

十五、有助于调节肠道菌群检验方法

1 动物实验

1.1 实验动物

推荐用近交系小鼠，18—22g，单一性别，每组 10—15 只。

1.2 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个阴性对照组，以人体推荐量的 10 倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组。受试样品给予时间 14 天，必要时可以延长至 30 天。

1.3 实验步骤

在给予受试样品之前，无菌采取小鼠肛门内粪便 0.1g，10 倍系列稀释，选择合适的稀释度分别接种在各培养基上。培养后，以菌落形态、革兰氏染色镜检、生化反应等鉴定计数菌落，计算出每克湿便中的菌数，取对数后进行统计处理。最后一次给予受试样品之后 24h，与实验前同样方式取直肠粪便，检测肠道菌群，方法同上。

1.4 观察指标

体重、双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌、肠杆菌、产气荚膜梭菌。

1.5 数据处理和结果判定

资料可用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

比较实验前后自身及组间双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌、肠杆菌、产气荚膜梭菌的变化情况，实验组实验前后自身比较差异有显著性，或实验后实验组与对照组组间比较差异有显著性、且实验组实验前后自身比较差异有显著性，符合以下任一项，可以判定该受试样品动物实验结果阳性。

1.5.1 粪便中双歧杆菌和/或乳杆菌明显增加，产气荚膜梭菌减少或不增加，肠杆菌、肠球菌无明显变化。

1.5.2 粪便中双歧杆菌和/或乳杆菌明显增加，产气荚膜梭菌减少或不增加，肠杆菌和/或肠球菌明显增加，但增加的幅度低于双歧杆菌/乳杆菌增加的幅度。

2 人体试食试验

2.1 受试者纳入标准

2.1.1 一个月内未患过胃肠疾病者。

2.1.2 一个月内未服用过抗生素者。

2.2 受试者排除标准

2.2.1 年龄在 65 岁以上者，妊娠或哺乳期妇女，过敏体质及对本保健食品过敏者。

2.2.2 合并有心血管、脑血管、肝、肾和造血系统等严重疾病及内分泌疾病，精神病患者。

2.2.3 停用受试样品或中途加服其它药物，无法判断功效或资料不全者。

2.2.4 短期内服用与受试功能有关的物品，影响到对结果的判断者。

2.3 试验设计及分组要求

采用自身和组间两种对照设计。接受试者的菌群状况随机分为试食和对照组，尽可能考虑影响结果的主要因素如年龄、性别、饮食因素等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者不少于 50 例。

2.4 受试样品的剂量和使用方法

试食组按推荐服用方法、服用量服用受试产品，对照组可服用安慰剂或采用空白对照。受试样品给予时间 14 天，必要时可以延长至 30 天。试验期间不改变原来的饮食习惯，正常饮食。

2.5 观察指标

2.5.1 安全性指标：

2.5.1.1 一般状况 包括精神、睡眠、饮食、大小便、血压等

2.5.1.2 血、尿、便常规检查

2.5.1.3 肝、肾功能检查（仅在试验开始前检查一次）

2.5.1.4 胸片、心电图、腹部 B 超检查（仅在试验开始前检查一次）

2.5.2 功效性指标：双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌、肠杆菌、拟杆菌、产气荚膜梭菌。

2.6 试验步骤：在给予受试样品之前，无菌采取受试者粪便 1.0g，10 倍系列稀释，选择合适的稀释度分别接种在各培养基上。培养后，以菌落形态、革兰氏染色镜检、生化反应等鉴定计数菌落，计算出每克湿便中的菌数，取对数后进行统计处理。最后一次给予受试样品之后 24h，再次检测，方法同上。

2.7 数据处理和结果判定

试验数据为计量资料，可用 t 检验进行分析。凡自身对照资料可以采用配对 t 检验，两组均数比较采用成组 t 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 t 检验；若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t' 检验或秩和检验；但变异系数太大（如 $CV > 50\%$ ）的资料应用秩和检验。

符合以下任一项，且试验组试食前后自身比较及试食后试食组与对照组比较，差异均有显著性，可以判定该受试样品具有有助于调节肠道菌群的作用。

2.7.1 粪便中双歧杆菌和/或乳杆菌明显增加，产气荚膜梭菌减少或不增加，肠杆菌、肠球菌、拟杆菌无明显变化。

2.7.2 粪便中双歧杆菌和/或乳杆菌明显增加，产气荚膜梭菌减少或不增加，肠杆菌和/或肠球菌、拟杆菌明显增加，但增加的幅度低于双歧杆菌/乳杆菌增加的幅度。

附：肠道菌群检验用培养基和培养方法（动物和人体通用）

项目	培养基	培养条件	鉴定方法
肠杆菌	伊红美蓝琼脂	36±1℃培养 24h	计数发酵乳糖、染色镜检为 G ⁻ 杆菌的所有菌落
肠球菌	叠氮钠—结晶紫—七叶苷琼脂	36±1℃培养 48h	计数有明显褐色圈、染色镜检为 G ⁺ 球菌的所有菌落

双歧杆菌	BBL 琼脂	36±1℃48h 厌氧培养	食品卫生微生物检验 双歧杆菌检验 (GB 报批稿)
乳杆菌	LBS 琼脂	36±1℃48h	G ⁺ 无芽孢杆菌 过氧化氢酶阴性 API CH50
产气荚 膜梭菌	TSC 琼脂	36±1℃ 24h 厌氧培养	计数所有在紫外光下有 荧光的黑色菌落
拟杆菌	改良 GAM 琼脂	36±1℃48 h 厌氧培养	G ⁻ 无芽孢杆菌 商业微生物生化鉴定系统

培养基成分和制法

肠杆菌培养基（伊红美蓝琼脂 EMB）

成分

蛋白胨	10g
乳糖	10g
磷酸氢二钾	2g
琼脂	17g
2%伊红 Y 溶液	20mL
0.65%美蓝溶液	10mL
蒸馏水	1000mL

pH7.1

制法：

将蛋白胨、磷酸盐和琼脂溶解于蒸馏水中，调整 pH，分装于烧瓶内，121℃高压灭菌 15min 备用。临用时加入乳糖并加热溶化琼脂，冷却至 50~55℃，加入伊红和美蓝溶液，摇匀，倾注平板。

肠球菌培养基（叠氮钠—结晶紫—七叶苷琼脂）

成分

多价胨	10g
酵母浸膏	5g
氯化钠	5g
磷酸氢二钾	4g
磷酸二氢钾	1.5g
叠氮化钠	0.5g
七叶苷	1g
0.05%结晶紫水溶液	0.4mL
柠檬酸铁铵	0.5g

琼脂	20~30g
蒸馏水	1000mL

pH8.0

制法:

将上述成分溶解于蒸馏水中, 调整 pH, 分装后, 121℃高压灭菌 15min 备用。

拟杆菌选择性培养基 (改良 GAM 琼脂)

成分

标朊	15g
大豆朊	3g
消化血清粉	13.5g
酵母浸膏	5g
牛肉膏	2g
牛肝膏	1.2g
葡萄糖	3g
磷酸二氢钾	2.5g
氯化钠	3g
可溶性淀粉	3g
L—半胱氨酸	0.3g
硫乙醇酸钠	0.15g
胰蛋白朊	10g
琼脂	15~18g
蒸馏水	

pH 7.2

制法:

- 1 将上述成分溶解于蒸馏水中, 调整 pH, 分装后, 115℃高压灭菌 15min, 冷却至 50℃左右, 加入混合抗生素 1 mL/L, 0.1%维生素 K₁ 溶液 1 mL/L, 氯化血红素 2.5 mL/L, 脱纤维兔血 70 mL/L, 混匀后倾注平板。
- 2 混合抗菌素的配制: 将卡那霉素 100mg、新霉素 100mg、万古霉素 1 mg 装入小瓶内, 加入 1 mL 无菌蒸馏水, 充分溶解后, 备用。

产气荚膜梭菌选择性培养基 (TSC 琼脂)

成分

胰蛋白朊	15g
大豆蛋白朊	5g
酵母浸膏	5g
无水亚硫酸钠	1g
枸橼酸铁胺	1g
琼脂	20g
蒸馏水	1000mL

pH7.6

制法:

将各成分溶于蒸馏水中, 调整 pH 至 7.6, 121℃高压灭菌 10min, 冷却至 50℃左右, 每 250mL 基础溶液中加入 20mL D-环丝氨酸溶液, 混匀后倾注平板。

D-环丝氨酸溶液配制：溶解 1g D-环丝氨酸于 200mL 蒸馏水，膜过滤除菌后，于 4℃ 冷藏保存备用。

双歧杆菌选择性培养基（BBL 琼脂）

成份

蛋白胨	15.0g
酵母粉	2.0g
葡萄糖	20.0g
可溶性淀粉	0.5g
氯化钠	5.0g
5%半胱氨酸	10.0mL
西红柿浸出液	400.0mL
吐温 80	1.0mL
肝提取液	80.0mL
琼脂	20.0g
蒸馏水	520.0mL

pH7.0

制法：

西红柿浸出液的制备：将新鲜西红柿洗净称重后切碎，加等量蒸馏水在 100℃ 水浴中加热，时时搅拌，约 90min，然后用绒布过滤，校正 pH7.0，分装三角瓶，115℃ 高压灭菌 15—20min。

肝提取液的制备：称取新鲜猪肝 1000g，切成小块或绞碎，加蒸馏水至 2000mL，混匀，置冰箱中过夜。第二天煮沸 15—20min，绒布过滤，并挤压收集全部滤液，加水补足原量。分装三角瓶，115℃ 高压灭菌 15—20min。

将上述成分配制，调整 pH 7.0，分装三角瓶，115℃ 高压灭菌 15—20min。

乳杆菌选择性培养基（LBS 琼脂）

成分

蛋白胨	10g
牛肉膏	10g
酵母粉	2g
葡萄糖	20g
吐温 80	1mL
磷酸氢二钾	2g
乙酸钠	5g
枸橼酸三氨	2g
硫酸镁	0.2g
硫酸锰	0.05g
琼脂	25g
蒸馏水	1000mL

pH6.0~6.5

制法：

将上述成分溶解于蒸馏水中，调整 pH，分装于烧瓶内，115℃ 高压灭菌 15—20min 备用。

稀释液

0.5% L-半胱氨酸 0.5mL

吐温 80	1.0mL
酵母粉	0.5g
蒸馏水	1000mL

pH 7.0—7.2

115°C 高压灭菌 20min 备用。