

中华人民共和国国家标准

GB/T 4789.29—2003
代替 GB/T 4789.29—1994

食品卫生微生物学检验 椰毒假单胞菌酵米面亚种检验

Microbiological examination of food hygiene—
Examination of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans*

2003-08-11 发布

2004-01-01 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

本标准对 GB/T 4789.29—1994《食品卫生微生物学检验 椰毒假单胞菌酵米面亚种检验》进行修订。

本标准与 GB/T 4789.29—1994 相比主要修改如下：

——按照 GB/T 1.1—2000 对标准文本的格式和文字进行修改。

——规范原标准中的“设备和材料”。

本标准自实施之日起，GB/T 4789.29—1994 同时废止。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心营养与食品安全所。

本标准主要起草人：刘秀梅、白竟玉、付萍、杨宝兰。

本标准于 1994 年首次发布，本次为第一次修订。

食品卫生微生物学检验

椰毒假单胞菌酵米面亚种检验

1 范围

本标准规定了椰毒假单胞菌酵米面亚种检验的基本要求、操作程序和结果判定。

本标准适用于酵米面、变质鲜银耳及其他淀粉类发酵食品引起食物中毒的病因学诊断及椰毒假单胞菌酵米面亚种的常规检验及菌种鉴定。

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/T 4789.28 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

GB/T 11675 银耳卫生标准

3 设备和仪器

- 3.1 冰箱:4℃~ -20℃。
- 3.2 恒温培养箱:26℃±1℃、36℃±1℃。
- 3.3 恒温水浴锅:46℃±1℃。
- 3.4 显微镜:10×~100×。
- 3.5 离心机:4 000 r/min。
- 3.6 架盘药物天平:0 g~500 g,精度 0.5 g。
- 3.7 锥形瓶:100 mL、500 mL。
- 3.8 灭菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)。
- 3.9 灭菌平皿:直径 90 mm,120 mm。
- 3.10 灭菌试管:16 mm×160 mm。
- 3.11 离心管:30 mm×100 mm。
- 3.12 小试管:10 mm×100 mm。
- 3.13 灭菌 L 形玻璃棒。
- 3.14 灭菌透明玻璃纸、滤纸。
- 3.15 灌胃器:1 mL。
- 3.16 小白鼠:18 g~20 g。

4 培养基和试剂

- 4.1 革兰氏染色液:按 GB/T 4789.28 配制。
- 4.2 氧化酶试验:按 GB/T 4789.28 执行。
- 4.3 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA):按 GB/T 4789.28 配制。
- 4.4 马铃薯葡萄糖半固体琼脂:按 4.3PDA 配方,琼脂量减至 0.5 g/100 mL。
- 4.5 马铃薯葡萄糖水(PD 水):按 4.3PDA 配方,不加琼脂。

- 4.6 GVC 增菌液(椰毒假单胞菌酵米面亚种增菌用):在高压灭菌的 PD 水(4.5)中,以无菌手续加龙胆紫水溶液(最终浓度为 1/10 万)氯霉素水溶液(最终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)混匀、分装后置 4℃ 备用。
- 4.7 卵黄琼脂:按 GB/T 4789.28 配制。
- 4.8 SS 琼脂:按 GB/T 4789.28 配制。
- 4.9 Hugh-Leifson 培养基(O/F 试验用):按 GB/T 4789.28 配制。
- 4.10 蛋白胨水(靛基质试验用):按 GB/T 4789.28 配制。
- 4.11 缓冲葡萄糖蛋白胨水(MR 和 VP 试验用):按 GB/T 4789.28 配制。
- 4.12 西蒙氏柠檬酸盐培养基:按 GB/T 4789.28 配制。
- 4.13 苯丙氨酸培养基:按 GB/T 4789.28 配制。
- 4.14 糖发酵管:按 GB/T 4789.28 配制。
- 4.15 半固体琼脂:按 GB/T 4789.28 配制。
- 4.16 抗 O 多价血清、型特异性因子血清(O-III、O-IV、O-V、O-VI、O-VII型、O-VIII型)。

5 检验程序

椰毒假单胞菌酵米面亚种检验程序见图 1。

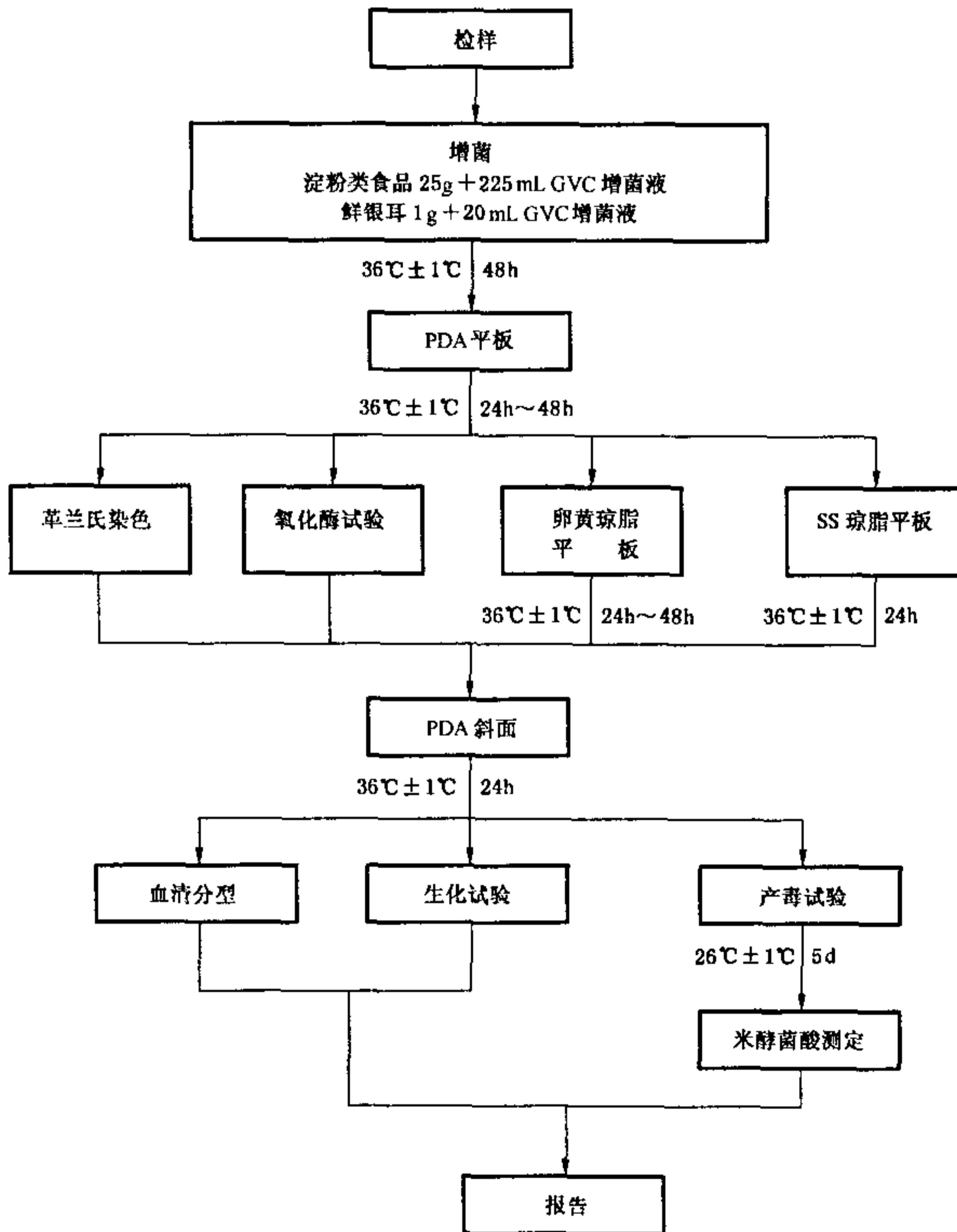


图 1

6 操作步骤

6.1 增菌

用无菌操作取样品 25 g, 加入盛有 225 mL 增菌液的锥形瓶中(鲜银耳样品取 1 g, 用剪刀剪碎, 加入盛有 20 mL 增菌液的锥形瓶中)36℃±1℃培养 48 h。

6.2 分离、纯化培养

取增菌液一接种环, 划线接种 PDA 平板, 36℃±1℃培养 24 h~48 h。观察平板上生长菌落的形态, 挑取可疑单个菌落, 进行革兰氏染色及氧化酶试验。革兰氏染色阴性, 氧化酶试验阴性的菌落再点种卵黄琼脂平板及 SS 琼脂平板, 36℃±1℃分别培养 48 h 和 24 h。椰毒假单胞菌酵米面亚种在不同分离平板上的菌落特征见表 1。

表 1 椰毒假单胞菌酵米面亚种在不同分离平板上的菌落特征

培养基	菌落特征
PDA 平板	菌落 1 mm~2 mm, 灰白或乳白色, 光滑、湿润、边缘整齐。培养 48 h 后, 中心有凸起, 呈草帽状, 菌落周围有黄绿色素扩散到基质中
卵黄琼脂平板	菌落表面光滑、湿润, 48 h 后, 菌落周围形成乳白色混浊环, 斜射日光下可见环的表面呈虹彩现象
SS 琼脂平板	不生长

从卵黄琼脂平板上挑取卵磷脂酶阳性, 并带有虹彩环的单个菌落, 接种 PDA 斜面, 36℃±1℃培养 24 h, 供下步试验用。

6.3 生化试验

从纯培养的 PDA 斜面上挑取少量菌苔, 分别接种 Hugh-Leifson 培养基、蛋白胨水、缓冲蛋白胨水、西蒙氏柠檬酸盐培养基、糖发酵管及苯丙氨酸培养基, 36℃±1℃培养, 按单项试验的要求分别进行观察。椰毒假单胞菌酵米面亚种生化性状见表 2。

表 2 椰毒假单胞菌酵米面亚种生化性状

阳 性		阴 性
动力	尿素	氧化酶
O/F 试验(O 型)	明胶液化	靛基质
葡萄糖	卵磷脂酶	V-P
果糖	侧金盏花醇	MR
木糖	柠檬酸盐利用	H ₂ S 产生
半乳糖	精氨酸	5℃不生长
阿拉伯糖	石蕊牛乳	41℃不生长
甘露醇	37℃生长	
肌醇		
卫茅醇		
硝酸盐还原		

6.4 血清学分型鉴定

6.4.1 O 抗原的制备

将马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)斜面 36℃±1℃, 24 h 培养物用灭菌生理盐水洗下, 煮沸 2 h, 离心弃上清液, 再用灭菌生理盐水稀释至 5 亿/mL~10 亿/mL 菌悬液, 作为凝集试验用抗原。

6.4.2 O 抗原的鉴定

用多价血清做玻片凝集试验, 同时用生理盐水做对照。与多价血清凝集者, 依次用 O-III、O-IV、O-

V、O-VI、O-VII型、O-VIII型因子血清做试管凝集试验。根据试验结果,判定O抗原型。在生理盐水中自凝者不能分型。生化学性状符合,但不能与以上血清凝集者,需保留菌株做进一步的鉴定。

6.5 毒性试验

6.5.1 产毒培养

取已鉴定为椰毒假单胞菌酵米面亚种的菌株接种PDA斜面,36℃±1℃,培养24 h,加入3 mL灭菌生理盐水,制成约100亿/mL的菌悬液,用无菌吸管吸取0.5 mL,滴在铺好灭菌玻璃纸的半固体PDA平板上,用灭菌L形玻璃棒涂布均匀,26℃±1℃培养5 d。取下带菌的玻璃纸,将半固体平板放入消毒锅内,100℃流动蒸气灭菌30 min。室温冷却后,置-10℃~-20℃冰箱过夜。将冰冻好的半固体平板置室温融化,用无菌吸管取出冻融液,经滤纸过滤放灭菌试管或锥形瓶中,4℃避光保存。此为粗毒素。

6.5.2 毒力测定

取粗毒素或经水浴蒸发的5倍~10倍浓缩液0.5 mL,灌胃小白鼠三只,体重18 g~20 g,观察7 d。若菌株产生米酵菌酸,小鼠在灌胃后20 min~24 h内发病、死亡。主要症状为竖毛,萎靡不振,继而躁动,行步蹒跚、肢体麻痹、瘫软、抽搐,呈角弓反张状,呼吸急促、死亡。

6.5.3 米酵菌酸测定

按照GB/T 11675执行。
