

食品微生物学检验方法

美国公职分析化学家协会官方
分析方法 (AOAC)

Sidney Williams 主编

Wallace H. Andrews 协助编辑

何镜承 吴仲梁 李桂生 等译

吕宝有 审校

中国进出口商品检验技术研究所

一九八五年八月

食品微生物学检验方法

Sidney Williams 主编

译者

(按章、节先后顺序)

李朝伟	张宗显	石玉屏	李桂生
吴仲梁	李慧珠	王宝根	何镜承
谢才璋	招为国	吕宝有	王 丽
何秀兰	方小东		

审校者

吕 宝 有

审校者的话

食品卫生微生物学检验方法在食品进出口贸易中，各国的规定不同，但是许多国家，特别是食品进口国，多数采用美国公职分析化学家协会的官方分析方法（AOAC）。

鉴于对外贸易中商品检验工作的需要，了解国际上进口食品国的食品卫生微生物学检验方法是必要的。现将 Sidney Williams 氏 1984 年修订的 AOAC 第十四版（最新版本）第 46 章微生物学检验方法部分全文译成中文出版。可供从事食品卫生微生物学检验人员，进出口商品食品卫生检验人员，教学、科研及卫生防疫工作者参改。

本书内容有蛋与蛋制品的微生物学检验方法，冷冻、冷藏、予制或加工食品的微生物学检验方法，食品的商业无菌微生物学检验方法，梭状芽孢杆菌检验方法，芽孢杆菌检验方法，沙门氏菌检验方法，葡萄球菌检验方法和体细胞检验方法等。

水平所限，书中难免有误，敬请读者随时批评指正。

吕宝有

1985.8.14.

46. 微生物学检验方法

(制备培养基时, 使用蒸馏水或去离子 usp XX 纯水, 不得发现有可溶性痕量金属元素, 细菌或抑制剂, 除非有特殊规定, 一般使用脱水盐类)。

交叉参考目录

46.001 食品检验方法

牛肉, 碎牛肉

病毒 46.188

糖果和糖果涂料

沙门氏菌 46.132

椰子果

沙氏门菌 46.132

蛋和蛋制品

大肠菌群 46.009

直接镜检计数 46.012

霉菌 46.011

平板计数

标准平板计数 46.008

螺旋平板计数 46.181—46.187

沙门氏菌	
培养法	46.117
荧光抗体法 (FA)	46.132
溶血性葡萄球菌	46.010
链球菌	46.010
鱼粉	
沙门氏菌	46.132
低酸罐头食品	
商业无菌	46.063—46.070 46.071—46.077
冷藏、冷冻、予煮或加工食品和食品配料	
需氧平板计数	
标准平板计数	46.015
螺旋平板计数	46.181—46.187
大肠菌群	46.016, 46.030—46.034
大肠杆菌	46.016, 46.030—46.034, 46.035— 46.048, 46.049—46.061
沙门氏菌: 荧光抗体法	46.132
凝固酶阳性金黄色葡萄球菌	
试管培养法	46.062
表面平板法	46.136—46.137
爆发性食物中毒食品 (Foods, outbreak)	
肉毒梭菌及其毒素	46.083—46.091
产气荚膜梭状芽孢杆菌	
(韦氏梭状芽孢杆菌)	46.092—46.097
α -毒素	46.098—46.105

金黄色葡萄球菌	46.062, 46.136—46.137
葡萄球菌肠毒素	46.138—46.146
田鸡腿	
沙门氏菌	46.132
大蒜粉	
沙门氏菌	46.117
肉和肉制品	
沙门氏菌	46.132
液体乳	
体细胞计数	46.152—46.180
干乳制品	
沙门氏菌	
培养法	46.117
荧光抗体法 (FA)	46.132
坚果仁	
需氧平板计数	
标准平板计数	46.015
螺旋平板计数	46.181—46.187
大肠菌群	46.016
大肠杆菌	46.016
洋葱粉	
沙门氏菌	46.117
糖	
嗜热细菌芽孢	46.078—46.082
酵母	
干活酵母	

沙门氏菌	46.117
干死酵母	
沙门氏菌	46.132
46.002 微生物检验方法	
细菌	
低酸罐头食品	46.071—46.077
肉毒梭状芽孢杆菌	
加工食品和罐头食品	46.083—46.091
产气荚膜梭状芽孢杆菌（韦氏梭状芽孢杆菌）	
冷藏、冷冻、予煮食品或加工食品	46.092—46.097
大肠菌群	
蛋和蛋制品	46.009
冷藏、冷冻、予煮食品或加工食品	46.016, 46.030—46.034
坚果仁	46.016
贝类生长用水	46.017—46.019
大肠杆菌	
冷藏、冷冻、予煮食品或加工食品	46.016, 46.030—46.034, 46.035—46.048,
	46.020—46.029
鼠肾细胞与乳鼠试验	46.049—46.061
坚果仁	46.016
贝类生长用水	46.017—46.019
霉菌	
蛋与蛋制品	46.011

沙门氏菌	
糖果和糖果涂料	46.132
椰子果	46.132
蛋和蛋制品	46.117, 46.132
鱼粉	46.132
田鸡腿	46.132
大蒜粉	46.117
肉和肉制品	46.132
干乳制品	46.117, 46.132
洋葱粉	46.117
干酵母	
活酵母	46.117
死酵母	46.132
体细胞	
液体乳	46.152
溶血性葡萄球菌	
蛋和蛋制品	46.010
金黄色葡萄球菌	
凝固酶阳性	46.136
冷藏、冷冻、予煮食品或加工食品	46.062, 46.137
链球菌	
蛋和蛋制品	46.010
嗜热细菌芽孢	
糖	46.078—46.082
病毒	

碎牛肉

46.188—46.190

蛋 和 蛋 制 品

蛋和蛋制品微生物学检验的取样方法

正 式 规 定

(为进一步研究培养技术中所获得的微生物, 应与美国公共卫生协会 (APHA) 食品微生物学方法学会/办事处, Manrin L. Speck, 1976, 主编的《食品微生物学检验方法提要》为指南)

46.003 设 备

(a) 液蛋——取样管或取样铲, 灭菌密封的样品容器 [品脱 (500 ml) 陶瓷瓶或摩盖铁听最实用]、酒精、酒精灯或其它的灯, 脱脂棉, 抹布或毛巾, 以及水槽。

(b) 冰蛋——电动(高速)钻或手摇钻, 钻头 (1×16吋, 锤子和钢条 (12×2×0.25吋), 或其它开听工具: 取样匙, 斧或凿, 予冷的灭菌容器等, 如(a)。

(c) 干蛋——粮谷采样器, 长度足以达到要取样的容器底部。清洁密封的样品容器 (品脱 (500 ml) 陶瓷瓶或纸板盒), 抹布或毛巾, 以及取样匙。

46.004 方 法

从成批约有代表性编号容器中取样, 17.001。用酒精棉擦拭取样管或取样铲, 钻头, 取样匙和斧, 然后在酒精灯或其它灯上烧灼灭菌。取样与取样之间, 充分洗净用具, 干燥并重新灭菌。所有的容器尽可能在无菌的条件下打开和取样。

(a) 液蛋——用无菌取样管或取样铲充分混合容器中的内容物, 取约 400ml (0.75品脱) 至灭菌样品容器内。样品在 5℃ 以下保存, 但避免冻结。观测和对各取样容器的气味作正常, 不正常, 次品或发霉记录。

(b) 冰蛋——用灭菌斧或凿去除蛋的顶层, 从容器的顶部至底部打三个钻芯: 第一个钻芯在中央, 第二个在中央与边缘之间, 第三个邻近容器的边缘。用灭菌采样匙将钻屑移至样品容器内。取完细菌样品之后, 打第四个钻孔, 在开口处对产品气味作感官检查。(由于电钻产生热, 使蛋原料的气味变浓, 有利于感官检查) 对气味作正常, 不正常, 次品或发霉记录。如需推迟检验或取样地点距实验室有一定距离, 则用干冰或其它适合的致冷剂冷藏样品。

(c) 干蛋——对于小包装, 取整包或数包作为样品, 对于箱装的和桶装的, 用灭菌匙或其它的灭菌用具去除上层, 以灭菌取样器移开三个或三个以上的钻芯, 如 (b)。(样品应当包括约 400 ml (0.75 品脱) 用灭菌匙或其它合适的工具, 无菌操作将样芯移至样品容器内。样品冷藏或置荫凉处保存。

参考: JAOAC 22, 625 (1939)。

蛋和蛋制品微生物学检验用培养基方法

正 式 规 定

46.005 培养基标准方法

(a) 稀释用水——制备储备溶液：溶解 KH_2PO_4 34g 于 500 ml 水中，用 1 N NaOH (约 175 ml) 调至 pH 7.2，再用水稀释至 1 L。制备稀释用缓冲 H_2O ：用煮沸而冷却的 H_2O 将 1.25 ml 储备液稀释至 1 L。121℃ 高压灭菌 15 分钟。

(b) 缓冲葡萄糖肉汤(MR-VP 培养基)——作 MP-VP 试验用。溶解胨 7.0g, 葡萄糖 5.0g 和 K_2HPO_4 5.0g 于约 800 ml 水中，轻微加热不时搅拌、过滤，冷至 20℃，稀释至 1L。分装试管各 10ml，121℃ 高压灭菌 12—15 分钟。加热最长不超过 30 分钟，最终 pH 6.9 ± 0.2 。

(c) 远藤 (Endo) 氏培养基——将 K_2HPO_4 3.5g, 蛋白胨 10.0g, 琼脂 20.0g 和乳糖 10.0g 悬于 1 L 水内，煮沸使溶解，加水至原体积，必要时，过滤，分装各 100ml，在 121℃ 高压灭菌 15 分钟，最终 pH 7.4 ± 0.1 。使用前融化，加入 Na_2SO_3 0.25g 和过滤的 5% 碱性复红酒精溶液 1.0ml。

(d) 伊红美兰琼脂 (Levine)——溶解蛋白胨 10.0g, K_2HPO_4 2.0g 和琼脂 15.0g 于 1 L 水中，煮沸使溶解，加水至原体积。分装各 100 或 200ml，121℃ 高压灭菌 15 分钟，最终 pH 7.1 ± 0.1 。使用前融化，于每 100ml 内加入无菌的

20%乳糖溶液 5.0 ml, 2%伊红 Y 水溶液 2.0 ml 和 0.5%美兰水溶液 1.3 ml。

(e) Koser 氏柠檬酸盐肉汤——溶解 $\text{NaNH}_2\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.5g, K_2HPO_4 1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g 及柠檬酸钠 (含 2 分子水) 3.0g 于 1 L 水中, 分装试管各 10 ml。121℃ 高压灭菌 15 分钟, 最终 pH 6.7 ± 0.1 。

(f) 乳糖肉汤——在水浴上搅拌溶解牛肉膏 3.0g, 多价胨或蛋白胨 5.0g 于 1 L 水中, 加入乳糖 5.0g, 分装于发酵试管内, 121℃ 高压灭菌 15 分钟, 加热最长不超过 30 分钟, 最终 pH 6.7 ± 0.2 。

(g) 平板计数琼脂 (胰酪葡萄糖酵母琼脂) ——将胰酪 (酪蛋白胰酶消化物) 5.0g, 酵母膏 2.5g, 葡萄糖 1.0g 和琼脂 15.0g 悬于 1 L 水内, 加热并煮沸使全部成份溶解, 121℃ 高压灭菌 15 分钟, 最终 pH 7.0 ± 0.1 。

(h) 色氨酸肉汤——搅拌加热溶解胰酪或胰酪胨 10.0g 于 1 L 水中, 分装试管各 5 ml, 121℃ 高压灭菌 15 分钟, 最终 pH 6.9 ± 0.2 。

46.006 其它培养基

(a) 麦芽糖琼脂——煮沸溶解麦芽浸膏 (Difco) 30.0g 和琼脂 15.0g 于 1 L 水中, 121℃ 高压灭菌 15 分钟。临用前融化麦芽糖琼脂, 以 85% 的乳酸酸化至 pH 3.5, 加入酸后培养基不再加热。

(b) 乳蛋白水解物葡萄糖琼脂——BBL 脱水培养基或用乳蛋白水解物 9.0g, 葡萄糖 1g, 琼脂 15g 和 1 L 水制备。调至 pH 7.0, 121℃ 高压灭菌 15 分钟, 冷至室温。如果需

要，再调至 pH 7.0。

(c) 生理盐水溶液——溶解 NaCl 8.5g 于 1 L 水中，121℃高压灭菌 15 分钟，冷至室温。

(d) 小牛肉浸液琼脂——将磨碎的小牛瘦肉 500g 与 1 L 水混合，在冰箱内浸渍过夜，不加压用粗布过滤，用水稀释至原体积，撇除滤液表面的脂肪，阿诺氏蒸汽灭菌 30 分钟，通过滤纸过滤。加入蛋白胨 (Difco) 10.0 g，NaCl 5.0g 和琼脂 15.0 g。在阿诺氏灭菌器内蒸至各成份溶解，调至 pH 7.6 经阿诺氏蒸汽灭菌 15 分钟，通过布氏漏斗，用纸浆垫减压过滤。（需要时，可用蛋白净化。在调整 pH 之前和冷至 50℃ 之后，将一个新鲜蛋白预先加入 50 ml 培养基内，再一并加入 1 L 培养基内或于 1 L 培养基内加入相当的干蛋白 (1.5g)，充分振荡，确保蛋白溶解，静置 20 分钟，置阿诺氏灭菌器内加热 15 分钟，使蛋白凝固，用力振荡和再加热，过滤，调至 pH 6.7，阿诺氏蒸汽灭菌 15 分钟，过滤。）

分装试管各 10 ml 或装入瓶内各 80 ml，121℃高压灭菌 20 分钟，最终 pH 7.4。

作溶血试验用：将融化的琼脂冷至 45℃，倾注平板前加入 5% 脱纤维马血、羊血或兔血 (0.5ml 血/10ml 培养基)。

张宗显 译

吕宝有 校

蛋与蛋制品微生物学检验方法

正 式 规 定

46.007 样品的制备

(a) 液蛋——用灭菌匙或灭菌搅拌机充分混合样品，以无菌操作称取 11.0g 蛋原料于灭菌玻塞广口瓶或螺盖瓶内；加入 99 ml 无菌稀释 H_2O ，46.005 (a) 或灭菌生理盐水溶液，46.006(c) 及一汤匙灭菌玻璃珠，制备 1:10 稀释液。充分摇动 1:10 稀释液，确保稀释剂内的蛋原料完全溶解分布均匀，其方法是：快速摇动各容器 25 次，每次摇动时上下移动约 30 cm 距离，间隔时间不超过 7 秒。放出气泡，如果需要，取 1:10 稀释液的具有代表性部份，作成较高序列的稀释液。按 46.008~46.012(a) 进行。为了避免微生物增殖或死亡，在第一稀释液制备后 15 分钟内倾注所有平板和接种其它的培养基。

(b) 冰蛋——为了避免样品中微生物增加和防止微生物被破坏，在低温下尽可能快地解冻蛋原料 ($\leq 45^{\circ}C$ ； ≤ 15 分钟)。(时常转动振荡样品容器，帮助冰冻原料溶解，可使用水浴或细菌学培养箱维持解冻温度) 按 (a) 进行。

(c) 干蛋——用灭菌匙或灭菌刮刀充分混合样品，制备 1:10 稀释液如 (a)。如果原料较难溶解(储备样品)，以 0.1N 的 LiOH 作稀释剂，制备序列稀释液如 (a) 并按 46.008—46.012(b) 进行。

46.008 平板计数

用各相应的稀释液 1 ml 接种一组平板, 以予先冷至 42—45℃ 的胰酪葡萄糖酵母琼脂或乳蛋白水溶解物葡萄糖琼脂倾注平板, 接种的平板置 32℃ 培养 3 天。如有 Quebec 菌落计数器计数平板, 以活细菌数/g 表示蛋原料最终结果。

46.009 大肠菌群的出现率

(a) 接种 1.0 ml 蛋原料的相应稀释液于乳糖肉汤发酵管内, 置 35℃ 培养 24—48 小时, 将所有产气乳糖肉汤培养物划线于伊红美兰平板或远藤氏平板, 置 35℃ 培养 24—48 小时, 检查鉴别培养基上的大肠菌群菌落。根据鉴别培养基上确证为阳性的最高稀释液的倒数, 记录大肠菌群细菌数/g 蛋原料。

(b) 生物化学反应 (任选的) —— 将出现在鉴别琼脂平板上的大肠菌群型的菌落接种于琼脂斜面, 46.005(g) 或 46.006(b), 置 35℃ 培养 24 小时。进一步研究, 要用纯培养物。用获得符合 IMViC 反应的纯培养物, 做下列试验:

Kovacs 试验 (产生吲哚)。46.016(a);

在甲基红指示剂中产生酸, 46.016(b);

产生乙酰甲基甲醇, 46.016(b);

Koser 柠檬酸钠试验 (利用柠檬酸钠为唯一的碳源), 46.016(c)。

注: 遵照华盛顿, DC 20036, 西北第十八街, 1015, 美国公共卫生协会《水和废水标准检验方法》1976年第十四版推荐的生物化学反

应方法。

46.010 溶血性葡萄球菌和溶血性链球菌的发现率——方法

接种 1 ml 样品的适当稀释液于平皿内，用含有 5% 脱纤维马血，羊血或兔血的小牛肉浸液琼脂倾注平板（每 10 ml 培养基含 0.5 ml 血）。琼脂被冷至 45℃，倾注平板前加入血。将平板置 35℃ 培养 24 小时。取具代表性的菌落涂片，革兰氏染色和用显微镜检查，以确证球形菌的存在。最终结果以个数/g 表示。

46.011 真菌试验——程序

接种 1 ml 样品的相应稀释液于平皿内，以予先冷至 42—45℃ 的麦芽糖琼脂，46.006(a) 倾注平板。将平板置 20℃ 培养 5 天，如无 20℃ 培养箱，在室温下培养 5 天。最终结果以霉菌数/g 表示蛋原料。镜检革兰氏染色的涂片，确证酵母菌的菌落。

46.012 显微镜直接计数

North 苯胺油——美兰染色——将苯胺油 3.0 ml 和酒精 10.0 ml 混合，缓缓加入盐酸 1.5 ml 中，不断搅拌。再加入饱和美兰酒精溶液 30.0 ml，用水稀释至 100.0 ml，过滤。

(a) 液蛋和冰蛋——于清洁，干燥的载玻片上，放 0.01 ml 未稀释的蛋原料，在 2 cm² 面积上涂布（建议为圆形面积，直径 1.6 cm）。让涂片在 35—40℃ 水平表面上干燥，浸