

## 46. 微生物学检验方法

(制备培养基时,使用蒸馏水或去离子 usp XX 纯水,不得发现有可溶性痕量金属元素,细菌或抑制剂,除非有特殊规定,一般使用脱水盐类)。

### 交叉参考目录

#### 46.001 食品检验方法

牛肉,碎牛肉

病毒 46.188

糖果和糖果涂料

沙门氏菌 46.132

椰子果

沙氏门菌 46.132

蛋和蛋制品

大肠菌群 46.009

直接镜检计数 46.012

霉菌 46.011

平板计数

标准平板计数 46.008

螺旋平板计数 46.181—46.187

沙门氏菌	
培养法	46.117
荧光抗体法 (FA)	46.132
溶血性葡萄球菌	46.010
链球菌	46.010
鱼粉	
沙门氏菌	46.132
低酸罐头食品	
商业无菌	46.063—46.070 46.071—46.077
冷藏、冷冻、予煮或加工食品和食品配料	
需氧平板计数	
标准平板计数	46.015
螺旋平板计数	46.181—46.187
大肠菌群	46.016, 46.030—46.034
大肠杆菌	46.016, 46.030—46.034, 46.035— 46.048, 46.049—46.061
沙门氏菌：荧光抗体法	46.132
凝固酶阳性金黄色葡萄球菌	
试管培养法	46.062
表面平板法	46.136—46.137
爆发性食物中毒食品 (Foods, outbreak)	
肉毒梭菌及其毒素	46.083—46.091
产气荚膜梭状芽孢杆菌	
(韦氏梭状芽孢杆菌)	46.092—46.097
$\alpha$ -毒素	46.098—46.105

金黄色葡萄球菌	46.062, 46.136—46.137
葡萄球菌肠毒素	46.138—46.146
田鸡腿	
沙门氏菌	46.132
大蒜粉	
沙门氏菌	46.117
肉和肉制品	
沙门氏菌	46.132
液体乳	
体细胞计数	46.152—46.180
干乳制品	
沙门氏菌	
培养法	46.117
荧光抗体法 (FA)	46.132
坚果仁	
需氧平板计数	
标准平板计数	46.015
螺旋平板计数	46.181—46.187
大肠菌群	46.016
大肠杆菌	46.016
洋葱粉	
沙门氏菌	46.117
糖	
嗜热细菌芽孢	46.078—46.082
酵母	
干活酵母	

沙门氏菌	46.117
干死酵母	
沙门氏菌	46.132
<b>46.002 微生物检验方法</b>	
细菌	
低酸罐头食品	46.071—46.077
肉毒梭状芽孢杆菌	
加工食品和罐头食品	46.083—46.091
产气荚膜梭状芽孢杆菌（韦氏梭状芽孢杆菌）	
冷藏、冷冻、予煮食品或加工食品	46.092—46.097
大肠菌群	
蛋和蛋制品	46.009
冷藏、冷冻、予煮食品或加工食品	46.016, 46.030—46.034
坚果仁	46.016
贝类生长用水	46.017—46.019
大肠杆菌	
冷藏、冷冻、予煮食品或加工食品	46.016, 46.030—46.034, 46.035—46.048, 46.020—46.029
鼠肾细胞与乳鼠试验	46.049—46.061
坚果仁	46.016
贝类生长用水	46.017—46.019
霉菌	
蛋与蛋制品	46.011

## 沙门氏菌

糖果和糖果涂料	46.132
椰子果	46.132
蛋和蛋制品	46.117, 46.132
鱼粉	46.132
田鸡腿	46.132
大蒜粉	46.117
肉和肉制品	46.132
干乳制品	46.117, 46.132
洋葱粉	46.117
干酵母	
活酵母	46.117
死酵母	46.132

## 体细胞

液体乳	46.152
-----	--------

## 溶血性葡萄球菌

蛋和蛋制品	46.010
金黄色葡萄球菌	
凝固酶阳性	46.136
冷藏、冷冻、予煮食品或加工食品	46.062, 46.137

## 链球菌

蛋和蛋制品	46.010
-------	--------

## 嗜热细菌芽孢

糖	46.078—46.082
---	---------------

## 病毒

碎牛肉

46.188—46.190

# 蛋 和 蛋 制 品

## 蛋和蛋制品微生物学检验的取样方法

### 正 式 规 定

(为进一步研究培养技术中所获得的微生物,应与美国公共卫生协会(APHA)食品微生物学方法学会/办事处, Manrin L. Speck, 1976,主编的《食品微生物学检验方法提要》为指南)

#### 46.003 设 备

(a) 液蛋——取样管或取样铲,灭菌密封的样品容器 [品脱(500 ml)陶瓷瓶或摩盖铁听最实用]酒精、酒精灯或其它的灯,脱脂棉,抹布或毛巾,以及水槽。

(b) 冰蛋——电动高速钻或手摇钻,钻头(1×16吋,锤子和钢条(12×2×0.25吋),或其它开听工具:取样匙,斧或凿,予冷的灭菌容器等,如(a)。

(c) 干蛋——粮谷采样器,长度足以达到要取样的容器底部。清洁密封的样品容器(品脱(500 ml)陶瓷瓶或纸板盒),抹布或毛巾,以及取样匙。

## 46.004 方 法

从成批约有代表性编号容器中取样， 17.001。用酒精棉擦拭取样管或取样铲，钻头，取样匙和斧，然后在酒精灯或其它灯上烧灼灭菌。取样与取样之间，充分洗净用具，干燥并重新灭菌。所有的容器尽可能在无菌的条件下打开和取样。

(a) 液蛋——用无菌取样管或取样铲充分混合容器中的内容物，取约 400ml (0.75品脱) 至灭菌样品容器内。样品在 5 以下保存，但避免冻结。观测和对各取样容器的气味作正常，不正常，次品或发霉记录。

(b) 冰蛋——用灭菌斧或凿去除蛋的顶层，从容器的顶部至底部打三个钻芯：第一个钻芯在中央；第二个在中央与边缘之间；第三个邻近容器的边缘。用灭菌采样匙将钻屑移至样品容器内。取完细菌样品之后，打第四个钻孔，在开口处对产品气味作感官检查。（由于电钻产生热，使蛋原料的气味变浓，有利于感官检查）对气味作正常，不正常，次品或发霉记录。如需推迟检验或取样地点距实验室有一定距离，则用干冰或其它适合的致冷剂冷藏样品。

(c) 干蛋——对于小包装，取整包或数包作为样品；对于箱装的和桶装的，用灭菌匙或其它的灭菌用具去除上层，以灭菌取样器移开三个或三个以上的钻芯，如 (b)。(样品应当包括约 400 ml (0.75 品脱) 用灭菌匙或其它合适的工具，无菌操作将样芯移至样品容器内。样品冷藏或置荫凉处保存。

参考：JAOAC 22. 625 (1939)。

# 蛋和蛋制品微生物学检验用培养基方法

## 正式规定

### 46.005 培养基标准方法

(a) 稀释用水——制备储备溶液：溶解  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  34g 于 500 ml 水中，用 1 N NaOH (约 175 ml) 调至 pH 7.2，再用水稀释至 1 L。制备稀释用缓冲  $\text{H}_2\text{O}$ ：用煮沸而冷却的  $\text{H}_2\text{O}$  将 1.25 ml 储备液稀释至 1 L。121°C 高压灭菌 15 分钟。

(b) 缓冲葡萄糖肉汤 (MR-VP 培养基)——作 MP-VP 试验用。溶解胨 7.0g, 葡萄糖 5.0g 和  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.0g 于约 800 ml 水中，轻微加热不时搅拌、过滤，冷至 20°C，稀释至 1L。分装试管各 10ml，121°C 高压灭菌 12—15 分钟。加热最长不超过 30 分钟，最终 pH  $6.9 \pm 0.2$ 。

(c) 远藤 (Endo) 氏培养基——将  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3.5g, 蛋白胨 10.0g, 琼脂 20.0g 和乳糖 10.0g 悬于 1 L 水内，煮沸使溶解，加水至原体积，必要时，过滤，分装各 100ml，在 121°C 高压灭菌 15 分钟，最终 pH  $7.4 \pm 0.1$ 。使用前融化，加入  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.25g 和过滤的 5% 碱性复红酒精溶液 1.0ml。

(d) 伊红美兰琼脂 (Levine)——溶解蛋白胨 10.0g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.0g 和琼脂 15.0g 于 1 L 水中，煮沸使溶解，加水至原体积。分装各 100 或 200ml，121°C 高压灭菌 15 分钟，最终 pH  $7.1 \pm 0.1$ 。使用前融化，干每 100ml 内加入无菌的

20%乳糖溶液 5.0 ml, 2%伊红 y 水溶液 2.0 ml 和 0.5%美兰水溶液 1.3 ml。

(e) Koser 氏柠檬酸盐肉汤——溶解  $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.5g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g 及柠檬酸钠 (含 2 分子水) 3.0g 于 1 L 水中, 分装试管各 10 ml。121°C 高压灭菌 15 分钟, 最终 pH  $6.7 \pm 0.1$ 。

(f) 乳糖肉汤——在水浴上搅拌溶解牛肉膏 3.0g, 多价胨或蛋白胨 5.0g 于 1 L 水中, 加入乳糖 5.0g 分装于发酵试管内, 121°C 高压灭菌 15 分钟, 加热最长不超过 30 分钟, 最终 pH  $6.7 \pm 0.2$ 。

(g) 平板计数琼脂 (胰胨葡萄糖酵母琼脂) ——将胰胨 (酪蛋白胰酶消化物) 5.0g 酵母膏 2.5g 葡萄糖 1.0g 和琼脂 15.0g 悬于 1 L 水内, 加热并煮沸使全部成份溶解, 121°C 高压灭菌 15 分钟, 最终 pH  $7.0 \pm 0.1$ 。

(h) 色氨酸肉汤——搅拌加热溶解胰胨或胰酪胨 10.0g 于 1 L 水中, 分装试管各 5 ml, 121°C 高压灭菌 15 分钟, 最终 pH  $6.9 \pm 0.2$ 。

#### 46.006 其它培养基

(a) 麦芽糖琼脂——煮沸溶解麦芽浸膏 (Difco) 30.0g 和琼脂 15.0g 于 1 L 水中, 121°C 高压灭菌 15 分钟。临用前融化麦芽糖琼脂, 以 85% 的乳酸酸化至 pH 3.5, 加入酸后培养基不再加热。

(b) 乳蛋白水解物葡萄糖琼脂——BBL 脱水培养基或用乳蛋白水解物 9.0g, 葡萄糖 1 g, 琼脂 15g 和 1 L 水制备。调至 pH 7.0, 121°C 高压灭菌 15 分钟, 冷至室温。如果需

要，再调至 pH 7.0。

(c) 生理盐水溶液——溶解 NaCl 8.5g 于 1 L 水中，121°C 高压灭菌 15 分钟，冷至室温。

(d) 小牛肉浸液琼脂——将磨碎的小牛瘦肉 500g 与 1 L 水混合，在冰箱内浸渍过夜，不加压用粗布过滤，用水稀释至原体积，撇除滤液表面的脂肪，阿诺氏蒸汽灭菌 30 分钟，通过滤纸过滤。加入蛋白胨 (Difco) 10.0 g, NaCl 5.0g 和琼脂 15.0 g。在阿诺氏灭菌器内蒸至各成份溶解，调至 pH 7.6 经阿诺氏蒸汽灭菌 15 分钟，通过布氏漏斗，用纸浆垫减压过滤。（需要时，可用蛋白净化。在调整 pH 之前和冷至 50°C 之后，将一个新鲜蛋白预先加入 50 ml 培养基内，再一并加入 1 L 培养基内或于 1 L 培养基内加入相当的干蛋白 (1.5g)，充分振荡，确保蛋白溶解，静置 20 分钟，置阿诺氏灭菌器内加热 15 分钟，使蛋白凝固，用力振荡和再加热，过滤，调至 pH 6.7，阿诺氏蒸汽灭菌 15 分钟，过滤。）

分装试管各 10 ml 或装入瓶内各 80 ml，121°C 高压灭菌 20 分钟，最终 pH 7.4。

作溶血试验用：将融化的琼脂冷至 45°C，倾注平板前加入 5% 脱纤维马血、羊血或兔血 (0.5ml 血/10ml 培养基)。

张宗显 译

吕宝有 校

# 蛋与蛋制品微生物学检验方法

## 正式规定

### 46.007 样品的制备

(a) 液蛋——用灭菌匙或灭菌搅拌机充分混合样品，以无菌操作称取 11.0g 蛋原料于灭菌玻塞广口瓶或螺盖瓶内；加入 99 ml 无菌稀释  $H_2O$ ，46.005 (a) 或灭菌生理盐水溶液，46.006(c) 及一汤匙灭菌玻璃珠，制备 1:10 稀释液。充分摇动 1:10 稀释液，确保稀释剂内的蛋原料完全溶解分布均匀，其方法是：快速摇动各容器 25 次，每次摇动时上下移动约 30 cm 距离，间隔时间不超过 7 秒。放出气泡，如果需要，取 1:10 稀释液的具有代表性部份，作成较高序列的稀释液。按 46.008~46.012(a) 进行。为了避免微生物增殖或死亡，在第一稀释液制备后 15 分钟内倾注所有平板和接种其它的培养基。

(b) 冰蛋——为了避免样品中微生物增加和防止微生物被破坏，在低温下尽可能快地解冻蛋原料( $\leq 45^\circ C$ ； $\leq 15$  分钟)。(时常转动振荡样品容器，帮助冰冻原料溶解，可用水浴或细菌学培养箱维持解冻温度)按 (a) 进行。

(c) 干蛋——用灭菌匙或灭菌刮刀充分混合样品，制备 1:10 稀释液如 (a)。如果原料较难溶解(储备样品)，以 0.1N 的 LiOH 作稀释剂，制备序列稀释液如 (a) 并按 46.008—46.012(b) 进行。

#### 46.008 平板计数

用各相应的稀释液 1 ml 接种一组平板，以预先冷至 42—45℃ 的胰脲葡萄糖酵母琼脂或乳蛋白水溶解物葡萄糖琼脂倾注平板，接种的平板置 32℃ 培养 3 天。如有 Quebec 菌落计数器计数平板，以活细菌数 /g 表示蛋原料最终结果。

#### 46.009 大肠菌群的发现率

(a) 接种 1.0 ml 蛋原料的相应稀释液于乳糖肉汤发酵管内，置 35℃ 培养 24—48 小时，将所有产气乳糖肉汤培养物划线于伊红美兰平板或远藤氏平板，置 35℃ 培养 24—48 小时，检查鉴别培养基上的大肠菌群菌落。根据鉴别培养基上确证为阳性的最高稀释液的倒数，记录大肠菌群细菌数 /g 蛋原料。

(b) 生物化学反应（任选的）—— 将出现在鉴别琼脂平板上的大肠菌群型的菌落接种于琼脂斜面，46.005(g) 或 46.006(b)，置 35℃ 培养 24 小时。进一步研究，要用纯培养物。用获得符合 IMViC 反应的纯培养物，做下列试验：

Kovacs 试验（产生吲哚），46.016(a)；

在甲基红指示剂中产生酸，46.016(b)；

产生乙酰甲基甲醇，46.016(b)；

Koser 柠檬酸钠试验（利用柠檬酸钠为唯一的碳源），46.016(c)。

注：遵照华盛顿，DC 20036，西北第十八街，1015，美国公共卫生协会《水和废水标准检验方法》1976年第十四版推荐的生物化学反

应方法。

#### 46.010 溶血性葡萄球菌和溶血性链球菌的发现率——方法

接种 1 ml 样品的适当稀释液于平皿内，用含有 5% 脱纤维马血，羊血或兔血的小牛肉浸液琼脂倾注平板（每 10 ml 培养基含 0.5 ml 血）。琼脂被冷至 45℃，倾注平板前加入血。将平板置 35℃ 培养 24 小时。取具代表性的菌落涂片，革兰氏染色和用显微镜检查，以确证球形菌的存在。最终结果以个数 /g 表示。

#### 46.011 真菌试验——程序

接种 1 ml 样品的相应稀释液于平皿内，以预先冷至 4<sub>2</sub>—45 的麦芽糖琼脂，46.006(a) 倾注平板。将平板置 20℃ 培养 5 天，如无 20℃ 培养箱，在室温下培养 5 天。最终结果以霉菌数 /g 表示蛋原料。镜检革兰氏染色的涂片，确证酵母菌的菌落。

#### 46.012 显微镜直接计数

North 苯胺油——美兰染色——将苯胺油 3.0 ml 和酒精 10.0 ml 混合，缓缓加入盐酸 1.5 ml 中，不断搅拌。再加入饱和美兰酒精溶液 30.0 ml，用水稀释至 100.0 ml，过滤。

(a) 液蛋和冰蛋——于清洁，干燥的载玻片上，放 0.01 ml 未稀释的蛋原料，在 2 cm<sup>2</sup> 面积上涂布（建议为园形面积，直径 1.6 cm）。让涂片在 35—40℃ 水平表面上干燥，浸

入二甲苯内不超过 1 分钟；然后浸入酒精内不超过 1 分钟；浸入 North 苯胺油——美兰染色液内  $\geq 45$  秒钟（10—20 分钟较好；2 小时染色不要过度）。反复在水内浸洗载玻片，检查之前使之充分干燥。以后的操作和注意事项遵照美国公共卫生协会《乳制品标准检验方法》1978 年第十四版。最终结果以细菌数/g 表示蛋原料的情况（因用  $2\text{ cm}^2$  面积，所以有双倍显微因素）。

(b) 干蛋——放 0.01 ml 干蛋原料 1:10 或 1:100 稀释液于清洁，干燥的载玻片上，在  $2\text{ cm}^2$  面积上涂布。

注：对于较难溶的样品，可用 0.1 N LiOH 作为稀释剂。直径 1.6 cm 的圆形面积较好 加水滴于涂片上有利于均匀涂布。

按 (a) 进行。因用  $2\text{ cm}^2$  面积，所以有双倍显微因素。依据制片时使用的是 1:10 或 1:100 稀释液，计数时乘以 10 或 100。

参考：JAOAC 36, 91, 316 (1953)

张宗显 译

吕宝有 校

# 冷藏、冷冻、予煮或加工食品的 微生物学检验方法

## 暂行规定

(除非对该产品有特殊要求,食品厂的卫生检验、如冷冻熟食、家禽、蔬菜产品、熟的或裹有面粉的海味食品,烘烤制品,色拉,果仁及配料物品,要进行需氧平板计数,大肠菌群近似值、埃希氏大肠杆菌,葡萄球菌等项目的检验。)

### 46.013 培养基和试剂

制备下列培养基的成份和试剂,可能是不同厂家生产的产品,只要对照试验能获得满意的结果,即可使用。微生物学试验,宜用纯碳水化合物。无机化学试验用 ACS 试剂级和经过“生物染色委员会”承认的染料,可用于培养基。

为了方便,可用具有等效配方的任何牌号脱水培养基。对每批培养基要进行无菌试验和促进相应微生物生长的特性试验。(例如:接种大肠菌群于乳糖培养基,接种葡萄球菌于葡萄球菌培养基等等)

在高压灭菌前,用标准缓冲液 50.007 校准 pH 值。需要时用 1 N NaOH 或 1 N HCL 调整 pH,使高压后的最终

pH 值符合规定。

使用无菌玻璃或塑料的 100×15 mm 平皿。

(a) 平板计数琼脂 — 见 46.005(g)。

(b) 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤：

将胰蛋白胨或酪蛋白胰酶水解物 20.0 g, NaCl 5.0g 乳糖 5.0g,  $K_2HPO_4$  2.75g,  $KH_2PO_4$  2.75g 和月桂基硫酸钠 0.1g, 用蒸馏水溶解至 1 L, 如有需要可微微加热。分装 10 ml 至带倒立发酵管的 20×150 mm 试管中, 于 121℃ 高压灭菌 15 分钟, 最终 pH 为  $6.8 \pm 0.1$ 。

(c) 煌绿乳糖胆盐肉汤 (BGLB),

将蛋白胨 10.0g、乳糖 10.0g 溶解于约 500ml 的蒸馏水中, 加入牛胆膏溶液 200 ml (将 20.0g 脱水牛胆汁溶于 200 ml 蒸馏水中, pH 7.0—7.5)。稀释到 975 ml, 调至 pH 7.4, 再加入 0.1% 的煌绿溶液 13.3 ml 最后用蒸馏水稀释到 1L, 通过棉花过滤后, 分装 10 ml 入 20×150 mm 试管, 内放一个倒置的 10×75 mm 发酵管, 于 121℃ 高压灭菌 15 分钟, 最终 pH  $7.2 \pm 0.1$ 。

(d) 伊红美兰琼脂 (Levine) — 见 46.005(d)。

(e) Baird-Parker 培养基 (蛋黄、亚硝酸盐、甘氨酸、焦葡萄糖酸盐琼脂 — ETGPA)。

1) 基础培养基：

称取胰蛋白胨 10.0g, 牛肉膏 5.0g、酵母膏 1.0g, 焦葡萄糖酸钠 10.0g, 甘氨酸 12.0g,  $LiCl \cdot 6 H_2O$  5.0g 和琼脂 20.0g, 加入 950 ml 蒸馏水, 加热至沸点并不断地搅动, 直至全部溶解。分装 95 ml 至有螺旋帽的瓶中, 于 121℃ 高压灭菌 15 分钟, 在 25℃ 时最终 pH  $7.0 \pm 0.2$ 。在  $4 \pm 1^\circ C$  储存