

1 主题内容与适用范围

本标准规定了出口食品中金黄色葡萄球菌的检验方法。

本标准适用于出口食品的检验。

2 设备和材料

- 2.1 供常规平板计数用的基本设备与材料。
- 2.2 L形玻璃棒。

3 培养基和试剂

- 3.1 普通肉汤培养基。
- 3.2 胰蛋白胨大豆肉汤。
- 3.3 Baird—Parker培养基。
- 3.4 甲苯胺蓝—DNA琼脂。
- 3.5 生理盐水。
- 3.6 凝固酶试验兔血浆。

4 样品制备

- 4.1 固体或半固体食品：以无菌操作称取25g样品，放入装有225mL灭菌生理盐水的灭菌均质杯内，于8 000r／min均质1～2min，制成1：10样品匀液。
- 4.2 液体食品：用灭菌吸管吸取25mL样品，放入装有225mL灭菌生理盐水的灭菌玻璃瓶内（瓶内预置适当数量的玻璃珠），经充分振荡制成1：10样品匀液。

- 4.3 供计数检验时，可按十进位递增稀释法将样品匀液再进行适当稀释。

5 检验步骤

- 5.1 最近似值 (MPN)测定法

适用于检测认为带有大量竞争菌的食品及其原料和未经处理的食品中的少量金黄色葡萄球菌。

- 5.1.1 选三个连续稀释度，从每个稀释度分别取1 mL稀释样品液，接种3管含10% 氯化钠胰蛋白胨大豆肉汤。样品的最高稀释度必须达到能获得阴性终点，置36±1℃培养48h。
- 5.1.2 用3mm接种环，从有细菌生长的各管中移取1环，划线接种于表面干燥的Baird—Parker琼脂平板，置36±1℃培养45～48h。
- 5.1.3 从有细菌生长的每一平板上至少挑取1个可疑金黄色葡萄球菌菌落〔见附录B (参考件)〕，移种到肉汤培养基中，置36±1℃培养20～24 h。

- 5.1.4 取肉汤培养物0.3mL同0.5mL凝固酶试验兔血浆于8mm×100mm试管内充分混合，置36 ±1℃培养，定时观察是否有凝块形成，至少观察6h，以内容物完全凝固，使试管倒置或倾斜时不流动者为阳性。试验中需同时做已知阳性和阴性对照。对可疑结果，应进行革兰氏染色、镜检和其他辅助试验〔如耐热核酸酶试验〔见附录C (补充件)〕等〕加以证实。

- 5.1.5 报告结果

根据凝固酶试验结果查最近似值 (MPN)表〔见附录D (补充件)〕，报告金黄色葡萄球菌的MPN/g (mL)。

5.2 平板表面计数法

适用于检查金黄色葡萄球菌数不小于10⁴/g (mL)的食品。

- 5.2.1 选三个连续稀释度，从每个稀释度分别取1 mL稀释样液，接种至3个表面干燥的Baird—Parker琼脂平板上 (如：0.4mL—0.3mL—0.3mL)。
- 5.2.2 以L形玻璃棒将接种物涂布于琼脂表面，避免涂到平板边缘，将平板正置直至接种物被培养基吸收，将平板翻转，36±1℃培养45—48h。
- 5.2.3 挑选有20～200个菌落的平板进行计数。如果有数种菌落皆类似金黄色葡萄球菌，则分别计算和记录每一类型的菌落数。当最低稀释度的平板的菌落数小于20时，仍可选用。如平板上的菌落数大于200，其中有些菌落具有典型金黄色葡萄球菌的外观，同时在其高倍稀释度未出现典型菌落者，亦可用这些平板进行金黄色葡萄球菌计数，但不能把非典型菌落计算在内。

- 5.2.4 从可计数的各类型菌落中至少各选取1个菌落，参照5.1.3～5.1.4条进行凝固酶试验。

- 5.2.5 报告结果

将呈凝固酶阳性的菌落所代表的3个平板上的菌落数相加。并乘以样品稀释倍数，即以此数报告为所检查食品中的金黄色葡萄球菌数/g (mL)。

5.3 非选择性增菌法

适用于检查含有受损伤的金黄色葡萄球菌的加工食品。

- 5.3.1 取1：10稀释的样品液10mL，接种于10mL双料胰蛋白胨大豆肉汤中，36±1℃培养2h。
- 5.3.2 再加入20mL含20% 氯化钠的单料胰蛋白胨大豆肉汤，36±1℃培养24±2h。
- 5.3.3 取上述培养物0.2mL，分别涂布于2个表面干燥的Baird—Parker琼脂平板上，36±1℃培养46±2 h。
- 5.3.4 从每个平板上至少挑取1个可疑金黄色葡萄球菌菌落，参照5.1.3～5.1.4条进行凝固酶试验。

- 5.3.5 报告结果

如发现有凝固酶试验阳性的菌落，即报告1g (mL)食品中有金黄色葡萄球菌存在，否则为阴性。

附 录 A

培养基和试剂

(补充件)

A1 普通肉汤培养基

成分：

牛肉膏	5.0g
氯化钠	5.0g
蛋白胨	20.0g
蒸馏水	1000.0mL

制法：将以上成分混合加热溶化，调至pH7.4～7.6，分装试管，121℃高压灭菌30min。

A2 胰蛋白胨大豆肉汤

成分：

胰蛋白胨	17.0g
植物蛋白胨	3.0g
氯化钠	5.0g
磷酸氢二钾 (K ₂ HPO ₄)	2.5g
葡萄糖	2.5g
蒸馏水	1000.0mL

制法：将各成分溶于蒸馏水中，必要时加热使完全溶解，分装于试管或瓶中，121℃高压灭菌15 min，最终pH7.3±0.2。

注：制备双料胰蛋白胨大豆肉汤时，除蒸馏水外，其他成分加倍，配制10% 或20% 氯化钠胰蛋白胨大豆肉汤时，可将氯化钠量增加至所需浓度。

A3 Baird—Parker培养基

成分：

胰蛋白胨	10.0g
牛肉膏	5.0g
酵母膏	1.0g
丙酮酸钠	10.0g
甘氨酸	12.0g
氯化锂 (LiCl·6H ₂ O)	5.0g
琼脂	20.0g
蒸馏水	950.0mL

制法：将各成分加于蒸馏水中，加热煮沸使完全溶解，冷至25℃，调至pH7.0±0.2，分装每瓶95mL，121℃高压灭菌15min，临用时加热溶化琼脂，冷至50℃左右，于每95mL加入预热至50℃的卵黄亚硝酸钾增菌剂5mL，摇匀后倾注平皿培养基，应是致密不透明的，使用前在冰箱贮存不得超过48 h。

卵黄亚硝酸盐增菌剂配制：

将新鲜鸡蛋浸泡在适当的HgCl₂溶液 (1：1 000)中约1 min，以无菌操作打开鸡蛋，使蛋黄与蛋白分开，将蛋黄加于生理盐水中 (3+7，V／V)充分摇匀，于50mL蛋黄乳液中加入10mL过滤除菌的1% 亚硝酸钾水溶液，混匀，4±1℃贮存。

A4 甲苯胺蓝—DNA琼脂

成分：

脱氧核糖核酸 (DNA)	0.3g
琼脂	10.0g
氯化钙 (CaCl ₂ ·无水)	1.1mg
氯化钠	10.0g
甲苯胺蓝 (O)	0.083g
三羟甲基氨基甲烷 〔(Tris (hydroxymethyl) aminomethane)〕	6.1g
蒸馏水	1000.0mL

制法：将三羟甲基氨基甲烷溶解于蒸馏水中，调至pH9.0，除甲苯胺蓝 (O)外将其余各项成分加热使溶解。再将甲苯胺蓝 (O)溶于培养基中。分装于塞有橡皮塞的烧瓶中。如立即使用可不需灭菌。已灭菌的培养基在室温可存放4个月无变化，并经数次熔化后仍可使用。

A5生理盐水

成分：

氯化钠	8.5g
蒸馏水	1000.0mL

制法：将氯化钠溶于蒸馏水中，分装于适当容器中，121℃高压灭菌15min。

A6 凝固酶试验兔血浆

临用时取3.8% (取柠檬酸钠3.8g加蒸馏水100mL，待溶解后过滤，121℃高压灭菌15min)柠檬酸钠1份，加入新鲜兔血4份，混匀后放冰箱中使用球沉降 (或以3 000r／min离心30min)后取上清液进行试验。

附 录 B

典型或可疑金黄色葡萄球菌菌落

(参考件)

金黄色葡萄球菌的单个菌落在Baird—Parker琼脂平板上呈圆形，表面光滑、凸起、湿润，直径2～3mm。灰黑色至黑色，有光泽，常有浅色 (非白色)的边缘，周围绕以不透明圈 (沉淀)，其外常有一清晰带。当用接种针触及菌落时具有黄油样粘稠感。有时可见到不分解脂肪的菌株，除没有不透明圈和清晰带外，其他外观基本相同。从长期贮存的冷冻或脱水食品中分离的菌落，其黑色常较典型菌落浅些，且外观可能较粗糙，质地较干燥。

附 录 C

耐热核酸酶试验

(补充件)

- C1 取3mL甲苯胺蓝—DNA琼脂平铺于载玻片上制成标本片。
- C2 待琼脂凝固后，在琼脂上打成直径2mm的小洞 (每个载玻片10～12个)，抽出小洞中的琼脂块。
- C3 加入约0.01mL加过热 (在水浴中煮沸15min)的供凝固酶试验的肉汤培养物至所制备载玻片上的小洞中。
- C4 将载玻片置湿室中，于35℃培养4h。
- C5 阳性反应为在小洞周围形成至少扩展约1 mm的浅粉红色的晕圈。

附 录 D

1 g样品的最近似值 (MPN)表

(补充件)

以0.1、0.01、0.001 g各用3管。

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	24
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	1100
1	3	3	29	3	3	3	>1100

附加说明：

本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出。

本标准由中华人民共和国天津进出口商品检验局、山东进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人何镜承、任怀秀。

本标准主要参考美国公积分析化学家协分 (AOAC)法定分析方法第14版第46.062, 46.136～46.137节 (1984年)。