



中华人民共和国国家标准

GB 4789.35—2010

食品安全国家标准

食品微生物学检验 乳酸菌检验

National food safety standard

Food microbiological examination: Lactic acid bacteria

2010-03-26 发布

2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准代替GB/T 4789.35-2008《食品卫生微生物学检验 食品中乳酸菌检验》。

本标准与GB/T 4789.35-2008相比，主要变化如下：

——修改了乳酸菌总数、乳杆菌、双歧杆菌和嗜热链球菌的计数方法。

本标准的附录A为规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

—— GB 4789.35-1996、GB/T 4789.35-2003、GB/T 4789.35-2008。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 乳酸菌检验

1 范围

本标准规定了含乳酸菌食品中乳酸菌（lactic acid bacteria）的检验方法。
本标准适用于含活性乳酸菌的食品中乳酸菌的检验。

2 规范性引用文件

本标准中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

3 术语和定义

3.1 乳酸菌 lactic acid bacteria

一类可发酵糖主要产生大量乳酸的细菌的通称。本标准中乳酸菌主要为乳杆菌属（*Lactobacillus*）、双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）和链球菌属（*Streptococcus*）。

4 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：

- 4.1 恒温培养箱：36℃±1℃。
- 4.2 冰箱：2℃～5℃。
- 4.3 均质器及无菌均质袋、均质杯或灭菌乳钵。
- 4.4 天平：感量0.1g。
- 4.5 无菌试管：18mm×180mm、15mm×100mm。
- 4.6 无菌吸管：1mL（具0.01mL刻度）、10mL（具0.1mL刻度）或微量移液器及吸头。
- 4.7 无菌锥形瓶：500mL、250mL。

5 培养基和试剂

- 5.1 MRS（Man Rogosa Sharpe）培养基及莫匹罗星锂盐（Li-Mupirocin）改良MRS培养基：见附录A中A.1。
- 5.2 MC培养基（Modified Chalmers 培养基）：见附录A中A.2。
- 5.3 0.5%蔗糖发酵管：见附录A中A.3。

- 5.4 0.5%纤维二糖发酵管：见附录A中A.3。
- 5.5 0.5%麦芽糖发酵管：见附录A中A.3。
- 5.6 0.5%甘露醇发酵管：见附录A中A.3。
- 5.7 0.5%水杨苷发酵管：见附录A中A.3。
- 5.8 0.5%山梨醇发酵管：见附录A中A.3。
- 5.9 0.5%乳糖发酵管：见附录A中A.3。
- 5.10 七叶苷发酵管：见附录A中A.4。
- 5.11 革兰氏染色液：见附录A中A.5。
- 5.12 莫匹罗星锂盐（Li-Mupirocin）：化学纯。

6 检验程序

乳酸菌检验程序见图1。

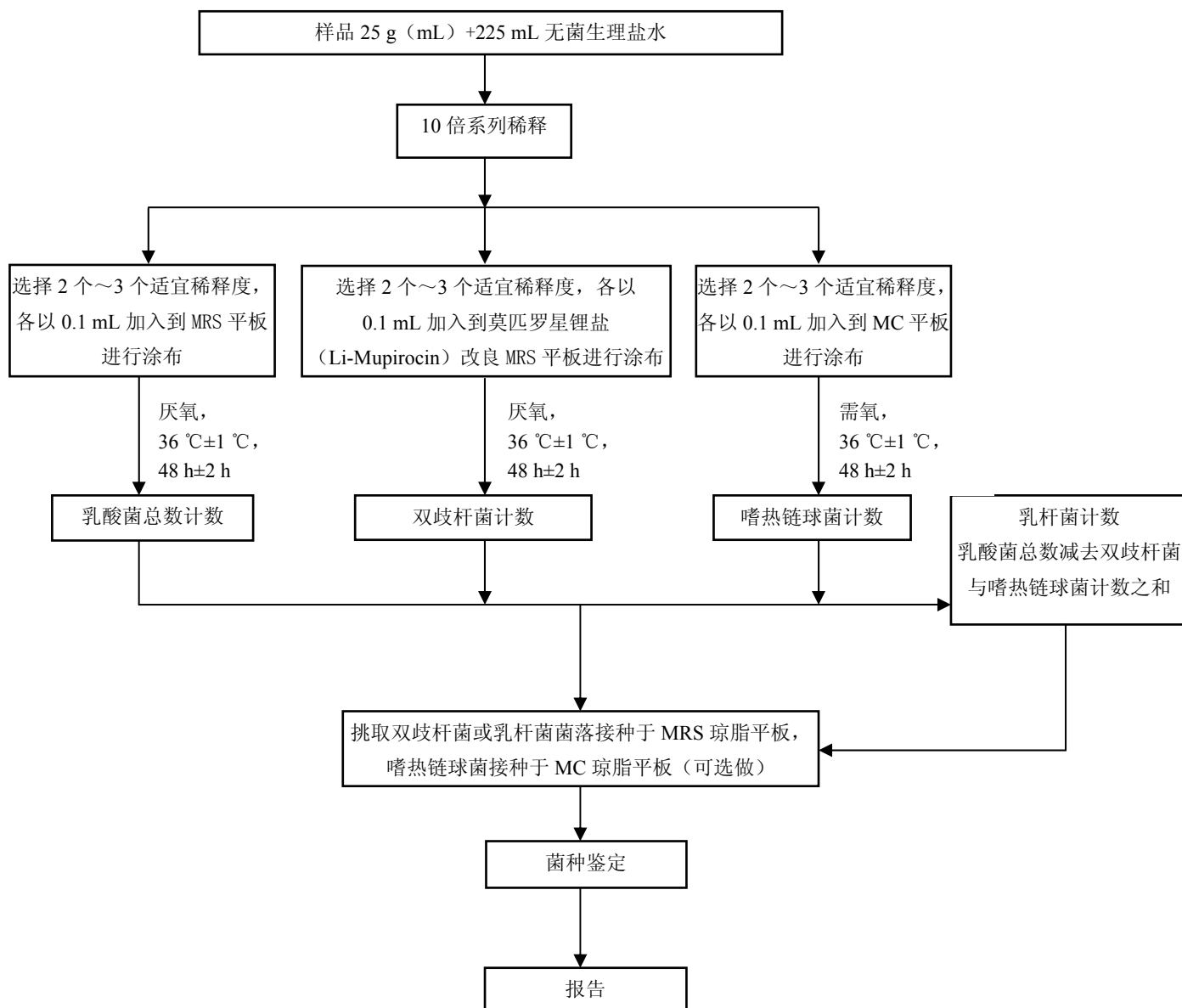


图1 乳酸菌检验程序图

7 操作步骤

7.1 样品制备

7.1.1 样品的全部制备过程均应遵循无菌操作程序。

7.1.2 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 的条件下解冻, 时间不超过 15 min。

7.1.3 固体和半固体食品：以无菌操作称取 25 g 样品，置于装有 225 mL 生理盐水的无菌均质杯内，于 8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min，制成 1:10 样品匀液；或置于 225 mL 生理盐水的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min 制成 1:10 的样品匀液。

7.1.4 液体样品：液体样品应先将其充分摇匀后以无菌吸管吸取样品 25 mL 放入装有 225 mL 生理盐水的无菌锥形瓶（瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分振摇，制成 1:10 的样品匀液。

7.2 步骤

7.2.1 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL，沿管壁缓慢注于装有 9 mL 生理盐水的无菌试管中（注意吸管尖端不要触及稀释液），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。

7.2.2 另取 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸头，按上述操作顺序，做 10 倍递增样品匀液，每递增稀释一次，即换用 1 次 1 mL 灭菌吸管或吸头。

7.2.3 乳酸菌计数

7.2.3.1 乳酸菌总数

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 0.1 mL 样品匀液分别置于 2 个 MRS 琼脂平板，使用 L 形棒进行表面涂布。36℃±1℃，厌氧培养 48 h±2 h 后计数平板上的所有菌落数。从样品稀释到平板涂布要求在 15 min 内完成。

7.2.3.2 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 0.1 mL 样品匀液于莫匹罗星锂盐（Li-Mupirocin）改良 MRS 琼脂平板，使用灭菌 L 形棒进行表面涂布，每个稀释度作两个平板。36℃±1℃，厌氧培养 48 h±2 h 后计数平板上的所有菌落数。从样品稀释到平板涂布要求在 15 min 内完成。

7.2.3.3 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 0.1 mL 样品匀液分别置于 2 个 MC 琼脂平板，使用 L 形棒进行表面涂布。36℃±1℃，需氧培养 48 h±2 h 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。从样品稀释到平板涂布要求在 15 min 内完成。

7.2.3.4 乳杆菌计数

7.2.3.1 项乳酸菌总数结果减去 7.2.3.2 项双歧杆菌与 7.2.3.3 项嗜热链球菌计数结果之和即得乳杆菌计数。

7.3 菌落计数

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。

7.3.1 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。

7.3.2 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。

7.3.3 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。

7.4 结果的表述

7.4.1 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 g (mL) 中菌落总数结果。

7.4.2 若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时，按公式 (1) 计算：

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

N ——样品中菌落数；

$\sum C$ ——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)。

7.4.3 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。

7.4.4 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。

7.4.5 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。

7.4.6 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。

7.5 菌落数的报告

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

7.5.2 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。

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

8 结果与报告

根据菌落计数结果出具报告，报告单位以 CFU/g (mL) 表示。

9 乳酸菌的鉴定 (可选做)

9.1 纯培养

挑取 3 个或以上单个菌落，嗜热链球菌接种于 MC 琼脂平板，乳杆菌属接种于 MRS 琼脂平板，置 36 °C±1 °C 厌氧培养 48 h。

9.2 鉴定

9.2.1 双歧杆菌的鉴定按 GB/T 4789.34 的规定操作。

9.2.2 涂片镜检：乳杆菌属菌体形态多样，呈长杆状、弯曲杆状或短杆状。无芽胞，革兰氏染色阳性。嗜热链球菌菌体呈球形或球杆状，直径为 0.5 μm~2.0 μm，成对或成链排列，无芽胞，革兰氏染色阳性。

9.2.3 乳酸菌菌种主要生化反应见表 1 和表 2。

表1 常见乳杆菌属内种的碳水化合物反应

菌种	七叶苷	纤维二糖	麦芽糖	甘露醇	水杨苷	山梨醇	蔗糖	棉子糖
干酪乳杆菌干酪亚种 (<i>L.casei subsp. casei</i>)	+	+	+	+	+	+	+	—
德氏乳杆菌保加利亚种 (<i>L.delbrueckii subsp. bulgaricus</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—
嗜酸乳杆菌 (<i>L.acidophilus</i>)	+	+	+	—	+	—	+	d
罗伊氏乳杆菌 (<i>L.reuteri</i>)	ND	—	+	—	—	—	+	+
鼠李糖乳杆菌 (<i>L.rhamnosus</i>)	+	+	+	+	+	+	+	—
植物乳杆菌 (<i>L.plantarum</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+
注: +表示90%以上菌株阳性; —表示90%以上菌株阴性; d表示11%~89%菌株阳性; ND表示未测定。								

表2 嗜热链球菌的主要生化反应

菌种	菊糖	乳糖	甘露醇	水杨苷	山梨醇	马尿酸	七叶苷
嗜热链球菌 (<i>S.thermophilus</i>)	—	+	—	—	—	—	—
注: +表示90%以上菌株阳性; —表示90%以上菌株阴性。							

附录 A
(规范性附录)
培养基及试剂

A.1 MRS 培养基

A.1.1 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
pH 6.2	

A.1.2 制法

将上述成分加入到 1000 mL 蒸馏水中, 加热溶解, 调节 pH, 分装后 121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。

A.1.3 莫匹罗星锂盐 (Li-Mupirocin) 改良 MRS 培养基

A.1.3.1 莫匹罗星锂盐 (Li-Mupirocin) 储备液制备: 称取 50mg 莫匹罗星锂盐 (Li-Mupirocin) 加入到 50 mL 蒸馏水中, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。

A.1.3.2 制法

将 A.1.1 成分加入到 950 mL 蒸馏水中, 加热溶解, 调节 pH, 分装后于 121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。临用时加热融化琼脂, 在水浴中冷至 48 °C, 用带有 0.22 μm 微孔滤膜的注射器将莫匹罗星锂盐 (Li-Mupirocin) 储备液加入到融化琼脂中, 使培养基中莫匹罗星锂盐 (Li-Mupirocin) 的浓度为 50 μg/mL。

A.2 MC 培养基

A.2.1 成分

大豆蛋白胨	5.0 g
牛肉粉	3.0 g
酵母粉	3.0 g
葡萄糖	20.0 g
乳糖	20.0 g
碳酸钙	10.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
1% 中性红溶液	5.0 mL
pH6.0	

A.2.2 制法

将前面7种成分加入蒸馏水中，加热溶解，调节pH，加入中性红溶液。分装后121℃高压灭菌15 min~20 min。

A.3 乳酸杆菌糖发酵管

A.3.1 基础成分

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
吐温 80	0.5 mL
琼脂	1.5 g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1.4 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

按0.5%加入所需糖类，并分装小试管，121℃高压灭菌15 min~20 min。

A.4 七叶苷培养基

A.4.1 成分

蛋白胨	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
七叶苷	3.0 g
枸橼酸铁	0.5 g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1.4 mL
蒸馏水	100 mL

A.4.2 制法

将上述成分加入蒸馏水中，加热溶解，121℃高压灭菌15 min~20 min。

A.5 革兰氏染色液

A.5.1 结晶紫染色液

A.5.1.1 成分

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

A.5.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

A.5.2 革兰氏碘液

A.5.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

A.5.2.2 制法

将碘与碘化钾先进行混合，加入蒸馏水少许，充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至300 mL。

A.5.3 沙黄复染液

A.5.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

A.5.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.5.4 染色法

A.5.4.1 将涂片在酒精灯火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染1 min，水洗。

A.5.4.2 滴加革兰氏碘液，作用1 min，水洗。

A.5.4.3 滴加95%乙醇脱色，约15 s~30 s，直至染色液被洗掉，不要过分脱色，水洗。

A.5.4.4 滴加复染液，复染1 min。水洗、待干、镜检。
