

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2524.1—2010

进出口食品中变形杆菌检测方法 第 1 部分：定性检测方法

Determination of *Proteaeae* species in food for import and export—
Part 1: Qualitative 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

前 言

SN/T 2524《进出口食品中变形杆菌检测方法》分为两部分：

——第 1 部分：定性检测方法；

——第 2 部分：MPN 方法。

本部分为 SN/T 2524 的第 1 部分。

本部分的附录 A 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：中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：蒋鲁岩、郭桂萍、陈双雅、徐邦兴、高洁湘、蒋原、薛峰、祝长青、陈国强。

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 1 部分:定性检测方法

1 范围

SN/T 2524 的本部分规定了乳与乳制品、肉与肉制品、水产品、蔬菜、蛋制品等 5 大类食品中变形杆菌的检测方法。

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、产碱普罗菲登斯菌的检测。

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 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 *Proteus*

变形杆菌簇(Proteaceae)的细菌统称为变形杆菌。它们是有动力的革兰氏阴性杆菌,分为三个独立的菌属,即变形杆菌属、摩根氏菌属和普罗菲登斯菌。目前报道的引起食物中毒的变形杆菌有普通变形杆菌、奇异变形杆菌、产碱普罗菲登斯菌和摩根摩根氏菌。

4 设备与材料

4.1 冰箱: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

4.2 恒温培养箱: $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

4.3 天平: $0\text{ g}\sim 500\text{ g}$,感量 0.5 g 。

4.4 均质器。

4.5 均质袋。

4.6 灭菌三角烧瓶: 500 mL , 250 mL 。

4.7 灭菌培养皿:直径 90 cm 。

4.8 显微镜: $10\times\sim 100\times$ 。

4.9 灭菌刀、剪子、镊子。

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。

5 培养基及试剂

- 5.1 肠杆菌增菌肉汤(EE 肉汤):见附录 A 中第 A.1 章。
- 5.2 革兰氏阴性菌增菌液(GN 增菌液):见附录 A 中第 A.2 章。
- 5.3 沙门氏菌和志贺氏菌琼脂(SS 琼脂):见附录 A 中第 A.3 章。
- 5.4 伊红美兰琼脂(EMB 琼脂):见附录 A 中第 A.4 章。
- 5.5 麦康凯琼脂(MAC 琼脂):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 革兰氏染色液:见附录 A 中第 A.7 章。
- 5.8 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

本方法采用增菌培养和分离鉴定的方法对变形杆菌进行定性检测。

6.2 检测流程

检测流程图见图 1。

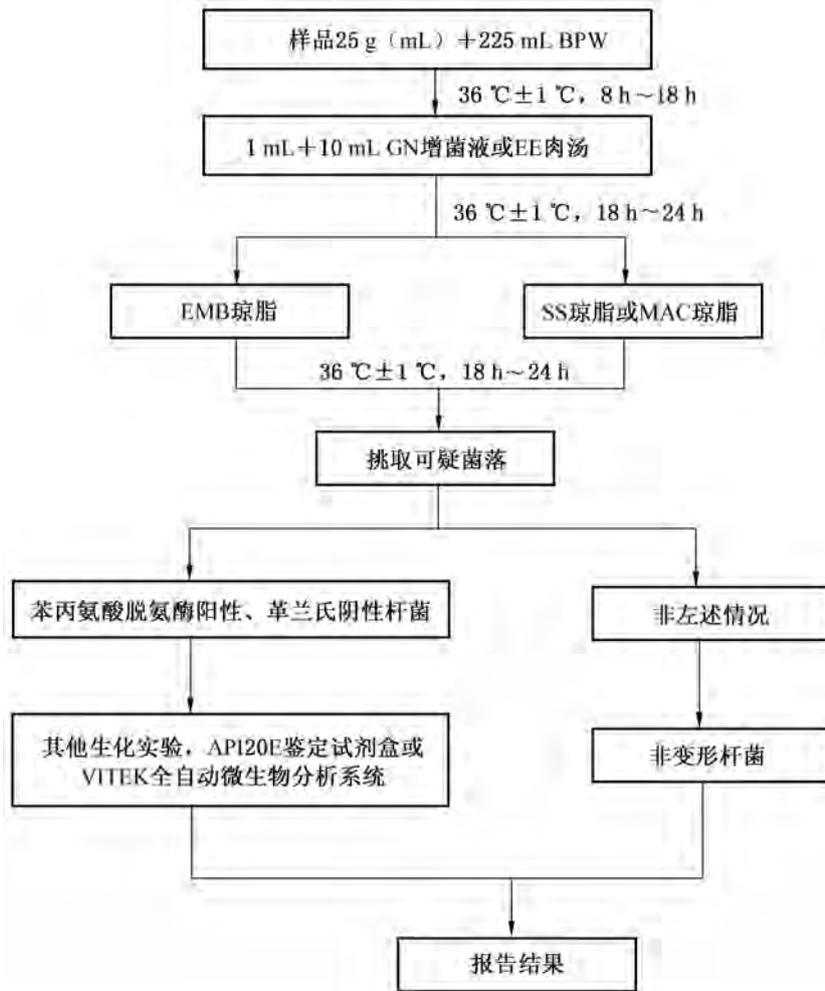


图 1 变形杆菌检测流程图

7 检测步骤

7.1 前增菌

称取 25 g(mL)样品,放入盛有 225 mL BPW 的无菌均质杯中,以 8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min,或置于盛有 225 mL BPW 的无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打 1 min~2 min,若样品为液态,不需要均质,振荡均匀。如需要,测定 pH 值,用 1 mol/L 无菌氢氧化钠或盐酸调 pH 值至 6.8 ± 0.2 。无菌操作,将样品转至 500 mL 锥形瓶中,如使用均质袋,可直接进行培养,于 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 8 h~18 h。

如为冷冻样品,应在 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 以下不超过 15 min,或 $2 \text{ }^\circ\text{C} \sim 5 \text{ }^\circ\text{C}$ 不超过 18 h 解冻。

7.2 增菌

轻轻摇动培养过的样品混合物,移取 1 mL,转种于 10 mL GN 增菌液或 EE 肉汤内,于 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

7.3 分离

以接种环取增菌液一环,划线接种于 EMB 琼脂平板和 SS 琼脂平板(或 MAC 琼脂),于 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 分别培养 18 h~24 h。变形杆菌在 EMB 琼脂上,菌落呈灰白色,圆形,光滑;在 SS 琼脂和 MAC 琼脂上的菌落呈圆形,扁平,无色至淡粉色,半透明,表面光滑。

7.4 鉴定

7.4.1 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。

7.4.2 苯丙氨酸脱氨酶试验

挑取可疑菌落接种到苯丙氨酸琼脂斜面, $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 6 h~8 h 或 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。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,按第 8 章报告结果。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,应进一步生化鉴定或用 API20E 生化鉴定试剂盒、VITEK 生化鉴定系统进行鉴定。

7.4.3 生化特征

普通变形杆菌、奇异变形杆菌、摩根摩根氏菌、产碱普罗威登斯菌生化特征见表 1。

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	摩根摩根氏菌	产碱普罗非登斯菌
苯丙氨酸脱氨酶	+	+	+	+
甘露糖醇发酵	—	—	+	+
鸟氨酸脱羧酶	—	+	+	—
麦芽糖发酵	+	—	—	—
吲哚产生	+	—	+	+
尿素酶	+	+	+	—
阿东醇发酵	—	—	—	+
肌醇发酵	—	—	—	—
木糖发酵	+	+	—	—
H ₂ S 产生	+	+/(+)	—	—
西蒙氏柠檬酸盐	d	+	+	—
明胶液化(22 °C)	+	+	—	—

注: + 阳性;— 阴性;+/(+)大部分菌株阳性,有少数菌株迟缓阳性;d 有不同的反应。

8 报告结果

生化特性鉴定结果为阳性,则报告每 25 g 样品中检出何种变形杆菌;若为阴性,则报告每 25 g 样品中未检出变形杆菌。

附 录 A
(规范性附录)
培养基与试剂

A.1 EE 肉汤**A.1.1 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.1.2 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 ℃~8 ℃冷藏柜保存,4 周内使用。

A.2 GN 增菌液**A.2.1 成分**

胰蛋白胨	20.0 g
葡萄糖	1.0 g
甘露醇	2.0 g
柠檬酸钠	5.0 g
去氧胆酸钠	0.5 g
磷酸氢二钾	4.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

按上述成分配好,加热使溶解,校正 pH。分装每瓶 225 mL,115 ℃灭菌 15 min,备用。

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 ℃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 EMB 琼脂

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 MAC 琼脂

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。

A.7 革兰氏染色法

A.7.1 结晶紫染色液

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

将结晶紫溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

A.7.2 革兰氏碘液

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

将碘与碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许,充分振摇,完全溶解后,再加蒸馏水 300 mL。

A.7.3 复染液

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.7.4 染色法

A.7.4.1 将涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染色液,染 1 min,水洗。

A.7.4.2 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。

A.7.4.3 滴加 95%乙醇脱色,约 30 s;或将乙醇滴满整个涂片,立即倾去,再用乙醇滴满整个涂片,脱色 10 s。

A.7.4.4 水洗,滴加复染液,复染 1 min,水洗,待干,镜检。

A.7.4.5 结果

革兰氏阳性菌呈紫色。革兰氏阴性菌呈红色。

注 1: 亦可用 1:10 稀释石炭酸复红染色液作复染液,复染时间仅需 10 s。

注 2: 本方法中使用的所有培养基有市售的半成品和成品,可选择使用干燥培养基。

注 3: 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。

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 1 部分：定性检测方法
SN/T 2524.1—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 14 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：155066·2-20850 定价 16.00 元



SN/T 2524.1—2010