

ICS 65.120
B 46



中华人民共和国国家标准

GB/T 26427—2010

饲料中蜡样芽孢杆菌的检测

Method for determination of *Bacillus cereus* in feeds

(ISO 7932:2004, Microbiology of food and animal feeding stuffs—
Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*—
Colony-count technique at 30 °C, MOD)

2011-01-14 发布

2011-07-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
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。

本标准使用重新起草法修改采用 ISO 7932:2004《食品和动物饲料的微生物学 推定蜡样芽孢杆菌计数的水平方法 30 ℃时菌落计数技术》(英文版)。

本标准与 ISO 7932:2004 相比在结构上有较多调整,附录 B 中列出了本标准与 ISO 7932:2004 的章条编号对照一览表。

本标准与 ISO 7932:2004 相比存在技术性差异,这些差异涉及的条款已通过在其外侧页边空白位置的垂直单线(|)进行了标识,附录 C 中给出了相应技术性差异及其原因的一览表。

本标准还做了下列编辑性修改:

- 删除了 ISO 7937:2004 的目次;
- 删除了 ISO 7937:2004 的引言;
- 删除了 ISO 7937:2004 的参考文献;
- 增加了蜡样芽孢杆菌的鉴定技术。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:广东省微生物分析检测中心。

本标准主要起草人:朱红惠、孙晓棠、羊宋贞、张鲜姣、陈远良。

饲料中蜡样芽孢杆菌的检测

1 范围

本标准规定了饲料中蜡样芽孢杆菌的检验方法。

本标准适用于饲料中蜡样芽孢杆菌的检测。

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 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB/T 14699.1 饲料 采样(GB/T 14699.1—2005,ISO 6497:2002, IDT)

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备(GB/T 20195—2006,ISO 6498:1998, IDT)

SN/T 1538.2—2007 培养基制备指南 第2部分:培养基性能测试实用指南(SN/T 1538.2—2007,ISO/TS 11133-2:2003,MOD)

3 术语和定义

3.1

蜡样芽孢杆菌 Bacillus cereus

在选择性培养基上能形成典型菌落,并经本标准指定的方法确证为阳性的细菌。

4 原理

4.1 在选择性固体培养基平板表面涂布待定量的待测液体样品或待定量的其他类型待测样品的初始悬液。在相同的条件下制备待测样品或初始悬液的十倍梯度稀释物。

4.2 平板 30 ℃培养 18 h~48 h。

4.3 典型菌落的数量用确证试验证实,计算每毫升或每克试样中蜡样芽孢杆菌菌数。

5 稀释液、培养基及试剂

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂,实验室用水采用蒸馏水或去离子水,或相当纯度的水。

5.1 蛋白胨生理盐水稀释液:参见附录 A 中的 A.1。

5.2 甘露醇卵黄多粘菌素(MYP)琼脂培养基:参见附录 A 中的 A.2。

5.3 羊血琼脂:参见附录 A 中的 A.3。

5.4 革兰氏染色液:参见附录 A 中的 A.4。

5.5 动力培养基:参见附录 A 中的 A.5。

5.6 甲醇。

5.7 0.5%碱性复红染色液:参见附录A中的A.6。

6 设备和玻璃器皿

需配备微生物学常规设备和以下设备。

- 6.1 干热灭菌烘箱或湿热高压灭菌锅。
- 6.2 干燥箱或培养箱:对流通风,能调节温度至37℃±1℃到55℃±1℃。
- 6.3 恒温培养箱:30℃±1℃。
- 6.4 水浴锅:44℃~47℃可调。
- 6.5 pH计:25℃最小检测单位为0.01,精度到±0.1个单位。
- 6.6 玻璃或塑料培养皿:直径9cm~10cm,如必要需直径14cm。
- 6.7 刻度吸管:标记容量为1mL和10mL,最小刻度分别为0.1mL和0.5mL。
- 6.8 玻璃或塑料涂布棒。
- 6.9 显微镜。

7 采样

实验室样品真实、具有代表性。采样工具,如铲子、匙、采样器、试管、广口瓶、剪子等,应是灭菌的。样品送到微生物检验室应越快越好。采样数量和方式按照GB/T 14699.1执行。

8 试样的制备

按照GB/T 20195进行试样的制备,样品制备后应尽快检验。

9 操作步骤

9.1 检样制备、初始悬液和十倍稀释

以无菌操作称取试样25g(mL)加入225mL蛋白胨生理盐水稀释液,均质1min~2min,制成1:10的初始悬液。吸取1:10的稀释液1mL,加入9mL蛋白胨生理盐水稀释液,经充分混匀后制成1:100的稀释液。更高稀释度可按此方法操作。

9.2 接种和培养

9.2.1 用无菌移液管分别吸取0.1mL初始悬液(若样品本身为液体,则直接吸取样液)接种到两个甘露醇卵黄多粘菌素(MYP)琼脂平板(5.2)上。采用同样操作步骤进行1:100的稀释物的接种和培养,必要时可采用同样操作步骤进行更高适宜稀释物的接种和培养。

9.2.2 对含蜡样芽孢杆菌数低于15个的样品,接种1mL的初始悬液于140mm直径的平皿,或分别接种0.3mL、0.3mL、0.4mL于3个90mm直径的平皿,使用无菌涂布棒涂布,可以达到10CFU/g的检测下限。每种方法各做一平行,需要140mm直径的2个大平皿(或90mm直径的6个小平皿)。

9.2.3 使用涂布棒尽可能小心快速地涂布接种液于琼脂表面,涂布棒不得接触平皿边缘。每个平皿用一支无菌涂布棒。涂布好的平皿盖好,置室温中放置15min使接种物完全被琼脂吸收。

9.2.4 翻转上述平皿置30℃培养箱中培养18h~24h。如菌落较小或无菌落生长,或未见典型菌落,可延长培养24h±3h。

9.3 菌落计数

培养后,选择长有 150 个菌落以下的平板,最好是两个连续稀释度的平板。计数每皿中典型的蜡样芽孢杆菌菌落数。典型蜡样芽孢杆菌菌落大,粉红色(表示不发酵甘露醇),周围有晕圈(表示产生卵磷脂酶)。

注 1:如果平板上含有较多的可以发酵甘露醇的微生物,会导致大量产酸,蜡样芽孢杆菌典型的粉红色将减弱或完全消失。

注 2:部分蜡样芽孢杆菌产生很少或不产生卵磷脂酶,这些菌株的菌落周围将不会有晕圈。这些菌落也应该进行确证试验。

如果 1.0 mL 接种液涂布在 3 个平皿上(9.2.2),相当于 1 个平板计数和进行确证试验。

9.4 确证试验

9.4.1 菌落挑选和纯化

挑选计数平板上的 5 个可疑菌落进行确证。如果平板上的可疑菌落数少于 5 个,挑选平板上所有可疑菌落进行确证。

若平板表面出现过度生长不可能选出良好分离的特征菌落时,应将 5 个特征菌落划线在甘露醇卵黄多粘菌素(MYP)琼脂平板上,30 ℃培养 18 h~24 h。从每一平板中选取至少 1 个良好分离的粉红色菌落,进行确证试验。

9.4.2 羊血琼脂上的溶血试验

挑选纯化的菌落划线、穿刺或点接在羊血琼脂(5.3)表面,30 ℃培养 24 h±2 h,观察溶血反应。蜡样芽孢杆菌菌落周围呈现溶血环。

9.4.3 形态观察

将挑选纯化的菌落做革兰氏染色(5.4)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。

9.4.4 动力试验

用接种针挑取选出的菌落穿刺接种于动力培养基(5.5)中,30 ℃培养 24 h±2 h。蜡样芽孢杆菌有动力,沿穿刺线呈扩散生长。

9.4.5 蛋白质结晶毒素试验

取经 30 ℃培养 24 h±2 h 并于室温放置 2 d~3 d 的培养物少许于载玻片上,滴加蒸馏水混涂成薄膜。待自然干燥后用弱火焰固定。于涂膜处加甲醇,半分钟后倾去甲醇,置火焰上干燥。然后滴加 0.5% 碱性复红染色液(5.7),置火焰上加热至微见蒸汽(勿使染液沸腾)后维持 1.5 min,移去火焰,将载玻片放置 0.5 min,倾去染液。用洁净自来水彻底漂洗、晾干、镜检。在油镜下观察有无游离芽孢和深染的似菱形的小结晶体(如游离芽孢形成得不丰富,应将培养物置室温 1 d~2 d 再行检查)。蜡样芽孢杆菌应为阴性,无深染的似菱形的小结晶体。

9.4.6 试验结果

试验结果见表 1。

表 1 试验结果

试验	确证为蜡样芽孢杆菌的试验结果
MYP琼脂(9.4.1)	形成粉红色菌落,周围有晕圈
溶血试验(9.4.2)	阳性*
形态观察(9.4.3)	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
动力试验(9.4.4)	阳性,沿穿刺线呈扩散生长
蛋白质结晶毒素试验(9.4.5)	阴性

10 结果计算与报告

10.1 每个平板中蜡样芽孢杆菌的数量

每个平板中蜡样芽孢杆菌菌落数 a 的计算见式(1):

式中：

a ——每块平板上的蜡样芽孢杆菌菌落数；

b ——挑取后经证实为蜡样芽孢杆菌的菌落数；

A——挑取平板上用于验证的菌落数；

C——平板上的所有特征菌落数。

最终结果按照 GB/T 8170 数值修约规则修约至整数。

示例

若某板上长有 30 个典型菌落,从中选出做确证试验的 5 个菌中有 4 个证实为蜡样芽孢杆菌,则:

$$a = \frac{4}{5} \times 30 = 24$$

10.2 试样中蜡样芽孢杆菌数的计算方法与报告

10.2.1 通常情况下试样中蜡样芽孢杆菌数的计算方法与报告

10.2.1.1 当有两个连续稀释度平板上经确证后的蜡样芽孢杆菌菌数介于 15~150 之间时,按式(2)计算 1 mL 或 1 g 试样中的蜡样芽孢杆菌菌数 N :

式中，

N ——样品中蜡样芽孢杆菌菌落数;

Σa ——所有平板经确证后的蜡样芽孢杆菌菌落数的总和：

V ——平板的接种体积,单位为毫升(mL);

n_1 ——第一个稀释度的平板数;

n_2 ——第二个稀释度的平板数;

d ——第一个稀释度的稀释因子(未经稀释的液体样品的*d* 值为 1)。

按照 GB/T 8170 数值修约规则将计算出的结果保留至两位有效数字,也可记录为 1.0~9.9 乘以 10 的指数幂形式。

报告每毫升或每克试样中蜡样芽孢杆菌数量,单位为 CFU/g(mL)。

示例：

若第一个稀释度(10^{-2})经确证后的菌落数为168和215,第二个稀释度(10^{-3})经确证后的菌落数为14和15,则:

$$N = \frac{168 + 215 + 14 + 15}{0.1 \times (2 + 0.1 \times 2) \times 10^{-2}} = \frac{422}{0.002} = 191\ 820$$

报告每毫升或每克试样中含蜡样芽孢杆菌数量为 1.9×10^5 CFU/g(mL) 或 190 000 CFU/g(mL)。

10.2.1.2 当只有一个稀释度平板上经确证后的蜡样芽孢杆菌菌数介于 15~150 个时,仍然按式(2)计算 1 mL 或 1 g 试样中的蜡样芽孢杆菌数。

示例：

如最后一稀释液(10^{-4})经证实含蜡样芽孢杆菌菌落数分别为120和130，则：

$$N = \frac{120 + 130}{0.1 \times 2 \times 10^{-4}} = \frac{250}{0.000\ 02} = 12\ 500\ 000$$

报告每毫升或每克试样中含蜡样芽孢杆菌数量为 1.2×10^7 CFU/g(mL) 或 12 000 000 CFU/g(mL)。

10.2.2 经确证后的蜡样芽孢杆菌数低于 15 个的情况下的计算方法与报告

10.2.2.1 仅液体测试样品原液或其他样品的初始悬液证实含蜡样芽孢杆菌，且均少于 15

仅液体测试样品原液或其他样品的初始悬液证实含蜡样芽孢杆菌,且均少于 15 时,按式(3)计算 1 mL 或 1 g 样品中的蜡样芽孢杆菌数 N_e 。

式中：

N_e ——样品中蜡样芽孢杆菌数;

Σ_a ——两个被选择平板中经确证后的蜡样芽孢杆菌菌落数的总和；

V ——平板的接种体积,单位为毫升(mL);

d ——稀释度的稀释因子(未经稀释的液体样品的*d*值为1)。

报告每毫升或每克试样中蜡样芽孢杆菌数量。

示例：

某固体样品接种 1 mL 初始悬液的菌落数分别为 8 和 6，则：

$$N = \frac{8 + 6}{1 \times 2 \times 10^{-1}} = \frac{14}{0.2} = 70$$

报告每克试样中含蜡样芽孢杆菌数为 70 CFU/g。

10.2.2.2 液体测试样品原液或其他样品的初始悬液经确证后不含蜡样芽孢杆菌

报告每毫升或每克试样中蜡样芽孢杆菌数量小于 $1/d$ (d 为液体测试样品原液或其他样品的初始悬液的稀释因子,未经稀释的液体样品 d 值为 1)。

附录 A
(资料性附录)
培养基和试剂

A. 1 蛋白胨生理盐水

A. 1. 1 成分

酪蛋白胨	1.0 g
氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 1. 2 制法

溶解各成分子水中,必要时加热。调整 pH 值,使培养基 pH 值在 25 ℃时为 7.0±0.2。

A. 2 甘露醇卵黄多粘菌素(MYP)琼脂培养基

A. 2. 1 基础培养基

A. 2. 1. 1 成分

牛肉膏	1.0 g
酪蛋白胨	10.0 g
D-甘露醇	10.0 g
氯化钠	10.0 g
酚红	0.025 g
琼脂	12.0 g~18.0 g ¹⁾
蒸馏水	900 mL

A. 2. 1. 2 制法

除酚红外加热溶解各成分,调整 pH 值,使培养基 pH 值在 25 ℃时为 7.2±0.2,加入酚红,分装烧瓶,每瓶 90 mL,121 ℃灭菌 15 min。

A. 2. 2 多粘菌素 B 溶液

A. 2. 2. 1 成分

多粘菌素 B	10 ⁶ IU
蒸馏水	100 mL

A. 2. 2. 2 制法

多粘菌素 B 溶于蒸馏水,过滤除菌。

1) 据凝胶强度而定。

A.2.3 卵黄液

取鲜鸡蛋,用硬刷将蛋壳彻底洗净,沥干,放于95%酒精溶液中浸泡30 s,风干。以无菌操作取出卵黄,放入灭菌量筒中,加入4倍体积的无菌水,转移至灭菌烧瓶中混匀。

水浴44 ℃~47 ℃加热2 h,5 ℃±3 ℃静置18 h~24 h,形成沉淀。

以无菌操作收集表面乳状液。

此乳状液5 ℃±3 ℃放置不可超过72 h。

A.2.4 完全培养基

A.2.4.1 成分

基础培养基(A.2.1)	90 mL
多粘菌素B溶液(A.2.2)	1.0 mL
卵黄液(A.2.3)	10.0 mL

A.2.4.2 制法

灭菌的基础培养基冷却至约44 ℃~47 ℃后,加入其他溶液,混匀。

水浴44 ℃~47 ℃冷却此完全培养基。

A.2.5 制备琼脂平板

每个灭菌平板倾注完全培养基15 mL~20 mL,冷却凝固备用。5 ℃±3 ℃最多可保存4天。用之前,最好放置在干燥箱中37 ℃~55 ℃之间,使琼脂表面干燥。

A.2.6 性能测试

性能测试见SN/T 1538.2—2007中的表B.1。

A.3 羊血琼脂

A.3.1 基础培养基

A.3.1.1 成分

蛋白胨	15.0 g
肝消化酶	2.5 g
酵母膏	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	12.0 g~18.0 g ²⁾
蒸馏水	1 000 mL

A.3.1.2 制法

热溶解各成分,调整pH值,使培养基pH值在25 ℃时为7.0±0.2,分装烧瓶,121 ℃灭菌15 min。

2) 据凝胶强度而定。

A.3.2 完全培养基

A.3.2.1 成分

基础培养基(A.3.1)	100 mL
无菌脱纤维羊血	5 mL~7 mL

A.3.2.2 制法

灭菌的基础培养基冷却至约44℃~47℃后,加入无菌脱纤维羊血,混匀。
每个灭菌平板至少倾注脱纤维羊血完全培养基12 mL,冷却凝固备用。

A.4 革兰氏染色液

A.4.1 结晶紫染色液

A.4.1.1 成分

结晶紫	1 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

A.4.1.2 制法

将结晶紫溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

A.4.2 革兰氏碘液

A.4.2.1 成分

碘	1 g
碘化钾	2 g
蒸馏水	300 mL

A.4.2.2 制法

将碘与碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许,充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至300 mL。

A.4.3 沙黄复染液

A.4.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

A.4.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.4.4 染色法

将涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染色液,染色1 min,水洗;滴加革兰氏碘液,作用1 min,水洗;

滴加 95%乙醇脱色,约 30 s,水洗;滴加沙黄复染液,复染 1 min,水洗,待干,镜检。

A.5 动力培养基

A.5.1 成分

胰蛋白胨	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	3.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

热溶解各成分,必要时,调整 pH 值,使培养基 pH 值在 25 ℃时为 7.3±0.2。分装试管,每管约 5 mL,121 ℃灭菌 15 min。

A.6 0.5%碱性复红染色液

A.6.1 成分

碱性复红染料	0.5 g
95%乙醇	20 mL
蒸馏水	80 mL

A.6.2 制法

将碱性复红染料溶解于乙醇中,然后加蒸馏水。如有不溶物时,可用滤纸过滤或静置后取上清液备用。

附录 B
(资料性附录)
本标准与 ISO 7932:2004 相比的结构变化情况

本标准与 ISO 7932:2004 相比在结构上有较多调整,具体章条编号对照情况见表 B. 1。

表 B. 1 本标准与 ISO 7932:2004 的章条编号对照情况

本标准章条编号	对应的国际标准章条编号
5. 4~5. 7	—
6. 9	—
9. 4. 3~9. 4. 5	—
9. 4. 6	9. 4. 3
10. 1~10. 2	10. 1
—	10. 3
—	11
附录 A	—
A. 1~A. 3	5. 1~5. 3
A. 4~A. 6	—
附录 B	—
附录 C	—
—	附录 A
—	附录 B

附录 C
(资料性附录)
本标准与 ISO 7932:2004 的技术性差异及其原因

表 C.1 给出了本标准与 ISO 7932:2004 的技术性差异及其原因。

表 C.1 本标准与 ISO 7932:2004 的技术性差异及其原因

本标准章条编号	技术性差异	原因
1	删除了 ISO 7932:2004 关于食品以及食品生产和食品处理过程中环境样品的适用范围	根据我国国情,食品与动物饲料分别制定标准
1	删除了 ISO 7932:2004“注:为了有一个切实可行的检测方法,确证试验仅包括在 MYP 培养基上的典型菌落特征和溶血试验。因此引入了‘推定’这个词,因为确证试验不能将蜡样芽孢杆菌和相近的但通常很少遇到的芽孢杆菌如炭疽芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、革状芽孢杆菌区分开。增加运动性试验可以区分蜡样芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌。”	增加了确证试验,可以将蜡样芽孢杆菌和相近的但通常很少遇到的芽孢杆菌如炭疽芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、革状芽孢杆菌区分开
2	关于规范性引用文件,本标准做了具有技术性差异的调整,调整的情况集中反映在第 2 章“规范性引用文件”中,具体调整如下: ——删除了 ISO 6887-1:1999; ——删除了 ISO 7218:1996; ——删除了 ISO 8261; ——用修改采用国际标准的 SN/T 1538.2—2007,代替了 ISO/TS 11133-2:2003; ——增加引用了 GB/T 8170; ——增加引用了 GB/T 14699.1; ——增加引用了 GB/T 20195	删除的国际标准无对应的国内标准,为便于标准使用者使用,本标准将这些内容直接列出纳入本标准中;引用 SN/T 1538.2—2007,便于标准使用者使用中文术语
5	只列出了培养基及试剂名称,将成分及配制方法转至附录 A 中	按 GB/T 20000.1 要求,与我国标准版式保持一致
5.4~5.7	增加了革兰氏染色液、动力培养基、甲酇、0.5%碱性复红染色液	本标准增加的确证试验所需的试剂和培养基
6.9	增加了显微镜	本标准增加的确证试验所需的仪器
7	将 ISO 7932:2004 中采样按照相应的国际标准执行,如果没有标准可按双方达成的一致意见执行,改为按照国内标准 GB/T 14699.1 执行	我国饲料采样有标准
8	将 ISO 7932:2004 中试样的制备按照相应的国际标准执行,如果没有标准可按双方达成的一致意见执行,改为按照国内标准 GB/T 20195 执行	我国饲料试样的制备有标准

表 C. 1 (续)

本标准章条编号	技术性差异	原因
9.1	将 ISO 7932:2004 中 9.1 引用的 ISO 6887-1 相关内容列出,纳入本标准中	便于标准使用者使用
9.4.3~9.4.5	增加了确证试验:形态观察、动力试验和蛋白质结晶毒素试验	区分蜡样芽孢杆菌和相近的但通常很少遇到的芽孢杆菌如炭疽芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、革状芽孢杆菌
10	将 ISO 7932:2004 中 10.1 引用的 ISO 7218:1996/Amd.1: 2001 中相关内容列出,纳入本标准中	便于标准使用者使用
—	删除 ISO 7932:2004 中“10.3 精密度”内容,包括“10.3.1 实验室间测定”、“10.3.2 重复性”和“10.3.3 再现性”	按 GB/T 20000.1 要求,与我国标准版式保持一致
—	删除 ISO 7932:2004 中第 11 章检测报告要求“检测报告应当注明所使用的检测方法,培养温度及其结果。还需要提及在本标准中未涉及的所有操作步骤细节或所有可选步骤以及所有可能影响最终结果的细节。检测报告应当包含对完成检测样品的所有必要的信息。”	按 GB/T 20000.1 要求,与我国标准版式保持一致
附录 A	将培养基和试剂成分及配制方法由 ISO 7932:2004 中第 5 章转至本标准的附录 A 中	按 GB/T 20000.1 要求,与我国标准版式保持一致,此内容属资料性内容,宜安排在标准附录中
—	删除 ISO 7932:2004 中“附录 A(资料性附录)实验室间比对试验数据”	按 GB/T 20000.1 要求,与我国标准版式保持一致
—	删除参考文献	按 GB/T 20000.1 要求,与我国标准版式保持一致