**食品微生物检测注意事项**

**一、检测标准**

**食品国家标准：**

GB 4789.2-2016 《食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定》

**生产用水：**

GB-T5750.12-2006 《生活饮用水标准检验方法微生物指标》

**二、培养基成分**

**PCA（平板计数琼脂培养基）**

胰蛋白胨      5.0g

酵母浸膏      2.5g

葡萄糖         1.0g

琼脂           15.0g

蒸馏水        1000mL

注：胰蛋白胨提供碳源和氮源；酵母浸粉提供B族维生素；葡萄糖提供能源；琼脂是培养基的凝固剂。

**NA（营养琼脂）**

蛋白胨        10g

牛肉膏        3g

氯化钠        5g

琼脂          14g（标准10g-20g）

蒸馏水        1000mL

注：蛋白胨和牛肉膏粉提供氮源、维生素、氨基酸和碳源;氯化钠能维持均衡的渗透压;琼脂是培养基的凝固剂。

**三、检测方法**



**四、操作注意细节**

（1）菌落总数是比较常规的微生物检测项目，也是比较容易做的一个微生物检测方法，主要注意无菌操作，与稀释液均匀性。

（2）在空白出现菌落的时候需要去分析哪一步出现问题，**人机料法环**。当然空白出现菌落的时候，那么该批次的菌落总数数据都作废处理。在制样和做样的时候需要在百级的环境（百级的洁净工作台）下进行。

（3）稀释液的均匀性，这个会影响结果，刚开始的时候可能会造成同一梯度的两个结果相差有点远，这个是因为做的时候没有把稀释液均匀。如果前后两个梯度没有梯度性，那么就是在做稀释做不好。这个都是靠多做，技术才会提高。

**五、计数**

（1）可用肉眼观察，必要时用全自动菌落计数仪，记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落计数以菌落形成单位(colony-formingunits , CFU )表示。

（2）选取菌落数在 30CFU~300CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于 30CFU的平板记录具体菌落数，大于 300CFU 的可记录为多不可计。每个稀释度的菌落数应采用两个平板的平均数。

（3）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以2，代表一个平板菌落数。

（4）当平板上出现菌落间无明显界线的链状生长时，则将每条单链作为一个菌落计数。

**计数（标准中介绍）**

（1） 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内，计算两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数，作为每 g ( mL )样品中菌落总数结果。

（2）若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时，按式( 1 )计算:



（3）若所有稀释度的平板上菌落数均大于 300CFU，则对稀释度最高的平板进行计数，其他平板可记录为多不可计，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。

（4）若所有稀释度的平板菌落数均小于 30CFU，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

（5）若所有稀释度(包括液体样品原液)平板均无菌落生长，则以小于1乘以最低稀释倍数计算。

（6）若所有稀释度的平板菌落数均不在 30CFU~300CFU 之间，其中一部分小于 30CFU 或大于300CFU时，则以最接近 30CFU 或 300CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

**六、菌落总数的问题**

**1.有新人可能会拿着菌落总数的平板去问别人这是什么菌？**

**答：**这是看不出来的，菌落总数只能检测出样品卫生情况，一个样品的细菌数量，不能验证出什么菌。这是一个不应该犯的误区。

**2.若所有稀释度的平板菌落数均不在 30CFU~300CFU 之间,其中一部分小于 30CFU 或大于300CFU 时。就会有人不知道怎么去判定那个梯度更接近30-300。**

**举例：一个梯度：28/28；另梯度：305/305，那么那个数据更接近呢？**

a、按标准字面意思直接做差比较后再乘以稀释倍数：28-30=-2，他们相差2；305-300=5，他们相差5。2比5要小，那么采取28相应的梯度再乘以稀释倍数；

b、恢复为同稀释度做差比较：把两个梯度换算成同一个梯度，一般把28换算成280。280-300=-20，相差20；305-300=5，相差5。20比5要大，那么采取305相应的梯度。

**3.有时候会出现这么一个情况，最低稀释梯度中一个平板出现1个菌落，另一个无菌落生长。那么结果怎么出呢？**

**答：**（以固态为例子）在过去也有讨论过，有人认为报告写5，也有认为报告写＜10（比较两个平板均无菌落生长的时候报＜10）这个两个报告方法其实也是可以采用。

**4.在做菌落总数的时候，有时候会样品和菌落分不清的（老前辈不会这样），那么如何区分两种物质呢？**

**答：**在培养基中添加TTC（一般2%浓度1mL加到400mL的培养基中，TTC的浓度不要过高，会有抑制作用）。TTC的原理：TTC和活细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶反应，生成红色的甲月赞。那么生长的菌落会变成红色，这样就可以区分菌落与样品。

还有一个方法：4℃冷藏保存一个样品和培养基混匀的平板做对照，观察菌落的形态特征，老前辈们基本靠这个去区分的。

**5、菌落总数计数包括霉菌吗？**

**答：**菌落总数的概念是这么规定的，食品检样经过处理，在一定条件下（如培养基、培养温度、培养时间等）培养后，所得每g（mL）检样中形成的微生物菌落总数。所以也包括在PCA上生长的霉菌和酵母等微生物。

**6、培养基温度不好控制？**

**答：**前提是培养基灭菌好了放在水浴锅内保温46摄氏度。使用时一个同事在外面把培养基从水浴锅拿到传递窗，培养基表面喷酒精杀菌，然后开启传递窗的紫外灯5min（这一步是对培养基表面杀菌，减少对洁净房的污染）。里面的同事5min之后拿起来放在手心人体不觉烫手，这样的温度最佳倒平板。

**7、有些朋友不理解菌落总数的单位CFU的意思。**

**答：**CFU为Colony-Forming Units英文缩写，其含义是形成菌落的菌落个数，不等于细菌个数。（比如两个相同的细菌靠得很近或贴在一起，那么经过培养这两个细菌将会形成一个菌落，此时就是2个细菌，1CFU）。菌落总数往往采用的是平板计数法，经过培养后我们数出平板上所生长出的菌落个数，从而计算出每毫升或每克待检样品中可以培养出多少个菌落，于是以CFU/ml或CFU/g报告之。

**8、菌落超标的危害。**

**答：**食品的菌落总数严重超标，说明其产品的卫生状况达不到基本的卫生要求，将会破坏食品的营养成分，加速食品的腐败变质，使食品失去食用价值。消费者食用微生物超标严重的食品，很容易患痢疾等肠道疾病，可能引起呕吐、腹泻等症状，危害人体健康安全。

但需要强调的是，菌落总数和致病菌有本质区别，菌落总数包括致病菌和有益菌，对人体有损害的主要是其中的致病菌，这些病菌会破坏肠道里正常的菌落环境，一部分可能在肠道被杀灭，一部分会留在身体里引起腹泻、损伤肝脏等身体器官，而有益菌包括酸奶中常被提起的乳酸菌等。但菌落总数超标也意味着致病菌超标的机会增大，增加危害人体健康的几率。

**9、培养后的培养基出现干裂情况。**

**答：**干裂是由于培养基里面的水份缺失导致，所以当出现干裂情况，先要观察干裂平板的数量和位置。看是否是培养箱内部温度不稳定导致（一般平皿一叠可以放置六个，同时要注意每叠之间需要保留一点间隙让其通风）；排除仪器的原因之后，看是培养基否倒得太薄（初学者可以拿三角瓶装水进行练习）；还有其他原因，其实在出现干裂的情况下，结果是无效的（除非干裂情况不严重）。排查出问题所在，可以避免我们下次再犯错。

**10、培养基的配置。**

**答：**培养基的包装上（标准上）都会写着先煮热溶解再分装，那么是不是一定要煮热溶解呢？首先瓶子上的配置方法是直接配置一升的PCA，这里是必须要煮热溶解（防止不均匀，使得部分培养基不凝固）。

其实配置培养基有两个方法：第一个：用一个大容器配置培养基，然后加水煮热溶解（注意搅拌，防止烧焦），待溶解完成之后进行分装（这里需要注意安全），再去灭菌。第二个方法就是使用500mL三角瓶（其他容器也可以）配置300ml的培养基，加水稍微溶解（此步不需要加热），再拿去灭菌。

**七、菌落总数超标的原因及对策分析**

菌落总数就是指在一定条件下（如需氧情况、营养条件、pH、培养温度和时间等）每克（每毫升）检样所生长出来的菌落数。菌落总数测定是用来判定食品被细菌污染的程度及卫生质量，它反映食品在生产过程中是否符合卫生要求，以便对被检样品做出适当的卫生学评价。菌落总数的多少在一定程度上标志着食品卫生质量的优劣。

• 食用菌落总数超标的食品，可能会引起急性中毒、呕吐、腹泻等症状，危害人体健康安全。那么，菌落总数超标的原因及其解决方案有哪些呢？下面我们就从六个方面角度来逐个分析。

**人员**

食品生产运输销售的各个环节员工的不正确行为都有可能导致菌落总数超标，而其中较为普遍的可能为：

1、负责清洗消毒工作的人员对清洗消毒的频率及要求执行不到位或不了解，可能出现生产环境卫生状况不良，生产设备连续使用未进行清洗消毒，对生产设备清洗不干净或消毒不严，产生微生物滞留和滋生等情况造成食品污染，进而导致菌落总数超标。

2、生产操作人员不按生产要求进行操作。如负责杀菌工序的人员对杀菌的参数及要求执行不到位或不了解，可能导致杀菌不彻底。

3、员工培训不到位，缺乏卫生意识。如加工过程中生熟不分发生交叉污染，进而导致菌落总数超标。

设备

设备设施的能力和状态也可能与菌落总数超标有关。此处我们以杀菌设备和包装机为例。

包装后需进行杀菌的产品，若杀菌设备性能不足、温度计未校准导致杀菌不彻底都有可能引起菌落总数超标。针对杀菌设备，我们可以通过做热力分布和热穿透测试，验证杀菌釜的性能以及定期使用温度记录仪，跟踪杀菌过程产品温度的变化、做好温度计的校准等工作来避免菌落总数超标。

同样的，包装机若密封性能不足，可能导致产品在杀菌和后期的贮存过程中出现被污染的情况。针对包装机，我们可以通过建立包装机性能验证，确保密封性良好，同时做好内包车间和包装机的清洁卫生来减少菌落总数超标的可能。

物料

物料主要包括各种原辅料、内包材、生产用水和冰等，若各种料原始微生物含量较高，还是有增加后期产品菌落总数超标的风险；因此我们应有针对性的对原辅料包材进行评估，制定一定的验收要求并对原辅料包材进行对应的检测，并在贮存和加工过程中做好温湿度控制和环境管理。

另外，内包材在使用前还可考虑采取紫外灯或臭氧进行消毒。对于生产用水和冰，可以采取每周一次的频率对其微生物状况进行验证。

**方法**

方法主要指的各种有关微生物措施制定的合理性。如，设备设施、环境、人员清洗消毒的频率及方法是否合理？杀菌公式的设定是否合理？生产过程中环境温湿度的控制是否合理？食品储存和运输中设定的条件（如冷链）是否合理等。

这种情况，可以采取的措施就是验证。通过对事前事后进行微生物实验，将得出的数据进行比对，确认方法是否可行。除此之外，我们还可以通过调整一定的参数并采集实验数据来对方法进行优化，进而确定最合适的方法。

**环境**

从原辅料的运输、贮存、加工成成品以及销售等各个环节场所的不当，都有可能导致产品菌落总数超标。如包装车间卫生不当、生产环境温湿度控制不当、废料间卫生间位置设施不当等等。

针对环境，我们可以采取的措施是合理考虑各个场所的布局、严格控制各个环节的温湿度以及持续保持各个场所的卫生等。

**流通**

若在流通环节检出多种食品存在菌落总数超标的情况，则问题极有可能是销售方未按照规定要求存储、摆放食品，比如个别超市不具备低温冷藏设施却销售需冷藏的食品，有的食品标签标注储存条件为避光，销售者却将食品置于阳光直射条件下等。

**八、泽析全自动菌落计数仪优势**

1. 经过几万张不同类别菌落图片的测试，开发出一系列针对不同菌落特点的分割统计方法，设置有十个一键计数按钮，实现了复杂菌落、高难度平皿的准确统计计数。在1秒内可计数1000个菌落，同时显示每个菌落的圆度、直径、周长等形态信息，对于复杂平皿还有智能修正按钮，真正达到了菌落计数便捷、快速、准确的目的。
2. 操作简单，维护方便，易上手。
3. 具备数据管理与数据审计追溯功能，确保数据的完整化、规范化以及不可修改的特性，让数据安全变得更可靠，符合CFDA和FDA的标准要求