

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2099—2008

进出口食品中绿脓杆菌检测方法

Determination of *Pseudomonas aeruginosa* in food for import and export

2008-07-17 发布

2009-02-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国 家 质 量 监 督 检 验 检 疫 总 局

前 言

本标准的附录 A、附录 B 均为规范性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国福建出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：郑晶、黄晓蓉、赵贵明、翁国柱、吴芸芸、郑麟毅、陈彬、邵碧英。

本标准系首次发布的出入境检验检疫标准。

进出口食品中绿脓杆菌检测方法

1 范围

本标准规定了食品中绿脓杆菌的定性和定量检测方法。

本标准适用于各类食品中的绿脓杆菌检测,可参考此法检测水的绿脓杆菌。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。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标准,然而,鼓励根据本标准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标准。

GB/T 4789.28—2003 食品微生物学检验 染色法、培养基和试剂

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

绿脓杆菌属假单胞菌属(*pseudomonas*)

亦名为铜绿假单胞菌,具荚膜、鞭毛,为无芽胞的革兰氏阴性杆菌,能分解蛋白质,发酵糖类能力较低,能产生两种水溶性色素:一种是绿脓菌素,为蓝绿色的吩嗪类化合物,无荧光性,另一种为荧光素,呈绿色。

4 设备和材料

4.1 恒温培养箱:36℃±1℃、42℃。

4.2 显微镜:带油镜头。

4.3 均质器。

4.4 高压灭菌器。

4.5 天平:精度 0.1 g。

4.6 VITEK 全自动微生物鉴定系统或类似设备。

注:VITEK 是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,则可使用这些等效产品。

4.7 吸管:1 mL,分刻度 0.1 mL;10 mL,分刻度 1 mL。

4.8 可调移液器:10 μL~100 μL,100 μL~1 000 μL。

4.9 试管:15 mm×100 mm。

4.10 灭菌平皿:直径 90 mm,底部平整的玻璃或一次性塑料灭菌平皿。

4.11 灭菌的样品处理器具:镊子、剪刀、勺子。

4.12 质控菌株:绿脓杆菌标准菌株 ATCC 9027,恶臭假单胞菌 ATCC 49128 或其他经过验证的具有相同生物学特征的同类菌株。

5 培养基和试剂

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,试验用水应符合 GB/T 6682 的规定。

5.1 SCDLP 增菌液:见第 A.1 章。

5.2 磷酸盐缓冲稀释液:见第 A.2 章。

- 5.3 假单胞菌 CFC 选择性培养基:见第 A.3 章。
- 5.4 假单胞菌 CN 选择性培养基:见第 A.4 章。
- 5.5 氧化酶试验:按 GB/T 4789.28—2003 中 3.18 规定。
- 5.6 乙酰胺培养基:见第 A.5 章。
- 5.7 葡萄糖酸盐培养基:见第 A.6 章。
- 5.8 精氨酸双水解酶培养基:见第 A.7 章。
- 5.9 硝酸盐蛋白胨水培养基:见第 A.8 章。
- 5.10 明胶培养基:见第 A.9 章。
- 5.11 赖氨酸脱羧酶培养基;见第 A.10 章。
- 5.12 营养琼脂:见第 A.11 章。
- 5.13 API 20NE 测试条。
- 5.14 GNI⁺ 测试卡。

注: API 20NE 测试条和 GNI⁺ 测试卡是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,则可使用这些等效产品。

6 检验程序

6.1 方法提要

食品中绿脓杆菌的检验方法是通过选择性增菌、分离、生化鉴定等方法对食品中可能存在的绿脓杆菌进行定性和定量的检验。

6.2 检验程序

绿脓杆菌的检验程序见图 1。

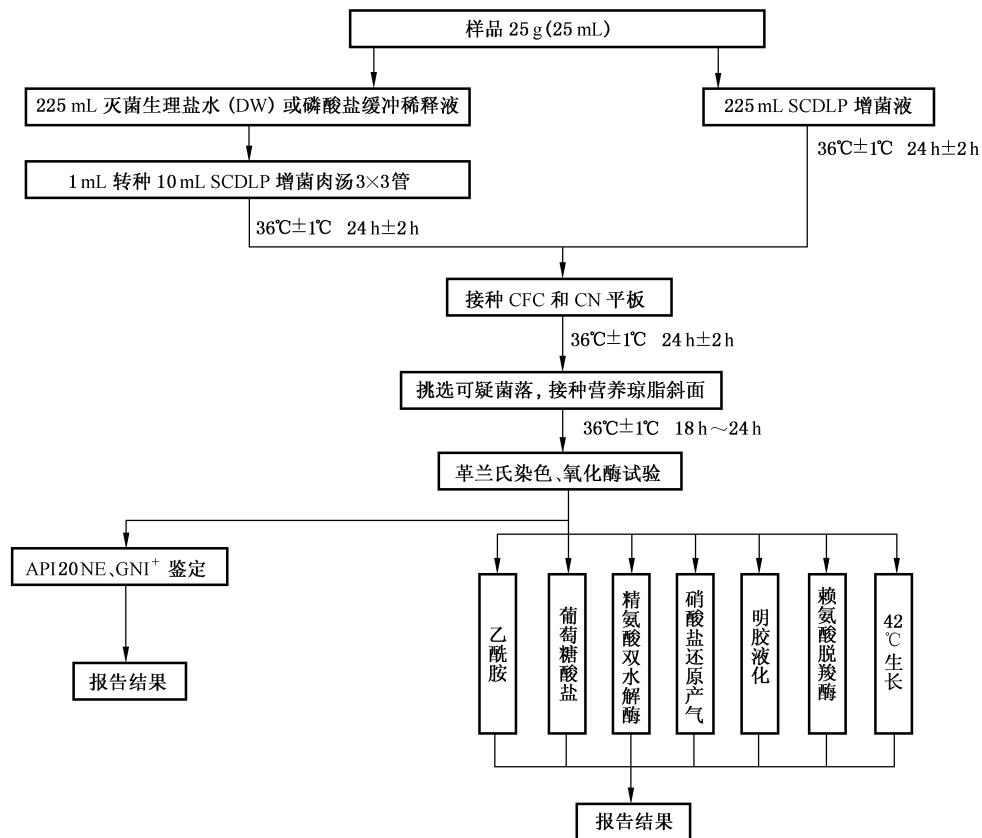


图 1 绿脓杆菌检验程序示意图

7 检验步骤

7.1 样品的存放

如为冷冻样品,应于 2℃~5℃解冻,且不超过 18 h,若不能及时检验,应置于小于-15℃保存。非冷冻的易腐样品应尽可能及时检验,若不能及时检验,应置于 4℃冰箱保存,并在 24 h 内检验。

7.2 绿脓杆菌定性检验

7.2.1 按无菌操作取检样 25 g(25 mL)至 225 mL SCDLP 增菌液中,充分摇匀,于 36℃±1℃培养 24 h±2 h。

7.2.2 接种 SCDLP 增菌培养物按 7.4 进行分离鉴定。

7.3 绿脓杆菌定量检验(MPN 法)

7.3.1 无菌操作取样品 25 g(25 mL),放入灭菌均质杯或均质袋中,加 225 mL 灭菌生理盐水或磷酸盐缓冲稀释液,均质混匀,制成 1:10 稀释液。

7.3.2 用 10 mL 灭菌吸管吸取 1:10 稀释液 10 mL,加入装有 90 mL 灭菌生理盐水或磷酸盐缓冲稀释液的广口瓶中,混合均匀,制成 1:100 稀释液。

7.3.3 每一稀释度换取一支 10 mL 灭菌吸管,按上述操作进行 10 倍递增稀释。

7.3.4 根据对样品污染情况的估计,选择三个连续适宜的稀释度。每个稀释度接种三管 SCDLP 肉汤,每管接种 1 mL。样品的最高稀释度应达到能获得阴性终点,置 36℃±1℃培养 24 h±2 h。如有绿脓杆菌生长,培养液表面通常有一层薄菌膜,培养液常呈黄绿色或蓝绿色。

7.4 分离鉴定

7.4.1 分离培养

每份增菌液用接种环分别划线接种于 CFC 平板和 CN 平板,置 36℃±1℃培养 24 h±2 h,观察菌落形态。绿脓杆菌在这两种平板上通常呈现圆形、平滑、湿润的黄绿色菌落,在紫外光照射下可观察到荧光。少数不形成黄绿色菌落,但有特殊芳香气味。从每个平板上挑取 5 个可疑菌落,分别接种到营养琼脂斜面上,36℃±1℃培养 18 h~24 h,取纯培养物进行鉴定。

7.4.2 氧化酶试验

挑取斜面上的纯培养物,按 GB/T 4789.28—2003 中 3.18 进行氧化酶试验,绿脓杆菌氧化酶试验呈阳性。

7.4.3 革兰氏染色

挑取斜面上的纯培养物,按 GB/T 4789.28—2003 中 2.2 进行革兰氏染色,绿脓杆菌为革兰氏阴性杆菌。

7.4.4 鉴定

革兰氏染色阴性、氧化酶阳性的培养物应用 API 20NE 测试条、VITEK 生化鉴定系统或按 7.4.5~7.4.11 进行生化鉴定。

7.4.5 乙酰胺试验

挑取斜面上的纯培养物,接种到乙酰胺培养基中,置 36℃±1℃培养 24 h±2 h,培养基不变色为阴性,红色为阳性。

7.4.6 葡萄糖酸盐试验

挑取斜面上的纯培养物,接种到葡萄糖酸盐培养基中,置 36℃±1℃培养 24 h±2 h,加 0.5 mL 班氏糖定性试剂,混匀,煮沸 1 min,冷却后观察。蓝色为阴性,黄色或砖红色沉淀为阳性。

7.4.7 精氨酸双水解酶试验

挑取斜面上的纯培养物,接种到精氨酸双水解酶培养基中,置 36℃±1℃培养 24 h±2 h,培养基不变色为阴性,红色为阳性。

7.4.8 硝酸盐还原产气试验

挑取斜面上的纯培养物,接种到硝酸盐还原胨水培养基中,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$,小倒管中有气体者,即为阳性。

7.4.9 明胶液化试验

挑取斜面上的纯培养物,穿刺接种到明胶培养基中,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$,取出放 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱 $10\text{ min}\sim 30\text{ min}$,仍呈溶解状为明胶液化试验阳性,凝固不溶为阴性。

7.4.10 赖氨酸脱羧酶试验

挑取斜面上的纯培养物,接种到赖氨酸脱羧酶培养基中,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$,黄色为阴性,紫红色为阳性。

7.4.11 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生长试验

挑取斜面上的纯培养物,接种在普通琼脂斜面培养基上,放在 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\sim 48\text{ h}$,能生长为阳性。

7.4.12 假单胞菌属细菌生化特性

特性见表 1。

表 1 假单胞菌属细菌生化特性

生化试验	绿脓杆菌	荧光假单胞菌	恶臭假单胞菌	施氏假单胞菌
氧化酶	+	+	-	-
乙酰胺	+	-	-	-
葡萄糖酸盐	+	-	-	-
精氨酸双水解酶	+	+	+	+
硝酸盐还原产气	+	-	-	+
明胶液化	+	-	-	-
赖氨酸脱羧酶	-	+	-	-
$42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生长	+	-	-	-

注: + 表示阳性; - 表示阴性。

7.5 结果报告

7.5.1 定性检验结果报告:符合表 1 中生化特性,或 API20NE 和 VITEK 生化鉴定为绿脓杆菌,报告样品中是否检出绿脓杆菌。

7.5.2 定量检验结果报告:符合表 1 中生化特性,或 API20NE 和 VITEK 生化鉴定为绿脓杆菌,根据每一稀释度的阳性管数差 MPN 表(见附录 B),计算并报告每克(毫升)样品中绿脓杆菌 MPN 值。

附 录 A
(规范性附录)
培 养 基

A.1 SCDLP 液体培养基

A.1.1 成分

酪蛋白胨	17.0 g
大豆蛋白胨	3.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
卵磷脂	1.0 g
吐温-80	7.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2±0.1	

A.1.2 制法

将上述各成分加热煮沸至完全溶解,调节 pH,分装适宜容器,121 °C 高压灭菌 20 min。

A.2 磷酸盐缓冲稀释液

A.2.1 贮存液

A.2.1.1 成分

磷酸二氢钾	34.0 g
蒸馏水	500 mL

A.2.1.2 制法

用大约 175 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2,用蒸馏水稀释至 1 000 mL 后贮存于冰箱中。

A.2.2 稀释液

用蒸馏水稀释 1.25 mL 贮存液至 1 000 mL,分装于适宜容器,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.3 假单胞菌 CFC 选择性培养基

A.3.1 基础培养基

A.3.1.1 成分

蛋白胨	20.0 g
硫酸钾	10.0 g
氯化镁	1.4 g
十六烷三甲基溴化胺	0.3 g
琼脂	13.6 g
丙三醇	10 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2±0.2	

A. 3. 1. 2 制法

除琼脂外,将其余成分溶解于蒸馏水中,调节 pH,加入琼脂,加热溶解,分装适宜容器,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A. 3. 2 CFC 添加剂**A. 3. 2. 1 成分**

十六烷三甲基溴化胺	5.0 mg
头孢菌素	25.0 mg
夫西地酸	5.0 mg

A. 3. 2. 2 制法

取无菌水和无水乙醇各 1 mL 混合均匀,将上述成分溶解于混合液中,摇匀,备用。

A. 3. 3 使用方法

待基础培养基冷却至 50 °C 左右,每 500 mL 基础培养基加入 2 mL 添加剂,倾注无菌平板。

A. 4 假单胞菌 CN 选择性培养基**A. 4. 1 基础培养基****A. 4. 1. 1 成分**

蛋白胨	16.0 g
水解酪蛋白	10.0 g
硫酸钾	10.0 g
氯化镁	1.4 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.1±0.2	

A. 4. 1. 2 制法

除琼脂外,将其余成分溶解于蒸馏水中,调节 pH,加入琼脂,加热溶解,分装适宜容器,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A. 4. 2 CN 添加剂**A. 4. 2. 1 成分**

十六烷三甲基溴化胺	100.0 mg
-----------	----------

A. 4. 2. 2 制法

取无菌水和无水乙醇各 1 mL 混合均匀,将上述成分溶解于混合液中,摇匀,备用。

A. 4. 3 使用方法

待基础培养基冷却至 50 °C 左右,每 500 mL 基础培养基加入 2 mL 添加剂,摇匀后倾注平板。

A. 5 乙酰胺培养基**A. 5. 1 成分**

乙酰胺	9.5 g
氯化钠	4.5 g
磷酸氢二钾	1.4 g
磷酸二氢钾	0.7 g
硫酸镁	0.3 g
酚红	0.012 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.2±0.1

A.5.2 制法

将上述各成分加热溶解,调节 pH,分装小试管,121 °C 高压灭菌 20 min,备用。

A.6 葡萄糖酸盐培养基

A.6.1 成分

蛋白胨	15 g
酵母粉	10 g
磷酸氢二钾	10 g
葡萄糖酸钾	400 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 6.8~7.2

A.6.2 制法

将上述各成分加热溶解,调节 pH,分装小试管,116 °C 高压灭菌 20 min,备用。

A.7 精氨酸双水解酶培养基

A.7.1 成分

酵母粉	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
氯化钠	30.0 g
L-精氨酸	5.0 g
溴甲酚紫	0.016 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 6.7±0.1

A.7.2 制法

除溴甲酚紫外,将其他成分加热溶解煮沸,调节 pH,加入溴甲酚紫,混匀,分装小试管,121 °C 高压灭菌 10 min,备用。

A.8 硝酸盐蛋白胨水培养基

A.8.1 成分

蛋白胨	10.0 g
酵母浸膏	3.0 g
硝酸钾	2.0 g
亚硝酸钠	0.5 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.2±0.1

A.8.2 制法

将蛋白胨和酵母浸膏加到蒸馏水中,加热溶解,调节 pH,煮沸过滤后补足液量,加入硝酸钾和亚硝酸钠,溶解混匀,分装到加有小倒管的试管中,115 °C 高压灭菌 20 min,备用。

A.9 明胶培养基

A.9.1 成分

牛肉膏	3.0 g
-----	-------

蛋白胨	5.0 g
明胶	120 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.4±0.1	

A. 9.2 制法

将各成分加在蒸馏水中浸泡 20 min,随时搅拌加热使溶解,调节 pH,分装于试管内,115 °C 高压灭菌 20 min,直立制成高层备用。

A. 10 赖氨酸脱羧酶培养基

A. 10.1 成分

酵母粉	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
L-赖氨酸	5.0 g
溴甲酚紫	0.016 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 6.7±0.1	

A. 10.2 制法

除溴甲酚紫外,将其他成分加热溶解煮沸,调节 pH,加入溴甲酚紫,混匀,分装小试管,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A. 11 营养琼脂

A. 11.1 成分

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2~7.4	

A. 11.2 制法

除琼脂外,将其余成分溶解于蒸馏水中,调节 pH,加入琼脂,加热溶解,分装试管,121 °C 高压灭菌 15 min,制成斜面备用。

附录 B

(规范性附录)

绿脓杆菌最大可能数(MPN)检索表

表 B.1 接种量为 0.1 g(mL)、0.01 g(mL)、0.001 g(mL)时三管法的 MPN 表

阳性管数			MPN	阳性管数			MPN
0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001	
0	0	0	<3.0	2	0	0	9.1
0	0	1	3.0	2	0	1	14
0	0	2	6.0	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3.0	2	1	0	15
0	1	1	6.1	2	1	1	20
0	1	2	9.2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	24
0	2	0	6.2	2	2	0	21
0	2	1	9.3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9.4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3.6	3	0	0	23
1	0	1	7.2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7.3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1 100
1	3	3	29	3	3	3	>1 100

注：如果接种量扩大十倍，分别为 1 g(mL)、0.1 g(mL)、0.01 g(mL)时，表中数字相应缩小十倍。
如果接种量缩小十倍，分别为 0.01 g(mL)、0.001 g(mL)、0.000 1 g(mL)时，表中数字相应扩大十倍。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
进出口食品中绿脓杆菌检测方法
SN/T 2099—2008

*

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

*

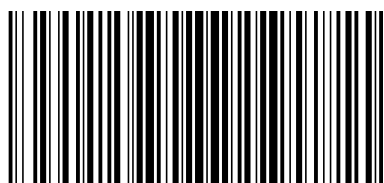
开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 19 千字

2008年9月第一版 2008年9月第一次印刷

印数 1—2 000

*

书号: 155066·2-19086 定价 10.00 元



SN/T 2099-2008