



中华人民共和国国家标准

GB 4789.8—2016

食品安全国家标准
食品微生物学检验
小肠结肠炎耶尔森氏菌检验

2016-08-31 发布

2017-03-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准代替 GB/T 4789.8—2008《食品卫生微生物学检验 小肠结肠炎耶尔森氏菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.8—2008 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 食品微生物学检验 小肠结肠炎耶尔森氏菌检验”;
- 修改了典型菌落的形态描述;
- 删除了生化鉴定中的商品化名称;
- 描述了血清鉴定的方法。

食品安全国家标准

食品微生物学检验

小肠结肠炎耶尔森氏菌检验

1 范围

本标准规定了食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)的检验方法。
本标准适用于食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌的检验。

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 冰箱: 0℃~4℃。
- 2.2 恒温培养箱: 26℃±1℃、36℃±1℃。
- 2.3 显微镜: 10倍~100倍。
- 2.4 均质器。
- 2.5 天平: 感量0.1g。
- 2.6 灭菌试管: 16mm×160mm、15mm×100mm。
- 2.7 灭菌吸管: 1mL(具0.01mL刻度)、10mL(具0.1mL刻度)。
- 2.8 锥形瓶: 200mL、500mL。
- 2.9 灭菌平皿: 直径90mm。
- 2.10 微生物生化鉴定试剂盒或微生物生化鉴定系统。

3 培养基和试剂

- 3.1 改良磷酸盐缓冲液: 见A.1。
- 3.2 CIN-1培养基(Cepulodin Irgasan Novobiocin Agar): 见A.2。
- 3.3 改良Y培养基(Agar Y, Modified): 见A.3。
- 3.4 改良克氏双糖培养基: 见A.4。
- 3.5 糖发酵管: 见A.5。
- 3.6 鸟氨酸脱羧酶试验培养基: 见A.6。
- 3.7 半固体琼脂: 见A.7。
- 3.8 缓冲葡萄糖蛋白胨水[甲基红(MR)和V-P试验用]: 见A.8。
- 3.9 碱处理液: 见A.9。
- 3.10 尿素培养基: 见A.10。
- 3.11 营养琼脂: 见A.11。
- 3.12 小肠结肠炎耶尔森氏菌诊断血清。

4 检验程序

小肠结肠炎耶尔森氏菌检验程序见图 1。

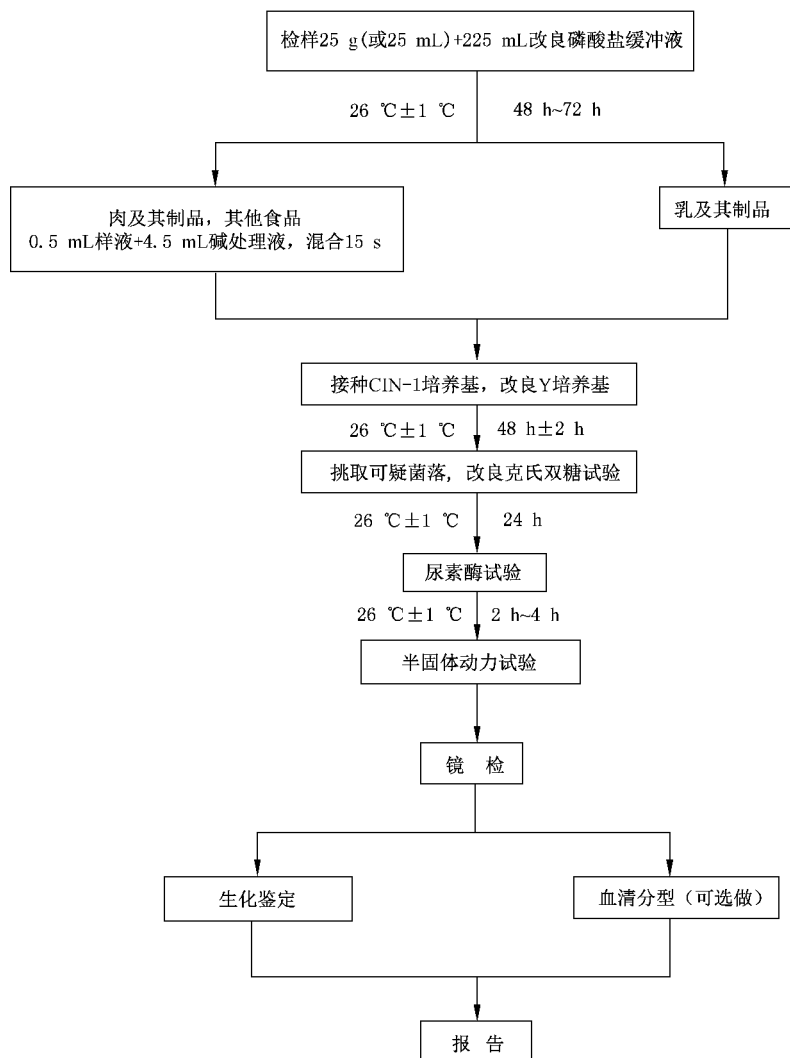


图 1 小肠结肠炎耶尔森氏菌检验程序

5 操作步骤

5.1 增菌

以无菌操作取 25 g(或 25 mL)样品放入含有 225 mL 改良磷酸盐缓冲液增菌液的无菌均质杯或均质袋内,以 8 000 r/min 均质 1 min 或拍击式均质器均质 1 min。液体样品或粉末状样品,应振荡混匀。均质后于 26 °C ± 1 °C 增菌 48 h ~ 72 h。增菌时间长短可根据对样品污染程度的估计来确定。

5.2 碱处理

除乳与乳制品外,其他食品的增菌液 0.5 mL 与碱处理液 4.5 mL 充分混合 15 s。

5.3 分离

将乳与乳制品增菌液或经过碱处理的其他食品增菌液分别接种于 CIN-1 琼脂平板和改良 Y 琼脂平板, 26 °C ± 1 °C 培养 48 h ± 2 h。典型菌落在 CIN-1 上为深红色中心, 周围具有无色透明圈(红色牛眼状菌落), 菌落大小为 1 mm ~ 2 mm, 在改良 Y 琼脂平板上为无色透明、不黏稠的菌落。

5.4 改良克氏双糖试验

分别挑取 5.3 中的可疑菌落 3 个 ~ 5 个, 分别接种于改良克氏双糖铁琼脂, 接种时先在斜面划线, 再于底层穿刺, 26 °C ± 1 °C 培养 24 h, 将斜面和底部皆变黄且不产气的培养物做进一步的生化鉴定。

5.5 尿素酶试验和动力观察

用接种环挑取一满环 5.4 得到的可疑培养物, 接种到尿素培养基中, 接种量应足够大, 振摇几秒钟, 26 °C ± 1 °C 培养 2 h ~ 4 h。将尿素酶试验阳性菌落分别接种于两管半固体培养基中, 于 26 °C ± 1 °C 和 36 °C ± 1 °C 培养 24 h。将在 26 °C 有动力而 36 °C 无动力的可疑菌培养物划线接种营养琼脂平板, 进行纯化培养, 用纯化物进行革兰氏染色镜检和生化试验。

5.6 革兰氏染色镜检

将纯化的可疑菌进行革兰染色。小肠结肠炎耶尔森氏菌呈革兰氏阴性球杆菌, 有时呈椭圆或杆状, 大小为 (0.8 μm ~ 3.0 μm) × 0.8 μm

5.7 生化鉴定

5.7.1 从 5.5 中的营养琼脂平板上挑取单个菌落接种生化反应管, 生化反应在 26 °C ± 1 °C 进行。小肠结肠炎耶尔森氏菌的主要生化特征以及与其他相似菌的区别见表 1。

表 1 小肠结肠炎耶尔森氏菌与其他相似菌的生化性状鉴别表

项 目	小肠结肠炎耶尔森氏菌 <i>Yersinia enterocolitica</i>	中间型耶尔森氏菌 <i>Yersinia intermedia</i>	弗氏耶尔森氏菌 <i>Yersinia frederiksenii</i>	克氏耶尔森氏菌 <i>Yersinia kirstensenii</i>	假结核耶尔森氏菌 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	鼠疫耶尔森氏菌 <i>Yersinia pestis</i>
动力(26 °C)	+	+	+	+	+	-
尿素酶	+	+	+	+	+	-
V-P 试验(26 °C)	+	+	+	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶	+	+	+	+	-	-
蔗糖	d	+	+	-	-	-
棉子糖	-	+	-	-	-	d
山梨醇	+	+	+	+	-	-
甘露醇	+	+	+	+	+	+
鼠李糖	-	+	+	-	-	+

注: + 阳性; - 阴性; d 有不同生化型。

5.7.2 如选择微生物生化鉴定试剂盒或微生物生化鉴定系统, 可根据 5.6 镜检结果, 选择革兰阴性球杆菌菌落作为可疑菌落, 从 5.5 所接种的营养琼脂平板上挑取单菌落, 使用微生物生化鉴定试剂盒或微生

物生化鉴定系统进行鉴定。

5.8 血清型鉴定(选做项目)

除进行生化鉴定外,可选择做血清型鉴定。在洁净的载玻片上加一滴 O 因子血清,将待试培养物混入其内,使成为均一性混浊悬液,将玻片轻轻摇动 0.5 min~1 min,在黑色背景下观察反应。如在 2 min 内出现比较明显的小颗粒状凝集者,即为阳性反应,反之则为阴性,另用生理盐水作对照试验,以检查有无自凝现象;具体操作方法可按 GB 4789.4 中沙门氏菌 O 因子血清分型方法进行。

6 结果与报告

综合以上及生化特征报告结果,报告 25 g(或 25 mL)样品中检出或未检出小肠结肠炎耶尔森氏菌。

附录 A 培养基和试剂

A.1 改良磷酸盐缓冲液

A.1.1 成分

磷酸氢二钠	8.23 g
磷酸二氢钠	1.2 g
氯化钠	5.0 g
三号胆盐	1.5 g
山梨醇	20.0 g

A.1.2 制法

将磷酸盐及氯化钠溶于蒸馏水中,再加入三号胆盐及山梨醇,溶解后校正 pH 至 7.6,分装试管,于 121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.2 CIN-1 培养基

A.2.1 基础培养基:

胰胨	20.0 g
酵母浸膏	2.0 g
甘露醇	20.0 g
氯化钠	1.0 g
去氧胆酸钠	2.0 g
硫酸镁	0.01 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	950 mL

校正 pH 至 7.5 ± 0.1 ,将基础培养基于 121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.2.2 Irgasan(二氯苯氧氯酚):可用 95% 的乙醇作溶剂,溶解二苯醚,配成 0.4% 的溶液来替代 Irgasan,待基础培养基冷至 80 °C 时,加入 1 mL 混匀。

A.2.3 冷至 50 °C 时,加入:

中性红(3.0 mg/mL)	10.0 mL
结晶紫(0.1 mg/mL)	10.0 mL
头孢菌素(1.5 mg/mL)	10.0 mL
新生霉素(0.25 mg/mL)	10.0 mL

最后不断搅拌加入 10.0 mL 的 10% 氯化锶,倾注平皿。

A.3 改良 Y 培养基

A.3.1 成分

蛋白胨	15.0 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	10.0 g
草酸钠	2.0 g
去氧胆酸钠	6.0 g
三号胆盐	5.0 g
丙酮酸钠	2.0 g
孟加拉红	40.0 mg
水解酪蛋白	5.0 g
琼脂	17.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

将 A.3.1 中成分混合,校正 pH 至 7.4 ± 0.1 。于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min,待冷至 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右时,倾注平皿。

A.4 改良克氏双糖培养基

A.4.1 成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉膏	3.0 g
酵母膏	3.0 g
山梨醇	20.0 g
葡萄糖	1.0 g
氯化钠	5.0 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
硫代硫酸钠	0.5 g
琼脂	12.0 g
酚红	0.025 g
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

将酚红以外的各成分溶解于蒸馏水中,校正 pH 至 7.4。加入 0.2% 的酚红溶液 12.5 mL,摇匀,分装试管,装量宜多些,以便得到比较高的底层。 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min,放置高层斜面备用。

A.5 糖发酵管

A.5.1 成分

牛肉膏	5.0 g
-----	-------

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	3.0 g
磷酸氢二钠	2.0 g
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

A.5.2.1 葡萄糖发酵管按 A.5.1 中成分配好后,校正 pH 至 7.4,按 0.5%加入葡萄糖,分装于有一个倒置小管的小试管内,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.5.2.2 其他各种糖发酵管可按上述成分配好后,分装每瓶 100 mL,121 °C 高压灭菌 15 min。另将各种糖类分别配好 10%溶液,同时高压灭菌。将 5 mL 糖溶液加入 100 mL 培养基内,以无菌操作分装小试管。蔗糖不纯,加热后会自行水解者,应采用过滤法除菌。

A.5.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取少量培养物接种于 26 °C ± 1 °C 培养,一般观察 2 d~3 d。迟缓反应需观察 14 d~30 d。

A.6 鸟氨酸脱羧酶试验培养基

A.6.1 成分

蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
蒸馏水	1000 mL
1.6%溴甲酚紫-乙醇溶液	1.0 mL
L-鸟氨酸或 DL-鸟氨酸	0.5 g/100 mL 或 1 g/100 mL

A.6.2 制法

除鸟氨酸以外的成分加热溶解后,分装,每瓶 100 mL,分别加入鸟氨酸。L-鸟氨酸按 0.5%加入,DL-鸟氨酸按 1%加入。再校正 pH 至 6.8。对照培养基不加鸟氨酸。分装于无菌的小试管内,每管 0.5 mL,上面滴加一层液体石蜡,115 °C 高压灭菌 10 min。

A.6.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取培养物接种,于 26 °C ± 1 °C 培养 18 h~24 h,观察结果。鸟氨酸脱羧酶阳性者由于产碱,培养基呈紫色。阴性者无碱性产物,但因葡萄糖产酸而使培养基变为黄色。对照管为黄色。

A.7 半固体琼脂

A.7.1 成分

蛋白胨	1.0 g
牛肉膏	0.3 g
氯化钠	0.5 g

琼脂	0.35 g~0.4 g
蒸馏水	100 mL

A.7.2 制法

将 A.7.1 中成分配好,煮沸使溶解,并校正 pH 至 7.4。分装小试管,121 °C 高压灭菌 15 min,直立凝固备用。

注:供动力观察、菌种保存、H 抗原位相变异试验等用。

A.8 缓冲葡萄糖蛋白胨水[甲基红(MR)和 V-P 试验用]

A.8.1 成分

磷酸氢二钾	5.0 g
多肽	7.0 g
葡萄糖	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.8.2 制法

溶化后校正 pH 至 7.0,分装试管,每管 1 mL,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.8.3 甲基红(MR)试验

自琼脂斜面挑取少量培养物接种本培养基中,于 26 °C ± 1 °C 培养 2 d~5 d,哈夫尼亚菌则应在 22 °C~25 °C 培养。滴加甲基红试剂一滴,立即观察结果。鲜红色为阳性,黄色为阴性。甲基红试剂配法:10 mg 甲基红溶于 30 mL 95%乙醇中,然后加入 20 mL 蒸馏水。

A.8.4 V-P 试验

用琼脂培养物接种本培养基中,于 26 °C ± 1 °C 培养 2 d~4 d。哈夫尼亚菌则应在 22 °C~25 °C 培养。加入 6%α-萘酚-乙醇溶液 0.5 mL 和 40%氢氧化钾溶液 0.2 mL,充分振摇试管,观察结果。阳性反应立刻或于数分钟内出现红色,如为阴性,应放在 36 °C ± 1 °C 培养 4 h 再进行观察。

A.9 碱处理液

A.9.1 0.5%氯化钠溶液

氯化钠	0.5 g
蒸馏水	100 mL

121 °C 高压灭菌 15 min。

A.9.2 0.5%氢氧化钾溶液

氢氧化钾	0.5 g
蒸馏水	100 mL

121 °C 高压灭菌 15 min。

A.9.3 制法

将 0.5%氯化钠及 0.5%氢氧化钾等量混合。

A.10 尿素培养基**A.10.1 成分**

尿素	20.0 g
酵母浸膏	0.1 g
磷酸二氢钾	0.091 g
磷酸氢二钠	0.095 g
酚红	0.01 g
蒸馏水	1 000 mL

A.10.2 制法

将 A.10.1 中成分于蒸馏水中溶解,校正 pH 至 6.8 ± 0.2 。不要加热,过滤除菌,无菌分装于灭菌小试管中,每管约为 3 mL。

A.10.3 试验方法

挑取琼脂培养物接种在尿素培养基, $26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 24 h。尿素酶阳性者由于产碱而使培养基变为红色。

A.11 营养琼脂**A.11.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g
蒸馏水	1 000 mL

A.11.2 制法

将 A.11.1 中成分于蒸馏水中溶解,校正 pH 至 7.3 ± 0.2 。121 $^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。