



中华人民共和国国家标准

GB/T 13091—2018
代替 GB/T 13091—2002

饲料中沙门氏菌的测定

Determination of *Salmonella* in feeds

2018-09-17 发布

2019-04-01 实施



国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 13091—2002《饲料中沙门氏菌的检测方法》。

本标准与 GB/T 13091—2002 相比,除编辑性修改外,主要变化如下:

- 删除了术语和定义(见 2002 年版的第 3 章);
- 删除了原理(见 2002 年版的第 4 章);
- 增加了试验程序图(见附录 A 图 A.1);
- 修改了增菌器具,并增加了均质袋及均质器选项(见 6.1,2002 年版的 9.1.2);
- 将分离培养基由“酚红煌绿琼脂和 DHL 琼脂”改为“BS 琼脂,DHL 琼脂或沙门氏菌显色培养基”(见 6.3,2002 年版的 9.4);
- 修改了鉴定流程和鉴定表(见 6.4,2002 年版的 9.5);
- 增加了“利用三糖铁试验和赖氨酸脱羧酶试验进行初步判断”步骤(见 6.4.1);
- 增加了“生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统”进行沙门氏菌鉴定选项(见 6.4.3)。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本标准起草单位:中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量监督检验中心(北京)]。

本标准主要起草人:饶正华、刘晓露、樊霞。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 13091—1991、GB/T 13091—2002。

饲料中沙门氏菌的测定

1 范围

本标准规定了饲料中沙门氏菌的检验方法。

本标准适用于饲料和饲料添加剂中沙门氏菌的检验。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 培养基或材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂。

- 3.1 水:应符合 GB/T 6682 中三级水的要求。
- 3.2 缓冲蛋白胨水(BPW):见附录 B 中 B.1。
- 3.3 氯化镁孔雀绿(RV)增菌液:见附录 B 中 B.2。
- 3.4 亚硒酸盐胱氨酸(SC)增菌液:见附录 B 中 B.3。
- 3.5 亚硫酸铋(BS)琼脂:见附录 B 中 B.4。
- 3.6 胆硫乳(DHL)琼脂:见附录 B 中 B.5。
- 3.7 沙门氏菌属显色培养基。
- 3.8 营养琼脂(NA):见附录 B 中 B.6。
- 3.9 三糖铁琼脂(TSI):见附录 B 中 B.7。
- 3.10 蛋白胨水、靛基质试剂:见附录 B 中 B.8。
- 3.11 尿素琼脂(pH 7.2):见附录 B 中 B.9。
- 3.12 氰化钾(KCN)培养基:见附录 B 中 B.10。
- 3.13 赖氨酸脱羧酶试验培养基:见附录 B 中 B.11。
- 3.14 糖发酵管:见附录 B 中 B.12。
- 3.15 邻硝基酚 β -D 半乳糖苷(ONPG)培养基:见附录 B 中 B.13。
- 3.16 半固体琼脂:见附录 B 中 B.14。
- 3.17 丙二酸钠培养基:见附录 B 中 B.15。
- 3.18 沙门氏菌因子 O 和 H 多价诊断血清,Vi 因子诊断血清。

4 仪器设备

- 4.1 冰箱:2℃~5℃。
- 4.2 恒温培养箱:36℃ \pm 1℃,42℃ \pm 1℃。
- 4.3 均质器。
- 4.4 振荡器。

- 4.5 电子天平:感量 0.1 g。
- 4.6 无菌锥形瓶:容量 500 mL、250 mL,或无菌均质袋。
- 4.7 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。
- 4.8 无菌培养皿:直径 60 mm,90 mm。
- 4.9 无菌试管:3 mm×50 mm、10 mm×75 mm。
- 4.10 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。
- 4.11 全自动微生物生化鉴定系统。

5 样品

5.1 采样原则

样品的采集应遵循随机性、代表性的原则。采样过程应遵循无菌操作程序,防止一切可能的外来污染。

5.2 采样方法

5.2.1 应在同一批次产品中采集样品,每件样品的采样量应满足微生物指标检验的要求,一般不少于 500 g(mL)。

5.2.2 独立包装不大于 500 g 的固态产品或不大于 500 mL 的液态产品,取完整包装。

5.2.3 独立包装大于 500 mL 的液态产品,应在采样前摇动或用无菌棒搅拌液体,使其达到均匀后采集适量样品,放入无菌采样容器内作为一件样品。

5.2.4 独立包装大于 500 g 的固态产品,应用无菌采样器从同一包装的不同部位分别采取适量样品,放入同一个无菌采样容器内作为一件样品。

5.3 采集样品的贮存和运输

5.3.1 应尽快将样品送往实验室检验。

5.3.2 应在运输过程中保持样品完整。

5.3.3 应在接近原有贮存温度条件下贮存样品,或采取必要措施防止样品中微生物数量的变化。

6 试验方法(试验程序图见附录 A)

6.1 前增菌

无菌条件下称取 25 g(mL)样品,加入装有 225 mL 灭菌 BPW 的 500 mL 无菌锥形瓶内,置于振荡器中,以 8 000 r/min~10 000 r/min 振荡 2 min~3 min;若样品为液态,振荡混匀即可。36 °C±1 °C 培养 18 h±2 h。

注:可用无菌均质袋代替锥形瓶,然后用均质器拍打 2 min~3 min,但有坚硬或棱角的样品不能够使用均质袋,只能使用锥形瓶,以防均质和增菌过程中均质袋破裂泄漏,造成污染。

6.2 选择性增菌

前增菌培养物摇匀后,取 1 mL 接种于装有 10 mL RV 的试管中,于 42 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。另取前增菌培养物 1 mL,接种于装有 10 mL SC 的试管中,36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。

6.3 分离培养

用接种环取 1 环选择性增菌液,划线接种于 BS 琼脂平板上,于 36 °C±1 °C 培养 40 h~48 h。另取

1 环选择性增菌液,划线接种于 DHL 琼脂平板或沙门氏菌显色培养基平板上,36 ℃±1 ℃培养 18 h~24 h,观察各个平板上生长的菌落,沙门氏菌在各个平板上的菌落特征见表 1。

表 1 沙门氏菌属在不同选择性琼脂平板上的菌落特征

选择性琼脂平板	沙门氏菌菌落特征
亚硫酸铋(BS)琼脂	菌落为黑色有金属光泽、棕褐色或灰色,菌落周围培养基可呈黑色或棕色;有些菌株形成灰绿色的菌落,周围培养基不变
胆硫乳(DHL)琼脂	菌落为无色半透明或粉红色,菌落中心黑色或几乎全黑色
沙门氏菌属显色培养	按照显色培养基的说明进行判定

6.4 生化试验

6.4.1 从选择性琼脂平板上分别挑取 2 个以上典型或可疑菌落,接种三糖铁琼脂,先在斜面划线,再于底层穿刺;接种针不要灭菌,直接接种赖氨酸脱羧酶试验培养基和营养琼脂平板,于 36 ℃±1 ℃培养 18 h~24 h,必要时可延长至 48 h。三糖铁琼脂培养基特征变化见表 2。在三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基内,沙门氏菌属的反应结果见表 3。

表 2 三糖铁培养基特征变化表

培养基部位	培养基变化	说明
斜面和底部	黄色	乳糖和蔗糖阳性
	红色或不变色	乳糖和蔗糖阴性
底部	底端黄色	葡萄糖阳性
	红色或不变色	葡萄糖阴性
	穿刺黑色	形成硫化氢
	气泡或裂缝	葡萄糖产气

表 3 沙门氏菌属在三糖铁和赖氨酸脱羧酶试验培养基内的反应结果

三糖铁琼脂				赖氨酸脱羧酶试验培养基	初步判断
斜面	底层	产气	硫化氢		
K	A	+(-)	+(-)	+	可疑沙门氏菌
K	A	+(-)	+(-)	-	可疑沙门氏菌
A	A	+(-)	+(-)	+	可疑沙门氏菌
A	A	+/-	+/-	-	非沙门氏菌
K	K	+/-	+/-	+/-	非沙门氏菌

注: K,产碱;A,产酸;+,阳性;- ,阴性;+(-),多数阳性,少数阴性;+/-,阳性或阴性。

6.4.2 接种三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基的同时,可直接接种蛋白胨水(供做靛基质试验)、尿素琼脂(pH 7.2)、氰化钾(KCN)培养基,也可在初步判断结果后从营养琼脂平板上挑取可疑菌落接种。于 36 ℃±1 ℃培养 18 h~24 h,必要时可延长至 48 h。将已挑菌落的平板储存于 2 ℃~5 ℃或室

温至少保留 24 h,以备必要时复查。

表 4 沙门氏菌属生化反应初步鉴别表

反应序号	硫化氢(H ₂ S)	靛基质	pH 7.2 尿素	氰化钾(KCN)	赖氨酸脱羧酶
A1	+	-	-	-	+
A2	+	+	-	-	+
A3	-	-	-	-	+/-

注: + 阳性; - 阴性; +/- 阳性或阴性。

根据表 4 对结果进行判定,具体如下:

- a) 反应序号 A1:典型反应判定为沙门氏菌属。如尿素、KCN 和赖氨酸脱羧酶 3 项中有 1 项异常,按表 5 可判定为沙门氏菌。如有 2 项异常为非沙门氏菌。

表 5 沙门氏菌属生化反应初步鉴别表

pH 7.2 尿素	氰化钾	赖氨酸脱羧酶	判定结果
-	-	-	甲型副伤寒沙门氏菌(要求血清学鉴定结果)
-	+	+	沙门氏菌 IV 或 V(要求符合本群生化特性)
+	-	+	沙门氏菌个别变体(要求血清学鉴定结果)

注: + 阳性; - 阴性; +/- 阳性或阴性。

- b) 反应序号 A2:补做甘露醇和山梨醇试验,沙门氏菌靛基质阳性变体的两项试验结果均为阳性,但需要结合血清学鉴定结果进行判定。
- c) 反应序号 A3:补做 ONPG 试验。ONPG 阴性为沙门氏菌,同时赖氨酸脱羧酶阳性,甲型副伤寒沙门氏菌为赖氨酸脱羧酶阴性。
- d) 必要时按表 6 进行沙门氏菌生化群的鉴别。

表 6 沙门氏菌属各生化群的鉴别

项目	I	II	III	IV	V	VI
卫矛醇	+	+	-	-	+	-
山梨醇	+	+	+	+	+	-
水杨苷	-	-	-	+	-	-
ONPG	-	-	+	-	+	-
丙二酸盐	-	+	+	-	-	-
KCN	-	-	-	+	+	-

注: + 表示阳性; - 表示阴性。

6.4.3 如选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统,可根据 6.4.1 的初步判断结果,从营养琼脂平板上挑取可疑菌落,用生理盐水制备成浊度适当的菌悬液,使用生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定。

6.5 血清学鉴定

6.5.1 检查培养物有无自凝性

采用 1.2%~1.5% 琼脂培养物作为玻片凝集试验用的抗原。首先排除自凝集反应,在洁净的玻片上滴加一滴生理盐水,将待试培养物混合于生理盐水中,使成为均一性的混浊悬液,将玻片轻轻摇动 30 s~60 s,在黑色背景下观察反应(必要时用放大镜观察),若出现可见的菌体凝集,即认为有自凝性,反之无自凝性。对无自凝的培养物参照下面方法进行血清学鉴定。

6.5.2 O 抗原的鉴定

在玻片上划出 2 个约 1 cm×2 cm 的区域,挑取 1 环待测菌,各放 1/2 环于玻片上的每一区域上部,在其中一个区域下部加 1 滴多价菌体 O 血清,在另一区域下部加入 1 滴生理盐水,作为对照。再用无菌的接种环或针分别将两个区域内的菌落研成乳状液。将玻片倾斜摇动混合 1 min,并对着暗背景进行观察,任何程度的凝集现象皆为阳性反应。O 血清不凝集时,将菌株接种在琼脂量较高的(2%~3%)细菌培养基上再检查;如果因 Vi 抗原的存在而阻止了 O 凝集反应,可挑取菌苔于 1 mL 生理盐水中做成浓菌液,于酒精灯火焰上煮沸后再检查。

6.5.3 H 抗原的鉴定

操作同 6.5.2。H 抗原发育不良时,将菌株接种在 0.55%~0.65% 半固体琼脂平板的中央,待菌落蔓延生长时,在其边缘部分取菌检查;或将菌株通过接种装有 0.3%~0.4% 半固体琼脂的小玻管 1 次~2 次,自远端取菌培养后再检查。

6.5.4 Vi 抗原的鉴定

操作同 6.5.2。用 Vi 因子血清检查。

7 结果表示

综合以上生化试验和血清学试验的结果,得出 25 g(mL)样品中检出或未检出沙门氏菌。

附录 A
(规范性附录)
试验程序图

沙门氏菌试验程序见图 A.1。

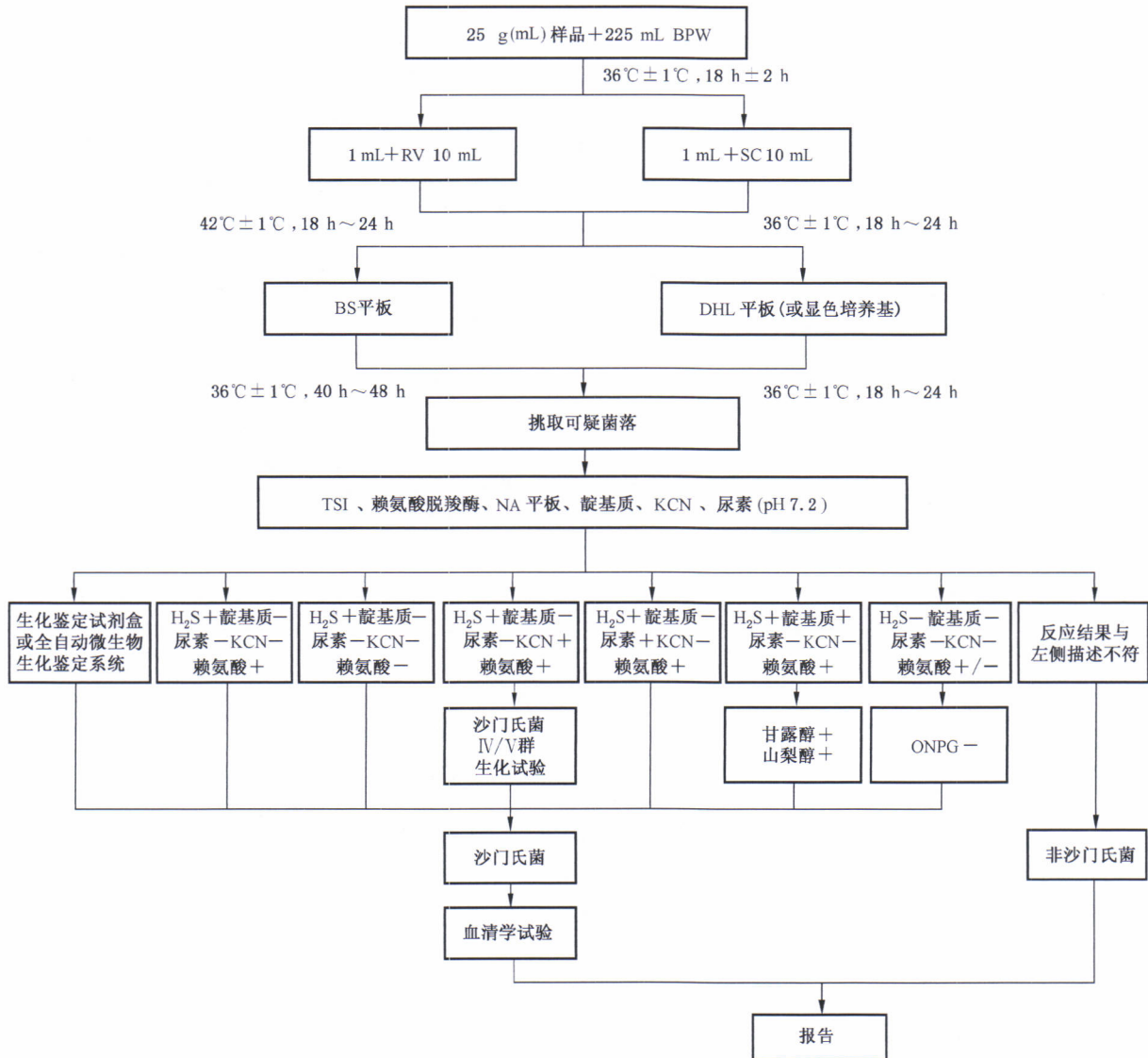


图 A.1 试验程序图

附 录 B

(规范性附录)

培养基和试剂的制备及试验方法

B.1 缓冲蛋白胨水(BPW)

B.1.1 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(KH_2PO_4)	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

B.1.2 制备

将各成分加入蒸馏水中,搅混均匀,静置约 10 min,煮沸溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 , $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 20 min,临用时分装在 500 mL 瓶中,每瓶 225 mL,或配好后校正 pH,分装于 500 mL 瓶中,每瓶 225 mL, $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌,20 min 后备用。

B.2 氯化镁孔雀绿(RV)增菌液

B.2.1 溶液 A

B.2.1.1 成分

蛋白胨	5.0 g
氯化钠	8.0 g
KH_2PO_4	1.6 g
蒸馏水	1 000 mL

B.2.1.2 制备

将各成分加入蒸馏水中,加热至约 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 溶解,调节 pH 至 7.0 此溶液需当天使用。

B.2.2 溶液 B

B.2.2.1 成分

氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	400 g
蒸馏水	1 000 mL

B.2.2.2 制备

将 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于水。

B.2.3 溶液 C

B.2.3.1 成分

孔雀绿	0.4 g
蒸馏水	100 mL

B.2.3.2 制备

将孔雀绿溶于水中。溶液可室温保存于棕色玻璃瓶中。

B.2.4 完全培养基

B.2.4.1 成分

溶液 A	1 000 mL
溶液 B	100 mL
溶液 C	10.0 mL

B.2.4.2 制备

按上述比例配制,调节 pH,使灭菌后 pH 为 5.2,分装于试管中,每管 10 mL。115 °C 高压灭菌 15 min。冰箱保存。

B.3 亚硒酸盐胱氨酸(SC)增菌液

B.3.1 基础液

B.3.1.1 成分

胰蛋白胨	5.0 g
乳糖	4.0 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	10.0 g
亚硒酸氢钠	4.0 g
蒸馏水	1 000 mL

B.3.1.2 制备

溶解前三种成分于水中,煮沸 5 min,冷却后,以无菌操作加入亚硒酸氢钠。

B.3.2 L-胱氨酸溶液

B.3.2.1 成分

L-胱氨酸	0.1 g
1 mol/L 氢氧化钠溶液	15.0 mL

B.3.2.2 制备

在灭菌条件下,用灭菌水将上述成分稀释到 100 mL,无须蒸汽灭菌。

B.3.3 完全培养基制备

基础液	1 000 mL
L-胱氨酸溶液	10.0 mL

基础液冷却后,以无菌操作加入 L-胱氨酸溶液,调节 pH 至 7.0 ± 0.2 后将培养基分装于适当容量的试管中,每管 10 mL。

注:培养基在配制当日使用。

B.4 亚硫酸铋(BS)琼脂**B.4.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
葡萄糖	5.0 g
硫酸亚铁	0.3 g
磷酸氢二钠	4.0 g
煌绿	0.025 g 或 5.0 g/L 水溶液 5.0 mL
柠檬酸铋铵	2.0 g
亚硫酸钠	6.0 g
琼脂	18.0 g~20 g
蒸馏水	1 000 mL

B.4.2 制备

将前三种成分加入 300 mL 蒸馏水(制作基础液),硫酸亚铁和磷酸氢二钠分别加入 20 mL 和 30 mL 蒸馏水中,柠檬酸铋铵和亚硫酸钠分别加入另一 20 mL 和 30 mL 蒸馏水中,琼脂加入 600 mL 蒸馏水中。然后分别搅拌均匀,煮沸溶解。冷至 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右时,先将硫酸亚铁和磷酸氢二钠混匀,倒入基础液中,混合均匀,将柠檬酸铋铵和亚硫酸钠混匀,倒入基础液中,再混匀。调节 pH 至 7.5 ± 0.2 ,随即倾入琼脂液中,混合均匀,冷至 $50\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。加入煌绿溶液,充分混匀后立即倾注平皿。

注:本培养基不需要高压灭菌,在制备过程中不宜过分加热,避免降低其选择性,贮于室温暗处,超过 48 h 会降低其选择性,本培养基宜于当天制备,第二天使用。

B.5 胆硫乳(DHL)琼脂**B.5.1 成分**

蛋白胨	20.0 g
牛肉浸膏	3.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
去氧胆酸钠	1.0 g
硫代硫酸钠	2.3 g
柠檬酸钠	1.0 g
柠檬酸铁铵	1.0 g

中性红	0.03 g
琼脂	18.0 g~20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

B.5.2 制备

将除中性红和琼脂以外的成分溶解于 400 mL 蒸馏水中,调节 pH 至 7.3 ± 0.2 ,再将琼脂于 600 mL 蒸馏水中煮沸溶解,两液合并,加入 0.5% 中性红溶液 6 mL,待冷却至 $50\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$,倾注平皿。

B.6 营养琼脂(NA)

B.6.1 成分

牛肉浸膏	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
琼脂	9.0 g~18.0 g
蒸馏水	1 000 mL

B.6.2 制备

将上述各成分煮沸溶解,调节 pH 至 $7.2 \sim 7.4$, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 20 min。

B.6.3 平皿制备

将制备的营养琼脂在水浴锅里溶解,冷却至 $50\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,倾注入灭菌平皿中,每皿约 15 mL。

B.7 三糖铁琼脂(TSI)

B.7.1 成分

牛肉浸膏	3.0 g
酵母浸膏	3.0 g
蛋白胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
柠檬酸铁	0.3 g
硫代硫酸钠	0.3 g
酚红	0.024 g
琼脂	12.0 g~18.0 g
蒸馏水	1 000 mL

B.7.2 制备

将除琼脂和酚红以外的各成分溶解于蒸馏水中,调节 pH 至 7.4 ± 0.1 ,加入琼脂,加热煮沸,以溶化琼脂,再加入酚红,摇匀,分装试管,装量宜多些,以便得到较高的底层, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 20 min,放置高层斜面备用。

B.8 蛋白胨水、靛基质试剂**B.8.1 蛋白胨水****B.8.1.1 成分**

蛋白胨(或胰蛋白胨)	20.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

B.8.1.2 制备

将上述成分加入蒸馏水,煮沸溶解,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 ,分装小试管,121 °C 高压灭菌 15 min。

B.8.2 靛基质试剂

B.8.2.1 柯凡克试剂:将 5 g 对二甲氨基甲醛溶解于 75 mL 戊醇中,然后缓慢加入浓盐酸 25 mL。

B.8.2.2 欧-波试剂:将 1 g 对二甲氨基甲醛溶解于 95 mL 95%乙醇内。然后缓慢加入浓盐酸 20 mL。

B.8.3 试验方法

挑取小量培养物接种,在 $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 1 d~2 d,必要时可培养 4 d~5 d。加入柯凡克试剂约 0.5 mL,轻摇试管,阳性者于试剂层呈深红色;或加入欧-波试剂约 0.5 mL,沿管壁流下,覆盖于培养液表面,阳性者于液面接触处呈玫瑰红色。

B.9 尿素琼脂(pH 7.2)**B.9.1 基础液****B.9.1.1 成分**

蛋白胨	1.0 g
葡萄糖	1.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
酚红	0.012 g
琼脂	12.0 g~18.0 g
蒸馏水	1 000 mL

B.9.1.2 制备

将上述成分溶于水,煮沸,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,121 °C 高压灭菌 20 min。

B.9.2 尿素溶液**B.9.2.1 成分**

尿素	400 g
蒸馏水	加至 1 000 mL

B.9.2.2 制备

将尿素溶于水中,通过滤器除菌,并应检查灭菌情况。

B.9.3 完全培养基制备

基础液 950 mL

尿素溶液 50 mL

在无菌条件下,将尿素溶液加到事先溶化并冷却至 45 ℃ 基础液中,分装试管,放置成斜面备用。

B.9.4 试验方法

挑取琼脂培养物接种,在 36 ℃ ± 1 ℃ 培养 24 h,观察结果。尿素酶阳性者由于产碱而使培养基变为红色。

B.10 氰化钾(KCN)培养基**B.10.1 成分**

蛋白胨 10.0 g

氯化钠 5.0 g

磷酸二氢钾 0.225 g

磷酸氢二钠 5.64 g

蒸馏水 1 000 mL

0.5% 氰化钾 20.0 mL

B.10.2 制备

将除氰化钾以外的成分加入蒸馏水中,煮沸溶解,分装后 121 ℃ 高压灭菌 15 min。放在冰箱内使其充分冷却。每 100 mL 培养基加入 0.5% 氰化钾溶液 2.0 mL(最后浓度为 1:10 000),分装于无菌试管内,每管约 4 mL,立刻用无菌橡皮塞塞紧,放在 4 ℃ 冰箱内,至少可保存 2 个月。同时,将不加氰化钾的培养基作为培养基,分装试管备用。

B.10.3 试验方法

将琼脂培养物接种于蛋白胨水内成为稀释菌液,挑取 1 环接种于氰化钾(KCN)培养基。并另挑取 1 环接种于对照培养基。在 36 ℃ ± 1 ℃ 培养 1 d~2 d,观察结果。如有细菌生长即为阳性(不抑制),经 2 d 细菌不生长为阴性(抑制)。

注:氰化钾是剧毒品,切勿沾染,以免中毒。夏天分装培养基应在冰箱内进行。试验失败的主要原因是封口不严,氰化钾逐渐分解,产生氢氰酸气体逸出,以致药物浓度降低,细菌生长,因而造成假阳性反应。试验时对每一环节都要特别注意。

B.11 赖氨酸脱羧酶试验培养基**B.11.1 成分**

蛋白胨 5.0 g

酵母浸膏 3.0 g

葡萄糖	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL
1.6%溴甲酚紫-乙醇溶液	1.0 mL
L-赖氨酸或 DL-赖氨酸	0.5 g/100 mL 或 1.0 g/100 mL

B.11.2 制备

将除赖氨酸以外的成分加热溶解后,每瓶 100 mL 分装,分别加入赖氨酸。L-赖氨酸按 0.5% 加入,DL-赖氨酸按 1% 加入。调节 pH 至 6.8 ± 0.2 ,对照培养基不加入赖氨酸。分装于无菌小试管内,每管 0.5 mL,上面滴加一层液体石蜡,115 °C 高压灭菌 10 min。

B.11.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取培养物接种,于 $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ 培养 18 h~24 h,观察结果。氨基酸脱羧酶阳性者由于产碱,培养基应呈紫色。阴性者无碱性产物,但因葡萄糖产酸而使培养基变为黄色。对照管应为黄色。

B.12 糖发酵管

B.12.1 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(含 12 个结晶水)	2.0 g
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

B.12.2 制备

B.12.2.1 葡萄糖发酵管按上述成分配好后,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 。按 0.5% 加入葡萄糖,分装于有一个倒置小管的小试管内,121 °C 高压灭菌 15 min。

B.12.2.2 其他各种糖发酵管可按上述成分配好后,分装每瓶 100 mL,121 °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。若蔗糖不纯,加热后会自行水解者,应采用过滤法除菌。

B.12.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取小量培养物接种,于 $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ 培养,一般 2 d~3 d。迟缓反应需观察 14 d~30 d。

B.13 邻硝基酚 β -D 半乳糖苷(ONPG)培养基

B.13.1 成分

邻硝基酚 β -D 半乳糖苷(ONPG)(O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)	60.0 mg
0.01 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.5)	10.0 mL
1%蛋白胨水(pH 7.5)	30.0 mL

B.13.2 制备

将 ONPG 溶于缓冲液内,加入蛋白胨水,以过滤法除菌,分装于无菌的小试管内,每管 0.5 mL,用橡皮塞塞紧。

B.13.3 试验方法

自琼脂斜面上挑取培养物 1 满环接种于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h~3 h 和 24 h 观察结果。如果 β -半乳糖苷酶产生,则于 1 h~3 h 变黄色,如无此酶则 24 h 不变色。

B.14 半固体琼脂**B.14.1 成分**

牛肉膏	0.3 g
蛋白胨	1.0 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	0.35 g~0.4 g
蒸馏水	100 mL

B.14.2 制备

将上述成分溶于水,煮沸溶解,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 ,分装小试管,121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 20 min。直立凝固备用。

注:供动力观察、菌种保存、H 抗原位相变异试验用。

B.15 丙二酸钠培养基**B.15.1 成分**

酵母浸膏	1.0 g
硫酸铵	2.0 g
磷酸氢二钾	0.6 g
磷酸二氢钾	0.4 g
氯化钠	2.0 g
丙二酸钠	3.0 g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

B.15.2 制备

除指示剂以外的成分溶解于水,调节 pH 至 6.8 ± 0.2 ,再加入指示剂,分装试管,121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

B.15.3 试验方法

用新鲜的琼脂培养物接种,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,观察结果。阳性者由绿色变为蓝色。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
饲料中沙门氏菌的测定
GB/T 13091—2018

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 30 千字
2018年9月第一版 2018年9月第一次印刷

*

书号: 155066·1-61470 定价 21.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 13091-2018