

国家食品药品监督管理总局科技和标准司 编著

微生物检验方法 食品安全国家标准

实操指南



中国医药科技出版社

微生物检验方法 食品安全国家标准 实操指南

国家食品药品监督管理总局科技和标准司 / 编著

中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书对现行有效的微生物检验方法食品安全国家标准进行了系统梳理,从食品微生物检验实际操作的角度,对常用的29项食品微生物检验方法标准进行了详细说明,涉及仪器耗材、检验步骤、结果判读、操作要点与注意事项等内容,并附有标准涉及的微生物典型菌落图片。同时,本书还特别针对检验过程中可能遇到的问题进行疑难解析,以帮助食品微生物检验人员准确理解标准、规范实际操作,提升食品微生物检验水平。

图书在版编目(CIP)数据

微生物检验方法食品安全国家标准实操指南 / 国家食品药品监督管理总局科技和标准司编著. — 北京: 中国医药科技出版社, 2017.10

ISBN 978-7-5067-9590-6

I. ①微… II. ①国… III. ①食品检验—微生物检定—国家标准—中国
IV. ①TS207.4-65

中国版本图书馆CIP数据核字(2017)第233006号

美术编辑 陈君杞

版式设计 也在

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲22号

邮编 100082

电话 发行: 010-62227427 邮购: 010-62236938

网址 www.cmstp.com

规格 787×1092mm¹/₁₆

印张 24³/₄

字数 444千字

版次 2017年10月第1版

印次 2017年10月第1次印刷

印刷 北京盛通印刷股份有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978-7-5067-9590-6

定价 120.00元

版权所有 盗版必究

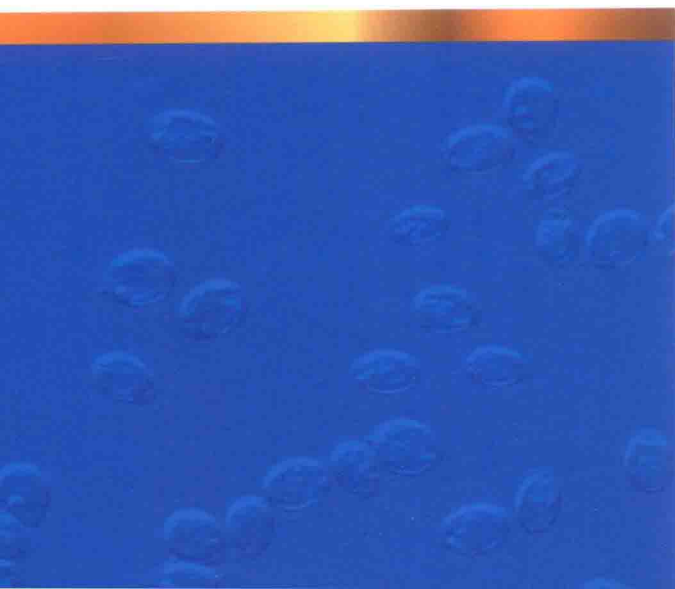
举报电话: 010-62228771

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换



微生物检验方法
食品安全国家标准

实操指南



编委会



主 编 于 军

执行主编 崔生辉 李晓瑜

主 审 刘秀梅

编 委 李凤琴 徐 进 郭云昌 赵琳娜 陈 倩

周 巍 邓自新 蔡芷荷 张 敏 任 秀

彭子欣 董银苹 闫韶飞 江 涛 白 瑶

裴晓燕 白 莉 王 伟 韩小敏 郭 森

王晓峰 杜 娟 张秀丽 付 萍 刘 伟

前 言



食品微生物检验方法食品安全国家标准是我国食品安全国家标准体系的重要组成部分。为推动食品微生物检验方法标准的宣贯实施，国家食品药品监督管理局科技和标准司组织中国食品药品检定研究院、国家食品安全风险评估中心等单位的专家，对现行有效的微生物检验方法食品安全国家标准进行系统梳理，从食品微生物检验实际操作的角度，对《食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则》(GB 4789.1—2016)、《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》(GB 4789.2—2016)等常用的29项食品微生物检验方法标准进行了详细说明，涉及仪器耗材、检验步骤、结果判读、操作要点与注意事项等内容，并附有标准涉及的微生物典型菌落图片。同时，本书还特别针对检验过程中可能遇到的问题进行疑难解析，以帮助食品微生物检验人员准确理解标准、规范实际操作，提升食品微生物检验水平。

由于编写时间有限，不妥之处敬请各位读者批评指正，我们将在今后工作中修改完善。

编 者

2017年7月



微生物检验方法
食品安全国家标准

实操指南



 目录

第一章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则》 (GB 4789.1—2016)	001
第二章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》 (GB 4789.2—2016)	009
第三章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》 (GB 4789.3—2016)	019
第四章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》 (GB 4789.4—2016)	029
第五章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验》 (GB 4789.5—2012)	041
第六章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》 (GB 4789.6—2016)	053
第七章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》 (GB 4789.7—2013)	069
第八章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 小肠结肠炎耶尔森氏菌 检验》(GB 4789.8—2016)	083
第九章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 空肠弯曲菌检验》 (GB 4789.9—2014)	097
第十章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》 (GB 4789.10—2016)	107
第十一章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 β 型溶血性链球菌检验》 (GB 4789.11—2014)	121
第十二章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验》 (GB 4789.12—2016)	127

第十三章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验》 (GB 4789.13—2012)	139
第十四章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验》 (GB 4789.14—2014)	147
第十五章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》 (GB 4789.15—2016)	159
第十六章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 商业无菌检验》 (GB 4789.26—2013)	167
第十七章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求》 (GB 4789.28—2013)	173
第十八章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏 菌检验》(GB 4789.30—2016)	255
第十九章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 双歧杆菌检验》 (GB 4789.34—2016)	271
第二十章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》 (GB 4789.35—2016)	291
第二十一章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验》(GB 4789.36—2016)	303
第二十二章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数》 (GB 4789.38—2012)	315
第二十三章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属 (阪崎肠杆菌) 检验》(GB 4789.40—2016)	331
第二十四章 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 诺如病毒检验》 (GB 4789.42—2016)	339
第二十五章 《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》 (GB 8538—2016)	357
第二十六章 《食品安全国家标准 食品中泛酸的测定》 (GB 5009.210—2016)	365
第二十七章 《食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》 (GB 5009.211—2014)	371
第二十八章 《食品安全国家标准 食品中生物素的测定》 (GB 5009.259—2016)	377
第二十九章 《食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中维生素 B ₁₂ 的测定》 (GB 5413.14—2010)	383

第一章

《食品安全国家标准 食品微生物学检验

总则》(GB 4789.1—2016)

《食品安全国家标准 食品卫生微生物学检验 总则》(GB 4789.1—2016)(以下简称《总则》)是我国食品安全微生物标准方法体系中食品微生物检验的通用基础标准。《总则》规定了食品微生物学检验基本原则和要求,适用于从事食品微生物学检验的实验室检验人员。为了缩短我国与国际标准先进理念之间的差距,加强我国国际食品贸易和国内监管的科学有效性,本标准遵循国际食品安全风险分析的现代理论,借鉴国际食品卫生法典委员会(Codex Committee on Food Hygiene,简称CCFH)“高危食品——重要致病菌”组合的风险管理模式,采纳了国际社会普遍认同的、先进的分级采样方案。

作为强制执行的食品安全国家标准,《总则》中详细说明了采样方案在我国食品安全标准体系中(致病菌限量标准、产品标准)微生物指标和限量设置的科学性,为采样方案的合理应用、促进食品安全标准间的协调一致,完善食品安全国家标准体系提供了科学支撑。

1 实验室基本要求

1.1 检验人员

- 1.1.1 应具有相应的微生物专业教育或培训经历，具备相应的资质，能够理解并正确实施检验。
- 1.1.2 应掌握实验室生物安全操作和消毒知识。
- 1.1.3 应在检验过程中保持个人整洁与卫生，防止人为污染样品。
- 1.1.4 应在检验过程中遵守相关安全措施的规定，确保自身安全。
- 1.1.5 有颜色视觉障碍的人员不能从事涉及辨色的实验。

1.2 环境与设施

- 1.2.1 实验室环境不应影响检验结果的准确性。
- 1.2.2 实验区域应与办公区域明显分开。
- 1.2.3 实验室工作面积和总体布局应能满足从事检验工作的需要，实验室布局宜采用单方向工作流程，避免交叉污染。
- 1.2.4 实验室内环境的温度、湿度、洁净度及照度、噪声等应符合工作要求。
- 1.2.5 食品样品检验应在洁净区域进行，洁净区域应有明显标示。
- 1.2.6 根据目前国内实验室生物安全设施的实际情况，以及对病原微生物病种的检验需求，病原微生物的分离鉴定工作应在二级或二级以上的生物安全实验室进行。

1.3 实验设备

- 1.3.1 实验设备应满足检验工作的需要。微生物实验室常用设备见表 1-1。
- 1.3.2 实验设备应放置于适宜的环境条件下，便于维护、清洁、消毒与校准，并保持整洁与良好的工作状态。
- 1.3.3 实验设备应定期进行检查和 / 或检定（加贴标识）、维护和保养，以确保工作性能和操作安全。
- 1.3.4 实验设备应有日常监控记录或使用记录。

1.4 检验用品

- 1.4.1 检验用品应满足微生物检验工作的需求，微生物实验室常用检验用品见表 1-1。
- 1.4.2 检验用品在使用前应保持清洁和 / 或无菌。
- 1.4.3 需要灭菌的检验用品应放置在特定容器内或用合适的材料（如专用包装纸、铝箔纸等）包裹或加塞，应保证灭菌效果。

1.4.4 检验用品的储存环境应保持干燥和清洁,已灭菌与未灭菌的用品应分开存放并明确标识。

1.4.5 灭菌检验用品应记录灭菌的温度与持续时间及有效使用期限。

表 1-1 微生物实验室常用设备和检验用品

类别	用途	名称
设备	称量	天平等
	消毒灭菌	干烤/干燥设备,高压灭菌、过滤除菌、紫外线装置等
	培养基制备	pH 计等
	样品处理	均质器(剪切式或拍打式均质器)、离心机等
	稀释	移液器
	培养	恒温培养箱、恒温水浴等装置
	镜检计数	显微镜、放大镜、游标卡尺等
	冷藏冷冻	冰箱、冷冻柜等
检验用品	生物安全	生物安全柜等
	常规检验	接种环(针)、酒精灯、镊子、剪刀、药匙、消毒棉球、硅胶(棉)塞、吸管、吸球、试管、平皿、锥形瓶、微孔板、广口瓶、量筒、玻棒及 L 形玻棒、pH 试纸、记号笔、均质袋等
	现场采样	无菌采样容器、棉签、涂抹棒、采样规格板、转运管等

1.5 培养基和试剂

培养基和试剂的制备和质量要求按照 GB 4789.28 的规定执行。

1.6 标准菌株

1.6.1 实验室应保存能满足实验需要的标准菌株。

1.6.2 应使用微生物菌种保藏专门机构或专业权威机构保存的、可溯源的标准菌株。

注:如 ATCC 保藏菌株,以及国内被认可的专业菌种保藏单位保存的菌株,如中国科学院微生物所、中国食品药品检定研究院、中国食品工业发酵研究院、中国科学院广州微生物所等单位保藏的菌株。

1.6.3 标准菌株的保存、传代按照 GB 4789.28 的规定执行。

1.6.4 质控菌株

在无法得到可溯源的标准菌株的条件下,为满足实验室开展的某些特定检测项目的需求,《总则》中提出质控菌株的要求,对实验室分离菌株(野生菌株),经过鉴定后,可作为实验室内部质量控制的菌株。

2 样品的采集

2.1 采样原则

2.1.1 样品的采集应遵循随机性、代表性的原则。

2.1.2 采样过程遵循无菌操作程序，防止一切可能的外来污染。

2.2 采样方案

2.2.1 根据检验目的、食品特点、批量、检验方法、微生物的危害程度等确定采样方案。

2.2.2 采样方案分为二级和三级采样方案。二级采样方案设有 n 、 c 和 m 值，三级采样方案设有 n 、 c 、 m 和 M 值。

n : 同一批次产品应采集的样品件数。

c : 最大可允许超出 m 值的样品数。

m : 微生物指标可接受水平限量值（三级采样方案）或最高安全限量值（二级采样方案）。

M : 微生物指标的最高安全限量值。

注 1: 按照二级采样方案设定的指标，在 n 个样品中，允许有 $\leq c$ 个样品其相应微生物指标检验值大于 m 值。

注 2: 按照三级采样方案设定的指标，在 n 个样品中，允许全部样品中相应微生物指标检验值小于或等于 m 值；允许有 $\leq c$ 个样品其相应微生物指标检验值在 m 值和 M 值之间；不允许有样品相应微生物指标检验值大于 M 值。

例如： $n=5$ ， $c=2$ ， $m=100\text{CFU/g}$ ， $M=1000\text{CFU/g}$ 。含义是从一批产品中采 5 个样品，若 5 个样品的检验结果均小于或等于 m 值（ $\leq 100\text{CFU/g}$ ），则这种情况是允许的；若 2 个样品的结果（ X ）位于 m 值和 M 值之间（ $100\text{CFU/g} < X \leq 1000\text{CFU/g}$ ），则这种情况也是允许的；若有 3 个及以上样品的检验结果位于 m 值和 M 值之间，则这种情况是不允许的；若有任一样品的检验结果大于 M 值（ $> 1000\text{CFU/g}$ ），则这种情况也是不允许的。

2.2.3 各类食品的采样方案按食品安全相关标准的规定执行。

2.2.4 食品安全事故中食品样品的采集：

根据《中华人民共和国食品安全法》，食品安全事故，指食源性疾病、食品污染等源于食品，对人体健康有危害或者可能有危害的事故。

(a) 由批量生产加工的食品污染导致的食品安全事故，食品样品的采集和判定原

则按 2.2.2 和 2.2.3 执行。重点采集同批次食品样品。

(b) 由餐饮单位或家庭烹调加工的食品导致的食品安全事故,重点采集现场剩余食品样品,以满足食品安全事故病因判定和病原确证的要求。

2.3 各类食品的采样方法

2.3.1 预包装食品

2.3.1.1 应采集相同批次、独立包装、适量件数的食品样品,每件样品的采样量应满足微生物指标检验的要求。

2.3.1.2 根据目前食品的包装规格现况,为了便于采样,同时保证样品用量和检验质量,将独立包装净含量划分标准从原标准的“500mL/500g”修改为“1000mL/1000g”。即独立包装小于、等于 1000g 的固态食品或小于、等于 1000mL 的液态食品,取相同批次的包装。

2.3.1.3 独立包装大于 1000mL 的液态食品,应在采样前摇动或用无菌棒搅拌液体,使其达到均质后采集适量样品,放入同一个无菌采样容器内作为一件食品样品;大于 1000g 的固态食品,应用无菌采样器从同一包装的不同部位分别采取适量样品,放入同一个无菌采样容器内作为一件食品样品。

2.3.2 散装食品或现场制作食品

用无菌采样工具从 n 个不同部位现场采集样品,放入 n 个无菌采样容器内作为 n 件食品样品。每件样品的采样量应满足微生物指标检验单位的要求。

2.4 采集样品的标记

应对采集的样品进行及时、准确的记录和标记,内容包括采样人、采样地点、时间、样品名称、来源、批号、数量、保存条件等信息。

2.5 采集样品的贮存和运输

2.5.1 应尽快将样品送往实验室检验。

2.5.2 应在运输过程中保持样品完整。

2.5.3 为了保证检验质量,应在接近原有贮存温度条件下贮存样品,或采取必要措施防止样品中微生物数量的变化。

3 检验

3.1 样品处理

3.1.1 实验室接到送检样品后应认真核对登记,确保样品的相关信息完整并符合检验要求。

3.1.2 实验室应按要求尽快检验。若不能及时检验，应采取必要的措施，防止样品中原有微生物因客观条件的干扰而发生变化。

3.1.3 各类食品样品处理应按相关食品安全标准检验方法的规定执行。

3.2 样品检验

由于各相关食品安全标准已有关于检验方法选择的规定，故不在本标准中重复规定。增加了对各类食品样品处理的原则性要求，即按照相关食品安全标准检验方法的规定执行。

4 生物安全要求

应符合 GB 19489 的规定。

5 记录与报告

5.1 记录

检验过程中应即时、客观地记录观察到的现象、结果和数据等信息。

5.2 报告

实验室应按照检验方法中规定的要求，准确、客观地报告检验结果。

6 检验后样品的处理

6.1 检验结果报告后，被检样品方能处理。

6.2 检出致病菌的样品要经过无害化处理。

6.3 检验结果报告后，剩余样品和同批产品不进行微生物项目的复检。

扩展阅读

1. ICMSF 食品微生物丛书第七卷（原著 ICMSF），刘秀梅，陆苏颀，田静主译. 微生物检验与食品安全控制，北京：中国轻工业出版社，2012.
2. ICMSF 食品微生物丛书第八卷（原著 ICMSF），刘秀梅，曹敏，毛雪丹主译. 食品加工过程的微生物控制原理与实践，北京：中国轻工业出版社，2017.
3. 《食品微生物标准的制定和应用原则》，国际食品法典委员会，CAC/GL 21-1997，2013.

1. 实验室应根据需要设置阳性对照、阴性对照和空白对照,定期对检验过程进行质量控制。
2. 实验室应定期对实验人员进行技术考核。
3. 检验人员必须具有相应的微生物专业教育或培训经历,具备相应的资质,能够理解并正确实施检验,以保证微生物检验全过程的安全、准确,以及检验结果的可靠性。
4. 培养基和试剂的制备和质量要求应按照 GB 4789.28 的规定执行,定期进行实验室内的质量验证和评定。
5. 实验需要的标准菌株,应使用微生物菌种保藏专门机构或专业权威机构保存的、可溯源的标准菌株。
6. 样品采样和检验的全过程应严格遵循无菌操作程序,防止一切可能的外来污染。
7. 检验过程中应即时、客观地记录观察到的现象、结果和数据等信息,并按照检验方法中规定的要求,准确、客观地报告检验结果。
8. 检验结果报告后,被检样品方能处理。检出致病菌的样品要经过无害化处理。

问题 1 采样人员或微生物实验室的检验人员如何理解和应用采样方案?

原则上讲,应根据检验目的和相关产品标准中规定的采样方案执行。如 GB 29921 中集中规定了沙门菌在肉、水产品、粮食制品等 11 大类预包装食品中的限量要求和采样方案($n5, c0, m0$ CFU/25g),那么,在依据该标准判定相关产品是否合格时,就必须采集同批食品 5 件,检验后报告 5 件中沙门菌的检出情况。如果 5 件均未检出沙门菌,报告:5、0、0,合格;只要有一件样品中检出 1 个沙门菌阳性菌落,报告:5、1、1 (CFU/25g),即为不合格。

问题 2

在处理食品安全事故时，也要按照相关食品产品标准中规定的采样方案执行吗？

原则上不需要，因为检验目的截然不同。在处理可能由食源性致病菌引起的食品安全事故时，重要的是发现病原，尽快明确事故原因，使涉案病人、场所等及时得到妥善、正确的处理。因此，如果由批量生产加工的食品污染导致的食品安全事故，要重点采集同批次食品样品，食品样品的采集和判定原则按相关采样方案执行。如果由餐饮单位或家庭烹调加工的食品导致的食品安全事故，重点采集现场剩余的全部或尽可能多的食品样品，以满足食品安全事故病因判定和病原确证的要求。

问题 3

在政府监管过程中，经常收到被检方提出复检的要求，如何理解《总则》中“检验结果报告后，剩余样品和同批产品不进行微生物项目的复检”的规定？

《总则》中的规定是对微生物学检验的规定，主要是基于微生物检验的常规特点和科学基础。国际食品法典委员会（Codex Alimentarius Commission）2013 修订的《食品微生物标准的制定和应用原则》CAC/GL 21-1997 中亦明确规定：采样方案中应规定每个被检批次食品分析单位的数量和规格，不合格批次不得通过复检否定初次检验的结果。也就是说：作为微生物检验本身，操作全程符合规定，没有外来污染的情况下，如果第一次检验结果为致病菌阳性，那么即使第二次、第三次检验结果都是阴性，也不能推翻第一次检验结果阳性的报告。理由之一，微生物污染是不均匀的，采样方案再科学，也是基于概率分布，不可能检验全部样品。理由之二，目前我国微生物安全标准体系已采用了 ICMSF 的分级采样方案，每批食品采集 $n(5)$ 件，不是只检验 1 件，实际等同于进行了微生物“复检”。如果按照这样的采样方案检验与判定，当然缺乏重复检验的必要性。