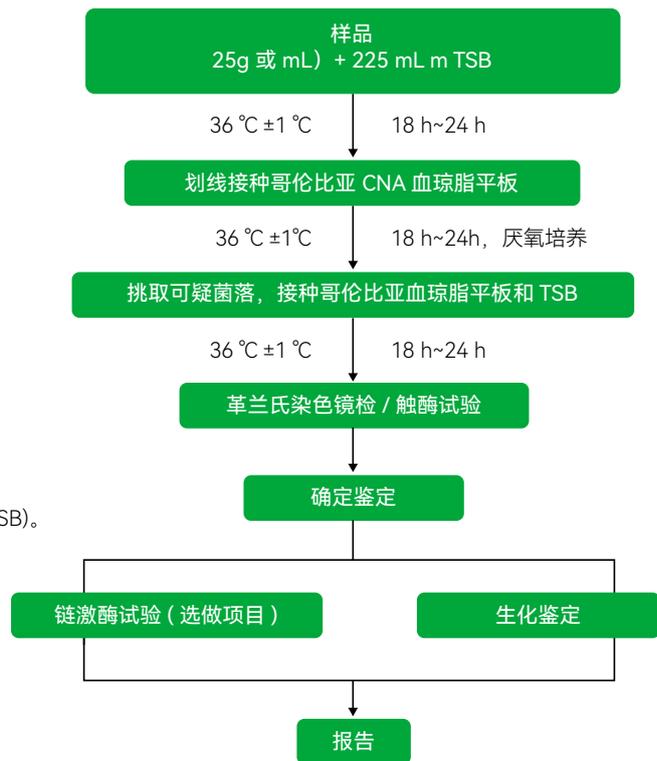
三、培养基与试剂

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 (CaCl₂) 溶液。
- 3.2.4 3% 过氧化氢 (H₂O₂) 溶液。



流程图 11-1 溶血性链球菌检验程序

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。



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℃ ±1℃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 (见下图)。

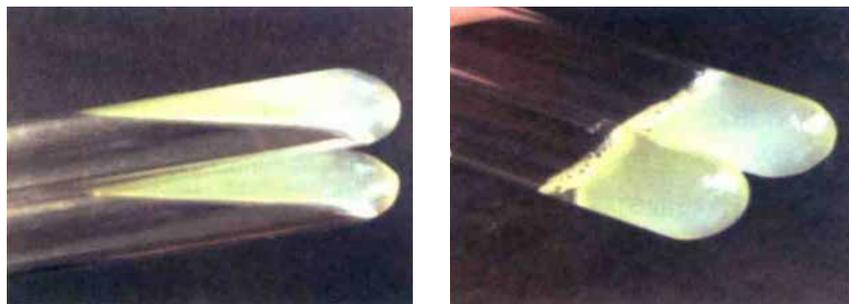


触酶试验

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℃ ±1℃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℃ ±1℃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℃ ±1℃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。

链激酶试验



a. 凝固

h. 溶解

图 11-3

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。

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℃，阴凉区域为不高于 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。

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℃ 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 β 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 β 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 β 型溶血与 α 型溶血在观察时有什么区别？

β 型溶血：菌落周围出现较宽的透明溶血环；α 型溶血：菌落周围出现较窄的草绿色溶血环。

6.2 β 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 β 型溶血性链球菌实验要在生物安全柜中操作？

β 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

胰蛋白胨大豆肉汤 (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、蜡样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：胰蛋白胨、植物蛋白胨提供氮源、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。



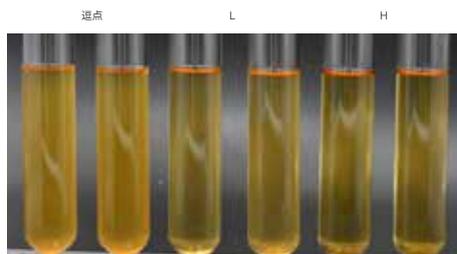
表 11-1：胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 验证数据

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
胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB)	β-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			符合
		H 品牌				符合
		L 品牌				符合

3、典型特征图片：



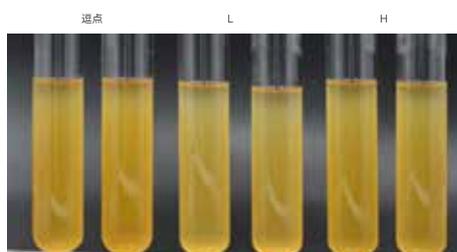
逗点 胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 生长现象



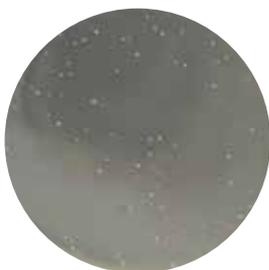
β-溶血性链球菌 CMCC(B)32210 TSB 肉汤竞品比对



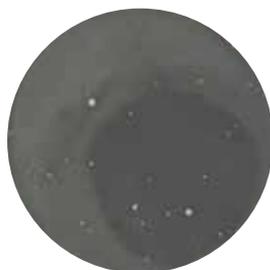
胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 竞品空白对比



金黄色葡萄球菌 ATCC6538 TSB 肉汤竞品比对



计数 β-溶血性链球菌 CMCC(B)32210



计数金黄色葡萄球菌 ATCC6538

图 11-4

4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌 β-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 感观：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℃ 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。

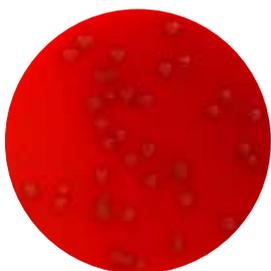


表 11-2：哥伦比亚 CNA 血琼脂验证

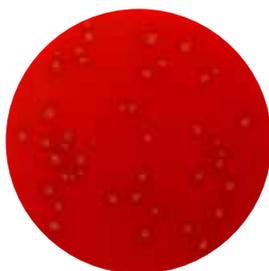
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
哥伦比亚 CNA 血琼脂	化脓性链球菌 ATCC19615	逗点	40	46	PR=0.9	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	51		PR=1.1		符合
		H 品牌	46		PR=1		符合
	普通变形杆菌 CMCC(B)49027	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/	/	G=0		符合
		H 品牌	/	/	G=0		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/	/	G=0		符合
		H 品牌	/	/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

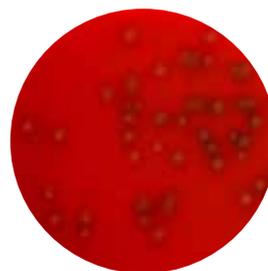
3、典型特征图片：



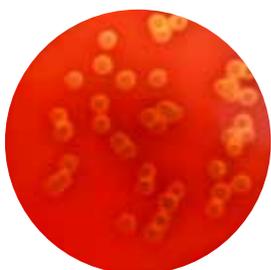
逗点化脓性链球菌 ATCC19615 (正面)



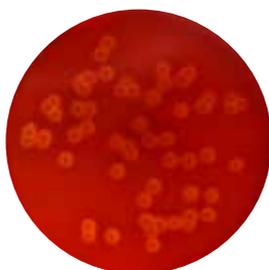
L 品牌化脓性链球菌 ATCC19615 (正面)



H 品牌化脓性链球菌 ATCC19615 (正面)



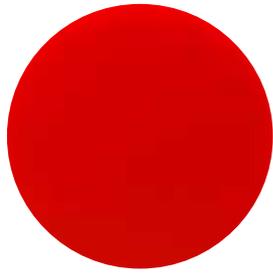
逗点化脓性链球菌 ATCC19615 (背面)



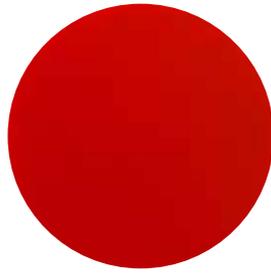
L 品牌化脓性链球菌 ATCC19615 (背面)



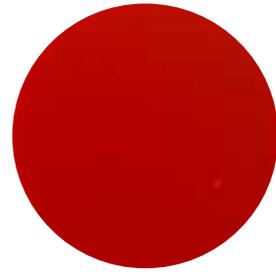
H 品牌化脓性链球菌 ATCC19615 (背面)



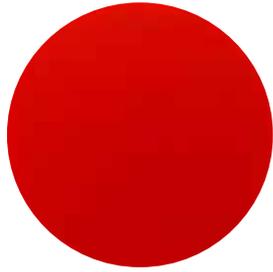
逗点普通变形杆菌 CMCC(B)49027



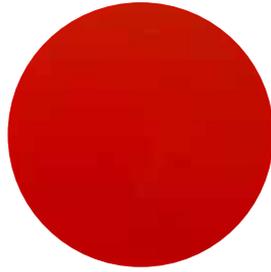
L 品牌普通变形杆菌 CMCC(B)49027



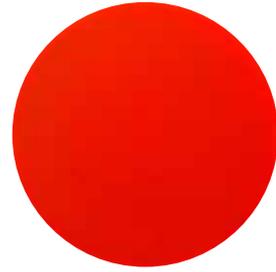
H 品牌普通变形杆菌 CMCC(B)49027



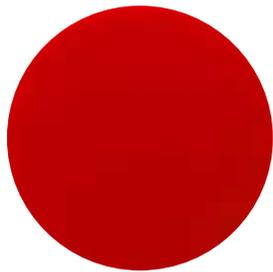
逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



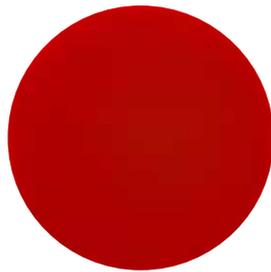
L 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



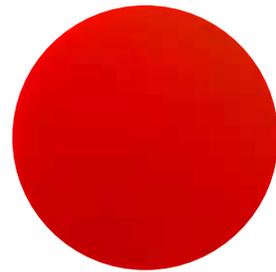
H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



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 $PR \geq 0.5$ 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 $G \leq 1$ 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℃ 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）



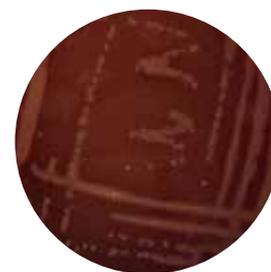
H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538（正面）



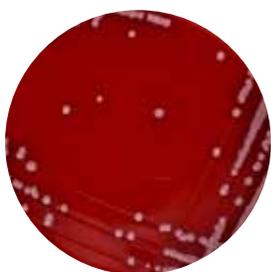
逗点金黄色葡萄球菌 ATCC 6538（反面）



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）



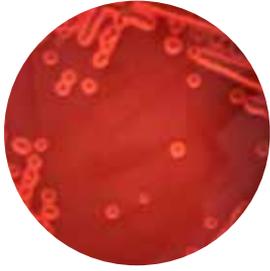
逗点蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303（正面）



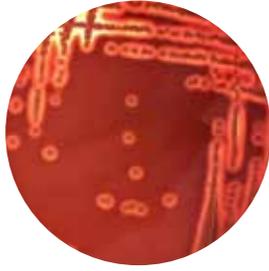
L 品牌蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303（正面）



H 品牌蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303（正面）



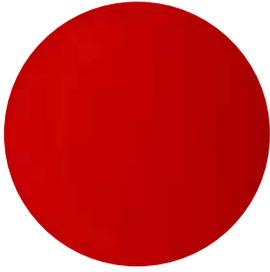
逗点蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303 (反面)



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。



培养基



干粉培养基



免称量袋装干粉培养基



即用型无菌袋装培养基



即用型无菌管装培养基



即用型无菌瓶装培养基



平板培养基

耗材



无菌采样袋



瓷珠菌种保存管



一次性无菌塑料培养皿



表面涂抹采样管

COMPANY PROFILE

企业简介

逗点生物 (Biocomma) 成立于 2006 年, 总部位于深圳, 主营生命科学和医疗健康产品的研发、生产和销售, 业务遍布五十多个国家和地区。

公司为食品和临床检测提供样本前处理解决方案, 包括过滤耗材、色谱耗材和微生物培养基。同时为生命科学研发和生产型厂家提供滤芯、拭子、试剂瓶、无菌液体和培养基等产品。努力让世界更健康, 更美好。



逗点生物公众号



逗点商城



逗点 1688



逗点锐竞



逗点喀斯玛

WSW-01-002CH

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