




“十二五”普通高等教育规划教材（食品类）

食品微生物 检验实验技术

SHIPIN WEISHENGWU
JIANYAN SHIYAN JISHU

● 周红丽 张滨 刘素纯 主编



 中国质检出版社
中国标准出版社

“十二五”普通高等教育规划教材(食品类)

食品微生物检验实验技术

周红丽 张 滨 刘素纯 主编

中国质检出版社
中国标准出版社

北 京

图书在版编目 (CIP) 数据

食品微生物检验实验技术 / 周红丽, 张滨, 刘素纯主编. —北京: 中国质检出版社, 2012

ISBN 978 - 7 - 5026 - 3582 - 4

I. ①食… II. ①周…②张…③刘… III. ①食品检验—微生物检定—实验技术—高等学校—教材 IV. ①TS207.4 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 057178 号

内 容 提 要

食品微生物检验实验技术是一门交叉性学科, 涵盖了食品微生物学、食品生物化学、无机化学、有机化学等学科的基本理论、基础知识和技能。其任务是培养学生掌握食品微生物检验工作的基本知识和检验技能, 是食品卫生检验、食品质量与安全、食品加工等专业的一门重要职业岗位技术课。本书内容包括食品微生物检验实验室、试剂及设备要求, 微生物常规检测技术, 生物化学检测技术, 食品中常见致病性微生物的检测, 免疫学检测技术, 分子生物学检测技术等。

本教材适合作为高等院校食品质量与安全专业、食品科学与工程专业、食品卫生检验专业教材, 同时, 对从事食品生产与研究的工程技术人员也有重要的参考价值。

中国质检出版社 出版发行
中国标准出版社

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号 (100013)

北京市西城区三里河北街 16 号 (100045)

网址: www.spc.net.cn

总编室: (010)64275323 发行中心: (010)51780235

读者服务部: (010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 787 × 1092 1/16 印张 18.5 字数 563 千字

2012 年 9 月第一版 2012 年 9 月第一次印刷

*

定价 39.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 68510107

编 委 会

- 主 编 周红丽（湖南农业大学）
张 滨（长沙环境保护职业技术学院）
刘素纯（湖南农业大学）
- 副主编 王 锋（湖南农业大学）
周 辉（湖南农业大学）
- 参 编 白 婕（中南林业科技大学）
邓 靖（湖南工业大学）
侯爱香（湖南农业大学）

前言 FOREWORD

随着我国经济的飞速发展，人民生活水平日益提高，人们对食品的要求不再仅仅限于数量和价格，而对其色、香、味和营养性，食用方便性，卫生安全性等品质要求也越来越高。2000年，世界卫生大会通过了《食品安全决议》，制定了全球食品安全战略，将食品安全列为公共卫生的优先领域，并要求成员国制定相应的行动计划，最大程度地减少食源性疾病对公众健康的威胁。

我国是一个食品生产和消费大国，控制食品污染，减少食源性疾病，保障消费者健康，是食品安全工作者的首要任务之一。目前造成食品安全问题的主要因素有微生物污染问题、种植养殖农药和兽药残留问题、食品生产者法律意识薄弱问题、新技术的应用及环境污染等，而首要的问题是微生物污染。随着2011年“金葡菌”事件的影响逐步扩大，食品中微生物的污染问题再次引起了人们的关注。与食品中滥用添加剂的危害相比，很多食品安全专家、营养专家更担心的是日常生活中更常见的微生物污染。生活中“吃坏了肚子”这样的事情，远不至于让人们像谈起“三聚氰胺”一样色变，但事实上，微生物天然污染也是食品安全中的重中之重。负责2011年德国大肠杆菌毒素检测的Life Technologies全球食品安全及动物健康部总经理Nir Nimrodi说，在西方，尤其是在美国，公众对于微生物污染、食品中毒事件采取的是“零容忍”的严厉态度。两年前，美国一家制作花生酱的食品公司，其花生酱发生了沙门氏菌感染事件，从一开始的否认到后来的承认花了很长时间，在接下来的4个月后，这家公司就不得不申请破产保护，因为它所有的产品都无法再销售。

基于以上食品安全形势的严峻性，为了确保消费者的安全与健康，迫切需要我们研究和采用一些新技术、新方法，加强对食品安全的检测，特别是对微生物的检测。编者从事微生物检测教学和科研工作已有十年，十年来总觉得能全面教授微生物检测技术的工具书很少。因此，秉着“创新和实用”的宗旨，我们编写了《食品微生物检验实验技术》一书，以适应我国食品工业的发展和高等院校食品专业教育的需要。本书内容包括食品微生物检验实验室、试剂及设备要求、微生物常规检测技术、生物化学检测技术、食品中常见致病性微生物的检测、免疫学检测技术、分子生物学检测技术等。

本书由湖南四所高校多年从事食品微生物检验教学与科研工作的教师合力编写，由周红丽、张滨、刘素纯任主编。前言由湖南农业大学食品科技学院周红丽编写，第1章由湖南农业大学食品科技学院王锋、湖

南工业大学包装与材料工程学院邓靖编写，第2章由湖南工业大学包装与材料工程学院邓靖编写，第3章由湖南农业大学食品科技学院周红丽、刘素纯、周辉编写，第4章由中南林业科技大学食品科学与工程学院白捷编写，第5章由湖南农业大学食品科技学院周红丽、侯爱香编写，第6章由长沙环境保护职业技术学院环境科学系张滨编写。

在《食品微生物检验实验技术》编写过程中曾得到许多同行的热心帮助和指导，在此深表谢意。此外，由于编写人员业务水平有限，书中内容难免有不妥之处，敬请读者批评指正，更希望与我们进行探讨与交流。本书作为农林、轻工、水产、商业及综合院校食品质量与安全专业、食品科学与工程专业本科生、研究生的教材或参考用书。也可供食品工业、食品检测行业从事科研开发的工程技术人员和质量技术监督部门的同志参考使用。

编 者

2012年2月14日

目 录 CONTENTS

第一章 食品微生物检测实验室设施与设备要求	(1)
第一节 微生物学检测实验室设施要求	(1)
第二节 食品微生物检测实验设备要求	(5)
第三节 常用器皿及其清洁方法	(12)
一、常用器皿	(12)
二、常用器皿的清洗与消毒方法	(14)
第四节 常用缓冲液与贮液的配制	(17)
一、配制缓冲液与贮液的注意事项	(17)
二、常用缓冲液与贮液的配制	(18)
第五节 常用抗生素	(33)
第二章 食品中微生物检测常规技术	(34)
第一节 消毒与灭菌技术	(34)
第二节 培养基的制备技术	(43)
第三节 微生物培养与接种技术	(48)
第四节 检测标本制作技术	(59)
一、标本的采集	(59)
二、标本固定	(60)
三、标本染色	(61)
四、标本脱水	(62)
五、标本透明	(62)
六、标本封固	(62)
第五节 显微镜检测技术	(62)
一、显微镜	(62)
二、常用检测方法	(63)
第六节 微生物染色技术	(64)
一、革兰氏染色法	(64)
二、萋-纳抗酸染色法	(66)
三、结核杆菌金胺“O”染色法	(67)
四、布鲁菌柯兹罗夫斯基染色法	(67)
五、墨汁染色法	(68)
六、Fontana 镀银染色法	(68)
七、乳酸酚棉蓝染色法	(68)

八、墨汁硫堇染色法	(69)
九、姬氏染色法	(69)
十、瑞氏染色法	(69)
十一、瑞氏与姬氏复合染色	(71)
十二、碘液染色法	(71)
十三、金胺-酚染色法	(71)
十四、卡红染色法	(72)
十五、特殊结构的染色方法	(72)
第七节 不染色标本检查	(75)
第八节 细菌 L 型检查	(76)
第三章 生物化学试验技术	(78)
第一节 碳源代谢试验	(79)
一、糖(醇、苷)类发酵试验	(80)
二、葡萄糖代谢类型鉴别试验	(83)
三、甲基红试验(Methyl Red, MR 试验)	(84)
四、 β -半乳糖苷酶试验(ONPG 试验)	(85)
五、乙酰甲基甲醇试验(V. P. 试验)	(86)
六、胆汁七叶苷水解试验	(87)
七、淀粉水解试验	(88)
八、甘油复红试验	(89)
九、葡萄糖酸氧化试验	(89)
第二节 氮源代谢试验	(90)
一、硫化氢试验	(91)
二、明胶液化试验	(92)
三、吲哚试验(靛基质试验)	(94)
四、苯丙氨酸脱氨酶试验	(95)
五、氨基酸脱羧酶试验	(95)
六、精氨酸双水解酶试验	(97)
七、尿素酶试验	(98)
八、霍乱红试验	(99)
第三节 碳源和氮源利用试验	(99)
一、枸橼酸盐利用试验	(100)
二、丙二酸盐利用试验	(101)
三、醋酸钠利用试验	(101)
四、马尿酸钠水解试验	(102)
第四节 酶类试验	(103)
一、氧化酶试验	(103)
二、触酶试验	(104)

三、凝固酶试验	(106)
四、DNA 酶试验	(107)
五、胆汁溶菌试验	(108)
六、硝酸盐还原试验	(108)
七、卵磷脂酶试验(Nagler 试验)	(110)
八、磷酸酶试验	(112)
九、脂酶试验	(112)
十、CAMP 试验	(113)
十一、石蕊牛奶试验	(113)
第五节 抑菌试验	(115)
一、Optochin 敏感试验	(115)
二、杆菌肽敏感试验	(115)
三、新生霉素敏感试验	(116)
四、O/129 试验	(117)
五、氰化钾试验	(117)
第六节 其他试验	(118)
一、克氏双糖铁或三糖铁琼脂培养基试验	(118)
二、氢氧化钾拉丝试验	(122)
第四章 食品中常见病原微生物检测技术	(123)
第一节 病原微生物检测技术的应用与发展	(123)
第二节 病原微生物检测的特点和影响因素	(123)
一、病原微生物检测对象的特点	(123)
二、病原微生物检测的特点	(124)
三、病原微生物检测的影响因素	(125)
第三节 食品中菌落总数测定	(125)
一、菌落总数的概念	(125)
二、菌落总数在食品卫生质量评价中的意义	(126)
三、菌落总数的平板计数法测定	(126)
附录 A	(128)
第四节 食品中大肠菌群计数	(129)
一、大肠菌群的概念	(129)
二、大肠菌群的食品卫生学意义	(130)
三、大肠菌群 MPN 计数	(130)
附录 B	(133)
第五节 食品中霉菌和酵母计数	(134)
一、食品中霉菌和酵母菌数的概念	(134)
二、霉菌和酵母菌数的食品卫生学意义	(134)
三、霉菌和酵母平板计数法	(135)

附录 C	(136)
第六节 食品中沙门氏菌检验	(137)
一、生物学性状	(137)
二、食物中毒	(139)
三、微生物学检验	(139)
附录 D	(150)
第七节 食品中志贺氏菌检验	(157)
一、生物学性状	(157)
二、致病性	(158)
三、微生物学检验	(159)
附录 E	(162)
第八节 食品中金黄色葡萄球菌定性检验	(165)
一、生物学性状	(165)
二、食物中毒	(166)
三、微生物学检验	(166)
附录 F	(168)
第九节 食品中溶血性链球菌检验	(171)
一、生物学性状	(171)
二、致病性	(172)
三、微生物学检验	(173)
附录 G	(174)
第十节 食品中蜡样芽孢杆菌检验	(175)
一、生物学性状	(175)
二、食物中毒	(175)
三、微生物学检验	(176)
附录 H	(179)
第十一节 食品中肉毒梭菌及肉毒毒素检验	(181)
一、生物学性状	(181)
二、致病性	(182)
三、临床症状	(182)
四、流行病学特点	(182)
五、肉毒梭菌及肉毒毒素检验	(183)
附录 J	(186)
第十二节 食品中大肠埃希氏菌 O ₁₅₇ :H ₇ /NM 常规培养法检验	(187)
一、生物学性状	(187)
二、致病性	(187)
三、大肠埃希氏菌 O ₁₅₇ :H ₇ /NM 检验	(188)
附录 K	(190)

第五章 免疫学检测技术	(194)
第一节 检测抗原制备技术	(194)
一、颗粒性抗原的制备	(194)
二、可溶性抗原的制备和纯化	(195)
三、半抗原免疫原的制备	(199)
四、佐剂	(200)
第二节 检测抗体制备技术	(200)
一、多克隆抗体制备技术	(201)
二、单克隆抗体制备技术	(204)
第三节 免疫凝集试验	(206)
一、直接凝集试验	(207)
二、间接凝集试验	(207)
第四节 免疫电泳技术	(210)
一、对流免疫电泳	(211)
二、火箭免疫电泳	(212)
三、免疫固定电泳	(212)
四、交叉免疫电泳	(213)
第五节 放射免疫技术	(213)
一、基本类型及原理	(213)
二、常用的放射性核素	(214)
三、标记物制备及鉴定	(214)
第六节 免疫荧光技术	(214)
第七节 免疫酶技术	(215)
第六章 分子生物学检测技术	(223)
第一节 聚合酶链反应(PCR)技术	(223)
一、概述	(223)
二、PCR 反应模板的制备	(225)
三、常规 PCR 技术	(226)
四、实时定量 PCR(Real time PCR)技术	(227)
五、巢式 PCR(Nested PCR)技术	(228)
六、免疫-PCR 技术	(229)
七、聚合酶链反应-单链构象多态性分析	(230)
八、其他扩增技术	(232)
第二节 核酸分子杂交技术	(233)
一、概述	(233)
二、探针的种类及其选择	(234)
三、核酸探针标记	(236)

四、探针与靶核酸的杂交	(241)
五、Southern 杂交	(252)
六、Northern 杂交	(254)
七、斑点及狭缝印记杂交	(257)
八、菌落原位杂交	(258)
九、斑点杂交	(260)
十、核酸原位杂交	(260)
十一、杂交反应的条件及参数的优化	(264)
十二、病原体的基因诊断(核酸探针杂交技术)	(264)
第三节 生物芯片检测技术	(268)
一、生物芯片分类	(269)
二、生物芯片的制备	(270)
三、分子杂交	(273)
四、杂交图谱的检测和分析	(274)
五、检测设备	(276)
六、生物芯片的应用	(277)
第四节 细菌质粒指纹图谱分析	(279)
参考文献	(281)

第一章 食品微生物检测实验室 设施与设备要求

内容提要:本章主要介绍从事微生物检验工作所需要的设施与设备,器皿的用法及清洗方法,常用试剂的配制方法。

教学目标:了解微生物检验所需的设施与设备要求,掌握常用器皿的清洗及使用方法,掌握常用微生物检验试剂的配制方法。

微生物检测实验室的设施与设备是开展微生物检测的物质基础和保障。因此,开展微生物检测实验,离不开实验室设施与设备以及相应要求。微生物检测实验室的设施与设备如何做好管理,确保质量标准,在总体管理上要建立明细目录,包括名称、型号、厂家、购置时间、验收、调试或校验、仪器保管负责人、使用操作规范、使用或维修记录、报废等一系列的仪器设备质量保证档案。

微生物检测过程中需要用到大量的器皿,其检测结果的可靠性不仅与实验者的技能有关,同样也与实验之前的准备工作(如器皿的清洗、消毒、试剂的准确配制等)密切相关。

第一节 微生物学检测实验室设施要求

中国合格评定国家认可委员会(简称 CNAS)2006 年制定检测和校准实验室能力认可准则,其中对设施与环境条件规定如下:

(1)用于检测和(或)校准的实验室设施,包括但不限于能源、照明和环境条件,应有利于检测和(或)校准的正确实施。

实验室应确保其环境条件不会使结果无效,或对所要求的测量质量产生不良影响。在实验室固定设施以外的场所进行抽样、检测和(或)校准时,应予特别注意。对影响检测和校准结果的设施和环境条件的技术要求应制定成文件。

(2)相关的规范、方法和程序有要求,或对结果的质量有影响时,实验室应监测、控制和记录环境条件。对诸如生物消毒、灰尘、电磁干扰、辐射、湿度、供电、温度、声级和振级等应予重视,使其适应于相关的技术活动。当环境条件危及到检测和(或)校准的结果时,应停止检测和校准。

(3)应将不相容活动的相邻区域进行有效隔离。应采取措施以防止交叉污染。

(4)应对影响检测和(或)校准质量的区域的进入和使用加以控制。实验室应根据其特定情况确定控制的范围。

(5)应采取措施确保实验室的良好内务,必要时应制定专门的程序。

根据食品行业自身的规定,为保证、满足病原微生物检测和进行实验的要求,病原微生物

物检测实验室总体上要具备以下条件:

(1)有能开展无菌检查、病原微生物限度检查和无菌采样各自严格分开的无菌室或者隔离系统。

(2)有能开展菌种处理与病原微生物检测鉴别的独立的局部 100 级的无菌洁净室。表 1-1 为 GMP 规定的洁净度。

(3)有能开展病原微生物检定或能进行细菌内毒素检查(凝胶法或定量法)、抗菌作用测定的各自分开的半无菌实验室。

(4)有能进行病原微生物生长培养的培养室。

(5)有可以进行配制试液及培养基的配制室。

(6)有能进行高压灭菌的灭菌室。

(7)有实验器皿洗涤、烘干室。

(8)有人员办公休息室。

(9)大型实验室还可设有实验用品、易耗品储藏室。

还要对这些设施与设备实施有效的监控与验证,以保证整个病原微生物检测实验室的布置符合规范要求,并应有合理的通风设施,按照各房间的使用要求配置适当的空气净化系统,以提高实验室的总体质量。

表 1-1 GMP 规定的洁净度

洁净级别	尘粒最大允许数		微生物最大允许数		相当于 ISO 分级
	$\geq 0.5\text{mm}$	$\geq 5\text{mm}$	浮游菌/ m^3	沉降菌/ m^3	
100 级	3 500	0	5	1	ISO 5 级
10 000 级	350 000	2 000	100	3	ISO 7 级
100 000 级	3 500 000	20 000	500	10	ISO 8 级
300 000 级	10 000 000	60 000			ISO 15 级

下面以洁净室及培养室等为例介绍微生物检测实验室实验设施与设备的要求与如何开展工作。

(一) 洁净室(无菌室)

洁净室(无菌室)是病原微生物检测的重要场所与最基本的设施,它是病原微生物检测质量保证的重要物质基础。因此它的设计要按国家相应的标准《洁净厂房设计规范》(GB 50073—2001)等规定进行。微生物实验室洁净室的施工、安装、验收应按行业标准 JGJ 71—1990《洁净室的施工及验收规范》进行。对于微生物检测工作者和使用管理者来讲,更大量的工作是进行正常管理到日常的使用。

洁净室(无菌室)的标准要符合 GMP 洁净度标准要求。其使用管理要做好以下工作。

1. 洁净室(无菌室)要符合规范要求

无菌室应采光良好、避免潮湿、远离厕所及污染区。面积一般不少于 1m^2 , 不超过 5m^2 ; 高度不超过 2.4m。由 1~2 个缓冲间、操作间组成(操作间和缓冲间的门不应直对), 操作间和缓冲间之间应具备灭菌功能的样品传递箱。在缓冲间内应有洗手盆、毛巾、无菌衣裤放置架及挂钩、拖鞋等, 不应放置培养箱和其他杂物; 无菌室内应六面光滑平整, 能耐受清洗消毒。墙壁与地面、天花板连接处应呈凹弧形, 无缝隙, 不留死角。操作间内不应安装下水道。

无菌操作室应具有空气除菌过滤的单向流空气装置,操作区洁净度 100 级或放置同等级别的超净工作台,室内温度控制在 $18 \sim 26^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $45\% \sim 65\%$ 。缓冲间及操作室内均应设置能达到空气消毒效果的紫外灯或其他适宜的消毒装置,空气洁净度级别不同的相邻房间之间的静压差应大于 5Pa ,洁净室(区)与室外大气的静压差大于 10Pa 。无菌室内的照明灯应嵌装在天花板内,室内光照应分布均匀,光照度不低于 300lx 。缓冲间和操作间设置紫外线杀菌灯($2 \sim 2.5\text{W}/\text{m}^3$),不符合要求的紫外杀菌灯应及时更换。

2. 建立使用登记制度

每个病原微生物检测实验室都要建立使用登记制度。在登记册中可设置以下项目内容:使用日期、时间、使用人、设备运行状况、温度、湿度、洁净度状态(沉降菌数、浮游菌数、尘埃粒子数)、报修原因、报修结果、清洁工作(台面、地面、墙面、天花板、传递窗、门把手)、消毒液名称等。

3. 建立使用标准操作规范(SOP)并严格管理

SOP 内容至少要有以下几点:

(1) 规定净化系统运转时间

每次实验前应开启净化系统使运转至少 1h,同时开启净化台和紫外灯。

(2) 物品进入洁净室(无菌室)基本要求

凡进入洁净室(无菌室)的物品必须先在外部或缓冲间内对其进行相应的处理。注意纤维、易发尘物品不得带进净化室。无菌室内固定物品不得任意搬出。

(3) 人员进入洁净室(无菌室)要求

实验人员进入洁净室(无菌室)不得化妆、戴手表、戒指等首饰,不得吃东西、嚼口香糖。应清洁手后进入第一缓冲间更衣,同时换上消毒隔离拖鞋,脱去外衣,用消毒液消毒双手后戴上无菌手套,换上无菌连衣帽(不得让头发、衣服等暴露在外面),戴上无菌口罩。然后,换或是再戴上第二副无菌手套,在进入第二缓冲间换第二双消毒隔离拖鞋。再经风淋室 30s 风淋后进入无菌室。

(4) 温湿度观察要求

观察温度计、湿度计上显示的温湿度是否在规定的范围内,并作为实验原始数据记录在案。如发现问题应及时寻找原因,及时报修和及时报告给实验室主管,并将报修原因和结果记录归档。

(5) 沉降菌落计数与浮游菌测定要求

在每次实验的同时,对操作室和层流台做微生物沉降菌落计数,将结果记录在使用登记本上,并作为实验环境原始数据记录在实验报告上。每周 1 次,或在无菌检查等必要时,在每次实验的同时对操作室和净化台进行浮游菌测定,将结果记录在使用登记本上,并作为实验环境原始数据记录在实验报告上。

(6) 消毒要求

无菌室每周和每次操作前使用 0.1% 新洁尔灭或 2% 甲酚液或其他适宜消毒液[常用消毒剂的品种有:5~20 倍稀释的碘伏水溶液、1:50 的 84 消毒液、75% 乙醇溶液、3% 碘酒溶液、5% 石碳酸(来苏尔)消毒溶液、2% 戊二醛水溶液、尼泊金乙醇消毒液(配方:对羟基苯甲酸甲酯 21.5g,对羟基苯甲酸丙酯 8.6g,75% 乙醇 10.0mL)等,所用的消毒剂品种与使用要进行有效性验证方可使用,并定期更换消毒剂的品种擦拭操作台及可能污染的死角,方法是

用无菌纱布浸渍消毒溶液,清洁超净台的整个内表面、顶面及无菌室、人流、物流、缓冲间的地板、传递窗、门把手。清洁消毒程序应从内向外,从高洁净区到低洁净区,逐步向外退出洁净区域。然后开启无菌空气过滤器及紫外灯杀菌 1~2h,以杀灭存留微生物。在每次操作完毕,同样用上述消毒溶液擦拭工作台面,除去室内湿气,用紫外灯杀菌 30min。

(7)其他要求

如遇停电,应立即停止实验,离开无菌室,关闭所有电闸。重新进入无菌室前至少开启机房运转 1h 以上。

4. 洁净度检查的要求与方法

无菌室在消毒处理后,无菌试验前及操作过程中需检查空气中菌落数,以此来判断无菌室是否达到规定的洁净度。常用沉降菌和浮游菌测定方法如下:

(1)沉降菌检测方法及标准

以无菌方式将 3 个营养琼脂平板带入无菌操作室,在操作区台面左、中、右各放 1 个;打开平板盖,在空气中暴露 30min 后将平板盖好,置 $(32.5 \pm 2.5)^\circ\text{C}$ 培养 48h,取出检查,3 个平板上生长的菌落数平均小于 1。

(2)浮游菌检测方法及标准

用专门的采样器,宜采用撞击法机制的采样器,一般采用狭缝式或离心式采样器,并配有流量计和定时器,严格按仪器说明书的要求操作并定时校验,采样器和培养皿进入被测房间前先用消毒房间的消毒剂灭菌,使用的培养基为营养琼脂培养基或行业认可的其他培养基。使用时,先开动真空泵抽气,时间不少于 5min,调节流量、转盘、转速。关闭真空泵,放入培养皿,盖上采样器盖子后调节缝隙高度。置采样口采样点后,依次开启采样器、真空泵,转动定时器,根据采样量设定采样时间。全部采样结束后,将培养皿置 $(32.5 \pm 2.5)^\circ\text{C}$ 培养 48h,取出检查,浮游菌落数平均不得超过 5 个/ m^3 。每批培养基应选定 3 只培养皿做对照培养。

无菌操作台面或超净工作台还应定期检测其悬浮粒子,应达到 100 级(一般用尘埃粒子数计数检测),并根据无菌状况必要时置换过滤器。

5. 定期进行洁净度再检验

定期(每季度、半年和 1 年)或当洁净室设施发生重大改变时,要按相关规定要求进行洁净度再检验,以确保洁净度符合规定,保存验证原始记录,定期归档保存,并将验证结果记录在无菌室使用登记册上,作为实验环境原始依据具趋势分析资料。并定期对洁净室的环境检测数据进行趋势分析和评估,根据评估结果,了解洁净室设施环境质量的稳定状况及变化趋势,决定是否有必要修订相应的警戒和纠偏限度。

6. 定期更换新的紫外灯管、更换净化系统的初效、中效、高效头

定期(至少每年 1 次)更换新的紫外灯管,以确保紫外灯管灭菌持续有效。并同时在使用登记本上做好更换记录,定期归档保存。至少两年 1 次,或按洁净度验证实际情况,定期更换初效、中效、高效头,以确保净化系统的功能持续有效,并同时在使用登记本上做好更换记录,定期归档保存。

7. 使用过程中应尽可能减少人员的走动或活动

平时实验室内应尽可能减少人员的走动或活动,通向洁净室的门要关闭或安装自动闭门器使其保持关闭状态。

8. 洁净度不符合规定时立即停止使用

发现洁净度不符合规定时,应立即停止使用,寻找原因,彻底清洁,必须经洁净度再验证符合规定后再使用,并同时 will 情况记录在无菌室使用登记册上,定期归档保存。

9. 对进入的外来人员或维修人员进行指导和监督

非微生物室检验人员不得进入洁净室(无菌室),对必须进入的外来人员或维修人员要进行指导和监督。

10. 洁净室(无菌室)的日常管理

建立安全卫生值日制度,一旦发现通风系统、墙壁、天花板、地面、门窗及公用介质系统等设施有损坏现象,要及时报告并采取相应的修复措施,并保存记录及时归档。从洁净室(无菌室)环境中检测到的微生物应能鉴别至属或种,保留鉴别实验原始记录及菌种,作为无菌生产、无菌检查洁净室环境质量、消毒剂有效性评估及污染源调查的依据,并且也是无菌检查阳性结果的调查提供第一手资料。

(二) 培养室

培养室用来放置各类微生物生长的细菌培养箱和真菌培养箱以及菌种保藏用的冰箱。如有条件也可用面积不大于 5m^2 的具有恒温装置的密闭小室代替培养箱。室内应保持清洁,不得堆放杂物,为防止培养过程中发生污染,培养室的洁净度要达到 100 000 级。同时,室内应注意避免抗生素污染和避免使用强效、挥发性、喷雾性消毒剂,以防止影响微生物生长。

(三) 试液及培养基的配制室或灭菌室、器皿洗涤、烘干室、实验室、办公休息室

试液及培养基的配制室、烘干室、实验室、办公休息室要求条件不高,为一般的清洁环境室。配制室应严格防止抗生素、消毒剂对试剂、试药、培养基原料及配制用器皿和溶剂的污染。清洁环境室应具有防止灭菌后物品再污染的有效措施。同时应制定有各试液及培养基配制的标准操作规程、环境清洁标准操作规程。此外抗生素微生物检定实验所用烧杯、漏斗、移液管、容量瓶、滴管、小钢管等器皿应与其他器皿分开洗涤,防止抗生素污染用于微生物培养的器皿;所有染菌物品、培养物均应经高压灭菌处理后再清洗;抗生素微生物检定平板与其他培养基平板也应分开洗涤。室内应保持清洁、干燥,防止微生物滋生和污染。应制定出实验器皿洗涤标准操作规程。灭菌室是放置高压灭菌器,进行物品灭菌的工作室,注意应有适当措施防止灭菌后物品的第二次污染。对于已灭菌过的物品和没有灭菌过的物品在放置区域和标志上应有明显区别。实验室还可以设有实验用品、易耗品储藏室,为一般清洁环境室。办公休息室为一般清洁环境室。

第二节 食品微生物检测实验设备要求

中国合格评定国家认可委员会(简称 CNAS)2006 年制定检测和校准实验室能力认可准则,其中对设备的规定如下:

(1) 实验室应配备正确进行检测和(或)校准(包括抽样、物品制备、数据处理与分析)所要求的所有抽样、测量和检测设备。当实验室需要使用永久控制之外的设备时,应确保满足本准则的要求。

(2) 用于检测、校准和抽样的设备及其软件应达到要求的准确度,并符合检测和(或)校