



中华人民共和国国家标准

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

National food safety standard

Food microbiological examination: *Listeria monocytogenes*

2010-03-26 发布

2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准代替 GB/T 4789.30-2008 《食品卫生微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.30-2008 相比，主要变化如下：

- 修改了标准的中英文名称；
- 删除“第二法 全自动酶链荧光免疫分析仪筛选法”；
- 删除“第三法 全自动病原菌检测系统筛选法”。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准所代替标准的历年版本发布情况为：

- GB 4789.30-1994、GB/T 4789.30-2003、GB/T 4789.30-2008。

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。
本标准适用于食品中单核细胞增生李斯特氏菌的检验。

2 设备和材料

除微生物实验室常规无菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

- 2.1 冰箱: 2℃~5℃。
- 2.2 恒温培养箱: 30℃±1℃、36℃±1℃。
- 2.3 均质器。
- 2.4 显微镜: 10×~100×。
- 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)。
- 2.8 无菌平皿: 直径 90 mm。
- 2.9 无菌试管: 16 mm×160 mm。
- 2.10 离心管: 30 mm×100 mm。
- 2.11 无菌注射器: 1 mL。
- 2.12 金黄色葡萄球菌(ATCC25923)。
- 2.13 马红球菌(*Rhodococcus equi*)。
- 2.14 小白鼠: 16 g~18 g。
- 2.15 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): 见附录 A 中 A.1。
- 3.2 含 0.6%酵母浸膏的胰酪胨大豆琼脂(TSA-YE): 见附录 A 中 A.2。
- 3.3 李氏增菌肉汤 LB(LB₁, LB₂): 见附录 A 中 A.3。

- 3.4 1%盐酸吡啶黄 (acriflavine HCl) 溶液: 见附录 A 中 A.3.2.1。
- 3.5 1%萘啶酮酸钠盐 (naladixic acid) 溶液: 见附录 A 中 A.3.2.1。
- 3.6 PALCAM 琼脂: 见附录 A 中 A.4。
- 3.7 革兰氏染液: 见附录 A 中 A.5。
- 3.8 SIM 动力培养基: 见附录 A 中 A.6。
- 3.9 缓冲葡萄糖蛋白胨水[甲基红 (MR) 和 V-P 试验用]: 见附录 A 中 A.7。
- 3.10 5%~8%羊血琼脂: 见附录 A 中 A.8。
- 3.11 糖发酵管: 见附录 A 中 A.9。
- 3.12 过氧化氢酶试验: 见附录 A 中 A.10。
- 3.13 李斯特氏菌显色培养基。
- 3.14 生化鉴定试剂盒。

4. 检验程序

单核细胞增生李斯特氏菌检验程序见图 1。

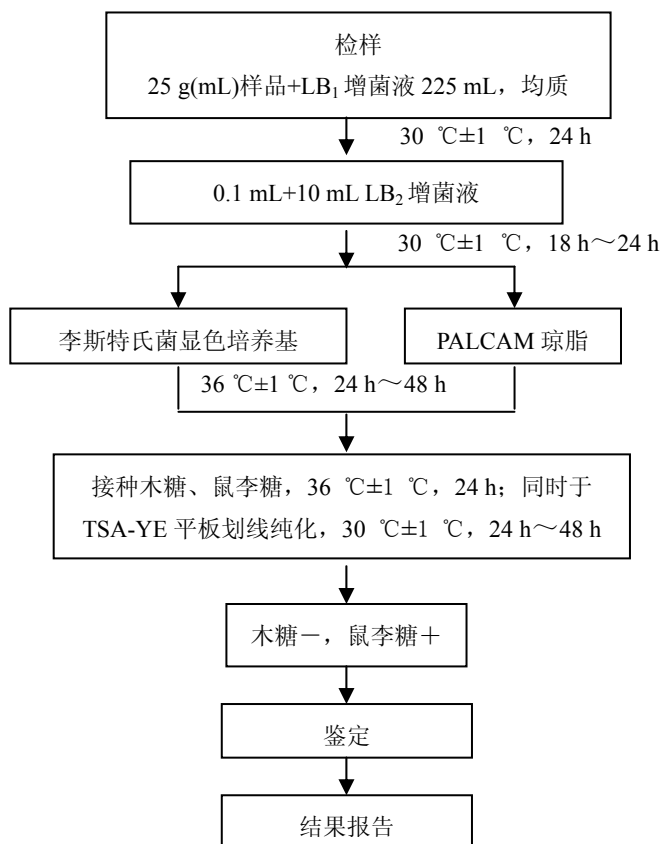


图 1 单核细胞增生李斯特氏菌检验程序

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, 8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min。于 30 °C±1 °C 培养 24 h, 移取 0.1 mL, 转种于 10 mL LB₂ 增菌液内, 于 30 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。

5.2 分离

取 LB₂ 二次增菌液划线接种于 PALCAM 琼脂平板和李斯特氏菌显色培养基上, 于 36 °C±1 °C 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; 典型菌落在李斯特氏菌显色培养基上的特征按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 5 个以上典型或可疑菌落, 分别接种在木糖、鼠李糖发酵管, 于 36 °C±1 °C 培养 24 h; 同时在 TSA-YE 平板上划线纯化, 于 30 °C±1 °C 培养 24 h~48 h。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

5.4.1 染色镜检: 李斯特氏菌为革兰氏阳性短杆菌, 大小为 $(0.4\ \mu\text{m}\sim 0.5\ \mu\text{m}) \times (0.5\ \mu\text{m}\sim 2.0\ \mu\text{m})$; 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: 李斯特氏菌有动力, 呈伞状生长或月牙状生长。

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(单增李斯特氏菌和伊氏李斯特氏菌)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, $36\ \text{C}\pm 1\ \text{C}$ 培养 24 h~48 h, 于明亮处观察, 单增李斯特氏菌和斯氏李斯特氏菌在刺种点周围产生狭小的透明溶血环, 英诺克李斯特氏菌无溶血环, 伊氏李斯特氏菌产生大的透明溶血环。

5.4.5 协同溶血试验 (cAMP): 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, 于 $30\ \text{C}\pm 1\ \text{C}$ 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的接种端溶血增强, 斯氏李斯特氏菌的溶血也增强, 而伊氏李斯特氏菌在靠近马红球菌的接种端溶血增强。

5.5 可选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统等对 5.3 中 3 个~5 个纯培养的可疑菌落进行鉴定。

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。

5.6 小鼠毒力试验 (可选择)

将符合上述特性的纯培养物接种于 TSB-YE 中, 于 $30\ \text{C}\pm 1\ \text{C}$ 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 10^{10} CFU/mL 的菌悬液, 取此菌悬液进行小鼠腹腔注射 3 只~5 只, 每只 0.5 mL, 观察小鼠死亡情况。致病株于 2 d~5 d 内死亡。试验时可用已知菌作对照。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。

6 结果与报告

综合以上生化试验和溶血试验结果, 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。

附录 A
(规范性附录)
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 |
| pH 7.2~7.4 | |

A.1.2 制法

将上述各成分加热搅拌溶解，调节 pH，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 |
| pH 7.2~7.4 | |

A.2.2 制法

将上述各成分加热搅拌溶解，调节 pH，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 |
| pH 7.2~7.4 | |

A.3.2 制法

将上述成分加热溶解, 调节 pH, 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

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 |
| pH 7.2~7.4 | |

A.4.2 制法

将上述成分加热溶解, 调节 pH, 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 将纯培养的单个可疑菌落涂片，火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染 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 |
| pH 7.2 | |

A.6.2 制法

将上述各成分加热混匀，调节 pH，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 30 °C 培养 24 h~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

| | |
|--------|----------|
| 多胨 | 7.0 g |
| 葡萄糖 | 5.0 g |
| 磷酸氢二钾 | 5.0 g |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |
| pH 7.0 | |

A.7.2 制法

溶化后调节 pH，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本培养基, 36 °C±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本培养基, 36 °C±1 °C 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 °C±1 °C 继续培养 4 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~10 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 °C 高压灭菌 15 min, 冷到 50 °C, 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(Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ 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 %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 °C 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 °C 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, 以无菌操作分装小试管。

A. 9.3 试验方法

取适量纯培养物接种于糖发酵管, 36 °C±1 °C 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, 置于洁净试管内, 滴加 3 % 过氧化氢溶液 2 mL, 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。
