

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 0169—2010

代替 SN 0169—1992, SN 0333—1994 和 SN/T 1059.2—2002

进出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群 和大肠杆菌检测方法

Determination of coliform, fecal coliform and *Escherichia coli*
in food for import and export

2010-11-01 发布

2011-05-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN 0169—1992《出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检验方法》、SN 0333—1994《出口食品中大肠杆菌(葡萄糖苷酶荧光)检验方法》和 SN/T 1059.2—2002《进出口食品中大肠菌群、大肠杆菌计数滤膜/MUG 法》。

本标准与 SN 0169—1992、SN 0333—1994 和 SN/T 1059.2—2002 相比,主要技术变化如下:

——将原标准名称《出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检验方法》、《出口食品中大肠杆菌(葡萄糖苷酶荧光)检验方法》和《进出口食品中大肠菌群、大肠杆菌计数滤膜/MUG 法》整合修订为《进出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检测方法》;

——SN 0169—1992 标准的范围不变,但 SN 0333—1994 和 SN/T 1059.2—2002 标准的范围有限,因此,本标准将范围进行整合修订;

——增加了规范性引用文件;

——增加了术语和定义;

——在设备和材料中删掉了乳钵和研棒,稀释瓶中增加了“其他适宜的容器”;

——对液体样品 MPN 法的检测修订为:

液体样品接种量 1 mL 以上者,用双料月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤;接种量 1 mL 及 1 mL 以下者,则用单料月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤;

——平板计数法中删去了计算公式;

——MPN 值表增加了“95%置信区间”。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国内蒙古出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:付宝莲、刘中学、侯丽萍、高飞。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN 0169—1992;

——SN 0333—1994;

——SN/T 1059.2—2002。

进出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群 和大肠杆菌检测方法

1 范围

本标准规定了进出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检测方法。

本标准中 MPN 法适用于进出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌的检验；平板计数法适用于进出口食品中大肠菌群的检验； β -葡萄糖苷酶荧光法适用于进出口食品（不包括贝类）中大肠杆菌的检验；滤膜/MUG 法适用于进出口方便面、膨化食品、矿泉水、饮料、牛奶（需用蛋白酶处理）、单晶糖和椒粒中大肠菌群和大肠杆菌的检验。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

SN/T 1538.1 培养基制备指南 第 1 部分：实验室培养基制备质量保证通则

SN/T 1538.2 培养基制备指南 第 2 部分：培养基性能测试实用指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

大肠菌群 *coliform*

需氧及兼性厌氧，能在 37 °C 48 h 分解乳糖产酸产气的一群革兰氏阴性无芽孢杆菌。

3.2

粪大肠菌群 *fecal coliform*

需氧及兼性厌氧，能在 44.5 °C \pm 0.5 °C，24 h 发酵乳糖产酸产气的一群革兰氏阴性无芽孢杆菌，该菌又可称耐热大肠菌群（thermotolerant coliform organisms）。

3.3

大肠杆菌 *Escherichia coli*

需氧及兼性厌氧，能在 44.5 °C \pm 0.5 °C 48 h 分解乳糖产酸产气，生化特征“IMViC”为“++--或-+-”的一群革兰氏阴性无芽孢杆菌。该菌又可称大肠埃希氏菌。

4 检验方法

4.1 原理

4.1.1 最可能近似值（most probable number, 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大肠菌群、粪大肠菌群或大肠杆菌在

待测样品中的最大可能数。

4.1.2 平板计数法

大肠菌群在固体培养基中发酵乳糖产酸,在指示剂的作用下形成可计数的红色或紫色,带有或不带有沉淀环的菌落。

4.1.3 β -葡萄糖苷酶荧光法

大肠杆菌中的 β -葡萄糖苷酶可降解培养基中 4-甲基伞形酮- β -D 葡萄糖苷酸(MUG),并释放 4-甲基伞形酮荧光物质(4-MU),该物质在紫外灯(波长 366 nm)下会显现蓝色荧光特点。

4.1.4 滤膜/MUG 法

待测样品通过滤膜过滤时,样品中的大肠菌群和大肠杆菌被截留于滤膜表面。将滤膜贴附于 LMG 或 BMA 琼脂上培养后,大肠菌群在 LMG 琼脂上会形成蓝色菌落;而 BMA 琼脂上的大肠杆菌由于葡萄糖苷降解 4-甲基伞形酮- β -D 葡萄糖苷酸(MUG)并释放 4-甲基伞形酮,形成紫外光(366 nm)下为蓝白色荧光的菌落。

4.2 培养基与试剂

- 4.2.1 生理盐水:见附录 A.1。
- 4.2.2 Butterfield 氏磷酸盐缓冲稀释液:见附录 A.2。
- 4.2.3 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤(LST):见附录 A.3。
- 4.2.4 煌绿乳糖胆盐肉汤(BGLB):见附录 A.4。
- 4.2.5 大肠杆菌肉汤(EC):见附录第 A.5。
- 4.2.6 伊红美蓝琼脂(EMB):见附录 A.6。
- 4.2.7 结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA):见附录 A.7。
- 4.2.8 月桂基硫酸盐胰蛋白胨 MUG 肉汤(LST-MUG):见附录 A.8。
- 4.2.9 Columbia-MUG:见附录 A.9。
- 4.2.10 蛋白胨-吐温 80 稀释液(PT):见附录 A.10。
- 4.2.11 乳糖莫能菌素葡萄糖酸琼脂(LMG):见附录 A.11。
- 4.2.12 缓冲 MUG 琼脂(BMA):见附录 A.12。
- 4.2.13 三(羟甲基)胺甲烷(Tris)缓冲剂:见附录 A.13。
- 4.2.14 营养琼脂斜面:见附录 A.14。
- 4.2.15 色氨酸肉汤:见附录 A.15。
- 4.2.16 MR-VP 培养基:见附录 A.16。
- 4.2.17 Korser 氏枸橼酸盐肉汤:见附录 A.17。
- 4.2.18 Kovacs 氏靛基质试剂:见附录 A.18。
- 4.2.19 甲基红指示剂:见附录 A.19。
- 4.2.20 VP 试剂(VP):见附录 A.20。
- 4.2.21 革兰氏染色液:见附录 A.21。
- 4.2.22 胰蛋白酶贮存液:见附录 A.22。

4.3 设备与材料

- 4.3.1 培养箱: $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $44.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.3.2 水浴箱: $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $44.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

- 4.3.3 冰箱:0℃~5℃和-15℃~-20℃。
- 4.3.4 均质器:涡旋式或拍击式。
- 4.3.5 吸管:1 mL,具0.1 mL刻度;5 mL和10 mL,具1 mL刻度。
- 4.3.6 平皿:直径90 mm。
- 4.3.7 试管:16 mm×160 mm。
- 4.3.8 稀释瓶:三角烧瓶、广口瓶或其他适宜的容器。
- 4.3.9 玻璃小倒管:长度约20 mm。
- 4.3.10 天平:感量0.1 g。
- 4.3.11 显微镜。
- 4.3.12 菌落计数器。
- 4.3.13 滤器:备预滤器。
- 4.3.14 滤膜:有机或水相,孔径0.45 μm。
- 4.3.15 真空泵。
- 4.3.16 紫外灯:波长366 nm。

4.4 样品制备

4.4.1 固体或半固体样品

无菌操作称取样品25 g置于装有225 mL灭菌稀释剂(4.2.1/4.2.2)的适宜容器中,充分振摇、混匀。或将剪碎后的试样25 g置于灭菌的均质杯/袋内,加入225 mL灭菌稀释剂,以8 000 r/min~10 000 r/min涡旋式均质1 min,或以6次/s~9次/s拍击式均质1 min,制成1:10的样品稀释液备用。

4.4.2 液体样品

以无菌吸管吸取样品25 mL置于装有225 mL灭菌稀释剂的适宜容器中,以30 cm幅度于7 s内振摇25次或机械振荡器中振摇。制成1:10的样品稀释液备用。

4.4.3 样品稀释

样品稀释液的pH值应在6.5~7.5之间,pH值过低或过高时可分别用1 mol/L氢氧化钠或1 mol/L盐酸予以调节。根据对样品污染情况的估计,将4.4.1或4.4.2制成的1:10样品稀释液用9 mL灭菌稀释剂进行系列十倍递增稀释,如 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ……,直至最高稀释度的检测结果达到阴性终点。每一稀释度换用1支1 mL无菌吸管或移液器吸头,上一稀释度用的吸管或吸头不要触及下一稀释度的稀释液。从制备样品稀释液至稀释完毕,全过程不得超过15 min。

4.4.4 样品的酶处理

4.4.4.1 一般要求

样品的酶处理可在室温下(23℃~27℃)进行。

4.4.4.2 固体或半固体样品

无菌操作称取样品25 g置于装有225 mL灭菌PT稀释液(4.2.10)的适宜容器中,充分振摇、混匀。或将剪碎后的试样25 g置于灭菌的均质杯/袋内,加入225 mL灭菌稀释剂,以8 000 r/min~10 000 r/min涡旋式均质1 min,或以6次/s~9次/s拍击式均质1 min,制成1:10的样品稀释液备用。

4.4.4.3 液体样品

以无菌吸管吸取样品 25 mL 置于装有 225 mL 灭菌 PT 稀释液的适宜容器中,以 30 cm 幅度于 7 s 内振摇 25 次或机械振荡器中振摇。制成 1:10 的样品稀释液备用。

4.4.4.4 样品稀释

取 1:10 的酶 PT 稀释液(胰蛋白酶贮存液:PT 稀释液)10 mL 于 4.4.4.1 或 4.4.4.2 制成的 1:10 样品稀释液中并混匀,置于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中处理 20 min~30 min 后,将制成的 1:10 样品酶处理稀释液用 9 mL 灭菌 PT 稀释液进行系列十倍递增稀释,如 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ……,直至最高稀释度的检测结果达到阴性终点。每一稀释度换用 1 支 1 mL 无菌吸管或移液器吸头,上一稀释度用的吸管或吸头不要触及下一稀释度的稀释液。从制备样品稀释液至稀释完毕,全过程不得超过 45 min。

4.4.4.5 样品过滤

将灭菌过滤装置连接于真空抽滤瓶上,以无菌操作将无菌滤膜放在抽滤底座上并固定。无菌操作加入 10 mL~20 mL 无菌蒸馏水于滤器中,打开真空泵,抽吸过滤,再从 4.4.4.4 中选取适宜的三个连续稀释度的样品稀释液,每个稀释度分别过滤,每次 10 mL。最后再加入 10 mL~15 mL 无菌蒸馏水,抽吸过滤后,关闭真空泵,用无菌镊子将滤膜取出于 4.5.3 中备用。

4.5 大肠菌群的测定

4.5.1 MPN 法

4.5.1.1 从 4.4.3 中选择适宜的三个连续稀释度的样品稀释液,每个稀释度均接种三管月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤,每管接种 1 mL。液体样品接种量 1 mL 以上者,用双料月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤;接种量 1 mL 及 1 mL 以下者,则用单料月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤。 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~48 h 后,观察倒管内是否有气泡产生,并记录 24 h 和 48 h 内产气的 LST 肉汤管数。对未产气管有疑问时,可以轻敲试管壁的方式观察是否有较细小的气泡从管底逸出,如所有 LST 肉汤管均未产气,可按 4.8.1 报告结果;如 LST 肉汤管有产气,则按 4.5.1.2 作证实试验。

4.5.1.2 证实试验。用直径 3 mm 的接种环从 4.5.1.1 中所有 24 h 和 48 h 内发酵产气的 LST 肉汤管中分别挑取培养液 1 环,分别移种于煌绿乳糖胆盐(BGLB)肉汤管中,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$,记录所有 BGLB 肉汤管的产气管数,根据 BGLB 肉汤的产气管数查 MPN 表(见附录 B.1)并按 4.8.1 报告结果。

4.5.2 平板计数法

4.5.2.1 从 4.4.3 中选取适宜的三个连续稀释度的样品稀释液,每个稀释度接种两个灭菌平皿,每皿 1 mL。另取 1 mL 稀释剂加入一灭菌平皿中,作空白对照。将冷至 $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)约 15 mL 倾注于每个平皿中,小心旋转平皿,使培养基与样液充分混匀。待琼脂凝固后,再加 3 mL~4 mL 的 VRBA 均匀覆盖于平板表层,凝固后翻转平皿, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

4.5.2.2 选取菌落数在 25 个~250 个之间的平板,计数平板上出现的典型大肠菌群菌落。典型大肠菌群菌落为紫红色,菌落周围有红色的胆盐沉淀环,菌落直径约 0.5 mm 或更大。典型和可疑菌落按 4.5.2.3 作证实试验。

4.5.2.3 证实试验。用接种环从 VRBA 平板上挑取 10 个不同类型的典型或可疑菌落,移种于 BGLB 肉汤管内, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~48 h 后观察产气情况。对 BGLB 肉汤产气者按 4.5.2.4 计算;对形成

菌膜的阳性管则应进行革兰氏染色,以便排除革兰氏阳性杆菌。

4.5.2.4 将 4.5.2.3 中证实为大肠菌群阳性的菌落数相加,再乘以稀释倍数,按 4.8.2 报告结果。

4.5.3 滤膜/MUG 法

以无菌操作将 4.4.4.5 样品过滤后的滤膜贴放于预先干燥的 LMG 琼脂平板表面上,滤膜与琼脂表面之间应无气泡。于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 后,选取菌落数在 25 个~250 个之间的平板,计数所有蓝色(包括深蓝或浅蓝色)菌落。将滤膜上的菌落数相加,再乘以其稀释倍数,按 4.8.4 报告结果。

4.6 粪大肠菌群 MPN 法的测定

用直径为 3 mm 的接种环从 4.5.1.1 中所有 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 内发酵产气的 LST 肉汤管中分别挑取培养液 1 环,转种于 EC 肉汤管中并放置于带盖的 $44.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱内,培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。水浴箱的水平面应高于肉汤培养基液面。记录 EC 肉汤管的产气情况,产气管为粪大肠菌群阳性;不产气为粪大肠菌群阴性。根据粪大肠菌群的阳性管数查 MPN 表(见附录 B.1)并按 4.8.1 报告结果。

4.7 大肠杆菌的测定

4.7.1 MPN 法

4.7.1.1 培养

将 4.6 中 EC 肉汤管在 $44.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱内继续培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 后,从产气管中挑取培养液划线接种于伊红美蓝(EMB)平板, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。

4.7.1.2 检查

检查平板上有无黑色中心、有光泽或无光泽的可疑菌落。用接种针蘸取菌落中心部位并转种于营养琼脂斜面上, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $18\text{ h}\sim 24\text{ h}$ 。

4.7.1.3 试验

4.7.1.3.1 将营养琼脂斜面培养物转种于下列生化培养基中进行试验。

4.7.1.3.2 色氨酸肉汤: $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 后,加 Kovacs 氏试剂 0.2 mL~0.3 mL,上层出现红色者为靛基质试验阳性。

4.7.1.3.3 MR-VP 培养基: $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 后,无菌操作移取培养物 1 mL 至 $13\text{ mm}\times 100\text{ mm}$ 试管中,加 5% α -萘酚乙醇溶液 0.6 mL,40%氢氧化钾溶液 0.2 mL 和少许肌酸结晶,振摇试管后静置 2 h,如出现伊红色,为 VP 试验阳性。将 MR-VP 培养物的剩余部分继续培养 48 h 后滴加 5 滴甲基红溶液,如培养物变红则表示甲基红试验阳性;若变黄则甲基红试验阴性。

4.7.1.3.4 Kovser 氏柠檬酸盐肉汤: $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 96 h 后,观察其生长情况。

4.7.1.3.5 LST 肉汤: $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 后,观察其产气情况。

4.7.1.3.6 革兰氏染色:取营养琼脂斜面培养物进行革兰氏染色。大肠杆菌为革兰氏阴性无芽孢杆菌。

4.7.1.3.7 大肠杆菌和非大肠杆菌生化鉴别如下表 1,如出现表中以外的生化反应类型,表明培养物可能不纯,应重新划线分离,必要时做重复试验。

表 1 大肠杆菌和非大肠杆菌生化鉴别表

靛基质	MR	VP	柠檬酸盐	鉴定(型别)
+	+	-	-	典型大肠杆菌
-	+	-	-	非典型大肠杆菌
+	+	-	+	典型中间型
-	+	-	+	非典型中间型
-	-	+	+	典型产气肠杆菌
+	-	+	+	非典型产气肠杆菌

4.7.1.3.8 大肠杆菌为革兰氏阴性无芽孢杆菌,发酵乳糖产酸产气,IMViC 试验为++--或-+-+。根据 LST 肉汤阳性管数查 MPN 表(见附录 B.1)并按 4.8.1 报告结果。

4.7.2 β -葡萄糖苷酶荧光法

4.7.2.1 从 4.4.3 中选择适宜的三个连续稀释度的样品稀释液,每个稀释度均接种三管 LST-MUG 肉汤,每管 1 mL。于 30 min 内置于 36 °C ± 1 °C 水浴或培养箱内培养 24 h ± 2 h。将培养后的 LST-MUG 肉汤管拿至暗室,在长波紫外光灯(波长 366 nm)下观察。产气显蓝色荧光的为大肠杆菌阳性;产气不显蓝色荧光的按 4.7.2.2 作证实试验。

4.7.2.2 证实试验:从 4.7.2.1 中产气不显蓝色荧光的 LST-MUG 肉汤管中挑取培养物,划线接种于 Columbia-MUG 琼脂平板,于 36 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h。将培养后的 Columbia-MUG 平板拿至暗室,在长波紫外光灯(波长 366 nm)下观察,凡显蓝色荧光的菌落均为大肠杆菌阳性菌落。

4.7.2.3 根据 4.7.2.1 中 LST-MUG 肉汤阳性管数,和 4.7.2.2 中 Columbia-MUG 琼脂平板证实为大肠杆菌阳性的 LST-MUG 肉汤阳性管数查 MPN 表(见附录 B.1)并按 4.8.3 报告结果。

4.7.3 滤膜/MUG 法

以无菌操作将 4.4.4.5 样品过滤后的滤膜贴放于预先干燥的 BMA 琼脂平板表面上,滤膜与琼脂表面之间应无气泡。放入 36 °C ± 1 °C 培养箱中培养 2 h,在暗室或紫外操作室内用波长 366 nm UV 灯观察滤膜上的菌落是否有蓝白色荧光。选用菌落数范围在 25 个~250 个之间的平板,计算蓝白色荧光的菌落数并相加,再乘以其稀释倍数后,按 4.8.4 报告结果。

4.8 报告结果

4.8.1 MPN 法

每克(毫升)样品中大肠菌群、粪大肠菌群或大肠杆菌的 MPN 值(MPN/g 或 MPN/mL)。

4.8.2 平板计数法

每克(毫升)样品中大肠菌群数(CFU/g 或 CFU/mL)。

4.8.3 葡萄糖苷酶荧光法

每克(毫升)样品中大肠杆菌的 MPN 值(MPN/g 或 MPN/mL)。

4.8.4 滤膜/MUG 法

每克(毫升)样品中大肠菌群或大肠杆菌数(CFU/g 或 CFU/mL)。

附 录 A
(规范性附录)
培养基与试剂

A.1 一般要求

为保证培养基的质量,应按 SN/T 1538.1 和 SN/T 1538.2 进行培养基的制备与性能测试。若使用商售的脱水合成培养基,应选用通过 ISO 9000 质量体系认证的国内外生产厂商的产品并按其说明进行制备和使用。

A.2 生理盐水

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

将氯化钠溶于蒸馏水中,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.3 Butterfield 氏磷酸盐缓冲稀释液

A.3.1 贮存液

磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	34.0 g
蒸馏水	500.0 mL

将磷酸二氢钾溶于蒸馏水中,用 1 mol/L 氢氧化钠约 175 mL 调至 pH 7.2。用蒸馏水加至 1 000 mL 贮存于冰箱。

A.3.2 稀释液

取贮存液 1.25 mL,用蒸馏水稀释至 1 000 mL,分装于合适的容器后,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.4 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤(LST)

胰蛋白胨或胰酪胨(Trypticase)	20 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	2.75 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	2.75 g
月桂基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000.0 mL

将各成分溶解于蒸馏水中。分装到有倒立发酵管的 20 mm×150 mm 试管中,每管 10 mL。121 °C 高压灭菌 15 min。最终 pH 6.8±0.2。双料培养基除蒸馏水不变外,其余成分加倍。

A.5 煌绿乳糖胆盐肉汤(BGLB)

蛋白胨	10.0 g
乳糖	10.0 g
牛胆粉(oxgall 或 oxbile)溶液	200.0 mL
0.1%煌绿水溶液	13.3 mL
蒸馏水	1 000.0 mL

将蛋白胨乳糖溶于约 500 mL 蒸馏水中,加入牛胆粉溶液 200 mL(将 20.0 g 脱水牛胆粉溶于 200 mL 蒸馏水中),用蒸馏水稀释到 975 mL,调 pH 7.4。再加入 0.1%煌绿水溶液 13.3 mL,用蒸馏水补足到 1 000 mL,用棉花过滤后,分装到 20 mm×150 mm 试管(管内有倒立的小发酵管)中,每管 10 mL。121 °C 高压灭菌 15 min。最终 pH 7.2±0.1。

A.6 EC 肉汤

胰蛋白胨或胰酪胨	20.0 g
3 号胆盐或混合胆盐	1.5 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	4.0 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	1.5 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

将以上成分溶解于蒸馏水中,分装 16 mm×150 mm 试管(管内有倒立的小发酵管),每管 8 mL。121 °C 高压灭菌 15 min,最终 pH 6.9±0.1。

A.7 伊红美蓝琼脂(EMB)

蛋白胨	10.0 g
乳糖	10.0 g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	2.0 g
琼脂	15.0 g
伊红(水溶性)	0.4 g 或 2%水溶液 20 mL
美蓝	0.065 g 或 0.5%水溶液 13 mL
蒸馏水	1 000.0 mL

在 1 000 mL 蒸馏水中煮沸溶解蛋白胨、磷酸盐和琼脂,加水补足至原量。分装于三角烧瓶中。每瓶 100 mL 或 200 mL,121 °C 高压灭菌 15 min。最终 pH 7.1±0.2。使用前将琼脂融化,于每 100 mL 琼脂中加 5 mL 灭菌的 20%乳糖水溶液、2 mL 2%伊红水溶液和 1.3 mL 0.5%美蓝水溶液,摇匀,冷至 45 °C~50 °C 倾注平皿。

A.8 结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)

蛋白胨	7.0 g
酵母膏	3.0 g

乳糖	10.0 g
氯化钠	5.0 g
胆盐或 3 号胆盐	1.5 g
中性红	0.03 g
结晶紫	0.002 g
琼脂	15.0 g~18.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

无需高压灭菌。将上述成分溶于蒸馏水中,静置几分钟,充分搅拌,调至 pH 7.4±0.1。煮沸 2 min,将培养基冷至 45℃~50℃倾注平板。临用时制备,不得超过 3 h。

A.9 LST-MUG 肉汤

胰蛋白胨或胰酪胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	2.75 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	2.75 g
月桂基硫酸钠	0.1 g
MUG	0.1 g
蒸馏水	1 000.0 mL

将各成分溶于蒸馏水中,分装试管(内装倒立小发酵管),每管 10 mL。121℃高压灭菌 15 min。最终 pH 6.8±0.2。

A.10 Columbia-MUG 琼脂培养基

胰酪胨	13.0 g
水解蛋白	6.0 g
酵母浸膏	3.0 g
牛肉浸膏	3.0 g
可溶性淀粉	1.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	13.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

将各成分溶于水中,无需调 pH 值。121℃高压灭菌 15 min。冷却至 55℃~60℃,倾注平板。

A.11 蛋白胨-吐温 80 稀释液(PT)

蛋白胨	1.0 g
吐温 80	10.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

将上述成分加热溶解分装 90 mL 于三角瓶中,121℃高压灭菌 15 min。

A. 12 乳糖莫能霉素葡萄糖醛酸琼脂(LMG)

胰蛋白胨	10.0 g
蛋白胨	5.0 g
酵母膏	3.0 g
乳糖	12.5 g
莫能霉素	0.038 g(于 95%酒精 10 mL 溶解)
苯胺蓝	0.1 g
葡萄糖醛酸钠盐	0.5 g
硫酸十七烷基钠盐	0.25 mL
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

无需高压灭菌。加热煮沸,温度冷至 45 °C~50 °C 无菌操作,调整 pH 最终为 7.2±0.1。倾注平板,打开皿盖在 35 °C±1 °C 温箱,15 min~20 min 烘干备用。

A. 13 缓冲 MUG 琼脂(BMA)

磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	8.23 g
磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)	1.20 g
4-甲基伞形酮- β -D 葡萄糖苷酸(MUG)	0.1 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

溶解加热煮沸,调整 pH 7.2~7.6,121 °C 高压灭菌 15 min。温度冷至 45 °C~50 °C,倾注平板。

A. 14 Tris 缓冲剂(1.0 mol/L)

溶解 121.1 g 三(羧甲基)胺甲烷于 500 mL 水中,用浓盐酸调节溶液至所需 pH 值。用水稀释至 1 L。于 4 °C~6 °C 保存。

A. 15 营养琼脂斜面

牛肉膏	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

将各成分于蒸馏水中煮沸溶解。分装合适的试管。121 °C 高压灭菌 15 min。最终 pH 7.3±0.1。灭菌后摆成斜面备用。

A. 16 色氨酸肉汤

胰胨或胰酪胨	10.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

加热搅拌溶解胰胨或胰酪胨于蒸馏水中。分装试管,每管 5 mL。121 °C 高压灭菌 15 min。最终 pH 6.9 ± 0.2 。

A. 17 MR-VP 培养基

胨	7.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	5.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

将各成分溶于蒸馏水中,分装试管,121 °C 高压灭菌 15 min,最终 pH 6.9 ± 0.2 。

A. 18 Koser 氏柠檬酸盐肉汤

磷酸氢铵钠($NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$)	1.5 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	1.0 g
硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2 g
柠檬酸钠(含 $2H_2O$)	3.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

将各成分溶解于蒸馏水中,分装试管,每管 10 mL,121 °C 高压灭菌 15 min。最终 pH 6.7 ± 0.2 。

A. 19 Kovacs 氏靛基质试剂

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

将对二甲氨基苯甲醛溶于戊醇中,然后慢慢加入浓盐酸即可。

A. 20 甲基红指示剂

甲基红	0.1 g
95%乙醇	300 mL

将甲基红溶解于 300 mL 乙醇中,加水稀释至 500 mL。

A. 21 Voges-Proskauer(V-P)试剂

甲液	
α -萘酚	5.0 g
无水乙醇	100.0 mL
乙液	
氢氧化钾	40.0 g

用蒸馏水加至 100.0 mL。

A.22 革兰氏染色液

A.22.1 结晶紫染色液

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

将结晶紫完全溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

A.22.2 革兰氏碘液

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL

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

A.22.3 沙黄复染液

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.22.4 染色步骤

染色步骤如下:

- 将涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染液 1 min 后水洗;
- 滴加革兰氏碘液作用 1 min 后水洗;
- 滴加 95%乙醇脱色约 15 s~30 s,直至染色液被洗掉,但不要过分脱色,水洗;
- 滴加复染液复染 1 min 后水洗、待干、镜检。

A.22.5 结果

革兰氏阳性菌呈紫色,革兰氏阴性菌呈红色。

A.23 胰蛋白酶贮存液

用 Tris 缓冲稀释剂 10 g 胰蛋白酶(Doifco No. 0153 或等效品)至 100 mL,pH 7.6. 如需要加热至 35 °C 以助溶,通过滤纸(Whatman No. 1 或等效品)过滤以除去不溶物质,再用 0.45 μm 滤膜过滤除菌。于 4 °C~6 °C 保存 1 周或-18 °C 保存 3 个月。

附录 B

(规范性附录)

检样中最大可能数(MPN)表

表 B.1 1 g(mL) 检样中最大可能数(MPN)

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		低	高	0.10	0.01	0.001		低	高
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[0.1 g(mL)、0.01 g(mL)和 0.001 g(mL)],每个稀释度接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1 g(mL)、0.1 g(mL)和 0.01 g(mL)时,表内数字应相应降低 10 倍;如改用 0.01 g(mL)、0.001 g(mL)和 0.000 1 g(mL)时,表内数字则应相应增加 10 倍,其余类推。

注 3: 采用三管法,接种量分别为 0.1 g(mL)、0.01 g(mL)、0.001 g(mL)。