中华人民共和国国家标准

GB 4789.40—2010

食品安全国家标准

食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验

National food safety standard

Food microbiological examination：*Enterobacter sakazakii*

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

前　言

本标准代替 GB/T 4789.40-2008 《食品卫生微生物学检验 阪崎肠杆菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.40-2008 相比，主要变化如下：

——修改了标准的中英文名称；

——删除了附录 A 中 A.3。

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 4789.40-2008。

食品安全国家标准
食品微生物学检验　阪崎肠杆菌检验

1　范围

本标准规定了食品中阪崎肠杆菌（*Enterobacter sakazakii*）的检验方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品、乳和乳制品及其原料中阪崎肠杆菌的检验。

2　设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

2.1　恒温培养箱：25 ℃±1 ℃，36 ℃±1 ℃，44 ℃±0.5 ℃。

2.2　冰箱：2 ℃～5 ℃。

2.3　恒温水浴箱：44 ℃±0.5 ℃。

2.4　天平：感量 0.1 g。

2.5　均质器。

2.6　振荡器。

2.7　无菌吸管：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。

2.8　无菌锥形瓶：容量 100 mL、200 mL、2000 mL。

2.9　无菌培养皿：直径 90 mm。

2.10　pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

2.11　全自动微生物生化鉴定系统。

3　培养基和试剂

3.1　缓冲蛋白胨水（buffer peptone water，BPW）：见附录 A 中 A.1。

3.2　改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素（modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium，mLST-Vm）：见附录 A 中 A.2。

3.3　阪崎肠杆菌显色培养基。

3.4　胰蛋白胨大豆琼脂（trypticase soy agar，TSA）：见附录 A 中 A.3。

3.5　生化鉴定试剂盒。

3.6　氧化酶试剂：见附录 A 中 A.4。

3.7　L-赖氨酸脱羧酶培养基：见附录 A 中 A.5。

3.8 L-鸟氨酸脱羧酶培养基：见附录 A 中 A.6。

3.9 L-精氨酸双水解酶培养基：见附录 A 中 A.7。

3.10 糖类发酵培养基：见附录 A 中 A.8。

3.11 西蒙氏柠檬酸盐培养基：见附录 A 中 A.9。

第一法 阪崎肠杆菌的检验

4 检验程序

阪崎肠杆菌检验程序见图 1。

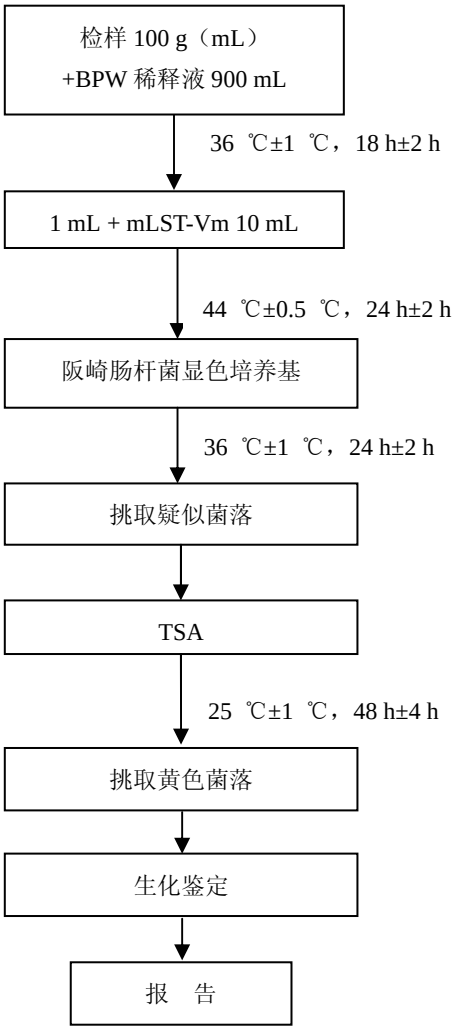


图 1 阪崎肠杆菌检验程序

5 操作步骤

5.1 前增菌和增菌

取检样 100 g（mL）加入已预热至 44 ℃装有 900 mL 缓冲蛋白胨水的锥形瓶中，用手缓缓地摇动至充分溶解，36 ℃±1 ℃培养 18 h±2 h。移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤，44 ℃±0.5 ℃培养 24 h±2 h。

5.2 分离

5.2.1 轻轻混匀 mLST-Vm 肉汤培养物，各取增菌培养物 1 环，分别划线接种于两个阪崎肠杆菌显色

培养基平板，36 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h。

5.2.2 挑取 1 个～5 个可疑菌落，划线接种于 TSA 平板。25 ℃±1 ℃培养 48 h±4 h。

5.3 鉴定

自 TSA 平板上直接挑取黄色可疑菌落，进行生化鉴定。阪崎肠杆菌的主要生化特征见表 1。可选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统。

表 1 阪崎肠杆菌的主要生化特征

生化试验		特　征
黄色素产生		＋
氧化酶		－
L-赖氨酸脱羧酶		－
L-鸟氨酸脱羧酶		（＋）
L-精氨酸双水解酶		＋
柠檬酸水解		（＋）
发酵	D-山梨醇	（－）
	L-鼠李糖	＋
	D-蔗糖	＋
	D-蜜二糖	＋
	苦杏仁甙	＋
注：＋＞99%阳性；－＞99%阴性；（＋）90%－99%阳性；（－）90%－99%阴性。		

6 结果与报告

综合菌落形态和生化特征，报告每 100 g（mL）样品中检出或未检出阪崎肠杆菌。

第二法 阪崎肠杆菌的计数

7 操作步骤

7.1 样品的稀释

7.1.1 **固体和半固体样品**：无菌称取样品 100 g、10 g、1 g 各三份，加入已预热至 44 ℃分别盛有 900 mL、90 mL、9 mL BPW 中，轻轻振摇使充分溶解，制成 1:10 样品匀液，置 36 ℃±1 ℃培养 18 h±2 h。分别移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤，44 ℃±0.5 ℃培养 24 h±2 h。

7.1.2 **液体样品**：以无菌吸管分别取样品 100 mL、10 mL、1 mL 各三份，加入已预热至 44 ℃分别盛有 900 mL、90 mL、9 mL BPW 中，轻轻振摇使充分混匀，制成 1:10 样品匀液，置 36 ℃±1 ℃培养 18h±2h。分别移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤，44 ℃±0.5 ℃培养 24 h±2 h。

7.2 分离、鉴定

同 5.2，5.3。

8 结果与报告

综合菌落形态、生化特征，根据证实为阪崎肠杆菌的阳性管数，查 MPN 检索表，报告每 100 g（mL）样品中阪崎肠杆菌的 MPN 值（见附录 B 中表 B.1）。

附录A
（规范性附录）
培养基和试剂

A.1 缓冲蛋白胨水（BPW）

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$）	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.2

A.1.2 制法

加热搅拌至溶解,调节 pH，121 ℃高压灭菌 15 min。

A.2 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素（Modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium，mLST-Vm）

A.2.1 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨（mLST）肉汤

A.2.1.1 成分

氯化钠	34.0 g
胰蛋白胨	20.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸二氢钾	2.75 g
磷酸氢二钾	2.75 g
十二烷基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 6.8±0.2

A.2.1.2 制法

加热搅拌至溶解，调节 pH。分装每管 10 mL，121 ℃高压灭菌 15 min。

A.2.2 万古霉素溶液

A.2.2.1 成分

万古霉素	10.0 mg
蒸馏水	10.0 mL

A.2.2.2 制法

10.0 mg 万古霉素溶解于 10.0 mL 蒸馏水，过滤除菌。万古霉素溶液可以在 0 ℃～5 ℃保存 15 天。

A.2.3 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素（Modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium，mLST-Vm）

每 10 mL mLST 加入万古霉素溶液 0.1 mL，混合液中万古霉素的终浓度为 10 μg/ mL。

注：mLST-Vm 必须在 24 h 之内使用。

A.3 胰蛋白胨大豆琼脂（TSA）

A.3.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
植物蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.3±0.2

A.3.2 制法

加热搅拌至溶解，煮沸 1 min，调节 pH，121 ℃高压 15 min。

A.4 氧化酶试剂

A.4.1 成分

N,*N*,*N*′,*N*′-四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
蒸馏水	100 mL

A.4.2 制法

少量新鲜配制，于冰箱内避光保存，在 7 d 之内使用。

A.4.3 试验方法

用玻璃棒或一次性接种针挑取单个特征性菌落，涂布在氧化酶试剂湿润的滤纸平板上。如果滤纸在 10 s 之内未变为紫红色、紫色或深蓝色，则为氧化酶试验阴性，否则即为氧化酶实验阳性。

注：实验中切勿使用镍/铬材料。

A.5 L-赖氨酸脱羧酶培养基

A.5.1 成分

L-赖氨酸盐酸盐（L-lysine monohydrochloride）	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 6.8±0.2

A.5.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 5 mL，121 ℃高压 15 min。

A.5.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-赖氨酸脱羧酶培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h，观察结果。L-赖氨酸脱羧酶试验阳性者，培养基呈紫色，阴性者为黄色。

A.6 L-鸟氨酸脱羧酶培养基

A.6.1 成分

L-鸟氨酸盐酸盐（L-ornithine monohydrochloride）	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 6.8±0.2

A.6.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 5 mL。121 ℃高压 15 min。

A.6.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-鸟氨酸脱羧酶培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h，观察结果。L-鸟氨酸脱羧酶试验阳性者，培养基呈紫色，阴性者为黄色。

A.7 L-精氨酸双水解酶培养基

A.7.1 成分

L-精氨酸盐酸盐（L-arginine monohydrochloride）	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 6.8±0.2	

A.7.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 5 mL。121 ℃高压 15 min。

A.7.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-精氨酸脱羧酶培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h，观察结果。L-精氨酸脱羧酶试验阳性者，培养基呈紫色，阴性者为黄色。

A.8 糖类发酵培养基

A.8.1 基础培养基

A.8.1.1 成分

酪蛋白（酶消化）	10.0 g
氯化钠	5.0 g
酚红	0.02 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 6.8±0.2	

A.8.1.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 5 mL。121 ℃高压 15 min。

A.8.2 糖类溶液（D-山梨醇、L-鼠李糖、D-蔗糖、D-蜜二糖、苦杏仁甙）

A.8.2.1 成分

糖	8.0 g
蒸馏水	100 mL

A.8.2.2 制法

分别称取 D-山梨醇、L-鼠李糖、D-蔗糖、D-蜜二糖、苦杏仁甙等糖类成分各 8 g，溶于 100 mL 蒸馏水中，过滤除菌，制成 80 mg/mL 的糖类溶液。

A.8.3 完全培养基

A.8.3.1 成分

基础培养基	875 mL
糖类溶液	125 mL

A.8.3.2 制法

无菌操作，将每种糖类溶液加入基础培养基，混匀；分装到无菌试管中，每管 10 mL。

A.8.4 实验方法

挑取培养物接种于各种糖类发酵培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h，观察结果。糖类发酵试验阳性者，培养基呈黄色，阴性者为红色。

A.9 西蒙氏柠檬酸盐培养基

A.9.1 成分

柠檬酸钠	2.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
磷酸二氢铵	1.0 g
硫酸镁	0.2 g
溴百里香酚蓝	0.08 g
琼脂	8.0 g～18.0 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 6.8±0.2

A.9.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 10 mL，121 ℃高压 15 min，制成斜面。

A.9.3 实验方法

挑取培养物接种于整个培养基斜面，36 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h，观察结果。阳性者培养基变为蓝色。

附录 B
（规范性附录）
阪崎肠杆菌最可能数（MPN）检索表

B.1 阪崎肠杆菌最可能数（MPN）检索表

每 100 g（mL）检样中阪崎肠杆菌最可能数（MPN）的检索见表 B.1。

表 B.1 阪崎肠杆菌最可能数（MPN）检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
100	10	1		下限	上限	100	10	1		下限	上限
0	0	0	＜0.3	--	0.95	2	2	0	2.1	0.45	4.2
0	0	1	0.3	0.015	0.96	2	2	1	2.8	0.87	9.4
0	1	0	0.3	0.015	1.1	2	2	2	3.5	0.87	9.4
0	1	1	0.61	0.12	1.8	2	3	0	2.9	0.87	9.4
0	2	0	0.62	0.12	1.8	2	3	1	3.6	0.87	9.4
0	3	0	0.94	0.36	3.8	3	0	0	2.3	0.46	9.4
1	0	0	0.36	0.017	1.8	3	0	1	3.8	0.87	11
1	0	1	0.72	0.13	1.8	3	0	2	6.4	1.7	18
1	0	2	1.1	0.36	3.8	3	1	0	4.3	0.9	18
1	1	0	0.74	0.13	2	3	1	1	7.5	1.7	20
1	1	1	1.1	0.36	3.8	3	1	2	12	3.7	42
1	2	0	1.1	0.36	4.2	3	1	3	16	4	42
1	2	1	1.5	0.45	4.2	3	2	0	9.3	1.8	42
1	3	0	1.6	0.45	4.2	3	2	1	15	3.7	42
2	0	0	0.92	0.14	3.8	3	2	2	21	4	43
2	0	1	1.4	0.36	4.2	3	2	3	29	9	100
2	0	2	2	0.45	4.2	3	3	0	24	4.2	100
2	1	0	1.5	0.37	4.2	3	3	1	46	9	200
2	1	1	2	0.45	4.2	3	3	2	110	18	410
2	1	2	2.7	0.87	9.4	3	3	3	＞110	42	--

注 1：本表采用 3 个检样量[100 g(mL)、10 g(mL)和 1 g(mL)]，每个检样量接种 3 管。

注 2：表内所列检样量如改用 1 000 g(mL)、10 g(mL)、和 1 g(mL)时，表内数字应相应降低 10 倍；如改用 10 g(mL)、1 g(mL)、和 0.1 g(mL) 时，则表内数字应相应增高 10 倍，其余类推。