

中等职业学校食品类专业“十一五”规划教材

食品微生物检验

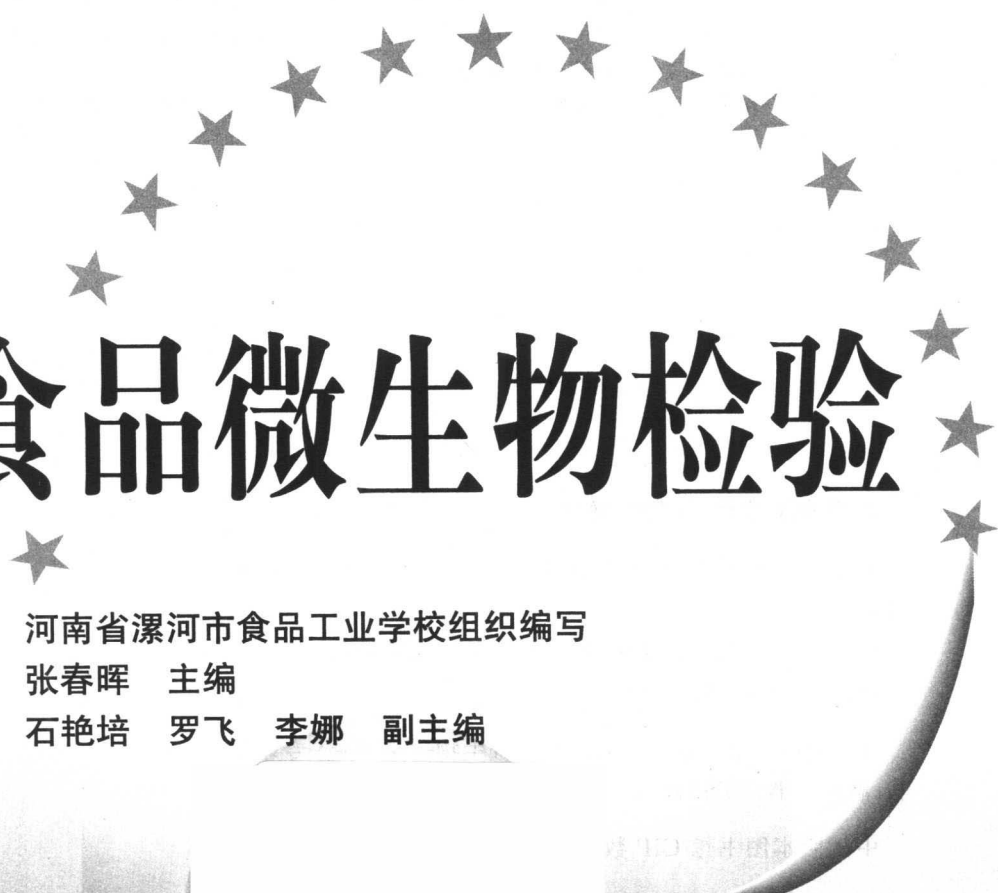
河南省漯河市食品工业学校组织编写
张春晖 主编

207
5



化学工业出版社

中等职业学校食品类专业“十一五”规划教材

A decorative arc of thirteen five-pointed stars, arranged in a semi-circle, framing the title.

食品微生物检验

河南省漯河市食品工业学校组织编写

张春晖 主编

石艳培 罗飞 李娜 副主编



化学工业出版社

· 北京 ·

本书是《中等职业学校食品类专业“十一五”规划教材》中的一个分册。

本教材概要论述了食品微生物检验在食品加工中的意义与作用,介绍了食品微生物检验的基本原理、仪器设备及检验方法和技术。重点介绍了食品中的微生物及其检验、食品微生物检验的基本条件与设备、食品卫生微生物检验技术、食品中常见病原微生物检验、发酵食品中微生物的检验以及食品微生物检验实验等内容。

本书适合作为中职食品类专业的教学用书,也可作为食品企业技术人员和技术工人的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

食品微生物检验/张春晖主编. —北京:化学工业出版社, 2008.1

中等职业学校食品类专业“十一五”规划教材

ISBN 978-7-122-01491-7

I. 食… II. 张… III. 食品微生物-食品检验-专业学校-教材 IV. TS207.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 177931 号

责任编辑:侯玉周

文字编辑:管景岩

责任校对:李林

装帧设计:郑小红

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)

印装:北京市彩桥印刷有限责任公司

720mm×1000mm 1/16 印张9 $\frac{3}{4}$ 字数185千字 2008年1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:16.00元

版权所有 违者必究

序

食品工业是关系国计民生的重要工业，也是一个国家、一个民族经济社会发展水平和人民生活质量的重要标志。经过改革开放 20 多年的快速发展，我国食品工业已成为国民经济的重要产业，在经济社会发展中具有举足轻重的地位和作用。

现代食品工业是建立在对食品原料、半成品、制成品的化学、物理、生物特性深刻认识的基础上，利用现代先进技术和装备进行加工和制造的现代工业。建设和发展现代食品工业，需要一批具有扎实基础理论和创新能力的研发者，更需要一大批具有良好素质和实践技能的从业者。顺应我国经济社会发展的需要，国务院做出了大力发展职业教育的决定，办好职业教育已成为政府和有识之士的共同愿望及责任。

河南省漯河市食品工业学校自 1997 年成立以来，紧紧围绕漯河市建设中国食品名城的战略目标，贴近市场办学、实行定向培养、开展“订单教育”，为区域经济发展培养了一批批实用技能型人才。在多年的办学实践中学校及教师深感一套实用教材的重要性，鉴于此，由学校牵头并组织相关院校一批基础知识厚实、实践能力强的教师编写了这套《中等职业学校食品类专业“十一五”规划教材》。基于适应产业发展，提升培养技能型人才的能力；工学结合、重在技能培养，提高职业教育服务就业的能力；适应企业需求、服务一线，增强职业教育服务企业的技术提升及技术创新能力的共识，经过编者的辛勤努力，此套教材将付梓出版。该套教材的内容反映了食品工业新技术、新工艺、新设备、新产品，并着力突出实用技能教育的特色，兼具科学性、先进性、适用性、实用性，是一套中职食品类专业的好教材，也是食品类专业广大从业人员及院校师生的良师益友。期望该套教材在推进我国食品类专业教育的事业上发挥积极有益的作用。

食品工程学教授、博士生导师 李元瑞

2007 年 4 月

前 言

食品专业学生修完食品微生物学课程后,应学习独立完成符合国家标准和相关国际标准检测要求的食品微生物检测方案设计、采样及处理、检验与分析、数据报告等。

食品微生物检验是食品专业的一门专业必修课程,其主要特点是实验技能要求较高,动手操作的能力要求较强。本课程要求学生掌握食品微生物检验的基本方法及其基本原理,学习了解国内外食品卫生检验的项目指标,掌握国内外食品卫生检验的常规方法和标准方法,了解当今最新的检测方法和手段。通过本课程的学习,学生应熟悉食品微生物检验的程序、要求和方法,了解国内及国际上食品微生物检验标准的要求,具备独立完成食品微生物检验的能力,掌握新技术和新方法在食品检验中的应用情况。

本书在撰写过程中注重学生实际操作能力的培养,提高其实验技能。教师在教学中也应重视学生实际动手能力的培养,以提高学生的实验技能和解决问题的能力。食品微生物检测方法随着科技的进步,新技术、新方法层出不穷,特别是分子水平的鉴定技术发展迅速,授课教师在全面掌握国家标准检测方法的基础上,应广泛阅读相关的参考文献,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、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。

本书由漯河双汇集团技术中心张春晖博士担任主编,漯河市食品工业学校石艳培、漯河双汇集团技术中心罗飞、漯河市食品工业学校李娜任副主编。张春晖、河南农业大学郭世良撰写了第一章,罗飞、漯河双汇集团技术中心路琳撰写了第二章,张春晖、漯河双汇集团技术中心胡小立撰写了第三章,石艳培、李娜撰写了第四章,漯河出入境检验检疫局夏双梅、漯河市食品工业学校张娟撰写了第五章,张春晖、路琳撰写了第六章。郑州轻工业学院高愿军教授对本书进行了细致的审阅,提出了许多宝贵的修改意见和建议。本书在编写过程中,得到了漯河市食品工业学校和漯河双汇集团技术中心的大力支持。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

2007年10月

目 录

第一章 概述	1
第一节 食品微生物检验简介	1
一、发展史	1
二、作用和地位	3
三、食品微生物快速检测和自动化	4
第二节 食品中的微生物	7
一、食品微生物的分类	7
二、食品微生物的来源	8
三、食品微生物概要	9
第三节 食品微生物检验的对象	13
一、菌落总数	14
二、大肠菌群	14
三、沙门菌	15
四、志贺菌	15
五、大肠埃希菌	15
六、金黄色葡萄球菌	16
七、肉毒梭菌和肉毒毒素	16
八、霉菌和酵母菌	17
复习题	17
第二章 食品微生物检验的基本条件与设备	19
第一节 微生物检验室	19
一、微生物检验室的基本条件	19
二、检验员手册	20
第二节 无菌室	21
一、无菌室的结构与要求	21
二、无菌室的熏蒸与消毒	22
三、无菌室无菌程度的检测	22
第三节 食品微生物检验的常用仪器设备	23
一、普通光学显微镜	23
二、培养箱	28
三、电热恒温干燥箱	29
四、高压蒸汽灭菌器	30
五、超净工作台	31

六、水浴锅	32
七、离心机	32
八、冰箱	33
九、BACTOMETER 全自动微生物检测仪	33
十、VIDAS 和 mini VIDAS 自动酶联免疫荧光检测仪	34
第四节 食品微生物检验常用玻璃器皿	35
一、玻璃器皿的种类	35
二、玻璃器皿的清洁与清洗	36
三、玻璃器皿的包扎	37
四、玻璃器皿的灭菌	38
复习题	38
第三章 食品卫生微生物检验技术	40
第一节 食品卫生微生物检验总则	40
一、样品采集	40
二、送检	41
三、样品处理	41
四、检验与报告	42
第二节 食品卫生微生物检验中常见检样的制备	42
一、肉及肉制品样品的采集与处理	42
二、乳及乳制品检样的制备	44
三、蛋及蛋制品检样的制备	45
四、饮料、冷冻饮品检样的制备	45
五、调味品检样的制备	46
六、冷食菜、豆制品检样的制备	46
七、糖果、糕点检样的制备	47
八、酒类检样的制备	47
九、方便面检样的制备	48
十、罐藏食品检样的制备	48
第三节 食品卫生细菌菌落总数的测定	48
一、菌落总数的标准平板培养计数法	49
二、其他方法	53
第四节 食品卫生大肠菌群的测定	53
一、设备和材料	53
二、培养基和试剂	54
三、检验程序	55
四、操作步骤	55
五、注意事项	58

复习题.....	58
第四章 食品中常见病原微生物检验	60
第一节 沙门菌检验.....	60
一、生物学特性.....	60
二、常规检验方法.....	63
三、mini VIDAS 快速检验方法	73
第二节 志贺菌检验.....	76
一、生物学特性.....	76
二、检验所需器材.....	79
三、检验程序.....	80
四、操作方法.....	80
第三节 金黄色葡萄球菌检验.....	83
一、生物学特性.....	83
二、常规检验法.....	85
三、3M Petrifilm 快速检测法	87
第四节 肉毒梭菌检验.....	93
一、生物学特性.....	93
二、检验所需器材.....	94
三、检验程序.....	95
四、操作步骤.....	96
复习题.....	97
第五章 发酵食品中微生物检验	99
第一节 乳酸菌饮料中乳酸菌的检验.....	99
一、生物学特性.....	99
二、检验所需器材	101
三、检验程序	102
四、操作方法	102
第二节 食品中霉菌和酵母菌的计数	103
一、生物学特性	103
二、检验所需器材	105
三、检验程序	105
四、操作步骤	106
附：培养基的制备方法	107
第三节 发酵酒微生物检验技术	110
一、微生物分析用具	110
二、微生物检测、鉴定和酵母菌直接计数	111
复习题	123

第六章 食品微生物检验实验	124
实验一 常用玻璃器皿的清洗、包扎及干热灭菌	124
实验二 培养基的制备与灭菌	127
实验三 饮料制品中菌落总数的测定	129
实验四 熟肉制品中大肠菌群的测定	132
实验五 鲜蛋液中志贺菌的检验	136
实验六 香肠中金黄色葡萄球菌的检验	139
实验七 酱油中霉菌数的测定	141
参考文献	143

第一章 概 述

第一节 食品微生物检验简介

微生物与人类有着密切的关系。一方面，人们在工农业生产、制药、环保等领域利用微生物为人类造福；另一方面，一些致病菌如痢疾杆菌给人类带来了巨大的痛苦和灾难。食物是人生存的第一要素，同时也是微生物与人接触的重要途径。“病从口入”主要就是指食用微生物含量超标的食品引起疾病。在认识到微生物是食品腐败变质的关键所在以及许多疾病是由特定的微生物引起之后，对食品中微生物的研究一直方兴未艾，尤其在微生物的检测方面，随着相关学科的发展和新型设备的出现，食品微生物检测技术获得了长足的进步，使检测更加快速、准确，且成本更低。

一、发展史

食品检验最初来自于宫廷，王公贵族为了防止有人在食物中下毒，通常在食用前令下属先尝一下，以检验食物是否安全。当然，这并不是完整意义上的食品检验。食品检验通常包括感官检验、理化检验、微生物检验和一些特殊指标的检验；食品检验的手段也是多种多样的，从一般的滴定分析到高级的串联质谱分析，从常见的平板培养到先进的传感器检测，根据不同的要求都在食品检验中得到应用。

食品微生物检验的发展是与整个微生物学的发展分不开的。虽然人类很早就开始利用微生物，但对微生物的认识直到显微镜的出现才开始。荷兰人吕文虎克 (Antony Van Leeuwenhoek, 1632—1723) 于 1676 年用自磨镜片制造了一架显微镜 (约放大 300 倍)，并从雨水、牙垢等标本中第一次观察和描述了各种形态的微生物，为微生物的存在提供了有力证据，并确定了细菌的三种基本形状：球菌、杆菌和螺旋菌。吕文虎克也因此被称为显微镜之父。从此以后，人们对微生物的形态、排列、大小等有了初步的认识，但受自然发生论的影响，仅限于形态学方面，进展不大。

1688 年，意大利科学家雷迪 (Francesco Redi, 1626—1697) 反驳了自然发生论，但证据并不充分。自然发生论的终结者是法国著名科学家巴斯德 (Louis Pas-

teur, 1822—1895), 他于 1861 年通过一个最令人信服然而十分简单的实验——“鹅颈瓶实验”证实了微生物并不是自然产生的。巴斯德的研究开创了微生物的生理学时代。人们认识到不同微生物间不仅有形态学上的差异, 在生理学特性上亦有所不同, 进一步肯定了微生物在自然界中所起的重要作用。自此, 微生物开始成为一门独立学科。巴斯德在蚕病、狂犬病、鸡霍乱和炭疽病的病原体研究和预防方面作出了卓越的贡献, 他发明的巴氏消毒法至今仍然用于各种液态食品的工业化生产。巴斯德被称为现代微生物学之父。

食品微生物的检验出现在德国细菌学家科赫 (Robert Koch, 1843—1910) 提出“科赫法则”之后。1884 年, “科赫法则”的发表推动了微生物培养技术的发展, 为食品微生物检验提供了最重要的手段。19 世纪末至 20 世纪初, 在巴斯德和科赫光辉业绩的影响下, 国际上形成了寻找病原微生物的热潮。由于国际间交往的增加, 尤其是第一次世界大战的爆发, 一些烈性传染病的全球性大流行, 促使人们必须将视线集中在病原微生物的研究方面, 一提到微生物, 人们就会联想到疾病与灾难。这时有关食品微生物检测的对象主要是致病菌, 这也是食品微生物检测的第一阶段。

事实上, 从样品中直接检测目的病原微生物有一定的难度, 原因在于环境中病原微生物数量少、种类多、生物学性状多样, 检验和鉴定的方法比较复杂。因此, 需要寻找某些带有指示性的微生物, 这些微生物应该在环境中存在数量较多, 易于检出, 检测方法较简单, 而且具有一定的代表性。根据其检出的情况, 可以判断样品被污染的程度, 并间接指示致病微生物有无存在的可能, 以及对人群是否构成潜在的威胁。这就是食品微生物检测的指示菌检测。指示菌是在常规安全卫生检测中, 用以指示检验样品卫生状况及安全性的指示性微生物。检验指示菌的目的, 主要是以指示菌在检品中存在与否以及数量多少为依据, 对照国家卫生标准, 对检验样品的饮用、食用或使用的安全性作出评价。指示菌可分为三种类型:

① 为了评价被检样品的一般卫生质量、污染程度以及安全性, 最常用的是菌落总数、霉菌和酵母菌数。

② 特指粪便污染的指示菌, 主要指大肠菌群。其他还有肠球菌、亚硫酸盐还原梭菌等。它们的检出标志着检品受过人、畜粪便的污染, 而且有肠道病原微生物存在的可能性。

③ 其他指示菌, 包括某些特定环境不能检出的菌类, 如特定菌、某些致病菌或其他指示性微生物。

食品微生物检验的第三个阶段是微生态制剂检测。厌氧菌广泛分布在自然界, 如土壤、沼泽、湖泊、海洋和淤泥中, 以及动植物体内, 尤其是广泛存在于人的皮肤和肠道中。19 世纪人们就发现并开始认识厌氧菌 (巴斯德, 1863), 但科学的发展并非一帆风顺, 直到 20 世纪 70 年代, 在了解到厌氧菌主要是无芽孢专性厌氧菌后, 科学家才开始重新这方面的研究。厌氧菌在人出生后数小时就开始在体内定

居,是人体中存在的主要微生物菌群之一,体内生态平衡时,与人体“和平共处”,体内生态失调时,成为人体感染的主要致病菌,形成厌氧菌感染症。由此,市场上出现了以乳酸菌、双歧杆菌为主,以调节生态平衡为目的的各种微生态制剂时,检验其菌株的特性和数量就成了20世纪末食品微生物检测的一项重要内容。

生物化学和分子生物学的发展,促进了微生物学的飞跃发展,从细胞水平进入亚细胞水平及分子水平。随着转基因动物、植物和基因工程菌被批准使用的数目以及进入商品化生产的种类日益增多,食品微生物检测的任务也更重。目前也发现了一些尚不能培养的微生物,这也促进了食品微生物检验技术的发展。检测技术方面也有极其迅速的发展,如电镜技术的进步,再配合生物化学、电泳法、免疫化学等,使人们对各种微生物的特性、抗原构造都有进一步的认识,从而对微生物的种属作出正确的分类和鉴定。

虽然食品微生物检测经历了几个重要的发展阶段,并且仍在快速发展,但微生物培养技术仍是众多检测手段的基石,也是我们学习的重点。新技术的应用使得检测更加快捷、准确,能够适应新形势下对食品微生物检测的要求,所以我们要了解这些新技术的基本情况,在需要的情况下能够利用这些技术来完成对食品中微生物的检验任务。

二、作用和地位

食品质量中的一项重要指标是与产品相关的微生物的含量,微生物数量超标的食品是严禁出售的。产品在出厂前都要经过抽查,检验合格后方可上市,并且在销售过程中会有监管部门对食品中的微生物情况进行监测。在我国,一些食品企业的卫生控制体系不够健全,许多产品不合格的原因就是微生物超标。食品在生产后往往要进行运输和分销,较长的保质期显然有利于食品的销售。如何延长食品的保质期一直是食品从业人员的研究热点,微生物是食品腐败变质的关键因素,对食品保质期的研究也主要集中在对微生物的控制方面,微生物检验伴随着整个研究过程。

食品安全关系到人民群众最基本的饮食问题,对社会的稳定和发展有重大的影响。发达国家在20世纪就把控制食品安全作为一项重要职能,并建立了相对完善的食品安全控制体系,比如欧盟和加拿大的“从农场到餐桌”(from farm to fork)全程追踪控制系统。随着我国经济的快速发展和人民群众生活水平的提高,食品安全问题越来越被政府和民众重视。微生物超标问题在食品安全中占据着举足轻重的地位,许多食品安全事故是由微生物引起的,比如1990年5~8月日本爆发O157:H7大肠埃希菌(简称大肠杆菌)感染事件,有9000多人患病,10余人死亡。微生物超标是我国食品安全的主要问题之一,这也是由我国许多食品企业技术和管理相对落后的现状决定的。菌落总数是衡量食品被有害微生物污染程度的指标,在国家抽查过程中,菌落总数超标现象普遍(2005年)。因此,食品微生物检验具有重

要意义。通过检验来发现和处理食品中微生物超标的问题,进一步促进企业对食品微生物的控制能力,使产品达到安全要求。

在食品对外贸易方面,涉及食品的出口和进口。出口的食品被外国检测机构检验出微生物超标就会被滞压、销毁或退货,从而使企业遭受重大损失。20世纪90年代末期,中国加入世贸组织以来,欧盟多次检出从中国进口的肉类有微生物问题,结果对我国动物源性食品全面禁止进口。而外国的食品在中国检出微生物超标时,部分外国企业往往声称他们有良好的卫生控制系统,质疑检测结果,引起双边摩擦。所以,一方面,国内食品企业要加强微生物的检验和控制;另一方面,要提高食品微生物检验的水平,使检验结果具有国际认可度。

三、食品微生物快速检测和自动化

近年来,微生物的快速检测和自动化研究进展迅速。快速检测及自动化综合利用微生物学、化学、生物化学、生物物理学、免疫学以及血清学试验技术,对微生物进行分离、检测、鉴定和计数。与依靠培养基进行培养、分离及生化鉴定的传统方法相比较,快速检测的速度更快、操作更方便、灵敏度更高。快速检测有两个方面的意思:一是反应速度由常规方法所需要的几个小时、几天或几星期缩短到几秒、几分钟或几个小时;二是每次处理的样品量,由常规的一次一个样品改进到一次10个、50个、96个甚至更多的样品。而自动化则指与操作者常规手工操作一次一个或多个样品相比,用各种仪器辅助的半自动化和完全由机器人完成的自动化。

1. 取样和样品制备

自动稀释器可将一定量的食品样品置于事先在天平上称量并去掉皮重的拍击袋或无菌均质杯中,确定稀释倍数(如1:10、1:100、1:1000),仪器将自动称量并释放所需的稀释液。也可使用可调程序的蠕动泵进行类似操作来获得所需的稀释度。胃蠕动式样品拍击器是在一次性无菌塑料袋中将样品打碎,无需在制样时灭菌和使用均质杯。先称取样品,放入袋中稀释,再将袋置于胃蠕动式样品拍击器中,两只拍击板不停地拍击样品,将样品中的微生物游离出来。操作者从拍击后的样品中取出一定量进行系列稀释,用后将袋弃去。

2. 活细胞计数检测

自动旋转平板和激光菌落扫描计数法,在均匀薄层琼脂培养基表面,以阿基米德螺旋线方式将液体样品从中心到边缘均匀输在平板上,经过培养,在计数格区间内计数,或用激光计数器来扫描平板,以透过光的强度来检测菌落的存在。直接荧光过滤膜技术利用紫外线显微镜来快速测定活菌数,首先用一特殊滤膜过滤样品,经吖啶橙染色后,用紫外线显微镜观察,活细胞呈橙色荧光,死细胞呈绿色荧光。

3. 微生物数量和菌量的估计

通过微生物生长所引起的物理、生物化学、生物物理指标的变化来对样品中的

微生物量进行估计,其中有 ATP 水平、阻抗和导电、接触酶的测定等。

化学发光的原理是利用可发光化学物质测定被分析物质的浓度。所有生物体的磷酸核苷酸 (ATP) 含量是相对固定的,当萤火虫酶系统和 ATP 接触时,发生光生物学反应,就会发光。在荧光素和荧光酶过量时,荧光强度与 ATP 含量成正比关系。用 ATP 生物发光确定细菌总数的准确程度依赖于从食品样品中细菌分离的效果和实验前将样品本身的 ATP 消除的程度。

很多分析技术是依赖于测定微生物的代谢活性而建立的,这些测量仪包括阻抗测量仪、染料还原测量仪、附产物(如热量、毒素、酸)生成测量仪等。阻抗测定的原理是,当细菌生长时,将大分子物质降解成小的带高电荷的粒子,从而改变周围培养基的导电性能。通过测定阻抗或电导变化,可以了解生物活动情况。当微生物含量达到某一阈值时,阻抗的变化与微生物含量呈相关性,即与污染程度呈相关性。

微热量计法 (microcalorimetry) 是利用细菌生长而产生热量的原理设计而成的。微生物在生长过程中产生热量,虽然产生的量很小,但仍能通过敏感的微热量计进行测量。用微热量计对微生物计数时,温谱图必须与微生物的绝对数量呈相关性,一旦建立了参考温谱图,被检食品温谱图便可与之相比较,从而得到样品中微生物的绝对数量。由于这种方法依赖仪器对热量的超强敏感性,应用受到一定的限制。

放射测量法 (radiometric) 利用细菌代谢碳水化合物而产生 CO_2 的原理,把微量的放射性标记源引入葡萄糖或其他糖类分子中,细菌生长时,糖被利用并放出含放射标记的 CO_2 。接触酶实验是利用接触酶反应来估计食品中微生物含量的快速方法。由这一原理设计出的仪器称为接触酶测定仪 (catalasometer)。其原理是通过计算一个含有接触酶的纸盘,在盛有 H_2O_2 的试管中的漂浮时间来估计菌数。当样品中接触酶含量高时(表明接触酶阳性细菌含量高),纸盘上浮的时间短(以 s 计)。反之,接触酶的浓度低,纸盘上浮的时间长(以 100~1000s 计)。可以用接触酶反应水平来估计某些食品中的嗜冷性菌群。

4. 常规操作微型化及计算机自动化分析鉴定系统

20 世纪 70 年代以来,微生物学常规方法进行了微型化改进。这些微型化法已成功地应用于微生物研究中。如微滴盘,它可以一次装入 96 个不同的培养基,或 48 个重复,使培养基的用量由 10mL 减少到 0.2mL,还有多头接种针与之配合使用,从而大大降低了工作量,适合大量微生物的分离或新的培养基的筛选。

自动微生物检测系统 (AMS) 是一种由传统生化反应及微生物检测技术与现代计算机技术相结合,运用概率最大近似值模型法进行微生物监测的技术。该系统对待检菌的鉴定,首先要求将手工分离的待检菌的纯菌制成符合一定浊度要求的菌悬液,然后充入细菌检测卡片,封口后放入读数器/恒温培养箱进行培养,根据被鉴卡片各介质反应情况,由读数器按光学扫描原理定时测定,并和预定的阈值进行

比较、分析，于 4~18h 内通过数据终端自动显示并打印结果报告，自动化程度非常高。

5. 免疫学方法检测

生化免疫反应快速检测试剂盒中应用的免疫学反应类型包括免疫扩散反应、凝集反应、免疫荧光反应、酶免疫试验（EIA）和酶联免疫吸附试验（ELISA）。免疫扩散技术中，抗体在液体或固体培养基中结合成不溶的抗原抗体复合物，产生可见的沉淀物，这种反应可在液体或固体培养基中进行。凝集反应的原理是细菌和细胞等颗粒性抗原与相应抗体特异性结合后，在适量的电解质存在下，可以出现肉眼可见的凝集现象。将荧光素标记在相应的抗体上，直接与相应抗原反应，成为免疫荧光反应。

酶免疫技术就是抗原抗体的免疫反应和酶的高效催化作用有机地结合起来，使抗原抗体的免疫反应和酶的高效催化放大作用同时显示出来的新技术。应用此新技术的试验称为酶免疫试验。ELISA 主要是基于抗原或抗体能吸附至固相载体的表面并保持其免疫活性，抗原或抗体与酶形成的酶结合物仍保持其免疫活性和酶催化活性的基本原理。在测定时，把受检标本（测定其中的抗体或抗原）和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应，用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开，最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量有一定的比例，加入酶反应的底物后，底物被酶催化变为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，根据颜色反应的深浅进行定性或定量分析。

6. 分子生物学方法

DNA 探针是最常用的核酸探针，指长度在几百碱基对以上的双链 DNA 或单链 DNA 探针。DNA 探针共有两种类型：一种是含有放射性标记的探针；另一种是无放射性标记的探针。有放射性标记的核酸探针的特异性非常强，检测病原微生物速度比常规方法快得多。无放射性标记的核酸探针类型很多，应用较广泛的有用生物素-抗生物素蛋白系统标记的非放射性核酸探针。生物素-抗生物素蛋白系统标记的探针已在沙门菌、产肠毒素大肠杆菌及乙型肝炎病毒检测中得到了应用。

PCR（polymerase chain reaction）即聚合酶链式反应的简称。利用 PCR 检测食品中的致病菌，可以对那些人工难以培养的微生物进行检测。由于在所有细菌中编码 rRNA 的一些基因保守性很强，因此可用 PCR 扩增其相应的 DNA 片断，来快速、灵敏地检测样品中是否存在某些细菌或致病菌，尤其是那些人工无法培养的微生物。

DNA 指纹图谱自动分析系统是从细菌细胞中提取 DNA，接着用限制性酶将 DNA 降解成片段，DNA 片段通过电泳得到分开，再转移至杂交膜上与 DNA 探针杂交。由于引入了化学发光标记物，杂交片段发现的光线被相机捕获，得到的核酸图谱与其他储存的 DNA 核酸碱基序列进行比较，通过核酸匹配分析可以对微生物

进行鉴定。

近年还来出现了一批可将病原菌鉴定至种以下水平的分子亚型分型方法,包括质粒 DNA 分析方法、基因组 DNA 微限制和巨限制分析方法、PCR 亚型分型方法等。

快速检测和自动化是食品微生物检测的发展方向,很多相关技术涉及比较前沿的研究发现,但其基本原理并不是很难理解。在此我们只需要对这些技术有所了解,对微生物检测领域有个基本的认识。本课程主要介绍食品微生物常规的检测方法,尽管如此,也会涉及一些新的技术和设备,食品微生物检测人员必须掌握这些知识。

第二节 食品中的微生物

沿用微生物分类的一般标准,食品中的微生物主要包括细菌、霉菌、酵母和一些原生动物。这些微生物并非全是有害的,对这些微生物的检测也具有选择性。

一、食品微生物的分类

1. 细菌

细菌是在自然界分布最广、个体数量最多的有机体,同时也是与食品安全关系最密切的微生物,许多细菌本身或其代谢产物对人体有毒害作用。食品中的细菌种类主要有:不动杆菌、欧文菌、片球菌、气单胞菌、埃希菌、变性菌、产碱菌、黄杆菌、假单胞菌、芽孢杆菌、哈夫尼菌、嗜冷杆菌、索丝菌、考克菌、沙门菌、弯曲杆菌、乳球菌、沙雷菌、肉杆菌、乳杆菌、李斯特菌、葡萄球菌、梭状芽孢杆菌、微球菌、漫游球菌、肠杆菌、莫拉菌、弧菌、肠球菌、类芽孢杆菌、魏斯菌、泛菌和耶尔森菌。

2. 霉菌

霉菌是丝状真菌的俗称,意即“发霉的真菌”,它们往往能形成分枝繁茂的菌丝体,但又不像蘑菇那样产生大型的子实体。有些霉菌能够合成有毒代谢产物——霉菌毒素。与食品相关的霉菌主要有:链格孢、枝孢霉、毛霉、曲霉、刺盘孢霉、青霉、短杆霉、尖镰孢、根霉、葡萄孢、白地霉、木霉、丝衣霉、丛根孢、*Wall-emia* 和 *Xeromyces*。

3. 酵母

酵母和霉菌同属真菌,所有的发酵食品都与酵母菌有关。食品中常见的酵母菌有:酒香酵母、伊氏酵母、裂殖酵母、假丝酵母、克鲁维酵母、孢酵母、隐球酵母、毕赤酵母、丝孢酵母、德巴里酵母、红酵母、接合酵母、有孢汉逊酵母。

4. 原生动物

食品中的原生动物主要有贾地虫、痢疾内变形虫、鼠弓形虫和 *Cryptosporidium parvum*。

二、食品微生物的来源

1. 土壤

土壤中的微生物数量众多,可达 $10^7 \sim 10^9$ 个/g。土壤中的微生物种类十分庞杂,其中细菌占有比例最大,可达 70%~80%,放线菌占 5%~30%,其次是真菌、藻类和原生动物。不同土壤中微生物的种类和数量有很大差异,在地面下 3~25cm 是微生物最活跃的场所,肥沃的土壤中微生物的数量和种类较多,果园土壤中酵母的数量较多。土壤中的微生物除了自身发展外,分布在空气、水和人及动植物的微生物也会不断进入土壤中。许多病原微生物就是随着动植物残体以及人和动物的排泄物进入土壤的。

2. 空气

空气中的微生物主要为霉菌、放线菌的孢子和细菌的芽孢及酵母。不同环境空气中微生物的数量和种类有很大差异。公共场所、街道、畜舍、屠宰场及通风不良处的空气中微生物的数量较高。空气中的尘埃越多,所含微生物的数量也就越多。室内污染严重的空气微生物数量可达 10^6 个/ m^3 ,海洋、高山、乡村、森林等空气清新地方微生物的数量较少。空气中可能会出现一些病原微生物,它们直接来自人或动物呼吸道、皮肤干燥脱落物及排泄物或间接来自土壤,如结核杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门菌、流感嗜血杆菌和病毒等。

3. 水

自然界中的江、河、湖、海等各种淡水与咸水水域中都生存着相应的微生物。由于不同水域中的有机物和无机物种类和含量、温度、酸碱度、含盐量、含氧量及不同深度光照度等的差异,因而各种水域中的微生物种类和数量呈明显差异。通常水中微生物的数量主要取决于水中有机物质的含量,有机物质含量越多,其中微生物的数量也就越大。

4. 人及动物体

人体及各种动物,如犬、猫、鼠等的皮肤、毛发、口腔、消化道、呼吸道均带有大量的微生物。当人或动物感染了病原微生物后,体内会存在有不同数量的病原微生物,其中有些菌种是人畜共患病原微生物,如沙门菌、结核杆菌、布氏杆菌 (*Bacterium burgeri*)。这些微生物可以通过直接接触或通过呼吸道和消化道向体外排出而污染食品。蚊、蝇及蟑螂等各种昆虫也都携带有大量的微生物,其中可能有多种病原微生物,它们接触食品同样会造成微生物的污染。