

### 配方乳粉中蜡样芽胞杆菌的分离鉴定和 毒力基因的检测

The isolation and identification of *Bacillus cereus* in powdered formula  
and the detection of its virulence genes

2024 - 04 - 01 发布

2024 - 05 - 01 实施

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由浙江省农产品质量安全学会提出并归口。

本文件起草单位：浙江大学动物科学学院、国科大杭州高等研究院、贝因美股份有限公司、浙江省农业科学院农产品质量安全与营养研究所。

本文件主要起草人：乐敏、唐标、尹睿、滕霖、廖思豪、冯梦瑶、李艳、熊丽娜、高悦华、张艺。

# 配方乳粉中蜡样芽胞杆菌的分离鉴定和毒力基因的检测

## 1 范围

本文件规定了配方乳粉来源的蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*) 的分离鉴定和定量检测方法中的设备和材料、培养基和试剂、样品制备与菌株分离鉴定、平板计数法 (第一法)、MPN 计数法 (第二法)、毒力基因的 PCR 检测及生物安全的要求。

本文件适用于配方乳粉中蜡样芽胞杆菌的分离鉴定和毒力基因的检测。

本文件第一法适用于蜡样芽胞杆菌含量较高的配方乳粉样品中蜡样芽胞杆菌的检验计数；第二法适用于蜡样芽胞杆菌含量较低的配方乳粉样品中蜡样芽胞杆菌的检验计数。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则
- GB 4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定
- GB 4789.14 食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验
- GB 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 设备和材料

### 4.1 设备

用于细菌分离的微生物实验室应符合 GB 19489 生物安全二级实验室 (BSL-2) 要求，灭菌、培养和鉴定设备按 GB 4789.1 执行，其他设备如下：

- 冰箱：-10℃～-20℃；
- 恒温培养箱：30℃±1℃、36℃±1℃；
- 均质器；
- 电子天平：感量 0.1 g 和 0.001 g；
- 显微镜：10 倍～100 倍 (油镜)；
- 微量可调移液器 (0.1 μL～2 μL、1 μL～10 μL、10 μL～100 μL、100 μL～1000 μL)；
- 水浴锅；
- 涡旋振荡器；
- 混匀仪 (振荡频率 1,400 r/min 以上)；
- 台式离心机 (离心转速 2,000 r/min)；
- 高速台式离心机 (离心转速 12,000 r/min 以上)；
- 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 扩增仪；
- 核酸电泳仪；
- 凝胶成像系统；

- 灭菌锅；
- pH 计；
- 全自动生化鉴定系统；
- 菌落自动计数仪；
- 微量核酸蛋白浓度测定仪；
- 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（选做）。

#### 4.2 材料

除微生物实验室常规材料外，其他材料如下：

- 灭菌离心管（1.5 mL、2 mL）；
- 灭菌吸头（10  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 mL）；
- 灭菌PCR扩增反应管；
- 无菌锥形瓶：100 mL、500 mL；
- 无菌平皿：直径 90 mm；
- 无菌试管：18 mm $\times$ 180 mm；
- 载玻片、盖玻片、油镜相关油擦镜纸、染色试剂；
- L 型涂布棒；
- API 鉴定试剂条。

### 5 培养基和试剂

#### 5.1 实验用水

培养基配制应符合GB 4789.28的规定，试剂配制用水应符合GB/T 6682的规定。

#### 5.2 培养基

- 5.2.1 磷酸盐缓冲液（PBS）：见附录 A 中 A.1。
- 5.2.2 甘露醇卵黄多黏菌素（MYP）琼脂：见附录 A 中 A.2。
- 5.2.3 胰酪胨大豆多黏菌素肉汤：见附录 A 中 A.3。
- 5.2.4 营养琼脂：见附录 A 中 A.4。
- 5.2.5 过氧化氢溶液：见附录 A 中 A.5。
- 5.2.6 动力培养基：见附录 A 中 A.6。
- 5.2.7 硝酸盐肉汤：见附录 A 中 A.7。
- 5.2.8 酪蛋白琼脂：见附录 A 中 A.8。
- 5.2.9 硫酸锰营养琼脂培养基：见附录 A 中 A.9。
- 5.2.10 0.5% 碱性复红：见附录 A 中 A.10。
- 5.2.11 动力培养基：见附录 A 中 A.11。
- 5.2.12 糖发酵管：见附录 A 中 A.12。
- 5.2.13 V-P（Voges-Proskauer）培养基：见附录 A 中 A.13。
- 5.2.14 胰酪胨大豆羊血（TSSB）琼脂：见附录 A 中 A.14。
- 5.2.15 溶菌酶营养肉汤：见附录 A 中 A.15。
- 5.2.16 西蒙氏柠檬酸盐培养基：见附录 A 中 A.16。
- 5.2.17 明胶培养基：见附录 A 中 A.17。

#### 5.3 试剂

- 5.3.1 细菌基因组 DNA 提取试剂盒。
- 5.3.2 无水乙醇。
- 5.3.3 柠檬酸钠（ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ）。
- 5.3.4 PCR 扩增试剂盒。

#### 5.4 引物

见表 B.1。

## 5.5 标准菌株

蜡样芽孢杆菌 ATCC 14579、蜡样芽孢杆菌 NCTC 11143，毒力基因阳性对照；枯草芽孢杆菌 CMCC(B) 63501，毒力基因阴性对照；蕈状芽孢杆菌 CGMCC 1.7891。

## 6 样品制备与菌株分离鉴定

### 6.1 样品制备

#### 6.1.1 样品保存

冷冻样品（整罐乳粉）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 -20 ~ -10 °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。

#### 6.1.2 样品处理

配方乳粉样品应在无菌环境下开启，使用无菌称量勺和无菌称量纸称取配方乳粉样品 25 g，放入盛有 225 mL 预热至 42 °C 的 2% 柠檬酸钠 ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) 溶液的无菌均质杯内，用均质器以 8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min，制成 1:10 的样品匀液，或放入盛有 225 mL 预热至 42 °C 的 2% 柠檬酸钠溶液的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min。在 8 000 g，4 °C 下离心 15 min，弃掉上清与脂质。

#### 6.1.3 样品的稀释

吸取 6.1.2 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。

### 6.2 分离和培养

#### 6.2.1 分离

用接种环从上述稀释液中移取 1 环，划线接种到 MYP 琼脂平板上，30 °C ± 1 °C 条件下培养 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）。

#### 6.2.2 培养

从上述平板上挑取典型菌落，划线接种于营养琼脂平板进行纯培养，30 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h 后进行确证。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。

### 6.3 确定鉴定（任选其一）

#### 6.3.1 生化鉴定

##### 6.3.1.1 染色镜检

挑取纯培养的单个菌落，革兰氏染色镜检。蜡样芽孢杆菌为革兰氏阳性芽孢杆菌，大小为 (1 μm~1.3 μm) × (3 μm~5 μm)，芽孢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。

##### 6.3.1.2 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 °C 培养 24 h。有动力的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。

##### 6.3.1.3 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24h±2h。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。

#### 6.3.1.4 根状生长试验

挑取单个可疑菌落，在室温干燥1d~2d的营养琼脂平板上，按间隔2cm~3cm左右距离划平行直线于经30℃±1℃培养24h~48h，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。

#### 6.3.1.5 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24h。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24h。巨大芽胞杆菌不生长。

#### 6.3.1.6 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24h±2h，并于室温放置3d~4d，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30s后倾去，再通过火焰干燥，于载玻片上滴满0.5%碱性复红，放火焰上加热（微见蒸气，勿使染液沸腾）持续1min~2min，移去火焰，再更换染色液再次加温染色30s，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。如发现游离芽胞数量较少，应再将培养物置室温2d~3d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。

#### 6.3.1.7 生化分型（选做项目）

蜡样芽胞杆菌与其他芽胞杆菌生化特征的区别，见附录C中表C.1。生化试验也可选用全自动生化鉴定系统进行。根据对柠檬酸盐利用、硝酸盐还原、淀粉水解、V-P试验反应、明胶液化试验的结果，将蜡样芽胞杆菌分成不同生化型别，见附录C中表C.2。

### 6.3.2 PCR 鉴定

#### 6.3.2.1 样品DNA提取

挑取6.2.2中获得的纯培养物，按照试剂盒说明书提取细菌总DNA。

#### 6.3.2.2 PCR扩增

靶基因*gyrB*的PCR检测需配制20μL的反应体系，见表B.2。PCR反应条件：95℃预变性2min；95℃变性15s，57℃退火15s，72℃延伸15s，31个循环后进入72℃，延伸5min，最后16℃保存。检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。用蜡样芽胞杆菌ATCC 14579作阳性对照，用枯草芽胞杆菌作阴性对照，用等体积的无菌水作空白对照。

#### 6.3.2.3 结果判定

吸取2μL PCR产物于2%的琼脂糖凝胶置电泳槽中，在电压120V条件下，电泳30min后，将琼脂糖凝胶置于凝胶成像系统下拍照并判定结果。参考图F.1，出现与阳性对照*gyrB*基因条带大小相同且有明亮条带的菌株鉴定为蜡样芽胞杆菌。

### 6.3.3 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定

挑取6.2.2中获得的纯培养物，均匀涂抹于靶板上的专用靶点孔位；每孔加入1μL 70%甲酸；待自然风干后，每孔加入1μL HCCA（ $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸）基质液；待自然风干后，通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS）进行鉴定。

## 7 平板计数法（第一法）

### 7.1 检验程序

蜡样芽胞杆菌平板计数法检验程序见图 1。

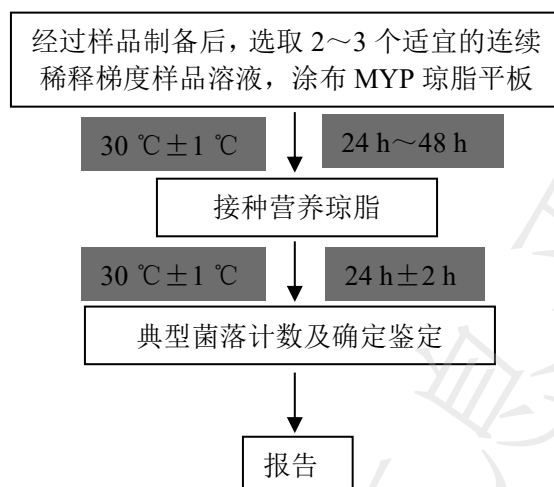


图 1 蜡样芽胞杆菌平板计数法检验程序

## 7.2 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, 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 涂布棒涂布整个平板, 注意不要触及培养基边缘。

## 7.3 计数

7.3.1 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 7.4.1 中公式 (1) 计算, 如果出现 g) 现象则按 7.4.2 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。

7.3.2 从每个平板中挑取至少 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 后, 按 6.3 进行确证。

## 7.4 计算公式

### 7.4.1 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。

#### 7.4.2 菌落计算公式 (2)

$$T = \frac{A_1 B_1 / C_1 + A_2 B_2 / C_2}{1.1d} \dots\dots\dots (2)$$

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)。

#### 7.5 报告

根据 MYP 平板上蜡样芽胞杆菌的典型菌落数, 按 7.4 中公式 (1)、公式 (2) 计算, 报告每 g 样品中蜡样芽胞杆菌菌数, 以 CFU/g 表示; 如  $T$  值为 0, 则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。必要时报告蜡样芽胞杆菌生化分型结果。

### 8 MPN 计数法(第二法)

#### 8.1 检验程序

蜡样芽胞杆菌 MPN 计数法检验程序见图 2。

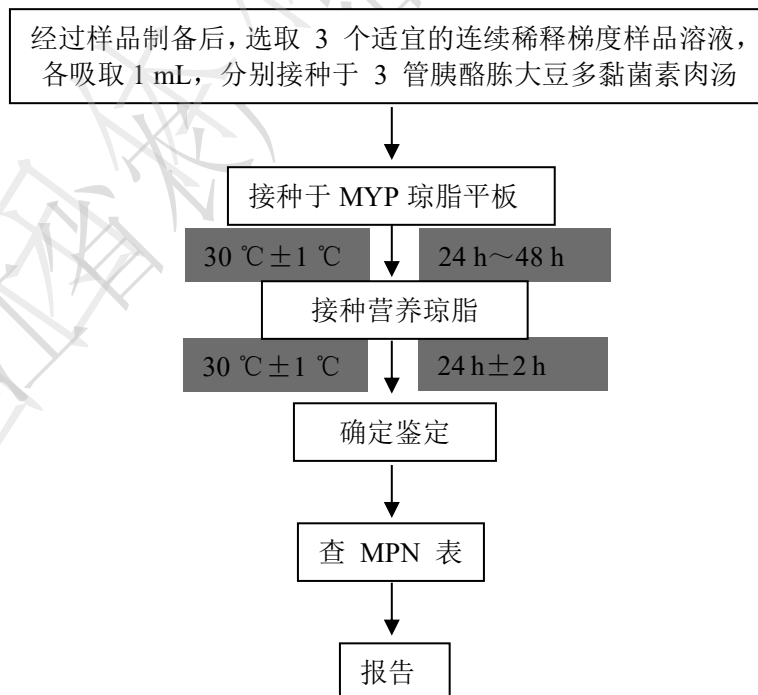


图 2 蜡样芽胞杆菌 MPN 计数法检验程序

#### 8.2 样品接种

在 6.1.3 的样品中，取 3 个适宜连续稀释度的样品匀液 1 mL，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 °C ± 1 °C 培养 48 h ± 2 h。

### 8.3 鉴定

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 °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。从每个平板选取 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 后，按 6.3 进行确证。

### 8.4 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 D），报告每 g 样品中蜡样芽胞杆菌的最可能数，以 MPN/g 表示。国际上对食品中蜡样芽胞杆菌的限量要求参考附录 E。

## 9 毒力基因的 PCR 检测

将按 6.3 进行确证的蜡样芽胞杆菌，进行毒力基因的检测。

### 9.1 样品 DNA 提取

同 6.3.2.1。

### 9.2 PCR 扩增

检测 *cesA*、*hblA*、*entFM*、*cytK* 或 *nheA* 毒力基因的 PCR 反应条件同 6.3.2.2。蜡样芽胞杆菌 NCTC 11143 作检测 *cesA* 基因的阳性对照，蜡样芽胞杆菌 ATCC 14579 作 *hblA*、*entFM*、*cytK* 或 *nheA* 基因的阳性对照，枯草芽胞杆菌 CMCC(B) 63501 作阴性对照，等体积的无菌水作空白对照。

#### 9.2.1 结果判定

参考图 F.1，根据是否出现与阳性对照中各毒力因子大小相同且明亮的条带，判定样品是否携带相应的毒力基因。

## 10 生物安全

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403 的规定执行。  
检测过程中的废弃物处理应严格按照 GB 19489 规定执行。

附 录 A  
(规范性)  
试剂及培养基

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 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2，用蒸馏水稀释至 1 000 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	100 000.0 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  $7.3 \pm 0.1$ ，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 10 000 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）	17.0 g
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 $7.3 \pm 0.2$ ， $121^\circ\text{C}$ 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 $7.2 \pm 0.2$ ，加热使琼脂溶化。 $121^\circ\text{C}$ 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  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30 s 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 ~5.0 g
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  $7.2 \pm 0.2$ ，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  $\pm$  1 °C 培养 48 h  $\pm$  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  $\pm$  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 min 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  $7.4 \pm 0.2$ ,加入溴麝香草酚蓝溶液,121 °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 °C  $\pm$  1 °C 培养 48 h  $\pm$  2 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  $7.2 \pm 0.2$ 。121 °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 $7.2 \pm 0.2$ ，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所述成分配好后，校正pH至 $7.2 \pm 0.2$ ，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。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 $7.0 \pm 0.2$ ，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，充分振荡试管，观察结果，阳性反应立即或于数 min 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 <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> 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 1 000.0 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。

#### 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  
(规范性)  
靶基因和 PCR 体系

## B.1 靶基因和引物

## B.1.1 靶基因名称和引物序列

本文件中的蜡样芽胞杆菌靶基因检测包括 1 个种鉴定基因 *gyrB*、5 个毒力基因 *cesA*、*hblA*、*entFM*、*cytK* 和 *nheA*。通常情况下，蜡样芽胞杆菌同时携带以上多种毒力基因。

根据 B.1 中的序列合成引物，加灭菌双蒸水或超纯水配制成 10  $\mu\text{M}$  储存液，-20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

表 B.1 靶基因和引物

靶基因	引物序列(5'→3')	扩增长度 (bp)	基因功能
<i>gyrB</i>	F: GGATTTAAAAGTCATTGGTGACACCGATCAAACA	165	编码DNA促旋酶的B亚单位
	R: TAATTCACGCATACGAGTTGCTAGCGTATCAAAAT		
<i>cesA</i>	F: TAAAACGGATAGTGGGAAAATAACGAGAAATGC	175	呕吐毒素合成酶基因A
	R: AGGATACGCTTTTGCCCAACTTACTTTTCGAC		
<i>hblA</i>	F: TTTCACCAGTAACAACCTTTTGCAAGATC	120	溶血素BL基因A
	R: ATTTTGCAAATAATCCAGCCT		
<i>entFM</i>	F: TAAAGTCAGCCAAGTGCTA	428	肠毒素FM基因
	R: TACTTTTAAAGCACCAAGTGTT		
<i>cytK</i>	F: GGCGCTAGTGCAACATTACG	482	细胞毒素K基因
	R: TCATACCAGGAGAGAAACCGC		
<i>nheA</i>	F: AAGGCGAATGTACGAGAGTGG	553	非溶血性肠毒素Nhe基因A
	R: CTTCTCTCGTTTGACTATCTGCAG		

## B.1.2 PCR体系配制

体系配制参考表B.2。

表 B.2 PCR 体系配制表

反应组分	体积 $\mu\text{L}$
2 $\times$ PCR 扩增缓冲液	10
10 $\times$ 上游引物 ( <i>gyrB</i> 、 <i>cesA</i> 、 <i>hblA</i> 、 <i>entFM</i> 、 <i>cytK</i> 或 <i>nheA</i> 引物, 10 $\mu\text{M}$ )	1
10 $\times$ 下游引物 ( <i>gyrB</i> 、 <i>cesA</i> 、 <i>hblA</i> 、 <i>entFM</i> 、 <i>cytK</i> 或 <i>nheA</i> 引物, 10 $\mu\text{M}$ )	1
灭菌双蒸水	7
细菌基因组 DNA	1
总体积	20

附 录 C  
(规范性)  
蜡样芽胞杆菌生化特征

C.1 蜡样芽胞杆菌与其他芽胞杆菌生化特征的区别

蜡样芽胞杆菌与其他芽胞杆菌生化特征的区别见表 C.1。

表 C.1 蜡样芽胞杆菌与其他芽胞杆菌生化特征的区别

项目	蜡样芽胞杆菌	苏云金芽胞杆菌	蕈状芽胞杆菌	巨大芽胞杆菌
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<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	+	+	+	-
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

## C.2 蜡样芽胞杆菌生化分型试验

蜡样芽胞杆菌生化分型见表 C.2。

表 C.2 蜡样芽胞杆菌生化分型

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。

附 录 D  
(规范性)  
蜡样芽胞杆菌最可能数 (MPN) 检索表

每 g 检样中蜡样芽胞杆菌最可能数 (MPN) 的检索表见表D.1。

表D.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、0.01 g和0.001 g)、每个稀释度接种 3 管。  
注2: 表内所列检样量如改用 1g、0.1 g 和 0.01 g 时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 0.01 g、0.001 g、0.0001 g 时, 则表内数字应相应增高 10 倍, 其余类推。

附录 E  
(资料性)  
食品中蜡样芽胞杆菌的限量要求

食品中蜡样芽胞杆菌的限量要求见表E.1。

表E.1 食品中蜡样芽胞杆菌的限量要求

食品类型	国家/地区	<i>Bacillus cereus</i> 限量标准 单位 CFU/g(mL)			有潜在危害
		满意	合格(可接受)	不合格(不满意)	
即食食品(米制品)	中国大陆	—	$\leq 10^4$	$> 10^4$	—
非预包装即食食品	中国大陆(广东省地方标准)	$< 10^3$	$10^3 - < 10^5$	$\geq 10^5$	—
即食食品	中国香港	$< 10^3$	$10^3 - < 10^5$	$\geq 10^5$	—
即食食品	中国澳门	$< 10^3$	$10^3 - < 10^4$	$10^4 - < 10^5$	$\geq 10^5$
即食食品	英国	$< 10^3$	$10^3 - < 10^5$	$\geq 10^5$	—
即食食品	澳大利亚-新西兰	$< 10^2$	$10^2 - < 10^3$	$10^3 - < 10^4$	$\geq 10^4$
食品类型	国家/地区	n	c	m	M
婴幼儿配方乳粉及医疗用途食品	欧盟	5	1	50 CFU/g	500 CFU/g

注: n代表同一批次产品应采集的样品件数; c代表最大可允许超出m值的样品数; m代表微生物指标可接受水平的限量值; M代表微生物指标的最高安全限量值。

附录 F  
(资料性)  
PCR 扩增电泳图

*gyrB*、*cesA*、*hblA*、*entFM*、*cytK*、*nheA*基因的PCR电泳图阳性结果见图F.1，没有对应条带或条带微弱则为阴性。

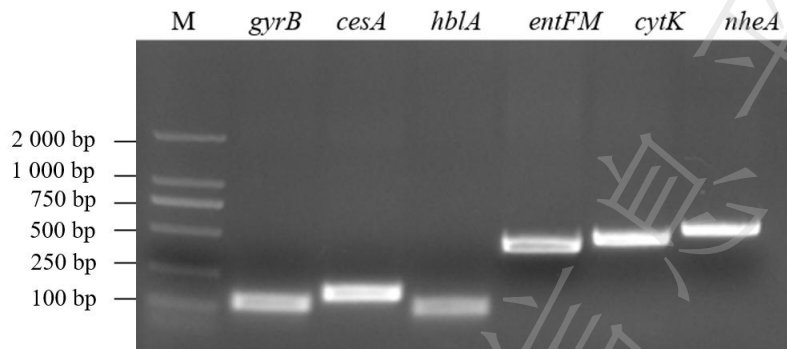


图 F.1 *gyrB*、*cesA*、*hblA*、*entFM*、*cytK*、*nheA*基因的 PCR 电泳图