

Food



普通高等教育“十二五”规划教材

食品 微生物学检验

周建新 主 编
焦凌霞 副主编



化学工业出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

食品微生物学检验

周建新 主编
焦凌霞 副主编



化学工业出版社

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

食品微生物学检验/周建新主编. —北京: 化学工业出版社, 2011. 6

普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-122-11512-6

I. 食… II. 周… III. 食品微生物-食品检验-高等学校-教材 IV. TS207.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 108914 号

责任编辑: 赵玉清
责任校对: 战河红

文字编辑: 刘 畅
装帧设计: 尹琳琳

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: 北京市振南印刷有限责任公司

装 订: 三河市宇新装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张 11 字数 274 千字 2011 年 8 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: 25.00 元

版权所有 违者必究

前言

食品安全问题关系到人民健康、国家经济（特别是工业、贸易和农业）的可持续发展和社会稳定，是世界关注的热点问题，已引起国内外前所未有的重视。目前，食品安全问题形势严峻，食品微生物污染问题突出，细菌性食物中毒占各种食物中毒之首，每年的发生数量、受害人数、死亡人数和造成的经济损失都是非常巨大的，我国如此，发达国家同样深受其害。食品微生物学检验作为四大检验（食品理化检验、食品卫生检验、食品感官检验和食品微生物学检验）之一，对食品安全控制起着非常关键的作用，食品微生物学检验的广泛应用和不断改进，是制定和完善有关法律、法规的基础和执行的依据，是制定各级预防、监控和预警系统的重要组成部分，是食品微生物污染的溯源、控制和降低由此引起的一系列重大损失的重要有效手段，对促进人民身体健康、经济可持续发展和社会稳定都很重要，具有较大的经济、社会意义。

本书是以南京财经大学江苏省特色专业、国家特色专业建设点食品科学与工程专业建设项目为依托，以新的食品安全法和 2010 版的食品安全标准食品微生物学检验方法为依据，注重微生物学基础实验与专业实验的有机衔接和食品微生物学检验原理与技能的兼容，学生修完本课程后，可独立完成微生物基础实验和符合相关国家标准要求的食品微生物检测方案设计、采样及处理、检验与分析、数据记录与报告等。

随着科学技术的发展，微生物学实验和食品微生物学检测新技术、新方法层出不穷，特别是分子生物学水平的鉴定技术发展迅速，授课教师应及时了解和掌握学科前沿，根据教学内容更新快的特点，及时补充新知识，掌握先进的检测方法，使学生在系统掌握国家标准内容的基础上，及时了解本学科的发展动向和未来的发展趋势。

本书由南京财经大学食品科学与工程学院的周建新教授担任主编，河南科技学院焦凌霞副教授担任副主编。内容编写分工如下：南京财经大学周建新（第一章～第三章、第十章、第十一章中实验二十五～实验二十九）、高瑀琰（第九章、第十一章中实验三十～实验三十四、第十三章）、姚明兰（第四章～第六章），河南科技学院焦凌霞（第七章、第八章、第十四章），丹阳市产品质量监督检验所王超（第十二章），周建新对全部书稿进行了整理和统稿。

本书在编写过程中，得到南京财经大学食品科学与工程学院各位领导的关心和支持，还得到化学工业出版社赵玉清编辑的大力支持和具体指导。另外，本书的出版也得到南京财经大学食品科学与工程专业国家特色专业建设点的经费资助。在此，我们表示衷心感谢。

本书在撰写过程中参考了国内外大量的研究成果，这固然能为本书的内容增加新鲜知识，但有些观点和结论仍需要实践验证，有些问题还需要继续研究和探讨。书中不妥之处，敬请读者批评指正。

编者

2011 年 4 月

目录

微生物学实验室规则	1
上篇 微生物学基础实验	3
第一章 微生物镜检技术	4
实验一 普通光学显微镜的使用	4
实验二 生物数码显微摄影技术	8
第二章 微生物的制片与染色技术	10
实验三 细菌的制片与镜检	10
实验四 细菌特殊结构的染色与观察	13
实验五 霉菌和酵母菌的制片与镜检	17
实验六 放线菌的制片与镜检	19
第三章 微生物的观察与识别技术	22
实验七 细菌的形态观察(一)	22
实验八 细菌的形态观察(二)	23
实验九 霉菌的形态观察(一)	24
实验十 霉菌的形态观察(二)	26
实验十一 霉菌的形态观察(三)	27
实验十二 酵母菌的形态观察	29
第四章 微生物的测微与显微计数技术	30
实验十三 微生物细胞大小的测定(测微尺的应用)	30
实验十四 微生物的显微计数[血球(细菌)计数器的应用]	32
第五章 培养基的制备技术	34

实验十五	常用基础培养基的配制	34
第六章	消毒与灭菌技术	37
实验十六	玻璃器皿包扎及干燥箱干热灭菌	37
实验十七	高压蒸汽灭菌	39
第七章	微生物的分离纯化与培养技术	41
实验十八	微生物的分离与纯化	41
实验十九	纯种移植与培养	44
实验二十	细菌生长曲线的测定	46
第八章	微生物生理生化试验	48
实验二十一	细菌生理生化反应试验	48
实验二十二	大分子物质的微生物分解试验	52
第九章	微生物菌种保藏技术	54
实验二十三	斜面菌种低温保藏法	54
实验二十四	冷冻干燥保藏法	56
下篇	食品微生物学检验	59
第十章	食品微生物学检验概述	60
第一节	食品微生物学检验的基本原则和要求	60
第二节	各类食品安全的微生物学检验	63
第十一章	食品安全的细菌学检验	72
实验二十五	食品中菌落总数测定 (GB 4789. 2—2010)	72
实验二十六	食品中大肠菌群计数 (GB 4789. 3—2010)	76
实验二十七	食品中沙门氏菌检验 (GB 4789. 4—2010)	82
实验二十八	食品中志贺氏菌检验 (GB/T 4789. 5—2003)	93
实验二十九	食品中金黄色葡萄球菌检验 (GB 4789. 10—2010)	98
实验三十	食品中副溶血性弧菌检验 (GB/T 4789. 7—2008)	105
实验三十一	食品中单核细胞增生李斯特氏菌检验 (GB 4789. 30—2010)	110
实验三十二	食品中乳酸菌检验 (GB 4789. 35—2010)	115
实验三十三	食品中阪崎肠杆菌检验 (GB 4789. 40—2010)	121
实验三十四	罐头食品商业无菌检验 (GB/T 4789. 26—2003)	127

第十二章	食品安全的真菌性检验	133
实验三十五	食品中霉菌和酵母计数 (GB 4789. 15—2010)	133
实验三十六	食品中产毒霉菌的鉴别 (GB/T 4789. 15—2010)	136
第十三章	食品生产用水和环境的微生物检测	141
实验三十七	食品生产用水的微生物学检验 (GB/T 5750. 12—2006)	141
实验三十八	食品生产环境 (空气、工作台) 的微生物检测	150
第十四章	食品微生物的快速检测	155
实验三十九	PCR 法检测乳制品中大肠杆菌	161
实验四十	全自动荧光酶联免疫方法检测食品中沙门氏菌	163
参考文献		167

微生物学实验室规则

在微生物实验中，由于使用具有潜在的致病菌作为实验材料，因此实验室中实验和工作安全是极其重要的，为了保证实验者和实验室的安全，特提出如下注意事项：

一、为了保证实验室的整洁和实验顺利进行，非必要的物品，请勿带入室内。

二、每次实验前要充分预习实验指导，应明确本次实验的目的、要求、原理和方法，以免临时忙乱，影响实验的进度和效果。

三、保持室内安静，不可高声谈笑和任意走动，以免影响实验操作。

四、爱护国家财产，使用显微镜及其他贵重仪器时，应定人使用，按要求操作，专处存放，按班交接，加强责任管理，注意节约水、电、药品和低值易耗品。

五、实验过程中，切实听从教师指导，认真思考，仔细观察，谨慎操作，及时做好实验记录工作。

六、实验仪器、标本等，用后必须清理干净，归还原处。自制玻片和培养物等，如不需保存，用后应及时清洗消毒，严防污染危害。

七、实验过程中，如不慎将菌液洒到桌面或地面，应以 5% 石炭酸或 3% 来苏儿溶液覆盖半小时后才能擦去。如将菌液吸入口中或皮肤破伤处或烫伤，应立即报告指导教师，及时处理，切勿隐瞒。

八、实验室内的菌种和物品，未经指导教师同意，不得携带出室外。

九、实验完毕，及时清理桌面，收拾整齐。离开实验室前，注意关闭门、窗、灯、火、煤气等，并用肥皂洗手。

十、每次实验的结果，应以实事求是的科学态度书写实验报告，及时汇交指导教师批阅。

上篇 微生物学基础实验

微生物学基础实验是微生物学课程的重要组成部分，也是进行食品微生物学检验的基础。微生物学基础实验包括显微镜技术、制片与染色技术、培养基的制备技术、消毒与灭菌技术、分离纯化与培养技术和菌种保藏技术。

- 第一章 微生物镜检技术
- 第二章 微生物的制片与染色技术
- 第三章 微生物的观察与识别技术
- 第四章 微生物的测微与显微计数技术
- 第五章 培养基的制备技术
- 第六章 消毒与灭菌技术
- 第七章 微生物的分离纯化与培养技术
- 第八章 微生物生理生化试验
- 第九章 微生物菌种保藏技术

第一章 微生物镜检技术

在微生物学的各种研究工作中，首先必须对微生物的个体形态特征和菌体细胞内的结构特征有个明确的概念。一般来说，微生物的个体极其微小，很难直接用肉眼去观察，因此显微镜是观察微生物必不可少的工具，而镜检技术是微生物学的基本技术，了解显微镜的构造，正确掌握显微镜的使用方法，很有必要。

显微镜是一种高度放大的光学仪器。显微镜的种类很多，通常有普通光学显微镜、相差显微镜、暗视野显微镜、偏光显微镜、荧光显微镜和电子显微镜等。用于微生物形态观察，以普通光学显微镜最为常见。此外，利用显微摄影装置把显微镜视野中所观察到影像拍摄下来，制成照片或将图像信息传输、记录于其他仪器设备中，以供进一步研究和分析之用的显微摄影也是教学和科研中常用的一种技术。

实验一 普通光学显微镜的使用

一、实验目的

1. 了解普通光学显微镜的结构和各部分的功能。
2. 学会普通光学显微镜的正确使用和维护。

二、实验器材

1. 仪器

普通光学显微镜。

2. 实验菌

霉菌玻片标本、细菌玻片标本。

3. 其他

香柏油、二甲苯、擦镜纸、吸水纸等。

三、概述

(一) 普通光学显微镜的构造

普通光学显微镜的构造，如图 1-1 所示，它包括两部分：光学系统和机械装置。

1. 光学系统

普通光学显微镜的光学系统主要有物镜和目镜组成。此外，还有反光镜、聚光镜等。其中物镜的性能最为关键，它直接影响着显微镜的分辨率。

(1) 物镜

物镜安装在镜筒下端的转换器上,因接近被观察的物体,故又称接物镜。其作用是第一次将镜检物放大而成实像。一般显微镜有3~4个物镜,分成干燥系和油浸系两组。干燥系是指镜检时,物镜与镜检物之间的介质是空气,此系物镜,通常又可分为两种:其一是低倍镜,一般为5×或8×、10×;其二是高倍镜,一般为40×或45×、50×。油浸系是指镜检时,镜检物与物镜之间的介质是折光率与玻片和镜头相近的油类,如香柏油。观察时,需将镜头浸埋在油中。油镜的放大倍数通常为90×或100×,在其侧壁上,刻有oil字样或以一圈黑线作为标志。

显微镜质量的好坏,由物镜的数值孔径和分辨率决定。

① 数值孔径 (Numerical aperture, 简写 NA): 它是用来表示聚光镜发出的锥形光柱照射在镜检物上,被物镜所能聚集的量,即:

$$NA = n \cdot \sin(\mu/2)$$

n 为物镜与镜检物之间介质的折射率, μ 是进入物镜的锥形光柱的角度。介质为空气时, $n=1$, μ 角最大只能到 180° (实验上不可能,因为这时物镜的镜头已经碰到观察的标本), $\sin(\mu/2)=1$, 所以干燥系的物镜的数值孔径小于1, 一般为0.05~0.95。但如果使用与玻璃相近、折射率较高的介质(如香柏油)时,数值孔径将会增大,一般油镜的数值孔径为0.85~1.40。

② 分辨率 (D): 是指显微镜能够辨别两点或两根细线之间的最小距离的能力。辨别距离越小,分辨率愈强。它与物镜的数值孔径 (NA) 成反比,与入射光线的波长 (λ) 成正比:

$$D = \lambda / (2NA)$$

由此看来,提高显微镜的分辨率的最好办法是增加数值孔径。因为可见光的波长范围比较窄(400~750nm),所以从减少光波长度来提高分辨率是有限的。由于物镜受分辨率的限制,所以其放大能力并不是无限的。

(2) 目镜

目镜又称接目镜,装在镜筒上方。其作用是将物镜所形成的实像进一步放大形成虚像,并映入眼部。目镜上也刻有表示放大倍数的标志,如5×或10×、16×。

(3) 聚光镜

聚光镜装在镜台下,它可以使光线从正面和斜面照射到标本后进入物镜,形成一个大角度的锥形光柱,以提高物镜的分辨率,并能增强照明度。聚光镜内部有孔径光阑可以调节开孔的大小。聚光镜可以上下移动调节。

(4) 反光镜

反光镜是普通光学显微镜的取光设备,有凹、平两面圆形镜子组成,可以自由转动方向,使光线射向聚光镜。

显微镜总的放大倍数是目镜和物镜的放大倍数的乘积,但从提高分辨率的实际效果来看,还是选用放大倍数较高的物镜为好。

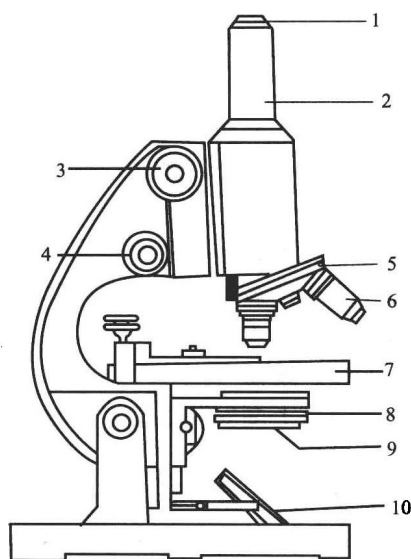


图 1-1 普通光学显微镜的构造

- 1—目镜; 2—镜筒; 3—粗调螺旋;
4—细调螺旋; 5—物镜转换器;
6—物镜; 7—载物台; 8—聚光镜;
9—彩虹光阑; 10—反光镜

2. 机械装置

显微镜的机械装置部分包括镜座、镜臂、镜筒、镜台、转换器 and 调焦装置等。

(1) 镜座

镜座是显微镜的基座，在显微镜的底部，用于支持整个镜体。通常呈马蹄形，也有三角形、矩形、圆形、椭圆形或丁字形。

(2) 镜臂

镜臂是显微镜的脊梁，机械装置一般都直接或间接与其相接，用以支撑、连接镜筒和镜座，为显微镜移动时的握持部分。有的显微镜下端有倾斜关节，可按需要调节镜臂与桌面的角度，便于观察。

(3) 镜筒

镜筒上端安装目镜，下端与转换器相连。

(4) 镜台

镜台用于放置标本（镜检物），常为圆形或方形，中间有孔可通过光线。台上装有标本推动器，它一方面用来固定标本，另一方面通过旋转推动器上的螺旋，使标本前后、左右移动，便于观察标本的不同部位。

(5) 转换器

转换器上端固定在镜筒上，下端有 3~4 个孔，用于安装不同放大倍数的物镜，根据需要可旋转更换不同放大倍数的物镜。

(6) 调焦装置

调焦装置可升降镜筒或镜台，以调节物镜和标本之间的距离，最清晰地观察标本。分为粗调节器和细调节器，前者调节的幅度大，只能做粗略调焦，后者调节的幅度小，可以作精细调焦。

(二) 普通光学显微镜的使用

1. 取镜

取镜时一手握镜臂，一手托镜座，轻拿轻放，切忌碰撞和猛振。

2. 采光

通过旋转反光镜、升降聚光镜和缩放光圈，以获得合适的亮度（一般以乳白色为适宜）。

3. 镜检

镜检时，将玻片标本放在镜台上，并用弹簧夹或标本推动器固定，移置欲检部位于物镜正下方，然后按照先用低倍镜，后用高倍镜（或油镜）的原则，依次观察。

(1) 低倍镜的使用

首先旋转粗调节器，如果调焦装置是调节镜筒的，使物镜向下移动（如果调焦装置是调节镜台的，应向上移动）至标本与物镜的距离约 2mm 处，用左眼在目镜上观察，慢慢旋转粗调节器，使物镜上升（或镜台下降），直到发现视野中的模糊镜检物后，换用细调节器，慢慢调节至清楚地看到标本为止，将所要观察的部位移至视野中央，以备换高倍镜（或油镜）观察。

(2) 高倍镜的使用

由低倍镜转换高倍镜观察时，先旋转转换器，将高倍镜移至镜筒下，再稍微调节细调节器即可。

(3) 油镜的使用

在低倍镜下找到所要观察的目标后，在标本的欲检部位加一滴香柏油，将油镜放正，再

稍微调节细调节器。或者慢慢转动粗调节器，将镜筒下降（或镜台上升），同时从镜体侧面观察，使镜头浸入油滴中、并几乎与标本接触，但切不可压及标本，以免损坏镜头。这时，使镜筒慢慢上升（或镜台慢慢下降），当视野中出现有模糊的被检物时，使用细调节器，直到被检物能看清楚为止。

（4）记录

使用显微镜时，用左眼观察目标，右眼看记录本，以便边观察边记录。

（5）收镜与存放

镜检结束后，取下标本，擦净显微镜各部，将镜头转成“八”字形，再将镜筒向下调节，以免物镜与聚光镜相碰受损。然后将显微镜装入镜箱内，妥善保存。

（三）普通光学显微镜的维护

显微镜是贵重的光学仪器，使用后正确的维护和保养，不但可使观察图像清晰，而且可延长显微镜的使用寿命。

◆ 显微镜是贵重和精密的光学仪器，使用时应小心谨慎，严禁随意拆卸玩弄。

◆ 显微镜应保持干净，若有不洁，机械装置部分用软布擦净，光学系统用擦镜纸擦拭。

◆ 显微镜调焦时，如为镜筒升降者，只准升，不能降；如为镜台升降者，只准降，不能升。

◆ 显微镜镜检时，应掌握“先低倍，后高倍（或油镜）”的使用顺序。

◆ 油镜使用后，必须用擦镜纸擦去残留在镜头上的香柏油，再用擦镜纸蘸少许二甲苯揩拭，最后再用干净的擦镜纸擦干。

◆ 显微镜使用时，或装箱存放后均需注意防潮、防晒、防霉、防震。

四、实验步骤

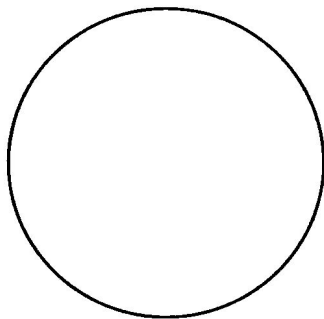
（1）按普通光学显微镜使用程序，利用高倍镜观察霉菌标本，并记录。

（2）按普通光学显微镜使用程序，利用油镜观察细菌标本，并记录。

（3）观察完毕后，对显微镜进行维护和保养。

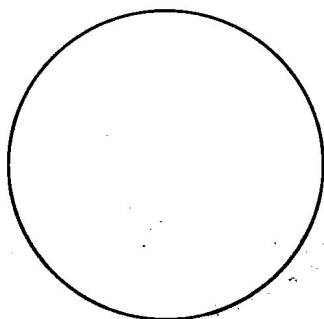
五、实验结果

将高倍镜观察到的霉菌标本和油镜观察到的细菌标本的形态绘图。



菌名：

放大倍数：



菌名：

放大倍数：

六、思考题

1. 绘出简明的光学显微镜光路图。
2. 简述光学显微镜使用程序要点。
3. 使用油镜时，为什么选用香柏油作为物镜与玻片间的介质？

实验二 生物数码显微摄影技术

一、实验目的

1. 学会数码显微摄影的方法。
2. 熟悉科技文献中对显微摄影图片的规范与要求。

二、实验器材

1. 仪器

具有数码显微摄影系统的普通光学显微镜、计算机等。

2. 实验菌

霉菌玻片标本、细菌玻片标本等。

3. 其他

香柏油、二甲苯、擦镜纸、吸水纸等。

三、概述

显微摄影技术是一种利用显微摄影装置把显微镜视野中所观察到的影像拍摄下来，制成照片或将图像信息传输、记录于其他仪器设备中，以供进一步研究和分析之用的一种技术

(图 1-2)。它在教学、科研中，尤其是生物学、食品研究领域已成为一项常规的、而又不可缺少的研究技术之一。

传统的显微摄影采用银盐胶片显微摄影，随着现代电子和计算机技术的发展，尤其是数码技术在摄影领域的广泛应用，传统的胶片式显微摄影已逐渐被数码显微摄影所取代。数码显微摄影除了正确记录图像信息外，还可将所观察到的现象与实验结果利用计算机显微图像分析软件进行更深层次的研究。数码摄影的成像原理是利用光电耦合器件，将镜头所形成的影像（甚至每个非常细小的局部）的光线亮度信号转化为计算机可以识别的、可以用数字进行描

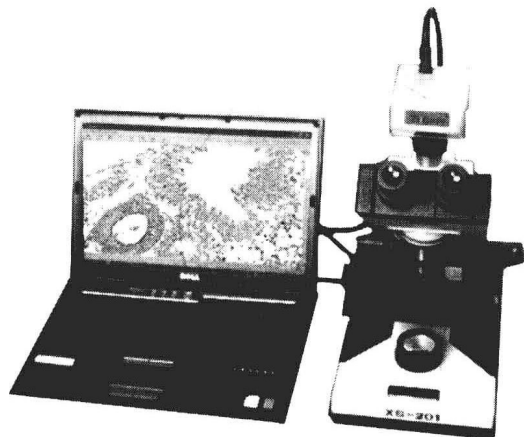


图 1-2 生物数码显微摄影

述的电子信号，最后通过计算机或其他专用设备，再把这些数字信号还原成光信号，使影像再现出来。数码显微摄影所产生的实时影像，由于采用了先进的数字技术，其精度远远高于传统的普通照片。

数码显微摄影技术的基本装置是数码摄像机或数码相机、显微镜、计算机和图像分析软件包。

四、实验步骤

- (1) 按普通光学显微镜使用程序，利用高倍镜观察霉菌标本，并拍摄。
- (2) 按普通光学显微镜使用程序，利用油镜观察细菌标本，并拍摄。

五、实验结果

将拍摄的霉菌和细菌标本的照片打印。

六、思考题

简述数码显微摄影技术要点。

第二章 微生物的制片与染色技术

用显微镜观察微生物个体特征前，必须首先将其制成玻片标本。而微生物种类繁多，包括细菌、放线菌和霉菌等，由于它们形态和结构上的差别，它们的制片方法不尽相同，有的微生物无色透明，在普通光学显微镜下难以将其与背景区分而看清，需要利用染料对微生物进行染色。

实验三 细菌的制片与镜检

一、实验目的

1. 掌握细菌革兰氏染色法的原理及操作步骤。
2. 进一步学习显微镜，尤其是油镜的使用方法。

二、实验器材

1. 仪器

普通光学显微镜。

2. 实验菌

大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、微球菌 (*Micrococcus sp.*)。

3. 染色液

蒸馏水或无菌生理盐水、结晶紫染色液、革兰氏碘液、95%乙醇、沙黄复染液。

4. 其他

香柏油、二甲苯、擦镜纸、吸水纸、载玻片、酒精灯、接种环。

三、概述

(一) 细菌的制片

根据镜检物及所要检查的项目，细菌的制片方法有两种。

1. 压片法 (普通法)

用压片法制作活细菌标本，不仅有利于观察细菌的运动，而且还能研究细菌的形态、大小和芽孢。其制片方法是：

- (1) 滴液——在洁净的载玻片中央，加一滴蒸馏水或无菌生理盐水；
- (2) 挑菌——用灭菌的接种环挑取一环细菌置于水中，混匀；
- (3) 盖片——菌悬液上慢慢加盖盖玻片，防止菌液外溢，避免产生气泡。

为便于观察，可用美蓝或复红等染色液代替水使用，将细菌染成蓝色或红色。