

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 0751—2010
代替 SN/T 0751—1999

进出口食品中嗜水气单胞菌检验方法

Determination of *Aeromonas hydrophila* in foods for import and export

2010-05-27 发布

2010-12-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 0751—1999《出口食品中嗜水气单细胞菌检验方法》。

本标准与 SN/T 0751—1999 相比, 主要技术变化如下:

——标准要素进行了调整, 增加了“规范性引用文件”、“术语和定义”和“要求”, 删除了“抽样和制样”相关内容;

——检测方法的检测试验依据 GB/T 18652—2002《致病性嗜水气单胞菌检验方法》和《伯杰氏系统细菌学手册》(1994 年第九版)作了修改;

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:王静、张琳、孙肖红、杨宁、胡征新、张顺合、张乐。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN/T 0751—1999。

进出口食品中嗜水气单胞菌检验方法

1 范围

本标准规定了进出口食品中嗜水气单胞菌的检验方法。

本标准适用于进出口水产品、水产加工品、罐头食品和小食品等食品中嗜水气单胞菌的检验方法。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件，凡是不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 18652 致病性嗜水气单胞菌检验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*

嗜水气单胞菌为细胞短杆状，两端圆形，至球菌状，直径 $1.0 \mu\text{m} \sim 4.4 \mu\text{m}$ ；单个、成队或成链；以极生鞭毛运动，一般单鞭毛；革兰氏阴性，氧化酶阳性。嗜水气单胞菌能导致鱼、蟹、牛蛙及蚌等水生动物的败血症及局部感染，人类也可因嗜水气单胞菌感染而发生腹泻、食物中毒、继发感染。

3.2

水产品 seafood

淡水或海水中的鱼类、甲壳类、软体动物类、藻类和其他的水生生物。

3.3

水产加工品 fishery product

以水产品为主要原料加工制成的食品或其他产品。

4 检样要求

4.1 微生物检验用的样品保存时，应注意保持样品处于无污染的环境中，要低温保存，冻品保持冷冻状态，鲜活品应尽量保持样品的原状态($7^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$)，从抽样至送到实验室的时间不能超过 48 h。

4.2 在制样的操作过程中，应防止样品受到污染。

5 设备和材料

5.1 电子天平：感量 0.1 g。

5.2 均质器或乳钵。

5.3 生化培养箱： $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

5.4 低倍双目生物显微镜。

- 5.5 灭菌广口瓶;500 mL。
- 5.6 灭菌三角烧瓶;250 mL,300 mL。
- 5.7 灭菌吸管;1 mL,10 mL。
- 5.8 灭菌平皿;15 mm,90 mm。
- 5.9 灭菌小试管;95 mm×5 cm。
- 5.10 接种环;直径3 mm。

6 培养基和试剂

- 6.1 碱性蛋白胨水(APW);见附录A第A.1章。
- 6.2 氨苄青霉素麦康凯琼脂;见附录A第A.2章。
- 6.3 革兰氏染色液;见附录A第A.3章。
- 6.4 氧化酶试剂;见附录A第A.4章。
- 6.5 粘丝试验试剂;见附录A第A.5章。
- 6.6 嗜盐性试验试剂;见附录A第A.6章。
- 6.7 AHM鉴别培养基;见附录A第A.7章。
- 6.8 Kovacs试剂;见附录A第A.8章。
- 6.9 GCF试管;见附录A第A.9章。
- 6.10 赖氨酸脱羧酶肉汤;见附录A第A.10章。
- 6.11 氨酸脱羧酶培养基;见附录A第A.11章。
- 6.12 明胶培养基;见附录A第A.12章。
- 6.13 糖发酵试验管;见附录A第A.13章。

7 检验步骤

7.1 检测流程

检测程序见附录B图B.1。

7.2 增菌

7.2.1 对液体食品,用无菌吸管取25 mL样品加入装有225 mL碱性蛋白胨水的500 mL广口瓶中,迅速振摇,充分混匀。

7.2.2 对于固体食品,无菌操作取25 g样品加入装有225 mL碱性蛋白胨水中,均质,28 ℃±1 ℃增菌培养,约在6 h~8 h有轻度混浊时,终止培养。

7.3 分离培养

用接种环接取一环增菌培养液划线接种于氨苄青霉素麦康凯琼脂,于28 ℃±1 ℃培养18 h~24 h。嗜水气单胞菌在氨苄青霉素麦康凯琼脂培养基上典型菌落为边缘整齐、光滑、微凸、无色或淡黄色的圆形菌落。挑取3个~5个革兰氏染色为阴性杆菌的菌落,接种营养琼脂平板进行纯化培养。

7.4 嗜水气单胞菌的初筛试验

7.4.1 氧化酶试验

用接种环挑取琼脂平板上单个菌落少许涂布于无菌滤纸片上,滴加氧化酶试剂,10 s内观察细菌

涂布处的颜色,出现红色即判定为阳性,不变色表明氧化酶实验阴性。嗜水气单胞菌应为阳性。

7.4.2 粘丝试验

在无菌载玻片上滴加一滴粘丝试验试剂。用接种环从平板上挑取一个氧化酶阳性可疑菌落在试剂中混匀。能拉出长丝者为阳性,否则为阴性。嗜水气单胞菌应为阴性。

7.4.3 嗜盐性试验

将琼脂平板上氧化酶阳性的可疑菌落接种到0%、3%、6.5%氯化钠蛋白胨水中。嗜水气单胞菌在6.5%氯化钠胨水中不生长。

7.4.4 呋唆试验

挑取琼脂平板上氧化酶阳性的可疑菌落穿刺接种AHM鉴别培养基,36℃±1℃培养24 h,在长有细菌的顶部滴加3滴~4滴Kovacs试剂。形成红色玫瑰吲哚判为阳性,不变色为阴性。嗜水气单胞菌应为阳性。

7.4.5 H_2S 试验

在GCF半固体琼脂培养基试管内穿刺接种,放置36℃±1℃培养,经过72 h孵化沿穿刺线弥漫状发出黑色介质,为阳性反应。疑似气单胞菌者(符合初筛试验特征)应做进一步试验。

7.5 嗜水气单胞菌的确认试验

可采用如下生化试验,或商品化的鉴定试剂、全自动和半自动生化鉴定系统进行鉴定。在无菌条件下用接种环挑取少量可疑菌落纯培养物,分别接种于赖氨酸和鸟氨酸(及对照管)、甘露醇、肌醇、明胶等系列生化培养基中。赖氨酸和鸟氨酸及对照管培养基,在接种后各加灭菌液体石蜡0.5 mL,放36℃±1℃培养18 h~24 h。培养基呈碱性变紫色为阳性,呈黄色为阴性。不含氨基酸的空白对照培养基为黄色。在无菌条件下用接种环挑取少量可疑菌落纯培养物接种到葡萄糖、蔗糖、阿拉伯糖、七叶苷等糖发酵试验管,28℃±1℃培养18 h~24 h。在鉴定系列生化中,糖、醇类培养基使用溴麝香草酚蓝做指示剂。当糖、醇被发酵或氧化后,生化管的顶部或全部变黄色为阳性,不变色为阴性。嗜水气单胞菌的生化反应见附录C表C.1。14种气单胞菌的鉴别要点见附录C表C.2。

8 结果与报告

8.1 结果判定

嗜水气单胞菌的检出,可根据全自动或半自动生化鉴定系统的结论判定,也可依据生化特征判定。

8.2 结果报告

8.2.1 报告阳性结果:“检出嗜水气单胞菌”。

8.2.2 报告阴性结果:“未检出嗜水气单胞菌”。

附录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 碱性蛋白胨水(APW)

氯化钠	10.0 g
多价蛋白胨	10.0 g
蒸馏水	1 000 mL

将各成分在蒸馏水中加热溶解后,调节 pH8.6。将配制好的培养基分别装入三角瓶后,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 氨苄青霉素麦康凯琼脂

蛋白胨	17.0 g
胰胨	3.0 g
猪胆盐(或牛、羊胆盐)	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	17.0 g
蒸馏水	1 000 mL
乳糖	10.0 g
0.01% 结晶紫水溶液	10 mL
0.5% 中性红水溶液	5 mL

将蛋白胨、胰胨、胆盐、氯化钠和琼脂溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,校正 pH7.2,115 °C 高压灭菌 15 min 备用。冷至 50 °C ~ 55 °C 时,加入结晶紫和中性红水溶液,并加入氨苄青霉素至终浓度为 20 μg/mL。

A.3 革兰氏染色液

A.3.1 草酸胺结晶紫染液

甲液:	
结晶紫	1.0 g
溶于 95% 乙醇 20 mL	
乙液:	
草酸胺	0.8 g
溶于蒸馏水 80 mL	

使用前将甲液和乙液混合。

A.3.2 革兰氏碘液

碘	1.0 g
---	-------

碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

将碘和碘化钾先进行混合,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.3.3 复红酒精染液

碱性复红	0.4 g
95% 酒精	100 mL

A.4 氧化酶试验试剂

1% 盐酸二甲基对苯二胺溶液: 少量新鲜配制,于冰箱内避光保存。

1% α -苯酚-乙醇溶液。

取白色洁净滤纸沾取菌落,加盐酸二甲基对苯二胺溶液一滴,阳性者呈现粉红色,并逐渐加深; 再加 α -苯酚-乙醇溶液一滴,阳性者于 30 s 内呈现鲜蓝色,阴性于 2 min 内不变色。

A.5 粘丝试验试剂

在玻片或平皿上,滴一大滴 0.5% 去氧胆酸钠水溶液,取一接种环被检菌的新鲜琼脂培养物放在试剂旁研磨混匀,制成浓厚悬液。阳性者很快(1 min 内)由混变清并变得粘稠,用接种环挑取时,可以拉出细丝来。阴性者呈均匀悬液状态,与蒸馏水对照相同。

A.6 嗜盐性试验培养基

多价蛋白胨	2.0 g
氯化钠	按不同量分别加入
蒸馏水	100 mL

配制 2% 的蛋白胨水,校正 pH7.7,共配制三瓶,每瓶 100 mL。每瓶分别加入不同量的氯化钠:(1) 不加;(2) 3 g;(3) 6.5 g。待溶解后分装试管 121 °C 灭菌 15 min。

A.7 AHM 鉴别培养基

蛋白胨	5.0 g
酵母提取物	3.0 g
胰蛋白胨	10.0 g
L-盐酸鸟氨酸	5.0 g
甘露醇	1.0 g
肌醇	1.0 g
硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.4 g
柠檬酸铁胺	0.5 g
溴甲酚紫	0.02 g
琼脂	3.0 g
蒸馏水	1 000 mL

混匀,加热溶解,pH 调至 6.7,分装,115 °C 高压灭菌 15 min。

A.8 Kovacs 试剂

对二甲基氨基苯甲醛	5.0 g
戊醇	75.0 g
浓盐酸	25 mL

将上述成分溶于浓盐酸中。

A.9 GCF

牛肉粉	3 g
胰蛋白胨	10 g
L-半胱氨酸盐酸盐	0.1 g
硫代硫酸钠	0.1 g
柠檬酸铁胺	0.4 g
琼脂	12 g~15 g
蒸馏水	1 000 mL

所有成分溶于 1 000 mL 蒸馏水中, pH 调至 7.4。分装于 3 mL 试管内, 115 °C 高压灭菌 10 min, 冷却备用。在半固体琼脂培养试管内穿刺接种, 放在 36 °C ± 1 °C 培养, 经 72 h 孵化沿穿刺线弥漫状发出黑色介质则显示阳性反应。

A.10 赖氨酸脱羧酶肉汤(Moeller)

蛋白胨	5.0 g
牛肉粉	5.0 g
葡萄糖	0.5 g
溴甲酚紫	0.01 g
甲酚红	0.005 g
吡哆醛	0.005 g
蒸馏水	1 000 mL

将各成分加入蒸馏水中, 轻轻搅拌加热至溶解。溶解 L-赖氨酸 10.0 g。分装 3 mL 于 13 mm × 100 mm 试管中, 另以不加氨基酸的基础液作试验对照。121 °C 灭菌 10 min。接种后覆盖约 1 mL 矿物油。最终 pH 为 6.0 ± 0.2。

A.11 鸟氨酸脱羧酶培养基

蛋白胨	5.0 g
牛肉粉	5.0 g
葡萄糖	0.5 g
溴甲酚紫	0.01 g
甲酚红	0.005 g
吡哆醛	0.005 g
蒸馏水	1 000 mL

将各成分加入蒸馏水中,轻轻搅拌加热至溶解。溶解 L-鸟氨酸 10.0 g。分装 3 mL 于 13 mm×100 mm 试管中,另以不加氨基酸的基础液作试验对照,121 °C 灭菌 10 min。接种后各加灭菌液体石蜡 0.5 mL,36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。最终 pH 为 6.0±0.2。培养基呈碱性变紫色为阳性,呈黄色为阴性。不含氨基酸的空白对照培养基为黄色。

A.12 明胶培养基

蛋白胨	5.0 g
牛肉粉	3.0 g
明胶	120.0 g
蒸馏水	1 000 mL

加热溶解,分装小管,121 °C 高压灭菌 10 min,取出后迅速冷却,使其凝固。复查最终 pH 应为 6.8~7.0。用琼脂培养物穿刺接种,22 °C~25 °C 培养,每天观察结果,记录液化时间;或 36 °C±1 °C 培养,放冰箱内 30 min 后再观察结果。

A.13 糖发酵试验管

牛肉粉	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	3.0 g
磷酸氢二钠	2.0 g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	12 mL
蒸馏水	1 000 mL

各种发酵管按上述成分配好后,分装每瓶 100 mL,115 °C 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 培养基中,以无菌操作分装小试管。

附录 B
(规范性附录)
进出口食品中嗜水气单胞菌检测程序

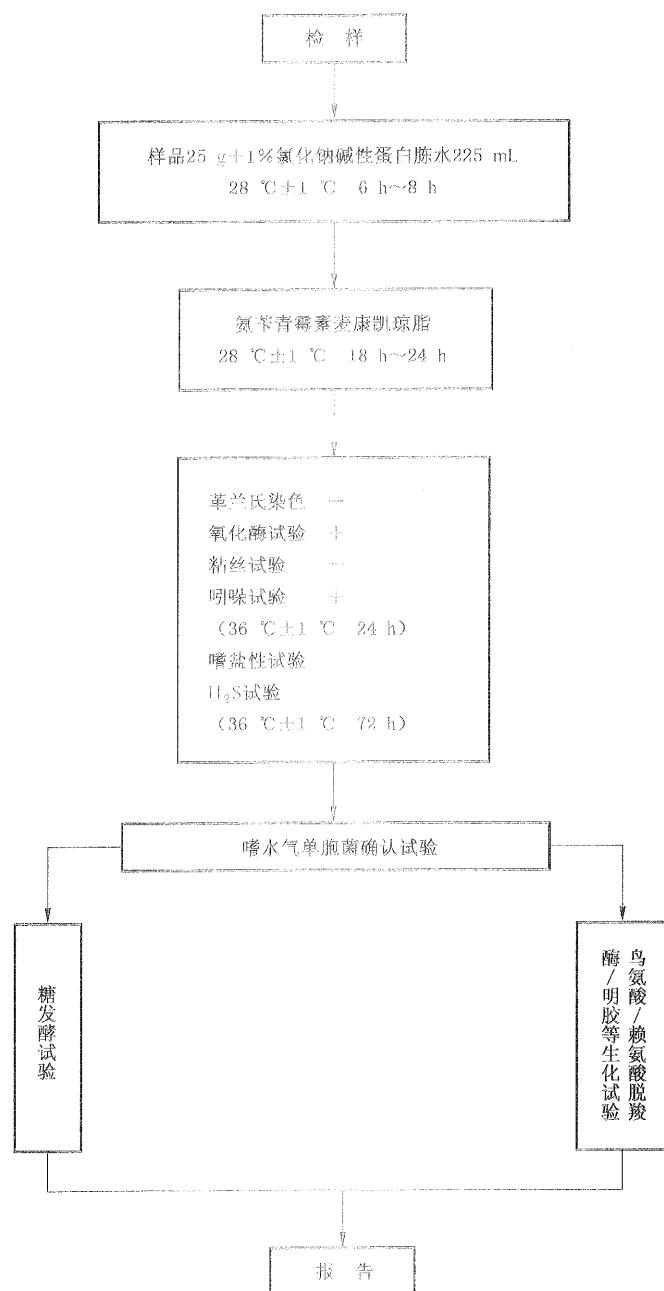


图 B.1 进出口食品中嗜水气单胞菌检测程序

附录 C
(规范性附录)
鉴别特征

C.1 弧菌科三个属主要鉴别特征

见表 C.1 和表 C.2。

表 C.1 弧菌科三个属主要鉴别特征

项 目	嗜水气单胞菌属 (<i>Aeromonas</i>)	邻单胞菌属 (<i>Plesiomonas</i>)	弧菌属 (<i>Vibrio</i>)
O/129(150 µg)敏感性	R	S	S
粘丝试验	—	—	+
在 6.5%氯化钠生长	—	—	(+)
鸟氨酸脱羧酶	(—)	+	+
肌醇发酵	—	+	(—)
甘露醇发酵	(—)	—	+
蔗糖发酵	(+)	—	(+)
明胶降解	+	—	+
在 TCBS 琼脂上生长	(—),部分黄色菌落	—	(+)

注: R: 不敏感; S: 易感;
+: 菌属中绝大多数为阳性;
-: 菌属中绝大多数为阴性;
(+): 大多数为阳性, 部分为阴性;
(-): 大多数为阴性, 部分为阳性。

C.2 气单胞菌鉴别要点

见表 C.2。

表 C.2 14 种气单胞菌鉴别要点

项 目	<i>A.veronii</i> biovar <i>sobria</i>	<i>A.veronii</i> biovar <i>veronii</i>	<i>A.trotta</i>	<i>A.sobria</i>	<i>A.schubertii</i>	<i>A.porri</i>	<i>A.media</i>	<i>A.jandaei</i>	<i>A.victoriae</i>	<i>A.eutrochomalis</i>	<i>A.spiralis</i>	<i>A.besteinum</i>	<i>A.cavicide</i>	<i>A.spiracle</i>	<i>A.allosaccharophila</i>	<i>A.hydrophila</i>
	HG1	HG15	HG2	HG4	HG16	HG6	HG9	HG5	HG17	HG12	HG7	HG14	HG10	HG8		
水解七叶苷	+	d	+	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—		

表 1 (续)

项 目	菌种(株)											
	HG1	HG5	HG2	HG4	HG6	HG7	HG8	HG9	HG10	HG12	HG14	HG17
由葡萄糖产气	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V.P. 反应	+	-	-	-	-	-	-	+	d	Weak+	-	+
产生吲哚	+	-	-	-	-	-	-	d	d	-	+	+
毗嗪酰胺	-	nd	-	-	-	-	-	d	nd	-	nd	-
产 L-树胶醛糖酸	d	d	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-
D-甘露醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
蔗糖	+	-	-	+	-	d	-	+	-	-	+	-
赖氨酸脱羧酶	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	Weak+	+
鸟氨酸脱羧酶	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
从 GCF 中产生 H ₂ S	-	nd	-	-	-	-	-	-	nd	-	nd	+
易 感 性	氨苄青霉素	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S
	羧苄青霉素	R	Nd	R	R	R	nd	R	nd	nd	R	S
	头孢菌素	R	Nd	R	R	nd	S	S	d	nd	S	S
	粘菌素	d	nd	d	S	nd	S	R	S	nd	S	S

注: +: ≥75% 或更多的菌株阳性;

-: ≤25% 或更少的菌株阴性;

d: 26%~74% 的菌株阳性;

nd: 未鉴定;

R: 不敏感;

S: 敏感。

SN/T 0751—2010

中华人民共和国出入境检验检疫
行业标准
进出口食品中嗜水气单胞菌检验方法

SN/T 0751—2010

*

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

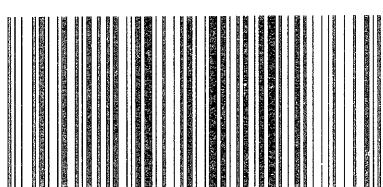
*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 20 千字
2010年11月第一版 2010年11月第一次印刷

印数 1—1 600

*

书号：155066·2-21146 定价 18.00 元



SN/T 0751-2010