

食品中蜡样芽孢杆菌检验方法验证结果分析

许涵秋 (龙岩市产品质量检验所, 福建龙岩 364000)

摘要 [目的]验证国标平板计数法、最大或然数(most probable number, MPN)计数法检测食品中蜡样芽孢杆菌的适用性。[方法]参照 GB 4789.14—2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验》中平板计数法、MPN 计数法检测样品中蜡样芽孢杆菌浓度,对比不同方法的检测结果。同时以蜡样芽孢杆菌为阳性对照,蕈状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌为阴性对照,验证方法的特异性。[结果]该方法具有特异性,能够准确检出蜡样芽孢杆菌的计数,方法精密度和重复性好,回收率在 84%~100%。[结论]2 种方法均具有适用性和可操作性,均能达到标准方法要求的技术指标水平,检验结果准确可靠。

关键词 食品;蜡样芽孢杆菌;方法验证;平板计数法;MPN 计数法

中图分类号 TS207 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2023)09-0184-06

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.09.044



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Analysis of Verification Results by Detection Method for *Bacillus cereus* in Food

XU Han-qiu (Longyan Product Quality Inspection Institute, Longyan, Fujian 364000)

Abstract [Objective] To verify the applicability of national standard plate counting method and MPN counting method for detecting *Bacillus cereus* in food. [Method] The concentration of *Bacillus cereus* in samples was detected by the first method (plate counting method) and the second method (MPN counting method) according to GB 4789.14-2014 "National Standard for Food Safety, Microbiological Test of Food, Test for *cerus*", and the detection results of different methods were compared. At the same time, *Bacillus cereus* was used as positive control, and *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus megaterium* used as negative control to verify the specificity of the method. [Result] The method had specificity and could accurately detect the count of *Bacillus cereus*. The method had good precision and repeatability and the recovery rate was 84%~100%. [Conclusion] Both methods have applicability and operability, and can meet the technical index level required by the standard method, and the test results are accurate and reliable.

Key words Food; *Bacillus cereus*; Methods validation; Plate counting method; MPN counting method

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)自从 1950 年被 Hauge 氏首次报道其能引起食物中毒以来,就一直为人们所广泛关注^[1]。蜡样芽孢杆菌是一种好氧、兼性厌氧的杆状革兰氏阳性细菌,属于芽孢杆菌科蜡样芽孢杆菌属,能形成热稳定的内生孢子,对环境具有很强的适应性^[2-3]。因此,它能够广泛存在于几乎所有种类食品中,在乳制品、婴幼儿食品、粮食、肉制品、海产品、蜂蜜及蔬菜水果等食品中均检出过蜡样芽孢杆菌^[4-21]。蜡样芽孢杆菌在水、空气、土壤中也广泛存在^[22],有研究表明,蜡样芽孢杆菌在 10~45 ℃、pH 2~11 均可生长,最适生长温度为 28~35 ℃,pH 为 4.3~9.3^[23]。

2017 年,中国疾病预防控制中心卫生应急中心发布的食物中毒事件数据显示,由蜡样芽孢杆菌引起的食物中毒事件分别占食物中毒事件总数和中毒总人数的 1.72%和 3.63%,仅次于细菌性食物中毒、沙门氏菌、副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌肠毒素,位列第五^[24-25]。2014—2016 年,山西省共采集 11 类食品 7 822 份样品进行食源性致病菌检测分析,蜡样芽孢杆菌检出率最高,为 11.0%^[26]。2015—2020 年,江西省丰城市采集辖区内各类食品 604 份样品进行检测分析,结果检出 12 株蜡样芽孢杆菌,检出率为 1.99%^[27]。2018 年,吉林省共采集 8 个辖区内各类外卖食品 830 份样品进行检测分析,结果检出 40 株蜡样芽孢杆菌,检出率为 4.82%^[28]。2011—2015 年,吉林省共采集 9 个辖区内流通环节食品 1 693 份样品进行检测分析,结果检出 557 株蜡样芽孢杆菌,检出率为 32.90%,其中乳与乳制品的蜡样芽孢杆菌污染最

为严重,检出率为 39.45%;其次为餐饮食品和婴幼儿配方食品,检出率分别为 31.49%和 31.09%^[29]。2020 年,武汉市共采集各类食品 200 份样品进行检测分析,结果检出 36 株蜡样芽孢杆菌,检出率 18.00%,为最高^[30]。产毒素蜡样芽孢杆菌按照食物中毒症状分为呕吐型和腹泻型 2 种,其分泌的毒素耐高温、耐高压,在食品加工过程中不能被分解,人们误食被其污染的食品会引起呕吐或者腹泻,可以导致各种局部或全身性感染,如坏死性肠炎、肝功能衰竭、菌血症和脑膜炎^[31-33],甚至导致死亡^[34]。由此可见,快速、准确地检测蜡样芽孢杆菌是控制食品污染和感染后治疗的关键环节。

我国现行的 GB 31607—2021《食品安全国家标准 散装即食食品中致病菌限量》首次在食品安全国家标准中规定了以米为主要原料制作的散装即食食品中蜡样芽孢杆菌的限量为 10 000 CFU/g(mL),而在其他食品中还没有限量要求,建议国家食品安全标准中增加其他类别食品特别是婴幼儿配方食品、婴幼儿辅助食品的蜡样芽孢杆菌指标,更好地确保人民群众食品安全。蜡样芽孢杆菌的检验方法依据 GB 4789.14—2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验》,但该标准中对于蜡样芽孢杆菌检测的部分操作步骤和细节没有详细说明,部分技术参数没有明确规定,这些可能会导致检测的不规范。在使用标准方法进行检测之前,实验室需证实能够正确运用标准方法以验证其技术能力是否达到了标准的规定要求^[35]。该研究通过将蜡样芽孢杆菌和蕈状芽孢杆菌接种于脑心浸出液肉汤(BHI)制备成菌悬液,加标于样品中,按 GB 4789.14—2014 中平板计数法和 MPN 计数法的检验步骤进行检验计数,并在重复条件下对 2 种定量方法进行比较研究,验证方法的重复性、加标

作者简介 许涵秋(1986—),女,福建宁德人,工程师,从事食品安全检测研究。

收稿日期 2022-10-11; **修回日期** 2022-11-21

回收率;同时以蜡样芽孢杆菌为阳性对照,蕈状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌为阴性对照,验证方法的特异性,为完善蜡样芽孢杆菌定量检测提供理论依据,也为制定相关技术验收标准提供基础试验支撑。

1 材料与与方法

1.1 试剂与试剂 蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) [CMCC (B) 63303,广东环凯微生物科技有限公司];蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides*) [CICC 21473,中国工业微生物菌种保藏管理中心];苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*) [CICC 22945,中国工业微生物菌种保藏管理中心];巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) [CGMCC 1.0217,广东微生物菌种保藏管理中心]。脑心浸出液肉汤(BHI)、甘露醇卵黄多黏菌素(MYP)琼脂、多黏菌素B、胰酪胨大豆多黏菌素肉汤(TSB)、营养琼脂、50%卵黄乳液、胰酪胨大豆羊血(TSSB)琼脂、硫酸锰营养琼脂、酪蛋白琼脂、蜡样芽孢杆菌生化鉴定试剂盒、革兰氏染色液、动力-硝酸盐培养基(A法)、磷酸盐缓冲液(PBS)均购自广东环凯微生物科技有限公司;米糕(农贸市场小作坊)。

1.2 仪器与设备 SM 530 自动高压蒸汽灭菌器(重庆雅马拓科技有限公司);AC2-6S1 生物安全柜(新加坡 ESCO 科技有限公司);SPX-250-II 生化培养箱(上海跃进医疗器械有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 菌种活化。将蜡样芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌标准菌株从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出,划线接种至营养琼脂斜面活化,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $18\sim 24\text{ h}$ 。连续转接2代,保证菌种的活性。

1.3.2 混合标准菌液的制备。用 $1\text{ }\mu\text{L}$ 无菌接种环各勾取一环蜡样芽孢杆菌和蕈状芽孢杆菌于 10 mL BHI 培养基, $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 。

1.3.3 样品和加标样稀释液的制备。称取 25 g 米糕于无菌均质袋中,加入 225 mL PBS,制成 10 倍样品稀释液,重复2次。同时称取 24 g 米糕于无菌均质袋中,吸取 1 mL 混合标准菌液加入其中,加入 225 mL PBS,制成 10 倍加标样稀释液。

1.3.4 样品的稀释与接种(平板计数法)。吸取“1.3.3”中

$1:10$ 的样品和加标样稀释液置于 9.0 mL 无菌 PBS 稀释液中,充分混匀制成 $1:100$ 的样品匀液,每递增稀释一次,即换用1次 1 mL 灭菌吸管。根据对样品浓度的估计,选择 $2\sim 3$ 个适宜稀释度的样品匀液,在进行 10 倍递增稀释时,分别吸取 0.3 、 0.3 、 0.4 mL 稀释液于 MYP 琼脂平皿内,用 L 型涂布棒涂抹均匀。分别吸取 0.3 、 0.3 、 0.4 mL 空白稀释液加入3个 MYP 琼脂平皿内作空白对照。静置 10 min ,待样液吸收后,将平板翻转, $(30\pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h ,培养后计数平板上的所有菌落数。

1.3.5 样品的稀释与接种(MPN 计数法)。吸取“1.3.3”中 $1:10$ 的样品和加标样稀释液置于 9.0 mL 无菌 PBS 稀释液中,充分混匀制成 $1:100$ 的样品匀液,每递增稀释一次,即换用1次 1 mL 灭菌吸管。根据对样品浓度的估计,取3个适宜连续稀释度的样品匀液,接种于 10 mL TSB 中,每一稀释度接种3管,每管接种 1 mL 于 $(30\pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 。用 $1\text{ }\mu\text{L}$ 无菌接种环从各管中分别移取1环,划线接种到 MYP 琼脂平板上, $(30\pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 。

1.3.6 菌种确定和鉴定。参照 GB 4789.14—2014 进行革兰氏染色镜检、生化鉴定盒生化分型鉴定。挑取纯培养的单个菌落于高倍(16×100)显微镜下进行革兰氏染色镜检。挑取纯培养的单个菌落,按 GB 4789.14—2014 中步骤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等生化分型鉴定试验。

2 结果与分析

2.1 2种方法的计数结果 按照“1.3”的试验方法,进行培养、验证和计数,结果如表1~2所示。经过计数,混合标准菌液中蜡样芽孢杆菌的平均含量为 $4.7\times 10^6\text{ CFU/mL}$,折算为 25 g 加标样中蜡样芽孢杆菌的含量为 $1.9\times 10^5\text{ CFU/g}$ 。

2.2 2种方法的实际样本加标试验检测结果比较 根据表1~2结果, 25 g 加标样中蜡样芽孢杆菌的含量为 $1.9\times 10^5\text{ CFU/g}$,回收率以平均值除以 1.9×10^5 乘以 100 计算,得平板计数法的回收率为 84.2% 、MPN 计数法的回收率为 100% 。结果如表3所示,结果表明2种方法均能较好地计数食品中蜡样芽孢杆菌的数量。

表1 平板计数法测定结果

Table 1 Detection results of plate counting method

样品 Sample	试验现象 Test phenomenon	菌落含量 Colony content
空白1 Blank 1	稀释度 10^{-1} 、 10^{-2} 平皿上均无菌落生长	$<10\text{ CFU/g}$
空白2 Blank 2	稀释度 10^{-1} 、 10^{-2} 平皿上均无菌落生长	$<10\text{ CFU/g}$
样品1 Sample 1	稀释度 10^{-1} 、 10^{-2} 平皿上均无菌落生长	$<10\text{ CFU/g}$
样品2 Sample 2	稀释度 10^{-1} 、 10^{-2} 平皿上均无菌落生长	$<10\text{ CFU/g}$
加标样1 Add standard sample 1	稀释度 10^{-4} 平皿上典型菌落数之和为 20 CFU	$2.0\times 10^5\text{ CFU/g}$
加标样2 Add standard sample 2	稀释度 10^{-4} 平皿上典型菌落数之和为 14 CFU	$1.4\times 10^5\text{ CFU/g}$
加标样3 Add standard sample 3	稀释度 10^{-4} 平皿上典型菌落数之和为 14 CFU	$1.4\times 10^5\text{ CFU/g}$
混合标准菌液 Mixed standard bacterial solution	重复3组试验,每组平皿上菌落数分别为 5.1×10^6 、 4.7×10^6 、 $4.3\times 10^6\text{ CFU}$,取3组试验平均值	$4.7\times 10^6\text{ CFU/mL}$

表2 MPN计数法测定结果

Table 2 Detection results of MPN counting method

样品 Sample	试验现象 Test phenomenon	菌落含量 Colony content//MPN/g
空白1 Blank 1	稀释度 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 试管均无菌落生长	<3.0
空白2 Blank 2	稀释度 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 试管均无菌落生长	<3.0
样品1 Sample 1	稀释度 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 试管均无菌落生长	<3.0
样品2 Sample 2	稀释度 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 试管均无菌落生长	<3.0
加标样1 Add standard sample 1	稀释度 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 阳性管数分别为3、2、1个	1.5×10^5
加标样2 Add standard sample 2	稀释度 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 阳性管数分别为3、2、2个	2.1×10^5
加标样3 Add standard sample 3	稀释度 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 阳性管数分别为3、2、2个	2.1×10^5

表3 加标样回收率测定结果

Table 3 Detection results of added standard sample recovery

样品 Sample	平板计数法 Plate counting method//CFU/g	MPN计数法 MPN counting method//MPN/g
加标1 Add standard 1	2.0×10^5	1.5×10^5
加标2 Add standard 2	1.4×10^5	2.1×10^5
加标3 Add standard 3	1.4×10^5	2.1×10^5
平均值 Mean	1.6×10^5	1.9×10^5
回收率 Recovery rate//%	84.2	100

对试验结果采用统计假设检验方法分析,运用 F 检验法进行等精度测量判定, T 检验法进行数据一致性判定,判定结果如表4所示。计算步骤如下:

(1) 统计量 $F(f_1, f_2) = \frac{S_1^2}{S_2^2}$, 式中, S_1 为两组对比数据的大

值标准偏差; S_2 为两组对比数据的小值标准偏差; 自由度 $f_1 = n_1 - 1, f_2 = n_2 - 1$; 次数 $n_1 = n_2 = 3$ 。经计算, $F(f_1, f_2) = 1.00$; 取显著水平 $\alpha = 0.05$, 查 F 分布临界值表得概率 $p = 0.95$ 水平下 $F_{0.95}(2, 2) = 19.00$, 可得 $F(f_1, f_2) < F_{0.95}(2, 2)$, 可判断两组对比数据属于等精度测量。

(2) 统计量 $T = \left| \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_p} \right| \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$, $S_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$, 式中, \bar{X}_1, \bar{X}_2 为两组对比数据平均值; S_1, S_2 为两组对比数据标准偏差; S_p 为两组对比数据合并标准偏差。计算得 $T = 1.061$; 取显著水平 $\alpha = 0.05$, 自由度 $f = n_1 + n_2 - 2 = 3 + 3 - 2 = 4$, 查 T 分布双侧临界值表得 $t_{\alpha, f} = t_{0.05, 4} = 2.776$ 。可得 $T < t_{\alpha, f}$, 可判断两组对比数据结果一致。

表4 样品检测结果基本描述统计量

Table 4 Basic descriptive statistics of sample test results

方法 Method	均值 Mean	次数 Times(n)	标准差 SD	自由度 df	统计量 F Statistic F	统计量 T Statistic T
平板计数法 Plate counting method	1.6×10^5 CFU/g	3	0.3×10^5 CFU/g	2	1.00	1.061
MPN计数法 MPN counting method	1.9×10^5 MPN/g	3	0.3×10^5 MPN/g	2		

结果说明2种方法检测结果波动性相对较小,精密度和重复性较好,有利于结果的准确性与重现性。

2.3 确定和鉴定结果

2.3.1 革兰氏染色镜检。蜡样芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌的革兰氏染色镜检结果如图1所示,结果表明4种菌株均为革兰氏阳性芽孢杆菌,大多呈短链排列。其中巨大芽孢杆菌呈单个或短链排列,部分菌镜检结果呈现阴性反应,可能由于其活化效果不佳,菌体死亡或自溶使部分阳性菌呈阴性反应。

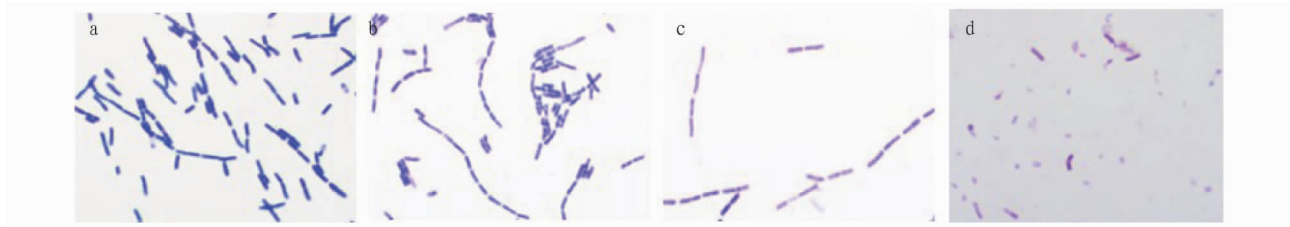
2.3.2 MYP琼脂平板上菌落形态。蜡样芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌在MYP琼脂平板上的培养结果如图2所示,结果表明,蜡样芽孢杆菌的典型菌落为粉红色,表示不发酵甘露醇,周围有白色沉淀环,表示产卵磷脂酶;蕈状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌的典型菌落为粉红色,其中苏云金芽孢杆菌周围有粉色沉淀环;巨大芽孢杆菌在MYP琼脂平板上生长受抑制,典型菌落为灰白色,培养基红色褪去而显示出淡黄色,表示发酵甘露醇产酸,并且周

围无沉淀环,表明该菌株在MYP琼脂平板上不产卵磷脂酶。

2.3.3 营养琼脂平板上菌落形态。蜡样芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌的根状生长试验结果如图3所示,结果表明蜡样芽孢杆菌在营养琼脂平板上呈灰白色,不透明,表面呈融蜡状,边缘呈扩展状,直径4~10 mm,呈粗糙山谷状生长的特征。蕈状芽孢杆菌呈根状生长的特征,苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌均无上述生长典型特征。

2.3.4 动力试验。标准菌株动力试验结果如图4所示,结果表明,蜡样芽孢杆菌在动力培养基中沿穿刺线呈扩散生长,巨大芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌沿穿刺线呈弱扩散生长,蕈状芽孢杆菌沿穿刺线呈绒毛状生长。

2.3.5 溶血试验。蜡样芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌的溶血试验结果如图5所示,结果表明,蜡样芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌在TSSB琼脂平板上产溶血素,有完全溶血环;蕈状芽孢杆菌在TSSB琼脂平板上为弱溶血,巨大芽孢杆菌为不溶血。

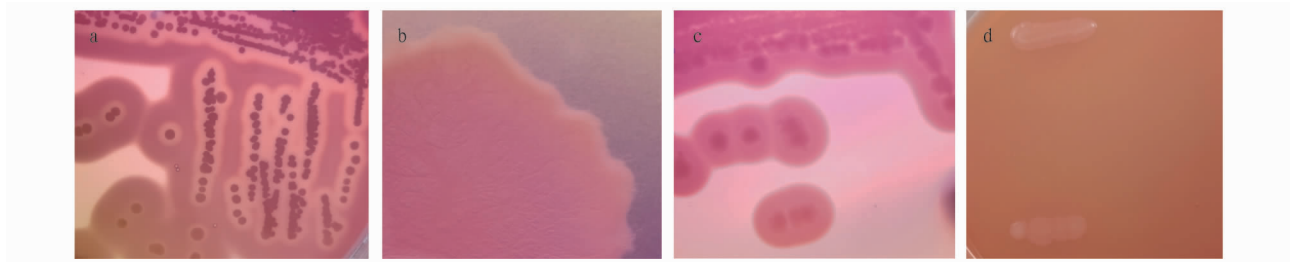


注:a. 蜡样芽孢杆菌;b. 蕈状芽孢杆菌;c. 苏云金芽孢杆菌;d. 巨大芽孢杆菌。

Note:a. *Bacillus cereus*; b. *Bacillus mycooides*; c. *Bacillus thuringiensis*; d. *Bacillus megaterium*.

图1 革兰氏染色镜检(16×100)

Fig. 1 Microscopic examination with Gram strain

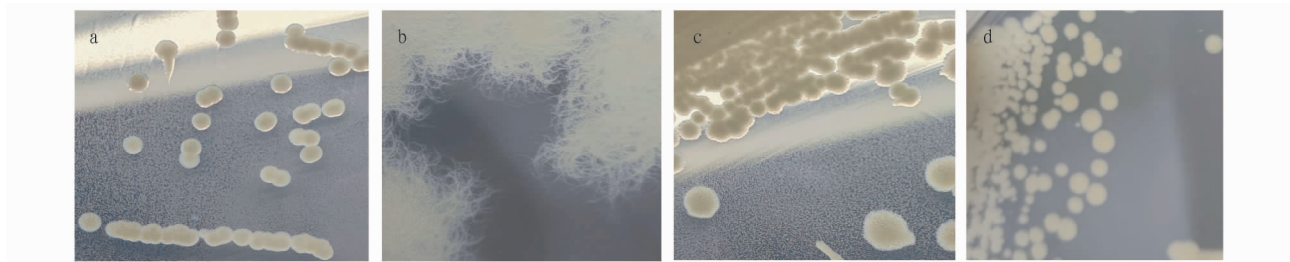


注:a. 蜡样芽孢杆菌;b. 蕈状芽孢杆菌;c. 苏云金芽孢杆菌;d. 巨大芽孢杆菌。

Note:a. *Bacillus cereus*; b. *Bacillus mycooides*; c. *Bacillus thuringiensis*; d. *Bacillus megaterium*.

图2 MYP 琼脂平板上菌落形态

Fig. 2 Colony morphology on MYP agar plate

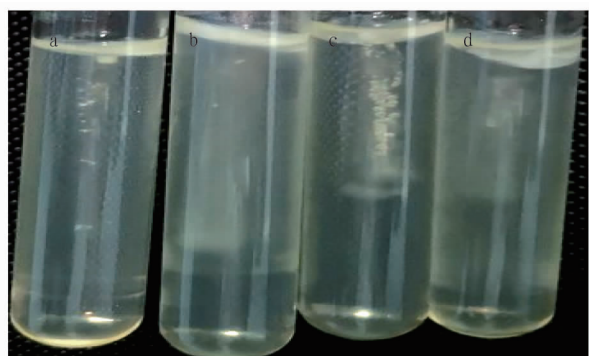


注:a. 蜡样芽孢杆菌;b. 蕈状芽孢杆菌;c. 苏云金芽孢杆菌;d. 巨大芽孢杆菌。

Note:a. *Bacillus cereus*; b. *Bacillus mycooides*; c. *Bacillus thuringiensis*; d. *Bacillus megaterium*.

图3 营养琼脂平板上菌落形态

Fig. 3 Colony morphology on nutrient agar plates



注:a. 巨大芽孢杆菌;b. 蜡样芽孢杆菌;c. 蕈状芽孢杆菌;d. 苏云金芽孢杆菌。

Note:a. *Bacillus megaterium*; b. *Bacillus cereus*; c. *Bacillus mycooides*; d. *Bacillus thuringiensis*.

图4 动力试验

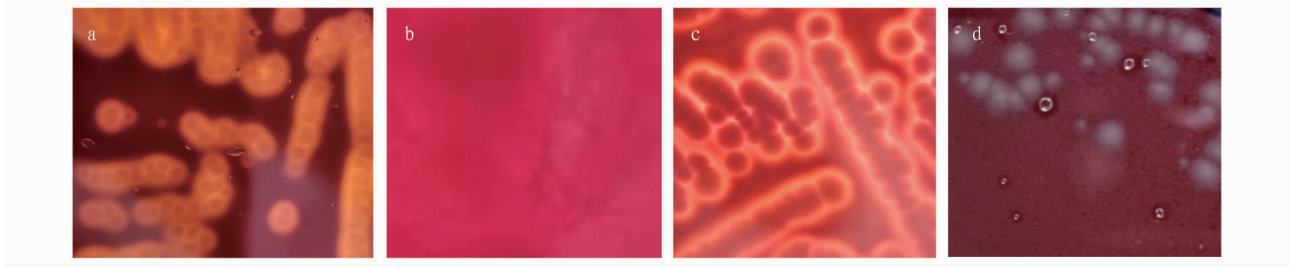
Fig. 4 Dynamic test

2.3.6 酪蛋白分解试验。蜡样芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、苏

云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌的酪蛋白分解试验结果如图6所示,结果表明,蜡样芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌菌株在酪蛋白琼脂平板上均呈阳性反应,说明这些菌株均能分解培养基的酪蛋白,使得培养基由绿色变为蓝色,生成的L-酪氨酸在菌落周围形成透明圈;而巨大芽孢杆菌标准菌株在酪蛋白琼脂平板上无上述现象。

2.3.7 蛋白质毒素结晶试验。蜡样芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌的酪蛋白分解试验结果如图7所示,结果表明4种菌株均有产生游离芽孢(浅红色),其中仅苏云金芽孢杆菌有产生菱形蛋白白色结晶体(深红色)。

2.3.8 其他生化特征。采用生化试剂盒鉴定,结果见表5。结果表明,蜡样芽孢杆菌的生化特征和蕈状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌十分相似。虽然淀粉和明胶的试验能有效区分蜡样芽孢杆菌与其他芽孢杆菌,但不能仅以这2项的试验结果进行判定归属的菌种。

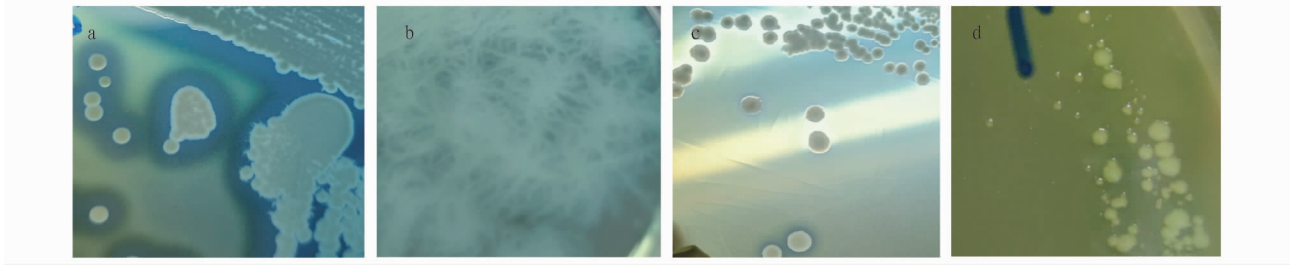


注:a. 蜡样芽孢杆菌;b. 蕈状芽孢杆菌;c. 苏云金芽孢杆菌;d. 巨大芽孢杆菌。

Note:a. *Bacillus cereus*;b. *Bacillus mycoides*;c. *Bacillus thuringiensis*;d. *Bacillus megaterium*.

图 5 溶血试验

Fig. 5 Hemolysis test

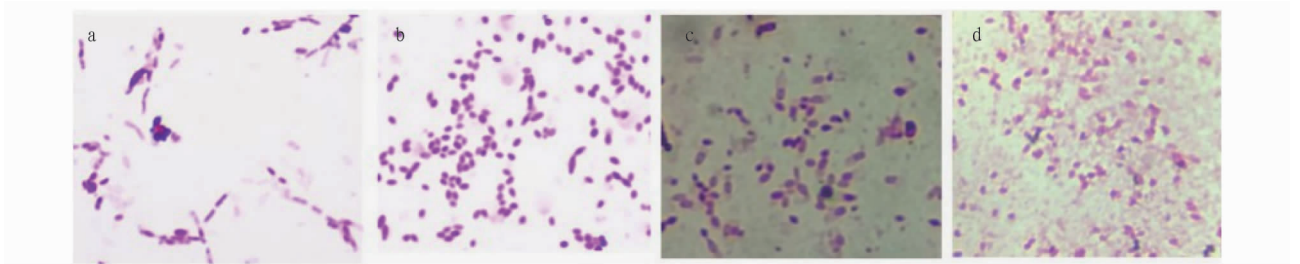


注:a. 蜡样芽孢杆菌;b. 蕈状芽孢杆菌;c. 苏云金芽孢杆菌;d. 巨大芽孢杆菌。

Note:a. *Bacillus cereus*;b. *Bacillus mycoides*;c. *Bacillus thuringiensis*;d. *Bacillus megaterium*.

图 6 酪蛋白分解试验

Fig. 6 Casein decomposition test



注:a. 蜡样芽孢杆菌;b. 蕈状芽孢杆菌;c. 苏云金芽孢杆菌;d. 巨大芽孢杆菌。

Note:a. *Bacillus cereus*;b. *Bacillus mycoides*;c. *Bacillus thuringiensis*;d. *Bacillus megaterium*.

图 7 蛋白质毒素结晶试验(16×100)

Fig. 7 Protein toxin crystallization test

表 5 其他生化特征

Table 5 Other biochemical characteristics

菌株 Bacterial strain	过氧化氢酶 Catalase	硝酸盐还原 Nitrate reduction	溶菌酶耐性 Lysozyme tolerance	葡萄糖 利用(厌氧) Glucose utilization (anaerobic)	V-P 试验 V-P test	甘露醇产酸 Mannitol acid production	淀粉 Starch	明胶 Gelatin
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+	-	-	+
蕈状芽孢杆菌 <i>Bacillus mycoides</i>	+	+	+	+	+	-	+	-
苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	+	+	+	+	+	-	+	-
巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	+	-	-	-	-	+	+	-

3 结论与讨论

近年来,国内外食品中的蜡样芽孢杆菌检出率较高,检验机构正确地按照国家标准方法准确检验食品中的蜡样芽孢杆菌显得十分重要。该研究通过对国家标准 GB 4789.14—2014 中的 2 种定量方法(平板计数法、MPN 计数法)进行比较研究,并在重复条件下对 2 种方法与实际添加菌数进

行对比,结果表明,平板计数法、MPN 计数法均能够很好地计数食品中蜡样芽孢杆菌的含量,方法精密度和重复性较好,回收率在 84%~100%。

同时,该研究以蜡样芽孢杆菌为阳性对照,蕈状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌为阴性对照,通过多种形态学观察和生化试验,验证方法的特异性,结果表明,蜡样芽

孢杆菌和蕈状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌在 MYP 琼脂平板、营养琼脂平板、TSSB 琼脂平板上的菌落形态存在不同程度差异,可以据此将它们区分开来,并以其他生化特征反应为辅助手段;其中营养琼脂平板上的根状生长试验能有效鉴别蜡样芽孢杆菌和蕈状芽孢杆菌。苏云金芽孢杆菌与蜡样芽孢杆菌大部分生化试验结果都相似,只有通过蛋白质毒素结晶试验能有效鉴别开。因此,通过 MYP 琼脂平板分离纯培养后,以根状生长试验和蛋白质毒素结晶试验为关键手段,以形态学观察和生化试验为辅助手段,可以有效鉴别出蜡样芽孢杆菌,大幅降低蜡样芽孢杆菌的结果假阳性率。总之标准方法具有特异性,能够有效鉴别出蜡样芽孢杆菌。

目前,参照国标方法检测食品中蜡样芽孢杆菌的可参考文献较少,对部分操作步骤细节和部分技术参数没有明确规定。如一是国标中未对酪蛋白分解试验中阴阳性反应的试验现象进行说明与解释;二是蛋白质毒素结晶试验,只有当细菌产生大量游离芽孢,毒素结晶体会才会释放出来,才有可能通过染色镜观察到这些结晶体的形态。因此,这个试验的关键是如何让细菌在最短的时间内产生大量的游离芽孢。可按标准将单个可疑菌落接种于硫酸锰营养琼脂平板上,(30±1)℃培养 3~4 d。如镜检时未见游离芽孢,可延长培养时间,直至见到大量游离芽孢为止。染色镜检过程中应严格控制甲醇作用时间及染色时间,清洗时要彻底。蛋白质毒素结晶体的形态是多样的,有菱形、圆形等,并且大小不一。

综上所述,国标中的平板计数法和 MPN 计数法在检测较高浓度的蜡样芽孢杆菌时均具有适用性和可操作性,均能达到标准方法要求的技术指标水平,检验结果准确可靠。但因该试验未对低浓度蜡样芽孢杆菌进行检验,未能验证 2 种方法在不同蜡样芽孢杆菌含量的食品中适用性,因此还需进一步试验验证。

参考文献

- [1] 布瑞德 R E,吉本斯 N E. 伯杰氏系统细菌学手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1984.
- [2] SETLOW P. Spores of *Bacillus subtilis*; Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals[J]. Journal of applied microbiology, 2006, 101(3): 514-525.
- [3] 张玲艳,宋丽丽,贾伟娟,等. 蜡样芽孢杆菌检测方法的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(4): 1360-1372.
- [4] 王慧莹. 基于计算机视觉技术快速检测食品中蜡样芽孢杆菌的研究[D]. 长春:吉林大学, 2011: 1-4.
- [5] ZHANG Z H, FENG L X, XU H Y, et al. Detection of viable enterotoxin-producing *Bacillus cereus* and analysis of toxigenicity from ready-to-eat foods and infant formula milk powder by multiplex PCR[J]. Journal of dairy science, 2016, 99(2): 1047-1055.
- [6] RAMARAO N, SANCHIS V. The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: A review[J]. Toxins, 2013, 5(6): 1119-1139.
- [7] 杨艳华,吕鹏,陈克平. 蜡样芽孢杆菌主要毒素及检测方法的研究进展[J]. 生命科学研究, 2021, 25(6): 471-478, 487.
- [8] 赵月明. 乳制品中蜡样芽孢杆菌的暴露研究[D]. 长沙:中南林业科技大学, 2014.
- [9] 周璐. 湿粉类食品中蜡样芽孢杆菌污染状况、毒力和菌株生长抑制研究[D]. 广州:南方医科大学, 2021.
- [10] 林宇斌. 鲜湿米粉中蜡样芽孢杆菌定量风险评估[D]. 长沙:中南林业科技大学, 2015.
- [11] 蒋荣荣. 我国市售大米中食源性致病菌—蜡样芽孢杆菌的检测和致病性分析[D]. 武汉:武汉轻工大学, 2013.
- [12] 郑开伦. 广州市湿米粉产业链中蜡样芽孢杆菌污染调查[D]. 广州:广州医科大学, 2021.
- [13] 李可维,刘思洁,赵薇,等. 2011~2019 年吉林省米面制品中食源性致病菌监测分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9390-9395.
- [14] 袁花艳,李雪艳,徐伟兵. 惠阳区熟肉制品中致病菌污染状况分析[J]. 食品安全导刊, 2021(25): 56-57.
- [15] 王静. 发酵肉制品中有害微生物安全风险评估[D]. 天津:天津科技大学, 2016.
- [16] 周婷婷. 蜡样芽孢杆菌在腐乳中的污染状况及其控制方法研究[D]. 广州:华南理工大学, 2013.
- [17] 曹飞扬. 北京市腐乳中蜡样芽孢杆菌检测及毒力基因和耐药性研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2017.
- [18] 杨久玲,张燧,黄坤宁,等. 贵阳市售腐乳蜡样芽孢杆菌污染研究分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(7): 2876-2880.
- [19] 何灏宇,杨久玲. 贵州某地自制腐乳微生物污染情况研究[J]. 食品安全导刊, 2022(19): 77-81.
- [20] 徐石勇,于海涛,刘娜,等. 天津市 2015~2019 年生鲜果蔬病原微生物污染排查分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(16): 274-280.
- [21] 肖兴宁,王珍,何天,等. 浙江省生菜致病菌污染现状与分析[J]. 浙江农业科学, 2020, 61(11): 2333-2335.
- [22] 曹飞扬,王姆,江连洲,等. 蜡样芽孢杆菌分型方法研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(17): 286-290.
- [23] 杨广锐. 食品中蜡样芽孢杆菌检测方法的分析及建立改进方法的研究[D]. 石河子:石河子大学, 2014.
- [24] 种婷. 食品中蜡样芽孢杆菌检测技术应用进展[J]. 现代食品, 2022, 28(7): 28-30.
- [25] 种婷. 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素 Cereulide 研究进展[J]. 现代食品, 2022, 28(10): 61-63.
- [26] 秦文彦,王静,马效东,等. 2014—2016 年山西省食品中食源性致病菌污染状况与分析[J]. 中国药物与临床, 2020, 20(1): 34-37.
- [27] 黄曾,詹卓莲,邹锦群,等. 2015—2020 年丰城市食源性致病菌监测结果分析[J]. 中国当代医药, 2022, 29(6): 103-106.
- [28] 张思文,刘思洁,王娟,等. 2018 年吉林省外卖食品中致病菌监测结果分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9349-9353.
- [29] 赵薇,孙景昱,刘思洁,等. 吉林省 2011~2015 年食品中蜡样芽孢杆菌污染监测数据分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(5): 1190-1194.
- [30] 孟丽亚. 武汉市食品风险监测微生物检测结果分析[J]. 现代食品, 2022, 28(9): 151-153.
- [31] BERTHOLD-PLUTA A, PLUTA A, GARBOWSKA M. The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract[J]. Microbial pathogenesis, 2015, 82: 7-14.
- [32] RATHER M A, AULAKH R S, GILL J P S, et al. Detection and sequencing of plasmid encoded tetracycline resistance determinants (tetA and tetB) from food-borne *Bacillus cereus* isolates[J]. Asian Pacific journal of tropical medicine, 2012, 5(9): 709-712.
- [33] DIERICK K, VAN COILLIE E, SWIECICKA I, et al. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning[J]. Journal of clinical microbiology, 2005, 43(8): 4277-4279.
- [34] PóSFAY-BARBE K M, SCHRENZEL J, FREY J, et al. Food poisoning as a cause of acute liver failure[J]. The pediatric infectious disease journal, 2008, 27(9): 846-847.
- [35] 李梅,王晴,李树贵,等. 浅谈实验室检测方法的验证与确认[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(23): 6305-6308.