



中华人民共和国国家标准

GB 4789.38-2012

食品安全国家标准

食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数

2012-05-17 发布

2012-07-17 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准代替 GB/T 4789.38-2008 《食品卫生微生物学检验 大肠杆菌计数》。

本标准与 GB/T 4789.38-2008 相比，主要变化如下：

——修改了标准的中文名称；

——修改了培养基和试剂；

——将“第二法 大肠杆菌 VRB-MUG 平板计数法”改为“大肠埃希氏菌平板计数法（第二法）”；

——删除了“第三法 大肠杆菌 PetrifilmTM 测试片计数法”；

——修改了附录 A。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数

1 范围

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

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

2 术语和定义

2.1 大肠埃希氏菌 *Escherichia coli*

大肠杆菌

广泛存在于人和温血动物的肠道中，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-+-的革兰氏阴性杆菌。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。

2.2 最可能数

基于泊松分布的一种间接计数方法，简称为MPN。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- a) 恒温培养箱：36℃±1℃；
- b) 冰箱：2℃~5℃；
- c) 恒温水浴箱：44.5℃±0.2℃；
- d) 天平：感量为0.1g；
- e) 均质器；
- f) 振荡器；
- g) 无菌吸管：1 mL（具0.01 mL刻度）、10 mL（具0.1 mL刻度）或微量移液器及吸头；
- h) 无菌锥形瓶：容量500 mL；
- i) 无菌培养皿：直径90 mm；
- j) pH计或pH比色管或精密pH试纸；
- k) 菌落计数器；
- l) 紫外灯：波长360 nm~366 nm，功率≤6 W。

4 培养基和试剂

4.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨（LST）肉汤：见附录A中A.1。

4.2 EC肉汤（*E.coli* broth）：见附录A中A.2。

4.3 蛋白胨水：见附录A中A.3。

- 4.4 缓冲葡萄糖蛋白胨水[甲基红(MR)和 V-P 试验用]: 见附录 A 中 A.4。
- 4.5 西蒙氏柠檬酸盐培养基: 见附录 A 中 A.5。
- 4.6 磷酸盐缓冲液: 见附录 A 中 A.6。
- 4.7 伊红美蓝(EMB)琼脂: 见附录 A 中 A.7。
- 4.8 营养琼脂斜面: 见附录 A 中 A.8。
- 4.9 结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA): 见附录 A 中 A.9。
- 4.10 结晶紫中性红胆盐-4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖苷琼脂(VRBA-MUG): 见附录 A 中 A.10。
- 4.11 革兰氏染色液: 见附录 A 中 A.11。
- 4.12 Kovacs 靛基质试剂: 见附录 A 中 A.12。
- 4.13 无菌 1 mol/L NaOH: 见附录 A 中 A.13。
- 4.14 无菌 1 mol/L HCl: 见附录 A 中 A.14。

5 大肠埃希氏菌 MPN 计数（第一法）

5.1 检验程序

大肠埃希氏菌MPN计数的检验程序见图1。

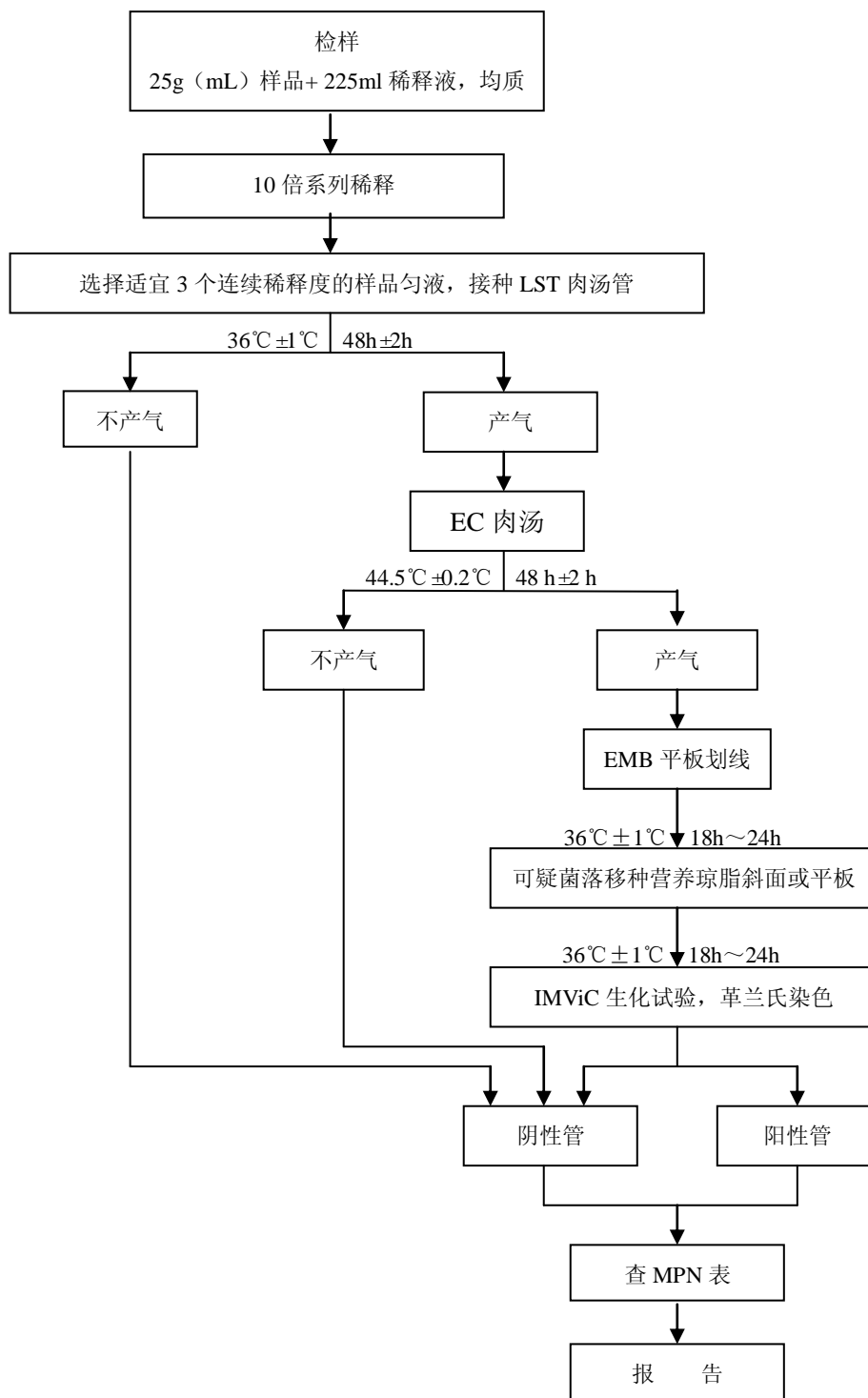


图1 大肠埃希氏菌MPN计数法检验程序

5.2 操作步骤

5.2.1 样品的稀释

5.2.1.1 固体和半固体样品：称取 25 g 样品，放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液的无菌均质杯内，8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min，制成 1:10 样品匀液，或放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min 制成 1:10 的样品匀液。

5.2.1.2 液体样品：以无菌吸管吸取 25 mL 样品置盛有 225 mL 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。

5.2.1.3 样品匀液的 pH 值应在 6.5~7.5 之间，必要时分别用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调节。

5.2.1.4 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL，沿管壁缓缓注入 9 mL 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 1 mL 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。

5.2.1.5 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 1 mL 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 min。

5.2.2 初发酵试验

每个样品，选择 3 个适宜的连续稀释度的样品匀液（液体样品可以选择原液），每个稀释度接种 3 管月桂基硫酸盐胰蛋白胨（LST）肉汤，每管接种 1 mL（如接种量超过 1 mL，则用双料 LST 肉汤），36 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h，观察小倒管内是否有气泡产生，24 h ± 2 h 产气者进行复发酵试验，如未产气则继续培养 48 h ± 2 h。产气者进行复发酵试验。如所有 LST 肉汤管均未产气，即可报告大肠埃希氏菌 MPN 结果。

5.2.3 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，移种于已提前预温至 45 °C 的 EC 肉汤管中，放入带盖的 44.5 °C ± 0.2 °C 水浴箱内。水浴的水面应高于肉汤培养基液面，培养 24 h ± 2 h，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 h ± 2 h。记录在 24 h 和 48 h 内产气的 EC 肉汤管数。如所有 EC 肉汤管均未产气，即可报告大肠埃希氏菌 MPN 结果；如有产气者，则进行 EMB 平板分离培养。

5.2.4 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 °C ± 1 °C 培养 18 h~24 h。观察平板上有无具黑色中心有光泽或无光泽的典型菌落。

5.2.5 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 °C ± 1 °C，培养 18 h~24 h。取培养物进行革兰氏染色和生化试验。

5.2.6 鉴定

取培养物进行靛基质试验、MR-VP 试验和柠檬酸盐利用试验。大肠埃希氏菌与非大肠埃希氏菌的生化鉴别见表 1。

表 1 大肠埃希氏菌与非大肠埃希氏菌的生化鉴别

靛基质 (I)	甲基红 (MR)	VP试验 (VP)	柠檬酸盐 (C)	鉴定 (型别)
+	+	-	-	典型大肠埃希氏菌
-	+	-	-	非典型大肠埃希氏菌
+	+	-	+	典型中间型
-	+	-	+	非典型中间型
-	-	+	+	典型产气肠杆菌
+	-	+	+	非典型产气肠杆菌

注1: 如出现表1以外的生化反应类型, 表明培养物可能不纯, 应重新划线分离, 必要时做重复试验。

注2: 生化试验也可以选用生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统等方法, 按照产品说明书进行操作。

5.3 大肠埃希氏菌 MPN 计数的报告

大肠埃希氏菌为革兰氏阴性无芽胞杆菌, 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氏菌, 其所代表的 LST 肉汤管即为大肠埃希氏菌阳性。依据 LST 肉汤阳性管数查 MPN 表 (见附录 B), 报告每 g (mL) 样品中大肠埃希氏菌 MPN 值。

6 大肠埃希氏菌平板计数法 (第二法)

6.1 检验程序

大肠埃希氏菌平板计数法的检验程序见图2。

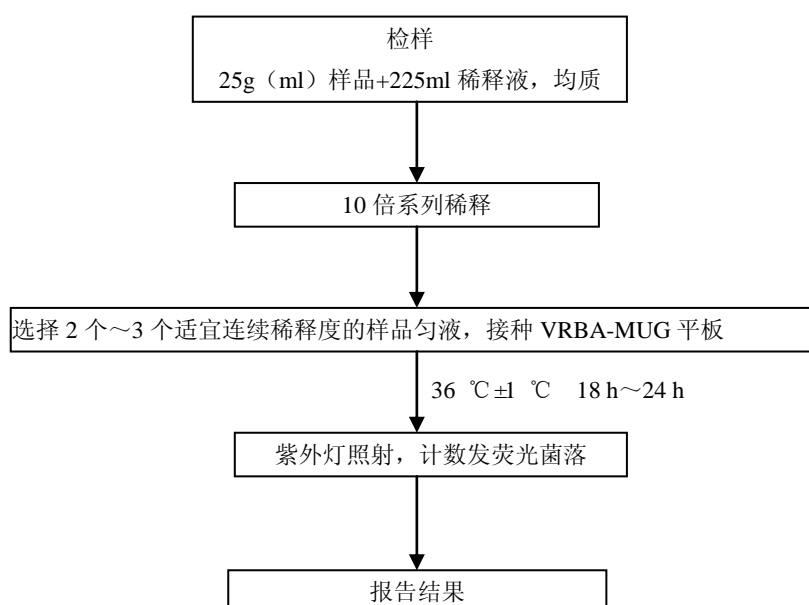


图 2 大肠埃希氏菌平板计数法检验程序

6.2 操作步骤

6.2.1 样品的稀释

按5.2.1进行。

6.2.2 平板计数

6.2.2.1 选取2个~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1 mL。同时取1 mL 稀释液加入无菌平皿做空白对照。

6.2.2.2 将10 mL~15 mL 冷至45 °C ±0.5 °C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 mL~4 mL VRBA-MUG覆盖平板表层。凝固后翻转平板，36 °C ±1 °C培养18 h~24 h。

6.3 平板菌落数的选择

选择菌落数在10 CFU~100 CFU之间的平板，暗室中360 nm~366 nm 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（如大肠埃希氏菌 ATCC 25922）和产气肠杆菌（如ATCC 13048）做阳性和阴性对照。

6.4 大肠埃希氏菌平板计数的报告

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)样品中大肠埃希氏菌数，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。

附录A

培养基和试剂

A.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨 (LST) 肉汤

A.1.1 成分

胰蛋白胨或胰酪胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)	2.75 g
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	2.75 g
月桂基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH6.8±0.2	

A.1.2 制法

将上述成分溶解于蒸馏水中, 调节pH。分装到有玻璃小倒管的试管中, 每管10 mL。121 °C 高压灭菌 15 min。

制备双料 LST 肉汤时, 除蒸馏水外其他成分加倍。

A.2 EC 肉汤 (*E. coli* broth)

A.2.1 成分

胰蛋白胨或胰酪胨	20.0 g
3号胆盐或混合胆盐	1.5 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)	4.0 g
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	1.5 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH6.9±0.1	

A.2.2 制法

将上述成分溶解于蒸馏水中, 调节pH, 分装到有玻璃小倒管的试管中, 每管8 mL。121 °C 高压灭菌15 min。

A.3 蛋白胨水

A.3.1 成分

胰胨或胰酪胨	10.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH6.9±0.2	

A.3.2 制法

加热搅拌溶解胰胨或胰酪胨于蒸馏水中。分装试管, 每管5 mL。121 °C 高压灭菌15 min。

A.4 缓冲葡萄糖蛋白胨水[甲基红(MR)和V-P 试验用]

A.4.1 成分

多胨	7.0 g
----	-------

葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)	5.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH7.0	

A. 4.2 制法

将上述成分溶解于蒸馏水中，调节pH，分装试管，每管1 mL，121 °C高压灭菌15 min，备用。

A. 4.3 甲基红 (MR) 试验

A. 4.3.1 甲基红试剂

A. 4.3.1.1 成分

甲基红	10 mg
95%乙醇	30.0 mL
蒸馏水	20.0 mL

A. 4.3.1.2 制法

10 mg甲基红溶于30 mL95%乙醇中，然后加入20 mL蒸馏水。

A. 4.3.1.3 试验方法

取适量琼脂培养物接种于缓冲葡萄糖蛋白胨水，36 °C \pm 1 °C培养2 d~5 d。滴加甲基红试剂一滴，立即观察结果。鲜红色为阳性，黄色为阴性。

A. 4.4 V-P 试验

A. 4.4.1 6% α -萘酚-乙醇溶液

成分及制法：取 α -萘酚6.0 g，加无水乙醇溶解，定容至100 mL。

A. 4.4.2 40%氢氧化钾溶液

成分及制法：取氢氧化钾40 g，加蒸馏水溶解，定容至100 mL。

A. 4.4.3 试验方法

取适量琼脂培养物接种于缓冲葡萄糖蛋白胨水，36 °C \pm 1 °C培养2 d~4 d。加入6% α -萘酚-乙醇溶液0.5 mL和40%氢氧化钾溶液0.2 mL，充分振摇试管，观察结果。阳性反应立刻或于数分钟内出现红色，如为阴性，应放在36 °C \pm 1 °C继续培养4 h 再进行观察。

A. 5 西蒙氏柠檬酸盐培养基

A. 5.1 成分

柠檬酸钠	2.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
磷酸二氢铵	1.0 g
硫酸镁	0.2 g
溴百里香酚蓝	0.08 g
琼脂	8.0 g~18.0g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 6.8 \pm 0.2	

A. 5.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 10 mL，121 °C高压 15 min，制成斜面。

A. 5.3 实验方法

挑取培养物接种于整个培养基斜面，36 °C \pm 1 °C培养24 h \pm 2 h，观察结果。阳性者培养基变为蓝色。

A. 6 磷酸盐缓冲液

A. 6.1 成分

磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	34.0g
蒸馏水	500.0 mL
pH7.2	

A. 6.2 制法

贮存液：称取34.0 g的磷酸二氢钾溶于500 mL蒸馏水中，用大约175 mL的1 mol/L氢氧化钠调节pH，用蒸馏水稀释至1000 mL后贮存于冰箱。

稀释液：取贮存液1.25 mL，用蒸馏水稀释至1 000 mL，分装于适宜容器中，121 °C高压灭菌15 min。

A. 7 伊红美蓝 (EMB) 琼脂

A. 7.1 成分

蛋白胨	10.0 g
乳糖	10.0 g
磷酸氢二钾 (K ₂ HPO ₄)	2.0 g
琼脂	15.0 g
伊红γ (水溶液)	0.4 g或2%水溶液20.0 mL
美蓝	0.065 g 或 0.5%水溶液 13.0 mL
蒸馏水	1 000.0 mL
pH7.1±0.2	

A. 7.2 制法

在1 000 mL蒸馏水中煮沸溶解蛋白胨、磷酸盐和琼脂，加水补足。分装于三角烧瓶中。每瓶100 mL或200 mL，调节pH，121 °C高压灭菌15 min。使用前将琼脂融化，于每100 mL琼脂中加5 mL灭菌的20%乳糖溶液，2 mL的2%的伊红γ水溶液和1.3 mL 0.5%的美蓝水溶液，摇匀，冷至45 °C~50 °C倾注平皿。

A. 8 营养琼脂斜面

A. 8.1 成分

牛肉膏	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH7.3±0.1	

A. 8.2 制法

将上述成分加于蒸馏水中，煮沸溶解，调节pH。分装合适的试管，121 °C高压灭菌15 min。灭菌后摆成斜面备用。

A. 9 结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA)

A. 9.1 成分

蛋白胨	7.0 g
酵母膏	3.0 g
乳糖	10.0 g
氯化钠	5.0 g
胆盐或3号胆盐	1.5 g
中性红	0.03 g
结晶紫	0.002 g
琼脂	15 g~18 g
蒸馏水	1 000.0 mL

pH7.4±0.1

A. 9.2 制法

将上述成分溶于蒸馏水中，静置几分钟，充分搅拌，调节pH。煮沸2 min，将培养基冷至45℃~50℃倾注平板。使用前临时制备，不得超过3 h。

A. 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）**A. 10.1 成分**

蛋白胨	7.0 g
酵母膏	3.0 g
乳糖	10.0 g
氯化钠	5.0 g
胆盐或3号胆盐	1.5 g
中性红	0.03 g
结晶紫	0.002 g
琼脂	15 g~18 g
蒸馏水	1 000.0 mL
4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖苷（MUG）	0.1 g

pH7.4±0.1

A. 10.2 制法

将上述成分溶于蒸馏水中，静置几分钟，充分搅拌，调节pH。煮沸2 min，将培养基冷至45℃~50℃使用。

A. 11 革兰氏染色液**A. 11.1 结晶紫染色液****A. 11.1.1 成分**

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20.0 mL
1%草酸铵水溶液	80.0 mL

A. 11.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

A. 11.2 革兰氏碘液**A. 11.2.1 成分**

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL

A. 11.2.2 制法

将碘与碘化钾先行混合，加入少许蒸馏水充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至300 mL。

A. 11.3 沙黄复染液**A. 11.3.1 成分**

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A. 11.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A. 11.4 染色法

A. 11. 4. 1 涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染液，染1 min，水洗。

A. 11. 4. 2 滴加革兰氏碘液，作用1 min，水洗。

A. 11. 4. 3 滴加95%乙醇脱色约15 s~30 s，直至染色液被洗掉，不要过分脱色，水洗。

A. 11. 4. 4 滴加复染液，复染1 min，水洗、待干、镜检。

A. 12 Kovacs 靛基质试剂

A. 12. 1 成分

对二甲氨基苯甲醛	5.0 g
戊醇	75.0 mL
盐酸（浓）	25.0 mL

A. 12. 2 制法

将对二甲氨基苯甲醛溶于戊醇中，然后慢慢加入浓盐酸即可。

A. 12. 3 试验方法

将培养物接种蛋白胨水，36 °C ± 1 °C 培养24 h ± 2 h后，加Kovacs靛基质试剂0.2 mL~0.3 mL，上层出现红色为靛基质阳性反应。

A. 13 无菌 1mol/L NaOH:

A. 13. 1 成分

NaOH	40.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 13. 2 制法:

称取40 g氢氧化钠溶于1000 mL蒸馏水中，121 °C 高压灭菌15 min。

A. 14 无菌 1 mol/L HCl:

A. 14. 1 成分

HCl	90.0 mL
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 14. 2 制法

移取浓盐酸90 mL，用蒸馏水稀释至1000 mL，121 °C 高压灭菌15 min。

附录B

大肠埃希氏菌最可能数（MPN）检索表

每g（mL）检样中大肠埃希氏菌最可能数（MPN）的检索见表B.1。

表 B.1 大肠埃希氏菌最可能数（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.	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	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	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。