



中华人民共和国国家标准

GB 4789.40—2016

食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会
国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB 4789.40—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验》、SN/T 1632.1—2013《出口奶粉中阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)检验方法 第1部分:分离与计数》。

本标准与 GB 4789.40—2010 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验”;
- 修改了可疑菌落的挑取数量。

食品安全国家标准

食品微生物学检验

克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验

1 范围

本标准规定了食品中克罗诺杆菌属(*Cronobacter*)的检验方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品、乳和乳制品及其原料中克罗诺杆菌属的检验。

2 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:

- 2.1 恒温培养箱:25℃±1℃,36℃±1℃,44℃±0.5℃。
- 2.2 冰箱:2℃~5℃。
- 2.3 恒温水浴箱:44℃±0.5℃。
- 2.4 天平:感量0.1g。
- 2.5 均质器。
- 2.6 振荡器。
- 2.7 无菌吸管:1mL(具0.01mL刻度)、10mL(具0.1mL刻度)或微量移液器及吸头。
- 2.8 无菌锥形瓶:容量100mL、200mL、2000mL。
- 2.9 无菌培养皿:直径90mm。
- 2.10 pH计或pH比色管或精密pH试纸。
- 2.11 全自动微生物生化鉴定系统。

3 培养基和试剂

- 3.1 缓冲蛋白胨水(buffer peptone water,BPW):见A.1。
- 3.2 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素(modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium,mLST-Vm):见A.2。
- 3.3 阪崎肠杆菌显色培养基。
- 3.4 胰蛋白胨大豆琼脂(trypticase soy agar,TSA):见A.3。
- 3.5 生化鉴定试剂盒。
- 3.6 氧化酶试剂:见A.4。
- 3.7 L-赖氨酸脱羧酶培养基:见A.5。
- 3.8 L-鸟氨酸脱羧酶培养基:见A.6。
- 3.9 L-精氨酸双水解酶培养基:见A.7。
- 3.10 糖类发酵培养基:见A.8。
- 3.11 西蒙氏柠檬酸盐培养基:见A.9。

第一法 克罗诺杆菌属定性检验

4 检验程序

克罗诺杆菌属检验程序见图 1。

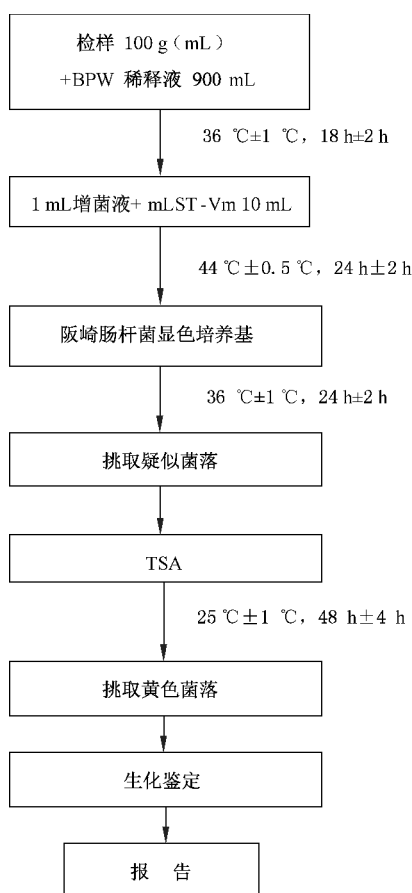


图 1 克罗诺杆菌属检验程序

5 操作步骤

5.1 前增菌和增菌

取检样 100 g(mL)置灭菌锥形瓶中,加入 900 mL 已预热至 44 °C 的缓冲蛋白胨水,用手缓缓地摇动至充分溶解,36 °C ± 1 °C 培养 18 h ± 2 h。移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤,44 °C ± 0.5 °C 培养 24 h ± 2 h。

5.2 分离

5.2.1 轻轻混匀 mLST-Vm 肉汤培养物,各取增菌培养物 1 环,分别划线接种于两个阪崎肠杆菌显色培养基平板,显色培养基须符合 GB 4789.28 的要求,36 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h,或按培养基要求条件

培养。

5.2.2 挑取至少 5 个可疑菌落,不足 5 个时挑取全部可疑菌落,划线接种于 TSA 平板。25 °C ± 1 °C 培养 48 h ± 4 h。

5.3 鉴定

自 TSA 平板上直接挑取黄色可疑菌落,进行生化鉴定。克罗诺杆菌属的主要生化特征见表 1。可选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统。

表 1 克罗诺杆菌属的主要生化特征

生化试验		特 征
黄色素产生		+
氧化酶		-
L-赖氨酸脱羧酶		-
L-鸟氨酸脱羧酶		(+)
L-精氨酸双水解酶		+
柠檬酸水解		(+)
发酵	D-山梨醇	(-)
	L-鼠李糖	+
	D-蔗糖	+
	D-蜜二糖	+
	苦杏仁甙	+
注: + > 99% 阳性; - > 99% 阴性; (+) 90% ~ 99% 阳性; (-) 90% ~ 99% 阴性。		

6 结果与报告

综合菌落形态和生化特征,报告每 100 g(mL)样品中检出或未检出克罗诺杆菌属。

第二法 克罗诺杆菌属的计数

7 操作步骤

7.1 样品的稀释

7.1.1 固体和半固体样品:无菌称取样品 100 g、10 g、1 g 各三份,分别加入 900 mL、90 mL、9 mL 已预热至 44 °C 的 BPW,轻轻振摇使充分溶解,制成 1 : 10 样品匀液,置 36 °C ± 1 °C 培养 18 h ± 2 h。分别移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤,44 °C ± 0.5 °C 培养 24 h ± 2 h。

7.1.2 液体样品:以无菌吸管分别取样品 100 mL、10 mL、1 mL 各三份,分别加入 900 mL、90 mL、9 mL 已预热至 44 °C 的 BPW,轻轻振摇使充分混匀,制成 1 : 10 样品匀液,置 36 °C ± 1 °C 培养 18 h ± 2 h。分别移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤,44 °C ± 0.5 °C 培养 24 h ± 2 h。

7.2 分离、鉴定

同 5.2 和 5.3。

8 结果与报告

综合菌落形态、生化特征,根据证实为克罗诺杆菌属的阳性管数,查 MPN 检索表,报告每 100 g (mL)样品中克罗诺杆菌属的 MPN 值(见表 B.1)。

附录 A 培养基和试剂

A.1 缓冲蛋白胨水(BPW)

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

加热搅拌至溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 , $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.2 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素(Modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium,mLST-Vm)

A.2.1 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨(mLST)肉汤

A.2.1.1 成分

氯化钠	34.0 g
胰蛋白胨	20.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸二氢钾	2.75 g
磷酸氢二钾	2.75 g
十二烷基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.1.2 制法

加热搅拌至溶解,调节 pH 至 6.8 ± 0.2 。分装每管 10 mL, $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.2.2 万古霉素溶液

A.2.2.1 成分

万古霉素	10.0 mg
蒸馏水	10.0 mL

A.2.2.2 制法

10.0 mg 万古霉素溶解于 10.0 mL 蒸馏水,过滤除菌。万古霉素溶液可以在 $0\text{ }^\circ\text{C} \sim 5\text{ }^\circ\text{C}$ 保存 15 d。

A.2.3 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素 (Modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium, mLST-Vm)

每 10 mL mLST 加入万古霉素溶液 0.1 mL, 混合液中万古霉素的终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

注: mLST-Vm 必须在 24 h 之内使用。

A.3 胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA)

A.3.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
植物蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

加热搅拌至溶解, 煮沸 1 min, 调节 pH 至 7.3 ± 0.2 , 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压 15 min。

A.4 氧化酶试剂

A.4.1 成分

<i>N,N,N',N'</i> -四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
蒸馏水	100 mL

A.4.2 制法

少量新鲜配制, 于冰箱内避光保存, 在 7 d 之内使用。

A.4.3 试验方法

用玻璃棒或一次性接种针挑取单个特征性菌落, 涂布在氧化酶试剂湿润的滤纸平板上。如果滤纸在 10 s 中之内未变为紫红色、紫色或深蓝色, 则为氧化酶试验阴性, 否则即为氧化酶实验阳性。

注: 实验中切勿使用镍/铬材料。

A.5 L-赖氨酸脱羧酶培养基

A.5.1 成分

L-赖氨酸盐酸盐 (L-lysine monohydrochloride)	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

将各成分加热溶解, 必要时调节 pH 至 6.8 ± 0.2 。每管分装 5 mL, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压 15 min。

A.5.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-赖氨酸脱羧酶培养基,刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h,观察结果。L-赖氨酸脱羧酶试验阳性者,培养基呈紫色,阴性者为黄色,空白对照管为紫色。

A.6 L-鸟氨酸脱羧酶培养基

A.6.1 成分

L-鸟氨酸盐酸盐(L-ornithine monohydrochloride)	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH 至 6.8±0.2。每管分装 5 mL。121 ℃高压 15 min。

A.6.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-鸟氨酸脱羧酶培养基,刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h,观察结果。L-鸟氨酸脱羧酶试验阳性者,培养基呈紫色,阴性者为黄色。

A.7 L-精氨酸双水解酶培养基

A.7.1 成分

L-精氨酸盐酸盐(L-arginine monohydrochloride)	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH 至 6.8±0.2。每管分装 5 mL。121 ℃高压 15 min。

A.7.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-精氨酸脱羧酶培养基,刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h,观察结果。L-精氨酸脱羧酶试验阳性者,培养基呈紫色,阴性者为黄色。

A.8 糖类发酵培养基

A.8.1 基础培养基

A.8.1.1 成分

酪蛋白(酶消化)	10.0 g
----------	--------

氯化钠	5.0 g
酚红	0.02 g
蒸馏水	1 000 mL

A.8.1.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH 至 6.8 ± 0.2 。每管分装 5 mL。121 °C 高压 15 min。

A.8.2 糖类溶液(D-山梨醇、L-鼠李糖、D-蔗糖、D-蜜二糖、苦杏仁甙)

A.8.2.1 成分

糖	8.0 g
蒸馏水	100 mL

A.8.2.2 制法

分别称取 D-山梨醇、L-鼠李糖、D-蔗糖、D-蜜二糖、苦杏仁甙等糖类成分各 8 g,溶于 100 mL 蒸馏水中,过滤除菌,制成 80 mg/mL 的糖类溶液。

A.8.3 完全培养基

A.8.3.1 成分

基础培养基	875 mL
糖类溶液	125 mL

A.8.3.2 制法

无菌操作,将每种糖类溶液加入基础培养基,混匀;分装到无菌试管中,每管 10 mL。

A.8.4 实验方法

挑取培养物接种于各种糖类发酵培养基,刚好在液体培养基的液面下。30 °C \pm 1 °C 培养 24 h \pm 2 h,观察结果。糖类发酵试验阳性者,培养基呈黄色,阴性者为红色。

A.9 西蒙氏柠檬酸盐培养基

A.9.1 成分

柠檬酸钠	2.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
磷酸二氢铵	1.0 g
硫酸镁	0.2 g
溴麝香草酚蓝	0.08 g
琼脂	8.0 g~18.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.9.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH 至 6.8 ± 0.2 。每管分装 10 mL,121 °C 高压 15 min,制成斜面。

A.9.3 实验方法

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

附录 B

克罗诺杆菌属最可能数(MPN)检索表

每 100 g(mL) 检样中克罗诺杆菌属最可能数(MPN)的检索见表 B.1。

表 B.1 克罗诺杆菌属最可能数(MPN)检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
100	10	1		下限	上限	100	10	1		下限	上限
0	0	0	<0.3	—	0.95	2	2	0	2.1	0.45	4.2
0	0	1	0.3	0.015	0.96	2	2	1	2.8	0.87	9.4
0	1	0	0.3	0.015	1.1	2	2	2	3.5	0.87	9.4
0	1	1	0.61	0.12	1.8	2	3	0	2.9	0.87	9.4
0	2	0	0.62	0.12	1.8	2	3	1	3.6	0.87	9.4
0	3	0	0.94	0.36	3.8	3	0	0	2.3	0.46	9.4
1	0	0	0.36	0.017	1.8	3	0	1	3.8	0.87	11
1	0	1	0.72	0.13	1.8	3	0	2	6.4	1.7	18
1	0	2	1.1	0.36	3.8	3	1	0	4.3	0.9	18
1	1	0	0.74	0.13	2	3	1	1	7.5	1.7	20
1	1	1	1.1	0.36	3.8	3	1	2	12	3.7	42
1	2	0	1.1	0.36	4.2	3	1	3	16	4	42
1	2	1	1.5	0.45	4.2	3	2	0	9.3	1.8	42
1	3	0	1.6	0.45	4.2	3	2	1	15	3.7	42
2	0	0	0.92	0.14	3.8	3	2	2	21	4	43
2	0	1	1.4	0.36	4.2	3	2	3	29	9	100
2	0	2	2	0.45	4.2	3	3	0	24	4.2	100
2	1	0	1.5	0.37	4.2	3	3	1	46	9	200
2	1	1	2	0.45	4.2	3	3	2	110	18	410
2	1	2	2.7	0.87	9.4	3	3	3	>110	42	—

注 1: 本表采用 3 个检样量[100 g(mL)、10 g(mL)和 1 g(mL)],每个检样量接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1 000 g(mL)、100 g(mL)和 10 g(mL)时,表内数字应相应降低 10 倍;如改用 10 g(mL)、1 g(mL)和 0.1 g(mL)时,则表内数字应相应增高 10 倍,其余类推。