



中华人民共和国国家标准

GB 4789.38—2025

食品安全国家标准

食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数

2025-03-16 发布

2025-09-16 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB 4789.38—2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数》。
本标准与 GB 4789.38—2012 相比,主要变化如下:

- 修改了范围;
- 删除了术语和定义;
- 增加了检验原理;
- 修改了设备和材料、培养基和试剂;
- 修改了检验程序、操作步骤、结果与报告和附录。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数

1 范围

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

本标准第一法适用于大肠埃希氏菌含量较低的食品中大肠埃希氏菌的计数;第二法适用于大肠埃希氏菌含量较高的食品中大肠埃希氏菌的计数,不适用于贝类及产品中大肠埃希氏菌的计数。

2 检验原理

大肠埃希氏菌在 44.5 °C 发酵乳糖产酸产气,具有 β -葡萄糖醛酸苷酶活性,能分解 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-葡萄糖醛酸苷,在胰蛋白胍胆盐 X-葡萄糖醛酸苷(Tryptone Bile X-glucuronide, TBX)琼脂上形成蓝绿色菌落。根据大肠埃希氏菌的以上特性,对其进行 MPN 计数和平板计数。

注:绝大多数大肠埃希氏菌具有 β -葡萄糖醛酸苷酶活性,但大肠埃希氏菌 O157 等菌株没有 β -葡萄糖醛酸苷酶活性。另外,肠杆菌科内一些志贺氏菌、沙门氏菌等菌株也具有 β -葡萄糖醛酸苷酶活性。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下。

- 3.1 恒温培养箱:36 °C $\pm$ 1 °C。
- 3.2 冰箱:2 °C $\sim$ 8 °C。
- 3.3 恒温水浴箱:44.5 °C $\pm$ 0.2 °C。
- 3.4 恒温装置:48 °C $\pm$ 2 °C。
- 3.5 天平:感量 0.1 g。
- 3.6 均质器及无菌均质袋、均质杯,振荡器。
- 3.7 试管:15 mm $\times$ 150 mm、18 mm $\times$ 180 mm 或其他合适规格,以及小倒管(杜氏管)或其他合适的产气收集装置。
- 3.8 无菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、2 mL(具 0.02 mL 刻度)、5 mL(具 0.05 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)或微量移液器及无菌吸头。
- 3.9 无菌锥形瓶:容量 500 mL。
- 3.10 无菌培养皿:直径 90 mm。
- 3.11 pH 计或精密 pH 试纸。
- 3.12 无菌接种环:10 μ L(直径约 3 mm)。

4 培养基和试剂

- 4.1 磷酸盐缓冲液:见附录 A 中 A.1。
- 4.2 生理盐水:见 A.2。

- 4.3 月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤:见 A.3。
 4.4 EC 肉汤:见 A.4。
 4.5 胰蛋白胨胆盐 X-葡萄糖醛酸苷(TBX)琼脂:见 A.5。
 4.6 1 mol/L NaOH:见 A.6。
 4.7 1 mol/L HCl:见 A.7。

第一法 大肠埃希氏菌 MPN 计数法

5 检验程序

大肠埃希氏菌 MPN 计数法的检验程序见图 1。

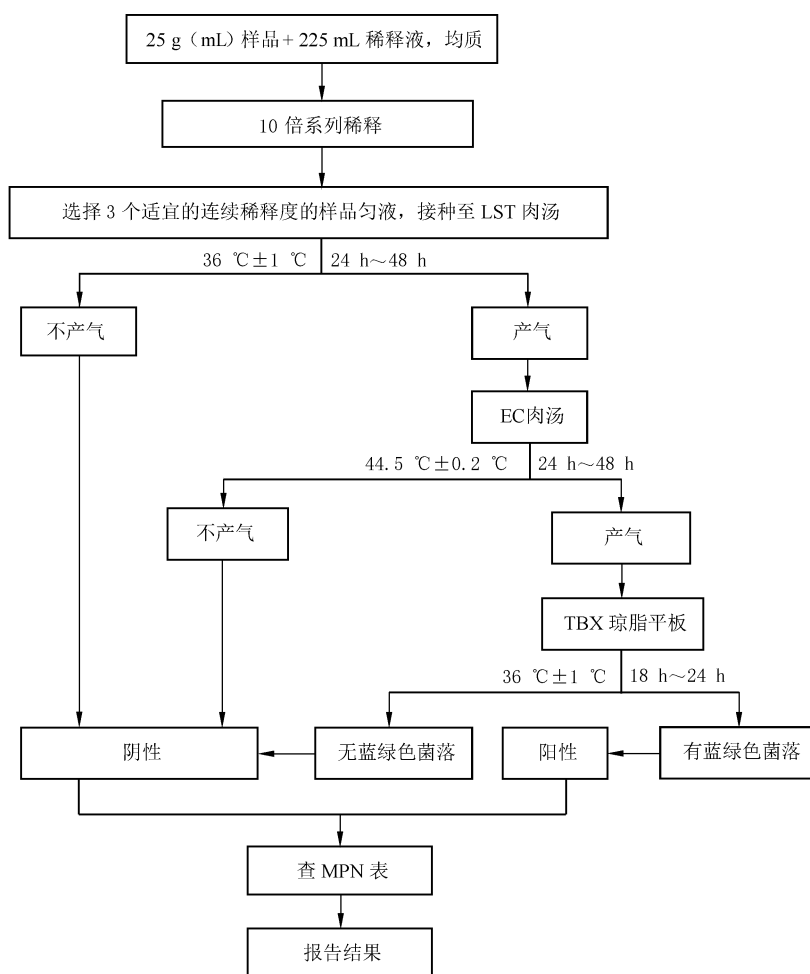


图 1 大肠埃希氏菌 MPN 计数法检验程序

6 操作步骤

6.1 样品的稀释

6.1.1 固体和半固体样品:无菌操作称取 25 g 样品,放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内,8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min;或放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理

盐水的无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打 1 min~2 min,制成 1:10 的样品匀液。

6.1.2 液体样品:用无菌吸管吸取 25 mL 样品置于盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶(瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠)中充分混匀,或放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打 1 min~2 min,制成 1:10 的样品匀液。当样品不适宜进行体积取样时,按 6.1.1 操作。

6.1.3 必要时用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl,调节样品匀液或液体样品原液的 pH 至 6.5~7.5。

6.1.4 用无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL,沿管壁缓缓注入装有 9 mL 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),将试管在振荡器上振荡混匀,制成 1:100 的样品匀液。

6.1.5 根据对样品污染状况的估计,参照 6.1.4 的操作,依次制成 10 倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释 1 次,换用 1 支无菌吸管或吸头。

6.2 初发酵试验

每个样品,选择 3 个适宜的连续稀释度的样品匀液(液体样品可以选择原液),每个稀释度接种 3 管 LST 肉汤(贝类及产品每个稀释度接种 5 管 LST 肉汤),每管 LST 肉汤接种 1 mL 样品匀液(如接种体积超过 1 mL,则加到等体积的双料 LST 肉汤中)。从制备样品匀液开始至接种至 LST 肉汤完毕,全过程不得超过 15 min。将已接种样品的 LST 肉汤管置于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$,检查产气情况。小倒管或产气收集装置内有气泡产生,或轻轻振摇 LST 肉汤管可见试管内有细密气泡不断上升者,判断为产气,产气者进行复发酵试验。如未产气则继续培养至 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$,产气者进行复发酵试验;培养至 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$,仍未产气者判断为大肠埃希氏菌阴性。若培养至 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$,所有 LST 肉汤管均未产气,按照附录 B 或附录 C 中的 MPN 检索表,报告每克(毫升)样品中大肠埃希氏菌的 MPN 值,以 MPN/g(mL)表示。

6.3 复发酵试验

轻轻振摇各产气的 LST 肉汤管,分别用接种环取培养物 1 环,转种至 EC 肉汤管中,放入带盖的水浴箱内。水浴箱的水面至少高于 EC 肉汤培养基液面 1 cm~2 cm, $44.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$,检查产气情况,如未见产气则继续培养至 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。记录 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 内所有产气的 EC 肉汤管数,并进行确认试验。若培养至 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$,所有 EC 肉汤管均未产气,判断为大肠埃希氏菌阴性,按照附录 B 或附录 C 中的 MPN 检索表,报告每克(毫升)样品中大肠埃希氏菌的 MPN 值,以 MPN/g(mL)表示。

6.4 确认试验

轻轻振摇各产气的 EC 肉汤管,分别用接种环取培养物划线接种于 TBX 琼脂平板, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h,观察 TBX 琼脂平板上的菌落,大肠埃希氏菌在 TBX 琼脂平板上的菌落为蓝绿色。TBX 琼脂平板上有蓝绿色菌落者,其对应的 EC 肉汤产气管为大肠埃希氏菌阳性,否则为阴性。

7 结果与报告

依据 3 个适宜的连续稀释度中大肠埃希氏菌的阳性管数,按照附录 B 或附录 C 中的 MPN 检索表,报告每克(毫升)样品中大肠埃希氏菌的 MPN 值,以 MPN/g(mL)表示。

第二法 大肠埃希氏菌平板计数法

8 检验程序

大肠埃希氏菌平板计数法的检验程序见图 2。

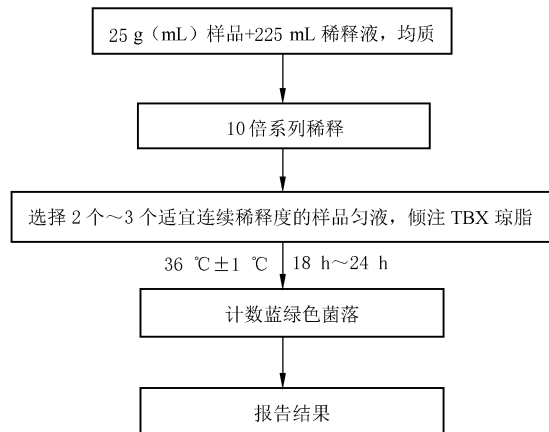


图 2 大肠埃希氏菌平板计数法检验程序

9 操作步骤

9.1 样品的稀释

按 6.1 进行。

9.2 接种与培养

9.2.1 根据对样品污染状况的估计,选取 2 个~3 个适宜的连续稀释度的样品匀液(液体样品可以选择原液),每个稀释度接种 2 个无菌培养皿,每皿 1 mL。同时取磷酸盐缓冲液或生理盐水加入 2 个无菌培养皿作空白对照,每皿 1 mL。

9.2.2 尽快将冷却至 $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 TBX 琼脂倾注于培养皿中,每皿 15 mL~20 mL。小心旋转培养皿,将培养基与接种的样品匀液充分混匀,水平静置待其凝固。从制备样品匀液开始至倾注 TBX 琼脂完毕,全过程不得超过 15 min。琼脂凝固后翻转平板,置于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

9.3 平板菌落数的选择

TBX 琼脂平板上大肠埃希氏菌的典型菌落为蓝绿色,选择典型菌落数在 15 CFU~150 CFU 之间的平板,对典型菌落进行计数。

9.4 大肠埃希氏菌菌落数的计算

9.4.1 若只有 1 个稀释度的平板上典型菌落数在计数范围内,以该稀释度典型菌落数的平均值,再乘以相应稀释倍数进行结果计算。

9.4.2 若有两个连续稀释度的平板上典型菌落数在计数范围内时,结果按式(1)计算:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

N ——样品中大肠埃希氏菌的菌落数；

C ——所选平板上的典型菌落数；

n_1 ——第一稀释度(低稀释倍数)所选平板个数；

n_2 ——第二稀释度(高稀释倍数)所选平板个数；

d ——稀释因子(第一稀释度)。

9.4.3 若所有稀释度的平板上典型菌落数均大于 150 CFU,则对稀释度最高的平板进行计数,其他稀释度的平板菌落数可记录为多不可计,结果按最高稀释度典型菌落数的平均值乘以相应稀释倍数计算。

9.4.4 若所有稀释度的平板上典型菌落数均小于 15 CFU,则对稀释度最低的平板进行计数,结果按最低稀释度典型菌落数的平均值乘以相应稀释倍数计算。

9.4.5 若所有稀释度(包括液体样品原液)平板均无典型菌落生长,则结果按小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

9.4.6 若所有稀释度的平板上典型菌落数均不在 15 CFU~150 CFU 之间,其中一部分小于 15 CFU,一部分大于 150 CFU 时,则以最接近 15 CFU 或 150 CFU 的典型菌落数平均值乘以相应的稀释倍数进行结果计算。

10 结果与报告

10.1 大肠埃希氏菌的菌落数小于 100 CFU 时,按“四舍五入”的原则修约,以整数报告。

10.2 大肠埃希氏菌的菌落数大于或等于 100 CFU 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,保留两位有效数字。

10.3 若空白对照上有菌落生长,则此次检验结果无效。

10.4 称重取样以 CFU/g 为单位报告结果,体积取样以 CFU/mL 为单位报告结果。

附 录 A

培养基和试剂

A.1 磷酸盐缓冲液

A.1.1 成分

磷酸二氢钾	34.0 g
蒸馏水	500 mL

A.1.2 制法

贮存液：称取 34.0 g 的磷酸二氢钾溶于 500 mL 蒸馏水(或其他符合要求的实验用水，下同)中，用大约 175 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ，用蒸馏水稀释至 1 000 mL，密封贮存于冰箱。稀释液：取贮存液 1.25 mL，用蒸馏水稀释至 1 000 mL，分装于适宜容器中，121 °C 高压灭菌 15 min，用作样品稀释。

A.2 生理盐水

A.2.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

将氯化钠在蒸馏水中溶解，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.3 月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤

A.3.1 成分

胰蛋白胨或胰酪胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾	2.75 g
磷酸二氢钾	2.75 g
月桂基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

将各成分(双料 LST 肉汤除蒸馏水外，各成分的用量加倍)加到蒸馏水中加热溶解，必要时调节 pH。分装至有小倒管的试管中，每管 10 mL。121 °C 高压灭菌 15 min，灭菌后培养基在 25 °C 时的 pH 为 6.8 ± 0.2 。

A.4 EC 肉汤

A.4.1 成分

胰蛋白胨或胰酪胨	20.0 g
----------	--------

3 号胆盐或混合胆盐	1.5 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾	4.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

将各成分在蒸馏水中加热溶解,必要时调节 pH。分装至有小倒管的试管中,每管 10 mL。121 °C 高压灭菌 15 min,灭菌后培养基在 25 °C 时的 pH 为 6.9 ± 0.2 。

A.5 胰蛋白胍胆盐 X-葡萄糖醛酸苷(TBX)琼脂

A.5.1 成分

胰蛋白胍	20.0 g
3 号胆盐	1.5 g
5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-葡萄糖醛酸苷(BCIG)环己胺盐或钠盐	144 μ mol
琼脂	9.0 g~18.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

在 2.5 mL 95% 的乙醇中加入 0.5 mL 1 mol/L 的氢氧化钠溶液,然后再加入 144 μ mol (0.075 g) 的 BCIG 环己胺盐混匀,与其他成分一并加入蒸馏水中。或者将 144 μ mol 的 BCIG 钠盐,与其他成分一并加入蒸馏水中。加热至完全溶解,必要时调节 pH。121 °C 高压灭菌 15 min,灭菌后培养基在 25 °C 时的 pH 为 7.2 ± 0.2 。灭菌后的培养基可在冰箱密封避光保存不超过 1 个月。

A.6 1 mol/L NaOH

A.6.1 成分

氢氧化钠	40.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制法

称取 40 g 氢氧化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中。

A.7 1 mol/L HCl

A.7.1 成分

浓盐酸	89 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

量取浓盐酸 89 mL,用蒸馏水稀释至 1 000 mL。

附 录 B

食品中大肠埃希氏菌最可能数(MPN)检索表

每克(毫升)食品检样中大肠埃希氏菌最可能数(MPN)的检索见表 B.1。

表 B.1 食品中大肠埃希氏菌最可能数(MPN)检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
0.1	0.01	0.001		下限	上限	0.1	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,每个稀释度接种 3 管,3 个稀释度中每管接种的样品量分别为 0.1 g(mL)、0.01 g(mL)、0.001 g(mL)。

注 2: 3 个稀释度中接种的样品量改用 1 g(mL)、0.1 g(mL)和 0.01 g(mL)时,表内数值要相应缩小 10 倍;如改用 0.01 g(mL)、0.001 g(mL)和 0.000 1 g(mL)时,则表内数值要相应扩大 10 倍。以此类推。

注 3: 必要时,本表的数值可乘以 100,报告每 100 克(毫升)检样中大肠埃希氏菌最可能数,以 MPN/100 g(mL)表示。

附 录 C

贝类及产品中大肠埃希氏菌最可能数(MPN)检索表

每克(毫升)贝类及产品检样中大肠埃希氏菌最可能数(MPN)的检索见表 C.1。

表 C.1 贝类及产品中大肠埃希氏菌最可能数(MPN)检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
0.1	0.01	0.001		下限	上限	0.1	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<1.8	—	6.8	2	2	2	14	5.9	36
0	0	1	1.8	0.09	6.8	2	3	0	12	4.1	26
0	1	0	1.8	0.09	6.9	2	3	1	14	5.9	36
0	1	1	3.6	0.7	10	2	4	0	15	5.9	36
0	2	0	3.7	0.7	10	3	0	0	7.8	2.1	22
0	2	1	5.5	1.8	15	3	0	1	11	3.5	23
0	3	0	5.6	1.8	15	3	0	2	13	5.6	35
1	0	0	2.0	0.1	10	3	1	0	11	3.5	26
1	0	1	4.0	0.7	10	3	1	1	14	5.6	36
1	0	2	6.0	1.8	15	3	1	2	17	6.0	36
1	1	0	4.0	0.7	12	3	2	0	14	5.7	36
1	1	1	6.1	1.8	15	3	2	1	17	6.8	40
1	1	2	8.1	3.4	22	3	2	2	20	6.8	40
1	2	0	6.1	1.8	15	3	3	0	17	6.8	40
1	2	1	8.2	3.4	22	3	3	1	21	6.8	40
1	3	0	8.3	3.4	22	3	3	2	24	9.8	70
1	3	1	10	3.5	22	3	4	0	21	6.8	40
1	4	0	11	3.5	22	3	4	1	24	9.8	70
2	0	0	4.5	0.79	15	3	5	0	25	9.8	70
2	0	1	6.8	1.8	15	4	0	0	13	4.1	35
2	0	2	9.1	3.4	22	4	0	1	17	5.9	36
2	1	0	6.8	1.8	17	4	0	2	21	6.8	40
2	1	1	9.2	3.4	22	4	0	3	25	9.8	70
2	1	2	12	4.1	26	4	1	0	17	6.0	40
2	2	0	9.3	3.4	22	4	1	1	21	6.8	42
2	2	1	12	4.1	26	4	1	2	26	9.8	70

表 C.1 贝类及产品中大肠埃希氏菌最可能数(MPN)检索表(续)

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
0.1	0.01	0.001		下限	上限	0.1	0.01	0.001		下限	上限
4	1	3	31	10	70	5	2	1	70	22	170
4	2	0	22	6.8	50	5	2	2	94	34	230
4	2	1	26	9.8	70	5	2	3	120	36	250
4	2	2	32	10	70	5	2	4	150	58	400
4	2	3	38	14	100	5	3	0	79	22	220
4	3	0	27	9.9	70	5	3	1	110	34	250
4	3	1	33	10	70	5	3	2	140	52	400
4	3	2	39	14	100	5	3	3	180	70	400
4	4	0	34	14	100	5	3	4	210	70	400
4	4	1	40	14	100	5	4	0	130	36	400
4	4	2	47	15	120	5	4	1	170	58	400
4	5	0	41	14	100	5	4	2	220	70	440
4	5	1	48	15	120	5	4	3	280	100	710
5	0	0	23	6.8	70	5	4	4	350	100	710
5	0	1	31	10	70	5	4	5	430	150	1 100
5	0	2	43	14	100	5	5	0	240	70	710
5	0	3	58	22	150	5	5	1	350	100	1 100
5	1	0	33	10	100	5	5	2	540	150	1 700
5	1	1	46	14	120	5	5	3	920	220	2 600
5	1	2	63	22	150	5	5	4	1 600	400	4 600
5	1	3	84	34	220	5	5	5	>1 600	700	—
5	2	0	49	15	150						

注 1: 本表采用 3 个稀释度,每个稀释度接种 5 管,3 个稀释度中每管接种的样品量分别为 0.1 g(mL)、0.01 g(mL)、0.001 g(mL)。

注 2: 3 个稀释度中接种的样品量改用 1 g(mL)、0.1 g(mL)和 0.01 g(mL)时,表内数值要相应缩小 10 倍;如改用 0.01 g(mL)、0.001 g(mL)和 0.000 1 g(mL)时,则表内数值要相应扩大 10 倍。以此类推。

注 3: 必要时,本表的数值可乘以 100,报告每 100 克(毫升)检样中大肠埃希氏菌最可能数,以 MPN/100 g(mL)表示。