

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 0176—2013  
代替 SN 0176—1992

---

### 出口食品中蜡样芽胞杆菌检测方法

Determination of *Bacillus cereus* in foods for export

2013-03-01 发布

2013-09-16 实施

---

中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN 0176—1992《出口食品中蜡样芽孢杆菌检验方法》。

本标准与 SN 0176—1992 相比,主要技术变化如下:

- 发布单位改为“中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局”,标准名称改为“出口食品中蜡样芽孢杆菌检测方法”;
- 增加前言;
- “主要内容与适用范围”改为“范围”,内容修改为“本标准规定了出口食品中蜡样芽孢杆菌的检验方法。本标准适用于食品中蜡样芽孢杆菌的检验”;
- 增加检验流程图;
- 结构上变化,将 SN 0176—1992 中的两种方法分为“第一法”和“第二法”;
- 增加了稀释液“0.85%生理盐水”;
- 将取样量“50 g”修改为“25 g”;
- 增加计数公式  $N = \frac{\sum \bar{a}}{V \times 1.1 \times d}$ ;
- 将培养温度 30 °C 改为 30 °C ± 1 °C;
- 将证实试验的培养温度由 30 °C 改为 36 °C ± 1 °C;
- 增加了 API 50 CHB 诊断试剂条和 VITEK 全自动微生物鉴定系统;
- “补充件”改为“规范性附录”。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:张泓、刘新亮、庞均予、李铁柱、高勇。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN 0176—1992。

## 出口食品中蜡样芽胞杆菌检测方法

### 1 范围

本标准规定了出口食品中蜡样芽胞杆菌的检测方法。

本标准适用于食品中蜡样芽胞杆菌的检测。

### 2 设备和材料

- 2.1 烘干箱:180 ℃。
- 2.2 培养箱:30 ℃±1 ℃和 36 ℃±1 ℃。
- 2.3 厌氧培养箱:36 ℃±1 ℃。
- 2.4 水浴锅:46 ℃±1 ℃。
- 2.5 pH 计:25 ℃测量,精度±0.1pH 单位。
- 2.6 旋转混合器。
- 2.7 培养皿:直径 90 mm 或 100 mm 或者是 140 mm。
- 2.8 吸量管:容量 10.0 mL 和 1.0 mL,具 0.5mL 和 0.1 mL 刻度。
- 2.9 显微镜。
- 2.10 微量移液器:容量 10.0 mL 和 1.0 mL,具 0.1 mL 刻度。
- 2.11 均质器:拍击式或蠕动式。
- 2.12 高压蒸汽灭菌器。
- 2.13 API 50 CHB 或 VITEK 全自动微生物鉴定系统<sup>1)</sup>。

### 3 培养基和试剂

- 3.1 甘露醇卵黄多粘菌素琼脂(MYP):见附录 A 中 A.1。
- 3.2 胰蛋白胨大豆多粘菌素肉汤(TSRB):见 A.2。
- 3.3 胰蛋白胨大豆羊血琼脂平板(TSSB):见 A.3。
- 3.4 酚红葡萄糖肉汤:见 A.4。
- 3.5 硝酸盐肉汤:见 A.5。
- 3.6 营养琼脂:见 A.6。
- 3.7 L-酪氨酸营养琼脂:见 A.7。
- 3.8 溶菌酶营养肉汤:见 A.8。
- 3.9 改良 V-P 培养基:见 A.9。
- 3.10 动力培养基:见 A.10。
- 3.11 磷酸盐缓冲液:见 A.11。

1) API 50 CHB 和 VITEK 全自动微生物鉴定系统由法国生物梅里埃公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效的产品。

- 3.12 碱性复红液:见 A.13。
- 3.13 0.85%生理盐水:见 A.14。
- 3.14 亚硝酸盐试剂:见 A.15。
- 3.15 V-P 试剂:见 A.16。

### 第一法 蜡样芽胞杆菌平板计数法

#### 4 检验程序

蜡样芽胞杆菌平板计数法的检测程序见图 1。

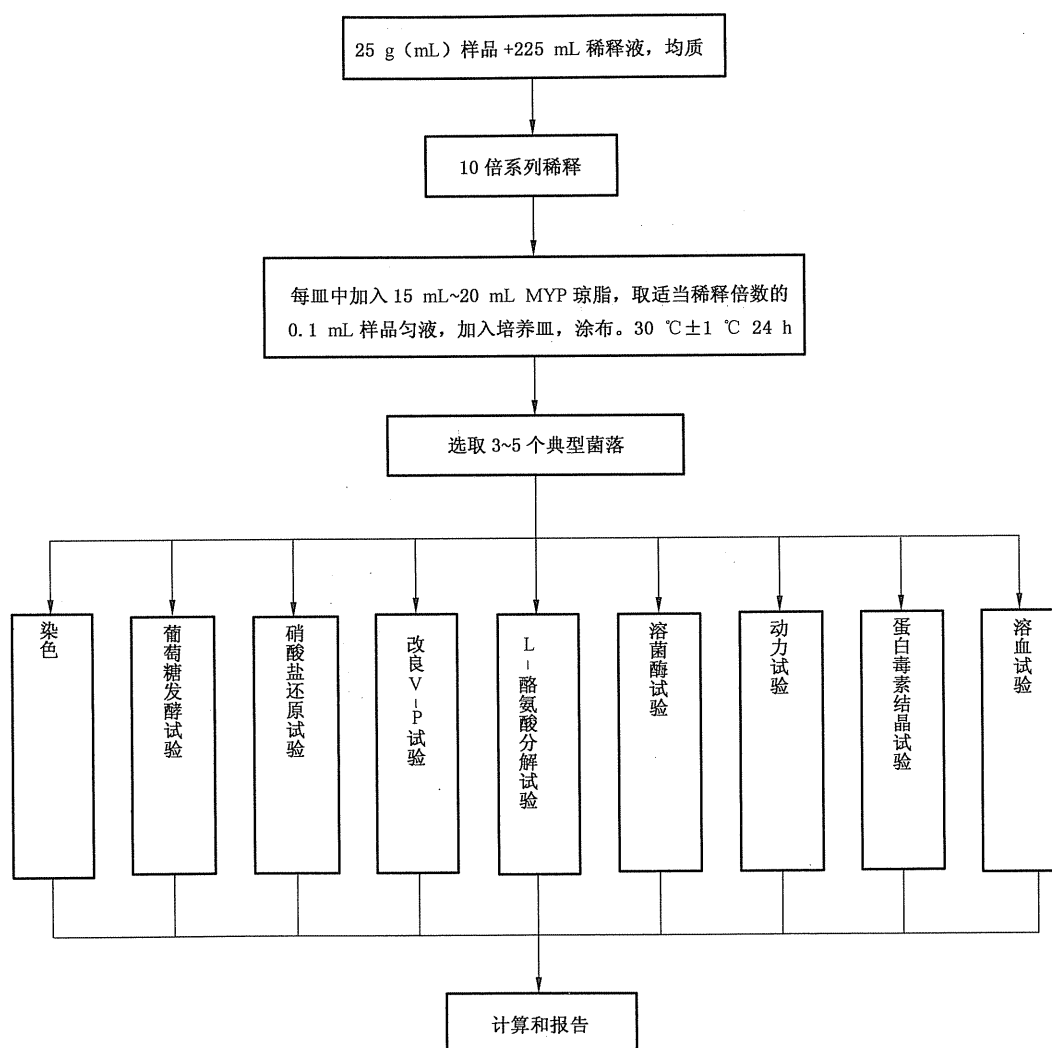


图 1 蜡样芽胞杆菌平板计数法的检测程序

## 5 操作步骤

### 5.1 样品的稀释

5.1.1 固体和半固体样品:称取 25 g 样品置于盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或 0.85% 生理盐水的无菌均质杯中,以 8 000 r/min~10 000 r/min 的转速均质 1 min~2 min,或放入盛有 225 mL 稀释液的无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打 1 min~2 min,制成 1:10 样品匀液。

5.1.2 液体样品:以无菌吸管吸取 25 mL 样品置于盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或 0.85% 生理盐水的无菌稀释瓶(瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠)中充分混匀,制成 1:10 样品匀液。

5.1.3 用 1 mL 的无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL,加到盛有 9 mL 磷酸盐缓冲液或 0.85% 生理盐水的试管中,充分混匀,制成 1:100 的样品匀液。

5.1.4 按 5.1.3 操作程序,制备 10 倍系列稀释样品匀液,直至适宜稀释倍数。

### 5.2 样品的接种

根据对样品污染状况的估计,选择 2~3 个适宜稀释度的样品匀液(液体样品可包括原液),在进行 10 倍递增稀释时,每个稀释度分别吸取 0.1 mL 样品匀液加入 MYP 琼脂平板,然后用无菌 L 棒均匀涂布于整个平板,注意不要触及平板边缘,每个稀释度接种两个 MYP 琼脂平板。

### 5.3 培养

5.3.1 在通常情况下,涂布之后将平皿静置 10 min~30 min,待样品匀液吸收后翻转平板,30 °C±1 °C 培养 24 h。如果培养物的菌落特征不显著,则继续培养至 48 h。

5.3.2 蜡样芽胞杆菌在 MYP 琼脂平板上生长的典型菌落为直径 2 mm~5 mm,菌落表面粗糙,在深红色背景下呈现粉红色或微粉红色,环绕产生 5 mm 宽的卵磷脂酶沉淀环。没有根状生长的特性(蕈状芽胞杆菌形成根状生长的特征)。

### 5.4 菌落计数

选取菌落数在 15 CFU~150 CFU 的典型或可疑蜡样芽胞杆菌菌落的平板,进行计数。

注:如果有很多发酵甘露醇的细菌,会影响到典型菌落,使之减少或消失。少量的蜡样芽胞杆菌无卵磷脂酶沉淀环,这些菌同样需要证实试验。

### 5.5 营养琼脂斜面或平板培养

从每个平板上挑取 5 个典型菌落,如无典型菌落则挑取可疑菌落。用接种针接触菌落中心部位,分别接种于营养琼脂斜面或平板,30 °C±1 °C 培养 24 h,取培养物进行革兰氏染色和证实试验。

### 5.6 证实试验

5.6.1 葡萄糖发酵试验:将培养物接种到酚红葡萄糖肉汤中,置于厌氧培养箱中 36 °C±1 °C 培养 24 h,振摇后肉汤由红变黄,表明在厌氧条件下蜡样芽胞杆菌分解葡萄糖产酸。

5.6.2 硝酸盐还原试验:将培养物接种到硝酸盐肉汤中,36 °C±1 °C 培养 24 h,加 0.25 mL 亚硝酸盐试剂 A 和 0.25 mL 亚硝酸盐试剂 B,在 10 min 内变为红色为阳性反应。

5.6.3 改良 V-P 试验:将培养物接种到改良 V-P 培养基中,36 °C±1 °C 培养 24 h,取 1 mL 培养物置于灭菌空试管中加入 0.2 mL 40% KOH 溶液和 0.6 mL 5% α-萘酚乙醇溶液和少量结晶肌酸。静置 1 h 出现伊红粉红色为阳性。

5.6.4 L-酪氨酸分解试验:将培养物接种到 L-酪氨酸琼脂培养基上,36 °C±1 °C 培养 48 h,在靠近菌

落生长的地方培养基为透明的,则表明酪氨酸被分解,阴性则继续培养至 72 h,结果仍为阴性的弃去。

5.6.5 溶菌酶试验:将培养物接种到 0.001%溶菌酶营养肉汤中,另取培养物接种到普通营养肉汤中作对照,36℃±1℃培养 24 h,蜡样芽胞杆菌在本培养基中能生长,为阳性反应。如出现阴性反应继续培养 24 h,结果仍为阴性弃去。

5.6.6 符合 MYP 琼脂上的典型菌落形态,镜检为革兰氏染色阳性大杆菌,呈链状,芽胞呈椭圆形位于菌体中央或偏端,并且在厌氧条件下发酵葡萄糖产酸,还原硝酸盐为亚硝酸盐,改良 V-P 试验阳性,分解 L-酪氨酸,能在 0.001%溶菌酶中生长的进行如下试验。

5.6.7 蜡样芽胞杆菌与类似菌的鉴别试验:

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℃±1℃培养 24 h。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。

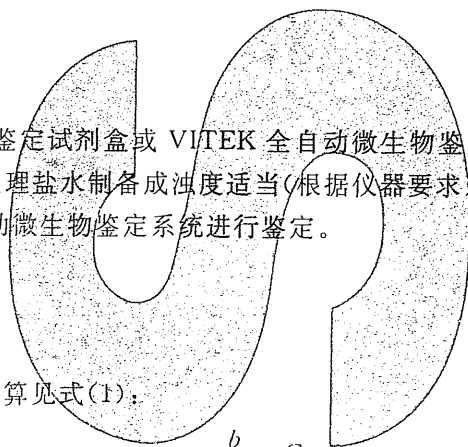
溶血试验:将疑似菌点种在绵羊血琼脂表面,30℃±1℃培养 24 h。蜡样芽胞杆菌会观察到强烈的β-溶血反应。苏云金芽胞杆菌和蕈状芽胞杆菌呈现弱的溶血现象,而炭疽芽胞杆菌通常为不溶血。

蛋白毒素结晶试验:取经 30℃±1℃培养 24 h 并于室温放置 2 d~3 d 的营养琼脂培养物少许于载玻片上,用灭菌蒸馏水做显微涂片。待干燥后将涂片慢慢通过火焰,短暂加热固定。待冷却后,用甲醇盖满涂片,30 s 后弃去甲醇,通过火焰使其充分干燥,再将涂片盖满 0.5%碱性复红水溶液或石碳酸复红 ZN 染色液。用微火轻轻从底部加热玻片至产生蒸气为止。过 1 min~2 min,再重复这个步骤。静置 30 s,弃去染液。用蒸馏水充分冲洗玻片,待其自然干燥。在显微镜油镜下观察是否有游离的芽胞和毒素结晶体。如果未见游离芽胞,可将培养物在室温下多放置几天后再进行试验。苏云金芽胞杆菌产生四角晶形(菱形)的暗色蛋白毒素结晶,蜡样芽胞杆菌不产生毒素结晶体。

5.6.8 符合蜡样芽胞菌群特征的,呈现强烈溶血,有活泼的动力,不产生蛋白毒素结晶的培养物,可确定为蜡样芽胞杆菌。

### 5.7 可替代的生化实验

如选择 API 50 CHB 生化鉴定试剂盒或 VITEK 全自动微生物鉴定系统,可按照 5.5 从营养琼脂斜面或平板上挑取培养物,用生理盐水制备成浊度适当(根据仪器要求)的菌悬液,使用 API 50 CHB 生化鉴定试剂盒或 VITEK 全自动微生物鉴定系统进行鉴定。



## 6 结果计算

6.1 平板上的有效菌落数的计算见式(1):

$$a = \frac{b}{A} \times C \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- a —— 平板上的有效菌落数;
- b —— 根据证实试验确定为蜡样芽胞杆菌的菌落数;
- A —— 进行证实试验的菌落数;
- C —— 平板上的菌落数。

同一稀释度有效菌落数的平均值计算见式(2):

$$\bar{a} = \frac{\sum a}{2} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- $\bar{a}$  —— 同一稀释度有效菌落数的平均值;
- $\sum a$  —— 同一稀释度有效菌落数的和。

若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时,按式(3)计算:

$$N = \frac{\sum \bar{a}}{V \times 1.1 \times d} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- $N$  ——样品中蜡样芽胞杆菌数;  
 $\sum \bar{a}$  ——连续两个稀释度的有效菌落数的平均数之和;  
 $V$  ——加样量(0.1 mL 或 1 mL);  
 $d$  ——连续两个稀释度中较低的稀释度。

例:将检样  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  连续两个梯度稀释液 0.1 mL 涂布于 MYP 琼脂平板上,生成的疑似蜡样芽胞杆菌菌落数分别为 137、148 和 21、17 个,各取 5 个进行鉴定,证实为蜡样芽胞杆菌的分别为 3、4 和 4、4 个,则每一稀释度的有效菌落数的平均数分别为 100、15 CFU。则 1 g 样品中蜡样芽胞杆菌数为:

$$(100+15)/(0.1 \times 1.1 \times 10^{-5}) = 115/(1.1 \times 10^{-6}) = 1.0 \times 10^8 \text{ CFU/g}$$

6.2 若同一稀释度平板上只有一个平板菌落数在适宜的范围之内,则计算此平板的有效菌落数,然后与其相邻稀释度的有效菌落数的平均值求和,再通过式(3)计算求值,即为每克(或毫升)中蜡样芽胞杆菌数。

6.3 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜的范围之内,计算此稀释度有效菌落数的平均值,再将平均值乘以相应稀释倍数再除以加样量,即为每克(或毫升)中蜡样芽胞杆菌数。

6.4 若所有稀释度的平板上菌落数均大于 150 CFU,则对稀释度最高的平板进行计数,计算此稀释度有效菌落数的平均值,再将平均值乘以相应稀释倍数再除以加样量,即为每克(或毫升)样品中蜡样芽胞杆菌数。

6.5 若所有稀释度的平板菌落数均小于 15 CFU,则对稀释度最低的平板进行计数,计算此稀释度有效菌落数的平均值,再将平均值乘以相应稀释倍数再除以加样量,即为每克(或毫升)样品中蜡样芽胞杆菌数。

6.6 若所有稀释度的平板菌落数均不在 15 CFU~150 CFU 之间,其中一部分小于 15 CFU 而另一部分大于 150 CFU 时,则以最接近 15 CFU 或 150 CFU 的平板进行计数,计算此稀释度有效菌落数的平均值,再将平均值乘以相应稀释倍数再除以加样量,即为每克(或毫升)样品中蜡样芽胞杆菌数。

## 7 蜡样芽胞杆菌平板计数的报告

根据 MYP 琼脂平板上蜡样芽胞杆菌的典型菌落数,按第 6 章中公式计算,报告每克(或毫升)样品中蜡样芽胞杆菌数,以 CFU/g(或 CFU/mL)表示;如果最低稀释倍数的两个培养皿均没有菌生长,则结果可以表述为每克(或每毫升)样品中蜡样芽胞杆菌数小于 1 乘以最低稀释倍数(如果是液态样品的原液,则结果可以表述为每毫升样品中蜡样芽胞杆菌数小于 1)。

## 第二法 蜡样芽胞杆菌 MPN 计数

### 8 检验程序

8.1 蜡样芽胞杆菌 MPN 计数法检测程序见图 2。

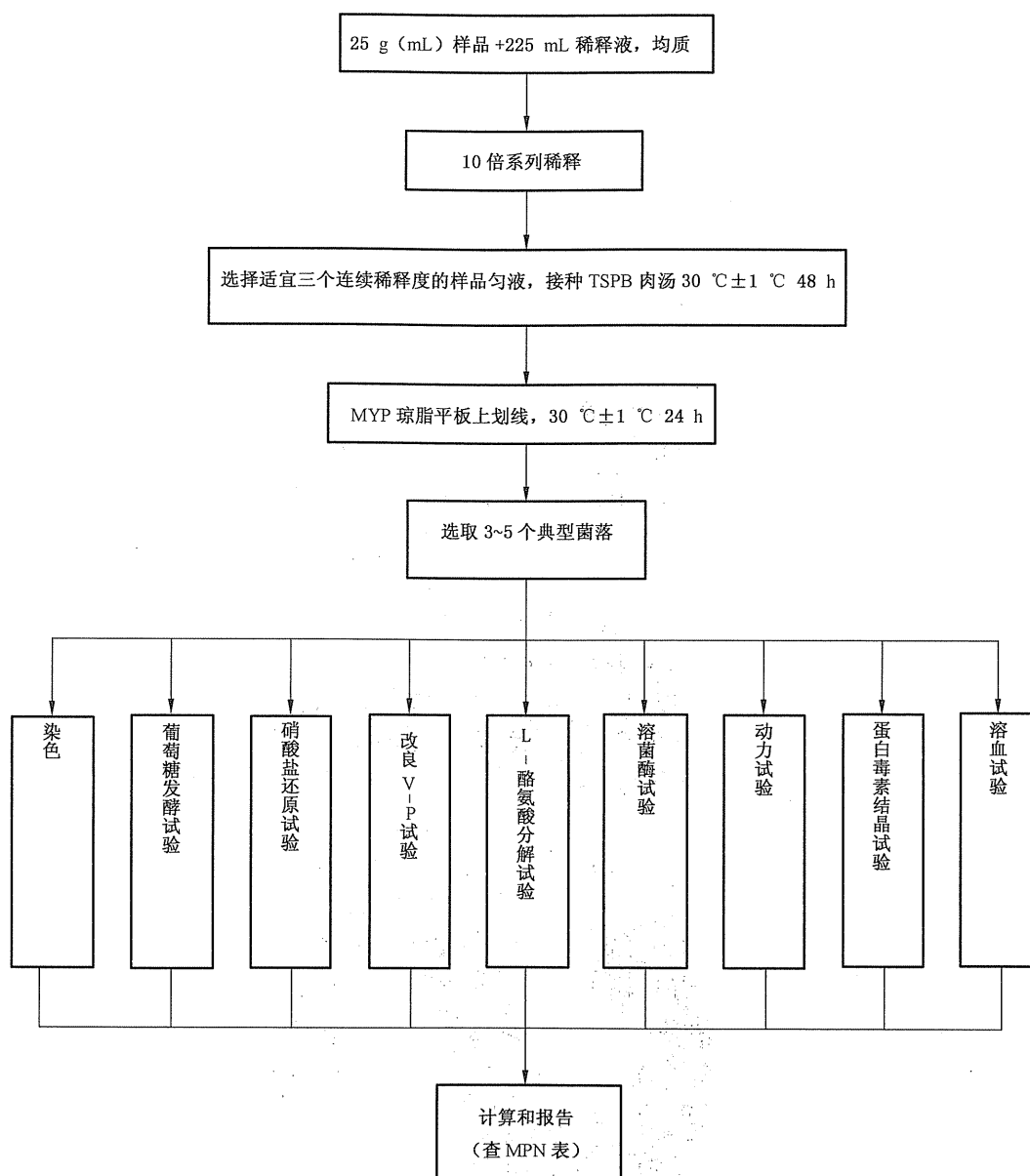


图 2 蜡样芽胞杆菌 MPN 计数检测程序

8.2 MPN 计数法适用于蜡样芽胞杆菌数  $\leq 10^3/g$  的情况。

## 9 操作步骤

### 9.1 样品的稀释

样品的稀释按 5.1 进行。

### 9.2 样品的接种和培养

每个样品选择三个适宜的连续稀释度的样品匀液(液体样品可选择原液),每个稀释度接种 3 管胰酪胨大豆多粘菌素肉汤(TSPB),每管接种 1 mL。(如接种量超过 1 mL,则用双料 TSPB,每管接种 10 mL)。30 °C ± 1 °C 培养 48 h。



### 9.3 分离

从出现浑浊的试管取培养物划线接种到 MYP 琼脂上,  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 24 h。如果培养物特征不显著, 可延长培养 24 h。蜡样芽胞杆菌在 MYP 琼脂平板上典型的菌落为表面粗糙, 在深红色背景下呈现粉红色或微粉红色, 环绕产生 5 mm 宽的卵磷脂酶沉淀环, 没有根状生长的特性。

### 9.4 营养琼脂斜面或平板培养

从每个 MYP 琼脂平板上挑取 5 个典型菌落, 如无典型菌落则挑取可疑菌落。用接种针接触菌落中心部位, 分别接种于营养琼脂斜面或平板,  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, 取培养物进行革兰氏染色和证实试验。

### 9.5 证实试验

证实试验按 5.6、5.7 进行。

## 10 蜡样芽胞杆菌 MPN 计数结果报告

根据证实试验确定为蜡样芽胞杆菌的管数, 只要有 1 个菌落鉴定为蜡样芽胞杆菌, 其所代表的 TSPB 管即为蜡样芽胞杆菌阳性。依据 TSPB 阳性管数查 MPN 表(见附录 B), 报告每克(或毫升)样品中蜡样芽胞杆菌 MPN 值。

附 录 A  
(规范性附录)  
培养基和试剂

### A.1 甘露醇卵黄多粘菌素琼脂培养基(MYP)

#### A.1.1 成分

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
50%卵黄液	50 mL
多粘菌素 B	100 IU/mL

#### A.1.2 制法

将前 5 种成分加入蒸馏水中加热溶解,校正 pH 至  $7.2 \pm 0.1$ ,加入酚红溶液,混匀后分装,每瓶 225 mL。 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 15 min。用时加热溶化,冷至  $47\text{ }^{\circ}\text{C}$  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 mL~18 mL。平板通常放置干燥处,在  $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  下可保存 4 天。在用之前,平皿应倒置在  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱中,直至琼脂表面干燥。

注: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 30 s 晾干。以无菌操作取出卵黄,加入等量灭菌生理盐水,混匀后备用。

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。

### A.2 胰酪胨大豆多粘菌素肉汤(TSPB)

#### A.2.1 成分

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
多粘菌素 B	100 IU/mL

#### A.2.2 制法

将前 5 种成分溶解在蒸馏水中,煮沸 2 min,校正 pH 至  $7.3 \pm 0.1$ ,分装大试管,每管 15 mL, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  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。

### A.3 胰酪胨大豆羊血琼脂(TSSB)

#### A.3.1 成分

胰酪胨	5.0 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

#### A.3.2 制法

将上述各成分于蒸馏水中加热溶解。校正 pH7.0±0.1。分装，每瓶 100 mL。121 °C 高压灭菌 15 min。水浴中冷至 45 °C~50 °C 加入 5 mL 无菌脱纤维羊血，混匀后倾注平板，每皿 18 mL~20 mL。

### A.4 酚红葡萄糖肉汤

#### A.4.1 成分

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

#### A.4.2 制法

将除酚红以外的成分溶解至蒸馏水中，校正 pH7.4±0.1，然后加入酚红，混匀分装至试管，每管 3 mL，121 °C 高压灭菌 10 min。

### A.5 硝酸盐肉汤

#### A.5.1 成分

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

#### A.5.2 制法

将上述所有成分溶解至蒸馏水中，校正 pH7.0±0.1，校正后混匀分装至试管，每管 5 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。

## A.6 营养琼脂

## A.6.1 成分

牛肉膏	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	稀释至 1 000 mL

## A.6.2 制法

将各成分于蒸馏水中加热溶解。校正 pH $7.2\pm 0.1$  后分装试管,每管 5 mL~7 mL;或分装烧瓶,每瓶 100 mL~150 mL。121 °C 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 °C~50 °C 倾注灭菌平皿,每皿 18 mL~20 mL。

## A.7 L-酪氨酸营养琼脂

## A.7.1 成分

营养琼脂	100 mL
5% 灭菌 L-酪氨酸悬液	10 mL

## A.7.2 制法

将 100 mL 营养琼脂溶化,冷至 45 °C,加入 5% 的灭菌 L-酪氨酸悬液 10 mL,充分混匀后,制成平板,每皿 18 mL~20 mL。平皿应迅速冷却,防止 L-酪氨酸分离而出。

注: L-酪氨酸悬液:将 0.5 g 加 10 mL 蒸馏水混匀,121 °C 高压灭菌 15 min。

## A.8 溶菌酶营养肉汤

## A.8.1 成分

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

## A.8.2 制法

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 $6.8\pm 0.1$  后,分装于烧瓶中,每瓶 99 mL。121 °C 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。

## A.9 改良 V-P 培养基

### A.9.1 成分

豚蛋白胨	7.0 g
葡萄糖	5.0 g
氯化钠	5.0 g

### A.9.2 制法

将上述各成分溶解于蒸馏水并稀释至 1 000 mL。校正 pH $6.5\pm 0.1$  后分装试管,每管 5 mL。121 °C 高压灭菌 10 min 备用。

## A.10 动力培养基

### A.10.1 成分

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

### A.10.2 制法

将上述各成分溶解于蒸馏水并稀释至 1 000 mL。校正 pH $7.4\pm 0.1$  后分装试管,每管 2 mL。121 °C 高压灭菌 10 min 备用。

## A.11 Butterfield 氏磷酸盐缓冲稀释液

在 500 mL 蒸馏水中溶解磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )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 °C 高压灭菌 15 min。

## A.12 革兰氏染色液

### A.12.1 结晶紫染色液制法

取结晶紫 1 g 溶解于 20 mL 95%乙醇中,再与 1%草酸铵水溶液 80 mL 混合。

### A.12.2 碘液制法

将 1 g 碘与 2 g 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. 12.3 沙黄复染液

将 0.25 g 沙黄溶解于 10 mL 95% 乙醇中,再加入 90 mL 蒸馏水稀释。

A. 12.4 染色法

将涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染色液,染 1 min 水洗。滴加碘液,作用 1 min 水洗。滴加 95% 乙醇脱色 30 s(或将乙醇涂满整个涂片,立即倾去,再用乙醇滴满整个涂片,脱色 10 s)。

A. 13 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。

A. 14 0.85% 盐水

取氯化钠 8.5 g 溶解于蒸馏水中稀释至 1 000 mL。

A. 15 亚硝酸盐试剂

A. 15.1 试剂 A:对氨基苯磺酸 8.0 g,溶解于 5 mol/L 乙酸 1 000 mL 中。

A. 15.2 试剂 B: $\alpha$ -萘酚 2.5 g 溶解于 5 mol/L 乙酸 1 000 mL 中。

A. 16 V-P 试剂

A. 16.1 5% $\alpha$ -萘酚溶液:取  $\alpha$ -萘酚 5.0 g 溶解于 100 mL 无水乙醇中。

A. 16.2 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。

A. 16.3 肌氨酸结晶。

附 录 B  
(规范性附录)

1 g 样品中最近似值(MPN)检索表

表 B.1 1 g 样品中最近似值(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	1 100	180	4 100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1 100	420	—

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

注 2: 表内所列检样量如改用 1 g(或 1 mL)、0.1 g(或 0.1 mL)和 0.01 g(或 0.01 mL)时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 0.01 g(或 0.01 mL)、0.001 g(或 0.001 mL)和 0.000 1 g(或 0.000 1 mL)时, 则表内数字应相应增高 10 倍, 其余类推。