

1 主题内容与适用范围

本标准规定了出口食品中蜡样芽孢杆菌的检验方法。

本标准适用于出口食品的检验。

2 设备和材料

- 2.1 吸管：容量1.0mL和10.0mL，具0.1 mL刻度。
- 2.2菌落计数器。
- 2.3 均质器。
- 2.4 厌氧培养装置。
- 2.5 涡动搅拌器。
- 2.6 L形玻璃棒。
- 2.7 恒温培养箱：30℃及36±1℃。

3 培养基和试剂

- 3.1 甘露醇卵黄多粘菌素琼脂(MYP)。
- 3.2 胰酪胨大豆多粘菌素肉汤。
- 3.3 酚红葡萄糖肉汤。
- 3.4 硝酸盐肉汤。
- 3.5 营养琼脂。
- 3.6 L—酪氨酸营养琼脂。
- 3.7 溶菌酶营养肉汤。
- 3.8 改良V—P培养基。
- 3.9动力培养基。
- 3.10 胰酪胨大豆羊血琼脂(TSSB)。
- 3.11 Butterfield氏磷酸盐缓冲稀释液。
- 3.12 亚硝酸盐试剂。
- 3.13 V—P试剂。
- 3.14 碱性复红染色液。

4 样品的保存和送检

待检样品应保持在6℃以下运送并尽可能不使其冷冻。送达实验室后，应保存于4℃并尽快进行检验。如在4d内不能进行检验，应将样品储存在20℃，检验前再于室温下解冻。

脱水食品可在常温下送检和储存。

5 样品的制备

- 5.1 以无菌操作用灭菌刀、剪将样品剪碎。称取50g放于无菌均质杯中。
- 5.2 加450mL无菌磷酸盐缓冲稀释液于均质杯中以18 000r／min均质2min。制成1：10样品稀释液。
- 5.3 取1：10稀释液10.0 mL加到含有90.0 mL无菌磷酸盐缓冲液的稀释瓶中，充分混匀制成1：100的稀释液。
- 5.4 每个稀释度换用1支10.0mL灭菌吸管，按上述操作程序进行10倍递增稀释直至10⁻⁶。

6 检验步骤

6.1 平板计数法

- 6.1.1 取各稀释液0.1mL接种到MYP琼脂平板上。用灭菌L形玻璃棒均匀涂布于整个琼脂表面。每稀释度接种两个MYP琼脂平板。
- 6.1.2 将平板置于30℃培养24h。
- 6.1.3 选取具有15～150个典型可疑蜡样芽孢杆菌菌落的平板，进行计数。并计算同一稀释度两个平板的平均菌落数。

蜡样芽孢杆菌在MYP琼脂平板上生成的菌落为微粉红色，环绕产生卵磷脂酶沉淀环。如反应不典型，可继续培养24h再计数。

- 6.1.4 计数后，从每个平板至少选取5个已计数的菌落分别接种于营养琼脂斜面，于30℃培养24h，按第6章进行证实试验。

6.1.5 根据证实试验确定为蜡样芽孢杆菌的菌落数，按比例计算出该皿内的蜡样芽孢杆菌菌落数，然后乘其稀释倍数再乘以10，即得每克样品所含蜡样芽孢杆菌数并作出报告。例：将检样10⁻⁴稀释液0.1mL涂布于MYP琼脂平板上，生成的可疑菌落数为25个，取5个进行鉴定，证实为蜡样芽孢杆菌的是4个，则1g样品中蜡样芽孢杆菌数为(25×4／5)×10⁴×10=2×10⁶。

6.2 最近似值(MPN)法

适用于污染蜡样芽孢杆菌数不大于10³个／g的食品。

- 6.2.1 选用三管法MPN系列。取10⁻¹、10⁻²、10⁻³三种稀释液，每种稀释液接种3管胰酪胨大豆多粘菌素肉汤，每管接种1mL。
- 6.2.2 置于30℃培养48±2h。
- 6.2.3 从长菌的试管取培养物划线接种到MYP琼脂平板上。
- 6.2.4 置30℃培养24～48h。

- 6.2.5 从MYP琼脂平板上挑取粉红色绕有沉淀环的单个菌落，接种营养琼脂斜面，置30℃培养24 h，供作证实试验。

- 6.2.6 根据证实试验确定为蜡样芽孢杆菌的管数，由MPN表(附录C(补充件))计算蜡样芽孢杆菌的MPN值／g，并作出报告。

7 证实试验

7.1 形态观察

取营养琼脂斜面培养物，作革兰氏染色镜检。蜡样芽孢杆菌为革兰氏阳性大杆菌，呈短链或长链，芽孢呈椭圆形位于菌体中央或偏端，不使菌体膨大。

7.2生化性性状

7.2.1 葡萄糖发酵试验

接种于酚红葡萄糖肉汤中，厌氧条件下35℃培养24h。培养基应由红色变为黄色(表明本菌在厌氧条件下分解葡萄糖产酸)。

7.2.2 硝酸盐还原试验

接种于硝酸盐肉汤中，35℃培养24h。加硝酸盐试剂后应为阳性反应(红色)。

7.2.3 V—P试验

接种于改良V—P培养基中，35℃培养48h。加V—P试剂及加酸数粒，静止1h，应为阳性反应(伊红色)。

7.2.4 L—酪氨酸分解试验

接种于L—酪氨酸琼脂培养基上，35℃培养48h，阳性反应菌落周围培养基应出现澄清透明区(表示产生酪蛋白酶)。阴性时应继续培养72h再观察。

7.2.5溶菌酶试验

用直径2mm接种环取纯菌悬液一环，接种于溶菌酶肉汤中，35℃培养24h。该菌在本培养基(含0.001%的溶菌酶)中能生长。如出现阴性反应，应继续培养24h。

7.2.6 卵磷脂酶试验

接种于MYP琼脂平板上，35℃培养24h。阳性反应菌落周围应出现沉淀环(表示产生卵磷脂酶)。

7.3 蜡样芽孢杆菌与类似菌的鉴别试验

7.3.1 动力试验

用接种针挑取培养物穿刺接种于动力培养基中，30℃培养24h。有动力蜡样芽孢杆菌应沿穿刺线呈扩散生长，而蕈状芽孢杆菌常呈绒毛状生长，形成所谓的蜂巢状扩散。也可用悬滴法检查。蜡样芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌通常运动极为活泼，而炭疽杆菌则不运动。

7.3.2 根状生长试验

用接种环取培养物接种于营养琼脂平板上，30℃培养18～24h。蜡样芽孢杆菌群的多数菌株形成粗短的似毛玻璃状或融蜡状的菌落。其中唯独蕈状芽孢杆菌则形成根状生长的特征。

7.3.3 溶血试验

取培养物接种于胰酪胨大豆羊血琼脂平板上，30～32℃培养24h。蜡样芽孢杆菌落周围呈现β型完全溶血的溶血环。苏云金芽孢杆菌和蕈状芽孢杆菌呈较弱的溶血现象，而炭疽芽孢杆菌通常为不溶血。

7.3.4 蛋白质结晶毒素试验

取经30℃培养24h并于室温放置2～3d的营养琼脂培养物少许于载玻片上，滴加蒸馏水湿涂成薄膜。经自然干燥，微火固定后，于涂膜加甲醇半分钟后倾掉，再通过火焰干燥，于载片上滴满0.5%碱性复红液，放火焰上加热微见蒸气(勿使染液沸腾)后持续1.5min，移去火焰，使载片放置0.5min再倾去染液。用洁净自来水彻底清洗、晾干。镜检。观察有无游离芽孢和染成果色的菱形毒素结晶体。如发现游离芽孢形成的不丰富，应将培养物置室温2～3d再行检查。苏云金芽孢杆菌用此法检测为阳性，而蜡样芽孢杆菌群的其他菌株则为阴性。

7.3.5 结果解释及报告

符合蜡样芽孢杆菌群的特征，有活泼的动力，很强的溶血能力，不形成根状生长和不产生蛋白结晶毒素，可报告为蜡样芽孢杆菌。

对偶尔遇到的一些少数可疑菌株，可以根据需要进行其他试验。如青霉素酶、噬菌体试验等。

附 录 A

培养基制备

(补充件)

A1 甘露醇卵黄多粘菌素琼脂培养基(MYP)

a. 基础琼脂	
牛肉膏	1.0g
蛋白胨	10.0g
D—甘露醇	10.0g
氯化钠	10.0g
琼脂	15.0g
酚红	0.025g(配成溶液加入)
蒸馏水	稀释至900mL
b. 50% 卵黄液	50mL
c. 多粘菌素B	100IU／mL

将a.中的前5种成分加入蒸馏水中加热溶解，校正pH至7.2±0.1，加入酚红溶液，混匀后分装烧瓶中，每瓶225mL。121℃高压灭菌15min。用时加热溶化，冷至50℃后每瓶加入50% 卵黄液12.5mL和2.5mL多粘菌素B溶液，混匀后倾注灭菌平皿，每皿15～18mL。用前应将平板置室温约24h。

注：①50% 卵黄液：取鲜鸡蛋，用硬刷将蛋壳彻底洗净，沥干，放于70% 酒精溶液中浸泡1h。以无菌操作取出卵黄，加入等量灭菌生理盐水，混匀后备用。

②多粘菌素B溶液：在50mL灭菌蒸馏水中溶解500 000国际单位的无菌硫酸盐多粘菌素B。

A2 胰酪胨大豆多粘菌素肉汤

胰酪胨	17.0g
植物胨	3.0g
氯化钠	5.0g
磷酸氢二钾	2.5g
葡萄糖	2.5g
蒸馏水稀释至	1000mL
pH7.3±0.1	

将上述各成分溶解在蒸馏水中，煮沸2min，分装大试管，每管15mL，121℃高压灭菌15min。临用时每管加入0.5% 多粘菌素B溶液0.1mL混匀即可。

注：多粘菌素B溶液：在33.3mL灭菌蒸馏水中溶解500 000国际单位无菌硫酸盐多粘菌素B。

A3 酚红葡萄糖肉汤

脉胨 10.0g	
牛肉膏 1.0g	
氯化钠 5.0g	
葡萄糖 5.0g	
酚红 0.018g(配成溶液加入)	
蒸馏水 稀释至1 000mL	
pH7.4±0.1	

将除酚红外的各成分溶解于蒸馏水并稀释至1 000mL。校正pH后加入酚红溶液，混匀，分装试管，每管3mL。121℃高压灭菌10min备用。最终pH7.4±0.1。

A4 硝酸盐肉汤

牛肉膏	3.0g
蛋白胨	5.0g
硝酸盐	1.0g
蒸馏水稀释至	1000mL
pH7.0±0.1	

将上述各成分溶解于蒸馏水并稀释至1 000mL。校正pH后分装试管，每管5mL，121℃高压灭菌15 min。

A5 营养琼脂

牛肉膏	3.0g
蛋白胨	5.0g
琼脂稀释至	1000mL
pH7.2±0.1	

将各成分于蒸馏水中加热溶解。校正pH后分装试管，每管5～7 mL；或分装烧瓶，每瓶100～150mL。121℃高压灭菌15min。将试管取出，制成斜面；如制平板，可将灭菌的琼脂冷至45～50℃倾注灭菌平皿，每皿18～20mL。

A6 L—酪氨酸营养琼脂

营养琼脂	100mL
5% 灭菌L—酪氨酸悬液	10mL

将100mL营养琼脂溶化，冷至45℃，加入5%的灭菌L—酪氨酸悬液10mL，充分混匀后，分装试管，每管3.5mL。制成的斜面应迅速冷却防止L—酪氨酸分离而出。

注：L—酪氨酸悬液：将0.5g酪氨酸加10mL蒸馏水混匀，121℃高压灭菌15min。

A7 溶菌酶营养肉汤

牛肉膏	3.0g
蛋白胨	5.0g
蒸馏水稀释至	1000mL
0.1% 溶菌酶溶液	10.0mL
pH8.5±0.1	

将上述成分(溶菌酶溶液除外)溶解于蒸馏水并稀释至1 000mL。校正pH后，分装于烧瓶中，每瓶99 mL。121℃高压灭菌15 min。于每瓶中加入0.1% 溶菌酶溶液1 mL，混匀后分装灭菌试管，每管2.5 mL。

注：溶菌酶溶液：65mL灭菌的0.1mol／L盐酸中加0.1g溶菌酶。煮沸20min溶解后，再用灭菌的0.1 mol／L盐酸稀释至100mL。

A8 改良V—P培养基

蛋白胨	7.0g
葡萄糖	5.0g
氯化钠	5.0g
pH8.5±0.1	

将上述各成分溶解于蒸馏水并稀释至1 000mL。校正pH后分装试管，每管5mL。121℃高压灭菌10min备用。

A9 动力培养基

胰酪胨	10.0g
酵母膏	2.5g
葡萄糖	5.0g
磷酸氢二钠	2.5g
琼脂	3.0g
蒸馏水稀释至	1000mL
pH7.4±0.2	

将上述各成分于蒸馏水加热溶解并稀释至1 000mL。校正pH后，分装试管，每管2mL。121 ℃高压灭菌10min备用。

A10 胰酪胨大豆羊血琼脂(TSSB)

胰酪胨	5.0g
植物胨	5.0g
氯化钠	5.0g
琼脂	15.0g
蒸馏水稀释至	1000mL
pH7.0±0.2	

将上述各成分于蒸馏水中加热溶解。校正pH后，分装烧瓶，每瓶100mL。121℃ 高压灭菌15min。水浴中冷至45～50 ℃加入5mL无菌脱纤维羊血，混匀后倾注平板，每皿18～20mL。

附 录 B

试剂 配 制

(补充件)

B1 Butterfield氏磷酸盐缓冲稀释液

在500mL蒸馏水中溶解磷酸二氢钾(KH₂PO₄)34.0g，用1 mol／L氢氧化钠溶液约175mL校正 pH至7.2，再用蒸馏水稀释至1 000mL，制成储存液于冰箱中储存。取原液1.25mL，用蒸馏水稀释至1 000mL。分装试管，每管90mL，121℃高压灭菌15min。

B2 亚硝酸盐试剂

- a. 试剂A：对氨基苯磺酸8.0g，溶解于5mol／L乙酸1 000mL中。
- b. 试剂B：α—萘酚2.5g溶解于5mol/L乙酸1 000mL中。

B3 V—P试剂

- a. 5% α—萘酚溶液：取α—萘酚5.0g溶解于100mL无水乙醇中。
- b. 40% 氢氧化钾溶液：将氢氧化钾40g于蒸馏水中溶解并稀释至100mL。
- c. 肌氨酸结晶。

B4 碱性复红染色液

取碱性复红0.5g溶解于20mL乙醇中，再用蒸馏水稀释至100mL，滤纸过滤后储存备用。

附 录 C

1g样品中最近似值(MPN)检索表

(补充件)

三管法采用0.1，0.01，0.001g。

阳性管数			MPN	阳性管数			MPN
0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001	
0	0	0	≤3	1	0	0	3.6
0	0	1	3	1	0	1	7.2
0	0	2	6	1	0	2	11
0	0	3	9	1	0	3	15
0	1	0	3	1	1	0	7.3
0	1	1	6.1	1	1	1	11
0	1	2	9.2	1	1	2	15
0	1	3	12	1	1	3	19
0	2	0	6.2	1	2	0	11
0	2	1	9.3	1	2	1	15
0	2	2	12	1	2	2	20
0	2	3	16	1	2	3	24
0	3	0	9.4	1	3	0	16
0	3	1	13	1	3	1	20
0	3	2	16	1	3	2	24
0	3	3	19	1	3	3	29
2	0	0	9.1	3	0	0	23
2	0	1	14	3	0	1	39
2	0	2	20	3	0	2	64
2	0	3	26	3	0	3	95
2	1	0	15	3	1	0	43
2	1	1	20	3	1	1	75
2	1	2	27	3	1	2	120
2	1	3	34	3	1	3	160
2	2	0	21	3	2	0	93
2	2	1	28	3	2	1	150
2	2	2	35	3	2	2	210
2	2	3	42	3	2	3	290
2	3	0	29	3	3	0	240
2	3	1	36	3	3	1	460
2	3	2	44	3	3	2	1100
2	3	3	53	3	3	3	>1100

附加说明：

本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出。

本标准由中华人民共和国黑龙江进出口商品检验局、辽宁进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人李冠泰、唐守亨。

本标准参考美国公积分析化学家协会(AOAC)法定分析方法第14版，第46章，第46.106～46.114节(1984年)。