逗点生物 biocomma Aiculture®
让微生物检测更省时

版本号
PCR-33-1CH

食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数 GB 4789.38—2012

一、概述

1.1 适用范围

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

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

1.2 检测原理

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

二、设备与耗材

2.1 设备

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备如下：

2.1.1 恒温培养箱 36℃ ±1℃。

2.1.2 冰箱 2~5℃。

2.1.3 恒温水浴箱 44.5℃ ±0.2℃。

2.1.4 天平 感量为 0.1g。

2.1.5 拍打式均质器或刀头式均质器。

2.1.6 涡旋混匀器。

2.1.7 菌落计数器。

2.1.8 pH 计或 pH 比色管。

2.1.9 紫外灯波长 360~366 nm，功率≤ 6W。

2.2 耗材

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

2.2.2 接种针。

2.2.3 接种环 (10μL)。

2.2.4 精密 pH 试纸。

2.2.5 无菌锥形瓶 容量 500mL。

2.2.6 无菌培养皿 直径 90mm。

三、培养基与试剂

3.1 培养基

3.1.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨 (LST) 肉汤。

3.1.2 EC 肉汤 (E.coli broth)。

3.1.3 蛋白胨水。

3.1.4 缓冲葡萄糖蛋白胨水 [甲基红 (MR) 和 V-P 试验用]。

3.1.5 西蒙柠檬酸盐培养基。

3.1.6 磷酸盐缓冲液。

3.1.7 伊红美蓝 (EMB) 琼脂。

3.1.8 营养琼脂斜面。

3.1.9 结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA)。

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

3.2 试剂

3.2.1 革兰染色液。

3.2.2 Kovacs 靛基质试剂。

3.2.3 无菌 1mol/LNaOH。

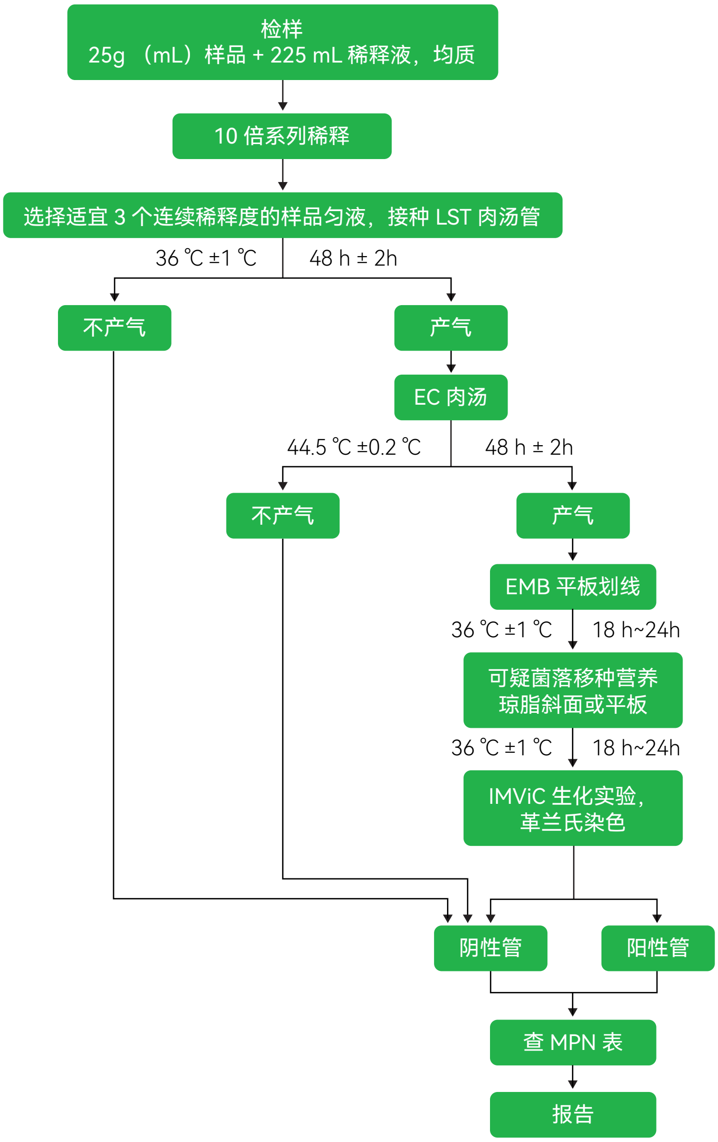
3.2.4 无菌 1mol/LHCl。

四、检验过程

4.1 大肠埃希菌 MPN 法 (第一法)

4.1.1 检验程序

大肠埃希菌 MPN 计数的检验程序见流程图 13-1



流程图 13-1 大肠埃希菌 MPN 计数法检验程序

4.1.2 操作步骤

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

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

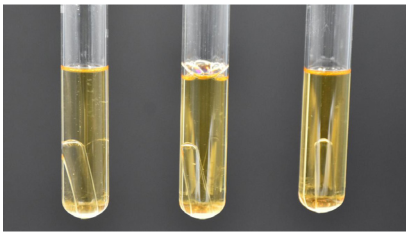
如为冷冻产品，应在 45℃以下 (如水浴中) 不超过 15 分钟解冻，或 2~5℃冰箱中不超过 18 小时解冻。

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

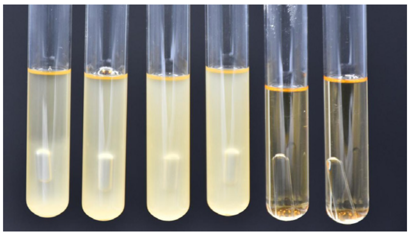
用 1mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1mL, 沿管壁缓缓注入 9mL 磷酸盐缓冲液的无菌试管中 (注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面), 振摇试管或换用 1 支 1mL 无菌吸管或吸头反复吹打，使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

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

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



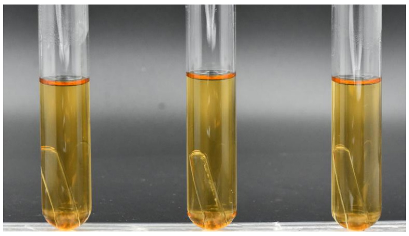
月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤（LST) 竞品空白对比



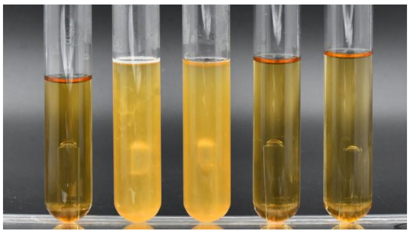
逗点 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤（LST) 生长现象

图 13-1

4.1.2.3 复发酵试验 用接种环从产气的 LST 肉汤管中分别取培养物 1 环 (约 10μL), 移种于已提前预温至 45℃的 EC 肉汤管中，放入带盖的 44.5℃ ±0.2℃水浴箱内。注意水浴的水面应高于肉汤培养基液面，培养 (24±2) 小时，检查小倒管内是否有气泡产生，如未有产气则继续培养至 (48±2) 小时。记录在 24 小时和 48 小时内产气的 EC 肉汤管数。如所有 EC 肉汤管均未产气，即可报告大肠埃希菌 MPN 结果；如有产气者，则进行 EMB 平板分离培养。



逗点 -L 品牌 -H 品牌 -EC 肉汤空白


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

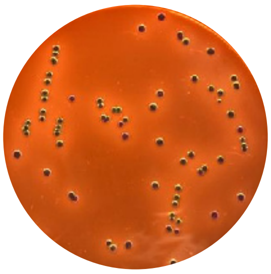

大肠埃希氏菌 ATCC25922 在逗点 EMB
平板上特征

图 13-2

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

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

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

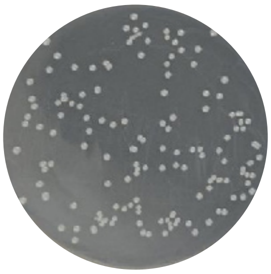

大肠埃希氏菌 ATCC25922 在逗点营养琼脂上的特征（菌落白色，圆形，表面光滑、湿润）

图 13-3

表 13-1：

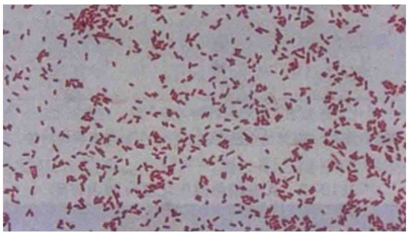
试验项目	结果判定		大肠埃希氏菌生化现象	培养时间	说明
	阴性结果	阳性结果			
靛基质	黄色	玫瑰红色	阳性	18h-24h	培养后滴加 2-3 滴靛基质试剂，即刻观察结果。
MR	不变色	红色	阳性	18h-24h	MR: 培养后滴加 2-3 滴甲基红试剂，即刻观察结果。 VP: 培养后依次滴加 VP 甲液 3 滴、乙液 1 滴，10-30min 内观察结果，如 为阴性应放在 36℃ ±1℃继续培养 4h 后再观察。
VP			阴性	18h-24h	
西蒙氏柠檬酸盐	浅绿色	蓝色	阴性	18h-24h	

注：菌悬液浓度不宜过大，否则可能产生假阳性结果。

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

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

染色结果：大肠埃希菌为革兰阴性杆菌，长度为 1~3μm, 无芽胞。



大肠埃希菌 CICC 10305(ATCC 25922) 革兰阴性
图 13-4

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

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

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

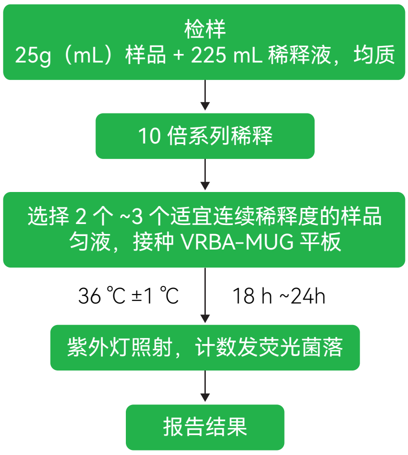
4.1.2.6.5 柠檬酸盐利用试验 挑取适量营养琼脂培养物，接种于西蒙柠檬酸盐培养基中，于 36℃ ±1℃培养 (24±2) 小时。观察结果，阳性结果为培养基变蓝色，阴性结果为绿色不变色。大肠埃希菌为阴性。

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

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

4.2 大肠埃希菌平板计数法 (第二法)

4.2.1 检验程序 大肠埃希菌平板计数法的检验程序。



流程图 13-2 大肠埃希菌平板计数法检验程序

4.2.2 操作步骤

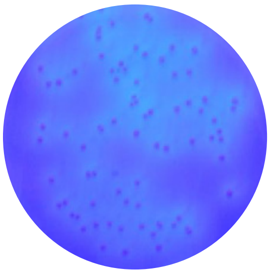
4.2.2.1 样品的稀释 按 4.1.2.1 进行。

4.2.2.2 平板计数

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

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

4.2.2.3 平板菌落数的选择 选择菌落数在 10~100CFU 之间的平板，暗室中 360~366nm 波长紫外灯照射下，计数平板上发浅蓝色荧光的菌落。检验时用已知 MUG 阳性菌株 (如大肠埃希菌 ATCC 25922) 和产气肠杆菌 (如 ATCC 13048) 做阳性和阴性对照。



紫外光下 逗点 -VRBA-MUG- 大肠埃希氏菌
ATCC25922

正常光下 逗点 -VRBA-MUG- 大肠埃希氏菌
ATCC25922

图 13-4

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

五、检验注意事项

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

六、疑难解析

6.1 大肠菌群、粪大肠菌群和大肠埃希菌的区别是什么？

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

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

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

6.2 大肠埃希菌计数的两种方法检验原理及适用范围是什么？

我国食品中大肠埃希菌的检验依据是《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希菌计数》(GB4789.38—2012), 共有两个方法：

第一法大肠埃希菌 MPN 计数：主要利用大肠埃希菌可以在 44.5℃ ±0.2℃发酵乳糖产酸产气的原理进行检测，样品经系列稀释并在 44.5℃ ±0.2℃培养后，根据其未生长的最低稀释度与生长的最高稀释度，应用统计学概率论推算出待测样品中大肠埃希菌的最大可能数。此方法适用于污染菌量较少的食品。

第二法大肠埃希菌平板计数法：主要利用超过 95% 的大肠埃希菌可产生 β- 葡糖醛酸糖苷酶 (GUD) 活性的原理进行检测，可与 VRBA-MUG 平板中底物 4- 甲基伞形酮 -β-D- 葡萄糖苷 (MUG) 反应使 4- 甲基伞形酮 (MU) 游离；在 360~366nm 波长紫外灯照射下，MU 显示蓝色荧光，通过计数产生荧光的菌落测定食品中大肠埃希菌的数量。与 MPN 计数法相比，检测结果更为精确，适用于污染比较严重的食品。

6.3 大肠埃希菌平板法为什么不适用于贝类？

VRBA-MUG 平板计数法的检测原理：超过 95% 的大肠埃希菌具有 β- 葡糖醛酸糖苷酶 (GUD), 可与平板中底物 4- 甲基伞形酮 -β-D- 葡萄糖苷 (MUG) 反应生成 4- 甲基伞形酮 (MU), 在 360~366nm 波长紫外灯照射下，MU 显示蓝色荧光，通过计数产生荧光的菌落测定食品中大肠埃希菌的数量。而贝类如牡蛎含有内源性 GUD, 会与培养基底物进行反应产生荧光，干扰计数结果的准确性。

此外，肠杆菌科中 GUD 阳性的细菌除了大肠埃希菌之外，还有某些志贺菌、沙门菌和耶尔森菌，但考虑到这些菌都是致病菌，所以这种假阳性在公共卫生学上不认为是缺陷。

本方法有大约 4% 的假阴性，特别是倍受关注的 O157:H7 大肠埃希菌 β- 葡萄糖苷酸酶也为阴性，用本方法检测为阴性反应。

参考文献 : < 食品检验操作技术规范 (微生物检验)> 中国食品药品检定研究院

附录 A

月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤（LST）

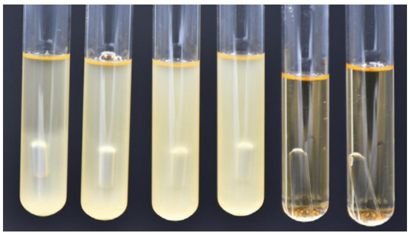
1、产品用途：月桂基硫酸盐盐胰蛋白胨肉汤用于多管发酵法测定大肠菌群和粪大肠菌群。

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

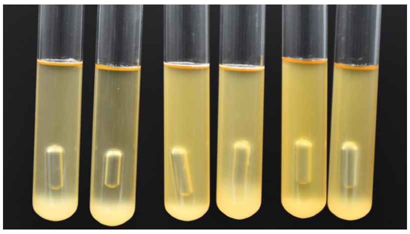
表 13-2：月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤（LST）验证数据

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

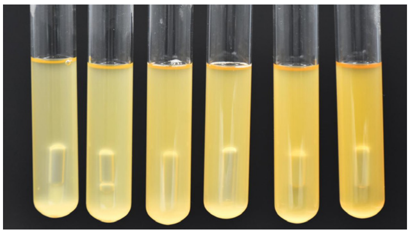
3、典型特征图片：



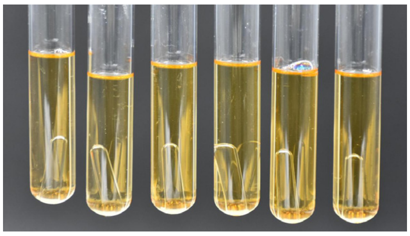
逗点 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤（LST）生长现象



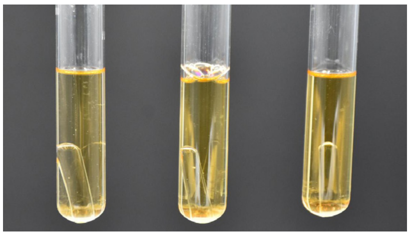
大肠埃希氏菌 ATCC 25922 LST 竞品比对



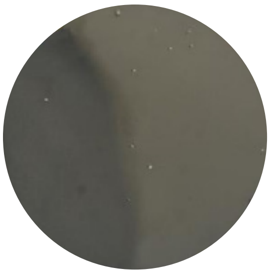
弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864 LST 竞品比对



粪肠球菌 ATCC 29212 LST 竞品比对

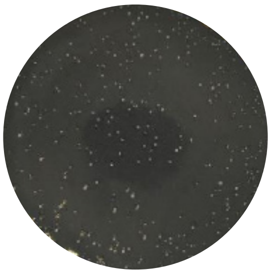


月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤（LST）竞品空白对比



计数大肠埃希氏菌 ATCC25922

计数弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864



计数粪肠球菌 ATCC29212

图 13-5

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、陆桥、环凯的混浊度、产气均满足要求；

4.2 选择性：粪肠球菌 ATCC29212，逗点、陆桥、环凯均满足不生长、不产气的要求；

4.3 感观：逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。

附录 B

伊红美蓝（EMB）琼脂培养基验证

1、产品用途：用于分离革兰氏阴性肠道菌特别是大肠菌群和粪大肠菌群。

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

表 13-3：红美蓝（EMB）琼脂培养基验证

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

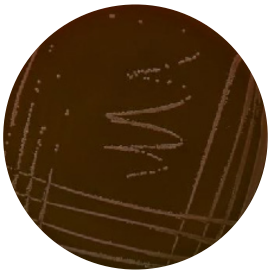
3、典型特征图片：

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 - 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 13-6

4、验证结果小结：

4.1 生长率: 目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922, 逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 PR ≥ 0.5; 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 感观：逗点、H 品牌平板颜色无明显差异，L 品牌平板颜色稍微深一点。

附录 C

EC 肉汤验证

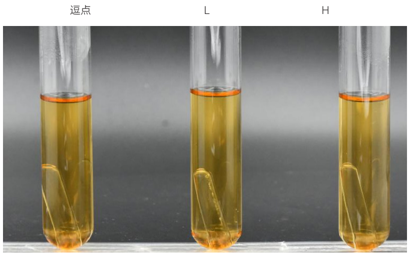
1、产品用途：用于多管发酵法测定粪大肠菌群和大肠杆菌的确证试验。

2、检验原理：胰蛋白胨提供碳氮源；3 号胆盐抑制革兰氏阳性菌；乳糖是可发酵的糖类；磷酸氢二钾和磷酸二氢钾为缓冲剂；氯化钠可维持均衡的渗透压。

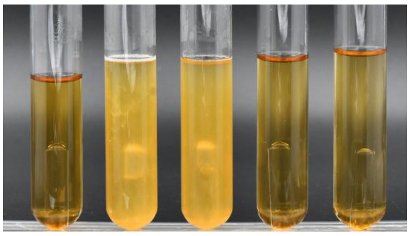
表 13-4：EC 肉汤验证

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

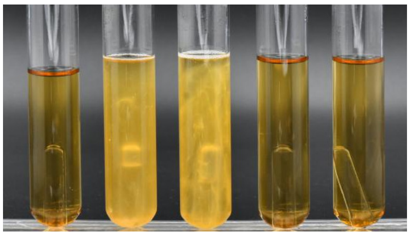
3、典型特征图片：



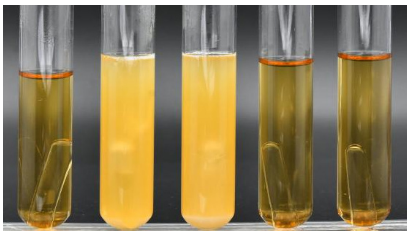
逗点 -L 品牌 -H 品牌 -EC 肉汤空白



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



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



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

菌液计数 - 大肠埃希氏菌

菌液计数 - 粪肠球菌

图 13-7

4、验证结果小结：

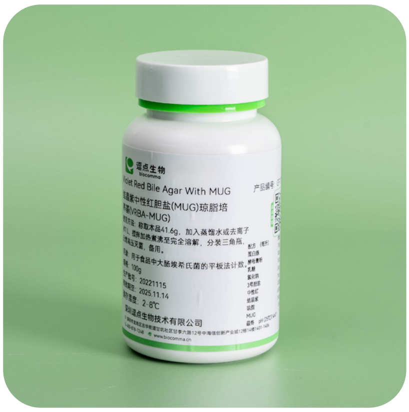
4.1 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标混浊度 2，且气体充满管内 1/3 的要求，H 品牌混浊度最明显；

4.2 选择性：粪肠球菌 ATCC29212，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标混浊度 0(不生长）的要求；

4.3 感观：逗点、L 品牌、H 品牌空白肉汤颜色无显著差异。

附录 D

结晶紫中性红胆盐 MUG 琼脂培养基 (VRBA-MUG) 验证



1、产品用途：用于食品中大肠埃希氏菌的平板法计数。

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

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

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数（TSA）	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
结晶紫中性红胆盐 MUG 琼脂培养基 (VRBA-MUG)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	87	56	1.5	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	63		1.1		符合
		H 品牌	83		1.4		符合
	弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864	逗点	/	/	带有沉淀环的红色菌落，无荧光	可带有沉淀环的红色菌落，无荧光	符合
		L 品牌	/		带有沉淀环的红色菌落，无荧光		符合
		H 品牌	/		带有沉淀环的红色菌落，无荧光		符合
1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在结晶紫中性红胆盐 MUG 琼脂培养基 (VRBA-MUG) 板上的菌落特征：PR ≥ 0.7，带有沉淀环的紫红色或红色菌落，有荧光； 2. 弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864 在结晶紫中性红胆盐 MUG 琼脂培养基 (VRBA-MUG) 板上的菌落特征：可带有沉淀环的红色菌落，无荧光； 3. 粪肠球菌 ATCC29212 在结晶紫中性红胆盐 MUG 琼脂培养基 (VRBA-MUG) 板上的菌落特征：G ＜ 5；							

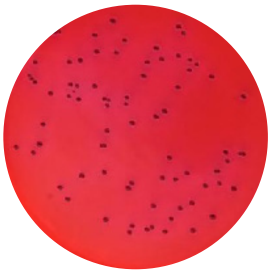
3、典型特征图片：

逗点 -VRBA-MUG 空白

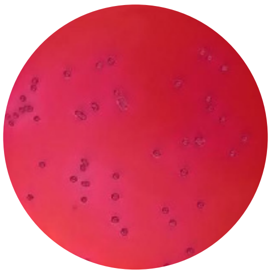
L 品牌 -VRBA-MUG 空白

H 品牌 -VRBA-MUG 空白

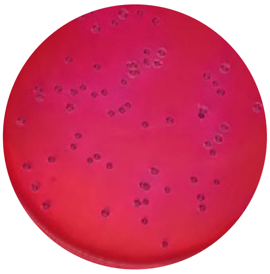
正常光下



逗点 -VRBA-MUG- 大肠埃希氏菌 ATCC25922

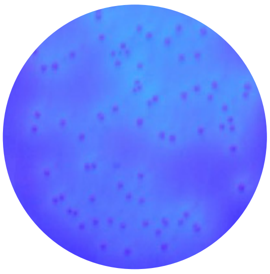


L 品牌 -VRBA-MUG- 大肠埃希氏菌 ATCC25922

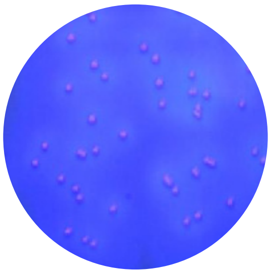


H 品牌 -VRBA-MUG- 大肠埃希氏菌 ATCC25922

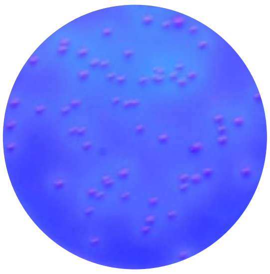
紫外光下



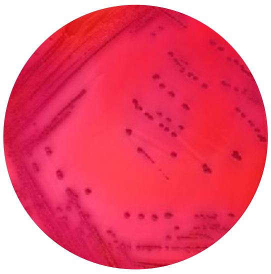
逗点 -VRBA-MUG- 大肠埃希氏菌 ATCC25922



L 品牌 -VRBA-MUG- 大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌 -VRBA-MUG- 大肠埃希氏菌 ATCC25922



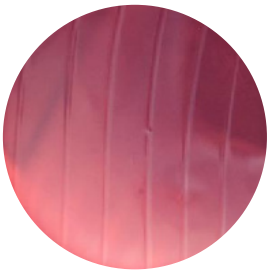
逗点 -VRBA-MUG- 弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864

L 品牌 -VRBA-MUG- 弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864

H 品牌 -VRBA-MUG- 弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864

逗点 -VRBA-MUG- 粪肠球菌 ATCC29212

L 品牌 -VRBA-MUG- 粪肠球菌 ATCC29212



H 品牌 -VRBA-MUG- 粪肠球菌 ATCC29212

图 13-8

4、验证结果小结：

4.1 生长率: 目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 PR ≥ 0.7，带有沉淀环的紫红色或红色菌落，有荧光的要求，逗点生长率最好，菌落比 L 品牌、H 品牌偏小；

4.2 选择性：弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标可带有沉淀环的红色菌落，无荧光的要求；

4.3 选择性：粪肠球菌 ATCC29212，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 G ＜ 5 的要求；

4.4 感观：逗点空白平板颜色较鲜红，L 品牌、H 品牌空白平板颜色无显著差异。

Aiculture®
让微生物检测更省时

让微生物检测更省时

官方公众号　　逗点商城　　逗点 1688　　逗点锐竞　　逗点喀斯玛

深圳逗点生物技术有限公司
Biocomma Limited

地址：深圳市龙岗区吉华街道甘坑社区甘李六路 12 号中海信创新产业城 12 栋 14 楼 1401-1406
TEL：400-878-7248　WEB：www.biocomma.cn　EMAIL：info@biocomma.com