



中国教师发展基金会教师出版专项基金资助

# 食品 微生物检验技术

王廷璞 王静 编著 



Shipin Weishengwu  
Jianyan Jishu



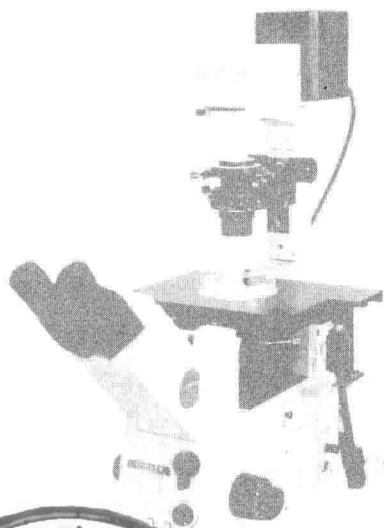
化学工业出版社



中国教师发展基金会教师出版专项基金资助

# 食品 微生物检验技术

王廷璞 王静 编著 ▶▶



Shipin Weishengwu  
Jianyan Jishu



化学工业出版社

·北京·

图书在版编目 (CIP) 数据

食品微生物检验技术/王廷璞, 王静编著. —北京: 化学工业出版社, 2014. 1

ISBN 978-7-122-19021-5

I. ①食… II. ①王…②王… III. ①食品微生物-食品检验 IV. ①TS207.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 274613 号

---

责任编辑: 刘亚军  
责任校对: 边涛

装帧设计: 史利平

---

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)  
印 刷: 北京云浩印刷有限责任公司  
装 订: 三河市宇新装订厂  
787mm×1092mm 1/16 印张 15 字数 396 千字 2014 年 2 月北京第 1 版第 1 次印刷

---

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

---

定 价: 48.00 元

版权所有 违者必究

# 前言

## Foreword

食品微生物检测是衡量食品卫生质量的重要指标之一，也是判定被检食品能否食用的科学依据之一。通过食品微生物检测，可以判断食品加工环境及食品卫生情况，能够对食品被细菌污染的程度做出正确的评价，为各项卫生管理工作提供科学依据，提供传染病和人类、动物的食品中毒的防治措施。食品微生物检测技术在食品科学领域和人才培养中的地位十分重要。因此，为了适应市场对食品质量安全人才的需要，加强食品微生物检测实验与教学间的联系，保持实验教学内容的连续性和连贯性，我们编写了这部既适合于高校食品质量与安全专业需求又可兼顾食品安全及卫生领域专业人员使用的食品微生物检测技术教程。

本书分为上篇和下篇。上篇为微生物实验基础，包括光学显微镜的使用，革兰染色，真菌和放线菌的形态观察，微生物的测微与显微计数技术，培养基的制备，消毒与灭菌技术，菌种的保藏等内容，将微生物实验的基础扼要地介绍给读者。下篇为食品微生物检验，该篇共包括 11 个食品细菌学检验实验、2 个食品真菌学检验实验以及 4 个食品微生物快速检验实验。在实验内容的选择上，遵循新颖性、标准性、系统性、连贯性、综合性和层次性的原则，兼顾学生知识面的拓宽和能力的培养以及各高等学校的实验教学条件，经过讲授和操作，学生将受到系统的食品微生物检测方法和技术的训练，使他们能够获得食品微生物检测技术的理论和系统、新颖、准确、实用的实验技能，为他们将来从事食品安全检验奠定一定的基础。本书以食品安全有关专业的本科生为对象，也可供其他相关领域的人士参考。

本书第一章、第六章、第七章、第八章、第十二章和附录由王廷璞编写，第二章、第三章、第四章、第五章、第九章、第十章和第十一章由王静编写。

在编写过程中，我们参阅了众多的书籍和资料，在参考文献中未能全部列出。

由于本书涉及的知识面广及我们的水平有限，书中难免存在错误和不妥，敬请广大读者和同行批评指正。

### ◎ 上篇 微生物实验基础

第一章 食品微生物检验实验室的总则 .....	3
第一节 微生物实验室设计 .....	3
第二节 微生物实验室基本要求 .....	5
第三节 食品微生物检验的操作技术要求 .....	7
第二章 微生物的形态观察与镜检 .....	10
实验一 光学显微镜的使用 .....	10
实验二 革兰染色法（经典法） .....	16
实验三 真菌的载片培养和形态观察 .....	19
实验四 放线菌的玻璃纸培养和形态观察 .....	22
第三章 微生物的测微与显微计数技术 .....	25
实验五 微生物细胞大小的测定 .....	25
实验六 微生物的显微镜直接计数 .....	28
第四章 培养基的制备 .....	31
实验七 常用基础培养基的配制 .....	31
实验八 选择性培养基的配制 .....	35
第五章 消毒与灭菌技术 .....	38
实验九 高压蒸汽灭菌 .....	38
实验十 干燥箱干热灭菌 .....	41
第六章 微生物的分离纯化与培养技术 .....	44
实验十一 平板划线法分离菌种 .....	44
实验十二 斜面接种与培养 .....	47
实验十三 三点接种与培养 .....	51

第七章 微生物生理生化试验 .....	54
实验十四 细菌生理生化反应试验 .....	54
第八章 菌种的保藏 .....	59
实验十五 常用的简易保藏法 .....	59
实验十六 冷冻真空干燥保藏法 .....	62

## ◎ 下篇 食品微生物检验

第九章 食品样品的采集 .....	69
第一节 食品样品的采集 .....	69
第二节 食品检验样品的运送与保存 .....	74
第三节 各类食品微生物检样样品的采集与制备实例 .....	75
第十章 食品的细菌学检验 .....	78
实验十七 食品中菌落总数测定 (GB 4789.2—2010) .....	78
实验十八 食品中大肠菌群计数 (GB 4789.3—2012) .....	82
实验十九 食品中沙门菌的检验 (GB 4789.4—2010) .....	89
实验二十 食品中金黄色葡萄球菌检验 (GB 4789.10—2010) .....	100
实验二十一 食品中副溶血性弧菌检验 (GB/T 4789.7—2008) .....	112
实验二十二 食品中单核细胞增生李斯特菌的检验 (GB 4789.30—2010) .....	120
实验二十三 食品中乳酸菌检验 (GB 4789.35—2010) .....	125
实验二十四 食品中双歧杆菌的鉴定 (GB 4789.34—2012) .....	130
实验二十五 食品中阪崎肠杆菌检验 (GB 4789.40—2010) .....	136
实验二十六 食品中志贺菌的检验 (GB 4789.5—2012) .....	141
实验二十七 罐头食品商业无菌检验 (GB/T 4789.26—2003) .....	150
第十一章 食品的真菌学检验 .....	159
实验二十八 食品中霉菌和酵母计数 (GB 4789.15—2010) .....	159
实验二十九 食品中产毒霉菌的鉴别 (GB 4789.16—2003) .....	162
第十二章 食品的微生物快速检验 .....	182
实验三十 用 PCR 技术检测食品中沙门菌 .....	182
实验三十一 罐头食品商业无菌检验 (BacT/ALERT 3D 系统快速检测法) .....	185

实验三十二	ATP 生物发光法检测食品中的菌落总数 .....	187
实验三十三	酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测食品中大肠杆菌 .....	190
附录	.....	195
参考文献	.....	230

# 上篇

## 微生物实验基础

第一章 食品微生物检验实验室的总则

第二章 微生物的形态观察与镜检

第三章 微生物的测微与显微计数技术

第四章 培养基的制备

第五章 消毒与灭菌技术

第六章 微生物的分离纯化与培养技术

第七章 微生物生理生化试验

第八章 菌种的保藏





# 第一章

## 食品微生物检验实验室的总则

### 第一节 微生物实验室设计

微生物实验室由准备室、洗涤室、无菌室、恒温培养室和普通实验室六部分组成。这些房间的共同特点是地板和墙壁的质地光滑坚硬，仪器和设备的陈设简洁，便于打扫卫生。

#### 一、准备室

准备室用于配制培养基和样品处理等。室内设有试剂柜、存放器具或材料的专柜、实验台、电炉、冰箱和上下水道、电源等。

#### 二、洗涤室

洗涤室用于洗刷器皿等。由于使用过的器皿已被微生物污染，有时还会存在病原微生物。因此，在条件允许的情况下，最好设置洗涤室。室内应备有加热器、蒸锅，洗刷器皿用的盆、桶等，还应有各种瓶刷、去污粉、肥皂、洗衣粉等。

#### 三、无菌室

无菌室也称接种室，是系统接种、纯化菌种等无菌操作的专用实验室。在微生物工作中，菌种的接种移植是一项主要操作，这项操作的特点就是要保证菌种纯种，防止杂菌的污染。在一般环境的空气中，由于存在许多尘埃和杂菌，很易造成污染，对接种工作干扰很大。

##### 1. 无菌室的设置

无菌室应根据既经济又科学的原则来设置。其基本要求有以下几点：

(1) 无菌室应有内、外两间，内间是无菌室，外间是缓冲室。房间容积不宜过大，以便于空气灭菌。内间面积  $2 \times 2.5 = 5\text{m}^2$ ，外间面积  $1 \times 2 = 2\text{m}^2$ ，高以 2.5m 以下为宜，都应有天花板。

(2) 内间设拉门,以减少空气的波动,门应设在离工作台最远的位置上;外间的门最好也用拉门,要设在距内间最远的位置上。

(3) 在分隔内间与外间的墙壁或“隔扇”上,应开一个小窗,作接种过程中必要的内外传递物品的通道,以减少人员进出内间的次数,降低污染程度。小窗宽 60cm、高 40cm、厚 30cm,内外都挂对拉的窗扇。

(4) 无菌室容积小而严密,使用一段时间后,室内温度很高,故应设置通气窗。通气窗应设在内室进门处的顶棚上(即离工作台最远的位置),最好为双层结构,外层为百叶窗,内层可用抽板式窗扇。通气窗可在内室使用后、灭菌前开启,以流通空气。有条件可安装恒温恒湿机。

## 2. 无菌室内设备和用具

(1) 无菌室内的工作台,不论是什么材质、用途的,都要求表面光滑和台面水平。

(2) 在内室和外室各安装一个紫外线灯(多为 30W)。内室的紫外线灯应安装在经常工作的座位正上方,离地面 2m,外室的紫外线灯可安装在外室中央。

(3) 外室应有专用的工作服、鞋、帽、口罩、盛有来苏儿水的瓷盆和毛巾、手持喷雾器和 5%石炭酸溶液等。

(4) 内室应有酒精灯、常用接种工具、不锈钢制的刀、剪、镊子、70%的酒精棉球、工业酒精、载玻璃片、特种蜡笔、记录本、铅笔、标签纸、胶水、废物筐等。

## 3. 无菌室的消毒与熏蒸

(1) 甲醛和高锰酸钾混合熏蒸 一般每平方米需 40%甲醛 10mL、高锰酸钾 8mL,进行熏蒸。使用时,先密闭门窗,量甲醛溶液盛入容器中,然后倒入量好的高锰酸钾,人员随之离开接种室,关紧房门,熏蒸 20~30min 即可。

(2) 0.1%升汞水消毒 用 0.1%升汞水浸过的纱布或海绵进行擦拭,或用喷雾器喷雾灭菌,使箱内的上下左右都沾上升汞水,手也可用升汞水消毒,并把袖子卷起来。喷雾后 20~30min,箱内的杂菌和雾滴一起落到箱底被杀死,内部的空气就变得很清洁。

(3) 紫外线照射灭菌 在无菌箱中装一支 200V, 30W 的紫外线灯管;每次开 20~30min,就能达到空间杀菌的目的。照射结束后,罩黑布半小时,以增强杀菌效果。

(4) 石炭酸喷雾 在每次接种之前,用 5%石炭酸溶液喷雾,可促使空气中的微粒和杂菌沉降,防止桌面微尘飞扬,并有杀菌作用。

(5) 石灰揩擦 经常用药物熏蒸,易造成酸性环境,特别用甲醛和高锰酸钾熏蒸长久,污染往往越来越严重,预防办法是可把各种药品交替使用,过一段时间(约 5 周)用石灰擦洗一遍。实践证明,这样做效果很好。

## 4. 无菌室工作规程

(1) 无菌室灭菌,每次使用前开启紫外线灯照射 30min 以上,或在使用前 30min,对内外室用 5%石炭酸喷雾。

(2) 用肥皂洗手后,把所需器材搬入外室;在外室换上已灭菌的工作服、工作帽和工作鞋,戴好口罩,然后用2%煤酚皂液将手浸洗2min。

(3) 将各种需用物品搬进内室清点、就位,用5%石炭酸在工作台面上方和操作人员站位空间喷雾,返回外室,5~10min后再进内室工作。

(4) 接种操作前,用70%酒精棉球擦手;进行无菌操作时,动作要轻缓,尽量减少空气波动和地面扬尘。

(5) 工作中应注意安全。如遇棉塞着火,用手紧握或用湿布包裹熄灭,切勿用嘴吹,以免扩大燃烧;如遇有菌培养物洒落或打碎有菌容器时,应用浸润5%石炭酸的抹布包裹后,并用浸润5%石炭酸的抹布擦拭台面或地面,用酒精棉球擦手后再继续操作。

(6) 工作结束,立即将台面收拾干净,将不应在无菌室存放的物品和废弃物全部拿出无菌室后,对无菌室用5%石炭酸喷雾,或开紫外线灯照射30min。

## 四、恒温培养室

### 1. 培养室的设置

(1) 培养室应有内、外两间,内室是培养室,外室是缓冲室。房间容积不宜大,以利于空气灭菌,内室面积在 $3.2 \times 4.4 = 14\text{m}^2$ 左右,外室面积在 $3.2 \times 1.8 = 6\text{m}^2$ 左右,高以2.5m左右为宜,都应有天花板。

(2) 分隔内室与外室的墙壁上部应设带空气过滤装置的通风口。

(3) 为满足微生物对温度的需要,需安装恒温恒湿机。

(4) 内外室都应在室中央安装紫外线灯,以供灭菌用。

### 2. 培养室内设备及用具

(1) 内室通常配备培养架和摇瓶机(摇床)。常用的摇瓶机有旋转式、往复式两种。

(2) 外室应有专用的工作服、鞋、帽、口罩、手持喷雾器和5%石炭酸溶液、70%酒精棉球等。

### 3. 培养室的灭菌、消毒

同无菌室的灭菌、消毒措施。

小规模的培养可不启用恒温培养室,而在恒温培养箱中进行。

## 五、普通实验室

进行微生物的观察、计数和生理生化测定工作的场所。室内的陈设因工作侧重点不同而有很大的差异。一般均配备实验台、显微镜、柜子及凳子。实验台要求平整、光滑,实验柜要足以容纳日常使用的用具及药品等。

## 第二节 微生物实验室基本要求

食品微生物检验对实验室的环境、人员、设备、检验用品、培养基、试剂和菌株七

个方面进行了要求。

## 一、环境

- (1) 实验室环境不应影响检验结果的准确性。
- (2) 实验室的工作区域应与办公室区域明显分开。
- (3) 实验室工作面积和总体布局应能满足从事检验工作的需要，实验室布局应采用单方向工作流程，避免交叉污染。
- (4) 实验室内环境的温度、湿度、照度、噪声和洁净度等应符合工作要求。
- (5) 一般样品检验应在洁净区域（包括超净工作台或洁净实验室）进行，洁净区域应有明显的标示。
- (6) 病原微生物分离鉴定工作应在二级生物安全实验室（Biosafety level 2, BSL-2）进行。

## 二、人员

- (1) 检验人员应具有相应的教育、微生物专业培训经历，具备相应的资质，能够理解并正确实施检验。
- (2) 检验人员应掌握实验室生物检验安全操作知识和消毒知识。
- (3) 检验人员应在检验过程中保持个人整洁与卫生，防止人为污染样品。
- (4) 检验人员应在检验过程中遵守相关预防措施的规定，保证自身安全。
- (5) 有颜色视觉障碍的人员不能执行涉及辨色的实验。

## 三、设备

- (1) 实验设备应满足检验工作的需要。
- (2) 实验设备应放置于适宜的环境条件下，便于维护、清洁、消毒与校准，并保持整洁与良好的工作状态。
- (3) 实验设备应定期进行检查、检定（加贴标识）、维护和保养，以确保工作性能和操作安全。
- (4) 实验设备应有日常性监控记录和使用记录。

## 四、检验用品

- (1) 常规检验用品主要有接种环（针）、酒精灯、镊子、剪刀、药匙、消毒棉球、硅胶（棉）塞、微量移液器、吸管、吸球、试管、平皿、微孔板、广口瓶、量筒、玻棒及L形玻棒等。
- (2) 检验用品在使用前应保持清洁和/或无菌。常用的灭菌方法包括湿热法、干热法、化学法等。

(3) 需要灭菌的检验用品应放置在特定容器内或用合适的材料（如专用包装纸、铝箔纸等）包裹或加塞，应保证灭菌效果。

(4) 可选择适用于微生物检验的一次性用品来替代反复使用的物品与材料（如培养皿、吸管、吸头、试管、接种环等）。

(5) 检验用品的储存环境应保持干燥和清洁，已灭菌与未灭菌的用品应分开存放并明确标识。

(6) 灭菌检验用品应记录灭菌/消毒的温度与持续时间。

## 五、培养基和试剂

### 1. 培养基

培养基的制备和质量控制按照 GB/T 4789.28 的规定执行。

### 2. 试剂

检验试剂的质量及配制应适用于相关检验。对检验结果有重要影响的关键试剂应进行适用性验证。

## 六、菌株

(1) 应使用微生物菌种保藏专门机构或同行认可机构保存的、可溯源的标准或参考菌株。

(2) 应对从食品、环境或人体分离、纯化、鉴定的，未在微生物菌种保藏专门机构登记注册的原始分离菌株（野生菌株）进行系统、完整的菌株信息记录，包括分离时间、来源、表型及分子鉴定的主要特征等。

(3) 实验室应保存能满足实验需要的标准或参考菌株，在购入和传代保藏过程中，应进行验证试验，并进行文件化管理。

# 第三节 食品微生物检验的操作技术要求

## 一、无菌操作要求

食品微生物实验室工作人员，必须有严格的无菌观念，食品微生物检验要求在无菌条件下进行。

(1) 接种细菌时必须穿工作服、戴工作帽。

(2) 进行接种食品样品时，必须穿专用的工作服、帽及拖鞋，应放在无菌室缓冲间，工作前经紫外线消毒后使用。

(3) 接种食品样品时，应在进无菌室前用肥皂洗手，然后用 75% 酒精棉球将手擦干净。

(4) 进行接种所用的吸管, 平皿及培养基等必须经消毒灭菌, 打开包装未使用完的器皿, 不能放置后再使用。金属用具应高压灭菌或用 95% 酒精点燃烧灼三次后使用。

(5) 从包装中取出吸管时, 吸管尖部不能触及外露部位, 使用吸管接种于试管或平皿时, 吸管尖不得触及试管或平皿边。

(6) 接种样品、转种细菌必须在酒精灯前操作, 接种细菌或样品时, 吸管从包装中取出后及打开试管塞都要通过火焰消毒。

(7) 接种环和针在接种细菌前应经火焰烧灼全部金属丝, 必要时还要烧到环和针与杆的连接处, 接种结核菌和烈性菌的接种环应在沸水中煮沸 5min, 再经火焰烧灼。

(8) 吸管吸取菌液或样品时, 应用相应的橡皮头吸取, 不得直接用口吸。

## 二、无菌室无菌程度的检测

无菌室的标准要符合良好作业规范 (Good Manufacturing Practice, GMP) 洁净度的标准要求 (表 1-1)。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, 常有沉降菌和浮游菌测定方法。

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 分数级
	$\geq 0.5\mu\text{m}$	$\geq 5\mu\text{m}$	浮游菌/ $\text{m}^3$	尘降菌/皿	
100 级	3500	0	5	1	ISO, 5 级
10000 级	350000	2000	100	3	ISO, 7 级
100000 级	3500000	20000	500	10	ISO, 8 级
300000 级	10000000	60000		15	

### 1. 沉降菌检测方法

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  $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$  培养 48h, 取出检查。每批培养基应选定 3 只培养皿做对照培养。

### 2. 浮游菌检测方法

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检, 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药典认可的其他培养基。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  $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$  培养 48h, 取出检查。每批培养基应选定 3 只培养皿做对照培养。

### 3. 监测无菌室的洁净程度的注意事项

(1) 采样装置采样前的准备及采样后的处理, 均应在设有高效空气过滤器排风的负压实验室进行操作, 该实验室的温度为  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; 相对湿度应为  $50\% \pm 10\%$ 。

(2) 采样器应消毒灭菌, 采样器选择应审核其精度和效率, 还有合格证书。

(3) 浮游菌采样器的采样率宜大于  $100\text{L}/\text{min}$ ; 碰撞培养基的空气速度应小于  $20\text{m}/\text{s}$ 。

### 三、消毒灭菌要求

微生物检测用的玻璃器皿、金属用具及培养基、被污染和接种的培养物等, 必须经灭菌后方能使用。

### 四、有毒有菌污物处理要求

微生物实验所用实验器材、培养物等未经消毒处理, 一律不得带出实验室。

(1) 经培养的污染材料及废弃物应放在严密的容器或铁丝筐内, 并集中存放在指定地点, 待统一进行高压灭菌。

(2) 经微生物污染的培养物, 必须经  $121^{\circ}\text{C}$ , 30min 高压灭菌。

(3) 染菌后的吸管, 使用后放入 5% 煤酚皂溶液或石炭酸液中, 最少浸泡 24h (消毒液体不得低于浸泡的高度) 再经  $121^{\circ}\text{C}$ , 30min 高压灭菌。

(4) 涂片染色冲洗片的液体, 一般可直接冲入下水道, 烈性菌的冲洗液必须冲在烧杯中, 经高压灭菌后方可倒入下水道, 染色的玻片放入 5% 煤酚皂溶液中浸泡 24h 后, 煮沸洗涤。做凝集试验用的玻片或平皿, 必须高压灭菌后洗涤。

(5) 打碎的培养物, 立即用 5% 煤酚皂溶液或石炭酸液喷洒和浸泡被污染部位, 浸泡半小时后再擦拭干净。

(6) 污染的工作服或进行烈性试验所穿的工作服、帽、口罩等, 应放入专用消毒袋内, 经高压灭菌后方能洗涤。



## 第二章

# 微生物的形态观察与镜检

显微镜是研究微生物必不可少的工具。自从发明了显微镜后，人们才能观察到各种微生物的形态，从此揭开了微生物世界的奥秘。随着科学技术不断发展，显微镜可利用的光源已从可见光扩展到紫外线，接着又出现利用非光源的电子显微镜，从而大大地提高了显微镜的分辨率和放大率。借助于各种显微镜，人们不仅可以观察到真菌、细菌的形态和构造，还能清楚地观察到病毒的形态和构造。

当今微生物实验室中最常用的还是普通光学显微镜。我们应了解显微镜的构造和原理，以达到正确使用和保养的目的。

除暗视野显微镜和相差显微镜可用于观察活的细菌细胞外，其他普通光学显微镜大多用于观察染色后的细菌细胞，只有经过染色的细菌才能看清其形态和构造。因此，各种染色法也是微生物学工作者应掌握的基本技术。

### 实验一 光学显微镜的使用

#### 【目的】

1. 了解普通显微镜的构造和原理。
2. 正确掌握使用显微镜的方法。

#### 【概述】

普通光学显微镜由机械装置和光学系统两部分（图 2-1）。

##### 1. 机械装置

###### （1）镜座和镜臂

它们是显微镜的基本骨架，起稳固和支撑显微镜的作用。直筒显微镜的镜臂与镜座之间有一倾斜关节，可使显微镜倾斜一定的角度，便于观察。