

中华人民共和国国家标准

GB 4789.40—2024

食品安全国家标准

食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验

2024-02-08发布

2024-08-08实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布
国家市场监督管理总局

前 言

本标准代替 GB4789.40—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验》。

本标准与 GB4789.40—2016相比,主要变化如下:

- 修改了标准名称;
- 标准适用范围增加了婴幼儿辅助食品;
- 增加了 PCR鉴定方法作为选做内容;
- 删除了挑取黄色菌落和生化鉴定中的产黄色素和苦杏仁苷项目;
- 修改了培养基和试剂 pH调节方法;
- 修改了预热、选择性增菌温度以及 TSA平板的培养温度和时间;
- 修改了生化反应的培养温度及氨基酸培养基的制备。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验

1 范围

本标准规定了食品中克罗诺杆菌(*Cronobacter* spp.)的检验方法。
本标准适用于婴幼儿配方食品、婴幼儿辅助食品、乳及乳制品及其原料中克罗诺杆菌的检验。

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 恒温培养箱:36℃±1℃,41.5℃±1℃。
- 2.2 冰箱:2℃~5℃,-20℃。
- 2.3 恒温水浴箱:41.5℃±1℃。
- 2.4 天平:感量0.1g、0.01g。
- 2.5 振荡器。
- 2.6 无菌吸管:1mL(具0.01mL刻度)、10mL(具0.1mL刻度)或微量移液器及吸头。
- 2.7 无菌容器:容量100mL、200mL、2000mL。
- 2.8 无菌培养皿:直径90mm。
- 2.9 pH计或pH比色管或精密pH试纸。
- 2.10 微生物生化鉴定系统。
- 2.11 PCR仪。
- 2.12 离心机:转速≥12000r/min。
- 2.13 凝胶成像系统或紫外检测仪。
- 2.14 琼脂糖水平电泳仪或毛细管电泳仪。
- 2.15 PCR反应管。
- 2.16 1.5mL离心管。
- 2.17 10μL接种环。

3 培养基和试剂

- 3.1 缓冲蛋白胨水(buffered peptone water,BPW):见A.1。
- 3.2 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素(modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium,mLST-Vm):见A.2。
- 3.3 克罗诺杆菌显色培养基。
- 3.4 胰蛋白胨大豆琼脂(trypticase soy agar,TSA):见A.3。
- 3.5 生化鉴定试剂盒。
- 3.6 氧化酶试剂:见A.4。
- 3.7 L-赖氨酸脱羧酶培养基:见A.5。

- 3.8 L-鸟氨酸脱羧酶培养基 :见 A. 6。
- 3.9 L-精氨酸双水解酶培养基 :见 A. 7。
- 3.10 糖类发酵培养基 :见 A. 8。
- 3.11 西蒙氏柠檬酸盐培养基 :见 A. 9。
- 3.12 内转录间隔区(its)PCR引物见表 1,基因扩增靶标参考序列见附录 B。
- 3.13 5U/ μ L耐热 DNA聚合酶。
- 3.14 2.5mmol/dNTPs:dATP、dTTP、dCTP、dGTP。
- 3.15 25mmol/L $MgCl_2$ 。
- 3.16 10 \times PCR缓冲液 :见 A. 10。
- 3.17 克罗诺杆菌质控菌株 :具有菌种保藏资质单位提供的 ATCC29544或等效菌株。
- 3.18 大肠埃希氏菌质控菌株 :具有菌种保藏资质单位提供的 ATCC25922或等效菌株。
- 3.19 DNA提取试剂 :细菌基因组 DNA提取试剂盒。
- 3.20 商品化 PCR反应预混液。
- 3.21 标准(高熔点)琼脂糖 :分析纯。
- 3.22 核酸染色剂。
- 3.23 分子质量标准 :100bp DNA ladder。
- 3.24 50 \times TAE电泳缓冲液 :见 A. 11。
- 3.25 6 \times DNA加样缓冲液 :见 A. 12。

第一法 克罗诺杆菌定性检验

4 检验程序

克罗诺杆菌检验程序见图 1。

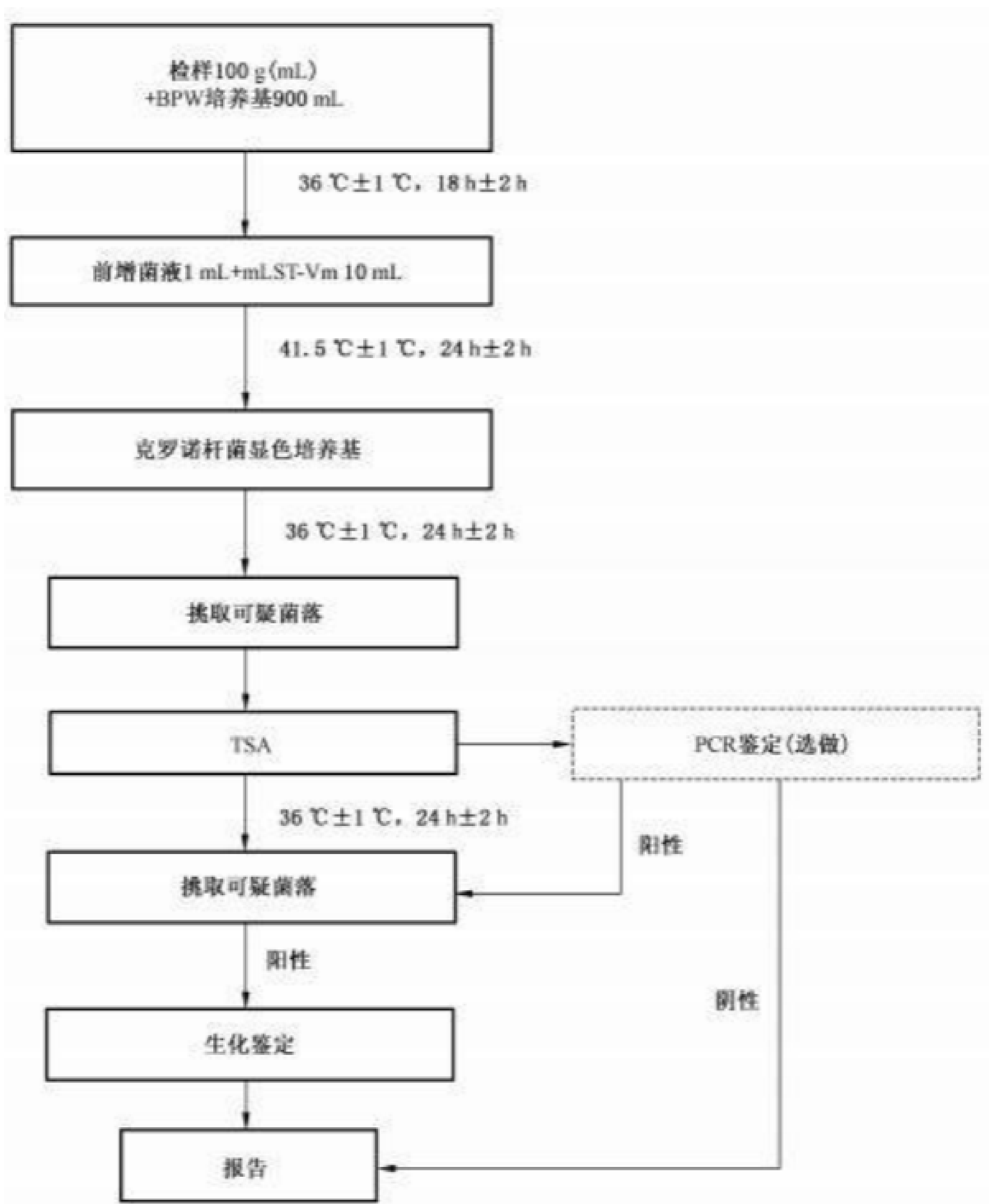


图 1 克罗诺杆菌检验程序

5 操作步骤

5.1 前增菌和选择性增菌

取检样 100g(mL)置于无菌容器中,加入 900mL已预热至 41℃±1℃的 BPW,用手缓缓地摇动至检样充分溶解后,36℃±1℃培养 18h±2h。轻轻摇动混匀培养过的前增菌液,移取 1mL转入 10mL mLST-Vm 肉汤中,41.5℃±1℃培养 24h±2h。

5.2 分离

- 5.2.1 轻轻混匀 mLST-Vm 肉汤培养物,使用 10μL接种环各取 1环增菌培养物,分别划线接种于2个 克罗诺杆菌显色培养基平板,36℃±1℃培养 24h±2h,或按培养基要求条件培养。
- 5.2.2 可疑菌落按显色培养基要求进行判定,每个平板挑取至少 5个可疑菌落(不足 5个时挑取全部可疑菌落),分别划线接种于 TSA平板,36℃±1℃培养 24h±2h。

5.3 PCR鉴定(选做)

PCR试验环境条件和过程控制参照 GB/T27403规定执行。

5.3.1 DNA模板制备

可采用热裂解法制备模板,从每个 TSA平板上挑取 2个~3个克罗诺杆菌可疑菌落至 500 μL灭菌去离子水中,充分混匀后 100 °C加热 10min,冰浴冷却至室温,12000r/min离心 10min,取上清液作为 DNA模板用于 PCR鉴定。若上清液不能及时分析则于 -20 °C保存备用(1周以内)。

注:也可用等效商品化的细菌基因组 DNA提取试剂盒或全自动核酸提取仪按操作要求提取 DNA模板。

5.3.2 PCR扩增

5.3.2.1 引物

PCR鉴定用引物信息见表 1。

表 1 克罗诺杆菌鉴定用内转录间隔(its)PCR引物序列

目的基因	引物序列	片段长度/bp
内转录间隔区(its)	上游引物 F:5'-GGGTTGTCTGCGAAAGCGAA-3'	282
	下游引物 R:5'-GTCTTCGTGCTGCGAGTTTG-3'	

5.3.2.2 PCR反应体系

PCR反应体系组成见表 2。

表 2 克罗诺杆菌鉴定用 PCR检测反应体系组成

试剂	反应体积/μL	终浓度
灭菌去离子水	14.75	—
10×PCR缓冲液	2.5	—
25mmol/L MgCl ₂	2.5	2.5mmol/L
2.5mmol/LdNTP	2.0	0.2mmol/L
上游引物(10μmol/L)	1.0	0.4μmol/L
下游引物(10μmol/L)	1.0	0.4μmol/L
DNA模板	1.0	—
5U/μL耐热 DNA聚合酶	0.25	0.05U/μL
总体积	25.0	—

注:也可用商品化 PCR反应预混液按要求制备反应体系。

5.3.2.3 反应条件:94°C预变性 5min;94°C变性 30s,61°C退火 30s,72°C延伸 30s,35个循环;72°C延伸 5min,4°C下保存。

5.3.3 对照设置

每次 PCR鉴定时使用克罗诺杆菌标准菌株 DNA模板作为阳性对照,大肠埃希氏菌标准菌株 DNA模板作为阴性对照,提取过程设置灭菌去离子水作为 DNA提取空白对照,PCR反应需另设灭菌去离子水作为 PCR反应体系空白对照。

5.3.4 电泳

用 1×TAE电泳缓冲液制备含核酸染色剂的 1.5%琼脂糖电泳凝胶(核酸染色剂按照说明书要求使用)。在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面没过胶面。将适量 PCR扩增产物与 6×加样缓冲液混合后点样,其中第 1孔加入 100bp DNA ladder。电压的设置根据公式—电泳槽正负极的距离(cm)×5V/cm计算并设置,电泳时间为 20min~ 30min。使用凝胶成像系统或紫外检测仪观察和记录结果。也可采用毛细管电泳仪等设备进行电泳。

5.3.5 PCR鉴定结果判定

质控系统:阴性对照和空白对照均未出现扩增条带,阳性对照出现预期大小(282bp,序列信息见附录 B)的扩增条带,则检测系统正常。任一种对照出现非上述正常结果,应重做试验,同时排除干扰因素。

阳性结果:在质控系统正常的情况下,待测样品出现预期大小(282bp)的扩增条带,判定 PCR结果为阳性。

阴性结果:在质控系统正常的情况下,待测样品未出现预期大小(282bp)的扩增条带,判定 PCR结果为阴性。

5.4 确证试验

选做 5.3时,自 PCR结果阳性的 TSA平板上挑取菌落进行生化鉴定,PCR结果阴性的 TSA平板不再进行生化鉴定。

未选做 5.3时,直接将 5.2.2的可疑菌落接种 TSA平板后进行生化鉴定。可以首先鉴定克罗诺杆菌显色培养基平板上最具特征性的菌落接种的 TSA平板上的菌落。如果是阳性,则不需要测试其他 TSA平板上的菌落。如果是阴性,则选取其他 TSA平板上的菌落进行鉴定,直到全部为阴性或发现阳性菌落为止。为确保结果的准确性,对 TSA平板上的菌落进行鉴定时,应使用新鲜的传代菌落。克罗诺杆菌的主要生化特征见表 3。上述鉴定也可选择商品化生化鉴定试剂盒或微生物生化鉴定系统进行。

表 3 克罗诺杆菌的主要生化特征

生化试验		特征
氧化酶		-
L-赖氨酸脱羧酶		-
L-鸟氨酸脱羧酶		(+)
L-精氨酸双水解酶		+
柠檬酸水解		(+)
发酵	D-山梨醇	(-)
	L-鼠李糖	+
	D-蔗糖	+
	D-蜜二糖	+
注: + >99%阳性;- >99%阴性;(+)90%~99%阳性;(-)90%~99%阴性。		

6 结果与报告

根据菌落特征、确证试验(生化鉴定)和/或 PCR鉴定结果,报告 100g(mL)样品中检出或未检出克罗诺杆菌。

第二法 克罗诺杆菌定量检验

7 操作步骤

7.1 样品的稀释

取检样 100g(mL)、10g(mL)、1g(mL)各 3份,分别置无菌容器中,分别加入 900mL、90mL、9mL已预热至 $41\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 BPW,用手缓缓地摇动至检样充分溶解,制成 1 : 10样品匀液, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $18\text{h}\pm 2\text{h}$ 。轻轻摇动混匀培养过的前增菌液,分别移取 1mL转入 10mL mLST-Vm 肉汤, $41.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{h}\pm 2\text{h}$ 。

7.2 分离、鉴定

同 5.2、5.3和 5.4。

8 结果与报告

综合菌落特征、确证试验(生化鉴定)或 PCR鉴定结果,根据检出克罗诺杆菌的阳性管数,查 MPN检索表,报告 100g(mL)样品中克罗诺杆菌的 MPN值(见附录 C中表 C.1)。

附 录 A
培养基和试剂

A. 1 缓冲蛋白胨水(buffered peptonewater,BPW)

A. 1. 1 成分

蛋白胨	10. 0g
氯化钠	5. 0g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9. 0g
磷酸二氢钾	1. 5g
蒸馏水	1000mL

A. 1. 2 制法

加热搅拌至溶解,必要时调节 pH,121℃高压灭菌 15 min。灭菌后的培养基 25℃时的 pH应为 7.2±0.2。

A. 2 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素(modified laurylsulfatetryptosebroth-vancomycin medium,mLST-Vm)

A. 2. 1 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨(mLST)肉汤

A. 2. 1. 1 成分

氯化钠	34. 0g
胰蛋白胨	20. 0g
乳糖	5. 0g
磷酸二氢钾	2. 75g
磷酸氢二钾	2. 75g
十二烷基硫酸钠	0. 1g
蒸馏水	1000mL

A. 2. 1. 2 制法

加热搅拌至溶解,必要时调节 pH。分装至无菌试管中,每管 10mL,121℃高压灭菌 15min。灭菌后培养基 25℃时的 pH应为 6.8±0.2。

A. 2. 2 万古霉素溶液

A. 2. 2. 1 成分

万古霉素	10. 0mg
蒸馏水	10. 0mL

A. 2. 2. 2 制法

10.0mg万古霉素溶解于 10. 0 mL蒸馏水中,过滤除菌。万古霉素溶液可以在 0℃~5℃保存 15d。

A.2.3 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素(modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium,mLST-Vm)

每 10mL mLST加入万古霉素溶液 0.1mL,混合液中万古霉素的终浓度为 10μg/mL。
注：mLST-Vm 需在 24h之内使用。

A.3 胰蛋白胨大豆琼脂(trypticasesoy agar,TSA)

A.3.1 成分

胰蛋白胨	15.0g
植物蛋白胨	5.0g
氯化钠	5.0g
琼脂	15.0g
蒸馏水	1000mL

A.3.2 制法

加热搅拌至溶解,必要时调节 pH,121℃高压 15min,灭菌后的培养基 25℃时的 pH应为 7.3±0.2。

A.4 氧化酶试剂

A.4.1 成分

N,N,N',N'-四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0g
蒸馏水	100mL

A.4.2 制法

少量新鲜配制,于冰箱内避光保存,在 7d之内使用。

A.4.3 试验方法

用玻璃棒或一次性接种针挑取单个特征性菌落,涂布在用氧化酶试剂湿润的滤纸平板上。如果滤纸在 10s中之内未变为紫红色、紫色或深蓝色,则为氧化酶试验阴性,否则即为氧化酶试验阳性。

注：实验中切勿使用镍/铬材料。

A.5 L-赖氨酸脱羧酶培养基

A.5.1 成分

L-赖氨酸盐酸盐(L-lysinehydrochloride)	5.0g
酵母浸膏	3.0g
葡萄糖	1.0g
溴甲酚紫	0.015g
蒸馏水	1000 mL

A.5.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH。每管分装 5mL,上面滴加一层液体石蜡,121℃高压 15min。灭菌后的培养基 25℃时的 pH应为 6.8±0.2。

A.5.3 试验方法

挑取培养物接种于 L-赖氨酸脱羧酶培养基液面下。36℃±1℃培养 24h±2h,观察结果。L-赖氨酸脱羧酶试验阳性者,培养基呈紫色,阴性者为黄色,空白对照管为紫色。

A.6 L-鸟氨酸脱羧酶培养基

A.6.1 成分

L-鸟氨酸盐酸盐(L-ornithinemonohydrochloride)	5.0g
酵母浸膏	3.0g
葡萄糖	1.0g
溴甲酚紫	0.015g
蒸馏水	1000 mL

A.6.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH。每管分装 5mL,上面滴加一层液体石蜡,121℃高压 15min。灭菌后的培养基 25℃时的 pH应为 6.8±0.2。

A.6.3 试验方法

挑取培养物接种于 L-鸟氨酸脱羧酶培养基液面下。36℃±1℃培养 24h±2h,观察结果。L-鸟氨酸脱羧酶试验阳性者,培养基呈紫色,阴性者为黄色,空白对照管为紫色。

A.7 L-精氨酸双水解酶培养基

A.7.1 成分

L-精氨酸盐酸盐(L-argininemonohydrochloride)	5.0g
酵母浸膏	3.0g
葡萄糖	1.0g
溴甲酚紫	0.015g
蒸馏水	1000 mL

A.7.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH。每管分装 5mL,上面滴加一层液体石蜡,121℃高压 15min。灭菌后的培养基 25℃时的 pH应为 6.8±0.2。

A.7.3 试验方法

挑取培养物接种于 L-精氨酸脱羧酶培养基液面下。36℃±1℃培养 24h±2h,观察结果。L-精氨酸脱羧酶试验阳性者,培养基呈紫色,阴性者为黄色,空白对照管为紫色。

A.8 糖类发酵培养基

A.8.1 基础培养基

A.8.1.1 成分

酪蛋白(酶消化)	10.0g
----------	-------

氯化钠	5.0g
酚红	0.02g
蒸馏水	1000mL

A.8.1.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH。每管分装 5mL。121℃高压 15min。灭菌后的培养基 25℃时的 pH应为 6.8±0.2。

A.8.2 糖类溶液(D-山梨醇、L-鼠李糖、D-蔗糖、D-蜜二糖)

A.8.2.1 成分

糖	8.0g
蒸馏水	100mL

A.8.2.2 制法

分别称取 D-山梨醇、L-鼠李糖、D-蔗糖、D-蜜二糖等各 8.0g,分别溶于 100mL蒸馏水中,过滤除菌后,各制成 80mg/mL的糖类溶液。

A.8.3 完全培养基

A.8.3.1 成分

基础培养基	875mL
糖类溶液	125mL

A.8.3.2 制法

无菌操作,将 8.2.2中制备的每种糖类溶液各自加到基础培养基中,混匀后,分别制成每一种糖的完全培养基,再分装到无菌试管中,每管 10mL。

A.8.4 试验方法

挑取培养物接种于 8.3.2中制备的各种糖类发酵培养基的液面下。36℃±1℃培养 24h±2h,观察结果。糖类发酵试验阳性者,培养基呈黄色,阴性者为红色,空白对照管为红色。

A.9 西蒙氏柠檬酸盐培养基

A.9.1 成分

柠檬酸钠	2.0g
氯化钠	5.0g
磷酸氢二钾	1.0g
磷酸二氢铵	1.0g
硫酸镁	0.2g
溴麝香草酚蓝	0.08g
琼脂	8.0g~18.0g
蒸馏水	1000mL

A.9.2 制法

将各成分加热溶解(必要时调节 pH)后分装到试管中,每管 10mL,121℃高压 15min,冷却后制成斜面。灭菌后的培养基 25℃时的 pH应为 6.8±0.2。

A.9.3 试验方法

挑取培养物接种于 9.2中制备的培养基整个斜面,36℃±1℃培养 24h±2h,观察结果。阳性者培养基变为蓝色,阴性者为绿色,空白对照管为绿色。

A. 10 10×PCR缓冲液

A.10.1 成分

1mol/LTris-HCl(pH8.5)	840mL
氯化钾(KCl)	37.25g
灭菌去离子水	160mL

A.10.2 制法

将氯化钾置于少许 1mol/LTris-HCl(pH8.5)中,充分溶解后用 1mol/LTris-HCl(pH8.5)定容至 1000mL,121℃高压灭菌 15min,分装后-20℃保存。

A. 11 50×TAE电泳缓冲液

A.11.1 成分

Tris	242.0g
EDTA-2Na(Na ₂ EDTA·2H ₂ O)	37.2g
冰乙酸(CH ₃ COOH)	57.1mL
灭菌去离子水	942.9mL

A.11.2 制法

将 Tris和 EDTA-2Na同时溶于 800mL灭菌去离子水,充分搅拌均匀;加入冰乙酸,充分溶解后,用 1mol/LNaOH调 pH至 8.3,并用去离子水定容至 1000mL后,室温保存。使用时用去离子水稀释 50倍即为 1×TAE电泳缓冲液。

A. 12 6×DNA加样缓冲液

A.12.1 成分

溴酚蓝	0.5g
二甲苯氰 FF	0.5g
0.5mol/LEDTA(pH8.0)	0.06mL
甘油	360mL
灭菌去离子水	640mL

A.12.2 制法

0.5mol/LEDTA(pH8.0)溶于 500mL灭菌去离子水中,加入溴酚蓝和二甲苯氰 FF溶解,与甘油混合,并用灭菌去离子水定容至 1000mL,分装后 4℃保存。

附 录 B
克罗诺杆菌基因扩增靶标参考序列

克罗诺杆菌基因扩增靶标参考序列如下：

5'-gggttgctt gcgaaagcga agtccctttc gtctagaggc ccaggacacc gccctttcac ggcggtaaca ggggttcgaa
tcccctaagggacgccacct gctggtaatg agtgaaaggc gttaccgatt gatatctcaa aactgactgt aaagtcacgt ttgagatatt
tgctctttaacaatccggaa caagctgaaa attgaaacagacatgctgctgcatttctccgtaataagaa atgcgcggtgtgtcagagtc tct-
caaactcgcagcacgaa gac-3'

注：加粗部分为引物合成参考序列。

附 录 C
克罗诺杆菌最大可能数(MPN)检索表

每 100g(mL)检样中克罗诺杆菌最可能数(MPN)的检索见表 C. 1。

表 C. 1 克罗诺杆菌最可能数(MPN)检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
100	10	1		下限	上限	100	10	1		下限	上限
0	0	0	<0.3	—	0.95	2	2	0	2.1	0.45	4.2
0	0	1	0.3	0.015	0.96	2	2	1	2.8	0.87	9.4
0	1	0	0.3	0.015	1.1	2	2	2	3.5	0.87	9.4
0	1	1	0.61	0.12	1.8	2	3	0	2.9	0.87	9.4
0	2	0	0.62	0.12	1.8	2	3	1	3.6	0.87	9.4
0	3	0	0.94	0.36	3.8	3	0	0	2.3	0.46	9.4
1	0	0	0.36	0.017	1.8	3	0	1	3.8	0.87	11
1	0	1	0.72	0.13	1.8	3	0	2	6.4	1.7	18
1	0	2	1.1	0.36	3.8	3	1	0	4.3	0.9	18
1	1	0	0.74	0.13	2	3	1	1	7.5	1.7	20
1	1	1	1.1	0.36	3.8	3	1	2	12	3.7	42
1	2	0	1.1	0.36	4.2	3	1	3	16	4	42
1	2	1	1.5	0.45	4.2	3	2	0	9.3	1.8	42
1	3	0	1.6	0.45	4.2	3	2	1	15	3.7	42
2	0	0	0.92	0.14	3.8	3	2	2	21	4	43
2	0	1	1.4	0.36	4.2	3	2	3	29	9	100
2	0	2	2	0.45	4.2	3	3	0	24	4.2	100
2	1	0	1.5	0.37	4.2	3	3	1	46	9	200
2	1	1	2	0.45	4.2	3	3	2	110	18	410
2	1	2	2.7	0.87	9.4	3	3	3	>110	42	—
注 1: 本表采用 3个检样量[100g(mL)、10g(mL)和 1g(mL)] ,每个检样量接种 3管。											
注 2: 表内所列检样量如改用 1000g(mL)、100g(mL)和 10g(mL)时 ,表内数字应相应降低 10倍 ;如改用 10g(mL)、1g(mL)和 0.1g(mL) 时 ,则表内数字应相应增高 10倍 ,其余类推。											

www.bzxz.net

免费标准下载网