

食品安全国家标准 食品微生物检验系列 标准变更要点解读

曾静

北京出入境检验检疫局

2017.04

概况:

共计15个4789系列标准变更

- GB 4789.1-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则
- GB 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定
- GB 4789.3-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数
- GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验
- GB 4789.6-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验
- GB 4789.10-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验
- GB 4789.12-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验
- GB 4789.16-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 常见产毒霉菌的形态学鉴定
- GB 4789.30-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验
- 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
- GB 4789.35-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验
- GB 4789.36-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌O157H7NM检验
- GB 4789.40-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验
- GB 4789.42-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 诺如病毒检验
- GB 4789.43-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 微生物源酶制剂抗菌活性的测定



中华人民共和国国家标准

GB 4789. 2—2010

食品安全国家标准

食品微生物学检验 菌落总数测定

National food safety standard

Food microbiological examination: Aerobic plate count

2010-03-26 发布

2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布



中华人民共和国国家标准

GB 4789.2—2016

食品安全国家标准

食品微生物学检验 菌落总数测定

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

6.1.3 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL，沿管壁缓慢注于盛有 9 mL 稀释液的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面）**振摇试管或换用 1 支无菌吸管反复吹打使其混合均匀**，制成 1:100 的样品匀液。

特点是：没有任何变化，除了标点符号和公式的表达方式以外

特别需要注意：

1. 酸性样品（酸性饮料）
2. 高渗样品（酱腌菜、蜂蜜等）
3. 含有防腐剂的样品



中华人民共和国国家标准

GB 4789.3—2016

食品安全国家标准

食品微生物学检验 大肠菌群计数

前 言

本标准代替 GB 4789.3—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》、GB/T 4789.32—2002《食品卫生微生物学检验 大肠菌群的快速检测》和 SN/T 0169—2010《进出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检测方法》大肠菌群计数部分。

本标准与 GB 4789.3—2010 相比,主要变化如下:

- 增加了检验原理;
- 修改了适用范围;
- 修改了典型菌落的形态描述;
- 修改了第二法平板菌落数的选择;
- 修改了第二法证实试验;
- 修改了第二法平板计数的报告。



食品安全国家标准

食品微生物学检验 大肠菌群计数

1 范围

本标准规定了食品中大肠菌群(Coliforms)计数的方法。

本标准第一法适用于大肠菌群含量较低的食品中大肠菌群的计数；第二法适用于大肠菌群含量较高的食品中大肠菌群的计数。

GB 4789.3—2010

食品安全国家标准

食品微生物学检验 大肠菌群计数

1 范围

本标准规定了食品中大肠菌群(Coliforms)计数的方法。

本标准适用于食品中大肠菌群的计数。

2016

9.3 平板菌落数的选择

选取菌落数在 15 CFU~150 CFU 之间的平板,分别计数平板上出现的典型和可疑大肠菌群菌落(如菌落直径较典型菌落小)。典型菌落为紫红色,菌落周围有红色的胆盐沉淀环,菌落直径为 0.5 mm 或更大,最低稀释度平板低于 15 CFU 的记录具体菌落数。

9.4 证实试验

学检验 大肠菌群计数.pdf - Adobe Reader

7 / 10



100%



Tools

S

板,置于36℃±1℃培养18h~24h。

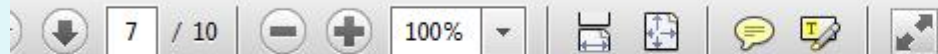
8.3 平板菌落数的选择

选取菌落数在 15 CFU~150 CFU 之间的平板,分别计数平板上出现的典型和可疑大肠菌群菌落。典型菌落为紫红色,菌落周围有红色的胆盐沉淀环,菌落直径为 0.5 mm 或更大。

9.3 平板菌落数的选择

选取菌落数在 15 CFU~150 CFU 之间的平板,分别计数平板上出现的典型和可疑大肠菌群菌落(如菌落直径较典型菌落小)。典型菌落为紫红色,菌落周围有红色的胆盐沉淀环,菌落直径为 0.5 mm 或更大,最低稀释度平板低于 15 CFU 的记录具体菌落数。

微生物学检验 大肠菌群计数.pdf - Adobe Reader



Tools ... Sig

8.3 平板菌落数的选择

选取菌落数在 15 CFU~150 CFU 之间的平板,分别计数平板上出现的典型和可疑大肠菌群菌落。典型菌落为紫红色,菌落周围有红色的胆盐沉淀环,菌落直径为 0.5 mm 或更大。

9.4 证实试验

从 VRBA 平板上挑取 10 个不同类型的典型和可疑菌落，少于 10 个菌落的挑取全部典型和可疑菌落。分别移种于 BGLB 肉汤管内， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~48 h，观察产气情况。凡 BGLB 肉汤管产气，即可报告为大肠菌群阳性。

微生物检验 大肠菌群计数.pdf - Adobe Reader



Tools

8.4 证实试验

从 VRBA 平板上挑取 10 个不同类型的典型和可疑菌落，分别移种于 BGLB 肉汤管内， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~48 h，观察产气情况。凡 BGLB 肉汤管产气，即可报告为大肠菌群阳性。

9.5 大肠菌群平板计数的报告

经最后证实为大肠菌群阳性的试管比例乘以 9.3 中计数的平板菌落数,再乘以稀释倍数,即为每 g(mL) 样品中大肠菌群数。例: 10^{-4} 样品稀释液 1 mL,在 VRBA 平板上有 100 个典型和可疑菌落,挑取其中 10 个接种 BGLB 肉汤管,证实有 6 个阳性管,则该样品的大肠菌群数为: $100 \times 6 / 10 \times 10^4 / \text{g}(\text{mL}) = 6.0 \times 10^5 \text{CFU/g}(\text{mL})$ 。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。

生物学检验 大肠菌群计数.pdf - Adobe Reader



Tools S

8.5 大肠菌群平板计数的报告

经最后证实为大肠菌群阳性的试管比例乘以8.3中计数的平板菌落数,再乘以稀释倍数,即为每g (mL) 样品中大肠菌群数。例: 10^{-4} 样品稀释液1 mL,在VRBA平板上有100个典型和可疑菌落,挑取其中10个接种BGLB肉汤管,证实有6个阳性管,则该样品的大肠菌群数为: $100 \times 6 / 10 \times 10^4 / \text{g}(\text{mL}) = 6.0 \times 10^5 \text{CFU/g}(\text{mL})$ 。



中华人民共和国国家标准

GB 4789.4—2016

食品安全国家标准

食品微生物学检验 沙门氏菌检验

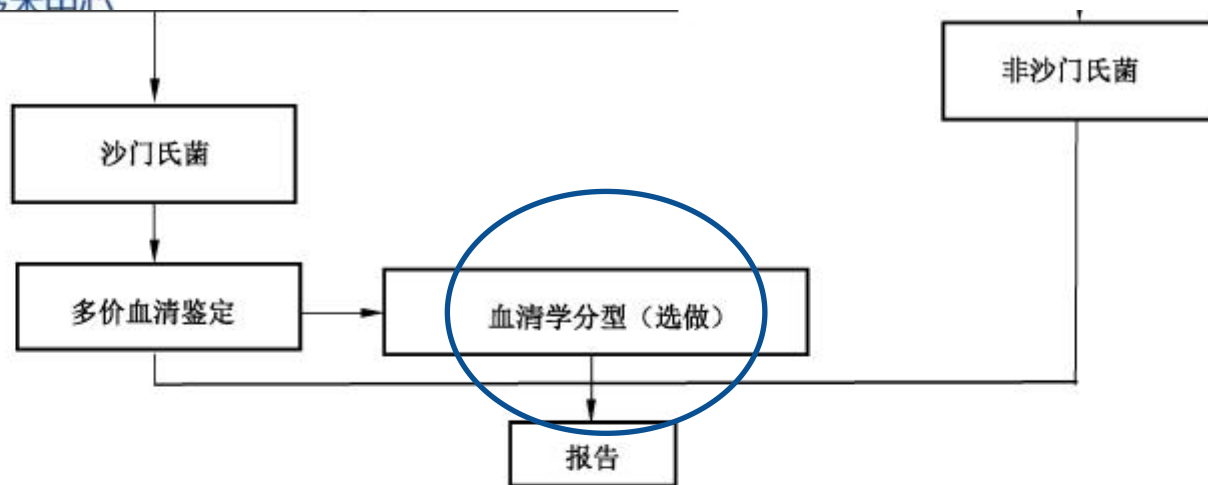


图 1 沙门氏菌检验程序

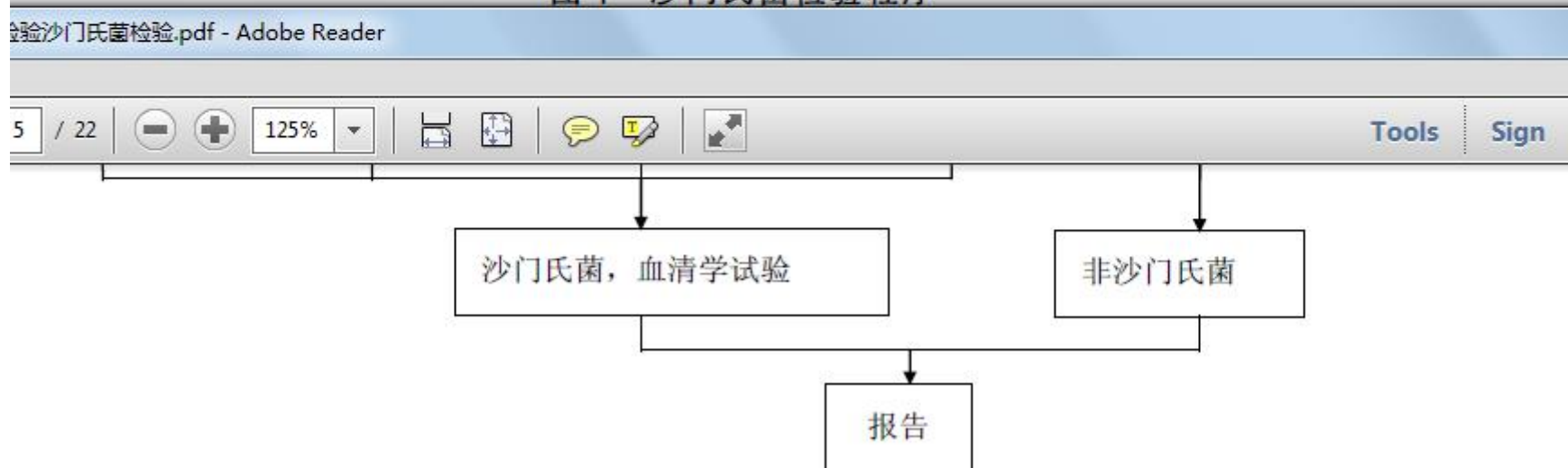


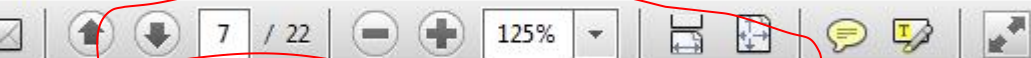
图 1 沙门氏菌检验程序

5.5.1 检查培养物有无自凝性

一般采用 1.2%~1.5% 琼脂培养物作为玻片凝集试验用的抗原。首先排除自凝集反应,在洁净的玻片上滴加一滴生理盐水,将待试培养物混合于生理盐水滴内,使成为均一性的混浊悬液,将玻片轻轻摇动 30 s~60 s,在黑色背景下观察反应(必要时用放大镜观察),若出现可见的菌体凝集,即认为有自凝性,反之无自凝性。对无自凝的培养物参照下面方法进行血清学鉴定。

标准 食品微生物学检验沙门氏菌检验.pdf - Adobe Reader

elp



Tools Sign

5.5.1 抗原的准备

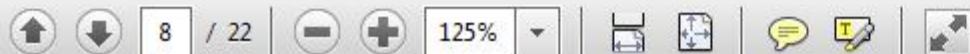
一般采用 1.2%~1.5% 琼脂培养物作为玻片凝集试验用的抗原。

O 血清不凝集时,将菌株接种在琼脂量较高的(如 2%~3%)培养基上再检查;如果是由于 Vi 抗原的存在而阻止了 O 凝集反应时,可挑取菌苔于 1 mL 生理盐水中做成浓菌液,于酒精灯火焰

5.5.2 多价菌体抗原(O)鉴定

在玻片上划出2个约1 cm×2 cm的区域,挑取1环待测菌,各放1/2环于玻片上的每一区域上部,在其中一个区域下部加1滴多价菌体(O)抗血清,在另一区域下部加入1滴生理盐水,作为对照。再用无菌的接种环或针分别将两个区域内的菌苔研成乳状液。将玻片倾斜摇动混合1 min,并对着黑暗背景进行观察,任何程度的凝集现象皆为阳性反应。O血清不凝集时,将菌株接种在琼脂量较高的(如2%~3%)培养基上再检查;如果是由于Vi抗原的存在而阻止了O凝集反应时,可挑取菌苔于1 mL生理盐水中做成浓菌液,于酒精灯火焰上煮沸后再检查。

食品微生物学检验沙门氏菌检验.pdf - Adobe Reader



Tools Sign

5.5.2 多价菌体抗原(O)鉴定

在玻片上划出2个约1 cm×2 cm的区域,挑取1环待测菌,各放1/2环于玻片上的每一区域上部,在其中一个区域下部加1滴多价菌体(O)抗血清,在另一区域下部加入1滴生理盐水,作为对照。再用无菌的接种环或针分别将两个区域内的菌落研成乳状液。将玻片倾斜摇动混合1 min,并对着黑暗背景进行观察,任何程度的凝集现象皆为阳性反应。

5.5.1 抗原的准备

一般采用1.2%~1.5%琼脂培养物作为玻片凝集试验用的抗原。

O血清不凝集时,将菌株接种在琼脂量较高的(如2%~3%)培养基上再检查;如果是由于Vi抗原的存在而阻止了O凝集反应时,可挑取菌苔于1 mL生理盐水中做成浓菌液,于酒精灯火焰

整个标准的缺陷:

1. 样品的制备
2. 对照

SUGGESTED CONTROL CULTURES

In addition to the positive control cultures (typical *Salmonella*), 3 additional *Salmonella* cultures are recommended to assist in the selection of atypical *Salmonella* colony morphology on selective agars. These cultures are a lactose-positive, H₂S-positive *S. diarizonae* (ATCC 12325) and a lactose-negative, H₂S-negative *S. abortus equi* (ATCC 9842); OR a lactose-positive, H₂S-negative *S. diarizonae* (ATCC 29934). These cultures may be obtained from the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

目前许多实验室使用食品中罕见的 *Salmonella tranoroa*



中华人民共和国国家标准

GB/T 4789.6—2003
代替 GB/T 4789.6—1994

食品卫生微生物学检验
致泻大肠埃希氏菌检验

Microbiological examination of food hygiene—
Examination of diarrheogenic *Escherichia coli*



中华人民共和国国家标准

GB 4789.6—2016

食品安全国家标准
食品微生物学检验
致泻大肠埃希氏菌检验

➤ 增加的内容:

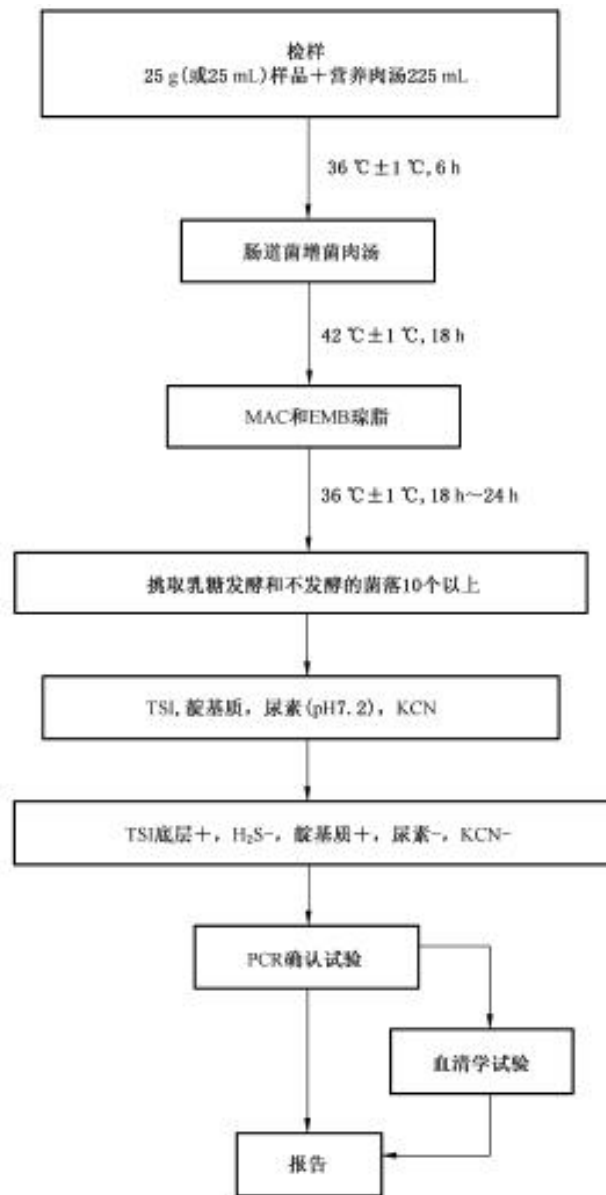
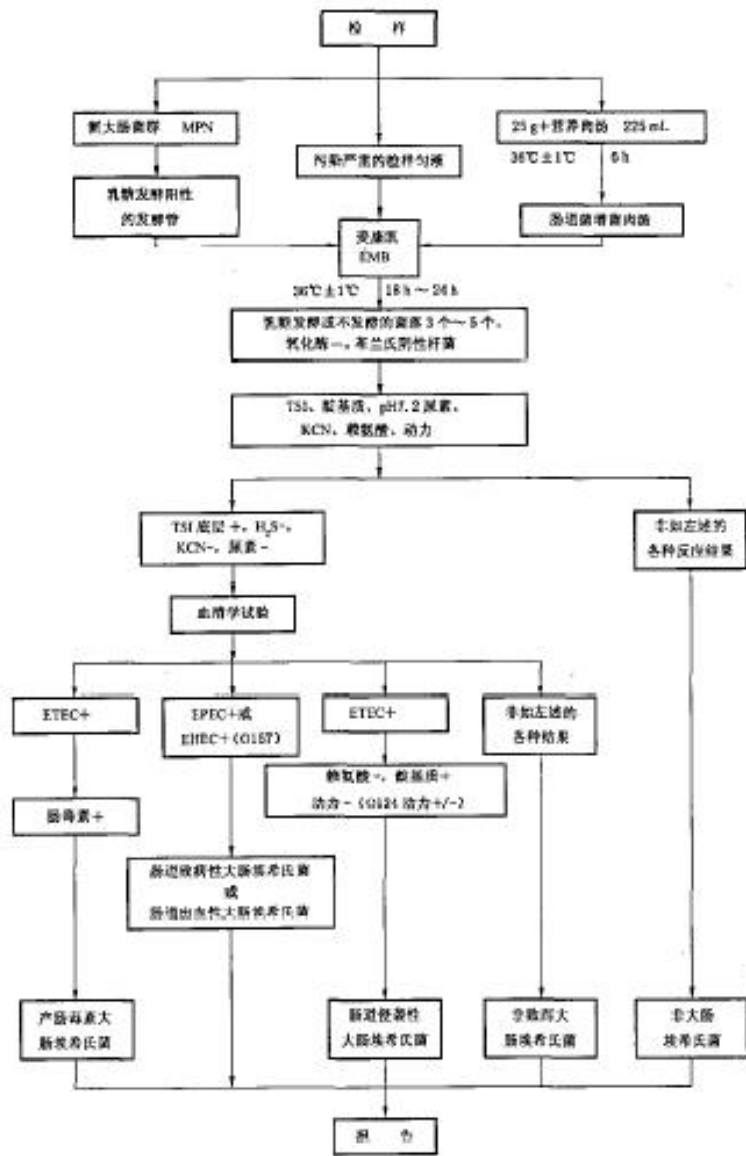
- 增加了术语和定义、缩略语;
- 增加了血清学试验中H 抗原鉴定;
- 增加了PCR确认试验;
- 增加了附录A;

➤ 修改的内容:

- 修改了设备和材料;
- 修改了培养基和试剂;
- 修改了检验程序;
- 修改了血清学试验中致泻大肠埃希氏菌所包括的O 抗原群;

➤ 删除的内容:

- 删除了肠毒素试验



6.4 生化试验

6.4.1 选取平板上可疑菌落 10 个~20 个(10 个以下全选),应挑取乳糖发酵,以及乳糖不发酵和迟缓发酵的菌落,分别接种 TSI 斜面。同时将这些培养物分别接种蛋白胨水、尿素琼脂(pH7.2)和 KCN 肉汤。于 36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。

6.4.2 TSI 斜面产酸或不产酸,底层产酸,靛基质阳性, H₂S 阴性和尿素酶阴性的培养物为大肠埃希氏菌。TSI 斜面底层不产酸,或 H₂S、KCN、尿素有任一项为阳性的培养物,均非大肠埃希氏菌。必要时做革兰氏染色和氧化酶试验。大肠埃希氏菌为革兰氏阴性杆菌,氧化酶阴性。

6.4.3 如选择生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统,可从营养琼脂平板上挑取经纯化的可疑菌落用无菌稀释液制备成浊度适当的菌悬液,使用生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统进行鉴定。

! PCR 作为确证实验

12个PCR反应+空白对照+阴性对照+阳性对照

6.5.3 每次 PCR 反应使用 EPEC、EIEC、ETEC、STEC/EHEC、EAEC 标准菌株作为阳性对照。同时，使用大肠埃希氏菌 ATCC 25922 或等效标准菌株作为阴性对照，以灭菌去离子水作为空白对照，控制 PCR 体系污染。致泻大肠埃希氏菌特征性基因见表 1。

6.5.7 结果判定。电泳结果中空白对照应无条带出现，阴性对照仅有 *uidA* 条带扩增，阳性对照中出现所有目标条带，PCR 试验结果成立。根据电泳图中目标条带大小，判断目标条带的种类，记录每个泳道中目标条带的种类，在表 5 中查找不同目标条带种类及组合所对应的致泻大肠埃希氏菌类别。

表 5 五种致泻大肠埃希氏菌目标条带与型别对照表

致泻大肠埃希氏菌类别	目标条带的种类组合	
EAEC	<i>aggR, astA, pic</i> 中一条或一条以上阳性	
EPEC	<i>bfpB</i> (+/-), <i>escV^a</i> (+), <i>stx1</i> (-), <i>stx2</i> (-)	
STEC/EHEC	<i>escV^a</i> (+/-), <i>stx1</i> (+), <i>stx2</i> (-), <i>bfpB</i> (-) <i>escV^a</i> (+/-), <i>stx1</i> (-), <i>stx2</i> (+), <i>bfpB</i> (-) <i>escV^a</i> (+/-), <i>stx1</i> (+), <i>stx2</i> (+), <i>bfpB</i> (-)	
ETEC	<i>lt, stp, sth</i> 中一条或一条以上阳性	
EIEC	<i>invE^b</i> (+)	

uidA^c(+/-)

^a 在判定 EPEC 或 SETC/EHEC 时, *escV* 与 *eae* 基因等效;

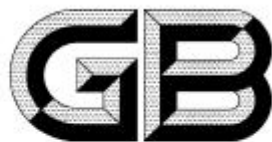
^b 在判定 EIEC 时, *invE* 与 *ipaH* 基因等效。

^c 97% 以上大肠埃希氏菌为 *uidA* 阳性。

7 结果报告

7.1 根据生化试验、PCR 确认试验的结果,报告 25 g(或 25 mL)样品中检出或未检出某类致泻大肠埃希氏菌。

7.2 如果进行血清学试验,根据血清学试验的结果,报告 25 g(或 25 mL)样品中检出的某类致泻大肠埃希氏菌血清型别。



中华人民共和国国家标准

GB 4789.10—2016

食品安全国家标准

食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

前 言

本标准代替 GB 4789.10—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》、SN/T 0172—2010《进出口食品中金黄色葡萄球菌检验方法》、SN/T 2154—2008《进出口食品中凝固酶阳性葡萄球菌检测方法 兔血浆纤维蛋白原琼脂培养基技术》。

本标准与 GB 4789.10—2010 相比,主要变化如下:

——试验用增菌液统一为 7.5%氯化钠肉汤

1 范围

本标准规定了食品中金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的检验方法。

本标准第一法适用于食品中金黄色葡萄球菌的定性检验;第二法适用于金黄色葡萄球菌含量较高的食品中金黄色葡萄球菌的计数;第三法适用于金黄色葡萄球菌含量较低的食品中金黄色葡萄球菌的计数。



中华人民共和国国家标准

GB 4789.12—2016

食品安全国家标准
食品微生物学检验
肉毒梭菌及肉毒毒素检验

没有与其他标准整合

标准名称修改为“食品安全国家标准 食品微生物学检验
肉毒梭菌及肉毒毒素检验”

增加了以下内容：

PCR鉴定方法

结果与报告；

附录A；

修改了以下内容：

设备和材料

修改了培养基和试剂

修改了检验程序

规范了样品制备过程

修改了操作步骤中增菌和分离培养部分试验方法。

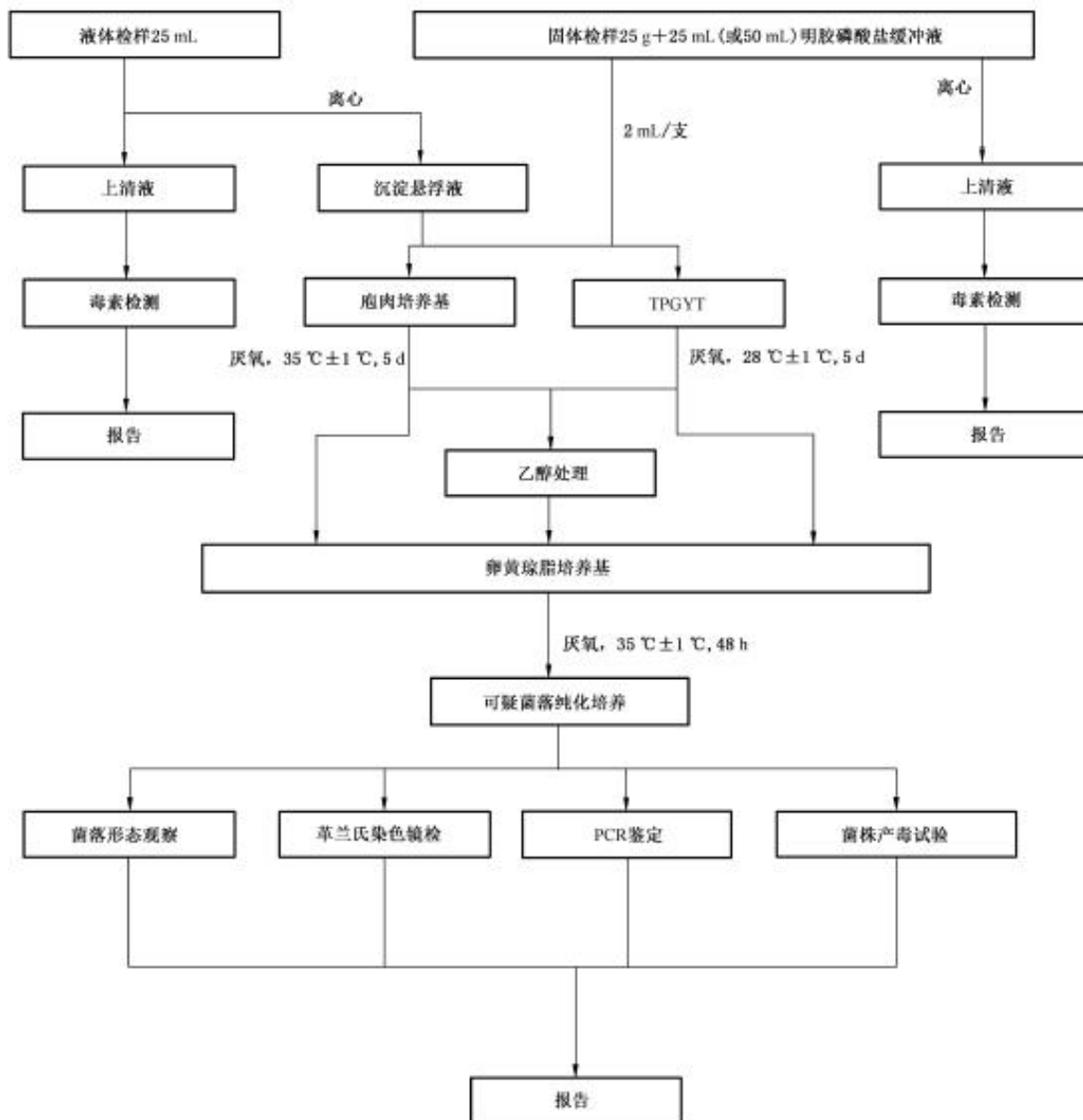


图 1 肉毒梭菌及肉毒毒素检验程序

该标准分为**3**个主要部分：

1. 样品中肉毒毒素的检验
2. 肉毒梭菌的检验 根据PCR的结果将肉毒梭菌分为ABEF型
3. 菌体培养后增菌液肉毒毒素的检验

5.2 肉毒毒素检测

检出和确证实验需要进行动物实验，毒力测定和定型实验是选做项目

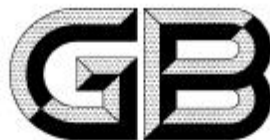
6 结果报告

6.1 肉毒毒素检测结果报告

根据 5.2.2 和 5.2.3 试验结果,报告 25 g(mL)样品中检出或未检出肉毒毒素。
根据 5.2.5 定型试验结果,报告 25 g(mL)样品中检出某型肉毒毒素。

6.2 肉毒梭菌检验结果报告

根据 5.3 各项试验结果,报告样品中检出或未检出肉毒梭菌或检出某型肉毒梭菌。



中华人民共和国国家标准

GB 4789.30—2016

食品安全国家标准
食品微生物学检验
单核细胞增生李斯特氏菌检验

本标准的变化:

1. 增加了“第二法 单核细胞增生李斯特氏菌平板计数法”
2. 增加了“第三法 单核细胞增生李斯特氏菌MPN 计数法”
3. 修改了范围

第一法适用于食品中单核细胞增生李斯特氏菌的定性检验

第二法适用于单核细胞增生李斯特氏菌含量较高的食品

第三法适用于目的菌含量较低($<100\text{CFU/g}$)而杂菌含量较高的食品,特别是牛奶、水以及含干扰菌落计数的颗粒物质的食品。

特点: 在鉴定步骤 “或选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物鉴定系统等”

5.4.2 动力试验:挑取纯培养的单个可疑菌落穿刺半固体或SIM动力培养基,于25 °C~30 °C培养48h,李斯特氏菌有动力,在半固体或SIM培养基上方呈伞状生长,如伞状生长不明显,可继续培养5d,再观察结果。

5.4.5 协同溶血试验cAMP(可选项目):

注:5%~8%的单核细胞增生李斯特氏菌在马红球菌一端有溶血增强现象。

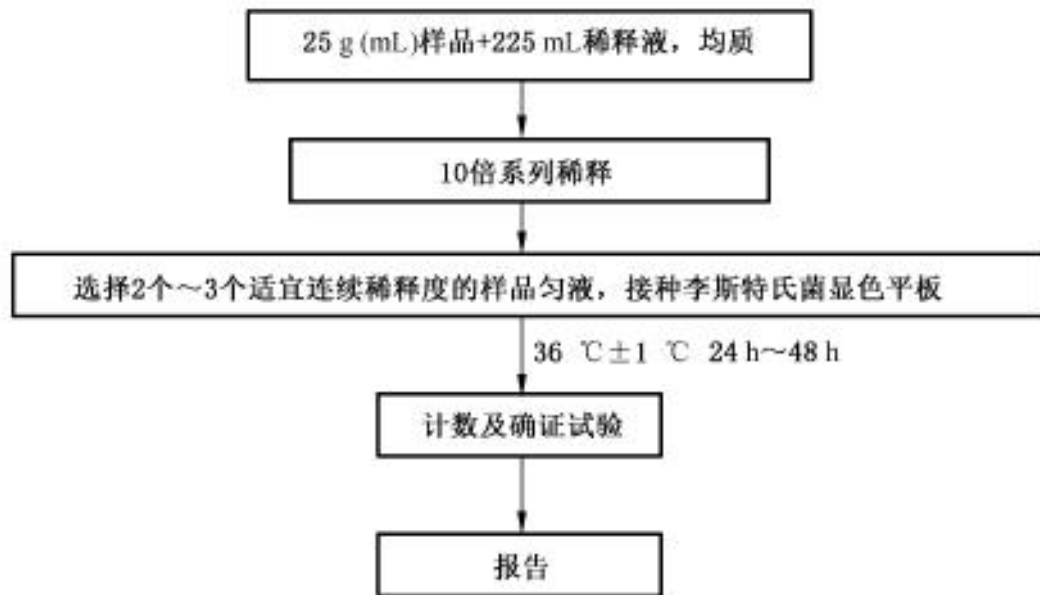


图 2 单核细胞增生李斯特氏菌平板计数程序

样品的稀释：可以使用缓冲蛋白胨水或无添加剂的LB肉汤样品的接种

样品接种：根据对样品污染状况的估计,选择2个~3个适宜连续稀释度的样品匀液
(液体样品可包括原液),

每个稀释度的样品匀液分别吸取1mL以0.3mL、0.3mL、0.4mL的接种量分别加入3块李斯特氏菌显色平板,用无菌L棒涂布整个平板,注意不要触及平板边缘。使用前,如琼脂平板表面有水珠,可放在25°C~50°C的培养箱里干燥,直到平板表面的水珠消失。

7.4 典型菌落计数和确认

7.4.1 单核细胞增生李斯特氏菌在李斯特氏菌显色平板上的菌落特征以产品说明为准。

7.4.2 选择有典型单核细胞增生李斯特氏菌菌落的平板,且同一稀释度3个平板所有菌落数合计在15CFU~150CFU之间的平板,计数典型菌落数。

如果:

- a) 只有一个稀释度的平板菌落数在15CFU~150CFU之间且有典型菌落,计数该稀释度平板上的典型菌落;
- b) 所有稀释度的平板菌落数均小于15CFU且有典型菌落,应计数最低稀释度平板上的典型菌落;

- c) 某一稀释度的平板菌落数大于150CFU 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;
- d) 所有稀释度的平板菌落数大于150CFU 且有典型菌落,应计数最高稀释度平板上的典型菌落;
- e) 所有稀释度的平板菌落数均不在15CFU~150CFU 之间且有典型菌落,其中一部分小于15CFU 或大于150CFU时,应计数最接近15CFU或150CFU的稀释度平板上的典型菌落。以上按式(1)计算。
- f) 2个连续稀释度的平板菌落数均在15CFU~150CFU 之间,按式(2)计算。

7.4.3 从典型菌落中任选5个菌落(小于5个全选),分别按5.3、5.4进行鉴定

8 结果计数

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

式中：

- T —— 样品中单核细胞增生李斯特氏菌菌落数；
- A —— 某一稀释度典型菌落的总数；
- B —— 某一稀释度确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数；
- C —— 某一稀释度用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数；
- d —— 稀释因子。

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

式中：

- T —— 样品中单核细胞增生李斯特氏菌菌落数；
- A₁ —— 第一稀释度(低稀释倍数)典型菌落的总数；
- B₁ —— 第一稀释度(低稀释倍数)确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数；
- C₁ —— 第一稀释度(低稀释倍数)用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数；
- A₂ —— 第二稀释度(高稀释倍数)典型菌落的总数；
- B₂ —— 第二稀释度(高稀释倍数)确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数；
- C₂ —— 第二稀释度(高稀释倍数)用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数；
- 1.1 —— 计算系数；
- d —— 稀释因子(第一稀释度)。



MPN法

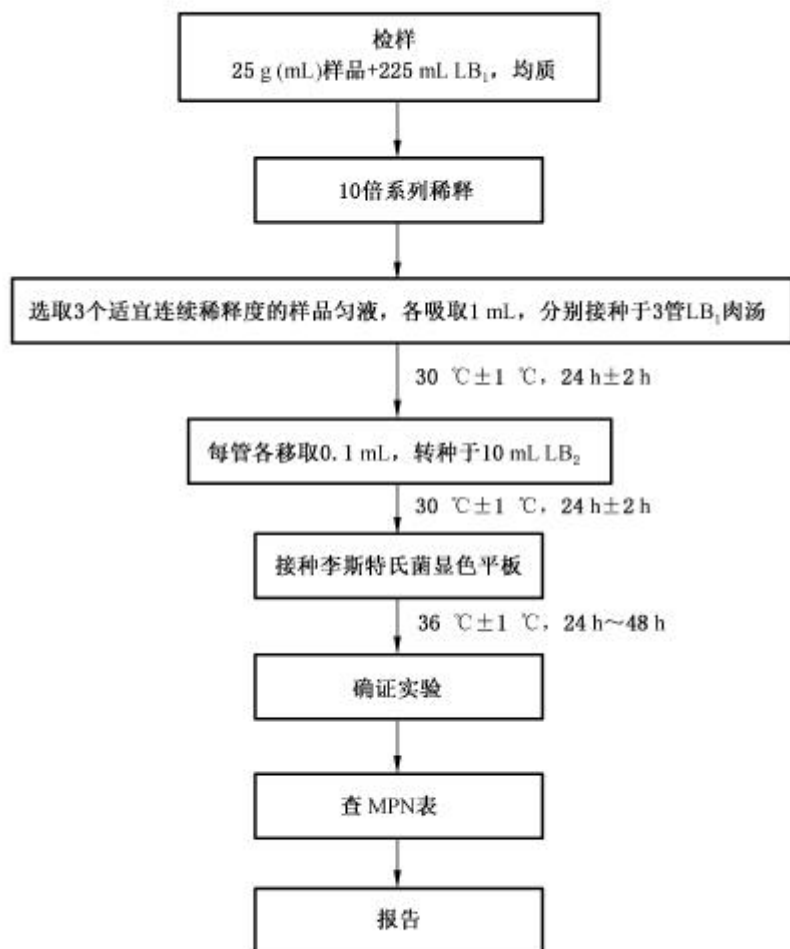


图3 单核细胞增生李斯特氏菌 MPN 计数程序

11.1 样品的稀释

按 7.1 进行。

11.2 接种和培养

11.2.1 根据对样品污染状况的估计,选取 3 个适宜连续稀释度的样品匀液(液体样品可包括原液),接种于 10 mL LB₁ 肉汤,每一稀释度接种 3 管,每管接种 1 mL(如果接种量需要超过 1 mL,则用双料 LB₁ 增菌液)于 30 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h。每管各移取 0.1 mL,转种于 10 mL LB₂ 增菌液内,于 30 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h。

11.2.2 用接种环从各管中移取 1 环,接种李斯特氏菌显色平板,36 °C ± 1 °C 培养 24 h ~ 48 h。

11.3 确证试验

自每块平板上挑取 5 个典型菌落(5 个以下全选),按照 5.3、5.4 进行鉴定。

12 结果与报告

根据证实为单核细胞增生李斯特氏菌阳性的试管管数,查 MPN 检索表(见附录 B),报告每 g(mL) 样品中单核细胞增生李斯特氏菌的最可能数,以 MPN/g(mL)表示。



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

1. 增加了双歧杆菌的计数方法;
2. 增加了**MRS**培养基;
3. 修改了标准的适用范围;
4. 修改了附录**B**为可选项。

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。

2012版标准只是适用于鉴定

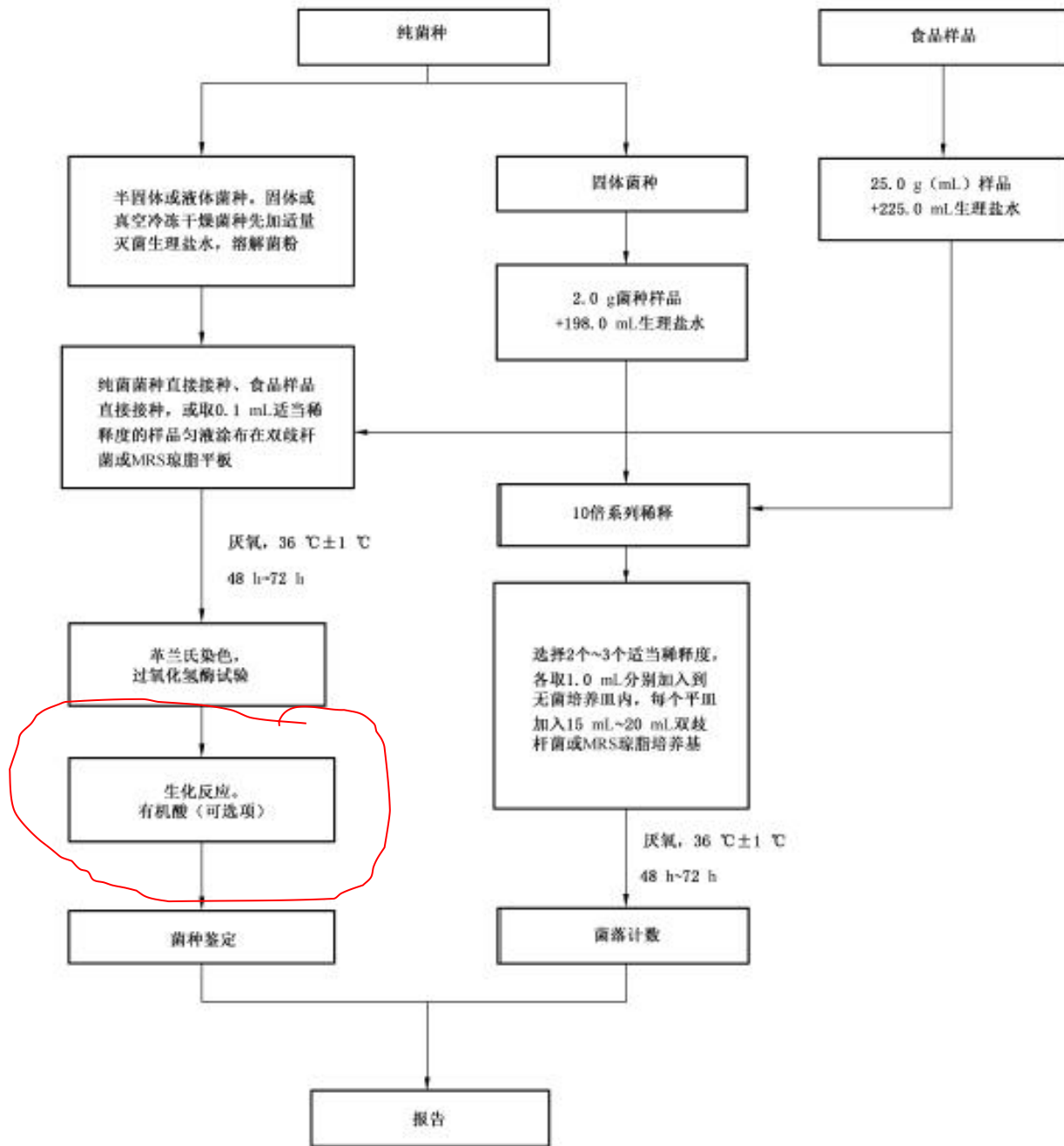


图 1 双歧杆菌的检验程序

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 °C ±1 °C 厌氧培养 48 h ±2 h,可延长至 72 h ±2 h。

5.2.2 食品样品

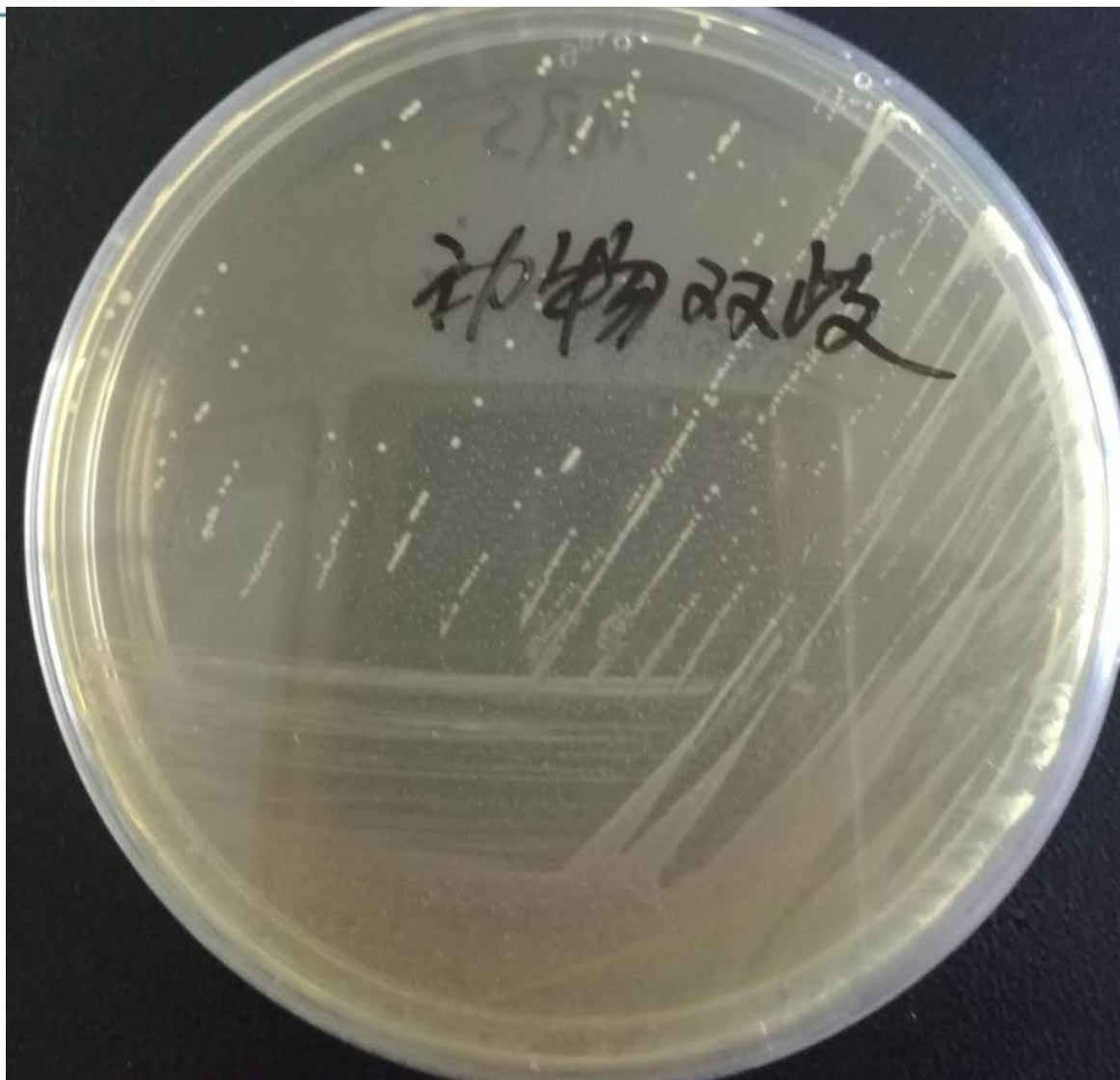
5.2.2.1 样品处理: 取样 25.0 g(mL), 置于装有 225.0 mL 生理盐水的灭菌锥形瓶或均质袋内, 于 8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min, 或用拍击式均质器拍打 1 min~2 min, 制成 1:10 的样品匀液。冷冻样品可先使其在 2 °C~5 °C 条件下解冻, 时间不超过 18 h; 也可在温度不超过 45 °C 的条件解冻, 时间不超过 15 min。

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 °C±1 °C 厌氧培养 48 h±2 h, 可延长至 72 h±2 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 °C±1 °C 厌氧培养 48 h±2 h, 可延长至 72 h±2 h。

没有对双歧杆菌的菌落形态进行描述

MRS平板



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。

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。

6.3 菌落计数

6.3.1 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。

6.3.2 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。

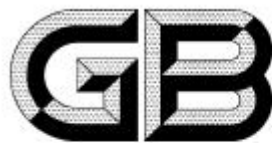
6.3.3 其中一个平板有较大片状菌落生长时,则不宜采用,而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数;若片状菌落不到平板的一半,而其余一半中菌落分布又很均匀,即可计算半个平板后乘以 2,代表一个平板菌落数。

6.3.4 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。

属于放线菌目、放线菌科

形态很不一致的杆菌， $0.5\sim 1.3\ \mu\text{m} \times 1.5\sim 8\ \mu\text{m}$ ，常呈弯、棒状和分支状。单生、成对、V字排列，有时成链，细胞平行成栅栏状，或玫瑰花结状。偶尔呈膨大的球杆状。革兰氏阳性，通常染色不规则。不运动，不产芽孢，抗酸染色阴性，厌氧生长，少数几个种可在含10%CO₂的空气中生长。pH低于4.5和高于8.5时不生长。化能有机营养。发酵碳水化合物活跃，发酵产物主要是乙酸和乳酸，二者的摩尔比是3: 2;不产生CO₂。不产生丁酸和丙酸。接触酶阴性。通常要求多种维生素。最适生长温度是37~41°C。分离于温血脊椎动物的肠道、昆虫和垃圾;被认为与人的感染有关但通常认为其为非致病菌。





中华人民共和国国家标准

GB 4789.35—2016

食品安全国家标准

食品微生物学检验 乳酸菌检验

乳酸菌检验程序见图 1。

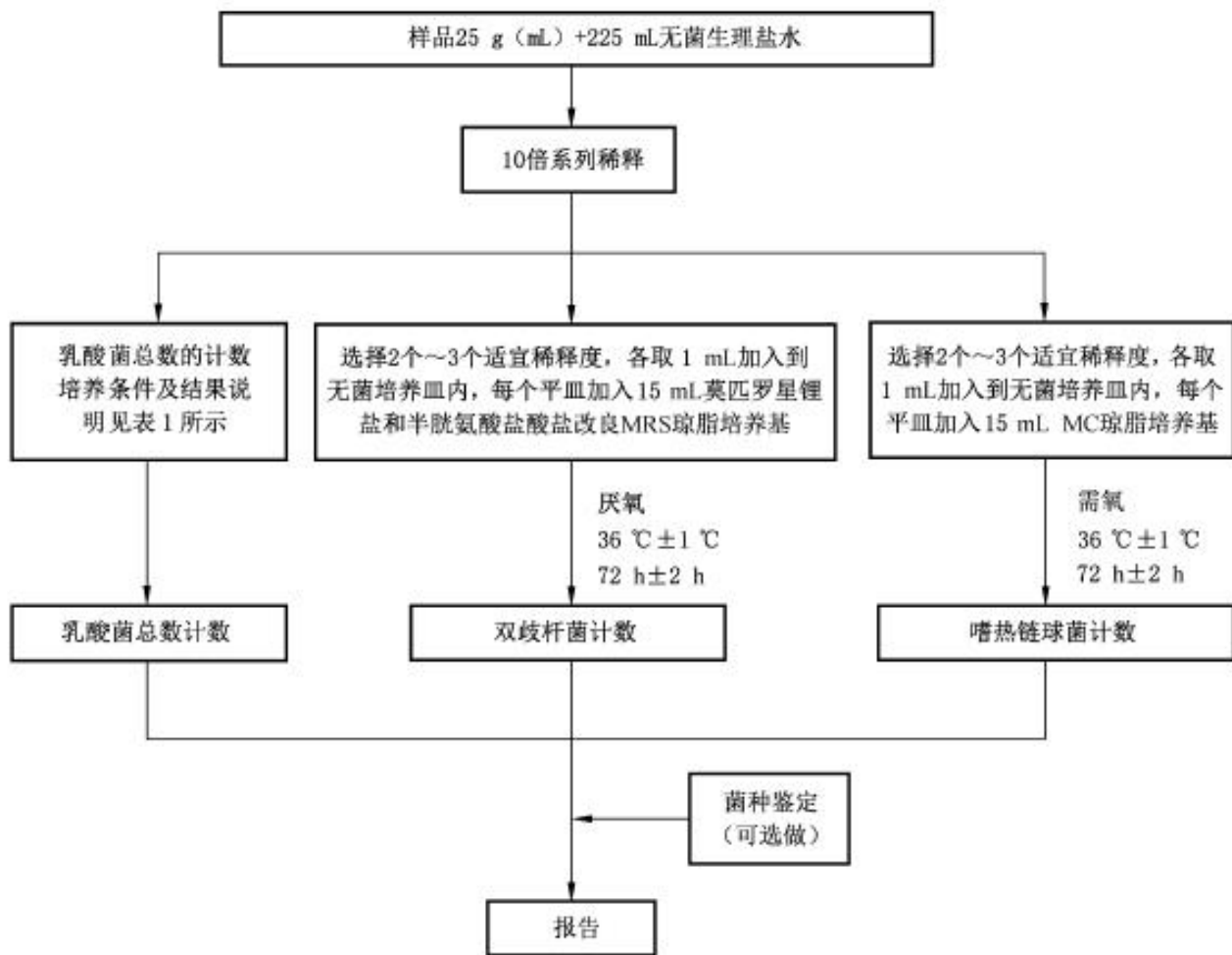


图 1 乳酸菌检验程序图

表 1 乳酸菌总数计数培养条件的选择及结果说明

样品中所包括乳酸菌菌属	培养条件的选择及结果说明
仅包括双歧杆菌属	按 GB 4789.34 的规定执行
仅包括乳杆菌属	按照 6.2.3.4 操作。结果即为乳杆菌属总数
仅包括嗜热链球菌	按照 6.2.3.3 操作。结果即为嗜热链球菌总数
同时包括双歧杆菌属和乳杆菌属	<ol style="list-style-type: none"> 1) 按照 6.2.3.4 操作。结果即为乳酸菌总数； 2) 如需单独计数双歧杆菌属数目,按照 6.2.3.2 操作
同时包括双歧杆菌属和嗜热链球菌	<ol style="list-style-type: none"> 1) 按照 6.2.3.2 和 6.2.3.3 操作,二者结果之和即为乳酸菌总数； 2) 如需单独计数双歧杆菌属数目,按照 6.2.3.2 操作
同时包括乳杆菌属和嗜热链球菌	<ol style="list-style-type: none"> 1) 按照 6.2.3.3 和 6.2.3.4 操作,二者结果之和即为乳酸菌总数； 2) 6.2.3.3 结果为嗜热链球菌总数； 3) 6.2.3.4 结果为乳杆菌属总数
同时包括双歧杆菌属,乳杆菌属和嗜热链球菌	<ol style="list-style-type: none"> 1) 按照 6.2.3.3 和 6.2.3.4 操作,二者结果之和即为乳酸菌总数； 2) 如需单独计数双歧杆菌属数目,按照 6.2.3.2 操作

6.2.3.2 双歧杆菌计数

根据对待检样品双歧杆菌含量的估计,选择2个~3个连续的适宜稀释度,每个稀释度吸取1 mL样品匀液于灭菌平皿内,每个稀释度做两个平皿。稀释液移入平皿后,将冷却至48 ℃的莫匹罗星锂盐和半胱氨酸盐酸盐改良的MRS培养基倾注入平皿约15 mL,转动平皿使混合均匀。36 ℃±1 ℃厌氧培养72 h±2 h,培养后计数平板上的所有菌落数。从样品稀释到平板倾注要求在15 min内完成。

6.2.3.3 嗜热链球菌计数

根据待检样品嗜热链球菌活菌数的估计,选择2个~3个连续的适宜稀释度,每个稀释度吸取1 mL样品匀液于灭菌平皿内,每个稀释度做两个平皿。稀释液移入平皿后,将冷却至48 ℃的MC培养基倾注入平皿约15 mL,转动平皿使混合均匀。36 ℃±1 ℃需氧培养72 h±2 h,培养后计数。嗜热链球菌在MC琼脂平板上的菌落特征为:菌落中等偏小,边缘整齐光滑的红色菌落,直径2 mm±1 mm,菌落背面为粉红色。从样品稀释到平板倾注要求在15 min内完成。

6.2.3.4 乳杆菌计数

根据待检样品活菌总数的估计,选择2个~3个连续的适宜稀释度,每个稀释度吸取1 mL样品匀液于灭菌平皿内,每个稀释度做两个平皿。稀释液移入平皿后,将冷却至48 ℃的MRS琼脂培养基倾注入平皿约15 mL,转动平皿使混合均匀。36 ℃±1 ℃厌氧培养72 h±2 h。从样品稀释到平板倾注要求在15 min内完成。



中华人民共和国国家标准

GB 4789.36—2016

食品安全国家标准
食品微生物学检验
大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验

前 言

本标准代替 GB/T 4789.36—2008《食品卫生微生物学检验 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验》。

本标准与 GB/T 4789.36—2008 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验”;
- 修改了标准的范围;
- 修改了设备和材料;
- 修改了培养基和生化反应的文字描述;
- 删除“第二法 免疫磁珠捕获法的原理”;
- 删除“第三法 全自动酶联荧光免疫分析仪筛选法”;
- 删除“第四法 全自动病原菌检测系统筛选法”。

大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 常规培养法检验程序见图 1。

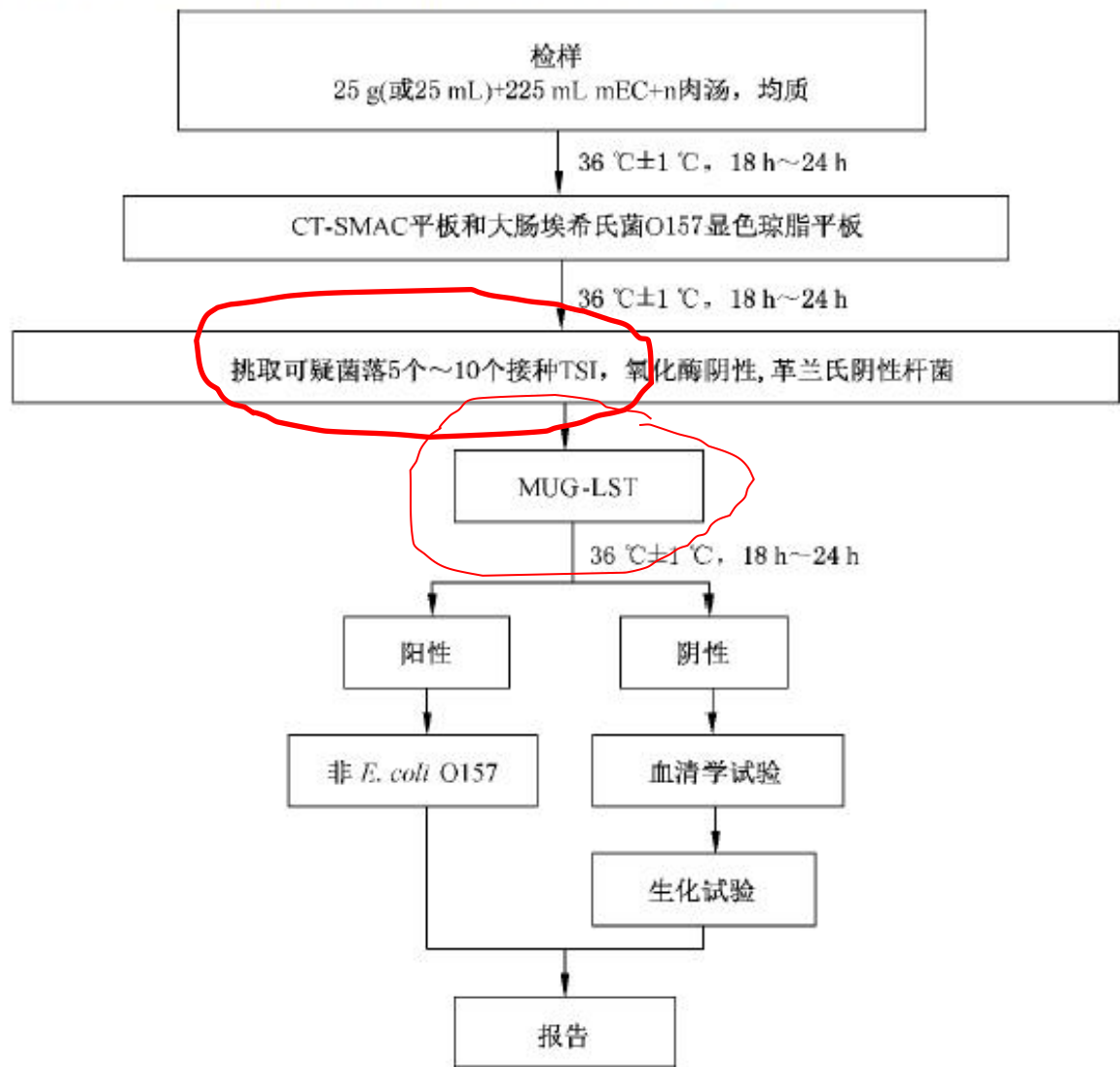


图 1 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 常规培养法检验程序

5.2 分离

取增菌后的 mEC+n 肉汤,划线接种于 CT-SMAC 平板和大肠埃希氏菌 O157 显色琼脂平板上, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h,观察菌落形态。在 CT-SMAC 平板上,典型菌落为圆形、光滑、较小的无色菌落,中心呈现较暗的灰褐色;在大肠埃希氏菌 O157 显色琼脂平板上的菌落特征按产品说明书进行判定。

5.3 初步生化试验

在 CT-SMAC 和大肠埃希氏菌 O157 显色琼脂平板上分别挑取 5 个~10 个可疑菌落,分别接种 TSI 琼脂,同时接种 MUG-LST 肉汤,并用大肠埃希氏菌株(ATCC25922 或等效标准菌株)做阳性对照和大肠埃希氏菌 O157:H7(NCTC12900 或等效标准菌株)做阴性对照,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。必要时进行氧化酶试验和革兰氏染色。在 TSI 琼脂中,典型菌株为斜面与底层均呈黄色,产气或不产气,不产生硫化氢(H_2S)。置 MUG-LST 肉汤管于长波紫外灯下观察,MUG 阳性的大肠埃希氏菌株应有荧光产生,MUG 阴性的应无荧光产生,大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 为 MUG 试验阴性,无荧光。挑取可疑菌落,在营养琼脂平板上分纯,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h,并进行下列鉴定。

5.4.2.2 如选择生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统,应从营养琼脂平板上挑取菌落,用稀释液制备成浊度适当的菌悬液,使用生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统进行鉴定。

5.4.3 毒力基因测定(可选项目)

样品中检出大肠埃希氏菌 O157:H7 或 O157:NM 时,如需要进一步检测 Vero 细胞毒素基因的存在,可通过接种 Vero 细胞或 HeLa 细胞,观察细胞病变进行判定;也可使用基因探针检测或聚合酶链反应(PCR)方法进行志贺毒素基因(*stx1*、*stx2*)、*eae*、*hly* 等基因的检测。如使用试剂盒检测上述基因,应按照产品的说明书进行。

6 结果报告

综合生化和血清学试验结果,报告 25 g(或 25 mL)样品中检出或未检出大肠埃希氏菌 O157:H7 或大肠埃希氏菌 O157:NM。



中华人民共和国国家标准

GB 4789.40—2016

食品安全国家标准
食品微生物学检验
克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验

GB 4789.40—2016

前 言

本标准代替 GB 4789.40—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验》、SN/T 1632.1—2013《出口奶粉中阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)检验方法 第1部分:分离与计数》。

本标准与 GB 4789.40—2010 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验”;
- 修改了可疑菌落的挑取数量。

4 检验程序

克罗诺杆菌属检验程序见图 1。

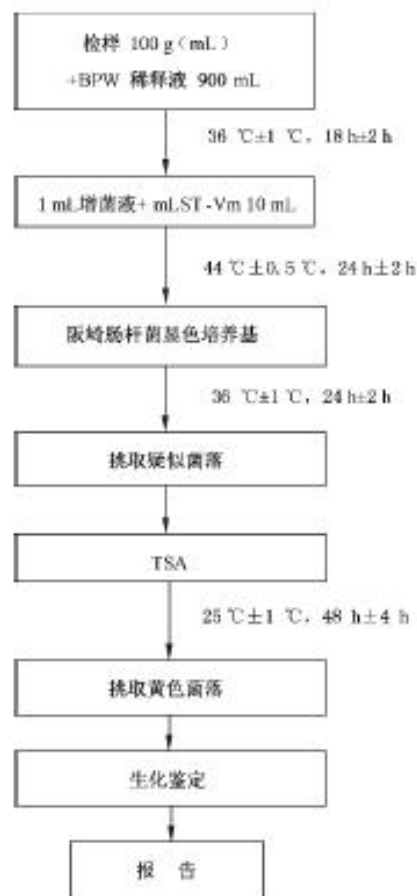


图 1 克罗诺杆菌属检验程序

5 操作步骤

5.1 前增菌和增菌

取检样 100 g(mL)置灭菌锥形瓶中,加入 900 mL 已预热至 44 °C 的缓冲蛋白胨水,用手缓缓地摇动至充分溶解,36 °C ±1 °C 培养 18 h ±2 h。移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤,44 °C ±0.5 °C 培养 24 h ±2 h。

5.2 分离

5.2.1 轻轻混匀 mLST-Vm 肉汤培养物,各取增菌培养物 1 环,分别划线接种于两个阪崎肠杆菌显色培养基平板,显色培养基须符合 GB 4789.28 的要求,36 °C ±1 °C 培养 24 h ±2 h,或按培养基要求条件

5.2.2 挑取至少 5 个可疑菌落,不足 5 个时挑取全部可疑菌落,划线接种于 TSA 平板。25 °C ± 1 °C 培养 48 h ± 4 h。

5.3 鉴定

自 TSA 平板上直接挑取黄色可疑菌落,进行生化鉴定。克罗诺杆菌属的主要生化特征见表 1。可选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统。