

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 0173—2010

代替 SN 0173—1992

### 进出口食品中副溶血性弧菌检验方法

Determination of *Vibrio Parahaemolyticus* in food for import and export

www.kingshunt.cn  
凯恒生物

2010-01-10 发布

2010-07-16 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

本标准代替 SN 0173—1992《出口食品副溶血性弧菌检验方法》。

本标准参照 ISO/TS 21872-1:2007《食品和饲料的微生物学检验方法 致病性弧菌属的水平检验方法 第 1 部分:副溶血性弧菌和霍乱弧菌的检验(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. —Part 1:Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*)》、美国 FDA 细菌学分析手册 第九章 弧菌属 2004 (FDA Bacteriological Analytical Manual Chapter 9 *Vibrio*,2004)对原标准文本格式、某些文字表述和文本内容进行修订,但主要技术路线与检验方法未做改动。

本标准与 SN 0173—1992 相比,主要变化如下:

- 将原标准名称修订为《进出口食品中副溶血性弧菌检验方法》;
- 将范围进行了修订;
- 增加了方法提要与流程;
- 在检测步骤中增加了带壳贝类样品的制备和稀释方法;
- 将副溶血性弧菌的定性和定量检测步骤分别进行叙述;
- 增加了显色培养基进行筛选检测;
- 将报告结果修订为“定性结果报告”和“最近似值(MPN)结果报告”;
- 将培养基、试剂的配方参照 ISO/TS 21872-1 方法进行了部分修订。

本标准的附录 A、附录 D 为规范性附录,附录 B、附录 C 为资料性附录。

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、天津出入境检验检疫局、山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:徐君怡、曹际娟、高旗利、郑秋月、雷质文、王秋艳、蒋丹、马惠蕊、宋慧君、卢行安。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN 0173—1992。

# 进出口食品中副溶血性弧菌检验方法

## 1 范围

本标准规定了进出口食品中副溶血性弧菌的定性检测方法和最近似值(MPN)计数方法。

本标准适用于食品中副溶血性弧菌的检验,动物饲料和其他食品生产和加工区域环境样品中的副溶血性弧菌检验可参照使用。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN 0330 出口食品中微生物学检验通则

SN/T 1538.1 培养基制备指南 第1部分:实验室培养基制备质量保证通则

SN/T 1538.2 培养基制备指南 第2部分:培养基性能测试实用指南

## 3 取样与制样

### 3.1 取样

取样数量及取样方法按 SN 0330 进行。

### 3.2 试样制备

#### 3.2.1 鱼类

取鱼体不同部位。

#### 3.2.2 带壳贝类

应先在清洁的流水中洗净外壳,用 70%乙醇消毒外壳,然后以无菌操作切断闭壳肌,打开贝壳。取出含内脏的全部贝肉和贝液。每个检测样品至少应包括 12 个贝类个体。

#### 3.2.3 甲壳类

取包括鳃及肠的部分或整体。

### 3.3 样品解冻及保存

冷冻样品应在 45℃以下不超过 15 min 或在 2℃~5℃不超过 18 h 解冻。若不能及时检验,应放于-15℃左右保存,在 48 h 内检验;非冷冻而易腐的样品应尽可能及时检验,若不能及时检验,应置于 6℃~10℃冰箱保存,在 24 h 内检验。

## 4 设备与材料

4.1 试管:15 mm×150 mm、10 mm×100 mm。

4.2 吸管:1 mL、10 mL。

4.3 培养皿:直径 90 mm。

4.4 均质器:8 000 r/min~10 000 r/min。

4.5 恒温箱:36℃±1℃。

4.6 恒温水浴箱:42℃±1℃。

## 5 培养基及试剂

- 5.1 碱性蛋白胨水(APW)。见附录 A 第 A.1 章。
- 5.2 氯化钠多粘菌素 B 肉汤(SPB)。见附录 A 第 A.2 章。
- 5.3 硫代硫酸钠、柠檬酸钠、胆盐、蔗糖琼脂(TCBS)。见附录 A 第 A.3 章。
- 5.4 CHROM ID VIBRIO 弧菌显色培养基。见附录 A 第 A.4 章。
- 5.5 氯化钠三糖铁琼脂(TSI)。见附录 A 第 A.5 章。
- 5.6 氯化钠营养琼脂。见附录 A 第 A.6 章。
- 5.7 氧化酶试剂。见附录 A 第 A.7 章。
- 5.8 鸟氨酸脱羧酶氯化钠肉汤(ODC)。见附录 A 第 A.8 章。
- 5.9 赖氨酸脱羧酶氯化钠肉汤(LDC)。见附录 A 第 A.9 章。
- 5.10 精氨酸双水解酶氯化钠肉汤(ADH)。见附录 A 第 A.10 章。
- 5.11  $\beta$ -半乳糖苷酶试剂。见附录 A 第 A.11 章。
- 5.12 氯化钠溶液。见附录 A 第 A.12 章。
- 5.13 氯化钠蛋白胨水。见附录 A 第 A.13 章。
- 5.14 靛基质氯化钠肉汤。见附录 A 第 A.14 章。
- 5.15 V-P 半固体琼脂(VP)。见附录 A 第 A.15 章。
- 5.16 糖类分解试验用培养基。见附录 A 第 A.16 章。
- 5.17 42 °C 生长试验用培养基。见附录 A 第 A.17 章。
- 5.18 O/F 试验用培养基(HLGB)。见附录 A 第 A.18 章。
- 5.19 神奈川现象试验用我妻氏琼脂(WA)。见附录 A 第 A.19 章。

## 6 方法提要与流程

### 6.1 方法提要

本方法采用增菌培养和分离鉴定的方法对副溶血性弧菌进行定性检测。同时也采用带有前增菌的最近似值(MPN)的方法对副溶血性弧菌进行定量检测。

### 6.2 检测流程

进出口食品中副溶血性弧菌检测流程图参见附录 B。

## 7 检测步骤

### 7.1 定性检测

#### 7.1.1 增菌培养

##### 7.1.1.1 新鲜样品

以无菌操作称取 25 g 检样,加入 225 mL SPB 肉汤或 APW 肉汤中,36 °C  $\pm$  1 °C 培养 18 h  $\pm$  1 h, 进行选择性的增菌。

如果样品不足 25 g,在实验能够证明不影响结果的情况下,则取全部样品( $x$  g 或  $x$  mL),加入  $9x$  mL 增菌液中进行选择性增菌。

##### 7.1.1.2 带壳贝类

取至少 12 个贝类个体,按 3.2.2 制备试样。取试样加入等体积的 SPB 肉汤(1 : 2 稀释),均质 90 s。称取上述均质样液 20 g 加入 80 mL SPB 肉汤中,36 °C  $\pm$  1 °C 培养 18 h  $\pm$  1 h。

注:建议称取均质样液的质量(20 g),由于均质时产生的气泡,可能影响正确的体积读数。

##### 7.1.1.3 经加热、辐射处理或冷藏、冻结的样品

以无菌操作称取 25 g 检样,接种于 225 mL APW 肉汤中,于 36 °C  $\pm$  1 °C 前增菌 6 h  $\pm$  1 h。之后,

在 APW 培养物表面取 1 mL 培养物接种到 10 mL 的 SPB 肉汤中,  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $18\text{ h} \pm 1\text{ h}$ , 进行选择增菌。

### 7.1.2 分离培养

将 7.1.2 的培养物接种 TCBS 琼脂和 CHROM ID VIBRIO 弧菌显色培养基平板上。  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $18\text{ h} \pm 1\text{ h}$ 。

副溶血性弧菌在 TCBS 平板上的典型菌落呈圆形, 边缘整齐、湿润、稍混浊、半透明, 多数具尖心、斗笠状, 蓝绿色菌落, 直径  $2\text{ mm} \sim 4\text{ mm}$ 。副溶血性弧菌在 CHROM ID VIBRIO 弧菌显色培养基平板上的典型菌落呈紫红色菌落(某些弧菌, 如河流弧菌也可能会产生与副溶血弧菌相似的紫红色菌落)。

取可疑菌落按 7.3 进行鉴定。

## 7.2 带有前增菌的最近似值(MPN)的定量检测

### 7.2.1 检样制备

以无菌操作称取 50 g 检样放于均质杯中, 加入 450 mL SPB 肉汤,  $8\ 000\text{ r/min}$  均质 1 min, 或以剪刀尽量剪碎, 并充分振荡使成  $1:10$  稀释液。

如果样品不足 50 g, 在实验能够证明不影响结果的情况下, 则取全部样品 ( $x\text{ g}$  或  $x\text{ mL}$ ), 加入  $9x\text{ mL}$  增菌液以获得  $10^{-1}$  浓度的稀释液。

用 1 mL 灭菌吸管吸取  $1:10$  稀释液 1 mL, 注入装有 SPB 肉汤的试管内, 振摇试管混合均匀, 制成  $1:100$  稀释液。按上项操作顺序进行 10 倍递增稀释。

### 7.2.2 增菌培养

#### 7.2.2.1 新鲜样品

选择 3 个连续适宜的稀释度, 分别以 1 mL 无菌吸管各吸取 1 mL 稀释液, 接种 10 mL 单料 SPB 肉汤中, 每一稀释度接种 3 管,  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $18\text{ h} \pm 1\text{ h}$ , 进行选择增菌培养。

若选择的稀释度为接种 1 g 样品时, 则应以 10 mL 灭菌吸管吸取  $1:10$  稀释液 10 mL, 接种 10 mL 双料 SPB 肉汤中。

#### 7.2.2.2 带壳贝类

取至少 12 个贝类个体, 按 3.2.2 制备试样。取试样加入等体积的 SPB 肉汤 ( $1:2$  稀释), 均质 90 s。称取上述均质样液 20 g 加入 80 mL SPB 肉汤中制成  $1:10$  稀释的均质液, 同 7.2.2.1 方法进行 10 倍递增稀释。  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $18\text{ h} \pm 1\text{ h}$ 。

注: 建议称取均质样液的质量 (20 g), 由于均质时产生的气泡, 可能影响正确的体积读数。

#### 7.2.2.3 经加热、辐射处理或冷藏、冷冻的样品

选择 3 个连续适宜的稀释度, 分别以 1 mL 无菌吸管各吸取 1 mL 稀释液, 接种 10 mL 单料 APW 肉汤, 每一稀释度接种 3 管,  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  前增菌  $6\text{ h} \pm 1\text{ h}$ 。

若选择的稀释度为接种 1 g 样品时, 则应以 10 mL 灭菌吸管吸取  $1:10$  稀释液 10 mL, 接种 10 mL 双料 APW 肉汤中。

在各管 APW 培养物表面各取 1 mL 培养物, 分别接种到 10 mL 的 SPB 肉汤中,  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $18\text{ h} \pm 1\text{ h}$ 。

### 7.2.3 分离培养

选取 3 个有菌生长的最高稀释度 SPB 肉汤管, 以 3 mm 直径接种环分别取一环菌液, 划线于 TCBS 平板和 CHROM ID VIBRIO 弧菌显色培养基平板上。  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ 。取可疑菌落按 7.3 进行鉴定。

## 7.3 鉴定

### 7.3.1 选择可疑菌落并纯化菌落

在 TCBS 平板和 CHROM ID VIBRIO 弧菌显色培养基平板上如出现可疑菌落, 至少应挑取 5 个可疑菌落, 进行传代培养。如果平板上的可疑菌落少于 5 个, 则应该全部挑取传代培养。

注：食品，特别是海产品，可能含有大量的细菌，包括非致病性的弧菌属，这些菌可能在选择性培养阶段生长。如果在传代培养阶段选择的菌落太少的话，则可能造成目标致病菌的漏检。

在氯化钠营养琼脂表面接种可疑菌落以获得纯培养物， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养  $24\text{ h}\pm 3\text{ h}$ 。用该纯培养物进行确认实验。

### 7.3.2 初步生化试验

#### 7.3.2.1 革兰氏染色与镜检

副溶血性弧菌为革兰氏阴性，呈棒状、弧状、卵圆状等多形态，两端浓染、无芽孢。

#### 7.3.2.2 无盐胰胨水

接种无盐胰胨水， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养  $24\text{ h}\pm 3\text{ h}$ 。副溶血性弧菌在无盐胰胨水中几乎不生长。

#### 7.3.2.3 3%氯化钠胰胨水

接种 3%氯化钠胰胨水， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养  $24\text{ h}\pm 3\text{ h}$ 。副溶血性弧菌在 3%氯化钠胰胨水中生长旺盛。

#### 7.3.2.4 氯化钠三糖铁琼脂

接种氯化钠三糖铁斜面，穿刺底层并划线斜面。 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养  $18\text{ h}\pm 1\text{ h}$ 。

反应结果解释如下：

##### a) 琼脂底层

- 1) 黄色：葡萄糖发酵反应阳性(发酵葡萄糖)；
- 2) 红色或者未变色：葡萄糖发酵反应阴性(不发酵葡萄糖)；
- 3) 黑色：产生硫化氢；
- 4) 产生气泡或者培养基爆裂：葡萄糖发酵产气；

##### b) 琼脂斜面

- 1) 黄色：乳糖或蔗糖利用阳性(使用乳糖或蔗糖)；
- 2) 红色或未变色：乳糖或蔗糖利用阴性(不使用乳糖或蔗糖)；
- 3) 典型的副溶血性弧菌在氯化钠三糖铁斜面上的反应为底层黄色，斜面红色，不产生硫化氢，不产气。

#### 7.3.2.5 生化确认菌株选择

选取初步生化实验符合的菌株继续按 7.3.3 进行生化鉴定确认，或采用法国梅里埃公司的 ID32E 鉴定试剂条进行生化鉴定(按该试剂盒的操作说明进行)。

### 7.3.3 生化确认

#### 7.3.3.1 嗜盐性试验

各取一环 3%氯化钠胰胨水培养物，分别接种 6%、8%和 10%氯化钠胰胨水中， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养  $24\text{ h}\pm 3\text{ h}$ 。

#### 7.3.3.2 氧化酶试验

以无菌白色滤纸蘸取营养琼脂表面纯培养物，滴加氧化酶试剂进行氧化酶试验。如果滤纸颜色在 10 s 内变为紫色或者深紫色，则为阳性反应。

#### 7.3.3.3 鸟氨酸脱羧酶试验

接种鸟氨酸脱羧酶氯化钠肉汤(5.8)。在肉汤上面覆盖 1 mL 灭菌矿物油。 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养  $24\text{ h}\pm 3\text{ h}$ 。

培养后液体混浊变紫为阳性反应(细菌生长，鸟氨酸脱羧)；液体黄色为阴性反应。

#### 7.3.3.4 赖氨酸脱羧酶试验

接种赖氨酸脱羧酶氯化钠肉汤(5.9)。在肉汤上面覆盖 1 mL 灭菌矿物油。 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养  $24\text{ h}\pm 3\text{ h}$ 。

培养后液体混浊变紫为阳性反应(细菌生长，赖氨酸脱羧)；液体黄色为阴性反应。

### 7.3.3.5 精氨酸双水解酶试验

接种精氨酸双水解酶氯化钠肉汤(5.10)。在肉汤上面覆盖 1 mL 灭菌矿物油。36 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 3 h。

培养后液体混浊变紫为阳性反应(细菌生长,精氨酸双水解);液体黄色为阴性反应。

### 7.3.3.6 V-P 试验

以接种针由氯化钠营养琼脂上取少许培养物穿刺 V-P 半固体琼脂(5.15),36 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 3 h。在加 V-P 试剂前应先观察动力。沿穿刺线周围呈扩散性生长为动力阳性。

### 7.3.3.7 β-半乳糖苷酶试验

挑取可疑菌落,在装有 0.25 mL 氯化钠溶液(5.12)的试管中制成菌悬液,加入一滴甲苯,振摇试管。将试管于 36 °C ± 1 °C 静置 5 min。加入 0.25 mL β-半乳糖苷酶试剂(5.11),混匀。将试管放入 36 °C ± 1 °C 培养箱中,放置 24 h ± 3 h,随时观察。

培养后液体变黄为阳性反应(存在 β-半乳糖苷酶)。反应结果通常 20 min 后可见。24 h 后无颜色变化为阴性反应。

### 7.3.3.8 靛基质试验

将可疑菌落接种于装有 5 mL 胰蛋白胨-色氨酸氯化钠肉汤(5.14)中。36 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 3 h。培养后加入 1 mL Kovacs' 试剂。形成红色环为阳性反应(形成吲哚),黄色环为阴性反应。

### 7.3.4 扩大生化鉴别

如果所分离的菌株符合 7.3.3 生化确认特性,按第 8 章报告结果。

如果所分离的菌株仅有一项不符合 7.3.3 生化确认特性时,则需进一步扩大生化鉴别,进行蔗糖分解试验,42 °C 生长试验,O/F 试验鉴定。

如上述扩大生化鉴别符合副溶血性弧菌特性,可按第 8 章报告结果;若有一项不符合,则为阴性。

副溶血性弧菌的生化鉴定特性见表 1。副溶血性弧菌与有关细菌的鉴别可参见附录 C。

表 1 副溶血性弧菌的生化鉴定特性

鉴定程序	生化项目	生化性状
初步生化实验	氯化钠三糖铁 斜面 底层 硫化氢 嗜盐性 无盐胰胨水 3%氯化钠胰胨水	产碱 产酸,不产气 阴性 几乎不生长 生长旺盛
生化确认	6%氯化钠胰胨水 8%氯化钠胰胨水 10%氯化钠胰胨水 靛基质 V-P 动力 氧化酶 赖氨酸脱羧酶 精氨酸双水解酶 鸟氨酸脱羧酶 ONPG 水解	明显生长 明显生长 几乎不生长 阳性 阴性 阳性 阳性 阳性 阴性 阳性 阴性
扩大生化鉴别	42 °C 生长 O/F 试验 发酵型	阳性 不分解 发酵型

## 7.4 神奈川现象及血清学试验(根据需要进行)

### 7.4.1 神奈川现象试验

以接种环将3%氯化钠胰胨水培养物点种于充分干燥的我妻氏琼脂平板上。可先在平板背面以玻璃铅笔划出若干小区,使一个平板能做多个试验。36℃±1℃培养18h±1h。在24h以内观察结果,阳性结果在菌落周围有一清晰的透明环。

### 7.4.2 血清学鉴定

#### 7.4.2.1 K抗原凝集试验

将经生化试验证实为副溶血性弧菌的菌株转种在两支3%氯化钠普通琼脂斜面上,36℃±1℃培养18h。以2mL 2%氯化钠溶液洗下一支琼脂斜面培养物,制成浓厚菌悬液。先以K多价抗血清与菌悬液进行玻片凝集试验。在1min内观察反应。阳性凝集者,另进行自然凝集试验,若自然凝集试验为阴性,再以该K多价抗血清中的单因子K抗血清进行试验。与单因子K抗血清出现阳性凝集的,为该菌株的相应K抗原。

#### 7.4.2.2 O抗原凝集试验

以2%氯化钠[含5%(体积分数)甘油]溶液洗另一支琼脂斜面培养物,将菌悬液经121℃高压灭菌1h。以离心沉淀法去上清液,再以2%氯化钠溶液4000r/min离心15min,洗两次沉淀后加0.5mL 2%氯化钠溶液制成浓厚的菌悬液。以已知K抗原对应的O群抗血清进行玻片凝集试验,同时以2%氯化钠溶液代替抗血清做自然凝集对照试验。与抗血清出现强阳性凝集的,为该菌株的O抗原。

#### 7.4.2.3 血清学报告

副溶血性弧菌的抗原分为O、K、H三种。血清学分型以O及K抗原进行鉴定。

根据以上血清学试验结果,可报告副溶血性弧菌为O××K××血清型。

注:副溶血性弧菌为二级生物安全有害微生物,微生物操作、废弃物处理及个体防护等生物安全保障规定参见GB 19489。

## 8 报告结果

### 8.1 定性结果报告

根据生化试验是否符合副溶血性弧菌特性,直接报告检出或未检出副溶血性弧菌。

### 8.2 最近似值(MPN)结果报告

生化试验符合副溶血性弧菌特性的菌株,按该菌阳性管数,应用MPN表(见附录D),查出每克样品中的副溶血性弧菌MPN值,报告为每克样品中的副溶血性弧菌的最近似值(MPN/g)。

当报告每100g样品中副溶血性弧菌的最近似值时,可将查表所得数字乘以100。



附 录 A  
(规范性附录)  
培养基与试剂<sup>1)</sup>

### A.1 碱性蛋白胨水

#### A.1.1 组成

蛋白胨	20.0 g
氯化钠	20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

#### A.1.2 制法

混匀后,调节 pH 值至  $8.6 \pm 0.2$  ( $25^{\circ}\text{C}$ ),根据试验需要分装于广口瓶或者试管中,  $121^{\circ}\text{C}$  灭菌 15 min。

### A.2 氯化钠多粘菌素 B 肉汤 (SPB)

#### A.2.1 组成

酵母浸膏	3.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	20.0 g
多粘菌素 B	250 U/mL 培养基
蒸馏水	1 000 mL

#### A.2.2 制法

将各组分(多粘菌素 B 除外)加热溶解,稍冷后加入多粘菌素 B,调至 pH7.4。分装于试管中,每管 10 mL。  $121^{\circ}\text{C}$  灭菌 15 min。灭菌后,立即将培养基取出放凉。

### A.3 TCBS 琼脂

#### A.3.1 组成

蛋白胨	10.0 g
酵母浸膏	5.0 g
柠檬酸钠	10.0 g
硫代硫酸钠	10.0 g
柠檬酸铁	1.0 g
氯化钠	10.0 g
牛胆盐	8.0 g
蔗糖	20.0 g
麝香草酚蓝	0.04 g
溴麝香草酚蓝	0.04 g
琼脂	18.0 g
水	1 000 mL

1) 为保证培养基的质量,应按 SN/T 1538.1、SN/T 1538.2 进行培养基的制备与性能测试。若使用商售的脱水合成培养基,应选用国内外通过 ISO 9000 质量管理体系认证生产厂商的产品并按其说明制备和使用。

## A.3.2 制法

将各成分加热煮沸,调节 pH 值至  $8.6 \pm 0.2$  ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ )。不要高压灭菌。分装 15 mL~20 mL 于培养皿内制成平板。

A.4 CHROM ID VIBRIO 弧菌显色培养基<sup>1)</sup>

## A.4.1 组成

蛋白胨(牛)	16.5 g
肉浸膏(牛或猪)	0.5 g
大豆蛋白胨	5 g
氯化钠	6 g
碳酸钠	0.85 g
中性红	0.01 g
碳水化合物混合物	16.6 g
胆盐(牛或绵羊)	0.6 g
显色剂混合物	0.125 g
选择性混合物	0.033 g
琼脂	11 g
纯水	1 000 mL

## A.4.2 制法

将各成分加热煮沸,调节 pH 值至  $8.6 \pm 0.2$  ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ )。不要高压灭菌。分装 15 mL~20 mL 于培养皿内制成平板。

## A.5 氯化钠三糖铁琼脂(TSI)

## A.5.1 组成

蛋白胨	20.0 g
牛肉浸膏	3.0 g
酵母浸膏	3.0 g
氯化钠	10.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
柠檬酸铁	0.3 g
酚红	0.024 g
琼脂	18 g
水	1 000 mL

## A.5.2 制法

混匀后,加热至溶解,调节 pH 值至灭菌后为  $7.4 \pm 0.2$  ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ )。分装 10 mL 于试管中,  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  灭菌 15 min。倾斜放置,制成斜面。

## A.6 氯化钠营养琼脂

## A.6.1 组成

牛肉浸膏	5.0 g
------	-------

1) 该培养基为法国梅里埃公司的产品。

蛋白胨	3.0 g
氯化钠	10.0 g
琼脂	18 g
水	1 000 mL

#### A.6.2 制法

混匀后,加热至溶解,调节 pH 值至灭菌后为  $7.2 \pm 0.2$  (25 °C), 121 °C 灭菌 15 min。分装 15 mL~20 mL 于培养皿内制成平板。或者分装 10 mL 于灭菌试管中,倾斜放置,制成斜面。

#### A.7 氧化酶试剂

##### A.7.1 组成

<i>N,N,N,N</i> -四甲基间苯二胺	1.0 g
水	100 mL

##### A.7.2 制法

在冷水中溶解,用前配制,置于棕色瓶内。

#### A.8 鸟氨酸脱羧酶氯化钠肉汤(ODC)

##### A.8.1 组成

L-鸟氨酸	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
氯化钠	10.0 g
水	1 000 mL

##### A.8.2 制法

混匀后,加热至溶解,调节 pH 值至  $6.8 \pm 0.2$  (25 °C)。分装 2 mL~5 mL 于小试管中,121 °C 灭菌 15 min。

#### A.9 赖氨酸脱羧酶氯化钠肉汤(LDC)

##### A.9.1 组成

L-赖氨酸	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
氯化钠	10.0 g
水	1 000 mL

##### A.9.2 制法

混匀后,加热至溶解,调节 pH 值至  $6.8 \pm 0.2$  (25 °C)。分装 2 mL~5 mL 于小试管中,121 °C 灭菌 15 min。

#### A.10 精氨酸双水解酶氯化钠肉汤(ADH)

##### A.10.1 组成

精氨酸	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g

葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
氯化钠	10.0 g
水	1 000 mL

## A. 10.2 制法

混匀后,加热至溶解,调节 pH 值至  $6.8 \pm 0.2$  ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ )。分装 2 mL~5 mL 于小试管中,  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  灭菌 15 min。

A. 11  $\beta$ -半乳糖苷酶试剂

## A. 11.1 ONPG 溶液

## A. 11.1.1 组成

磷硝基酚- $\beta$ -半乳糖苷	0.08 g
水	15 mL

## A. 11.1.2 制法

将 ONPG 溶于  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  水中。将溶液冷却。

## A. 11.2 缓冲液

## A. 11.2.1 组成

磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	6.9 g
氢氧化钠( $\text{NaOH}$ ) ( $0.1\text{ mol/L}$ )	3 mL
水,补足至	50 mL

## A. 11.2.2 制法

50 mL 容量瓶中将磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )溶于约 45 mL 水中,用  $0.1\text{ mol/L}$  的氢氧化钠溶液调节 pH 值至  $7.0 \pm 0.2$  ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),用水补足体积至 50 mL。

## A. 11.3 试验用混合试剂

## A. 11.3.1 组成

缓冲液(A. 11.2)	5 mL
ONPG 溶液(A. 11.1)	15 mL

## A. 11.3.2 制法

将缓冲液加入 ONPG 溶液中。在  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

## A. 12 氯化钠溶液

## A. 12.1 组成

氯化钠	10.0 g
水	1 000 mL

## A. 12.2 制法

混匀后,调节 pH 值至灭菌后为  $7.5 \pm 0.2$  ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ )。分装 10 mL 于试管中,  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  灭菌 15 min。

## A. 13 氯化钠蛋白胨水

## A. 13.1 组成

蛋白胨	10 g
氯化钠	0 g、20 g、60 g、80 g 或 100 g
水	1 000 mL

## A. 13.2 制法

混匀后,调节 pH 值至灭菌后为  $7.5 \pm 0.2$  ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ )。分装 10 mL 于试管中,  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  灭菌 15 min。

## A. 14 靛基质氯化钠肉汤

## A. 14.1 色氨酸氯化钠肉汤

## A. 14.1.1 组成

酪蛋白胨(酶消化)	10.0 g
DL-色氨酸	1.0 g
氯化钠	10.0 g
水	1 000 mL

## A. 14.1.2 制法

混匀,加热至溶解,过滤。调节 pH 值至灭菌后为  $7.0 \pm 0.2$  ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ )。分装 5 mL 于试管中,  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  灭菌 15 min。

## A. 14.2 Kovacs' 试剂

## A. 14.2.1 组成

对二甲氨基苯甲醛	5 g
盐酸( $\rho=1.18\text{ g/mL}\sim 1.19\text{ g/mL}$ )	25 mL
2-甲基-2-丁醇	75 mL

## A. 14.2.2 制法

将 3 种物质混匀。

## A. 15 V-P 半固体琼脂(VP)

## A. 15.1 V-P 半固体琼脂

## A. 15.1.1 组成

酵母浸膏	1.0 g
蛋白胨	12.0 g
氯化钠	30.0 g
葡萄糖	10.0 g
琼脂	3.0 g
蒸馏水	1 000 mL

## A. 15.1.2 制法

混匀后,加热至溶解,调节 pH 值至  $7.3 \pm 0.1$  ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ )。分装于试管中,每管 1 mL,  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  灭菌 15 min。灭菌后,立即取出放凉。

## A. 15.2 V-P 试剂

## A. 15.2.1 组成

甲液: $\alpha$ -萘酚	6.0 g
无水乙醇	100.0 mL
乙液:氢氧化钾	40.0 g
肌酸	0.3 g
蒸馏水	100.0 mL

## A. 15.2.2 制法

甲液:将  $\alpha$ -萘酚溶于无水乙醇中。

乙液:先将氢氧化钾溶于水中,再加入肌酸。

以上试剂保存于冰箱中,可使用2个月。试验时,分别加甲液0.2 mL(约6滴)和乙液0.1 mL(约3滴)。加入试剂后呈现红色者为阳性,铜色者为阴性。对阴性结果1 h后再做一次检查。

#### A. 16 糖类分解试验用培养基

##### A. 16.1 组成

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸膏	3.0 g
氯化钠	30.0 g
溴钾酚紫	0.04 g
蒸馏水	1 000 mL

##### A. 16.2 制法

混匀后,加热溶解,按1%量加入糖类。调至 $\text{pH}7.0 \pm 0.2$ (25 °C)。分装于试管中,每管1 mL,112 °C高压灭菌15 min。

#### A. 17 42 °C 生长试验用培养基

##### A. 17.1 组成

胰胨	17.0 g
大豆胨	3.0 g
氯化钠	30.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL

##### A. 17.2 制法

除葡萄糖外,将各种成分混合溶解,煮沸1 min~2 min,加入葡萄糖,调至 $\text{pH}7.3 \pm 0.2$ (25 °C)。分装于试管中,每管7 mL,121 °C高压灭菌15 min。

#### A. 18 O/F 试验用培养基(HLGB)

##### A. 18.1 组成

蛋白胨	2.0 g
酵母浸膏	0.5 g
氯化钠	30.0 g
葡萄糖	10.0 g
溴钾酚紫	0.015 g
琼脂	3.0 g
蒸馏水	1 000 mL

##### A. 18.2 制法

混匀后,加热溶解,调至 $\text{pH}7.4 \pm 0.2$ (25 °C)。分装于试管中,每管3 mL,121 °C高压灭菌15 min。本培养基用于鉴别革兰氏阴性细菌对于葡萄糖的发酵性和氧化型代谢作用。将同一菌株接种于2支该培养基中,其中一支管的培养基上面加灭菌矿物油脂来隔离氧气,而另一支管不加。

这样发酵型细菌在两管培养基中均产生酸性反应,氧化型细菌则在未加矿物油脂的管中产生酸性反应,而在加油脂的培养管中只有轻度或者不生长也无反应变化。

## A. 19 神奈川现象试验用我妻氏琼脂(WA)

## A. 19.1 组成

酵母浸膏	3.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	70.0 g
磷酸氢二钾	5.0 g
甘露醇	10.0 g
结晶紫	0.001 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

## A. 19.2 制法

调至 pH8.0(不必高压),加热 30 min,待冷至 50 ℃,按 5%的体积轻轻加入事先准备好的以生理盐水洗三次的新鲜人或兔血球。混合均匀倾注平皿,充分干燥后使用。

www.kinghunt.cn  
凯恒生物

附录 B  
 (资料性附录)  
 进出口食品中副溶血性弧菌检测流程图

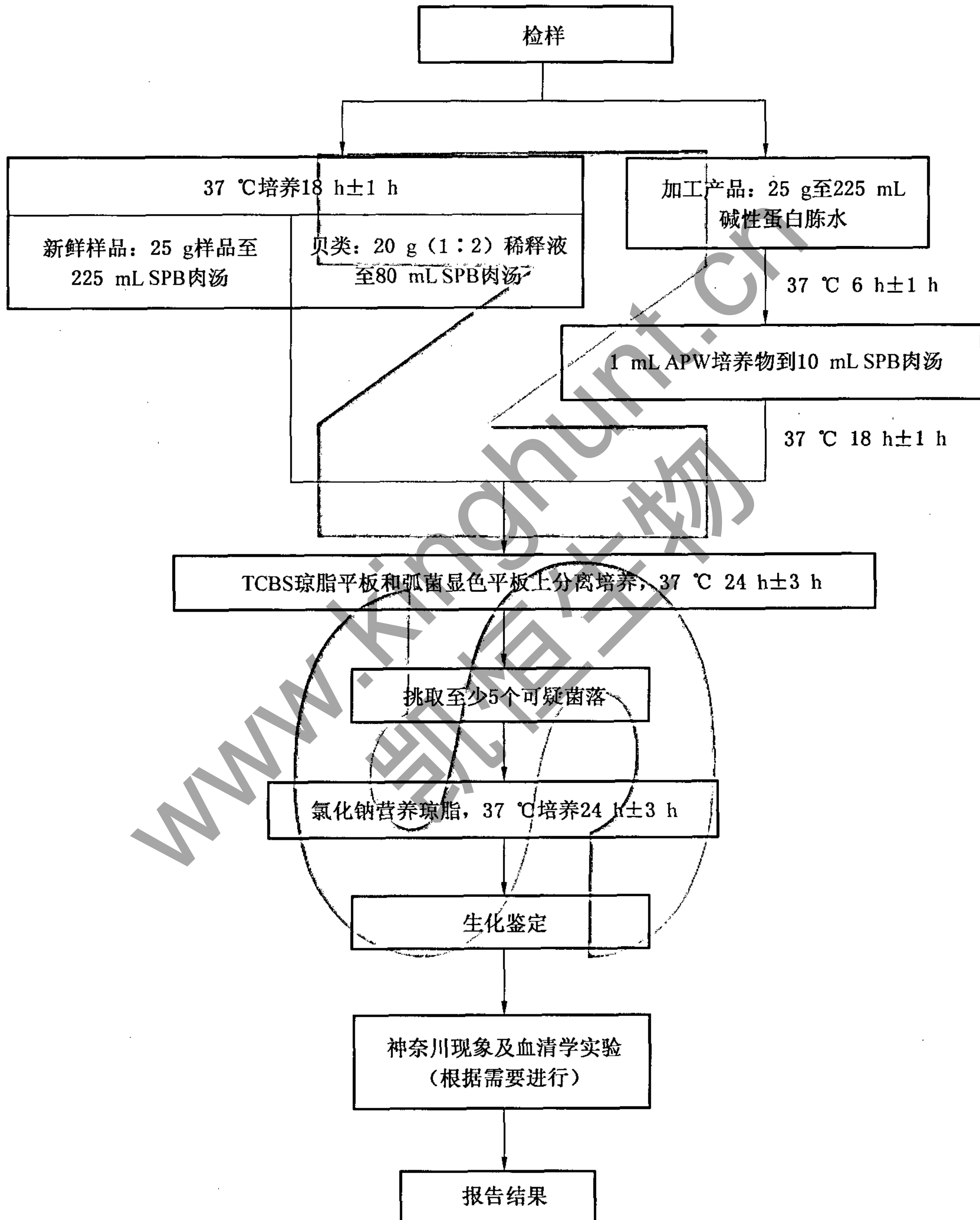


图 B.1 进出口食品中副溶血性弧菌定性检测流程图



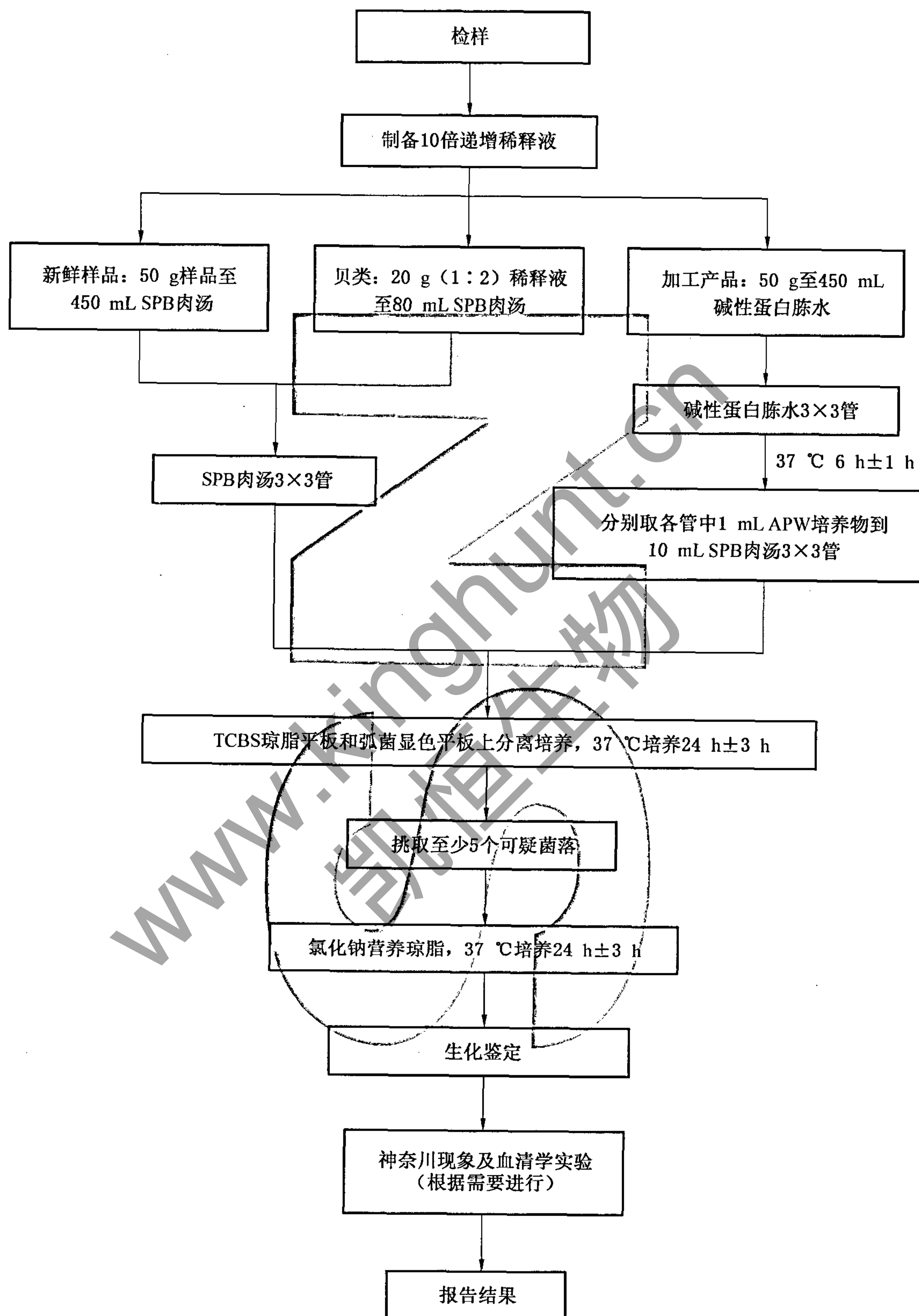


图 B.2 进出口食品中副溶血性弧菌最近似值(MPN)检测流程图

附录 C  
(资料性附录)

副溶血性弧菌与有关细菌鉴别表

表 C.1 副溶血性弧菌与有关细菌鉴别表

试验		副溶血性弧菌	霍乱弧菌	麦氏弧菌	河弧菌	创伤弧菌	溶藻弧菌	拟态弧菌
TCBS(蓝绿色菌落)		+	-	-	-	+	-	+
盐耐受试验(生长)	0%氯化钠	-	+	-	-	-	-	+
	3%氯化钠	+	+	+	+	+	+	+
	6%氯化钠	+	-	+	+	+	+	-
	8%氯化钠	+	-	v	+	-	+	-
	10%氯化钠	-	-	-	-	-	+	-
精氨酸双水解酶		-	-	+	+	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶		+	+	-	-	+	v	+
蔗糖发酵		-	+	+	+	-	+	-
乳糖发酵		-	-	v	-	+	-	-
甘露醇发酵		+	+	+	+	v	+	+
阿拉伯糖发酵		+	-	-	+	-	-	-
V-P 试验		-	v	+	-	-	+	-
42℃生长		+	+	v	v		+	
注：空白处表示未试验；v表示可变的。								

附录 D  
(规范性附录)

## 1 g(mL)检样中最近似数(MPN)表

表 D.1 1 g(mL)检样中最近似数(MPN)表

阳性管数				阳性管数			
接种量/g(mL)			MPN	接种量/g(mL)			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：表内所列接种量如改用 1 g(mL)、0.1 g(mL)、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)、0.000 1 g(mL)时，则表内数字应相应增加 10 倍，其余类推。

www.kinghunt.cn  
凯恒生物

中华人民共和国出入境检验检疫  
行业标准  
进出口食品中副溶血性弧菌检验方法  
SN/T 0173—2010

\*

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

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)  
电话:68523946 68517548

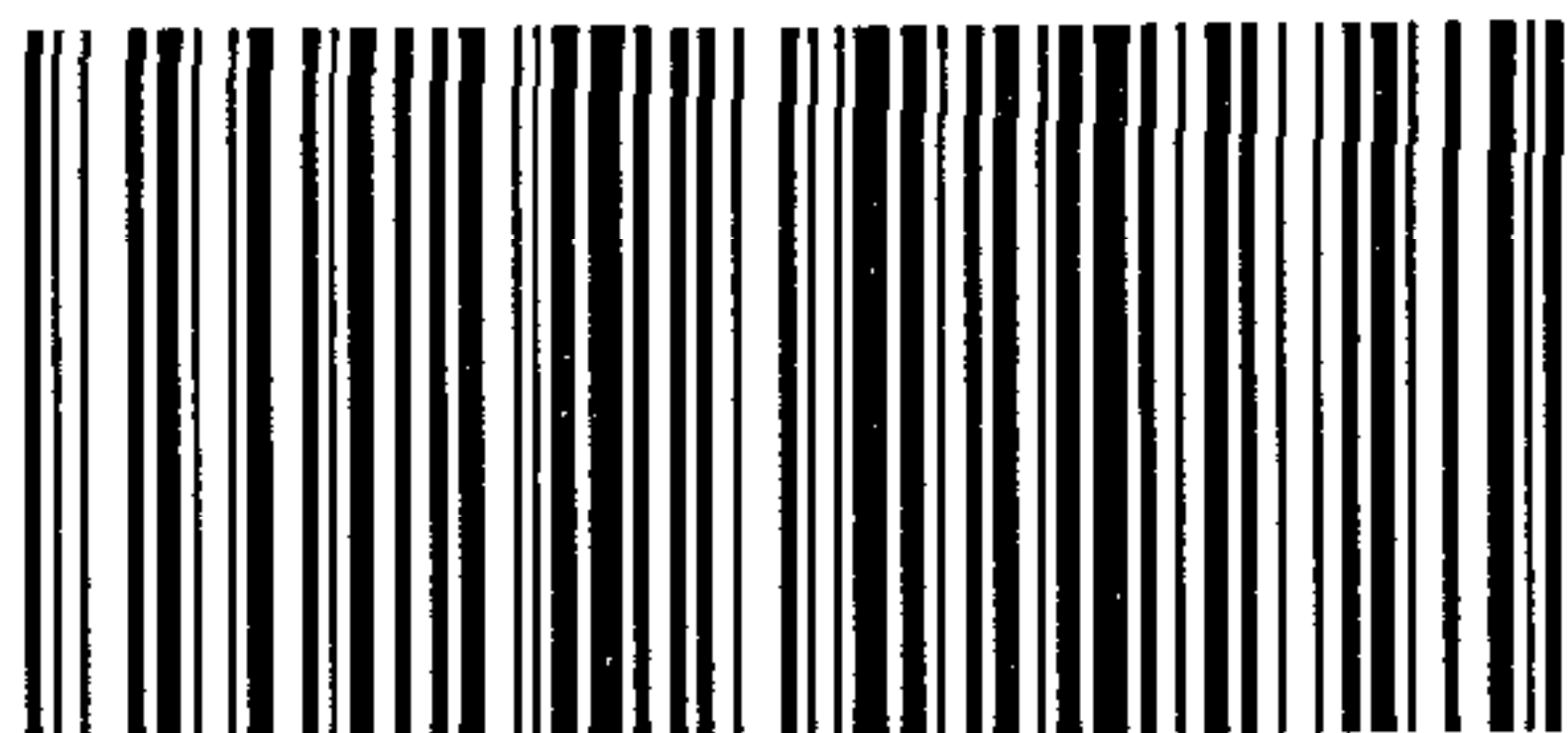
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*

开本 880×1230 1/16 印张 1.5 字数 35 千字  
2010年4月第一版 2010年4月第一次印刷  
印数 1—1 600

\*

书号: 155066·2-20675



SN/T 0173-2010