

Food

A Series of Food Science
& Technology Textbooks

食品科技
系列

普通高等教育本科“十二五”规划教材



食品微生物学 实验

刘素纯 吕嘉桢 蒋立文 主编



化学工业出版社

013043248

TS201.3
04

Food

A Series of Food Science
& Technology Textbooks

食品科技
系列

普通高等教育本科“十二五”规划教材



食品微生物学 实验

刘素纯 吕嘉栎 蒋立文 主编



化学工业出版社

·北京·



北航

C1650050

TS201.3
04

83330810

本书是配合食品类专业开设“基础微生物学”、“食品微生物学”、“食品微生物卫生检验”及“酿造食品加工学”课程等基础上,总结以往实验课的内容、教学效果及相关实验指导编写的较为系统、连贯、实践性强的实验课程教材,力争成为今后教学改革形成课程群的理想教材。

全书分为微生物学实验准备及检验要求、食品微生物学基础实验实用技术、食品微生物学检验实验技术、食品微生物学应用实验技术以及附录,比较系统地介绍了:微生物的染色制片技术,微生物的观察,微生物的接种培养技术,微生物的数量测定及生理代谢试验,微生物菌种分离、诱变育种及菌种保藏技术,微生物卫生检验以及酿造食品微生物学技术等;主要是通过微生物学实验让学生验证理论,巩固与加深所学的知识,掌握基本的实验技能,培养学生理论联系实际、独立思考问题和解决问题的能力。每个实验相对独立,各院校根据具体情况选择实验内容。

本书可作为高等院校食品科学与工程专业、食品质量与安全专业和食品生物工程专业的骨干课教材,也可供食品、环保、卫生等领域从事微生物教学和科研工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

食品微生物学实验/刘素纯,吕嘉桡,蒋立文主编. —北京:化学工业出版社,2013.4

普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-122-16646-3

I. ①食… II. ①刘…②吕…③蒋… III. ①食品微生物-微生物学-高等学校-教材②食品微生物-实验-高等学校-教材 IV. ①TS201.3

中国版本图书馆CIP数据核字(2013)第042510号

责任编辑:赵玉清 朱理
责任校对:宋夏

文字编辑:向东
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11 字数267千字 2013年6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:24.00元

版权所有 违者必究

本书编写人员名单

- 主 编** 刘素纯 湖南农业大学
吕嘉枋 陕西科技大学
蒋立文 湖南农业大学
- 副主编** 钟青萍 华南农业大学
张香美 河北经贸大学
周 康 四川农业大学
张继红 湖南省食品质量监督检验研究院
- 参 编** 周红丽 湖南农业大学
旭日花 内蒙古农业大学
周 辉 湖南农业大学
武 运 新疆农业大学
王 静 新疆农业大学
高 蕾 新疆农业大学
曹广丽 哈尔滨工业大学
肖作为 湖南中医药大学
- 主 审** 贺稚非 西南大学
邓芳席 湖南农业大学

前 言

食品微生物学实验是食品科学中一门重要的专业课，也是一门实践性很强的操作技术课，它与食品生产、贮存、运输、销售、保鲜及食品安全质量评价密切相关。设置该课程的目的是使学生了解食品微生物学实验的基本理论，弄清基本概念，掌握基本操作技能，研究微生物与食品问题。以便充分利用有益微生物活动，控制有害微生物活动，提高食品安全质量，保障人民身体健康。

本书共分四个部分，包括 42 个实验。第一部分为微生物学实验准备及检验要求，由刘素纯编写，第二部分是食品微生物学基础实验实用技术，由吕嘉枏、刘素纯、钟青萍、旭日花、曹广丽负责编写，第三部分是食品微生物学检验实验技术，由周康、周红丽、周辉、张继红、肖作为负责编写，第四部分是食品微生物学应用实验技术，由刘素纯、蒋立文、张香美、武运、高蕾、王静负责编写，附录和参考文献由刘素纯整理。全书的整理、绘图、统编、定稿由刘素纯负责。西南大学贺稚非教授担任主审，湖南农业大学邓芳席教授担任副主审。每个实验内容基本上都按：目的要求、基本原理、器具材料、操作步骤、作业与思考题五个部分来编写的。各实验所用染色液、试剂、培养基等的配制均列在附录内。每个实验都是相对独立，各院校使用可根据具体情况开设实验内容。

本书在编写过程中得到了各编委所在单位和领导的支持，谨在此表示衷心的感谢。

本书难免存在不妥之处，敬请读者谅解并给予指正。

编者

2013 年 1 月

目 录

第一部分	微生物学实验准备及检验要求	1
第二部分	食品微生物学基础实验实用技术	11
实验一	普通光学显微镜的使用	11
实验二	细菌的简单染色法和革兰染色法	16
实验三	细菌特殊结构的染色(芽孢、荚膜和鞭毛)及细菌运动性观察	19
实验四	放线菌形态观察	22
实验五	酵母菌形态的观察及酵母菌死活细胞的鉴别	24
实验六	霉菌形态及特殊结构观察	26
实验七	微生物的培养特征的观察	28
实验八	噬菌体培养与噬菌斑的观察	32
实验九	培养基的配制与灭菌方法	34
实验十	微生物细胞大小的测量	39
实验十一	微生物细胞数量的直接计数法	41
实验十二	微生物的分离、纯化与接种技术	43
实验十三	细菌生长曲线的测定	48
实验十四	用生长谱法测定微生物的营养要求	50
实验十五	物理、化学因素对微生物的影响	51
实验十六	细菌鉴定用生理生化试验	54
实验十七	微生物菌种保藏方法	57
实验十八	微生物的诱变育种	60
实验十九	微生物菌种的复壮技术	62
实验二十	细菌原生质体融合技术	64
实验二十一	细菌总 DNA 的提取	66
第三部分	食品微生物学检验实验技术	68
实验二十二	空气、食品接触面微生物检验	68
实验二十三	常见食品微生物检验样品的采集与处理	70
实验二十四	食品安全国家标准 食品微生物学检验菌落总数的测定	79
实验二十五	食品安全国家标准 食品微生物学检验大肠菌群计数	82
实验二十六	食品安全国家标准 食品微生物学检验霉菌和酵母计数	86
实验二十七	食品安全国家标准 食品微生物学检验致病菌检验	88
实验二十八	食品用水卫生微生物学检验	113
实验二十九	罐头食品商业无菌的检验	119

实验三十	食品中乳酸菌检验	123
实验三十一	鲜乳中抗生素残留量检验	125
第四部分	食品微生物学应用实验技术	127
实验三十二	小曲质量的测定	127
实验三十三	糖化曲的制备及其活力的测定	129
实验三十四	蛋白酶产生菌的筛选及其活力的测定	132
实验三十五	酱油种曲中米曲霉孢子数及发芽率的测定	135
实验三十六	腐乳制作	138
实验三十七	果酒酿造	140
实验三十八	啤酒酵母的扩大培养及其啤酒发酵实验	142
实验三十九	酒酿中根霉的分离与甜酒酿的制作	145
实验四十	酸奶制作及其乳酸菌活力的测定	147
实验四十一	酱油的酿制	149
实验四十二	醋酸发酵	151
附录		154
附录一	实验常用培养基及制备	154
附录二	常用染色液及试剂的配制	164
参考文献		167

第一部分

微生物学实验准备及检验要求

一、微生物实验准备

(一) 无菌室的准备

在微生物实验中，菌种的移植、接种和分离工作等，都要排除杂菌的污染，才能获得符合要求的微生物纯培养体。为此，除严格按照无菌操作技术进行外，尚需要有一个无杂菌污染的工作环境。通常，学生实验课时可在酒精灯旁进行无菌接种；小规模的操作可以使用无菌箱（接种箱）或超净工作台；工作量大的使用无菌室（接种室）；要求严格的可在无菌室内再结合使用超净工作台。

1. 无菌室的设置

无菌室的设置可因地制宜，但应具备以下基本条件。

(1) 工作室应矮小、平整，面积只需 4m^2 左右，高 $2.2\sim 2.3\text{m}$ ，内部装修应平整、光滑，无凹凸不平或棱角等，四壁及屋顶应用不透水之材质，便于擦洗及杀菌，工作台面应平整、抗热、抗腐蚀便于洗刷。

(2) 室内采光面积大，从室外应能看到室内情况。

(3) 为保证无菌室的洁净，无菌室周围需设缓冲走廊，走廊旁再设缓冲间，其面积可小于无菌室。在向外一侧的玻璃上，安装一个双层的小型玻璃橱窗，便于内外传递物品，减少人员进出无菌室的次数。

(4) 无菌室、缓冲走廊及缓冲间均设有日光灯及供消毒空气用紫外灯，杀菌紫外灯离工作台以 1m 为宜，其电源开关均应设在室外。

(5) 无菌室与缓冲间进出口应设拉门，门与窗平齐，门缝要封紧，两门应错开，以免空气对流造成污染。

2. 无菌室内的设施

(1) 无菌室的里外两间均应安装照明灯和紫外线杀菌灯，吊装在经常工作位置的上方，离地高度 $2\sim 2.2\text{m}$ 。

(2) 缓冲间内应放置隔离用的工作服、鞋、帽、口罩、消毒用药物、手持式喷雾器、废物桶等。无菌室应有接种用的常用器具，如酒精灯、接种环、接种针、不锈钢刀、剪刀、镊子、酒精棉球、铅笔等。

3. 无菌室的杀菌

(1) 紫外线灯照射 在每次工作前后均应打开紫外线灯，分别照射 30min 进行杀菌。忌在紫外线灯开着的情况下进入室内，更不能在开着的紫外线灯下工作。

(2) 熏蒸 先将室内打扫干净，打开气孔和排气窗通风干燥后，重新关闭好再进行熏蒸杀菌。常用的熏蒸药剂为福尔马林（含 $37\%\sim 40\%$ 甲醛的水溶液）。按 $6\sim 10\text{mL}/\text{m}^3$ 的用量

盛于铁制容器中，加半量高锰酸钾，通过氧化作用加热使福尔马林蒸发。熏蒸后应保持密闭12h以上，最好是隔夜。甲醛气体未散尽而要使用无菌室时，则在使用无菌室前1~2h，按所用甲醛溶液量量取氨水，倒入搪瓷盘内，放入无菌室，使其挥发中和甲醛气体的刺激作用。除甲醛外也可用乳酸、硫黄等进行熏蒸杀菌。

(3) 石炭酸液喷雾 在进接种室操作前，用手持喷雾器喷5%石炭酸溶液，主要喷于台面和地面，以防空气微尘飞扬。

4. 无菌室空气污染情况的检验

为了检验无菌室内的无菌程度，应定期检查室内空气无菌状况，细菌和霉菌数应控制在10个以下，发现不符合要求时，应立即彻底消毒灭菌。无菌室无菌程度的测定方法：取营养琼脂平板、改良马丁培养基平板各3个（平板直径均9cm），置无菌室各工作位置上，开盖曝露30min，然后倒置进行培养，测细菌总数应置37℃恒温箱培养48h；测霉菌数则应置28℃恒温箱培养5d。细菌和霉菌总数均不得超过10个。根据检验结果采取措施。无菌室杀菌后使用前检验的结果应是无菌生长。如有霉菌生长则表明室内湿度过大，应通风干燥后再灭菌；如有细菌生长为主时可采用乳酸熏蒸，效果较好。

5. 无菌室的操作规则

(1) 将所用的材料、用品先全部放入无菌室内，以避免在操作过程中进出无菌室或传递物品（如同时放入了培养基则需用牛皮纸遮盖），使用前打开紫外线灯，照射30min后，关闭紫外线灯，过一会儿才能使用。

(2) 进入缓冲间即无菌室前，必须于缓冲间更换消毒过的工作服、工作帽及工作鞋，用2%新洁尔灭（或煤酚皂液）将手浸洗1~2min后，再进入工作间。

(3) 操作前再用酒精棉球擦手，然后严格按无菌操作进行工作。

(4) 接种环、接种针等金属器材使用前后均需灼烧，灼烧时先通过内焰，使残物烘干后再灼烧灭菌，再在近火焰区进行。使用吸管时，切勿用嘴直接吸、吹吸管，而必须用吸管吸球和刻度吸管吸球操作（图1-1）。

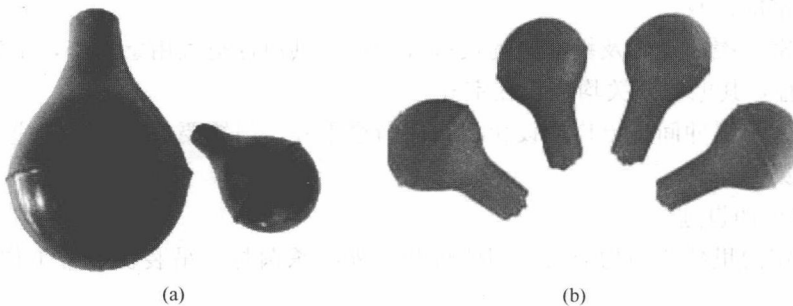


图1-1 吸管吸球 (a) 和刻度吸管吸球 (b)

(5) 工作后应将台面收拾干净，废物丢入废物桶内，取出培养物品及废物桶，用5%石炭酸喷雾，再打开紫外线灯照30min，以保持无菌室的无菌状态。

(二) 玻璃器皿的准备

微生物学实验常用的玻璃器皿，主要有试管、吸管、培养皿、锥形瓶、载玻片，盖玻片等，都需要经过清洗，达到无灰尘、无油垢和无机盐离子等杂质后，才能保证获得正确的实验结果，有的器皿还需经包装、灭菌后方能使用。

1. 洗涤剂的种类及应用

(1) 水 水是最重要的洗涤剂，但只能洗去可溶解于水的沾污物。油、蜡等不溶于水的沾污物则必须用其他方法处理后，再用水洗。对于要求无杂质颗粒或无机盐离子的玻璃器皿，在用清水洗过后，应再用蒸馏水进行漂洗。

(2) 肥皂 肥皂是常用的很好的去污剂。有油污的器皿，通常用湿刷子涂抹一些肥皂后，刷洗器皿，再用水清洗。5%热肥皂水的去油污能力很强。

(3) 洗衣粉 洗衣粉有很强的去污、去油能力。用1%的洗衣粉溶液洗涤玻璃器皿，特别是洗涤带油的载玻片和盖玻片，如果加热煮沸，则有很好的清洁效果。

(4) 去污粉 主要作用是摩擦去污，也有一定的去油污作用。用时先将器皿湿润，再用湿布或湿刷子沾上去污粉擦拭去污垢，然后用清水洗掉去污粉。

(5) 铬酸洗液 称取92g 二水重铬酸钠溶于460mL水中，然后注入800mL硫酸。另一个配方是把1L硫酸注入35mL饱和重铬酸钾溶液中。重铬酸钾（或重铬酸钠）的硫酸溶液，是一种去污能力很强的强氧化剂，常用于玻璃或搪瓷器皿上污垢或有机物的清洗，但不能用于金属器皿。配好的洗涤液可多次使用，每次用完后倒回原瓶中保存，当洗液使用至变绿色后，就失去洗涤能力。使用铬酸洗液时，被洗涤的器皿带水量应少，最好是干的，以免洗液被稀释而降低效率。将洗涤液加热至40~50℃后使用，可以加快作用速度，也可以用重铬酸钾代替重铬酸钠，但前者的溶解度较低。用铬酸洗液洗涤后的容器要用清水充分冲洗，以除去可能存在的铬离子。当器皿上带有大量有机物时，应先将器皿上的有机物尽量清除后，再用洗涤液洗涤，否则洗涤液很快失效。

洗涤液有强腐蚀性，溅在桌椅上，应立即用水水洗并用湿布擦拭，皮肤及衣服上沾有洗涤液时，应立即用水冲洗，然后用苏打（碳酸钠）水或氨液洗去洗涤液。

(6) 浓硫酸与强碱液 器皿上如沾有煤膏、焦油及树脂类物质，可用浓硫酸或40%氢氧化钠溶液浸洗，处理所需时间随所沾物质的性质而定，一般只需5~10min，有的需数小时。

(7) 硫酸及发烟硝酸混合物 适用于特别油污、肮脏的玻璃器皿。

(8) 氢氧化钠（钾）乙醇溶液 把约1L 95%的乙醇加到含120g 氢氧化钠（钾）的120mL水溶液中，就成为一种去污力很强的洗涤剂，玻璃磨口长期暴露在这种洗液中易被损坏。

(9) 有机溶剂 有时洗涤浓重的油脂物质及其他不溶于水也不溶于酸或碱的物质，需要用特定的有机溶剂。常用有机溶剂有汽油、丙酮、酒精、苯、二甲苯及松节油等，可根据具体情况选用。

(10) 高锰酸钾的碱性溶液 少量高锰酸钾溶于100~200g/L的氢氧化钠溶液中。适于洗涤带油污的玻璃器皿，但余留的二氧化锰沉淀物需用盐酸或盐酸加过氧化氢洗去。

(11) 磷酸三钠溶液 将57g磷酸三钠、28g油酸钠（别名十八烯酸钠）溶于470mL水中，为除去玻璃器皿上的碳质残渣，可将器皿在此溶液里浸泡几分钟，然后用刷子除去残渣。100~150g/L的氢氧化钠（钾）溶液也有同样作用。

(12) 10g/L 乙二胺四乙酸（EDTA）的20g/L 氢氧化钠溶液 用此溶液浸泡洗净的玻璃器皿，能除去容器表面吸附的一些微量金属离子。

(13) 盐酸乙醇溶液 1份盐酸和2份乙醇的混合物，用以洗涤有机试剂染色的器皿。

2. 常用玻璃器皿的洗涤方法

洗涤玻璃器皿日常最方便的方法是用肥皂、洗涤剂等以毛刷进行清洗，然后依次用自来

水、蒸馏水淋洗。清洗干净后的玻璃器皿表面，再用蒸馏水淋洗时应器皿内壁的水均匀扩展成一薄层而不现水珠，即为洗涤干净；如果是挂上一个个的小水珠，则表面未清洗干净。对于不使用毛刷清洗或清洗不干净的器皿，可配制上述清洗液进行化学清洗。对分析某些痕量金属所使用的器皿，洗涤后还需要在一定浓度的盐酸、硝酸溶液或含络合剂的溶液中浸泡相当时间，除去表面吸附的金属离子，然后再用蒸馏水淋洗干净。聚乙烯、聚氯乙烯、聚四氟乙烯器皿也可用同样的方式清洗，但要注意塑料制品受热易变形、易被硬物划伤及对许多有机溶剂敏感的特点。目前所有玻璃器皿均可以采用超声波清洗机来清洗，同时洗涤剂除酸性外均可以放入超声波洗涤槽中一起使用，提高洗涤效果。

(1) 新玻璃器皿的洗涤 新购置的玻璃器皿含有游离碱，应用 2% 盐酸溶液浸泡数小时后，再用水冲洗干净。

(2) 用过的玻璃器皿的洗涤 盛过培养基的玻璃器皿，应先将培养物倒入或刮入废物缸中，另行处理。如对人、畜、植物有致病作用的培养物需经煮沸灭菌后再倒去及洗涤。如果器皿内的培养基已经干涸，可将器皿放在水中浸泡数小时或煮沸，将干涸物倒出后再行洗涤。洗涤时可用试管刷或瓶刷，蘸去污垢擦去洗不脱的污垢，或用洗衣粉或肥皂擦洗油脂，最后再用流动的清水清洗干净。经这样洗涤过的器皿，可用来盛培养基和无菌水等。如盛化学药剂（试剂）或用于较精确的实验，则在用自来水冲洗之后，还要用蒸馏水淋洗 3~4 次，烘干备用。

(3) 吸管的洗涤 吸取过一般液体的吸管，用后浸没在盛有清水的容器内，切勿使管内物干燥以免增加洗涤的麻烦。吸过菌液的吸管，应先浸入 5% 石炭酸溶液内，经 5min 以上灭菌后，再浸入清水中；吸过有油脂液体的吸管，应先浸入 10% 氢氧化钠溶液中，浸 1h 以上，再进行清洗，如仍有油脂，则需浸入洗涤液内，浸泡 1h 以后再洗涤。无菌操作所用的吸管，应先用钢针将棉塞取出后再洗涤。吸管洗涤后可倒立于垫有干净纱布的容器中，待水滤干后再用，如急用可放电烤箱内 60~70℃ 烤干备用。

(4) 载玻片及盖玻片的洗涤 新载玻片和盖玻片，应先在 2% 的盐酸溶液中浸泡 1h，后用自来水冲洗，再用蒸馏水洗 2~3 次，也可用 1% 的洗衣粉液洗涤。用洗衣粉洗涤时应先将洗衣粉液煮沸，后将玻片散开放入煮沸液中，持续煮沸 10~15min（勿使玻片露出液面以防钙化变质）。冷却后用自来水冲洗，再用蒸馏水淋洗 2~3 次。如用洗衣粉液洗涤新玻片时则只能在煮沸的洗衣粉中保持 1min，待泡沫平下后再煮沸 1min，如此反复 2~3 次（煮沸时间过长，会使玻片钙化、易碎），冷却后再用自来水冲洗，蒸馏水淋洗。

用过的玻片，洗涤方法同上，但应先擦去表面油垢后再用洗衣粉液煮，煮沸的时间以 30min 为好，其余处理同上法。洗涤后的载、盖玻片，可以烘干或晒干后放在干净的容器内或用干净纱布包好备用。

3. 玻璃器皿灭菌的包装

在微生物学工作中需要无菌的玻璃器皿，如无菌吸管、无菌培养皿等。这些玻璃器皿在灭菌之前需要进行隔离包装，常用的包装方法如下。

(1) 培养皿的包装 洗净干燥后的培养皿，可放在特制的金属容器中灭菌，或可按 6~10 套培养皿为一组，用旧报纸卷起来，将两端封严，再进行灭菌。

(2) 吸管的包装 无菌操作用的吸管经洗净干燥后，首先在吸管上端的管口内塞棉花，作为隔离及过滤杂菌之用。棉花柱长度不少于 1cm，一般用脱脂棉为宜，用量根据吸管口径大小而定，以塞得不紧不松为宜，棉花不能弄湿，以免影响空气的流通和滤菌效果。塞好棉

塞后用纸条卷起包好(见图 1-2),先将牛皮纸裁成 5cm 宽的长纸条,再从吸管尖端开始封住后卷起,卷至吸管上端约 3~4cm 处即可,留一小段露在纸卷外,可用糨糊将纸粘住。注意不要卷得太紧,以免使用时不易抽出;也可将吸管顶端完全包住,再将纸卷末端折回固定。也可用金属制成的专用圆筒,将塞好棉花柱的吸管成批放入,吸管上端向外,盖好筒盖,经灭菌后随时抽用,较方便。

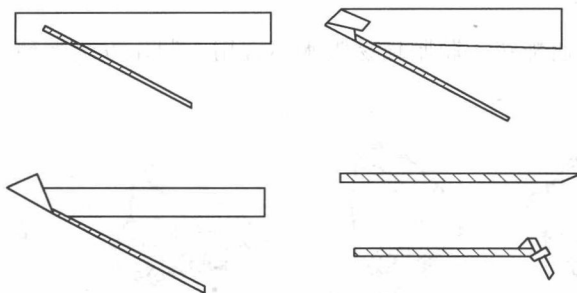


图 1-2 吸管的包装方法和步骤

4. 玻璃器皿干热灭菌

通过使用干燥热空气去杀灭微生物的方法称为干热灭菌。玻璃器具(如吸管及培养皿等)、金属用具等凡不适于其他方法灭菌而又能耐高温的物品都可以用此法灭菌,而培养基、橡胶制品、塑料制品等都不能用干热灭菌。

干热灭菌的方式,一般是把待灭菌的物品包装就绪后,放入电烘箱中烘烤,即加热到 160~170℃,维持 1.5~2h。

玻璃器皿如培养皿、吸管等在灭菌前应洗净、晾干(一定注意干燥,如有水滴,灭菌时易炸裂)并包装得当。

使用电烘箱干热灭菌时应注意以下问题:

(1) 灭菌物品在箱内不能堆放太满,一般不要超过总容量的 2/3,灭菌物之间应留有一定空隙。

(2) 灭菌物品不能直接放在烘箱的底板上,即使需要放得很低,也要用铁筐子架起。灭菌物品的包装物,如纸、棉花或纱布等,不能接触到烘箱内壁的铁板,因为铁板温度一般高于箱内空气温度,容易烘焦着火。

(3) 升温时或灭菌物品有水分需要迅速蒸发时,可打开进气孔和排气孔,待达到所需温度(如 165℃)后,将进气孔和排气孔关闭,使箱内温度一致。

(4) 灭菌温度超过 170℃,包装纸就将变黄,超过 180℃,纸或棉花等就会烤焦至燃烧。如因不慎或其他原因烘箱内发生纸或棉花烤焦或燃烧的事故时,应立即先关闭电源,将进气孔、排气孔关闭,令其自行降温到 60℃以下后,才能打开箱门进行处理,切勿在未断电源前打开箱门或排气孔,以免促进燃烧造成更大事故。

(5) 正常情况下,灭菌完毕,让其自然降温到 100℃以后,打开排气孔促使降温,降到 60℃以下时(视室温而定)再打开箱门取出灭菌物品,以免骤然降温使玻璃器具爆破。

(6) 如果干燥箱配有数控程序的,只需按照上述要求设定温度和时间,灭菌时间到等待温度降到 60℃以下即可。

(三) 棉塞的制作技术

1. 棉塞的作用和要求

一般情况下，培养微生物用的试管和锥形瓶口均需加棉塞。其作用是既要保持空气的流通，以保证供应微生物生长所需的氧气，又要滤除空气中的杂菌，避免污染。

制作棉塞的基本要求是：松紧适度，太紧影响通气，太松则影响过滤除菌的效果。插入的部分长度要恰当，一般为容器口径的 1.5 倍，过短则易脱落。外露部分应略微粗大些，且比较整齐硬实，便于握取。

2. 棉塞的制作方法

制作棉塞应采用普通棉花，脱脂棉易吸水不宜用。制作方法多种多样，下面仅介绍一种作参考（见图 1-3）。

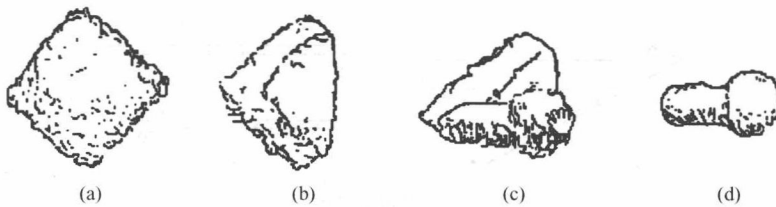


图 1-3 棉塞的制作方法

根据所做棉塞的大小，选取一块棉花，铺平成正方形，把一角的两边各叠进一段，使其叠齐加厚。按住另一角边把棉花卷起来，卷时两手紧捏中间部分，两头不要卷得太紧，卷成棉卷后，从中间折起并拢，插入试管或锥形瓶中，深度如要求中所述。新做的棉塞弹性比较大，不易定形。插在容器上经过一次加压蒸汽灭菌后形状和大小便基本可固定。为了便于无菌操作，减少棉塞的污染概率、延长棉塞的使用时间，可在棉塞外面包上 1~2 层纱布，并用棉线扎住纱布断口。

（四）接种用具及其制作

1. 接种环

量取约 10cm 长的镍铬丝（500W 的电炉丝也可），将其一端弯成一个直径为 2mm 左右的小圆环，另一端插入接种棒或空心玻棒中卡紧即为接种环。所做成的接种环，其前端之圆环要求圆而封口且与接种环柄在同一平面上，这样便于在培养基上划线、挑取菌种和使液体在环内形成水膜。

2. 接种针

量取约 9cm 长的镍铬丝将其拉直，搓成针一样，再将镍铬丝的一端插入接种棒中即成接种针。所制的接种针要直，才便于对固体深层培养基进行穿刺接种。

3. 接种圈

将镍铬丝的末端卷成若干圈使之成盘状，另一端插入接种棒中即成。此用具较适宜于从砂土管内移取菌种时使用。

4. 接种钩

将镍铬丝的末端 3~4mm 处横折 90° 即成。可供挑取菌丝进行移植时使用。

5. 接种铲

可用单车轮上的钢丝条，将其一端砸扁至呈平铲状，另一端套橡皮管作棒柄。

6. 玻璃刮铲

用一段长约 30cm、直径 5~6mm 的玻璃棒，在喷灯火焰上把一端变成“了”形或“丿”形，或按弯端的平面略向下。在与平板接触的一侧，要求平直光滑，使平皿内的琼脂表面不

受损伤，并能涂布均匀。此种工具用于稀释涂抹法在琼脂平板上进行菌种分离或微生物计数时，将放在平板表面的菌悬液涂布均匀。

以上接种工具见图 1-4。

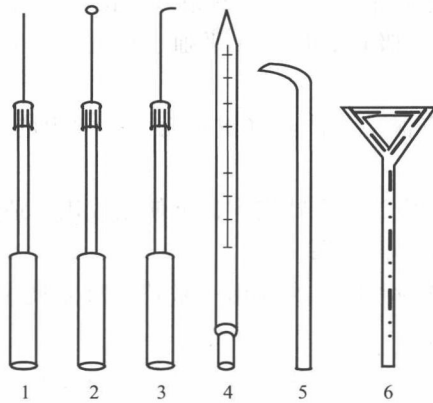


图 1-4 接种工具

1—接种针；2—接种环；3—接种钩；4—吸管；5、6—玻璃刮铲

二、食品微生物检验要求

(一) 实验室基本要求

1. 环境

- (1) 实验室环境不应影响检验结果准确性。
- (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 (局部百级)] 进行，洁净区域应用明显的标识。
- (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) 中进行。

2. 人员

- (1) 检验人员应具有相应的教育、微生物专业培训经历，具有相应的资历，能够理解并正确实施检验 (指上岗工作人员)。
- (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。

3. 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能监控记录和使用记录。

4. 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使用或用合适的材料(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。

5. 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(如血清、抗生素等)应进行适用性验证。

6. 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。

(二) 样品的采集

1. 采样原则

(1) 根据检验目的、食品特点、批量、检验方法、微生物的危害程度等确定采样方案。

(2) 应采用随机原则进行采样,确保所采集的样品具有代表性。

(3) 采样过程遵循无菌操作程序,防止一切可能的外来污染。

(4) 样品在保存和运输过程中,应采用必要的措施防止样品中原有微生物的数量变化,保持样品的原有状态。

2. 采集方案

(1) 类型 分为二级和三级采样方案。二级采样方案设有 n 、 c 和 m 值,三级采样方案设有 n 、 c 、 m 和 M 值。

n : 同一批次产品应采集的样品数;

c : 最大可允许超出 m 值的样品数;

m : 微生物指标可接受水平的限量值;

M : 微生物指标的最高安全限量值。

注: 1. 按照二级采样方案设定的指标, 在 n 个样品中, 允许有 $\leq c$ 个样品其相应微生物指标检验值大于 m 值。菌落计数以菌落形成单位 (colony forming units, CFU) 表示。

2. 按照三级采样方案设定的指标, 在 n 个样品中, 允许全部样品中相应微生物指标检验值小于或等于 m 值; 允许有 $\leq c$ 个样品其相应微生物指标检验值在 m 值和 M 值之间; 不允许有样品相应微生物指标检验值大于 M 值。

例如: $n=5$, $c=2$, $m=100\text{CFU/g}$, $M=1000\text{CFU/g}$, 含义是从一批产品中采集 5 个样品, 若 5 个样品的检验结果均小于或等于 m 值 ($\leq 100\text{CFU/g}$), 则这种情况是允许的; 若 ≤ 2 个样品的结果 (X) 位于 m 值和 M 值之间 ($100\text{CFU/g} < X \leq 1000\text{CFU/g}$), 则这种情况也是允许的; 若有 3 个及以上样品的检验结果位于 m 值和 M 值之间, 则这种情况是不允许的; 若有任一样品的检验结果大于 M 值 ($> 1000\text{CFU/g}$), 则这种情况也是不允许的。

(2) 各类食品的采样方案 按相应产品标准中的规定执行。

(3) 食源性疾病及食品安全事件中食品样品的采集

① 由工业化批量生产加工的食品污染导致的食源性疾病或食品安全事件, 食品样品的采集和判断原则按“2. 采集方案”下 (1) 和 (2) 执行。同时, 确保采集现场剩余食品样品。

② 由餐饮单位或家庭烹调加工的食品导致的食源性疾病或食品安全事件, 食品样品的采集按 GB 14938 中安全学检验的要求执行。

3. 各类食品的采样方法

采样应遵循无菌操作程序, 采样工具和容器应无菌、干燥、防漏, 形状及大小适宜。

(1) 即食类预包装食品 取相同批次的最小零售原包装, 检验前要保持包装的完整, 避免污染。

(2) 非即食类预包装食品 原包装小于 500g 的固态食品或小于 500mL 的液态食品, 取相同批次的最小零售原包装; 大于 500mL 的液态食品, 应在采样前摇动或用无菌棒搅拌液体, 使其达到均质后分别从相同批次的 n 个容器中采集 5 倍或以上检验单位的样品; 大于 500g 的固态食品, 应用无菌采样器从同一包装的几个不同部位分别采取适量样品, 放入同一个无菌采样容器内, 采样总量应满足微生物指标检验的要求。

(3) 散装食品或现场制作食品 根据不同食品的种类和状态及相应检验方法中规定的检验单位, 用无菌采样器现场采样 5 倍或以上检验单位的样品, 放入无菌采样容器内, 采样总量应满足微生物检验的要求。

(4) 食源性疾病及食品安全事件的食品样品 采样量应满足食源性疾病诊断和食品安全事件病因判定的检验要求。

4. 采集样品的标记

应对采集的样品进行及时、准确的记录和标记, 采样人应清晰填写采样单 (包括采样的人、地点、时间, 样品名称、来源、批号、数量、保存条件等信息)。

5. 采集样品的贮存和运输

采样后, 应将样品在接近原有贮存温度条件下尽快送往实验室检验。运输时应保持样品完整。如不能及时运送, 应在接近原有贮存温度条件下贮存。

(三) 样品检验

1. 样品处理

(1) 实验室接到送检样品后, 应认真核对登记, 确保样品的相关信息完整并符合检验

要求。

(2) 实验室应按要求尽快检验。若不能及时检验,应采取必要的措施保持样品的原有状态,防止样品中目标微生物因客观条件的干扰而发生变化。

(3) 冷冻食品应在 45℃ 以下不超过 15min,或在 2~5℃ 不超过 18h 解冻后进行检验。

2. 检验方法的选择

(1) 应选择现行有效的国家标准方法。

(2) 食品微生物检验方法标准中对同一检验项目有两个及两个以上定性检验方法时,应以常规培养方法为基准方法。

(3) 食品微生物检验方法标准中对同一检验项目有两个及两个以上定量检验方法时,应以平板计数法为基准方法。

(四) 生物安全与质量控制

1. 实验室生物安全要求

应符合 GB 19489 的规定。实验室的生物安全条件和状态不低于容许水平,可避免实验室人员、来访人员、社区及环境受到不可接受的损害,符合相关法规、标准等对实验室生物安全责任的要求。

2. 质量控制

(1) 实验室应定期对实验用菌株、培养基、试剂等设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

(2) 实验室应对重要的检验设备(特别是自动化检验仪器)设置仪器比对。

(3) 实验室应定期对实验人员进行技术考核和人员比对。

(五) 实验记录与报告

1. 记录

检验过程中应即时、准确地记录观察到的现象、结果和数据等信息。

2. 报告

实验室应按照检验方法中规定的要求,准确、客观地报告每一项检验结果。

(六) 检验后样品的处理

(1) 检验结果报告后,被检样品方能处理。检出致病菌的样品要经过无害化处理。

(2) 检验结果报告后,剩余样品或同批样品不进行微生物项目的复检。