



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 °C±1 °C, 36 °C±1 °C, 44 °C±0.5 °C。
- 2.2 冰箱: 2 °C~5 °C。
- 2.3 恒温水浴箱: 44 °C±0.5 °C。
- 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。

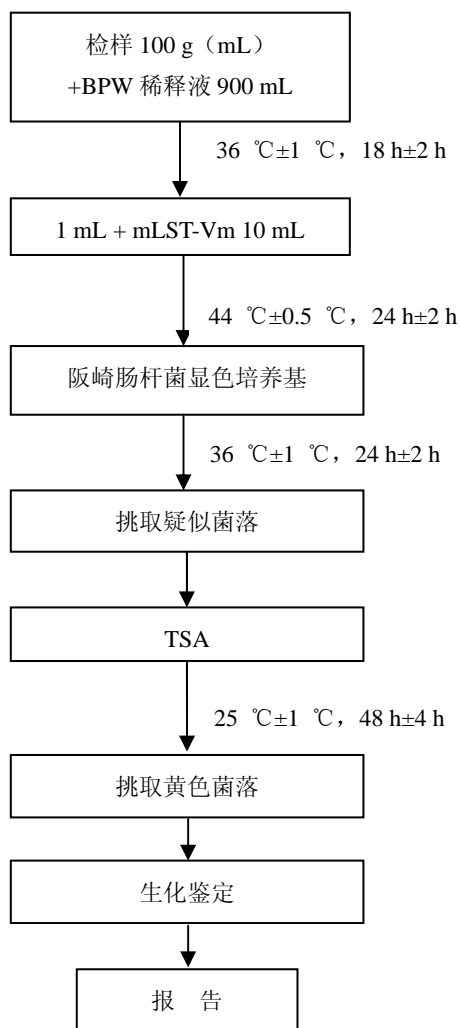


图 1 阪崎肠杆菌检验程序

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 °C 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 °C±1 °C 培养 18 h±2 h。移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤, 44 °C±0.5 °C 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24h±2h。

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48h±4h。

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

7.1.2 液体样品：以无菌吸管分别取样品100mL、10mL、1mL各三份，加入已预热至44℃分别盛有900mL、90mL、9mL 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1mL转种于10mL mLST-Vm肉汤，44℃±0.5℃培养24h±2h。

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 ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	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 °C 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 °C 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 °C ~ 5 °C 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 °C 高压 15 min。

A.4 氧化酶试剂

A.4.1 成分

<i>N,N,N',N'</i> -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 °C 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 °C±1 °C 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 °C 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 °C 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 °C±1 °C 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。