

SHIPINWEISHENGWUJIANYANJIUSHU

食品微生物 检验技术

秦翠丽 李松彪 侯玉泽 主编



兵器工业出版社

责任编辑：常小虹
封面设计：李 晖

ISBN 978-7-80248-027-8



9 787802 480278 >

定价：46.00元

河南科技大学资助出版教材

食品微生物检验技术

秦翠丽 李松彪 侯玉泽 主编

兵器工业出版社

内 容 简 介

本书分上、中、下三篇和附录共四部分内容。上篇主要介绍了食品的微生物污染及其危害。中篇全面介绍了食品生产环境及各类食品微生物检验样品的采集与处理。下篇详细介绍了菌落总数、大肠菌群、食物中毒病原菌、产毒霉菌等各项微生物指标与食品卫生质量的关系及其生物学特性、检验程序、检验方法等。此外,还详细介绍了食品中常见益生菌的生物学特性及其检验方法等。附录部分主要介绍了食品微生物检验中常用染色法及一些溶液的配制、培养基配方与制法、霉菌分类检索表和常见食品的微生物限量标准。本书既突出了理论知识的系统性、完整性,又强调了检验方法的实用性、先进性,反映了食品微生物检验技术的最新水平,并注意与国际接轨。

本书可供高等院校食品质量与安全、食品营养卫生、食品科学、食品加工、畜产品加工等专业教学使用,也可供从事食品生产加工、食品卫生监督、食品质量检验等方面的工作人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

食品微生物检验技术/秦翠丽,李松彪,侯玉泽主编.

北京:兵器工业出版社,2008.4

ISBN 978-7-80248-027-8

I. 食… II. ①秦…②李…③侯… III. 食品微生物—食品检验 IV. TS207.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 029157 号

出版发行:兵器工业出版社

发行电话:010-68962596, 68962591

邮 编:100089

社 址:北京市海淀区车道沟 10 号

经 销:各地新华书店

印 刷:北京市登峰印刷厂

版 次:2008 年 4 月第 1 版第 1 次印刷

责任编辑:常小虹

封面设计:李 晖

责任校对:郭 芳

责任印制:赵春云

开 本:787×1092 1/16

印 张:22.75

字 数:560 千字

定 价:46.00 元

(版权所有 翻印必究 印装有误 负责调换)

《食品微生物检验技术》 编委会

主 编 秦翠丽 李松彪 侯玉泽

副 主 编 (按姓氏笔画排序)

马丽苹 牛明福 纠 敏 何 佳 侯 颖

宫 强 贺家亮 符丹丹

主 审 侯玉泽

前 言

随着经济发展和人们生活水平的提高，食品质量与安全问题越来越受到人们的重视。为了解决我国食品质量与安全方面人才短缺问题，2000年前后，国内许多高校纷纷开办了相关专业，但至今其重要的专业课——食品微生物检验还没有统编教材。为了提高教学质量，编者结合20余年的教学经验，并走访了多家企事业单位，参照国家食品微生物检验标准及食品微生物检验方面的最新研究进展，编写了本教材。

本书分上、中、下三篇和附录共四部分内容。上篇主要介绍了食品的微生物污染及其危害。中篇全面介绍了食品生产环境及各类食品微生物检验样品的采集与处理。下篇详细介绍了菌落总数、大肠菌群、食物中毒病原菌、产毒霉菌等各项微生物指标与食品卫生质量的关系，及其生物学特性、检验程序、检验方法等。此外，还详细介绍了食品中常见益生菌的生物学特性及其检验方法等。附录部分主要介绍了食品微生物检验中常用染色法及一些溶液的配制、培养基配方与制法、霉菌分类检索表和常见食品的微生物限量标准。本书既突出了理论知识的系统性、完整性，又强调了检验方法的实用性、先进性，反映了食品微生物检验技术的最新水平，并注意与国际接轨。

本书由秦翠丽、李松彪、马丽苹编写绪论、第一章、第二章、第九章、附录Ⅱ、附录Ⅳ，何佳、符丹丹编写第三章、第四章、第五章、第十一章、第十二章、附录Ⅱ，侯玉泽、马丽苹编写第六章、第七章、第十章、附录Ⅰ、附录Ⅱ、附录Ⅲ，纠敏、牛明福、宫强、贺家亮、侯颖编写第八章、附录Ⅱ。

本书在编写过程中得到了河南科技大学食品与生物工程学院微生物教研室全体老师的支持与帮助，在出版过程中得到了河南科技大学教材出版基金的大力支持，同时书中不少地方引用了国家食品微生物标准检验方法以及有关教材的图片，在此一并致谢！

由于食品微生物检验涉及知识面广、发展速度快，限于作者的水平和能力，不当和错漏之处在所难免，恳请广大师生、同行和读者批评指正。谢谢！

编 者

2007年12月16日

目 录

绪 论	1
第一节 食品微生物检验的特点、范围与指标	1
第二节 食品微生物检验方法新进展	3

上篇 食品的微生物污染及其危害

第一章 食品的微生物污染	13
第一节 食品微生物污染的来源与途径	13
第二节 常见食品的微生物污染	18
第三节 污染食品的常见微生物	22
第二章 食品中微生物污染的危害及其控制	27
第一节 食品微生物污染的危害	27
第二节 食品微生物污染的控制	42

中篇 微生物检验样品的采集与处理

第三章 食品生产环境微生物检验样品的采集与处理	49
第一节 水样的采集与处理	49
第二节 空气样品的采集与处理	55
第三节 土壤样品的采集与处理	57
第四节 食品生产工用具样品的采集与处理	58
第四章 各类食品微生物检验样品的采集与处理	60
第一节 食品微生物检验样品的采集与处理	60
第二节 肉与肉制品样品的采集与处理	67
第三节 乳与乳制品样品的采集与处理	69
第四节 蛋与蛋制品样品的采集与处理	70
第五节 水产食品样品的采集与处理	71

第六节	清凉饮料样品的采集与处理	72
第七节	调味品样品的采集与处理	73
第八节	冷食菜、豆制品样品的采集与处理	74
第九节	糖果、糕点、果脯样品的采集与处理	75
第十节	酒类样品的采集与处理	75
第十一节	粮食样品的采集与处理	76
第五章	微生物性食物中毒样品的采集与处理	77
第一节	微生物性食物中毒样品的采集与送检	77
第二节	微生物性食物中毒样品的处理与检验	78

下篇 食品卫生各项微生物指标的检验

第六章	食品中菌落总数的测定	81
第一节	菌落总数与食品卫生质量	81
第二节	食品中菌落总数的测定	82
第七章	食品中大肠菌群最近似数的测定	87
第一节	大肠菌群与食品卫生质量	87
第二节	食品中大肠菌群最近似数的测定	89
第八章	细菌性食物中毒病原菌的检验	98
第一节	细菌性食物中毒及其检验	98
第二节	食品中沙门氏菌的检验	104
第三节	食品中志贺氏菌的检验	126
第四节	食品中病原性大肠埃希氏菌的检验	133
第五节	食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌的检验	142
第六节	食品中空肠弯曲菌的检验	148
第七节	食品中副溶血性弧菌的检验	154
第八节	食品中葡萄球菌的检验	159
第九节	食品中溶血性链球菌的检验	171
第十节	食品中李斯特氏菌的检验	175
第十一节	食品中肉毒梭菌及其毒素的检验	181
第十二节	食品中产气荚膜梭菌的检验	189
第十三节	食品中蜡样芽孢杆菌的检验	194
第十四节	食品中椰毒假单胞菌酵米面亚种的检验	200
第九章	食品中霉菌与酵母菌的检验	205
第一节	食品中霉菌和酵母菌菌数的测定	205

第二节	食品中霉菌的分离与鉴定概论	212
第三节	食品中曲霉属产毒霉菌的快速分离与鉴定	219
第四节	食品中青霉属产毒霉菌的快速分离与鉴定	226
第五节	食品中镰刀菌属产毒霉菌的快速分离与鉴定	231
第六节	食品中其他产毒霉菌的鉴定	235
第七节	真菌毒素中毒及其检测	237
第十章	食品中益生菌的检验	245
第一节	益生菌概述	245
第二节	双歧杆菌的检验	247
第三节	乳酸菌的检验	252
第十一章	罐头食品的商业无菌检验	256
第十二章	鲜乳中抗生素残留量的检验	261
附录 I	食品微生物检验常用染色法与溶液的配制	264
附录 II	食品微生物检验用培养基	268
附录 III	霉菌分类检索表	328
附录 IV	国家食品微生物限量标准	338
参考文献		351

绪 论

“国以民为本，民以食为天，食以安为先”，这 15 个字是治国安民的古训，道出了食品安全是关系到国计民生的重大问题！因为食品安全不仅关系到人们的身体健康和生命安全，还关系到经济发展和社会稳定，关系到国际食品贸易，关系到国家和政府的形象。因此，食品安全问题已成为 21 世纪世界各国政府和消费者广泛关注的焦点。

在影响食品安全诸因素中，病原微生物污染食品引发食物中毒与食源性感染是影响食品安全的头号问题。全世界每年数以亿计的食源性疾病患者中，70%是由各种病原微生物污染食品和饮水引起的。我国每年至少有 3 亿人发生食源性疾病。因此，1997 年 6 月由联合国食品法典委员会（FAO/CAC）颁布的、得到国际上共同认可和接受的食品安全保证体系——HACCP（Hazard Analysis Critical Control Point）体系，将食品微生物危害作为食品安全的重要内容进行控制。

第一节 食品微生物检验的特点、范围与指标

一、食品微生物检验的概念与特点

食品微生物检验就是应用微生物学的理论与方法，研究外界环境和食品中微生物的种类、数量、性质、活动规律、对人和动物健康的影响及其检验方法与指标的一门学科。它是微生物学的一个分支，是近年来形成的一门新的学科。食品微生物检验是食品检验、食品加工以及公共卫生方面的从业人员必须熟悉和掌握的专业知识之一。

微生物与食品关系复杂，既有有益的、可利用的一面，也有有害的、需要防范的一面。食品微生物检验，侧重有害方面，重点研究食品的微生物污染及检测范围、卫生指标和检验方法等问题。这就决定了食品微生物检验具有以下几个特点：

1. 研究范围广

原因有两方面：一方面食品种类繁多、来源复杂，不同的食品又有不同的生产加工工艺、贮藏、运输和销售渠道，这些过程涉及不同的地区和气候条件，而所有这些食品的种类、来源、加工、运输过程及地区、气候条件，都涉及微生物对食品的污染问题；另一方面存在于食品中的微生物种类繁多，有致病性微生物（包括对人类致病的病原微生物、对动物致病的病原微生物及人兽共患病的病原微生物）、致腐性微生物（能引起食品发生腐败变质）以及许许多多对人类有益的微生物（如发酵用微生物、产酶用微生物、食用菌类等），因而使本学科具有研究范围广的特点。

2. 涉及学科多

食品微生物检验不仅与食品微生物学、医学微生物学、普通微生物学、兽医微生物学、

畜牧微生物学、工业微生物学、农业微生物学、环境微生物学、免疫学、传染病学、流行病学、公共卫生学等学科有关，而且还涉及物理学、化学、生物学、生物化学等基础学科。

3. 应用性强

本学科在促进人类健康方面起着重要的作用。通过检验，可以判断食品及食品加工环境的卫生状况；可以正确分析并找到食品的微生物污染途径，为食品的卫生管理工作提供科学依据；可以预防食物中毒与食源性感染的发生，从而保障食用者的身体健康与生命安全；还可以防止食品腐败变质，避免造成经济损失等。

4. 法规约束

世界各国，在食品的国内生产及对外贸易中，均制定有统一的规定与标准，尤其在食品卫生质量标准中，均有明确的微生物学指标，同时还规定了统一的标准检验方法，并且都是以法规的形式颁布的。这就要求所有从事食品卫生检验的工作人员，必须认真贯彻执行国家的各项食品卫生法规。

二、食品微生物检验的范围

食品的微生物危害与食品生产所用的原辅料、生产环境、加工过程、贮藏和销售条件以及从业人员的卫生状况等有密切关系，如果卫生状况好，食品的微生物污染就较轻，其危害可以降低到最小程度；如果卫生状况不好，食品的微生物污染就严重，其危害较大。因此，为了保证食品质量，食品微生物检验的范围包括以下几个方面：

1. 生产环境的检验

包括车间用水、空气、地面、墙壁等。

2. 原辅料的检验

包括食用动物、谷物、添加剂等一切原辅材料。

3. 食品加工过程、储藏、销售诸环节的检验

包括食品从业人员的卫生状况检验、加工工具、运输车辆、包装材料的检验等。

4. 食品的检验

重要的是对出厂食品、可疑食品及食物中毒食品的检验。

三、食品微生物检验指标

食品微生物检验指标是根据食品卫生要求，从微生物学的角度，对不同食品所提出的具体指标要求。我国卫生部颁布的食品微生物检验指标主要有：

1. 菌落总数

菌落总数是指食品检样经过处理，在一定条件下培养后所得 1g 或 1mL 或 1cm² 检样中所含细菌菌落的总数。它可以反映食品的新鲜度、被细菌污染的程度、食品生产的一般卫生状况以及食品是否腐败变质等。因此，它是判断食品卫生质量的重要依据之一。

2. 大肠菌群

大肠菌群是指包括大肠杆菌和产气杆菌的一些中间类型的细菌。这些细菌是人及温血动物肠道内的常居菌，随着大便排出体外。如果食品中大肠菌群数越多，说明食品受粪便污染的程度越大。故以大肠菌群作为粪便污染食品的卫生指标来评价食品的卫生质量，具有广泛的意义。

3. 致病菌

致病菌即能够引起人们发病的细菌。对不同食品 and 不同场合，应选择不同的参考菌群进行检验。例如，海产品以副溶血性弧菌作为参考菌群；蛋与蛋制品以沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、变形杆菌等作为参考菌群；米、面类食品以蜡样芽孢杆菌、变形杆菌、霉菌等作为参考菌群；罐头食品以耐热性芽孢杆菌作为参考菌群等。

4. 真菌及其毒素

霉菌和酵母菌虽然是食品加工中的常用菌，但在某些情况下，霉菌和酵母菌可使一些食品失去原有的色、香、味，造成食品腐败变质。例如，酵母菌可使饮料混浊、产生气泡、形成薄膜、改变颜色及散发不正常的气味等。因此，世界许多国家已制定了某些食品的霉菌和酵母菌限量标准。我国也制定了一些食品中霉菌和酵母菌的限量标准，并以单位食品中霉菌和酵母菌数来判定食品被污染的程度。

还有少数霉菌污染食品不仅可造成食品腐败变质，还可产生毒素，引起人类和动物的急性或慢性中毒，尤其是 20 世纪 60 年代发现强致癌的黄曲霉毒素以来，世界各国对真菌毒素的污染问题日益关注和重视，先后制定了各种真菌毒素的限量标准，以保护国民的身体健康及农业、畜牧业的经济利益。我国也制定了一些食品的真菌毒素限量标准，如黄曲霉毒素等。

5. 其他指标

食品微生物指标还应包括病毒，如肝炎病毒、口蹄疫病毒、猪瘟病毒、鸡新城疫病毒、马立克氏病毒、猪水泡病毒等。

第二节 食品微生物检验方法新进展

目前我国各地的食品卫生监督检验机构及食品企业的化验室，对食品进行微生物检验时，基本上都采用国标法（即常规法）进行检验。国标法检验虽然检测结果准确、权威性高，但普遍存在操作繁琐、手工操作、费时费力、卫生指导反馈慢等缺点，给食品生产和销售带来一定的影响。最为明显的就是食品保质期与检验周期发生冲突问题，如消毒保鲜牛奶的保质期为 5 天，而抽样检验周期约需 3 天，等检验结果出来后，再运输到销售地点，已接近保质期，完全失去了销售价值。因此，对消毒保鲜牛奶等保质期短的食品，目前是边检验边放行，存在着一定的微生物危害风险。

鉴于国标法检测食品微生物指标存在的问题，以及控制食品微生物危害是保证食品安全的主要问题，加强对食品中污染微生物，尤其是病原微生物快速检测技术的研究与应用推广，一直是世界各国微生物学工作者研究的热点。

近年来，食品微生物的快速检测及其自动化研究进展迅速，其综合运用微生物学、化学、生物化学、生物物理学、免疫学以及分子生物学实验技术等，对微生物进行分离、检测、鉴定和计数。与国标检测法比较，其检测更快捷、更方便、更灵敏。下面对近些年来食品微生物快速检测技术及自动化研究进展进行简要介绍。

一、气相色谱技术

气相色谱技术原理是将微生物细胞经过水解、甲醇分解、提取以及硅烷化、甲基化等衍

生化处理后，使之分离尽可能多的化学组分供气相色谱仪进行分析。在微生物检验中，该技术主要用于病原微生物的分类、鉴定和传染病的快速诊断三个方面。主要是依据不同病原体的化学组成或所产生的不同代谢产物，通过色谱检查可直接分析各种体液中的细菌代谢产物、细胞中的脂肪酸、蛋白质、氨基酸、多肽、多糖等，以确定病原微生物的特异性化学标志成分，协助病原诊断和检测（如结核分枝杆菌的分类，厌氧菌、霍乱弧菌的鉴定等），该方法简单、快速。

二、“既用胶”测定法

把 1mL 食物样品放入盛有无菌液体培养基的试管中，混匀后再将混合物倒入装有胶质的特殊培养皿中。混合物与胶质接触后便形成与琼脂相似的复合物，经培养后便可计数菌种及数量。该系统是包装好的产品，用时不需灭菌，极适合野外测定。目前，这种系统正在受到美国 AOAC（American Organization of Analytical Chemists, AOAC）的鉴定。

三、以生物化学手段建立的快速检测技术

1. 微生物专有酶快速反应系统检测技术

微生物专有酶快速反应是根据细菌在其生长繁殖过程中，可合成和释放某些特异性的酶，按酶的特性选用相应的底物和指示剂，将它们配制在相关的培养基中。根据细菌反应后出现的明显的颜色变化，确定待分离的可疑菌株，反应的测定结果有助于细菌的快速诊断。这种技术将传统的细菌分离与生化反应有机的结合起来，并使得检测结果直观，正成为今后微生物检测的一个主要发展方向。利用细菌中某些具有特征性的酶，应用适当的底物可迅速完成细菌鉴定。如沙门氏菌具有辛酸酯酶，以 4MU-辛酸酯酶为底物，经沙门氏菌酶解，在紫外灯下观察游离 4MU 的荧光。

2. 微量生化反应系统

生化反应是实验室鉴定细菌最常用的方法。20 世纪 60 年代以后人们利用生化反应原理，发展了微量快速培养基和微量生化反应系统，并实现了从生化模式到数字模式的转化，并将恒温孵育箱辅以读数仪和计算机分析，从而形成了半自动化或自动化微生物鉴定系统。

微量生化反应系统是由 10~24 项生化指标组合而成，通过对结果的判断，得出 3~7 位数据，查阅编码手册即获得相应细菌的名称，与计算机联合使用，则会更迅速简便。目前，用得较多的微量生化反应系统有：肠杆菌科细菌鉴定用微量生化反应系统（如 Enterotube II 系统、Microbact 12E 和 24E 系统、API20E 系统、Minitex 系统等）、酵母菌鉴定用微量生化反应系统（Uni-Yeast-Tek 系统、API20C 和 Minitex 酵母菌鉴定系统）、非发酵菌鉴定用微量生化反应系统（如 N/F 系统，API20E、Minitex、Microbact24E 等系统亦可用于非发酵菌的鉴定）、链球菌鉴定用微量生化反应系统（如 API20S 系统）、葡萄球菌鉴定用微量生化反应系统（如 Staph-Ident 及 Staph-Tract 系统）等。

四、以免疫学方法建立的快速检测技术

免疫检测的基本原理是抗原抗体反应。抗原抗体反应是指抗原与相应抗体之间所发生的特异性结合反应。不同的微生物有其特异的抗原并能激发机体产生相应的特异性抗体。在免疫检测中，可利用单克隆抗体检测微生物的特异性抗原，也可利用微生物抗原检测体内产生

的特异性抗体，两种方法均能判断机体的感染状况。

1. 免疫荧光技术

免疫荧光技术（Immunofluorescence Technique）是用荧光素标记的抗体（或抗原）检测抗原（或抗体）的免疫学标记技术，又称荧光抗体技术。所用的荧光素标记抗体通称为荧光抗体，免疫荧光技术在实际应用上主要有直接法和间接法。直接法是在检测样品上直接滴加已知特异性荧光标记的抗血清，经洗涤后在荧光显微镜下观察结果。间接法是在检样上滴加已知的细菌特异性抗体，待作用后经洗涤，再加入荧光标记的第二抗体。如研制成的抗沙门氏菌荧光抗体，用于 750 份食品样品的检测，结果表明与常规培养法符合率基本一致。免疫荧光直接法可清楚地观察抗原，并用于定位标记观察。

2. 酶免疫测定技术

酶免疫测定（Enzyme Immunoassay, EIA）技术根据抗原抗体反应是否需要分离结合的和游离的酶标记物而分为均相和非均相两种类型。非均相法较常用，包括液相免疫测定法与固相免疫测定法。固相免疫测定法的代表技术是 ELISA。ELISA 技术是抗原或抗体吸附到固相载体上作为一种试剂来检测标本中有无相应的抗体或抗原的一种方法。根据反应原理，加入某种酶标记的抗体或抗原，洗涤除去未结合物，加入该酶的底物，酶催化底物生成有色产物，产物的量与标本中受检物的量有关，根据反应颜色的深浅可定量测定。EIA 在微生物学领域中可用于病原的检测、抗体检测和细菌代谢产物的检测。EIA 具有高度的特异性和敏感性，几乎所有可溶性的抗原抗体反应系统均可检测，最小可测值能够达到 ng 甚至 pg 水平。与放射免疫方法相比较，EIA 的标记试剂较稳定，且无放射性危害；与免疫荧光技术相比，EIA 敏感性高，不需特殊设备、结果观察简便。

3. 免疫印迹技术

免疫印迹（Immunoblot）技术主要包括三个步骤：第一，SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），可将蛋白质抗原按分子大小和所带电荷的不同分成不同的区带；第二，电转移，目的是将凝胶中已分离的条带转移至硝酸纤维素膜上；第三，酶免疫定位，该步的意义是将前两步中已分离出，但肉眼不能见到的抗原带显示出来。将印有蛋白抗原条带的硝酸纤维素膜依次与特异性抗体和酶标记的第二抗体反应后，再与能形成不溶性显色物的酶反应底物作用，最终使区带染色。本法综合了 SDS-PAGE 的高分辨率及 ELISA 的高敏感性和高特异性，是一种有效的分析手段。

4. 免疫组织化学技术

免疫组织化学技术（Immunohistochemistry）是应用免疫学中的抗原抗体反应，借助可见的标记物，在组织原位显示抗原或抗体的方法。常用的免疫组织化学技术有荧光免疫、酶免疫、金标免疫和免疫电镜等免疫组织化学技术，该技术特点是对细胞涂片、印片、组织切片进行处理和染色镜检。免疫组化技术弥补了上述血清学诊断方法的不足，使得在细胞或组织内检测病原微生物成分成为可能。对于在宿主组织液中微量表达或不表达抗原、抗体的微生物，免疫组化具有较好的辅助诊断价值。利用免疫组化技术，还能观察被侵犯组织致病微生物繁殖和对组织的破坏情况。

五、估计微生物数量和菌量的新方法

通过微生物生长所引起的物理、生物化学、生物物理指标的变化来对样品中的微生物量

进行估计，其方法主要有以下几种：

1. 生物发光法

生物发光法 (Bioluminescence) 是利用微生物细胞内的 ATP，测定被分析物质浓度的一种新方法。ATP 普遍存在于包括微生物在内的一切活细胞内，不同微生物其 ATP 含量是相对固定的，当萤火虫酶系统和 ATP 接触时，发生光生物学反应就会发光。在荧光素和荧光酶过量时，荧光强度与 ATP 含量成正比关系。用 ATP 生物发光确定细菌总数的准确程度依赖于从食品样品中细菌分离的效果和实验前将样品本身的 ATP 消除的程度。

2. 电阻抗技术

电阻抗是交流电路中导电物质对电流所起的阻碍和抵抗作用。电阻抗技术 (Electric Impedance) 是根据微生物生长时，可使培养基中的电活性底物 (如碳水化合物、蛋白质等营养物质) 代谢成为电活性产物 (如乳酸盐或氨等)，从而改变周围培养基的导电性能。通过测定阻抗或电导变化，可以了解生物活动情况。当微生物含量达到某一值时，阻抗的变化与微生物含量呈相关性，即与污染程度呈相关性。美国 Bactomatic 公司生产的细菌计数仪 (Bactometer Model 8.32) 就是利用该技术制造的。其细菌 (10^4 以上) 计数准确率 (与标准平皿计数比较) 在 93% 以上。Bactometer 由孵育器、一对插入培养基的不锈钢电极、阻抗监测系统和一个微处理机组成。据资料报道，在筛选牛奶样品时 (21°C) 用 Bactometer 可在 22h 之内区分出含菌大于 10^3 和小于 10^3 的样品，准确率达 88%；在 13.7h 内区分出大于 10^4 和小于 10^4 的试样，准确率达 91%。

3. 微热量测定法

微热量测定法 (Microcalorimetry) 是利用细菌生长产生热量的原理设计而成的。微生物在生长过程中产生热量，虽然产生的量很小，但仍能通过敏感的微热量计进行测量。用微热量计对微生物计数时，温谱图必须与绝对微生物细胞数呈相关性，一旦建立了参考温谱图，食品样品温谱图便可与之相比较而得到微生物的绝对数量。

4. 放射测量法

放射测量法 (Radiometric) 的原理是根据细菌在生长繁殖过程中，可利用培养基中加有 ^{14}C 标记的碳水化合物或盐类底物代谢产生 $^{14}\text{CO}_2$ ，然后通过放射测量仪 (Bactec 301 或 Bactec 225、Bactec 460) 测量 $^{14}\text{CO}_2$ 含量的增加与否，来确定标本中有无细菌的存在。这样可迅速进行细菌计数，检测时间随接种量、繁殖率和代谢类型而变化，但仍比常规方法要快，一般只需 6~18h。

5. 接触酶实验

接触酶实验 (Catalase Assay) 是利用接触酶反应来估计食品中微生物含量的快速方法。由这一原理设计出的仪器称为接触酶测定仪 (Catalasometer)。其原理是通过计算一个含有接触酶的纸盘在盛有 H_2O_2 的试管中的漂浮时间来估计菌数。当样品中接触酶含量高时 (表明接触酶阳性细菌含量高)，纸盘上浮的时间短 (以秒计)；反之，接触酶的浓度低，纸盘上浮的时间长 (100~1000s 计)。

六、分子生物学方法

1. PCR 技术

PCR (Polymerase Chain Reaction, PCR) 技术是 1985 年诞生的一项 DNA 体外扩增技

术。该技术通过对人工难以培养的微生物相应 DNA 片段的扩增,检测扩增产物含量,从而快速地对食品中致病菌含量进行检测。检测时,首先在高温下(95℃)使得蛋白质变性,DNA 双链变成单链;再迅速降温(55℃左右),使单链 DNA 退火,然后进行延伸(72℃),这就是所谓的热循环。之后温度重新上升到 95℃,开始新的循环。经一套扩增循环(21 次到 31 次)将一个单分子 DNA 扩增到 10^7 个分子。整个过程可以在 1h 内通过自动热量循环器完成。理论上,只要样品中含有 1 个分子沙门氏菌的 DNA,通过 PCR 技术完全可以在短时间内检测到。这种测定方法的优点是测定结果迅速,灵敏度和特异性高,检测成本低。

PCR 技术采用 DNA 扩增和自动化程序对特定的致病菌进行检测,已经成功地对沙门氏菌、大肠杆菌 O₁₅₇:H₇、产单核细胞李斯特菌等致病菌进行了有效测定。

目前,国际上有 4 种系统利用该技术进行 PCR 产品的反应和检测。即 BAX 系统、新 BAX 系统(Qualicon, Inc., Wilmington, Del., U.S.A)、TaqMan 系统(FosterCity, Calif., U.S.A)以及分子信号技术(Stratagene, LaJolla, Calif., U.S.A)。与传统的 PCR 技术相比,以上 4 种自动化设备不仅简化了检测过程,同时也避免了在 DNA 扩增后需要经过凝胶电泳、放射标记或非标记探针进行杂交的烦琐步骤,它们的最低检测限较已报道的更低;而且,分子信号技术还可以在同一个反应管中进行多种致病菌的复合检测,大大缩短了同一个样品的检测时间。

2. 实时定量 PCR 技术

实时定量 PCR 技术(Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, RQ-PCR)是近年来发展起来的新技术,是在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号的积累实时监测整个 PCR 进程,通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。这种方法既保持了 PCR 技术灵敏、快速的特点,又克服了以往 PCR 技术中存在的假阳性污染和不能进行准确定量的缺点。另外,还有重复性好、省力、低费用等优点。

实时定量 PCR 技术是从传统 PCR 技术发展而来的,其基本原理相同,但定量技术原理不同。实时定量技术应用了荧光染料和探针来保证扩增的特异性,并且荧光信号的强弱同扩增产物的量成正比,从而准确定量。该技术在基因突变的检测、基因表达的研究、微生物的检测、转基因食品的检测等领域均有重要的应用价值。美国 Applere 公司推出了 7000 型和 9000 型荧光定量 PCR 仪。这两种荧光定量 PCR 仪可以采用荧光探针法和荧光染料法对 PCR 产品进行定量和定性分析。其检测过程应用特异性报告荧光和淬灭荧光标记探针,引入 CT 值(标准内标物和样品的荧光强度 E 值之差)来追踪荧光的曲线。其优点为使用标准曲线,准确性高,还可以进行绝对定量和相对定量。样品的批内和批间重现性好,可以去除加样造成的误差。对定量检测细菌、病毒、衣原体、支原体、炭疽菌,以及沙门氏菌等均有良好的检测效果。

3. PCR-ELISA 技术

基于 PCR 技术和 ELISA 技术各自的优缺点, M. Munch 等报道(2001 年)采用 PCR-ELISA 技术完成了对鸟类感染病毒的快速检测,在临床、环境、流行病以及食品致病性微生物和病毒的快速检测中具有重要的意义。采用 PCR-ELISA 技术所测结果较通过凝胶电泳方法测得的结果灵敏度高一百倍。

严银芳等报道了(2003 年)采用 PCR-微孔板杂交-ELISA 基因检测技术对巨病毒感染的定量检测。这种方法是常规 PCR 技术基础上发展起来的一种新型病毒 DNA 检测技术。

杂交过程采用了较为简单的液相杂交，即直接将标记有生物素的 PCR 扩增产物与特异探针呈液相混合并进行杂交，通过 ELISA 技术使得探针结合在微孔板上，用酶标记的抗体与杂交分子反应，经过显色反应由酶标仪读数。该技术对阳性标本检测时阳性率、灵敏度很高。它综合了 PCR、分子杂交和 ELISA 3 种技术的优点，具有特异性强、灵敏度强和操作简单等特点。对在食品中肠炎沙门氏菌、致病性大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、变形杆菌、副溶血性弧菌、单核细胞增生性李斯特菌、霍乱弧菌、致病性链球菌等的鉴定筛选和准确的定量方法的标准化和普及率，加强对转基因食品的检测以及强化我国对这些食源性疾病暴发的准确诊断和快速溯源能力均有重要意义。

4. 基因探针

基因探针 (Gene Probe) 又称核酸探针，是指能特异识别核苷酸 (基因) 序列的带有标记的一段 DNA (或 RNA) 分子，也可以说是一段与被检测的核苷酸序列 (靶序列) 互补的带标记的单股核苷酸。用以检测未知样品中是否具有与其互补的序列。

目前使用的 DNA 探针杂交方法总体上可以分为两类：一类是异相杂交 (即固相杂交技术)；另一类是同相杂交 (即液相杂交技术)。近年来 DNA 探针杂交技术在食品微生物检测中的应用研究十分活跃，目前已可以用 DNA 探针检测食品中的大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、志贺氏菌 (*Shigella spp*)、李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等。本法具有特异强、敏感性高、速度快等优点。

七、噬菌体法

何晓青等 (1984) 发现一种称作肠杆菌科分属诊断噬菌体，鉴定沙门氏菌等只需 6min，加上培养菌落时间只需 2d。

具体方法：挑取鉴别培养基上的可疑菌落，做胨水培养 (37℃ 过夜)。若菌液混浊，做 1:200 稀释，再用灭菌棉签在烘干的琼脂平皿上做条状涂布，依次加噬菌体 O~1、C、E、CE、E₄ 和 Ent，最后根据反应现象进行判断。

八、鲎试剂分析法

鲎试剂中加入细菌内毒素可出现胶凝反应。胶凝程度 (凝集价) 与样品中内毒素含量成正比。阴性菌为引起食品腐败变化的主要菌相，内毒素是革兰氏阴性菌的细胞壁成分，通过平行试验可找出内毒素与阴性菌数及菌落总数的相关性。据报道特定地区和工艺流程的各类食品，同时用鲎试剂和标准平皿计数检测，出现较稳定的相关性。汪诚天等 (1983) 用鲎试剂分析法检出食品中小于 0.1μg 的毒素，整个检测过程在 3h 内完成。为食品卫生质量提供可靠的评价，此法不失为一快速、灵敏、简易的筛选检测方法。

九、其他新方法研究进展

近几年来，人们普遍较为关注“生物芯片”和“微芯片”在食源性致病菌等微生物的检测。在设计生物芯片时，研究人员在芯片上加上不同种类的抗体或者 DNA 分子，以便在同一个芯片上同时完成对沙门氏菌、李斯特氏菌、大肠杆菌、葡萄球菌等的检测，同时，使用生物芯片可以对成品中微生物含量进行监控。据 Heron 报道 (2000 年)，生物芯片在本世纪中叶会有举足轻重的作用，其市场价值可达 50 亿美元之高。但在食品加工过程中一些特殊的