

团 体 标 准

T/QGCML 3888—2024

熟大米蜡样芽孢杆菌检验规范

Specification for the test of *Bacillus cereus* in cooked rice

2024 - 03 - 15 发布

2024 - 03 - 30 实施

## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 设备和材料 .....	1
5 培养基及试剂 .....	1
6 检验方法 .....	2
7 操作步骤 .....	2
8 结果报告 .....	4

## 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。

本文件由运城市市场监管综合行政执法队提出。

本文件由全国城市工业品贸易中心联合会归口。

本文件起草单位：运城市市场监管综合行政执法队、运城市综合检验检测中心、山西大学、玖零零幺质量研究院（山西）有限公司。

本文件主要起草人：窦梦璇、曹本男、韩珍珍、王彬、师娟、王彪、张锦华、李宣英。

# 熟大米蜡样芽孢杆菌检验规范

## 1 范围

本文件规定了熟大米蜡样芽孢杆菌检验的术语和定义、设备和材料、培养基和试剂、检验方法、操作步骤和结果报告。

本文件适用于熟大米蜡样芽孢杆菌的检验。

## 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 4789.14—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

## 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

除生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- a) 显微镜带照相系统，10倍~100倍（油镜）；
- b) 浊度仪；
- c) 全自动微生物鉴定及药敏分析系统；
- d) 生物安全柜；
- e) 生化培养箱；
- f) 蜡样芽孢杆菌（ATCC 11778 或其他等效标准菌株）；
- g) 苏云金芽孢杆菌（ATCC 10792 或其他等效标准菌株）；
- h) 蕈状芽孢杆菌（CICC 21473 或其他等效标准菌株）；
- i) 巨大芽孢杆菌（ATCC 14581 或其他等效标准菌株）；
- j) 大肠埃希氏菌（CMCC B44102 或其他等效标准菌株）。

## 5 培养基及试剂

检验中使用的培养基及试剂如下：

- a) 甘露醇卵黄多粘菌素（MYP）琼脂；
- b) 动力培养基；
- c) 硫酸锰营养琼脂培养基；
- d) 胰酪胨大豆羊血（TSSB）琼脂；
- e) 溶菌酶营养肉汤；
- f) 生化鉴定试剂盒；
- g) 革兰氏染色液；

h) BCL 鉴定卡。

## 6 检验方法

6.1 按 GB 4789.14—2014 的规定对样品进行蜡样芽孢杆菌检验。对检出蜡样芽孢杆菌的样品取  $n=5$  进行检验,依次编号为 01 ~ 05,共 5 组,每组做两个平行,步骤依次为增菌、分离、鉴定和计数。

6.2 检测前应对实验室的环境、关键培养基、菌种进行验证,确保实验准确。

## 7 操作步骤

### 7.1 样品处理

冷冻样品应在  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下不超过 15 min 或在  $(2\sim5)\text{ }^{\circ}\text{C}$  不超过 18 h 解冻,若不能及时检验,应放于  $-10\text{ }^{\circ}\text{C} \sim -20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。非冷冻且易腐的样品应及时检验,若不能及时检验,应置于  $(2\sim5)\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存,24 h 内检验。

### 7.2 样品制备

称取样品 25 g,放入盛有 225 mL PBS 或生理盐水的无菌均质杯内,用旋转刀片式均质器以 8 000 r/min ~ 10 000 r/min 均质 1 min ~ 2 min,或放入盛有 225 mL PBS 或生理盐水的无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打 1 min ~ 2 min。若样品为液态,吸取 25 mL 样品至盛有 225 mL PBS 或生理盐水的无菌锥形瓶(瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠)中,振荡混匀,作为 1:10 的样品匀液。

### 7.3 样品的稀释

吸取 7.2 中 1:10 的样品液 1 mL 加到装有 9 mL PBS 或生理盐水的稀释管中充分混制成 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,应换用 1 支 1 mL 无菌吸管或吸头。

### 7.4 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(液体样品可包括原液),以 0.3 mL、0.3 mL、0.4 mL 接种量分别移入三块 MYP 琼脂平板,用无菌 L 棒涂布整个平板,涂布时应注意不触及平板边缘。使用前,如 MYP 琼脂平板表面有水珠,可放在  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$  的培养箱里干燥,直到平板表面的水珠消失。

### 7.5 分离

在通常情况下,涂布后,将平板静置 10 min。如样液不易吸收,可将平板放在培养箱  $(30\pm1)\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 1 h,等样品匀液吸收后翻转平皿,倒置于培养箱, $(30\pm1)\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $(24\pm2)\text{ h}$ 。如果菌落不典型,可继续培养  $(24\pm2)\text{ h}$  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)。

### 7.6 纯培养

从每个平板中挑取至少 5 个典型落(小于 5 个全选),分别划线接种于营养琼脂平板做纯培养, $(30\pm1)\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $(24\pm2)\text{ h}$ ,进行确证试验。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。

### 7.7 鉴定

分别挑取纯培养的单菌落，用生化鉴定试剂盒对可疑菌落进行生化鉴定，符合 GB 4789.14—2014 中蜡样芽孢杆菌的生化特征，同时用全自动微生物鉴定系统鉴定可疑菌株，两者结果均为蜡样芽孢杆菌，判定为蜡样芽孢杆菌。

## 7.8 计算

### 7.8.1 典型菌落计数和确认

7.8.1.1 选择有典型蜡样芽孢杆菌菌落的平板，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) 现象按公式 (1) 计算，如果出现 g) 现象则按公式 (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。

7.8.1.2 从每个平板中至少挑取 5 个典型菌落（小于 5 个全选），划线接种于营养琼脂平板做纯培养，(30±1)℃ 培养 (24±2) h。

### 7.8.2 样品中蜡样芽孢杆菌菌落数计算公式

7.8.2.1 公式 (1)：

$$T = \frac{AB}{Cd} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- T——样品中蜡样芽孢杆菌菌落数；
- A——某一稀释度蜡样芽孢杆菌典型菌落的总数；
- B——鉴定结果为蜡样芽孢杆菌的菌落数；
- C——用于蜡样芽孢杆菌鉴定的菌落数；
- d——稀释因子。

7.8.2.2 公式 (2)：

$$T = \frac{A_1B_1/C_1 + A_2B_2/C_2}{1.1d} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- T——样品中蜡样芽孢杆菌菌落数；
- A<sub>1</sub>——第一稀释度（低稀释倍数）蜡样芽孢杆菌典型菌落的总数；
- B<sub>1</sub>——第一稀释度（低稀释倍数）鉴定结果为蜡样芽孢杆菌的菌落数；
- C<sub>1</sub>——第一稀释度（低稀释倍数）用于蜡样芽孢杆菌鉴定的菌落数；
- A<sub>2</sub>——第二稀释度（高稀释倍数）蜡样芽孢杆菌典型菌落的总数；

$B_2$ ——第二稀释度（高稀释倍数）鉴定结果为蜡样芽孢杆菌的菌落数；

$C_2$ ——第二稀释度（高稀释倍数）用于蜡样芽孢杆菌鉴定的菌落数；

1.1——计算系数（如果第二稀释度蜡样芽孢杆菌鉴定结果为 0，计算系数采用 1）；

$d$ ——稀释因子（第一稀释度）。

## 8 结果报告

8.1 根据 MYP 平板上蜡样芽孢杆菌的典型菌落数，按公式（1）、公式（2）计算，报告每 g（mL）样品中蜡样芽孢杆菌菌数，以 CFU/g（mL）表示；如 T 值为 0，则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。

8.2 必要时应报告蜡样芽孢杆菌生化分型结果。

---