

国家标准测定食品细菌总数培养基的改进研究*

刘坚真 陈国寿 李海波 周海涛 梁艳彦

(华南农业大学食品系 广州 510642)

摘要:应用我国国家标准营养琼脂(GB4789 2-94 简称 NA)与美国食品药品监督管理局(FDA)标准平板(简称 SA)两种培养基对动植物食品中细菌总数进行检测对比,结果表明 FDA 标准平板比 GB 营养琼脂效果较好,前者比后者的检出率高出 23.9%。且菌落大而明显。为此,对这两种培养基进行优化筛选试验,并优选出 C8 培养基。扩大试验结果表明 C8 培养基的检出率较 GB 营养琼脂及 FDA 标准平板分别高出 35.8%和 9.5%。

关键词:食品检测,细菌计数,培养基

中图分类号:TS201.3 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)02-0063-06

AN IMPROVED TECHNIQUE ON NUTIONAL GB NUTRIENT AGAR FOR COUNTING BACTERIA RIENT AGAR FOR COUNTING BACTERIA

LIU Jiang-Zhen CHEN Guo-Zhon LI Hai-Bo ZHOU Hai-Tao LIANG Yan-Yan

(Dept. of Food Science, South China Agric. Univ. Gangzhou 510642)

Abstract: Both Chinese GB nutrient agar and American FDA standard method agar are commonly used for counting bacteria in food inspection. A number of our experiments showed that the count of bacteria by FDA standard method agar is 23.9% higher than that by GB nutrient agar. The present C8 medium is an improved medium based on the composition of the two media mentioned above. The result of our comparison experiment showed that the C8 medium used for counting bacteria was 35.8% higher than that by GB nutrient agar and 9.5% higher than that by FDA standard method agar respectively.

Key words: Food inspection, Bacterial count, Medium

食品所含细菌总数是食品卫生学的微生物学重要指标。主要作为判别食品被污染程度的一个重要指标。具体应用于观察食品中细菌繁殖动态、食品的新鲜程度、预测食品的存放期限,以及对食品及其生产进行卫生学的总评价的一个标准。

* 广东省重点攻关资助项目(No. 9622035-020)

收稿日期:1999-10-25, 修回日期:2000-02-29

随着经济改革和对外开放,食品生产的种类,数量和进出口贸易也不断增加,如何能更准确快速地检测食品中的细菌总数是食品卫生部门面临的一个严峻问题。在目前细菌总数检测中,我国国家标准是应用营养琼脂(简称 NA, GB 4789 2-94 中华人民共和国卫生部,1994)而美国(FDA1986)、日本(日本食品卫生协会,1993)和我国台湾(Marin, 1978)等则用美国食品药品监督管理局(FDA)的标准平板(简称 SA)进行测定,但两种培养基(即 NA 和 SA)在营养成分上有明显差异,究竟哪一种培养基对细菌总数检出率较高?作者特进行了试验对比。结果证实了 FDA 标准平板较 GB 营养琼脂平均检出率高出 23.9%。

为了使我国在食品微生物检测中能更好地赶超世界水平,笔者进行了细菌总数检测培养基优化试验,并优选出 C8 配方。

1 材料与方法

1.1 材料

豆奶由本校乳品厂送检、饮料由农产品加工室送检、新鲜蔬菜、肉鱼类购自农贸市场、菌种:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella sp.*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、假单胞菌(*Pseudomonas tomato*)、欧文氏菌(*Erwinia carotovora var*)由本教研室提供。

1.2 培养基配制

各种培养基按国标(GB4789 2-94)法配制,调整 pH 为 7.0 ± 0.2 , 1.05×10^5 Pa 灭菌 15min。

1.3 检测方法

细菌的总数测定按国标(GB)法用平板倾注混合法进行,在对各种培养基进行检测对比前,先用营养琼脂对样品进行稀释测定后,选用在平板上细菌菌落总数在 30~200 个之间的稀释度为最佳稀释度。用此最佳稀释度,每种培养基倒 3 皿,经 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 48 ± 2 h 培养。并以每种培养基的 3 个平板(即每处理 3 次重复)的平均菌落数为各检测数进行比较。

1.4 试验项目

(1)用 GB 营养琼脂 NA(即每 1000mL 培养基含蛋白胨 10g、牛肉膏 3g、NaCl 5g、琼脂 15g)与 FDA 标准平板 SA(即每 1000mL 培养基含胰蛋白胨 5g、酵母膏 2.5g、葡萄糖 1g、琼脂 15g)分别检测各种材料的细菌总数进行比较。

(2)在 NA 基础上进行优选:在每 1000mL NA 培养基中分别加入 0.25g、0.5g、1.0g、1.5g 葡萄糖或 0.5g、1.0g、1.5g、2.0g 酵母膏共 8 种培养基进行检测比较。

在每 1000mL NA 培养基中同时加入不同浓度配比的葡萄糖和酵母膏如下:1 配方 C1 加入葡萄糖和酵母膏分别为 0.5g 和 0.5g,2 配方 C2 分别为 1.0g 和 0.5g,3 配方 C3 分别为 1.0g 和 1.0g,4 配方 C4 分别为 1.0g 和 2.0g,5 配方 C5 分别为 0.5g 和 1.0g,6 配方 C6 分别为 1.0g 和 2.5g,7 配方 C7 分别为 1.0g 和 3.0g,并与 SA 进行检测比较。

(3)在 SA 基础上进行优选:以 SA 为基础设计 C8、C9 配方即在 1000mL SA 培养基中分别加入牛肉膏 1.0g(称为 C8)或 2.0g(称为 C9),检测时与 SA 同时进行作为比对。

配方 C8 与 NA、SA 3 种培养基扩大比较试验。用标准菌株:大肠杆菌、沙门氏菌、假单胞菌、枯草杆菌、欧文氏菌 5 种标准菌株,在配方 C8、NA 和 SA 3 种培养基中比较试验。

2 结果

(1)通过 NA 与 SA 对 31 种动植物食品中的细菌总数检测对比,试验结果(表 1)表明:SA

较NA细菌总数检出率平均高23.9%,且SA较NA的菌落大而明显。

(2)在NA基础上优选;在NA基础上分别单独加入不同浓度的葡萄糖或酵母膏,进行检测比较,10个样品检测结果表明:当NA中加入0.1%葡萄糖时,检出的细菌总数较原NA高,增幅为0.5%~29%,而加入0.1%酵母膏的增幅则为2.3%~30%。但其它浓度的葡萄糖或酵母膏则效果不显著(本文省略)。

在NA基础上加入不同浓度的葡萄糖和酵母膏搭配与SA检测对比。结果各配方检测率均比SA低,差幅在-10.7%~-26.5%之间(此表省略)。

表1 标准平板与营养琼脂两种培养基检测比较 (个/g, mL)

样 品	标准平板 (SA)	营养琼脂 (NA)	相差 %
豆奶(前)	1.7×10^3	1.6×10^3	+6.3
豆奶(中)	2.5×10^3	2.1×10^3	19.0
豆奶(后)	1.3×10^3	1.2×10^3	+8.3
芒果汁	5.4×10	5.0×10	8.0
艾菜	3.6×10^9	1.9×10^9	+89.5
通心菜	1.4×10^9	1.1×10^9	+89.5
大白菜	1.9×10^8	1.8×10^8	+27.3
芹菜	7.0×10^8	6.5×10^8	+5.6
白菜	1.4×10^8	1.3×10^8	+7.7
荷兰豆	1.7×10^7	1.6×10^7	+7.7
甜麦菜	7.8×10^7	5.9×10^7	+6.3
芜菜	2.6×10^8	2.2×10^8	+32.2
酸菜	6.4×10^7	4.0×10^7	+18.2
姜汁饮料	2.5×10	2.1×10	+60.0
鲩鱼	1.18×10^6	1.16×10^6	+19.1
鸡肉	1.03×10^5	9.00×10^4	+0.2
猪肉	4.23×10^6	3.65×10^6	+14.4
排骨	5.34×10^7	3.66×10^7	+15.9
海虾	5.22×10^4	4.09×10^4	+45.9
牛肉	4.9×10^6	3.70×10^6	+27.6
鸡肉	6.53×10^5	5.93×10^5	+32.4
黄鳝	8.83×10^6	7.53×10^6	+10.1
带鱼	2.02×10^7	1.75×10^7	+17.3
鱿鱼	5.87×10^5	4.67×10^5	+15.4
草鱼	4.23×10^5	3.79×10^5	+25.7
猪肝	1.73×10^6	1.15×10^6	+12.1
花蟹	4.71×10^4	3.63×10^4	+50.4
芥菜	1.1×10^5	7.6×10^5	+29.7
菜心	9.9×10^5	9.1×10^5	+44.7
豆角	8.7×10^8	7.8×10^8	+88.0
椰菜	6.9×10^8	6.1×10^8	+11.5
总平均			+23.9

(3)在SA基础上优选:用配方C8(即SA中加入1%牛肉膏)、配方C9(SA中加入0.2%牛肉膏)、和SA分别检测6个供试样品,结果(表2)表明:配方C8在6个检样中有5个样品的细菌总数检出率均比SA检出率高+2.8%~+36.5%,而只有1个样品检出率稍低(-2.8%),平均增幅为+10.7%;但配方C9检测效果较差。

C8与NA、SA 3种培养基分别同时检测20个样品,结果表明:C8均比NA检测率高,均差+35.8%,而与SA比较则其中有15个样品检出率较高,有5个检出率稍低,差幅在-1.4%~-7.5%之间,但总体明显增加,均差为10.8%(见表3)。

表2 配方C8、C9与SA检测结果比较(个/g)

样 品	SA	C8(相差%)		C9(相差%)	
通菜	9.3×10 ⁴	1.02×10 ⁵	+9.7	9.2×10 ⁴	-1.1
小白菜	5.2×10 ⁵	7.1×10 ⁵	+36.5	5.2×10 ⁵	0
莴菜	7.2×10 ⁵	7.4×10 ⁵	+2.8	6.6×10 ⁵	-8.3
芽菜	2.2×10 ⁶	2.3×10 ⁶	+4.5	1.4×10 ⁶	-36.4
芥菜	7.4×10 ⁴	8.4×10 ⁴	+13.5	8.0×10 ⁴	+8.1
豆角	2.18×10 ⁵	2.12×10 ⁵	-2.8	2.29×10 ⁵	+5.0
平均差幅			+10.7		-5.5

表3 培养基C8、NA、SA对比试验(个/g)

配 方	NA	SA	C8	C8/NA(%)	C8/SA(%)
麦菜	2.9×10 ⁸	3.10×10 ⁸	3.48×10 ⁸	+18.4	+12.3
大白菜	5.0×10 ⁶	6.2×10 ⁶	7.3×10 ⁶	+46	+17.7
西瓜	1.47×10 ⁸	1.82×10 ⁸	2.06×10 ⁸	+40.1	+13.2
马蹄	1.42×10 ⁹	1.67×10 ⁹	1.91×10 ⁹	34.5	14.4
菜	1.65×10 ⁸	1.78×10 ⁸	2.24×10 ⁸	+35.8	+25.8
蚝	1.04×10 ⁶	1.13×10 ⁶	1.33×10 ⁶	+27.9	+17.7
香菜	7.10×10 ⁵	9.10×10 ⁵	8.80×10 ⁵	+23.9	-3.3
草鱼	1.50×10 ⁶	2.07×10 ⁶	2.43×10 ⁶	+62.0	+17.4
豆角	9.8×10 ⁴	1.20×10 ⁵	1.46×10 ⁵	+49.0	+21.2
丝瓜	6.2×10 ⁴	6.4×10 ⁴	8.7×10 ⁴	+40.3	+35.9
带鱼	1.14×10 ⁶	1.43×10 ⁶	1.60×10 ⁶	+40.3	+11.9
虾	1.53×10 ⁷	1.99×10 ⁷	1.93×10 ⁷	+26.1	-3.0
芽菜	1.97×10 ⁵	2.24×10 ⁵	2.58×10 ⁵	+31.0	+15.2
凉瓜	4.5×10 ⁴	6.5×10 ⁴	7.2×10 ⁴	+60.0	+10.8
花甲	1.63×10 ⁵	2.13×10 ⁵	2.10×10 ⁵	+28.8	-1.4
牛腩	1.83×10 ⁵	2.12×10 ⁵	2.19×10 ⁵	+19.7	+3.3
猪肝	1.53×10 ⁵	1.79×10 ⁵	1.96×10 ⁵	+28.1	+9.5
鱿鱼	3.9×10 ⁴	5.2×10 ⁴	4.8×10 ⁴	+23.1	-7.5
瘦肉	1.75×10 ⁵	2.34×10 ⁵	2.52×10 ⁵	+44.0	+7.7
牛肉	1.15×10 ⁶	1.63×10 ⁶	1.58×10 ⁶	+37.4	-3.1
均差				+35.8	+10.8

显著性试验,t检验法:

C8与NA:t=13.1 $t_{(19)0.01}=2.86$ ∵t>t_{(19)0.01} P≤0.01,∴二者有非常显著差异;C8与

SA: $t=4.4$ $t_{(19)0.01}=2.86$ $\therefore t > t_{(19)0.01} P \leq 0.01$, \therefore 二者也有非常显著差异。

正态分布法:将C8/SA增幅值从小至大排列,记下重复个数,进而计算累积的个数并最后得累积的频率,在正态概率纸上描点,结果诸点能拟合成一直线,说明C8/SA的检测比接近正态分布,从图上求出其均数估计值为:C8/SA = $\hat{u} = X_{0.05} = 0.095 = 9.5\%$,表明C8较SA检出率高9.5%。

用标准菌株比较试验结果:3种培养基中5种菌的菌落基本相同,但在C8中大肠杆菌的菌落粘液较明显。大肠杆菌、假单孢菌、沙门氏菌、欧文氏菌4种菌落在3种培养基中菌落均较小,有的较难分辨,故数目不太准。但C8和SA中可分辨菌落明显较NA多。C8与NA比较,5种菌的菌数则C8均较NA高;C8与SA比较其中大肠杆菌、沙门氏菌、假单孢菌3种菌的菌数均C8较SA高,而枯草杆菌的菌数则SA较C8高。欧文氏菌的菌数相同(此表省略)。

3 讨论

(1)要提高细菌总数检测率一定要配制一种营养成分更全面、更丰富,而又极易被大多数微生物吸收利用的培养基。本实验用SA和NA来分别检测食品中的细菌总数并作对比,结果表明前者较后者的检出率平均高23.9%。从理论上分析比较两种培养基的成分:(a)NA没有提供初始纯碳源。培养基中的碳源、氮源均来自牛肉膏和蛋白胨。但SA则有0.1%葡萄糖作碳源。葡萄糖是一种绝大多数细菌最易吸收利用的良好碳源,因而对绝大多数细菌的初始生长是极有利的。(b)SA中含有0.5%胰蛋白胨。胰蛋白胨是由胰蛋白酶分解蛋白质所得到的水解物,含有的氨基酸种类齐全,也是一种极易被大多数微生物吸收的良好氮源和碳源,因而SA的胰蛋白胨较NA中的蛋白胨更有利于绝大多数细菌吸收利用。(c)SA中还有0.25%酵母膏。酵母膏营养丰富,除提供大量B族维生素、蛋白质、氨基酸、核酸等碳源、氮源外,还提供矿物质以及谷胱甘肽、酶类、核酸等具有生理活性作用的营养成分,非常有利于绝大多数微生物的生长。(d)NA中虽然还含有0.5%NaCl,但NaCl一般不作为营养成分,主要用于维持培养基的渗透压。因此从理论上分析SA在细菌总数检测中优于NA是合理的。

本实验配方C8是在SA标准平板基础上增加其缺乏的而营养丰富的牛肉膏后又明显地提高了检测率。这一结果在理论上分析也是合理的。鉴于上述提及的几种原因,SA检出率大大高于NA,而笔者又在SA基础上加入其缺乏的牛肉膏,这又为大多数微生物提供更丰富、易吸收利用的有机氮源、碳源、维生素及矿物质,因而又大大提高了其检测率。所以配方C8的检测率既高于SA而更高于NA。

(2)用C8配方检测20个样品的扩大试验结果表明:C8均比NA检测率高达35%,但C8与SA比较有15个样品检测率高于SA而却有5个稍低-1.4%~7.5%。这可能是由于这5个样品中的微生物生态群更适合于SA营养成分所致。实际上要使某一培养基对各种样品的细菌检出率都绝对地高是不可能的,只能是对绝大多数而已。

(3)本文采用t检验法,得出C8与NA;C8与SA都存在极显著差异,此外以C8/SA增幅及积累频率在正态概率纸上描点能拟合成一直线,说明C8/SA接近正态分布,从图上求出均数估计值,求得C8较SA检出率高9.5%。这一结果与实际试验中增幅值10.8%比较接近。

(4)用5种标准菌株检测试验结果也表明C8均较NA、SA效果较好,因此我们认为C8配方符合本试验要求,建议今后在食品细菌总数检测中考虑选用C8配方,以代替目前国家标准的营养琼脂。

致谢 本文经范怀忠教授审阅修改,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 食品卫生检验方法(微生物学部分). 北京: 中国标准出版社, 1994, GB 4789.2~94.
- [2] 日本卫生协会. 食品卫生检验手册(微生物分册). 天津: 天津科技翻译出版公司, 1993, 55~61.
- [3] 甄宏太译. FDA. 细菌学分析手册. 北京: 轻工出版社, 1986, 21~24.
- [4] Marrin. 食品微生物检验法. 台湾: 文源书局, 1978, 11~17.