

食品卫生微生物学检验技术

(全国食品卫生微生物学检验技术学习班讲义)

中国医学科学院食品卫生检验所
北京医学院卫生系

1978

食品卫生微生物学检验技术

(全国食品卫生微生物学检验技术学习班讲义)

中国医学科学院食品卫生检验所
北京医学院卫生系

1978

食品卫生微生物学检验技术

中国医学科学院食品卫生检验所
北 京 医 学 院 卫 生 系

•

黑龙江省绥化印刷厂印刷
字数 640,000 印数 15,000

黑龙江省卫生防疫站

(内部发行)

前 言

中央卫生部为了贯彻国务院74 (82) 号文件精神及执行1978年5月公布试行的中华人民共和国国家标准GBn 1 ~54~77做好准备, 于1977年以卫防字434号文件委托北京医学院卫生系和中国医学科学院食品卫生检验所, 于1977年11月至1978年1月举办全国食品卫生微生物学检验技术学习班。学习班还邀请十一个兄弟单位18名教师担任讲课。并请刘家驥、李兆晋两位同志指导实验。鉴于内容比较丰富和实用, 学员要求印发资料, 有些省、市卫生防疫部门和食品有关部门准备培训微生物检验技术人员, 也需要参考资料。卫生部委托黑龙江省卫生防疫站负责印刷出版。

各授课教师在交稿前对讲课内容又进行了补充和修改。交稿后全书又经孟昭赫、宋圃菊、张国柱及唐仪四位同志主编和整理。刘鸿礼等同志负责校对。

因时间仓促, 经验和水平所限, 缺点和错误在所难免。恳请读者批评指正。

中国医学科学院食品卫生检验所
北 京 医 学 院 卫 生 系

1978年6月

目 录

第一章	大肠菌群	刘宏道 (1)
第二章	肠道致病菌的检验与鉴定	何晓青 (46)
第三章	副溶血性弧菌(致病性嗜盐菌)	周桂莲 (147)
第四章	葡萄球菌食物中毒	孟昭赫 (157)
第五章	葡萄球菌肠毒素的检验	马贤凯 (164)
第六章	链球菌	刘宏道 (182)
第七章	肉毒梭菌	王成怀 (193)
第八章	韦氏梭菌	王成怀 (218)
第九章	蜡样芽胞杆菌食物中毒	孟昭赫 (226)
第十章	炭疽芽胞杆菌	李仲三 (235)
第十一章	布鲁氏菌病的研究进展	尚德秋 (243)
第十二章	结核分枝杆菌	郭钧 单菊生 (263)
第十三章	微生物性食物中毒	孟昭赫 (283)
第十四章	食品卫生微生物检验	刘以贤 (302)

第十五章	荧光抗体技术在食品细菌快速检验中的应用.....	高庆仪 (309)
第十六章	乳胶凝集反应.....	周桂莲 (314)
第十七章	真菌学概论.....	张国柱 (319)
第十八章	曲霉和青霉的形态和鉴定.....	齐祖诤 (336)
第十九章	镰刀菌属的分类梗概.....	陈庆涛 (353)
第二十章	主要致癌性曲霉毒素.....	宋圃菊 (370)
第二十一章	霉菌毒素的化学测定方法.....	张国柱 (392)
第二十二章	黄变米和黄粒米研究概况.....	刘兴玠 (420)
第二十三章	食品中常见寄生虫及其检验.....	李雄豪 (426)

第一章 大肠菌群

中国医学科学院卫生研究所 刘宏道

第一节 大肠菌群检验及其卫生学意义

第二节 大肠菌群快速检验方法（倾注法）

第三节 有关大肠菌群检验方面的一些问题

第一节 大肠菌群检验及其卫生学意义

1974年5月卫生部在石家庄市召开了“修订食品卫生细菌检验方法座谈会”，统一了有关食品卫生细菌的检验方法，并建议今后以大肠菌群作为粪便污染指标，使我国食品卫生细菌检验工作迈向新的阶段。根据会议精神，为了更好地掌握和了解大肠菌群的检验方法及其卫生学意义，协作组在这方面进行了广泛的科学研究和实践，并取得了一定成绩，在大肠菌群领域中积累了丰富的宝贵经验。现将有关大肠菌群检验方法（发酵法）及其卫生学意义等方面简述如下。

一、大肠菌群定义

大肠菌群系指一群细菌，这些细菌在生化及血清学方面并非完全一致。该菌群主要来源于人畜粪便，故以此做为粪便污染指标来评价食品的卫生质量，具有广泛的卫生学意义。该定义为：系指一群需氧及兼性厌氧、在37℃24小时能分解乳糖产酸产气的革兰氏阴性无芽胞杆菌。有些科学工作者又用靛基质、甲基红、服一波、枸橼酸盐、硫化氢、明胶、动力和44.5℃乳糖分解等试验，将这群细菌再分为大肠艾希氏菌、枸橼酸杆菌、产气克雷白氏菌和阴沟肠杆菌等（见表1-1），有的则将凡符合上述定义的肠杆菌均列入大肠菌群内。不论分法如何，但应以上述定义为基础。目前我国是以上述定义做为判定大肠菌群的标准，而不再细分。

表 1—1

大 肠 菌 群 分 类 表

菌 名		生 化 反 应							
		靛基质	甲基红	V-P	枸橼酸盐	H ₂ S	明胶	动力	44.5℃ 乳 粉
大 肠 艾 希 氏 菌	I	+	+	-	-	-	-	+/-	+
"	II	-	+	-	-	-	-	+/-	-
"	III	+	+	-	-	-	-	+/-	-
"	IV*	-	+	-	-	-	-	+/-	+
弗 劳 地 枸 橼 酸 杆 菌	I	-	+	-	+	+/-	-	+/-	-
"	II	+	+	-	+	+/-	-	+/-	-
产 气 克 雷 白 氏 菌	I	-	-	+	+	-	-	-	-
"	II	+	-	+	+	-	-	-	-
"	III*	-	-	+	-	-	-	-	-
"	IV*	-	-	+	+	-	-	-	+
阴 沟 肠 杆 菌	I	-	-	+	+	-	+/-	+	-
"	II*	+	-	+	+	-	+/-	+	-

*拟列的

二、大 肠 菌 群 检 验

大肠菌群的检验应根据大肠菌群定义来考虑制订。我国大肠菌群检验为三步法：初发酵试验、平板分离和复发酵试验。具体步骤如下。

(一) 初发酵试验：以无菌操作采取样品，采取量及稀释倍数，依据国家和当地卫生标准要求及样品污染情况而定。将待检样品接种于乳糖胆盐发酵管内，1毫升以上可用双料乳糖胆盐发酵管，1毫升及1毫升以下可用单料乳糖胆盐发酵管。每一稀释度接种三管，置35~37℃温箱内，培养24±2小时。经培养后，如所有乳糖胆盐发酵管都不产气，则可报告为大肠菌群阴性；如有产气者，则按下列程序进行。

(二) 平板分离：将产气的发酵管分别接种在一种鉴别培养基（伊红美兰琼脂培养基、远藤琼脂培养基或麦康开琼脂培养基）上，置35~37℃培养18~24小时，然后取出，挑取可疑菌落做革兰氏染色和乳糖复发酵试验。

(三) 复发酵试验：挑取大肠菌群可疑菌落转种乳糖发酵管，置35~37℃温箱内，培养24±2小时，观察产气情况。凡乳糖产气、革兰氏染色为阴性无芽胞杆菌，即可报告为大肠菌群阳性；如乳糖不产气或革兰氏染色阳性，则报告为大肠菌群阴性。

三、大肠菌群报告

过去的报告方式有两类，一类是以含有大肠菌群的最小样品限量（毫升、克）为报告单位，即大肠菌值。另一类则以定量样品内含有大肠菌群的实际数值（个）为报告单位，即大肠菌指数。今后食品中的大肠菌群检验，均报告每100毫升（克）样品中的大肠菌群最近似数（M. P. N.），不再以含有大肠菌群的最小样品限量进行报告。

四、大肠菌群计算

大肠菌群最近似数的计算是根据复发酵试验中，各不同稀释度证实为大肠菌群阳性的发酵管数，查表报告之（见表1—2）。该表上之数值系通过机率计算而求得的最大可能数。

表1—2 每100毫升（克）样品中大肠菌群最近似数（M. P. N.）检索表

1			2			3		
10毫升 (克) × 3	1毫升 (克) × 3	大肠菌群 最近似数 个/100毫升 (克)	1毫升 (克) × 3	0.1毫升 (克) × 3	大肠菌群 最近似数 个/100毫升 (克)	0.1毫升 (克) × 3	0.01毫升 (克) × 3	大肠菌群 最近似数 个/100毫升 (克)
0	0	<3	0	0	<30	0	0	<300
0	1	3	0	1	30	0	1	300
0	2	6	0	2	60	0	2	600
0	3	10	0	3	100	0	3	1000
1	0	4	1	0	40	1	0	400
1	1	7	1	1	70	1	1	700
1	2	12	1	2	120	1	2	1200
1	3	16	1	3	160	1	3	1600
2	0	9	2	0	90	2	0	900
2	1	15	2	1	150	2	1	1500
2	2	20	2	2	200	2	2	2000
2	3	30	2	3	300	2	3	3000
3	0	25	3	0	250	3	0	2500
3	1	45	3	1	450	3	1	4500
3	2	110	3	2	1100	3	2	11000
3	3	>250	3	3	>2500	3	3	>25000

五、大肠菌群检验常用培养基和反应原理

(一) 乳糖胆盐发酵培养基

成分:

蛋白胨	20克
猪胆盐(或牛、羊胆盐)	5克
乳糖	10克
0.04%溴甲酚紫水溶液	2.5毫升
蒸馏水	1000毫升

制法: 将蛋白胨、胆盐、乳糖溶于1000毫升蒸馏水中,调pH7.2~7.4,然后加溴甲酚紫溶液2.5毫升、混匀,分装于置有倒管的试管中,每管约10毫升,10磅15分种高压灭菌后备用。

注: 双料乳糖胆盐发酵培养基,除蒸馏水外,其他成分加倍。

用途: 乳糖发酵试验用。

原理: 细菌分解糖类是依靠细菌细胞所产生的各种酶类的作用,细菌产生的分解糖类的酶,随细菌种类不同而异,可以此来鉴别细菌。

乳糖是双糖,细菌分解双糖的酶大多是胞外酶。乳糖被乳糖酶(即 β -半乳糖苷酶)水解成葡萄糖和半乳糖,葡萄糖可直接被细菌利用,而半乳糖则需在细胞内转化为葡萄糖后再被利用。

细菌分解葡萄糖的方式很多。葡萄糖的降解途径和最终产物因微生物的种类和条件而异。一般可归纳为有氧降解和无氧降解两大类型。葡萄糖有氧降解又称氧化,其最终产物为 CO_2 和 H_2O ,其代谢的途径有二:(1)葡萄糖转化为1,6-二磷酸果糖,降解成丙酮酸,进入三羧循环而被彻底氧化。(2)葡萄糖转化为6-磷酸葡萄糖,降解为磷酸戊糖而被氧化,故与戊糖的代谢有联系。葡萄糖的无氧降解又称发酵(肠杆菌科),其基本代谢途径与上面相似,但其最终产物不同:(1)葡萄糖转化为1,6-二磷酸果糖,降解成丙酮酸,生成乳酸、琥珀酸、甲酸、乙酸等有机酸,并生成醇类和气体(CO_2 和 H_2)。(2)葡萄糖转化为6-磷酸葡萄糖,降解为磷酸戊糖,并进一步降解,生成乳酸或乙醇等产物。

糖发酵试验主要是测定细菌分解糖类以后所产生的酸,以培养基pH降低(指示剂变色)作为观察结果的指标。

大肠杆菌等细菌在酸性环境中,由于甲酸脱氢酶的作用,可使甲酸分解成 CO_2 和 H_2 ,在培养基中产生大量气体,进入倒管中,以便观察。

注: 常用于供发酵试验的各种糖类、醇类和糖甙类(见表1—3)。

表 1—3

供发酵试验用的糖类醇类和糖甙类

(一) 供发酵试验用的各种糖类

化 学 上 的 分 类	名 称
戊糖 ($C_5H_{10}O_5$)	阿拉伯糖 Arabinose 木糖 Xylose 鼠李糖 Rhamnose
己糖 ($C_6H_{12}O_6$)	葡萄糖 Glucose, Dextrose 果糖 Fructose, Levulose 甘露糖 Mannose 半乳糖 Galactose
双糖类 ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	麦芽糖 Maltose 乳糖 Lactose 蔗糖 Sucrose 蜜二糖 Trehalose 纤维二糖 Cellobiose 木蜜糖 Melibiose
三糖类 ($C_6H_{10}O_5$)	棉子糖 Raffinose 落叶松糖 Melizitose
多糖类 ($C_6H_{10}O_5$) _x	菊粉 Inulin 淀粉 Starch 肝粉 Glycogen 糊精 Dextrin

(二) 供发酵试验的各种醇类和糖甙类

化 学 上 的 分 类	名 称
三元醇 $C_3H_8(OH)_3$	甘油 Glycerin
四元醇 $C_4H_8(OH)_4$	赤丝藻醇 Erythritol
五元醇类 $C_5H_8(OH)_5$	侧金盏花醇 Adonitol 阿拉伯胶醇 Arabitol
六元醇类 $C_6H_8(OH)_6$	甘露醇 Mannitol 卫矛醇 Dulcitol 山梨醇 Sorbitol
环己六醇 (CHOH) ₆	肌醇 Inositol
糖甙类	水杨甙 Salicin 七叶甙, 马栗树皮甙 Aesculin 松柏甙 Coniferin

(二) 伊红美兰琼脂培养基

成分: 蛋白胨	10克
乳 糖	10克
K_2HPO_4	2克
琼 脂	20克
2%伊红溶液	20毫升
0.5%美兰溶液	13毫升
蒸馏水	1,000毫升

制法: 将蛋白胨、 K_2HPO_4 、琼脂加于1,000毫升蒸馏水中, 加热溶化, 调pH 7.2~7.4, 过滤。再加入乳糖10克, 混匀使溶解, 定量分装于三角瓶内, 10磅20分钟灭菌后, 俟冷至60℃, 以无菌手续加入灭菌的伊红、美兰溶液, 然后倾注平皿备用。

用途: 鉴别分离培养基。

原理: 大肠菌群细菌发酵乳糖产酸, 使伊红与美兰结合而成黑色化合物, 故菌落呈黑紫色, 有时还可产生金属光泽。黑色程度与光泽产生情况与伊红、美兰二者比例有关(见表1—4)。

表1—4 三种伊红美兰培养基(EMB)与菌落色泽产生的关系

菌 株	EMB (1)		EMB (2)		EMB (3) **	
	光泽	色 (全黑)	光泽	色 (全黑)	光泽	色 (全黑)
大 肠 杆 菌	O_6H_1	+	++	++	+++	++
	O_7H-	-	-	+	+++	++
	O_8H_{12}	+	++	+++*	+++	++
	$O_{12}H-$	-	+	-	+++	++
	$O_{15}H_{12}$	-	-	-	+++	++

注: +++: 全部菌落;
 ++: 多数菌落;
 +: 少数菌落;
 -: 无;
 *: 全部菌落, 光泽强;
 **: 目前采用的培养基。

不发酵乳糖的细菌(如沙门氏菌、志贺氏菌)则为无色菌落。

(三) 远藤琼脂培养基

成分: 蛋白胨	10克
乳 糖	10克
K_2HPO_4	3.6克

琼脂	20克
蒸馏水	1,000毫升
无水亚硫酸钠	5克左右
5%碱性品红乙醇溶液	20毫升

制法:

1、储备培养基:将蛋白胨、 K_2HPO_4 、琼脂加于1,000毫升蒸馏水中,加热溶化,调pH7.2~7.4,过滤。再加入乳糖,混匀使溶解,定量分装于三角瓶内,10磅20分钟灭菌后备用。

2、品红、亚硫酸钠溶液:根据三角瓶内的培养基量,用无菌吸管按比例吸取一定量的5%碱性品红乙醇溶液,置灭菌空试管内。再按比例称取无水亚硫酸钠置于灭菌空试管内,加灭菌水少许,使其溶解,再置于沸水浴中煮沸10分钟。用灭菌吸管吸取已灭菌的亚硫酸钠溶液,滴加于碱性品红乙醇溶液内至深红色退成淡粉色为止(此液应新鲜配制)。

3、将品红、亚硫酸钠溶液按比例加于已溶化的储备培养基内,充分混匀后,倾注平皿备用。此培养基于冰箱内保存不宜超过二周,如培养基已由淡粉红色变成深红色,则不能再用。

用途:鉴别分离培养基。

原理:此培养基中碱性品红为指示剂,亚硫酸钠为还原剂,可将碱性品红的颜色脱掉,故培养基制成后呈淡粉红色。大肠菌群细菌能发酵乳糖产酸,被脱色的碱性品红一迁到酸即显示出颜色,故菌落为红色。不发酵乳糖的细菌(如沙门氏菌、志贺氏菌)则为无色菌落。

(四)麦康开琼脂培养基

成分: 蛋白胨	17克
胨	3克
胆盐(猪、牛、羊胆盐)	5克
氯化钠	5克
乳糖	10克
0.1%结晶紫水溶液	1毫升
0.5%中性红水溶液	5毫升
琼脂	17克
蒸馏水	1,000毫升

制法:将蛋白胨、胨、胆盐、氯化钠、琼脂加热溶解于1,000毫升蒸馏水中,调pH7.2,过滤。再加入乳糖、结晶紫及中性红水溶液,混匀溶解,10磅20分钟灭菌后,倾注平皿备用。

用途:鉴别分离培养基。

原理:本培养基内中性红为指示剂(6.8~8.0),酸性时呈红色,碱性时呈黄色。大肠菌群细菌能分解乳糖产酸,中性红指示剂迁酸即呈现红色,故菌落为红色。不分解乳

糖的细菌，菌落为无色。

(五) 双糖铁培养基

成分：牛肉膏	0.3克
蛋白胨	1.5克
豚 豚	0.5克
葡萄糖	0.1克
乳 糖	1克
硫酸亚铁	0.02克
氯化钠	0.5克
亚硫酸钠	0.04克
硫代硫酸钠	0.008克
酚 红	0.0024克
(或0.2%酚红溶液加1.2毫升)	
琼 脂	1.5克
蒸馏水	100毫升

制法：除葡萄糖、乳糖、酚红外，将其他成分加入100毫升蒸馏水内，加热溶化。再加入葡萄糖、乳糖，溶解后，调pH7.4~7.6，过滤，然后加入酚红，分装小试管内，8磅15分钟灭菌后，制成高层斜面备用。

用途：观察葡萄糖、乳糖及硫化氢反应。

原理：

1、本培养基含酚红指示剂，pH为6.8~8.4（黄~红），乳糖含量较多（1%），而葡萄糖含量较少（0.1%）。

2、细菌发酵葡萄糖时，由于培养基底部游离氧较少，发酵不易达到最后产物（ CO_2 、 H_2 ），虽然葡萄糖含量少，但所积聚的酸较多，pH下降，可使酚红指示剂变为黄色。斜面部分氧充足，发酵进行较完全，易达到最后产物，由于葡萄糖含量较低，所产之酸很少积蓄，因而斜面pH上升，酚红指示剂呈现红色。所以当细菌发酵葡萄糖时，培养基底部为黄色，斜面为红色。

3、细菌发酵乳糖时，因乳糖含量较多，培养基底部和斜面均能积聚较多的酸，而使酚红指示剂变黄。所以当细菌分解乳糖时，则培养基底部和上部斜面均呈黄色。

4、本培养基观察结果一般以24小时左右为宜。提前观察，因发酵葡萄糖的细菌（不发酵乳糖），在培养时间过短时，对斜面部分的葡萄糖的发酵尚未进行完全，还积聚有较多的酸，故斜面仍为黄色，从而有可能被误认为乳糖阳性。延长观察时间，因培养时间过久，斜面上的乳糖可能全部被分解为最后产物，pH又复回升，斜面部分由黄色变为红色，故又可能将阳性乳糖反应作为阴性处理。

5、硫化氢试验原理可参阅醋酸铅培养基部分。

(六) 蛋白胨水

成分：胰蛋白胨	20克
---------	-----

氯化钠

5克

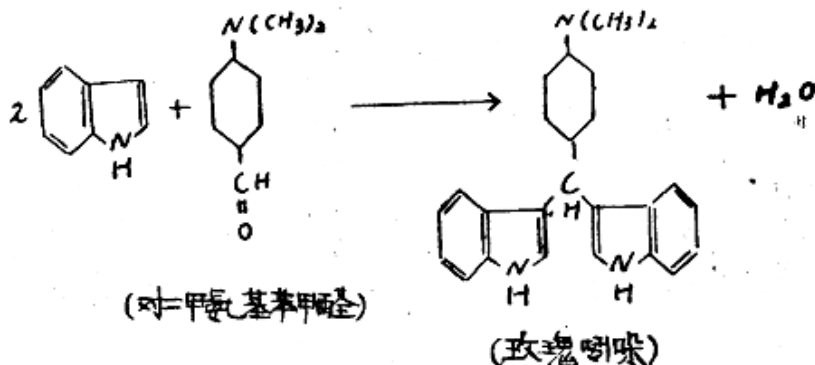
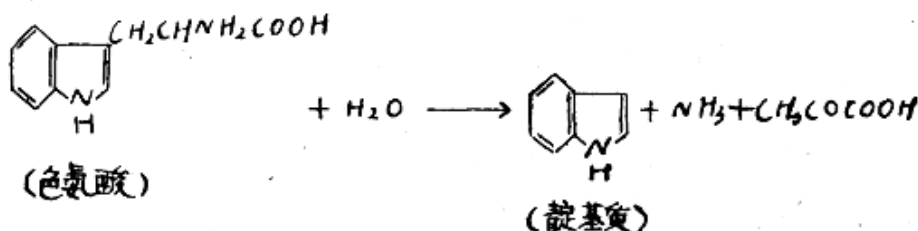
蒸馏水

1,000毫升

制法：上述成分混合加热溶化，调pH7.4，过滤，然后分装小试管，15磅15分钟灭菌后备用。

用途：靛基质试验用。

原理：细菌能分解蛋白胨中的色氨酸，生成靛基质，与对二甲氨基苯甲醛作用，形成玫瑰吲哚而呈红色。



(七) 葡萄糖蛋白胨水

成分：蛋白胨

7克

葡萄糖

5克

K_2HPO_4

5克

蒸馏水

1,000毫升

制法：上述成分混合加热溶化，调pH7.0，过滤，然后分装小试管，10磅15分钟灭菌后备用。

用途：甲基红及V-P试验用。

原理：

1、甲基红试验：甲基红为指示剂（4.2~6.3），酸性时呈红色，碱性时呈黄色。大肠杆菌（艾希氏菌属）和产气杆菌（克雷白氏菌属）在糖代谢过程中，分解葡萄糖，产生丙酮酸，丙酮酸再被分解，生成甲酸、乙酸、乳酸、琥珀酸。大肠杆菌分解丙酮酸，产生的酸类较多，pH可下降到4.5或更低，甲基红指示剂呈红色（阳性）。在产气杆菌的培养液中，一部分丙酮酸变为中性的乙酰甲基甲醇，生成的酸类较少，pH在6.4以上，甲基红呈桔黄色（阴性）。

(1) 乙酰甲基甲醇的生成

(2) 乙酰甲基甲醇氧化为二乙酰

(3) 二乙酰与胍基生成红色化合物

(八) 枸橼酸盐培养基

成分：氯化钠	5克
硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2克
磷酸二氢铵	1克
磷酸氢二钾	1克
枸橼酸钠	5克
琼脂	20克
0.2% 溴麝香草酚兰溶液	40毫升
蒸馏水	1,000毫升

制法：将以上各种盐类溶于水中，再加琼脂，加热溶化后，调pH6.8，再加入指示剂，混匀后过滤，15磅15分钟灭菌后，放置成斜面备用。

用途：枸橼酸盐利用试验用。

原理：大肠菌群中的大肠杆菌可利用 $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 中之铵作为氮源，但不能利用枸橼酸盐作为碳源，故在此培养基上不能生长。而产气杆菌既能利用 $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 中之铵作氮源，又能利用枸橼酸盐作碳源，故能在此培养基上生长。当细菌生长时，分解枸橼酸钠，生成碳酸钠，使培养基变碱，培养基中溴麝香草酚兰指示剂 (6.0~7.8，黄~兰) 即由绿变为兰色。

(九) 明胶培养基

成分：牛肉膏	3克
蛋白胨	5克
明胶	120克
蒸馏水	1,000毫升

制法：将上述成分加热溶化 (时间不宜过长)，调pH7.4，过滤，分装小试管，10磅15分钟灭菌后，迅速冷却，保存于冰箱中备用。

用途：明胶液化试验用。

原理：某些细菌具有蛋白酶，能分解蛋白质，大部分细菌无此能力。蛋白酶的功用能使不能吸收的蛋白质变为可以透入菌体的多肽或氨基酸，这种酶主要为胞外酶。明胶系一种蛋白质，明胶酶是胞外蛋白酶的一种，它可以使明胶分解而失去凝固力，阴沟肠杆菌即具有此种胞外蛋白酶，能使明胶液化。

(十) 醋酸铅培养基

成分：1.5% 肉浸液琼脂	100毫升
10% 硫代硫酸钠溶液 (新配制)	2.5毫升
10% 醋酸铅溶液	3毫升

制法：

1、加热溶化琼脂，以无菌操作加入10%硫代硫酸钠溶液2.5毫升 (先经煮沸灭菌)。

2、待琼脂冷至60℃左右，再加入10%灭菌醋酸铅溶液3毫升，混匀，无菌分装小