



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

第二版



www.commashop.cn



400-878-7248

BRAND PROFILE

品牌简介

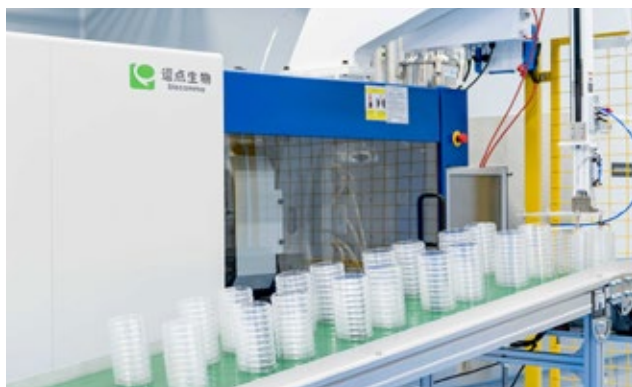
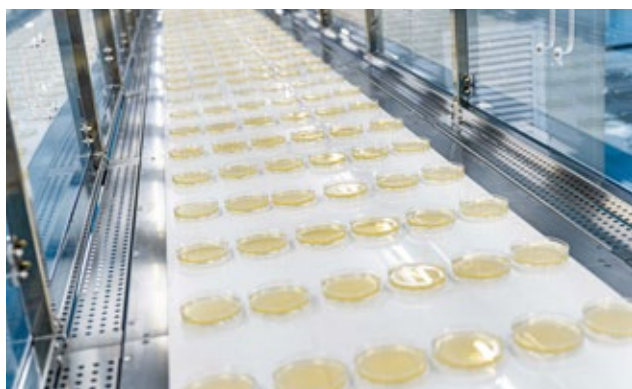


Aiculture® 是国际化的品牌，在新加坡和深圳，两地经营。

Aiculture® 的品牌使命是：让微生物检测更省时。

我们在培养基制造中引入制药 GMP 管理体系，不断提高产品质量。

我们通过提供方便快捷的培养基和无菌耗材，提高微生物检测效率，节约检测专家的时间。他们用来配制培养基的时间，可以做更有价值的事情。





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

食品微生物检验 GB4789.2-2022 菌落总数测定及注意事项

食品微生物检验 GB4789.2-2022 菌落总数测定及注意事项	02
平板计数琼脂 (PCA)	05

02

食品微生物检验 GB4789.3-2016 大肠菌群计数及注意事项

食品微生物检验 GB4789.3-2016 大肠菌群计数及注意事项	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

食品微生物检验 GB 4789.15-2016 霉菌酵母计数

食品微生物检验 GB 4789.15-2016 霉菌酵母计数	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

食品微生物检验 GB4789.4-2016 沙门氏菌检验及注意事项

食品微生物检验 GB4789.4-2016 沙门氏菌检验及注意事项	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

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

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

06

食品微生物检验 GB4789-30-2016 单核细胞增生李斯特氏菌检验及注意事项

食品微生物检验 GB4789-30-2016单核细胞增生李斯特氏菌检验及注意	63
李氏增菌肉汤基础 (LB1) 验证	70
李斯特氏菌显色培养基验证	72
PALCAM 琼脂基础培养基验证	74
含 0.6% 酵母浸粉的胰酪胨大豆琼脂(TSA-YE) 验证	76
含 0.6% 酵母浸粉的胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE) 验证	77

07

食品微生物检验志贺氏菌检验及注意事项 GB 4789.5-2012

食品微生物检验志贺氏菌检验及注意事项 GB 4789.5-2012	78
志贺氏菌增菌肉汤验证	80
木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 验证	82
麦康凯琼脂 (MAC) 验证	84
志贺氏菌显色培养基验证	86
三糖铁琼脂 (TSI) 验证	88

08

食品微生物副溶血性弧菌检验及注意事项 GB 4789.7-2013

食品微生物副溶血性弧菌检验及注意事项 GB 4789.7-2013	90
3% 氯化钠碱性蛋白胨水验证	94
弧菌显色培养基验证	96
3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂培养基验证	98

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

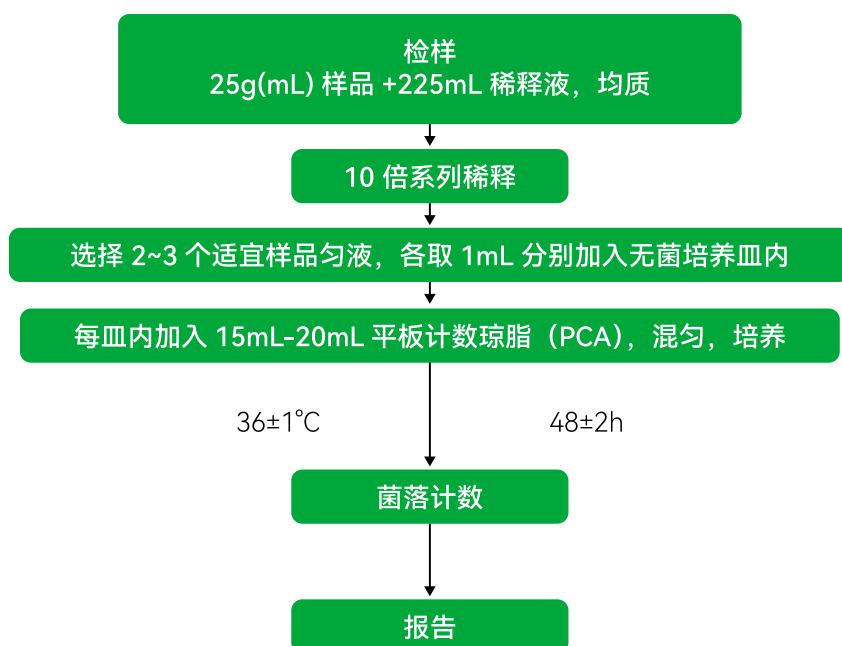
菌落总数定义:指在一定条件下(如需氧情况、营养条件、pH、培养温度和时间等)每克(每毫升)检样所生长出来的菌落数。

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;

Σc ——平板 (含适宜范围菌落数的平板) 菌落数之和;

n_1 ——第一稀释度 (低稀释倍数) 平板个数;

n_2 ——第二稀释度 (高稀释倍数) 平板个数;

d——稀释因子 (第一稀释度)。

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

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 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		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 ²
3	多不可计	多不可计	150	160	15	20	15500	16000 或 1.6×10 ⁴
4	多不可计	多不可计	236	245	35	33	24955	25000 或 2.5×10 ⁴
5	多不可计	多不可计	236	245	25	33	24476	24000 或 2.4×10 ⁴
6	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	320	330	325000	330000 或 3.3×10 ⁵
7	多不可计	多不可计	310	320	28	26	27000	27000 或 2.7×10 ⁴
8	多不可计	多不可计	295	325	22	20	29500	30000 或 3.0×10 ⁴
9	菌落蔓延	菌落蔓延	菌落蔓延	菌落蔓延	菌落蔓延	菌落蔓延	菌落蔓延	菌落蔓延

三、质量控制和疑难解析

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 2cm²，计数其中的菌落数，计算每 2cm² 的平均菌落数，乘以平皿面积（如平皿直径为 90mm，则乘以平皿面积 63.6cm²），再乘以稀释倍数报告。

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



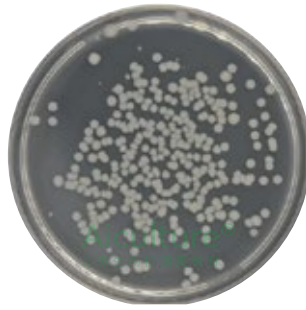
L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



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：

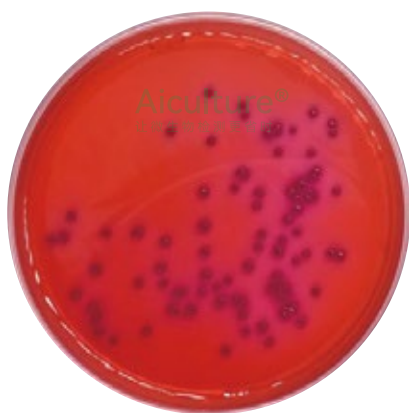
- 1、生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922 、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、枯草芽孢杆菌 ATCC6633，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 $PR \geq 0.7$ 的要求。
- 2、感观：三家平板颜色无显著差异。

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。

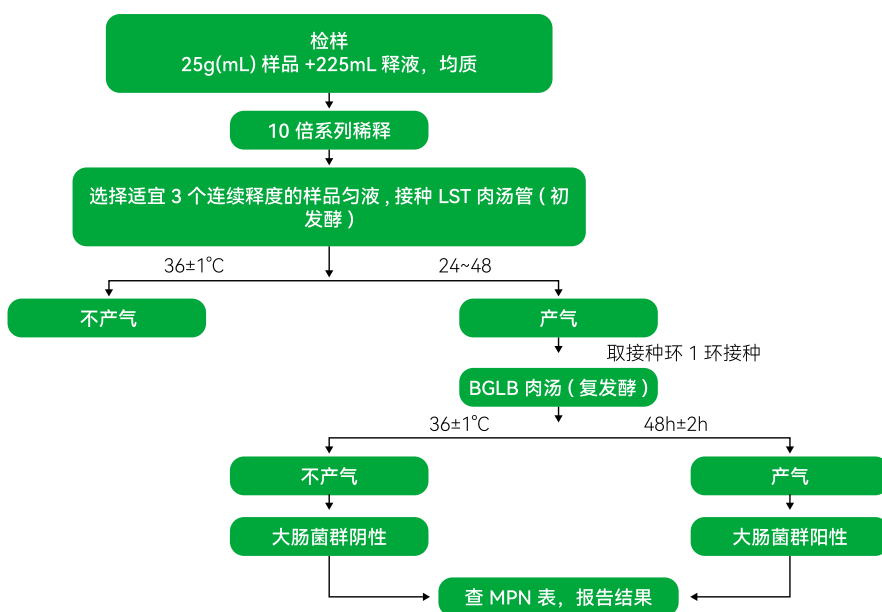


二、GB4789.3-2016 大肠菌群 MPN 法

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



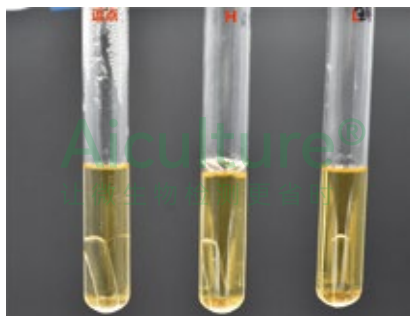
操作注意事项

- 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。

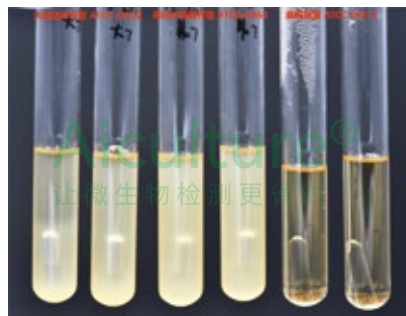
3. 培养基原理解析

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

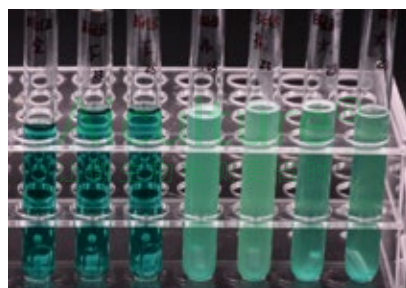


逗点 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST) 生长现象



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



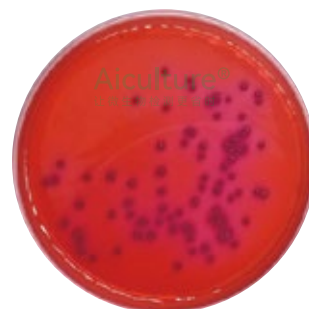
操作注意事项

- 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

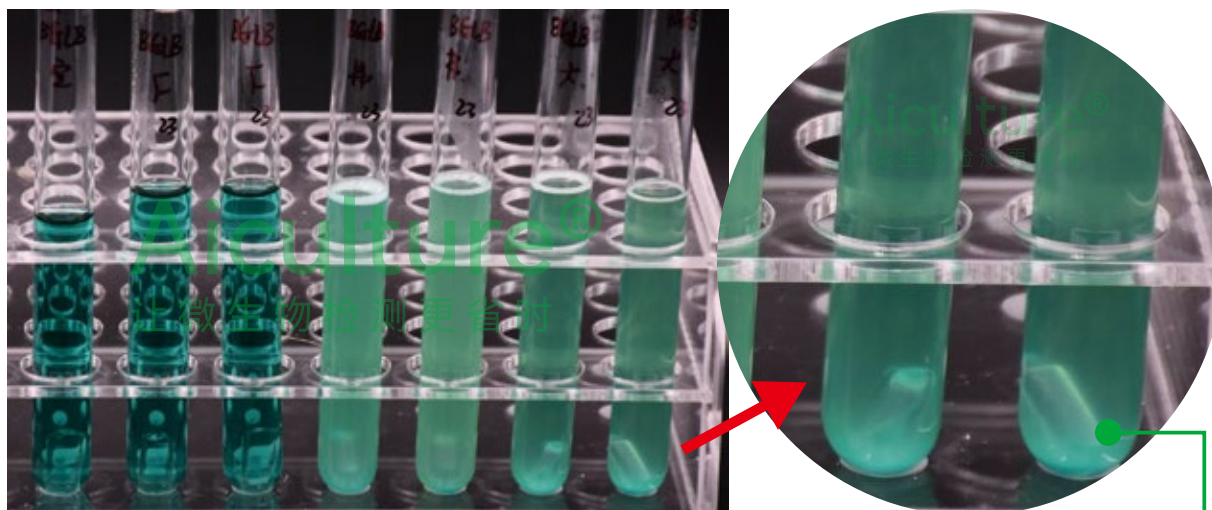
3. 计数典型和可疑菌落数

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：10⁻⁴ 样品稀释液 1mL，在 VRBA 平板上有 100 个典型和可疑菌落，挑取其中 10 个接种 BGLB 肉汤管，证实有 6 个阳性管，则该样品的大肠菌群数为： $100 \times 6 / 10 \times 10^4 / \text{g(mL)} = 6.0 \times 10^5 \text{CFU/g(mL)}$ 。若所有稀释度（包括液体样品原液）平板均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。
- 若所有稀释度（包括液体样品原液）平板均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

四、质量控制

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。

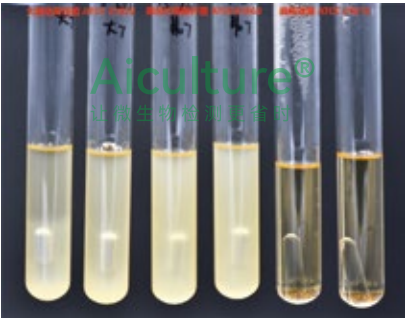
月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤（LST）

- 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

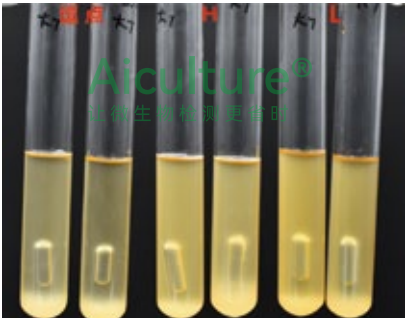


样品名称	质控菌株	厂家	参比培养基计数（TSA）	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤（LST）	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	26	液体混浊且产气	混浊度 2， 且气体充满管内 1/3	符合
		L 品牌				符合
		H 品牌				符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	41			符合
		L 品牌				符合
		H 品牌				符合
	枯草芽孢杆菌 ATCC6633	逗点	2118	未生长	混浊度 0（不生长）	符合
		L 品牌				符合
		H 品牌				符合

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



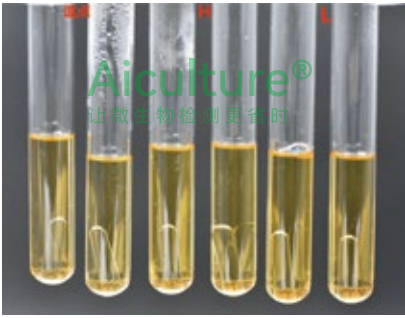
大肠埃希氏菌 ATCC 25922 LST
竞品比对



弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864 LST
竞品比对



粪肠球菌 ATCC 29212 LST
竞品比对



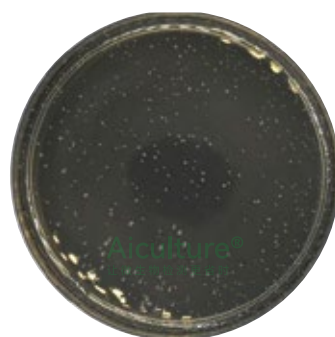
月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤（LST）
竞品空白对比



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。

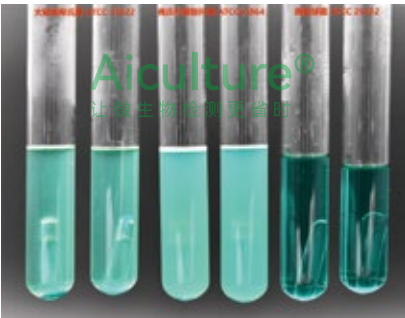
煌绿乳糖胆盐肉汤（BGLB）

- 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

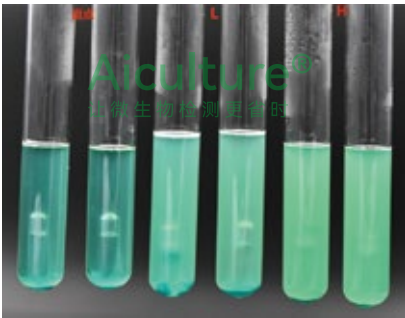


样品名称	质控菌株	厂家	参比培养基计数（TSA）	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
煌绿乳糖胆盐肉汤（BGLB）	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	26	液体混浊且产气	混浊度 2， 且气体充满管内 1/3	符合
		L 品牌				符合
		K 品牌				符合
	弗氏柠檬酸杆菌 ATCC43864	逗点	41			符合
		L 品牌				符合
		K 品牌				符合
	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	2118	未生长	混浊度 0（不生长） 或混浊度 1（微弱生长）， 不产气	符合
		L 品牌				符合
		K 品牌				符合

4、典型特征图片：



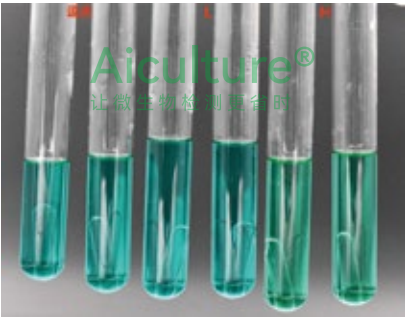
逗点煌绿乳糖胆盐肉汤（BGLB）
生长现象



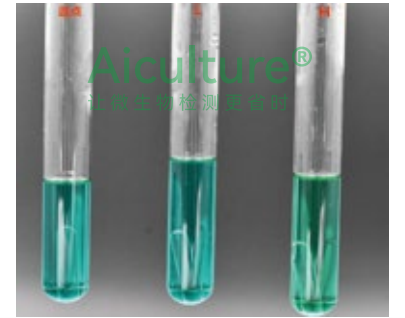
大肠埃希氏菌 ATCC 25922 BGLB
逗点、L 品牌、K 品牌竞品比对



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）



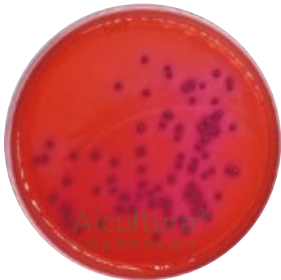
- 1. 产品用途：用于水或食品中大肠菌群平板菌落计数。
- 2. 检验原理：蛋白胨和酵母膏粉提供碳氮源和微量元素；乳糖是可发酵的糖类；氯化钠可维持均衡的渗透压；3 号胆盐和结晶紫抑制革兰氏阳性菌，特别抑制革兰氏阳性杆菌和粪链球菌；中性红为 pH 指示剂。
- 3、结晶紫中性红胆盐琼脂（VRBA）验证数据

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

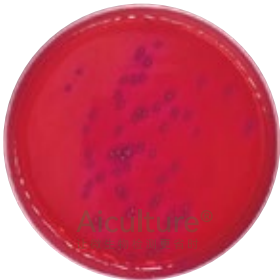
1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 VRBA 板上的菌落特征：有或无沉淀环的紫红色或红色菌落；

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；

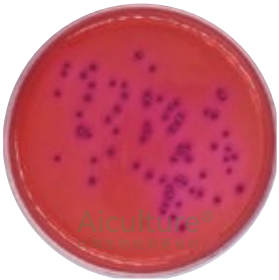
3. 粪肠球菌 ATCC 29212 在 VRBA 板上的菌落特征：选择性 G<5；



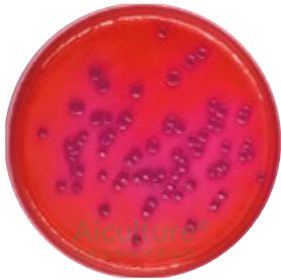
逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



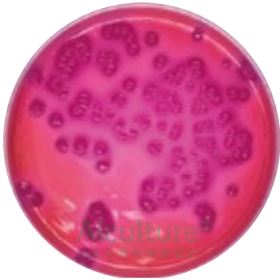
L 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



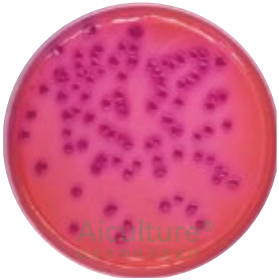
H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



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

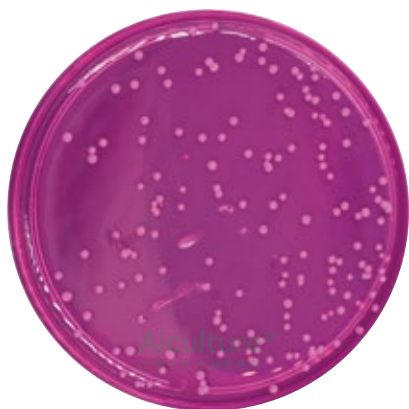
4、验证结果小结：

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。

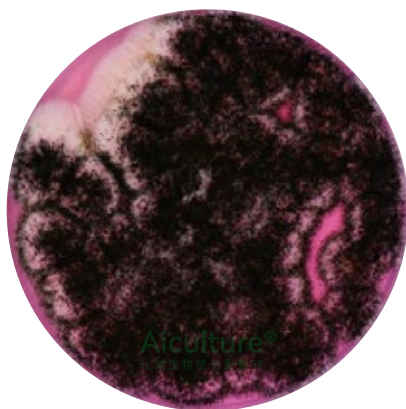
03 食品微生物检验 GB 4789.15-2016 霉菌酵母计数

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。



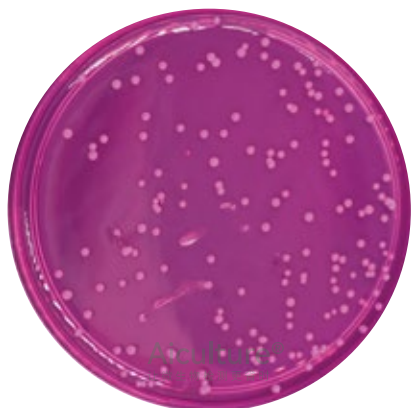
逗点黑曲霉 ATCC16404



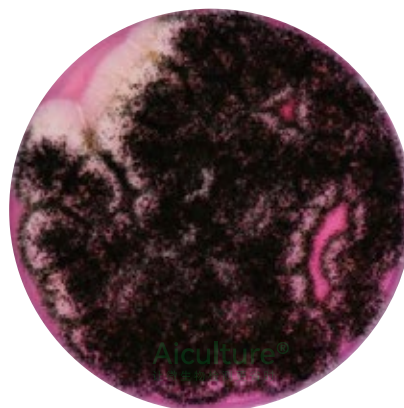
逗点酿酒酵母 ATCC9763

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。



逗点酿酒酵母 ATCC9763



逗点黑曲霉 ATCC16404

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°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



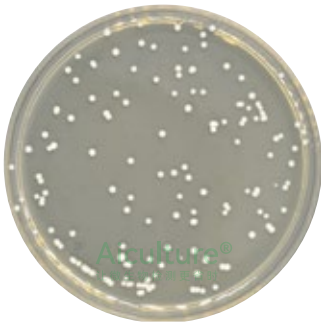
- 1. 产品用途：供霉菌和酵母的计数、分离和培养用。
- 2. 检验原理：马铃薯浸出粉有助于各种霉菌的生长；葡萄糖提供能源；琼脂是培养基的凝固剂；氯霉素可抑制细菌的生长。
- 3. 马铃薯葡萄糖琼脂 PDA(含氯霉素) 验证数据

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：



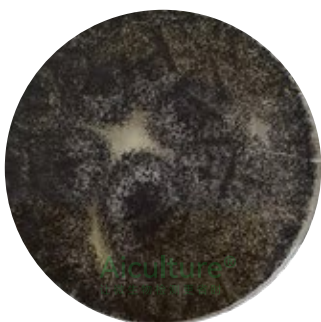
逗点酿酒酵母 ATCC9763



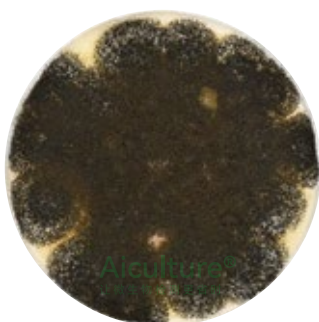
L 品牌酿酒酵母 ATCC9763



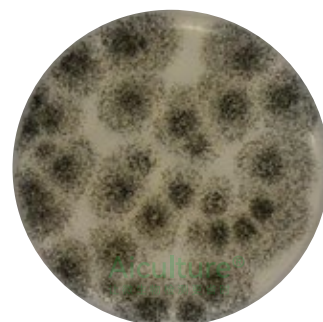
H 品牌酿酒酵母 ATCC9763



逗点黑曲霉 ATCC16404



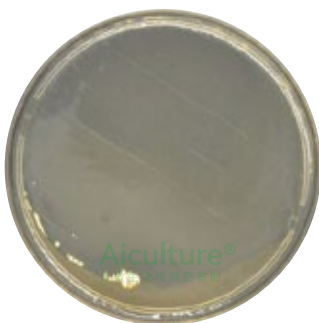
L 品牌黑曲霉 ATCC16404



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。

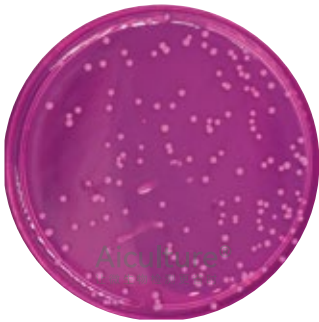
孟加拉红（虎红）琼脂验证

- 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							

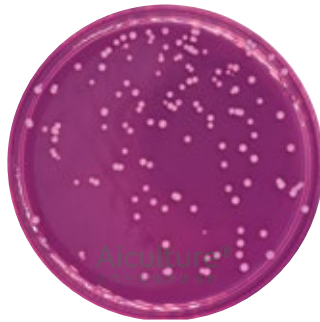
4、典型特征图片：



逗点酿酒酵母 ATCC9763



L 品牌酿酒酵母 ATCC9763



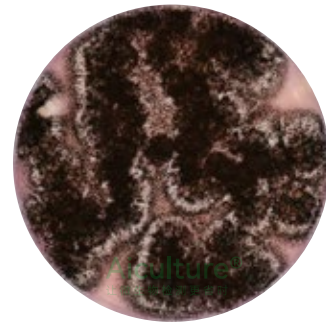
H 品牌酿酒酵母 ATCC9763



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。

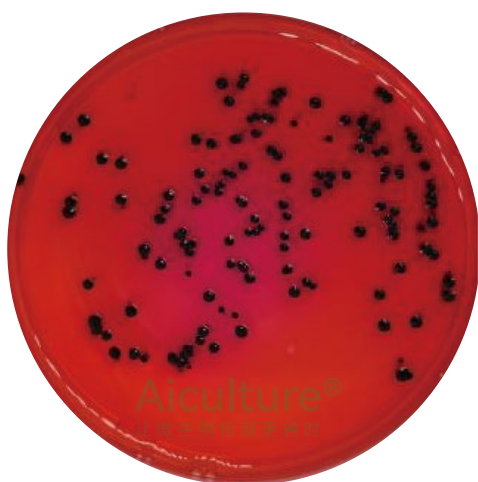
04 食品微生物检验 GB4789.4-2016 沙门氏菌检验及注意事项

一、沙门氏菌生物学特性

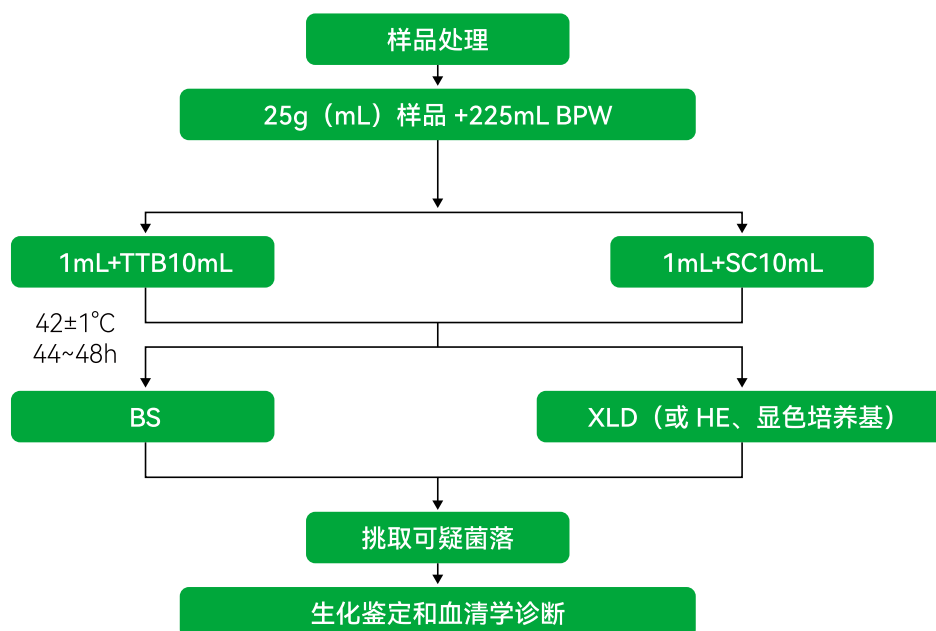
生物学特性：沙门氏菌属是食源性细菌性肠胃炎的首要病原菌，属于肠杆菌科，革兰氏阴性无芽孢杆菌，营养需求不高，需氧或兼性厌氧。典型菌株多具有周生鞭毛、能运动（除鸡瘟沙门菌和鸡沙门菌外）、大部分菌株产 H₂S、能分解葡萄糖并产气，最适培养温度为 37℃，最适 pH 7.2 ~ 7.6。耐受胆盐，在粪便、土壤、食品、水中可生存 5 个月至二年之久。

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

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



二、沙门氏菌的检验



操作注意事项

- 1: 对易产生较大颗粒的样品（如肉类）进行检测时，建议使用带滤网均质袋，以便均质后用吸管吸取匀液；
- 2: 预增菌时间与样品种类、目标菌和杂菌的含量及状态等因素有关。一般菌相比复杂的高污染样品，如果增菌时间过长会导致杂菌生长过多，目标菌可能就会被另一种优势菌所取代，这种情况下，增菌时间不宜过长。低污染样品的增菌时间可以适当延迟。由于本标准适用的样品种类众多，预增菌的时间范围设置的较宽（8h~18h），应根据实际情况和经验进行具体选择。建议 BPW 发生浑浊时停止预增菌。
3. 分离划线用直径 3mm 的接种环（1 环约 10 微升）。
4. 在 TSI 培养时。应将试管口松开，保存管内有充足的氧气，否则会产生过量 H₂S，导致整管变黑。
5. 血清学鉴定中的多价菌体（O）和多价鞭毛抗原鉴定是沙门氏菌的必做项目，血清学分型为选作试验。实验室必须配备沙门氏菌的多价菌体（O）和多价鞭毛（H）诊断血清。

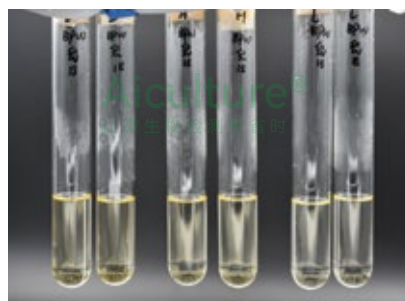
三、培养基原理解析

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



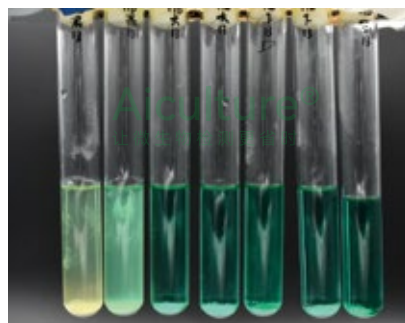
逗点 -H 品牌 -L 品牌 -
鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028

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。



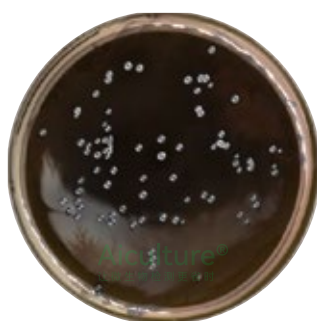
逗点 - 空白平板



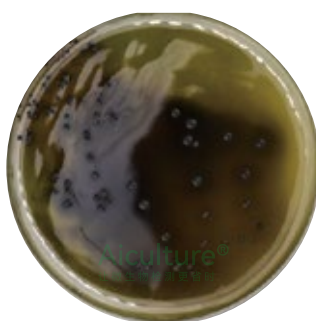
L 品牌 - 空白平板



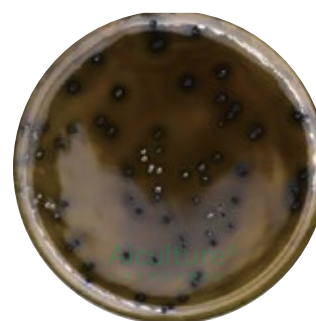
H 品牌 - 空白平板



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。



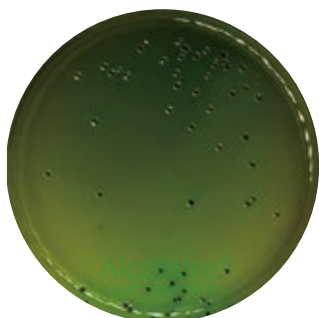
逗点 - 空白平板



L 品牌 - 空白平板



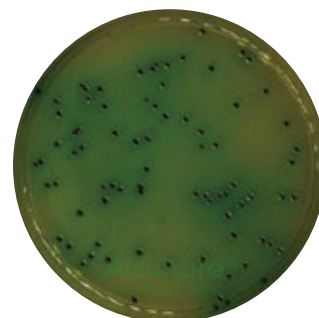
H 品牌 - 空白平板



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。



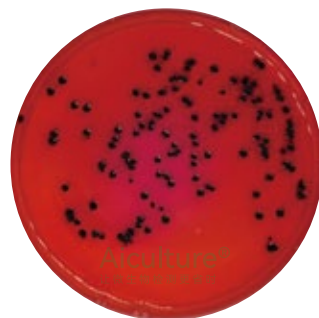
逗点木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂
(XLD) 空白



L 品牌木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂
(XLD) 空白



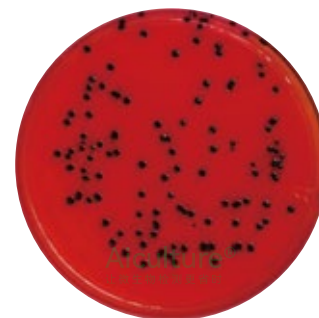
H 品牌木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂
(XLD) 空白



逗点鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



L 品牌鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



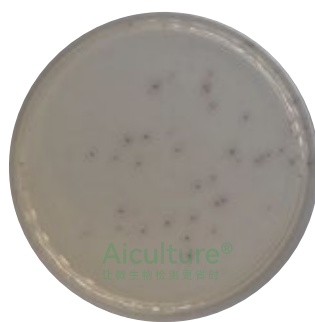
H 品牌鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028

7. 沙门氏菌显色培养基

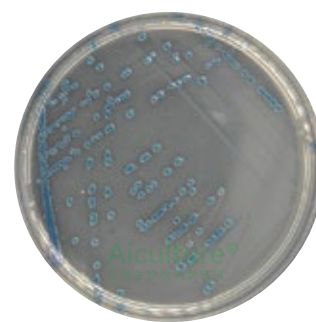
• 蛋白胨和酵母膏粉提供碳氮源和微量元素；氯化钠可维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂；胆盐抑制革兰氏阳性菌；选择性添加剂增强培养基的抑制杂菌的能力；混合色素分别与沙门氏菌和大肠菌群所对应的酶发生特异性反应，水解底物，释放出显色基团，在淡黄色平板上沙门氏菌产生品红色的菌落，大肠菌群产生蓝绿色的菌落。



逗点 - 空白平板



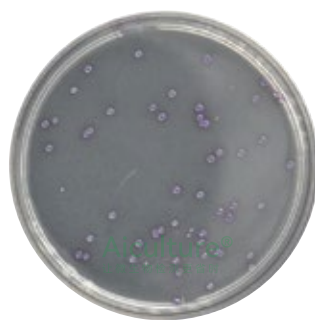
逗点 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



逗点 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌 - 空白平板



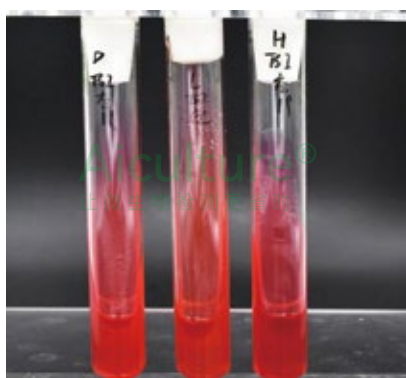
H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



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

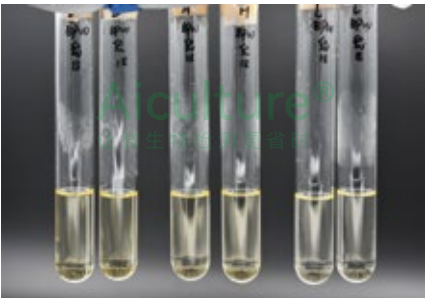
4、典型特征图片：



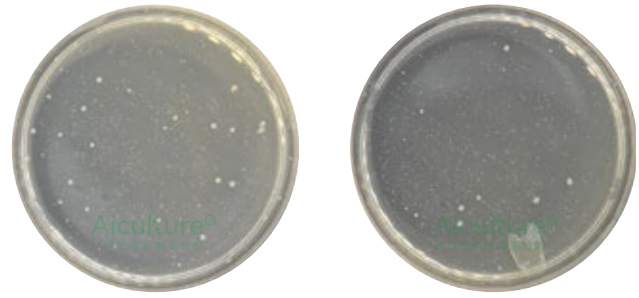
逗点 -H 品牌 -L 品牌 -BPW 空白



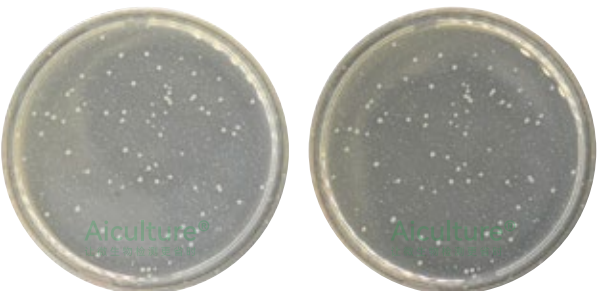
接菌液计数（鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028）



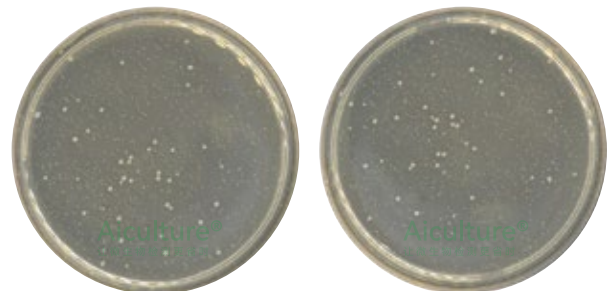
逗点 -H 品牌 -L 品牌 -BPW- 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028



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；

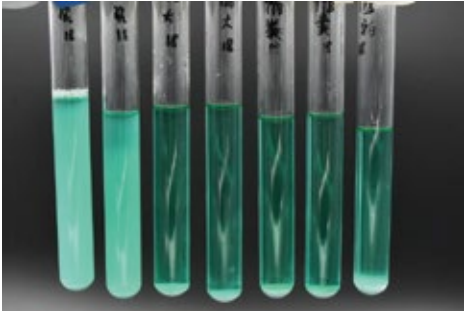
2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在四硫磺酸钠煌绿（TTB）增菌上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；

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。

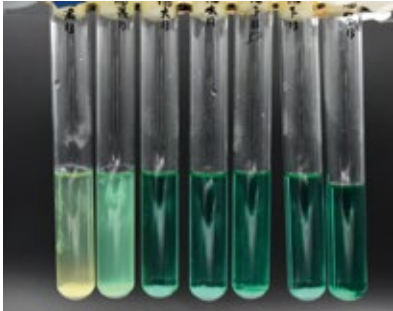
4、典型特征图片：



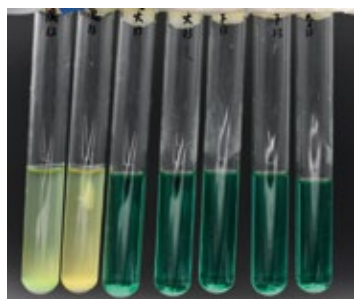
逗点、L 品牌、H 品牌 TTB 空白



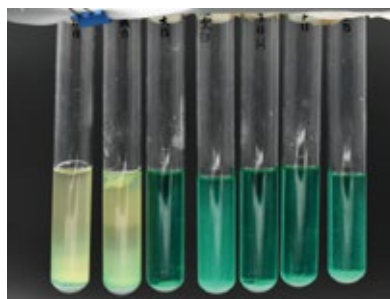
逗点 -TTB 增菌现象



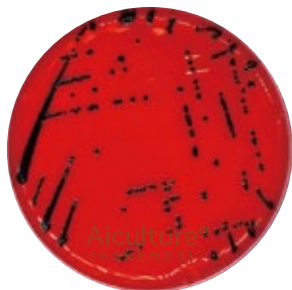
逗点 -TTB24H 后增菌现象



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



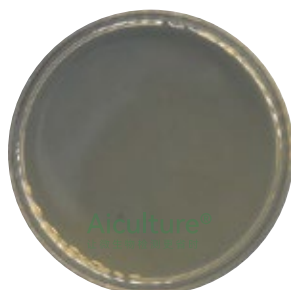
L 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



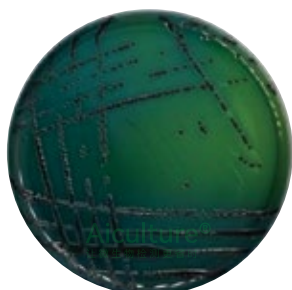
逗点 - 粪肠球菌 ATCC29212



L 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



逗点 TTB 混菌划线 HE



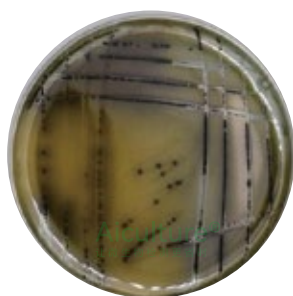
L 品牌 TTB 混菌划线 HE



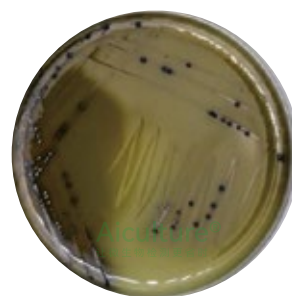
H 品牌 TTB 混菌划线 HE



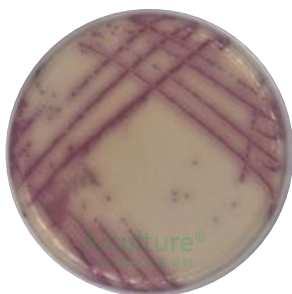
逗点 TTB 混菌划线 BS



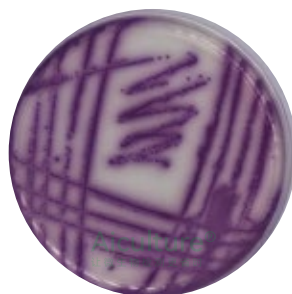
L 品牌 TTB 混菌划线 BS



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 > 10CFU, 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 < 100CFU 的要求；
粪肠球菌 ATCC29212：逗点、L 品牌、H 品牌均无菌落生长，满足国标在 TSA 上 < 100CFU 的要求；
- 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

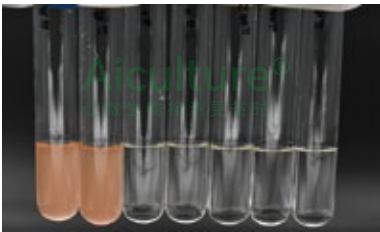


样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	菌液浓度计数（TSA）	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
亚硒酸盐胱氨酸增菌液（SC）	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	58	76	在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明，有黑心	在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明，有黑心	符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	L 品牌	81		在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明，有黑心		符合
	铜绿假单胞菌 ATCC27853	H 品牌	56		在 XLD 上 > 10CFU 菌落无色半透明，有黑心		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	8	多不可计	<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

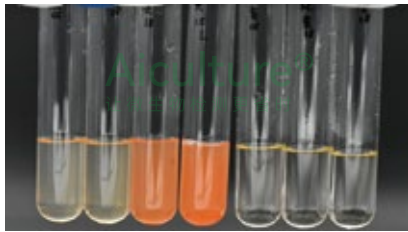
4、典型特征图片：



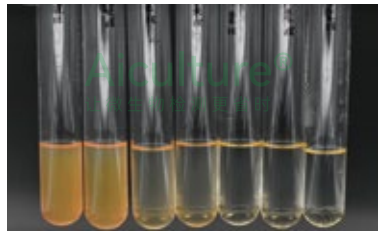
逗点 - 空白 L 品牌 - 空白 H 品牌 - 空白



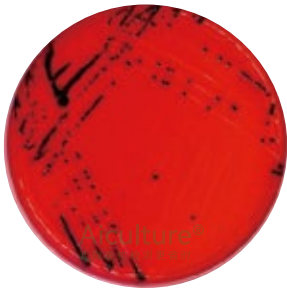
逗点 -SC 增菌后现象



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



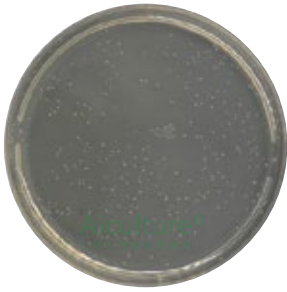
逗点 - 大肠埃希氏菌
ATCC25922



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



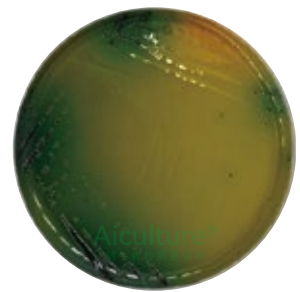
H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC29212



逗点 SC 混菌划线 HE



L 品牌 SC 混菌划线 HE



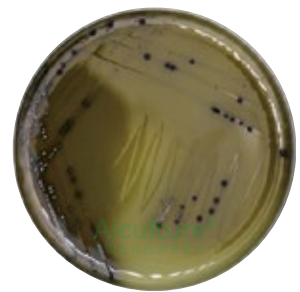
H 品牌 SC 混菌划线 HE



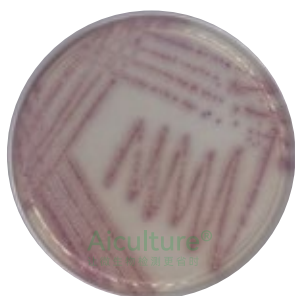
逗点 SC 混菌划线 BS



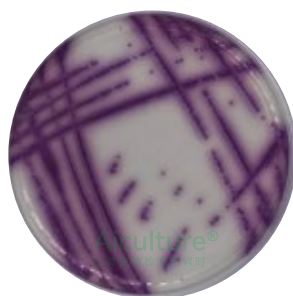
L 品牌 SC 混菌划线 BS



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：



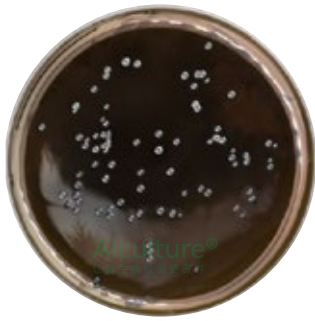
逗点 - 空白平板



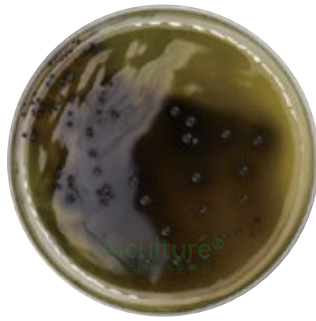
L 品牌 - 空白平板



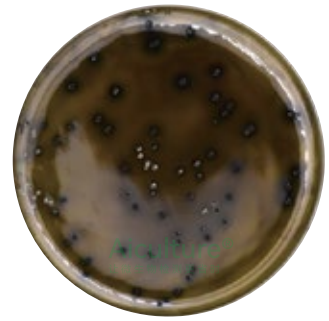
H 品牌 - 空白平板



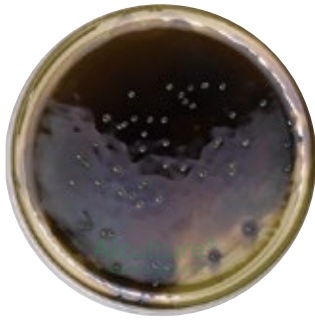
逗点 - 鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



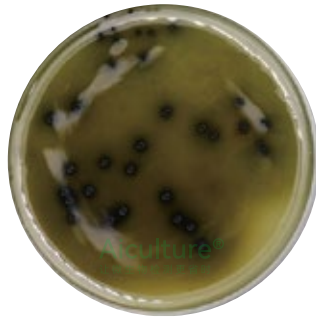
L 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



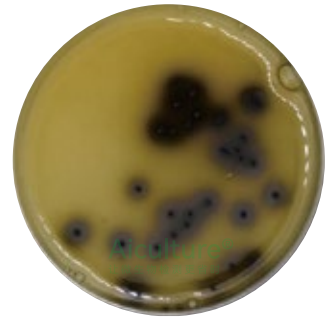
H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



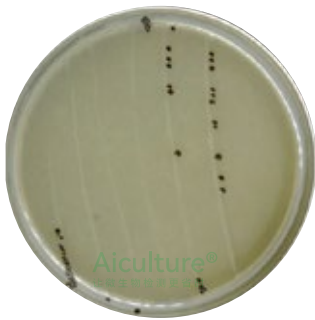
逗点 - 伤寒沙门氏菌
CMCC50071



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



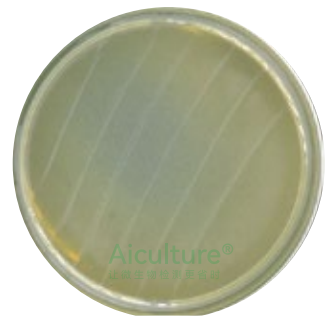
H 品牌 - 大肠埃希氏菌
ATCC25922



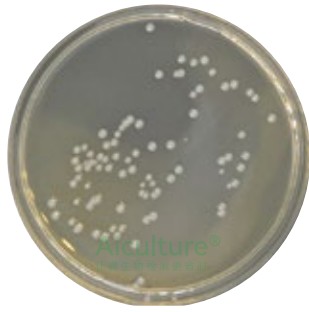
逗点 - 粪肠球菌
ATCC29212



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。
- 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：



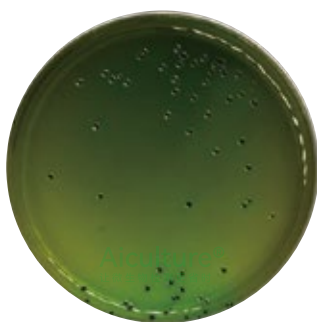
逗点 - 空白平板



L 品牌 - 空白平板



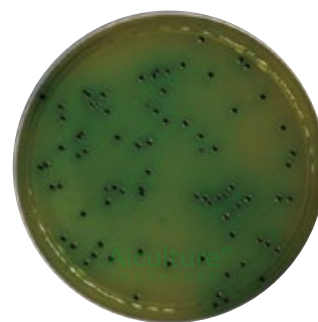
H 品牌 - 空白平板



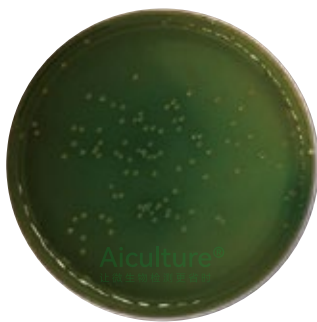
逗点 - 鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



L 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



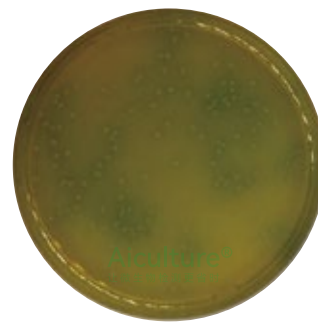
H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



逗点 - 福氏志贺氏菌
ATCC12022



L 品牌 - 福氏志贺氏菌
ATCC12022



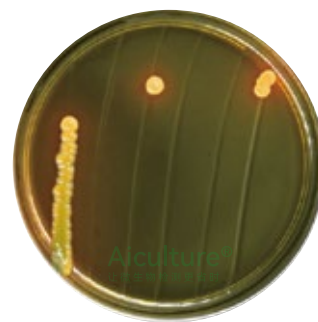
H 品牌 - 福氏志贺氏菌
ATCC12022



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

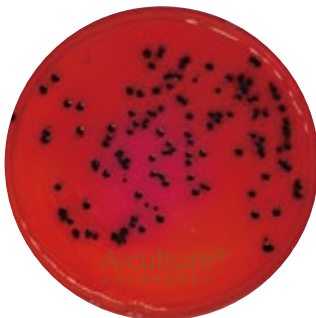
- 1. 产品用途：用于沙门氏菌、志贺氏菌的分离培养。
- 2. 检验原理：酵母膏粉提供氮源、维生素、生长因子；氯化钠维持均衡的渗透压；木糖、乳糖、蔗糖为可发酵糖类，产酸使酚红指示剂变黄；去氧胆酸钠抑制革兰氏阳性菌，但不影响沙门氏菌的生长；硫代硫酸钠可被某些细菌还原硫化氢，与柠檬酸铁铵中的铁盐生成黑色硫化铁；琼脂是培养基的凝固剂；酚红为 pH 指示剂。
- 3、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD) 验证



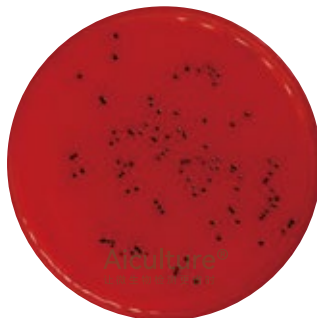
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	菌液浓度计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD)	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	125	102	PR=1.2	PR≥0.5	符合
		L 品牌	84		PR=0.8		符合
		H 品牌	139		PR=1.4		符合
	福氏志贺氏菌 ATCC12022	逗点	209	203	PR=1.1	PR≥0.5	符合
		L 品牌	172		PR=0.8		符合
		H 品牌	193		PR=0.9		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G=3.5	G < 5	符合
		L 品牌	/		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；

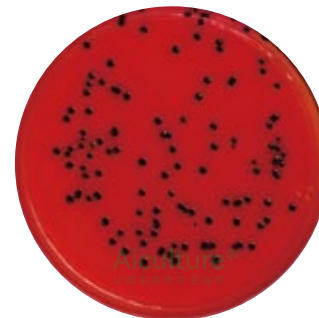
4、典型特征图片：



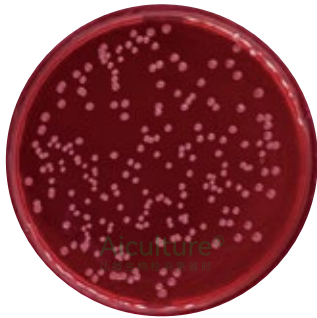
逗点鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



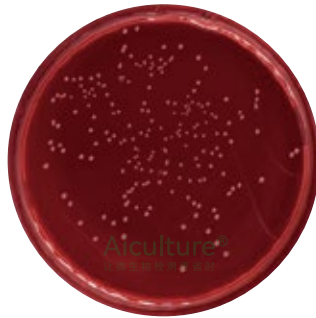
L 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



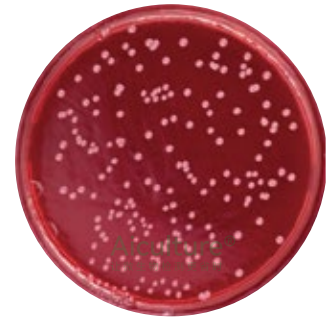
H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



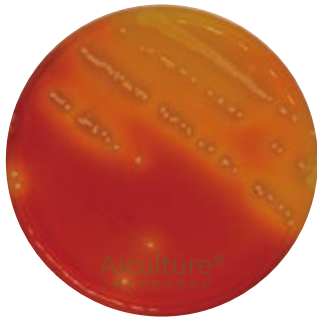
逗点福氏志贺氏菌
CMCC(B)51572



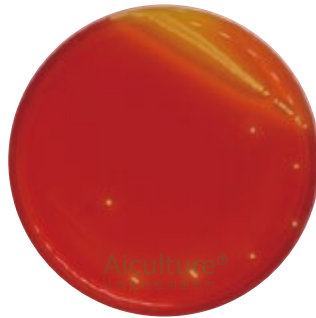
L 品牌 - 福氏志贺氏菌
CMCC(B)51572



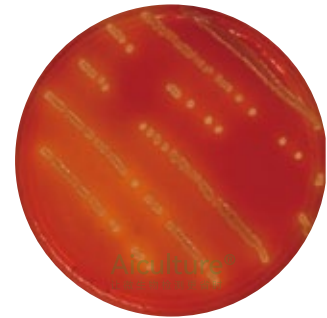
H 品牌 - 福氏志贺氏菌
CMCC(B)51572



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、L 品牌均满足国标 $G < 5$ 的要求，H 品牌 $G=5.5$ ，不满足国标要求；金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 $G \leq 1$ 的要求；
3. 感观：三家平板颜色无显著差异。
4. 生长性能，逗点和 L 品牌优于 H 品牌。特异性上（特别是对大肠的抑制）L 品牌更好，逗点目前排第二。

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；							

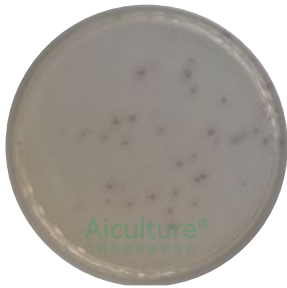
4、典型特征图片：



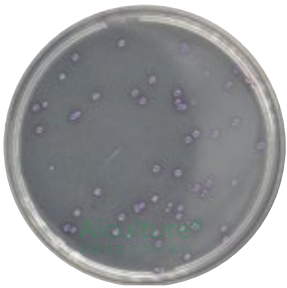
逗点 - 空白平板



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 ≥ 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。

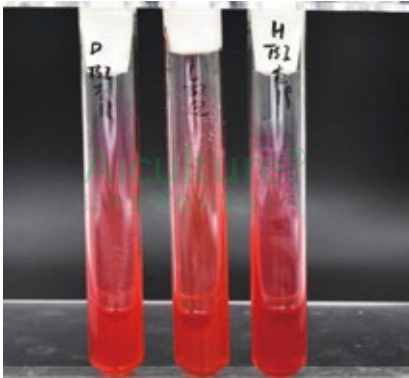
三糖铁琼脂 (TSI) 验证

- 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；						

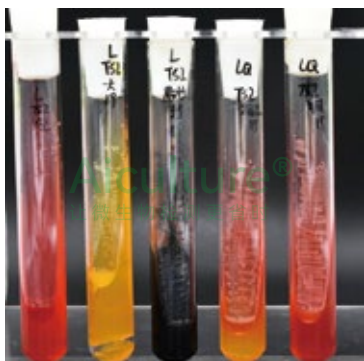
4、典型特征图片：



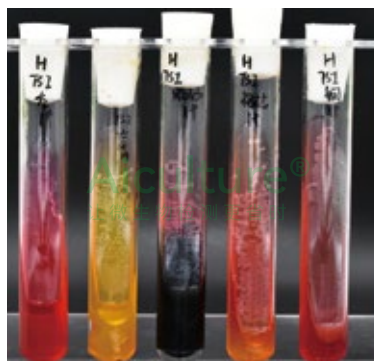
逗点 -L 品牌 -H 品牌空白



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

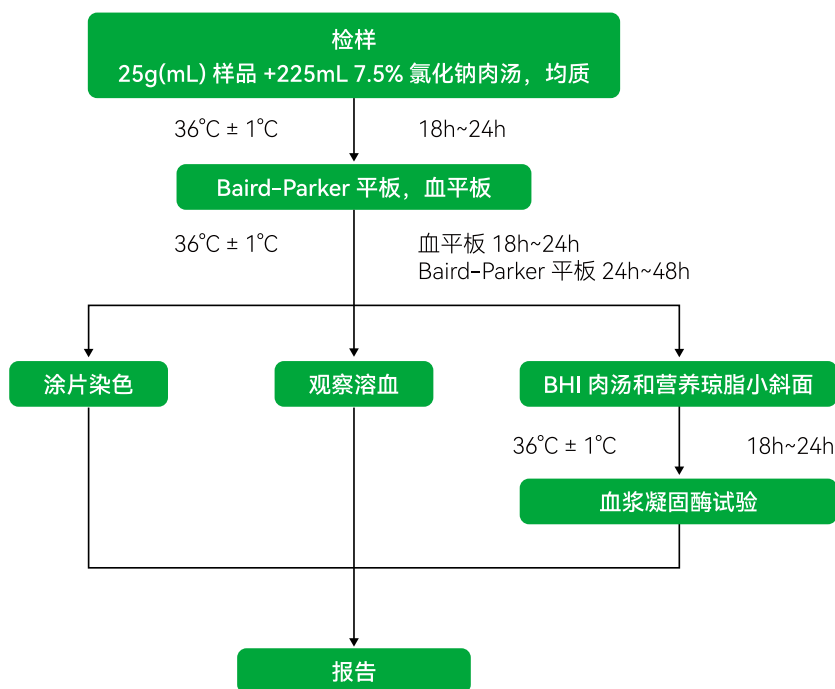


图 1 金黄色葡萄球菌检验程序



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

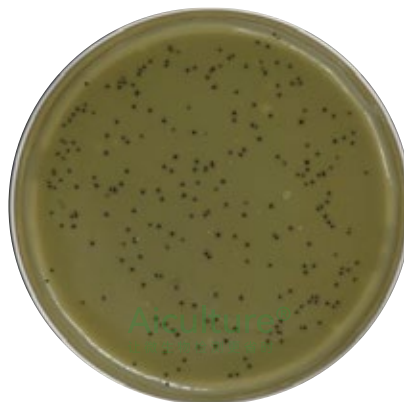
将上述样品匀液于 36℃ ± 1℃ 培养 18h~24h。金黄色葡萄球菌在 7.5% 氯化钠肉汤中呈混浊生长。

· 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 $0.5\mu\text{m}$ ~ $15\mu\text{m}$ 。

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。

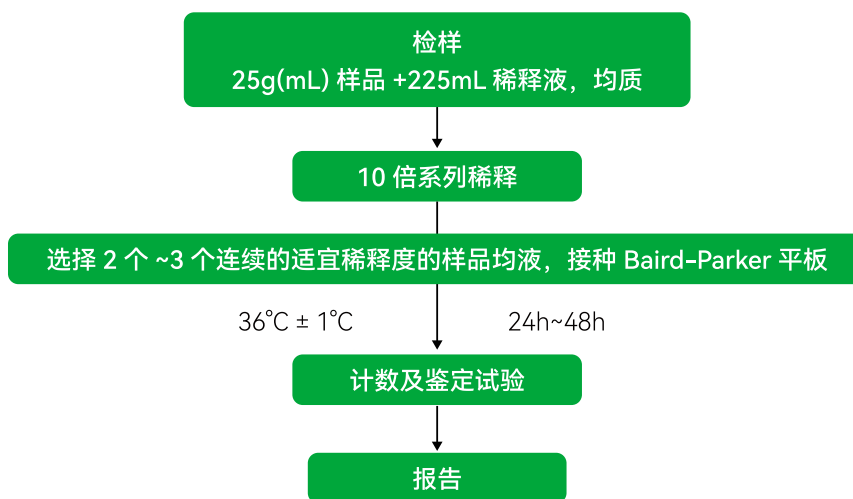


图 2 金黄色葡萄球菌平板计数法检验程序

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；

A₁——第一稀释度（低稀释倍数）典型菌落的总数；

B₁——第一稀释度（低稀释倍数）鉴定为阳性的菌落数；

C₁——第一稀释度（低稀释倍数）用于鉴定试验的菌落数；

A₂——第二稀释度（高稀释倍数）典型菌落的总数；

B₂——第二稀释度（高稀释倍数）鉴定为阳性的菌落数；

C₂——第二稀释度（高稀释倍数）用于鉴定试验的菌落数；

1.1——计算系数；

d——稀释因子（第一稀释度）。

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

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

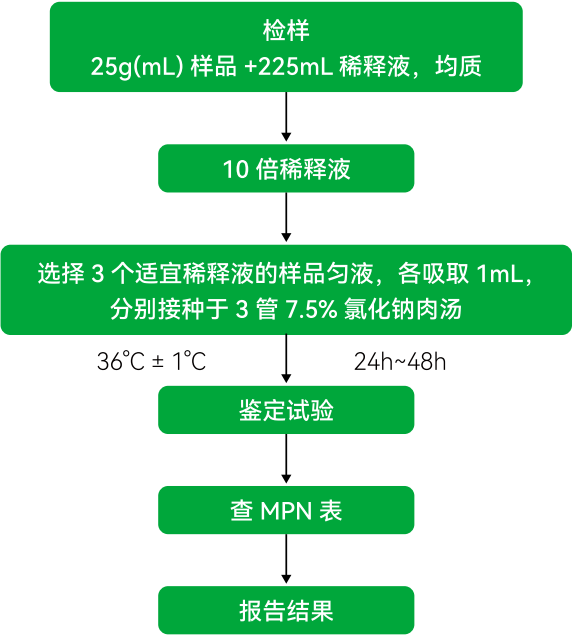


图 3 金黄色葡萄球菌 MPN 法检验程序

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。

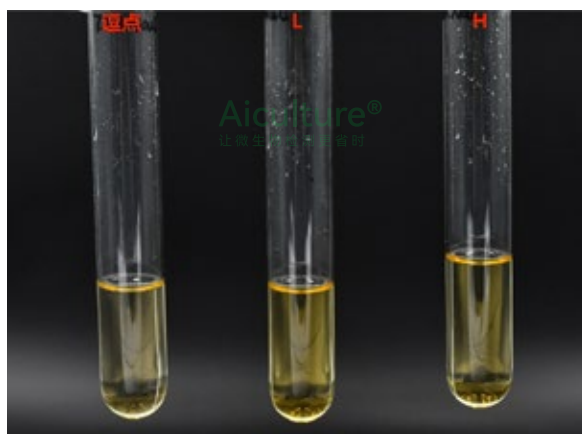
注意要点

- 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。



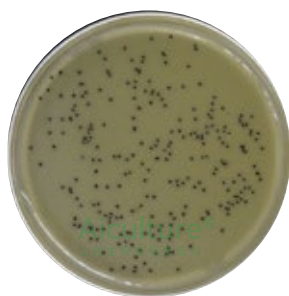
7.5% 氯化钠肉汤空白竞品比对

2. Baird-Parker 琼脂基础

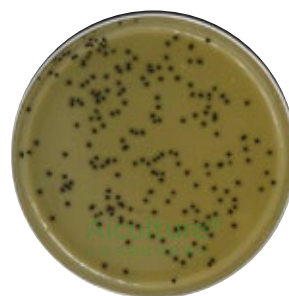
胰蛋白胨、牛肉膏粉和酵母膏粉提供碳氮源、维生素和生长因子; 丙酮酸钠和甘氨酸刺激葡萄球菌的生长; 氯化锂和亚碲酸钾抑制非葡萄球菌的微生物; 含有卵磷脂酶的葡萄球菌降解卵黄使菌落产生透明圈, 而脂酶作用则产生不透明的沉淀环; 凝固酶阳性的葡萄球菌还能还原亚碲酸钾而产生黑色菌落; 琼脂是培养基的凝固剂。



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

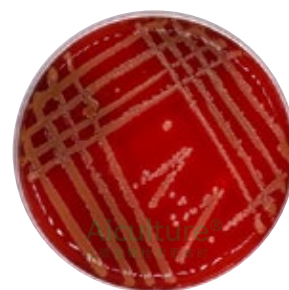
酪蛋白胰酶消化物、心胰酶消化物、肉胃酶消化物、酵母浸出粉、可溶性淀粉提供碳氮源、维生素和生长因子；羊血是细菌生长繁殖的良好营养物质。在 45 ~ 50°C 的基础培养基中加入血液可以保存血液中某些不耐热的生长因子，同时血球不被破坏。



逗点金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



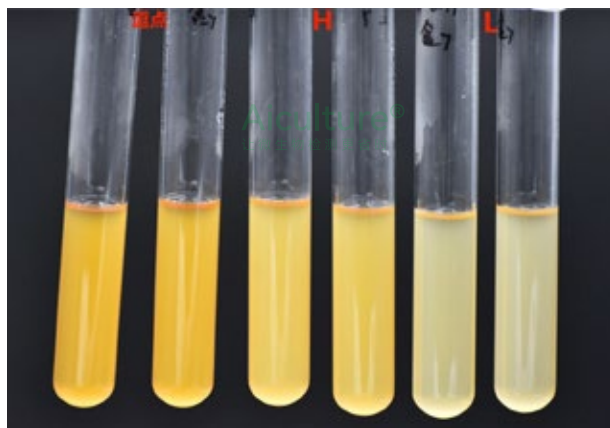
L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538

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

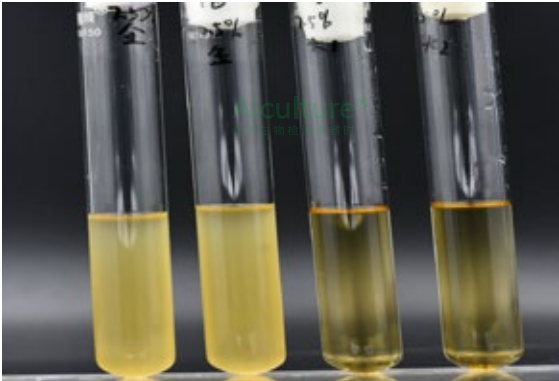
7.5% 氯化钠肉汤验证

- 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

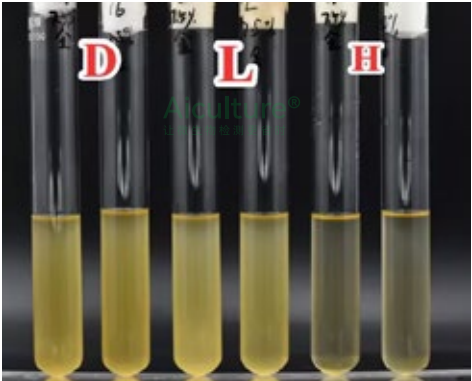


样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计 数 (CFU)	接种计数培养基 (TSA)	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
7.5% 氯化钠 肉汤	金黄色葡萄球 ATCC6538 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	26	26CFU (金黄色葡萄球 ATCC6538) +2135CFU (大肠埃希氏菌 ATCC25922)	在 Baird-Parker 上 > 10CFU 菌落黑色凸起， 周围有一混浊带，在其外 层有一透明圈	在 Baird- Parker 上 > 10CFU 菌落黑 色凸起，周围 有一混浊带， 在其外层有一 透明圈	符合
		L 品牌			在 Baird-Parker 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

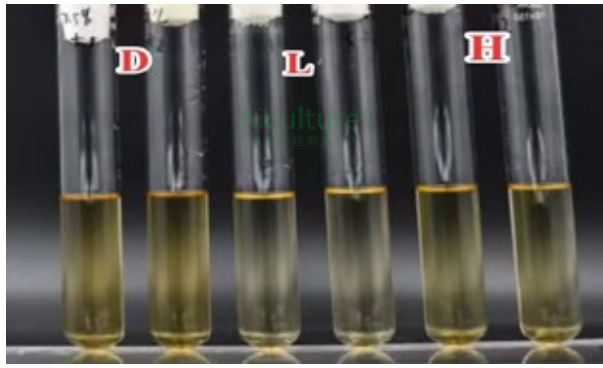
4、典型特征图片：



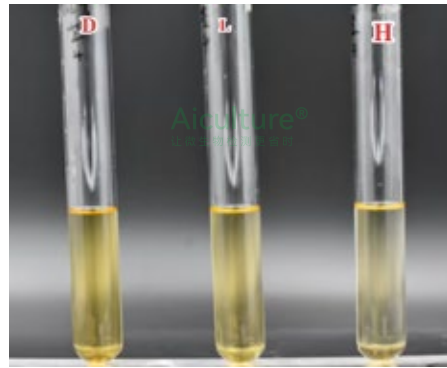
逗点 7.5% 氯化钠肉汤增菌后现象



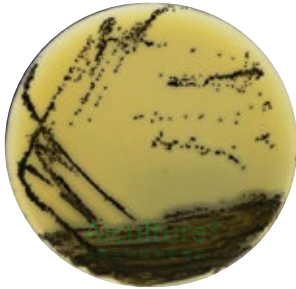
金黄色葡萄球 ATCC6538+
大肠埃希氏菌 ATCC25922 7.5% 氯化钠肉汤竞品比对



大肠埃希氏菌 ATCC25922 7.5% 氯化钠肉汤竞品比对



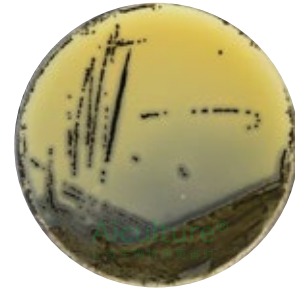
7.5% 氯化钠肉汤空白竞品比对



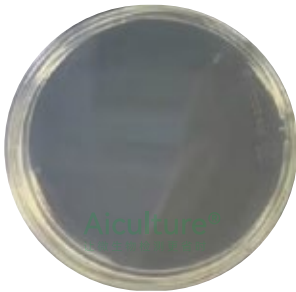
逗点混菌划线 BP



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



金黄色葡萄球菌 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菌 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

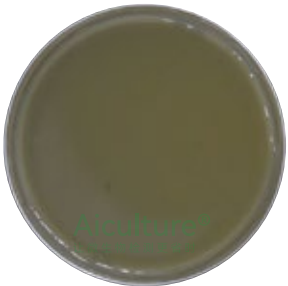


样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计 数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
Baird- Parker 琼 脂	金黄色葡萄球 菌 ATCC6538	逗点	215	155	1.3	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	218		1.4		符合
		H 品牌	244		1.5		符合
	表皮葡萄球菌 ATCC12228	逗点	/	/	黑色菌落，无混浊带， 无透明圈	黑色菌落，无 混浊带和透明 圈。	符合
		L 品牌	/	/	黑色菌落，无混浊带和透 明圈		符合
		H 品牌	/	/	黑色菌落，无混浊带， 无透明圈		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	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



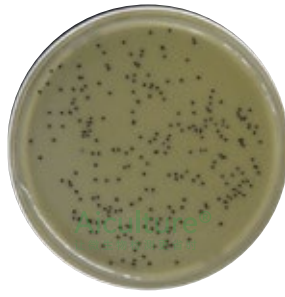
L 品牌空白平板



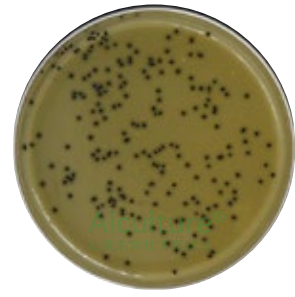
H 品牌空白平板



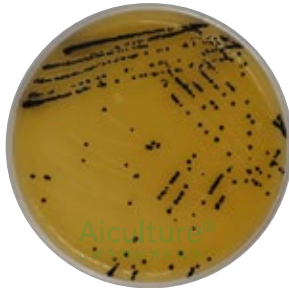
逗点金黄色葡萄球菌 ATCC12228



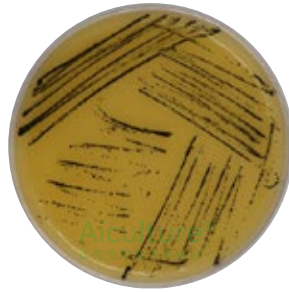
L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC12228



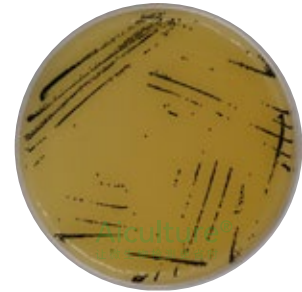
H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC12228



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 β 溶血环	菌落周围有 β 溶血环	符合
		L 品牌	菌落周围有 β 溶血环		符合
		H 品牌	菌落周围有 β 溶血环		符合
	蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303	逗点	菌落周围有 α 溶血环	菌落周围有 α 溶血环	符合
		L 品牌	菌落周围有 α 溶血环		符合
		H 品牌	菌落周围有 α 溶血环		符合



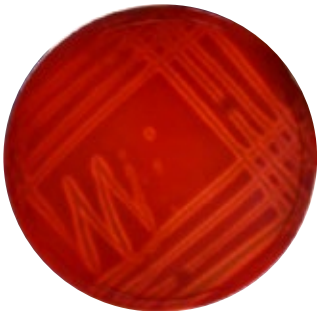
逗点金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



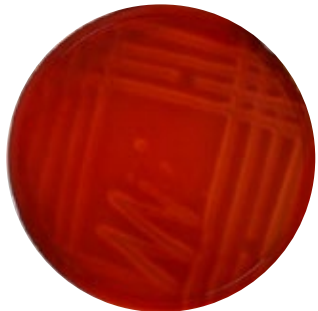
H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538



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



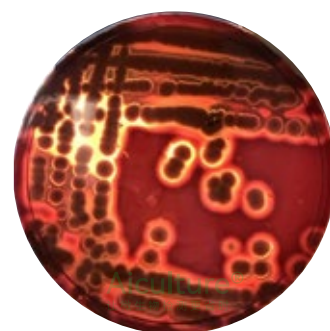
H 品牌蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303



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

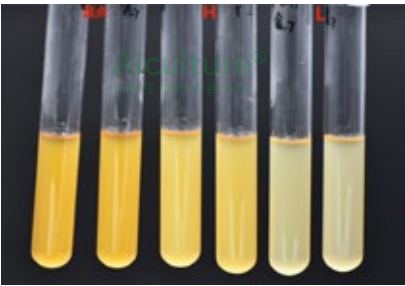
脑心浸出液肉汤（BHI）

- 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

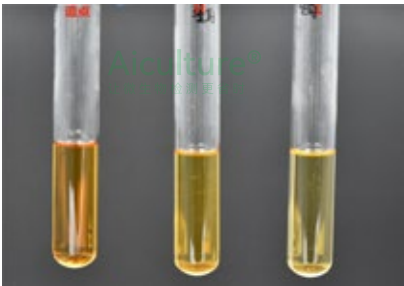


样品名称	质控菌株	厂家	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
脑心浸出液肉汤 (BHI)	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	61	混浊度 2	混浊度 2	符合
		L 品牌		混浊度 2		符合
		H 品牌		混浊度 2		符合

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。

06 食品微生物检验 GB4789.30-2016 单核细胞增生李斯特氏菌检验及注意事项

一、单核细胞增生李斯特氏菌的生物学特性

生物学特性：单核细胞增生李斯特氏菌为革兰氏阳性短杆菌，营养需求不高，兼性厌氧。该菌触酶阳性，有动力，具有溶血反应、能发酵葡萄糖、麦芽糖、鼠李糖和七叶苷，不能发酵甘露醇和木糖，MR-VP 阳性。

流行病学特征：单核细胞增生李斯特菌是一种人畜共患病原菌，它的临床症状为菌血症、脑膜炎及导致孕妇流产。单核细胞增生李斯特菌广泛分布存在于自然界，可以加热杀死，但是对高浓度盐和酸相对不敏感。它还能在冰箱温度和真空包装内增殖，特别有风险的材料包括生加工肉类、生牛奶产品、生熏鱼、预制沙拉和长期真空储存的包装食物。



二、单核细胞增生李斯特氏菌的国标检验方法 -- 第一法定性检验

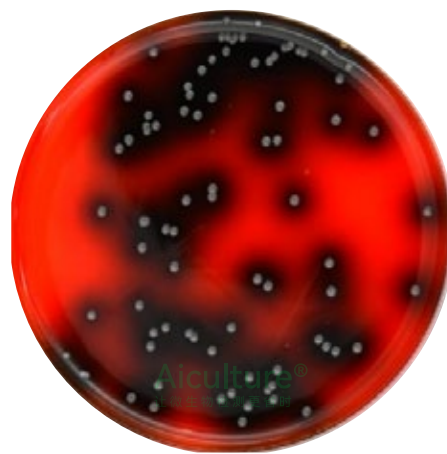
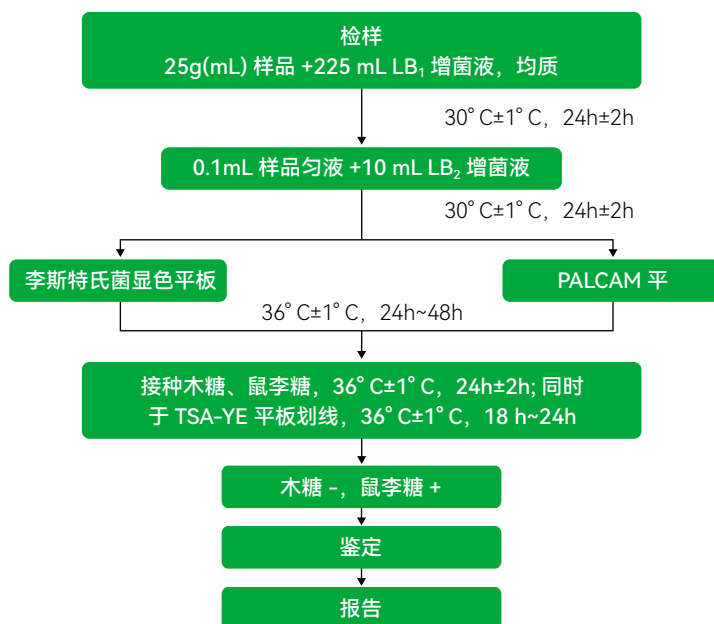


图 1 单核细胞增生李斯特氏菌定性检验程序

1、操作步骤

1.1 增菌

以无菌操作取样品 25g(mL) 加入到含有 225mL LB₁ 增菌液的均质袋中, 在拍击式均质器上连续均质 1min~2min; 或放入盛有 225mL LB₁ 增菌液的均质杯中, 以 8000r/min~10000r/min 均质 1min~2min。于 30 °C ±1 °C 培养 24h±2h, 移取 0.1mL, 转种于 10mL LB₂ 增菌液内, 于 30 °C ±1 °C 培养 24h±2h。

1.2 分离

取 LB₂ 二次增菌液划线接种于李斯特氏菌显色平板和 PALCAM 琼脂平板, 于 36 °C ±1 °C 培养 24h~48h, 观察各个平板上生长的菌落。典型菌落在 PALCAM 琼脂平板上为小的圆形灰绿色菌落, 周围有棕黑色水解圈, 有些菌落有黑色凹陷; 在李斯特氏菌显色平板上的菌落特征, 参照产品说明进行判定

1.3 初筛

自选择性琼脂平板上分别挑取 3 个 ~5 个典型或可疑菌落, 分别接种木糖、鼠李糖发酵管, 于 36 °C ±1 °C 培养 24h±2h, 同时在 TSA-YE 平板上划线, 于 36 °C ±1 °C 培养 18h~24h, 然后选择木糖阴性、鼠李糖阳性的纯培养物继续进行鉴定。

第二法 单核细胞增生李斯特氏菌平板计数法

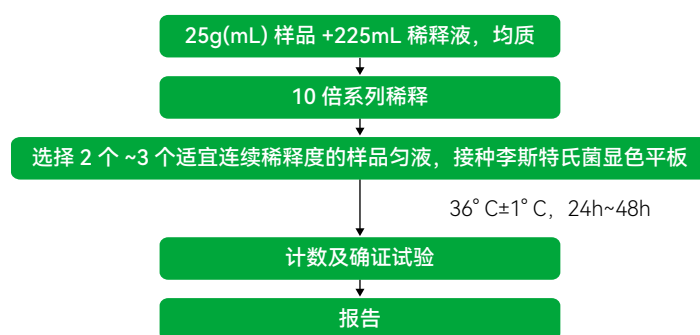


图 2 单核细胞增生李斯特氏菌平板计数程序

2.1 样品的稀释

2.1.1 以无菌操作称取样品 25g(mL), 放入盛有 225mL 缓冲蛋白胨水或无添加剂的 LB 肉汤的无菌均质袋内 (或均质杯) 内, 在拍击式均质器上连续均质 1min~2min 或以 8000r/min~10000r/min 均质 1min~2min。液体样品, 振荡混匀, 制成 1 : 10 的样品匀液。

2.1.2 用 1mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1 : 10 样品匀液 1mL, 沿管壁缓慢注于盛有 9mL 缓冲蛋白胨水或无添加剂的 LB 肉汤的无菌试管中 (注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面), 振摇试管或换用 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。

2.1.3 按 2.1.2 操作程序, 制备 10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释 1 次, 换用 1 支 1mL 无菌吸管或吸头。

2.2 样品的接种

根据对样品污染状况的估计, 选择 2 个 ~3 个适宜连续稀释度的样品匀液 (液体样品可包括原液), 每个稀释度的样品匀液分别吸取 1mL 以 0.3mL、0.3mL、0.4mL 的接种量分别加入 3 块李斯特氏菌显色平板, 用无菌 L 棒涂布整个平板, 注意不要触及平板边缘。使用前, 如琼脂平板表面有水珠, 可放在 25 °C ~50 °C 的培养箱里干燥, 直到平板表面的水珠消失。

2.3 培养

在通常情况下, 涂布后, 将平板静置 10min, 如样液不易吸收, 可将平板放在培养箱 36 °C ±1 °C 培养 1h; 等样品匀液吸收后翻转平皿, 倒置于培养箱, 36 °C ±1 °C 培养 24h~48h。

2.4 典型菌落计数和确认

2.4.1 单核细胞增生李斯特氏菌在李斯特氏菌显色平板上的菌落特征以产品说明为准。

2.4.2 选择有典型单核细胞增生李斯特氏菌菌落的平板,且同一稀释度 3 个平板所有菌落数合计在 15CFU~150CFU 之间的平板,计数典型菌落数。如果:

- a) 只有一个稀释度的平板菌落数在 15CFU~150CFU 之间且有典型菌落,计数该稀释度平板上的典型菌落;
- b) 所有稀释度的平板菌落数均小于 15CFU 且有典型菌落,应计数最低稀释度平板上的典型菌落;
- c) 某一稀释度的平板菌落数大于 150CFU 且有典型菌落,但下一稀释度平板上没有典型菌落,应计数该稀释度平板上的典型菌落;
- d) 所有稀释度的平板菌落数大于 150CFU 且有典型菌落,应计数最高稀释度平板上的典型菌落;
- e) 所有稀释度的平板菌落数均不在 15CFU~150CFU 之间且有典型菌落,其中一部分小于 15CFU 或大于 150CFU 时,应计数最接近 15CFU 或 150CFU 的稀释度平板上的典型菌落。

以上按式 (1) 计算。

f) 2 个连续稀释度的平板菌落数均在 15CFU~150CFU 之间,按式 (2) 计算。

式中:

T——样品中单核细胞增生李斯特氏菌菌落数;

A——某一稀释度典型菌落的总数;

B——某一稀释度确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数;

C——某一稀释度用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数;

d——稀释因子。

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

式中:

T——样品中单核细胞增生李斯特氏菌菌落数;

A1——第一稀释度(低稀释倍数)典型菌落的总数;

B1——第一稀释度(低稀释倍数)确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数;

C1——第一稀释度(低稀释倍数)用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数;

A2——第二稀释度(高稀释倍数)典型菌落的总数;

B2——第二稀释度(高稀释倍数)确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数;

C2——第二稀释度(高稀释倍数)用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数;

1.1——计算系数;

d——稀释因子(第一稀释度)。

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

2.4 结果报告

报告每 g(mL) 样品中单核细胞增生李斯特氏菌菌数,以 CFU/g(mL) 表示;如 T 值为 0,则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。

第三法 单核细胞增生李斯特氏菌 MPN 计数法

3.1 检验程序

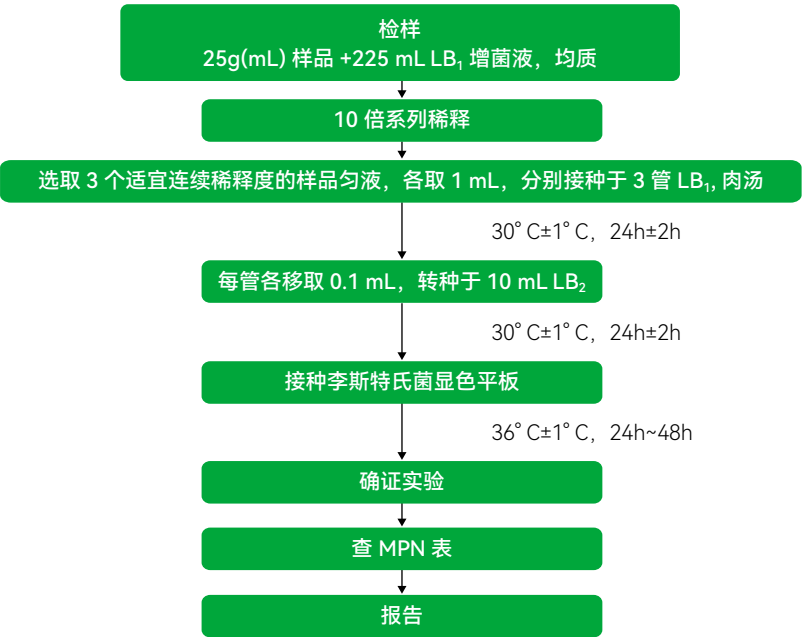


图 3 单核细胞增生李斯特氏菌 MPN 计数程序

3.2 操作步骤

3.2.1 样品的稀释

按 2.1 进行。

3.2.2 接种和培养

3.2.2.1 根据对样品污染状况的估计, 选取 3 个适宜连续稀释度的样品匀液 (液体样品可包括原液), 接种于 10mL LB₁ 肉汤, 每一稀释度接种 3 管, 每管接种 1mL (如果接种量需要超过 1mL, 则用双料 LB₁ 增菌液) 于 30 °C ± 1°C 培养 24h ± 2h。每管各移取 0.1mL, 转种于 10mL LB₂ 增菌液内, 于 30 °C ± 1°C 培养 24h ± 2h。

3.2.2.2 用接种环从各管中移取 1 环, 接种李斯特氏菌显色平板, 36 °C ± 1°C 培养 24h ~ 48h。

3.2.3 确证试验

自每块平板上挑取 5 个典型菌落 (5 个以下全选), 按照 1.3 进行鉴定。

3.3.4 结果与报告

根据证实为单核细胞增生李斯特氏菌阳性的试管管数, 查 MPN 检索表 (见附录 B), 报告每 g(mL) 样品中单核细胞增生李斯特氏菌的最可能数, 以 MPN/g(mL) 表示。

操作注意事项

- 1: 对易产生较大颗粒的样品 (如肉类) 进行检测时, 建议使用带滤网均质袋, 以便均质后用吸管吸取匀液;
- 2: 预增菌时间与样品种类、目标菌和杂菌的含量及状态等因素有关。一般菌相比较复杂的高污染样品, 如果增菌时间过长会导致杂菌生长过多, 目标菌可能就会被另一种优势菌所取代, 这种情况下, 增菌时间不宜过长。低污染样品的增菌时间可以适当延长。由于本标准适用的样品种类众多, 预增菌的时间应根据实际情况和经验进行具体选择。建议增菌液发生混浊时停止预增菌。
- 3: 分离划线用直径 3mm 的接种环 (1 环约 10 微升)。
- 4: 动力试验的培养温度不能超过 30 °C。

附录 B 单核细胞增生李斯特氏菌最可能数 (MPN) 检索表

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

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

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

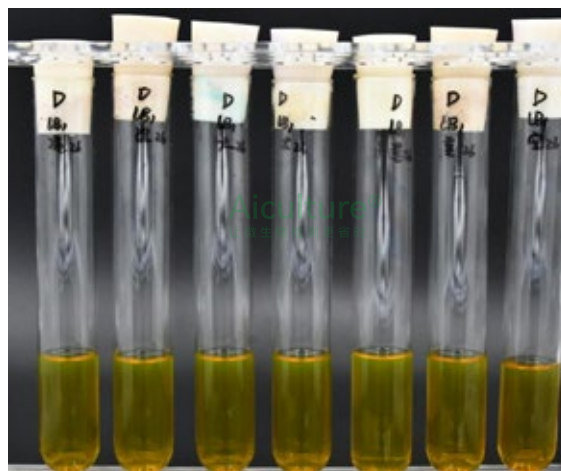
三、培养基原理解析

1) 李氏增菌肉汤 (LB₁, LB₂) 基础

李氏增菌肉汤检验原理：蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；磷酸二氢钾和磷酸氢二钠是缓冲剂。



逗点 -L 品牌 -H 品牌 -LB₁ 空白

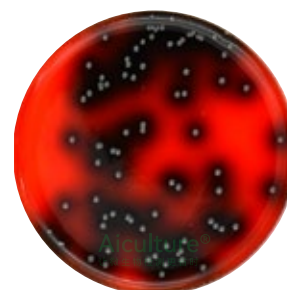


逗点 -LB₁ 增菌

2) PALCAM 培养基

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

可疑菌落特征：在 PALCAM 琼脂平板上为小的圆形灰绿色菌落，周围有棕黑色水解圈，有些菌落有黑色凹陷。



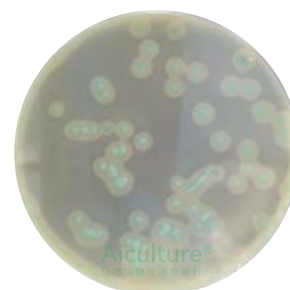
单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115

疑点：单核细胞增生李斯特氏菌与属内其他李斯特氏菌菌落特征无明显差别，可疑菌落多，后续确证工作量大。

3) 李斯特显色培养基

可疑菌落特征：单核细胞增生李斯特氏菌形成蓝绿色光滑的小菌落，周围有乳白色脂肪沉淀环；其他李斯特氏菌为蓝绿色无晕圈菌落；杂菌被抑制或显示其他颜色。

疑点：乳白色脂肪沉淀环扩散覆盖其他菌落时极易引起假阳性。



逗点 - 单核细胞增生李斯特氏菌
ATCC19115

4) 含 0.6% 酵母浸膏的胰酪胨大豆琼脂 (TSA-YE)

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



单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115

5) 含 0.6% 酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤 (TSB-YE)(EB 增菌液基础)

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



逗点 -L 品牌 -H 品牌 - 空白肉汤



单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115

四. 质量控制及疑难解析

1、质量控制

- 1): 实验室过程中, 每批预增菌液、选择性增菌液、分离平板等都要做空白对照。以掌握检验过程中是否存在来自检验环境的污染。
- 2): 定期使用单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115 菌种或等效的其他标准株, 在 P2 实验室或阳性对照实验室内, 用适当的食品样品进行阳性对照实验验证, 污染剂量应控制在 10-100CFU/25g, 并进行记录, 验证实验至少每 2 个月进行 1 次。
- 3): 要求对使用的培养基和生化试剂每批均用 GB4789.30-2016 推荐的阳性和阴性对照标准菌种进行验证, 并做好记录。

2、疑难解析

Q1: 为什么在没有典型菌落时仍要挑取非典型菌落进行鉴定?

根据经验, 有少数单核细胞增生李斯特氏菌在李斯特显色平板上呈现非典型菌落。

Q2: 为什么在 PALCAM 选择性平板上挑取典型菌落, 鉴定后非单核细胞增生李斯特菌的概率较高?

PALCAM 是李斯特菌属的选择性平板, 根据经验, 环境存在较多的英诺克李斯特菌, 应结合显色平板, 挑取较多的典型菌落鉴定。

Q3: 当 3 个及以上连续稀释度的结果均为阳性时, 如何选择?

选择原则参考 Bacteriological Analytical Manual Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions.

Q4: 如果前增菌或选择性增菌结束后, 肉汤中未见微生物生长, 是否可以终止实验?

不可以, 因为肉眼可见的细菌浓度为 10^7 CFU/mL, 在此浓度以下, 肉眼不能发现。

李氏增菌肉汤基础 (LB₁) 验证

- 1、产品用途：用于李斯特氏菌的选择性增菌培养。
- 2、检验原理：蛋白胨提供碳源和氮源满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；磷酸二氢钾和磷酸氢二钠是缓冲剂。
- 3、LB₁ 验证



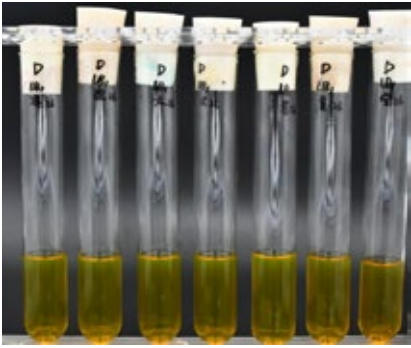
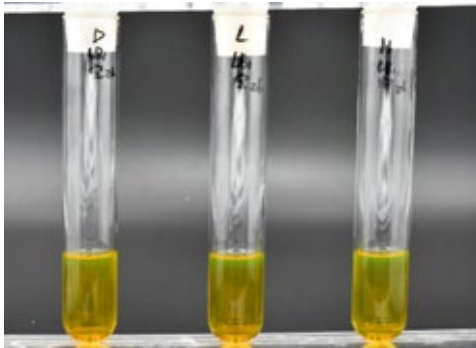
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计 数 (CFU)	接种计数培养基 (TSA))	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
LB1	单核细胞增生 李斯特氏菌 ATCC19115+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922+ 粪肠球菌 ATCC29212	逗点	/	多不可计	在 PALCAM 上 > 10CFU, 培养基变黑色	在 PALCAM 上 > 10CFU , 培养基变黑色	符合
		L 品牌	/		在 PALCAM 上 > 10CFU, 培养基变黑色		符合
		H 品牌	/		在 PALCAM 上 > 10CFU, 培养基变黑色		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	0	3980	< 100	在 TSA 上 < 100CFU	符合
		L 品牌	0		< 100		符合
		H 品牌	0		< 100		符合
	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	0	2050	< 100	在 TSA 上 < 100CFU	符合
		L 品牌	124		> 100		不符合
		H 品牌	187		> 100		不符合

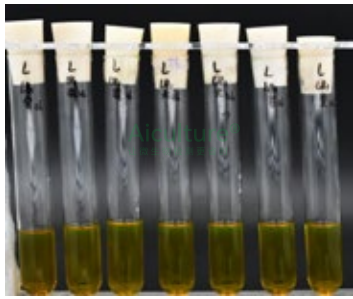
1. 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115 在 LB₁ 增菌上的菌落特征：在 PALCAM 上 > 10CFU, 培养基变黑色;

2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 LB₁ 增菌上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU;

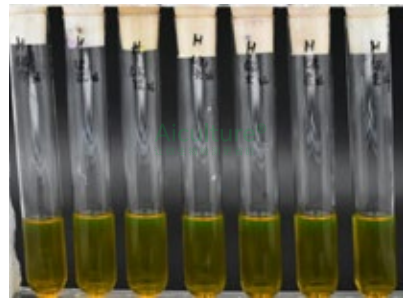
3. 粪肠球菌 ATCC 29212 在 LB₁ 增菌上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU;

4、典型特征图片：

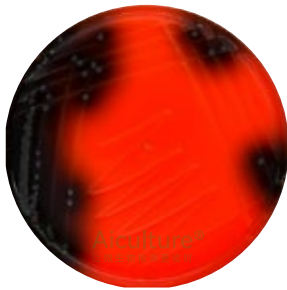




L 品牌 -LB1 增菌



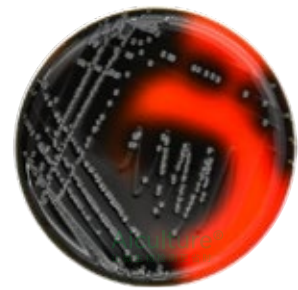
H 品牌 -LB1 增菌



逗点 - 混菌划线 PALCAM



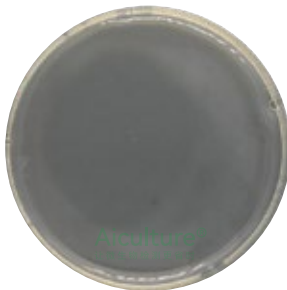
L 品牌 - 混菌划线 PALCAM



H 品牌 - 混菌划线 PALCAM



逗点 - 大肠埃希氏菌 ATCC 25922



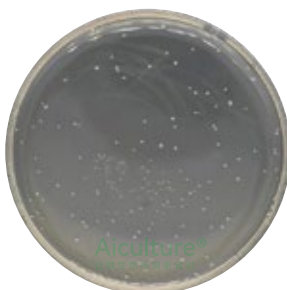
L 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC 25922



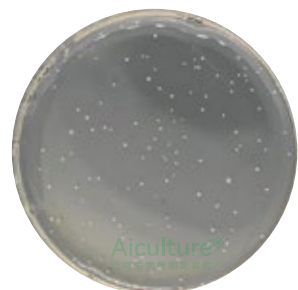
H 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC 25922



逗点 - 粪肠球菌 ATCC 29212



L 品牌 - 粪肠球菌 ATCC 29212



H 品牌 - 粪肠球菌 ATCC 29212

5、验证结果小结：

- 1、生长率：目标菌单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922+ 粪肠球菌 ATCC29212，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标在 PALCAM 上 > 10CFU，培养基变黑色的要求；
- 2、选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922 逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标在 TSA 上 < 100CFU 的要求；粪肠球菌 ATCC 29212，逗点满足国标在 TSA 上 < 100CFU 的要求，L 品牌、H 品牌不满足国标在 TSA 上 < 100CFU 的要求，逗点选择性优于 L 品牌、H 品牌；
- 3、感观：逗点、L 品牌、H 品牌空白液体颜色无显著差异。

李斯特氏菌显色培养基验证

- 1、产品用途：用于单增李斯特菌的分离和初步鉴别。
- 2、检验原理：蛋白胨、大豆胨和酵母粉提供氮源和微量元素；葡萄糖提供碳源；丙酮酸钠、甘油磷酸镁、硫酸镁、氯化锂促进菌体细胞生长，调节酶活；氯化钠维持均衡的渗透压；磷酸氢二钠为缓冲剂；琼脂是培养基的凝固剂；5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-葡萄糖苷为显色底物，与李斯特氏菌的β-葡萄糖苷酶发生特异性水解反应，释放出显色基团，使李斯特氏菌属细菌形成绿色菌落；而李斯特氏菌显色培养基配套试剂含卵磷脂和抗生素，可抑制杂菌生长，使具有卵磷脂酶的单增李斯特氏菌在绿色菌落周围形成乳白色脂肪沉淀环。
- 3、李斯特氏菌显色培养基验证

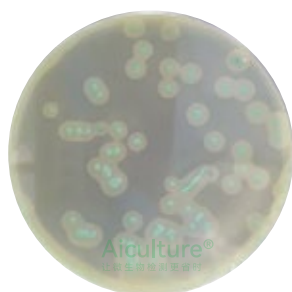


样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	接种计数培养基 (TSA))	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
李斯特氏菌显色培养基	单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115	逗点	73	75	0.9	PR ≥ 0.5	符合
	英诺克李斯特氏菌 ATCC33090	逗点	/	/	蓝绿色菌落，无白色晕环	蓝绿色菌落，无白色晕环	符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G < 1	G ≤ 1	符合
	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	/	/	G < 1	G ≤ 1	符合
1. 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115 在李斯特菌显色培养基上的菌落特征：蓝绿色菌落，带白色晕环； 2. 英诺克李斯特氏菌 ATCC33090 在李斯特菌显色培养基上的菌落特征：蓝绿色菌落，无白色晕环 3. 大肠埃希氏菌 ATCC25922、粪肠球菌 ATCC29212 在李斯特菌显色培养基上的菌落特征：G ≤ 1。							

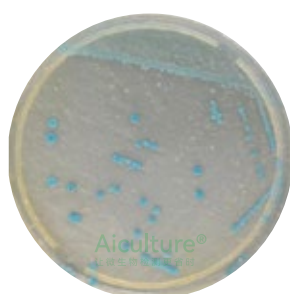
4、典型特征图片：



逗点 - 空白平板



逗点 - 单核细胞增生李斯特氏菌
ATCC19115



逗点 - 英诺克李斯特氏菌
ATCC33090



逗点 - 大肠埃希氏菌
ATCC25922



逗点 - 粪肠球菌
ATCC29212

5、验证结果小结：

- 1、生长率：目标菌单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115，逗点均满足国标 $PR \geq 0.5$ 的要求，逗点菌落蓝绿色菌落，带白色晕环；
- 2、特异性：英诺克李斯特氏菌 ATCC33090，逗点满足国标菌落为蓝绿色菌落，无白色晕环；
- 3、选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922、粪肠球菌 ATCC29212，逗点满足国标 $G \leq 1$ 的要求；
- 4、感观：逗点空白平板有沉淀（添加增补剂）。

PALCAM 琼脂基础培养基验证

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



样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计 数 (CFU)	参比培养基计 数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
PALCAM	单核细胞增生 李斯特氏菌 ATCC19115	逗点	104	104	1.0	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	95		0.9		符合
		B 品牌	100		0.9		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G < 1	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/		G < 1		符合
		B 品牌	/		G < 1		符合
	粪肠球菌 ATCC29212	逗点	/	/	G < 1	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/		G < 1		符合
		B 品牌	/		G < 1		符合
1. 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115 在 PALCAM 板上的菌落特征：灰绿色菌落，中心凹陷黑色，周围有黑色； 2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 PALCAM 板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1； 3. 粪肠球菌 ATCC 29212 在 PALCAM 板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；							

4、典型特征图片：



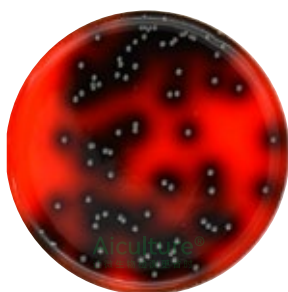
逗点 - 空白平板



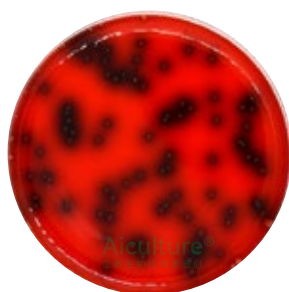
L 品牌 - 空白平板



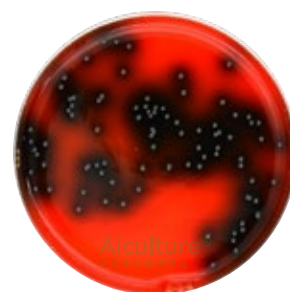
B 品牌 - 空白平板



逗点 - 单核细胞增生李斯特氏菌
ATCC19115



L 品牌 - 单核细胞增生李斯特氏菌
ATCC19115



B 品牌 - 单核细胞增生李斯特氏菌
ATCC19115



逗点 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



L 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



B 品牌 - 大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点 - 粪肠球菌 ATCC 29212



L 品牌 - 粪肠球菌 ATCC 29212



B 品牌 - 粪肠球菌 ATCC 29212

5、验证结果小结：

- 1、生长率：目标菌单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115，逗点、L 品牌、B 品牌均满足国标 $PR \geq 0.5$ 的要求，逗点生长率优于 L 品牌、B 品牌；
- 2、选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922、粪肠球菌 ATCC 29212，逗点、L 品牌、B 品牌均满足国标 $G \leq 1$ 的要求；
- 3、感观：逗点、L 品牌、B 品牌平板颜色无显著差异。

含 0.6% 酵母浸粉的胰酪胨大豆琼脂
(TSA-YE) 验证

- 1、产品用途：广泛用于细菌的培养，特别用于食品中李斯特氏菌的培养。
- 2、检验原理：胰胨、多价胨和酵母膏粉提供氮源、维生素和生长因子；氯化钠维持均衡的渗透压；葡萄糖提供碳源；磷酸氢二钾为缓冲剂；琼脂是培养基的凝固剂。
- 3、TSA-YE 验证



样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计 数 (CFU)	参比培养基计 数 (TSA)	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
TSA-YE	单核细胞增生 李斯特氏菌 ATCC19115	逗点	104	104	1.0	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	95		0.9		符合
		B 品牌	100		0.9		符合
1. 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115 在 TSA-YE 板上的菌落特征：							

4、典型特征图片：



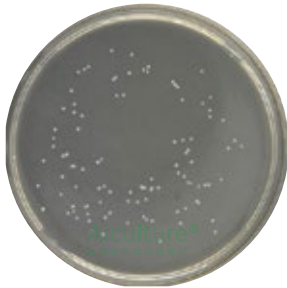
逗点 - 空白平板



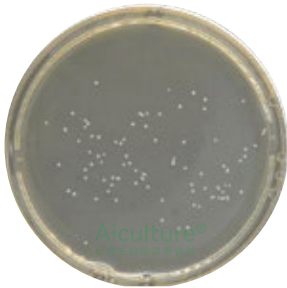
L 品牌 - 空白平板



H 品牌 - 空白平板



逗点 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115



L 品牌 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115



H 品牌 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115

5、验证结果小结：

- 1、生长率：目标菌单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 PR ≥ 0.7 的要求，逗点生长率性能优于 L 品牌、H 品牌；
- 2、感观：H 品牌平板颜色较深，逗点与 L 品牌无显著差异。

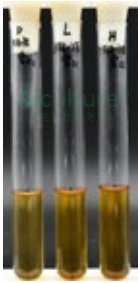
含 0.6% 酵母浸粉的胰酪胨大豆肉汤 (TSB-YE) 验证

- 1、产品用途：广泛用于细菌的培养，特别用于食品中李斯特氏菌的增菌培养。
- 2、检验原理：胰胨、多价胨和酵母膏粉提供氮源、维生素和生长因子；氯化钠维持均衡的渗透压；葡萄糖提供碳源；磷酸氢二钾为缓冲剂；萘啶酮酸和盐酸吡啶黄为选择性抑菌剂，抑制非李斯特氏菌生长。
- 3、TSB-YE 验证



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

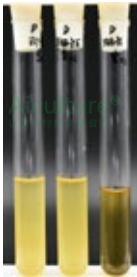
4、典型特征图片：



逗点 - L 品牌 - H 品牌 - 空白肉汤



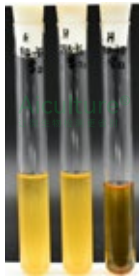
菌液计数 - 单核细胞增生李斯特氏菌



逗点 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115



L 品牌 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC1911



H 品牌 - 单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115

5、验证结果小结：

- 1、生长率：目标菌单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标混浊度 2；
- 2、感观：逗点空白肉汤颜色较浅，L 品牌、H 品牌空白肉汤颜色无显著差异。

07 食品微生物检验志贺氏菌检验及注意事项 GB 4789.5-2012

一、志贺氏菌的生物学特性

志贺菌属 (*Shigella*) 是人类细菌性痢疾最为常见的病原菌, 通称痢疾杆菌, 属肠杆菌科, 革兰阴性无芽孢杆菌, 无动力, 无荚膜、无鞭毛、有菌毛, 在营养培养基上生长良好。志贺菌常寄居在人及较高等猿类的肠道里, 根据宿主的健康状况和年龄, 一般只要 10 个菌体以上就能使人致病, 其致病因素主要是侵袭力 (菌毛) 菌体内毒素以及个别菌株产生的外毒素。食品接触人员个人卫生差、从事食品加工行业人员患病或带菌者污染食品、存放已污染的食品温度不适当等是食源性志贺菌流行的最主要原因。

志贺菌属共有 A、B、C、D 四个亚群, 分别是痢疾志贺菌、福氏志贺菌、鲍氏志贺菌和宋氏志贺菌, 结合生化和血清上的各个特征可以区别四个亚群。A 群主要由不发酵甘露醇的菌组成 (有些菌株例外), 其他三个亚群的菌都发酵甘露醇。B 群中的菌在血清学上有内在联系, C 群中的菌彼此之间或与其他亚群血清上是无关的, D 群中的菌培养几天后一般能发酵乳糖和蔗糖。



二、检验步骤

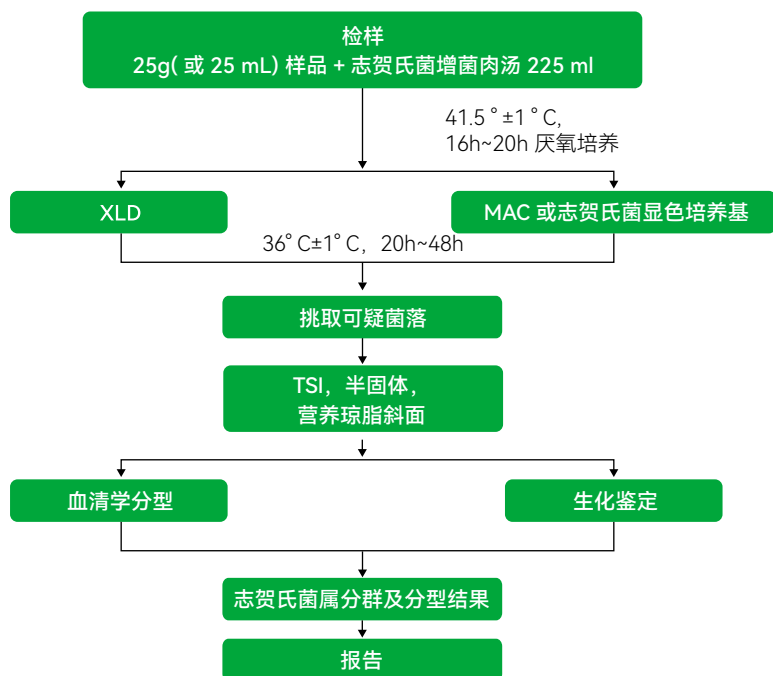


图 1 志贺氏菌检验程序

三、样品处理及增菌

1. 样品的处理

以无菌操作取样 25g(mL) 加入装有灭菌 225mL 志贺氏菌增菌肉汤的均质容器中，常用均质容器有均质杯、锥形瓶、均质袋。

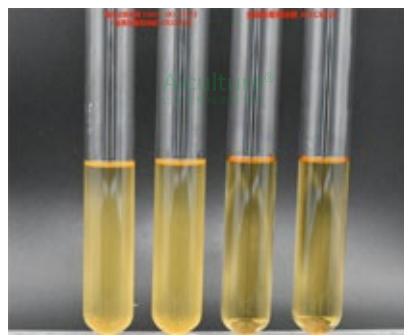
均质杯：多用于不易溶解的固体样品均质，可将固体样品切割搅拌均匀；

均质袋：可置于拍击式均质器中均质固体，常用于液体的均质；

锥形瓶：可置于摇床中，常用于液体的均质。

2. 增菌

均质后的样品置于 $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，厌氧培养 16h-20h。厌氧培养可使用厌氧培养箱、厌氧培养盒和厌氧培养袋等，志贺氏菌在志贺氏增菌肉汤中生长浑浊。



四、志贺氏菌的分离

取增菌后的志贺氏增菌液分别划线接种于 XLD 琼脂平板和 MAC 琼脂平板或志贺氏显色培养基平板上，于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 需氧培养 20h-24h。若出现的菌落不典型或菌落较小不易观察，则继续培养至 48h 再进行观察。

1. XLD 琼脂平板

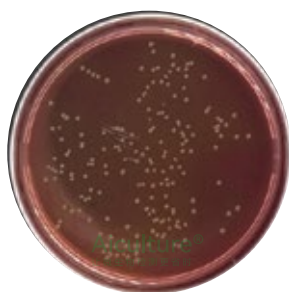
志贺氏菌在 XLD 琼脂平板上的菌落特征为粉色至无色，半透明、光滑、湿润、圆形、边缘整齐或不齐菌落。志贺氏菌大多不发酵木糖、乳糖和蔗糖，可与发酵此三种糖类的细菌（如大肠黄色菌落）区分；志贺氏菌不产硫化氢，可与产硫化氢的细菌（如大部分沙门等）区分。



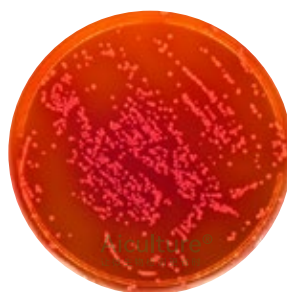
逗点福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572

2. MAC 或志贺显色培养基

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



MAC 逗点福氏志贺氏菌
CMCC(B)51572



逗点显色培养基痢疾志贺氏菌
CMCC(B)51105

五、初步生化试验

自上述选择性平板上分别挑取 2 个以上典型或可疑菌落，分别接种三糖铁琼脂 (TSI)、半固体和营养琼脂斜面一管，置于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 需氧培养 20h-24h。

1. 三糖铁琼脂

志贺氏菌在三糖铁琼脂 TSI 中：

- ① 斜面产碱呈红色且底层产酸呈黄色（发酵葡萄糖，不发酵乳糖、蔗糖）；
- ② 不产气（福氏志贺氏菌 6 型可产生少量气体）；
- ③ 不产硫化氢。



逗点 TSI- ①空白 - ②大肠埃希氏菌 - ③
肠炎沙门氏菌 - ④福氏志贺氏菌 - ⑤
铜绿假单胞菌

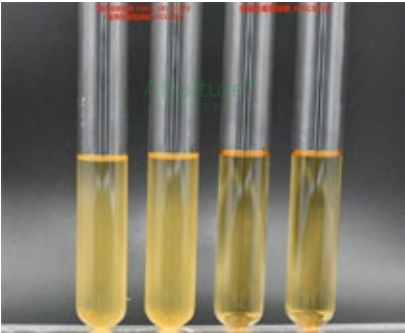
志贺氏菌增菌肉汤验证

- 1、产品用途：用于志贺氏菌的选择性分离和初步鉴别。
- 2、检验原理：胰蛋白胨提供氮源，葡萄糖提供碳源满足细菌生长的需求；氯化钠可维持均衡的渗透压；磷酸二氢钾和磷酸氢二钾是缓冲剂；吐温 80 是中和剂；新生霉素可抑制革兰氏阳性菌生长。
- 3、志贺氏菌增菌肉汤验证

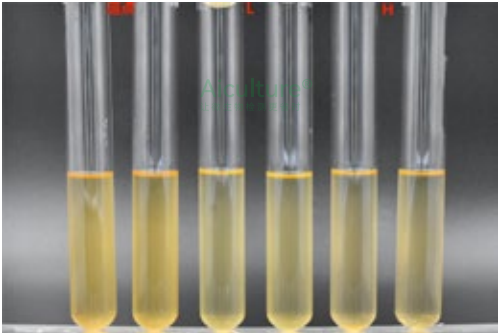


样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
志贺氏菌增菌肉汤	福氏志贺氏菌 CMCC（B）51572 + 金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	134CFU(福氏志贺氏菌 CMCC（B）51572) +1124CFU(金黄色葡萄球菌 ATCC6538)	在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色，半透明菌落	在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色，半透明菌落	符合
		L 品牌	/		在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色，半透明菌落		符合
		H 品牌	/		在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色，半透明菌落		符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	1124CFU	< 1CFU	在 TSA 上 < 100CFU	符合
		L 品牌	/		< 1CFU		符合
		H 品牌	/		< 1CFU		符合
	1. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在志贺氏菌增菌肉汤上的菌落特征：在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色，半透明菌落； 2. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在志贺氏菌增菌肉汤上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；						

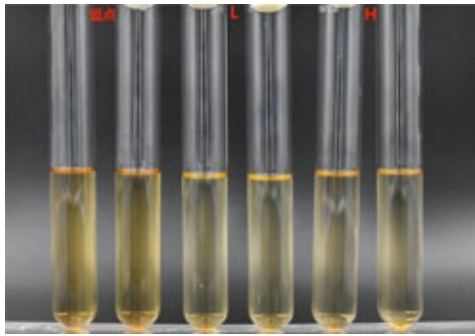
4、典型特征图片：



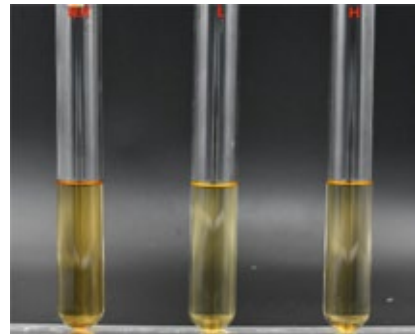
逗点志贺氏菌增菌肉汤增菌后现象



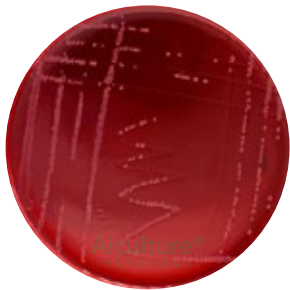
福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572+
金黄色葡萄球菌 ATCC6538 志贺氏菌增菌肉汤竞品比对



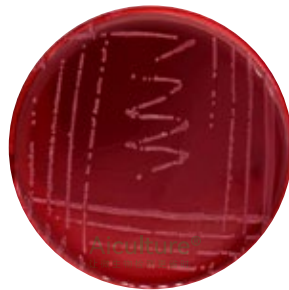
金黄色葡萄球菌 ATCC6538 志贺氏菌增菌肉汤竞品比对



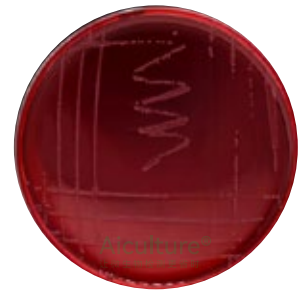
志贺氏菌增菌肉汤空白竞品比对



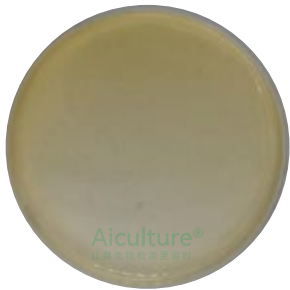
逗点志贺氏菌增菌肉汤混菌划线 XLD



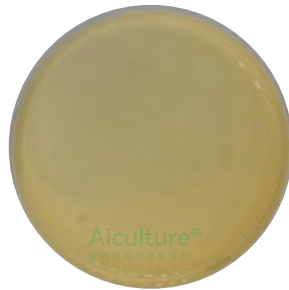
L 品牌志贺氏菌增菌肉汤混菌划线
XLD



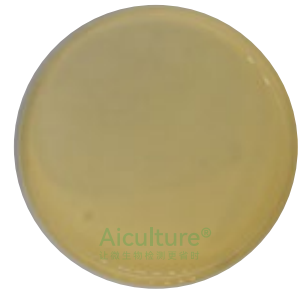
H 品牌志贺氏菌增菌肉汤混菌划线
XLD



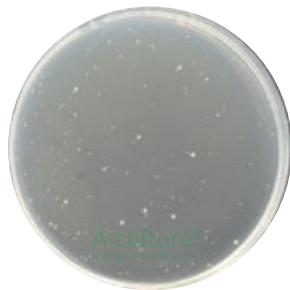
逗点 金黄色葡萄球菌倾注 TSA



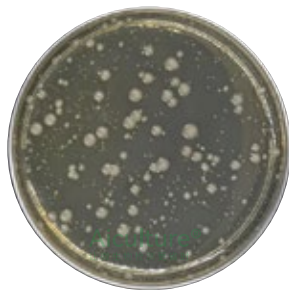
L 品牌金黄色葡萄球菌倾注 TSA



H 品牌金黄色葡萄球菌倾注 TSA



福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572 计数
TSA



金黄色葡萄球菌 ATCC6538 计数 TSA

5、验证结果小结：

- 1、生长率：目标菌福氏志贺氏菌 CMCC (B) 51572+ 金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标在 XLD 上 > 10CFU, 无色至粉红色，半透明菌落的要求；
- 2、选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均符合国标在 TSA 上 < 100CFU 要求；
- 3、感观：感观：逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。

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 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD)	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	逗点	125	102	PR=1.2	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	84		PR=0.8		符合
		H 品牌	139		PR=1.4		符合
	福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572	逗点	209	203	PR=1.1	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	172		PR=0.8		符合
		H 品牌	193		PR=0.9		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC 25922	逗点	/	/	G=3.5	G < 5	符合
		L 品牌	/		G=1		符合
		H 品牌	/		G=5.5		不符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/		G=0		符合
		H 品牌	/		G=0		符合

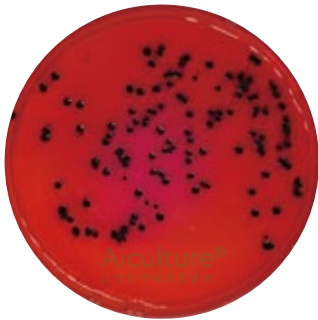
1. 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 在 XLD 板上的菌落特征：黑色菌落；

2. 福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572 在 XLD 板上的菌落特征：无色菌落，无黑心；

3. 大肠埃希氏菌 ATCC 25922 在 XLD 板上的菌落特征：黄色菌落，选择性 G < 5

4. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在 XLD 上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；

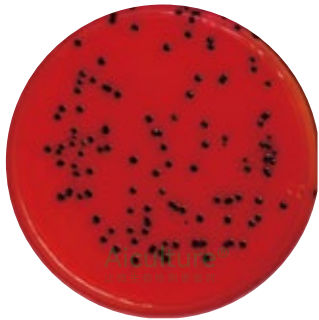
4、典型特征图片：



逗点鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



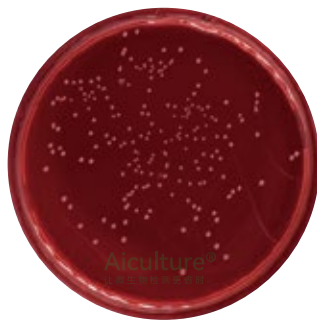
L 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



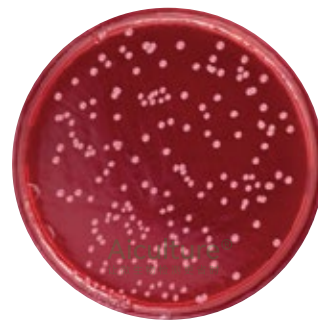
H 品牌 - 鼠伤寒沙门氏菌
ATCC14028



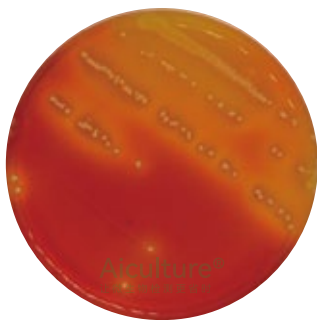
逗点福氏志贺氏菌
CMCC(B)51572



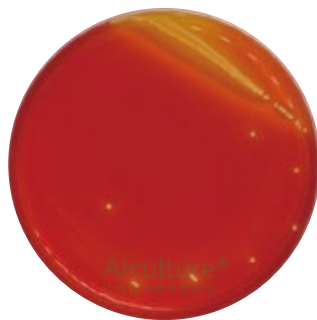
L 品牌 - 福氏志贺氏菌
CMCC(B)51572



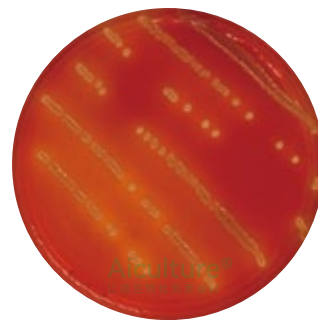
H 品牌 - 福氏志贺氏菌
CMCC(B)51572



逗点大肠埃希氏菌
ATCC 25922



L 品牌 - 大肠埃希氏菌
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、L 品牌均满足国标 $G < 5$ 的要求，H 品牌 $G=5.5$ ，不满足国标要求；金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 $G \leq 1$ 的要求；
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。

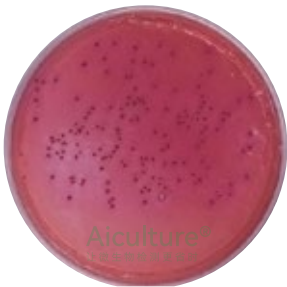
麦康凯琼脂（MAC）验证

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

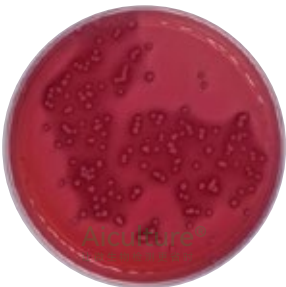


样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
麦康凯琼脂 (MAC)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	170	142	PR=1.2	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	158		PR=1.1		符合
		H 品牌	111		PR=0.8		符合
	福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572	逗点	216	203	PR=1.2	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	265		PR=1.3		符合
		H 品牌	234		PR=1.1		符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/	/	G=0		符合
		H 品牌	/	/	G=0		符合
1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 MAC 板上的菌落特征：鲜桃红色或粉红色，可有胆酸沉淀； 2. 福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572 在 MAC 板上的菌落特征：无色至浅粉红色，半透明棕色或绿色菌落； 3. 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 在 MAC 板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；							

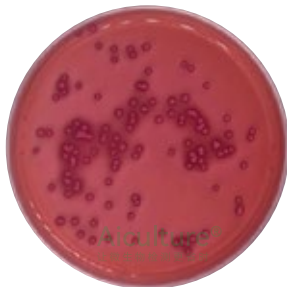
4、典型特征图片：



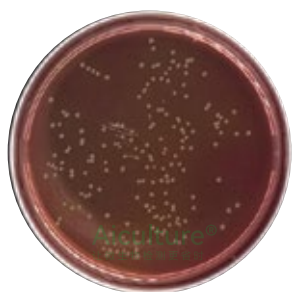
逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



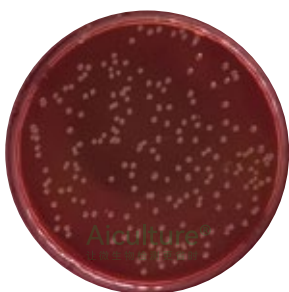
L 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



L 品牌福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



H 品牌福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572



逗点金黄色葡萄球菌 ATCC6538



L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



逗点麦康凯琼脂 (MAC) 空白



L 品牌麦康凯琼脂 (MAC) 空白



H 品牌麦康凯琼脂 (MAC) 空白

5、验证结果小结：

1. 生长率：目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 $PR \geq 0.5$ 的要求，H 品牌、L 品牌有明显胆酸盐沉淀，目标菌落较大，逗点无胆酸盐沉淀，标菌落较小；福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572，逗点、品牌、H 品牌均满足国标 $PR \geq 0.5$ 的要求。
2. 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、品牌、H 品牌均满足国标 $G \leq 1$ 的要求。
3. 感观：三家平板颜色无显著差异、逗点颜色略深。

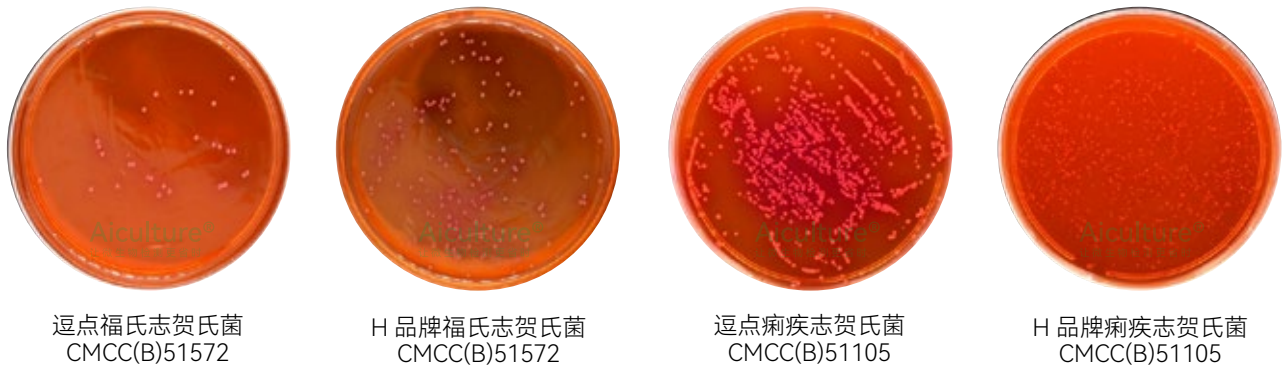
志贺氏菌显色培养基验证

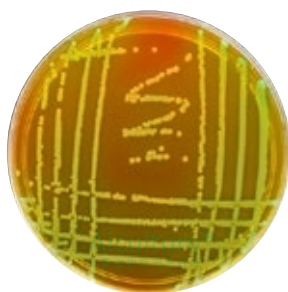
- 1. 产品用途：用于志贺氏菌的选择性分离和初步鉴别。
- 2. 检验原理：蛋白胨和酵母膏粉提供碳氮源和微量元素；氯化钠可维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂；抑制剂抑制杂菌的生长；酚红是 pH 指示剂，发酵糖产酸的菌呈黄色；混合色素对应的酶发生特异性反应，水解底物，释放出显色基团。
- 3. 志贺氏菌显色培养基验证



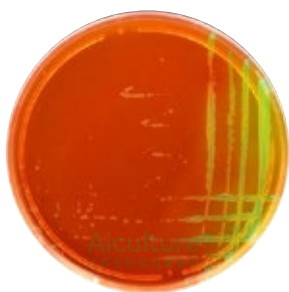
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计 数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
志贺氏 菌显色 培养基	福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572	逗点	32	67	PR=0.5	PR ≥ 0.5	符合
		H 品牌	136		PR=2.0	PR ≥ 0.5	符合
	痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105	逗点	264	233	PR=1.3	PR ≥ 0.5	符合
		H 品牌	431		PR=1.8	PR ≥ 0.5	符合
	产气肠杆菌 ATCC13048	逗点	/	/	蓝绿色菌落，周围培养基 变黄	蓝绿色菌落， 周围培养基变 黄	符合
		H 品牌	/	/	绿色菌落，无环和沉淀圈	绿色菌落，无 环和沉淀圈	符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	蓝绿色菌落，周围培养基 变黄	蓝绿色菌落， 周围培养基变 黄	符合
		H 品牌	/	/	黄色菌落，有清晰环，无 色素沉淀圈	黄色菌落，有 清晰环，无色 素沉淀圈	符合
	金黄色葡萄球 菌 ATCC 6538	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		H 品牌	/	/	G=0		符合
1. 生长率：逗点福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572、痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105 在志贺氏菌显色板上的菌落特征：白色菌落，周围培养基紫红色；H 品牌福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572、痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105 在志贺氏菌显色板上的菌落特征：白色至粉红色的菌落，周围培养基变为红色； 2. 特异性：逗点产气肠杆菌 ATCC13048、大肠埃希氏菌 ATCC25922 在志贺氏菌显色板上的菌落特征：蓝绿色菌落，周围培养基变黄；H 品牌产气肠杆菌 ATCC13048 在志贺氏菌显色板上的菌落特征：绿色菌落，无环和沉淀圈；H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922 在志贺氏菌显色板上的菌落特征黄色菌落，有清晰环，无色素沉淀圈； 3. 选择性：金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 在志贺氏菌显色板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；							

4、典型特征图片：





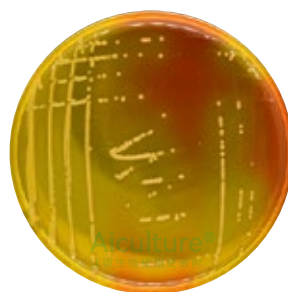
逗点产气肠杆菌
ATCC13048



H 品牌产气肠杆菌
ATCC13048



逗点大肠埃希氏菌
ATCC25922



H 品牌大肠埃希氏菌
ATCC25922



逗点金黄色葡萄球菌
ATCC 6538



H 品牌金黄色葡萄球菌
ATCC 6538



逗点志贺氏菌显色培养基空
白



H 品牌志贺氏菌显色培养基
空白

5、验证结果小结：

1. 生长率：目标菌福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572、痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105 逗点、H 品牌均满足国标 $PR \geq 0.5$ 的要求。H 品牌菌落生长速度更快；
2. 选择性：逗点、H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538，逗点、H 品牌均满足国标 $G \leq 1$ 的要求；
3. 特异性：产气肠杆菌 ATCC13048、痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51105 逗点、H 品牌均满足菌落颜色特征要求。
4. 感观：两家平板颜色无显著差异。
5. 2 家产品无明显差异，都满足国标。

三糖铁琼脂 (TSI) 验证

- 1、产品用途:用于鉴别肠道菌发酵蔗糖、乳糖、葡萄糖及产生硫化氢的生化反应。
- 2、检验原理：胨、牛肉浸出粉提供氮源、维生素、矿物质；乳糖、葡萄糖、蔗糖为可发酵糖类，其产酸时通过酚磺酞指示剂测出，酸性呈黄色，碱性呈红色；硫代硫酸钠可被某些细菌还原为硫化氢，与硫酸亚铁中的铁盐生成黑色硫化铁；氯化钠维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂。
- 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 (CFU)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
麦康凯琼 脂 (MAC)	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢	生长良好, A/A; 产气; 不产硫 化氢	符合
		L 品牌	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢		符合
		H 品牌	/	生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢		符合
	肠炎沙门氏菌 CMCC (B) 50335	逗点	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢	生长良好, K/A; 产气; 产硫化 氢	符合
		L 品牌	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢		符合
		H 品牌	/	生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢		符合
	福氏志贺氏菌 ATCC12022	逗点	/	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢	生长良好, K/A; 不产气; 不产 硫化氢	符合
		L 品牌	/	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢		符合
		H 品牌	/	生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢		符合
	铜绿假单胞菌 ATCC27853	逗点	/	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢	生长良好, K/ K; 不产气; 不 产硫化氢	符合
		L 品牌	/	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢		符合
		H 品牌	/	生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢		符合

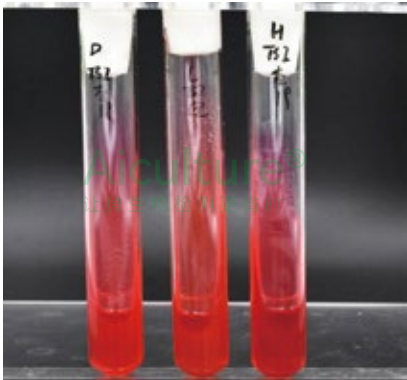
1. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在三糖铁琼脂 (TSI) 上生长良好, A/A; 产气; 不产硫化氢;

2. 肠炎沙门氏菌 CMCC (B) 50335 生长良好, K/A; 产气; 产硫化氢;

3. 福氏志贺氏菌 ATCC12022 生长良好, K/A; 不产气; 不产硫化氢;

4. 铜绿假单胞菌 ATCC27853 生长良好, K/K; 不产气; 不产硫化氢;

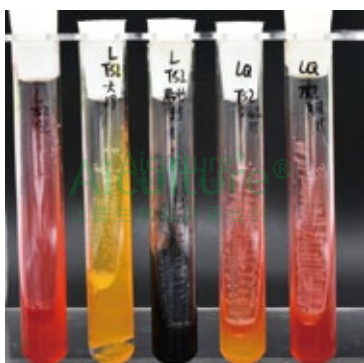
4、典型特征图片：



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。

08 食品微生物副溶血性弧菌检验及注意事项 GB 4789.7-2013

一、副溶血性弧菌的生物学特性

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

流行病学特征

主要存在于温带地区海水、海水沉积物和鱼虾、贝类等海产品中，是沿海国家及地区食品中毒的主要致病菌，主要污染水产制品或交叉污染肉制品等其他食品，人食用这些生、半生或交叉污染的海产品可能导致急性肠胃炎、关节炎等，有时甚至引起原发性败血症。

副溶血性弧菌的检验

二、检验步骤

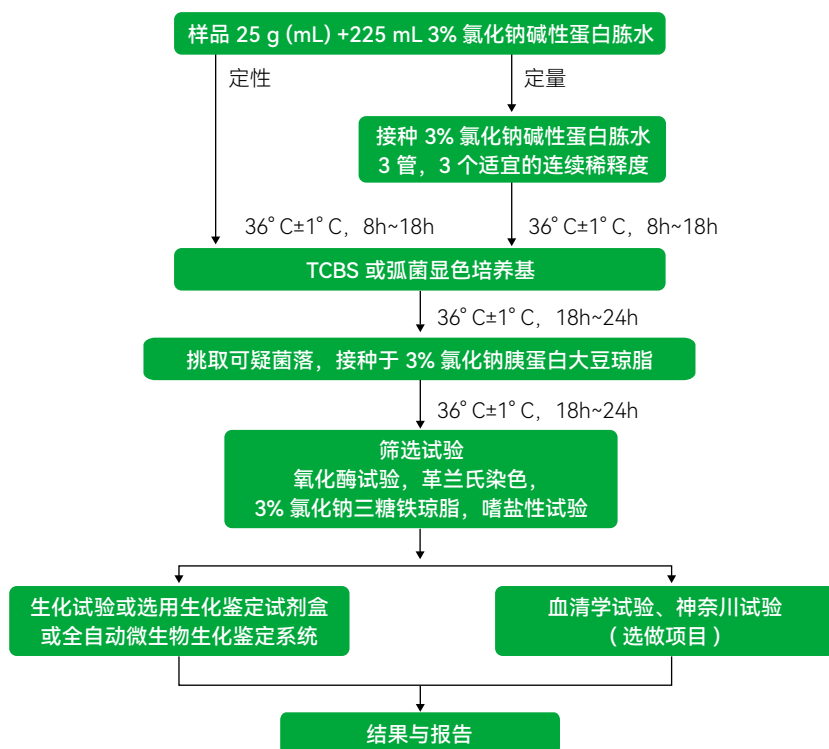


图 1 副溶血性弧菌检验程序



三、操作步骤

3.1 样品制备

3.1.1 非冷冻样品采集后应立即置 7℃~10℃冰箱保存，尽可能及早检验；冷冻样品应在 45℃以下不超过 15 min 或在 2℃~5℃不超过 18 h 解冻。

3.1.2 鱼类和头足类动物取表面组织、肠或鳃。贝类取全部内容物，包括贝肉和体液；甲壳类取整个动物，或者动物的中心部分，包括肠和鳃。如为带壳贝类或甲壳类，则应先在自来水中洗刷外壳并甩干表面水分，然后以无菌操作打开外壳，按上述要求取相应部分。

3.1.3 以无菌操作取样品 25 g (mL)，加入 3% 氯化钠碱性蛋白胨水 225 mL，用旋转刀片式均质器以 8 000 r/min 均质 1 min，或拍击式均质器拍击 2 min，制备成 1:10 的样品匀液。如无均质器，则将样品放入无菌乳钵，自 225 mL 3% 氯化钠碱性蛋白胨水中取少量稀释液加入无菌乳钵，样品磨碎后放入 500 mL 无菌锥形瓶，再用少量稀释液冲洗乳钵中的残留样品 1~2 次，洗液放入锥形瓶，最后将剩余稀释液全部放入锥形瓶，充分振荡，制备 1:10 的样品匀液。

3.2 增菌

3.2.1 定性检测

将 3.1.3 制备的 1:10 样品匀液于 36℃±1℃培养 8 h~18 h。

3.2.2 定量检测

3.2.2.1 用无菌吸管吸取 1:10 样品匀液 1 mL，注入含有 9 mL 3% 氯化钠碱性蛋白胨水的试管内，振摇试管混匀，制备 1:100 的样品匀液。

3.2.2.2 另取 1 mL 无菌吸管，按 5.2.2.1 操作程序，依次制备 10 倍系列稀释样品匀液，每递增稀释一次，换用一支 1 mL 无菌吸管。

3.2.2.3 根据对检样污染情况的估计，选择 3 个适宜的连续稀释度，每个稀释度接种 3 支含有 9 mL 3% 氯化钠碱性蛋白胨水的试管，每管接种 1 mL。置 36℃±1℃恒温箱内，培养 8 h~18 h。

3.3、分离培养：对所有显示生长的增菌液，用接种环在距离液面以下 1cm 内沾取一环增菌液，于 TCBS 平板或弧菌显色培养基平板上划线分离。一支试管划线一块平板。于 36℃±1℃培养 18h~24h。典型的副溶血性弧菌在 TCBS 上呈圆形、半透明、表面光滑的绿色菌落，用接种环轻触，有类似口香糖的质感，直径 2mm~3mm。从培养箱取出 TCBS 平板后，应尽快（不超过 1h）挑取菌落或标记要挑取的菌落。典型的副溶血性弧菌在弧菌显色培养基上的特征按照产品说明进行判定。

3.3.1、氧化酶试验：挑选纯培养的单个菌落进行氧化酶试验，副溶血性弧菌为氧化酶阳性。

3.3.2、涂片镜检：将可疑菌落涂片，进行革兰氏染色，镜检观察形态。副溶血性弧菌为革兰氏阴性，呈棒状、弧状、卵圆状等多形态，无芽胞，有鞭毛。

3.3.3、挑取纯培养的单个可疑菌落，转种 3% 氯化钠三糖铁琼脂斜面并穿刺底层，36℃±1℃培养 24h 观察结果。副溶血性弧菌在 3% 氯化钠三糖铁琼脂中的反应为底层变黄不变黑，无气泡，斜面颜色不变或红色加深，有动力。

3.3.4、嗜盐性试验：挑取纯培养的单个可疑菌落，分别接种 0%、6%、8% 和 10% 不同氯化钠浓度的胰胨水，36℃±1℃培养 24h，观察液体混浊情况。副溶血性弧菌在无氯化钠和 10% 氯化钠的胰胨水中不生长或微弱生长，在 6% 氯化钠和 8% 氯化钠的胰胨水中生长旺盛。继续进行下列有关试验。

3.3.5、生化试验：取纯培养物分别接种含 3% 氯化钠的甘露醇试验培养基、赖氨酸脱羧酶试验培养基、MR-VP 培养基，36℃±1℃培养 24h~48h 后观察结果；3% 氯化钠三糖铁琼脂隔夜培养物进行 ONPG 试验。

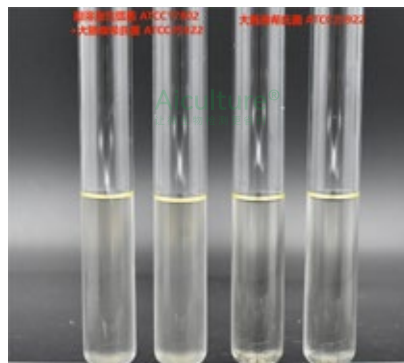
操作注意事项

- 1、样本在收集后应该立即被冷却 (7~10° C)，然后尽快检验，
- 2、带贝壳类或甲壳类样品前处理时，应先在符合生活饮用水卫生标准的流水中洗刷外壳并甩干表面水分，然后以无菌操作打开外壳后取样；
- 3、注意分离时所选增菌液的部位，副溶血性弧菌在 3% 氯化钠碱性蛋白胨水中增菌后呈均匀混浊生长，培养基表面容易形成菌膜，分离时，要求“液面以下 1cm 内”在这个范围内，应该目标菌最多、没有干扰的区域；
- 4、一般样品中含有多种弧菌比较常见，分离时一定要在平板上多级稀释划线，不要一条线划线到底，培养出来发现没有分开。

培养基原理解析

3% 氯化钠碱性蛋白胨水

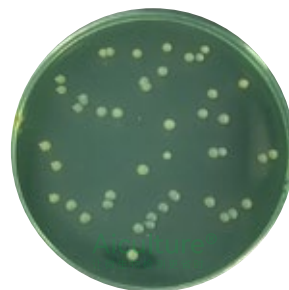
蛋白胨提供碳源、氮源、维生素、生长因子；高含量氯化钠和高 pH 值可以抑制非弧菌类细菌生长，不影响副溶血性弧菌生长。



硫代硫酸盐 - 柠檬酸盐 - 胆盐 - 蔗糖 (TCBS) 琼脂

• 配方中多价蛋白胨、酵母膏粉提供碳氮源、维生素和生长因子；氯化钠可刺激弧菌的生长；蔗糖是可发酵的糖类；胆酸钠、牛胆汁粉、硫代硫酸钠和柠檬酸钠及较高的 pH 可抑制革兰氏阳性菌和大肠菌群；硫代硫酸钠与柠檬酸铁反应作为检测硫化氢产生的指示剂；溴麝香草酚蓝和麝香草酚蓝是 pH 指示剂；琼脂是培养基的凝固剂。

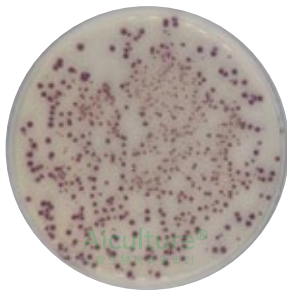
• 副溶血性弧菌不发酵蔗糖，不会使培养基 pH 降低，因而在该培养基上为绿色菌落，创伤和拟态弧菌都不发酵蔗糖，需进一步确证鉴定，霍乱弧菌发酵蔗糖为黄色。



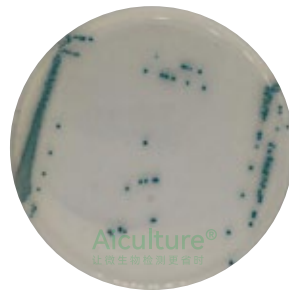
副溶血性弧菌
蓝绿色呈圆形、半透明、表面光滑的
绿色菌落，H₂S 阴性

弧菌显色培养基

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



副溶血性弧菌 ATCC17802



霍乱弧菌 VbO

3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂

• 胰蛋白胨、大豆蛋白胨提供氮源、维生素、生长因子；高含量氯化钠可以抑制非弧菌类细菌生长，不影响副溶血性弧菌生长；琼脂为凝固剂。



副溶血性弧菌 ATCC17802

氧化酶试验

Ø 原理：氧化酶使细胞色素 C 氧化，氧化型细胞色素 C 再氧化对苯二胺试剂形成紫色复合物，产生颜色反应。

操作：滴加 1 滴氧化酶试剂到一小块洁净滤纸上，用玻棒或接种环（铂或塑料）挑取适量新鲜菌苔涂在试剂润湿的纸片上；30 秒内出现蓝紫色为阳性，延迟反应或无颜色变化为阴性

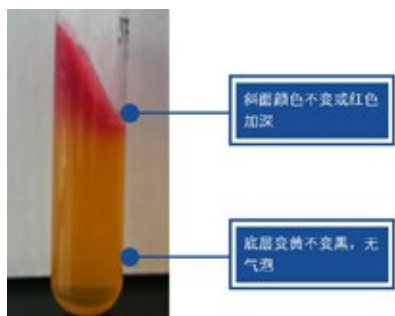


阳性

阴性

3%氯化钠三糖铁琼脂

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



副溶血性弧菌在 3%氯化钠三糖铁琼脂上的特征

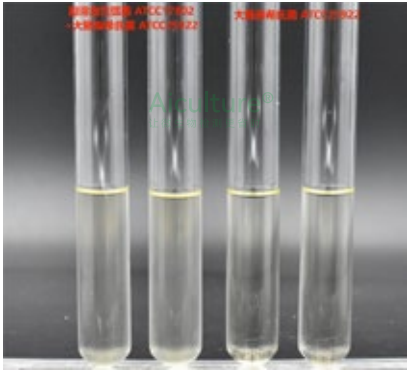
3% 氯化钠碱性蛋白胨水验证

- 1、产品用途：用于副溶血性弧菌增菌培养。
- 2、检验原理：蛋白胨提供碳源、氮源、维生素、生长因子；高含量氯化钠和高 pH 值可以抑制非弧菌类细菌生长，不影响副溶血性弧菌生长。
- 3、3% 氯化钠碱性蛋白胨水验证。

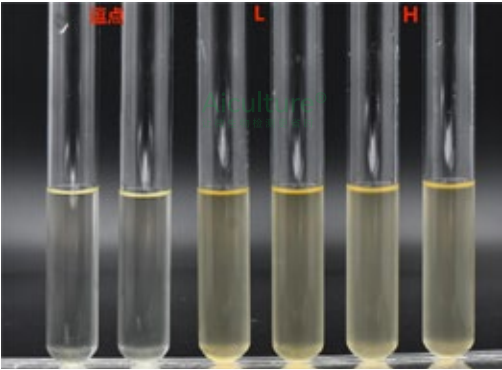


样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计 数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
3% 氯化 钠碱性蛋 白胨水	副溶血性弧菌 ATCC17802 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	113CFU(副溶血性 弧菌 ATCC17802) +2367CFU(大肠埃 希氏菌 ATCC25922)	在弧菌显色培养基平板上 > 10CFU，品红色菌落	在弧菌显色培 养基平板上 > 10CFU，品红 色菌落	符合
		L 品牌	/		在弧菌显色培养基平板上 > 10CFU，品红色菌落		符合
		H 品牌	/		在弧菌显色培养基平板上 > 10CFU，品红色菌落		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	2367CFU	5CFU	在 TSA 上 < 100Cfu	符合
		L 品牌	/		多不可计		不符合
		H 品牌	/		多不可计		不符合
1. 副溶血性弧菌 ATCC17802 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 3% 氯化钠碱性蛋白胨水上的菌落特征：品红色菌落； 2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 3% 氯化钠碱性蛋白胨水上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；							

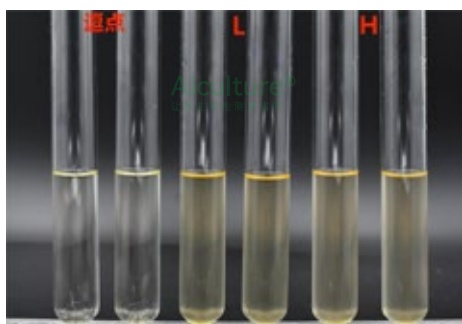
4、典型特征图片：



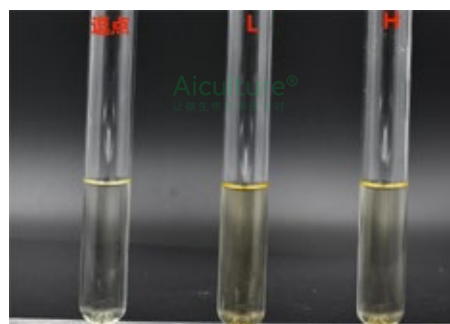
逗点 3% 氯化钠碱性蛋白胨水增菌后现象



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



大肠埃希氏菌 ATCC25922 3% 氯化钠
碱性蛋白胨水竞品比对



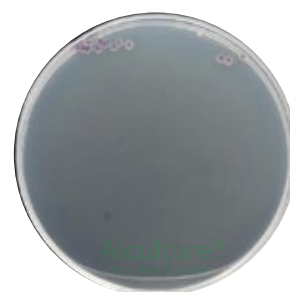
3% 氯化钠碱性蛋白胨水空白竞品比对



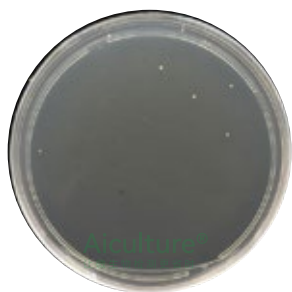
逗点混菌划线弧菌显色板



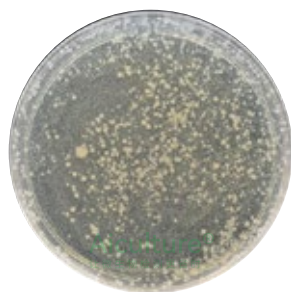
L 品牌混菌划线弧菌显色板



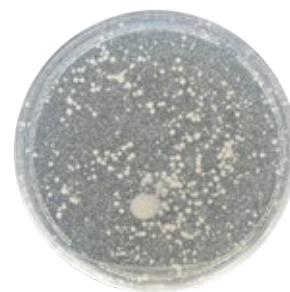
H 品牌混菌划线弧菌显色板



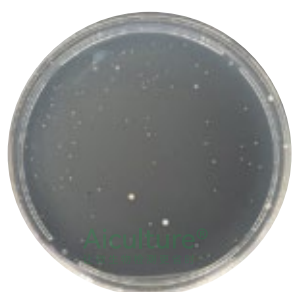
逗点大肠埃希氏菌倾注 TSA



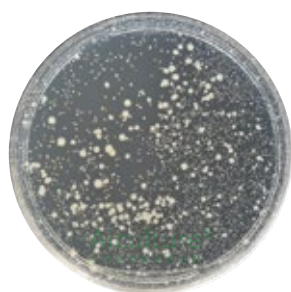
L 品牌大肠埃希氏菌倾注 TSA



H 品牌大肠埃希氏菌倾注 TSA



副溶血性弧菌 ATCC17802 计数 TSA



大肠埃希氏菌 ATCC25922 计数 TSA

5、验证结果小结：

- 1、生长率：目标菌副溶血性弧菌 ATCC17802，L 品牌、H 品牌、逗点均满足国标在弧菌显色培养基平板上 $> 10\text{CFU}$ ，品红色菌落。L 品牌目标菌生长率最好，H 品牌最差，逗点生长率在 L 品牌、H 品牌之间。
- 2、选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点均符合国标在 TSA 上 $< 100\text{CFU}$ 要求，L 品牌、H 品牌不符合国标在 TSA 上 $< 100\text{CFU}$ 要求。

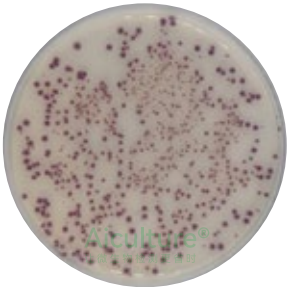
弧菌显色培养基验证



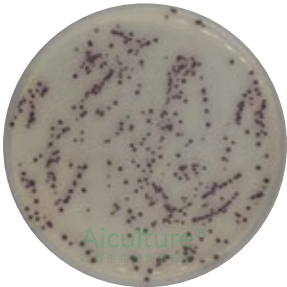
- 1. 产品用途：用于弧菌特别是副溶血性弧菌的分离和初步鉴定。
- 2. 检验原理：蛋白胨和酵母膏粉提供氮源、维生素、氨基酸和碳源；蔗糖为可发酵的糖类；抑菌剂抑制大部分非弧菌细菌，氯化钠可维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂；混合色素与副溶血性弧菌、霍乱弧菌和创伤弧菌所对应的酶发生特异性反应，水解底物，释放出显色基团，在淡黄色平板上产生品红色菌落（副溶血性弧菌）和绿 - 蓝绿色的菌落（霍乱弧菌和创伤弧菌）。
- 3. 弧菌显色培养基验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
弧菌显色培养基	副溶血性弧菌 ATCC17802	逗点	442	308	PR=1.4	PR ≥ 0.5	符合
		H 品牌	389		PR=1.3		符合
	霍乱弧菌 VbO	逗点	/	/	蓝绿色菌落	/	符合
		H 品牌	/	/	蓝色菌落	/	符合
	溶藻弧菌 ATCC33787	逗点	/	/	白色菌落	/	符合
		H 品牌	/	/	无色，不扩散	/	符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		H 品牌	/	/	G=0		符合
1. 逗点副溶血性弧菌 ATCC17802 在弧菌显色板上的菌落特征：呈紫红色菌落，生长良好；H 品牌溶血性弧菌 ATCC17802 在弧菌显色板上的菌落特征：品红色菌落；							
2. 逗点霍乱弧菌 VbO 在弧菌显色板上的菌落特征：蓝绿色菌落；H 品牌霍乱弧菌 VbO 在弧菌显色板上的菌落特征：蓝色菌落；							
3. 逗点溶藻弧菌 ATCC33787 在弧菌显色板上的菌落特征：白色菌落；H 品牌溶藻弧菌 ATCC33787 在弧菌显色板上的菌落特征：无色，不扩散；							
4. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在弧菌显色板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；							

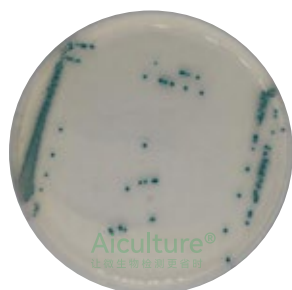
4、典型特征图片：



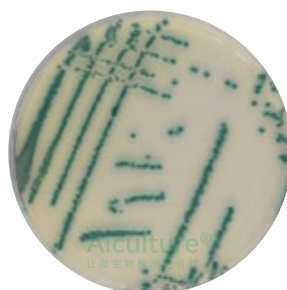
逗点副溶血性弧菌 ATCC17802



H 品牌副溶血性弧菌 ATCC17802



逗点霍乱弧菌 VbO



H 品牌霍乱弧菌 VbO



逗点溶藻弧菌 ATCC33787



H 品牌溶藻弧菌 ATCC33787



逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌黄色葡萄球菌 ATCC6538



逗点弧菌显色培养基空白



H 品牌弧菌显色培养基空白

5、验证结果小结：

1. 生长率：目标菌副溶血性弧菌 ATCC17802、逗点、H 品牌均满足国标 $PR \geq 0.7$ 的要求。H 品牌菌落生长速度更快；
2. 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、H 品牌均满足国标 $G \leq 1$ 的要求；
3. 特异性：霍乱弧菌 VbO、溶藻弧菌 ATCC33787 逗点、H 品牌均满足菌落颜色特征要求
4. 感观：两家平板颜色无显著差异。

3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂培养基验证

- 1. 产品用途：用于副溶血性弧菌的培养。
- 2. 检验原理：胰蛋白胨、大豆蛋白胨提供氮源、维生素、生长因子；高含量氯化钠可以抑制非弧菌类细菌生长，不影响副溶血性弧菌生长；琼脂为凝固剂。
- 3.3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂培养基验证

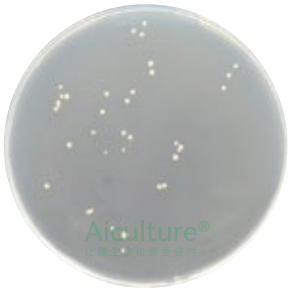


样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计 数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
3% 氯化 钠胰蛋白 胨大豆琼 脂培养基	副溶血性弧菌 ATCC17802	逗点	79	62	PR=1.3	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	44		PR=0.7		符合
		H 品牌	92		PR=1.5		符合
	创伤弧菌落 ATCC 27562	逗点	312	370	PR=0.8	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	490		PR=1.3		符合
		H 品牌	450		PR=1.2		符合
1. 副溶血性弧菌 ATCC17802 在 3%TSA 板上的菌落特征：生长率 PR ≥ 0.7； 2. 创伤弧菌落 ATCC 27562 在 3%TSA 板上的菌落特征：生长率 PR ≥ 0.7；							

4、典型特征图片：



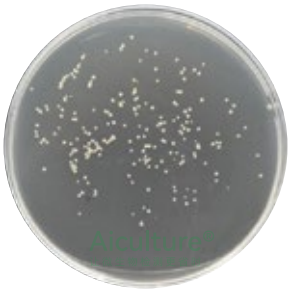
逗点副溶血性弧菌 ATCC17802



L 品牌副溶血性弧菌 ATCC17802



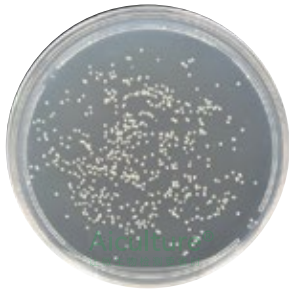
H 品牌副溶血性弧菌 ATCC17802



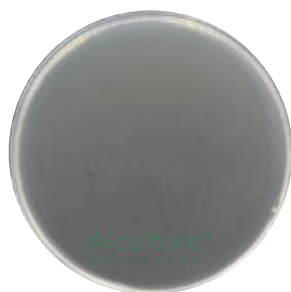
逗点创伤弧菌落 ATCC 27562



L 品牌创伤弧菌落 ATCC 27562



H 品牌创伤弧菌落 ATCC 27562



逗点 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂空白

L 品牌 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂空白

H 品牌 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂空白

5、验证结果小结：

1. 生长率：目标菌副溶血性弧菌 ATCC17802、创伤弧菌落 ATCC 27562，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国 标 $PR \geq 0.7$ 的要求；
2. 感观：三家平板颜色无显著差异。

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。



逗点生物公众号



逗点商城



逗点 1688



逗点锐竞



逗点喀斯玛

WSW-01-002CH

深圳逗点生物技术有限公司

Biocomma Limited

地址：深圳市龙岗区吉华街道甘坑社区甘李六路 12 号中海信创新产业城 12 栋 14 楼 1401-1406

TEL: 400-878-7248 WEB: www.biocomma.cn EMAIL: info@biocomma.com