

ICS 07.100.30
C53



中华人民共和国食品安全国家标准

GB 4789.40—××××
代替 GB/T 4789.40-2008

食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验

Microbiological examination in foods—
Examination of *Enterobacter sakazakii*

（征求意见稿）

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准的第一法修改采用国际标准化组织(ISO)ISO/TS 22964:2006《乳和乳制品中阪崎肠杆菌》(Milk and milk products—Detection of *Enterobacter sakazakii*)的检验方法,第二法参考美国食品药品监督管理局(FDA)《婴儿配方粉中阪崎肠杆菌的分离和计数》[Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula(July 2002)]的检验方法。

本标准与 ISO 方法的区别如下:

- 培养温度由 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 改为 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 阪崎肠杆菌选择性分离平板由 ESIA 改为 DFI,培养温度由 $44\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 改为 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 第一法中确定 100 g(或 100 mL)为基本检测单位;
- 增加了第二法,作为阪崎肠杆菌检测的 MPN 定量检测方法。

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

食品微生物学检验

阪崎肠杆菌检验

1 范围

本标准规定了食品中阪崎肠杆菌的检验方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品、乳和乳制品及其原料中阪崎肠杆菌的检验。

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 VITEK全自动微生物鉴定系统¹⁾。

3 培养基和试剂

- 3.1 缓冲蛋白胨水(buffer peptone water,BPW):见第A.1章。
- 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):见第A.2章。
- 3.3 阪崎肠杆菌显色培养基(druggan-forsythe-iversen,DFI)²⁾琼脂:见第A.3章。
- 3.4 胰蛋白胨大豆琼脂(trypticase soy agar,TSA):见第A.4章。
- 3.5 API 20E生化鉴定试剂盒¹⁾。
- 3.6 氧化酶试剂:见第A.5章。
- 3.7 L-赖氨酸脱羧酶培养基:见第A.6章。
- 3.8 L-鸟氨酸脱羧酶培养基:见第A.7章。
- 3.9 L-精氨酸双水解酶培养基:见第A.8章。
- 3.10 糖类发酵培养基:见第A.9章。
- 3.11 西蒙氏柠檬酸盐培养基:见第A.10章。

1) 由法国生物梅里埃公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效的产品。

2) 由英国 Oxoid 公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效的产品。

第一法 阪崎肠杆菌的检验

4 检验程序

检验程序见图 1。

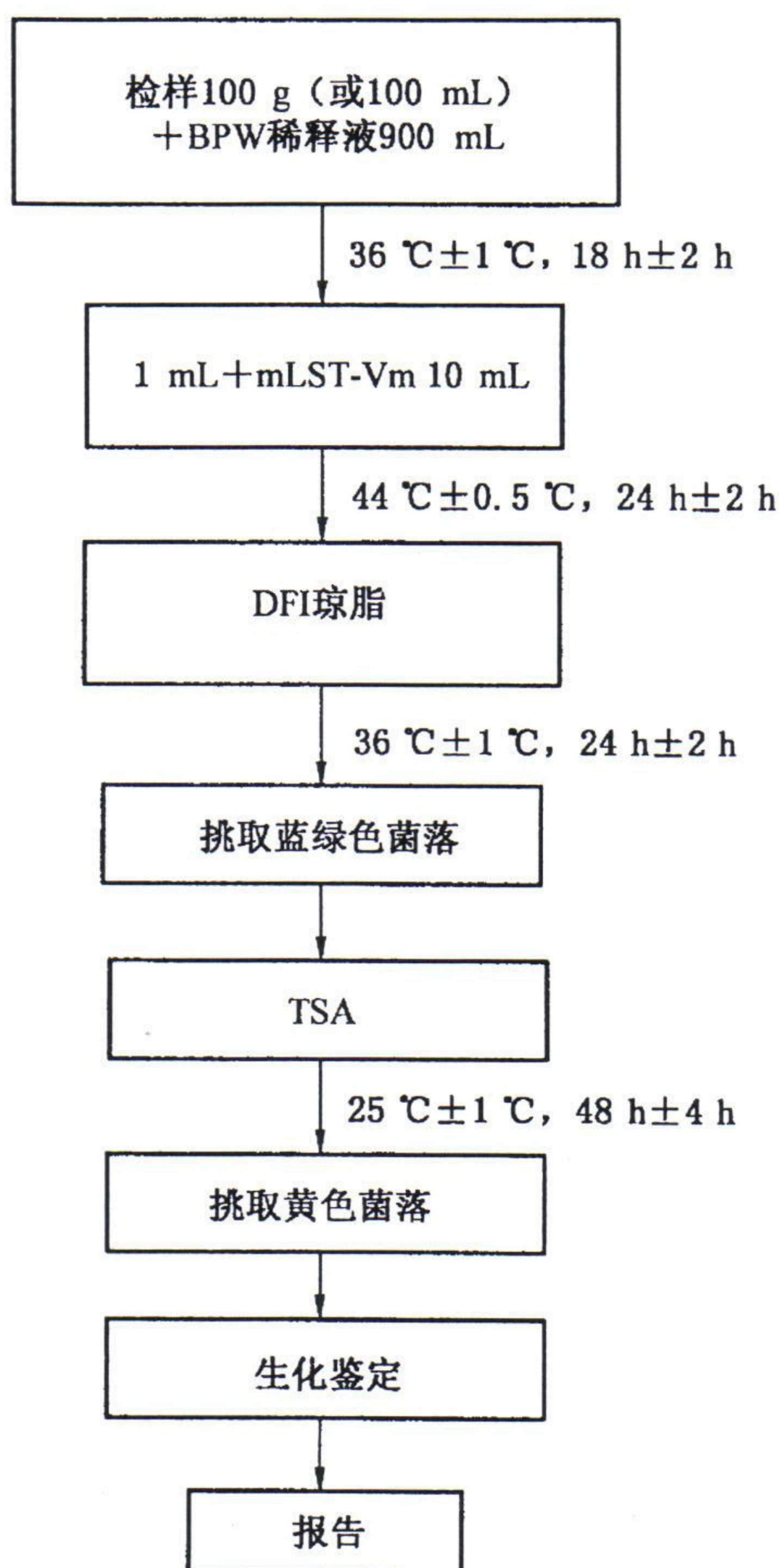


图 1 阪崎肠杆菌检验程序

5 操作步骤

5.1 前增菌和增菌

取检样 100 g (或 100 mL) 加入已预热至 44 °C 装有 900 mL 缓冲蛋白胨水的锥形瓶中, 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 DFI 平板, 36 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h。

5.2.2 挑取 1 个~5 个可疑菌落 (直径约 1 mm~3 mm 的蓝绿色菌落), 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。阪崎肠杆菌的主要生化特征见表 1。可选择 API 20E 生化鉴定试剂盒或 VITEK 全自动微生物鉴定系统等生化鉴定系统。

表 1 阪崎肠杆菌的主要生化特征

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。		

5.4 阪崎肠杆菌的报告

综合菌落形态和生化特征,报告每 100 g(或 100 mL)样品中检出或未检出阪崎肠杆菌。

第二法 阪崎肠杆菌的计数

6 操作步骤

6.1 样品的稀释

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

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

6.2 分离、鉴定

同 5.2~5.3。

6.3 阪崎肠杆菌计数的报告

综合菌落形态、生化特征,根据证实为阪崎肠杆菌的阳性管数,查 MPN 检索表,报告每 100 g(或 100 mL)样品中阪崎肠杆菌的 MPN 值(见表 B. 1)。

附录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 缓冲蛋白胨水(BPW)

A.1.1 成分

蛋白胨	10 g
氯化钠	5 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2	

A.1.2 制法

加热搅拌至溶解,调节 pH,121 °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
pH 6.8±0.2	

A.2.1.2 制法

加热搅拌至溶解,调节 pH。分装每管 10 mL,121 °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 °C~5 °C 保存 15 天。

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 µg/mL。

注意:mLST-Vm 必须在 24 h 之内使用。

A.3 阪崎肠杆菌显色培养基(DFI 琼脂)

A.3.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
柠檬酸铁铵	1.0 g
硫代硫酸钠	1.0 g
脱氧胆酸钠	1.0 g
5-溴-4-氯-3-吲哚- α -D-吡喃葡萄糖甙	0.1 g
琼脂	15 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.3 $\pm$ 0.2	

A.3.2 制法

加热搅拌至完全溶解,调节 pH,121 °C 高压 15min,冷却至 50 °C,倾注平板。

A.4 胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)

A.4.1 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
pH 7.3 $\pm$ 0.2	

A.4.2 制法

加热搅拌至溶解,煮沸 1 min,调节 pH,121 °C 高压 15 min。

A.5 氧化酶试剂

A.5.1 成分

N,N,N',N'-四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
蒸馏水	100.0 mL

A.5.2 制法

少量新鲜配制,于冰箱内避光保存,在 7 d 之内使用。

A.5.3 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 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。

注意:实验中切勿使用镍/铬材料。

A.6 L-赖氨酸脱羧酶培养基

A.6.1 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.6.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH,使之在灭菌后 25 °C pH 值为 6.8 ± 0.2 。每管分装 5 mL, 121 °C 高压 15 min。

A.6.3 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 °C ± 1 °C 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。

A.7 L-鸟氨酸脱羧酶培养基

A.7.1 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.7.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH,使之在灭菌后 25 °C pH 值为 6.8 ± 0.2 。每管分装 5 mL。121 °C 高压 15 min。

A.7.3 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 °C ± 1 °C 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.8 L-精氨酸双水解酶培养基

A.8.1 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.8.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH,使之在灭菌后 25 °C pH 值为 6.8 ± 0.2 。每管分装 5 mL。121 °C 高压 15 min。

A.8.3 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 °C ± 1 °C 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.9 糖类发酵培养基

A.9.1 基础培养基

A.9.1.1 成分

酪蛋白(酶消化)	10 g
氯化钠	5 g
酚红	0.02 g

蒸馏水	1 000 mL
-----	----------

A.9.1.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH,使之在灭菌后 25 ℃ pH 值为 6.8。每管分装 5 mL。121 ℃ 高压 15 min。

A.9.2 糖类溶液(D-山梨醇、L-鼠李糖、D-蔗糖、D-蜜二糖、苦杏仁甙)

A.9.2.1 成分

糖	8 g
蒸馏水	100 mL

A.9.2.2 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.9.3 完全培养基

A.9.3.1 成分

基础培养基	875 mL
糖类溶液	125 mL

A.9.3.2 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.9.4 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 ℃ ± 1 ℃ 培养 24 h ± 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.10 西蒙氏柠檬酸盐培养基

A.10.1 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
溴百里香酚蓝	0.08 g
琼脂	8.0 g~18.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.10.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH,使之在灭菌后 25 ℃ pH 值为 6.8 ± 0.2。每管分装 10 mL,121 ℃ 高压 15 min,制成斜面。

A.10.3 实验方法

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

附 录 B
(规范性附录)

阪崎肠杆菌最可能数(MPN)检索表

每 100 g(或 100 mL)检样中阪崎肠杆菌最可能数(MPN)的检索见表 B.1。

表 B.1 阪崎肠杆菌最可能数(MPN)检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
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(或 100 mL)、10 g(或 10 mL)和 1 g(或 1 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(或 1 000 mL)、10 g(或 10 mL)和 1 g(或 1 mL)时,表内数字应相应降低 10 倍;如改用 10 g(或 10 mL)、1 g(或 1 mL)和 0.1 g(或 0.1 mL)时,则表内数字应相应增高 10 倍,其余类推。