



中华人民共和国国家标准

GB/T 28228—2011

入出境船舶压舱水中单核细胞 增生李斯特氏菌的检验方法

Detection of *Listeria monocytogenes* in ballast water of entry-exit ships

2011-12-30 发布

2012-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准修改采用美国食品和药物管理局(FDA)《细菌学检验手册:单核细胞增生李斯特氏菌的检测和计数》(2003年1月)(BAM:Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*, January 2003)。

本标准与 FDA 方法的主要区别是:

- 增加了初筛步骤;
- 明确了计数步骤;
- 培养箱温度由 35 °C 修改为 36 °C ±1 °C。

本标准由国家质量监督检验检疫总局提出。

本标准由中国检验检疫科学研究院归口。

本标准起草单位:中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:张顺合、王林、庞秋艳、张乐、李金有、李俊成、李德昕、聂维忠、陈春田、顾大勇、慈颖、赵彬、韩辉。

入出境船舶压舱水中单核细胞 增生李斯特氏菌的检验方法

1 范围

本标准规定了入出境船舶压舱水中单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)的检测程序和方法。

本标准适用于入出境船舶压舱水中单核细胞增生李斯特氏菌的检测。

2 设备和材料

- 2.1 冰箱:2℃~8℃。
- 2.2 恒温培养箱:30℃±1℃,36℃±1℃。
- 2.3 显微镜:10×~100×。
- 2.4 无菌移液管或无菌量筒:1 mL,25 mL,精确到0.1 mL。
- 2.5 锥形瓶:500 mL。
- 2.6 无菌培养皿:直径90 mm。
- 2.7 无菌试管:16 mm×125 mm。
- 2.8 接种环。
- 2.9 接种针。
- 2.10 金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)。
- 2.11 马红球菌(*Rhodococcus equi*)。
- 2.12 伊氏李斯特氏菌。
- 2.13 单核细胞增生李斯特氏菌。
- 2.14 英诺克李斯特氏菌。

3 培养基和试剂

- 3.1 李斯特氏菌缓冲增菌肉汤(BLEB):见A.1。
- 3.2 PALCAM琼脂:见A.2。
- 3.3 ALOA显色培养基¹⁾。
- 3.4 含0.6%酵母浸膏的胰酪胨大豆琼脂(TSAye):见A.3。
- 3.5 SIM动力培养基:见A.4。
- 3.6 5%羊血琼脂:见A.5。
- 3.7 革兰氏染色液。
- 3.8 3%过氧化氢溶液:用于过氧化氢酶试验。
- 3.9 生化反应管²⁾:鼠李糖、木糖、葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、MR/VP试验。

- 1) 由法国AES公司提供的产品的商品名,给出这一信息仅为方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可,如果其他产品具有相同效果,则可使用这些等效产品。
- 2) 建议使用商品化的生化反应管以保证质量稳定,也可使用自动微生物生化鉴定仪完成。

- 3.10 盐酸吡啶黄。
- 3.11 萘啶酮酸钠。
- 3.12 放线菌酮。
- 3.13 多粘菌素 B。

4 检验程序

单核细胞增生李斯特氏菌检验程序见图 1。

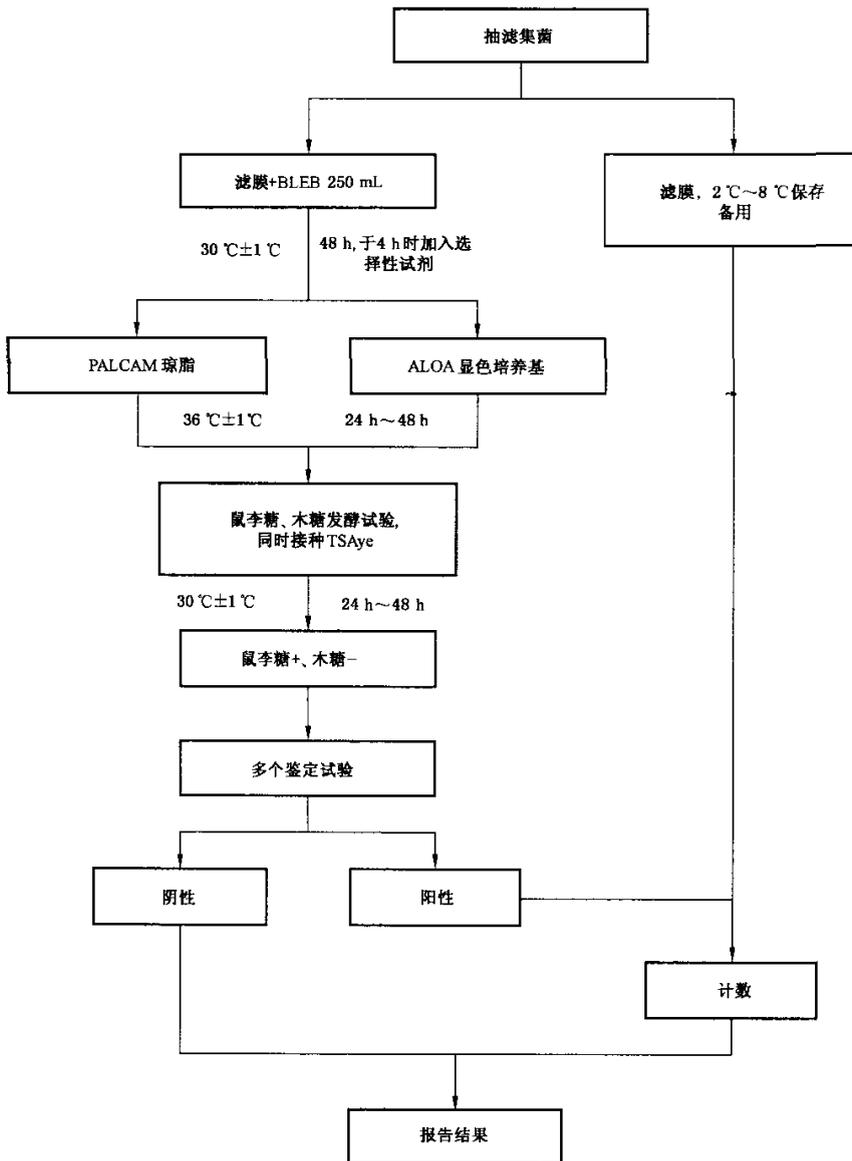


图 1 单核细胞增生李斯特氏菌检验程序

5 操作步骤

5.1 准备

用于进行单核细胞增生李斯特氏菌检测的水样应在 2℃~8℃条件下进行处理、储存和运输。以无菌操作分别抽滤 1 L 压舱水样两份,取一份集菌滤膜于 2℃~8℃保存,以备计数,另一份备检。

5.2 增菌

以无菌操作取一份集菌滤膜加入到 250 mL 李斯特氏菌缓冲增菌肉汤(BLEB)中,充分振荡混匀。30℃±1℃下培养 4 h,加入 A.1.3 中的选择性试剂,继续在 30℃±1℃培养 44 h。

5.3 分离

挑取培养 48 h 的增菌液划线接种于 PALCAM 琼脂平板和 ALOA 李斯特氏菌显色琼脂平板,置于 36℃±1℃培养 24 h~48 h,并观察各个平板上菌落的生长状态。在 PALCAM 琼脂培养基上,典型菌落呈圆形灰绿色小菌落,周围有一个棕黑色水解环,部分菌落有黑色凹陷;在 ALOA 李斯特氏菌显色琼脂平板上,典型菌落呈圆形蓝绿色小菌落,周围有不透明晕环。

5.4 初筛

从以上选择性琼脂平板上挑取 5 个或以上的典型菌落分别划线接种于胰酪胨大豆琼脂平板(TSAye),30℃±1℃培养 24 h~48 h,以纯化培养;同时分别接种于鼠李糖和木糖发酵管,于 36℃±1℃下培养 24 h,选择鼠李糖发酵阳性、木糖发酵阴性的纯培养菌落继续进行鉴定。

5.5 鉴定

5.5.1 染色镜检

李斯特氏菌为革兰氏阳性细短杆状菌;用无菌生理盐水制成菌悬液,在油镜或相差显微镜下观察,可见轻微旋转或翻滚样的运动。镜检可与标准菌株对照观察。

5.5.2 生化鉴定

挑选典型的纯培养菌落按 A.6 进行过氧化氢酶试验,选择过氧化氢酶反应阳性的菌落进行其他生化鉴定,包括糖发酵(葡萄糖、麦芽糖、甘露醇)试验、甲基红(MR)试验、VP 试验。

5.5.3 动力试验

挑取典型的纯培养菌落穿刺接种于 SIM 培养基中,于 30℃±1℃培养 24 h~48 h,每日观察,李斯特氏菌呈典型伞状生长或月牙状生长。

5.5.4 溶血试验

将 5%羊血琼脂平板底面划分 20 个~25 个小格,挑取典型的纯培养菌落刺种血平板,每格刺种一个菌落,并刺种阳性对照菌(伊氏李斯特氏菌和单核细胞增生李斯特氏菌)和阴性对照菌(英诺克李斯特氏菌)。穿刺时尽量接近底部,但不要触到底面,防止琼脂破裂,30℃±1℃培养 24 h~48 h。在亮光下观察经穿刺的血琼脂平板,单核细胞增生李斯特氏菌在刺种点周围产生微小的透明溶血环,英诺克李斯特氏菌无溶血环,而伊氏李斯特氏菌在接种点周围产生大的透明溶血环。

5.5.5 协同溶血试验(CAMP)

在羊血琼脂平板上划两条平行线,分别接种金黄色葡萄球菌和马红球菌。挑取典型的纯培养菌落在两平行线之间垂直划线接种,垂直线与两平行线相近但不相交,于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~48 h,观察培养板上的溶血情况。单核细胞增生李斯特氏菌在靠近金黄色葡萄球菌接种的区域内溶血反应增强,且通常在 24 h 溶血现象比在 48 h 更明显;而在靠近马红球菌接种的区域溶血反应无增强或增强不明显。

5.5.6 鉴定特征

单核细胞增生李斯特氏菌的鉴定特征见表 1。

表 1 单核细胞增生李斯特氏菌的鉴定特征

鼠李糖	木糖	过氧化氢酶	葡萄糖	麦芽糖
+	-	+	+	+
甘露醇	MR/VP 试验	动力试验	溶血试验	协同溶血试验 金葡萄菌/马红球菌
-	+/+	+	+	+/-
注: + 阳性; - 阴性。				

5.6 计数

5.6.1 如果样品经试验确定单核细胞增生李斯特氏菌阳性,则将另一份集菌滤膜用于计数。

5.6.2 以无菌操作取集菌滤膜加入 10 mL 蛋白胍缓冲液,充分洗涤后于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 复苏 1 h,移取 0.1 mL 涂布 ALOA 平板, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,计数周围有不透明晕环的圆形蓝绿色小菌落数,平行计数两个平板,取平均值 a 。

5.6.3 每升水样中单核细胞增生李斯特氏菌估算数为 $100 a$ 。

5.7 结果报告

综合以上检测试验结果,报告每升水样中未检出或报出每升水样中单核细胞增生李斯特氏菌估算数。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 李斯特氏菌缓冲增菌肉汤(BLEB)**A.1.1 成分**

胰酪胨大豆粉	3.0 g
酵母膏	6.0 g
磷酸氢二钾	1.4 g
磷酸氢二钠	9.6 g

A.1.2 制法

将各组分混合,不加入抗生素,调节 pH 到 7.3 ± 0.2 , $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.1.3 选择性试剂

萘啶酮酸	40.0 mg/L
放线菌酮	50.0 mg/L
盐酸吡啶黄	15.0 mg/L

用无菌水分别制备 0.5%(质量浓度)的吡啶黄素溶液和萘啶酮酸溶液,用 40%(体积分数)的酒精制备 1%(质量浓度)的放线菌酮溶液,过滤除菌后。使用时每 1 000 mL 培养基分别加 3 mL 吡啶黄素溶液、8 mL 萘啶酮酸溶液和 5 mL 放线菌酮溶液。

A.2 PALCAM 琼脂**A.2.1 成分**

酵母膏	8.0 g
葡萄糖	0.5 g
七叶苷	0.8 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
甘露醇	10.0 g
酚红	0.1 g
氯化锂	15.0 g
酪蛋白胰酶消化物	10.0 g
心胰酶消化物	3.0 g
玉米淀粉	1.0 g
肉胃酶消化物	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 2.2 PALCAM 选择性添加剂

多粘菌素 B	5.0 mg
盐酸吡啶黄	2.5 mg
头孢他啶	10.0 mg
无菌蒸馏水	500 mL

A. 2.3 制法

将 A. 2.1 中成分加热溶解,调 pH 至 7.2~7.4,121 °C 高压灭菌 15 min,冷却至 50 °C,加入 2 mL PALCAM 选择性添加剂,混匀后倾倒入无菌平皿,备用。

A. 3 含 0.6% 酵母浸膏的胰酪胨大豆琼脂(TSAye)

A. 3.1 成分

胰胨	17.0 g
胨	3.0 g
酵母膏	6.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 3.2 制法

将上述各成分加热搅拌溶解,调 pH 至 7.2~7.4,分装,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A. 4 SIM 动力培养基

A. 4.1 成分

胰胨	20.0 g
多价胨	6.0 g
硫酸铁铵	0.2 g
硫代硫酸钠	0.2 g
琼脂	3.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 4.2 制法

将上述各成分加热混匀,调 pH 至 7.2,分装小试管,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A. 5 5% 羊血琼脂

A. 5.1 成分

蛋白胨	1.0 g
-----	-------

牛肉膏	0.3 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

加热熔化上述各组分,121 ℃高压灭菌 15 min,冷却到 50 ℃,以无菌操作加入新鲜脱纤维羊血 5 mL,摇匀,倾注平板。

A.6 过氧化氢酶试验

A.6.1 试剂

3%过氧化氢溶液:现配现用。

A.6.2 试验方法

用细玻璃棒或一次性接种针挑取单个菌落,置于洁净试管内,滴加 3%过氧化氢溶液 2 mL,观察结果。

A.6.3 结果

于半分钟内发生气泡者为阳性,不发生气泡者为阴性。

A.7 蛋白胨缓冲液

A.7.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
十二水磷酸氢二钠	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

调节 pH 至 6.7,121 ℃高压灭菌 15 min,备用。
