

1 主题内容与适用范围

本标准规定了出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌的检验方法。

本标准适用于出口食品的检验。

2 设备和材料

- 2.1 吸管：1mL，具0.1mL刻度；5mL和10mL，具1mL刻度。
- 2.2 水浴箱：44.5±0.5℃。
- 2.3 培养箱：36±1℃，44.5±0.5℃。
- 2.4 冰箱：0～5℃和-15～-20℃。
- 2.5 均质器。
- 2.6乳钵和研棒。
- 2.7 平皿：直径90mm。
- 2.8天平：感量0.1g。
- 2.9 显微镜。
- 2.10 稀释瓶：100mL、200mL和500mL三角烧瓶及广口瓶。
- 2.11 玻璃珠：直径约5mm。
- 2.12菌落计数器。

3 培养基及试剂

- 3.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤。
- 3.2 煌绿乳糖胆盐(BGLB)肉汤。
- 3.3 EC肉汤。
- 3.4 伊红美蓝琼脂(EMB)。
- 3.5营养琼脂斜面。
- 3.6 色氨酸肉汤。
- 3.7 MR—VP培养基。
- 3.8 Koser氏枸橼酸盐肉汤。
- 3.9 结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)。
- 3.10 Butterfield氏磷酸盐缓冲稀释液。
- 3.11 生理盐水。
- 3.12 革兰氏染色液。
- 3.13 Kovacs氏靛基质试剂。
- 3.14 甲基红指示剂。
- 3.15 Voges—proskauer(V—P)试剂。

4 样品制备

4.1 以无菌操作取有代表性的样品。如有包装则用75%乙醇在开口处擦拭后取样。若不能及时检验，应将冷冻样品置于-15℃保存；非冷冻而易腐的食品，应置于4℃冰箱保存。检验前冷冻样品可于2—5℃18h内解冻，或在45℃以下15min内解冻。

- 4.2 不同食品样品匀液的制备

- 4.2.1 液体食品

以灭菌吸管取25mL放入装有225mL稀释剂的灭菌玻璃瓶(瓶内预置适当数量的玻璃珠)，以30cm幅度、于7s内振摇25次(或以机械振荡器振荡)，制成1：10的样品匀液。

- 4.2.2 固体和半固体食品

以无菌操作取25g样品，放入装有225mL稀释剂的灭菌均质瓶内，于8000r/min均质1～2min，制成1：10样品匀液(也可用灭菌乳钵研磨的方法代替)。

4.3 稀释样品匀液根据对样品污染情况的估计，用稀释剂将样品匀液制成一系列十倍递增的样品稀释液，如10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、………。从制备样品匀液至稀释完毕，全过程不得超过15min。

5 大肠菌群的测定

- 5.1 大肠菌群MPN值的测定

- 5.1.1 对每个样品，选择适宜的三个连续稀释度的样品稀释液。每个稀释度接种三管月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤，每管接种1mL。

- 5.1.2 将接种管置于36±1℃培养48±2h。

5.1.3 观察试管的产气情况：检查倒管内是否有气泡产生，记录在24h和48h内产气的LST肉汤管数。如所有LST肉汤管均未产气，则可报告为大肠菌群阴性；如有产气者，则进一步作证实试验。

- 5.2 大肠菌群的证实试验

- 5.2.1 将所有产气管用直径为3mm的接种环移种到煌绿乳糖胆盐(BGLB)肉汤管中。

- 5.2.2 置BGLB肉汤管于36±1℃培养48±2h。

- 5.2.3 记录所有BGLB肉汤管的产气管数。

- 5.2.4 结果报告：按BGLB肉汤产气管数，查MPN表(见附录B(补充件))报告每克(毫升)样品中大肠菌群的MPN值。

6 粪大肠菌群测定

- 6.1 用直径为3mm的接种环将所有48±2h内产气的LST肉汤管培养物移种于EC肉汤管中。

6.2 将所有接种的EC肉汤管在30min内放入带盖44.5±0.5℃水浴箱内，培养24±2h。水浴箱的水平面应高于肉汤培养基液面。应以已知为4.5℃产气阳性的大肠杆菌和4.5℃不产气的产气肠杆菌或其他大肠菌群细菌作阳性和阴性对照。

- 6.3 记录EC肉汤管的产气情况。产气管为粪大肠菌群试验阳性；不产气管为粪大肠菌群试验阴性。

- 6.4 结果报告：按产气管数，查MPN表报告每克(毫升)样品中粪大肠菌群的MPN值。

7 大肠杆菌测定

- 7.1 将6.3条中的EC肉汤管继续培养24h，取其产气管的培养物划线接种于伊红美蓝(EMB)平板，36±1℃培养24±2h。

- 7.2 检查平板上有无具黑色中心有光泽或无光泽的典型菌落。

7.3 如有典型菌落，则从每个平板上至少挑取2个典型菌落；如无典型菌落，则从每个平板上至少挑取2个可疑菌落。用接种针接触菌落中心部位，移种到营养琼脂斜面上，36±1℃培养18～24h。

- 7.4 将斜面培养物移种到下列培养基中进行生化试验。

- 7.4.1 色氨酸肉汤：在36±1℃培养24±2h后，加Kovacs试剂0.2～0.3mL，上层出现红色为靛基质阳性反应。

7.4.2 MR—VP培养基：在36±1℃培养48±2h。以无菌操作移取培养物1mL至13mm×100mm试管中，加5%α-萘酚乙醇溶液0.6mL，40%氢氧化钾溶液0.2mL和少许肌酸结晶，振荡试管后静置2h，如出现伊红色，为VP试验阳性。

将MR—VP培养物的剩余部分再培养48h滴加5滴甲基红溶液。如培养物变红色，为甲基红试验阳性，若变黄色则为阴性反应。

- 7.4.3 Koser氏枸橼酸盐肉汤：于36±1℃培养96h记录有无生长。

- 7.4.4 LST肉汤：于30±1℃培养48±2h，观察试管中是否产气。

- 7.4.5 革兰氏染色：取18h营养琼脂斜面培养物作革兰氏染色。大肠杆菌为革兰氏阴性。

- 7.4.6 大肠杆菌与非大肠杆菌生化鉴别如下：

脲基质	MR	VP	枸橼酸盐	鉴定(类型)
+	+	-	-	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

如出现上表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。

7.5 结果报告：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+-+，再根据LST肉汤阳性管数查MPN表，报告每克(毫升)样品中大肠杆菌MPN值。

8 大肠菌群固体培养基测定法

- 8.1 样品制备同第4章。

- 8.2 计数

- 8.2.1 选取适宜的三个连续稀释度的样品液，每个稀释度接种两个灭菌平皿，每皿1mL。另取1mL稀释剂加入一个灭菌平皿中，作空白对照。

- 8.2.2 将冷至45±0.5℃的结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)10～15mL倾注于每个平皿中。小心旋转平皿，将培养基与样液充分混匀。

- 8.2.3 待琼脂凝固后，再加3～4mLVRBA覆盖平板表层。

- 8.2.4 翻转平板，置于36±1℃培养18～24h。

8.2.5 选用有30～150个菌落的平板，计数平板上出现的典型大肠菌群菌落。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0.5mm或更大。

- 8.2.6 证实

- 8.2.6.1 从VRBA平板上挑取10个不同类型的典型和可疑菌落，移种于BGLB肉汤管内，36±1℃培养24h和48h，观察产气情况。

- 8.2.6.2 将出现产气的肉汤管判为大肠菌群阳性。对形成菌膜的阳性管，应进行革兰氏染色，以便排除革兰氏阳性杆菌。

- 8.2.7 结果报告

经最后证实为阳性(产气，革兰氏阴性杆菌)的试管百分比乘以于8.2.5条中计数的平板菌落数，再乘以稀释倍数，即为每克(毫升)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：

$$100 \times 6 \div 10 \times 10^4 \div g(mL) = 6.0 \times 10^5 \div g(mL)$$

附录A

培养基和试剂

(补充件)

A1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤

胰蛋白胨或胰酪胨(Trypticase)	20g
氯化钠	5.0g
乳糖	5.0g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	2.75g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	2.75g
月桂基硫酸钠	0.1g
蒸馏水	1000.0mL

将各成分溶解于蒸馏水中。分装到有倒立发酵管的20mm×150mm试管中，每管10mL。121℃高压灭菌15min。最终pH6.8±0.2。

A2 煌绿乳糖胆盐(BGLB)肉汤

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

将蛋白胨乳糖溶于约500mL蒸馏水中，加入牛胆粉溶液200mL(将20.0g脱水牛胆粉溶于200mL蒸馏水中，pH7.0～7.5)，用蒸馏水稀释到975mL，调pH7.4。使用前将琼脂融化，于每100mL琼脂中加5mL灭菌的20%乳糖水溶液、2mL的2%伊红Y水溶液和1.3mL0.5%的美蓝水溶液，摇匀，冷至45～50℃倾注平皿。

A3 EC肉汤

胰蛋白胨或胰酪胨	20.0g
3号胆盐或混合胆盐	1.5g
乳糖	5.0g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	4.0g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	1.5g
氯化钠	5.0g
蒸馏水	1000.0mL

将以上成分溶解于蒸馏水中，分装16mm×150mm(试管内有倒立的小发酵管)，每管5mL。

121℃高压灭菌15min，最终pH6.9±0.1。

A4 伊红美蓝琼脂(EMB)

蛋白胨	10.0g
乳糖	10.0g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	2.0g
琼脂	15.0g
伊红Y(水溶性)	0.4g或2%水溶液20mL
美蓝0.065g或0.5%水溶液	13mL
蒸馏水	1000.0mL

在1000mL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100mL或200mL，高压灭菌15min。最终pH7.1±0.2。使用前将琼脂融化，于每100mL琼脂中加5mL灭菌的20%乳糖水溶液、2mL的2%伊红Y水溶液和1.3mL0.5%的美蓝水溶液，摇匀，冷至45～50℃倾注平皿。

A5 营养琼脂斜面

牛肉膏	3.0g
蛋白胨	5.0g
琼脂	15.0g
蒸馏水	1000.0mL

将各成分加于蒸馏水中，煮沸溶解。分装合适的试管。121℃高压灭菌15min。最终pH7.3±0.1。灭菌后摆成斜面备用。

A6 色氨酸肉汤

胰酪或胰酪胨 10.0g

蒸馏水 1000.0mL

加热搅拌溶解胰酪或胰酪胨于蒸馏水中。分装试管，每管5mL。121℃高压灭菌15min。最终pH6.9±0.2。

A7 MR-VP培养基

肌酸	7.0g
葡萄糖	5.0g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	5.0g
蒸馏水	1000.0mL

将各成分溶于蒸馏水中，分装试管，121℃高压灭菌15min，最终pH6.9±0.2。

A8 Koser氏枸橼酸盐肉汤

磷酸氢钠钾(NaNH ₄ HP ₂ O ₄ ·4H ₂ O)	1.5g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	1.0g
硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.2g
枸橼酸钠(含2H ₂ O)	3.0g
蒸馏水	1000.0mL

将各成分溶解于蒸馏水中，分装试管，每管10mL，121℃高压灭菌15min。最终pH6.7±0.2。

A9 结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)

蛋白胨	7.0g
酵母膏	3.0g
乳糖	10.0g
氯化钠	5.0g
胆盐或3号胆盐	1.5g
中性	0.03g
结晶紫	0.002g
琼脂	15～18g
蒸馏水	1000.0mL

将上述成分溶于蒸馏水中，静置几分钟，充分搅拌，调至pH7.4±0.1。煮沸2min，将培养基冷45～50℃倾注平板。临用时制备，不得超过3h。

A10 Butterfield氏磷酸盐缓冲稀释液

贮存液	
磷酸二氢钾(K ₂ HPO ₄)	34.0g
蒸馏水	500mL

将磷酸二氢钾溶于蒸馏水中，用1mL/L氢氧化钠调至pH7.2。用蒸馏水加至1000mL贮存于冰箱。稀释液取贮存液1.25mL，用蒸馏水稀释至100mL，分装于合适容器中，121℃高压灭菌15min。

A11 生理盐水

氯化钠	8.5g
蒸馏水	1000.0mL

将氯化钠溶于蒸馏水中，121℃高压灭菌15min。

A12 革兰氏染色液

结晶紫染色液：	
结晶紫	1.0g
95%乙醇	20.0mL
1%草酸水溶液	80.0mL

将结晶紫完全溶解于乙醇中，然后与草酸液溶液混合。

革兰氏碘液：	
碘	1.0g
碘化钾	2.0g
蒸馏水	300.0mL

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

沙黄复染液：	
沙黄	0.25g
95%乙醇	10.0mL
蒸馏水	90.0mL

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

染色法

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

结果：革兰氏阳性菌呈紫色，革兰氏阴性菌呈红色。

A13 Kovacs氏靛基质试剂

对二甲氨基苯甲醛	5.0g
戊醇	75.0mL
盐酸(浓)	25.0mL

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。

A14 甲基红指示剂

甲基红	0.1g
95%乙醇	300mL

将甲基红溶解于300mL乙醇中，加水稀释至500mL。

A15 Voges—Proskauer(V—P)试剂

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

附录B

1g检样中最近似值(MPN)表

(补充件)

使用三管法，接种量分别为0.1、0.01和0.001g。

阳性管数			MPN	阳性管数			MPN
0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001	
0	0	0	<3	2	0	0	9.1
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6.1	2	1	1	20
0	1	2	9.2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6.2	2	2	0	21
0	2	1	9.3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9.4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3.6	3	0	0	23
1	0	1	7.2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7.3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3		3	3	3	>1100

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。

②表内所列检样量如改用1g(mL)、0.18(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加10倍，其余类推。

附加说明

本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出。

本标准由中华人民共和国秦皇岛进出口商品检验局、安徽进出口商品检验局、山西进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人李桂生、汤鹏飞、于桂华。

本标准主要参考美国公积分析化学家协会(AOAC)法定分析方法第14版第46章(1984年)。