



中华人民共和国国家标准

GB 4789.34—2016

食品安全国家标准 食品微生物学检验 双歧杆菌检验

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会
国家食品药品监督管理总局 发布

前　　言

本标准代替 GB 4789.34—2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验 双歧杆菌的鉴定》。

本标准与 GB 4789.34—2012 相比,主要变化如下:

——增加了双歧杆菌的计数方法;

——增加了 MRS 培养基;

——修改了标准的适用范围;

——修改了附录 B 为可选项。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 双歧杆菌检验

1 范围

本标准规定了双歧杆菌(*Bifidobacterium*)的鉴定及计数方法。

本标准适用于双歧杆菌纯菌菌种的鉴定及计数。本标准适用于食品中仅含有单一双歧杆菌的菌种鉴定。本标准适用于食品中仅含有双歧杆菌属的计数,即食品中可包含一个或多个不同的双歧杆菌菌种。

2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

- 2.1 恒温培养箱:36 ℃±1 ℃。
- 2.2 冰箱:2 ℃~5 ℃。
- 2.3 天平:感量0.01 g。
- 2.4 无菌试管:18 mm×180 mm、15 mm×100 mm。
- 2.5 无菌吸管:1 mL(具0.01 mL刻度)、10 mL(具0.1 mL刻度)或微量移液器(200 μL~1 000 μL)及配套吸头。
- 2.6 无菌培养皿:直径90 mm。

3 培养基和试剂

- 3.1 双歧杆菌培养基;见A.1。
- 3.2 PYG培养基;见A.2。
- 3.3 MRS培养基;见A.3。
- 3.4 甲醇:分析纯。
- 3.5 三氯甲烷:分析纯。
- 3.6 硫酸:分析纯。
- 3.7 冰乙酸:分析纯。
- 3.8 乳酸:分析纯。

4 检验程序

双歧杆菌的检验程序见图1。

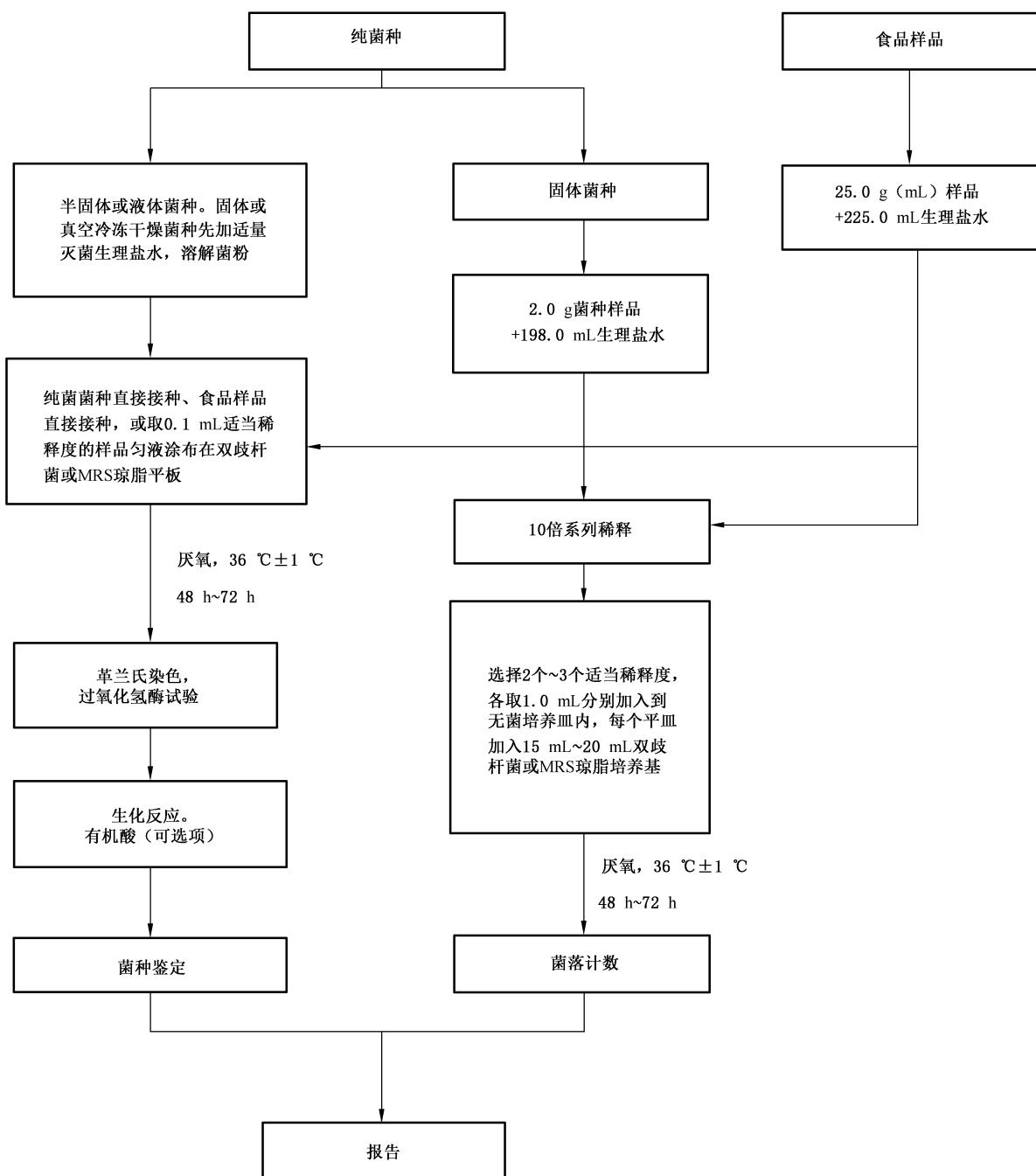


图 1 双歧杆菌的检验程序

5 操作步骤

5.1 无菌要求

全部操作过程均应遵循无菌操作程序。

5.2 双歧杆菌的鉴定

5.2.1 纯菌菌种

5.2.1.1 样品处理:半固体或液体菌种直接接种在双歧杆菌琼脂平板或MRS琼脂平板。固体菌种或真空冷冻干燥菌种,可先加适量灭菌生理盐水或其他适宜稀释液,溶解菌粉。

5.2.1.2 接种:接种于双歧杆菌琼脂平板或MRS琼脂平板。 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 $48\text{ h}\pm2\text{ h}$,可延长至 $72\text{ h}\pm2\text{ h}$ 。

5.2.2 食品样品

5.2.2.1 样品处理:取样 25.0 g(mL) ,置于装有 225.0 mL 生理盐水的灭菌锥形瓶或均质袋内,于 $8\,000\text{ r/min}\sim10\,000\text{ r/min}$ 均质 $1\text{ min}\sim2\text{ min}$,或用拍击式均质器拍打 $1\text{ min}\sim2\text{ min}$,制成 $1:10$ 的样品匀液。冷冻样品可先使其在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下解冻,时间不超过 18 h ;也可在温度不超过 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下解冻,时间不超过 15 min 。

5.2.2.2 接种或涂布:将上述样品匀液接种在双歧杆菌琼脂平板或MRS琼脂平板,或取 0.1 mL 适当稀释度的样品匀液均匀涂布在双歧杆菌琼脂平板或MRS琼脂平板。 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 $48\text{ h}\pm2\text{ h}$,可延长至 $72\text{ h}\pm2\text{ h}$ 。

5.2.2.3 纯培养:挑取3个或以上的单个菌落接种于双歧杆菌琼脂平板或MRS琼脂平板。 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 $48\text{ h}\pm2\text{ h}$,可延长至 $72\text{ h}\pm2\text{ h}$ 。

5.2.3 菌种鉴定

5.2.3.1 涂片镜检:挑取双歧杆菌平板或MRS平板上生长的双歧杆菌单个菌落进行染色。双歧杆菌为革兰氏染色阳性,呈短杆状、纤细杆状或球形,可形成各种分支或分叉等多形态,不抗酸,无芽孢,无动力。

5.2.3.2 生化鉴定:挑取双歧杆菌平板或MRS平板上生长的双歧杆菌单个菌落,进行生化反应检测。过氧化氢酶试验为阴性。双歧杆菌的主要生化反应见表1。可选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统。

表1 双歧杆菌菌种主要生化反应

编号	项目	两歧双歧杆菌 (<i>B. bifidum</i>)	婴儿双歧杆菌 (<i>B.infantis</i>)	长双歧杆菌 (<i>B.longum</i>)	青春双歧杆菌 (<i>B.adolescentis</i>)	动物双歧杆菌 (<i>B.animalis</i>)	短双歧杆菌 (<i>B.breve</i>)
1	L-阿拉伯糖	-	-	+	+	+	-
2	D-核糖	-	+	+	+	+	+
3	D-木糖	-	+	+	d	+	+
4	L-木糖	-	-	-	-	-	-
5	阿东醇	-	-	-	-	-	-
6	D-半乳糖	d	+	+	+	d	+
7	D-葡萄糖	+	+	+	+	+	+
8	D-果糖	d	+	+	d	d	+
9	D-甘露糖	-	+	+	-	-	-
10	L-山梨糖	-	-	-	-	-	-

表 1(续)

编号	项目	两歧双歧杆菌 (<i>B. bifidum</i>)	婴儿双歧杆菌 (<i>B.infantis</i>)	长双歧杆菌 (<i>B.longum</i>)	青春双歧杆菌 (<i>B.adolescentis</i>)	动物双歧杆菌 (<i>B.animalis</i>)	短双歧杆菌 (<i>B.breve</i>)
11	L-鼠李糖	—	—	—	—	—	—
12	卫矛醇	—	—	—	—	—	—
13	肌醇	—	—	—	—	—	+
14	甘露醇	—	—	—	— ^a	—	— ^a
15	山梨醇	—	—	—	— ^a	—	— ^a
16	α-甲基-D-葡萄糖甙	—	—	+	—	—	—
17	N-乙酰-葡萄糖胺	—	—	—	—	—	+
18	苦杏仁甙(扁桃甙)	—	—	—	+	+	—
19	七叶灵	—	—	+	+	+	—
20	水杨甙(柳醇)	—	+	—	+	+	—
21	D-纤维二糖	—	+	—	d	—	—
22	D-麦芽糖	—	+	+	+	+	+
23	D-乳糖	+	+	+	+	+	+
24	D-蜜二糖	—	+	+	+	+	+
25	D-蔗糖	—	+	+	+	+	+
26	D-海藻糖(覃糖)	—	—	—	—	—	—
27	菊糖(菊根粉)	—	— ^a	—	— ^a	—	— ^a
28	D-松三糖	—	—	+	+	—	—
29	D-棉籽糖	—	+	+	+	+	+
30	淀粉	—	—	—	+	—	—
31	肝糖(糖原)	—	—	—	—	—	—
32	龙胆二糖	—	+	—	+	+	+
33	葡萄糖酸钠	—	—	—	+	—	—

注: + 表示 90% 以上菌株阳性; - 表示 90% 以上菌株阴性; d 表示 11%~89% 以上菌株阳性。

^a 表示某些菌株阳性。

5.2.3.3 有机酸测定: 测定双歧杆菌的有机酸代谢产物(可选项), 见附录 B。

5.3 双歧杆菌的计数

5.3.1 纯菌菌种

5.3.1.1 固体和半固体样品的制备: 以无菌操作称取 2.0 g 样品, 置于盛有 198.0 mL 稀释液的无菌均质杯内, 8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min, 或置于盛有 198.0 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 1:100 的样品匀液。

5.3.1.2 液体样品的制备:以无菌操作量取 1.0 mL 样品,置于 9.0 mL 稀释液中,混匀,制成 1:10 的样品匀液。

5.3.2 食品样品

5.3.2.1 样品处理:取样 25.0 g(mL),置于装有 225.0 mL 生理盐水的灭菌锥形瓶或均质袋内,于 8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min,或用拍击式均质器拍打 1 min~2 min,制成 1:10 的样品匀液。冷冻样品可先使其在 2 ℃~5 ℃ 条件下解冻,时间不超过 18 h;也可在温度不超过 45 ℃ 的条件下解冻,时间不超过 15 min。

5.3.3 系列稀释及培养

用1 mL无菌吸管或微量移液器,制备10倍系列稀释样品匀液,于8 000 r/min~10 000 r/min均质1 min~2 min,或用拍击式均质器拍打1 min~2 min。每递增稀释一次,即换用1次1 mL灭菌吸管或吸头。根据对样品浓度的估计,选择2个~3个适宜稀释度的样品匀液,在进行10倍递增稀释时,吸取1.0 mL样品匀液于无菌平皿内,每个稀释度做两个平皿。同时,分别吸取1.0 mL空白稀释液加入两个无菌平皿内作空白对照。及时将15 mL~20 mL冷却至46 °C的双歧杆菌琼脂培养基或MRS琼脂培养基(可放置于46 °C±1 °C恒温水浴箱中保温)倾注平皿,并转动平皿使其混合均匀。从样品稀释到平板倾注要求在15 min内完成。待琼脂凝固后,将平板翻转,36 °C±1 °C厌氧培养48 h±2 h,可延长至72 h±2 h。培养后计数平板上的所有菌落数。

5.3.4 菌落计数

5.3.4.1 可用肉眼观察,必要时用放大镜或菌落计数器,记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落计数以菌落形成单位(*colony-forming units*,CFU)表示。

5.3.4.2 选取菌落数在 30 CFU~300 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于 30 CFU 的平板记录具体菌落数,大于 300 CFU 的可记录为多不可计。每个稀释度的菌落数应采用两个平板的平均数。

5.3.4.3 其中一个平板有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数；若片状菌落不到平板的一半，而其余一半中菌落分布又很均匀，即可计算半个平板后乘以2，代表一个平板菌落数。

5.3.4.4 当平板上出现菌落间无明显界线的链状生长时，则将每条单链作为一个菌落计数。

5.3.5 结果的表述

5.3.5.1 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内,计算两个平板菌落数的平均值,再将平均值乘以相应稀释倍数,作为每克或每毫升中菌落总数结果。

5.3.5.2 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(1)计算:

式中：

N ——样品中菌落数;

ΣC ——平板(含适宜范围菌落数的平板)菌落数之和;

n_1 ——第一稀释度(低稀释倍数)平板个数;

n_2 ——第二稀释度(高稀释倍数)平板个数;

d ——稀释因子(第一稀释度)。

5.3.5.3 若所有稀释度的平板上菌落数均大于 300 CFU，则对稀释度最高的平板进行计数，其他平板可

记录为多不可计,结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。

5.3.5.4 若所有稀释度的平板菌落数均小于 30 CFU,则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

5.3.5.5 若所有稀释度(包括液体样品原液)平板均无菌落生长,则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

5.3.5.6 若所有稀释度的平板菌落数均不在 30 CFU~300 CFU 之间,其中一部分小于 30 CFU 或大于 300 CFU 时,则以最接近 30 CFU 或 300 CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

5.3.6 菌落数的报告

5.3.6.1 菌落数小于 100 CFU 时,按“四舍五入”原则修约,以整数报告。

5.3.6.2 菌落数大于或等于 100 CFU 时,第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后,取前 2 位数字,后面用 0 代替位数;也可用 10 的指数形式来表示,按“四舍五入”原则修约后,采用两位有效数字。

5.3.6.3 称重取样以 CFU/g 为单位报告,体积取样以 CFU/mL 为单位报告。

5.4 结果与报告

根据 5.2.3.1、5.2.3.2、5.2.3.3 结果,报告双歧杆菌属的种名。根据 5.3.6 菌落计数结果出具报告,报告单位以 CFU/g(mL)表示。

附录 A

培养基和试剂

A.1 双歧杆菌琼脂培养基

A.1.1 成分

蛋白胨	15.0 g
酵母浸膏	2.0 g
葡萄糖	20.0 g
可溶性淀粉	0.5 g
氯化钠	5.0 g
西红柿浸出液	400.0 mL
吐温 80	1.0 mL
肝粉	0.3 g
琼脂粉	20.0 g
加蒸馏水至	1 000.0 mL

A.1.2 制法

A.1.2.1 半胱氨酸盐溶液的配制:称取半胱氨酸 0.5 g, 加入 1.0 mL 盐酸, 使半胱氨酸全部溶解, 配制成半胱氨酸盐溶液。

A.1.2.2 西红柿浸出液的制备:将新鲜的西红柿洗净后称重切碎, 加等量的蒸馏水在 100 ℃水浴中加热, 搅拌 90 min, 然后用纱布过滤, 校正 pH 7.0±0.1, 将浸出液分装后, 121 ℃高压灭菌 15 min~20 min。

A.1.2.3 制法:将 A.1.1 所有成分加入蒸馏水中, 加热溶解, 然后加入半胱氨酸盐溶液, 校正 pH 至 6.8±0.1。分装后 121 ℃高压灭菌 15 min~20 min。

A.2 PYG 液体培养基

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	2.5 g
酵母粉	5.0 g
半胱氨酸-HCl	0.25 g
盐溶液	20.0 mL
维生素 K ₁ 溶液	0.5 mL
氯化血红素溶液 5 mg/mL	2.5 mL
加蒸馏水至	500.0 mL

A.2.2 制法

A.2.2.1 盐溶液的配制:称取无水氯化钙 0.2 g, 硫酸镁 0.2 g, 磷酸氢二钾 1.0 g, 磷酸二氢钾 1.0 g, 碳酸

氢钠 10.0 g, 氯化钠 2.0 g, 加蒸馏水至 1 000 mL。

A.2.2.2 氯化血红素溶液(5 mg/mL)的配制:称取氯化血红素 0.5 g 溶于 1 mol/L 氢氧化钠 1.0 mL 中, 加蒸馏水至 100 mL, 121 ℃ 高压灭菌 15 min~20 min。

A.2.2.3 维生素 K₁ 溶液的配制:称取维生素 K₁ 1.0 g, 加无水乙醇 99.0 mL, 过滤除菌, 避光冷藏保存。

A.2.2.4 制法:除氯化血红素溶液和维生素 K₁ 溶液外, A.2.1 其余成分加入蒸馏水中, 加热溶解, 校正 pH 至 6.0±0.1, 加入中性红溶液。分装后 121 ℃ 高压灭菌 15 min~20 min。临用时加热熔化琼脂, 加入氯化血红素溶液和维生素 K₁ 溶液, 冷至 50 ℃ 使用。

A.3 MRS 培养基

A.3.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉粉	5.0 g
酵母粉	4.0 g
葡萄糖	20.0 g
吐温 80	1.0 mL
K ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	2.0 g
醋酸钠 · 3H ₂ O	5.0 g
柠檬酸三铵	2.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.05 g
琼脂粉	15.0 g
加蒸馏水至	1 000.0 mL

A.3.2 制法

将 A.3.1 所有成分加入蒸馏水中, 加热溶解, 调节 pH 至 6.2±0.1, 分装后 121 ℃ 高压灭菌 15 min~20 min。

附录 B

双歧杆菌的有机酸代谢产物检测方法

B.1 双歧杆菌培养液制备

挑取双歧杆菌琼脂平板或 MRS 琼脂平板上纯培养的双歧杆菌接种于 PYG 液体培养基, 同时用未接种菌的 PYG 液体培养基做空白对照, 厌氧, $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。

B.2 标准液的配制

B.2.1 乙酸标准溶液: 准确吸取分析纯冰乙酸 5.7 mL, 加水稀释至 100.0 mL, 摆匀, 进行标定, 配成约 1.0 mol/L 的乙酸标准溶液。标定方法为: 准确称取乙酸 3.0 g, 加水 15.0 mL, 酚酞指示液 2 滴, 用 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液滴定, 并将滴定结果用空白试验校正。1.0 mL 1 mol/L 氢氧化钠溶液相当于 60.05 mg 的乙酸。

B.2.2 乙酸使用液: 将经标定的乙酸标准溶液用水稀释至 20.0 mmol/L。

B.2.3 乳酸标准溶液: 吸取分析纯乳酸 8.4 mL, 加水稀释至 100.0 mL, 摆匀, 进行标定, 配成约 1.0 mol/L 的乳酸标准溶液。标定方法为: 准确称取乳酸 1.0 g, 加水 50.0 mL, 加入 1 mol/mL 氢氧化钠滴定液 25.0 mL, 煮沸 5 min, 加入酚酞指示液 2 滴, 同时用 0.5 mol/mL 硫酸滴定液滴定, 并将滴定结果用空白试验校正。1.0 mL 1 mol/mL 氢氧化钠溶液相当于 90.08 mg 的乳酸。

B.2.4 乳酸使用液: 将乳酸标准溶液用水稀释至 20.0 mmol/L。

B.3 方法

B.3.1 乙酸的处理

取双歧杆菌培养液 2.0 mL~3.0 mL 放入 10 mL 离心管中, 加入 0.2 mL 50% 硫酸溶液(体积分数), 混匀, 加入 2.0 mL 丙酮, 混匀后加过量氯化钠, 剧烈振摇 1 min, 再加入 2.0 mL 乙醚, 振摇 1 min 后, 于 3 000 r/min 离心 5 min, 将上清液转入另一试管中, 下层溶液用 2.0 mL 丙酮和 2.0 mL 乙醚重复提取 2 次, 合并有机相, 于 40 °C 水浴中用氮气吹至尽干, 用 20 mmol/L 的磷酸二氢钠溶液(pH 2.0)-乙腈(99+1)溶解并定容至 1.0 mL, 混匀后备用。同样操作步骤处理乙酸标准和空白培养液。

B.3.2 乳酸的处理

取双歧杆菌培养液 2.0 mL~3.0 mL 放入 10 mL 比色管中, 100 °C 水浴 10 min, 加入 0.2 mL 50% (体积分数)硫酸溶液, 混匀, 加入 1.0 mL 甲醇, 于 58 °C 水浴 30 min 后加水 1.0 mL, 加三氯甲烷 1.0 mL, 振摇 3 min, 3 000 r/min 离心 5 min, 取三氯甲烷层分析。同样操作步骤处理乳酸标准和空白培养液。

B.3.3 液相色谱条件

色谱柱: ZorbaxSb-Aq 液相色谱柱($4.6 \times 150\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$)或其他等效色谱柱; 流动相: 20 mmol/L 的磷酸二氢钠溶液(pH 2.0)-乙腈(99+1), 等度洗脱, 流速 1 mL/min; 柱温箱: 35 °C; 紫外检测波长: 210 nm; 外标定量。

B.4 结果计算

式中：

X ——样品培养液中乙酸或乳酸的含量,单位为微摩尔每毫升($\mu\text{mol}/\text{mL}$);

$A_{\text{样}}$ ——样品培养液中乙酸或乳酸的峰面积；

$A_{\text{空}}$ —— 空白培养液中乙酸或乳酸的峰面积；

$A_{\text{标}}$ ——乙酸标准或乳酸标准的峰面积；

c ——乙酸标准或乳酸标准的浓度,单位为微摩尔每毫升($\mu\text{mol}/\text{mL}$)。

B.5 允许差

相对相差 $\leq 15\%$ 。

B.6 结果判定

如果乙酸($\mu\text{mol}/\text{mL}$)与乳酸($\mu\text{mol}/\text{mL}$)比值大于1,可判定为是双歧杆菌的有机酸代谢产物。