



海洋生物及制品微生物检测 实用手册

◎ 沈 飏 主 编

ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

海洋生物及制品微生物 检测实用手册

沈 飏 主 编



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

海洋生物及制品微生物检测实用手册 / 沈飏主编.

—杭州:浙江大学出版社,2014.11

ISBN 978-7-308-14055-3

I. ①海… II. ①沈… III. ①海洋生物—微生物检定

—手册②海洋生物—生物制品—微生物检定—手册 IV.

①Q178.53-62②Q93-331

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 265513 号

海洋生物及制品微生物检测实用手册

沈 飏 主 编

责任编辑 石国华

封面设计 刘依群

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州星云光电图文制作有限公司

印 刷 杭州日报报业集团盛元印务有限公司

开 本 710mm×1000mm 1/16

印 张 20

字 数 380 千

版 印 次 2014 年 11 月第 1 版 2014 年 11 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-14055-3

定 价 38.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部联系方式:0571-88925591; <http://zjdxcb.tmall.com>

编委会

主 编 沈 飏(舟山检验检疫局)

主要编写人员 胡兴娟 王忠发 张祖舜 杨赛军

编 写 人 员 陈笑梅 徐君辉 江玲丽 汪云泉

朱应伟 周向阳 龙 彪 周秀锦

邵宏宏 张 静 施 进 丁 颢

单长林 贝文联 吴 刚 何 明

屠卡滨 林日斌 陶海波

前 言

海洋生物包括了很多的种类,大多数是同我们人类生活直接相关的可以食用的产品。民以食为天,食品的安全事关人民健康的大问题,它关系到国家在世界的影响力,关系到人民对政府的信任度,关系到人民的生存环境。食品引发的安全事件时常发生,特别是微生物方面的问题已成为重要的食品中毒事件的原因。所以,食品中微生物检测技术是保障食品安全的重要部分,不仅对食品安全有重要意义,对中国及世界贸易发展都具有十分重要的意义。

本书主要介绍了海洋生物及制品的微生物检测实验室的基本要求,微生物实验室的生物安全等,国外检验标准及限量标准,抽样的方法等,以及海洋生物及制品微生物检测基础知识,检测的方法和包括细菌、真菌、病毒及其各类的经典检测方法和先进的检测方法。

本书的编写者均为一线检测岗位的技术人员,他们结合多年来的实践经验,收集了多种检测技术,与大家分享。在此,对本书的编写付出辛勤劳动的所有相关人员,表示衷心的感谢。希望该书能对卫生防疫、医药、外贸、科研单位等从事食品安全管理、加工、检测、研究人员有参考的价值。

由于编者水平有限,纰漏和不足在所难免,敬请同行和广大读者批评指正。

编 者

2014年9月

目 录

第一章 概 述	(1)
第一节 海洋生物制品定义和分类	(1)
一、海洋生物制品定义	(1)
二、海洋生物制品分类	(1)
第二节 海洋生物制品微生物学特性	(3)
一、海洋生物制品微生物学安全性	(3)
二、海洋生物制品主要致病性微生物种类	(6)
三、海洋生物制品微生物的主要来源	(6)
四、海洋生物制品微生物的控制规范	(7)
第二章 海洋生物制品微生物检测实验室的质量管理	(9)
第一节 海洋生物制品微生物检测实验室的质量控制要求	(9)
一、管理要求	(9)
二、技术要求	(14)
三、过程控制要求	(21)
四、内部质量控制和外部质量评估	(24)
第二节 海洋生物制品微生物实验室仪器设备的校准、维护和性能确认	(25)
一、仪器设备的校准	(25)
二、微生物检测实验室常用仪器设备的校准、维护和性能确认	(29)
三、微生物检测实验室仪器的验证	(29)
第三节 微生物实验室的生物安全管理	(30)
一、微生物实验室生物安全	(30)
二、生物安全实验室安全设备	(32)
三、微生物实验安全措施	(37)

四、微生物实验室安全应急程序	(41)
第三章 海洋生物制品样品的收集和制备	(44)
第一节 取样的原理和方案	(44)
一、取样的原理	(44)
二、取样的方案	(46)
第二节 取样的方法	(47)
一、基本取样的要求	(47)
二、取样工具	(48)
三、常用取样方法	(49)
第三节 样品的制备	(51)
一、样品制备常用的器具	(51)
二、前处理	(51)
三、混合和均质	(52)
四、稀释液的制备	(52)
第四章 海洋生物制品微生物的检测	(54)
第一节 主要微生物检测项目及其限量	(54)
一、海洋生物制品中主要致病菌	(54)
二、国外海洋生物制品微生物检测项目及限量要求	(68)
第二节 病原菌的检测	(90)
一、病原菌检测的一般方法	(90)
二、沙门氏菌检测	(110)
三、霍乱弧菌	(118)
四、副溶血性弧菌	(125)
五、单核细胞增生李斯特菌	(133)
六、出血性大肠杆菌 O157:H7	(138)
七、金黄色葡萄球菌	(142)
八、亚硫酸盐还原厌氧菌	(145)
九、志贺氏菌	(146)
十、罐头食品商业无菌	(152)
第三节 卫生指示菌检测	(154)

一、卫生指示菌的概念及选择原理	(154)
二、海洋生物制品中卫生指示菌	(160)
三、菌落总数检测	(160)
四、肠球菌检测	(164)
五、大肠杆菌、大肠菌群、粪大肠菌群	(165)
六、金黄色葡萄球菌计数	(177)
七、霉菌酵母菌计数	(182)
第四节 海洋生物制品主要病毒检测技术	(186)
一、海洋生物制品中病毒检测技术概述	(186)
二、海洋生物制品中病毒常用检测技术	(195)
三、海洋生物制品中急性胃肠炎病毒及其检测	(202)
四、水产食品中甲型肝炎病毒(Hepatitis A Virus)及其检验	(226)
五、海洋生物制品中肠道病毒及其检测	(237)
附录 A 实验常用培养基配置成分	(247)
附录 B 食品生产经营过程中微生物控制指导原则	(299)
附录 C 消毒效果监测	(306)
参考文献	(309)

第一章 概 述

第一节 海洋生物制品定义和分类

一、海洋生物制品定义

1. 海洋生物定义:海洋里具有动能的生命体,也是一个物体的集合,而个体生物指的是生物体。其元素包括:在自然条件下,通过化学反应生成的具有生存能力和繁殖能力的有生命的物体以及由它(或它们)通过繁殖产生的有生命的后代,能进行呼吸。

2. 海洋生物制品定义:以海洋生物作为主要原料,为了满足消费者、运输、储存等需要,加入或不加入一定的敷料,采取烘、蒸、干、腌、熏、泡、提取等加工工艺制成的,具有一定特色味道,可直接食用或经过加工再食用的海洋生物制品。

二、海洋生物制品分类

海洋生物品种很多,常见海洋生物如图 1-1 所示。我国海域记录到了 20278 种海洋生物,这些海洋生物隶属于 5 个生物界、44 个生物门。其中动物界的种类最多(12794 种),原核生物界最少(229 种)。我国海洋生物种类约占世界海洋生物总种数的 10%。

(一)海洋生物的分类

(1)海洋哺乳动物。我国现有各种海兽 39 种,如各种鲸类、海豚、海豹、海狮、儒艮等。

(2)海洋爬行动物。爬行动物是体被角质鳞片,在陆上繁殖的变温动物。

(3)海洋鸟类。海洋鸟类的种类不多,在中国海域里共记录了 183 种海鸟,如红喉潜鸟、黑脚信天翁、海燕、小军舰鸟、海雀、白鹭、海鸥等。

(4)海洋鱼类。鱼类是脊椎动物中最低级的一个类群。在我国海域里,目前已记录到海洋鱼类 3023 种,其中软骨鱼类 237 种、硬骨鱼类 2786 种,约占我国全部海洋生物种类的 1/7。

(5)海洋节肢动物。目前,在中国海共记录节肢动物 4362 种,约占中国海全部海洋生物物种的 1/5,如鲎、虾类、蟹类等。



图 1-1 常见海洋生物

(6)海洋软体动物。在中国海共记录到各类软体动物 2557 种,约占中国海全部海洋生物种的 1/8,如石鳖、贻贝、珍珠贝、扇贝、牡蛎、文蛤、乌贼、章鱼等。

(7)海洋腔肠动物。腔肠动物因其特有刺细胞,故又被称作为刺胞动物。目

前,在中国海记录到各种海洋腔肠动物,共计是 1010 种,它们分属于腔肠动物门的三个纲。

(8)海洋植物。海洋植物可以简单分为两大类:低等的藻类植物和高等的种子植物。

(二)海洋生物制品分类

海洋生物制品类别繁多,在世界上也没有一个统一的分类方法,国外先进的国家,也都按照生产、加工等方面的需要,同时按照基本国情、人民习俗来简单分类。我国的地域广阔大,人口、民族众多,饮食文化习俗差距,还有出口产品要符合进口国的要求,海洋生物制品种类极其繁多。因此,结合各个因素、科学分类方式,可将海洋生物制品划分为类和种(见表 1-1),分类的原则如下:

类是以加工工艺为基础,当同一产品采用几种工艺,以决定该产品最后特色的加工工艺为准。种是指海洋生物的品种而区分。

表 1-1 海洋生物制品分类

类	种
熟制品	熟虾、熟鱼等
腌制品	盐渍小虾,咸螃蟹,海蜇等
干制品	鱿鱼丝,虾干、虾米等
熏烤制品	烟熏三文鱼、烤鱼等
冷冻	冻虾仁、冻安康鱼、章鱼等
罐头	青鱼罐头,金枪鱼罐头,蟹肉罐头等
提取制品	胶原蛋白,角鲨烯胶丸、氨基酸、保健品等
即食生制品	寿司虾、生鱼片等

第二节 海洋生物制品微生物学特性

一、海洋生物制品微生物学安全性

海洋生物美味、营养价值高,成为人们膳食的主要产品。含丰富蛋白质、22 种氨基酸,并含有脂肪、糖类和多种维生素、无机盐钙、镁,还含有较丰富的铁、锌、铜、锰、钴、硒、维生素 A、维生素 B₁、维生素 B₂ 等。由于营养成分丰富,所以最容易受微生物的污染而导致变质。活的海洋生物的肌肉组织里一般无病原菌生存,但由于海洋生物如此丰富的营养成分,通过海洋、加工、运输、储藏、销售等环节极容易遭受细菌、霉菌、病毒等微生物污染。由于致病性细菌、腐败菌、产毒菌、病毒等污染,在适宜的温度下会很快繁殖,使海洋生物制品腐败变质,失去了商业和食用价值,更可怕的是会导致国际性的食品安全事件,造成消费者食物中毒,危害健康甚至生命,表 1-2 为国内外安全事件。

表 1-2 细菌性食物中毒细菌的分类(2002—2011 年)

致病因素	中毒起数(起)	占比(%)	中毒人数(人)	占比(%)
致病性大肠杆菌	6	37.5	137	32.31
金黄色葡萄球菌	4	25.0	78	18.40
志贺氏菌属	2	12.5	41	9.67
沙门氏菌属	2	12.5	138	32.55
副溶血性弧菌	1	6.25	24	5.66
原因不明	1	6.25	6	1.42
合计	16	100.00	424	100.00

根据中国疾病预防控制中心相关报道数据:2012 年,中国疾病预防控制中心收到全国食物中毒类突发公共卫生事件(以下简称食物中毒事件)报告 174 起,中毒 6685 人、死亡 146 人,其中微生物性食物中毒事件中中毒人数最多,占总数的 56.1%。主要是由沙门氏菌、蜡样芽孢杆菌、副溶血性弧菌、大肠杆菌、肉毒毒素、葡萄球菌肠毒素、变形杆菌、气单胞菌、志贺氏菌等引起的细菌性食物中毒^①,表 1-3 为美国李斯特菌感染暴发场所及污染的食品统计。

1998—2008 年美国食源性疾病暴发概况见表 1-4。

表 1-3 2009—2011 年美国李斯特菌感染暴发场所及污染的食物

年份	报告起数	中毒发生的场所	污染的食物
2009	18	私人家庭	墨西哥奶酪
	8	私人家庭	墨西哥奶酪
2010	8	私人家庭	猪头肉冻
	2	私人家庭	寿司卷
	4	医院餐厅	未知
	10	医院餐厅	芹菜
	6	私人家庭	墨西哥奶酪
	2	未知	未知
2011	2	私人家庭和餐馆	韭菜奶酪
	147	私人家庭	哈密瓜
	2	私人家庭	墨西哥奶酪
	15 ^{††}	婚宴	蓝纹奶酪

① 中国 CDC 网站, http://www.chinacdc.cn/tjsj/tfggwssj_1696/201303/t20130307_78236.htm。

表 1-4 1998—2008 年美国食源性疾病暴发概况

病例	中毒人数				患病人数				住院人数				死亡人数			
	确诊 人数	疑似 人数	总数		确诊 人数	疑似 人数	总数		确诊 人数	疑似 人数	总数		确诊 人数	疑似 人数	总数	
			总人 数	占比 (%)			总人 数	占比 (%)			总人 数	占比 (%)			总人 数	占比 (%)
蜡样芽孢杆菌	56	179	235	3	881	1169	2050	1	7	10	17	0	0	0	0	0
空肠弯曲杆菌	121	19	140	2	4503	78	4581	2	84	10	94	1	0	0	0	0
弯曲杆菌属	46	22	68	1	509	96	605	0	28	7	35	0	0	0	0	0
肉毒梭菌	29	4	33	0	106	15	121	0	84	4	88	1	5	1	6	3
产气荚膜梭菌	253	283	536	7	13182	7862	21044	10	74	14	88	1	5	3	8	4
产毒素大肠杆菌	13	6	19	0	1400	647	2047	1	11	3	14	0	0	0	0	0
产志贺毒素大肠杆菌	286	22	308	4	6306	319	6625	3	1238	33	1271	16	21	1	22	11
其他大肠杆菌	1	3	4	0	12	10	22	0	0	8	8	0	0	0	0	0
李斯特菌	24	1	25	0	350	3	353	0	216	0	216	3	48	0	48	25
沙门氏菌	1291	158	1449	18	37394	1732	39126	19	3952	82	4034	50	58	2	60	31
弗氏志贺菌	18	2	20	0	1189	4	1193	1	55	1	56	1	0	0	0	0
宋氏志贺菌	86	10	96	1	4663	248	4911	2	117	4	121	1	1	0	1	1
志贺氏菌属	14	4	18	0	251	209	460	0	19	2	21	0	0	0	0	0
金黄色葡萄球菌	167	291	458	6	4818	1977	6795	3	296	37	333	4	3	0	3	2
副溶血弧菌	37	34	71	1	1056	165	1221	1	22	3	25	0	0	0	0	0
弧菌属	5	8	13	0	16	17	33	0	1	2	3	0	0	0	0	0
小肠结肠炎耶尔森菌	11	0	11	0	100	0	100	0	8	0	8	0	0	0	0	0
其他细菌	26	103	129	1	1280	719	1999	1	65	5	64	1	0	0	0	0
细菌总数	2466	1147	3613	45	76827	15266	92093	45	6222	224	6446	80	141	7	148	77

来源:美国 CDC, <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6222a4.htm>。

随着环境的恶劣、大量抗生素的使用,使微生物不断产生抗体、变异,对环境的适宜性和抵抗性增强,传染性急剧提高,对社会的危害越来越大,极可能造成大范围的安全事件。所以海洋生物制品的卫生安全被国际和国内高度重视,也是民生的要求,必须完善微生物检验和监控体系,增强预防和处理的能力。

二、海洋生物制品主要致病性微生物种类

致病性微生物种类主要分致病性细菌和致病性病毒,见表 1-5。

表 1-5 主要致病性微生物种类

	序号	中文	英文
主要致病性细菌	1	霍乱弧菌	<i>Vibrio cholerae</i>
	2	副溶血性弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
	3	创伤弧菌	<i>Vibrio vulnificus</i>
	4	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>
	5	空肠炎弯曲杆菌	<i>Campylobacter jejuni</i>
	6	沙门氏菌	<i>Salmonella</i>
	7	单核细胞增多性李斯特菌	<i>Listeria monocytogenes</i>
	8	肠出血性大肠杆菌 O157:H7	<i>E. coli</i> O157:H7
	9	阪崎肠杆菌	<i>Enterobacter sakazakii</i>
	10	志贺氏菌	<i>Shigella</i>
	11	小肠结肠炎耶尔森菌	<i>Yersinia enterocolitica</i>
	12	蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>
	13	假单胞杆菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	14	产气荚膜梭菌	<i>Clostridium perfringens</i>
	15	肉毒梭菌	<i>Clostridium botulinum</i>
	16	乙型溶血性链球菌	<i>Beta-hemolytic streptococcus</i>
	17	变形杆菌	<i>Proteus</i>
主要致病性病毒	1	札如病毒	<i>Sapovirus, SV</i>
	2	轮状病毒	<i>Rotavirus</i>
	3	星状病毒科	<i>Astroviridae</i>
	4	甲型肝炎病毒	<i>Hepatitis A Virus</i>
	5	戊型肝炎病毒	<i>Hepatitis E Virus</i>
	6	脊髓灰质炎病毒	<i>poliovirus</i>
	7	柯萨奇病毒	<i>Coxsackievirus</i>

三、海洋生物制品微生物的主要来源

(一)新鲜海洋生物及制品的主要微生物来源

一般情况下,健康的海洋生物的胴体,特别是肌肉组织深部是无菌的,但从海洋、捕捞、解体、运输等环节到最终消费者经过了很多环节,不可能保证无微生物污

染。所以新鲜海洋生物微生物的来源与很多因素有关。

1. 海洋污染。随着海洋环境的不断恶化,海洋生物的体表及一些与外界相通的腔道,尤其是消化道内、肠腺等组织微生物种类更多,通常情况下,这些微生物不侵入肌肉等机体组织中,但当海洋生物肌体抵抗力下降,某些病原性或条件致病菌微生物,容易侵入。如副溶学弧菌等进入淋巴、血液、内脏以至肌肉组织。

2. 捕捞污染。由于海洋生物在捕捞操作过程中,通过机械的工具,还有渔民的卫生安全意识的缺乏会造成体表的创伤、感染,还有渔民的卫生安全意识的缺乏,也会把致病微生物污染整个新鲜的海洋生物。

3. 海洋生物在运输、买卖、交易等过程中,由于各种不良的影响,容易受到空气、水、环境、工具等因素影响,被病原微生物污染,造成风险。

(二) 冷冻海洋生物及制品的主要微生物来源

冷冻海洋生物及制品的主要微生物来源主要为:加工、储存、运输、销售过程污染。

1. 海洋生物制品从新鲜到加工厂制成产品,需要经过很多程序,如剖、剥、分、摊、拈、泡等工序,还要很多的人经手,所以加工卫生条件不好,很容易造成污染。

2. 冷藏、冷冻的条件。冷藏有利于低温、湿度合适的微球菌和酵母菌等生长,冷冻适合嗜冷的细菌生长和存活。

3. 运输过程的污染。海洋生物制品在搬运过程中和不洁的表面直接接触,运输车的卫生情况、运输包装的容器、运输的温度、人员接触的情况等都易造成微生物的污染。

4. 销售过程的污染。因为市场中空气含有大量的病原微生物,市场人员进出繁多,造成污染概率提升;由于市场卫生状况不是太好,所用到的材料也不是经常清理和消毒处理,也造成了产品的污染。

四、海洋生物制品微生物的控制规范

1. 设施设备的卫生。分析每种产品、每个生产工段的设施设备在保持卫生方面应采取的措施,包括防蝇、防鼠、防蟑螂,空气净化(防止细菌和尘埃飘落),防止铁锈油漆剥脱、落屑及其他防止异物的措施等。

2. 机械器具的卫生。生产加工过程中使用的各种用具、容器、机械类、管道、操作台等均不能有细菌生存繁殖的死角。这里需要强调的是实行机械化、管道化、密闭化的同时,必须重点把握住管道内彻底的洗涤消毒。否则,这种管道化、密闭化就增加了细菌生长繁殖的死角和条件,提高了产品的污染程度。

3. 从业人员的个人卫生。所有从业人员必须经过卫生知识培训合格和体格检查合格,要有良好的个人卫生习惯。如工作服清洁、合体,生产前和便后洗手消毒,销售时不用手抓直接入口的食品等。

4. 控制微生物的繁殖。微生物得以繁殖需具备 3 个基本要素,即水分、温度、

养分。在处理水分多的食品原材料的企业,能控制的就是温度,与此有密切关系的是时间。在规定工艺总体温度控制(包括加热烹调与灭菌工艺)的同时,还需要规定各工段温度控制的基本时间。

5. 日常的微生物监测监控。食品企业必须建立日常的微生物监测监控体制,并确实地实行。这一工作不仅限于对成品、原材料采样检验,还要求按工段采取样品,检验容器、工具机械等,还应该制定企业内控标准,按企业标准(不仅是成品)检查每个工段、每批产品过程是否都能达标。国内企业的食品安全意识日益增强,对于产品质量,消费者会通过他们的购买进行判断,那些提供高品质产品以及在食品过程中严格遵循相关质量标准的企业将最终获得消费者的青睐。对于食品生产企业无论是手工生产还是自动化生产,HACCP 都是一个非常好的工具,建议食品企业严格遵循 HACCP 要求,广泛开展食品安全保障工作。

第二章 海洋生物制品微生物检测实验室的质量管理

控制海洋生物制品中微生物的危害,首先要控制从捕捞到餐桌的全过程监控,其次要加强对该过程的中致病性微生物的检测。由于微生物的特殊生物学特征,因此微生物的检测必须在特定的场所微生物实验室内进行。海洋生物制品微生物实验室是进行海洋生物制品微生物检测、加工环境中微生物检测、添加剂的微生物检测、包装材料微生物检测、微生物的毒素检测、加工用水等微生物检测和评估的专业实验室。

海洋生物制品微生物实验室的建设和配套环境设施的科学性和合理性、检测人员的素质、检测的器具和消耗材料的质量、检验方法的实用性、仪器设备的状态、内部质量控制和外部质量评估等,都直接关系到微生物检测质量,也关系到食品安全,甚至关系人身安全和外向型经济发展。因此,必须对微生物实验室进行科学、合理的管理。

第一节 海洋生物制品微生物检测实验室的质量控制要求

一、管理要求

(一)组织和管理

(1)海洋生物制品微生物检测实验室或其所在的组织应具有明确的法律地位。

(2)实验室有责任使其检测活动既符合实验室质量管理的规定与要求,又满足客户、管理机构或认可组织的要求。

(3)实验室管理体系应覆盖其固定场所、远离固定场所的其他地点、临时或可移动场所的所有工作。实验室固定设施以外的场所,如在其他地点的实验室、流动实验室、抽样现场或野外进行检测和抽取样品的现场,都必须在适当的技术控制和有效监督下进行,需要时应在各站点设授权签字人,并保留所有相应活动的记录。

(4)若实验室是不从事检测活动的母体组织的一部分,应明确规定母体组织中可能对检测人员有影响的责任权限,实验室人员不应因经济或政治因素影响检测。

(5)实验室管理层应负责质量管理体系的设计、实施、维持及改进,包括: