

高职高专“十一五”规划教材

杨玉红 主编

**食品** SHIPIN

**微生物检验技术**

WEISHENGWU JIANYAN JISHU



中国计量出版社

CHINA METROLOGY PUBLISHING HOUSE

高职高专“十一五”规划教材

# 食品微生物检验技术

杨玉红 主编

中国计量出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

食品微生物检验技术 / 杨玉红主编. —北京:中国计量出版社,2011.1

高职高专“十一五”规划教材

ISBN 978-7-5026-3374-5

I. ①食… II. ①杨… III. ①食品微生物—食品检验—高等学校:技术学校—教材 IV. ①TS207.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 228674 号

## 内 容 提 要

本书根据我国高等职业教育食品类专业的培养目标要求编写,主要包括:食品微生物检验室及配置、食品微生物检验的常用试剂及配制、微生物检验基础技术、食品卫生细菌学检验技术、食品中常见病原微生物检验技术、发酵食品微生物检验技术以及食品微生物检验方法新进展。

本书适合作为高职高专食品类专业的教材,也可作为食品企业从事卫生检验工作的技术人员的参考用书。

中国计量出版社出版

北京和平里西街甲2号

邮政编码 100013

电话 (010)64275360

<http://www.zgjl.com.cn>

北京市密东印刷有限公司印刷

新华书店北京发行所发行

版权所有 不得翻印

\*

787 mm × 1092 mm 16 开本 印张 13 字数 312 千字

2011 年 1 月第 1 版 2011 年 1 月第 1 次印刷

\*

印数 1—2 000 定价:26.00 元

# 前 言

本教材根据我国高等职业教育食品类专业的培养目标和要求编写,以适应我国高等职业教育的学生现状和实际水平为目标,适当降低理论深度,内容符合“必需,够用,实用”的原则,重视学生上岗就业所需的基础知识和培养其实际操作能力,力求使学生能够比较系统地掌握食品微生物学检验技术。

本教材既注重基本理论和基本知识的系统性,又突出重点、突出实用。适当压缩了理论部分内容,扩大实验及应用部分的相关知识,侧重实际操作、检验方法,并对食品微生物检验实验室管理内容做了适当介绍。

本教材内容主要包括:食品微生物检验室及配置、食品微生物检验的常用试剂及配制、微生物检验基础技术、食品卫生细菌学检验技术、食品中常见病原微生物检验技术、发酵食品微生物检验技术、食品微生物检验方法新进展。教材注重培养学生的动手能力和实践创新能力,而从事食品卫生检验工作的技术人员通过本书也能在较短时间内达到学以致用。

本教材可作为高职高专食品类专业的教材及食品卫生检验的培训教材,也可作为食品企业检验人员的参考资料。

全书由杨玉红主编。编写分工为:第一章由鲁梅(潍坊教育学院)编写;第二章由郭宏伟(郑州牧业工程高等专科学校)编写;第三章由侯会绒(江苏食品职业技术学院)编写;第四章及附录由杨玉红(鹤壁职业技术学院)编写;第五章由黄木花(漳州城市职业学院)编写;第六章由王海花(郑州牧业工程高等专科学校)编写;第七章由杨令叶(漳州城市职业学院)编写;第八章由陈乐乐(浙江医药高等专科学校)编写。全书由杨玉红整理并统稿。

本教材编写中,参考了相关图书和其他参考文献,在此谨向有关作者表示诚挚的感谢!

由于编者水平和经验有限,教材中难免存在不妥之处,敬请同行专家和广大读者批评指正。

编者

2010年10月

# 目 录

<b>第 1 章 绪论</b> .....	(1)
1.1 食品微生物检验的概念与特点 .....	(1)
1.2 食品微生物检验的范围 .....	(2)
1.3 食品微生物检验的指标 .....	(2)
1.4 微生物检验的要求 .....	(3)
1.5 食品微生物检验的意义 .....	(5)
思考题 .....	(5)
<b>第 2 章 食品微生物检验室及配置</b> .....	(6)
2.1 微生物检验室 .....	(6)
2.2 无菌室 .....	(8)
2.3 食品微生物检验的常用仪器设备 .....	(9)
2.4 食品微生物检验常用玻璃器皿 .....	(25)
思考题 .....	(28)
<b>第 3 章 食品微生物检验的常用试剂及配制</b> .....	(30)
3.1 染料及染液配制技术 .....	(30)
3.2 常用试剂的配制技术 .....	(33)
3.3 培养基配制技术 .....	(43)
思考题 .....	(60)
<b>第 4 章 微生物检验基础技术</b> .....	(61)
4.1 显微镜的使用与维护 .....	(61)
4.2 染色与细菌的形态观察技术 .....	(64)
4.3 放线菌、酵母菌和霉菌的形态观察 .....	(71)
4.4 微生物细胞大小的测定和显微镜直接计数技术 .....	(74)
4.5 消毒与灭菌技术 .....	(77)
4.6 微生物的分离、纯化与接种技术 .....	(90)
4.7 微生物菌种保藏技术 .....	(95)
思考题 .....	(98)

<b>第5章 食品卫生细菌学检验技术</b> .....	(100)
5.1 食品卫生细菌学检验总则 .....	(100)
5.2 食品卫生微生物检验中常见检样的制备 .....	(103)
5.3 菌落总数的检验技术 .....	(116)
5.4 食品卫生大肠菌群检验技术 .....	(121)
思考题 .....	(134)
<b>第6章 食品中常见病原微生物检验技术</b> .....	(135)
6.1 沙门氏菌检验技术 .....	(135)
6.2 金黄色葡萄球菌检验技术 .....	(140)
6.3 志贺氏菌检验技术 .....	(143)
6.4 肉毒梭状芽孢杆菌检验技术 .....	(147)
6.5 常见产毒霉菌的鉴定技术 .....	(151)
思考题 .....	(151)
<b>第7章 发酵食品微生物检验技术</b> .....	(152)
7.1 乳酸菌饮料中乳酸菌的检验技术 .....	(152)
7.2 酱油种曲孢子数及发芽率的测定 .....	(155)
7.3 发酵酒微生物检验技术 .....	(157)
思考题 .....	(161)
<b>第8章 食品微生物检验方法新进展</b> .....	(162)
8.1 免疫学方法 .....	(162)
8.2 分子生物学方法 .....	(164)
8.3 电化学方法 .....	(169)
8.4 仪器分析方法 .....	(172)
8.5 测试片法 .....	(175)
思考题 .....	(179)
<b>附录 I 食品检验工国家职业标准(中级)</b> .....	(180)
<b>附录 II 高级食品检验工技能操作考试模拟试卷</b> .....	(185)
<b>附录 III 微生物检验常用培养基</b> .....	(188)
<b>参考文献</b> .....	(199)

# 第1章 绪论

## 学习目标

1. 掌握食品微生物检验的概念、特点、范围和指标。
2. 熟悉微生物检验的要求。
3. 了解食品微生物检验的意义。

食品是人类生存和发展的最基本物质,是人类生命的能源。食品卫生与人类的健康密切相关。随着生活水平的提高,人民群众对食品的安全和卫生提出了更高的要求。据统计,在食源性疾病危险因素中,微生物性食物中毒是首要危害,因而对食品进行微生物检验至关重要。

## 1.1 食品微生物检验的概念与特点

食品微生物检验是应用微生物学及其相关学科的理论与方法,研究外界环境和食品中微生物的种类、数量、性质、活动规律及其对人和动物健康的影响。

微生物与食品的关系非常复杂,包括有益、有害两个方面,食品微生物检验偏重检验食品中的有害微生物。与其他微生物检验相比,食品微生物检验具有以下几个特点。

### (1) 涉及的微生物种属繁多

微生物广泛存在于土壤、水、空气、人和动植物体上,通过食品的生产、加工、贮藏、运输、销售等环节污染到食品上。因此,食品上污染的微生物种类和数量是很多的,不像医学微生物检验的对象只是对人类致病的微生物,兽医微生物检验的对象是畜禽疫病及人畜共患疫病的病原微生物。

### (2) 食品中目的菌少,杂菌量多,对检验工作干扰严重

这里所说的目的菌是指食品中含有的致病性微生物或能引起食物中毒的微生物及其毒素。食品中的微生物主要来源于食品的生产、贮藏、运输等各个环节。在污染的微生物中,绝大部分都是非致病性微生物,能够危害人体健康的微生物仅占很小的比例。大量杂菌的存在给食品中致病菌的检验工作造成严重干扰。为确保获得准确可靠的结果,在检验食品中是否含有某种致病性微生物时常进行增菌培养并采用选择性培养基以抑制非目的菌的生长繁殖。

### (3) 微生物的数量观念强

在国家的食品卫生微生物学检验标准中,对某些微生物的数量有明确的规定。如菌落总数测定和大肠菌群数(MPN)测定是食品微生物检验的两个基本指标。另外,对某些食物中毒

性微生物如蜡样芽孢杆菌、变形杆菌、韦氏梭菌等,在检验其是否污染的同时,还规定要进行菌数测定。这就要求在检验食品中某些微生物的数量时,对检样要注意冷藏,必须尽快检验,以防止食品中微生物增殖影响检验结果。

#### (4) 食品微生物检验受相关法规约束

对食品中的微生物检验,世界各国均制定有检验法规。我国与食品微生物检验有关的法规有国家商检局颁布的进出口检验用的专业检验标准(ZBX)以及卫生部颁布的中华人民共和国国家标准(GB)食品卫生微生物学检验标准。国际食品卫生法典委员会(CAC)也制订了一系列检验方法。这些法规都详细规定了食品中微生物检验的程序和操作方法。作为食品微生物检验人员,在检验食品中的微生物时,必须按规定的程序和方法检验,不得任意更换其他方法。

#### (5) 快速性与准确性

食品的货架寿命一般都比较短,尤其是新鲜果蔬需要尽快地进入市场。这就要求食品的微生物检验必须尽快获得准确结果,保证销售食品的安全卫生。传统的微生物检验方法往往耗时较长,对货架寿命较短的食品在卫生质量方面的评估作用不大,难以满足食品生产企业特别是出口企业检测期较短的需求。随着科学技术的发展,近几年出现了很多食品微生物的快速测定技术,缩短了食品的库存时间,极大地提高了经济效益,对食品生产、运输、销售过程中质量的监控具有十分重要的意义。

## 1.2 食品微生物检验的范围

食品在加工、贮藏等各个环节,均可能受到微生物的污染。污染的机会和原因很多,包括食品生产环境的污染、食品原料的污染、食品加工过程的污染等。据此可知,食品微生物检验的范围包括以下几点。

#### (1) 生产环境的检验

生产环境的检验包括车间用水、空气、地面、墙壁等的检验。

#### (2) 原辅料的检验

原辅料的检验包括主料、辅料、添加剂等一切原辅材料的检验。

#### (3) 食品加工、储藏、销售诸环节的检验

食品加工、储藏、销售诸环节的检验包括食品从业人员的健康及卫生状况、加工工具、运输车辆、包装材料等的检验。

#### (4) 食品的检验

食品的检验包括对出厂食品、可疑食品及食物中毒食品的检验,这是食品微生物检验的重点范围。

## 1.3 食品微生物检验的指标

食品在生产、运输、销售等环节中,不可避免要受到微生物的污染。评价食品被微生物污染的程度,要根据微生物检验的指标来判断。食品微生物检验的指标就是根据食品卫生的要



求,从微生物学的角度,对不同食品所提出的与食品有关的具体指标要求。按照国家标准规定,食品微生物检验的指标包括菌落总数、大肠菌群和致病菌三项,具体的检验指标如下所示。

### (1) 菌落总数

菌落总数是指食品检样经过处理,在一定条件下培养后所得 1g 或 1mL 检样中所含细菌菌落的总数。它可以反映食品的新鲜程度、食品是否变质及食品生产的卫生状况等。菌落总数能在一定程度上反映食品卫生质量的优劣。

### (2) 大肠菌群

大肠菌群是指一群在 37℃ 条件下培养 48h 能发酵产生乳糖、产酸产气的需氧和兼性厌氧革兰氏阴性无芽孢杆菌。该菌群主要来源于人畜粪便,因此,可根据食品中大肠菌群数来判断食品被粪便污染的程度,进而推断食品被肠道致病菌污染的可能。食品中大肠菌群数常以每 1mL(g) 检样中大肠菌群最可能数(MPN)来表示。

### (3) 致病菌

致病菌是指能引起人类疾病或能产生毒素并引起食物中毒的细菌,它是评价食品卫生质量的极其重要而必不可少的指标。

食品中病原细菌的种类很多,常见的有沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、肉毒梭菌、蜡样芽孢杆菌等。由于不同食品的加工工艺、贮藏条件不同,因而不同食品中可能污染的致病菌种类也各不相同。常根据不同食品的特点选择某种或某些致病菌作为参考检验菌群。如肉与肉制品以沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌为参考检验菌群,水产品除检验上述三种致病菌外,还需检验副溶血性弧菌。

### (4) 霉菌和酵母菌

霉菌和酵母菌广泛分布于自然界,常通过空气或不洁净的器具污染食品。有些霉菌污染食品后,在适宜条件下能够产生毒素,人和动物食用了被霉菌毒素污染的食品后可能引起急性或慢性中毒,甚至引发肿瘤。因此对可能被产毒霉菌污染的食品需进行霉菌及其毒素的检验。常见的污染食品的产毒霉菌主要分布在曲霉属、镰刀菌属和青霉属这三个属中,产生的霉菌毒素包括黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、镰刀菌毒素和青霉菌毒素等。

### (5) 病毒及寄生虫

有些食品尤其是动物性食品中可能含有能感染人并引起疾病的病毒,如肝炎病毒、猪瘟病毒、鸡新城疫病毒、马立克氏病毒、口蹄疫病毒、狂犬病病毒等。这些致病性病毒也应作为相关食品微生物检验的指标。另外,寄生虫也被很多学者列为食品微生物检验的指标,如旋毛虫、猪肉孢子虫、蛔虫、肺吸虫、弓形体、螨、姜片吸虫、中华分支睾吸虫等。

## 1.4 微生物检验的要求

### 1.4.1 微生物检验室的基本要求

微生物检验室要建在周围环境良好的区域,尽量避开易污染、嘈杂的环境。检验室工作面积和总体布局应能满足从事微生物检验工作的需要,检验室布局应采用单方向工作流程,避免交叉污染。微生物检验室要与准备室分开,两室的墙壁和地面应光滑易清洗,桌面最好铺上胶皮或其他防震易清洗的材料,为防止蚊蝇进入,最好配备纱窗。

检验室应具有优良的采光条件和照明设备,并具有良好的通风条件,如安装空调设备及过滤设备,室内空气测试应基本达到无菌。检验室应配备能满足微生物检验工作需求的各种实验设备,如超净工作台、恒温培养箱等。实验设备应放置于适宜的环境条件下,经常检查、维护和保养,以确保工作性能和操作安全。

### 1.4.2 微生物检验人员的要求

微生物检验人员应具有相应的教育、微生物专业培训经历,具备相应的资质。检验人员在微生物检验过程中必须严格按照无菌操作技术进行,即在无菌环境下使用无菌器材进行实验。无菌操作技术是微生物检验人员必须掌握的一项基本技能。之所以要求无菌操作,一方面可以保证待检样品不会被环境中的微生物污染,另一方面也能防止样品中的被检微生物污染环境或感染检验人员。

微生物检验一般实验步骤繁琐且费时较长,这就要求检验人员要有一丝不苟的工作态度和科学严谨的工作作风,绝对不能因为检验方法的繁琐而敷衍了事。同时,检验人员还要注意及时了解微生物检验领域新的进展和动态,不断提高自己的专业知识水平和检验工作效率。

除上述以外,微生物检验人员还应掌握实验室生物检验安全操作知识,在检验过程中遵守相关预防措施的规定,保证自身安全。微生物检验实验所用器材、培养物及阳性的检验标本未经灭菌或消毒处理,一律不得带出检验室。

### 1.4.3 培养基、试剂和菌株的基本要求

培养基质量的好坏是决定微生物检验工作成败的重要因素。培养基的制备和质量控制要严格按照相关国家标准的规定执行。制备培养基时所用的化学药品纯度应符合要求,每种药品均应按配方准确称量。培养基的酸碱度和渗透压应符合所培养微生物的生长要求。制成的培养基必须及时灭菌,一般采用高压蒸汽灭菌,灭菌温度和时间应根据各种培养基的规定进行,以保证灭菌效果的同时不损失培养基的有效营养成分。无论哪种类型培养基均应是透明的,以便观察微生物的生长性状及其他代谢活动产生的变化。培养基在使用前还应做无菌试验,即在 37℃ 培养 24h 没有菌生长方能使用。

微生物检验室应配备检验所需的常用试剂、诊断血清和标准菌株。试剂和诊断血清要注意在有效期内使用,并定期用标准菌株监测其敏感性和特异性。对检验结果有重要影响的重要试剂(如血清、抗生素等)要进行适用性验证。标准菌株可从微生物菌种保藏专门机构或同行认可机构获得,在购入和传代保藏过程中,应进行验证实验。对从食品、环境或人体分离的未在微生物菌种保藏专门机构登记注册的原始分离菌株(野生菌株)要进行系统、完整的菌株信息记录,包括分离时间、来源、表型、分子鉴定的主要特征等。

### 1.4.4 微生物检验程序的基本要求

检验人员进行微生物检验时应根据检验目的要求,严格按照现行有效的标准方法所规定的检验程序进行操作,这是微生物检验人员应具备的基本常识。只有这样,检验结果才能准确可靠、符合国家标准。检验人员不得随意更改检验程序,否则检验结果无效。

## 1.5 食品微生物检验的意义

食品的质量检验包括感官检验、理化检验和微生物检验,从中可以看出食品微生物检验为食品质量检验必不可少的重要组成部分。

首先,它是判断食品卫生质量的重要指标之一,通过微生物检验可以准确判断出食品被微生物污染的程度,正确评价食品的卫生状况,并为食品能否安全食用提供科学的依据。

其次,通过食品微生物检验,可以判断食品生产环境的卫生及操作流程是否合格,对生产各环节卫生管理工作的改进具有重要的指导意义。

最后,食品微生物检验坚持贯彻“预防为主”的卫生方针,可以及时发现微生物指标不合格的食品,有效防止不合格食品出厂销售,避免食物中毒和人畜共患病的发生,保障人民的身体健康。同时,通过食品微生物检验,可杜绝含有致病性微生物的食品进入我国市场,并能保证我国出口食品的卫生质量,避免重大经济损失,具有重要的政治和经济意义。

### 思考题

1. 什么是食品微生物检验?它具有哪些特点?
2. 食品微生物检验的范围包括哪些?
3. 简述微生物检验的要求。
4. 微生物检验的指标有哪些?
5. 试述食品微生物检验的意义。

## 第2章 食品微生物检验室及配置

### 学习目标

1. 熟悉微生物检验室和无菌室的操作程序和要求。
2. 了解微生物检验常用设备仪器的使用方法及维护。
3. 掌握实验室常用玻璃器皿的灭菌方法。
4. 学会进行无菌操作。

### 2.1 微生物检验室

微生物检验室的设备与设施是开展食品微生物检验的基础条件,也是微生物检验准确与否的物质基础;在此基础上应该建立完善的管理制度,对微生物检验实验室的设备与设施做好管理,确保质量标准,在总体管理上建立明细目录,包括名称、厂家、型号、购置时间、验收、调试或校验、仪器保管负责人、使用操作规范、使用或维修记录、报废等一系列的仪器设备管理档案,使仪器设备得到合理的维护,延长其使用时间和确保检验结果正确。

#### 2.1.1 微生物检验室的基本条件

为保证和满足微生物检验的顺利进行,微生物检验室总体上要具备以下几个条件:

- ① 具有进行菌毒种处理和微生物检验的无菌洁净室;
- ② 具有能对微生物分离培养的培养室和能进行高压灭菌的灭菌室;
- ③ 具有光线明亮、空气清新、洁净无菌的室内环境,地面与墙壁平滑,不留死角,便于清洁和消毒;
- ④ 要有安全、适宜的电源和充足的水源;
- ⑤ 具备整洁、稳固、适用的试验台,台面要有耐酸碱、防腐蚀的黑胶板;
- ⑥ 显微镜和实验室常用的仪器、设备、药品、工具等应设有相应的存放橱柜;
- ⑦ 大型实验室还可设有存放实验用品、易耗品和其他用具的储藏室;
- ⑧ 应有合理的通风设施,按照各房间的使用要求配置适当的空气净化系统,以提高实验室总体检验质量;
- ⑨ 应有基本的微生物检验设备,如培养箱(普通培养箱、真菌培养箱和厌氧培养箱)、恒温水浴箱、恒温干燥箱、冰箱,高压蒸汽灭菌器,生物安全工作台,显微镜(暗视野显微镜、荧光显微镜和显微摄影装置),离心机,电动匀浆器,薄膜过滤装置,以及无菌室使用的主要仪器设

备等。

## 2.1.2 检验员守则

在进行微生物检验时,实验的许多对象可能是病原微生物,如果不慎发生意外,不仅自身感染,而且可能造成病原微生物的传播,危害他人安全。为了上好微生物学实验课,并保证安全,必须遵守以下守则:

① 为确保实验室整洁、个人及他人安全,以及实验顺利进行,书包、衣物等各类非必要的物品一律不得带入实验室内,必须的文具、笔记本等带入后要放置在远离操作部位的地方。

② 在进行每一项实验之前,应预习实习指导并清楚实验的目的、内容,所依据的原理、采用的方法和基本要术。

③ 实验室内要保持安静、有秩序,不得高声谈话。实验进行过程中,应尽量避免在实验室内走动,防止造成大量尘埃、气溶胶而导致污染。

④ 各种仪器设备的使用必须严格按照说明书或已定出的操作步骤及要求进行。各种废弃物应按要求放入指定位置有标识的容器内。

⑤ 实验操作要轻柔、细心谨慎,并认真细致观察,如实做好实验记录。

⑥ 实验中发生和出现操作失误、实验材料泄漏等事故应立即向指导教师报告,并在老师指导下采用合适的方法做及时消毒和去除污染处理。

⑦ 实验中凡用过的菌种、毒种以及带有毒种或菌种的各种器皿,必须先经高压灭菌后才能洗涤。用过的玻片上的活菌、吸管等用具上的活菌应先浸泡于有效消毒液中(充分淹没,排除气泡)30min~60min后进行清洗。芽孢污染者应延长浸泡时间至120min以上。

⑧ 在进行高压蒸汽灭菌时,必须严格遵守操作规程,注意观察压力、温度变化和维持时间,灭菌进行的过程中负责消毒者不准离开消毒室。

⑨ 须进行培养的实验材料和物品必须标明名称、编号、组别、姓名及处理方法,置于老师指定的位置进行培养。

⑩ 必须爱护国家财产、厉行节约、严禁浪费;注意节约使用水、电、药品及试剂;易损物品要小心轻放,精密仪器更要特别爱护和细心使用和维护。不慎损坏了仪器设备应及时向指导老师报告,执行报损登记或按规定进行赔偿。

⑪ 每次实验结果,应以科学的态度,求实的精神认真记录填写、分析和整理实验报告,及时交指导老师评阅。

⑫ 实验完毕,应将仪器放回原处,将实验台面收拾整齐,并作消毒处理。离开实验室前应注意要求脱去帽、口罩等并认真洗手消毒,关好门、窗、灯、火、电源、煤气等,然后离开。

⑬ 如遇到以下几种意外情况,要及时进行处理。

a. 皮肤破伤:先除尽异物,用蒸馏水或生理盐水洗净后,涂以2%碘酒。

b. 灼烧伤:涂以凡士林油、5%的鞣酸或2%的苦味酸。

c. 化学药品腐蚀伤:若为强酸腐蚀,先用大量清水冲洗后,再用50g/L碳酸氢钠或氨水溶液洗涤中和;若为强碱腐蚀,先用大量清水冲洗后,再用5%醋酸或5%硼酸溶液洗涤中和。若受伤处是眼部,经过上述步骤处理后,最后滴入橄榄油或液体石蜡1~2滴。

## 2.2 无菌室

### 2.2.1 无菌室的结构与要求

#### 2.2.1.1 无菌室的结构

无菌室一般是在微生物实验室内专辟一个小房间,可以用板材和玻璃建造。无菌室外要设一个缓冲间,通常包括缓冲间和工作间两大部分。为了便于无菌处理,无菌室的面积和容积不宜过大,以适宜操作为准,一般可为 $9\text{m}^2 \sim 12\text{m}^2$ 。缓冲间与工作间二者的比例可为1:2,高度2.5m左右为适宜。工作间内设有固定的工作台,工作台的台面应该处于水平状态。无菌室和缓冲间都装有紫外线灯,无菌室的紫外线灯距离工作台面1m左右。无菌室还应具有空气过滤装置及通风装置,较为理想的应有空调设备、空气净化装置,以便在进行微生物操作时切实达到无尘无菌。缓冲间门和工作间门不要朝向同一方向,避免直接相通,减少无菌室内的空气对流,以免带进杂菌。无菌室和缓冲间都必须密闭。窗户应装有两层玻璃,以防外界的微生物进入。无菌室内的地面、墙壁必须平整,尤其是墙角应为弧形结构,不易藏污纳垢,且便于清洗。

#### 2.2.1.2 无菌室的要求

- ① 无菌操作间洁净度应达到10000级,室内温度保持在 $20^\circ\text{C} \sim 24^\circ\text{C}$ ,湿度保持在45%~60%。超净台洁净度应达到100级。
- ② 无菌室应保持密封、防尘、清洁、干燥,严禁堆放杂物,以防污染。进行操作时,尽量避免走动。
- ③ 无菌室的大小,应按每个操作人员占用面积不少于 $3\text{m}^2$ 设置。
- ④ 无菌室应备有工作浓度的消毒液,如5%的甲酚溶液,70%的酒精,0.1%的新洁尔灭溶液,等等。
- ⑤ 无菌室应定期用适宜的消毒液灭菌清洁,工作台、地面和墙壁可用新洁尔灭或过氧乙酸溶液擦洗消毒,以保证无菌室的洁净度符合要求。
- ⑥ 需要带入无菌室使用的仪器、器械、平皿等一切物品,均应包扎严密,并应经过适宜的方法灭菌。
- ⑦ 工作人员进入无菌室前,必须用肥皂或消毒液洗手消毒,然后在缓冲间更换专用工作服、鞋、帽子、口罩和手套(或用70%的乙醇再次擦拭双手),方可进入无菌室进行操作。
- ⑧ 无菌室使用前必须打开无菌室的紫外灯灭菌30min以上,并且同时打开超净台进行吹风,间隔30min后方可进入室内工作。操作完毕,应及时清理无菌室,再用紫外灯灭菌20min。
- ⑨ 为避免污染,工作间内不应安装下水道。
- ⑩ 无菌室应每周进行沉降菌落计数。
- ⑪ 根据无菌室的净化情况和空气中含有的杂菌种类,可采用不同的化学消毒剂。例如霉菌较多时,可用5%石炭酸全面喷洒室内,再用甲醛熏蒸;如果细菌较多,可采用甲醛与乳酸交替熏蒸。一般情况下也可酌情间隔一定时间用 $2\text{mL}/\text{m}^3$ 甲醛溶液或 $20\text{mL}/\text{m}^3$ 丙二醇溶液熏蒸消毒。

## 2.2.2 无菌室的熏蒸消毒

无菌室的熏蒸消毒,主要采用甲醛熏蒸消毒法,可以达到全面彻底的消毒效果,保证实验的顺利开展。

### 2.2.2.1 加热熏蒸

室内温度要求 20℃ 或更高,这对于得到良好有效的灭菌效果非常重要。当温度在 20℃ 或更高时,甲醛蒸汽就不会凝结,也不会形成多聚甲醛。按熏蒸空间计算量取甲醛溶液,一般每立方米用 40% 的甲醛 20mL,盛在小铁筒内,用铁架支好,在酒精灯内注入适量酒精(估计能蒸干甲醛溶液所需的量,不要超过太多)。将室内各种物品准备妥当后,点燃酒精,关闭门窗,任甲醛溶液煮沸挥发。酒精灯最好能在甲醛液蒸完后即自行熄灭。在完成甲醛蒸汽灭菌后,每立方米空间用 25% 氨水 14mL,中和甲醛。这个过程的产物叫环六亚甲基四胺(又叫乌洛托品)。这种物质对人体无害,允许通过正常的实验室排风系统排放。

### 2.2.2.2 氧化熏蒸

称取高锰酸钾于一瓷碗或玻璃容器内,再量取定量的甲醛溶液,一般高锰酸钾与甲醛的量为 1:2,每立方米空间用高锰酸钾 15g,甲醛 30mL。室内准备妥当后,把甲醛溶液倒在盛有高锰酸钾的陶瓷器皿内,立即关门。几秒钟后,甲醛溶液即沸腾而挥发。高锰酸钾是一种强氧化剂,当它与一部分甲醛溶液作用时,由氧化作用产生的热可使其余的甲醛溶液挥发为气体。甲醛液熏蒸后关门密闭应保持 12h 以上。甲醛液熏蒸对人的眼、鼻有强烈刺激,在相当时间内不能入室工作。为减弱甲醛对人的刺激作用,甲醛熏蒸后 12h,再量取与甲醛液等量的氨水,迅速放入室内,同时敞开门窗以放出剩余的有刺激性气体。

## 2.2.3 无菌室无菌程度的测定

测定无菌室无菌程度一般采用平板法。在超净工作台开启的状态下,取内径 90mm 的无菌培养皿若干,无菌操作分别注入融化并冷却至约 45℃ 的营养琼脂培养基约 15mL,放至凝固后,倒置于 30℃ ~ 35℃ 培养箱培养 48 h,证明无菌后,取平板 3 ~ 5 个,分别放置工作位置的左中右等处,开盖暴露 30min 后,倒置于 30℃ ~ 35℃ 培养箱培养 48h,取出检查。100 级洁净区平板杂菌数平均不得超过 1 个菌落,10000 级洁净室平均不得超过 3 个菌落。如超过限度,应对无菌室进行彻底消毒,直至重复检查合乎要求为止。

## 2.3 食品微生物检验的常用仪器设备

### 2.3.1 显微镜

显微镜是研究微生物的一种最基本的工具。它能帮助人们直接观测和探索微观世界,了解微生物细胞的形态结构,为我们直观的研究微生物提供了极大的帮助。它经历了两个发展阶段:从光学显微镜到电子显微镜,其放大倍数从 1000 倍提高到上百万倍。

#### 2.3.1.1 普通光学显微镜

普通光学显微镜的构造可分为两大部分:一是机械装置,二是光学系统,这两部分很好地

配合,才能发挥显微镜的作用。

### (1) 显微镜的机械构造

显微镜的机械装置是显微镜的重要组成部分。其作用是固定与调节光学镜头,固定与移动标本等。主要由镜座、镜臂、载物台、镜筒、物镜转换器与调焦装置组成(见图2-1)。

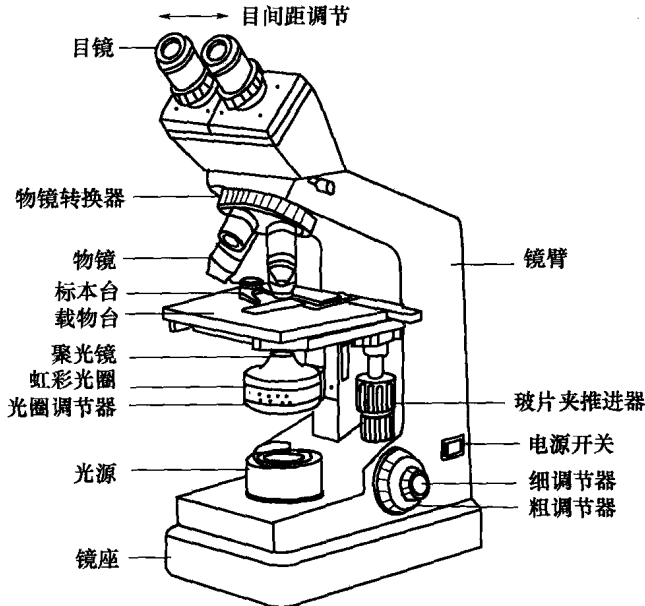


图2-1 显微镜构造示意图

#### ① 镜座和镜臂

镜座的作用是支撑整个显微镜,保持显微镜平稳,并装有反光镜或可调节光强度的照明光源。镜臂的作用是支撑镜筒和载物台,分固定和可倾斜两种。

#### ② 载物台(又称工作台、镜台)

载物台的作用是安放载玻片,形状有圆形和方形两种,其中方形的面积为 $120\text{mm} \times 110\text{mm}$ 。中心有一个通光孔,通光孔后方左右两侧各有一个安装压片夹用的小孔。分为固定式与移动式两种。有的载物台的纵横坐标上都装有游标尺,一般读数为 $0.1\text{mm}$ ,游标尺可以用来测定标本的大小,也可用来对被检部分做标记。

#### ③ 镜筒

镜筒上端放置目镜,下端连接物镜转换器,分为固定式和可调节式两种。机械筒长(从目镜管上缘到物镜转换器螺旋口下端的距离称为镜筒长度或机械筒长)不能变更的叫做固定式镜筒,能变更的叫做调节式镜筒,新式显微镜大多采用固定式镜筒,国产显微镜也大多采用固定式镜筒,国产显微镜的机械筒长通常是 $160\text{mm}$ 。

安装目镜的镜筒,有单筒和双筒两种。单筒又可分为直立式和倾斜式两种,双筒则都是倾斜式的。其中双筒显微镜,两眼可同时观察以减轻眼睛的疲劳。双筒之间的距离可以调节,而且其中有一个目镜有屈光度调节(即视力调节)装置,便于两眼视力不同的观察者使用。

普通光学显微镜上的镜头有两种:目镜和物镜。目镜一般有单筒目镜和双筒目镜两种,通常整个镜筒包括上面的目镜总长度为 $160\text{mm}$ 时,所产生的图像最为清晰。



#### ④ 物镜转换器

物镜转换器固定在镜筒下端,有3~4个物镜螺旋口,物镜应按放大倍数高低顺序排列,分别是低倍镜、(中倍镜)、高倍镜和油镜。它们也是有不同的工作距离,所谓工作距离就是在对准焦距后物镜与载玻片(标本)表面之间的垂直距离,其中低倍镜的工作距离是25mm、中倍镜是7.63mm、高倍镜是0.5mm、油镜是0.2mm。旋转物镜转换器时,应用手指捏住旋转碟旋转,不要用手指推动物镜,因时间长容易使光轴歪斜,影响成像质量。

#### ⑤ 调焦装置

显微镜上装有粗准焦螺旋和细准焦螺旋。有的显微镜粗准焦螺旋与细准焦螺旋装在同一轴上,大螺旋为粗准焦螺旋,小螺旋为细准焦螺旋;有的则分开安置,位于镜臂的上端较大的一对螺旋为粗准焦螺旋,其转动一周,镜筒上升或下降10mm。位于粗准焦螺旋下方较小的一对螺旋为细准焦螺旋,其转动一周,镜筒升降值为0.1mm,细准焦螺旋调焦范围不小于1.8mm。

### (2) 显微镜的光学系统构造

显微镜的光学系统由反光镜、聚光器、接物镜、接目镜等组成,光学系统使物体放大,形成物体放大像。

#### ① 反光镜或光源

较早的普通光学显微镜是用自然光检视物体,在镜座上装有反光镜。反光镜是由一平面和另一凹面的镜子组成,可以将投射到它上面的光线反射到聚光器透镜的中央,照明标本。不用聚光器时用凹面镜,凹面镜能起会聚光线的作用。用聚光器时,一般都用平面镜。目前生产的显微镜镜座上装有光源,并有电流调节螺旋,可通过调节电流大小调节光照强度。

#### ② 聚光器

聚光器在载物台下面,它是由聚光透镜、虹彩光圈和升降螺旋组成的。聚光器可分为明视场聚光器和暗视场聚光器。普通光学显微镜配置的都是明视场聚光器,明视场聚光器有阿贝聚光器、齐明聚光器和摇出聚光器。阿贝聚光器在物镜数值孔径高于0.6时会显示出色差和球差。齐明聚光器对色差、球差和彗差的校正程度很高,是明视场镜检中质量最好的聚光器,但它不适于4倍以下的物镜。摇出聚光器能将聚光器上透镜从光路中摇出满足低倍物镜(4×)大视场照明的需要。

聚光器安装在载物台下,其作用是将光源经反光镜反射来的光线聚焦于样品上,以得到最强的照明,使物像获得明亮清晰的效果。聚光器的高低可以调节,使焦点落在被检物体上,以得到最大亮度。一般聚光器的焦点在其上方1.25mm处,而其上升限度为载物台平面下方0.1mm。因此,要求使用的载玻片厚度应在0.8mm~1.2mm之间,否则被检样品不在焦点上,影响镜检效果。聚光器前透镜组前面还装有虹彩光圈,它可以开大和缩小,影响着成像的分辨力和反差,若将虹彩光圈开放过大,超过物镜的数值孔径时,便产生光斑;若收缩虹彩光圈过小,分辨力下降,反差增大。因此,在观察时,通过虹彩光圈的调节再把视场光阑(带有视场光阑的显微镜)开启到视场周缘的外切处,使不在视场内的物体得不到任何光线的照明,以避免散射光的干扰。

#### ③ 物镜

安装在镜筒前端转换器上的接物透镜利用光线使被检物体第一次造像,物镜成像的质量,对分辨力有着决定性的影响。物镜的性能取决于物镜的数值孔径(numerical aperture 简写为NA),每个物镜的数值孔径都标在物镜的外壳上,数值孔径越大,物镜的性能越好。