



原料奶中芽孢、耐热芽孢、嗜冷菌 及抗生素残留的测定

柴彤涛

(利乐中国有限公司)

编者按:

《国家“学生饮用奶计划”暂行管理办法》要求学生饮用奶必须是超高温(UHT)灭菌奶,采用无抗生素优质原料奶为原料生产,严禁使用还原奶;定点生产企业必须具备较高的生产管理水平、健全的质量保证体系和完善的配送系统。

上期我们介绍了原料奶中微生物的控制,知道了芽孢、耐热芽孢和嗜冷菌对学生饮用奶质量的影响和控制方法。在学生饮用奶生产中进行芽孢、耐热芽孢和嗜冷菌的检测也是十分必要的,可正确分析产品缺陷原因,缩短故障排除时间;从长远角度看,能提高成品的合格率,减少生产损失,提高生产效率。

一、芽孢总数

将少量原奶(5~10毫升)在80℃条件下加热10分钟。这一过程可杀死大多数生长的微生物,仅有耐热的活菌可存活下来。下面对已加热处理的奶样品进行细菌总数测定。

1.材料

无菌稀释烧瓶:内装99毫升无菌稀释液。

氯化钠:含0.9%氯化钠的水溶液,用于制备稀释液。

无菌吸管:容量分别为1.0毫升和0.1毫升。

培养皿:经预先消毒的一次性塑料培养皿,或可多次使用的玻璃培养皿。玻璃培养皿使用前须进行消毒。

用于孢子生长的无菌固体培养基,可用普通营养琼脂,但最好使用进行孢子计数的专用培养基。

两个水浴锅:一个80℃水浴,用于原奶样品的加热(溶解固体琼脂),一个40℃~50℃的水浴,用于冷却琼脂,维持琼脂液体状态以便倒平皿。

培养箱:温度为30℃~35℃的培养箱。

煮开水的壶和加热板:溶解固态的无菌营养琼脂。

试管:备用

吸管:10毫升的吸管。

温度计:0℃~100℃。

高压灭菌器:用于玻璃器械、营养基质的杀

菌。

2.方法

将一定容量(5~10毫升)的原奶放入一个试管,在另一试管中加入与奶等量的水。将两支试管放入80℃水浴。在加水的试管中插入一根温度计,温度升到80℃,再等10分钟,用冷水冲,使含原奶样品的试管冷却。用加热后的原奶样品制备稀释样品,在99毫升无菌稀释液(放入一个无菌稀释烧瓶)中加入1毫升已加热的原奶,并摇动使其彻底混匀。用吸管将样品加入培养皿,每一步骤用一个培养皿,并在培养皿上作出标记。

例如:1号:1.0毫升加热的原奶样品

2号:0.1毫升加热的原奶样品

3号:1.0毫升经稀释的加热原奶样品

4号:0.1毫升经稀释的加热原奶样品

在每个含原奶样品的培养皿中分别加入约10毫升冷却的无菌液态营养琼脂,转动培养基使样品与液体琼脂充分混匀,直至液体营养琼脂凝固。最后将培养皿放入培养箱(30℃~35℃)培养72小时。

3.计数

从培养箱中取出已培养的培养皿,统计培养过程中长出的菌落数。

计算结果:最好选用那些最后的菌落计数在30~300个之间的培养皿。用数出的菌落数乘以稀释系数(稀释液1的系数为1,稀释液2的系数为10,稀释液3的系数为100,稀释液4的系数为1000),得出每毫升测试样品中的总孢子数。



二、耐热孢子

目前，对“耐热孢子数”一词没有明确的解释，所使用的程序不同，得出的结果也不同。下面论述方法的优点在于操作简单，不需要高压杀菌程序，然而，当与不同实验室所做出的耐热孢子数进行比较时，必须注意使用的方法和流程。

1. 材料

吸管：吸量分别为 1.0 毫升和 0.1 毫升的无菌吸管。

培养皿：经预先消毒的一次性塑料培养皿或可多次使用的玻璃培养皿，玻璃培养皿使用前必须消毒。

孢子生长的无菌固体营养培养基：可用普通细菌总数营养琼脂，但最好使用进行孢子计数专用培养基。

水浴箱：将温度设在 40℃~45℃，用以冷却液化营养琼脂培养基。

煮开水的壶和加热板：用来对原奶样品进行加热处理。

二个培养箱：一个温度调至 30℃~35℃，另一个调至 50℃~55℃。

试管：备用

10 毫升的吸管：备用

温度计：测量范围为 0℃~100℃。

高压灭菌器：用于玻璃器械、营养基质的杀菌。

2. 方法

在煮沸的水浴中将无菌固体营养琼脂融解。将融解了的无菌营养琼脂放入 40℃~45℃水浴后，进行冷却。用吸管吸取 10ml 原奶样品加入一支或几支试管。在另一支试管中加入与奶量相等的水。将装有原奶样品和水的试管同时放入沸水中水浴。在装水的试管中插入一根温度计。直至“装水试管”的温度到达 100℃。再等 10 分钟，如果水不到 100℃就沸腾，则等候时间需延长。或在水中加入盐以提高沸点温度，但要避免原奶样品沸腾！用冷水冲，使含原奶样品的试管冷却。

用吸管分别向两组无菌培养皿中加样，两组培养皿中分别加入 1:0.1 毫升加热了的原奶样品；2:1.0 毫升加热了的原奶样品分别在培养皿上标记样品及稀释情况。

在已加入原奶样品的培养皿中分别倒入约 10 毫升无菌冷却的液态营养琼脂，转动培养皿使样品与液态琼脂充分混匀，直至液态琼脂凝固。

将培养皿放入培养箱：一组培养皿放入 30℃~35℃培养箱，另一组放入 50℃~55℃培养箱，培养 72 小时。

3. 计数

分别从两个培养箱中取出培养皿。

计数培养阶段长出的菌落数：30℃~35℃培养的菌数为耐热适温菌的孢子数，而 50℃~55℃培养的菌落数为耐热嗜热型的孢子数（大多数为嗜热脂肪芽孢杆菌）。

计算结果：最好选用菌落计数在 30~300 个之间的培养皿及稀释度。用计数的菌落数乘以稀释系数（稀释液 1 的系数为 1，稀释液 2 的系数为 10），得出每毫升测试样品中的总耐热适温型孢子数及总耐热嗜热型孢子数。

三、嗜冷菌的测定

嗜冷菌的繁殖代谢产生耐热蛋白酶和脂肪酶，过多的蛋白酶和脂肪酶将导致 UHT 奶制品产生凝块，发苦，并产生脂肪氧化味，从而严重影响产品的货架期。因此原料奶应检测低温菌。

1. 材料及仪器

内装 9.2ml, 0.7%氯化钠水溶液（稀释液）的试管数支，用棉塞塞好。

蒸馏水：备用

天平：最大称量为 100g，精度为 0.05g

培养皿：可用预先消毒的一次性塑料培养皿，也可使用玻璃培养皿，玻璃培养皿使用前须先消毒。

培养基：普通营养琼脂。

水浴锅：40℃~50℃的水浴锅用于冷却琼脂。

高压杀菌釜：用于玻璃器械及营养基质的杀菌。

冰箱：备用

开水壶或电炉：备用

1ml 的无菌吸管数支：备用

2. 方法

将普通营养琼脂按说明溶解后分装与锥形瓶中，将装有营养琼脂的锥形瓶、内装 9.2ml, 0.7%



氯化钠水溶液的试管、培养皿、吸管等在高压杀菌釜中于 121℃ 杀菌，15min 后待用。

在开水中融化凝固的营养琼脂培养基（已杀菌），然后将融化的营养琼脂培养基放入 40℃~50℃ 的水浴锅中保温待用。

原奶稀释液的准备：将 1ml 原奶样品吸入一个内装 9.2ml 无菌稀释液的试管中并充分摇匀混合（稀释液 1）。再将 1ml 稀释液 1 吸入一个内装 9.2ml 无菌稀释液的试管中并充分摇匀混合（稀释液 2）。再将 1ml 稀释液 2 吸入一个内装 9.2ml 无菌稀释液的试管中并充分摇匀混合（稀释液 3）。再将 1ml 稀释液 3 吸入一个内装 9.2ml 无菌稀释液的试管中并充分摇匀混合（稀释液 4）。

用 1ml 吸管将稀释液或原奶样品加入培养皿，每一步骤用一个培养皿，并在培养皿上做标记。

A	B	C	D	E
1.0ml	1.0ml	1.0ml	1.0ml	1.0ml
原奶样品	稀释液 1	稀释液 2	稀释液 3	稀释液 4

对同一稀释液重复操作。即每个选定的样品稀释度做两个平皿。在每个含稀释液或原奶样品的培养皿中加入约 10ml 的冷却无菌液态营养琼脂，转动培养皿使样品与液体琼脂充分混合。

待营养琼脂凝固后将培养皿放入冰箱的冷藏室中，在 4℃~6℃ 的温度下培养 10 天。

3. 计数

培养 10 天后，将平皿从冰箱中取出，数出培养皿中的菌落数。

计算结果：最好选用那些菌落计数在 30~300 之间的平行培养皿（即同一稀释度的朋友皿）。用统计出的菌落数（平行样品的平均菌落数）乘以稀释倍数即得出每毫升测试样品中的嗜冷菌数。

四、抗生素残留检验

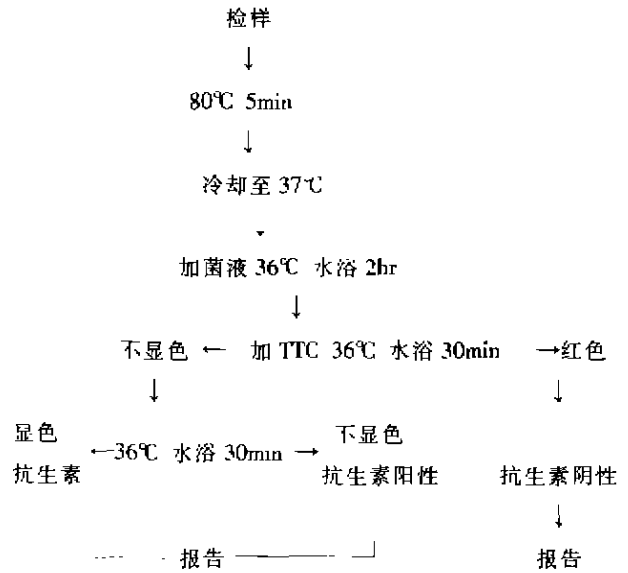
仪器：水浴锅；温度计；蜡笔；试管架；10ml、1ml 吸管；15×150 试管；

试剂：菌种：嗜热乳酸链球菌

脱脂乳：经 113℃，20min 灭菌

TTC：4% 氯化三苯四氮唑水溶液，7℃ 褐色瓶贮存，用时 1:5 稀释

检验程序：



检样步骤：

1、菌液制备：将菌种放入脱脂乳中经 36℃ 培养 15hr，以灭菌脱脂乳 1:1 稀释待用。

2、取样 9ml 置 15×150 试管，80℃ 水浴 5min，冷却至 37℃ 以下，加菌液 1ml，36℃ 水浴 2hr，加 TTC、0.3ml，36℃ 水浴培养 30min。

观察：如为阳性，再水浴 30min 作二次观察。

判定：显色状态	判断
未显色	阳性
微红色	可疑
桃红色-红色	阴性

五、结束语

只有坚持对每一批原料奶的微生物进行检测，控制原料奶被污染程度，选用优质的原料奶生产，才能够保证学生饮用奶的质量。

学生饮用奶原料奶微生物指标推荐标准：

微生物	标准	可接受	下可接受
细菌总数 cfu/ml	≤ 50,000	50,000~200,000	>200,000
芽胞总数 cfu/ml	≤ 100	100~1,000	>1,000
耐热芽胞数 cfu/ml	≤ 10	10~100	>100
低温菌 cfu/ml	≤ 10, 000	10, 000~100,000	>100,000