

# 国家食品卫生标准大肠菌群检验方法探究

白凤翎

(渤海大学辽宁省食品质量安全与功能性食品重点实验室, 辽宁锦州 121000)

**摘 要:** 主要对国家食品卫生微生物标准大肠菌群测定的基本原理、方法步骤、应用范围等进行分析与探讨, 指出大肠菌群检验方法存在的不足, 提出我国食品卫生大肠菌群检验方法和标准的修订建议。

**关键词:** 大肠菌群, 检验方法, 国家标准, 应用范围, 修改建议

中图分类号: TS207.4 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2005)11-0179-03

大肠菌群具有下列特点: 来源专一性, 只存在人和温血动物的肠道; 在粪便中具有较大的数量从而需进行高倍稀释; 对于外部环境有较高的耐受性, 可以评价它们对外界的污染; 即使数量较少时, 仍可进行相对容易和可靠的检测。大肠菌群是世界大多数国家和组织评价食品卫生质量的重要安全性指标之一。我国食品卫生微生物标准体系主要由菌落总

数、大肠菌群和致病菌三大类构成。大肠菌群作为粪便污染指示菌, 既是细菌总量指数——菌落总数的一部分, 又与肠道致病菌之间有着密切的相关性, 因此大肠菌群在食品微生物指标体系中占有举足轻重的地位。

## 1 大肠菌群及其检验意义

### 1.1 大肠菌群及检验意义

大肠菌群是指在 37℃, 24h 内能够发酵乳糖产酸产气的革兰氏阴性无芽孢杆菌, 主要包括肠杆菌科的四个属即埃希氏菌属(*Escherichia*)、枸橼酸杆菌属(*Citrobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)。食品中大肠菌群值的高低, 表明该食品被粪便污染的程度, 也反映对人体健康危害性的大小。粪便是人类肠道排泄物, 其中有健康人粪便, 也有肠道疾病患者或带菌者的粪便, 所以粪便内除一般正常细菌外, 同时会有一些肠道致病菌存在(如沙门氏菌、志贺氏菌等)的可能。如果食品被粪便污染, 则可以推测该食品中存在着肠道致病菌污染的

收稿日期: 2005-04-27

作者简介: 白凤翎(1964—), 男, 副院长, 副教授, 主要从事食品微生物学、食品安全方面的教学与科研工作。

基金项目: 辽宁省教育厅资助项目(2004D228)。

缓倒入配料缸内, 并加入余下的蔗糖; 加热至 90~95℃, 停止加热, 保温 3~5min, 加入预先溶解好的柠檬酸、柠檬酸钠、柠檬酸钾溶液, 加香精、色素, 搅拌均匀, 灌装、封盖。

## 4 生产人造食品(类果肉)

使用结冷胶生产人造食品明显比使用其它食品胶的效果要好得多, 特别是生产人造水果块。例如, 生产人造多香果块, 结冷胶的使用量为 0.7%, 但如使用海藻胶则用量为 1.0%, 而其它加工性能远不及结冷胶, 结冷胶可使人造果块在杀菌过程中不融化, 并且在加工过程中保持着其特征外形, 而且结冷胶可以用模具制造出形式多样、色彩丰富的动、植物形状, 这是其它胶凝剂无法比拟的。

## 5 在饼馅和布丁中的应用

饼馅和布丁这类食品, 过去一般使用淀粉或淀粉与蛋白质、磷酸盐混合物以提供饼馅和布丁所需的特征质构。但是使用淀粉的产品形体不稳定, 口感一般。在使用变性淀粉代替一般淀粉后, 这些缺陷才得以稍稍改善, 若使用结冷胶代替部分变性淀粉, 所得产品形体更加稳定, 口感得到很大的改善。

### 参考文献:

- [1] 黄来发. 食品增稠剂[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000, 7.
- [2] 张俊, 等. 结冷胶水溶液的流变特性及其影响因素研究[J]. 食品工业科技, 2002(11): 28~29.
- [3] 詹晓北. 食用胶的生产、性能与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003, 3.
- [4] 蔡云升, 等. 新版糖果与巧克力配方[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002, 4.

可能性，即潜伏着引起人类食物中毒和流行病的威胁，必须看作对人体健康具有潜在的危险性。

1.2 大肠菌群的相关标准

1895 年 Schardinger 首先建议使用这种微生物作为粪便污染的一个指标，因为它具有比其他的由水引起的传染性致病菌更容易分离和鉴定的优势，1895 年 T.Smith 提出了用这种微生物作为饮用水可饮性检测方法的试验。这标志着大肠菌群作为水的致病菌指标的开始，如今实际应用早已扩展到食品领域。

100 多年来，世界各国应用大肠杆菌及其相关菌群作为衡量食品被粪便污染的指标。由于不同国家的食品种类的不同和对粪便指示菌的认识的差异，而对粪便污染指示菌的应用也具有很大的不同，其中多以大肠菌群、埃希氏大肠杆菌、粪大肠菌群、耐热大肠菌群、粪链球菌、肠杆菌科等作为粪便指示菌。

2 大肠菌群检验原理、检验方法和应用范围

2.1 大肠菌群的检验原理和检验程序

食品卫生微生物检验国家标准 GB/T4789.3—2003 中大肠菌群检验采用 3 个稀释度 9 管法，检验程序包括乳糖发酵试验、EMB 分离培养和确证试验三步，根据最后确证试验的阳性管数查 MPN 检索表得到大肠菌群最可能数即 MPN 值。

乳糖发酵试验即初发酵是从食品复杂的微生物区系中应用选择性试剂——胆盐将大肠菌群分离出

来，并用指示剂——溴甲酚紫和杜汉氏小管指示产酸产气的发酵结果。由于选择性试剂的局限性，有可能存在由非大肠菌群发酵乳糖产酸产气，因此利用 EMB 培养基从初发酵阳性的试管中分离培养获得典型的发酵乳糖的菌落为确证试验提高菌源。最后根据大肠菌群的定义一方面通过纯培养复发酵证实其是否发酵乳糖，另一方面通过革兰氏染色证实其是否为革兰氏阴性无芽孢小杆菌。只有同时满足发酵乳糖产酸产气和革兰氏阴性无芽孢小杆菌两个条件才能确定该发酵管为阳性。

2.2 大肠菌群的限量标准和应用范围

大肠菌群作为卫生微生物指标几乎应用于所有的食品中。根据卫生部 2003 年 9 月 24 日颁布的食品卫生国家标准，我国的大多数食品中大肠菌群的限量标准为 30MPN/100mL(g) 和 3MPN/100mL(g) 两个水平。依据表 1 大肠菌群最可能数(MPN)检索表(9 管法)，只有满足 1、0.1、0.01mL(g) 三个连续稀释度的 9 支乳糖发酵管全部为阴性时，才能符合 < 30MPN/100mL(g) 的限量标准。依此类推只有满足 0.1、0.01、0.001mL(g) 三个连续稀释度的 9 支乳糖发酵管全部为阴性时，才能符合 < 3MPN/100mL(g) 的限量标准。食品法典委员会(Codex Alimentarius Commission) 大肠菌群限量用标准 MPN 法中无阳性管表示，日本农林省 JAS 标准中大肠菌群限量用大肠菌群阴性表示。我国的大肠菌群的限量标准针对

表 1 大肠菌群最可能数(MPN)检索表(9 管法)

阳性管数			每 100mL(g) 的 MPN 指数	95%可信限	
1mL(g)×3	0.1mL(g)×3	0.01mL(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	<5	130
0	1	1	60		
0	1	2	90		
0	1	3	120		

表 2 用不同管数进行稀释时(10g、1g、0.1g)不同阳性组合的 MPN 指数和 95%可信限

阳性组合	每个稀释度的管数					
	3			5		
	95%可信限			95%可信限		
	每 100g 的 MPN 指数	较低的	较高的	每 100g 的 MPN 指数	较低的	较高的
0-0-0	<3			<2		
0-0-1	3	<0.5	9	2	<0.5	7
0-1-0	3	<0.5	13	2	<0.5	7
0-2-0	—			4	<0.5	11
1-0-0	4	<0.5	20	2	<0.5	7
1-0-1	7	1	21	4	<0.5	11
1-1-0	7	1	23	4	<0.5	11
1-1-1	11	3	36	6	<0.5	15
1-2-0	11	3	36	6	<0.5	15

不同的食品种类制定两个水准,其实也具有不允许检出的含义。

该表的后注说明表内所列检样量如改用 10、1、0.1mL(g)时,表内数字相应降低 10 倍;如改用 0.1、0.01、0.001mL(g),则表内数字应相应增加 10 倍,其余可类推。

### 3 大肠菌群检验方法及与检验标准之间的缺陷和不足

#### 3.1 大肠菌群检验方法的不足

我国的食品卫生标准中有一部分食品的大肠菌群最大限量为 3MPN/100mL(g),依据表 1 和表 2 选择 1、0.1、0.01mL(g)三个接种量的最小检出限为 30 MPN/100mL(g),因此必须选择 10、1、0.1mL(g)更具有检验意义。在国标 GB/T4789.3-2003 中要求接种量为 1mL 以上者,用双料乳糖胆盐发酵管,1mL 及 1mL 以下者,用单料乳糖胆盐发酵管。接种量为 10mL(g)时如何进行接种国标尚未提及。若是液体检样直接吸取 10mL 样品加入双料乳糖胆盐发酵管即可,固体检样 1g 接种可选择接种 1:10 稀释液 10mL 较为合理。但若是固体食品检样如何将 10g 检样接种乳糖胆盐发酵管,国家标准没有明确规定。若将 10g 检样直接接种乳糖胆盐发酵管中,一是由于样品未经稀释处理会使大肠菌群在检样中分布不均造成误差,二是 10g 检样与经稀释处理的 25g 检样如何代表同一整体,三是样品经过稀释使接种量达 100mL 而无法进行实验。笔者认为国标方法中没有明确对大肠菌群检验过程中可能存在的检验操作,这是国标的缺憾。

#### 3.2 大肠菌群检验方法与限量标准之间的缺陷

从表 2 可以看出大肠菌群检验采用 1、0.1、0.01mL 时,其最小检出限量为 30MPN/100mL,而发酵酒、食醋、瓶装纯净饮用水、乳酸菌饮料的卫生标准 $\leq 3\text{MPN}/100\text{mL}$ 。因此,大肠菌群检验必须采取 10、1、0.1mL 三个检样量才能获得有检验意义的检测结果。在进行大肠菌群检验时,接种量为 10mL 的必须用双料乳糖胆盐发酵管,否则会因采样量的增加而引起培养基的稀释影响初发酵效果,而其余两管则采用单料。

从表 2 中还可以得出只有当三管都为阴性(0-0-0)或只 0.1mL 管为阳性(0-0-1)或只 1mL 管为阳性(0-1-0)三种情况下,这些食品的大肠菌群值 $\leq 3\text{MPN}/100\text{mL}$ 时,才符合卫生标准。而后两者的 95% 可信限分别为 0.5~9MPN/100mL 和 0.5~13MPN/100mL,说明在这种情况下,还存在一定的超出 3 MPN/100mL 的概率。所以从某种意义上讲,只有当 3 管皆为阴性时,其检测结果才真正符合卫

生标准。笔者认为该检验方法在检测时存在检验方法与卫生标准不相匹配的问题。

在进行大肠菌群检验时若采用 15 管法比国标法更具有优势,该法基本原理同 9 管法,区别在于每个稀释度接种 5 支乳糖胆盐发酵管。在计数方面比 9 管法有较高的准确度和精确度。从表 2 可以看出用不同管数进行稀释时,取 10、1、0.1mL 三个取样量与不同阳性组合的 MPN 指数和 95% 可信限的关系。首先从最低检出限来看,9 管法的每 100mL 的 MPN 指数为 3,15 管法的每 100mL 的 MPN 指数为 2;其次,从 95% 可信限来看,15 管法明显优于 9 管法;第三,从符合卫生标准的阳性组合几率看,15 管法有 4 种而 9 管法只有 3 种。上述三点说明 15 管法在检测发酵酒、食醋、瓶装纯净饮用水、乳酸菌饮料等食品大肠菌群时明显优于 9 管法。

### 4 对大肠菌群检验方法及检验标准的修改建议

食品卫生检验现行国家标准对某些卫生标准要求较高的食品大肠菌群检验的样品接种量达 10mL(g)时,检验方法中只说明使用双料乳糖胆盐发酵管,而没有说明将 10mL(g)样品如何接种培养基。笔者认为此处由于方法的不足会给检验操作者带来不便,同时也会造成结果的不确定性,建议选用大容量的双料的乳糖胆盐发酵管(如 30mL)进行发酵试验,同时必须保证检验样品的均一性。

对于发酵酒、食醋、瓶装纯净饮用水、乳酸菌饮料等的卫生标准 $\leq 3\text{MPN}/100\text{mL}$ 的食品应采用三个稀释度 15 管法进行检验,无论是从检出限和灵敏度,还是准确度都比 9 管法都会有较大的进步。

#### 参考文献:

- [1] 徐岩等译,James M Jay 编著.现代食品微生物学[M].北京:中国轻工业出版社,2001,7.
- [2] 广东出入境检验检疫局编译.国内外技术法规和标准中食品微生物限量[M].北京:中国标准出版社,2002,9.
- [3] 中华人民共和国国家标准.GB/T 4789.3-2003[S].北京:中国标准出版社,2003,8.
- [4] 卫生部卫生监督中心编.食品卫生国家标准汇编(6)[M].北京:中国标准出版社,2004,6.
- [5] 林维宣,薛维政主编.国内外食品标准大全[M].大连:大连海事大学出版社,1997,3.
- [6] 美国食品与药品管理局编,甄宏太,俞平译.细菌学分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1982,3,472~492.
- [7] 王叔淳主编.食品卫生检验技术手册[M](第3版).北京:化学工业出版社,2002,12,1054~1058.
- [8] 罗雪云,刘宏道主编.食品卫生微生物检验标准手册[M].北京:中国标准出版社,1995,8.