



中华人民共和国国家标准

GB/T 4789.37—2008

食品卫生微生物学检验 金黄色葡萄球菌计数

Microbiological examination of food hygiene—
Enumeration of *Staphylococcus aureus*

2008-11-21 发布

2009-03-01 实施



中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的第一法修改采用国际分析家学会(AOAC INTERNATIONAL)AOAC 975.55《食品中金黄色葡萄球菌表面平板分离和计数法》(AOAC Official Method 975.55, *Staphylococcus aureus* in foods surface plating method isolation and enumeration, 1976), 国际标准化组织(ISO)ISO 6888-1:1999《食品和动物饲料中血浆凝固酶阳性葡萄球菌计数方法》(Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive *staphylococci*, *Staphylococcus aureus* and other species, 1999); 第二法修改采用国际分析家学会(AOAC INTERNATIONAL)AOAC 987.09《食品中金黄色葡萄球菌分离和计数法 MPN 法》(1991年)(AOAC Official Method 987.09, *Staphylococcus aureus* in foods most probable number method for isolation and enumeration); 第三法修改采用国际分析家学会(AOAC INTERNATIONAL)AOAC 2003.07《加工食品中金黄色葡萄球菌计数 Petrifilm 测试片法》(2003年)(AOAC Official Method 2003.07, 3M™ Petrifilm™ staph express count plate method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected types of processed and prepared foods: collaborative study)、AOAC 2003.08《乳制品中金黄色葡萄球菌计数 Petrifilm 测试片法》(2003年)(AOAC Official Method 2003.08, 3M™ Petrifilm™ staph express count plate method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected dairy foods)、AOAC 2003.11《肉、水产品 and 禽中金黄色葡萄球菌计数 Petrifilm 测试片法》(2003年)(AOAC Official Method 2003.11, 3M™ Petrifilm™ staph express count plate method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected types of meats, seafood and poultry)。

本标准的第一法与 AOAC 975.55 和 ISO 6888-1:1999 的主要区别如下:

- 将 AOAC 样品制备时取样量 50 g(或 50 mL)修改为 25 g(或 25 mL);
- 修改了 ISO 的计算公式。

本标准的第二法与 AOAC 987.09 的主要区别为:将样品制备时取样量 50 g(或 50 mL)修改为 25 g(或 25 mL)。

本标准的第三法与 AOAC 2003.07、AOAC 2003.08、AOAC 2003.11 的主要区别如下:

- 将测试片的培养温度 35 °C±1 °C 或 37 °C±1 °C 统一为 36 °C±1 °C;
- 规定了测试片上需确认的可疑菌落。

本标准自实施之日起 GB/T 4789.10—2003 中金黄色葡萄球菌计数部分同时废止。

本标准的附录 A 和附录 B 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准由中华人民共和国卫生部负责解释。

本标准负责起草单位:中国疾病预防控制中心营养与食品安全所。

本标准参与起草单位:上海市疾病预防控制中心、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中华人民共和国内蒙古出入境检验检疫局、江苏省疾病预防控制中心。

本标准主要起草人:刘秀梅、陈敏、刘弘、卢行安、刘中学、袁宝君、田静。

食品卫生微生物学检验

金黄色葡萄球菌计数

1 范围

本标准规定了食品中金黄色葡萄球菌的计数方法。

本标准适用于食品和食物中毒样品中金黄色葡萄球菌的计数。其中第一法适用于金黄色葡萄球菌含量较高的食品；第二法适用于金黄色葡萄球菌含量较低而杂菌含量较高的食品；第三法适用于肉及其制品、奶制品等。

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℃。
- 2.2 冰箱:2℃~5℃。
- 2.3 恒温水浴箱:37℃±1℃。
- 2.4 天平:感量0.1g。
- 2.5 均质器。
- 2.6 振荡器。
- 2.7 无菌吸管:1 mL(具0.01 mL刻度)、10 mL(具0.1 mL刻度)或微量移液器及吸头。
- 2.8 无菌锥形瓶:容量100 mL、500 mL。
- 2.9 无菌培养皿:直径90 mm。
- 2.10 无菌L型涂布棒。
- 2.11 pH计或pH比色管或精密pH试纸。

3 培养基和试剂

- 3.1 胰酪胨大豆肉汤:见第A.1章
- 3.2 Baird-Parker琼脂平板:见第A.2章。
- 3.3 脑心浸出液(BHI)肉汤:见第A.3章。
- 3.4 兔血浆:见第A.4章。
- 3.5 磷酸盐缓冲液:见第A.5章。
- 3.6 营养琼脂斜面:见第A.6章。
- 3.7 革兰氏染色液:见第A.7章。
- 3.8 无菌生理盐水:称取8.5g氯化钠溶于1000 mL蒸馏水中,121℃高压灭菌15 min。
- 3.9 1 mol/L氢氧化钠(NaOH):称取40g氢氧化钠溶于1000 mL蒸馏水中。
- 3.10 1 mol/L盐酸(HCl):移取浓盐酸90 mL,用蒸馏水稀释至1000 mL。
- 3.11 PetrifilmTM¹⁾金黄色葡萄球菌测试片。

1) PetrifilmTM是由3M公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效的产品。

第一法 Baird-Parker 平板计数

4 检验程序

检验程序见图 1。

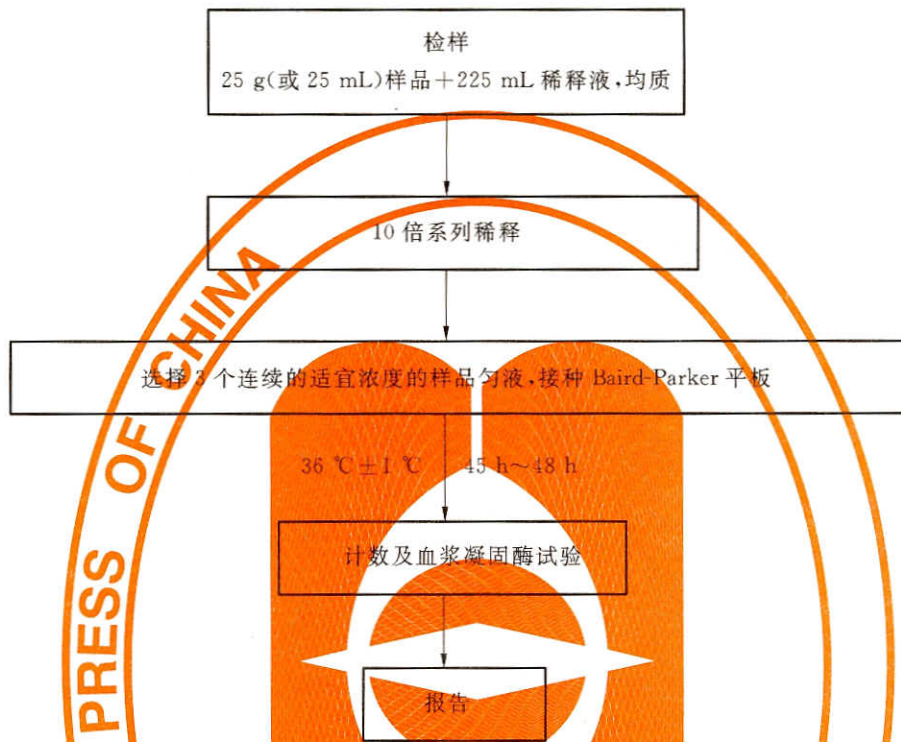


图 1 金黄色葡萄球菌 Baird-Parker 平板法检验程序

5 操作步骤

5.1 样品的稀释

5.1.1 固体和半固体样品:称取 25 g 样品置盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内, 8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min, 或置盛有 225 mL 稀释液的无菌均质袋中, 用拍击式均质器拍打 1 min~2 min, 制成 1:10 的样品匀液。

5.1.2 液体样品:以无菌吸管吸取 25 mL 样品, 置盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶(瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠)中, 充分混匀, 制成 1:10 的样品匀液。

5.1.3 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL, 沿管壁缓慢注于盛有 9 mL 稀释液的无菌试管中(注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面), 振摇试管或换用一支 1 mL 无菌吸管反复敲打使其混合均匀, 制成 1:100 的样品匀液。

5.1.4 按 5.1.3 操作程序, 制备 10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释一次, 换用一次 1 mL 无菌吸管或吸头。

5.2 样品的接种

根据对样品污染状况的估计, 选择 2 个~3 个适宜稀释度的样品匀液(液体样品可包括原液), 在进行 10 倍递增稀释时, 每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液以 0.3 mL、0.3 mL、0.4 mL 接种量, 分别加入三块 Baird-Parker 平板, 然后用无菌 L 棒涂布整个平板, 注意不要触及平板边缘。使用前, 如 Baird-Parker 平板表面有水珠, 可放在 25 °C~50 °C 的培养箱里干燥, 直到平板表面的水珠消失。

5.3 培养

在通常情况下,涂布后,将平板静置 10 min,如样液不易吸收,可将平板放在培养箱 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h;等样品匀液吸收后翻转平皿,倒置于培养箱, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养,45 h~48 h。

5.4 典型菌落计数和确认

5.4.1 金黄色葡萄球菌在 Baird-Parker 平板上,菌落圆形、凸起、湿润,直径为 2 mm~3 mm,颜色呈灰色到黑色,边缘为淡色,周围为一混浊带,在其外层有一透明圈。用接种针接触菌落有似奶油至树胶样的硬度,偶尔会遇到非脂肪溶解的类似菌落;但无混浊带及透明圈。长期保存的冷冻或干燥食品中所分离的菌落比典型菌落所产生的黑色较淡些,外观可能粗糙并干燥。

5.4.2 选择合计菌落数在 20~200 的平板,计算典型菌落数。如果:

- 最低稀释度平板的菌落小于 20,计数该稀释度平板上的典型菌落。
- 某一稀释度平板的菌落大于 200 且有典型菌落,但上一稀释度平板上没有典型菌落,计数该稀释度平板上的典型菌落。
- 某一稀释度平板的菌落大于 200 且有典型菌落,且上一稀释度平板上有典型菌落,其平板上的菌落数不在 20~200 之间,计数该稀释度平板上的典型菌落。

以上按式(1)计算。

- 平板菌落数均在 20~200 之间,按式(2)计算。

5.4.3 从典型菌落中任选五个菌落(小于五个全选),分别接种到 5 mL BHI 肉汤和营养琼脂斜面, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

5.4.4 取新鲜配置兔血浆 0.5 mL,放入小试管中,再加入 5.4.3 BHI 培养物 0.2 mL~0.3 mL,振荡摇匀,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱或水浴内,每半小时观察一次,观察 6 h,如呈现凝固(即将试管倾斜或倒置时,呈现凝块)或凝固体积大于原体积的一半,判定为阳性结果。同时以血浆凝固酶试验阳性和阴性葡萄球菌株的肉汤培养物作为对照。也可用商品化的试剂,按说明书操作,进行凝固酶试验。

5.4.5 如实验结果可疑,挑取营养琼脂斜面的菌落到 5 mL BHI 肉汤, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~48 h,重复 5.4.4。

6 结果计算

式(1):

$$T = AB/Cd \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- T*——样品中金黄色葡萄球菌菌落数;
A——某一稀释度典型菌落的总数;
B——某一稀释度血浆凝固酶阳性的菌落数;
C——某一稀释度用于血浆凝固酶试验的菌落数;
d——某一稀释度。

式(2):

$$N = \sum T/1.1d \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- N*——样品中金黄色葡萄球菌菌落数;
 $\sum T$ ——平板上所有金黄色葡萄球菌菌落数之和;
 1.1——计算系数;
d——稀释因子(第一稀释度)。

7 金黄色葡萄球菌平板计数的报告

根据 Baird-Parker 平板上金黄色葡萄球菌的典型菌落数,按第 6 章中公式计算,报告每克(或毫升)

样品中金黄色葡萄球菌数,以 CFU/g(或 CFU/mL)表示;如 T 或 N 值为 0,则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。

第二法 金黄色葡萄球菌 MPN 计数

8 检验程序

检验程序见图 2。

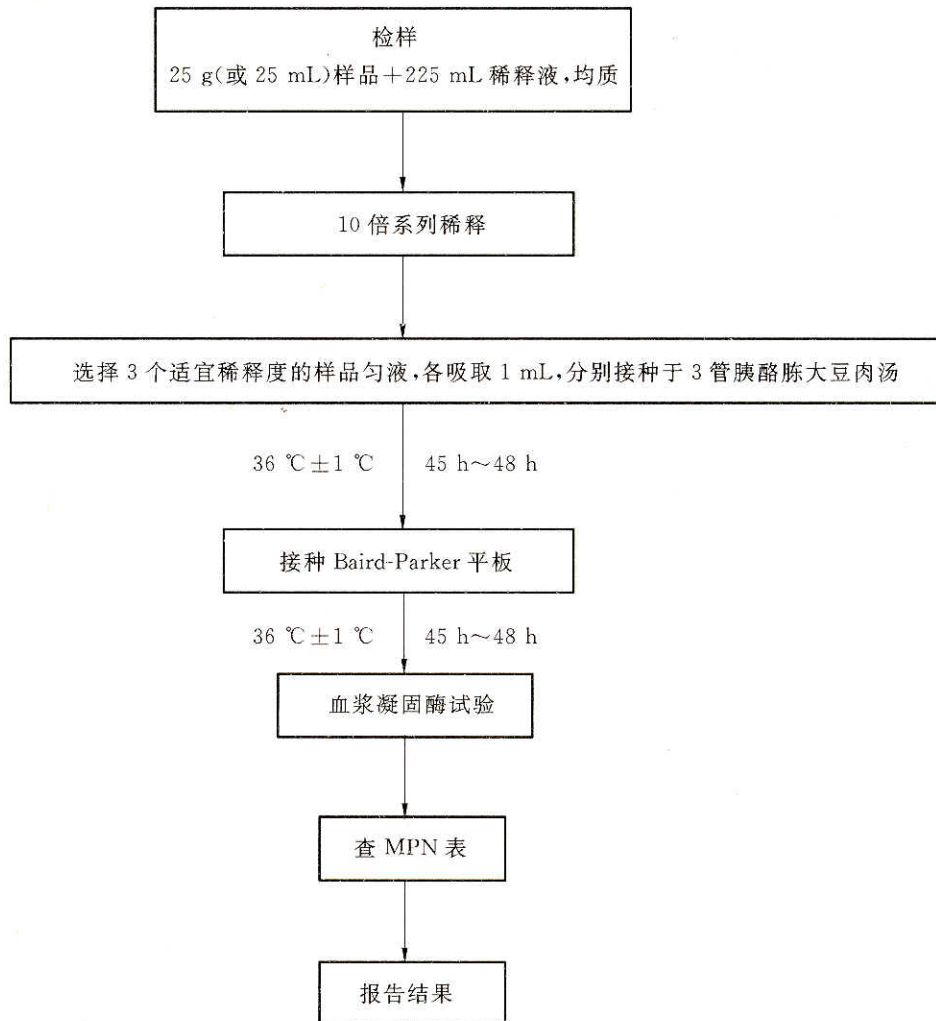


图 2 金黄色葡萄球菌 MPN 法检验程序

9 操作步骤

9.1 样品的稀释

按 5.1 进行。

9.2 接种和培养

9.2.1 根据对样品污染状况的估计,选择 3 个适宜稀释度的样品匀液(液体样品可包括原液),在进行 10 倍递增稀释时,每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液接种到胰酪胨大豆肉汤管,每个稀释度接种 3 管,将上述接种物 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养,45 h~48 h。

9.2.2 用接种环从有细菌生长的各管中,移取 1 环,分别接种 Baird-Parker 平板, $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养,45 h~48 h。

9.3 典型菌落确认

9.3.1 见 5.4.1。

9.3.2 从典型菌落中至少挑取 1 个菌落接种到 BHI 肉汤和营养琼脂斜面, $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。进行血浆凝固酶试验(见 5.4.4、5.4.5)。

10 结果计算

计算血浆凝固酶试验阳性菌落对应的管数,查 MPN 检索表(见附录 B)。

11 金黄色葡萄球菌最可能数(MPN)的报告

根据检索表的数值,报告每克(或毫升)样品中金黄色葡萄球菌的最可能数,以 MPN/g(MPN/mL)表示。

第三法 金黄色葡萄球菌 Petrifilm™ 测试片法

12 检验程序

检验程序见图 3。

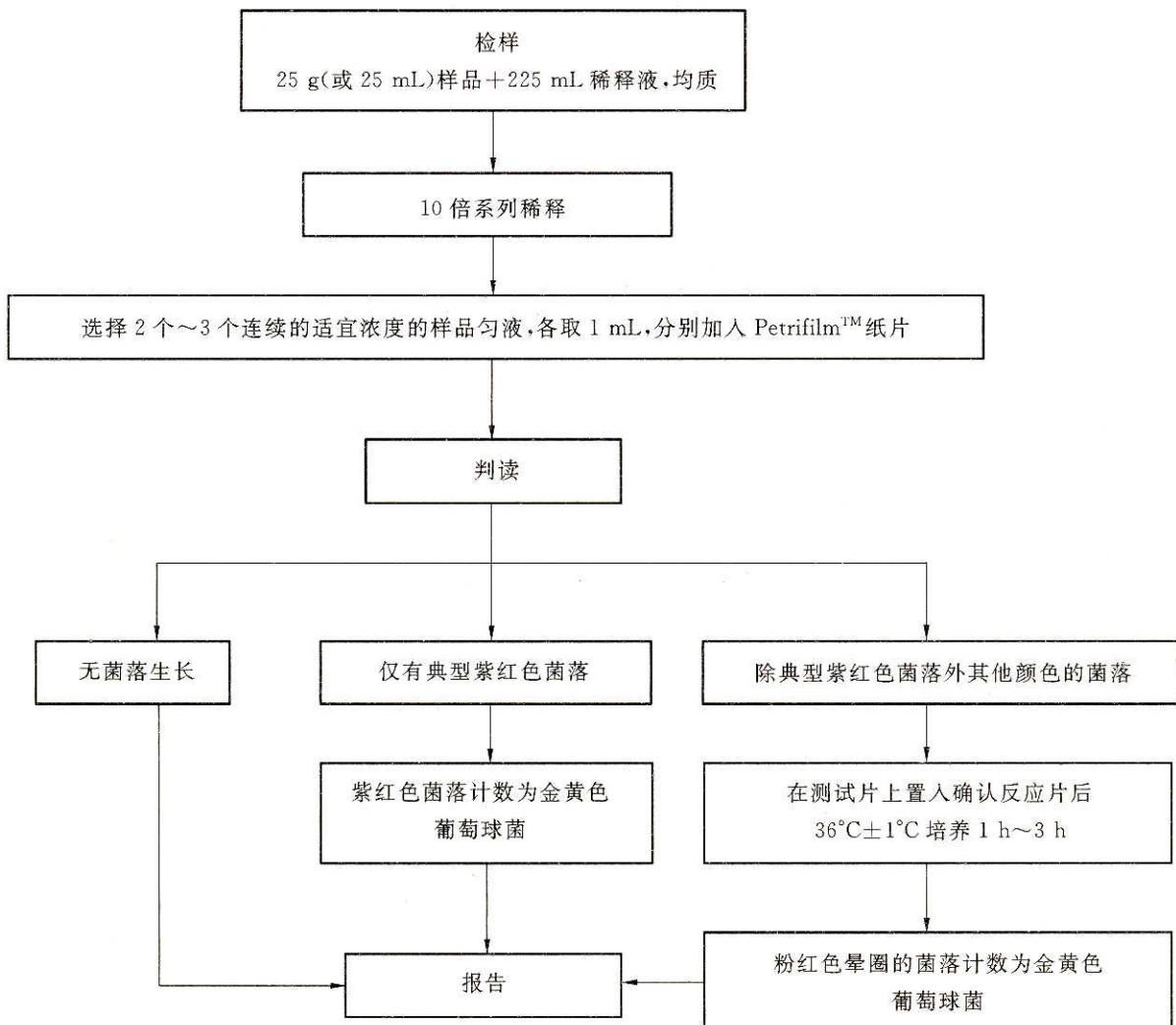


图 3 金黄色葡萄球菌 Petrifilm™ 测试片法检验程序

13 操作步骤

13.1 样品稀释

按照 5.1.1~5.1.2 制备 1:10 样品匀液后,用 1 mol/L 氢氧化钠(NaOH)或 1 mol/L 盐酸(HCl)调节该样品匀液的 pH 至 6.0~8.0。

13.2 接种和培养

选择 2 个~3 个适宜稀释度的样品匀液,每个稀释度接种两张测试片。将测试片置于平坦实验台面处,揭开上层膜,用吸管吸取样品匀液 1 mL 垂直滴加到一张测试片的中央,将上层膜缓慢盖下,避免气泡产生,切勿使上层膜直接落下,将压板放置在上层膜中央处,轻轻地压下,使样液均匀覆盖于圆形的培养面积上,切勿扭转或滑动压板,拿起压板,静置至少 1 min 以使培养基凝固。将测试片的透明面朝上置于培养箱内,堆叠片数不超过 20 片,36 °C ± 1 °C 下培养 24 h ± 2 h。培养 24 h ± 2 h 后,如果测试片上没有菌落生长或菌落全部是典型紫红色,检验完毕;如果培养 24 h ± 2 h 时测试片上出现除典型紫红色以外颜色的菌落,如黑色、蓝绿色等,需使用确认反应片作进一步确认。

13.3 确认反应

当需要使用确认反应片时,将上层膜掀起,将确认反应片置入测试片的培养范围内,再将上层膜放下覆盖在确认反应片上,用手指以滑动的方式轻轻将测试片与确认反应片压紧,包括确认反应片的边缘,此步骤可使测试片与确认反应片紧密接触并除去气泡,最后把插入确认反应片的测试片放在 36 °C ± 1 °C 的培养箱内培养 1 h~3 h。

14 结果计算与报告

14.1 判读

培养 24 h ± 2 h 时在测试片上呈典型紫红色的菌落为确认的金黄色葡萄球菌,无需用确认反应片作进一步确认;如果培养 24 h ± 2 h 时出现典型紫红色以外的其他菌落,需用确认反应片进行确认,有粉红色晕圈的菌落为金黄色葡萄球菌。没有粉红色晕圈的菌落不是金黄色葡萄球菌,不应被计数。如果整个培养面积呈粉红色而没有明显的晕圈,说明金黄色葡萄球菌大量存在,结果记录为“多不可计”,然后进一步稀释后重新检验。

14.2 金黄色葡萄球菌测试片计数的报告

培养时间一到应立即计数,可目测或用放大镜辅助计数。选择菌落数在 15~150 之间的稀释度,两张测试片菌落平均数乘以稀释倍数,即为每克(或毫升)样品中金黄色葡萄球菌数,以 CFU/g(CFU/mL)表示。

如果所有稀释度测试片上的菌落数都小于 15,计数稀释度最低的测试片上的菌落数乘以稀释倍数报告;如果所有稀释度的测试片上均无菌落生长,以“小于 1 乘以最低稀释倍数”报告;如果所有稀释度的菌落数都大于 150,计数最高稀释度测试片上的菌落数乘以稀释倍数报告。计数菌落数大于 150 的测试片时,可计数一个或两个具有代表性的方格内的菌落数,换算成单个方格内的菌落数后乘以 30 即为测试片上估算的金黄色葡萄球菌数(圆形生长面积为 30 cm²)。

附 录 A
(规范性附录)
培养基制备

A.1 胰酪胨大豆肉汤

A.1.1 成分

胰酪胨(或胰蛋白胨)	17 g
植物蛋白胨(或大豆蛋白胨)	3 g
氯化钠	100 g
磷酸氢二钾	2.5 g
丙酮酸钠	10 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH7.3±0.2	

A.1.2 制法

将上述成分混合,加热,轻轻搅拌并溶解,调节 pH,分装 10 mL 于 16 mm×150 mm 试管内,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 Baird-Parker 琼脂平板

A.2.1 成分

胰蛋白胨	10 g
牛肉膏	5 g
酵母膏	1 g
丙酮酸钠	10 g
甘氨酸	12 g
氯化锂(LiCl·6H ₂ O)	5 g
琼脂	20 g
蒸馏水	950 mL
pH7.0±0.2	

A.2.2 增菌剂的配法

30%卵黄盐水 50 mL 与除菌过滤的 1%亚碲酸钾溶液 10 mL 混合,保存于冰箱内。

A.2.3 制法

将各成分加到蒸馏水中,加热煮沸至完全溶解。冷却至 25 °C,调节 pH。分装每瓶 95 mL,121 °C 高压灭菌 15 min。临用时加热溶化琼脂,冷至 50 °C,每 95 mL 加入预热至 50 °C 的卵黄亚碲酸钾增菌剂 5 mL 摇匀后倾注平板。培养基应是致密不透明的。使用前在冰箱储存不得超过 48 h。

A.3 脑心浸出液(BHI)肉汤

A.3.1 成分

胰蛋白质胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	2.5 g

葡萄糖	2.0 g
牛心浸出液	500 mL
pH	7.4±0.2

A.3.2 制法

加热溶解,调节 pH,分装 16 mm×150 mm 试管,每管 5 mL 置 121 °C,15 min 灭菌。

A.4 兔血浆

取柠檬酸钠 3.8 g,加蒸馏水 100 mL,溶解后过滤,装瓶,121 °C 高压灭菌 15 min。

兔血浆制备:取 3.8% 柠檬酸钠溶液一份加兔(人)全血四份,混好静置之(或以 3 000 r/min 离心 30 min),则使血液细胞下降,即可得血浆。

A.5 磷酸盐缓冲液

A.5.1 成分

磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	34.0 g
蒸馏水	500 mL
pH	7.2

A.5.2 制法

贮存液:称取 34.0 g 的磷酸二氢钾溶于 500 mL 蒸馏水中,用大约 175 mL 的 1mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2,用蒸馏水稀释至 1 000 mL 后贮存于冰箱。

稀释液:取贮存液 1.25 mL,用蒸馏水稀释至 1 000 mL,分装于适宜容器中,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.6 营养琼脂斜面

A.6.1 成分

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g~20 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.2~7.4

A.6.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内,加入 15% 氢氧化钠溶液约 2 mL 校正 pH 至 7.2~7.4。加入琼脂,加热煮沸,使琼脂熔化,分装 13 mm×130 mm 小试管,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.7 革兰氏染色液

A.7.1 结晶紫染色液

A.7.1.1 成分

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20.0 mL
1%草酸铵水溶液	80.0 mL

A.7.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

A.7.2 革兰氏碘液

A.7.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL

A.7.2.2 制法

将碘与碘化钾先行混合,加入蒸馏水少许充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

A.7.3 沙黄复染液

A.7.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.7.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.7.4 染色法

A.7.4.1 涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染液,染 1 min,水洗。

A.7.4.2 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。

A.7.4.3 滴加 95%乙醇脱色约 15 s~30 s,直至染色液被洗掉,不要过分脱色,水洗。

A.7.4.4 滴加复染液,复染 1 min,水洗,待干,镜检。

附录 B
(规范性附录)

金黄色葡萄球菌最可能数(MPN)检索表

每克(或毫升)检样中金黄色葡萄球菌最可能数(MPN)的检索见表 B.1。

表 B.1 金黄色葡萄球菌最可能数(MPN)检索表

阳性管数			MPN	95%置信区间		阳性管数			MPN	95%置信区间	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	—	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1 000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1 000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2 000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1 100	180	4 100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1 100	420	—

注1: 本表采用3个稀释度[0.1 g(或0.1 mL)、0.01 g(或0.01 mL)和0.001 g(或0.001 mL)],每个稀释度接种3管。

注2: 表内所列检样量如改用1 g(或1 mL)、0.1 g(或0.1 mL)和0.01 g(或0.01 mL)时,表内数字应相应降低10倍;如改用0.01 g(或0.01 mL)、0.001 g(或0.001 mL)、0.000 1 g(或0.000 1 mL)时,则表内数字应相应增高10倍,其余类推。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
食 品 卫 生 微 生 物 学 检 验
金 黄 色 葡 萄 球 菌 计 数

GB/T 4789.37—2008

*

中国标准出版社出版发行
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
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 21 千字

2009年3月第一版 2009年3月第一次印刷

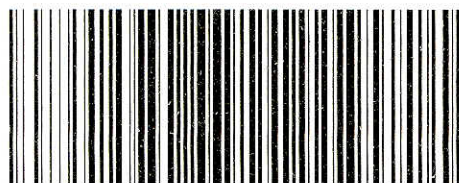
*

书号:155066·1-36103 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 4789.37-2008