



中华人民共和国国家标准

GB 4789.14—2014

食品安全国家标准

食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验

2014-12-01 发布

2015-05-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准代替 GB/T 4789.14-2003 《食品卫生微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.14-2003 相比，主要变化如下：

- 修改了标准的中文名称；
- 增加了第二法 蜡样芽胞杆菌 MPN 计数法；
- 将选择性分离培养基（MYP）培养条件由 37 °C 培养 12 h~20 h 改为 30 °C ± 1 °C 培养 24 h~48 h；
- 增加了溶菌酶试验；
- 修改了操作步骤；
- 增加了附录 A、附录 B。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验

1 范围

本标准规定了食品中蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*) 的检验方法。

本标准第一法适用于蜡样芽胞杆菌含量较高的食品中蜡样芽胞杆菌的计数；第二法适用于蜡样芽胞杆菌含量较低的食品样品中蜡样芽胞杆菌的计数。

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：

- a) 冰箱：2℃~5℃；
- b) 恒温培养箱：30℃±1℃、36℃±1℃；
- c) 均质器；
- d) 电子天平：感量0.1g；
- e) 无菌锥形瓶：100mL、500mL；
- f) 无菌吸管：1mL（具0.01mL刻度）、10mL（具0.1mL刻度）或微量移液器及吸头；
- g) 无菌平皿：直径90mm；
- h) 无菌试管：18mm×180mm；
- i) 显微镜：10倍~100倍（油镜）；
- j) L涂布棒。

3 培养基和试剂

- 3.1 磷酸盐缓冲液（PBS）：见附录A中A.1。
- 3.2 甘露醇卵黄多黏菌素（MYP）琼脂：见附录A中A.2。
- 3.3 胰酪胨大豆多黏菌素肉汤：见附录A中A.3。
- 3.4 营养琼脂：见附录A中A.4。
- 3.5 过氧化氢溶液：见附录A中A.5。
- 3.6 动力培养基：见附录A中A.6。
- 3.7 硝酸盐肉汤：见附录A中A.7。
- 3.8 酪蛋白琼脂：见附录A中A.8。
- 3.9 硫酸锰营养琼脂培养基：见附录A中A.9。
- 3.10 0.5%碱性复红：见附录A中A.10。
- 3.11 动力培养基：见附录A中A.11。
- 3.12 糖发酵管：见附录A中A.12。
- 3.13 V-P培养基：见附录A中A.13。
- 3.14 胰酪胨大豆羊血（TSSB）琼脂：见附录A中A.14。
- 3.15 溶菌酶营养肉汤：见附录A中A.15。
- 3.16 西蒙氏柠檬酸盐培养基：见附录A中A.16。
- 3.17 明胶培养基：见附录A中A.17。

4 蜡样芽胞杆菌平板计数法（第一法）

4.1 检验程序

蜡样芽胞杆菌平板计数法检验程序见图 1。

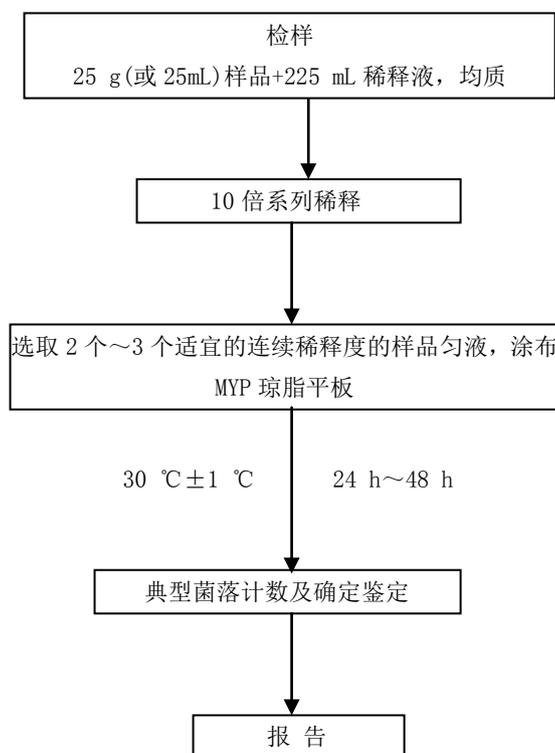


图 1 蜡样芽胞杆菌平板计数法检验程序

4.2 操作步骤

4.2.1 样品处理

冷冻样品应在 45 °C 以下不超过 15 min 或在 2 °C ~ 5 °C 不超过 18 h 解冻, 若不能及时检验, 应放于 -10 °C ~ -20 °C 保存; 非冷冻而易腐的样品应尽可能及时检验, 若不能及时检验, 应置于 2 °C ~ 5 °C 冰箱保存, 24 h 内检验。

4.2.2 样品制备

称取样品 25 g, 放入盛有 225 mL PBS 或生理盐水的无菌均质杯内, 用旋转刀片式均质器以 8000 r/min ~ 10000 r/min 均质 1 min ~ 2 min, 或放入盛有 225 mL PBS 或生理盐水的无菌均质袋中, 用拍击式均质器拍打 1 min ~ 2 min。若样品为液态, 吸取 25 mL 样品至盛有 225 mL PBS 或生理盐水的无菌锥形瓶(瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠)中, 振荡混匀, 作为 1:10 的样品匀液。

4.2.3 样品的稀释

吸取 4.2.2 中 1:10 的样品匀液 1 mL 加到装有 9 mL PBS 或生理盐水的稀释管中, 充分混匀制成 1:100 的样品匀液。根据对样品污染状况的估计, 按上述操作, 依次制成十倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释 1 次, 换用 1 支 1 mL 无菌吸管或吸头。

4.2.4 样品接种

根据对样品污染状况的估计,选择2个~3个适宜稀释度的样品匀液(液体样品可包括原液),以0.3 mL、0.3 mL、0.4 mL 接种量分别移入三块 MYP 琼脂平板,然后用无菌 L 棒涂布整个平板,注意不要触及平板边缘。使用前,如 MYP 琼脂平板表面有水珠,可放在 25 °C~50 °C 的培养箱里干燥,直到平板表面的水珠消失。

4.2.5 分离、培养

4.2.5.1 分离

在通常情况下,涂布后,将平板静置 10 min。如样液不易吸收,可将平板放在培养箱 30 °C ±1 °C 培养 1 h,等样品匀液吸收后翻转平皿,倒置于培养箱,30 °C ±1 °C 培养 24 h ±2 h。如果菌落不典型,可继续培养 24 h ±2 h 再观察。在 MYP 琼脂平板上,典型菌落为微粉红色(表示不发酵甘露醇),周围有白色至淡粉红色沉淀环(表示产卵磷脂酶)。

4.2.5.2 纯培养

从每个平板(符合 4.4.1.1 要求的平板)中挑取至少 5 个典型菌落(小于 5 个全选),分别划线接种于营养琼脂平板做纯培养,30 °C ±1 °C 培养 24 h ±2 h,进行确证实验。在营养琼脂平板上,典型菌落为灰白色,偶有黄绿色,不透明,表面粗糙似毛玻璃状或融蜡状,边缘常呈扩展状,直径为 4 mm~10 mm。

4.3 确定鉴定

4.3.1 染色镜检

挑取纯培养的单个菌落,革兰氏染色镜检。蜡样芽胞杆菌为革兰氏阳性芽胞杆菌,大小为(1 μm~1.3 μm) × (3 μm~5 μm),芽胞呈椭圆形位于菌体中央或偏端,不膨大于菌体,菌体两端较平整,多呈短链或长链状排列。

4.3.2 生化鉴定

4.3.2.1 概述

挑取纯培养的单个菌落,进行过氧化氢酶试验、动力试验、硝酸盐还原试验、酪蛋白分解试验、溶菌酶耐性试验、V-P 试验、葡萄糖利用(厌氧)试验、根状生长试验、溶血试验、蛋白质毒素结晶试验。蜡样芽胞杆菌生化特征与其他芽胞杆菌的区别见表 1。

表1 蜡样芽胞杆菌生化特征与其他芽胞杆菌的区别

项目	蜡样芽胞杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	苏云金芽胞杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	覃状芽胞杆菌 <i>Bacillus mycoides</i>	炭疽芽胞杆菌 <i>Bacillus anthracis</i>	巨大芽胞杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>
革兰氏染色	+	+	+	+	+
过氧化氢酶	+	+	+	+	+
动力	+/-	+/-	-	-	+/-
硝酸盐还原	+	+/-	+	+	-/+
酪蛋白分解	+	+	+/-	-/+	+/-
溶菌酶耐性	+	+	+	+	-
卵黄反应	+	+	+	+	-

表 1 (续)

项目	蜡样芽胞杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	苏云金芽胞杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	蕈状芽胞杆菌 <i>Bacillus mycoides</i>	炭疽芽胞杆菌 <i>Bacillus anthracis</i>	巨大芽胞杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>
葡萄糖利用(厌氧)	+	+	+	+	-
V-P试验	+	+	+	+	-
甘露醇产酸	-	-	-	-	+
溶血(羊红细胞)	+	+	+	-/+	-
根状生长	-	-	+	-	-
蛋白质毒素晶体	-	+	-	-	-

注：+ 表示 90%~100% 的菌株阳性；- 表示 90%~100% 的菌株阴性；+/- 表示大多数的菌株阳性；-/+ 表示大多数的菌株阴性。

4.3.2.2 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。有动力的蜡样芽胞杆菌应沿穿刺线呈扩散生长，而蕈状芽胞杆菌常呈“绒毛状”生长。也可用悬滴法检查。

4.3.2.3 溶血试验

挑取纯培养的单个可疑菌落接种于 TSSB 琼脂平板上，30℃±1℃培养 24 h±2 h。蜡样芽胞杆菌菌落为浅灰色，不透明，似白色毛玻璃状，有草绿色溶血环或完全溶血环。苏云金芽胞杆菌和蕈状芽胞杆菌呈现弱的溶血现象，而多数炭疽芽胞杆菌为不溶血，巨大芽胞杆菌为不溶血。

4.3.2.4 根状生长试验

挑取单个可疑菌落按间隔 2 cm~3 cm 左右距离划平行直线于经室温干燥 1d~2d 的营养琼脂平板上，30℃±1℃培养 24 h~48 h，不能超过 72h。用蜡样芽胞杆菌和蕈状芽胞杆菌标准株作为对照进行同步试验。蕈状芽胞杆菌呈根状生长的特征。蜡样芽胞杆菌菌株呈粗糙山谷状生长的特征。

4.3.2.5 溶菌酶耐性试验

用接种环取纯菌悬液一环，接种于溶菌酶肉汤中，36℃±1℃培养 24 h。蜡样芽胞杆菌在本培养基(含 0.001%溶菌酶)中能生长。如出现阴性反应，应继续培养 24 h。巨大芽胞杆菌不生长。

4.3.2.6 蛋白质毒素结晶试验

挑取纯培养的单个可疑菌落接种于硫酸锰营养琼脂平板上，30℃±1℃培养 24 h±2 h，并于室温放置 3 d~4 d，挑取培养物少许于载玻片上，滴加蒸馏水混匀并涂成薄膜。经自然干燥，微火固定后，加甲醇作用 30 s 后倾去，再通过火焰干燥，于载玻片上滴加 0.5% 碱性复红，放火焰上加热(微见蒸气，勿使染液沸腾)持续 1 min~2 min，移去火焰，再更换染色液再次加温染色 30 s，倾去染液用洁净自来水彻底清洗、晾干后镜检。观察有无游离芽胞(浅红色)和染成深红色的菱形蛋白结晶体。如发现游离芽胞形成的不丰富，应再将培养物置室温 2 d~3 d 后进行检查。除苏云金芽胞杆菌外，其他芽胞杆菌不产生蛋白结晶体。

4.3.3 生化分型(选做项目)

根据对柠檬酸盐利用、硝酸盐还原、淀粉水解、V-P 试验反应、明胶液化试验，将蜡样芽胞杆菌分成不同生化型别，见表 2。

表 2 蜡样芽胞杆菌生化分型试验

型别	生化试验				
	柠檬酸盐	硝酸盐	淀粉	V-P	明胶
1	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+
3	+	+	-	+	+
4	-	-	+	+	+
5	-	-	-	+	+
6	+	-	-	+	+
7	+	-	+	+	+
8	-	+	-	+	+
9	-	+	-	-	+
10	-	+	+	-	+
11	+	+	+	-	+
12	+	+	-	-	+
13	-	-	+	-	-
14	+	-	-	-	+
15	+	-	+	-	+

注：+表示 90%~100%的菌株阳性；-表示 90%~100%的菌株阴性。

4.4 结果计算

4.4.1 典型菌落计数和确认

4.4.1.1 选择有典型蜡样芽胞杆菌菌落的平板,且同一稀释度 3 个平板所有菌落数合计在 20 CFU~200 CFU 之间的平板,计数典型菌落数。如果出现 a)~f) 现象按 4.4.2.1 中公式(1)计算,如果出现 g) 现象则按 4.4.2.2 中公式(2)计算;

- a) 只有一个稀释度的平板菌落数在 20 CFU~200 CFU 之间且有典型菌落,计数该稀释度平板上的典型菌落;
- b) 2 个连续稀释度的平板菌落数均在 20 CFU~200 CFU 之间,但只有一个稀释度的平板有典型菌落,应计数该稀释度平板上的典型菌落;
- c) 所有稀释度的平板菌落数均小于 20 CFU 且有典型菌落,应计数最低稀释度平板上的典型菌落;
- d) 某一稀释度的平板菌落数大于 200 CFU 且有典型菌落,但下一稀释度平板上没有典型菌落,应计数该稀释度平板上的典型菌落;
- e) 所有稀释度的平板菌落数均大于 200 CFU 且有典型菌落,应计数最高稀释度平板上的典型菌落;
- f) 所有稀释度的平板菌落数均不在 20 CFU~200 CFU 之间且有典型菌落,其中一部分小于 20 CFU 或大于 200 CFU 时,应计数最接近 20 CFU 或 200 CFU 的稀释度平板上的典型菌落。
- g) 2 个连续稀释度的平板菌落数均在 20 CFU~200 CFU 之间且均有典型菌落。

4.4.1.2 从每个平板中至少挑取 5 个典型菌落(小于 5 个全选),划线接种于营养琼脂平板做纯培养,30℃±1℃培养 24 h±2 h。

4.4.2 计算公式

4.4.2.1 菌落计算公式(1)

$$T = \frac{AB}{Cd} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- T ——样品中蜡样芽胞杆菌菌落数;
- A ——某一稀释度蜡样芽胞杆菌典型菌落的总数;
- B ——鉴定结果为蜡样芽胞杆菌的菌落数;
- C ——用于蜡样芽胞杆菌鉴定的菌落数;
- d ——稀释因子。

4.4.2.2 菌落计算公式 (2)

$$T = \frac{A_1B_1/C_1 + A_2B_2/C_2}{1.1d} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- T ——样品中蜡样芽胞杆菌菌落数;
- A_1 ——第一稀释度 (低稀释倍数) 蜡样芽胞杆菌典型菌落的总数;
- A_2 ——第二稀释度 (高稀释倍数) 蜡样芽胞杆菌典型菌落的总数;
- B_1 ——第一稀释度 (低稀释倍数) 鉴定结果为蜡样芽胞杆菌的菌落数;
- B_2 ——第二稀释度 (高稀释倍数) 鉴定结果为蜡样芽胞杆菌的菌落数;
- C_1 ——第一稀释度 (低稀释倍数) 用于蜡样芽胞杆菌鉴定的菌落数;
- C_2 ——第二稀释度 (高稀释倍数) 用于蜡样芽胞杆菌鉴定的菌落数;
- 1.1——计算系数 (如果第二稀释度蜡样芽胞杆菌鉴定结果为 0, 计算系数采用 1);
- d ——稀释因子 (第一稀释度)。

4.5 结果与报告

4.5.1 根据 MYP 平板上蜡样芽胞杆菌的典型菌落数, 按 4.4 中公式 (1)、公式 (2) 计算, 报告每 g (mL) 样品中蜡样芽胞杆菌菌数, 以 CFU/g (mL) 表示; 如 T 值为 0, 则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。

4.5.2 必要时报告蜡样芽胞杆菌生化分型结果。

5 蜡样芽胞杆菌 MPN 计数法 (第二法)

5.1 检验程序

蜡样芽胞杆菌 MPN 计数法检验程序见图 2。

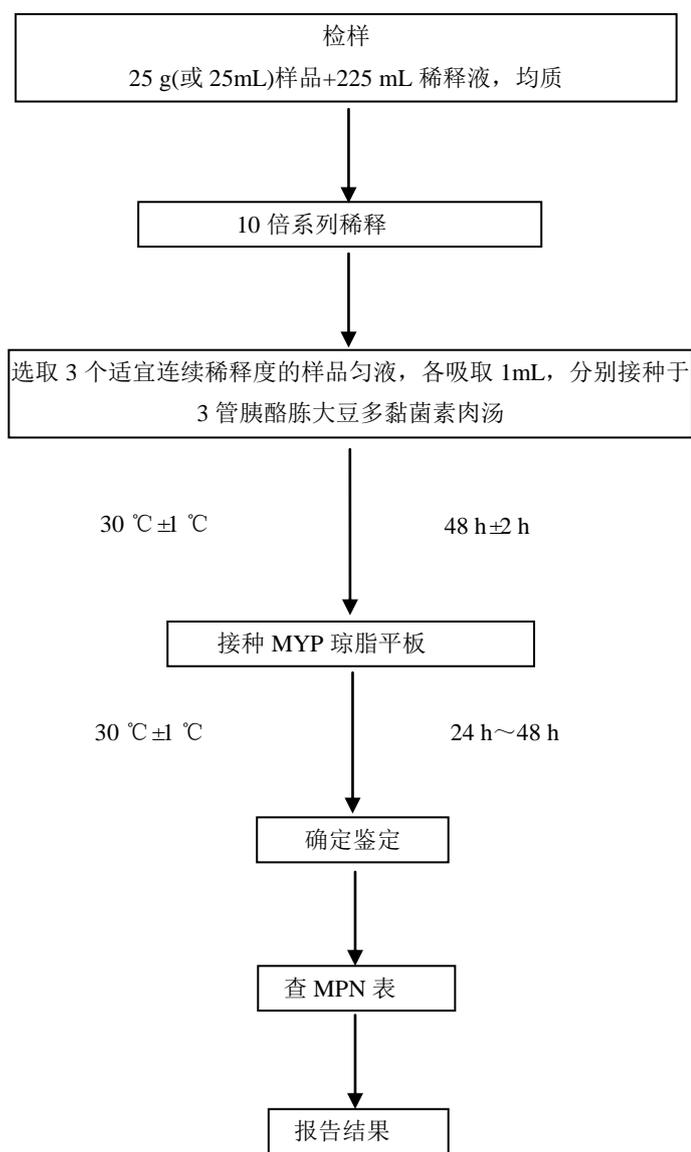


图 2 蜡样芽胞杆菌 MPN 计数法检验程序

5.2 操作步骤

5.2.1 样品处理

同 4.2.1。

5.2.2 样品制备

同 4.2.2。

5.2.3 样品的稀释

同 4.2.3。

5.2.4 样品接种

取 3 个适宜连续稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），接种于 10 mL 胰酪胨大豆多黏菌素肉汤中，每一稀释度接种 3 管，每管接种 1 mL（如果接种量需要超过 1 mL，则用双料胰酪胨大豆多黏菌素肉汤）。于 $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 。

5.2.5 培养

用接种环从各管中分别移取 1 环，划线接种到 MYP 琼脂平板上， $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 。如果菌落不典型，可继续培养 $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 再观察。

5.2.6 确定鉴定

从每个平板选取 5 个典型菌落（小于 5 个全选），划线接种于营养琼脂平板做纯培养， $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ ，进行确证实验，见 4.3。

5.3 结果与报告

根据证实为蜡样芽胞杆菌阳性的试管管数，查 MPN 检索表（见附录 B），报告每 g（mL）样品中蜡样芽胞杆菌的最可能数，以 MPN/g（mL）表示。

附录 A

培养基和试剂

A.1 磷酸盐缓冲液 (PBS)

A.1.1 成分

磷酸二氢钾	34.0 g
蒸馏水	500.0 mL

A.1.2 制法

贮存液：称取 34.0 g 的磷酸二氢钾溶于 500 mL 蒸馏水中，用大约 175 mL 的 1mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2，用蒸馏水稀释至 1000 mL 后贮存于冰箱。

稀释液：取贮存液 1.25 mL，用蒸馏水稀释至 1 000 mL，分装于适宜容器中，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 甘露醇卵黄多黏菌素 (MYP) 琼脂

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉粉	1.0 g
D-甘露醇	10.0 g
氯化钠	10.0 g
琼脂粉	12.0~15.0 g
0.2 % 酚红溶液	13.0 mL
50 % 卵黄液	50.0 mL
多黏菌素 B	100,000 IU
蒸馏水	950.0 mL

A.2.2 制法

将 A.2.1 前五种成分加入于 950 mL 蒸馏水中，加热溶解，校正 pH 至 7.3 ± 0.1 ，加入酚红溶液。分装，每瓶 95 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。临用时加热溶化琼脂，冷却至 50 °C，每瓶加入 50% 卵黄液 5 mL 和浓度为 10000 IU 的多黏菌素 B 溶液 1 mL，混匀后倾注平板。

A.2.2.1 50 % 卵黄液

取鲜鸡蛋，用硬刷将蛋壳彻底洗净，沥干，于 70% 酒精溶液中浸泡 30 min。用无菌操作取出卵黄，加入等量灭菌生理盐水，混匀后备用。

A.2.2.2 多黏菌素 B 溶液

在 50 mL 灭菌蒸馏水中溶解 500 000 IU 的无菌硫酸盐多黏菌素 B。

A.3 胰酪胨大豆多黏菌素肉汤

A.3.1 成分

胰酪胨（或酪蛋白胨）	17.0g
植物蛋白胨（或大豆蛋白胨）	3.0 g
氯化钠	5.0 g
无水磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
多黏菌素B	100 IU/mL
蒸馏水	1 000.0 mL

A.3.2 制法

将 A.3.1 前五种成分加入于蒸馏水中，加热溶解，校正 pH 至 7.3 ± 0.2 ， 121°C 高压灭菌 15 min。临用时加入多黏菌素 B 溶液混匀即可。多黏菌素 B 溶液制法同附录 A.2.2.2。

A.4 营养琼脂

A.4.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂粉	12.0~15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.4.2 制法

将 A.4.1 所述成分溶解于蒸馏水内，校正 pH 至 7.2 ± 0.2 ，加热使琼脂溶化。 121°C 高压灭菌 15 min，备用。

A.5 过氧化氢溶液

A.5.1 试剂

3%过氧化氢溶液：临用时配制，用 H_2O_2 配制。

A.5.2 试验方法

用细玻璃棒或一次性接种针挑取单个菌落，置于洁净试管内，滴加 3%过氧化氢溶液 2 mL，观察结果。

A.5.3 结果

于 30s 内发生气泡者为阳性，不发生气泡者为阴性。

A.6 动力培养基

A.6.1 成分

胰酪胨（或酪蛋白胨）	10.0 g
------------	--------

酵母粉	2.5 g
葡萄糖	5.0 g
无水磷酸氢二钠	2.5 g
琼脂粉	3.0 ~5.0g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 6.2 制法

将 A.6.1 所述成分于蒸馏水，校正 pH 至 7.2 ± 0.2 ，加热溶解。分装每管 2 mL~3 mL。115 °C 高压灭菌 20 min，备用。

A. 6.3 试验方法

用接种针挑取培养物穿刺接种于动力培养基中，30 °C ± 1 °C 培养 48 h ± 2 h。蜡样芽胞杆菌应沿穿刺线呈扩散生长，而蕈状芽胞杆菌常常呈绒毛状生长，形成蜂巢状扩散。动力试验也可用悬滴法检查。蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌通常运动极为活泼，而炭疽杆菌则不运动。

A. 7 硝酸盐肉汤

A. 7.1 成分

蛋白胨	5.0 g
硝酸钾	0.2 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 7.2 制法

将 A.7.1 所述成分溶解于蒸馏水。校正 pH 至 7.4，分装每管 5 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。

A. 7.3 硝酸盐还原试剂

甲液：将对氨基苯磺酸 0.8 g 溶解于 2.5 mol/L 乙酸溶液 100 mL 中。

乙液：将甲萘胺 0.5 g 溶解于 2.5 mol/L 乙酸溶液 100 mL 中。

A. 7.4 试验方法

接种后在 36 °C ± 1 °C 培养 24 h~72 h。加甲液和乙液各 1 滴，观察结果，阳性反应立即或数分钟内显红色。如为阴性，可再加入锌粉少许，如出现红色，表示硝酸盐未被还原，为阴性。反之，则表示硝酸盐已被还原，为阳性。

A. 8 酪蛋白琼脂

A. 8.1 成分

酪蛋白	10.0 g
牛肉粉	3.0 g
无水磷酸氢二钠	2.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂粉	12.0~15.0 g

蒸馏水	1 000.0 mL
0.4 %溴麝香草酚蓝溶液	12.5 mL

A.8.2 制法

除溴麝香草酚蓝溶液外，将 A.8.1 所述各成分溶于蒸馏水中加热溶解（酪蛋白不会溶解）。校正 pH 至 7.4 ± 0.2 ，加入溴麝香草酚蓝溶液， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min 后倾注平板。

A.8.3 试验方法

用接种环挑取可疑菌落，点种于酪蛋白琼脂培养基上， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ ，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）。阴性反应时应继续培养 72 h 再观察。

A.9 硫酸锰营养琼脂培养基

A.9.1 成分

胰蛋白胨	5.0 g
葡萄糖	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
磷酸氢二钾	4.0 g
3.08% 硫酸锰 ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.0 mL
琼脂粉	12.0~15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.9.2 制法

将 A.9.1 所述成分溶解于蒸馏水。校正 pH 至 7.2 ± 0.2 。 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min，备用。

A.10 0.5 % 碱性复红

A.10.1 成分

碱性复红	0.5 g
乙醇	20.0 mL
蒸馏水	80.0 mL

A.10.2 制法

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。

A.11 动力培养基

A.11.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸粉	3.0 g
琼脂	4.0 g

氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 11.2 制法

将 A.11.1 所述成分溶解于蒸馏水。校正 pH 至 7.2 ± 0.2 ，分装小试管， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min，备用。

A. 12 糖发酵管

A. 12.1 成分

牛肉粉	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	3.0 g
磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.0 g
0.2 % 溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 12.2 制法

A. 12.2.1 糖发酵管按 A.12.1 所述成分分配好后，校正 pH 至 7.2 ± 0.2 ，按 0.5 % 加入葡萄糖，分装于一个有倒置小管的小试管内， $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A. 12.2.2 其他各种糖发酵管可按 A.12.1 所述成分分配好后，分装每瓶 100 mL， $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。另将各种糖类分别配好 10 % 溶液，同时 $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。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。

注：蔗糖不纯，加热后会自行水解者，应采用过滤法除菌。

A. 12.3 试验方法

挑取可疑菌落接种于葡萄糖发酵管中，厌氧条件下 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 。培养基由红色变为黄色者表明该菌在厌氧条件下能发酵葡萄糖。

A. 13 V-P培养基

A. 13.1 成分

磷酸氢二钾	5.0 g
蛋白胨	7.0 g
葡萄糖	5.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 13.2 制法

将 A.13.1 所述成分溶解于蒸馏水。校正 pH 至 7.0 ± 0.2 ，分装每管 1 mL。 $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 20 min，备用。

A. 13.3 试验方法

用营养琼脂培养物接种于本培养基中, 36 °C ±1 °C 培养 48 h~72 h。加入 6 %α-萘酚-乙醇溶液 0.5 mL 和 40 %氢氧化钾溶液 0.2 mL, 充分振摇试管, 观察结果, 阳性反应立即或于数分钟内出现红色。如为阴性, 应放在 36 °C ±1 °C 培养 4 h 再观察。

A. 14 胰酪胨大豆羊血 (TSSB) 琼脂

A. 14.1 成分

胰酪胨 (或酪蛋白胨)	15.0 g
植物蛋白胨 (或大豆蛋白胨)	5.0 g
氯化钠	5.0 g
无水磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
琼脂粉	12.0~15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 14.2 制法

将 A.14.1 所述各成分于蒸馏水中加热溶解。校正 pH 至 7.2±0.2, 分装每瓶 100 mL。121 °C 高压灭菌 15 min。水浴中冷却至 45 °C~50 °C, 每 100 mL 加入 5~10 mL 无菌脱纤维羊血, 混匀后倾注平板。

A. 15 溶菌酶营养肉汤

A. 15.1 成分

牛肉粉	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
蒸馏水	990.0 mL
0.1%溶菌酶溶液	10.0 mL

A. 15.2 制法

除溶菌酶溶液外, 将 A.15.1 所述成分溶解于蒸馏水。校正 pH 至 6.8±0.1, 分装每瓶 99 mL。121 °C 高压灭菌 15 min。每瓶加入 0.1 %溶菌酶溶液 1 mL, 混匀后分装灭菌试管, 每管 2.5 mL。0.1%溶菌酶溶液配制: 在 65 mL 灭菌的 0.1 mol/L 盐酸中加入 0.1 g 溶菌酶, 隔水煮沸 20 min 溶解后, 再用灭菌的 0.1 mol/L 盐酸稀释至 100 mL。或者称取 0.1 g 溶菌酶溶于 100 mL 的无菌蒸馏水后, 用孔径为 0.45 μm 硝酸纤维素膜过滤。使用前测试是否无菌。

A. 15.3 试验方法

用接种环取纯菌悬液一环, 接种于溶菌酶肉汤中, 36 °C ±1 °C 培养 24 h。蜡样芽胞杆菌在本培养基 (含 0.001 %溶菌酶) 中能生长。如出现阴性反应, 应继续培养 24 h。

A. 16 西蒙氏柠檬酸盐培养基

A. 16.1 成分

氯化钠	5.0 g
-----	-------

硫酸镁 (MgSO ₄ ·7 H ₂ O)	0.2 g
磷酸二氢氨	1.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
柠檬酸钠	1.0 g
琼脂粉	12.0~15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
0.2 %溴麝香草酚蓝溶液	40.0 mL

A. 16.2 制法

除溴麝香草酚蓝溶液和琼脂外，将 A.16.1 所述各成分溶解于 1000.0 mL 蒸馏水内，校正 pH 至 6.8，再加琼脂，加热溶化。然后加入溴麝香草酚蓝溶液，混合均匀后分装试管，121 °C 高压灭菌 15 min。制成斜面。

A. 16.3 试验方法

挑取少量琼脂培养物接种于西蒙氏柠檬酸培养基，36 °C ± 1 °C 培养 4d。每天观察结果，阳性者斜面上有菌落生长，培养基从绿色转为蓝色。

A. 17 明胶培养基

A. 17.1 成分

蛋白胨	5.0 g
牛肉粉	3.0 g
明胶	120.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 17.2 制法

将 A.17.1 所述成分混合，置流动蒸汽灭菌器内，加热溶解，校正 pH 至 7.4~7.6，过滤。分装试管，121 °C 高压灭菌 10 min，备用。

A. 17.3 试验方法

挑取可疑菌落接种于明胶培养基，36 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h，取出，2 °C ~ 8 °C 放置 30 min，取出，观察明胶液化情况。

附录B

蜡样芽胞杆菌最可能数（MPN）检索表

每g(mL)检样中蜡样芽胞杆菌最可能数（MPN）的检索见表B.1。

表B.1 蜡样芽胞杆菌最可能数（MPN）检索表

阳性管数			MPN	95%置信区间		阳性管数			MPN	95%置信区间	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	—	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	—

注1：本表采用3个稀释度[0.1 g (mL)、0.01 g (mL)和0.001 g (mL)]、每个稀释度接种3管。

注2：表内所列检样量如改用1 g (mL)、0.1 g (mL)和0.01 g (mL)时，表内数字应相应降低10倍；如改用0.01 g (mL)、0.001 g (mL)、0.0001 g (mL)时，则表内数字应相应增高10倍，其余类推。