

SN

中华人民共和国进出口商品检验行业标准

SN/T 0738—1997

出口食品中肠杆菌科检验方法

Method for determination of
Enterobacteriaceae in food for export

1997-12-22 发布

1998-05-01 实施

中华人民共和国国家进出口商品检验局 发布

前 言

本标准是根据 GB/T 1.1—1993《标准化工作导则 第1单元:标准的起草与表述规则 第1部分:标准编写的基本规定》,对标准的起草与表述规则中标准编写的基本规定,参照 ISO 8523:1991,ISO 7402:1993 和 NMKL.144:1992 检验方法,研制了对损伤细菌带恢复的最近似值(MPN)法,在增菌培养基、培养时间、生化确认和结果的计算与表述等方面均有较大的改进,经试验和验证试验后编写的。

本标准的附录 A、附录 B 都是标准的附录。

本标准的附录 C 是提示的附录。

本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国天津进出口商品检验局、中华人民共和国辽宁进出口商品检验局。

本标准主要起草人:齐素瑛、姚霞、唐守亭、秦诚。

本标准系首次发布的行业标准。

中华人民共和国进出口商品检验行业标准

出口食品中肠杆菌科检验方法

SN/T 0738—1997

Method for determination of Enterobacteriaceae in food for export

1 范围

本标准规定了出口冻水产品、冻、烤禽肉、速冻方便食品、干燥食品、糖果食品中肠杆菌科定量检验方法。

本标准适用于出口冻鱼片、冻贝肉、冻鸡肉、冻烤鸭、冻菜卷、冻春卷、冻饺子、冻八宝袋、冻莲藕塞肉、脱水蔬菜、奶粉、方便面、挂面、饼干、糖果中肠杆菌科定量检验，其他食品可参照使用。

2 引用标准

下列标准所包含的条文，通过在本标准中引用而构成本标准的条文。本标准出版时，所示版本均为有效。所有标准都会被修订，使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

SN 0330—94 出口食品中微生物学检验通则

3 定义和符号

3.1 定义

本标准采用下列定义。

3.1.1 肠杆菌科 Enterobacteriaceae

需氧兼性厌氧、革兰氏阴性、有周鞭毛、不产生芽胞的短杆菌、发酵葡萄糖、氧化酶阴性。

3.1.2 肠杆菌科计数 Enterobacteriaceae count

按规定方法完成所测试的每克或每毫升样品中的肠杆菌科计数。

3.2 符号

PW: 稀释液。

TSB: 胰酪大豆肉汤。

MEE 肉汤: 改良的缓冲煌绿胆盐葡萄糖肉汤。

VRBGA: 结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂。

4 抽样

按 SN 0330—94 进行。

5 试验方法

5.1 原理

5.1.1 菌落计数法

将已知量的食品稀释液与 VRBGA 混合，于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，培养 18~24 h 后，肠杆菌科的细菌形成粉红色至红色，带有或不带有沉淀环的菌落。用氧化酶试验、葡萄糖琼脂发酵试验对所选择的有代表性的

中华人民共和国国家进出口商品检验局 1997-12-22 批准

1998-05-01 实施

菌落进行确认和计数。

5.1.2 带有前增菌的最近似值(MPN)法

将已知量的适宜的三个连续的食品稀释液分别各接种于三管非选择性液体培养基 TSB 中,于 $36\text{C}\pm 1\text{C}$, 4 或 18~24 h 进行前增菌,再将一定量的该培养物转种于 MEE 肉汤中,于 $36\text{C}\pm 1\text{C}$, 18~24 h 进行选择性的增菌,所得培养物划线于 VRBGA 上, $36\text{C}\pm 1\text{C}$, 培养 18~24 h 后挑选典型菌落,确认同菌落计数法,利用最近似值(MPN)表由所确认的阳性管数进行估算。

5.2 培养基与试剂

5.2.1 PW:见附录 A. A1。

5.2.2 TSB(非选择性前增菌培养基):见附录 A. A2。

5.2.3 MEE 肉汤(选择性增菌培养基):见附录 A. A3。

5.2.4 VRBGA:见附录 A. A4。

5.2.5 营养琼脂:见附录 A. A5。

5.2.6 葡萄糖琼脂:见附录 A. A6。

5.2.7 氧化酶试剂:见附录 A. A7。

5.3 设备与材料

5.3.1 培养箱: $36\text{C}\pm 1\text{C}$ 。

5.3.2 干燥箱: $50\text{C}\pm 1\text{C}$ 。

5.3.3 水浴箱: $45\text{C}\pm 1\text{C}$ 。

5.3.4 玻璃三角烧瓶和广口瓶:容量 500 mL。

5.3.5 陪替氏皿:玻璃制,直径 90 mm。

5.3.6 试管: $17\text{mm}\times 170\text{mm}$,玻璃制。

5.3.7 吸管:1 mL 和 10 mL,具刻度。

5.3.8 铂铍或镍铬接种环:直径约 3 mm。及同样材料制的接种针。

注:镍铬接种环不适于氧化酶试验。

5.4 试样制备

无菌操作称取剪碎后的样品 25 g,置于装有 225 mL PW 的 500 mL 广口瓶中,充分振荡(若采用 5.5.2 法必须均质。可将剪碎后的试样 25 g 置于灭菌的均质杯内,加入 25 mL 已灭菌的 PW,以 8 000~10 000 r/min 均质 1 min,再将均质好的试样置于装有 200 mL PW 的 500 mL 广口玻璃瓶中,充分振荡。),制成 10^{-1} 食品样液。

5.5 方法

5.5.1 菌落计数法

适用于检查未经加工处理的生鲜食品或肠杆菌科计数 $>100/\text{g}(\text{mL})$ 的加工食品。

5.5.1.1 接种和培养

a) 对每一份试样,选用适宜的二个连续稀释的样液进行菌落计数。分别用灭菌吸管吸取 1 mL 稀释的样液,一式双份地接种于每个灭菌的陪替氏皿中。

b) 倾注约 15 mL 制备好的,并于水浴箱保温至约 45C 的 VRBGA。从完成制备最初稀释液到倾注培养基于最后一个陪替氏皿所用的时间不应超过 15 min,旋转平板。使接种物和培养基充分混匀,水平放置,使其凝固。

c) 待该混合物完全凝固后,倾注一薄层同样的琼脂于已凝固的琼脂上面,以防止蔓延生长和得到半厌氧条件。

d) 待该薄层凝固后,反转制备好的平板,于 $36\text{C}\pm 1\text{C}$ 培养 18~24 h。

5.5.1.2 计数和挑选菌落

选择具有直径 $\geq 0.5\text{mm}$,有或无沉淀环的粉红色—红色,15~150 个菌落的平板,计数所有典型的

菌落,若平板上可疑菌落的直径均小于 0.5 mm,该平板应继续培养 24 h 后再进行计数。

a) 如只有一个稀释液的两个平板上的菌落数均在合适范围内或仅一个稀释度的两个平板中,一个有 15~150 个菌落,另一个的菌落多于 150 个或少于 15 个,则两个平板上的菌落均要计数。

b) 如两个连续稀释度的每个平板上的菌落数都在合适范围内或每个稀释度都有一个平板的菌落数在 15~150 个范围内,而另一个的菌落数高于 150 个或低于 15 个,则四个平板均要计数。

c) 当所有平板上的菌落数均超过 150 个时,则应计数最高稀释度的两个平板上的菌落数。

d) 当所有平板上的菌落数均少于 15 个时,应计数最低稀释度的两个平板上的菌落数。

e) 从 a)~d) 的每个平板上随机挑取五个有代表性的菌落(不足五个时,应全部挑选)纯培养后进行生化确认。

5.5.1.3 确认

a) 纯培养

分别将所挑选的每一个菌落,划线于营养琼脂表面,于 $36\text{C}\pm 1\text{C}$ 培养 18~24 h,从每个培养的平板上挑选单个菌落进行生化确认。

b) 生化确认

1) 葡萄糖发酵试验

用接种针挑取少许的单个菌落,穿刺并划线于葡萄糖琼脂斜面上,于 $36\text{C}\pm 1\text{C}$,培养 18~24 h,若试管内的整个内容物都变为黄色或黄底层,蓝斜面,视为阳性反应,大多数菌株产气。

2) 氧化酶试验

用铂/铱接种环挑取 a) 中所选择的同一菌落,涂于浸湿氧化酶试剂的滤纸上,不要用镍铬环。或将一滴氧化酶试剂直接滴加于 a) 中所选择的同一菌落上。滤纸或平板上菌落的颜色在 10 s 内不变成蓝紫色,该试验视为阴性。

5.5.2 带有前增菌的最近似值(MPN)法

适用于检查含有受损伤的肠杆菌科及肠杆菌科计数 ≤ 100 /g(mL) 的加工食品。

5.5.2.1 接种和培养

a) 非选择性前增菌

对冷冻或加热-冷冻食品,选用适宜的三个连续稀释的样液,从每个样液中分别吸取 1 mL,一式 3 份地接种于 3 管装有 TSB 的试管中,于 $36\text{C}\pm 1\text{C}$ 培养 4 h,对加热干燥食品,同上接种,于 $36\text{C}\pm 1\text{C}$ 培养 18~24 h。

b) 选择性增菌

分别转种 1 mL 5.5.2.1a) 得到的培养物于 9 管装有 MEE 肉汤中,于 $36\text{C}\pm 1\text{C}$ 培养 18~24 h。

c) 分离

分别从培养的 9 管培养物中取一环划线于 VRBGA 平板表面,于 $36\text{C}\pm 1\text{C}$ 培养 18~24 h。

d) 挑选菌落和确认

从 5.5.2.1c) 每个培养过的呈现出粉红-红色(有或无沉淀环)或无色,粘液状菌落的平板上随机挑选至少两个典型或可疑菌落,按 5.5.1.3 进行确认。

5.6 结果的计算和表述

5.6.1 菌落计数的计算

5.6.1.1 一般原则

用所选择计数的每个平板上典型和可疑肠杆菌科的菌落总数,乘以相应平板上已确认为肠杆菌科的菌落数与所挑取的有代表性的菌落数之比,以此求出所选用的同一稀释度两个计数平板上的肠杆菌科菌落数并计算平均值,再乘以该稀释倍数,得出肠杆菌科数/g(mL)。

例如:在 10^{-1} 食品样液的两个平板中分别有 85 个和 80 个菌落,而确认在 5 个菌落中分别有 4 个和 3 个为肠杆菌科,那么每克食品的肠杆菌科数为 $(85 \times 4/5 + 80 \times 3/5) / 2 \times 10 = 580$

5.6.1.2 无特征性菌落

若测试试样最低稀释度的二个平板上均无特征性菌落,以 $<10/g(mL)$ 报告。

5.6.2 最近似值(MPN)的估算

5.6.2.1 计算每个稀释的食品样液得到的阳性反应管数。

5.6.2.2 若一管次培养物中所挑选的典型菌落中有一个为氧化酶试验阴性、葡萄糖发酵试验阳性,则该供试培养物的管应视为阳性。

5.6.2.3 利用最近似值(MPN)表,由所确认的阳性管数估算每 $g(mL)$ 试样的肠杆菌科最近似值。

附录 A
(标准的附录)
培养基和试剂

若使用商售的培养基,应按厂商说明使用。制备好的培养基和试剂若不能立即用完,应于冷(1~6℃)暗处贮存。

A1 PW

氯化钠	8.50 g
蛋白胨	1.00 g
蒸馏水	1 000.00 mL

将各成分加热溶解,于25℃调节pH至7.2,分装于500 mL广口瓶中,每瓶225 mL,121℃高压灭菌20 min。

A2 TSB(非选择性前增菌培养基)

胰酪胨	17.00 g
大豆胨	3.00 g
氯化钠	5.00 g
磷酸氢二钾	2.50 g
葡萄糖	2.50 g
蒸馏水	1 000.00 mL

将各成分溶于水中,加热煮沸至完全溶解,25℃调节pH至 7.3 ± 0.2 ,分装于17 mm×170 mm试管,每管10 mL,121℃高压灭菌20 min。

A3 MEE 肉汤(选择性增菌培养基)

蛋白胨	10.00 g
葡萄糖	5.00 g
磷酸氢二钠(无水)	6.45 g
磷酸二氢钾	2.00 g
3号胆盐	10.00 g
煌绿	3.00 mL(0.5%水溶液)
蒸馏水	1 000.00 mL

将各成分溶于水中(煌绿除外),加热煮沸至完全溶解,加入煌绿,加热不超过30 min,迅速冷却培养基,分装于灭菌的17 mm×170 mm试管中,每管10 mL,不需高压灭菌,0~5℃可存放一周。

A4 VRBGA

蛋白胨	7.00 g
酵母膏	3.00 g
3号胆盐	1.50 g
葡萄糖	10.00 g
氯化钠	5.00 g
中性红	0.03 g(或0.6%酒精溶液5 mL)

结晶紫	0.002 g(或 0.1%水溶液 2 mL)
琼脂粉	10~12.00 g
蒸馏水	1 000.00 mL

将各成分溶于水,加热煮沸至完全溶解,25℃调节 pH 至 7.4,分装于灭菌的三角烧瓶中,煮沸备用。不用高压灭菌,用前制备。若临用前制备平板,应将平板干燥,最好去掉皿盖,使琼脂面朝下,于 50℃±1℃干燥箱中干燥 30 min;若提前制备平板,未干燥的平板于室温保存应不超过 4 h 或于 0~5℃保存不应超过一天。

A5 营养琼脂

牛肉膏	3.00 g
蛋白胨	5.00 g
琼脂粉	10~12.00 g
蒸馏水	1 000.00 mL

将各成分溶于水,加热煮沸,调节 pH,25℃时为 7.0,121℃高压灭菌 20 min。

A6 葡萄糖琼脂

胰蛋白胨	10.00 g
酵母膏	1.50 g
葡萄糖	10.00 g
氯化钠	5.00 g
溴甲酚紫	0.015 g
(或 0.4%溴甲酚紫酒精溶液 3.75 mL)	
琼脂粉	10~12.00 g
蒸馏水	1 000.00 mL

将各成分溶于水,加热煮沸,25℃时调节 pH 为 7.0,分装于 13 mm×130 mm 试管,121℃高压灭菌 20 min。斜置试管使成 2/3 深底层和 1/3 斜面。

A7 氧化酶试剂

N,N,N,N-四甲基对苯二胺二盐酸盐	1.00 g
蒸馏水	100.00 mL

用前配制,置于棕色瓶内。

附录 B
(标准的附录)
最近似值(MPN)表

表 B1

g

阳性管数				阳性管数			
接种量			MPN	接种量			MPN
0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001	
0	0	0	<3	2	0	0	9.1
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	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	34
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

附录 C
(提示的附录)
参考资料

- C1 ISO 8523:1991. Microbiology-General guidance for the detection of Enterobacteriaceae with pre-enrichment.
 - C2 ISO 7402:1993. Microbiology-General guidance for the enumeration of Enterobacteriaceae without resuscitation-MPN technique and colony-count technique.
 - C3 Nordic Committee on Food Analysis No. 144. 1992.
Enterobacteriaceae. Determination in Food.
-