

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1071—2002

进出口食品中厌氧亚硫酸盐 还原梭状芽胞杆菌检验方法

Method for the determination of anaerobic
sulfite-reducing clostridia in food for import and export

2002-01-16 发布

2002-06-01 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

本标准是按照 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》中的要求进行编写的。其中技术路线参考了国内外有关资料,经研究、改进和验证后,在普遍采用的平板计数法的基础上,增加采用最近似值法来计数厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌。

本标准的附录 A、附录 B 是标准的附录。

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:中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:曹际娟、寇运同、马惠蕊、唐守亭。

本标准首次发布。

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

进出口食品中厌氧亚硫酸盐 还原梭状芽胞杆菌检验方法

SN/T 1071—2002

Method for the determination of anaerobic
sulfite-reducing clostridia in food for import and export

1 范围

本标准规定了进出口食品中厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌的检验方法。
本标准适用于进出口食品中厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌的检验。

2 定义

本标准采用下列定义：

厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌

一群厌氧、过氧化氢酶阴性、能将亚硫酸盐还原为硫化物的革兰氏阳性梭状芽胞杆菌。是食品、水、食品加工设备、食品生产环境等卫生状况的评估指标菌之一。

3 设备和材料

- 3.1 均质器。
- 3.2 恒温水浴箱。
- 3.3 恒温培养箱： $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 或 $46^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 3.4 厌氧培养装置。
- 3.5 菌落计数器。
- 3.6 吸管：1.0 mL 和 10.0 mL，分别具有 0.1 mL 和 1.0 mL 刻度。
- 3.7 培养皿：90 mm 或 100 mm。
- 3.8 低温冰箱。
- 3.9 显微镜。

4 培养基和试剂

- 4.1 氯化钠胰蛋白胨稀释液：见附录 A 中 A1。
- 4.2 亚硫酸铁琼脂：见附录 A 中 A2。
- 4.3 庖肉培养基：见附录 A 中 A3。
- 4.4 3%过氧化氢溶液：使用前配制。
- 4.5 缓冲甘油-氯化钠溶液：见附录 A 中 A4。

5 样品制备

- 5.1 样品的贮存和运送

冷冻样品如不能立即进行检验,应置于 -18°C 保存;非冷冻而易腐的食品,应加等量缓冲甘油-氯化钠溶液(液体食品应加双料),置于 4°C 冰箱保存。运送样品时,应采取措施,防止样品中微生物数量和性质发生变化。

5.2 制样

将样品解冻,取 25 g 移入灭菌均质杯,加 225 mL 氯化钠胰蛋白胨稀释液,以 $8\ 000\text{ r/min}\sim 10\ 000\text{ r/min}$ 均质 2 min 。如为液体样品,则取样 25 mL ,加入盛有 225 mL 氯化钠胰蛋白胨稀释液的 500 mL 稀释瓶中,摇匀。吸取此 $1:10$ 样品匀液 10 mL ,加入 90 mL 氯化钠胰蛋白胨稀释液中,充分混匀后根据样品污染情况做进一步的系列十倍递增稀释。

若检测厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌的芽胞,可对 $1:10$ 样品匀液进行 75°C 20 min 或煮沸保持 10 min 热处理,之后以流水迅速冷却至室温后再做进一步的系列十倍递增稀释。

6 检验步骤与计数

6.1 平板计数法

适用于检验未经加工处理的生鲜食品及厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌 $>10/\text{g}(\text{mL})$ 的食品。

6.1.1 接种和培养

6.1.1.1 对每一份试样,选用适宜的三个连续稀释度的样液,分别用灭菌吸管吸取 1 mL ,一式双份接种于每个灭菌的培养皿中。

6.1.1.2 倾注约 15 mL 制备好的并于水浴箱保温至 50°C 的亚硫酸铁琼脂。从制备最初稀释液结束到倾注培养基于最后一个平皿所用的时间不应超过 15 min 。仔细将接种物和培养基充分混匀,水平放置,使其凝固。

6.1.1.3 待混合物凝固后,再倾注 10 mL 2% 无菌琼脂于已凝固的培养基上作为隔层。

6.1.1.4 待该隔层凝固后反转制备好的平板于 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 $24\text{ h}\sim 48\text{ h}$ 。若对培养温度有特殊要求(如 46°C),可根据情况进行培养。

6.1.2 计数

6.1.2.1 厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌在亚硫酸铁琼脂上呈黑色菌落。 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 24 h 后,计数典型的菌落;若平板上无特征性菌落或菌落较小($<0.5\text{ mm}$),则需继续培养 24 h 再计数;若 48 h 后的菌落增大以至相连,则以 24 h 的计数为准,反之则以 48 h 为准。

那些仅产生氢[而不是硫化氢(H_2S)]的厌氧菌生长时也可还原亚硫酸盐而导致培养基出现弥散的、非典型的普遍变黑,这种现象不应计数。

6.1.2.2 从可计数的平板(具 $20\sim 200$ 个菌落)中任取 10 个典型菌落,分别取培养物按 7.1 和 7.2 进行证实试验。对阳性结果进行计数。

6.1.2.3 平板典型菌落数乘以证实为厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌菌落所占比例,再乘以样品稀释倍数即为样品中厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌的计数,报告为厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌/ $\text{g}(\text{mL})$ 。

6.2 最近似值(MPN)法

适用于检验含有受损伤的厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌的加工食品及厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌 $\leq 10/\text{g}(\text{mL})$ 的食品。

6.2.1 接种和培养

6.2.1.1 增菌

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 ,一式三份接种于 3 管装有庖肉培养基的试管中, $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 $24\text{ h}\sim 72\text{ h}$ 。待出现生长特征(培养液混浊、产气、出现异味)后,进行分离培养。反之,则按阴性计数。

6.2.1.2 分离培养

各取 6.2.1.1 出现生长特性的增菌培养物 1 mL 分别置于灭菌的培养皿中,倾注约 15 mL 50℃ 的亚硫酸铁琼脂。仔细将接种物和培养基充分混匀,待其凝固后,再倾注 10 mL 同样的培养基作为隔层,于 36℃±1℃ 厌氧培养 24 h~48 h。若生成黑色菌落,则取各培养皿中的典型菌落按 7.1 和 7.2 加以证实;若无黑色菌落生成,则按阴性结果计数。

6.2.2 最近似值(MPN)的估算

6.2.2.1 计数每个稀释度得到的阳性反应管数。

6.2.2.2 根据反应阳性管数查阅 MPN 检索表,得出样品中厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌最近似值,报告为厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌数/g(mL)。

7 证实试验

7.1 形态观察

取可疑菌落涂片,做革兰氏染色,镜检,检查培养物细菌形态。厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌为革兰氏阳性的梭状芽胞杆菌。产芽胞时,芽胞呈卵圆形或球形,位于中央、次终端或终端。

7.2 过氧化氢酶试验

在洁净载玻片上滴 1 滴培养物,再滴加 1~2 滴 3% 的过氧化氢溶液,于半分钟内观察出现小气泡说明有过氧化氢酶活性。

厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌不形成过氧化氢酶。

附录 A
(标准的附录)
培养基和试剂

A1 氯化钠胰蛋白胨稀释液

将 8.5 g 氯化钠和 1.0 g 胰蛋白胨溶解于 1 000 mL 蒸馏水中。调节 pH 至 7.2 ± 0.1 。分装 225 mL 于 250 mL 广口瓶中, 121℃ 高压灭菌 15 min。

A2 亚硫酸铁琼脂

胰蛋白胨	15.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
偏重亚硫酸钠	1.0 g
柠檬酸铁铵	1.0 g
琼脂	20.0 g
蒸馏水	1 000 g

将各成分混匀, 加热溶解, 调节 pH 至 7.6 ± 0.1 , 分装于 500 mL 锥形瓶中各 250 mL, 121℃ 高压灭菌 15 min。一周内用完。

A3 庖肉培养基

牛肉浸液	1 000 mL
蛋白胨	30.0 g
酵母浸膏	5.0 g
磷酸二氢钠	5.0 g
葡萄糖	3.0 g
可溶性淀粉	2.0 g
碎肉渣	适量

取碎肉渣分装 15 mm×150 mm 试管约 2 cm~3 cm 高, 将上述液体培养基分装至每管内超过肉渣表面约 1 cm。上面覆盖熔化的凡士林或液体石蜡 0.3 cm~0.4 cm。121℃ 高压灭菌 15 min。

A4 缓冲甘油-氯化钠溶液

在 900 mL 蒸馏水中溶解氯化钠 4.2 g, 加无水磷酸氢二钾 12.4 g, 无水磷酸二氢钾 4.0 g 和甘油 100 mL。混合, 充分溶解。

调至 pH 7.2, 121℃ 高压灭菌 15 min。

配制双料缓冲甘油溶液(20%)时, 用甘油 200 mL 和蒸馏水 800 mL。

附录 B

(标准的附录)

1 g 检样中最近似值(MPN)表

使用三管法,接种量分别为 0.1,0.01,0.001 g(见表 B1)。

表 B1

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	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

注

- 1 本表采用 3 个稀释度[0.1 g(mL)、0.01 g(mL)和 0.001 g(mL)],每个稀释度接种 3 管。
- 2 表内所列检样量如改用 1 g(mL)、0.1 g(mL)和 0.01 g(mL)时,表内数字应相应降低 10 倍;如改用 0.01 g(mL)、0.001 g(mL)和 0.000 1 g(mL)时,则表内数字应相应增加 10 倍,其余类推。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
进出口食品中厌氧亚硫酸盐
还原梭状芽胞杆菌检验方法
SN/T 1071—2002

*

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
电话:68523946 68517548
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

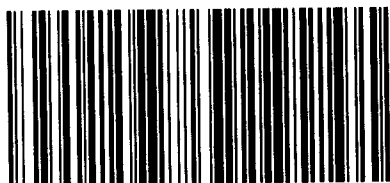
*

开本 880×1230 1/16 印张 3/4 字数 12 千字
2002年5月第一版 2002年5月第一次印刷
印数 1—2 000

*

书号: 155066·2-14387 定价 8.00 元
网址 www.bzchs.com

版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



SN/T 1071—2002