

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1071—2014
代替 SN/T 1071—2002

出口食品中厌氧亚硫酸盐 还原梭状芽孢杆菌检测方法

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

2014-01-13 发布

2014-08-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 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》。

本标准与 SN/T 1071—2002 相比,主要技术变化如下:

- 将原标准名称《进出口食品中厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌检验方法》修改为《出口食品中厌氧亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌检测方法》;
- 增加了规范性引用文件;
- 修改和规范了“设备和材料”;
- 增加了“非冷冻而易腐蚀的样品”的采集、贮存和运输,及样品制备的方法;
- 增加了平板计数法中的“分别吸取 1 mL 空白稀释液加入两个无菌平皿内做空白对照”;
- 增加了平板计数法中结果计算的举例;
- 将平板计数法中的数值单位“/g(mL)”修改为“CFU/g(mL)”;
- 将最近似值(MPN)法中的数值单位“/g(mL)”修改为“MPN/g(mL)”;
- 附录 A 中增加了 2% 无菌琼脂的成分和制法。

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。

本标准主要起草人:曹际娟、王金玲、张莹、徐君怡、李俊环。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN/T 1071—2002。

出口食品中厌氧亚硫酸盐 还原梭状芽孢杆菌检测方法

1 范围

本标准规定了出口食品中厌氧亚硫酸盐还原梭状芽孢杆菌检测方法。
本标准适用于出口食品中厌氧亚硫酸盐还原梭状芽孢杆菌检测。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

厌氧亚硫酸盐还原梭状芽孢杆菌 anaerobic sulfite-reducing clostridia

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孢杆菌。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 冰箱:2℃~5℃。
- 3.2 恒温水浴箱:50℃±1℃。
- 3.3 恒温培养箱:36℃±1℃。
- 3.4 天平:感量0.1g。
- 3.5 均质器及均质杯或均质袋。
- 3.6 厌氧条件及相关设备:选择合适大小的厌氧罐、密封效果好的密封盒中,或其他保持厌氧条件的设备中放入厌氧袋,也可在厌氧恒温工作站中进行培养。
- 3.7 无菌吸管:1 mL(具0.01刻度)、10 mL(具0.1刻度)或微量移液器及吸头。
- 3.8 无菌培养皿:直径90 mm。
- 3.9 无菌试管:15 mm×150 mm。
- 3.10 pH计或pH比色管或精密pH试纸。

4 培养基和试剂

- 4.1 氯化钠胰蛋白胨稀释液:见附录A中A.1。
- 4.2 亚硫酸铁琼脂:见A.2。
- 4.3 庖肉培养基:见A.3。
- 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A.4。
- 4.6 2%无菌琼脂:见A.5。

5 样品的贮存和运输

- 5.1 冷冻样品,如不能立即进行检验,应置于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 5.2 非冷冻而易腐蚀的样品,无菌操作称取 25 g (mL)样品加入 25 mL 无菌缓冲甘油-氯化钠溶液(液体食品应加双料),并尽快放入 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。
- 5.3 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。

6 样品制备

将冷冻样品在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下不超过 15 min ,或 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 不超过 18 h 解冻后进行检验。以无菌操作称取 25 g 样品,放入装有 225 mL 氯化钠胰蛋白胨稀释液的灭菌均质杯或无菌均质袋内(如为5.2中样品,加入 200 mL 氯化钠胰蛋白胨稀释液),于 $8\text{ }000\text{ r/min}\sim 10\text{ }000\text{ r/min}$ 均质 $1\text{ min}\sim 2\text{ min}$ 或用拍击式均质器拍击 1 min ,制成 $1:10$ 样品匀液。如为液体样品,则无菌操作移样 25 mL ,加入装有 225 mL 氯化钠胰蛋白胨稀释液的灭菌玻璃瓶中(如为5.2中样品,加入 200 mL 氯化钠胰蛋白胨稀释液),充分混匀后,制成 $1:10$ 样品匀液。根据样品污染情况做进一步的系列 10 倍递增稀释。若检测厌氧亚硫酸盐还原梭状芽孢杆菌的芽孢,可对 $1:10$ 样品匀液进行 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 10 倍递增稀释。

7 检验步骤与计算

7.1 平板计数法

- 7.1.1 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孢杆菌 $>10\text{ CFU/g}(\text{mL})$ 的食品。
- 7.1.2 选适宜的三个连续稀释度,从每个稀释度分别吸取 1 mL 稀释样液于无菌培养皿内,每个稀释度做两个平皿。同时,分别吸取 1 mL 空白稀释液加入两个无菌平皿内做空白对照。
- 7.1.3 及时将约 15 mL 冷却至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的亚硫酸铁琼脂培养基(可放置于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱保温)倾注平皿,并转动平皿使其混合均匀。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 。
- 7.1.4 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。
- 7.1.5 待该隔层凝固后,将制备好的平板于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 $24\text{ h}\sim 48\text{ h}$ 。若对培养温度有特殊要求(如 $46\text{ }^{\circ}\text{C}$),可根据情况进行培养。
- 7.1.6 厌氧亚硫酸盐还原梭状芽孢杆菌在亚硫酸铁琼脂上呈黑色菌落。
- 7.1.7 从计数的平板(具 20 个 ~ 200 个菌落)中任取 10 个典型菌落,分别取培养物按9.1和9.2进行证实试验。对阳性结果进行计数。
- 7.1.8 平板典型菌落数乘以证实为厌氧亚硫酸盐还原梭状芽孢杆菌菌落所占比例,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孢杆菌的计数,报告为厌氧亚硫酸盐还原梭状芽孢杆菌 $\text{CFU/g}(\text{mL})$ 。例如:在 10^{-1} 样液的两个平板中分别有 85 个和 80 个菌落,而确认在 10 个菌落中分别有 8 个和 4 个为厌氧亚硫酸盐还原梭状芽孢杆菌,那么每克或每毫升食品的厌氧亚硫酸盐还原梭状芽孢杆菌数为 $(85\times 8/10+80\times 4/10)/2\times 10=500$ 。

7.2 最近似值(MPN)法

- 7.2.1 适用于检验含有受损伤的厌氧亚硫酸盐还原梭状芽孢杆菌的加工食品及厌氧亚硫酸盐还原梭

状芽孢杆菌 ≤ 10 CFU/g(mL)的食品。

7.2.2 选适宜的三个连续稀释度,从每个稀释度中分别吸取 1 mL 稀释样液,接种于 3 管装有庖肉培养基的试管中,36 °C \pm 1 °C 厌氧培养 24 h~72 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(即:按照 7.2.3 进行培养)。反之,则按阴性结果计数。

7.2.3 吸取 7.2.2 出现生长特征性的增菌培养物 1 mL 分别置于无菌培养皿中,将约 15 mL 46 °C 的亚硫酸铁琼脂(可放置于 46 °C \pm 1 °C 恒温水浴箱保温)倾注平皿,并转动平皿使其混合均匀,待其凝固后,再倾注 10 mL 同样的培养基作为隔层,于 36 °C \pm 1 °C 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 8.1 和 8.2 加以证实;若无黑色菌落生成,则按阴性结果计数。

7.2.4 最近似值(MPN)的估算应计数每个稀释样液得到的阳性反应管数。根据反应阳性管数查阅 MPN 检索表(见附录 B),得出样品中厌氧亚硫酸盐还原梭状芽孢杆菌最近似值,报告为厌氧亚硫酸盐还原梭状芽孢杆菌 MPN/g(mL)。

8 证实试验

8.1 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孢杆菌为革兰氏阳性的梭状芽孢杆菌。产芽孢时,芽孢呈卵圆形或球形,位于中央、次终端。

8.2 过氧化氢酶试验

在洁净载玻片上滴 1 滴培养物,再滴 1 滴~2 滴 3% 的过氧化氢溶液,于 0.5 min 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孢杆菌不产生过氧化氢酶。

附录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 氯化钠胰蛋白胨稀释液

A.1.1 成分

胰蛋白胨	1.0 g
氯化钠(NaCl)	8.5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.1.2 制法

将以上成分混合加热溶化,调节 pH 至 7.2 ± 0.1 , 121°C 高压灭菌 15 min。

A.2 亚硫酸铁琼脂

A.2.1 成分

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($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)	1.0 g
柠檬酸铁铵 $[(\text{NH}_4)_3\text{FeCl}_2\text{H}_6\text{O}_4]$	1.0 g
琼脂	20.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.2.2 制法

将以上成分混合加热溶化,调节 pH 至 7.6 ± 0.1 , 121°C 高压灭菌 15 min。

A.3 庖肉培养基

A.3.1 成分

牛肉浸液	1 000.0 mL
蛋白胨	30.0 g
酵母浸膏	5.0 g
磷酸二氢钠($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$)	5.0 g
葡萄糖	3.0 g
可溶性淀粉	2.0 g
碎肉渣	适量

A.3.2 制法

取碎肉渣分装 15 mm×150 mm 试管,高约 2 cm~3 cm,将上述液体培养基分装至每管内超过肉

渣表面约 1 cm。上面覆盖融化的凡士林或液体石蜡 0.3 cm~0.4 cm。121 °C 高压灭菌 15 min。

A.4 缓冲甘油-氯化钠溶液

A.4.1 成分

氯化钠(NaCl)	4.2 g
无水磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	12.4 g
无水磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	4.0 g
甘油	100.0 mL
蒸馏水	900.0 mL

A.4.2 制法

将以上成分混合加热溶化,调节 pH 至 7.2,121 °C 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。

A.5 2%无菌琼脂

A.5.1 成分

琼脂	2.0 g
蒸馏水	100.0 mL

A.5.2 制法

将以上成分混合加热溶化,121 °C 高压灭菌 15 min。

附 录 B
(规范性附录)

1 g(mL) 检样中厌氧亚硫酸盐还原梭状芽孢杆菌最近似值(MPN)表

使用三管法,接种量分别为 0.1 g,0.01 g,0.001 g(见表 B.1)。

表 B.1 1 g(mL) 检样中厌氧亚硫酸盐还原梭状芽孢杆菌最近似值(MPN)表

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)],每个稀释度接种三管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1 g(mL)、0.1 g(mL)时,表内数字应相应降低 10 倍;如改用 0.01 g(mL)和 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
出口食品中厌氧亚硫酸盐
还原梭状芽孢杆菌检测方法
SN/T 1071—2014

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

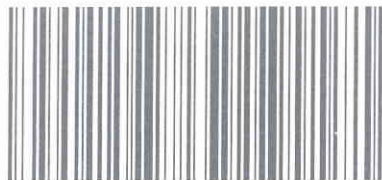
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 12 千字
2014年12月第一版 2014年12月第一次印刷
印数 1—1 300

*

书号: 155066·2-27760 定价 16.00 元



SN/T 1071-2014