

国际标准

ISO
11290-2

第二次编辑
2017-05

食品微生物学—
单核细胞李斯特菌和李斯特菌属水平检测和计数方
法—
第 2 部分：
计数方法



参考编号
ISO 11290-2:2017(E)

食品微生物学— 单核细胞李斯特菌和李斯特菌属水平检测和计数方法—

第 2 部分： 计数方法

注意：为了保护实验室人员的健康，检测单增李斯特氏菌和李斯特菌属时，要在有经验的微生物学家的控制下，只能在有适当设备的实验室中进行，并且所有的培养材料都应小心处理。使用本标准的人应熟悉常规实验室流程。本文档并不是旨在解决使用中有关的所有安全问题，如果有的话。使用者有责任建立安全和健康措施。特别是，强烈建议检测单增李斯特氏菌在有生物安全 2 级的实验室中进行。强烈建议让女性实验室工作人员意识到，暴露于单增李斯特氏菌和李斯特氏菌属的母亲受感染后对胎儿发育的特殊风险，孕妇和患有公认的基础性疾病或免疫细胞损伤疾病的人不可操作单增李斯特氏菌和李斯特氏菌属的培养物。

1. 范围

本文档规定了一个水平方法用于

- 单增李斯特氏菌的计数，和
- 李斯特氏菌属（包括单增李斯特氏菌）的计数。

本文档适用于

- 供人类消费和动物饲养的产品，和
- 食品生产和食品处理领域的环境样品。

使用本方法可能无法检测或确认某些额外描述的李斯特氏菌物种。^{[3][6][9][11]}

2. 引用文件

以下文件的部分或全部内容被引用到正文中，构成了本文件的要求。对于标注日期的参考文献，仅适用于引用的版本。对未标注日期的参考文献，适用于引用文件的最新版本（包括任何修订）。

ISO 6887（全部），食品链微生物学——微生物检验用的检样，初始悬浮液和十倍系列稀释液的制备。

ISO 7218，食品和动物饲料微生物学——微生物检验的一般要求和指南。

ISO 11133，食品动物饲料和水微生物学——培养基的制备，生产，储存和性能测试。

ISO 11290-1，食品微生物学—单核细胞李斯特菌和李斯特菌属水平检测和计数方法—第 1 部分：检测方法

3. 术语和定义

下列术语和定义只适用于本文档。

ISO 和 IEC 维护的标准化术语数据库见下列地址：

——IEC 电子百科：<http://www.electropedia.org/>

——ISO 在线浏览平台：<http://www.iso.org/obp>

3.1. 单增李斯特氏菌

在固体选择性培养基上形成典型菌落并表现出本文所述的形态，生理和生化特征的微生物。

3.2. 单增李斯特氏菌的计数

依据本文档进行分析，确定每克，每毫升，每平方厘米或每采样设备的单增李斯特氏菌的菌落形成单位（cfu）。

3.3. 李斯特氏菌属

在固体选择性培养基上形成典型菌落并表现出本文所述的形态，生理和生化特征的微生物。

3.4. 李斯特氏菌属的计数

依据本文档进行分析，确定每克，每毫升，每平方厘米或每采样设备的李斯特氏菌属的菌落形成单位（cfu）。

4. 原理

4.1. 常规

在本文档范围内，对单增李斯特氏菌和李斯特氏菌属的计数需要 5 个连续的步骤，如附录 A 中流程图所述。

4.2. 初始悬浮液

根据样品类型用适当的稀释液制备初始悬浮液。

4.3. 表面接种

在依据 Ottaviani 和 Agosti 的李斯特琼脂^{[13][14]}进行表面接种，液体样品用规定量的检样，其它产品用初始悬浮液，如有需要和/或使用十倍系列稀释液。

4.4. 培养

平皿在 37℃ 培养，24h 后检查，再过 24h 再检查。

4.5. 鉴定

通过形态学和/或生化试验，鉴定推定单增李斯特氏菌和/或推定李斯特氏菌属的菌落。

4.6. 计数

根据已确定的菌落数量，计算每 g，每 ml，每平方厘米或每采样设备的单增李斯特氏菌和/

或李斯特氏菌属的数量。

5. 培养基和试剂

对于现有的实验室，参考 ISO 11133。

培养基和试剂的组分及制备方法见附件 B。

6. 设备和耗材

常规微生物设备（如 ISO 7218 中规定）和，特殊的，如下。

6.1. 干热灭菌设备（烘箱）或湿热灭菌设备（高压釜）。

如 ISO 7218 中规定。

6.2. 干燥柜或培养箱，可维持在 25°C 和 50°C。

6.3. 培养箱，可运行在 30°C ± 1°C，37°C ± 1°C 和 25°C ± 1°C（可选）。

6.4. 水浴，可运行在 47°C 和 50°C。

6.5. 接种环直径约 3mm 或 10 μL，和接种针或金属丝。

6.6. 玻璃或塑料涂布棒，无菌。

6.7. pH 计，在 25°C 可读取最小值 0.01pH，测量可精确至 ± 0.1pH 单位。

6.8. 总量刻度吸管或自动吸管，标称容量为 1ml 和 10ml。

6.9. 培养皿，例如直径 90mm 的。

6.10. 显微镜，最好有相差功能，有载玻片和盖玻片。

6.11. 冰箱，可在 5°C ± 3°C 工作

7. 采样

采样不是本文档规定方法的一部分。如果没有相关产品抽样的具体国际标准，建议相关各方就此问题达成协议。对于食品和饲料样品，参考 ISO/TS 17728^[3]。对于环境样品，使用 ISO 18593^[2]和看参考文献^[24]。

重要的是实验室接到的样品应具有真正的代表性，且在运输或储存中不能被损坏或改变（见 ISO 7218）。

8. 试样的制备

根据相关产品具体的国际标准制备试样[见 ISO 6887（全部）和 ISO 18593^[2]]。如果没有具体的国际标准，建议相关各方就此问题达成协议。

9. 过程

9.1. 试验部分，初始悬浮液和稀释液

缓冲蛋白胨水，以及 ISO 6887（全部）和任何适用于相关产品的特定的国际标准中提到的适

用的稀释液，可以用作初始悬浮液的稀释液。

半量-Fraser 肉汤（如 ISO 11290-1 中规定），无论是否加入选择性试剂，在相同试样的检测方法（如 ISO 11290-1 中规定）和计数方法，都可作为初始悬浮液的稀释液。应在计数之后检测方法之前，优先将选择性试剂加入到悬浮液中。

如果使用了加了添加剂的半量-Fraser，应尽快接种，不超过 45min。

9.2. 接种和培养

9.2.1. 用无菌吸管（6.8），分配 0.1ml 的初始悬浮液（或液体样品）和 0.1ml 的进一步十倍系列稀释液分别接种到依据 Ottaviani 和 Agosti 的李斯特琼脂（见 B.2）的小平板（90mm）的表面。

对某种产品，当需要估计单增李斯特氏菌和/或李斯特氏菌属的低数量时，检测初始产品为液体的 1ml 检样或其它产品的 1ml 初始悬浮液时，检出限可以升高 10 倍。分配 1ml 的接种物到一块大平板（140mm）表面或 3 块小平板（90mm）的表面，如有需要在培养箱（6.2）中预先干燥。如果只使用初始悬浮液，也要另准备一套平板用于培养基的额外的三块小平板和一块大平板（见 ISO 7218）。

使用 0.1ml 的初始悬浮液（或液体样品）和 0.1ml 的进一步十倍系列稀释液，重复这一步骤，如有需要分别接种到琼脂培养基的小平板（90mm）上。

9.2.2. 用涂布棒（6.6）小心地尽快将接种物涂布在琼脂平板表面，不要触及平板边缘。每个稀释度用一支新的无菌涂布棒。平板盖上盖子正置在环境温度下放置 15min，让接种物被琼脂吸收。

对一个样品的所有平板可以使用同一个涂布棒，从高稀释度开始。

9.2.3. 将 9.2.2 中制备的依据 Ottaviani 和 Agosti 的李斯特琼脂平板在 37°C（6.3）培养 24h±2h，并且额外培养 37°C 24±2h。

9.3. 典型菌落的计数

9.3.1. 24±2h 培养后（在菌落过度生长形成大的重叠的不透明晕圈，使得读取困难之前），和额外 24h±2h 培养后（为了使菌落更好的生长，形成不透明晕圈），检查平板（9.2.3）上存在的单增李斯特氏菌（见 9.3.2）和/或李斯特氏菌属（见 9.3.3）的推定菌落。

9.3.2. 蓝绿色菌落周围有不透明晕圈（典型菌落）的认为是单增李斯特氏菌。伊氏李斯特氏菌的菌落也是蓝绿色周围也有不透明晕圈。

注 1 一些单增李斯特氏菌株在应激条件下，特别是酸应激下，显示出一个很微小的晕圈（甚至没有晕圈）。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/537133003165006105>