

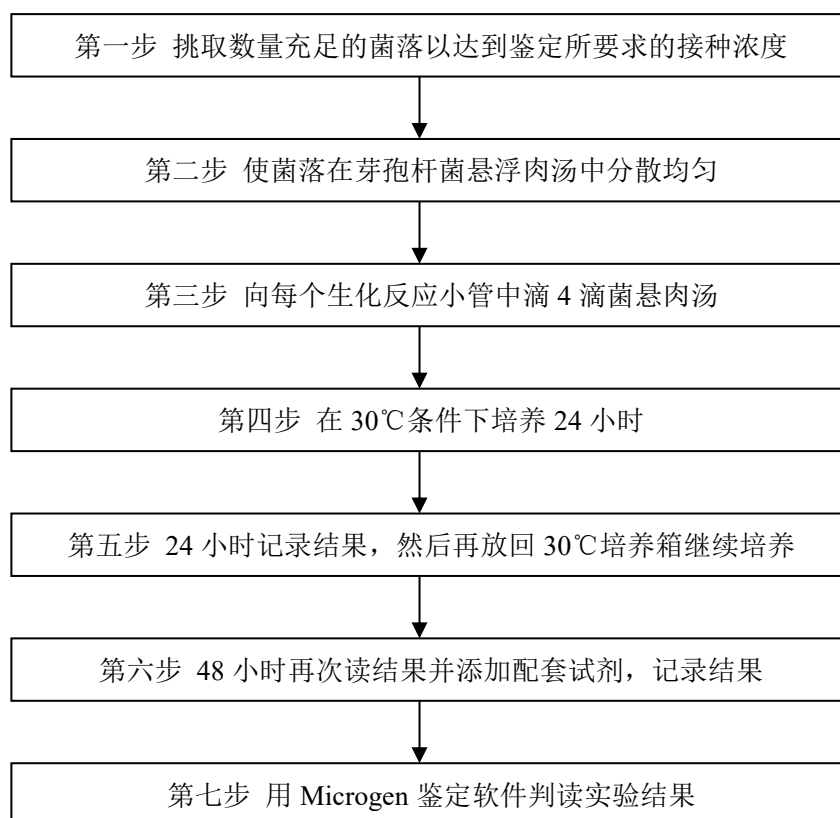
MID 芽孢杆菌生化鉴定条 (MID-66 Bacillus ID) 使用说明书

用于食物和食物原材料中嗜常温芽孢杆菌 (Mesophilic Bacillus spp) 的鉴定



广东环凯微生物科技有限公司
广东省微生物研究所

鉴定流程:



Bacillus ID 系统是用于鉴定从食物和食物原料中分离出来的嗜常温芽孢杆菌 (Mesophilic *Bacillus* spp)。

以下种类可由 Bacillus ID 系统鉴定:

***Bacillus* species**

B. cereus group 蜡样芽孢菌群
B. firmus 坚硬芽孢杆菌
B. badius 栗褐芽孢杆菌
B. laevolacticus 左乳酸芽孢杆菌
B. coagulans 凝结芽孢杆菌
B. lentus 缓慢芽孢杆菌
B. amyloliquefaciens 解淀粉芽孢杆菌
B. subtilis 枯草芽孢杆菌
B. circulans 环状芽孢杆菌
B. insolitus 异常芽孢杆菌
B. thiaminolyticus 解维生素乙芽孢杆菌
B. freudenreichii 弗氏芽孢杆菌
B. globisporus 圆孢芽孢杆菌
B. sphaericus 球形芽孢杆菌

B. pumilus 短小芽孢杆菌

B. licheniformis 地衣芽孢杆菌

B. megaterium 巨大芽孢杆菌

***Vergibacillus* species**

V. pantothenticus 泛酸枝芽孢杆菌

***Paenibacillus* species**

P. alvei 蜂房类芽孢杆菌

P. polymyxa 多粘类芽孢杆菌

P. macerans 浸麻类芽孢杆菌

***Brevibacillus* species**

Br. brevis 短小短芽孢杆菌

Br. laterosporus 侧孢短芽孢杆菌

注意: 蜡样芽孢菌群 (*B. cereus* Group) 包括: 蜡样芽孢菌 (*B. cereus*), 苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*), 草状芽孢杆菌 (*B. mycoides*) 和 *B. weihenstephanensis*。在通常进行的生化试验中, 这些菌种无法区分 (见产品使用局限性)。

基本原理：

Bacillus ID 系统由两条生化反应小管组成（标明 BAC 1 和 BAC 2），每条有 12 个反应小管，小管中装有干燥底物，用于碳水化合物发酵反应和其他反应试验。第二条鉴定条最后一个反应管作为糖发酵空白标准对照。该鉴定条所选择的底物是经过电脑分析选择适用于鉴定和鉴别此菌群的底物进行设计的。

在 30℃ 条件下培养，分别在 24、48 小时记录结果，并在 48 小时添加配套试剂（Indole, Nitrate 和 VP tests），记录最后的结果。

将记录结果输入 MID 鉴定系统软件 (MID-60) 进行分析。

MID-Bacillus 鉴定条反应结果对照表：

管编号	反应底物	反应	阳性	阴性
1	阿拉伯糖 Arabinose	发酵糖产酸，使酚红指示剂由红变黄	黄色	红色
2	纤维二糖 Cellobiose			
3	肌醇 Inositol			
4	甘露醇 Mannitol			
5	甘露糖 Mannose			
6	棉子糖 Raffinose			
7	鼠李糖 Rhamnose			
8	水杨苷 Salicin			
9	山梨醇 Sorbitol			
10	蔗糖 Sucrose			
11	海藻糖 Trehalose			
12	木糖 Xylose			
13	阿东醇 Adonitol			
14	半乳糖 Galactose			
15	D 甲基-甘露糖苷 Methyl-D-Mannoside			
16	D-甲基葡萄糖苷 Methyl-D-glucoside			
17	菊粉 Inulin			
18	松三糖 Melezitose			
19	蛋白胨水 Indole	由色氨酸产生吲哚，添加 Kovac 氏试剂生成粉/红色化合物	粉/红色	无色/黄色
20	半乳糖苷酶 ONPG	在半乳糖苷酶存在时将 ONPG 水解成黄色的邻硝基酚	黄色	无色
20	硝酸盐 Nitrate	硝酸盐还原成亚硝酸盐，在添加甲萘胺和对氨基苯磺酸时生成红色化合物	红色	无色

21	精氨酸双水解酶 Arginine Dihydrolase	在精氨酸双水解酶作用下，精氨酸生成鸟氨酸、氨和 CO ₂ ，使 pH 上升，指示剂溴麝香草酚蓝由绿色变为蓝色，24 小时： 48 小时：	绿/蓝色 蓝色	黄色 黄色/绿色
22	柠檬酸盐 Citrate Utilisation	利用柠檬酸盐作为唯一碳源，pH 上升，溴麝香草酚蓝由黄绿变蓝	蓝色	黄/浅绿色
23	VP	由葡萄糖产生丙酮，在 KOH 环境中与 α-萘酚和肌酸生成红色化合物	粉红/红色	稻草黄
24	对照 control	碳水化合物对照		红色

原装整套试剂包括（20 次检测）：

铝箔袋独立包装的 20 套鉴定条（MID66c）（BAC1 和 BAC2），20 瓶 MID66b 芽孢杆菌悬浮培养基，反应条培养槽，结果记录报告单，使用说明书。

其它必备品（未在套装中提供）：

MID 鉴定系统软件 (MID-60) 1.1.16.19 版本或以上，矿物油（或无菌液体石蜡油），VP I 和 VP II 试剂，Nitrate A&B 试剂，Kovac 试剂，结果对照图（彩色），血琼脂/营养琼脂平板，接菌环，无菌滴管，30℃无风扇培养箱，冰箱（2-8℃），油性笔，革兰氏染液，触酶反应试剂，显微镜，显微镜用玻片，振荡器。

储存：

未开封的试验条以及芽孢杆菌悬浮肉汤储存于 2-8℃ 条件，可保藏至使用有效期。

使用说明：

（在使用本产品前，请参考注意事项和产品使用局限性）

1. 选择鉴定菌落

- 1.1 选用非选择性培养基（如血琼脂平板）上的纯培养物进行鉴定试验，初分离的培养物需进一步分离。
- 1.2 在接种到 Bacillus ID 前，分离物必须经检验确认是属于芽孢杆菌属。
 - 1.2.1. 革兰氏阳性芽孢杆菌，
 - 1.2.2. 内生芽孢
 - 1.2.3. 触酶阳性
 - 1.2.4. 最佳生长温度在 25℃ 到 45℃ 之间，生长温度在此范围之外将不适用本产品进行鉴定。

2. 接种准备

- 2.1 接种前将悬浮肉汤和鉴定反应条置于室温条件；
- 2.2 用无菌接菌环挑取经过 18-24 小时培养的纯培养物于小瓶芽孢杆菌悬浮培养基（5ml）中分散均匀；
- 2.3 在接种前，使用振荡器将其彻底混匀，且浓度为 MacFarland 2.0 左右，配置该菌悬液可能需要多

于一个平板的培养物；

2.4 配置好菌悬液后，在 10 分钟内接种。

3. 接种与培养

3.1 将鉴定反应条从铝箔袋中拿出，固定在反应条培养槽上；

3.2 小心打开鉴定条的粘性封口膜，但不要将其丢弃；

3.3 用无菌滴管加 4 滴（100-125 微升）菌悬液至每个反应小管；

3.4 在接种后，加 3-4 滴矿物油覆盖管 21（精氨酸）；

3.5 用粘性封口膜封住管口，放至 30℃ 的培养箱中培养 24 和 48 小时，同时确保粘性封口膜透气小孔位于 BAC2 鉴定条的柠檬酸盐和 ONPG 小管的正上方。

3.6 同时进行培养物纯度检验，即加一滴菌悬液于非选择性培养基平板上，在 30℃ 好氧条件下培养 18-24 小时，进行检验。

4. 分析结果

4.1 在 24 小时后，小心打开粘性封口膜（之后需重新封口），参照对照小管，记录管 1 到 18（碳水化合物）中的所有阳性结果。与对照相比更显橙或黄色的小管均记为阳性。精氨酸，ONPG 和柠檬酸盐结果应与彩色结果图表对比，将其结果填写在结果记录报告单上，重新封口，放于 30℃ 培养箱中继续培养 24 小时。

4.2 在培养 48 小时后，向以下的小管中添加配套试剂：

4.2.1 在管 19 中加入 2 滴 Kovac 试剂，60 秒后读取结果。如果显示粉红或红色，结果为阳性；

4.2.2 在管 23 中加入 1 滴 VPI 和 1 滴 VPII 试剂，15-30 分钟后读取结果。如果显示粉红或红色，结果是阳性；

4.2.3 在读取 ONPG 结果后，在管 20 中进行硝酸盐还原实验，即加入 1 滴 Nitrate A 和 1 滴 Nitrate B 至小管中，60 秒后读取结果；

4.3 在结果记录报告单中填写结果；

4.4 结果记录报告单

MICROGEN BACILLUS-ID 24 TEST
REPORT FORM

Lab. No. F4560 Specimen Type COOKED RICE Date 12-10-04

MICROGEN BIOPRODUCTS

	Bacillus Strip 1 (BAC 1)												Bacillus Strip 2 (BAC 2)													
Well Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
Reaction	ALA	CEL	MG	MAN	AME	RAF	RHA	GAL	SON	SUC	TRE	ERY	ADO	GAL	MEU	MOB	NU	MLJ	MG	ONPG	ARG	CIT	VP	UT	MS	
24 hours	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
48 hours	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	
Sum of Positive Reactions	0			0			2			6			0			0			1			3				

Profile No: 00260013 Final Identification: Bacillus cereus group

注意事项：

1. Bacillus ID 鉴定系统必须由合格的实验人员严格按各项微生物技术要求进行操作；
2. 使用过的材料必须经过高压灭菌，焚化或浸于消毒剂当中，然后才能丢弃；
3. 鉴定反应条不得在二氧化碳或带有风扇的培养箱里培养；
4. 读取碳水化合物发酵反应结果时，必须参照对照管（管 24）；
5. 碳水化合物的发酵反应必须在 24 和 48 小时后两次读取结果。如果在 24 小时后是阳性结果，在 48

小时后是阴性结果，该结果应记为阳性。

产品使用局限性：

1. Bacillus ID 系统只能用于鉴定芽孢菌属细菌，不能鉴定其它属的细菌。
2. 蜡样芽孢菌群 (*B. cereus* Group) 包括：蜡样芽孢菌 (*B. cereus*)，苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)，草状芽孢杆菌 (*B. mycoides*)，和 *B. weihenstephanensis*。在通常进行的生化试验中，这些菌种无法辨别，但以下信息能帮助有效的辨别菌种。

培养物	运动性
蜡样芽孢菌 (<i>B. cereus</i>)	+
苏云金芽孢杆菌 (<i>B. thuringiensis</i>)	+
草状芽孢杆菌 (<i>B. mycoides</i>)	-
<i>B. weihenstephanensis</i>	?

3. *B. subtilis* 枯草芽孢杆菌, *B. amyloliquefaciens* 解淀粉芽孢杆菌, *B. licheniformis* 地衣芽孢杆菌和 *B. pumilus* 短小芽孢杆菌属于枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 群。这些菌种十分相似，需要做进一步的鉴定试验来有效辨别。
4. 建议从悬浮肉汤中转接培养物至平板中培养，以证实被接种到反应鉴定条小管中的为纯培养物。
5. Bacillus ID 系统只能用于鉴定生长温度在 25-45°C 之间的嗜中温菌株，在此范围之外的，将不适用此鉴定产品。

质量控制：

Bacillus ID 系统的鉴定性能应用适当的质控菌株进行检验，建议用以下菌株进行质控。

B. licheniformis ATCC 14580, NCTC 10341 地衣芽孢杆菌

B. cereus ATCC 11778, NCTC 10320 蜡样芽孢菌

P. macerans ATCC 8244, NCTC6355 浸麻类芽孢杆菌

P. alvei ATCC 6344, NCTC6352 蜂房类芽孢杆菌

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	20	24
反应	A R A	C E L	I N O	M A N	M N S	R A F	R H A	S A L	S O R	S U C	T R E	X Y L	A D O	G A L	M D M	M D G	I N U	M L Z	I N D	O N P	A R G	C I T	V P	N I T	N E G
<i>B. licheniformis</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	+/-	-	+	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+	-			
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-			
<i>P. MACERANS</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+/-	+		+	-	-			
<i>P. alvei</i>	-	+/-	+/-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-		+	-	-			
	-	+/-	+/-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+/-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	

相关文献：

Lapage S.P, S.Bascombe, W.R. Willcox and M.A Curtis. 1973 Identification of Bacteria by Computer: General Aspects and Perspectives J.Gen. Microbiol. 77:273-290.

数据表（数据表明阳性反应几率）:

		TESTS																							
菌种名称		ARA	CEL	INO	MAN	MNS	RAF	RHA	SAL	SOR	SUC	TRE	XYL	ADO	GAL	MDM	MDG	INU	MLZ	IND	ONP	ARG	CIT	VP	NIT
<i>P. alvei</i> (2)	蜂房类芽孢杆菌	0.1	50	52	0.1	35	45	44	21	20	52	43	0.1	98	43	0.1	59	0.1	9	99	65	0.1	0.1	94	1
<i>B. amyloliquefaciens</i> (4)	解淀粉芽孢杆菌	86	99.9	45	55	79	67	0.1	99	94	99	90	66	0.1	23	0.1	96	40	1	0.1	68	0.1	56	94	74
<i>B.adius</i>	栗褐芽孢杆菌	0.1	0.1	1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	99.9	0.1	0.1
<i>B. cereus</i> Guoup(1)	蜡样芽孢菌群	0.1	67	2	0.1	8	0.1	0.1	73	0.1	54	87	1	0.1	5	0.1	1	0.1	1	0.1	1	62	50	47	64
<i>B. circulans</i>	环状芽孢杆菌	89	98	36	89	98	96	48	99.9	63	99	99	96	0.1	66	14	51	38	30	0.1	63	1	2	39	17
<i>B. coagulans</i>	凝结芽孢杆菌	52	60	26	34	91	62	39	68	24	86	93	60	6	96	10	57	4	3	0.1	81	0.1	0.1	93	25
<i>B. firmus</i>	坚硬芽孢杆菌	6	12	1	74	20	4	0.1	7	7	92	70	3	0.1	6	1	2	4	1	4	20	5	26	75	63
<i>B. freudenreichii</i>	弗氏芽孢杆菌	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	33	0.1	99.9
<i>B. globisporus</i>	圆孢芽孢杆菌	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	99.9	0.1	0.1	0.1	0.1
<i>B. insolitus</i>	异常芽孢杆菌	99.9	99.9	50	99.9	0.1	50	0.1	99.9	50	99.9	50	99.9	0.1	50	50	99.9	50	50	0.1	99.9	0.1	99.9	99.9	50
<i>B. laevolacticus</i>	左乳酸芽孢杆菌	0.1	99.9	0.1	99.9	99.9	99.9	60	99.9	99.9	99.9	99.9	0.1	0.1	99.9	80	99.9	99.9	99.9	0.1	60	20	0.1	99.9	20
<i>B. lentus</i>	缓慢芽孢杆菌	57	74	11	65	98	67	50	72	26	89	84	37	2	35	50	26	22	26	17	45	0.1	18	55	8
<i>B. licheniformis</i> (4)	地衣芽孢杆菌	50	50	50	95	98	65	59	98	93	98	98	99	43	50	37	50	83	30	1	90	95	72	92	86
<i>B. megaterium</i>	巨大芽孢杆菌	66	63	57	74	12	75	1	45	51	88	79	63	0.1	63	2	34	50	43	0.1	70	0.1	31	53	19
<i>V. pantothenticus</i> (5)	泛酸枝芽孢杆菌	0.1	94	28	50	99.9	0.1	99.9	99.9	78	89	99.9	0.1	0.1	99.9	0.1	99.9	0.1	0.1	0.1	78	0.1	22	50	50
<i>B. pumilus</i> (4)	短小芽孢杆菌	93	99	20	99	98	70	10	99	9	99	99	99	30	50	68	44	12	1	1	50	1	60	92	1
<i>B. sphaericus</i>	球形芽孢杆菌	0.1	0.1	1	1	1	1	0.1	0.1	0.1	1	2	0.1	0.1	4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	6	1	47	11	14
<i>B. subtilis</i> (4)	枯草芽孢杆菌	95	98	79	96	79	47	51	91	94	99	99	74	1	17	1	93	82	1	0.1	84	0.1	60	99	65
<i>B. thiaminolyticus</i>	解维生素乙芽孢杆菌	0.1	91	91	0.1	99.9	99.9	0.1	99.9	0.1	99.9	99.9	0.1	9	99.9	91	99.9	0.1	99.9	27	99.9	4	99.9	27	18
<i>P. polymyxa</i> (2)	多粘类芽孢杆菌	50	50	0.1	50	50	50	17	50	0.1	50	99	95	0.1	95	24	99	74	30	0.1	95	0.1	10	92	72
<i>P. macerans</i> (2)	浸麻类芽孢杆菌	99	99	25	97	99	97	77	96	45	99.9	99.9	99	2	99.9	54	85	85	78	0.1	95	1	1	64	36
<i>Br. brevis</i> (3)	短小短芽孢杆菌	1	7	7	16	1	1	1	1	1	6	8	2	0.1	5	0.1	1	1	0.1	1	24	6	31	50	53
<i>Br. Laterosporus</i> (3)	侧孢短芽孢杆菌	3	77	3	82	82	0.1	3	88	3	6	99	15	0.1	1	0.1	3	1	0.1	13	3	0.1	31	79	70

注：（1）*B. cereus* Group 包括： *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoide*), 和 *B. weihenstephanensis*;

（2）*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* 和 *B. pumilus* 属于 *B. subtilis*;

（3）*B. alvei*, *B. polymyxa* 和 *B. macerans* 现在为 *Paenibacillus* spp.

（4）*B.brevis* 和 *B. laterosporus* 现在为 *Brevibacillus* spp.

（5）*B. pantothenicus* 现在为 *Vergibacillus pantothenicus*