

ICS. 67. 100. 01

CCS X 16

团 体 标 准

T/NXZX 059—2025

# 牛奶和牛奶制品微生物检验的球菌 检测方法

Microbiological examination of milk and milk products – Methods for  
detection of cocci

2025-12-05 发布

2025-12-18 实施

宁夏质量技术协会 发布

# 目 次

前 言 .....	II
1 范围 .....	- 1 -
2 规范性引用文件 .....	- 1 -
3 术语和定义 .....	- 1 -
4 球菌检测 .....	- 1 -
5 质量控制 .....	- 3 -
6 注意事项 .....	- 3 -
7 结果解释与应用 .....	- 3 -
附录 A .....	- 4 -

## 前 言

本标准依据 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本标准内容应符合强制性国家标准、行业标准及地方标准；如有抵触，应以强制性标准为准。

本标准由宁夏计量质量检验检测研究院提出。

本标准由宁夏质量技术协会归口。

本标准起草单位：宁夏计量质量检验检测研究院、蒙牛（银川）乳品有限公司、国智（宁夏）知识产权服务有限公司。

本标准主要起草人：谭勋哲、银鑫叶、刘杰、张静旖、田菊梅、简敏捷、吕晓东、方向阳、米江、赵燕、姚博伟、魏建设、段斌、刘杨琼、魏金娥、周慧、石亚东、王俊。

# 牛奶和牛奶制品微生物检验的球菌检测方法

## 1 范围

本标准规定了牛奶和牛奶制品中常见球菌（如葡萄球菌属、链球菌属等）的检测方法。

本标准适用于生乳及乳制品（包括但不限于巴氏杀菌乳、灭菌乳、调制乳、发酵乳、奶粉、奶酪等）中目标球菌的分离与鉴定。

**注：**本方法为标准化的实验室检测程序。用户应根据产品适用的食品安全国家标准（GB 29921）的具体要求，确定是否需要开展特定致病球菌（如金黄色葡萄球菌）的检测，并正确应用检测结果进行符合性判定。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件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文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 4789.1-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验总则

GB 4789.11-2014 食品安全国家标准 食品微生物学检验β型溶血性链球菌检验

GB 4789.18-2024 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳与乳制品采样和检样处理

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB 29921-2021 食品安全国家标准 预包装食品中致病菌限量

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**球菌 coccus**

一类呈球形或近似球形的细菌，根据其排列方式可分为单球菌、双球菌、链球菌、葡萄球菌等，部分球菌可导致乳制品腐败变质或引发食源性疾病。

## 4 球菌检测

### 4.1 检验原理

本标准采用集成化检测设计，基于选择性培养基对牛奶及乳制品中常见的葡萄球菌属和链球菌属进行同步分离与鉴定。该方法通过共享样品前处理流程、并行分离培养，以及系统化的形态学、染色及生化鉴定步骤，在保证检测准确性的前提下，旨在提升检测效率，缩短整体检测周期。与分别检测相比，本方法可减少重复操作，节约实验室资源。

球菌检测基于选择性培养基分离、形态学观察、染色特性及生化反应的综合鉴定。

**葡萄球菌：**在Baird-Parker琼脂上形成黑色或灰色菌落，周围有浑浊带和透明圈，触酶试验阳性，血浆凝固酶阳性者可鉴定为金黄色葡萄球菌。

**链球菌：**在血琼脂平板上形成灰白色小菌落，依据溶血类型（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ）初步分类，结合CAMP试验、七叶苷水解、马尿酸钠水解等生化反应进一步鉴定为无乳链球菌、停乳链球菌、乳房链球菌等。

### 4.2 试剂与材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的三级水。具体试剂

配制方法见附录A。

4.2.1 培养基：Baird-Parker琼脂、血琼脂平板、胰蛋白胨大豆肉汤。

4.2.2 染色液：革兰氏染色液。

4.2.3 生化试剂：3%过氧化氢溶液、兔血浆、糖发酵管（甘露醇、乳糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖等糖发酵管）、七叶苷培养基、马尿酸钠培养基。

4.2.4 稀释液：0.85%无菌氯化钠溶液。

4.2.5 无菌采样工具：无菌采样勺、采样管、无菌乳样杯、无菌吸管、无菌镊子等，使用前应经高压蒸汽灭菌（121℃，15 min ~ 20 min）处理。

### 4.3 仪器设备

4.3.1 恒温培养箱：温度范围25℃ ~ 65℃，精度±0.5℃。

4.3.2 生物安全柜：垂直层流型，气流流速0.3 m/s ~ 0.5 m/s，定期进行气流和洁净度验证。

4.3.3 显微镜：配备10×、40×、100×等物镜，可清晰观察细菌形态，配备油镜用于革兰氏染色观察。

4.3.4 高压蒸汽灭菌器：能够达到121℃，压力103.4 kPa。

4.3.5 电子天平：感量为0.1 g或0.01 g。

4.3.6 均质器：转速8000 r/min ~ 10000 r/min，可定时。

### 4.4 检验步骤

#### 4.4.1 通则

为最大化提升检测效率，推荐实验室在计划同时检测葡萄球菌和链球菌时，采用整合流程。即从同一份样品制备出共用的1:10样品匀液（见4.4.2），并据此进行后续系列稀释。此后的分离培养（4.4.3）可在同一批次内，使用同一稀释度的样品匀液连续或同步完成两种培养基的接种，从而实现单次样品处理，完成多目标筛查。

#### 4.4.2 采样与样品处理

样品采样按GB 4789.18的规定执行。实验室样品处理按以下步骤进行：

a) 液态样品（生乳、巴氏杀菌乳等）：无菌操作吸取25 mL（g）样品，加入225 mL无菌氯化钠稀释液中，充分振摇，制成1:10的样品匀液。

b) 固态或半固态样品（乳粉、干酪等）：无菌操作称取25 g样品，加入225 mL无菌氯化钠稀释液，用均质器均质1 min ~ 2 min，制成1:10的样品匀液。

c) 根据样品污染预期，用无菌氯化钠稀释液对1:10样品匀液进行10倍系列稀释，以备接种。

#### 4.4.3 分离培养

4.4.3.1 葡萄球菌分离：将适当稀释度的样品匀液分别吸取0.1 mL，涂布于Baird - Parker琼脂平板上，用无菌涂布棒均匀涂布，每个稀释度设两个平行平板。将平板置于36℃ ± 1℃的恒温培养箱中培养24 h ~ 48 h，观察菌落形态。典型的葡萄球菌菌落在Baird - Parker琼脂平板上为圆形、凸起、直径1 mm ~ 2 mm，颜色为黑色或灰色，周围有浑浊带和透明圈。

4.4.3.2 链球菌分离：将适当稀释度的样品匀液吸取0.1 mL，接种于血琼脂平板上，用无菌涂布棒均匀涂布，每个稀释度涂布2个平板。将平板置于36℃ ± 1℃的恒温培养箱中培养24 h ~ 48 h，观察菌落形态和溶血现象。链球菌在血琼脂平板上形成灰白色、半透明、表面光滑的小菌落，根据溶血现象初步判断种类，如β溶血可能为无乳链球菌，α溶血可能为停乳链球菌或乳房链球菌。

#### 4.4.4 鉴定

4.4.4.1 革兰氏染色：挑取平板上的典型菌落，进行革兰氏染色。将涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染液染色1 min，水洗；滴加碘液媒染1 min，水洗；用95%乙醇脱色约30 s，水洗；滴加沙黄染液复染1 min，水洗，干燥后在显微镜下观察。革兰氏阳性球菌染成紫色，革兰氏阴性球菌染成红色。

4.4.4.2 触酶试验：对于疑似葡萄球菌的菌落，挑取菌落置于洁净的玻璃片上，滴加3%过氧化氢溶液，若立即出现大量气泡，为触酶试验阳性，葡萄球菌属细菌触酶试验阳性。

4.4.4.3 血浆凝固酶试验：吸取0.5 mL兔血浆与0.5 mL疑似葡萄球菌的肉汤培养物充分混匀，置于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养，每隔半小时观察一次，连续观察6 h，若出现凝固（小试管倾斜或倒置时，内容物不流动），判为血浆凝固酶试验阳性，金黄色葡萄球菌血浆凝固酶试验阳性。

4.4.4.4 CAMP试验（针对链球菌）：在血琼脂平板上用金黄色葡萄球菌培养物划一条直线，然后将疑似链球菌培养物划一条线，与金黄色葡萄球菌培养物的划线相互垂直，但不接触，二者相距3 mm ~ 5 mm。将平板置于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中培养24 h后观察结果，在两划线交界处出现箭头样的溶血区为CAMP试验阳性，无乳链球菌CAMP试验阳性。

4.4.4.5 生化反应：挑取疑似菌落接种于各种糖发酵管、七叶苷培养基、马尿酸钠培养基等，按照培养基说明书要求的温度和时间进行培养，观察结果。例如，葡萄球菌能分解甘露醇、乳糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖等；无乳链球菌不水解七叶苷和马尿酸钠，停乳链球菌不水解七叶苷和马尿酸钠，乳房链球菌水解七叶苷和马尿酸钠。

#### 4.5 结果报告

根据菌落形态、染色特性、生化反应等结果，报告样品中是否检出特定的球菌种类，如“样品中检出金黄色葡萄球菌”“样品中未检出无乳链球菌”等。

### 5 质量控制

每批次检测应设置阴性对照、阳性对照（金黄色葡萄球菌ATCC 25923、无乳链球菌ATCC 13813），并记录培养基、试剂批号及培养条件。

### 6 注意事项

- 6.1 样品采集后4 h内检测，否则应于 $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$ 保存不超过24 h。
- 6.2 试剂配制应记录配制日期、有效期及配制人。
- 6.3 无菌操作应在生物安全柜中进行，避免交叉污染。

### 7 结果解释与应用

7.1 本方法提供的金黄色葡萄球菌定量或定性检测结果，可用于评估：

- a) 生乳的卫生质量；
- b) 乳制品生产过程中的卫生控制状况；
- c) 特定产品（发酵乳、奶酪等）是否符合其产品标准中规定的微生物指标。

7.2 对于GB 29921-2021中明确规定了金黄色葡萄球菌限量的乳制品类别（如乳清蛋白粉、干酪等），本方法检测结果可用于该标准的符合性判定。

7.3 对于GB 29921-2021中未设定金黄色葡萄球菌限量的乳制品类别（如巴氏杀菌乳、调制乳），本方法检测结果不作为强制性合格判定依据，但可用于企业内部过程控制、风险调查或科研目的。

附录 A  
(规范性)  
试剂配制方法

### A.1 通则

- A.1.1 本附录所列试剂与培养基,除商品化预制产品外,均应按照下述规定进行配制与灭菌。
- A.1.2 所有化学试剂应为分析纯 (AR) 或微生物学专用级别。实验用水应符合 GB/T 6682 规定的三级水标准。
- A.1.3 配制过程应在清洁环境中进行,涉及无菌操作的步骤应在生物安全柜或超净工作台内完成。
- A.1.4 所有培养基和试剂溶液在配制后均应清晰标识,内容包括:名称、浓度、配制日期、有效期、配制人及批号。
- A.1.5 除特殊说明外,培养基及试剂灭菌条件均为 121°C (103.4 kPa) 高压蒸汽灭菌 15 min。灭菌后应迅速冷却(琼脂培养基冷却至 45°C~50°C)备用,避免长时间受热。

### A.2 培养基配制

#### A.2.1 Baird-Parker 琼脂基础培养基

##### A.2.1.1 成分(每升)

胰蛋白胨	10.0 g
牛肉膏粉	5.0 g
酵母膏粉	1.0 g
丙酮酸钠	10.0 g
甘氨酸	12.0 g
氯化锂 (LiCl·6H <sub>2</sub> O)	5.0 g
琼脂	20.0 g

##### A.2.1.2 配制步骤

- (1) 称取上述成分(商品化干粉或按配方称取),加入约 950 mL 蒸馏水中,搅拌加热至完全沸腾,使成分完全溶解。
- (2) 用 1 mol/L NaOH 或 HCl 溶液调节 pH 值至  $6.8 \pm 0.2$ (灭菌后最终 pH 应为  $7.0 \pm 0.2$ )。
- (3) 补充蒸馏水至最终体积 1000 mL。
- (4) 分装至合适的容器,121°C 高压灭菌 15 min。
- (5) 将灭菌后的基础培养基冷却至  $50^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 。
- (6) 无菌添加:在每 95 mL 已冷却的基础培养基中,依次加入 5 mL 50% 无菌卵黄乳液和 1 mL 3.5% 无菌亚碲酸钾溶液。随后立即轻柔但充分地混匀(避免产生气泡),倾注无菌平板(约 15~20 mL/板)。凝固后,平板应呈不透明乳白色。

##### A.2.1.3 质量控制

制备好的平板应使用金黄色葡萄球菌标准菌株(如 ATCC 25923)进行验证,典型菌落应为黑色、有浑浊带和透明圈。平板应密封,于 2°C~8°C 避光保存,有效期 7 天。

#### A.2.2 血琼脂平板

A.2.2.1 基础培养基:哥伦比亚琼脂或胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)。

##### A.2.2.2 配制步骤:

- (1) 称取哥伦比亚琼脂干粉 40.0 g(或 TSA 40.0 g),加入 1000 mL 蒸馏水中,搅拌加热至完全沸腾溶解。
- (2) 121°C 高压灭菌 15 min。
- (3) 冷却至  $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。
- (4) 在无菌条件下,加入 50 mL 脱纤维绵羊血或兔血(终浓度 5%, v/v)。
- (5) 缓慢、单向轻柔旋转混匀,避免产生气泡,混匀后立即倾注无菌平板。

A. 2. 2. 3 质量控制：平板应湿润、均匀、无凝块。应使用已知溶血类型的链球菌（如无乳链球菌 ATCC 13813， $\beta$ 溶血；肺炎链球菌 ATCC 49619， $\alpha$ 溶血）验证其支持生长和显示溶血环的能力。于 2°C~8°C 保存，有效期 14 天。

### A. 2. 3 胰蛋白胨大豆肉汤

#### A. 2. 3. 1 成分（每升）

胰蛋白胨	15.0 g
大豆胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g

#### A. 2. 3. 2 配制步骤

- (1) 称取上述成分，加入 1000 mL 蒸馏水中，磁力搅拌至完全溶解。
- (2) 分装至试管（如 9 mL/管）或小三角瓶中。
- (3) 121°C 高压灭菌 15 min。灭菌后 pH 值应为  $7.3 \pm 0.2$ 。

A. 2. 3. 3 质量控制：灭菌后肉汤应清澈。接种标准菌株应生长良好。于室温或 2°C~8°C 暗处保存，有效期 3 个月。

## A. 3 染色液与生化试剂配制

### A. 3. 1 革兰氏染色液

#### A. 3. 1. 1 结晶紫染液：

溶液 A：结晶紫 2.0 g 溶解于 20 mL 95% 乙醇中。

溶液 B：草酸铵 0.8 g 溶解于 80 mL 蒸馏水中。

将溶液 A 和溶液 B 混合，静置 24 小时后过滤使用。室温避光保存，有效期 1 年。

#### A.3.1.2 卢戈氏碘液：

碘 ( $I_2$ ) 1.0 g，碘化钾 (KI) 2.0 g，加蒸馏水少许充分研磨溶解，最后定容至 300 mL。棕色瓶室温避光保存，有效期 6 个月。

#### A. 3. 1. 3 脱色液：95% 乙醇。

#### A. 3. 1. 4 复染液（沙黄液）：

沙黄（番红 O）2.5 g 溶解于 100 mL 95% 乙醇中，制成储存液。

工作液：取 10 mL 储存液，用 90 mL 蒸馏水稀释。室温避光保存，储存液有效期 1 年，工作液有效期 3 个月。

### A. 3. 2 3% 过氧化氢溶液

A. 3. 2. 1 配制：吸取 10 mL 30% 过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 原液，加入 90 mL 无菌蒸馏水，混匀。现用现配。使用前检查有效期，30% 原液开封后易分解失效。

### A. 3. 3 兔血浆

A. 3. 3. 1 要求：推荐使用商业化的无菌、含抗凝剂（如柠檬酸钠或 EDTA）的兔血浆产品。

A. 3. 3. 2 储存与使用：未开封产品按说明书（通常 -20°C）保存。使用时解冻，并恢复至室温。解冻后应尽快使用，避免反复冻融。每批次试验应设阳性（金黄色葡萄球菌）和阴性（表皮葡萄球菌或生理盐水）对照。

### A. 3. 4 专用生化培养基

A. 3. 4. 1 七叶苷培养基、马尿酸钠培养基、各种糖发酵管：严格按照商品化产品的说明书进行配制、分装和灭菌。

A. 3. 4. 2 记录产品货号与批号。

A. 3. 4. 3 配制后应使用标准菌株验证其反应准确性（如粪肠球菌对七叶苷水解阳性）。

## A. 4 其他溶液

### A. 4. 1 稀释液

A. 4. 1. 1 配制：称取 8.5 g 氯化钠 (NaCl)，溶解于 1000 mL 蒸馏水中。

A. 4. 1. 2 灭菌：分装后，121°C 高压灭菌 15 min。