中华人民共和国国家标准

GB 4789.40—××××

食品安全国家标准

食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验

（征求意见稿）

××××-××-××发布　　××××-××-××实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局　发布

前　　言

本标准代替GB 4789.40-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属（阪崎肠杆菌）检验》。

本标准与GB 4789.40-2016相比，主要变化如下：

——修改了标准名称为《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验》；

——标准适用范围增加了婴幼儿辅助食品；

——增加了PCR鉴定方法作为选做内容；

——删除了挑取黄色菌落和生化鉴定中的产黄色素和苦杏仁苷项目；

——修改了培养基和试剂pH值调节方法；

——修改了预热、选择性增菌温度以及TSA平板的培养温度和时间。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 克罗诺杆菌检验

1 范围

本标准规定了食品中克罗诺杆菌（*Cronobacter* spp.）的检验方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品、婴幼儿辅助食品、乳及乳制品及其原料中克罗诺杆菌的检验。

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：30 ℃±1 ℃，36 ℃±1 ℃，41.5 ℃±1 ℃。

2.2 冰箱：2 ℃～5 ℃。

2.3 恒温水浴箱：41.5 ℃±1 ℃。

2.4 天平：感量 0.1 g，0.01 g。

2.5 振荡器。

2.6 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。

2.7 无菌容器：容量 100 mL、200 mL、2 000 mL。

2.8 无菌培养皿：直径 90 mm。

2.9 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

2.10 微生物生化鉴定系统。

2.11 PCR 仪。

2.12 离心机：转速≥12 000 r/min。

2.13 凝胶成像系统或紫外检测仪。

2.14 琼脂糖水平电泳仪或毛细管电泳仪。

2.15 PCR 反应管。

2.16 1.5 mL 离心管。

3 培养基和试剂

3.1 缓冲蛋白胨水（buffered peptone water，BPW）：见附录 A 中 A.1。

3.2 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素（modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium， mLST-Vm）：见附录 A 中 A.2。

3.3 克罗诺杆菌显色培养基。

3.4 胰蛋白胨大豆琼脂（trypticase soy agar，TSA）：见附录 A 中 A.3。

3.5 生化鉴定试剂盒。

3.6 氧化酶试剂：见附录 A 中 A.4。

3.7 L-赖氨酸脱羧酶培养基：见附录 A 中 A.5。

3.8 L-鸟氨酸脱羧酶培养基：见附录 A 中 A.6。

3.9 L-精氨酸双水解酶培养基：见附录 A 中 A.7。

3.10 糖类发酵培养基：见附录 A 中 A.8。

3.11 西蒙氏柠檬酸盐培养基：见附录 A 中 A.9。

3.12 内转录间隔区（*its*）PCR 引物见表 1，基因扩增靶标参考序列见附录 B。

3.13 5 U/μL 耐热 DNA 聚合酶。

3.14 2.5 mmol/ dNTPs：dATP、dTTP、dCTP、dGTP。

3.15 25 mmol/L $MgCl_2$。

3.16 10×PCR 缓冲液：见附录 A 中 A.10。

3.17 克罗诺杆菌质控菌株：具有菌种保藏资质单位提供的 ATCC 29544 或等效菌株。

3.18 大肠埃希氏菌质控菌株：具有菌种保藏资质单位提供的 ATCC 25922 或等效菌株。

3.19 DNA 提取试剂：细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

3.20 商业化 PCR 反应预混液。

3.21 标准（高熔点）琼脂糖：分析纯。

3.22 核酸染色剂。

3.23 分子量标准：100 bp DNA ladder。

3.24 50×TAE 电泳缓冲液：见附录 A 中 A.11。

3.25 6×DNA 加样缓冲液：见附录 A 中 A.12。

第一法 克罗诺杆菌定性检验

4 检验程序

克罗诺杆菌检验程序见图 1。

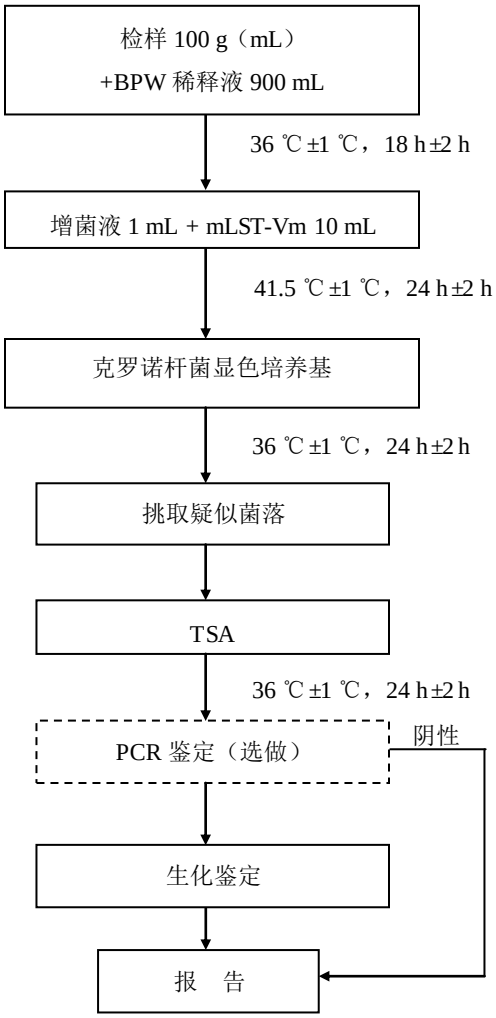

图 1 克罗诺杆菌检验程序

5 操作步骤

5.1 前增菌和选择性增菌

取检样 100 g（mL）置无菌容器中，加入 900 mL 已预热至 41 ℃的 BPW，用手缓缓地摇动至充分溶解，36 ℃±1 ℃培养 18 h±2 h。轻轻摇动混匀培养过的前增菌液，移取 1 mL 转入 10 mL mLST-Vm 肉汤，41.5 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h。

5.2 分离

5.2.1 轻轻混匀 mLST-Vm 肉汤培养物，将增菌培养物各取 1 环分别划线接种于 2 个克罗诺杆菌显色培养基平板，36 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h，或按培养基要求条件培养。

5.2.2　可疑菌落按显色培养基要求进行判定，每个平板挑取至少 5 个可疑菌落，不足 5 个时挑取全部可疑菌落，划线接种于 TSA 平板，36 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h。

5.3　PCR 鉴定（选做）

PCR 实验环境条件和过程控制参照 GB/T 27403《实验室质量控制规范　食品分子生物学检测》规定执行。

5.3.1　DNA 模板制备

可采用热裂解法制备模板，从 TSA 平板挑取 2 个~3 个克罗诺杆菌疑似菌落至 500 μL 灭菌去离子水，充分混匀后 100 ℃加热 10 min，冰浴冷却至室温，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液作为 DNA 模板用于 PCR 鉴定。若不能及时分析则于-20 ℃保存备用（1 周以内）。

注：也可用商品化的细菌基因组 DNA 提取试剂盒按操作要求提取 DNA 模板。

5.3.2　PCR 扩增

5.3.2.1　引物 PCR 鉴定用引物信息见表 1。

表 1　克罗诺杆菌内转录间隔（*its*）PCR 引物序列

目的基因	引物序列	片段长度/bp
内转录间隔区（*its*）	上游引物 F:5’-GGGTTGTCTGCGAAAGCGAA-3’	282
	下游引物 R:5’-GTCTTCGTGCTGCGAGTTTG-3’	

5.3.2.2　PCR 反应体系见表 2。

表 2　克罗诺杆菌 PCR 检测反应体系组成

试剂	反应体积/μL	终浓度
灭菌去离子水	14.75	
10×PCR 缓冲液	2.5	
25 mmol/L $MgCl_2$	2.5	2.5 mmol/L
2.5 mmol/L dNTP	2.0	0.2 mmol/L
上游引物（10 μmol/L）	1.0	0.4 μmol/L
下游引物（10 μmol/L）	1.0	0.4 μmol/L
DNA 模板	1.0	
5 U/μL 耐热 DNA 聚合酶	0.25	0.05 U/μL
总体积	25.0	

注：也可用商品化 PCR 反应预混液按要求制备反应体系。

5.3.2.3　反应条件：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，61 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，35 个循环；72 ℃延伸 5 min，4 ℃下保存。

5.3.3　对照设置

每次 PCR 反应使用克罗诺杆菌标准菌株 DNA 模板作为阳性对照，大肠埃希氏菌标准菌株 DNA 模板作为阴性对照，提取过程设置灭菌去离子水作为 DNA 提取空白对照，PCR 反应需另设灭菌去离子水作为 PCR 反应体系空白对照。

5.3.4　电泳

用 1×TAE 电泳缓冲液制备含核酸染色剂的 1.5%琼脂糖电泳凝胶（核酸染色剂按照明书要求使用）。在电泳槽中加入电泳缓冲液，使液面没过胶面。将适量 PCR 扩增产物与 6×加样缓冲液混合，点样，其中 1 孔加入 100 bp DNA ladder。根据以下公式：电泳槽正负极的距离（cm）×5 V/cm 计算并设置电压，电泳 20 min～30 min。使用凝胶成像系统或紫外检测仪观察和记录

结果。也可采用毛细管电泳仪等设备进行电泳。

5.3.5 PCR 鉴定结果判定

质控系统：阴性对照和空白对照均未出现扩增条带，阳性对照出现预期大小（282 bp，序列信息参见附录 B）的扩增条带，则检测系统正常。任一种对照出现非上述正常结果，应重做实验，同时排除干扰因素。

阳性结果：在质控系统正常的情况下，待测样品出现预期大小（282 bp）的扩增条带，判定 PCR 结果为阳性。

阴性结果：在质控系统正常的情况下，待测样品未出现预期大小（282 bp）的扩增条带，判定 PCR 结果为阴性。

5.4 确证实验

选做 5.3 时，自 PCR 结果阳性的 TSA 平板上挑取菌落进行生化鉴定，PCR 结果阴性的 TSA 平板不再进行生化鉴定。未选做 5.3 时，直接按 5.2.2 的要求将可疑菌落接种 TSA 平板后进行生化鉴定。克罗诺杆菌的主要生化特征见表 3。可选择生化鉴定试剂盒或微生物生化鉴定系统。

表 3 克罗诺杆菌的主要生化特征

生化试验		特　征
氧化酶		－
L-赖氨酸脱羧酶		－
L-鸟氨酸脱羧酶		（＋）
L-精氨酸双水解酶		＋
柠檬酸水解		（＋）
发酵	D-山梨醇	（－）
	L-鼠李糖	＋
	D-蔗糖	＋
	D-蜜二糖	＋
注：＋＞99%阳性；－＞99%阴性；（＋）90%－99%阳性；（－）90%-99%阴性。		

6 结果与报告

根据菌落特征、确证实验（生化鉴定）或 PCR 鉴定结果，报告 100 g（mL）样品中检出或未检出克罗诺杆菌。

第二法 克罗诺杆菌定量检验

7 操作步骤

7.1 样品的稀释

取检样 100 g（mL）、10 g（mL）、1 g（mL）各 3 份置无菌容器中，分别加入 900 mL、90 mL、9 mL 已预热至 41 ℃的 BPW，用手缓缓地摇动至充分溶解，制成 1:10 样品匀液，36 ℃±1 ℃培养 18 h±2 h。轻轻摇动混匀培养过的前增菌液，分别移取 1 mL 转入 10 mL mLST-Vm 肉汤，41.5 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h。

7.2 分离、鉴定

同 5.2、5.3 和 5.4。

8 结果与报告

综合菌落特征、确证实验（生化鉴定）或 PCR 鉴定结果，根据证实为克罗诺杆菌的阳性管数，查 MPN 检索表，报告 100 g（mL）样品中克罗诺杆菌的 MPN 值（见附录 C 表 C.1）。

附录A

培养基和试剂

A.1 缓冲蛋白胨水（Buffered Peptone Water，BPW）

A.1.1 成分

蛋白胨	10 .0g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$）	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

加热搅拌至溶解，调节 pH 值，121 ℃高压灭菌 15 min。培养基 25 ℃时 pH 值应为 7.2±0.2。

A.2 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素（Modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium，mLST-Vm）

A.2.1 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨（mLST）肉汤

A.2.1.1 成分

氯化钠	34.0 g
胰蛋白胨	20.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸二氢钾	2.75 g
磷酸氢二钾	2.75 g
十二烷基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.1.2 制法

加热搅拌至溶解，调节 pH 值。分装每管 10 mL，121 ℃高压灭菌 15 min。培养基 25 ℃时 pH 值应为 6.8±0.2。

A.2.2 万古霉素溶液

A.2.2.1 成分

万古霉素	10.0 mg
蒸馏水	10.0 mL

A.2.2.2 制法

10.0 mg 万古霉素溶解于 10.0 mL 蒸馏水，过滤除菌。万古霉素溶液可以在 0 ℃~5 ℃保存 15 d。

A.2.3 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素（Modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium，mLST-Vm）

每 10 mL mLST 加入万古霉素溶液 0.1 mL，混合液中万古霉素的终浓度为 10 μg/ mL。

注：mLST-Vm 必须在 24 h 之内使用。

A.3 胰蛋白胨大豆琼脂（Trypticase Soy Agar，TSA）

A.3.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
植物蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

加热搅拌至溶解，煮沸 1 min，必要时调节 pH 值，121 ℃高压 15 min，培养基 25 ℃时 pH 值应为 7.3±0.2。

A.4 氧化酶试剂

A.4.1 成分

N,*N*,*N*′,*N*′-四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
蒸馏水	100 mL

A.4.2 制法

少量新鲜配制，于冰箱内避光保存，在 7 d 之内使用。

A.4.3 试验方法

用玻璃棒或一次性接种针挑取单个特征性菌落，涂布在氧化酶试剂湿润的滤纸平板上。如果滤纸在 10 s 中之内未变为紫红色、紫色或深蓝色，则为氧化酶试验阴性，否则即为氧化酶实验阳性。

注：实验中切勿使用镍/铬材料。

A.5 L-赖氨酸脱羧酶培养基

A.5.1 成分

L-赖氨酸盐酸盐（L-lysine monohydrochloride）	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH 值。每管分装 5 mL，121 ℃高压 15 min。培养基 25 ℃时 pH 值应为 6.8±0.2。

A.5.3 试验方法

挑取培养物接种于 L-赖氨酸脱羧酶培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h，观察结果。L-赖氨酸脱羧酶试验阳性者，培养基呈紫色，阴性者为黄色，空白对照管为紫色。

A.6 L-鸟氨酸脱羧酶培养基

A.6.1 成分

L-鸟氨酸盐酸盐（L-ornithine monohydrochloride）	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH 值。每管分装 5 mL。121 ℃高压 15 min。培养基 25 ℃时 pH 值应为 6.8±0.2。

A.6.3 试验方法

挑取培养物接种于 L-鸟氨酸脱羧酶培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h，观察结果。L-鸟氨酸脱羧酶试验阳性者，培养基呈紫色，阴性者为黄色。

A.7 L-精氨酸双水解酶培养基

A.7.1 成分

L-精氨酸盐酸盐（L-arginine monohydrochloride）	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH 值。每管分装 5 mL。121 ℃高压 15 min。培养基 25 ℃时 pH 值应为 6.8±0.2。

A.7.3 试验方法

挑取培养物接种于 L-精氨酸脱羧酶培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h，观察结果。L-精氨酸脱羧酶试验阳性者，培养基呈紫色，阴性者为黄色。

A.8 糖类发酵培养基

A.8.1 基础培养基

A.8.1.1 成分

酪蛋白（酶消化）	10.0 g
氯化钠	5.0 g
酚红	0.02 g
蒸馏水	1 000 mL

A.8.1.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH 值。每管分装 5 mL。121 ℃高压 15 min。培养基 25 ℃时 pH 值应为 6.8±0.2。

A.8.2 糖类溶液（D-山梨醇、L-鼠李糖、D-蔗糖、D-蜜二糖、苦杏仁甙）

A.8.2.1 成分

糖	8.0 g
蒸馏水	100 mL

A.8.2.2 制法

分别称取 D-山梨醇、L-鼠李糖、D-蔗糖、D-蜜二糖、苦杏仁甙等糖类成分各 8 g，溶于 100 mL 蒸馏水中，过滤除菌，制成 80 mg/mL 的糖类溶液。

A.8.3 完全培养基

A.8.3.1 成分

基础培养基	875 mL
糖类溶液	125 mL

A.8.3.2 制法

无菌操作，将每种糖类溶液加入基础培养基，混匀；分装到无菌试管中，每管 10 mL。

A.8.4 试验方法

挑取培养物接种于各种糖类发酵培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h，观察结果。糖类发酵试验阳性者，培养基呈黄色，阴性者为红色。

A.9 西蒙氏柠檬酸盐培养基

A.9.1 成分

柠檬酸钠	2.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
磷酸二氢铵	1.0 g
硫酸镁	0.2 g
溴麝香草酚蓝	0.08 g
琼脂	8.0 g～18.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.9.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH 值。每管分装 10 mL，121 ℃高压 15 min，制成斜面。培养基 25 ℃时 pH 值应为 6.8±0.2。

A.9.3 试验方法

挑取培养物接种于整个培养基斜面，36 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h，观察结果。阳性者培养基变为蓝色。

A.10 10×PCR 缓冲液

A.10.1 成分

1 mol/L Tris-HCl（pH 8.5）	840 mL
氯化钾（KCl）	37.25 g
灭菌去离子水	160 mL

A.10.2 制法

将氯化钾溶于 1 mol/L Tris-HCl（pH 8.5），定容至 1 000 mL，121 ℃高压灭菌 15 min，分装后-20 ℃保存。

A.11 50×TAE 电泳缓冲液

A.11.1 成分

Tris	242.0 g
EDTA-2Na（$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$）	37.2 g
冰乙酸（CH_3COOH）	57.1 mL
灭菌去离子水	942.9 mL

A.11.2 制法

Tris 和 EDTA-2Na 溶于 800 mL 灭菌去离子水，充分搅拌均匀；加入冰乙酸，充分溶解；用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 8.3，定容至 1 000 mL 后，室温保存。使用时稀释 50 倍即为 1×TAE 电泳缓冲液。

A.12 6×DNA加样缓冲液

A.12.1 成分

溴酚蓝	0.5 g
二甲苯氰 FF	0.5 g
0.5 mol/L EDTA（pH8.0）	0.06 mL
甘油	360 mL
灭菌去离子水	640 mL

A.12.2 制法

0.5 mol/L EDTA（pH8.0）溶于 500 mL 灭菌去离子水中，加入溴酚蓝和二甲苯氰 FF 溶解，与甘油混合，定容至 1 000 mL，分装后 4 ℃保存。

附录B

克罗诺杆菌基因扩增靶标参考序列

克罗诺杆菌基因扩增靶标参考序列如下：

5’-**gggttgtct gcgaaagcga a**gtccctttc gtctagaggc ccaggacacc gccctttcac ggcggtaaca ggggttcgaa tcccctaagg gacgccacct gctggtaatg agtgaaaggc gttaccgatt gatatctcaa aactgactgt aaagtcacgt ttgagatatt tgctctttaa caatccggaa caagctgaaa attgaaacag acatgctgct gcatttctcc gtaataagaa atgcgcggtg tgtcagagtc tct**caaactc gcagcacgaa gac**-3’

注：加粗部分为引物合成参考序列。

附录C

克罗诺杆菌最大可能数（MPN）检索表

C.1 克罗诺杆菌最可能数（MPN）检索表

每 100 g（mL）检样中克罗诺杆菌最可能数（MPN）的检索见表 C.1。

表 C.1 克罗诺杆菌最可能数（MPN）检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
100	10	1		下限	上限	100	10	1		下限	上限
0	0	0	＜0.3	--	0.95	2	2	0	2.1	0.45	4.2
0	0	1	0.3	0.015	0.96	2	2	1	2.8	0.87	9.4
0	1	0	0.3	0.015	1.1	2	2	2	3.5	0.87	9.4
0	1	1	0.61	0.12	1.8	2	3	0	2.9	0.87	9.4
0	2	0	0.62	0.12	1.8	2	3	1	3.6	0.87	9.4
0	3	0	0.94	0.36	3.8	3	0	0	2.3	0.46	9.4
1	0	0	0.36	0.017	1.8	3	0	1	3.8	0.87	11
1	0	1	0.72	0.13	1.8	3	0	2	6.4	1.7	18
1	0	2	1.1	0.36	3.8	3	1	0	4.3	0.9	18
1	1	0	0.74	0.13	2	3	1	1	7.5	1.7	20
1	1	1	1.1	0.36	3.8	3	1	2	12	3.7	42
1	2	0	1.1	0.36	4.2	3	1	3	16	4	42
1	2	1	1.5	0.45	4.2	3	2	0	9.3	1.8	42
1	3	0	1.6	0.45	4.2	3	2	1	15	3.7	42
2	0	0	0.92	0.14	3.8	3	2	2	21	4	43
2	0	1	1.4	0.36	4.2	3	2	3	29	9	100
2	0	2	2	0.45	4.2	3	3	0	24	4.2	100
2	1	0	1.5	0.37	4.2	3	3	1	46	9	200
2	1	1	2	0.45	4.2	3	3	2	110	18	410
2	1	2	2.7	0.87	9.4	3	3	3	＞110	42	--

注 1：本表采用 3 个检样量[100 g(mL)、10 g(mL)和 1 g(mL)]，每个检样量接种 3 管。

注 2：表内所列检样量如改用 1 000 g(mL)、100 g(mL)、和 10 g(mL)时，表内数字应相应降低 10 倍；如改用 10 g(mL)、1 g(mL)、和 0.1 g(mL) 时，则表内数字应相应增高 10 倍，其余类推。