

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2524.2—2010

进出口食品中变形杆菌检测方法 第2部分:MPN法

Determination of *Proteae* species in foods for import and export—
Part 2:MPN Method

2010-03-02 发布

2010-09-16 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
进出口食品中变形杆菌检测方法
第 2 部分:MPN 法

SN/T 2524.2—2010

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街 16 号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 15 千字

2010 年 5 月第一版 2010 年 5 月第一次印刷

印数 1—1 600

*

书号: 155066·2-20851 定价 16.00 元

前 言

SN/T 2524《进出口食品中变形杆菌检测方法》分为两个部分：

——第 1 部分：定性检测方法；

——第 2 部分：MPN 法。

本部分为 SN/T 2524 的第 2 部分。

本部分的附录 A 和附录 B 均为规范性附录。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：陈双雅、张永祥、蒋鲁岩、陈伟玲、王群力、祝长青、谢明星、刘棠、彭小莉、郭桂萍。

本部分系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

进出口食品中变形杆菌检测方法

第2部分:MPN法

1 范围

SN/T 2524 的本部分规定了食品中变形杆菌的 MPN 检测方法。

本部分适用于食品中普通变形杆菌、奇异变形杆菌、摩根摩根氏菌、产碱普罗威登斯菌的 MPN 检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 SN/T 2524 的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

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 SN/T 2524 的本部分。

3.1

变形杆菌 *Proteace*

通常将变形杆菌簇的细菌通称为变形杆菌。变形杆菌为肠杆菌科有动力的革兰氏阴性杆菌,无芽孢、无荚膜。分为三个独立的菌属,即变形杆菌属(*Proteus*)、摩根氏菌属(*Morganella*)和普罗菲登斯菌属(*Providencia*)。引起食物中毒的变形杆菌主要是普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、摩根摩根氏菌(*Morganella morganii*)和产碱普罗菲登斯菌(*Providencia alcalifaciens*)。

4 设备与材料

4.1 天平:最大称量 2 000 g,感量 0.1 g。

4.2 均质器。

4.3 培养箱:36 °C ± 1 °C。

4.4 冰箱:4 °C ~ -20 °C。

4.5 吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)或微量移液器及吸头。

4.6 试管:15 mm × 100 mm。

4.7 培养皿:直径 90 mm。

4.8 锥形瓶:250 mL 和 500 mL。

4.9 显微镜。

4.10 质控菌株:普通变形杆菌 ATCC 13315^T、奇异变形杆菌 ATCC 29906^T、摩根摩根氏菌 ATCC 25830^T、产碱普罗威登斯菌 ATCC 9886^T 或类似菌株。

4.11 API 20E 肠杆菌和其他革兰氏阴性杆菌鉴定试剂盒或类似产品。

4.12 VITEK 全自动微生物分析系统或类似设备。

注：API 20E 和 VITEK 是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，则可使用这些等效产品。

5 培养基及试剂

- 5.1 缓冲蛋白胨水(BPW):见附录 A 中第 A.1 章。
- 5.2 肠杆菌增菌肉汤(EE 肉汤):见附录 A 中第 A.2 章。
- 5.3 SS 琼脂:见附录 A 中第 A.3 章。
- 5.4 伊红美兰琼脂(EMB):见附录 A 中第 A.4 章。
- 5.5 麦康凯琼脂(MAC):见附录 A 中第 A.5 章。
- 5.6 苯丙氨酸琼脂斜面:见附录 A 中第 A.6 章。
- 5.7 培养基和试剂的配制遵循 SN/T 1538.1 和 SN/T 1538.2 的要求。

6 方法提要与流程

6.1 方法提要

应用“三管”增菌法,结合分离、生化鉴定等方法对食品中可能存在的致病性变形杆菌进行定量检测。

6.2 检测流程

检测流程图见图 1。

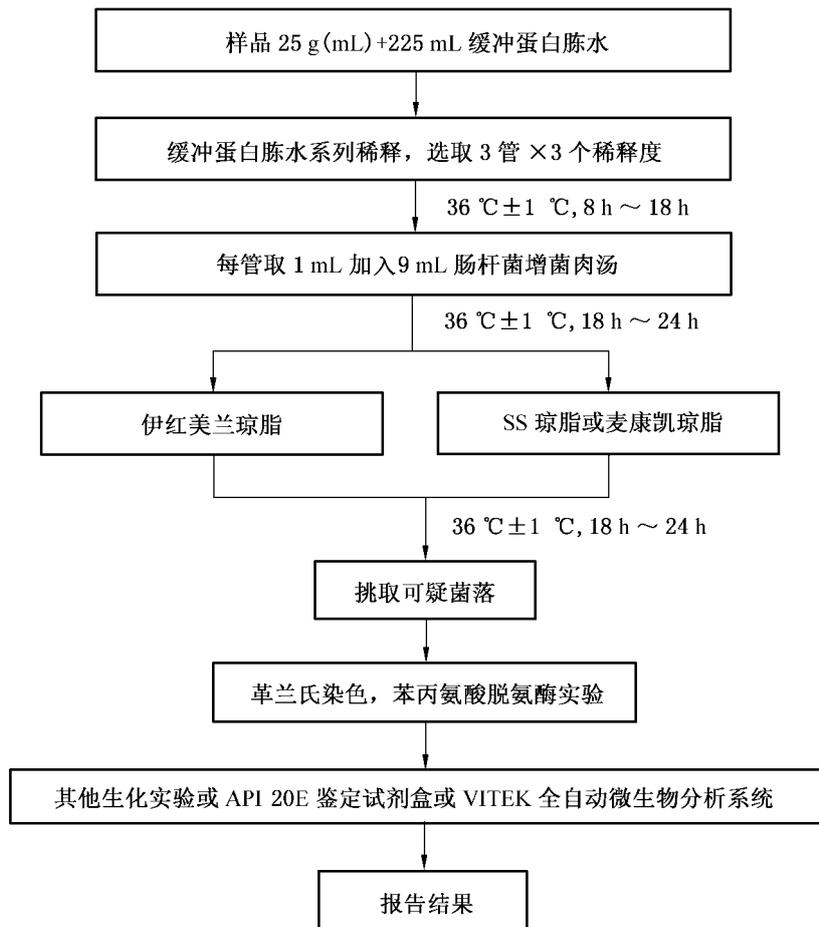


图 1 变形杆菌 MPN 检测流程图

7 检测步骤

7.1 样品制备

称取 25 g(mL)样品,放入无菌均质杯中,加入 225 mL BPW,以 8 000 r/min 均质 1 min~2 min;或放入无菌均质袋中,加入 225 mL BPW,用拍击式均质器拍打 1 min~2 min,制成 1:10 样品稀释液。冷冻样品应在 45 °C 以下不超过 15 min 或在 2 °C~5 °C 不超过 18 h 解冻。若不能及时检验,应放于 -15 °C 左右保存;非冷冻而易腐的样品应尽可能及时检验,若不能及时检验,应置于 6 °C~10 °C 冰箱保存,在 24 h 内检验。

7.2 前增菌

7.2.1 用灭菌吸管吸取增菌液 1 mL,注入含有 9 mL BPW 的试管内,振荡试管混匀,并依次制备 10 倍递增稀释液,每递增稀释一次,换用一支 1 mL 灭菌吸管。

7.2.2 根据对检样污染情况的估计,选择三个连续的适宜稀释度,最高稀释度应能达到获得阴性菌株。每个稀释度接种三支含有 9 mL BPW 的试管,每管接种 1 mL。于 36 °C±1 °C 培养 8 h~18 h。

7.3 选择性增菌

分别移取培养 8 h~18 h 的悬液各 1 mL 加入 9 mL EE 增菌液中,36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。

7.4 分离

7.4.1 在所有显示生长的试管或增菌液中用 3 mm 接种环沾取一环,分别接种于伊红美兰琼脂及 SS 琼脂(或麦康凯琼脂)平板各一个,三区法或四区法划线,以得到单个菌落。平板于 36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。

7.4.2 上述平板上如出现可疑菌落,至少应挑取 5 个疑似菌落,进行传代培养。如果平板上的目标可疑菌落少于 5 个,则应该全部挑取传代培养。按 7.5 进行鉴定。变形杆菌在 SS 琼脂和麦康凯琼脂上的菌落呈圆形,扁平,无色至淡粉色,半透明,表面光滑;在伊红美兰琼脂上,菌落呈灰白色,圆形,光滑。

7.5 鉴定

7.5.1 革兰氏染色与镜检

挑取可疑菌落涂片,进行革兰氏染色,镜检观察细菌形态。变形杆菌为革兰氏阴性杆菌,无芽孢、无荚膜、周生鞭毛、具运动性。

7.5.2 苯丙氨酸脱氨酶试验

7.5.2.1 挑取可疑菌落接种到苯丙氨酸琼脂斜面,36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。滴加 10%三氯化铁溶液 2 滴~3 滴,自斜面培养物上流下,苯丙氨酸脱氨酶阳性者呈棕黑色。

7.5.2.2 若挑取的可疑菌落苯丙氨酸脱氨酶均为阴性,则直接判定生化特性鉴定结果阴性。

7.5.2.3 若挑取的可疑菌落经涂片、染色和镜检为革兰氏染色阴性,且苯丙氨酸脱氨酶反应呈阳性,则按表 1 的生化试验进行细菌鉴定。也可以用 API 20E 生化鉴定试剂盒或 VITEK 生化鉴定系统进行鉴定。

表 1 变形杆菌有关细菌鉴别表

种类	普通变形杆菌	奇异变形杆菌	产粘变形杆菌	彭氏变形杆菌	摩根摩根氏菌	产碱普罗菲登斯菌	雷氏普罗菲登斯菌	斯氏普罗菲登斯菌	拉氏普罗菲登斯菌	海氏普罗菲登斯菌
苯丙氨酸脱氨酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
甘露糖发酵	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
麦芽糖发酵	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+

表 1 (续)

种类	普通变形杆菌	奇异变形杆菌	产粘变形杆菌	彭氏变形杆菌	摩根摩根氏菌	产碱普罗菲登斯菌	雷氏普罗菲登斯菌	斯氏普罗菲登斯菌	拉氏普罗菲登斯菌	海氏普罗菲登斯菌
吲哚产生	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
尿素酶	+	+	+	+	+	-	+	d	-	-
阿东醇发酵	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
肌醇发酵	-	-	-	-	-	-	+	+	-	d
木糖发酵	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
H ₂ S 产生	+	+	-	d	-	-	-	-	-	-
明胶液化(22 ℃)	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-
注：+，阳性；-，阴性；d，可变。										

7.5.3 生化特征

普通变形杆菌、奇异变形杆菌、摩根摩根氏菌、产碱普罗威登斯菌与其他变形杆菌细菌的生化特征见表 1。

8 报告结果

根据每一稀释度证实生化特性鉴定结果为阳性的试管管数，查最可能数(MPN)表(见附录 B)，报告每克(毫升)样品中变形杆菌的最近似数。

附 录 A
(规范性附录)
培养基与试剂

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(含 12 个结晶水)	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,混匀,静置约 10 min,加热煮沸至完全溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.1 , $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.2 肠杆菌增菌肉汤(EE 肉汤)**A.2.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钠	8.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
牛胆盐	20.0 g
煌绿	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

应使用纯净的牛胆盐和煌绿,减少对受损伤且数量极少的肠杆菌的生长抑制。将各成分加入蒸馏水中,加热煮沸,分装每瓶 90 mL。制成的培养基为绿色,可放置 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏柜保存,4 周内使用。

A.3 SS 琼脂**A.3.1 基础培养基****A.3.1.1 组成**

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	5.0 g
三号胆盐	3.5 g
琼脂	17.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.1.2 制法

按上述成分配好,加热使溶解, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min,保存备用。

A.3.2 完全培养基**A.3.2.1 组成**

基础培养基	1 000 mL
-------	----------

乳糖	10.0 g
柠檬酸钠	8.5 g
硫代硫酸钠	8.5 g
10%柠檬酸铁溶液	10.0 mL
1%中性红溶液	2.5 mL
0.1%煌绿溶液	0.33 mL

A.3.2.2 制法

加热溶化基础培养基,按比例加入上述除染料以外之各成分,充分混合均匀,调节 pH 至 7.0 ± 0.2 ,加入中性红和煌绿溶液,倾注平板。

注 1: 制好的培养基宜当日使用,或冷藏保存于冰箱内于 48 h 内使用。

注 2: 煌绿溶液配制好后应在 10 d 内使用。

注 3: 可以购用 SS 琼脂的干粉培养基。

A.4 伊红美蓝琼脂(EMB)

A.4.1 组成

蛋白胨	10.0 g
乳糖	10.0 g
磷酸氢二钾	2.0 g
琼脂	17.0 g
2%伊红 Y 溶液	20.0 mL
美蓝 0.5%水溶液	13.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

将蛋白胨、磷酸盐和琼脂溶解于蒸馏水中,调节 pH 至 7.1 ± 0.2 ,分装于烧瓶内,121 °C 高压灭菌 15 min,冷却至 $50\text{ °C} \sim 55\text{ °C}$,按无菌操作加入灭菌的乳糖、伊红和美蓝溶液,摇匀,倾注平板。

A.5 麦康凯琼脂(MAC)

A.5.1 组成

蛋白胨	17.0 g
胨	3.0 g
猪胆盐(或牛、羊胆盐)	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	17.0 g
蒸馏水	1 000 mL
乳糖	10.0 g
0.01%结晶紫水溶液	10.0 mL
0.5%中性红水溶液	5.0 mL

A.5.2 制法

除乳糖和指示液外,将其他成分配好,加热溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,分装于烧瓶内,121 °C 高压灭菌 15 min,冷却至 $50\text{ °C} \sim 55\text{ °C}$,按无菌操作加入灭菌的乳糖、结晶紫和中性红水溶液,摇匀后倾注平板。

结晶紫和中性红水溶液配好后应经高压灭菌。

A.6 苯丙氨酸琼脂斜面

A.6.1 组成

酵母浸膏	3.0 g
DL-苯丙氨酸	2.0 g
磷酸氢二钠	1.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制法

将各成分加热煮沸,121 °C 高压灭菌 15 min,分装斜面。

附 录 B
(规范性附录)

1 g(mL)样品中最可能数(MPN)表

采用三管法,接种量分别为 0.10 g(mL)、0.01 g(mL)、0.001 g(mL),每克样品的最可能数和 95% 可信度(见表 B.1)。

表 B.1

阳性管数			MPN/ g	95%置信限		阳性管数			MPN/ g	95%置信限	
0.10	0.01	0.001		最低值	最高值	0.10	0.01	0.001		最低值	最高值
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:表内所列接种量如改用 1 g(mL)、0.1 g(mL)、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)、0.000 1 g(mL)时,则表内数字应相应增加 10 倍,其余类推。



SN/T 2524.2-2010

书号:155066·2-20851

定价: 16.00 元