

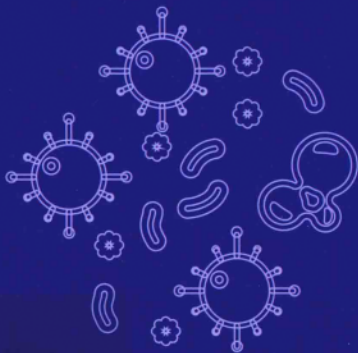
国家级食品工程与质量安全实验教学示范中心系列教材



# 食品安全微生物 检验技术

SHIPIN ANQUAN WEISHENGWU JIANYAN JISHU

主 编 朱军莉  
副主编 赵广英 许光治  
石双妮 黄建锋



浙江工商大学出版社  
ZHEJIANG GONGSHANG UNIVERSITY PRESS

# 食品安全微生物检验技术

主 编 朱军莉  
副主编 赵广英 许光治  
石双妮 黄建锋



浙江工商大学出版社  
ZHEJIANG GONGSHANG UNIVERSITY PRESS

· 杭州 ·

## 图书在版编目(CIP)数据

食品安全微生物检验技术 / 朱军莉主编. — 杭州:  
浙江工商大学出版社, 2020.3  
ISBN 978-7-5178-3579-0

I. ①食… II. ①朱… III. ①食品检验—微生物检定  
IV. ①TS207.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2019)第 257614 号

## 食品安全微生物检验技术

SHIPIN ANQUAN WEISHENGWU JIANYAN JISHU

主编 朱军莉 副主编 赵广英 许光治 石双妮 黄建锋

责任编辑 吴岳婷

责任校对 唐桂礼

封面设计 林朦朦

责任印制 包建辉

出版发行 浙江工商大学出版社

(杭州市教工路 149 号 邮政编码 310012)

(E-mail: zjgsupress@163.com)

(网址: <http://www.zjgsupress.com>)

电话: 0571-88823703, 88831806(传真)

排 版 杭州朝曦图文设计有限公司

印 刷 浙江全能工艺美术印刷有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 14.5

字 数 335 千

版 印 次 2020 年 3 月第 1 版 2020 年 3 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-5178-3579-0

定 价 49.80 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江工商大学出版社营销部邮购电话 0571-88904970

# 序 言

浙江工商大学食品与生物工程学院重视专业实践教学是长期坚持的传统,老一辈教师在二十世纪七八十年代为实验课制作的标本、切片、教具等至今仍然留存,老校友常常津津乐道求学时老师们手把手指导实验以及带队实习时与同学们同行、同吃、同住的美好往事。

二十一世纪初,随着食品质量与安全(原食品卫生与检验)专业教学改革的进行,实践教学的重要性越发凸显,从之前作为理论教学的补充和辅助,逐步发展为自成一体的知识体系和技能模块,成为课程体系的重要组成部分。针对专业人才的培养,学院设定了“精食品、强检验、善管理”三位一体的目标,经过多年摸索实践,“‘技术管理型’食品质量与安全专业人才培养模式的创新及实践”获得了2005年国家教学成果二等奖。在之后该成果推广应用的过程中,学院结合自身学科特色和行业发展要求,对食品人才培养目标有增加了时代特征,提出了“精技术、善管理、承商道、求创新”的人才培养新理念,在实践教学方面,以原有的一体化实践训练平台为基础,重构了适应学生个性化发展,整合各方面资源要素的“多阶段、多方向、多能力”的立体化实践教学体系,“‘工商融和’的食品类专业人才培养模式创新与实践”荣获2014年浙江省教学成果一等奖。

基于上述教学成果和实践教学改革的尝试,我院食品工程与质量安全实验教学中心也于2014年获批为国家级实验教学示范中心。中心现设“食品工程实验教学”“工程教学与实训”“食品质量与安全专业实验”等3个分中心,面积达8000平方米,各类、各层次实验室20个,校内外实习基地十余个。中心面向校内多个学院的本科专业开设《食品理化检验实验》《食品感官科学实验》《食品工艺学实验》《水产品加工综合实验》《金工实训》《化工原理实验》等20门实验课程,年接纳实验学生1900多人,完成8.3万实验人时数;同时还实施对社会开放,成为多家中小学的教学对接点。

为了提高示范中心的建设水平,更好地发挥示范中心的专业育人作用,结合本学科的优势和特色,经过中心教师的多次研讨,决定编辑出版系列实验指导教材,主要包括《食品产品开发实验技术》《食品质量安全快速检测原理及技术实验手册》《食品安全微生物检验技术》《食品新产品开发虚拟仿真平台指导手册》等。系列教材立足于从基础到专业、从群体到个体、从学校到企业、从学习到创新的“四位一体”立体网络化实验教学体系,涉及《食品理化检验实验》《食品感官科学实验》《食品工艺学实验》《水产品加工综合实验》《金工实训》《化工原理实验》等多门实验课程。实验内容结合学科知识基础、行业技术进展及教师最新科研成果,以单一知识点和单项技能为出发点,将上游与下游的相关实验串联成知识链,将不同的实验课程结成面,促使单独的实验课程或实验项目变成具有内在逻辑关系的项目链和课程群,辅以问题引导、结果反推等教学方法,强化学生知识和技能的系统性、实验设计的主动性,最终完成构建满足学生的共性学习要求和个性化发展要求的教学实验体

系,逐步强化学生的科学思维,培养他们的工程思维和系统思维,发展其创新创业的能力。

本系列实验教材的编辑出版,是示范中心建设的重要内容,是我校实践教学改革的组成部分,得到了校、院领导的大力支持,相关教师也付出了大量的心血,在此,谨表示由衷感谢!

由于时间仓促,教材中不免存在不足甚至错误之处,敬请提出宝贵意见,我们将在后续修订中加以改进。

示范中心执行主任 顾振宇 教授

二〇一七年十二月

## 国家级食品工程与质量安全实验教学示范中心系列教材编委会

主 任:顾振宇 饶平凡

委 员:(按姓氏笔画排序)

邓少平 陈建设 陈忠秀 孟岳成

顾 青 韩剑众 戴志远

## 目 录

第一章 食品微生物学检验总则 .....	1
第二章 食品微生物指示菌检验 .....	12
检验一 食品中菌落总数测定 .....	12
检验二 食品中大肠菌群计数 .....	17
检验三 食品中大肠埃希氏杆菌计数 .....	23
检验四 食品中霉菌和酵母计数 .....	29
第三章 食品革兰氏阴性肠道致病菌检验 .....	33
检验五 食品中沙门氏菌检验 .....	33
检验六 食品中志贺氏菌检验 .....	43
检验七 食品中致泻性大肠埃希氏菌检验 .....	52
检验八 食品大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验 .....	62
检验九 食品中副溶血性弧菌检验 .....	69
检验十 食品中小肠结肠耶尔森氏菌检验 .....	76
检验十一 食品中空肠弯曲菌检验 .....	82
检验十二 食品中克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验 .....	90
第四章 食品革兰氏阳性致病菌检验 .....	95
检验十三 食品中金黄色葡萄球菌检验 .....	95
检验十四 食品中 $\beta$ 型链球菌检验 .....	106
检验十五 食品中肉毒梭菌及肉毒毒素检验 .....	110
检验十六 食品中产气荚膜梭菌检验 .....	118
检验十七 食品中蜡样芽孢杆菌检验 .....	124
检验十八 食品中单核细胞增生李斯特氏菌检验 .....	133
第五章 食品产毒霉菌和病毒检验 .....	142
检验十九 食品中产毒霉菌和霉菌毒素检验 .....	142
检验二十 食品中诺如病毒检验 .....	150

<b>第六章 食品工业微生物检验</b> .....	160
检验二十一 生产用水微生物学检验 .....	160
检验二十二 饮用水中铜绿假单胞菌检验 .....	174
检验二十三 食品中乳酸菌检验 .....	179
检验二十四 食品中双歧杆菌检验 .....	186
检验二十五 食品商业无菌检验 .....	191
检验二十六 消毒餐具微生物检验 .....	195
检验二十七 食品生产企业环境微生物检验 .....	198
<b>附 录</b> .....	208
附录 1 细菌生化试验 .....	208
附录 2 常用染色液的配制 .....	215
附录 3 常用指示剂的配制 .....	217
附录 4 部分微生物菌种保藏机构名称和缩写 .....	218
附录 5 食品微生物常见检测项目关系图 .....	219
<b>参考文献</b> .....	220
<b>后 记</b> .....	221

# 第一章 食品微生物学检验总则

《食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则》(GB 4789.1—2016)(下称《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,明确检验人员、环境与设施、实验设备、检验用品、培养基和试剂、质控菌株六方面微生物检验实验室的基本要求,适用于从事食品微生物学检验的实验室检验人员。本标准遵循国际食品安全风险分析的现代理论,借鉴国家食品卫生法典委员会“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。《总则》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)的微生物指标和限量设置,保证了食品安全国家标准体系的科学性与国际性。

## 一、范围

本标准规定了食品微生物学检验基本原则和要求。

本标准适用于食品微生物学检验。

## 二、实验室基本要求

### (一)检验人员

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。
2. 应掌握实验室生物安全操作和消毒知识。
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。
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。
5. 有颜色视觉障碍的人员不能从事涉及辨色的实验。

### (二)环境与设施

1. 实验室环境不应影响检验结果的准确性。
2. 实验区域应与办公区域明显分开。
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。
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。
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。
6. 病原微生物分离鉴定工作应在二级或以上生物安全实验室进行。

### (三) 实验设备

1. 实验设备应满足检验工作的需要,常用设备见表 1-1、常用设备的工作原理见表 1-2 所示。

2. 实验设备应放置于适宜的环境条件下和便于维护、清洁、消毒与校准,并保持整洁与良好的工作状态。

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。

4. 实验设备应有日常监控记录或使用记录。

表 1-1 微生物实验室常用设备和检验用品

类别	用途	仪器名称
设备	称量	天平
	消毒灭菌	干烤/干燥设备、高压灭菌、过滤除菌、紫外线等
	培养基制备	pH 计
	样品处理	均质器(剪切式或拍打式均质器)、离心机
	稀释	移液器、吸管
	培养	恒温培养箱、恒温水浴等
	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	生物安全设备	生物安全柜、超净工作台
	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
	现场采样检验	无菌采样容器、棉签、涂抹棒、采样规格板、转运管等

表 1-2 食品微生物实验主要设备的工作原理

设备		工作原理
高压蒸汽灭菌锅		高压蒸汽灭菌锅利用高压饱和蒸汽穿透力强,可杀灭包括芽孢在内的所有微生物的原理,成为热力消毒灭菌效果最有效,一旦温度超过它的上限,其蛋白质、酶及核酸就会遭到永久性的破坏,微生物也会随之发生不可逆的死亡。因此,高压蒸汽灭菌器适用于培养基、稀释液等在高温和湿热条件下不发生或损坏的物质灭菌
鼓风干燥箱		用于玻璃器皿等器具的干燥、消毒和灭菌,不适用于培养基和稀释液等样品的灭菌
生物安全柜		生物安全柜是由特殊气流组织结构、高效空气过滤器、风机压力系统和必要的在线仪表等组成的一种负压箱式结构的安全设备。使用该设备可用于保护操作者、实验环境、实验对象,以免在操作具有传染性的实验材料时可能产生的传染性气溶胶和溅出,是实验室生物安全中一级防护屏障中最基本的安全防护设备

续表

设备		工作原理
超净工作台		超净工作台原理是在特定空间内,室内空气经预过滤器初滤,由小型离心风机压入静压箱,再经空气高效过滤器二级过滤,从空气高效过滤器出风面吹出的洁净气流具有一定的和均匀的断面风速,可以排除工作区原来的空气,将尘埃颗粒和生物颗粒带走,以形成无菌的高洁净的工作环境
生化培养箱		生化培养箱同时装有电热丝和压缩机,具有制冷和加热双向调温系统,温度可控,可适应范围很大,一年四季均可保持在恒定温度,是细菌、霉菌等微生物培养、保存、育种试验的专用恒温设备
光学显微镜		显微镜由机械装置和光学系统两部分组成,其中光学系统主要包括物镜、目镜、反光镜和聚光器四个部件。它是一种光学显微镜结构,精密的光学仪器主要是对各类微生物的形态观察和结构研究
拍打式均质机		拍打式均质器广泛应用于食品微生物分析,用于多种肉、鱼、蔬菜、水果等固体组织均质。将固体样品和稀释液加入到无菌的样品袋中,然后将样品袋放入拍打式均质器中即可完成样品的处理。处理后的样品溶液可以直接进行取样和培养,减少交叉污染的危险
离心机		离心机是利用离心力,分离液体与固体颗粒或液体与液体的混合物中各组分机械
PCR 仪		PCR 是利用 DNA 聚合酶对特定基因做体外大量合成,基本上它是利用 DNA 聚合酶进行专一性的连锁复制。PCR 仪能利用升温使 DNA 变性,在聚合酶的作用下使单链复制成双链,进而达到基因复制的目的,可以将一段基因复制为原来的一百亿至一千亿倍
真空冷冻干燥机		真空冷冻干燥机原理是将含水物品预先冻结,然后将其水分在真空状态下升华而获得干燥物品的一种技术方法。经冷冻干燥处理的物品易于长期保存,加水后能恢复到冻干前的状态并保持原有的生化特性。可用于热敏物质如抗菌素、疫苗和微生物菌种制备
超低温冰箱		超低温冰箱用于保存血浆、生物材料、疫苗、试剂、生物制品、化学试剂、菌种、生物样本等要求低温保存的物质

#### (四) 检验用品

1. 检验用品应满足微生物检验工作的需求,常用检验用品见表 1-1。
2. 检验用品在使用前应保持清洁和/或无菌,并保证无抑菌物质存在。

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。

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。

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。

### (五)培养基和试剂

食品微生物的常规培养检验中,使用多种不同培养基和试剂对微生物进行分离、培养、鉴定、保藏和(或)对各种微生物进行计数。因此,培养基及试剂的质量对保证实验结果的准确性、科学性具有重要的意义。随着科技的进步和发展,培养基和试剂逐步进入商品化、标准化的大规模生产,适宜的培养基制备方法、贮藏条件和质量控制试验显得尤为重要。因此,国家卫计委依据国内外的相关标准对 GB 4789.28 进行了编制与修订,并于 2013 年颁布了《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)。该标准对食品微生物检验中使用的培养基的制备、性能测试方法、质量评价指标作出了量化要求,从而建立了对培养基质量控制的标准流程,为确保食品微生物实验的质量提供必要的保证。

#### 1. 培养基及其分类

培养基是指液体、半固体或固体形式的、含天然或合成成分,用于保证微生物繁殖(含或不含某类微生物的抑菌剂)、鉴定或保持其活力的物质。常见培养基的分类和作用如表 1-3 所示。

#### 2. 培养基及试剂质量保证

##### (1)证明文件。

##### ①生产企业提供的文件。

生产企业应提供以下资料(可提供电子文本):

——培养基或试剂的各种成分、添加成分名称及产品编号;

——批号;

——最终 pH(适用于培养基);

——储存信息和有效期;

——标准要求及质控报告;

——必要的安全和(或)危害数据。

##### ②产品的交货验收。

对每批产品,应记录接收日期,并检查:

——产品合格证明;

——包装的完整性;

——产品的有效期;

——文件的提供。

##### (2)贮存。

①一般要求:应严格按照供应商提供的贮存条件、有效期和使用方法进行培养基和试剂的保存和使用。

表 1-3 培养基的分类和作用

分类	培养基种类	培养基组成和作用	典型培养基
按营养物质	天然培养基	由化学成分不完全明了的天然物质组成	—
	合成培养基	全部由已知化学成分的物质组成	—
	半合成培养基	由不明化学成分的天然物质和已知化学成分的物质组成	—
按物理性状	液体培养基	不含凝固剂,利于菌体的快速繁殖、代谢和积累产物	LB 培养基
	流体培养基	含 0.05%~0.07% 琼脂粉,可降低空气中氧进入培养基的速度,利于一般厌氧菌的生长繁殖	—
	半固体培养基	含 0.2%~0.8% 琼脂粉,多用于细菌的动力观察、菌种传代保存及贮运细菌标本材料。	—
	固体培养基	含 1.5%~2% 琼脂粉,用于细菌的分离、鉴定、菌种保存等。	营养琼脂
按功能	运输培养基	在取样后和实验室处理前,保护和维持微生物活性且不允许明显增殖的培养基	缓冲甘油-氯化钠溶液
	保存培养基	用于在一定期限内保护和维持微生物活力,防止长期保存对其不利影响,或使其在长期保存后容易复苏的培养基。	营养琼脂斜面
	复苏培养基	能够使受损或应激的微生物修复,使微生物恢复正常生长能力,但不一定促进微生物繁殖的培养基	—
	增菌培养基	大多为液体培养基,能够给微生物的繁殖提供较适当的生长环境,分为选择性增菌培养基和非选择性增菌培养基。	TTB 培养基和营养肉汤
	分离培养基	支持微生物生长的固体或半固体培养基。分为选择性分离培养基和非选择性分离培养基。	XLD 琼脂和营养琼脂
	鉴别培养基	能够进行一项或多项微生物生理和生化特性鉴定试验的培养基。	麦康凯琼脂
	鉴定培养基	能够产生一个特定的鉴定反应而通常不需要进一步确证实验的培养基。	乳糖发酵管

②脱水合成培养基及其添加成分的质量管理和质量控制:脱水合成培养基一般为粉状或颗粒状形式包装于密闭的容器中。用于微生物选择或鉴定的添加成分通常为冻干物或液体。培养基的购买应有计划,以利于存货的周转(即掌握先购先用的原则)。实验室应保存有效的培养基目录清单,清单应包括以下内容:

- 容器密闭性检查;
- 记录首次开封日期;
- 内容物的感官检查。

开封后的脱水合成培养基,其质量取决于贮存条件。通过观察粉末的流动性、均匀性、结块情况和色泽变化等判断脱水培养基的质量的变化。若发现培养基受潮或物理性状发生明显改变则不应再使用。

③商品化即用型培养基和试剂:应严格按照供应商提供的贮存条件、有效期和使用方法进行保存和使用。

- ④实验室自制的培养基,在保证其成分不会改变的条件下保存,即避光、干燥保存,必

要时在 $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,通常建议平板不超过2~4周,瓶装及试管装培养基不超过3至6个月,除非某些标准或实验结果表明保质期比上述的更长。

建议需在培养基中添加的不稳定的添加剂应即配即用,除非某些标准或实验结果表明保质期更长;含有活性化学物质或不稳定性成分的固体培养基也应即配即用,不可二次融化。

培养基的贮存应建立经验证的有效期。观察培养基是否有颜色变化、蒸发(脱水)或微生物生长的情况,当培养基发生这类变化时,应禁止使用。

培养基使用或再次加热前,应先取出平衡至室温。

### (3)培养基的实验室制备。

#### ①一般要求。

正确制备培养基是微生物检验的最基础步骤之一,使用脱水培养基和其他成分,尤其是含有有毒物质(如胆盐或其他选择剂)的成分时,应遵守良好实验室规范和生产厂家提供的使用说明。培养基的不正确制备会导致培养基出现质量问题。

使用商品化脱水合成培养基制备培养基时,应严格按照厂商提供的使用说明配制。如重量(体积)、pH、制备日期、灭菌条件和操作步骤等。

实验室使用各种基础成分制备培养基时,应按照配方准确配制,并记录相关信息,如:培养基名称和类型及试剂级别、每个成分物质含量、制造商、批号、pH、培养基体积(分装体积)、无菌措施(包括实施的方式、温度及时间)、配置日期、人员等,以便溯源。

#### ②水。

实验用水的电导率在 $25^{\circ}\text{C}$ 时不应超过 $25\ \mu\text{S}/\text{cm}$ (相当于电阻率 $\geq 0.4\ \text{M}\Omega\text{cm}$ ),除非另有规定要求。水的微生物污染不应超过 $10^3\ \text{CFU}/\text{mL}$ 。应按GB 4789.2,采用平板计数琼脂培养基,在 $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 培养 $(48\pm 2)\text{h}$ 进行定期检查微生物污染。

#### ③称重和溶解。

小心称量所需量的脱水合成培养基(必要时佩戴口罩或在通风柜中操作,以防吸入含有有毒物质的培养基粉末),先加入适量的水,充分混合(注意避免培养基结块),然后加水至所需的量后适当加热,并重复或连续搅拌使其快速分散,必要时完全溶解。含琼脂的培养基在加热前应浸泡几分钟。

#### ④pH的测定和调整。

用pH计测pH,必要时在灭菌前进行调整,除特殊说明外,培养基灭菌后冷却至 $25^{\circ}\text{C}$ 时,pH应在标准 $\text{pH}\pm 0.2$ 范围内。一般使用浓度约为 $40\ \text{g}/\text{L}$ (约 $1\ \text{mol}/\text{L}$ )的氢氧化钠溶液或浓度约为 $36.5\ \text{g}/\text{L}$ (约 $1\ \text{mol}/\text{L}$ )的盐酸溶液调整培养基的pH。如需灭菌后进行调整,则使用灭菌或除菌的溶液。

#### ⑤分装。

将配好的培养基分装到适当的容器中,容器的体积应比培养基体积最少大20%。

#### ⑥灭菌。

##### A. 一般要求。

培养基应采用湿热灭菌法或过滤除菌法。

某些培养基不能或不需要高压灭菌,可采用煮沸灭菌,如SC肉汤等特定的培养基中

含有对光和热敏感的物质,煮沸后应迅速冷却,避光保存;有些试剂则不需灭菌,可直接使用。

#### B. 湿热灭菌。

湿热灭菌在高压锅或培养基制备器中进行,高压灭菌一般采用 $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ 灭菌 15 min,具体培养基按食品微生物学检验标准中的规定进行灭菌。培养基体积不应超过 1000 mL,否则灭菌时可能会造成过度加热。所有的操作应按照规定或使用说明的规定进行。

灭菌效果的控制是关键问题。加热后采用适当的方式冷却,以防加热过度。这对于大容量和敏感培养基十分重要,例如含有煌绿的培养基。

#### C. 过滤除菌。

过滤除菌可在真空或加压的条件下进行。使用孔径为  $0.2 \mu\text{m}$  的无菌设备和滤膜。消毒过滤设备的各个部分或使用预先消毒的设备。一些滤膜上附着有蛋白质或其他物质(如抗生素),为了达到有效过滤,应事先将滤膜用无菌水润湿。

#### D. 检查。

应对经湿热灭菌或过滤除菌的培养基进行检查,尤其要对 pH、色泽、灭菌效果和均匀度等指标进行检查。

#### E. 添加成分的制备。

制备含有有毒物质的添加成分(尤其是抗生素)时应小心操作(必要时在通风柜中操作),避免因粉尘的扩散造成实验人员过敏或发生其他不良反应;制备溶液时应按产品使用说明操作。不要使用过期的添加剂;抗生素工作溶液应现用现配;批量配制的抗生素溶液可分装后冷冻贮存,但解冻后的贮存溶液不能再次冷冻;厂商应提供冷冻对抗生素活性影响的有关资料,也可由使用者自行测定。

#### (4) 培养基的使用。

##### ① 琼脂培养基的融化。

将培养基放到沸水浴中或采用有相同效果的方法(如高压锅中的层流蒸汽)使之融化。经过高压的培养基应尽量减少重新加热时间,融化后避免过度加热。融化后应短暂置于室温中(如 2 min)以避免玻璃瓶破碎。

融化后的培养基放入  $47 \sim 50^\circ\text{C}$  的恒温水浴锅中冷却保温(可根据实际培养基凝固温度适当提高水浴锅温度),直至使用,培养基达到  $47 \sim 50^\circ\text{C}$  的时间与培养基的品种、体积、数量有关。融化后的培养基应尽快使用,放置时间一般不应超过 4 h。未用完的培养基不能重新凝固留待下次使用。敏感的培养基尤应注意,融化后保温时间应尽量缩短,如有特定要求可参考指定的标准。倾注到样品中的培养基温度应控制在约  $45^\circ\text{C}$  左右。

##### ② 培养基的脱氧。

必要时,将培养基在使用前放到沸水浴或蒸汽浴中加热 15 min;加热时松开容器的盖子;加热后盖紧,并迅速冷却至使用温度(如 FT 培养基)。

##### ③ 添加成分的加入。

对热不稳定的添加成分应在培养基冷却至  $47 \sim 50^\circ\text{C}$  时再加入。无菌的添加成分在加入前应先放置到室温,避免冷的液体造成琼脂凝结或形成片状物。将加入添加成分的培养

基缓慢充分混匀,尽快分装到待用的容器中。

④平板的制备和储存。

倾注融化的培养基到平皿中,使之在平皿中形成厚度至少为 3 mm(直径 90 mm 的平皿,通常要加入 18~20 mL 琼脂培养基)。将平皿盖好皿盖后放到水平平面使琼脂冷却凝固。如果平板需储存,或者培养时间超过 48 h 或培养温度高于 40 ℃,则需要倾注更多的培养基。凝固后的培养基应立即使用或存放于暗处和(或)(5±3)℃冰箱的密封袋中,以防止培养基成分的改变。在平板底部或侧边做好标记,标记的内容包括名称、制备日期和(或)有效期。也可使用适宜的培养基编码系统进行标记。

将倒好的平板放在密封的袋子中冷藏保存可延长储存期限。为了避免冷凝水的产生,平板应冷却后再装入袋中。储存前不要对培养基表面进行干燥处理。

对于采用表面接种形式培养的固体培养基,应先对琼脂表面进行干燥;揭开平皿盖,将平板倒扣于烘箱或培养箱中(温度设为 25~50 ℃);或放在有对流的无菌净化台中,直到培养基表面的水滴消失为止。注意不要过度干燥。商品化的平板琼脂培养基应按照厂商提供的说明使用。

(5)培养基的弃置。

所有污染和未使用的培养基的弃置应采用安全的方式,并且要符合相关法律法规的规定。

3. 培养基和试剂的其他内容

参考 GB 4789.28。

(六)质控菌株

1. 实验室应保存能满足实验需要的标准菌株。
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。
3. 标准菌株的保存、传代按照 GB 4789.28 的规定执行。
4. 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。

三、样品的采集

(一)采样原则

1. 样品的采集应遵循随机性、代表性的原则。
2. 采样过程遵循无菌操作程序,防止一切可能的外来污染。

(二)采样方案

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. 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: $n=5, c=2, m=100$  CFU/g,  $M=1000$  CFU/g。含义是从一批产品中采集5个样品,若5个样品的检验结果均小于或等于 $m$ 值( $\leq 100$  CFU/g),则这种情况是允许的;若 $\leq 2$ 个样品的结果( $x$ )位于 $m$ 值和 $M$ 值之间( $100$  CFU/g  $< x \leq 1000$  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( $> 1000$  CFU/g),则这种情况也是不允许的。

3. 各类食品的采样方案按食品安全相关标准的规定执行,食品中致病菌限量见本章附录。

4. 食品安全事故中食品样品的采集:

(1)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和3执行。重点采集同批次食品样品。

(2)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。

### (三) 各类食品的采样方法

#### 1. 预包装食品

(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)独立包装小于、等于1000 g的固态食品或小于、等于1000 mL的液态食品,取相同批次的包装。

(3)独立包装大于1000 mL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1000 g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. 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。

### (四) 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。

### (五) 采集样品的贮存和运输

1. 应尽快将样品送往实验室检验。

2. 应在运输过程中保持样品完整。

3. 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。