

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1933.2—2007

食品 and 水中肠球菌检验方法 第 2 部分：滤膜法

Detection of *Enterococci* in food and water—
Part 2: Method for membrane filtration

2007-05-23 发布

2007-12-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国 家 质 量 监 督 检 验 检 疫 总 局

前 言

SN/T 1933《食品和水中的肠球菌检验方法》分为两个部分：

——第 1 部分：平板计数法和最近似值测定法；

——第 2 部分：滤膜法。

本部分为 SN/T 1933 的第 2 部分。

本部分的附录 A 是资料性附录。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分由中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局负责起草。

本部分主要起草人：郑秋月、曹际娟、王芳、赵昕、于灵、马慧蕊。

本部分系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

食品和水中的肠球菌检验方法

第 2 部分：滤膜法

1 范围

SN/T 1933 的本部分规定了水和液体饮料中肠球菌检验滤膜法。

本部分适用于生活用水、生产加工用水、废水及茶饮料、碳酸饮料等液体饮料中肠球菌的检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 SN/T 1933 的本部分的引用而成为本部分的条款。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部分，然而，鼓励根据本部分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部分。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

SN/T 0330 出口食品中微生物学检验通则

3 方法提要

一定数量液体样品或样品稀释液通过滤膜时，细菌被截留在滤膜上。将滤膜置于选择性培养基上培养后，肠球菌菌落呈现特定颜色。经过肠球菌菌落确证实验后，计数并计算滤膜上阳性肠球菌菌落数，即可检验出样品中肠球菌数目。

4 术语、定义和缩略语

SN/T 1933.1 确立的术语、定义和缩略语适用于 SN/T 1933 的本部分。

5 设备和材料

- 5.1 电子天平：感量为 0.001 g。
- 5.2 恒温培养箱： $41^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ， $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ， $45^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.3 振荡器。
- 5.4 移液管：容量 1 mL，10 mL。
- 5.5 培养皿： 9×50 mm，直径 90 mm。
- 5.6 玻璃、耐高温塑料、陶瓷或不锈钢过滤器。
- 5.7 抽滤瓶。
- 5.8 真空泵。
- 5.9 滤膜：直径 47 mm，微孔径 $0.45 \mu\text{m} \pm 0.02 \mu\text{m}$ 。

6 培养基和试剂

实验用水符合 GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法的要求。除另有规定外，试剂为分析纯。

- 6.1 mEI 琼脂(见第 A.1 章)。
- 6.2 胆汁七叶苷琼脂(BEA 琼脂)(见第 A.2 章)。

- 6.3 脑心浸液肉汤(见第 A.3 章)。
- 6.4 含 6.5%NaCl 脑心浸液肉汤(见第 A.4 章)。
- 6.5 脑心浸液琼脂(见第 A.5 章)。
- 6.6 缓冲蛋白胨水(见第 A.6 章)。

7 样品制备

7.1 抽样数量及抽样方法

抽样数量及抽样方法按 SN/T 0330 进行。

7.2 样品的贮存和运送

采样后应尽快进行检验,冷冻样品如不能立即进行检验,应置于-18℃保存。应冷藏保存的待检样品在运送实验室过程中应于 1℃~4℃保存。样品采集后 8 h 之内要完成检验。

7.3 制样

7.3.1 污染程度低的水及液体饮料可以直接进行检验。

7.3.2 污染严重的水及液体饮料可吸取 25 mL 样品,加入 225 mL 缓冲蛋白胨水中,充分混匀,制成 1:10 样品匀液。

7.3.3 以上样品制备可根据样品污染程度及检验需要,进一步制成 10 倍递增的样品稀释液。

8 检验程序

水和液体饮料中肠球菌滤膜法检验程序见图 1。

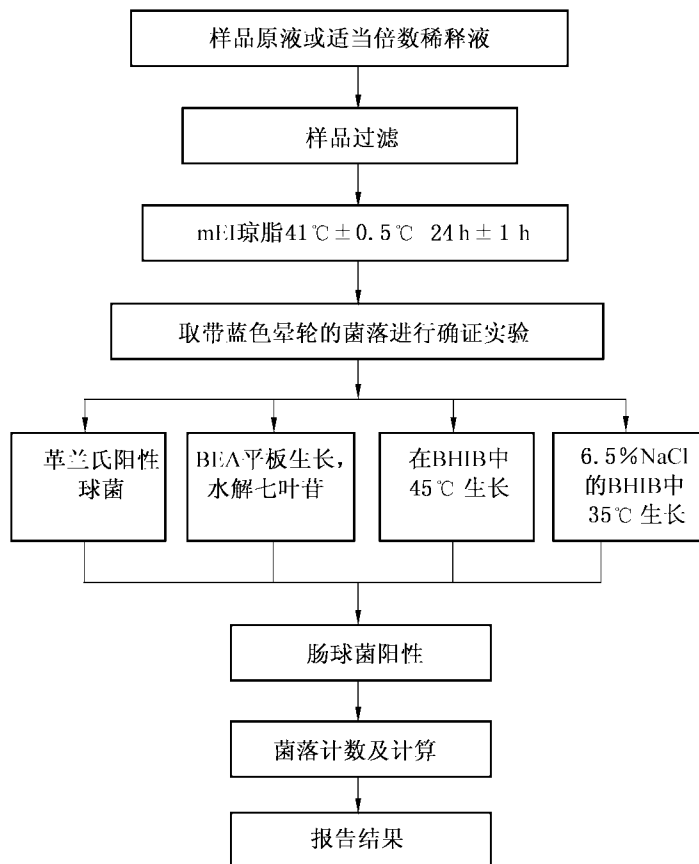


图 1 食品和水中的肠球菌滤膜法的检验程序示意图

9 检验步骤与计数

9.1 培养基平板制备

制备 mEI 琼脂培养基(见第 A.1 章)。

9.2 样品量的选择

根据样品污染情况,选择适宜稀释度的样液。样品加样量在 1 mL~100 mL 之间按半对数间距选择(例如:加样 100 mL、30 mL、10 mL、3 mL),以能在滤膜上生长出 20 个~60 个菌落为宜。每个样品至少选择三个加样量进行过滤。

9.3 样品过滤

将灭过菌的过滤装置连接到抽滤瓶上,用无菌镊子夹取滤膜,将滤膜放至滤器底部。无菌吸取样液至滤器内,打开真空泵进行抽滤。当全部样液通过滤膜后,用 20 mL~30 mL 灭菌生理盐水轻洗滤器边缘至少两次。关闭真空泵,打开滤器,用无菌镊子移取滤膜。

9.4 接种与培养

将已滤过样液的滤膜紧贴在 mEI 琼脂表面上,防止滤膜与琼脂间产生气泡,如有气泡产生,重新放置滤膜。倒置平板于 $41^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养 $24 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ 。

9.5 菌落形态观察

肠球菌在 mEI 琼脂平板的滤膜上形成带有蓝色晕轮的菌落。

9.6 确证试验

9.6.1 用灭菌接种针从滤膜上至少挑取 10 个带有蓝色晕轮的菌落(不必考虑菌落本身颜色,只要是带有蓝色晕轮的菌落即可)进行确证试验。菌落分别接种到 BHIB 肉汤和 BHIA 斜面,BHIB 肉汤置 $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养 $24 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$,BHIA 斜面置 $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养 $48 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ 。

9.6.2 BHIB 肉汤培养 $24 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ 后,每管肉汤培养物分别接种到相应 BEA 平板、BHIB 肉汤及含 6.5%氯化钠的 BHIB 肉汤中。BEA 平板及含 6.5%氯化钠的 BHIB 肉汤置 $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养 $48 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$;BHIB 肉汤置 $45^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养 $48 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$,观察细菌生长情况。

9.6.3 BHIA 斜面培养 $48 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ 后,从斜面上挑取菌落作革兰氏染色。

9.6.4 革兰氏染色镜检为革兰氏阳性球菌;在 BEA 平板上生长并水解七叶苷(形成黑色或棕色沉淀);BHIB 肉汤中 $45^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 生长;并且在含 6.5%氯化钠的 BHIB 肉汤中 $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 生长良好;具有以上特性的典型菌落可确证为肠球菌。

9.7 肠球菌的计数

对确证为肠球菌菌落的滤膜进行计数,生长有 20 个~60 个肠球菌的滤膜为计数合适范围。

9.8 肠球菌菌数的计算

根据所使用的样品量,按照式(1),计算每 100 mL 样品中肠球菌菌落数。

$$\text{肠球菌}/100 \text{ mL} = \frac{\text{肠球菌菌落数} \times 100}{\text{样品过滤体积}(\text{mL}) \times \text{稀释倍数}} \dots\dots\dots(1)$$

10 结果报告

肠球菌:CFU/100 mL。

附 录 A
(资料性附录)
培 养 基

A.1 mEI 琼脂**A.1.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	15.0 g
七叶苷	1.0 g
放线菌酮	0.05 g
叠氮化钠	0.15 g
酵母浸膏	30.0 g
β -D-吡啶葡萄糖苷	0.75 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.1.2 制法

将以上各成分加热溶解,121℃高压灭菌 15 min,在 50℃水浴中冷却。在 5 mL 蒸馏水中加 0.24 g 萘啶酮酸,滴加几滴 0.1 mol/L 的氢氧化钠,配制萘啶酮酸溶液,将此溶液加入 mEI 琼脂中。再加入 0.02 g 无菌氯化三苯四氮唑(TTC),充分混匀。调节 pH 值至 7.1 ± 0.2 。

倾注约 4 mL~6 mL 的 mEI 琼脂至 9×50 mm 的平板,琼脂厚度约 4 mm~5 mm。平板冷藏备用。

A.2 胆汁七叶苷琼脂**A.2.1 成分**

蛋白胨	8.0 g
胆汁盐	20.0 g
柠檬酸铁	0.5 g
七叶苷	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.2.2 制法

将各成分加热溶解,121℃高压灭菌 15 min,调节 pH 值至 7.1 ± 0.2 。冷至 45℃~50℃倾注平板。

A.3 脑心浸液肉汤(BHIB)**A.3.1 成分**

牛脑浸出粉	10.0 g
牛心浸出粉	9.0 g
胰蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	2.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠	2.5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 3.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,加热溶解,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 ,分装,121℃ 高压灭菌 15 min。

A. 4 含 6.5%氯化钠(NaCl)脑心浸液肉汤**A. 4.1 成分**

除加入氯化钠(NaCl),其余成分与 BHIB 肉汤相同。

A. 4.2 制法

每升 BHIB 肉汤中加 60.0 g 氯化钠(NaCl),其余制法与 BHIB 肉汤相同。

A. 5 脑心浸液琼脂**A. 5.1 成分**

除每升 BHIB 肉汤加 15.0 g 琼脂,其余成分与 BHIB 肉汤相同。

A. 5.2 制法

称取 52 g BHIA 溶于 1 000 mL 蒸馏水中,加热溶解,每管分装 10 mL,121℃ 高压灭菌 15 min,制备成斜面,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 。

A. 6 缓冲蛋白胨水**A. 6.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 6.2 制法

按上述成分配好后,调节 pH 至 7.2,每瓶分装 225 mL,121℃ 高压灭菌 15 min。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
食品和水 中 肠 球 菌 检 验 方 法
第 2 部分：滤膜法
SN/T 1933.2—2007

*

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

电话：68523946 68517548

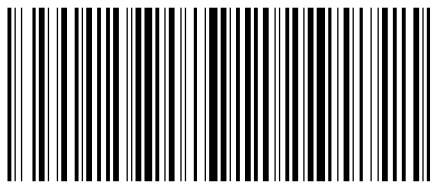
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 11 千字
2007年9月第一版 2007年9月第一次印刷
印数 1—2 000

*

书号：155066·2-18077 定价 8.00 元



SN/T 1933.2-2007