



中华人民共和国国家标准

GB 4789.30—2016

食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会
国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB 4789.30—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》。

本标准与 GB 4789.30—2010 相比,主要变化如下:

- 增加了“第二法 单核细胞增生李斯特氏菌平板计数法”;
- 增加了“第三法 单核细胞增生李斯特氏菌 MPN 计数法”;
- 修改了范围。

食品安全国家标准

食品微生物学检验

单核细胞增生李斯特氏菌检验

1 范围

本标准规定了食品中单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)的检验方法。

本标准第一法适用于食品中单核细胞增生李斯特氏菌的定性检验;第二法适用于单核细胞增生李斯特氏菌含量较高的食品中单核细胞增生李斯特氏菌的计数;第三法适用于单核细胞增生李斯特氏菌含量较低(<100 CFU/g)而杂菌含量较高的食品中单核细胞增生李斯特氏菌的计数,特别是牛奶、水以及含干扰菌落计数的颗粒物质的食品。

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 冰箱: $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 2.2 恒温培养箱: $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 2.3 均质器。
- 2.4 显微镜: $10\text{ }^{\times}\sim 100\text{ }^{\times}$ 。
- 2.5 电子天平:感量 0.1 g 。
- 2.6 锥形瓶: 100 mL 、 500 mL 。
- 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 无菌平皿:直径 90 mm 。
- 2.9 无菌试管: $16\text{ mm}\times 160\text{ mm}$ 。
- 2.10 离心管: $30\text{ mm}\times 100\text{ mm}$ 。
- 2.11 无菌注射器: 1 mL 。
- 2.12 单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*) ATCC 19111 或 CMCC 54004,或其他等效标准菌株。
- 2.13 英诺克李斯特氏菌(*Listeria innocua*) ATCC 33090,或其他等效标准菌株。
- 2.14 伊氏李斯特氏菌(*Listeria ivanovii*) ATCC 19119,或其他等效标准菌株。
- 2.15 斯氏李斯特氏菌(*Listeria seeligeri*) ATCC 35967,或其他等效标准菌株。
- 2.16 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923 或其他产 β -溶血环金葡萄菌,或其他等效标准菌株。
- 2.17 马红球菌(*Rhodococcus equi*) ATCC 6939 或 NCTC 1621,或其他等效标准菌株。
- 2.18 小白鼠:ICR 体重 $18\text{ g}\sim 22\text{ g}$ 。
- 2.19 全自动微生物生化鉴定系统。

3 培养基和试剂

- 3.1 含 0.6% 酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE):见 A.1。

- 3.2 含 0.6% 酵母浸膏的胰酪胨大豆琼脂(TSA-YE):见 A.2。
 3.3 李氏增菌肉汤 LB(LB₁, LB₂):见 A.3。
 3.4 1% 盐酸吡啶黄(acriflavine HCl)溶液:见 A.3.2.1、A.3.2.2。
 3.5 1% 萘啶酮酸钠盐(naladixic acid)溶液:见 A.3.2.1、A.3.2.2。
 3.6 PALCAM 琼脂:见 A.4。
 3.7 革兰氏染液:见 A.5。
 3.8 SIM 动力培养基:见 A.6。
 3.9 缓冲葡萄糖蛋白胨水[甲基红(MR)和 V-P 试验用]:见 A.7。
 3.10 5%~8% 羊血琼脂:见 A.8。
 3.11 糖发酵管:见 A.9。
 3.12 过氧化氢试剂:见 A.10。
 3.13 李斯特氏菌显色培养基。
 3.14 生化鉴定试剂盒或全自动微生物鉴定系统。
 3.15 缓冲蛋白胨水:见 A.11。

第一法 单核细胞增生李斯特氏菌定性检验

4 检验程序

单核细胞增生李斯特氏菌定性检验程序见图 1。

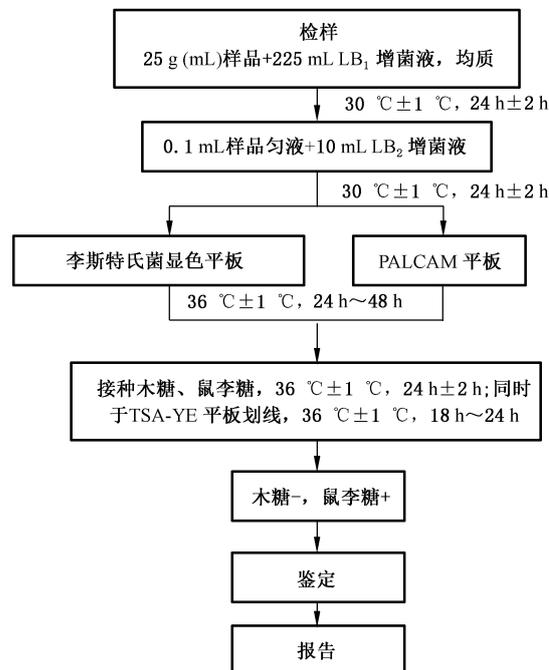


图 1 单核细胞增生李斯特氏菌定性检验程序

5 操作步骤

5.1 增菌

以无菌操作取样品 25 g(mL)加入到含有 225 mL LB₁ 增菌液的均质袋中,在拍击式均质器上连续均质 1 min~2 min;或放入盛有 225 mL LB₁ 增菌液的均质杯中,以 8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min。于 30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h,移取 0.1 mL,转种于 10 mL LB₂ 增菌液内,于 30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h。

5.2 分离

取 LB₂ 二次增菌液划线接种于李斯特氏菌显色平板和 PALCAM 琼脂平板,于 36 ℃±1 ℃培养 24 h~48 h,观察各个平板上生长的菌落。典型菌落在 PALCAM 琼脂平板上为小的圆形灰绿色菌落,周围有棕黑色水解圈,有些菌落有黑色凹陷;在李斯特氏菌显色平板上的菌落特征,参照产品说明进行判定。

5.3 初筛

自选择性琼脂平板上分别挑取 3 个~5 个典型或可疑菌落,分别接种木糖、鼠李糖发酵管,于 36 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h,同时在 TSA-YE 平板上划线,于 36 ℃±1 ℃培养 18 h~24 h,然后选择木糖阴性、鼠李糖阳性的纯培养物继续进行鉴定。

5.4 鉴定(或选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物鉴定系统等)

5.4.1 染色镜检:李斯特氏菌为革兰氏阳性短杆菌,大小为(0.4 μm~0.5 μm)×(0.5 μm~2.0 μm);用生理盐水制成菌悬液,在油镜或相差显微镜下观察,该菌出现轻微旋转或翻滚样的运动。

5.4.2 动力试验:挑取纯培养的单个可疑菌落穿刺半固体或 SIM 动力培养基,于 25 ℃~30 ℃培养 48 h,李斯特氏菌有动力,在半固体或 SIM 培养基上方呈伞状生长,如伞状生长不明显,可继续培养 5 d,再观察结果。

5.4.3 生化鉴定:挑取纯培养的单个可疑菌落,进行过氧化氢酶试验,过氧化氢酶阳性反应的菌落继续进行糖发酵试验和 MR-VP 试验。单核细胞增生李斯特氏菌的主要生化特征见表 1。

5.4.4 溶血试验:将新鲜的羊血琼脂平板底面划分为 20 个~25 个小格,挑取纯培养的单个可疑菌落刺种到血平板上,每格刺种一个菌落,并刺种阳性对照菌(单增李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌和斯氏李斯特氏菌)和阴性对照菌(英诺克李斯特氏菌),穿刺时尽量接近底部,但不要触到底面,同时避免琼脂破裂,36 ℃±1 ℃培养 24 h~48 h,于明亮处观察,单增李斯特氏菌呈现狭窄、清晰、明亮的溶血圈,斯氏李斯特氏菌在刺种点周围产生弱的透明溶血圈,英诺克李斯特氏菌无溶血圈,伊氏李斯特氏菌产生宽的、轮廓清晰的 β-溶血区域,若结果不明显,可置 4 ℃冰箱 24 h~48 h 再观察。

注:也可用划线接种法。

5.4.5 协同溶血试验 cAMP(可选项目):在羊血琼脂平板上平行划线接种金黄色葡萄球菌和马红球菌,挑取纯培养的单个可疑菌落垂直划线接种于平行线之间,垂直线两端不要触及平行线,距离 1 mm~2 mm,同时接种单核细胞增生李斯特氏菌、英诺克李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌和斯氏李斯特氏菌,于 36 ℃±1 ℃培养 24 h~48 h。单核细胞增生李斯特氏菌在靠近金黄色葡萄球菌处出现约 2 mm 的 β-溶血增强区域,斯氏李斯特氏菌也出现微弱的溶血增强区域,伊氏李斯特氏菌在靠近马红球菌处出现约 5 mm~10 mm 的“箭头状”β-溶血增强区域,英诺克李斯特氏菌不产生溶血现象。若结果不明显,可置 4 ℃冰箱 24 h~48 h 再观察。

注:5%~8%的单核细胞增生李斯特氏菌在马红球菌一端有溶血增强现象。

表 1 单核细胞增生李斯特氏菌生化特征与其他李斯特氏菌的区别

菌种	溶血反应	葡萄糖	麦芽糖	MR-VP	甘露醇	鼠李糖	木糖	七叶苷
单核细胞增生李斯特氏菌 (<i>L. monocytogenes</i>)	+	+	+	+/+	-	+	-	+
格氏李斯特氏菌 (<i>L. grayi</i>)	-	+	+	+/+	+	-	-	+
斯氏李斯特氏菌 (<i>L. seeligeri</i>)	+	+	+	+/+	-	-	+	+
威氏李斯特氏菌 (<i>L. welshimeri</i>)	-	+	+	+/+	-	V	+	+
伊氏李斯特氏菌 (<i>L. ivanovii</i>)	+	+	+	+/+	-	-	+	+
英诺克李斯特氏菌 (<i>L. innocua</i>)	-	+	+	+/+	-	V	-	+

注：+阳性；-阴性；V反应不定。

5.5 小鼠毒力试验(可选项目)

将符合上述特性的纯培养物接种于 TSB-YE 中,于 36 °C ±1 °C 培养 24 h,4 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用无菌生理盐水制备成浓度为 10¹⁰ CFU/mL 的菌悬液,取此菌悬液对 3 只~5 只小鼠进行腹腔注射,每只 0.5 mL,同时观察小鼠死亡情况。接种致病株的小鼠于 2 d~5 d 内死亡。试验设单增李斯特氏菌致病株和灭菌生理盐水对照组。单核细胞增生李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌对小鼠有致病性。

5.6 结果与报告

综合以上生化试验和溶血试验的结果,报告 25 g(mL)样品中检出或未检出单核细胞增生李斯特氏菌。

第二法 单核细胞增生李斯特氏菌平板计数法

6 检验程序

单核细胞增生李斯特氏菌平板计数程序见图 2。

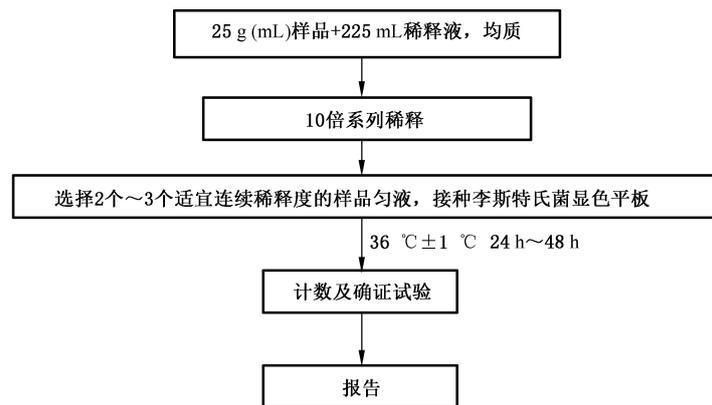


图 2 单核细胞增生李斯特氏菌平板计数程序

7 操作步骤

7.1 样品的稀释

7.1.1 以无菌操作称取样品 25 g(mL),放入盛有 225 mL 缓冲蛋白胨水或无添加剂的 LB 肉汤的无菌均质袋内(或均质杯)内,在拍击式均质器上连续均质 1 min~2 min 或以 8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min。液体样品,振荡混匀,制成 1:10 的样品匀液。

7.1.2 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 缓冲蛋白胨水或无添加剂的 LB 肉汤的无菌试管中(注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面),振摇试管或换用 1 支 1 mL 无菌吸管反复吹打使其混合均匀,制成 1:100 的样品匀液。

7.1.3 按 7.1.2 操作程序,制备 10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释 1 次,换用 1 支 1 mL 无菌吸管或吸头。

7.2 样品的接种

根据对样品污染状况的估计,选择 2 个~3 个适宜连续稀释度的样品匀液(液体样品可包括原液),每个稀释度的样品匀液分别吸取 1 mL 以 0.3 mL、0.3 mL、0.4 mL 的接种量分别加入 3 块李斯特氏菌显色平板,用无菌 L 棒涂布整个平板,注意不要触及平板边缘。使用前,如琼脂平板表面有水珠,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。

7.3 培养

7.3.1 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 °C ± 1 °C 培养 1 h;等样品匀液吸收后翻转平皿,倒置于培养箱,36 °C ± 1 °C 培养 24 h~48 h。

7.4 典型菌落计数和确认

7.4.1 单核细胞增生李斯特氏菌在李斯特氏菌显色平板上的菌落特征以产品说明为准。

7.4.2 选择有典型单核细胞增生李斯特氏菌菌落的平板,且同一稀释度 3 个平板所有菌落数合计在 15 CFU~150 CFU 之间的平板,计数典型菌落数。如果:

- 只有一个稀释度的平板菌落数在 15 CFU~150 CFU 之间且有典型菌落,计数该稀释度平板上的典型菌落;
- 所有稀释度的平板菌落数均小于 15 CFU 且有典型菌落,应计数最低稀释度平板上的典型

菌落；

- c) 某一稀释度的平板菌落数大于 150 CFU 且有典型菌落,但下一稀释度平板上没有典型菌落,应计数该稀释度平板上的典型菌落；
- d) 所有稀释度的平板菌落数大于 150 CFU 且有典型菌落,应计数最高稀释度平板上的典型菌落；
- e) 所有稀释度的平板菌落数均不在 15 CFU~150 CFU 之间且有典型菌落,其中一部分小于 15 CFU 或大于 150 CFU 时,应计数最接近 15 CFU 或 150 CFU 的稀释度平板上的典型菌落。

以上按式(1)计算。

- f) 2 个连续稀释度的平板菌落数均在 15 CFU~150 CFU 之间,按式(2)计算。

7.4.3 从典型菌落中任选 5 个菌落(小于 5 个全选),分别按 5.3、5.4 进行鉴定。

8 结果计数

$$T = \frac{AB}{Cd} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

- T ——样品中单核细胞增生李斯特氏菌菌落数；
- A ——某一稀释度典型菌落的总数；
- B ——某一稀释度确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数；
- C ——某一稀释度用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数；
- d ——稀释因子。

$$T = \frac{A_1B_1/C_1 + A_2B_2/C_2}{1.1d} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中：

- T ——样品中单核细胞增生李斯特氏菌菌落数；
- A_1 ——第一稀释度(低稀释倍数)典型菌落的总数；
- B_1 ——第一稀释度(低稀释倍数)确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数；
- C_1 ——第一稀释度(低稀释倍数)用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数；
- A_2 ——第二稀释度(高稀释倍数)典型菌落的总数；
- B_2 ——第二稀释度(高稀释倍数)确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数；
- C_2 ——第二稀释度(高稀释倍数)用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数；
- 1.1 ——计算系数；
- d ——稀释因子(第一稀释度)。

9 结果报告

报告每 g(mL)样品中单核细胞增生李斯特氏菌菌数,以 CFU/g(mL)表示;如 T 值为 0,则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。

第三法 单核细胞增生李斯特氏菌 MPN 计数法

10 检验程序

单核细胞增生李斯特氏菌 MPN 计数法检验程序见图 3。

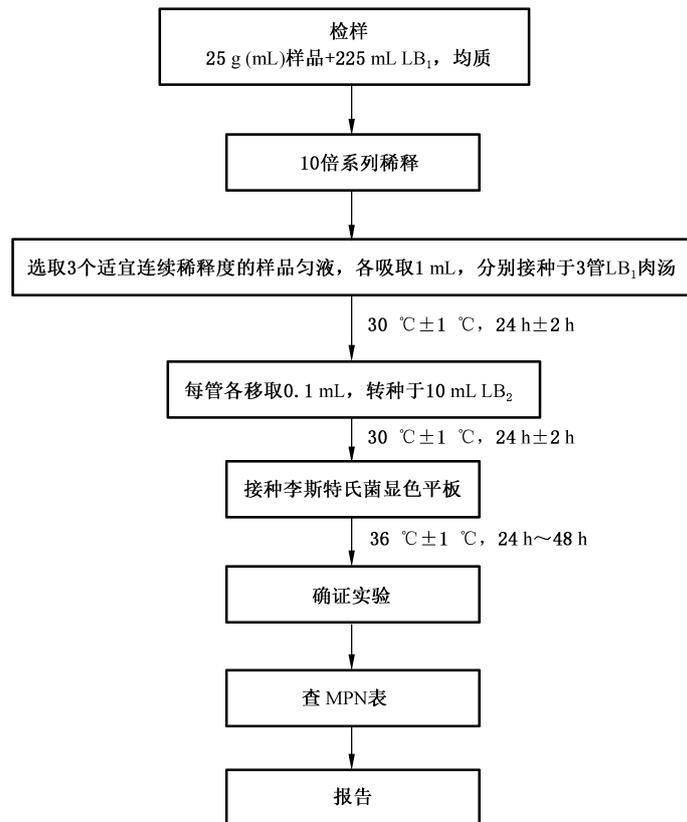


图3 单核细胞增生李斯特氏菌 MPN 计数程序

11 操作步骤

11.1 样品的稀释

按 7.1 进行。

11.2 接种和培养

11.2.1 根据对样品污染状况的估计,选取 3 个适宜连续稀释度的样品匀液(液体样品可包括原液),接种于 10 mL LB₁ 肉汤,每一稀释度接种 3 管,每管接种 1 mL(如果接种量需要超过 1 mL,则用双料 LB₁ 增菌液)于 30 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h。每管各移取 0.1 mL,转种于 10 mL LB₂ 增菌液内,于 30 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h。

11.2.2 用接种环从各管中移取 1 环,接种李斯特氏菌显色平板,36 °C ± 1 °C 培养 24 h ~ 48 h。

11.3 确证试验

自每块平板上挑取 5 个典型菌落(5 个以下全选),按照 5.3、5.4 进行鉴定。

12 结果与报告

根据证实为单核细胞增生李斯特氏菌阳性的试管管数,查 MPN 检索表(见附录 B),报告每 g(mL) 样品中单核细胞增生李斯特氏菌的最可能数,以 MPN/g(mL)表示。

附 录 A 培养基和试剂

A.1 含 0.6% 酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤 (TSB-YE)

A.1.1 成分

胰胨	17.0 g
多价胨	3.0 g
酵母膏	6.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将上述各成分加热搅拌溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,分装,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.2 含 0.6% 酵母膏的胰酪胨大豆琼脂 (TSA-YE)

A.2.1 成分

胰胨	17.0 g
多价胨	3.0 g
酵母膏	6.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

将上述各成分加热搅拌溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,分装,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.3 李氏增菌肉汤 (LB₁, LB₂)

A.3.1 成分

胰胨	5.0 g
多价胨	5.0 g
酵母膏	5.0 g
氯化钠	20.0 g
磷酸二氢钾	1.4 g

磷酸氢二钠	12.0 g
七叶苷	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

将上述成分加热溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,分装,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.3.2.1 李氏 I 液 (LB₁)225 mL 中加入:

1% 萘啶酮酸 (用 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液配制)	0.5 mL
1% 吡啶黄 (用无菌蒸馏水配制)	0.3 mL

A.3.2.2 李氏 II 液 (LB₂)200 mL 中加入:

1% 萘啶酮酸	0.4 mL
1% 吡啶黄	0.5 mL

A.4 PALCAM 琼脂

A.4.1 成分

酵母膏	8.0 g
葡萄糖	0.5 g
七叶甙	0.8 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
甘露醇	10.0 g
酚红	0.1 g
氯化锂	15.0 g
酪蛋白胰酶消化物	10.0 g
心胰酶消化物	3.0 g
玉米淀粉	1.0 g
肉胃酶消化物	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

将上述成分加热溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,分装,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.4.2.1 PALCAM 选择性添加剂

多粘菌素 B	5.0 mg
盐酸吡啶黄	2.5 mg
头孢他啶	10.0 mg
无菌蒸馏水	500 mL

A.4.2.2 制法

将 PALCAM 基础培养基溶化后冷却到 50 °C,加入 2 mL PALCAM 选择性添加剂,混匀后倾倒在无菌的平皿中,备用。

A.5 革兰氏染色液

A.5.1 结晶紫染色液

A.5.1.1 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.5.1.2 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.5.2 革兰氏碘液

A.5.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

A.5.2.2 制法

将碘与碘化钾先进行混合,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.5.3 沙黄复染液

A.5.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.5.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.5.4 染色法

A.5.4.1 涂片用火焰固定后滴加结晶紫染液,作用 1 min,水洗。

A.5.4.2 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。

A.5.4.3 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.5.4.4 滴加复染液,复染 1 min,水洗、待干、镜检。

A.6 SIM 动力培养基

A.6.1 成分

胰胨	20.0 g
多价胨	6.0 g

硫酸铁铵	0.2 g
硫代硫酸钠	0.2 g
琼脂	3.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制法

将上述各成分加热混匀,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,分装小试管,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.6.3 试验方法

挑取纯培养的单个可疑菌落穿刺接种到 SIM 培养基中,于 25 °C ~ 30 °C 培养 48 h,观察结果。

A.7 缓冲葡萄糖蛋白胨水(MR 和 VP 试验用)

A.7.1 成分

多价胨	7.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钾	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

溶化后调节 pH 至 7.0 ± 0.2 ,分装试管,每管 1 mL,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.7.3 甲基红(MR)试验

A.7.3.1 甲基红试剂

A.7.3.1.1 成分

甲基红	10 mg
95%乙醇	30 mL
蒸馏水	20 mL

A.7.3.1.2 制法

10 mg 甲基红溶于 30 mL 95%乙醇中,然后加入 20 mL 蒸馏水。

A.7.3.1.3 试验方法

取适量琼脂培养物接种于缓冲葡萄糖蛋白胨水中,36 °C \pm 1 °C 培养 2 d ~ 5 d。滴加甲基红试剂一滴,立即观察结果。鲜红色为阳性,黄色为阴性。

A.7.4 V-P 试验

A.7.4.1 6% α -萘酚-乙醇溶液

成分及制法:取 α -萘酚 6.0 g,加无水乙醇溶解,定容至 100 mL。

A.7.4.2 40%氢氧化钾溶液

成分及制法:取氢氧化钾 40 g,加蒸馏水溶解,定容至 100 mL。

A.7.4.3 试验方法

取适量琼脂培养物接种于缓冲葡萄糖蛋白胨水中,36℃±1℃培养 2 d~4 d。加入 6% α-萘酚-乙醇溶液 0.5 mL 和 40%氢氧化钾溶液 0.2 mL,充分振摇试管,观察结果。阳性反应立刻或于数分钟内出现红色,如为阴性,应放在 36℃±1℃继续培养 1 h 再进行观察。

A.8 血琼脂

A.8.1 成分

蛋白胨	1.0 g
牛肉膏	0.3 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	1.5 g
蒸馏水	100 mL
脱纤维羊血	5 mL~8 mL

A.8.2 制法

除新鲜脱纤维羊血外,加热溶化上述各组分,121℃高压灭菌 15 min,冷到 50℃,以无菌操作加入新鲜脱纤维羊血,摇匀,倾注平板。

A.9 糖发酵管

A.9.1 成分

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	3.0 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.0 g
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.9.2 制法

A.9.2.1 葡萄糖发酵管按上述成分配好后,按 0.5%比例加入葡萄糖,分装于有一个倒置小管的小试管内,调节 pH 至 7.4,115℃高压灭菌 15 min,备用。

A.9.2.2 其他各种糖发酵管可按上述成分配好后,分装每瓶 100 mL,115℃高压灭菌 15 min。另将各种糖类分别配好 10%溶液,同时高压灭菌。将 5 mL 糖溶液加入于 100 mL 培养基内,以无菌操作分装于含倒置小管的小试管中。或按照 A.9.2.1 葡萄糖发酵管的配制方法制备其他糖类发酵管。

A.9.3 试验方法

取适量纯培养物接种于糖发酵管,36℃±1℃培养 24 h~48 h,观察结果,蓝色为阴性,黄色为

阳性。

A.10 过氧化氢酶试验

A.10.1 试剂

3%过氧化氢溶液:临用时配制。

A.10.2 试验方法

用细玻璃棒或一次性接种针挑取单个菌落,置于洁净玻璃平皿内,滴加3%过氧化氢溶液2滴,观察结果。

A.10.3 结果

于半分钟内发生气泡者为阳性,不发生气泡者为阴性。

A.11 缓冲蛋白胨水(BPW)

A.11.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.11.2 制法

加热搅拌至溶解,调节pH至 7.2 ± 0.2 ,121℃高压灭菌15 min。

附录 B

单核细胞增生李斯特氏菌最可能数(MPN)检索表

每 g(mL) 检样中单核细胞增生李斯特氏菌最可能数(MPN)检索表见表 B.1。

表 B.1 单核细胞增生李斯特氏菌最可能数(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(mL)、0.01 g(mL)和 0.001 g(mL)]、每个稀释度接种 3 管。

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