

# 《食品安全检测与评价》 教学实习实验指导书

编者：师俊玲 杨保伟

西北农林科技大学食品科学与工程学院

二〇〇九年五月

# 食品安全检测与评价教学实习

## 目 录

实验一	食品卫生微生物学检验·····	2
实验二	食品生物性安全检测培养基制备·····	5
实验三	食品中菌落总数测定·····	26
实验四	食品中大肠菌群测定·····	29
实验五	食品金黄色葡萄球菌检验·····	33
实验六	食品中单核细胞增生李斯特氏菌的检测·····	39
实验七	食品中霉菌和酵母菌计数·····	44
实验八	食品中志贺氏菌的检测·····	47

## 实验一 食品卫生微生物学检验

1. 实验目的：了解食品卫生微生物学检验中常用的采样方法及数据处理方法，样品处理、运送及分析方法。

2. 实验原理：

在食品检验中，所采集的样品必须有代表性。食品中因其加工批号、原料情况（来源、种类、地区、季节等）、加工方法、运输、保藏条件、销售中的各个环节（例如有无防蝇、防污染、防蟑螂及防鼠等设备）及销售人员的责任心和卫生认识水平等均可影响食品卫生质量，因此必须考虑周密。样品种类可分为大样、中样、小样三种。大样系指一整批，中样是从样品各部分取得的混合样品，小样系指做分析用的检样。定型包装及散装食品均采样 250 g。

3 采样方法

3.1 采样必须在无菌操作下进行。

3.2 根据样品种类，袋装、瓶装和罐装食品，应采完整的未开封的样品。如果样品很大，则需用无菌

采样器取样；固体粉末样品，应边取边 t 混合；液体样品通过振摇混匀；冷冻食品应保持冷冻状态（可放在

冰内、冰箱的冰盒内或低温冰箱内保存），非冷冻食品需在 0℃. 5℃中保存。

3.3 采样数量

根据不同种类，采样数量有所不同，见表 1。

表 1 各种样品采样数量

检样种类	采样数量	备注
肉及肉制品	生肉：取屠宰后两腿内腿肌或背最长肌 250 g； 脏器：根据检验目的而定； 壳禽：每份样品一只； 熟肉制品：熟食、肴肉、烧烤肉、肉灌肠、酱肉肉、熏煮火腿，取 250g； 熟肉干制品：肉松、油压肉松、肉粉松、肉干、肉脯、肉糜脯、其他熟肉干制品等，取 250g。	要在容器的不同部位采取。
乳及乳制品	鲜乳：250 mL； 干酪：250 g； 消毒、灭菌乳：250 mL； 乳粉：250g； 稀奶油、奶油：250g； 酸奶：250 g(ml)； 全脂炼乳：250 g； 乳清粉：取 250 g。	每批样品按千分之一采样，不足千件者按 250 g。

检样种类	采样数量	备注
蛋品	巴氏杀菌冰全蛋、冰蛋黄、冰蛋白，每件各采样 250 g； 巴氏杀菌全蛋粉、蛋黄粉、蛋白片，每件各采样 250 g。	一日或一班生产为一批，检验沙门氏菌按 5% 抽样，每批不少于三个检样； 测定菌落总数和大肠菌群，每批按装听过程前、中、后流动取样三次，每次 100g，每批合为一个样品。
	皮蛋、糟蛋，咸蛋等；每件各采样 250 g。	
水产食品	鱼、大贝甲类，每个为一件(不少于 250 g)； 小虾蟹类； 鱼糜制品：鱼丸、虾丸等； 即食动物性水产干制品：鱼干、鱿鱼干； 腌醉制生食动物性水产品、即食藻类食品，每件样品均取 250 g。	

罐头	可采用下述方法之一： 1. 按杀菌锅抽样： (1) 低酸性食品罐头杀菌冷却后抽样两罐，3kg 以上大罐每锅抽样一罐； (2) 酸性食品罐头每锅抽一罐，一般一个班的产品组成一个检验批，各锅的样罐组成一个样批组，每批每个品种取样基数不得少于三罐。 2. 按生产班(批)次抽样： (1) 取样数为 1/6 000，尾数超过 2 000 者增取一罐，每班(批)每个品种不得少于三罐； (2) 某些产品班产量较大，则以 30 000 罐为基数，其取样数按 1/6 000；超过 30 000 罐以上的按 1/20 000，尾数超过 4 000 罐者增取一罐； (3) 个别产品量过小，同品种同规格可合并班次为一批取样，但并班总数不超过 5 000 罐，每个批次样数不得少于三罐。	产品如按锅分堆放，在遇到由于杀菌操作不当引起问题时，也可以按锅处理。
----	---	------------------------------------

冷冻饮品	冰棍、雪糕；每批不得少于三件，每件不得少于三支； 冰淇淋：原装四杯为一件，散装 250 g； 食用冰块，每件样品取 250 g。	年产量 20 万支以下者，一瓶为一批；以上者以工作台为一批。
饮料	瓶(桶)装饮用纯净水：原装一瓶(不少于 250 mL)； 瓶(桶)装饮用水：原装一瓶(不少于 250 mL)； 茶饮料、碳酸饮料、低糖复原果汁、含乳饮料、乳酸菌饮料、植物蛋白饮料、果蔬汁饮料；原装一瓶(不少于 250 mL)。	
	固体饮料：原装一瓶和(或)袋(不少于 250 g)； 可可粉固体饮料：原装一瓶和(或)袋(不少于 250 g)； 茶叶：罐装取一瓶(不少于 250 g)，散装取 250 g。	

检样种类	采 样 数 量	备 注
调味品	酱油：原装一瓶(不少于 250 mL)； 醋：原装一瓶(不少于 250 mL)； 食醋：原装一瓶(不少于 250 mL)； 袋装调味料：原装一瓶(不少于 250 g)； 水产调味品：鱼露、蚝油、虾油、虾酱、蟹酱(蟹糊)等原装一瓶(不少于 250 g/mL)。	
糕点、蜜饯、糖果	糖果、糕点、饼干、面包、巧克力、淀粉糖(液体葡萄糖、麦芽糖饮品、果葡糖浆等)； 蜂蜜、胶姆糖、果冻、食糖等每件样品各取 250 g/mL。	
酒类	鲜啤酒、熟啤酒、葡萄酒、果酒、黄酒等瓶装两瓶为一件。	

非发酵豆制品及面筋、发酵豆制品	非发酵豆制品及面筋：定性包装取一袋(不少于 250 g)； 发酵豆制品：原装一瓶(不少于 250 g)。	
粮谷及果蔬类食品	膨化食品、油炸小食品、早餐谷物、淀粉类食品等，定型包装取一袋(不少于 250 g)，散装取 250 g； 方便面：定型包装取一袋和(或)碗(不少于 250 g)； 速冻预包装面米食品：定型包装取一袋(不少于 250 g)，散装取 250 g； 酱腌菜：定型包装取一瓶(不少于 250 g)； 干果食品、烘炒食品：定型包装取一袋(不少于 250 g)，散装取 250 g。	
方便面	采取 250 g。	
油炸小食品、膨化食品	采取 250 g。	
果冻	采取 250 g。	
酱腌菜	采取 250 g。	
速冻预包装面、米食品、麦片	采取 250 g。	

### 3.4 采样标签

采样前或后应立即贴上标签，每件样品必须标记清楚（如品名、来源、数量、采样地点、采样人及采样时间等）。

### 3.5 送检

样品送到微生物检验室应越快越好。如果路途遥远，可将不需冷冻样品保持在 1℃05℃环境中（如冰壶）。如需保持冷冻状态，则需保存在泡沫塑料隔热箱内（箱内有干冰可维持在 0℃以下）。送检时，必须认真填写申请单，以供检验人员参考。

### 3.6 检验

微生物检验室接到送检申请单，应立即登记，填写实验序号，并按检验要求，立即将样品放在冰箱或冰盒中，积极准备条件进行检验。各食品卫生微生物检验室必须备有专用冰箱存放样品。一般阳性样品，发出报告后 3d（特殊情况可适当延长），方能处理样品。进口食品的阳性样品，需保存，6 个月，方能处理。阴性样品可及时处理。检验完后，检验人员应及时填写报告单，签名后，送主管人员核实签字，加盖单位印章，以示生效，立即交食品卫生监督人员处理。

## 实验二 食品生物性安全检测培养基制备

1. 实验目的：学习适用于食品和食物中有毒样品中各类微生物检验用染色剂配制微生物染色方法，培养基和相关试剂的制备。

2. 实验原理：微生物染色是借助物理因素和化学因素的作用而进行。物理因素如细胞及细胞物质对染料的毛细现象、渗透、吸附作用等，化学因素则是根据细胞物质和染料的不同性质而发生地各种化学反应。染色后微生物细胞折光率发生改变，易于观察。

培养基是发酵过程或动植物细胞大量培养中供微生物或动、植物细胞生长、繁殖或积累代谢产物，以合成生物化工产品所必需的营养基质。其主要含有水、碳源(能源)、氮源、矿物质、微量元素及维生素等。

### 3 染色液配制及染色法

#### 3.1 美蓝染色法

##### 3.1.1 吕氏碱性美蓝染色液

美蓝 0.3g            95%乙醇 30mL

0.01%氢氧化钾溶液    100mL

将美蓝溶解于乙醇中，然后与氢氧化钾溶液混合。

##### 3.1.2 染色法

将涂片在火焰上固定，待冷。滴加染液，染 1P-3min，水洗，待干，镜检。

##### 3.1.3 结果

菌体呈蓝色。

#### 3.2 革兰氏染色法

##### 3.2.1 结晶紫染色液

结晶紫 1g            95%乙醇 20mL            1%鞣酸铵水溶液 80mL

将结晶紫溶解于乙醇中，然后与鞣酸铵溶液混合。

##### 3.2.2 革兰氏碘液

碘 1g            碘化钾 1g            蒸馏水 300mL

将碘与碘化钾先进行混合，加入蒸馏水少许，充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至 300mL。

##### 3.2.3 沙黄复染液

沙黄 0.25g            95%乙醇 10mL            蒸馏水 90mL

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

##### 3.2.4 染色法

3.2.4.1 将涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染 1min，水洗。

3.2.4.2 滴加革兰氏碘液，作用 1min，水洗。

3.2.4.3 滴加 95%乙醇脱色，约 30s；或将乙醇滴满整个涂片，立即倾去，再用乙醇滴满整个涂片，脱色 10s。

3.2.4.4 水洗，滴加复染液，复染 1min。水洗，待干，镜检。

### 3.2.5 结果

革兰氏阳性菌呈紫色。革兰氏阴性菌呈红色。

注：亦可用 1:10 稀释石炭酸复红染色液作复染液，复染时间仅需 10s。

## 3.3 鞭毛染色法

### 3.3.1 染色液的配制

3.3.1.1 甲液：称丹宁酸 59、氯化高铁 ( $\text{FeCl}_3$ ) 1.5g，溶于 100mL 蒸馏水中，待溶解后加入 1% 的氢氧化钠溶液 1mL 和 15% 的甲醛溶液 2mL。

3.3.1.2 乙液：称 29 硝酸银溶于 100mL 蒸馏水中。

在 90mL 乙液中滴加浓氢氧化铵溶液，到出现沉淀后，再滴加使其变为澄清，然后用其余 10mL 乙液小心滴加至澄清液中，至出现轻微雾状为止（此为关键性操作，应特别小心）。滴加氢氧化铵和用剩余乙液回滴时，要边滴边充分摇荡，染液当天配，当天使用，2---3d 基本无效。

### 3.3.2 染色法

在风干的载玻片上滴加甲液，4--6min 后，用蒸馏水轻轻冲净。再加乙液，缓缓加热至冒汽，维持约半分钟（加热时注意勿使出现干燥面）。在菌体多的部位可呈深褐色到黑色，停止加热，用水冲净，干后镜检，菌体及鞭毛为深褐色到黑色。

## 3.4 碱性复红染色法

将 0.5g 碱性复红染料溶解于 20mL 95% 乙醇中，然后用蒸馏水稀释至 100mL。如有不溶物时，可用滤纸过滤，或静置后取上清液备用。

注：本染色液系用于苏云金芽胞内蛋白质毒素结晶的染色，藉以与蜡样芽胞杆菌相区别。

## 4 生化试验培养基和试剂

### 4.1 糖发酵管

#### 4.1.1 成分

牛肉膏 5g      蛋白胨 10g      氯化钠 3g  
磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 2g  
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液 12mL      蒸馏水 1 000mL      pH7.4

#### 4.1.2 制法

4.1.2.1 葡萄糖发酵管接上述成分配好后，按 0.5% 加入葡萄糖，分装于有一个倒置小管的小试管内，121℃ 高压灭菌 15min。

4.1.2.2 其他各种糖发酵管可按上述成分配好后，分装每瓶 100mL，121℃ 高压灭菌 15min。另将各种糖类分别配好 10% 溶液，同时高压灭菌。将 5mL 糖溶液加入于 100mL 培养基内，以无菌操作分装小试管。

注：蔗糖不纯，加热后会自行水解者，应采用过滤法除菌。

4.1.3 试验方法：从琼脂斜面上挑取少量培养物接种，于  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  培养，一般观察 2~3d。迟缓反应需观察 14 ---30d。

#### 4.2 ONPG 培养基

##### 4.2.1 成分

邻硝基酚 B -D-半乳糖苷 (ONPG)      60mg  
(O-Nitrophenyl-B -D-galactopyranoside)  
0.01mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH7.5)      10mL  
1%蛋白胨水 (pH7.5)      30mL

##### 4.2.2 制法

将 ONPG 溶于缓冲液内，加入蛋白胨水，以过滤法除菌，分装于  $10\text{mm} \times 75\text{mm}$  试管，每管 0.5mL，用橡皮塞塞紧。

##### 4.2.3 试验方法

自琼脂斜面上挑取培养物 1 满环接种，于  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  培养 1---3h 和 24h 观察结果。如果  $\beta$ -半乳糖苷酶产生，则于 1--3h 变黄色，如无此酸则 24h 不变色。

#### 4.3 缓冲葡萄糖蛋白胨水 (MR 和 VP 试验用)

##### 4.3.1 成分

磷酸氢二钾 5g      多胨 7g      葡萄糖 5g  
蒸馏水 1 000mL      pH7.0

##### 4.3.2 制法

溶化后校正 pH，分装试管，每管 1mL， $121^\circ\text{C}$  高压灭菌 15min。

##### 4.3.3 甲基红 (MR) 试验

自琼脂斜面挑取少量培养物接种本培养基中，于  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  培养 2 ---5d，哈夫尼亚菌则应在  $22-25^\circ\text{C}$  培养。滴加甲基红试剂一滴，立即观察结果。鲜红色为阳性，黄色为阴性。甲基红试剂配法：10mg 甲基红溶于 30mL95%乙醇中，然后加入 20mL 蒸馏水。

##### 4.3.4 V-P 试验

用琼脂培养物接种本培养基中，于  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  培养 2 ---4d。哈夫尼亚菌则应在  $22-25^\circ\text{C}$  培养。加入 6% $\alpha$ -萘酚-乙醇溶液 0.5mL 和 40%氢氧化钾溶液 0.2mL，充分振摇试管，观察结果。阳性反应立刻或于数分钟内出现红色，如为阴性，应放在  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  下培养 4h 再进行观察。

#### 4.4 西蒙氏柠檬酸盐培养基

##### 4.4.1 成分

氯化钠      5g



硫酸镁 (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 0.2g

磷酸二氢铵 1g

磷酸氢二钾 1g                      柠檬酸钠 5g

琼脂 20g                      蒸馏水 1 000mL

0.2%溴麝香草酚蓝溶液      40mL

pH6.8

#### 4.4.2 制法

先将盐类溶解于水内，校正 pH，再加琼脂，加热溶化。然后加入指示剂，混合均匀后分装试管，121℃高压灭菌 15min。放成斜面。

#### 4.4.3 试验方法

挑取少量琼脂培养物接种，于 36±1℃培养 4d，每天观察结果。阳性者斜面上有菌落生长，培养基从绿色转为蓝色。

### 4.5 克氏柠檬酸盐培养基

#### 4.5.1 成分

柠檬酸钠      3g

葡萄糖      0.2g

酵母浸膏      0.5g

单盐酸半胱氨酸 0.1g

磷酸二氢钾      1g

氯化钠      5g

0.2%酚红溶液      6mL

琼脂      15g

蒸馏水      1 000mL

#### 4.5.2 制法

加热溶解，分装试管，121℃高压灭菌 15min。放成斜面。

#### 4.5.3 试验方法

用琼脂培养物接种整个斜面，在 36±1℃培养 7d，每天观察结果。阳性者培养基变为红色。

### 4.6 葡萄糖铵培养基

#### 4.6.1 成分

氯化钠      5g

硫酸镁 (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)      0.2g

磷酸二氢铵      1g

磷酸氢二钾      1g

葡萄糖 2g  
琼脂 20g  
蒸馏水 1 000mL  
0.2%溴麝香草酚蓝溶液 40mL  
pH6.8

#### 4.6.2 制法

先将盐类和糖溶解于水内，校正 pH，再加琼脂，加热溶化，然后加入指示剂，混合均匀后分装试管，121℃高压灭菌 15min，放成斜面。

#### 4.6.3 试验方法

用接种针轻轻触及培养物的表面，在盐水管内做成极稀的悬液，肉眼观察不见混浊，以每一接种环内含菌数在 20—100 之间为宜。将接种环灭菌后挑取菌液接种，同时再以同法接种普通斜面一支作为对照。于  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  培养 24h。阳性者葡萄糖铵斜面上有正常大小的菌落生长；阴性者不生长，但在对照培养基上生长良好。如在葡萄糖铵斜面生长极微小的菌落可视为阴性结果。

注：容器使用前应用浦洁液浸泡。再用清水、蒸馏水冲洗干净，并用新棉花做成棉塞，干热灭菌后使用。如果操作时不注意，有杂质污染时，易造成假阳性的结果。

### 4.7 马尿酸钠培养基

#### 4.7.1 成分

马尿酸钠 1g  
肉浸液 100mL

#### 4.7.2 制法

将马尿酸钠溶解于肉浸液内，分装于小试管内，并于管壁画一横线。以标志管内液面高度，高压灭菌 121℃20min。

4.7.3 试剂 三氯化铁( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )12g，溶于 2%盐酸溶液 100mL 中即成。

#### 4.7.4 试验方法

用纯培养物接种，于 42℃培养 48h，观察培养液是否到达试管壁上记号处，如不足时，用蒸馏水补足至原量。经离心沉淀，吸取上清液 0.8mL，加入三氯化铁试剂 0.2mL，立即混合均匀，经 10P- 15min，观察结果。

4.7.5 结果：出现恒久之沉淀物为阳性。

### 4.8 营养明胶

#### 4.8.1 成分

蛋白胨 5g  
牛肉膏 3g  
明胶 120g

蒸馏水 1 000mL

pH6.8--- 7.0

#### 4.8.2 制法

加热溶解、校正至 pH7.4-7.6，分装小管，121℃ 高压灭菌 10min，取出后迅速冷却，使其凝固。复查最终 pH 应为 6.8~7.0。

#### 4.8.3 试验方法

用琼脂培养物穿刺接种，放在 22---25℃ 培养，每天观察结果，记录液化时间。或放在 36±1℃ 培养，每天取出，放冰箱内 30min 后再观察结果。

#### 4.9 氨基酸脱羧酶试验培养基

##### 4.9.1 成分

蛋白胨 5g

酵母浸膏 3g

葡萄糖 1g

蒸馏水 1000mL

1.6%溴甲酚紫-乙醇溶液 1mL

L-氨基酸或 DL-氨基酸 0.5 或 1g/100mL

pH6.8

##### 4.9.2 制法

除氨基酸以外的成分加热溶解后，分装每瓶 100mL，分别加入各种氨基酸：赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸。L-氨基酸按 0.5% 加入，DL-氨基酸按 1% 加入。再行校正 pH 至 6.8。对照培养基不加氨基酸。分装于灭菌的小试管内，每管 0.5mL，上面滴加一层液体石蜡，115℃ 高压灭菌 10min。

##### 4.9.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取培养物接种，于 36±1℃ 培养 18~24h，观察结果。氨基酸脱羧酶阳性者由于产碱，培养基应呈紫色。阴性者无碱性产物，但因葡萄糖产酸而使培养基变为黄色。对照管应为黄色。

#### 4.10 蛋白胨水（靛基质试验用）

##### 4.10.1 成分

蛋白胨（或胰蛋白胨） 20g

氯化钠 5g

蒸馏水 1 000mL

pH7.4

##### 4.10.2 制法

接上述成分配制，分装小试管，121℃ 高压灭菌 15min。

#### 4.10.3 靛基质试剂

4.10.3.1 柯凡克试剂：将 5g 对二甲氨基苯甲醛溶解于 75mL 戊醇中。然后缓慢加入浓盐酸 25mL。

4.10.3.2 欧一波试剂：将 1g 对二甲氨基苯甲醛溶解于 95mL95%乙醇内。然后缓慢加入浓盐酸 20mL。

#### 4.10.4 试验方法

挑取少量培养物接种，在  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  培养 Y-2d，必要时可培养 4-- 5d。加入柯凡克试剂约 0.5mL，轻摇试管，阳性者于试剂层呈深红色；或加入欧一波试剂约 0.5mL，沿管壁流下，覆盖于培养液表面，阳性者于液面接触处呈玫瑰红色。

注：蛋白胨中应含有丰富的色氨酸。每批蛋白胨买来后，应先用已知菌种鉴定后方可使用。

#### 4.11 硫酸亚铁琼脂（硫化氢试验用）

##### 4.11.1 成分

牛肉膏	3g
酵母浸膏	3g
蛋白胨	10g
硫酸亚铁	0.2g
硫代硫酸钠	0.3g
氯化钠	5g
琼脂	12g
蒸馏水	1 000mL
pH7.4	

##### 4.11.2 制法

加热溶解，校正 pH，分装试管， $115^\circ\text{C}$  高压灭菌 15min，取出直立俟其凝固。

##### 4.11.3 试验方法

挑取琼脂培养物，沿管壁穿刺，于  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  培养 1r-2d，观察结果。产硫化氢者使培养基变为黑色。

注：肠杆菌科细菌测定硫化氢的产生，应采用三糖铁琼脂或本培养基。

#### 4.12 尿素琼脂

##### 4.12.1 成分

蛋白胨	1g
氯化钠	5g
葡萄糖	1g
磷酸二氢钾	2g

0.4%酚红溶液 3mL  
琼脂 20g  
蒸馏水 1 000mL  
20%尿素溶液 100mL  
pH7.2±0.1

#### 4.12.2 制法

将除尿素和琼脂以外的成分配好，并校正 pH，加入琼脂，加热溶化并分装烧瓶。  
121℃

高压灭菌 15min。冷至 50 ---55℃，加入经除菌过滤的尿素溶液。尿素的最终浓度为 2%最终 pH 应为 7.2±0.1。分装于灭菌试管内，放成斜面备用。

#### 4.12.3 试验方法

挑取琼脂培养物接种，在 36±1℃培养 24h，观察结果，尿素酶阳性者由于产碱而使培

养基变为红色。

#### 4.13 氰化钾 (KCN) 培养基

##### 4.13.1 成分

蛋白胨 10g  
氯化钠 5g  
磷酸二氢钾 0.225g  
磷酸氢二钠 5.64g  
蒸馏水 1 000mL  
0.5%氰化钾溶液 20mL  
pH7.6

##### 4.13.2 制法

将除氰化钾以外的成分配好后分装烧瓶，121℃高压灭菌 15min。放在冰箱内使其充分冷却。每 100mL 培养基加入 0.5%氰化钾溶液 2.0mL(最后浓度为 1: 10 000)，分装于 12mm×100mm 灭菌试管，每管约 4mL，立刻用灭菌橡皮塞塞紧，放在 4℃冰箱内，至少可保存两个月。同时，将不加氰化钾的培养基作为对照培养基，分装试管各用。

##### 4.13.3 试验方法

将琼脂培养物接种于蛋白胨水内成为稀释菌液，挑取 1 环接种于氰化钾 (KCN) 培养基。并另挑取 1 环接种于对照培养基。在 36±1℃培养 1-2d，观察结果。如有细菌生长即为阳性（不抑制），经 2d 细菌不生长为阴性（抑制）。

注：氰化钾是剧毒药物，使用时应小心，切勿沾染，以免中毒。夏天分装培养基

应在冰箱内进行。试验失败的主要原因是封口不严，氰化钾逐渐分解，产生氢氰酸气体逸出，以致药物浓度降低，细菌生长，因而造成假阳性反应。试验时对每一环节都要特别注意。

#### 4.14 细胞色素氧化酶试验

##### 4.14.1 试剂

4.14.1.1 1%盐酸二甲基对苯二胺溶液。

4.14.1.2 1%Q-萘酚一乙醇溶液。

##### 4.14.2 试验方法

取 37℃（或低于 37℃）培养 20h 的斜面培养物一支，将两种试剂各 2—3 滴，从斜面上端滴下，并将斜面略加倾斜，使试剂混合液流经斜面上的培养物。如系平板培养物，则可用试剂混合液滴在菌落上。

##### 4.14.3 结果

于 2min 内呈现蓝色者为阳性。阳性培养物大多数于半分钟内出现强阳性反应，2min 以后出现微弱或可疑反应均作为阴性结果。

#### 4.15 过氧化氢酶试验

##### 4.15.1 试剂

3%过氧化氢溶液：临用时配制。

##### 4.15.2 试验方法

挑取固体培养基上菌落一接种环，置于洁净试管内，滴加 3%过氧化氢溶液 2mL，观察结果。

4.15.3 结果 于半分钟内发生气泡者为阳性，不发生气泡者为阴性。

#### 4.16 牛肉（或牛心）消化汤

##### 4.16.1 成分

绞碎牛肉（或牛心）	1 000g
15%氢氧化钠溶液	27mL
胰蛋白酶	40mL
三氯甲烷	1mL
氯化钠	10g
蒸馏水	2 000mL

##### 4.16.2 制法

4.16.2.1 称取碎牛肉，加蒸馏水，隔水加热到 80℃，维持 15min。

4.16.2.2 加氢氧化钠溶液，对 pH 试纸呈弱碱性，冷至 40℃。

4.16.2.3 加胰蛋白酶、氯仿，在 36±1℃放置 4---5h，每小时摇动一二次。

4.16.2.4 4h 后，吸取上层液 5mL 于试管中，加 5%硫酸铜溶液 0.1mL、4%氢氧化钠

溶液 5mL，混合之。若呈红色，则不须再消化，可由温箱取出。

4.16.2.5 加入 15%乙酸溶液 45mL，对 pH 试纸呈酸性。

4.16.2.6 煮沸 15min，使胰蛋白酶破坏，冷后，放冰箱内一夜。

4.16.2.7 次日吸取上层清液，加氯化钠 10g，并加水补足原量，煮沸。

4.16.2.8 校正 pH7.4- 7.6(加 15%氢氧化钠溶液约 10mL)，加热，用滤纸过滤，分装烧瓶，121℃ 高压灭菌 20min。

注：①此培养基可作为琼脂培养基的基础，不需加蛋白胨。

②胰蛋白酶之配制：称取去脂绞碎的猪胰 500g，加入乙醇 500mL、蒸馏水 1500mL，混合之，装入玻塞瓶内。每日摇匀三次。3d 后，用绒布过滤挤出其汁，加盐酸至 0.05%，放冰箱内保存备用。

#### 4.17 血琼脂

##### 4.17.1 成分

pH7.4—7.6 豆粉琼脂	100mL
脱纤维羊血（或兔血）	5 -10mL

##### 4.17.2 制法

加热溶化琼脂，冷至 50℃，以灭菌手续加入脱纤维羊血，摇匀，倾注平板。亦可分装灭菌试管，置成斜面。亦可用其他营养丰富的基础培养基配制血琼脂。

#### 4.18 营养琼脂

##### 4.18.1 成分

蛋白胨	10g
牛肉膏	3g
氯化钠	5g
琼脂	15~20g
蒸馏水	1 000mL

##### 4.18.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内，加入 15%氢氧化钠溶液约 2mL，校正 PH 至 7.2~7.4。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化。分装烧瓶，121℃ 高压灭菌 15min。

注：此培养基可供一般细菌培养之用，可倾注平板或制成斜面。如用于菌落计数，琼脂量为 1.5%；如作成平板或斜面，则应为 2%。

#### 4.19 营养肉汤

##### 4.19.1 成分

蛋白胨	15g
牛肉膏	10g
氯化钠	5g

蒸馏水 1000mL

#### 4.19.2 制法

按上述成分混合，溶解后校正 pH，分装烧瓶，每瓶 225mL，121℃ 高压灭菌 15min。

#### 4.20 乳糖胆盐发酵管

##### 4.20.1 成分

蛋白胨	20g
猪胆盐（或牛、羊胆盐）	5g
乳糖	10g
0.04%溴甲酚紫水溶液	25mL
蒸馏水	1 000mL
pH7.4	

##### 4.20.2 制法

将蛋白胨、胆盐及乳糖溶于水中，校正 pH，加入指示剂，分装每管 10mL，并放入一个小倒管，115℃ 高压灭菌 15min。

注：双料乳糖胆盐发酵管除蒸馏水中，其他成分加倍。

#### 4.21 乳糖发酵管

##### 4.21.1 成分

蛋白胨	
乳糖	
0.04%溴甲酚紫水溶液	
蒸馏水	
pH7.4	

##### 4.21.2 制法

将蛋白胨及乳糖溶于水中，校正 pH，加入指示剂，按检验要求分装 30mL、10mL 或 3mL，并放入一个小倒管，115℃ 高压灭菌 15min。

注：①双料乳糖发酵管除蒸馏水外，其他成分加倍。

②30mL 和 10mL 乳糖发酵管专供酱油及酱类检验用，3mL 乳糖发酵管供大肠菌群证实试验用。

#### 4.22 EC 肉汤

##### 4.22.1 成分

胰蛋白胨	20g
3号胆盐（或混合胆盐）	1.5g
乳糖	5g
磷酸氢二钾	4g



磷酸二氢钾	1.5g
氯化钠	5g
蒸馏水	1000mL

#### 4.22.2 制法

将上述成分混合，溶解后，分装有发酵倒管的试管中，121℃高压灭菌 15min，最终 pH 为  $6.9 \pm 0.2$ 。

#### 4.23 缓冲蛋白胨水 (BP)

##### 4.23.1 成分

蛋白胨	10g
氯化钠	5g
磷酸氢二钠 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O)	9g
磷酸二氢钾	1.5g
蒸馏水	1 000mL

pH7.2

##### 4.23.2 制法

按上述成分配好后以大烧瓶装，121℃高压灭菌 15min。临用时无菌分装每瓶 225mL。

注：本培养基供沙门氏菌前增菌用。

#### 4.24 氯化镁孔雀绿增菌液 (MM)

##### 4.24.1 甲液

胰蛋白胨	5g
氯化钠	8g
磷酸二氢钾	1.6g
蒸馏水	1 000mL

##### 4.24.2 乙液

氯化镁（化学纯）	40g
蒸馏水	100mL

##### 4.24.3 丙液

0.4%孔雀绿水溶液。

##### 4.24.4 制法

分别按上述成分配好后，121℃高压灭菌 15min 备用。临用时取甲液 90mL、乙液 9mL、丙液 0.9mL，以无菌操作混合即可。

注：本培养基亦称 Rappaport 10 (R10) 增菌液。

#### 4.25 四硫磺酸钠煌绿增菌液 (TTB)

#### 4.25.1 基础培养基

多胨或（月示）胨	5g
胆盐	1g
碳酸钙	10g
硫代硫酸钠	30g
蒸馏水	1 000mL

#### 4.25.2 碘溶液

碘	6g
碘化钾	5g
蒸馏水	20mL

#### 4.25.3 制法

将基础培养基的各成分加入蒸馏水中，加热溶解，分装每瓶 100mL。分装时应随时振摇，使其中的碳酸钙混匀。121℃ 高压灭菌 15min 备用。临用时每 100mL 基础培养基中加入碘溶液 2mL、0.1% 煌绿溶液 1mL。

#### 4.26 亚硒酸盐胱氨酸增菌液 (SC)

##### 4.26.1 成分

蛋白胨	5g
乳糖	4g
亚硒酸氢钠	4g
磷酸氢二钠	5.5g
磷酸二氢钾	4.5g
L-胱氨酸	0.01g
蒸馏水	1 000mL

4.26.2 L-胱氨酸-氢氧化钠溶液的配法：称取 L-胱氨酸 0.1g (或 DL-胱氨酸 0.2g)，加 1mol/L 氢氧化钠 1.5mL，使溶解，再加入蒸馏水 8.5mL 即成。

4.26.3 制法：将除亚硒酸氢钠和 L-胱氨酸以外的各成分溶解于 900mL 蒸馏水中，加热煮沸，待冷备用。另将亚硒酸氢钠溶解于 100mL 蒸馏水中，加热煮沸，待冷，以无菌操作与上液混合。再加入 1%L-胱氨酸-氢氧化钠溶液 1mL。分装于灭菌瓶中，每瓶 100mL，pH 应为 7.0±0.1。

#### 4.27 亚硫酸铋琼脂 (BS)

##### 4.27.1 成分

蛋白胨	10g
牛肉膏	5g
葡萄糖	5g

硫酸亚铁	0.3g
磷酸氢二钠	4g
煌绿	0.025g
柠檬酸铋铵	2g
亚硫酸钠	6g
琼脂	18—20g
蒸馏水	1000ml

pH7.5

#### 4.27.2 制法

4.27.2.1 将前面5种成分溶解于300mL蒸馏水中。

4.27.2.2 将柠檬酸铋铵和亚硫酸钠另用50mL蒸馏水溶解。

4.27.2.3 将琼脂于600mL蒸馏水中煮沸溶解，冷至80℃。

4.27.2.4 将以上三液合并，补充蒸馏水至1000mL，校正pH，加0.5%煌绿水溶液5mL，摇匀。冷至50~55℃，倾注平皿。

注：此培养基不需高压灭菌，制备过程不宜过分加热，以免降低其选择性。应在临用前一天制备，贮存于室温暗处。超过48h不宜使用。

#### 4.28 DHL 琼脂(Deoxycholate Hydrogen Sulfide Lactose Agar)

##### 4.28.1 成分

蛋白胨	20g
牛肉膏	3g
乳糖	10g
蔗糖	10g
去氧胆酸钠	1g
硫代硫酸钠	2.3g
柠檬酸钠	1g
柠檬酸铁铵	1g
中性红	0.03g
琼脂	18 ---20g
蒸馏水	1000mL

pH7.3

##### 4.28.2 制法

将除中性红和琼脂以外的成分溶解于400mL蒸馏水中，校正pH。再将琼脂于600mL蒸馏水中煮沸溶解，两液合并，并加入0.5%中性红水溶液6mL，待冷至50~55℃，倾注平板。

#### 4.29 HE 琼脂 (Hektoen Enteric Agar)

##### 4.29.1 成分

(月示) 豚	12g
牛肉膏	3g
乳糖	12g
蔗糖	12g
水杨素	2g
胆盐	20g
氯化钠	5g
琼脂	18 ---20g
蒸馏水	1 000mL
0.4%溴麝香草酚蓝溶液	16mL
Andrade 指示剂	20mL
甲液	20mL
乙液	20mL
pH7.5	

##### 4.29.2 制法

将前面七种成分溶解于 400mL 蒸馏水内作为基础液；将琼脂加入于 600mL 蒸馏水内，加热溶解。加入甲液和乙液于基础液内，校正 pH。再加入指示剂，并与琼脂液合并，待冷至 50 ---55℃，倾注平板。

注：①此培养基不可高压灭菌。

##### ②甲液的配制

硫代硫酸钠	34g
柠檬酸铁铵	4g
蒸馏水	100mL

##### ③乙液的配制

去氧胆酸钠  
蒸馏水

##### ④Andrade 指示剂

酸性复红  
1mol/L 氢氧化钠溶液  
蒸馏水

将复红溶解于蒸馏水中，加入氢氧化钠溶液 1—2mL。

#### 4.30 SS 琼脂

#### 4.30.1 基础培养基

牛肉膏	5g
(月示) 豚	5g
三号胆盐	3.5g
琼脂	17g
蒸馏水	1 000mL

将牛肉膏、(月示)豚和胆盐溶解于 400mL 蒸馏水中，将琼脂加入于 600mL 蒸馏水中，煮沸使其溶解，再将两液混合，121℃ 高压灭菌 15min，保存备用。

#### 4.30.2 完全培养基

基础培养基	1 000mL
乳糖	10g
柠檬酸钠	8.5g
硫代硫酸钠	8.5g
10%柠檬酸铁溶液	10mL
1%中性红溶液	2.5mL
0.1%煌绿溶液	0.33mL

加热溶化基础培养基，按比例加入上述染料以外之各成分，充分混合均匀，校正至 pH7.0，加入中性红和煌绿溶液，倾注平板。

注：①制好的培养基宜当日使用，或保存于冰箱内于 48h 内使用。

②煌绿溶液配好后应在 10d 以内使用。

③可以购用 SS 琼脂的干燥培养基。

#### 4.31 WS 琼脂

##### 4.31.1 成分

(月示) 豚	12g
牛肉膏	3g
氯化钠	5g
乳糖	12g
蔗糖	12g
十二烷基硫酸钠	2g
琼脂	15g
Andrade 指示剂	20mL
0.4%溴麝香草酚蓝溶液	16mL
甲液	20mL
蒸馏水	1 000mL

pH7.0

#### 4.31.2 制法

除指示剂和甲液外，将其他成分加热溶解，不需消毒，校正 pH 后加入指示剂和甲液，倾注平板应呈草绿色。

注：①供沙门氏菌分离用。

②Andrade 指示剂和甲液的配制均见 HE 琼脂。

#### 4.32 麦康凯琼脂

##### 4.32.1 成分

蛋白胨	17g
（月示）胨	3g
猪胆盐（或牛、羊胆盐）	5g
氯化钠	5g
琼脂	17g
蒸馏水	1000ml
乳糖	10g
0.01%结晶紫水溶液	10mL
0.5%中性红水溶液	5mL

##### 4.32.2 制法

4.32.2.1 将蛋白胨、胨、胆盐和氯化钠溶解于 400mL 蒸馏水中，校正 pH7.2。将琼脂加入 600mL 蒸馏水中，加热溶解。将两液合并，分装于烧瓶内，121℃ 高压灭菌 15min 备用。

4.32.2.2 临用时加热溶化琼脂，趁热加入乳糖，冷至 50 ---55℃ 时，加入结晶紫和中性红水溶液，摇匀后倾注平板。

注：结晶紫及中性红水溶液配好后须经高压灭菌。

#### 4.33 伊红美蓝琼脂(EMB)

##### 4.33.1 成分

蛋白胨	10g
乳糖	10g
磷酸氢二钾	2g
琼脂	17g
2%伊红 Y 溶液	20mL
0.65%美蓝溶液	10mL
蒸馏水	1 000mL

pH7.1

#### 4.33.2 制法

将蛋白胨、磷酸盐和琼脂溶解于蒸馏水中，校正 pH，分装于烧瓶内，121℃ 高压灭菌 15min 备用。临用时加入乳糖并加热溶化琼脂，冷至 50 ---55℃，加入伊红和美蓝溶液，摇匀，倾注平板。

#### 4.34 三糖铁琼脂(TSI)

##### 4.34.1 成分

蛋白胨	15g
(月示) 胨	5g
牛肉膏	3g
酵母膏	3g
乳糖	10g
蔗糖	10g
葡萄糖	1g
氯化钠	5g
硫酸亚铁	0.2g
硫代硫酸钠	0.2g
琼脂	12g
酚红	0.025g
蒸馏水	1 000mL
pH7.4	

##### 4.34.2 制法

将除琼脂和酚红以外的各成分溶解于蒸馏水中，校正 pH。加入琼脂，加热煮沸，以溶化琼脂。加入 0.2% 酚红水溶液 12.5mL，摇匀。分装试管，装量宜多些，以便得到较高的底层。121℃ 高压灭菌 15min，放置高层斜面备用。

#### 4.35 半固体琼脂

##### 4.35.1 成分

蛋白胨	0.3g
牛肉膏	0.5g
氯化钠	0.35 -- 0.4g
琼脂	1g
蒸馏水	100mL
pH7.4	

##### 4.35.2 制法

按以上成分配好，煮沸使溶解，并校正 pH。凝固备用。分装小试管。121℃ 高

压灭菌 15min, 直立。

注: 供动力观察、菌种保存、H 抗原位相变异试验等用。

#### 4.36 甘氨酸培养基

##### 4.36.1 成分

布氏(Brucella)肉汤 1 000mL  
琼脂 1.6g  
甘氨酸(glycine)(又称氨基乙酸 aminoacetic acid) 10.0g

##### 4.36.2 制法

将以上成分混合, 加热溶解, 校正 pH7.0±0.2, 分装 13mm×100mm 试管, 每支约 4mL 左右, 121℃ 高压灭菌 15min, 备用。

##### 4.36.3 说明

空肠弯曲菌对甘氨酸有耐受性, 穿刺接种于甘氨酸培养基中。置于微需氧环境下, 在 43℃ 培养 48h。在培养基表面出现云雾状现象为阳性, 胎儿弯曲菌空肠亚种为阳性结果。

#### 4.37 胰酪胨大豆肉汤

##### 4.37.1 成分

胰酪胨(或胰蛋白胨) 17g  
植物蛋白胨(或大豆蛋白胨) 3g  
氯化钠 100g  
磷酸氢二钾 2.5g  
葡萄糖 2.5g  
蒸馏水 1 000mL

##### 4.37.2 制法

将上述成分混合, 加热并轻轻搅拌并溶解, 分装后, 121℃ 高压灭菌 15min, 最终 pH7.3±0.2。

#### 4.38 Baird-Parker 氏培养基

##### 4.38.1 成分

胰蛋白胨 10g  
牛肉膏 5g  
酵母膏 1g  
丙酮酸钠 10g  
甘氨酸 12g  
氯化锂(LiCl·6H<sub>2</sub>O) 5g  
琼脂 20g



蒸馏水 1000mL

PH 7.5

#### 4.38.2 增菌剂的配法

30%卵黄盐水 50mL 与除菌过滤的 1%亚碲酸钾溶液 10mL 混合，保存于冰箱内。

#### 4.38.3 制法

将各成分加到蒸馏水中，加热煮沸至完全溶解。冷至 25℃，校正 pH。分装每瓶 95mL，121℃ 高压灭菌 15min。临用时加热溶化琼脂，冷至 50℃，每 95mL 加入预热至 50℃ 的卵黄亚碲酸钾增菌剂 5mL，摇匀后倾注平板。培养基应是致密不透明的。使用前在冰箱储存不得超过 48h。

#### 4.39 7.5%氯化钠肉汤

##### 4.39.1 成分

蛋白胨 10g

牛肉膏 3g

氯化钠 75g

蒸馏水 1 000mL

pH7.4

##### 4.39.2 制法

将上述成分加热溶解，校正 pH，分装试管，121℃ 高压灭菌 15min。

#### 4.40 甘露醇卵黄多粘菌素琼脂

##### 4.40.1 成分

蛋白胨 10g

牛肉膏 1g

甘露醇 10g

氯化钠 10g

琼脂 15g

蒸馏水 1 000mL

0.2%酚红溶液 13mL

50%卵黄液 50mL

多粘菌素 B 100 国际单位/mL

pH7.4

##### 4.40.2 制法

将前面五种成分加入于蒸馏水中，加热溶解，校正 pH，加入酚红溶液。分装烧瓶，每瓶 100mL，121℃ 高压灭菌 15min。临用时加热溶化琼脂，冷至 50℃，每瓶加入 50%卵黄液 5mL 及多粘菌素 B10000 国际单位，混匀后倾注平板。

#### 4.41 卵黄琼脂培养基

##### 4.41.1 成分

###### 4.41.1.1 基础培养基

肉浸液	1 000mL
蛋白胨	15g
氯化钠	5g
琼脂	25 ----30g
pH7.5	

###### 4.41.1.2 50%葡萄糖水溶液。

###### 4.41.1.3 50%卵黄盐水悬液。

##### 4.41.2 制法

制备基础培养基，分装每瓶 100mL。121℃ 高压灭菌 15min。临用时加热溶化琼脂，冷至 50℃，每瓶内加入 50%葡萄糖水溶液 2mL 和 50%卵黄盐水悬液 10-15mL，摇匀，倾注平板。

### 实验三 食品中菌落总数测定

1. 实验目的：掌握食品中菌落总数的测定方法。

2. 实验原理：

菌落总数：食品检样经过处理，在一定条件下培养后(如培养基成分、培养温度和时间、pH、需氧性质等)，所得 1 ml (g) 检样中所含菌落的总数。本实验规定的培养条件下所得结果，只包括一群在营养琼脂上生长发育的嗜中温性需氧的菌落总数。

菌落总数主要作为判定食品被污染程度的标志，也可以应用这一方法观察细菌在食品中繁殖的动态，以便对被检样品进行卫生学评价时提供依据。

### 3. 设备和材料

冰箱： $0. C \sim 4^{\circ}C$ ，恒温培养箱： $36^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ ，恒温水浴锅： $46^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ ，均质器或灭菌乳钵，架盘药物天平，菌落计数器，放大镜 $4\times$ ，灭菌吸管： $1\text{ mL}$ （具 $0.01\text{ mL}$ 刻度）、 $10\text{ mL}$ ，（具 $0.1\text{ mL}$ 刻度），灭菌锥形瓶： $500\text{ mL}$ ，灭菌玻璃珠：直径约 $5\text{ mm}$ ，灭菌培养皿：直径 $90\text{ mm}$ ，灭菌试管： $16\text{ mm} \times 160\text{ mm}$ ，灭菌刀、剪子、镊子等。

### 4. 培养基和试剂

营养琼脂培养基，磷酸盐缓冲液， $0.85\%$ 灭菌生理盐水， $75\%$ 乙醇

### 5. 检验程序

菌落总数的检验程序见图 1。

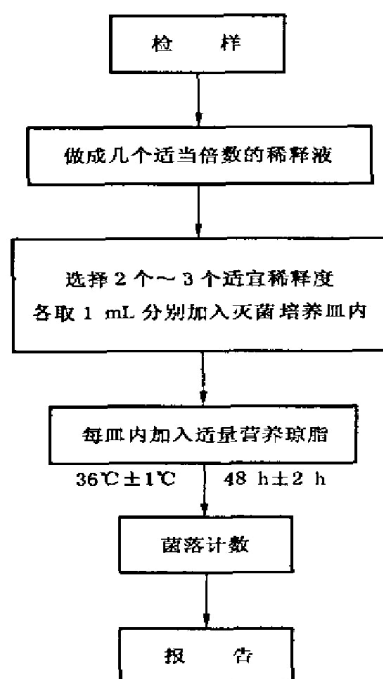


图 1

### 6. 操作步骤

#### 6. 1 检样稀释及培养

6. 1. 1 以无菌操作将检样  $25\text{g}$  ( $\text{mL}$ ) 剪碎放于含有  $225\text{ mL}$  灭菌生理盐水或其他稀释液灭菌玻璃瓶内(瓶内预置适当数量的玻璃珠)或灭菌乳钵内，经充分振摇或研磨做成  $1:10$  的均匀稀释液。

固体检样在加入稀释液后，最好置均质器中以  $8\ 000\text{ r/min} \sim 10\ 000\text{ r/min}$  的速度处理  $1\text{ min}$ ，做成  $1:10$  的均匀稀释液。

6. 1. 2 用  $1\text{ mL}$  灭菌吸管吸取  $1:10$  稀释液  $1\text{ mL}$ ，沿管壁徐徐注入含有  $9\text{ mL}$  灭菌生理盐水或其他稀释液的试管内(注意吸管尖端不要触及管内稀释液)，振摇试管，混合均匀，做成  $1:100$  的稀释液。

6. 1. 3 另取  $1\text{ mL}$ ，灭菌吸管，按上条操作方法，做  $10$  倍递增稀释，如此每递增稀释一次，

即换用 1 支 1 mL 灭菌吸管。

6. 1. 4 根据食品卫生标准要求或对本污染情况的估计，选择 2 个~3 个适宜稀释度，分别在做 10 倍递增稀释的同时，即以吸取该稀释度的吸管移 1 mL 稀释液于灭菌培养皿内，每个稀释度做两个培养皿。

6. 1. 5 稀释液移入培养皿后，应及时将凉至 46℃ 营养琼脂培养基(可放置于 46℃ ± 1℃ 水浴保温)注入培养皿约 15 mL，并转动培养皿使混合均匀。同时将营养琼脂培养基倾入加有 1 mL 稀释液灭菌培养皿内作空白对照。

6. 1. 6 待琼脂凝固后，翻转平板，置 36℃ ± 1℃ 温箱内培养 48 h ± 2h。

## 6. 2 菌落计数方法

做平板菌落计数时，可用肉眼观查，必要时用放大镜检查，以防遗漏。在记下各平板的菌落数后，求出同稀释度的各平板平均菌落总数。

## 6. 3 菌落计数的报告

### 6. 3. 1 平板菌落数的选择

选取菌落数在 30~300 之间的平板作为菌落总数测定标准。一个稀释度使用两个平板，应采用两个平板平均数，其中一个平板有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数，若片状菌落不到平板的一半，而其余一半中菌落分布又很均匀，即可计算半个平板后乘 2 以代表全皿菌落数。平板内如有链状菌落生长时(菌落之间无明显界线)，若仅有一条链，可视为一个菌落；如果有不同来源的几条链，则应将每条链作为一个菌落计。

### 6. 3. 2 稀释度的选择

6. 3. 2. 1 应选择平均菌落数在 30~300 之间的稀释度，乘以稀释倍数报告之(见表 1 中例 1)。

6. 3. 2. 2 若有两个稀释度，其生长的菌落数均在 30~300 之间，则视两者之比如何来决定。若其比值小于或等于 2，应报告其平均数；若大于 2 则报告其中较小的数字(见表 1 中例 2 及例 3)。

6. 3. 2. 3 若所有稀释度的平均菌落数均大于 300，则应按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数报告之(见表 1 中例 4)。

6. 3. 2. 4 若所有稀释度的平均菌落数均小于 30，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数报告之(见表 1 中例 5)。

6. 3. 2. 5 若所有稀释度均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告之(见表 1 中例 6)。

6. 3. 2. 6 若所有稀释度的平均菌落数均不在 30~300 之间，其中一部分大于 300 或小于 30 时，则以最接近 30 或 300 的平均菌落数乘以稀释倍数报告之(见表 1 中例 7)。

### 6. 3. 3 菌落数的报告

菌落数在 100 以内时，按其实有数报告，大于 10。时，采用两位有效数字，在两位有效数字后面的数值，以四舍五入方法计算。为了缩短数字后面的零数，也可用 10 的指数来表示(见表 1)。

表 1 稀释度选择及菌落数报告方式

例次	稀释液及菌落数			两稀释液之比	菌落总数/ [cfu/g(mL)]	报告方式/[cfu/g(mL)]
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>			
1	多不可计	164	20	—	16 400	16 000 或 1.6×10 <sup>4</sup>
2	多不可计	295	46	1.6	37 750	38 000 或 3.8×10 <sup>4</sup>
3	多不可计	271	60	2.2	27 100	27 000 或 2.7×10 <sup>4</sup>
4	多不可计	多不可计	313	—	313 000	310 000 或 3.1×10 <sup>5</sup>
5	27	11	5	—	270	270 或 2.7×10 <sup>2</sup>
6	0	0	0	—	<1×10	<10
7	多不可计	305	12	—	30 500	31 000 或 3.1×10 <sup>4</sup>

#### 实验四 食品中大肠菌群测定

1. 实验目的：掌握食品中大肠菌群的测定方法，加强食品卫生意识。
2. 试验原理：大肠菌群 (Coliform bacteria)：一群能发酵乳糖、产酸产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽胞杆菌。该菌主要来源于人畜粪便，故以此作为粪便污染指标来评价食品的卫生质量，推断食品中有否污染肠道致病菌的可能。

食品中大肠菌群数系以 100 ml(g) 检样内大肠菌群最可能数 (maximum probable number, MPN) 表示。

#### 3. 设备和材料

冰箱：0℃~4℃，恒温培养箱：36℃±1℃，恒温水浴锅：46℃±1℃，显微镜：10×—100×，均质器或灭菌乳钵，架盘药物天平：0 g—500g，灭菌吸管 1mL (具 0.01 mL 刻度)、10 ml。(具 0.1 mL 刻度)，4.8 灭菌锥形瓶：500 mL，灭菌玻璃珠：直径约 5 mm，

灭菌培养皿：直径 90 mm，灭菌试管：16 mm×160 mm，灭菌刀、剪子、镊子等。

#### 4. 培养基和试剂

4.1 乳糖胆盐发酵管：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.9 规定制作。

4.2 伊红美蓝琼脂平板：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.25 规定制作。

4.3 乳糖发酵管：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.10 规定制作。

4.4 EC 肉汤：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.11 规定制作。

4.5 磷酸盐缓冲液：按 GB/T 4789. 28-2003 中 3.22 规定制作。

4.6 0. 85%灭菌生理盐水。

4.7 革兰氏染色液：按 GB/T 4789. 28-2003 中 2.2 规定制作。

#### 5. 检验程序

大肠菌群检验程序见图 2。

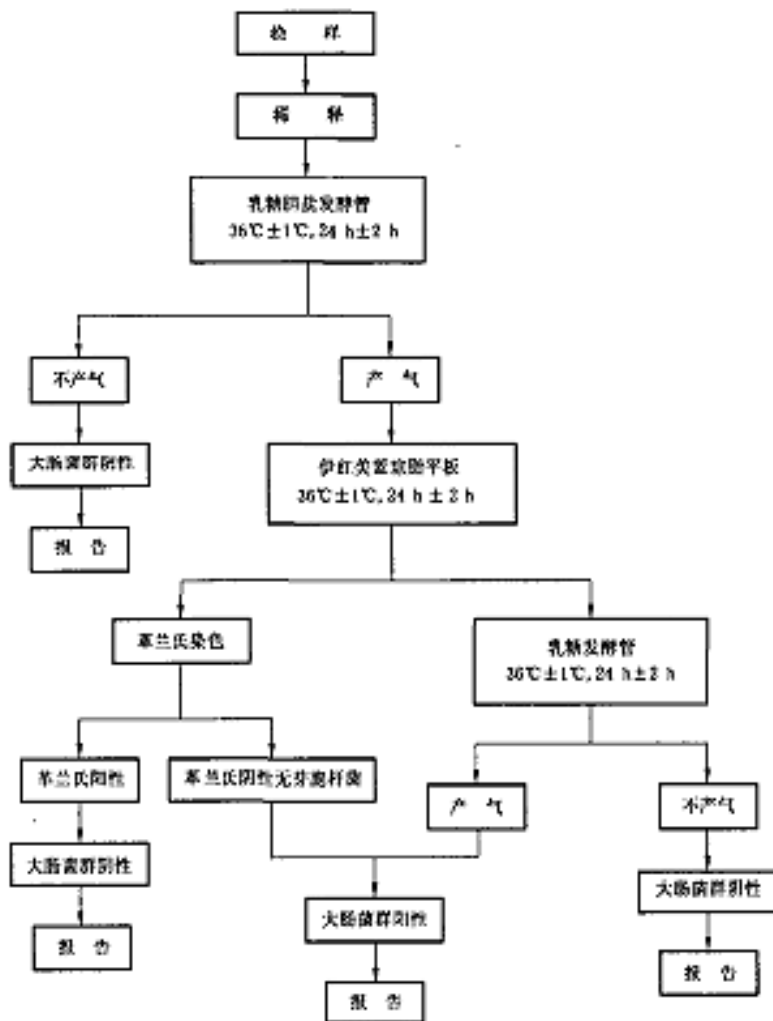
#### 6. 操作步骤

##### 6.1 检样稀释

6.1.1 以无菌操作将检样 25 g(mL)放于含有 225 ml\_灭菌生理盐水或其他稀释液的灭菌玻璃瓶内（瓶内预置适当数量的玻璃珠）或灭菌乳钵内，经充分振摇或研磨做成 1: 10 的均匀稀释液。固体检样最好用均质器，以 8 000 r/min~10 000 r/min 的速度处理 1 min，做成 1: 10 的均匀稀释液。

6.1.2 用 1 mL 灭菌吸管吸取 1: 10 稀释液 1 mL，注入含有 9 mL 灭菌生理盐水或其他稀释液的试管内，振摇试管混匀，做成 1: 100 的稀释液。

6.1.3 另取 1 mL 灭菌吸管，按上条操作依次做 10 倍递增稀释液，每递增稀释一次，换用 1 支 1 mL 灭菌吸管。



6.1.4 根据食品卫生标准要求或对检样污染情况的估计，选择三个稀释度，每个稀释度，接种三管。

## 6.2 乳糖发酵试验

将待检样品接种于乳糖胆盐发酵管内，接种量在 1 mL 以上者，用双料乳糖胆盐发酵管，1 mL 及 1 mL 以下者，用单料乳糖胆盐发酵管。每一稀释度接种三管，置 36℃±1℃温箱内，培养 24 h±2h，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。

## 6.3 分离培养

将产气的发酵管分别转种在伊红美蓝琼脂平板上，置 36℃±1℃温箱内，培养 18 h~24 h，然后取出，观察菌落形态，并做革兰氏染色和证实试验。

## 6.4 证实试验

在上述平板上，挑取可疑大肠菌群菌落 1 个—2 个进行革兰氏染色，同时接种乳糖发酵管，置 36℃±1℃培养箱内培养 24 h±2h，观察产气情况。凡乳糖管产气、革兰氏染色为阴性的无芽胞杆菌，即可报告为大肠菌群阳性。

## 6.5 报告

根据证实为大肠菌群阳性的管数，查 MPN 检索表，报告每 100mL(g) 大肠菌群的 MPN 值。

## 7. 粪大肠菌群 (Faecal coliform)

7.1 用接种环将所有产气的乳糖胆盐发酵管培养物（见 6.2）转种于 EC 肉汤管内，置 44.5℃ ± 0.2℃ 水浴箱内（水浴箱内的水面应高于 EC 肉汤液面），培养 24 h ± 2h，经培养后，如所有 EC 肉汤管均不产气，则可报告为阴性；如有产气者，则将所有产气的 EC 肉汤管分别转种于伊红美蓝琼脂平板上，置培养 18 h ~ 24 h，凡平板上有典型菌落者，则证实为粪大肠菌群阳性。

## 7.2 结果报告

根据证实为粪大肠菌群的阳性管数，查 MPN 检索表，报告每 100 mL(g) 粪大肠菌群的 MPN 值（见表 2）。

表 2 大肠菌群最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN 100 mL(g)	95% 可信限	
1 mL(g) × 3	0.1 mL(g) × 3	0.01 mL(g) × 3		下 限	上 限
0	0	0	<30		
0	0	1	30	<5	90
0	0	2	60		
0	0	3	90		
0	1	0	30		
0	1	1	60	<5	130
0	1	2	90		
0	1	3	120		
0	2	0	60		
0	2	1	90		
0	2	2	120		
0	2	3	160		
0	3	0	90		
0	3	1	130		
0	3	2	160		
0	3	3	190		



1	0	0	40	<5	200
1	0	1	70	10	210
1	0	2	110		
1	0	3	150		
1	1	0	70	10	230
1	1	1	110	30	360
1	1	2	150		
1	1	3	190		
1	2	0	110	30	360
1	2	1	150		
1	2	2	200		
1	2	3	240		
1	3	0	160		
1	3	1	200		
1	3	2	240		
1	3	3	290		
2	0	0	90	10	360
2	0	1	140	30	370
2	0	2	200		
2	0	3	260		
2	1	0	150	30	440
2	1	1	200	70	890
2	1	2	270		
2	1	3	340		
2	2	0	210	40	470
2	2	1	280	100	1 500
2	2	2	350		
2	2	3	420		
2	3	0	290		
2	3	1	360		
2	3	2	440		
2	3	3	530		
3	0	0	800	40	1 200
3	0	1	390	70	1 300
3	0	2	640	150	3 800
3	0	3	950		
3	1	0	430	70	2 100
3	1	1	760	140	2 300
3	1	2	1 200	300	3 800
3	1	3	1 600		
3	2	0	930	150	3 800
3	2	1	1 500	300	4 400
3	2	2	2 100	350	4 700
3	2	3	2 900		
3	3	0	2 400	360	13 000
3	3	1	4 600	710	24 000
3	3	2	11 000	1 500	48 000
3	3	3	≥24 000		

注1：本表采用3个稀释度(1 mL(g)、0.1 mL(g)和0.01 mL(g))，每稀释度三管。

注2：表内所列检样量如改用10 mL(g)、1 mL(g)和0.1 mL(g)时，表内数字应相应降低10倍；如改用0.1 mL(g)、0.01 mL(g)和0.001 mL(g)时，则表内数字应相应增加10倍。其余可类推。

## 实验五：食品金黄色葡萄球菌检验

1. 实验目的：掌握食品中金黄色葡萄球菌的检验方法，了解该方法应用于各类食品和食物中毒样品中金黄色葡萄球菌的检验。

2. 实验原理：金黄色葡萄球菌在自然界中无处不在，空气、水、灰尘及人和动物的排泄物中都可找到。因而，食品受其污染的机会很多。金黄色葡萄球菌肠毒素是个世界性卫生难题，在美国由金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒，占整个细菌性食物中毒的 33%金黄色葡萄球菌在血平板上呈金黄或白色菌落，大而凸起，表面光滑，周围有溶血圈。在 Baird-Parker 平板上菌落为圆形，直径 2~3mm，颜色灰或黑色，周围有一浑浊带。

### 3. 设备和材料

冰箱：0℃~4℃，恒温培养箱：36℃±1℃，显微镜：10×—100×，均质器或灭菌乳钵，架盘药物天平：0 g~500 g，精确至 0.5 g，灭菌试管：10 mm×100 mm、16 mm×160 mm，灭菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度），灭菌锥形瓶：500 mL、100 mL，灭菌培养皿：直径 90 mm，注射器：0.5 mL，灭菌 L 型涂布棒，灭菌刀、剪子、镊子等。

### 4. 培养基相试剂

4.1 胰酪胨大豆肉汤：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.59 规定。

4.2 7. 5%氯化钠肉汤：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.61 规定。

4.3 血琼脂平板：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.6 规定。

4.4 Baird-Parker 琼脂平板：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.60 规定。

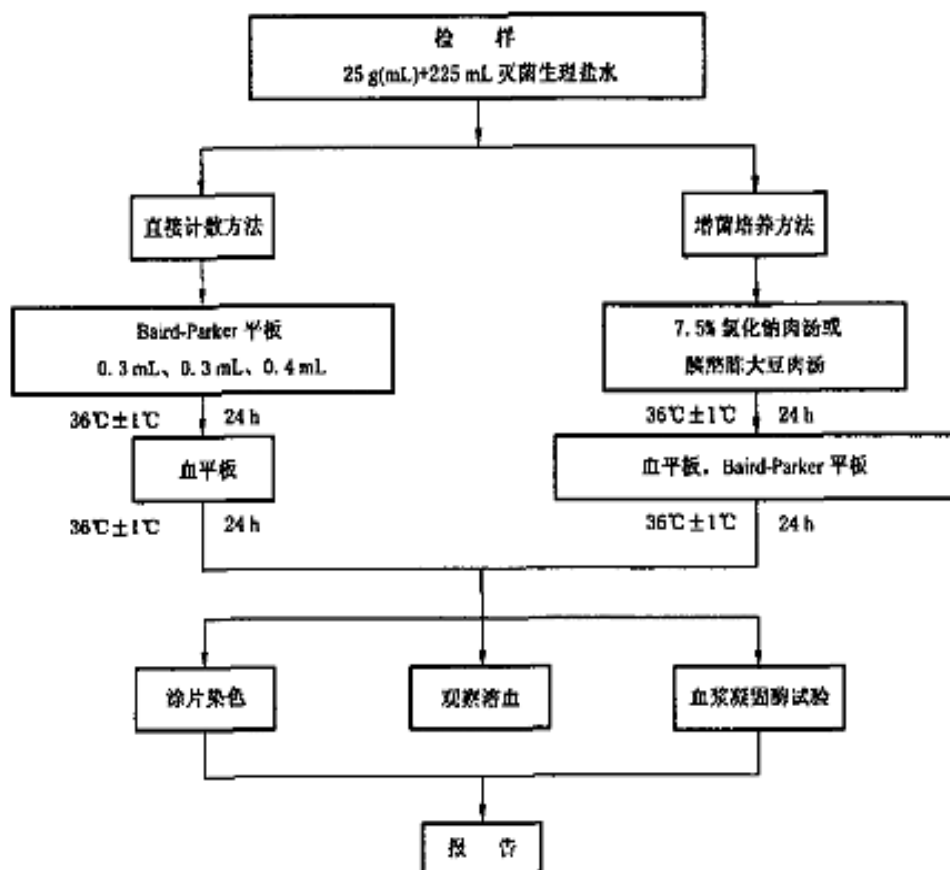
4.5 肉浸液肉汤：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.1 规定。

4.6 0. 85%灭菌生理盐水。

4.7 兔血浆：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.63 规定。

### 5. 检验程序

金黄色葡萄球菌检验程序如图所示：



## 6 操作步骤

### 6.1 增菌培养法

6.1.1 检样处理：按无菌操作取检样 25 g(mL)，加入 225 mL 灭菌生理盐水，固体样品研磨或置均质器中制成混悬液。

6.1.2 增菌及分离培养：吸取 5 mL 上述混悬液，接种于 7.5%氯化钠肉汤或胰酪胨大豆肉汤 50 mL 培养基内，36°C ± 1°C 培养 24 h，转种血平板和 Baird-Parker 平板，36°C ± 1°C 培养 24 h，挑取血平板上金黄色（有时为白色）菌落进行革兰氏染色镜检及血浆凝固酶试验。

6.1.3 形态：本菌为革兰氏阳性球菌，排列呈葡萄球状，无芽胞，无荚膜，致病性葡萄球菌菌体较小，直径约为 0.5 μm—1 μm。

6.1.4 在肉汤中呈混浊生长，在胰酪胨大豆肉汤内有时液体澄清，菌量多时呈混浊生长，血平板上菌落呈金黄色，有时也为白色，大而突起、圆形、不透明、表面光滑，周围有溶血圈，在 Baird-Parker 平板上为圆形、光滑凸起、湿润、直径为 2 mm~3 mm，颜色呈灰色到黑色，边缘为淡色，周围为一混浊带，在其外层有一透明圈。用接种针接触菌落似有奶油树胶的硬度，偶尔会遇到非脂肪溶解的类似菌落；但无混浊带及透明圈。长期保存的冷冻或干燥食品中所分离的菌落比典型菌落所产生的黑色较淡些，外观可能

粗糙并干燥。

6.1.5 血浆凝固酶试验:吸取 1:4 新鲜兔血浆 0.5 mL,放入小试管中,再加入培养 24 h 的金黄色葡萄球菌肉浸液肉汤培养物 0.5 mL,振荡摇匀,置  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  温箱或水浴内,每半小时观察一次,观察 6h,如呈现凝固,即将试管倾斜或倒置时,呈现凝块者,被认为阳性结果。同时以已知阳性和阴性葡萄球菌株及肉汤作为对照。

## 6.2 直接计数方法

6.2.1 吸取上述 1:10 混悬液,进行 10 倍递次稀释,根据样品污染情况,选择不同浓度的稀释液 1 mL,分别加入三块 Baird-Parker 平板,每个平板接种量分别为 0.3 mL、0.3 mL、0.4 mL,然后用灭菌 L 棒涂布整个平板。如水分多不易吸收,可将平板放在  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养,等水分蒸发后反转平皿置  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养。

6.2.2 在三个平板上点数周围有混浊带的黑色菌落,并从中任选五个菌落,分别接种血平板,  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  24 h 培养后进行染色镜检、血浆凝固酶试验,步骤同增菌培养法。

6.2.3 菌落计数:将三个平板中疑似金黄色葡萄球菌黑色菌落数相加,乘以血浆凝固酶阳性数,除以 5,再乘以稀释倍数,即可求出每克样品中金黄色葡萄球菌数。

## 葡萄球菌肠毒素检验

A. 1.1 冰箱:  $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$ 。

A. 1.2 恒温培养箱:  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

A. 1.3 振荡培养箱或普通培养箱:  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

A. 1.4 酶标仪。

A. 1.5 离心机: 8 000 r/min。

A. 1.6 均质器或灭菌乳钵。

A. 1.7 层析柱:  $40\text{ mm} \times (20\text{ mm} \sim 25\text{ mm})$ 。

A. 1.8 微量加样器: 200  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{L}$ 。

A. 1.9 细滴管。

A. 1.10 分液漏斗。

A. 1.11 透析袋。

A. 1.12 洗瓶。

A. 1.13 灭菌吸管: 1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10mL(具 0.1 mL 刻度)。

A. 1.14 灭菌培养皿: 直径 150 mm(或带盖搪瓷盘)。

A. 1.15 灭菌锥形瓶: 250 mL。

A. 1.16 有机玻璃模板。

A. 1.17 打孔器: 直径 2.5 mm。

A. 1.18 载玻片、橡皮圈。

A. 1.19 灭菌玻璃纸、三角棒、镊子等

## A. 2 培养基和试剂

A. 2.1 肠毒素产毒培养基；按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.86 规定。

A. 2.2 营养琼脂：按 GB/T 4789. 28-2003 中规定。

A. 2.3 1%琼脂糖（0.9%生理盐水配制）溶液。

A. 2.4 0.2 mol/L pH7.5 烧酸盐缓冲液。

A. 2.5 三氯甲烷。

A. 2.6 6 mol/L 盐酸溶液。

A. 2.7 5 mol/L 氢氧化钠。

A. 2.8 0.85%生理盐水。

A. 2.9 1%乙酸溶液。

.1%噻嗪红 R 或氨基黑 B。

硅胶或凡士林。

A、B、C、D 型葡萄球菌肠毒素和抗血清。

羧甲基纤维素 (CM22 或 CM11 Whatman)。

0.2 mol/L pH6.8 磷酸盐缓冲液。

酶标记 A、B、C、D 肠毒素抗血清或酶联免疫试剂盒。

0.1 mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液。

0.01-0.02mol/L pH7.2 吐温-20 缓冲液。

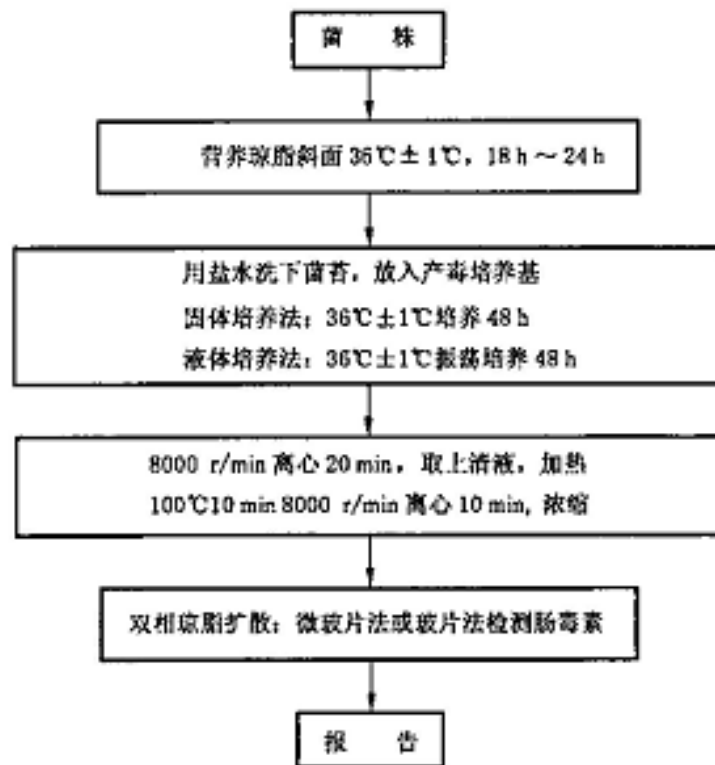
邻苯二胺酶底物。

2 mol/L 硫酸。

## A. 3 检验程序

### A. 3.1 从菌株中检测肠毒素

从菌株中检测肠毒素程序见图 A. 1。



#### A. 4.1 从菌株中提取肠毒素方法

A. 4.1.1 液体透析培养法: 用宽 2.5 cm、长 80 cm 的透析袋装入 60 mL 产毒培养基, 两端扎紧, 将透析袋装入 250 mL 锥形瓶内, 加入 15 mL 灭菌生理盐水, 透析袋两端留在瓶口, 用棉塞塞好, 121℃ 高压灭菌 30 min, 待测菌株接种营养琼脂斜画 (试管 18 mm×180 mm), 37℃ 培养 24 h, 用 5 mL 生理盐水洗下菌落, 倾入上述培养瓶中, 每个菌种一瓶, 37℃ 振荡培养 48 h, 振速为 100 次/min, 吸出菌液离心, 8 000 r/min 30 min, 取上清液做双相琼脂扩散, 如为阴性, 再装入透析袋内, 用电风扇吹, 或用多聚乙二醇, 浓缩至 1 mL~2 mL, 再做琼脂扩散。

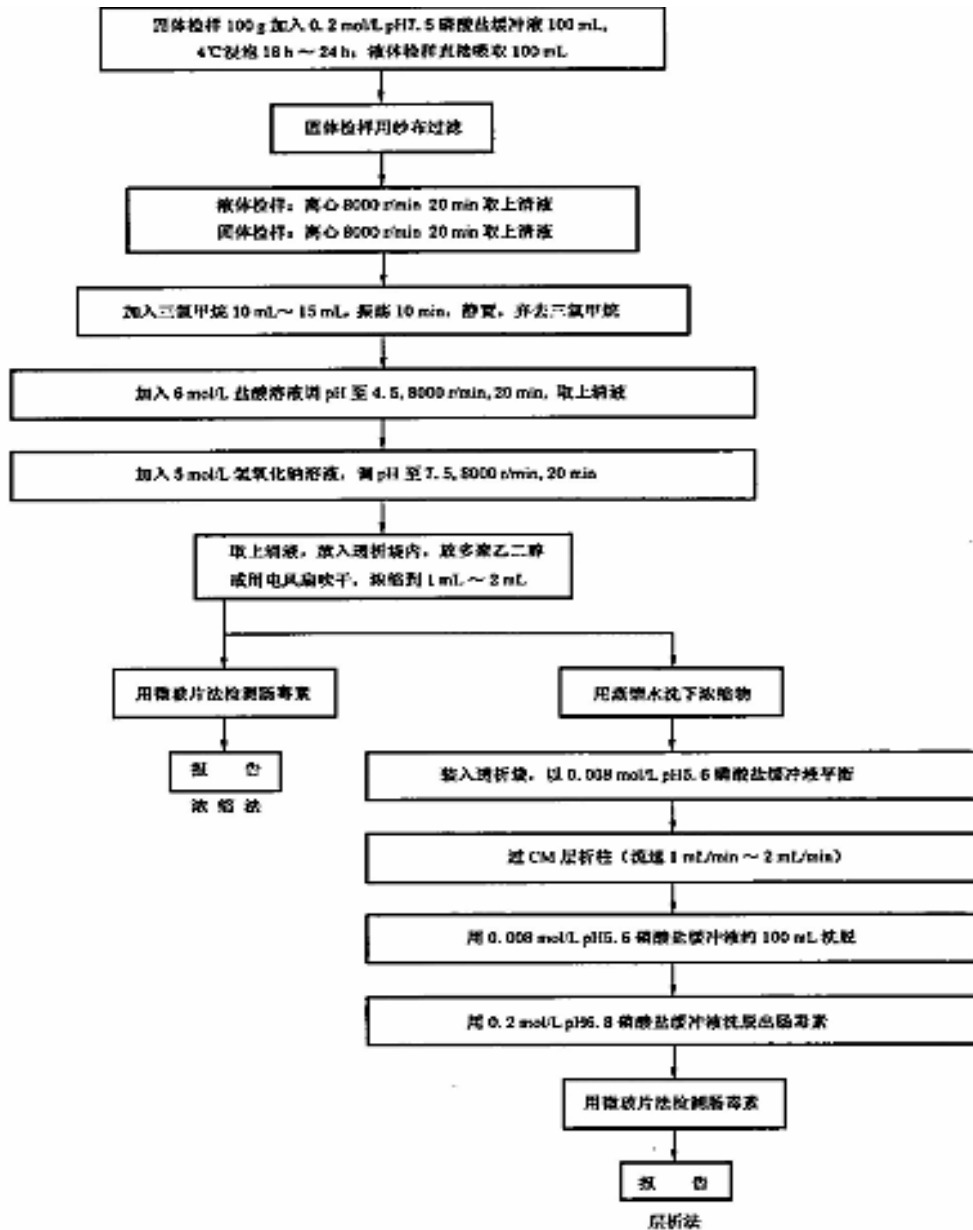
A. 4.1.2 固体透析培养法: 向直径 150 mm 的灭菌平皿或带盖搪瓷盘中倾入灭菌产毒培养基约 100 mL~120 mL, 凝固后表面铺一灭菌玻璃纸, 待测菌株接种在营养琼脂上, 37℃ 培养 24 h, 用约 3 mL 灭菌盐水洗下菌苔, 倾在玻璃纸上, 用灭菌三角棒涂满平皿, 37℃ 培养 48 h, 加入 10 mL~20 mL 灭菌生理盐水, 用灭菌三角棒刮取菌苔, 吸取菌液离心, 以下步骤同液体透析培养法。

#### A. 4.2 从食品中提取肠毒素方法

A. 4.2.1 直接浓缩法: 取食品样品 100 g, 加入无菌 0.2 mol/L pH7.5 磷酸盐缓冲液, 均质成匀浆, 置 4℃ 浸泡 18 h~24 h, 用纱布过滤将滤液离心 8 000 r/min 20 min, 取上清液, 放入分液漏斗中, 加入 10 mL 三氯甲烷, 振摇 10 min, 静置, 将底层三氯

甲烷弃去(如不分层,可8 000 r/min离心20 min)。加6 mol/L盐酸溶液调pH至4.5, 8 000 r/min离心20 min, 取上清液, 加5 mol/L氢氧化钠溶液, 调pH至7.5, 离心取上清液, 装入透析袋或玻璃纸, 用电扇吹干, 或放多聚乙二醇浓缩至1 mL~2 mL, 做微玻片双向琼脂扩散。

A, 4.2.2 层析法: 如需提取较纯肠毒素, 可将上述浓缩液用蒸馏水洗下, 装入透析袋, 以0.008 mol/L pH5.6 磷酸盐缓冲液平衡, 加入CM层析柱内, 流速1 mL/min~2 mL/min, 用0.008 mol/L pH5.6 磷酸盐缓冲液洗脱, 再用0.2 mol/L pH6.8 磷酸盐缓冲液洗脱出肠毒素。洗脱液装入透析袋内, 用电扇或多聚乙二醇浓缩至1 mL, 做微玻片双向琼脂扩散, 检测肠毒素。



## 实验六 食品单核细胞增生李斯特氏菌检验

1. 实验目的：学习单核细胞增生李斯特氏菌的检验方法，掌握食品和食物中毒样品中单核细胞增生李斯特氏菌的检验。

2. 实验原理：

单核细胞增生李斯特氏菌是一种人畜共患病的病原菌。它能引起人畜的李氏菌的病，感染后主要表现为败血症、脑膜炎和单核细胞增多。它广泛存在于自然界中，食品中存在的单增李氏菌对人类的安全具有危险，该菌在 4℃ 的环境中仍可生长繁殖，是冷藏食品威胁人类健康的主要病原菌之一。

该菌的生长范围为 2—42℃（也有报道在 0℃ 能缓慢生长），最适培养温度为 35—37℃，在 pH 中性至弱碱性（pH9.6）、氧分压略低、二氧化碳张力略高的条件下该菌生长良好，在 pH3.8—4.4 能缓慢生长，在 6.5% NaCl 肉汤中生长良好。在固体培养基上，菌落初始很小，透明，边缘整齐，呈露滴状，但随着菌落的增大，变得不透明。在 5—7% 的血平板上，菌落通常也不大，灰白色，刺种血平板培养后可产生窄小的 β-溶血环。在 0.6% 酵母浸膏胰酪大豆琼脂 (TSAYE) 和改良 Mc Bride (MMA) 琼脂上，用 45° 角入射光照射菌落，通过解剖镜垂直观察，菌落呈兰色、灰色或兰灰色。

该菌触酶阳性，氧化酶阴性，能发酵多种糖类，产酸不产气，如发酵葡萄糖、乳糖、水杨素、麦芽糖、鼠李糖、七叶苷、蔗糖（迟发酵）、山梨醇、海藻糖、果糖，不发酵木糖、甘露醇、肌醇、阿拉伯糖、侧金盏花醇、棉子糖、卫矛醇和纤维二糖，不利用枸橼酸盐，40% 胆汁不溶解，吡啶、硫化氢、尿素、明胶液化、硝酸盐还原、赖氨酸、鸟氨酸均阴性，VP、甲基红试验和精氨酸水解阳性。

3 设备和材料

3.1 冰箱：4℃ ~ -20℃。

3.2 恒温培养箱：30℃ ± 1℃、24℃ ± 1℃。

3.3 恒温水浴锅：46℃ ± 1℃。



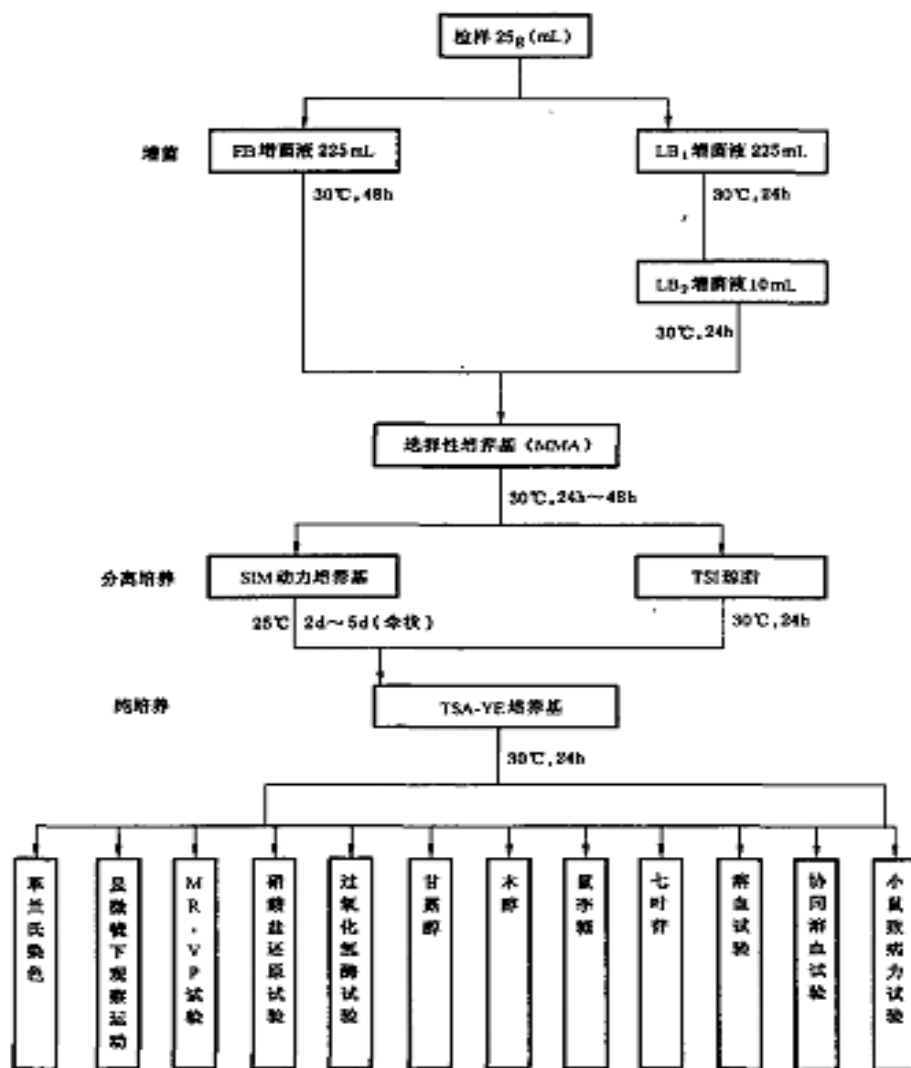
- 3.4 均质器或灭菌乳钵。
- 3.5 显微镜：10×—100×。
- 3.6 离心机：4 000 r/min。
- 3.7 架盘药物天平：0 g—500 g，精度 0.5 g。
- 3.8 锥形瓶：100 mL、500 mL。
- 3.9 灭菌吸管；1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL。(具 0.1 mL 刻度)。
- 3.10 灭菌平皿：直径 90 mm。
- 3.11 灭菌试管：16 mm×160 mm。
- 3.12 离心管：30 mm×100 mm。
- 3.13 灭菌注射器：1 mL。
- 3.14 单核细胞增生李斯特氏菌标准株。
- 3.15 马红球菌。
- 3.16 小白鼠：16 g~18 g。

#### 4 培养基和试剂

- 4.1 含 0.6%酵母浸膏的胰酪大豆肉汤(TSB-YE)：见第 A.1 章。
- 4.2 含 0.6%酵母浸膏的胰酪大豆琼脂(TSA-YE)：见第 A.2 章。
- 4.3 EB 增菌液：见第 A.3 章。
- 4.4 李氏增菌液(LB1, LB2)：见第 A.4 章。
- 4.5 三糖铁(TSI)琼脂：按 GB/T 4789.28-2003 中 4.26、4.27。
- 4.6 SIM 动力培养基：见第 A.5 章。
- 4.7 血琼脂：GB/T 4789.28-2003 中 4.6。
- 4.8 改良的 Mc Bride(MMA)琼脂：见第 A.5 章。
- 4.9 硝酸盐培养基：GB/T 4789.28-2003 中 3.17。
- 4.10 缓冲葡萄糖蛋白胨水(MR 和 VP 试验用)：GB/T 4789.28-2003 中 3.4。
- 4.11 糖发酵培养基：GB/T 4789.28-2003 中 3.2。
- 4.12 过氧化氢酶试验：GB/T 4789.28-2003 中 4.38。
- 4.13 1-盐酸乙酰胂黄溶液(Acriflavine HCl)：见第 A.4.2.1 章。
- 4.14 1%萘啶酮酸钠盐溶液(Naladixic acid)：见第 A.4.2.1 章。

#### 5 检验程序

单核细胞增生李斯特氏菌检验程序见图 1。



## 6 操作步骤

### 6.1 样品的收集及处理

无菌取样品 25 g (mL) 放灭菌均质器中加 225 mL EB 和 LB 增菌液中，充分搅拌成均质。如不能及时检验，可暂存 4℃ 冰箱。

### 6.2 增菌培养

EB 增菌液放 30℃ ± 1℃ 培养 48 h，I. Bi 增菌液 225 mL 放 30℃ ± 1℃ 培养 24 h，吸取 0.1 mL，加入 10 mL LB<sub>2</sub> 增菌液中二次增菌。

### 6.3 分离培养

将 EB 增菌液和 LB<sub>2</sub> 二次增菌液分离于选择培养基 MMA 琼脂平板上，培养 30℃ ± 1℃ 48 h，挑选可疑菌落，用白炽灯 45° 角斜光照射平板，李斯特氏菌的菌落为灰蓝或蓝色，小的圆形菌落。

6.4 选五个以上的上述可疑菌落接种三糖铁 (TSI) 琼脂和 SIM 动力培养基，培养于 25℃ ± 1℃，观察是否有动力，且成伞状或月芽状生长。一般观察 2 d ~ 7 d，阳性者可做下

一步鉴定。

### 6.5 纯培养

将上述有动力、形成伞状者并在三糖铁琼脂培养基上层、下层的产酸而不产硫化氢的可疑培养物接种于胰酪胨大豆琼脂培养基(TSA-YE)上纯培养，做以下鉴定。

### 6.6 染色镜检

将上述可疑纯培养物做革兰氏染色并做湿片检查；李斯特氏菌为革兰氏阳性小杆菌，大小为(0.4 $\mu$ m~0.5 $\mu$ m)×(0.5 $\mu$ m~2.0 $\mu$ m)；用生理盐水制成菌悬液，在油镜或相差显微镜下观察，该菌出现轻微旋转或翻滚样的运动。

### 6.7 生化特性

将上述可疑菌做进一步的生化试验，单核细胞增生李斯特氏菌的主要生化特性及其种间的区别见表1。

表1 单核细胞增生李斯特氏菌生化性状与有关菌的区别

菌种	溶血反应	硝酸盐还原	尿素酶	MR-VP	甘露醇	鼠李糖	木糖	七叶苷
单核细胞增生李斯特氏菌 ( <i>L. monocytogenes</i> )	+	-	-	+/+	-	+	-	+
绵羊李斯特氏菌 ( <i>L. ivanovii</i> )	+	-	-	+/+	-	-	+	+
英诺克李斯特氏菌 ( <i>L. innocua</i> )	-	-	-	+/+	-	V	-	+
威尔斯李斯特氏菌 ( <i>L. welshimeri</i> )	-	-	-	+/+	-	V	+	+
西尔李斯特氏菌 ( <i>L. seeligeri</i> )	+	-	-	+/+	-	-	+	+
格氏李斯特氏菌 ( <i>L. grayi</i> )	-	-	-	+/+	+	-	-	+
默氏李斯特氏菌 ( <i>L. murrayi</i> )	-	+	-	+/+	+	V	-	+

注：V反应不定，+阳性，-阴性。

### 6.8 对小鼠的毒力试验

将符合上述特性的纯培养物接种于TSB-YE中，30℃培养24h，离心，弃上清液，用0.85%灭菌生理盐水制备成浓度为10<sup>10</sup> cfu/mL的菌悬液，取此菌悬液进行小鼠腹腔注射3只—5只，每只0.5mL，观察小鼠死亡情况。致病株于2d~5d内死亡。试验时可用已知菌作对照。单核细胞增生李斯特氏菌、绵羊李斯特氏菌(*L. ivanovii*)对小鼠有致病性。

### 6.9 协同溶血试验(cAMP)

在血平板上平行接种金黄色葡萄球菌和马红球菌(*R. equz*)，在它们中两者之间垂直接种可疑李斯特氏菌，但不要触及它们，30℃培养24h~48h，检查平板中垂直

接种点对溶血环的影响。靠近金黄色葡萄球菌接种点的单核细胞增生李斯特菌的溶血增强，西尔李斯特氏菌(*L. seEligeri*)的溶血也增强，而绵羊李斯特氏菌(*L. ivanovii*)在马红球菌附近的溶血增强。

1. 实验目的：学习了解各类粮食、食品和饮料霉菌和酵母菌计数的检验方法。掌握各类食品和饮料中霉菌和酵母菌的计数。

2. 实验原理：霉菌和酵母菌数测定是指食品检样在一定条件下培养后，1g 或 1mL 食品中所污染的活的霉菌和酵母菌数量，依次判断食品被霉菌和酵母污染程度及其一般卫生状况。

### 3 设备和材料

3.1 冰箱；0℃—4℃。

3.2 恒温培养箱：25℃~28℃。

3.3 恒温振荡器。

3.4 显微镜：10×~100×。

3.5 架盘药物天平：0 g~500 g，精确至 0.5 g，

3.6 灭菌具玻塞锥形瓶：300 mL。

3.7 灭菌广口瓶：500 mL。

3.8 灭菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）。

3.9 灭菌平皿：直径 90 mm。

3.10 灭菌试管：16 mm×160 mm。

3.11 载玻片、盖玻片。

3.12 灭菌牛皮纸袋、塑料袋。

3.13 灭菌金属勺、刀等。

### 4 培养基和试剂

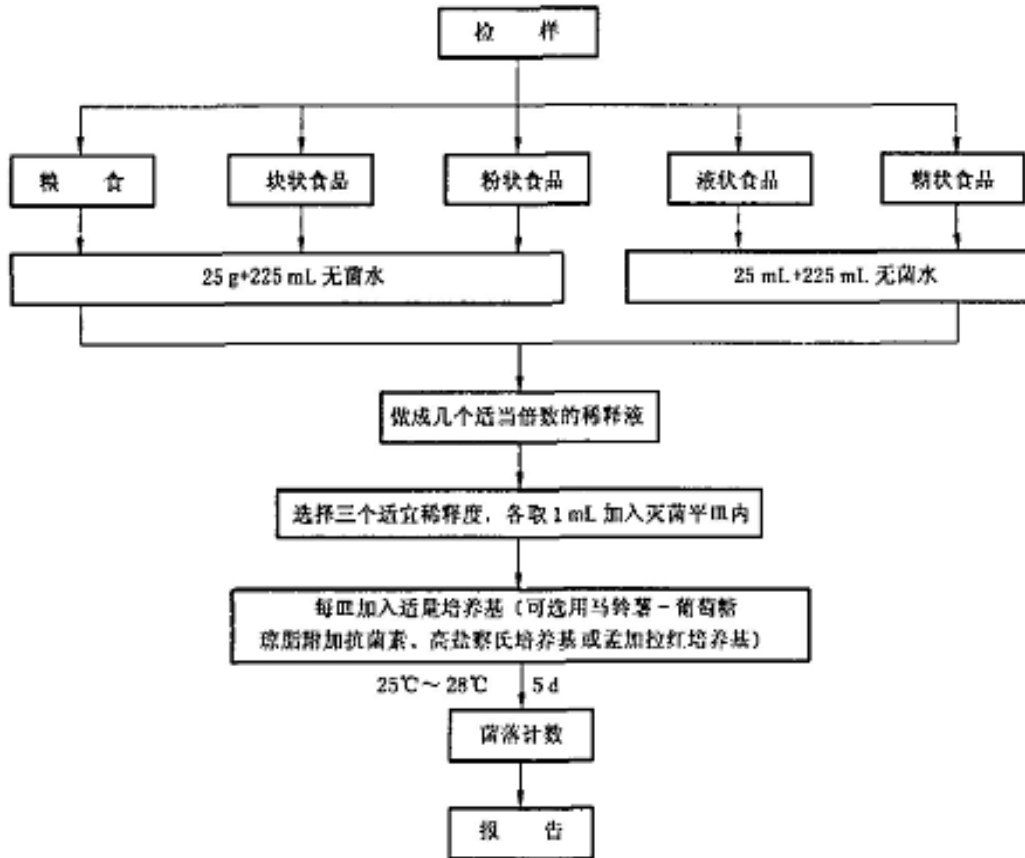
4.1 马铃薯—葡萄糖琼脂培养基，附加抗菌素：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.78 规定。

4.2 孟加拉红培养基：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.80 规定。

4.3 灭菌蒸馏水。

### 5 检验程序

检验程序见图 1。



## 6 操作步骤

6.1 以无菌操作称取检样 25 g(ml), 放入含 225 mL 灭菌水的具玻塞锥形瓶中, 振摇 30 min, 即为 1: 10 稀释液。

6.2 用灭菌吸管吸取 1: 10 稀释液 10 mL, 注入灭菌试管中, 另用 1 mL 灭菌吸管反复吹吸 50 次, 使霉菌孢子充分散开。

6.3 取 1 mL 1: 10 稀释液注入含有 9 mL 灭菌水的试管中, 另换一支 1 mL 灭菌吸管吹吸五次, 此液为 1: 100 稀释液。

6.4 按上述操作顺序做 10 倍递增稀释液, 每稀释一次, 换用一支 1 mL 灭菌吸管, 根据对样品污染情况的估计, 选择三个合适的稀释度, 分别在做 10 倍稀释的同时, 吸取 1 mL 稀释液于灭菌平皿中, 每个稀释度做两个平皿, 然后将晾至 45℃ 左右的培养基注入平皿中, 并转动平皿使之与样液混匀, 待琼脂凝固后, 倒置于 25℃~28℃ 温箱中, 3d 后开始观察, 共培养观察 5d。

6.5 计算方法: 通常选择菌落数在 10~150 之间的平皿进行计数, 同稀释度的两个平皿的菌落平均数乘以稀释倍数, 即为每克 (或毫升) 检样中所含霉菌和酵母数。稀释度选择及菌落报告方式可参考 GB/T 4789.2。

6.6 报告: 每克 (或毫升) 食品所含霉菌和酵母数以 cfu/g(ml.) 表示。

## 7 霉菌直接镜检计数法

霉菌直接镜检计数法见附录 A。

## 附录 A

(资料性附录)

### 霉菌直接镜检计数法

常用的为郝氏霉菌计测法，本方法适用于番茄酱罐头。

#### A. 1 设备和材料

A. 1.1 折光仪。

A. 1.2 显微镜。

A. 1.3 郝氏计测玻片：具有标准计测室的特制玻片。

A. 1.4 盖玻片。

A. 1.5 测微器：具标准刻度的玻片。

#### A. 2 操作步骤

A. 2.1 检样的制备：取定量检样，加蒸馏水稀释至折光指数为 1.3447~1.3460(即浓度为 7.9%~8.8%)，备用。

A. 2.2 显微镜标准视野的校正：将显微镜按放大率 90 倍~125 倍调节标准视野，使其直径为 1.382 mm。

A. 2.3 涂片：洗净郝氏计测玻片，将制好的标准液，用玻璃棒均匀的摊布于计测室，以备观察。

A. 2.4 观测：将制好之载玻片放于显微镜标准视野下进行霉菌观测，一般每一检样观察 50 个视野，同一检样应由两人进行观察。

A. 2.5 结果与计算：在标准视野下，发现有霉菌菌丝其长度超过标准视野(1.382 mm)的六分之一或三根菌丝总长度超过标准视野的六分之一(即测微器的一格)时即为阳性(+)，否则为阴性(~)，按 100 个视野计，其中发现有霉菌菌丝体存在的视野数，即为霉菌的视野百分数。

## 实验八 食品中志贺氏菌检验

1. 实验目的：了解食品中志贺氏菌的检验方法，掌握各类食品和食物中毒样品中志贺氏菌的检验。

2. 实验原理：为兼性厌氧菌，能在普通培养基上生长，形成中等大小，半透明的光滑型菌落。在肠道杆菌选择性培养基上形成无色菌落。分解葡萄糖，产酸不产气。VP 试验阴性，不分解尿素，不形成硫化氢，不能利用枸橼酸盐作为碳源。宋内氏志贺氏菌能迟缓发酵乳糖（37℃ 3~4 天）。是人类细菌性痢疾最为常见的病原菌，传染源主要为病人和带菌者，通过污染了痢疾杆菌的食物、饮水等经口感染。人类对志贺氏菌易感，10~200 个细菌可使 10~50% 消费者致病。

### 3 设备和材料

3.1 冰箱：0℃~4℃。

3.2 恒温培养箱：36℃±1℃，42℃。

3.3 显微镜：10×~100×。

3.4 均质器或灭菌乳钵。

3.5 架盘药物天平：0 g—500 g，精确至 0.5 g。

3.6 灭菌广口瓶：500 mL。

3.7 灭菌锥形瓶：500 mL、250 mL。

3.8 灭菌培养皿：直径 90 mm。

3.9 硝酸纤维素滤膜：150 mm×50 mm，+0.45 μm。临用时切成两张，每张 70 mm×50 mm，用铅笔划格，每格 6 mm×6 mm。每行 10 格，分 6 行。灭菌备用。

### 4 培养基和试剂

4.1 GN 增菌液：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.17 规定。

4.2 HE 琼脂：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.21 规定。

4.3 SS 琼脂：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.22 规定。

4.4 麦康凯琼脂：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.24 规定。

4.5 伊红美蓝琼脂(EMB)：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.25 规定。

4.6 三糖铁琼脂(TSI)：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.26、4.27 规定。

4.7 葡萄糖半固体管：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.31 规定。

4.8 半固体管：按 GB/T 4789. 28-2003 中 4.30 规定。

4.9 葡萄糖铵琼脂：按 GB/T 4789. 28-2003 中 3.8 规定。

4.10 尿素琼脂(pH7.2)：按 GB/T 4789. 28-2003 中 3.15 规定。

4.11 西蒙氏柠檬酸盐琼脂：按 GB/T 4789. 28-2003 中 3.5 规定。

4.12 氰化钾(KCN)培养基：按 GB/T 4789. 28-2003 中 3.16 规定。

4.13 氨基酸脱羧酶试验培养基：赖氨酸、鸟氨酸及对照培养基，按 GB/T 4789. 28-



2003 中 3.12

4.14 糖发酵管：棉子糖、甘露醇、甘油、七叶苷及水杨苷，按 GB/T 4789.28-2003 中 3.2 规定。

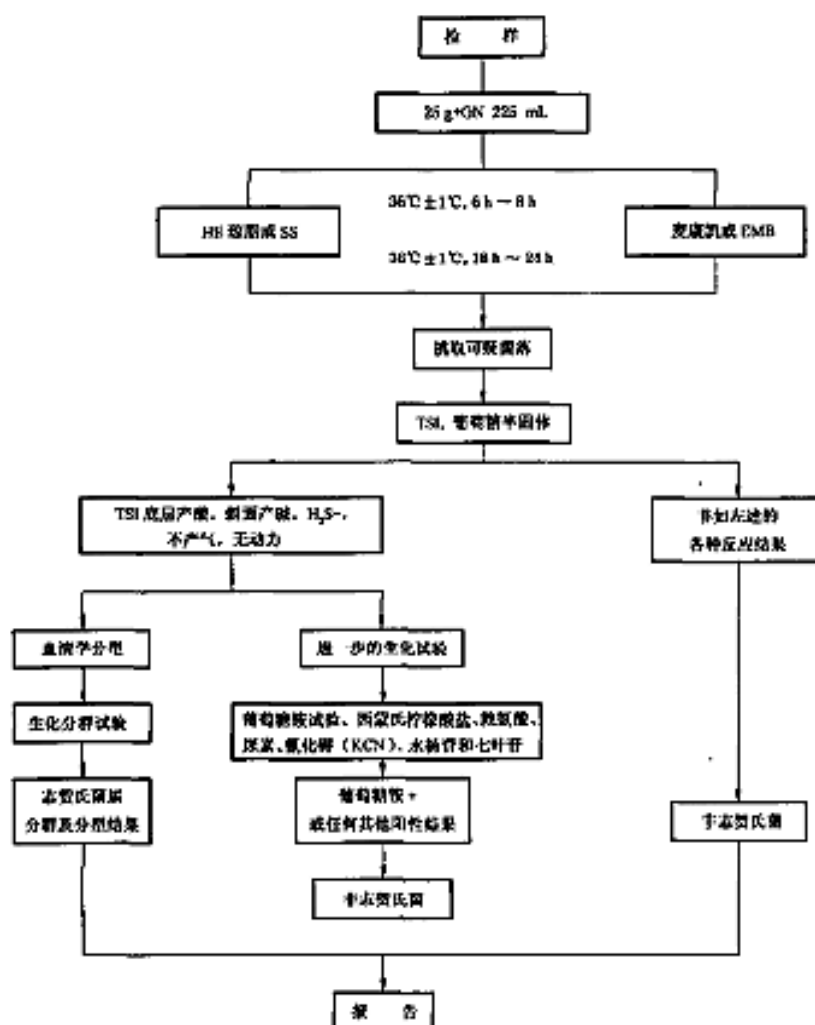
4.15 5%乳糖发酵管：按 GB/T 4789.28-2003 中 4.32 规定。

4.16 蛋白胨水、靛基质试剂：按 GB/T 4789.28-2003 中 3.13 规定。

4.17 志贺氏菌属诊断血清。

## 5 检验程序

志贺氏菌检验程序见图 1。



## 6 操作步骤

### 6.1 增菌

以无菌操作取检样 25 g (mL)，加入装有 225 mL GN 增菌液的广口瓶内，固体食品用均质器以 8 000 r/min~10 000 r/min 打碎 1 min，或用乳钵加灭菌砂磨碎，粉状食品用金属匙或玻璃棒研磨使其乳化，于 36°C 培养 6 h~8 h。培养时间视细菌生长情况而定，当培养液出现轻微混浊时应中止培养。

### 6.2 分离和初步生化试验

6.2.1 取增菌液 1 环，划线接种于 HE 琼脂平板或 ss 琼脂平板一个；另取 1 环划线接种于麦康凯琼脂平板或伊红美蓝琼脂平板一个，于 36℃ 培养 18 h—24 h，志贺氏菌在这些培养基上呈现无色透明不发酵乳糖的菌落。

6.2.2 挑取平板上的可疑菌落，接种三糖铁琼脂和葡萄糖半固体各一管。一般应多挑几个菌落，以防遗祸，经 36℃ 培养 18 h~24 h，分别观察结果。

6.2.3 下述培养物可以弃去：

- a) 在三糖铁琼脂斜面上呈蔓延生长的培养物；
- b) 在 18 h~24 h 内发酵乳糖、蔗糖的培养物；
- c) 不分解葡萄糖和只生长在半固体表面的培养物；
- d) 产气的培养物；
- e) 有动力的培养物；
- f) 产生硫化氢的培养物。

6.2.4 凡是乳糖、蔗糖不发酵，葡萄糖产酸不产气（福氏志贺氏菌 6 型可产生少量气体），无动力的菌株，可做血清学分型和进一步的生化试验。

### 6.3 血清学分型和进一步的生化试验

#### 6.3.1 血清学分型

挑取三糖铁琼脂上的培养物，做玻片凝集试验。先用四种志贺氏菌多价血清检查，如果由于 K 抗原的存在而不出现凝集，应将菌液煮沸后再检查；如果呈现凝集，则用 A1、A2、B 群多价和 D 群血清分别试验。如系 B 群福氏志贺氏菌，则用群和型因子血清分别检查。福氏志贺氏菌各型和亚型的型和群抗原见表 1。

可先用群因子血清检查，再根据群因子血清出现凝集的结果，依次选用型因子血清检查。

4 种志贺氏菌多价血清不凝集的菌株，可用鲍氏多价 1、2、3 分别检查，并进一步用各型因子血清检查。如果鲍氏多价血清不凝集，可用痢疾志贺氏菌 3-12 型多价血清及各型因子血清检查。

表 1 福氏志贺氏菌各型和亚型的型抗原和群抗原

表 1 福氏志贺氏菌各型和亚型的型抗原和群抗原

型和亚型	型抗原	群抗原	在群因子血清中的凝集		
			3,4	6	7,8
1a	I	1,2,4,5,9.....	+	-	-
1b	I	1,2,4,5,9.....	+	+	-
2a	II	1,3,4.....	+	-	-
2b	II	1,7,8,9.....	-	-	+
3a	III	1,6,7,8,9.....	-	+	+
3b	III	1,3,4,6.....	+	+	-
4a	IV	1,(3,4).....	(+)	-	-
4b	IV	1,3,4,6.....	+	+	-
5a	V	1,3,4.....	+	-	-
5b	V	1,5,7,9.....	-	-	+
6	VI	1,2,(4).....	(+)	-	-
X 变体	-	1,7,8,9.....	-	-	+
Y 变体	-	1,3,4.....	+	-	-

注：+凝集；-不凝集；( )有或无。

### 6.3.2 进一步的生化试验

在做血清学分型的同时，应做进一步的生化试验，即：葡萄糖铵，西蒙氏柠檬酸盐，赖氨酸和鸟氨酸脱羧酶，pH7.2 尿素，氰化钾(KCN)生长，以及水杨苷和七叶苷的分解。除宋内氏菌和鲍氏 13 型为鸟氨酸阳性外，志贺氏菌属的培养物均为阴性结果。必要时还应做革兰氏染色检查和氧化酶试验，应为氧化酶阴性的革兰氏阴性杆菌。生化反应不符合的菌株，即使能与某种志贺氏菌分型血清发生凝集，仍不得判定为志贺氏菌属的培养物。

已判定为志贺氏菌属的培养物，应进一步做 5%乳糖发酵，甘露醇、棉子糖和甘油的发酵和靛基质试验。志贺氏菌属四个生化群的培养物，应符合该群的生化特性。但福氏 6 型的生化特性与 A 群或 C 群相似，见表 2。

表 2 志贺氏菌属四个群的生化特性

表 2 志贺氏菌属四个群的生化特性

生化群	5%乳糖	甘露醇	棉子糖	甘油	靛基质
A 群：痢疾志贺氏菌	-	-	-	(+)	-/+
B 群：福氏志贺氏菌	-	+	+	-	(+)
C 群：鲍氏志贺氏菌	-	+	-	(+)	-/+
D 群：宋内氏志贺氏菌	+/(+)	+	+	d	-

注：+阳性；-阴性；-/+多数阴性，少数阳性；(+)迟缓阳性；d 有不同生化型。

### 6.4 结果报告

综合生化和血清学的试验结果判定菌型并作出报告。