



逗点生物
biocomma

Aiculture®
让微生物检测更省时

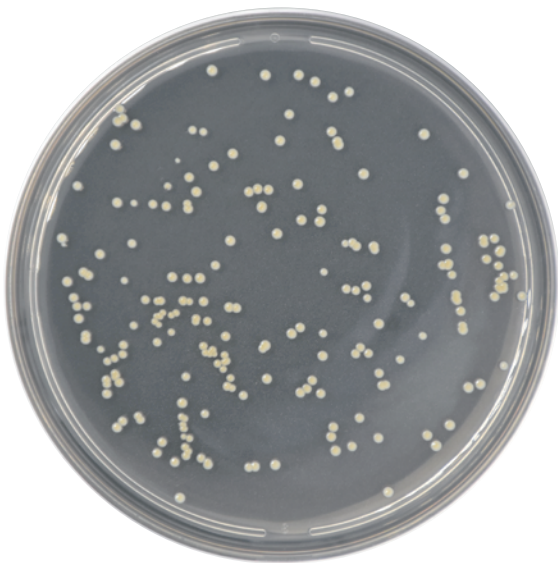
版本号
PCR-12-1CH

食品微生物检验GB4789.2-2022 菌落总数测定及注意事项

一、菌落总数定义和卫生学意义

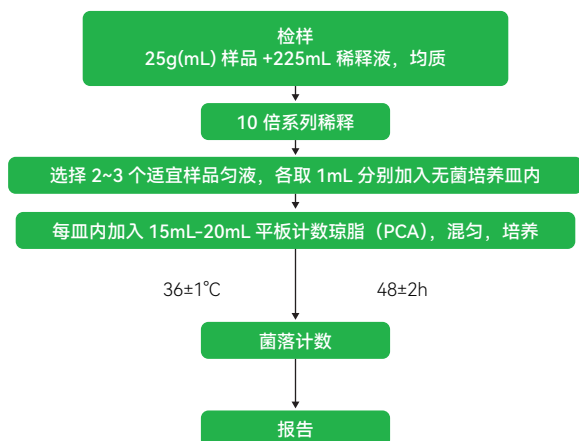
菌落总数定义：指在一定条件下（如需氧情况、营养条件、pH、培养温度和时间等）每克（每毫升）检样所生长出来的菌落数。

卫生学意义：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。



二、GB4789.2-2016 菌落总数测定（平板法）

1. 菌落总数检验流程图



操作注意事项

- 1: 从样品的均质到倾注琼脂, 应在 15 分钟内完成;
- 2: 检验所有物品需无菌和无残留的抑菌物质;
- 3: 建议用磷酸盐缓冲液作为稀释液, 因为磷酸盐缓冲液能更好地纠正食品样品中 pH 变化, 对细菌具有保护作用。
- 4: 对易产生较大颗粒的样品 (如肉类) 进行检测时, 建议使用带滤网均质袋, 以便均质后用吸管吸取匀液;
- 5: 高压灭菌后, 培养基的琼脂会分层在底部, 应摇匀后使用;
- 6: 当样品中含有吸水性物质 (如淀粉、面粉等), 应以最快速度进行琼脂倾注;
- 7: 在培养箱中倒置培养, 为防止中间平皿过热, 堆叠高度建议不超过 5 个平皿。

2. 结果计数

• 可用肉眼观察, 必要时用放大镜或菌落计数器, 记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落数以菌落形成单位 (colony-forming units, CFU) 表示。

• 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。

• 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。

• 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。



三、质量控制和疑难解析

1. 质量控制

- 实验室过程中，每批样品稀释液都要做空白对照。
- 为了控制环境污染，每次检验过程中，于检验台上打开两块计数琼脂平板，并在检验环境中暴露不少于 15 分钟，将此平板与本批次样品同时进行培养，以掌握检验过程中是否存在来自检验环境的污染。
- 定期使用大肠埃希氏菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC6538 和枯草芽孢杆菌 ATCC6633 或相应定量活菌参考品，在 P2 实验室或阳性对照实验室内，用适当的食品样品进行阳性实验验证，并进行记录，次验证实验至少每 2 个月进行 1 次。

2. 疑难解析

1: 为什么水产品与其他食品中菌落总数检测时所采用的培养条件不同？

水产品产自海水或淡水，其温度较低，因而在制定水产品的食品安全检验时选择了 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 进行培养，培养时间为 $72 \pm 3\text{h}$ 。

2: 当高稀释度平板上的菌落数反而比低稀释度平板上菌落数高时，如何处理？

首先结果不能直接记录报告。应针对此结果进行原因分析，并对剩余样品进行重复实验，如确认结果如此，则表示样品中可能有影响菌落计数结果的抑菌物质，应使用稀释、中和剂、过滤等方式去除样品中的抑菌物质再进行检测、报告。

3: 当所有平板上都菌落密布时，结果如何报告？

不应报告多不可计，应在稀释度最高的两个平板上，分别任意取 2cm^2 ，计数其中的菌落数，计算每 2cm^2 的平均菌落数，乘以平皿面积（如平皿直径为 90mm ，则乘以平皿面积 63.6cm^2 ），再乘以稀释倍数报告。

四、所需培养基试剂

| 用途 | 货号 | 名称 | 规格 |
|--------|------------|-------------------|------------------|
| 样品稀释 | DZ1000.225 | 生理盐水 | 盒（袋装）225 mL×10 袋 |
| | PZ1000.225 | 0.85% 生理盐水（瓶装即用型） | 225mL/ 瓶 ×10 |
| | GZ1011.9 | 磷酸盐缓冲液（PBS） | 盒（管装）9 mL×20 支 |
| | GZ1011.10 | 磷酸盐缓冲液（PBS） | 盒（管装）10 mL×20 支 |
| | GF1011 | 磷酸盐缓冲液（PBS） | 瓶（干粉）250 g |
| | GZ1000.9 | 生理盐水 | 盒（管装）9 mL×20 支 |
| 平板计数 | GF1001 | 平板计数琼脂（PCA） | 瓶（干粉）250 g |
| | GF1001-1KG | 平板计数琼脂（PCA） | 瓶（干粉）1000g |
| | KL1001 | 平板计数琼脂（颗粒型）(PCA) | 瓶（颗粒）250 g |
| | KL1001-1KG | 板计数琼脂（颗粒型）(PCA) | 瓶（颗粒）1000 g |
| 微生物测试片 | TS001 | 菌落总数测试片 | 25 片 / 包 |

附录 A

平板计数琼脂 (PCA)



- 1、产品用途：用于菌落总数测定。
- 2、检验原理：胰蛋白酶提供碳源和氮源；酵母膏粉提供 B 族维生素；葡萄糖提供能源；琼脂是培养基的凝固剂。
- 3、平板计数琼脂 (PCA) 验证

| 样品名称 | 质控菌株 | 厂家 | 待测培养基计数 | 参比培养基计数 (TSA) | 生长率 (或特征) | 评定标准 | 结果判定 |
|--------------|---------------------|------|---------|---------------|-----------|------|------|
| 平板计数琼脂 (PCA) | 大肠埃希氏菌 ATCC25922 | 逗点 | 115 | 142 | 0.8 | 逗点 | 符合 |
| | | L 品牌 | 138 | | 0.9 | L 品牌 | 符合 |
| | | H 品牌 | 121 | | 0.8 | H 品牌 | 符合 |
| | 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 | 逗点 | 202 | 155 | 1.3 | 逗点 | 符合 |
| | | L 品牌 | 180 | | 1.1 | L 品牌 | 符合 |
| | | H 品牌 | 131 | | 0.8 | H 品牌 | 符合 |
| | 枯草芽孢杆菌 ATCC6633 | 逗点 | 219 | 187 | 1.1 | 逗点 | 符合 |
| | | L 品牌 | 281 | | 1.5 | L 品牌 | 符合 |
| | | H 品牌 | 230 | | 1.2 | H 品牌 | 符合 |

4、典型特征图片：



逗点空白平板



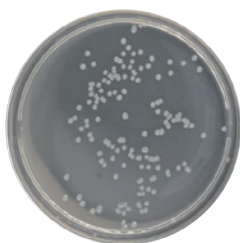
L 品牌空白平板



H 品牌空白平板



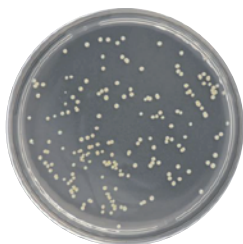
逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



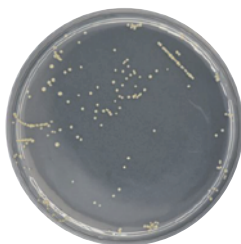
L 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点金黄色葡萄球菌 ATCC6538



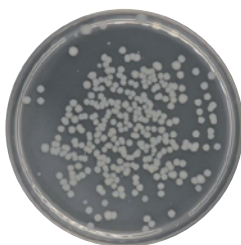
L 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



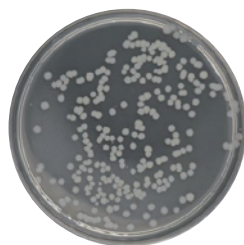
H 品牌金黄色葡萄球菌 ATCC6538



逗点枯草芽孢杆菌 ATCC6633



L 品牌枯草芽孢杆菌 ATCC6633



H 品牌枯草芽孢杆菌 ATCC6633

5、验证结果小结:

- 1、生长率: 目标菌大肠埃希氏菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、枯草芽孢杆菌 ATCC6633, 逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 $PR \geq 0.7$ 的要求。
- 2、感观: 三家平板颜色无显著差异。