



逗点生物  
biocomma

Aiculture®  
让微生物检测更省时

更好滤芯·更好样本前处理·更好生物工艺  
Better Filter & Better Sample Prep & Better Bioprocess



# 微生物应用手册

第一版



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



400-878-7248

# Company Profile

## 企业简介



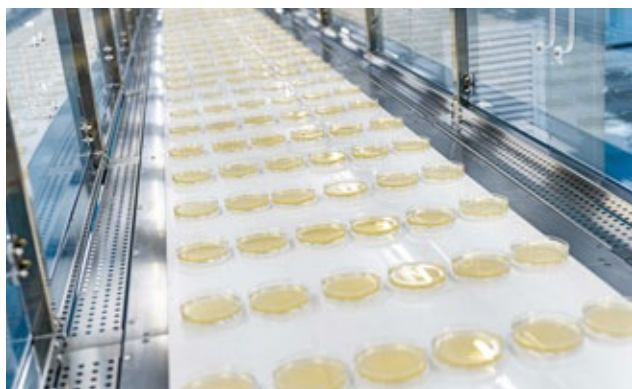
逗点生物（Biocomma）成立于 2006 年，总部位于深圳，主营生命科学和医疗健康产品的研发、生产和销售，业务遍布五十多个国家和地区。

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。同时为生命科学研究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。

Aiculture® 是逗点生物旗下品牌，专注于微生物培养基的研发和生产，致力于为微生物检测提供高效、便捷的系统化整体解决方案，作为专业的微生物检测解决方案提供商，我们拥有领先级的技术、全方位的产品和一站式的服务，是值得您信赖的微生物学合作伙伴。

特点：

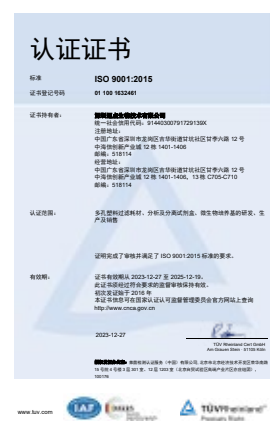
- 无菌工艺控制：产自十万级 GMP 洁净生产车间，可提供卓越的无菌保证；
- 超一流的性能：选用最高质量的原料制成并通过严格测试，确保产品一致性、稳定性和可重现性；
- 快速可靠的交付：供应稳定，货源充足，能够提供可靠的培养基次日交付服务；
- 值得信赖的安全性能：密封包装，有效减少运输过程中的破损或意外开盖和污染。



# 企业荣誉



- ◆ 国家高新技术企业
- ◆ 深圳市专精特新中小企业
- ◆ 中国医药保健品进口协会会员
- ◆ 深圳市医疗器械行业协会理事单位
- ◆ 深圳市医疗器械质量管理促进会理事单位
- ◆ 获得 ISO9001 体系认证；ISO13485 体系认证
- ◆ 广东省吸附分离与过滤产品工程技术研究中心
- ◆ 《一次性使用采样拭子》团体标准第一起草单位
- ◆ 《样本保存管（含保存液）》团体标准主要起草单位
- ◆ 获国家发明专利与实用新型专利授权 80 余项、软著授权 10 项







## 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

# CONTENTS

## 目录

01	<b>食品微生物检验 GB4789.2-2022</b> <b>菌落总数测定及注意事项</b>	
	食品微生物检验 GB4789.2-2022 菌落总数测定及注意事项	02
	平板计数琼脂 (PCA)	05
02	<b>食品微生物检验 GB4789.3-2016</b> <b>大肠菌群计数及注意事项</b>	
	食品微生物检验 GB4789.3-2016 大肠菌群计数及注意事项	07
	月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST)	12
	煌绿乳糖胆盐肉汤 (BGLB)	14
	结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA)	16
03	<b>食品微生物检验 GB 4789.15-2016</b> <b>霉菌酵母计数</b>	
	食品微生物检验 GB 4789.15-2016 霉菌酵母计数	18
	马铃薯葡萄糖琼脂PDA(含氯霉素) 验证	22
	孟加拉红 (虎红) 琼脂验证	24
04	<b>食品微生物检验 GB4789.4-2016</b> <b>沙门氏菌检验及注意事项</b>	
	食品微生物检验 GB4789.4-2016 沙门氏菌检验及注意事项	26
	缓冲蛋白胨水 (BPW) 产品验证	31
	四硫磺酸钠煌绿 (TTB) 增菌验证	32
	亚硒酸盐胱氨酸增菌液 (SC) 验证	35
	亚硫酸铋琼脂基础 (BS) 验证	38
	HE 琼脂验证	41
	木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 验证	43
	沙门氏菌显色培养基验证	45
	三糖铁琼脂 (TSI) 验证	47
05	<b>食品微生物检验 GB4789.10-2016</b> <b>金黄色葡萄球菌的检验及注意事项</b>	
	食品微生物检验GB4789.10-2016 金黄色葡萄球菌的检验及注意事项	49
	7.5%氯化钠肉汤验证	56
	Baird-Parker琼脂验证	58
	血液琼脂基础验证	60
	脑心浸出液肉汤 (BHI)	62

# 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

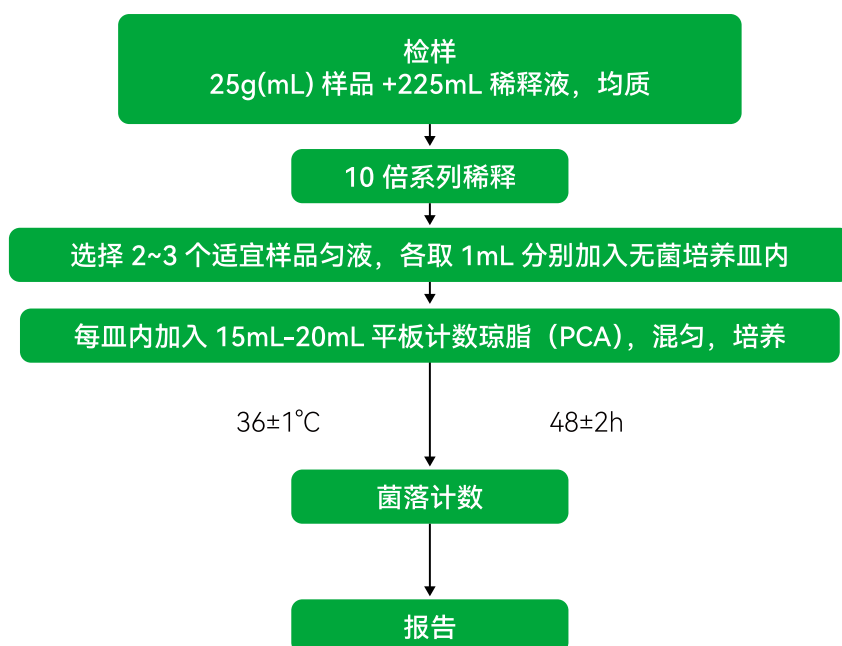
菌落总数定义:指在一定条件下(如需氧情况、营养条件、pH、培养温度和时间等)每克(每毫升)检样所生长出来的菌落数。

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、GB4789.2-2016 菌落总数测定(平板法)

### 1. 菌落总数检验流程图



## 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. 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。

## 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;

$\Sigma c$ ——平板 (含适宜范围菌落数的平板) 菌落数之和;

$n_1$ ——第一稀释度 (低稀释倍数) 平板个数;

$n_2$ ——第二稀释度 (高稀释倍数) 平板个数;

d——稀释因子 (第一稀释度)。

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

## 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。
- 注: 菌落总数结果计算与报告方式实例见以下表格



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

### 三、质量控制和疑难解析

#### 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。

#### 2. 疑难解析

1：为什么水产品与其他食品中菌落总数检测时所采用的培养条件不同？

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

2：当高稀释度平板上的菌落数反而比低稀释度平板上菌落数高时，如何处理？

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

3：当所有平板上都菌落密布时，结果如何报告？

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

### 四、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。
- 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

4、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



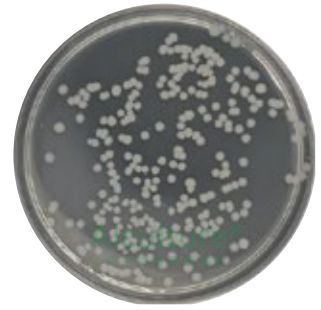
H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



逗点枯草芽孢杆菌 ATCC6633



L 品牌枯草芽孢杆菌 ATCC6633



H 品牌枯草芽孢杆菌 ATCC6633

##### 5、验证结果小结：

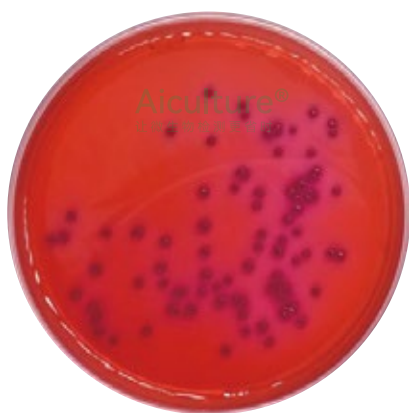
- 1、生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922 、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、枯草芽孢杆菌 ATCC6633，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $PR \geq 0.7$  的要求。
- 2、感观：三家平板颜色无显著差异。

## 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）和等。

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

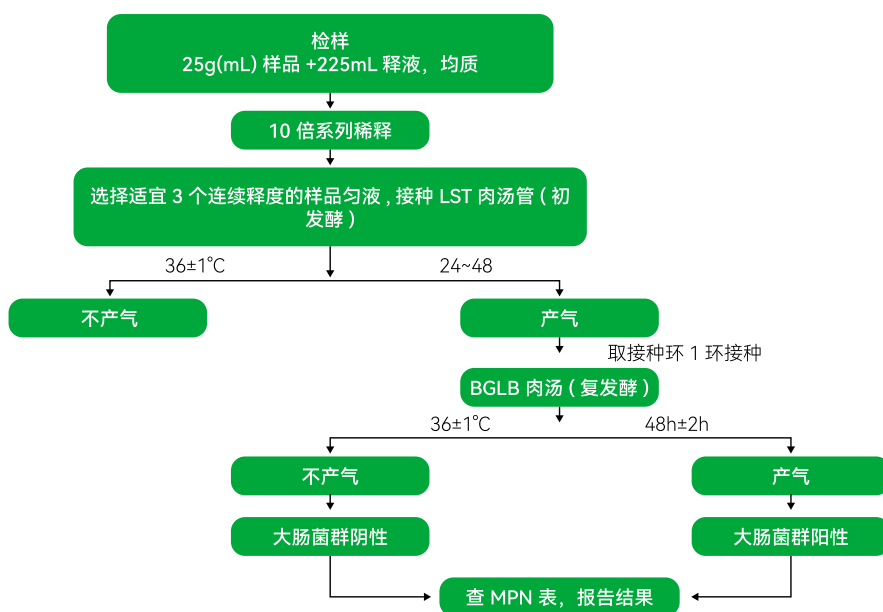


### 二、GB4789.3-2016 大肠菌群 MPN 法

#### 1. 什么是 MPN 法？

- MPN 法是统计学和微生物学结合的一种定量检测法。待测样品经系列稀释并培养后，根据其未生长的最低稀释度与生长的最高稀释度，应用统计学概率论推算出待测样品中大肠菌群的最大可能数。
- MPN 值并不能表示实际菌落数，实际菌落数有可能落在置信区间内的任何一点，MPN 值是落在这个置信区间内概率最大的一点。
- 灵敏度较高，适用于污染菌落较少的样品。

#### 2. 大肠菌群 MPN 计数的检验操作



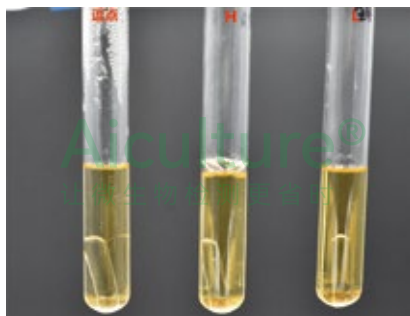
### 操作注意事项

- 1: 建议用磷酸盐缓冲液作为稀释液, 因为磷酸盐缓冲液能更好地纠正食品样品中 pH 变化, 对细菌具有保护作用。
- 2: 初发酵接种量超过 1mL, 则用双料 LST 肉汤。
- 3: 培养基检测。加入样品前应观察导管内是否有气泡, 若有, 应适当倾斜试管, 让气体排出。
- 4: 结果观察。某些食品样品可能会堵塞小导管底部, 影响导管内气泡的观察, 可将试管微微倾斜, 用手指轻弹管壁, 观察是否有一串小气泡沿管壁升起, 若有, 则判定产气。

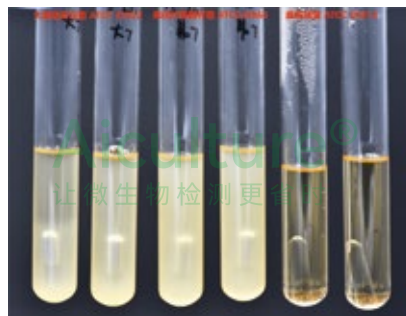
### 3. 培养基原理解析

#### 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST)

- 月桂基硫酸盐能抑制革兰氏阳性菌生长, 胰蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求; 氯化钠可维持均衡的渗透压; 乳糖是大肠菌群可发酵的糖类; 磷酸二氢钾和磷酸氢二钾是缓冲剂。
- $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  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  $48\pm 2\text{h}$ 。
- 如接种量超过 1mL, 则用双料 LST 肉汤。



月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST) 竞品空白对比

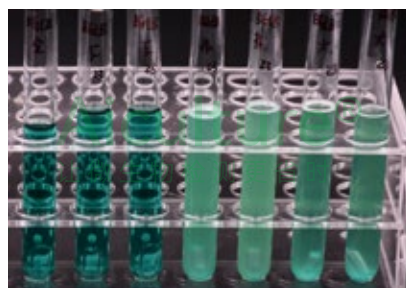


逗点 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST) 生长现象



煌绿乳糖胆盐肉汤 (BGLB)

逗点、L 品牌、K 品牌竞品空白对比



阴性

阳性

### 4. 大肠菌群最大可能数 (MPN) 报告

- 确证的大肠菌群 BGLB 阳性管数, 检索 MPN 表, 报告每 1g(mL) 样品中大肠菌群的 MPN 值。
- 当实验结果在 MPN 表中无法查找到 MPN 值时, 如: 阳性管数为 122, 123, 232, 233 等时, 建议增加稀释度 (可做 4~5 个稀释度), 使样品最高稀释度能达到阴性终点 (如果污染程度不能判定, 则多加一稀释度), 然后再遵循相关的规则进行查找, 最终确定 MPN 值。



表：大肠菌群最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN	95 % 可信限		阳性管数			MPN	95 % 可信限	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	< 3.0	—	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1 000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1 000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2 000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1 100	180	4 100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	> 1 100	420	—

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

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

### 三、GB4789.3-2016 大肠菌群平板计数法

#### 1. 大肠菌群平板计数法流程图



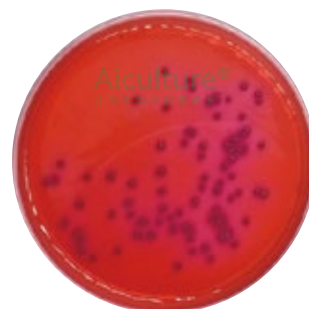
### 操作注意事项

- 1: 平板法相对 MPN 法来说, 结果更加直观精准。长成的一个单菌落也可能来自样品中的 2~3 或更多个细胞。因此平板菌落计数的结果往往偏低。适用与污染较为严重的样品。
- 2: 从一个样品取样到倾注琼脂平板, 应在 15 分钟内完成。
- 3: 检验所用物品应无菌, 无抑菌残留物。
- 4: BGLB 确证试验需从 VRBA 平板上挑起至少 10 个典型和可疑菌落进行, 如平板上菌落数少于 10 个, 则挑取全部典型和可疑菌落进行确证。

## 2. 培养基原理解析

### 结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA)

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



大肠埃希氏菌 ATCC25922  
在 VRBA 上的菌落形态

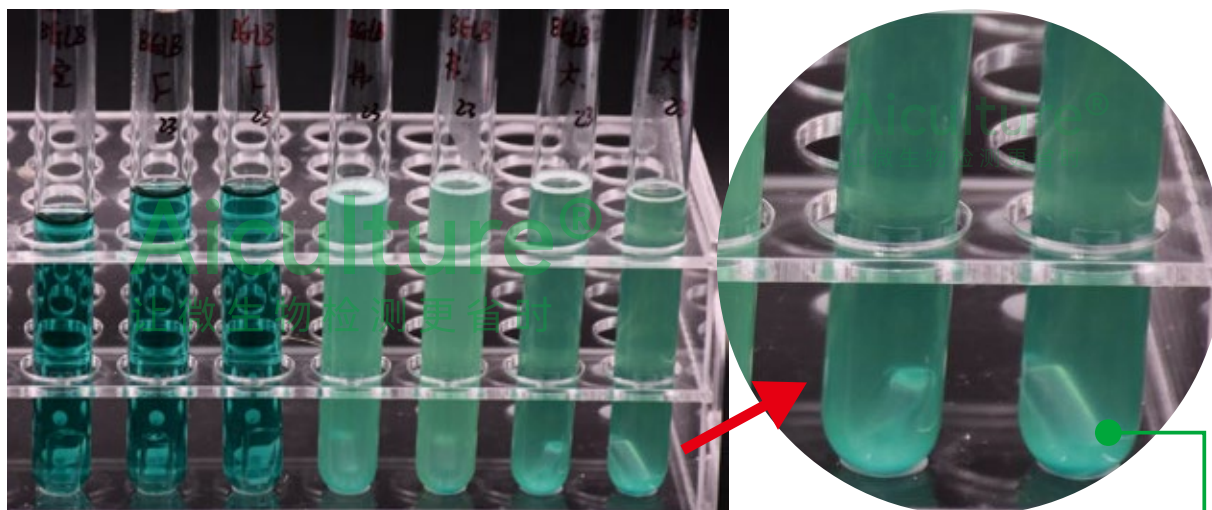
## 3. 计数典型和可疑菌落数

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

典型大肠菌群菌落:  
紫红色, 菌落周围有  
红色的胆盐沉淀环



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



BGLB 肉汤试管中的小导管有气泡，大肠菌群阳性。

#### 4. 大肠菌群平板计数的报告

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

#### 四、质量控制

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

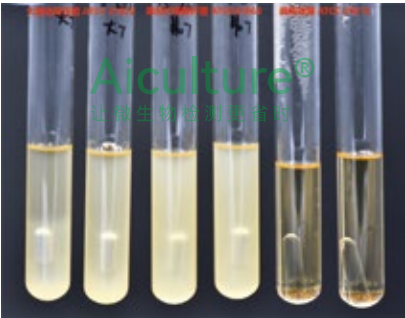
月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤（LST）

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

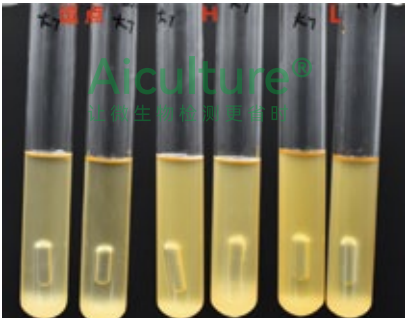


样品名称	质控菌株	厂家	参比培养基计数（TSA）	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤（LST）	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	26	液体混浊且产气	混浊度 2， 且气体充满管内 1/3	符合
		L 品牌				符合
		H 品牌				符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	41			符合
		L 品牌				符合
		H 品牌				符合
	枯草芽孢杆菌 ATCC6633	逗点	2118	未生长	混浊度 0（不生长）	符合
		L 品牌				符合
		H 品牌				符合

4、典型特征图片：



逗点 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤（LST）  
生长现象



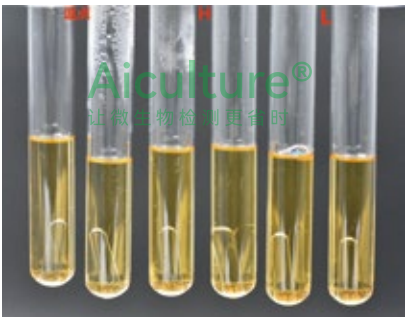
大肠埃希氏菌 ATCC 25922 LST  
竞品比对



弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864 LST  
竞品比对



粪肠球菌 ATCC 29212 LST  
竞品比对



月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤（LST）  
竞品空白对比

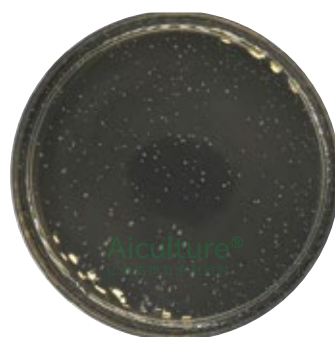




计数大肠埃希氏菌 ATCC25922



计数弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864



计数粪肠球菌 ATCC29212

##### 5、验证结果小结：

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

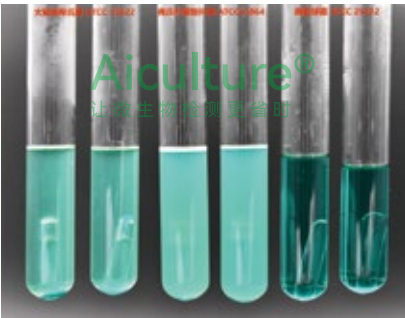
煌绿乳糖胆盐肉汤（BGLB）

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

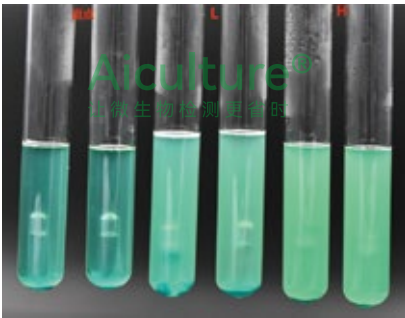


样品名称	质控菌株	厂家	参比培养基计数（TSA）	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
煌绿乳糖胆盐肉汤（BGLB）	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	26	液体混浊且产气	混浊度 2， 且气体充满管内 1/3	符合
		L 品牌				符合
		K 品牌				符合
	弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864	逗点	41			符合
		L 品牌				符合
		K 品牌				符合
	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	2118	未生长	混浊度 0（不生长） 或混浊度 1（微弱生长）， 不产气	符合
		L 品牌				符合
		K 品牌				符合

4、典型特征图片：



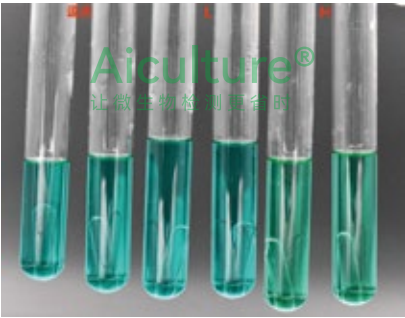
逗点煌绿乳糖胆盐肉汤（BGLB）  
生长现象



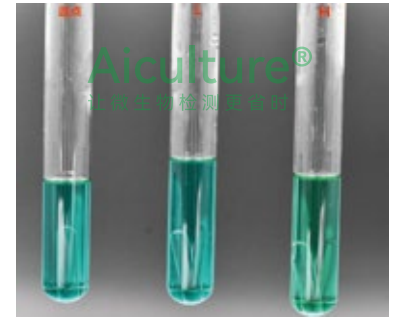
大肠埃希氏菌 ATCC 25922 BGLB  
逗点、L 品牌、K 品牌竞品比对



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



粪肠球菌 ATCC 2921 BGLB  
逗点、L 品牌、K 品牌竞品比对



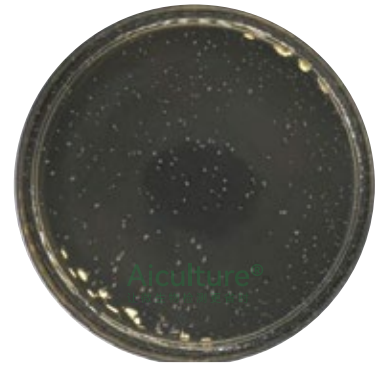
煌绿乳糖胆盐肉汤（BGLB）  
逗点、L 品牌、K 品牌竞品空白对比



计数大肠埃希氏菌 ATCC25922



计数弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864



计数粪肠球菌 ATCC29212

##### 5、验证结果小结：

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

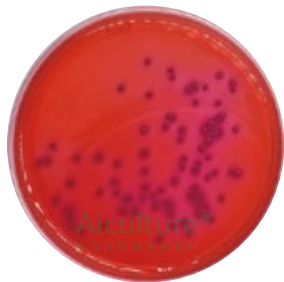
# 结晶紫中性红胆盐琼脂（VRBA）



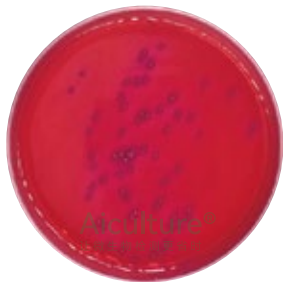
- 1. 产品用途：用于水或食品中大肠菌群平板菌落计数。
- 2. 检验原理：蛋白胨和酵母膏粉提供碳氮源和微量元素；乳糖是可发酵的糖类；氯化钠可维持均衡的渗透压；3 号胆盐和结晶紫抑制革兰氏阳性菌，特别抑制革兰氏阳性杆菌和粪链球菌；中性红为 pH 指示剂。
- 3、结晶紫中性红胆盐琼脂（VRBA）验证数据

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

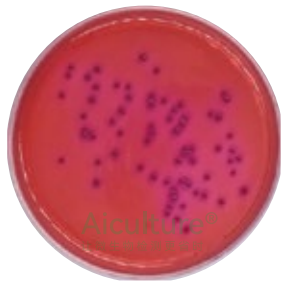
- 1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 VRBA 板上的菌落特征：有或无沉淀环的紫红色或红色菌落；
- 2. 弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864 在 VRBA 板上的菌落特征：有或无沉淀环的紫红色或红色菌落；
- 3. 粪肠球菌 ATCC 29212 在 VRBA 板上的菌落特征：选择性 G<5；



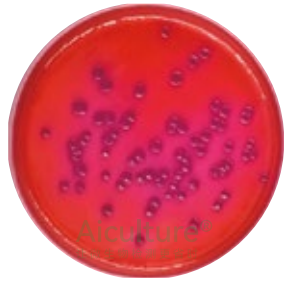
逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



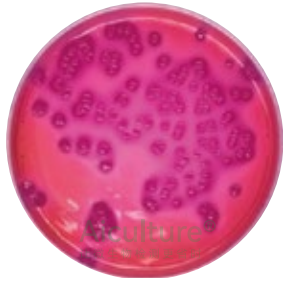
L 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



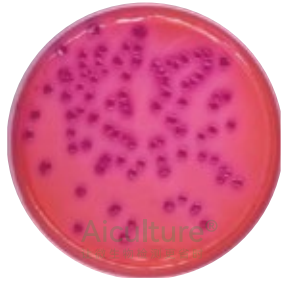
H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



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

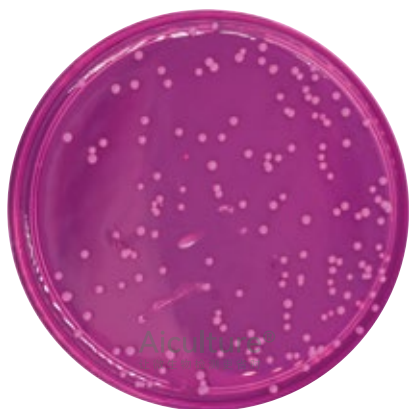
#### 4、验证结果小结：

1. 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922、弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $PR \geq 0.7$  的要求，逗点、H 品牌、L 品牌都有明显胆酸盐沉淀。
2. 选择性：粪肠球菌 ATCC 29212，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标  $G \leq 1$  的要求。
3. 感观：H 品牌平板颜色为紫红色偏粉，L 品牌平板颜色为紫红色偏紫，逗点颜色为紫红偏红色。其中逗点颜色最深，H 品牌颜色最浅，L 品牌在两者之间。

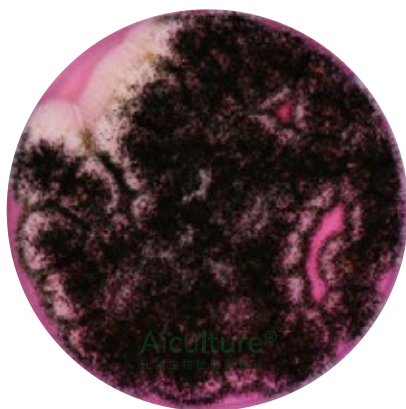
## 03 食品微生物检验 GB 4789.15-2016 霉菌酵母计数

### 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。



逗点酿酒酵母 ATCC9763



逗点黑曲霉 ATCC16404



### 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》

#### 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 基本要求

##### 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 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。

##### 2.3 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。

##### 2.4 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。

#### 2.4.1 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。



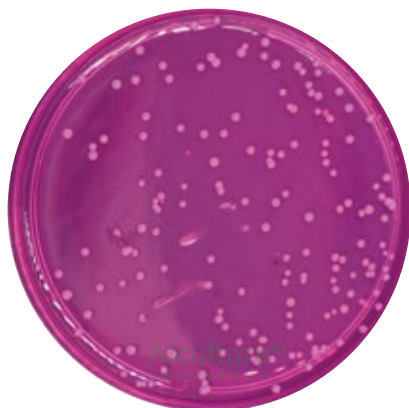
逗点黑曲霉 ATCC16404



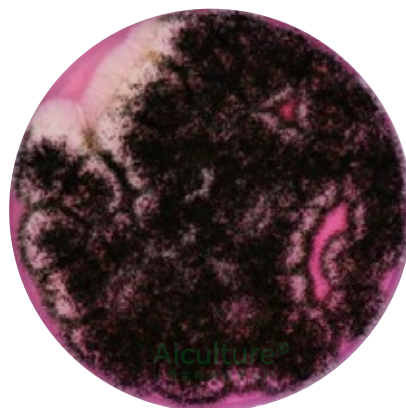
逗点酿酒酵母 ATCC9763

#### 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。



逗点黑曲霉 ATCC16404



逗点酿酒酵母 ATCC9763

#### 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。

#### 2.4.4 磷酸盐缓冲液的配制

##### a) 贮存液的配制

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

##### b) 稀释液的配制

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

#### 2.5 生物垃圾的处理

所有生物垃圾应经 121℃高压灭菌 30min 后，方可运离实验室。

### 3 检验程序

按下图霉菌和酵母的平板计数法的检验程序进行食品中霉菌和酵母的计数。



#### 3.1 样品的稀释

##### 3.1.1 固体和半固体样品

用天平无菌称取  $25\text{g} \pm 0.1\text{g}$  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  $46^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  恒温水浴箱中保温，或及时将 20mL ~ 25mL 冷却至  $46^{\circ}\text{C}$  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  $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  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。

# 马铃薯葡萄糖琼脂 PDA(含氯霉素) 验证



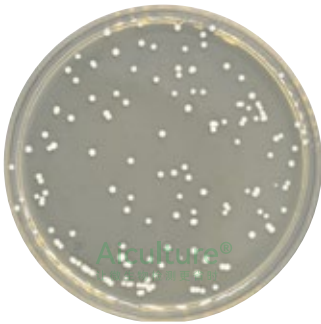
- 1. 产品用途：供霉菌和酵母的计数、分离和培养用。
- 2. 检验原理：马铃薯浸出粉有助于各种霉菌的生长；葡萄糖提供能源；琼脂是培养基的凝固剂；氯霉素可抑制细菌的生长。
- 3. 马铃薯葡萄糖琼脂 PDA(含氯霉素) 验证数据

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							

4、典型特征图片：



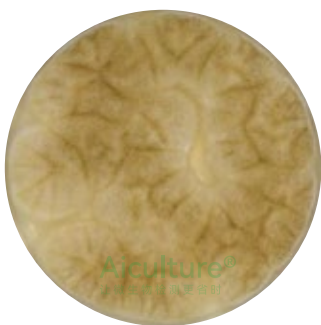
逗点酿酒酵母 ATCC9763



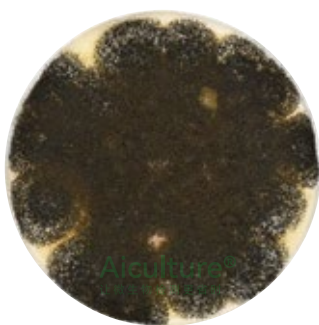
L 品牌酿酒酵母 ATCC9763



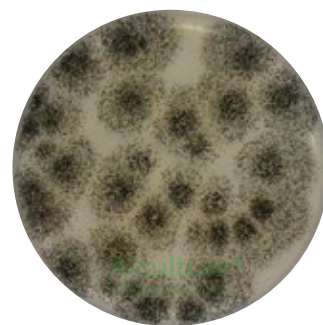
H 品牌酿酒酵母 ATCC9763



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 PDA 空白



逗点 PDA 空白



H 品牌 PDA 空白

## 5. 验证结果小结

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，其中逗点黑色孢子生长较少，现象不明显；H 品牌、L 品牌黑色孢子生长良好，现象明显。
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。
3. 感观：逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。

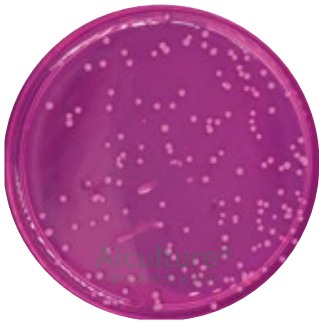
孟加拉红（虎红）琼脂验证

- 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蔓延生长。
- 3. 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							

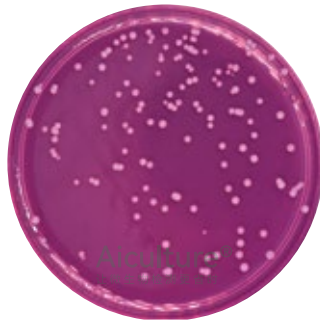
4、典型特征图片：



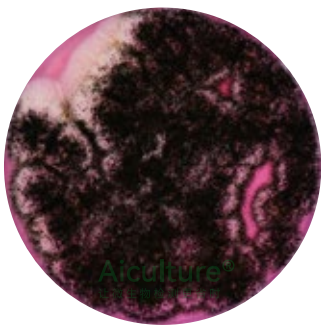
逗点酿酒酵母 ATCC9763



L 品牌酿酒酵母 ATCC9763



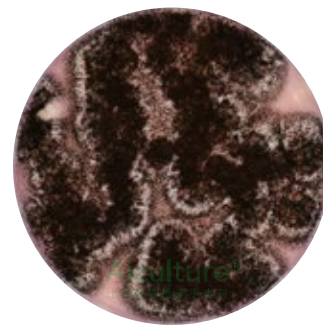
H 品牌酿酒酵母 ATCC9763



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

## 5. 验证结果小结

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



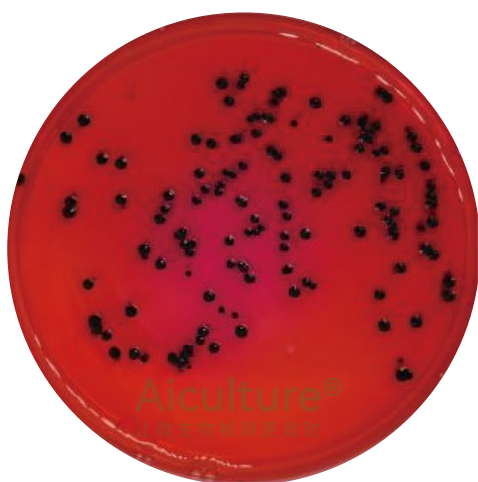
## 04 食品微生物检验 GB4789.4-2016 沙门氏菌检验及注意事项

### 一、沙门氏菌生物学特性

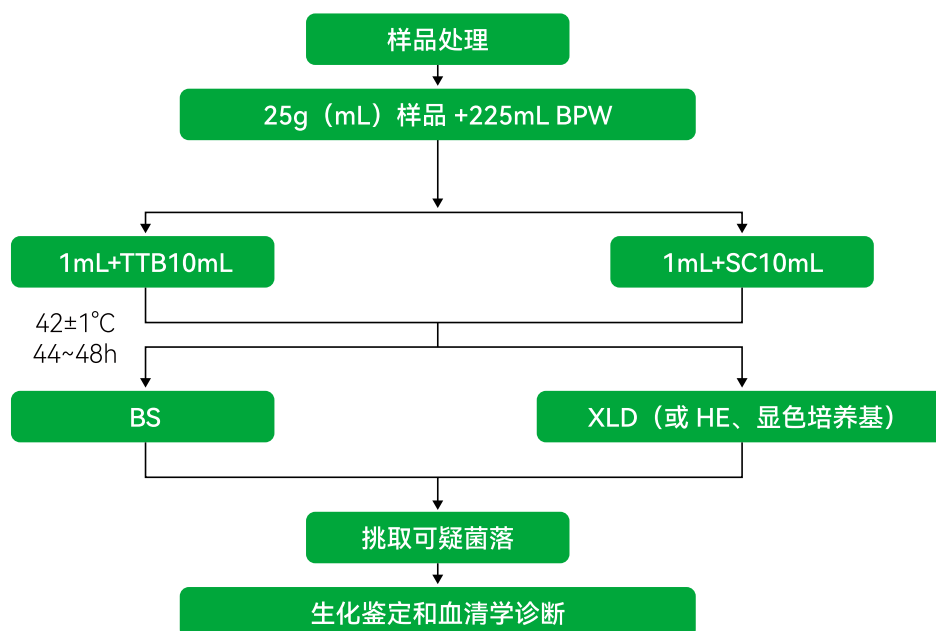
生物学特性：沙门氏菌属是食源性细菌性肠胃炎的首要病原菌，属于肠杆菌科，革兰氏阴性无芽孢杆菌，营养需求不高，需氧或兼性厌氧。典型菌株多具有周生鞭毛、能运动（除鸡瘟沙门菌和鸡沙门菌外）、大部分菌株产 H<sub>2</sub>S、能分解葡萄糖并产气，最适培养温度为 37℃，最适 pH 7.2 ~ 7.6。耐受胆盐，在粪便、土壤、食品、水中可生存 5 个月至二年之久。

血清型：沙门菌属由两个种组成：肠道沙门菌（S. enterica）和邦哥沙门氏菌（S. bongori）。目前已知沙门氏菌血清型有 2500 多种。

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



### 二、沙门氏菌的检验



### 操作注意事项

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

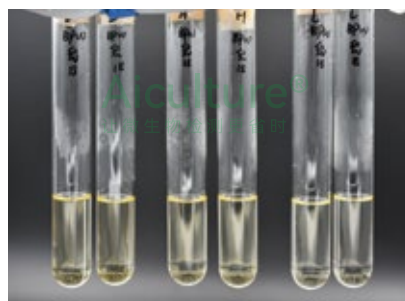
### 三、培养基原理解析

#### 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。



逗点 -H 品牌 -L 品牌 -BPW 空白



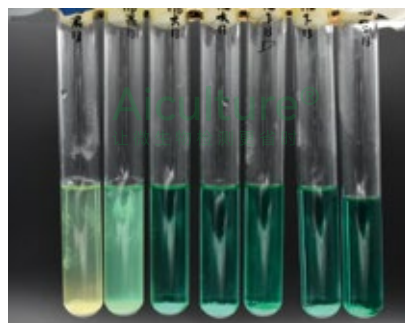
逗点 -H 品牌 -L 品牌 -  
鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028

#### 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。



逗点、L 品牌、H 品牌 TTB 空白



逗点 -TTB 24h 后增菌现象

### 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。



逗点、L 品牌、H 品牌 TTB 空白



逗点 -TTB 24h 后增菌现象

### 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。



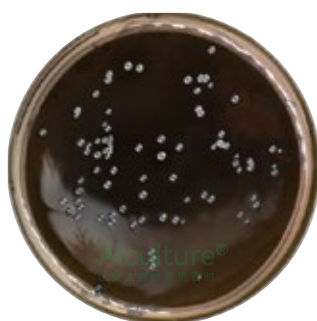
逗点 - 空白平板



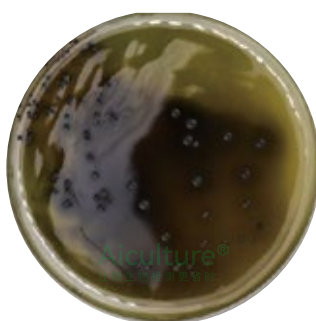
L 品牌 - 空白平板



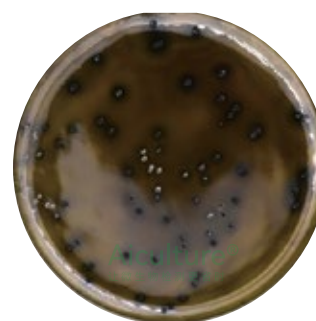
H 品牌 - 空白平板



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

### 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。



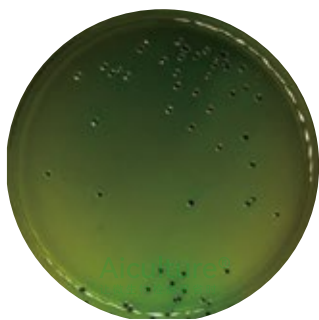
逗点 - 空白平板



L 品牌 - 空白平板



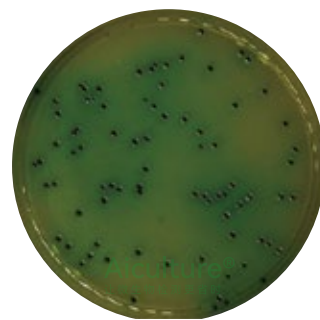
H 品牌 - 空白平板



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

## 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。



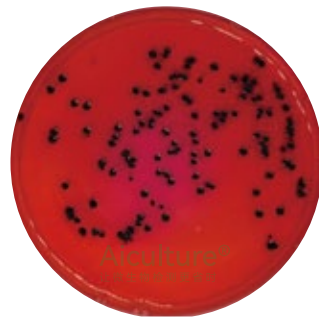
逗点木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂  
(XLD) 空白



L 品牌木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂  
(XLD) 空白



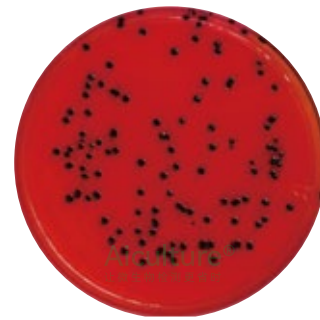
H 品牌木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂  
(XLD) 空白



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

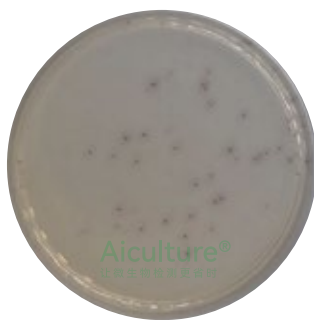


## 7. 沙门氏菌显色培养基

• 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。



逗点 - 空白平板



逗点 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



逗点 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌 - 空白平板



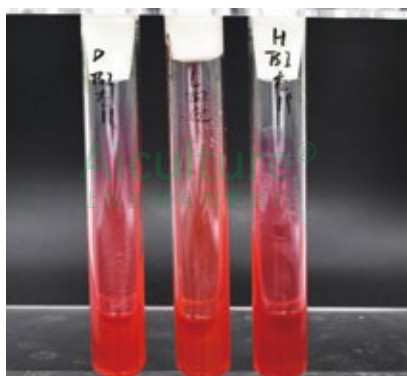
H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



H 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922

## 8. 三糖铁琼脂培养基

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



逗点 - L 品牌 - H 品牌空白



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



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。
- 3、缓冲蛋白胨水（BPW）验证



样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	菌液浓度计数（TSA）	评定标准	结果判定
缓冲蛋白胨水（BPW）	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	820	27	取 10μl 增菌液倾注 TSA 平板 36℃±1℃培养 18h ~ 24h, 在 TSA 上 > 100CFU	符合
		L 品牌	2291			符合
		H 品牌	1905			符合

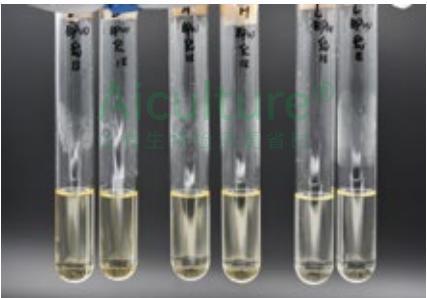
4、典型特征图片：



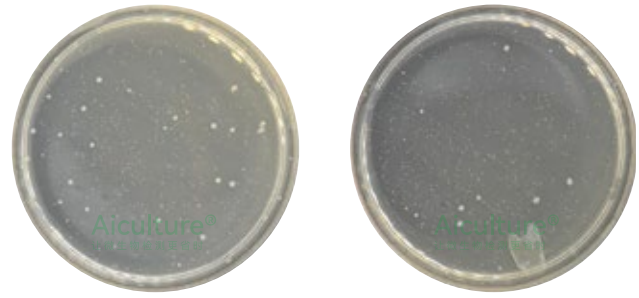
逗点 -H 品牌 -L 品牌 -BPW 空白



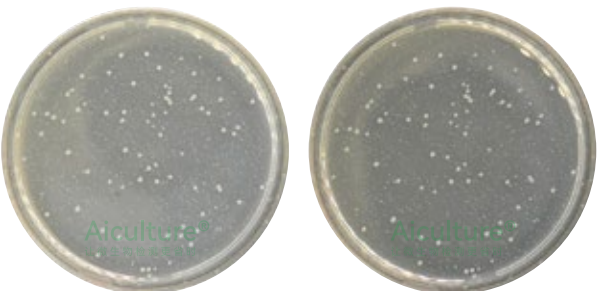
接菌液计数（鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028）



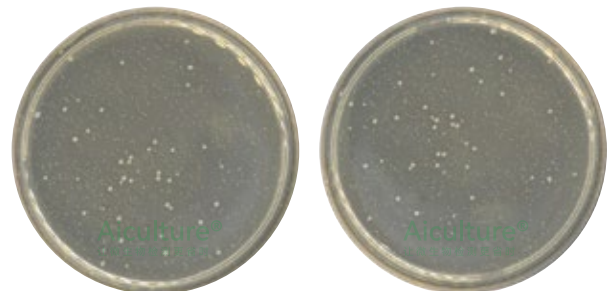
逗点 -H 品牌 -L 品牌 -BPW- 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



逗点 -BPW 增菌后计数



L 品牌 -BPW 增菌后计数



H 品牌 -BPW 增菌后计数

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。
- 3、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 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922 + 铜绿假单胞菌 ATCC27853	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
		L 品牌	/		在 XLD 上 > 10Cfu 菌落无色半透明，有黑心		符合
		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

1. 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；

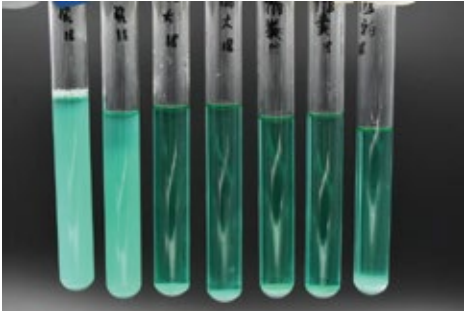
2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在四硫磺酸钠煌绿（TTB）增菌上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；

3. 粪肠球菌 ATCC29212 在四硫磺酸钠煌绿（TTB）增菌上上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU。

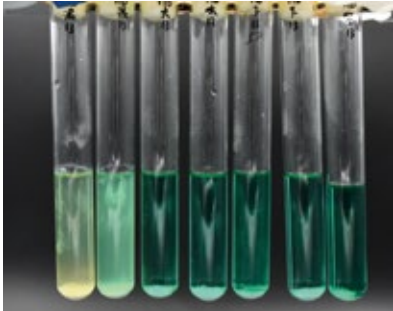
4、典型特征图片：



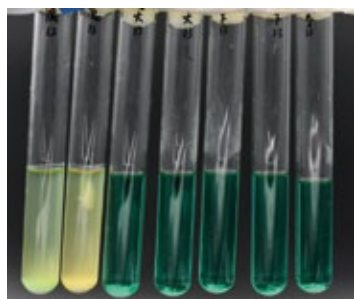
逗点、L 品牌、H 品牌 TTB 空白



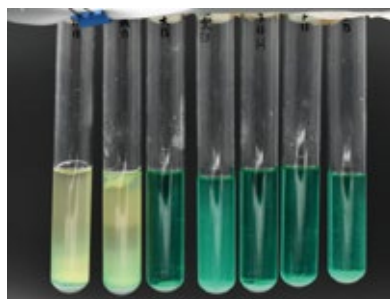
逗点 -TTB 增菌现象



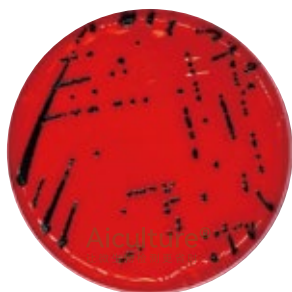
逗点 -TTB24H 后增菌现象



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



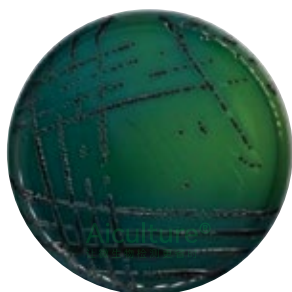
逗点 - 粪肠球菌 ATCC29212



L 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



逗点 TTB 混菌划线 HE



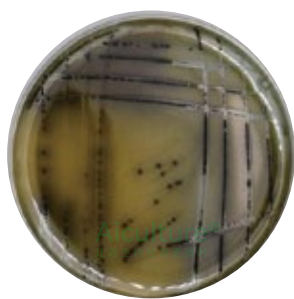
L 品牌 TTB 混菌划线 HE



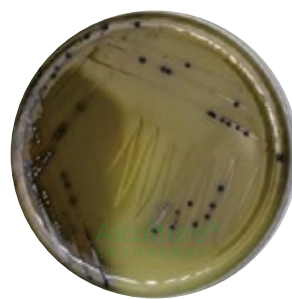
H 品牌 TTB 混菌划线 HE



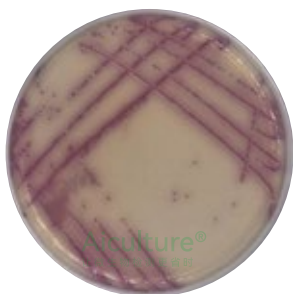
逗点 TTB 混菌划线 BS



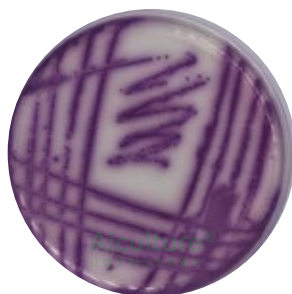
L 品牌 TTB 混菌划线 BS



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

#### 5、验证结果小结：

- 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  $> 10\text{CFU}$ ，菌落无色半透明，有黑心的要求；
- 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  $< 100\text{CFU}$  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  $< 100\text{CFU}$  的要求；
- 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、三家产品无明显差距。



# 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。
- 3、亚硒酸盐胱氨酸增菌液（SC）验证

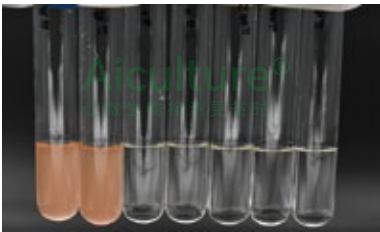


样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	菌液浓度计数（TSA）	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
亚硒酸盐胱氨酸增菌液（SC）	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	58	76	在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明，有黑心	在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明，有黑心	符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	L 品牌	81		在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明，有黑心		符合
	铜绿假单胞菌 ATCC27853	H 品牌	56		在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明，有黑心		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	8	多不可计	<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

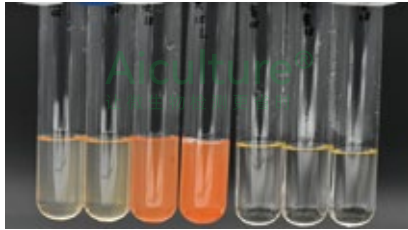
4、典型特征图片：



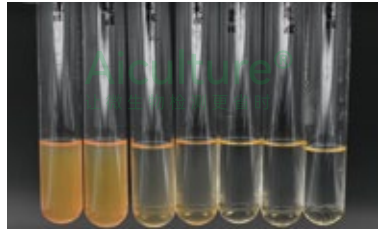
逗点 - 空白 L 品牌 - 空白 H 品牌 - 空白



逗点 -SC 增菌后现象

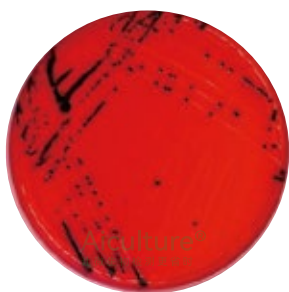


L 品牌 -SC 增菌后现象



H 品牌 -SC 增菌后现象





逗点 SC 混菌划线 XLD



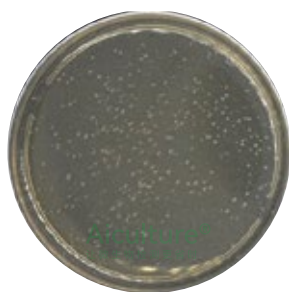
L 品牌 SC 混菌划线 XLD



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



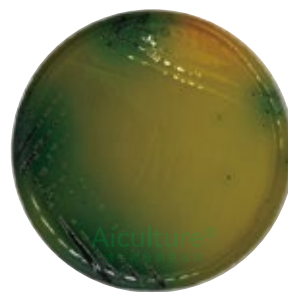
H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



逗点 SC 混菌划线 HE



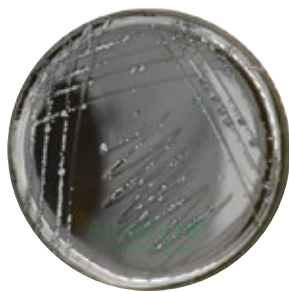
L 品牌 SC 混菌划线 HE



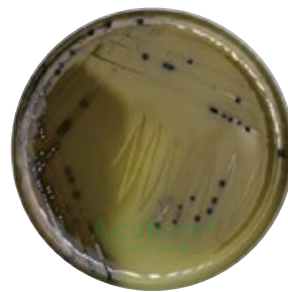
H 品牌 SC 混菌划线 HE



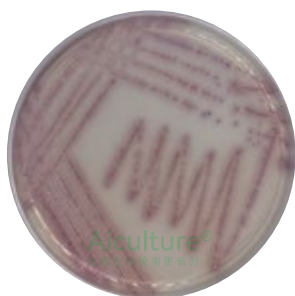
逗点 SC 混菌划线 BS



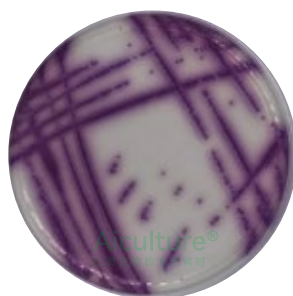
L 品牌 SC 混菌划线 BS



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

##### 5、验证结果小结：

- 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  $> 10\text{CFU}$ ，菌落无色半透明，有黑心的要求；
- 2、选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点符合国标在 TSA 上  $< 100\text{CFU}$  要求，L 品牌、H 品牌均不符合国标在 TSA 上  $< 100\text{CFU}$  要求；逗点大肠埃希氏菌选择性比 L 品牌、H 品牌好；
- 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、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。

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。
- 3、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	菌液浓度计数（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	88	81	1.0	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	51	41	1.2	PR≥0.5	符合
		L 品牌	46		1.1		符合
		H 品牌	24		0.5		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G=2	G≤1	不符合
		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。							

4、典型特征图片：



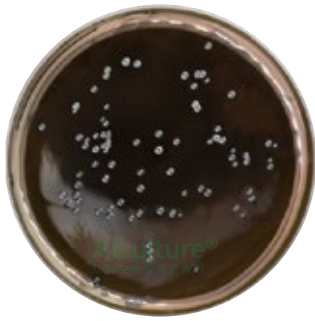
逗点 - 空白平板



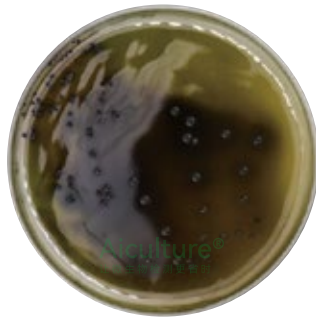
L 品牌 - 空白平板



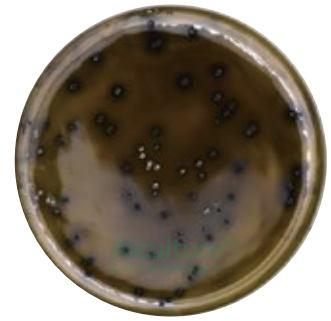
H 品牌 - 空白平板



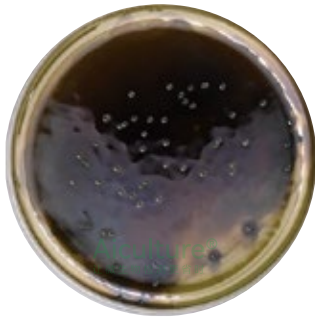
逗点 - 鼠伤寒沙门氏菌  
ATCC14028



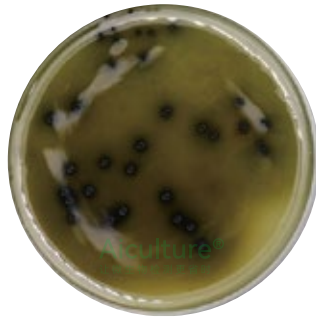
L 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌  
ATCC14028



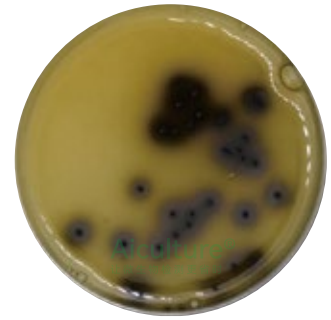
H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌  
ATCC14028



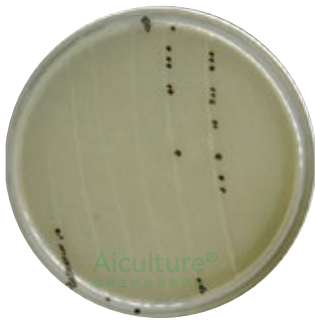
逗点 - 伤寒沙门氏菌  
CMCC50071



L 品牌 - 伤寒沙门氏菌  
CMCC50071



H 品牌 - 伤寒沙门氏菌  
CMCC50071



逗点 - 大肠埃希氏菌  
ATCC25922



L 品牌 - 大肠埃希氏菌  
ATCC25922



H 品牌 - 大肠埃希氏菌  
ATCC25922



逗点 - 粪肠球菌  
ATCC29212



L 品牌 - 粪肠球菌  
ATCC29212



H 品牌 - 粪肠球菌  
ATCC29212



参比 - 鼠伤寒沙门氏菌



参比 - 伤寒沙门氏菌

#### 5、验证结果小结：

- 1、生长率：目标菌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、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，鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 生长率 L 品牌比逗点、H 品牌高，伤寒沙门氏菌 CMCC50071H 品牌生长率较低；
- 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  $G=2$ ，选择性稍差，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；目前研发正在修改配方，新配方即将上市。
- 3、感观：逗点空白平板颜色比 L 品牌稍微偏深一点，沉淀较少，L 品牌空白平板颜色较浅，沉淀较明显，H 品牌空白平板颜色较深，无沉淀。



# 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。
- 3、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；

4、典型特征图片：



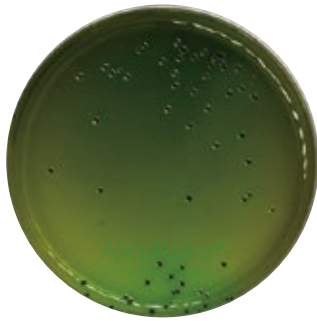
逗点 - 空白平板



L 品牌 - 空白平板



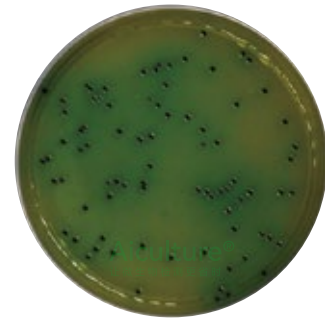
H 品牌 - 空白平板



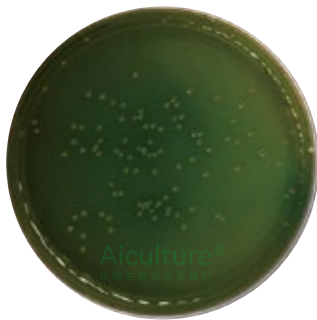
逗点 - 鼠伤寒沙门氏菌  
ATCC14028



L 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌  
ATCC14028



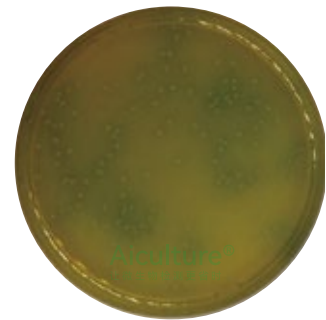
H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌  
ATCC14028



逗点 - 福氏志贺氏菌  
ATCC12022



L 品牌 - 福氏志贺氏菌  
ATCC12022



H 品牌 - 福氏志贺氏菌  
ATCC12022



逗点 - 大肠埃希氏菌  
ATCC25922



L 品牌 - 大肠埃希氏菌  
ATCC25922



H 品牌 - 大肠埃希氏菌  
ATCC25922



逗点 - 粪肠球菌 ATCC29212



L 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212

##### 5、验证结果小结：

- 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。
- 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；
- 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；

# 木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 验证

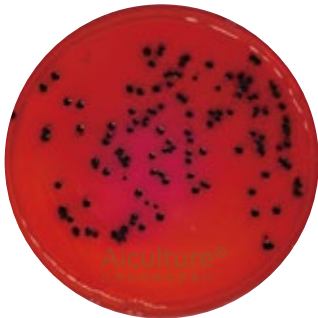
- 1. 产品用途：用于沙门氏菌、志贺氏菌的分离培养。
- 2. 检验原理：酵母膏粉提供氮源、维生素、生长因子；氯化钠维持均衡的渗透压；木糖、乳糖、蔗糖为可发酵糖类，产酸使酚红指示剂变黄；去氧胆酸钠抑制革兰氏阳性菌，但不影响沙门氏菌的生长；硫代硫酸钠可被某些细菌还原硫化氢，与柠檬酸铁铵中的铁盐生成黑色硫化铁；琼脂是培养基的凝固剂；酚红为 pH 指示剂。
- 3、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 验证



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；

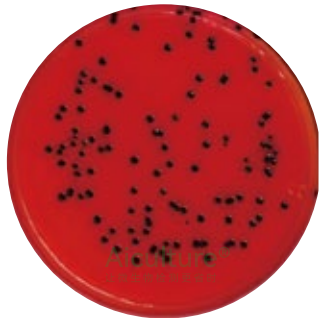
4、典型特征图片：



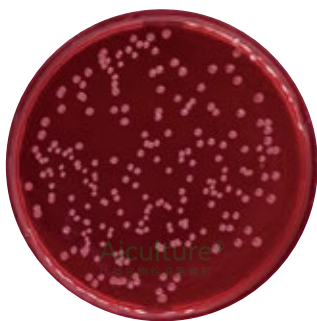
逗点鼠伤寒沙门氏菌  
ATCC14028



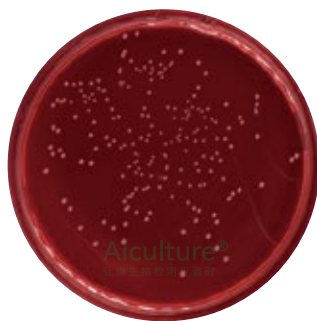
L 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌  
ATCC14028



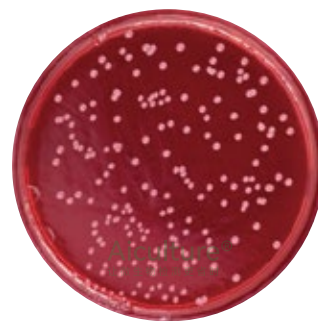
H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌  
ATCC14028



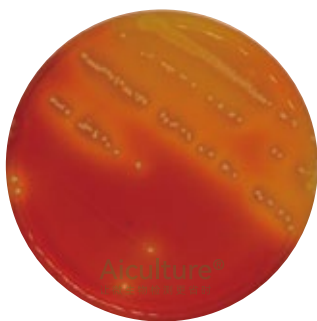
逗点福氏志贺氏菌  
CMCC(B)51572



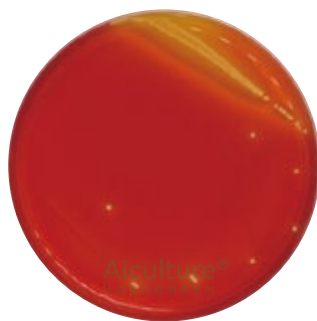
L 品牌 - 福氏志贺氏菌  
CMCC(B)51572



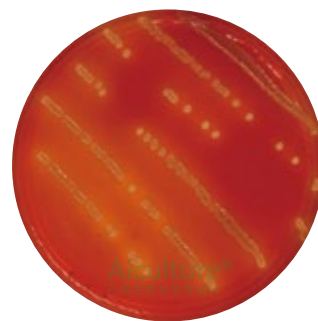
H 品牌 - 福氏志贺氏菌  
CMCC(B)51572



逗点大肠埃希氏菌  
ATCC 25922



L 品牌 - 肠埃希氏菌  
ATCC 25922



H 品牌 - 大肠埃希氏菌  
ATCC 25922



逗点金黄色葡萄球菌  
ATCC6538



L 品牌 - 黄色葡萄球菌  
ATCC6538



H 品牌 - 黄色葡萄球菌  
ATCC653



逗点木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂  
(XLD) 空白



L 品牌 - 木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂  
(XLD) 空白



H 品牌 - 木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂  
(XLD) 空白

## 5、验证结果小结：

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；
2. 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC 25922，逗点、H 品牌均满足国标  $G < 5$  的要求，环凯  $G=5.5$ ，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；
3. 感观：三家平板颜色无显著差异。
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，逗点目前排第二。研发目前正在攻克对大肠的抑制。



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。
- 3、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板上的菌落特征：品（紫）红色菌落； 2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在沙门氏菌显色培养基板上的菌落特征：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板上的菌落特征：按说明书判定； 4. 粪肠球菌 ATCC29212 在沙门氏菌显色培养基板上的菌落特征：选择性 G≤1；							

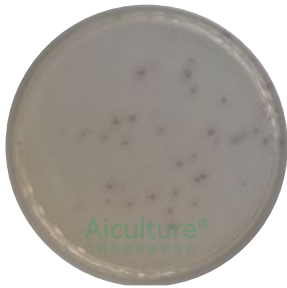
4、典型特征图片：



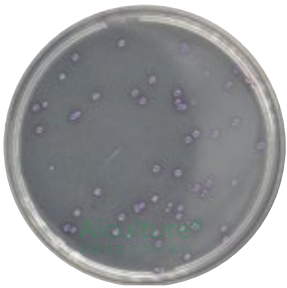
逗点 - 空白平板



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



H 品牌 - 奇异变形杆菌 CMCC(B)49005



H 品牌 - 24h 后奇异变形杆菌 CMCC(B)49005



逗点 - 粪肠球菌 ATCC29212



H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212

#### 5、验证结果小结：

- 1、生长率：目标菌鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028，逗点满足国标  $PR \geq 0.5$  的要求，H 品牌满足说明书  $\geq 0.7$  的要求；
- 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；
- 3、选择性：粪肠球菌 ATCC29212：逗点、H 品牌都满足国标  $G \leq 1$  的要求；
- 4、感观：逗点、H 品牌空白平板颜色无显著差异。
- 5、逗点产品需提高鼠伤寒沙门氏菌的显色，目前配方正在更新中。

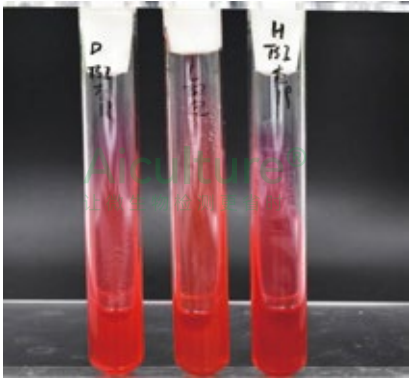
# 三糖铁琼脂 (TSI) 验证

- 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。
- 3、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
	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	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；						

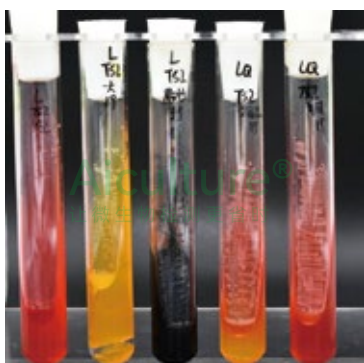
4、典型特征图片：



逗点 -L 品牌 -H 品牌空白



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

#### 5、验证结果小结：

- 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；
- 2、感观：逗点、L 品牌、H 品牌空白管无明显差异。
- 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。

# 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

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。

## 金黄色葡萄球菌的检验

### 第一法 定性检验法

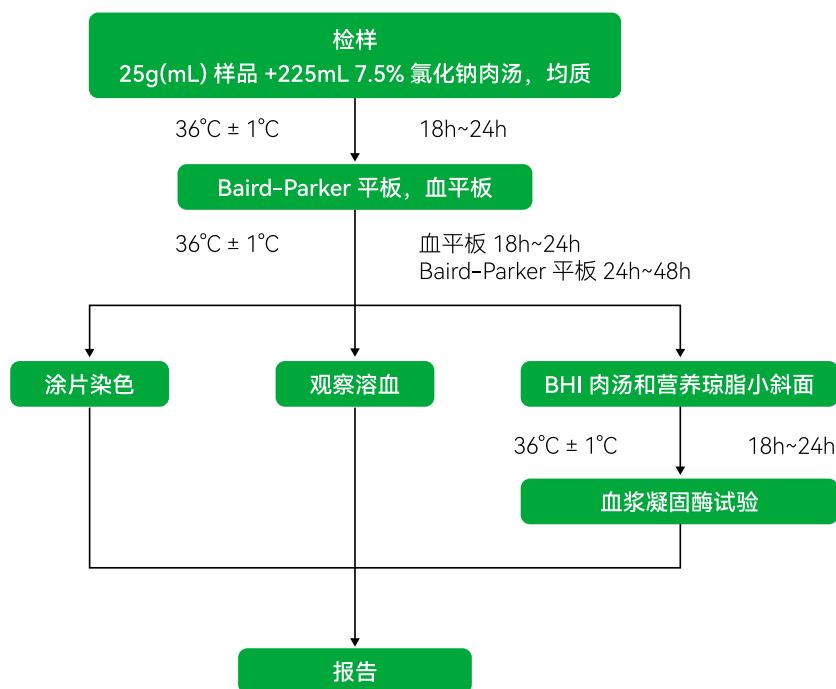


图 1 金黄色葡萄球菌检验程序



## 1、操作步骤

### 1.1 样品的处理

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

#### · 增菌

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

#### · 分离

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

## 1.2 初步鉴定

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



金黄色葡萄球菌 ATCC12228

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



金黄色葡萄球菌 ATCC 6538

## 1.3 确证鉴定

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  $0.5\mu\text{m}\sim 15\mu\text{m}$ 。

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。

## 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；

## 1.4. 接种原则：

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；

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；

1.4.3 5 个及以下则全部接种 BHI，不接种 NA。



#### 1.4.4. Baird-Parker 平板：

36±1℃培养 24h 后观察，有菌落生长则取出，无菌落生长则继续培养至 48h 后再观察。若血平板已挑取菌落进行证实试验，则不必再挑取 Baird-Parker 平板上的菌落进行实验。若血平板上无菌落生长，则应在 24h ~ 48h 内逐步观察 Baird-Parker 平板是否长菌或有无长菌迹象，有则需配置 BHI 及 NA，挑取 Baird-Parker 平板上的菌落进行纯化、增菌，36±1℃培养 24h。

#### 1.4.5. 血浆凝固酶试验：

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

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

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

## 2、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。

### 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图 2。

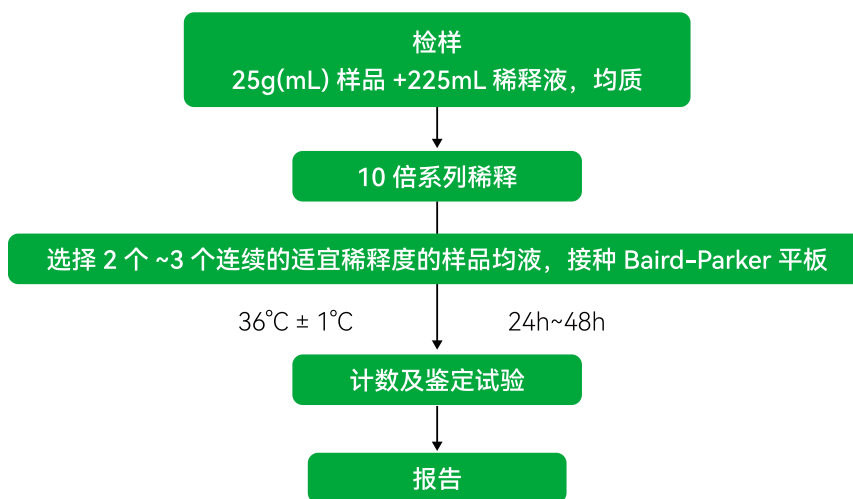


图 2 金黄色葡萄球菌平板计数法检验程序

## 1、操作步骤

### 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。

### 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。

### 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、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。

## 3、结果计数

1. 若只有一个稀释度平板的典型菌落数在 20CFU~200CFU 之间，计数该稀释度平板上的典型菌落，按式 (1) 计算。
2. 若最低稀释度平板的典型菌落数小于 20CFU，计数该稀释度平板上的典型菌落，按式 (1) 计算。
3. 若某一稀释度平板的典型菌落数大于 200CFU，但下一稀释度平板上没有典型菌落，计数该稀释 度平板上的典型菌落，按式 (1) 计算。
4. 若某一稀释度平板的典型菌落数大于 200CFU，而下一稀释度平板上虽有 典型菌落但不在 20CFU~200CFU 范围内，应计 数该稀释度平板上的典型菌落，按式 (1) 计算。
5. 若 2 个连续稀释度的平板典型菌落数均在 20CFU~200CFU 之间，按式 (2) 计算。

### 式中 (1):

T——样品中金黄色葡萄球菌菌落数；

A——某一稀释度典型菌落的总数；

B——某一稀释度鉴定为阳性的菌落数；

C——某一稀释度用于鉴定试验的菌落数；

d——稀释因子。

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

**式中 (2):**

T——样品中金黄色葡萄球菌菌落数；

A<sub>1</sub>——第一稀释度（低稀释倍数）典型菌落的总数；

B<sub>1</sub>——第一稀释度（低稀释倍数）鉴定为阳性的菌落数；

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

A<sub>2</sub>——第二稀释度（高稀释倍数）典型菌落的总数；

B<sub>2</sub>——第二稀释度（高稀释倍数）鉴定为阳性的菌落数；

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

1.1——计算系数；

d——稀释因子（第一稀释度）。

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

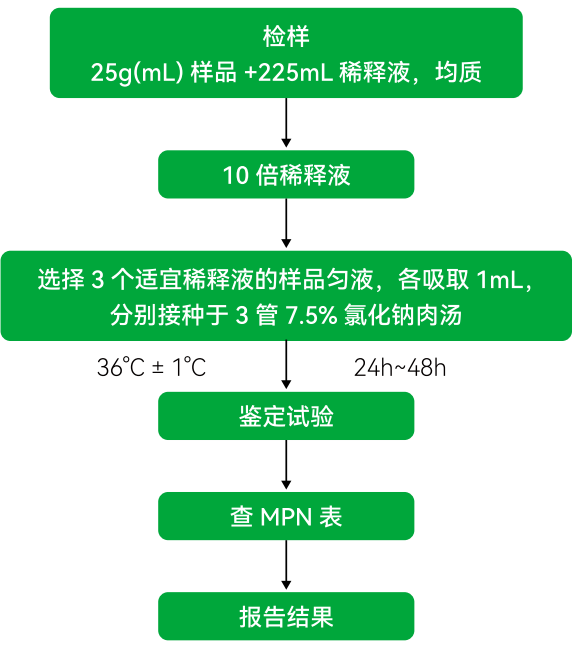
**4、结果报告**

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。

**第三法 金黄色葡萄球菌 MPN 计数**



**图 3 金黄色葡萄球菌 MPN 法检验程序**

## 1、操作步骤

同第二法

## 2、接种培养

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

## 3、典型菌落确认

同第二法

## 4、结果报告

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

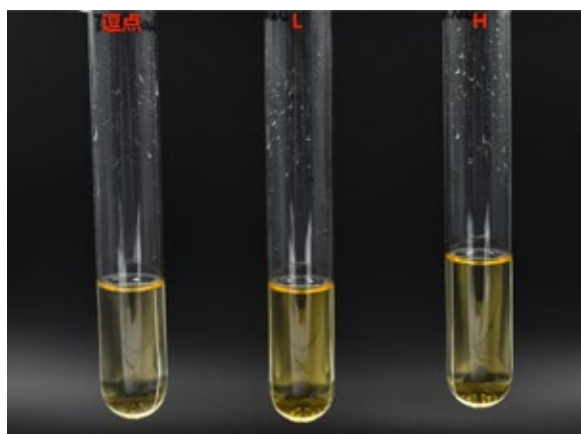
### 注意要点

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

## 三、培养基原理解析

### 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。



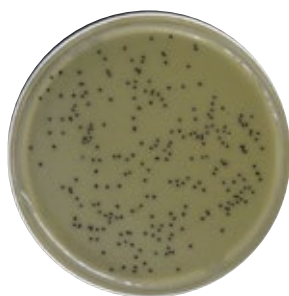
7.5% 氯化钠肉汤空白竞品比对

### 2. Baird-Parker 琼脂基础

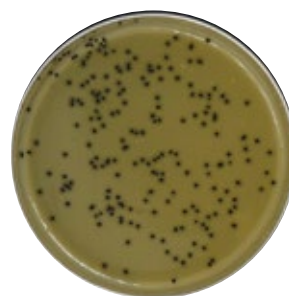
胰蛋白胨、牛肉膏粉和酵母膏粉提供碳氮源、维生素和生长因子; 丙酮酸钠和甘氨酸刺激葡萄球菌的生长; 氯化锂和亚碲酸钾抑制非葡萄球菌的微生物; 含有卵磷脂酶的葡萄球菌降解卵黄使菌落产生透明圈, 而脂酶作用则产生不透明的沉淀环; 凝固酶阳性的葡萄球菌还能还原亚碲酸钾而产生黑色菌落; 琼脂是培养基的凝固剂。



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

### 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 ~ 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。



逗点金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



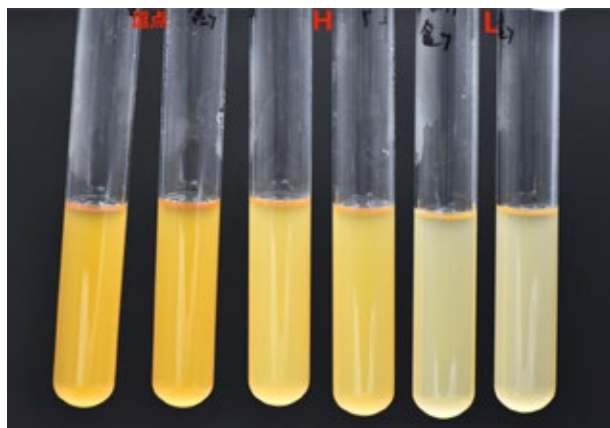
L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538

### 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



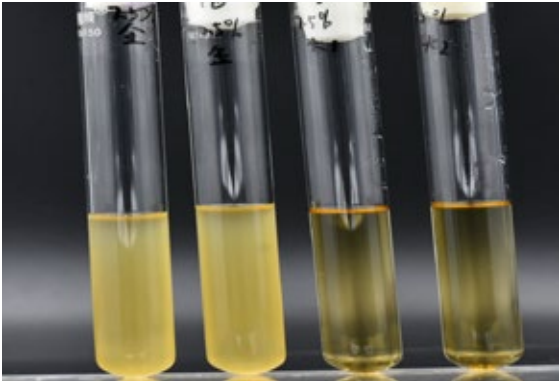
7.5% 氯化钠肉汤验证

- 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。
- 3、7.5% 氯化钠肉汤验证

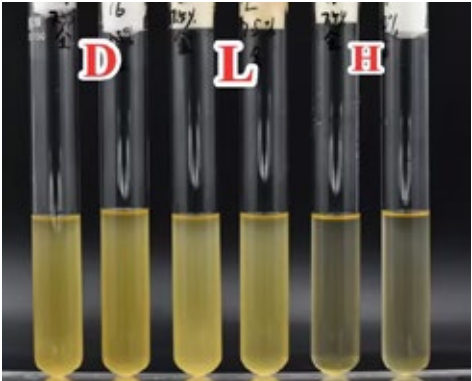


样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计 数 (CFU)	接种计数培养基 (TSA)	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
7.5% 氯化钠 肉汤	金黄色葡萄球 ATCC6538 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	26	26CFU (金黄色葡萄球 ATCC6538) +2135CFU (大肠埃希氏菌 ATCC25922 )	在 Baird-Parker 上 > 10CFU 菌落黑色凸起， 周围有一混浊带，在其外 层有一透明圈	在 Baird- Parker 上 > 10CFU 菌落黑 色凸起，周围 有一混浊带， 在其外层有一 透明圈	符合
		L 品牌			在 Baird-Parker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

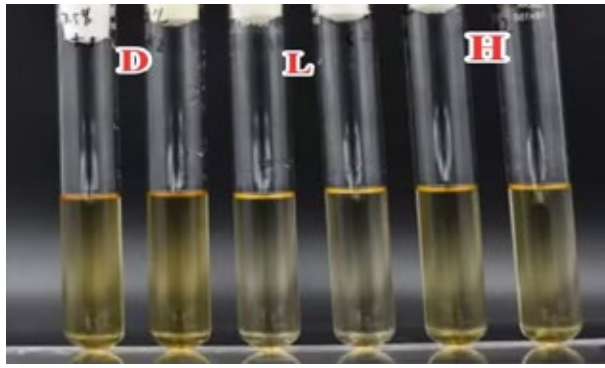
4、典型特征图片：



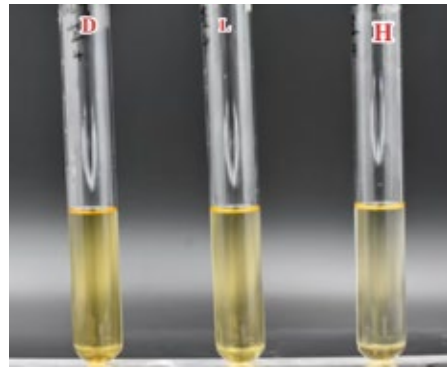
逗点 7.5% 氯化钠肉汤增菌后现象



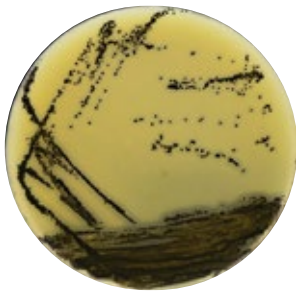
金黄色葡萄球 ATCC6538+  
大肠埃希氏菌 ATCC25922 7.5% 氯化钠肉汤竞品比对



大肠埃希氏菌 ATCC25922 7.5% 氯化钠肉汤竞品比对



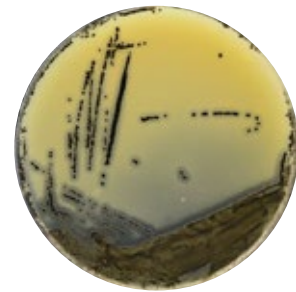
7.5% 氯化钠肉汤空白竞品比对



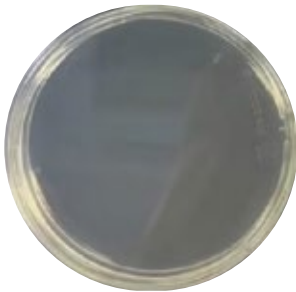
逗点混菌划线 BP



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 ATCC6538 计数 TSA



大肠埃希氏菌 ATCC25922 计数 TSA

##### 5、验证结果小结：

- 1、生长率：目标菌金黄色葡萄球 ATCC6538, L 品牌、H 品牌、逗点均满足国标在 Baird-Parker 上  $> 10\text{Cfu}$ , 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
- 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  $< 100\text{Cfu}$  要求。
- 3、感观：三家产品外观颜色无明显差异。

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。
- 3、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 B-P 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 B-P 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 B-P 上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；							

4、典型特征图片：



逗点空白平板



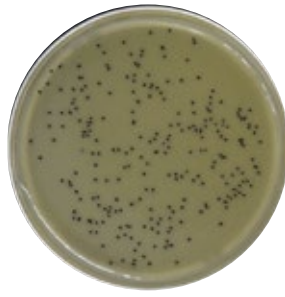
L 品牌空白平板



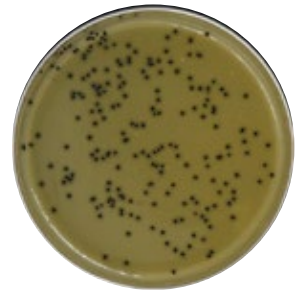
H 品牌空白平板



逗点金黄色葡萄球菌 ATCC12228



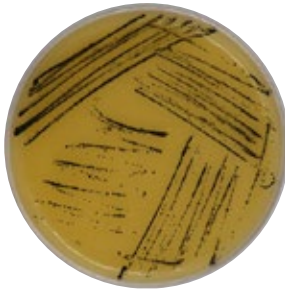
L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC12228



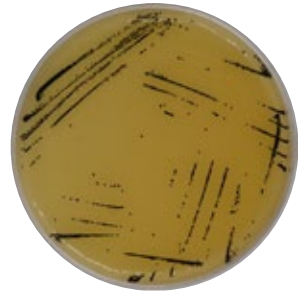
H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC12228



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

##### 5、验证结果小结：

- 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；
- 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；
- 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、感观：三家平板颜色无显著差异。

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。
- 3. 血液琼脂基础验证



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



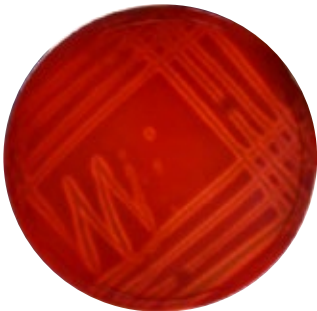
逗点金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



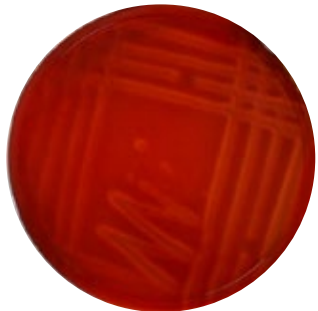
H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



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



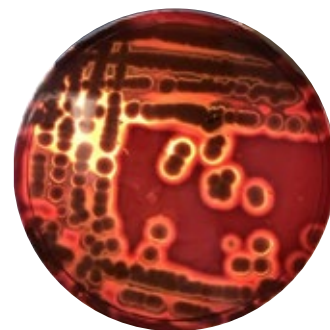
H 品牌蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303



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

#### 4、验证结果小结

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。
2. 感观：逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。

附录 D

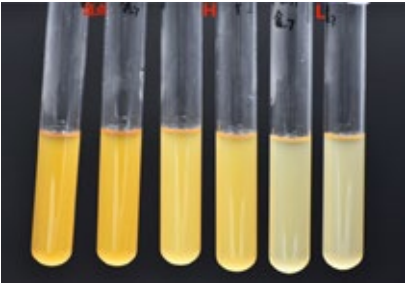
脑心浸出液肉汤（BHI）

- 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。
- 3、脑心浸出液肉汤（BHI）验证数据

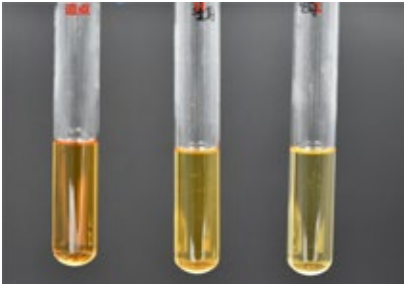


样品名称	质控菌株	厂家	参比培养基计数 (TSA)	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
脑心浸出液肉汤（BHI）	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	61	混浊度 2	混浊度 2	符合
		L 品牌		混浊度 2		符合
		H 品牌		混浊度 2		符合

4、典型特征图片：



金黄色葡萄球 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

5、验证结果小结：

- 1. 生长率：目标菌金黄色葡萄球 ATCC6538 逗点、L 品牌、H 品牌的混浊度满足要求；
- 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。
- 3. 都满足标准，液体增菌仅看外观，并不能发现明显差别。



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