

国外优秀食品科学与工程专业教材

食品微生物学 实验指导

[美] Lynne McLandsborough 著

张柏林 等译

Food Microbiology Laboratory

 中国轻工业出版社

国外优秀食品科学与工程专业教材

食品微生物学实验指导

[美] Lynne McLandsborough 著

张柏林 等译

 中国轻工业出版社

图书在版编目(CIP)数据

食品微生物学实验指导/(美)麦克兰德博拉夫(McLand -
sborough, L.)著;张柏林等译. —北京:中国轻工业出版社,
2007.4

国外优秀食品科学与工程专业教材

ISBN 978 - 7 - 5019 - 5789 - 7

I. 食… II. ①麦…②张… III. 食品微生物 - 微生物学 -
实验 - 高等学校 - 教材 IV. TS201.3 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 156497 号

Authorized translation from English language edition published by
CRC Press, part of Taylor & Francis Group LLC.

策划编辑:伊双双 李亦兵

责任编辑:伊双双

责任终审:劳国强

封面设计:水长流文化

版式设计:马金路

责任校对:郎静瀛

责任监印:胡兵 张可

出版发行:中国轻工业出版社(北京东长安街6号,邮编:100740)

印 刷:北京宝莲鸿图科技有限公司

经 销:各地新华书店

版 次:2007年4月第1版第1次印刷

开 本:787×1092 1/16 印张:11.25

字 数:259千字

书 号:ISBN 978 - 7 - 5019 - 5789 - 7/TS · 3369 定价:25.00元

著作权合同登记 图字:01 - 2006 - 4753

读者服务部邮购热线电话:010 - 65241695 85111729 传真:85111730

发行电话:010 - 85119845 65128898 传真:85113293

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社读者服务部联系调换

60445J4X101ZYW

译者序

食品在加工、保藏、运输和销售等环节中存在许多微生物学问题,微生物实验技术显然是食品微生物学的重要组成部分。然而,近年来,作为专业基础知识的微生物学理论和实验手段也在不断改进和提高,像免疫学和分子生物学等技术手段正快速渗透到食品微生物的教学和实验中来。因此,逐步引进和翻译国外优秀的食品微生物学实验指导教材显然是必要的。

本书作者 Lynne McLandsborough 博士在马萨诸塞州立大学食品科学系工作,长期承担食品科学专业“食品微生物学”以及营养专业“食品操作卫生学”等课程的教学和实验工作,有着丰富的教学经验。本书是作者在 8 年的教学过程中逐步形成的,由 18 个独立的实验构成,可与《食品微生物学》教材配套使用,既包含食物样品中传统的微生物计数方法,同时也涵盖了食品工业中的现代“快速检测”技术。它强调了食品微生物学的基本概念,重点涉及了各类食品中大肠杆菌(*E. coli*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)和沙门氏菌(*Salmonella*)等重要食品病原菌的检测技术以及如何运用 PCR 技术来快速检测单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)等内容。

本书具有以下几个特点:①向学生阐述这些经仔细设计和学生证实的实验内容的逻辑关系;②书中引入了美国食品与药物管理局(FDA)《细菌学分析手册》(*Bacteriological Analytical Manual*)中的检测方法;③包含快速的检测方法以及常规的检测技术;④可以作为一个学期的实验教材使用。另外,书中罗列的所有参数以及操作程序都进行了优化,以确保每一项实验都能顺利完成。因此,本书适合从事食品专业的教师、学生以及食品行业相关技术人员作为参考,相信这本实验指导书的出版对于促进国内食品微生物学的教学实践工作会有很大的裨益。

受中国轻工业出版社的委托,我们组织相关院校从事食品微生物学教学和实践工作的人员翻译编写了此书,各章节翻译人员如下:王立平(实验 1、实验 2 和实验 5),吴荣荣(实验 3 和实验 14),崔建超(实验 4),高莉莉(实验 6 和实验 7),郭佳(实验 8 和实验 9),欧阳杰(实验 13 和实验 15),许美玉(实验 11 和实验 12),裴家伟和吴风亮(实验 10),张柏林和韩俊华(实验 16、实验 17 和实验 18)。全书由张柏林教授负责统稿和

审校。

中国轻工业出版社伊双双编辑在本书翻译过程中提出了许多宝贵的建议,为本书的出版付出了大量心血,对此深表谢意。

限于作者水平,译文中的任何错误,缘于译者的疏忽或认识不够,恳请读者批评指正。

张柏林

2007 年 1 月

前 言

微生物学是一门实验科学。当作为一名大学生时,在学习普通的科学知识时,我是一位非常好的学生。如果不考虑课程的性质的话,在班上我的功课成绩很好。然而,那时我认为实验课是很枯燥的。直到上了第一堂微生物学课后,我才理解到实验技能训练可以巩固和加深课堂中所学到的知识。在过去的 20 年中,我一直是一名从事微生物学的“学生”。我始终相信,要对基础微生物学(以及食品微生物学)有良好的理解,就必须具备一定的实验经验。有鉴于此,我坚信食品微生物学课程教学不能与配套的实验课程脱节,两者是互为补充的。本书中开列出的实验课程是在 8 年的教学过程中逐步形成的。参加这些实验课程的学生既包括来自食品科学的大四学生,他们已完成了微生物学导论课程的学习;也包括来自营养专业的学生,这些学生不具备任何微生物学背景知识。因此,按层次要求,所有实验的头一部分主要包括微生物学的基本操作技能,并且所有的练习中都包括流程图。其次,本实验指导中提供的所有参数和流程都是经过优化的,以确保每项实验练习都会取得成功。这是因为时间和费用因素使实验课指导教师不允许学生通过反复的实验失败来达到学习效果。

本书无意作为一本综合性的指导教程来包含所有的操作技能,也无法对所有的来自食品中的微生物进行检测。相反,本书提供的 18 个实验重点涉及食品微生物学的基本概念,包括活菌检测与计数评价方法中的各种变化。我赞同(使用本书的)指导教师将本书中的实验练习作为其教学的主线,同时糅合其它实验内容或检测方法以突出其授课重点。通常,我采用本实验指导中的 8~9 个实验,同时实验中增加一些商业化快检试剂盒的内容,这样做主要取决于我每个学期的经费预算情况。例如,实验 3,除了采用传统的 3 试管最大可能数法(MPN)外,我们实验中也通常采用商业化的 MPN 试剂盒来检测大肠菌群数(像华盛顿州 Bellevue 的 BioControl Systems 公司生产的 SimPlates™ MPN 试剂盒)。基于学生课程中理解的难点问题,我们也会将商业化的酶联免疫试剂盒(ELISA)或 PCR 反应试剂盒用于实验室中的致病菌检测中。总之,涉及快检试剂盒以及是否这些试剂盒已受到美国官方分析化学师协会(Association of Analytical Chemists, AOAC)认可的有益信息,都可以在 <http://www.aoac.org/testkits/microbiologykits.htm> 网站上查阅。

致 谢

衷心感谢在编写此书过程中给予我支持和帮助的每一个人! Ron Labbe 和 Robert Levin 两人为本书提出很多真知灼见,对此表示衷心的感谢! 作为我的第一任助教,William K. Shaw, Jr. 完成了实验 7 和实验 15 的编写工作,同时对本书的许多地方提出了改进建议;Emmanouil Apostilidis 和 Chris Kosteck 分别对实验 14 和实验 18 中的操作参数进行了优化;John Wood 是我们系富有极高天分的学生,他帮助绘制了实验 2 中的真菌示意图,对此表示衷心的感谢! 此外,我要向 William K. Shaw, Jr, Caroline Cronin 和 Marcus Teixeira 致以最衷心的感谢,他们在百忙之中抽时间对本书进行了审阅和校正。最后,感谢我的丈夫 Edward、儿子 Aaron 和女儿 Sophia,在本书编写过程中他们给予我非常多的爱心、支持和耐心!

Lynne A. McLandsborough

University of Massachusetts, Amherst

作者简介

Lynne A. McLandsborough, 博士, 副教授, 在马萨诸塞州阿默斯特市的马萨诸塞州立大学食品科学系工作。

1986 年, McLandsborough 从俄亥俄州的迈阿密大学获得微生物学学士学位, 于 1989 年和 1993 年先后获得明尼苏达州立大学食品科学专业硕士和博士学位。1995 年进入马萨诸塞州立大学食品科学系工作之前, 她在明尼苏达州立大学微生物系从事过博士后研究工作。她的工作兴趣主要涉及微生物的黏附机制、生物膜形成的生态学机制以及加工过程表面除菌方法学研究等。

McLandsborough 博士是美国微生物协会、食品技术协会、国际食品保护联合会和新英格兰工业微生物协会会员, 现为《食品和农业科学杂志》(*Journal of the Science of Food and Agriculture*) 副编审和《食品生物技术》(*Food Biotechnology*) 杂志编委。同时, 她也是多个联邦基金的评审专家。她主要承担食品科学专业“食品微生物学”以及营养专业“食品操作卫生学”等课程的教学工作。鉴于教学业绩突出, 她最近获得了马萨诸塞州立大学食品和自然资源学院的杰出教学奖。

实验室安全

这是这本书中最重要的知识,也是学生们在微生物实验室确保工作安全必须了解的知识。在这门课程中,学生将会从食品中分离出不同的微生物。食品是一个载体,其中含有多微生物,某些微生物可能是非致病性的,有些则可能是致病性的。因此,在对所有的实验材料进行处理时,我们都应将其当作含有致病菌一样采取处理措施,记住这点是非常重要的。

微生物实验室操作标准

安全设备

(1) **白大褂和鞋子** 只要进实验室,就要穿白大褂并穿好鞋子。白大褂可以由实验室提供,也可以购买。购买来的白大褂应放在实验室,当学期结束时,白大褂必须进行消毒处理后才允许学生们把它带回家。

(2) **眼罩** 实验中,学生有可能会接触到高浓度的人类致病菌,必须戴眼罩来保护眼睛。要时刻提醒那些戴眼镜的同学保护好自己的眼睛。为了卫生起见,每位同学都应购买自己的眼罩。

(3) **橡胶手套** 应时刻戴好手套。如果手上的皮肤受到伤害,应立刻用绷带包扎好伤口,并戴上手套。当与致病菌接触,或者与富集致病菌的增菌培养液进行接触时,应该一直戴着手套。用完后的手套应该作为生物垃圾来处理,并且需要洗手。

标准操作

(1) **实验前做好准备。**进入实验室之前,应仔细阅读和学习实验室注意事项,确信你已意识到实验中可能存在的危害。

(2) **不要在实验室吃东西,不要用化妆品,不要用手接触眼镜。**实验室中的食物样品绝对不能吃!

(3) **经常洗手。**接触任何微生物培养物后,或摘掉手套后,或者结束一天工作离开实验室之前,都要洗手。

(4) **对实验室消毒。**实验开始前或离开实验室之前,要用消毒剂对实验台进行

清洗。

(5) **注意实验室的环境。**注意灭火器和眼药水存放的位置,注意紧急情况下可能要使用到的电话的位置。

(6) **安全使用明火。**酒精灯不用时要熄灭,离开实验室时要确认酒精灯是否熄灭。留长发的同学要把长发扎好,以免接触到酒精灯火焰引起烧伤。酒精摆放位置离明火至少要有 5.5m 远。

(7) **保持实验室整洁。**仅把实验记录本放到实验台上。衣服、背包、钱包应该放在远离实验台的指定位置。要与你的同伴有条不紊地进行实验,因为很多人挤在一个空间很小的地方工作容易出现差错。

(8) **一旦你或你的同伴在实验中受伤,应立即通知指导老师。**

(9) **一旦实验过程中有东西溅出或损坏,应立即通知指导老师。**如果培养基或被污染设备中的一部分接触到了实验台、地板或器材的话,应该立即用纸巾擦去污染,并用清洁剂清洗。清洗后应通知老师或实验管理员。如果污物溅洒到手套上,应立即通知老师。手套应立刻摘下,作为生物垃圾来处理。然后,用热水和肥皂洗手 30s 以上。

(10) **当不安全操作,或者实验器材破损时,应及时通知指导老师。**为避免出现安全问题,当实验器材部分破损时,要及时通知老师。在实验过程中,如果你认为同伴或者其他学生处于不安全的工作状态,请通知老师。

(11) **工作要细心,切忌过急。**急躁往往会造成实验事故。

(12) **轻松自在地进行实验。**完成一项实验,仅仅是你完成了指导教师开出的实验课程的一小部分。实际上,实验的大部分时间和工作是花在了策划实验、准备实验和清洗方面。请感谢你的指导老师花时间和精力为你准备实验练习。正是老师的前期准备工作,才能让学生们进入实验室后很容易完成每个实验中最有意思的部分。

目 录

实验 1 水产品微生物菌群——微生物学基本技巧与标准平板计数	(1)
一、实验目的	(1)
二、背景知识	(1)
三、实验方法	(8)
四、结 果	(15)
五、问题讨论	(16)
实验记录	(18)
实验 2 酵母菌、霉菌和细菌显微镜观察	(19)
一、实验目的	(19)
二、背景知识	(19)
三、实验方法	(23)
四、结 果	(25)
五、问题讨论	(25)
实验记录	(26)
实验 3 食品中酵母菌和霉菌的计数	(27)
一、实验目的	(27)
二、背景知识	(27)
三、实验方法	(27)
四、结 果	(28)
五、问题讨论	(29)
实验记录	(30)
实验 4 水中大肠菌群及大肠杆菌检测：最大可能数法	
(MPN)和 3M 测试片法	(31)
一、实验目的	(31)
二、背景知识	(31)

三、实验方法	(35)
四、结 果	(38)
五、问题讨论	(40)
实验记录	(41)
实验5 分割肉中的微生物菌群:标准平板计数与大肠杆菌计数	(43)
一、实验目的	(43)
二、背景知识	(43)
三、实验方法	(44)
四、结 果	(46)
五、问题讨论	(47)
实验记录	(48)
实验6 大肠杆菌 O157: H7 富集与免疫磁性分离技术	(49)
一、实验目的	(49)
二、背景知识	(49)
三、实验方法	(51)
四、结 果	(53)
五、问题讨论	(53)
实验记录	(54)
实验7 沙门氏菌的检测和鉴定	(55)
一、实验目的	(55)
二、背景知识	(55)
三、实验方法	(59)
四、结 果	(62)
五、问题讨论	(63)
实验记录	(65)
实验8 MPN 富集法在虾类制品副溶血弧菌计数中的应用	(67)
一、实验目的	(67)
二、背景知识	(67)
三、实验方法	(69)
四、结 果	(74)

五、问题讨论	(74)
实验记录	(75)
实验9 空肠弯曲杆菌和大肠弯曲杆菌的分离	(77)
一、实验目的	(77)
二、背景知识	(77)
三、实验方法	(79)
四、结 果	(83)
五、问题讨论	(84)
实验记录	(85)
实验10 食品中金黄色葡萄球菌的计数	(87)
一、实验目的	(87)
二、背景知识	(87)
三、实验方法	(88)
四、结 果	(90)
五、问题讨论	(91)
实验记录	(92)
实验11 冷藏食品中李斯特氏菌的分离	(93)
一、实验目的	(93)
二、背景知识	(93)
三、实验方法	(95)
四、结 果	(98)
五、问题讨论	(98)
实验记录	(99)
实验12 应用PCR检测技术筛选李斯特氏菌	(101)
一、实验目的	(101)
二、背景知识	(101)
三、实验方法	(105)
四、结 果	(107)
五、问题讨论	(107)
实验记录	(108)

实验 13 胡椒中的芽孢计数	(109)
一、实验目的	(109)
二、背景知识	(109)
三、实验方法	(111)
四、结 果	(112)
五、问题讨论	(113)
实验记录	(114)
实验 14 热对微生物的破坏效果	(115)
一、实验目的	(115)
二、背景知识	(115)
三、实验方法	(116)
四、结 果	(118)
五、问题讨论	(119)
实验记录	(120)
实验 15 低酸食品的罐藏和腐败	(121)
一、实验目的	(121)
二、背景知识	(121)
三、实验方法	(122)
四、结 果	(125)
五、问题讨论	(130)
实验记录	(131)
实验 16 运用梯度平板法检测内在和外在因素对微生物生长的影响	(133)
一、实验目的	(133)
二、背景知识	(133)
三、实验方法	(133)
四、结 果	(136)
五、问题讨论	(138)
实验记录	(139)
实验 17 清洗和消毒	(141)
一、实验目的	(141)

二、背景知识	(141)
三、实验方法	(143)
四、结 果	(146)
五、问题讨论	(148)
实验记录	(149)
实验 18 荧光素/荧光素酶法检测与细菌和食物残留相关的 ATP	(151)
一、实验目的	(151)
二、背景知识	(151)
三、实验方法	(152)
四、结 果	(156)
五、问题讨论	(159)
实验记录	(160)
参考文献	(161)

实验 1 水产品微生物菌群——微生物学

基本技巧与标准平板计数

一、实验目的

1. 掌握稀释、倾注平板和涂布平板操作技术；
2. 运用标准平板计数法计算菌落数(cfu/g)；
3. 学习平板划线获得纯培养物。

二、背景知识

(一) 用于微生物分析的食品采样与准备

对食品微生物学而言,很重要的一个方面是强调细菌通常在食品中是不均匀或异质性分布的。对某些商品而言,如水果、蔬菜、肉和鱼等,这些食品表层分布的细菌数要高于其内部的细菌数。其次,一个特定产品中的细菌分布也是变化的。例如,鱼片不同部位的细菌分布常常是不均匀的,其中鳞翅与肠道中存在的细菌数较高。加工食品同样如此。通常,同一批食品中的细菌分布也并非均匀。例如,如果从1 000个样品中抽取一个样品进行标准平板计数(SPC),就很难判定这个结果是具有代表性,还是例外。因此,只有进行大量样品分析才能对食品的微生物质量有更好的了解。此外,采集到的食物样品越多,发现产品中含有较高数量微生物的可能性,甚至是致病菌的可能性就越高。然而,鉴于实验室分析的成本,在确定采样数量之前,有必要考虑实验室的条件、人力以及产品成本。所以基于统计原理制定采样计划,能有效确定最佳的样本数量,保证某种食品中的微生物数量分析具有可靠性¹⁻³。

收集食物样品并将它们送往实验室进行分析时要非常仔细,运送样品时最好不要拆封。或者采样和运送样品时应使用密闭容器和无菌的不锈钢器皿。冷冻样品在运送过程中应保持冷冻状态。冷藏样品不允许冷冻,但在运送过程中温度应始终保持在0~4℃。所有样品在进入实验室的24h内必须完成检查。冷冻食物样品应按冷冻方式贮藏,易腐败的冷藏食物样品应保存在0~4℃。

实验室中,典型的是取 25 ~ 50g 的样品用于实验分析。样品开启前,要用 70% 的酒精对用于保存食物样品的器皿外部进行消毒,以减少被污染的几率。对于液体样品,在用无菌移液管取样前,样品应翻转混匀;对于固体样品,则须用灭菌器具(刀、勺或穿孔器)进行采集,并且采集的样品在与稀释液混合前必须称重。

食品微生物实验中,稀释液通常有 Butterfield 磷酸盐缓冲液(pH 7.2, 0.6m mol/L KH_2PO_4)、生理盐水(8.5g/L 氯化钠)和蛋白胨溶液(1g/L 蛋白胨)。在欧洲,人们也使用蛋白胨生理盐水的混合物(8.5g/L 氯化钠和 1g/L 蛋白胨)作为稀释液,其中添加蛋白胨和盐的目的是为了维持菌体细胞渗透压的稳定性。通常,样品稀释操作最好不要超过 30min,因超过 30min 后,细菌一方面可能会在蛋白胨溶液中生长,另一方面长时间在生理盐水中可能会加速菌体细胞死亡。因此,活菌计数时,样品的稀释和倒平板最好控制在 30min 内。

固体食品需混匀后再进行分析。混合通常是将称重后的样品放入灭菌杯或灭菌的塑料袋中,然后加入稀释液(通常是样品质量的 9 倍)来完成的。食品要么借助混合器(如 Waring® 或其它混合器)来混匀,要么采用实验室用的搅拌器(如 Stomacher® 细菌分离器或其它品牌的桨状搅拌器)的搅拌作用进行混合。

(二) 稀释操作要点

为了对菌体细胞的数量进行准确的定量分析,则每个平板的菌落数应维持在 25 ~ 250cfu 之间。在倒平板时,尽管以往的知识能为你提供了一个理想的预期水平,但你无法知道菌悬液中准确的细胞数。有鉴于此,出于能找到至少一个稀释度平板上的菌落数是在可计范围内的目的,对样品进行系列稀释后倒平板。

系列稀释法是指一系列的稀释过程。在细菌学操作中,稀释法通常采用 1/10 或 1/100 稀释倍数。采用系列稀释法是因为可以在不同浓度进行取样和分析。在我们了解系列稀释法之前,让我们回顾一下样品的稀释过程。例如,1/10 的稀释液就是将 1mL 的样品加到 9mL 的空白液中,或将 11mL 的样品加到 99mL 的空白液中,或者将 25g 食物样品加入到 225mL 的稀释液中[分别见式(1.1)、式(1.2)和式(1.3)]。当计算稀释度时,总稀释溶液的体积等于样品的体积加上稀释液(亦称空白液)的体积。同样需要注意的是,当稀释固体食物样品时,通常是假定 1g 的食物样品与其 1mL 体积等同。为简化起见,可以运用科学计数法来表达稀释度,如可以将 1/10 稀释度用 0.1 、 1×10^{-1} 或简单地用 10^{-1} 来表示。