

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

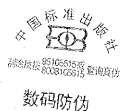
SN/T 2552.13—2010

### 乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第 13 部分:假单孢菌属的分离与计数

Microbiological examination for milk and milk products hygiene—  
Part 13: Isolation and enumeration of *Pseudomonas* spp.

2010-05-27 发布

2010-12-01 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 2552《乳及乳制品卫生微生物学检验方法》分为十三个部分：

- 第1部分：取样指南；
- 第2部分：检验样品的制备与稀释；
- 第3部分：酵母、霉菌菌落计数；
- 第4部分：嗜冷菌微生物菌落计数；
- 第5部分：沙门氏菌检验；
- 第6部分：柠檬酸杆菌检验；
- 第7部分：阴沟肠杆菌检验；
- 第8部分：普通变形杆菌和奇异变形杆菌检验；
- 第9部分：克雷伯氏菌检验；
- 第10部分：阪崎肠杆菌检验 免疫荧光法；
- 第11部分：蜡样芽孢杆菌的分离与计数；
- 第12部分：单核细胞增生李斯特氏菌检测与计数；
- 第13部分：假单胞菌属的分离与计数。

本部分是 SN/T 2552 的第 13 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分参照了 ISO 13720:1995《肉及肉制品假单胞菌属计数方法》(Meat and meatproducts—Enumeration of *Pseudomonas* spp.)。

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：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国福建出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：赵贵明、赵勇胜、郑晶、黄晓蓉。

# 乳及乳制品卫生微生物学检验方法

## 第 13 部分:假单胞菌属的分离与计数

### 1 范围

SN/T 2552 的本部分规定了乳及乳制品中假单胞菌属的分离与计数方法。  
本部分适用于乳及乳制品中假单胞菌属的分离与计数。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件,凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

SN/T 2552.1 乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第 1 部分:取样指南

SN/T 2552.2 乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第 2 部分:检验样品的制备与稀释

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

假单胞菌属 *Pseudomonas* spp.

按照该项标准操作、25℃培养,在 CFC 琼脂上形成菌落的一类菌。

### 4 原理

#### 4.1 样品处理

如果样品为液体,平行接种一定数量试验样品于固体选择性平板;如果样品为固体,则首先将样品制成悬液,接种样品后于 25℃下需氧培养 48 h。

#### 4.2 假单胞菌属数量计算

从平板上挑取菌落经氧化酶试验和克氏双糖铁试验确证后,计算获得每毫升、每克样品中假单胞菌属数量。

### 5 设备和材料

5.1 水浴箱:水温 45.5℃±0.2℃。

5.2 温度计:量程 1℃~55℃,分刻度 0.1℃。

5.3 培养箱:35℃~37℃和 24℃~26℃。

5.4 吸管:1 mL、5 mL 和 10 mL,分刻度 0.1 mL。

5.5 “L”型玻璃涂布棒:直径 3 mm~4 mm,可涂布 45 mm~55 mm 的区域。

5.6 接种环:3 mm 直径。

5.7 天平:量程 2 kg,灵敏度 0.1 g。

- 5.8 灭菌样品处理器具:取样勺、剪刀、开罐器。
- 5.9 样品稀释瓶:100 mL、125 mL、160 mL、250 mL 和 2 L 样品稀释瓶。
- 5.10 15 mm×150 mm 灭菌平皿。
- 5.11 假单孢菌属标准质控菌株:铜绿假单孢菌,ATCC 10145;荧光假单孢菌,ATCC 13525。

## 6 培养基和试剂

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,试验用水应为蒸馏水。

- 6.1 CFC 琼脂:见附录 A 第 A.1 章。
- 6.2 营养琼脂(NA):见附录 A 第 A.2 章。
- 6.3 克氏双糖铁:见附录 A 第 A.3 章。
- 6.4 氧化酶试剂:见附录 A 第 A.4 章。
- 6.5 API 20NE 生化鉴定试剂盒或类似产品。

注:API 20NE 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部分的使用者,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。

## 7 假单孢菌属检验方法

### 7.1 方法提要

乳及乳制品中假单孢菌是通过选择性分离、生化鉴定等方法对乳及乳制品中可能存在的假单孢菌进行定性和定量的检验。

### 7.2 检验程序

假单孢菌属检验程序见图 1。

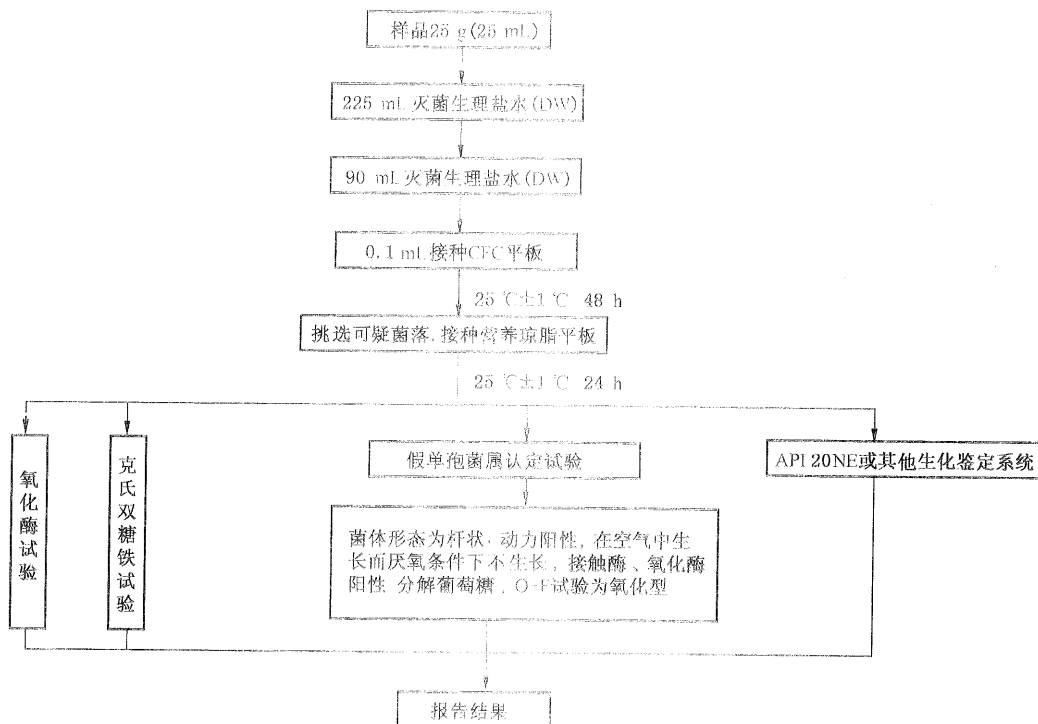


图 1 假单孢菌属检验程序

## 8 检验步骤

### 8.1 制备样品

取样按照 SN/T 2552.1 执行。无菌称取样品 25 g(或 mL)加入 500 mL 样品稀释瓶中,加入 225 mL 灭菌盐水(1:10 稀释),或者将样品直接称量到装有 225 mL 灭菌生理盐水的样品稀释瓶中,振荡使样品充分混匀,混合均匀后,取 10 mL 悬浮液于 90 mL 灭菌盐水(1:100 稀释)进行稀释,必要时采用相同方法进一步 10 倍稀释。其他乳制品在制样时按 SN/T 2552.2 进行。

### 8.2 接种样品

取两个 CFC 琼脂平板,分别移取初始悬液 0.1 mL 用灭菌玻璃涂布棒涂布于该平板上,待表面干燥后翻转平板于 25 °C ± 1 °C 培养 48h。对系列 10 倍稀释液用同样方法操作。

### 8.3 假单孢菌属的计数和菌落选择

培养 48h 后,对平板进行菌落计数,保留菌落在 15 个~300 个范围的平板,从每块平板上随机选择 5 个可疑菌落。从平板上挑取 5 个菌落划线接种于营养琼脂平板,25 °C 培养 24 h,选择菌落进行生化反应确认试验。

### 8.4 生化确认试验

#### 8.4.1 氧化酶试验

按附录 A 配方将试剂溶于蒸馏水中(用前配制),待溶解后,用该试剂将滤纸润湿,用塑料材质或铂丝制成的接种针挑取菌落涂于滤纸条上在 5 s~10 s 内观察颜色反应,如果出现紫色即为阳性,反之为阴性。商品化试剂按使用说明操作。

#### 8.4.2 克氏双糖铁试验

挑取进行氧化酶试验的相同菌落在斜面划线,并穿刺于克氏双糖铁底部,25 °C 培养 24 h。假单孢菌属细菌为氧化酶阳性,且仅在克氏双糖铁试管斜面生长。

#### 8.4.3 其他鉴别试验

可进行符合假单孢菌属生物学特性的七项认定试验:菌体形态为杆状,动力阳性,在空气中生长而厌氧条件下不生长,接触酶、氧化酶阳性,分解葡萄糖,O-F 试验为氧化型。

也可应用 API 20NE 生化鉴定试剂或其他相当生化鉴定系统进行鉴定。

## 9 结果描述

### 9.1 计算方法

鉴定之后,计算每块平板得到鉴定的假单孢菌属数量,按式(1)计算:

$$a = \frac{b}{A} \times C \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

$a$  ——每块平板的假单孢菌数;

$A$  ——挑选的可疑菌落数(5 个);

$b$  ——可疑菌落中与标准一致的菌落数；

$C$  ——平板上总菌数。

用式(2)计算样品中所含假单胞菌数：

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots(2)$$

式中：

$N$  ——样品中所含假单胞菌数；

$\sum a$  ——所有保留平板上经过鉴定的假单胞菌属数量之和；

$V$  ——每块平板接种液体积，单位为毫升(mL)；

$n_1$  ——第1个稀释度保留平板的数量；

$n_2$  ——第2个稀释度保留平板的数量；

$d$  ——稀释倍数。

### 9.2 结果报告

经生化鉴定确认后，进行计算，报告每克(或毫升)样品中的假单胞菌属菌落数值，以 CFU/g 或 CFU/mL 表示。

附 录 A  
(规范性附录)  
培养基和试剂

### A.1 CFC 琼脂(十六烷三甲基溴化氨、梭链孢酸钠、头孢菌素 II 琼脂)

#### A.1.1 基础成分

明胶胨	16.0 g
酸水解酪蛋白	10.0 g
硫酸钾	10.0 g
氯化镁	1.4 g
琼脂	12.0 g~18.0 g(取决于胶的强度)
蒸馏水	1 000 mL

#### A.1.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,加热并不断搅拌,煮沸 1 min,使琼脂溶解,分装适当的容器,121 °C 高压灭菌 15 min,25 °C 下最终 pH 为 7.2±0.2。

#### A.1.3 抑制剂

十六烷三甲基溴化氨、梭链孢酸钠、头孢菌素 II 琼脂各 0.1 g,分别溶解于 100 mL 蒸馏水中,过滤除菌。使用时按每 100 mL 基础培养基(47 °C 下)加十六烷三甲基溴化氨 1 mL,梭链孢酸钠 1 mL,头孢菌素 II 琼脂 5 mL,混匀,倾注平板,用前在安全柜中半开盖子放置 30 min 使表面干燥,制好的平板可在 0 °C~5 °C 保存 1 个月。

### A.2 营养琼脂(NA)

#### A.2.1 成分

肉浸出粉	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	12.0 g~18.0 g
蒸馏水	1 000 mL

#### A.2.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,加热煮沸,使各成分完全溶解,于 25 °C 下调节 pH 至 7.0±0.2。121 °C 灭菌 20 min 备用。

### A.3 克氏双糖铁琼脂

#### A.3.1 成分

牛肉浸粉	3.0 g
------	-------

酵母浸粉	3.0 g
胰酪胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
硫酸亚铁铵 $[\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$	0.5 g
硫代硫酸钠 $[\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$	0.5 g
酚红	0.025 g
琼脂	12.0 g~18.0 g
蒸馏水	1 000 mL

#### A.3.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,加热煮沸,分装每管 10 mL,灭菌后于 25 ℃ 下调节 pH 至 7.4±0.2,121 ℃ 灭菌 20 min,4 周内使用。

#### A.4 氧化酶试验试剂

##### A.4.1 成分

四甲基对苯二胺	1.0 g
蒸馏水	100 mL

##### A.4.2 制法

将四甲基对苯二胺溶于蒸馏水即可。使用新鲜配制的试剂,如放置于冷藏柜,可在配制后 7 d 内使用。



中华人民共和国出入境检验检疫  
行业标准  
乳及乳制品卫生微生物学检验方法  
第13部分：假单孢菌属的分离与计数  
SN/T 2552.13—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](http://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 12 千字  
2010年10月第一版 2010年10月第一次印刷  
印数 1—1 600

\*

书号：155066·2-21215 定价 16.00 元



SN/T 2552.13—2010