

SN

中华人民共和国进出口商品检验行业标准

SN 0176—92

出口食品中蜡样芽孢杆菌 检 验 方 法

**Method for detection of bacillus cereus
in food for export**

1992-12-28发布

1993-05-01实施

中华人民共和国国家进出口商品检验局 发布

中华人民共和国进出口商品检验行业标准

出口食品中蜡样芽孢杆菌 检 验 方 法

SN 0176—92

代替 ZB X09 006—86

Method for detection of bacillus
cereus in food for export

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 1.0 mL 和 10.0 mL,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 4 d 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 50 g 放于无菌均质杯中。

5.2 加 450 mL 无菌磷酸盐缓冲稀释液于均质杯中以 18 000~20 000 r/min 均质 2 min。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 10.0 mL 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 0.1 mL 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 24 h。

6.1.3 选取具有 15~150 个典型或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 24 h 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 24 h，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 0.1 mL 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 1 g 样品中蜡样芽孢杆菌数为 $(25 \times 4/5) \times 10^4 \times 10 = 2 \times 10^6$ 。

6.2 最近似值(MPN)法

适用于污染蜡样芽孢杆菌数不大于 10^3 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 1 mL。

6.2.2 置于 30 ℃培养 48±2 h。

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 24~48 h。

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,不使菌体胀大。

7.2 生化学性状

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24 h。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24 h。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48 h。加V-P试剂及肌酸数粒,静止1 h,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48 h,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72 h再观察。

7.2.5 溶菌酶试验

用直径2 mm接种环取纯菌悬液一环,接种于溶菌酶肉汤中,35℃培养24 h。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24 h。

7.2.6 卵磷脂酶试验

接种于MYP琼脂平板上,35℃培养24 h。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24 h。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18~24 h。蜡样芽孢杆菌群的多数菌株形成粗糙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24 h。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现弱的溶血现象,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24 h并于室温放置2~3 d的营养琼脂培养物少许于载玻片上,滴加蒸馏水混涂成薄膜。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1.5 min,移去火焰,使载片放置0.5 min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黑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2~3 d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种则为阴性。

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	1.0 g
蛋白胨	10.0 g
D-甘露醇	10.0 g
氯化钠	10.0 g
琼脂	15.0 g
酚红	0.025 g(配成溶液加入)
蒸馏水	稀释至 900 mL
b. 50%卵黄液	50 mL
c. 多粘菌素 B	100 IU/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 225 mL, 121 ℃ 高压灭菌 15 min。用时加热溶化, 冷至 50 ℃ 后每瓶加入 50% 卵黄液 12.5 mL 和 2.5 mL 多粘菌素 B 溶液, 混匀后倾注灭菌平皿, 每皿 15~18 mL。用前应将平板置室温约 24 h。

注: ① 50% 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 1 h。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 50 mL 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	17.0 g
植物胨	3.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	稀释至 1 000 mL
pH7.3±0.1	

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

注: 多粘菌素 B 溶液: 在 33.3 mL 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

胰胨	10.0 g
牛肉膏	1.0 g
氯化钠	5.0 g
葡萄糖	5.0 g
酚红	0.018 g(配成溶液加入)
蒸馏水	稀释至 1 000 mL

pH7.4±0.1

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

A4 硝酸盐肉汤

牛肉膏	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
硝酸钾	1.0 g
蒸馏水	稀释至1 000 mL
pH7.0±0.1	

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

A5 营养琼脂

牛肉膏	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
琼脂	稀释至1 000 mL
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100~150 mL。121℃高压灭菌15 min。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18~20 mL。

A6 L-酪氨酸营养琼脂

营养琼脂	100 mL
5%灭菌L-酪氨酸悬液	10 mL

将100 mL营养琼脂溶化，冷至45℃，加入5%的灭菌L-酪氨酸悬液10 mL，充分混匀后，分装试管，每管3.5 mL。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0.5 g酪氨酸加10 mL蒸馏水混匀，121℃高压灭菌15 min。

A7 溶菌酶营养肉汤

牛肉膏	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
蒸馏水	稀释至1 000 mL
0.1%溶菌酶溶液	10.0 mL
pH6.8±0.1	

将上述成分(溶菌酶溶液除外)溶解于蒸馏水并稀释至1 000 mL。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，在65 mL灭菌的0.1 mol/L盐酸中加0.1 g溶菌酶。煮沸20 min溶解后，再用灭菌的0.1 mol/L盐酸稀释至100 mL。

A8 改良V-P培养基

豚蛋白胨	7.0 g
------	-------

葡萄糖	5.0 g
氯化钠	5.0 g
pH6.5±0.1	

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

A9 动力培养基

胰酪胨	10.0 g
酵母膏	2.5 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钠	2.5 g
琼 脂	3.0 g
蒸馏水	稀释至1 000 mL

pH7.4±0.2

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

A10 胰酪胨大豆羊血琼脂(TSSB)

胰酪胨	15.0 g
植物胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼 脂	15.0 g
蒸馏水	稀释至1 000 mL

pH7.0±0.2

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

附录 B 试剂配制 (补充件)

B1 Butterfield氏磷酸盐缓冲稀释液

在500 mL蒸馏水中溶解磷酸二氢钾(KH_2PO_4)34.0 g,用1 mol/L氢氧化钠溶液约175 mL校正pH至7.2,再用蒸馏水稀释至1 000 mL,制成储存液于冰箱中储存。取原液1.25 mL,用蒸馏水稀释至1 000 mL。分装试管,每管90 mL,121 ℃高压灭菌15 min。

B2 亚硝酸盐试剂

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

B3 V-P 试剂

- a. 5% α -萘酚溶液:取 α -萘酚5.0 g溶解于100 mL无水乙醇中。

- b. 40%氢氧化钾溶液: 将氢氧化钾40 g于蒸馏水中溶解并稀释至100 mL。
 c. 肌氨酸结晶。

B4 碱性复红染色液

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

附录 C
1 g 样品中最近似值(MPN)检索表
(补充件)

三管法采用0.1, 0.01, 0.001 g。

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	2	0	0	9.1
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6.1	2	1	1	20
0	1	2	9.2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6.2	2	2	0	21
0	2	1	9.3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9.4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3.6	3	0	0	23
1	0	1	7.2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7.3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1 100
1	3	3	29	3	3	3	>1 100

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廷泰、唐守亭。

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

(京)新登字 023 号

SN 0176—92

中华人民共和国进出口商品检验
行 业 标 准
出口食品中蜡样芽孢杆菌
检 验 方 法

SN 0176—92

*
中国标准出版社出版
(北京复外三里河)

中国标准出版社北京印刷厂印刷
版权专有 不得翻印

*
开本 880×1230 1/16 印张 3/4 字数 15 千字
1993年7月第一版 1993年7月第一次印刷
印数 1—3 000