

食品微生物检验技术

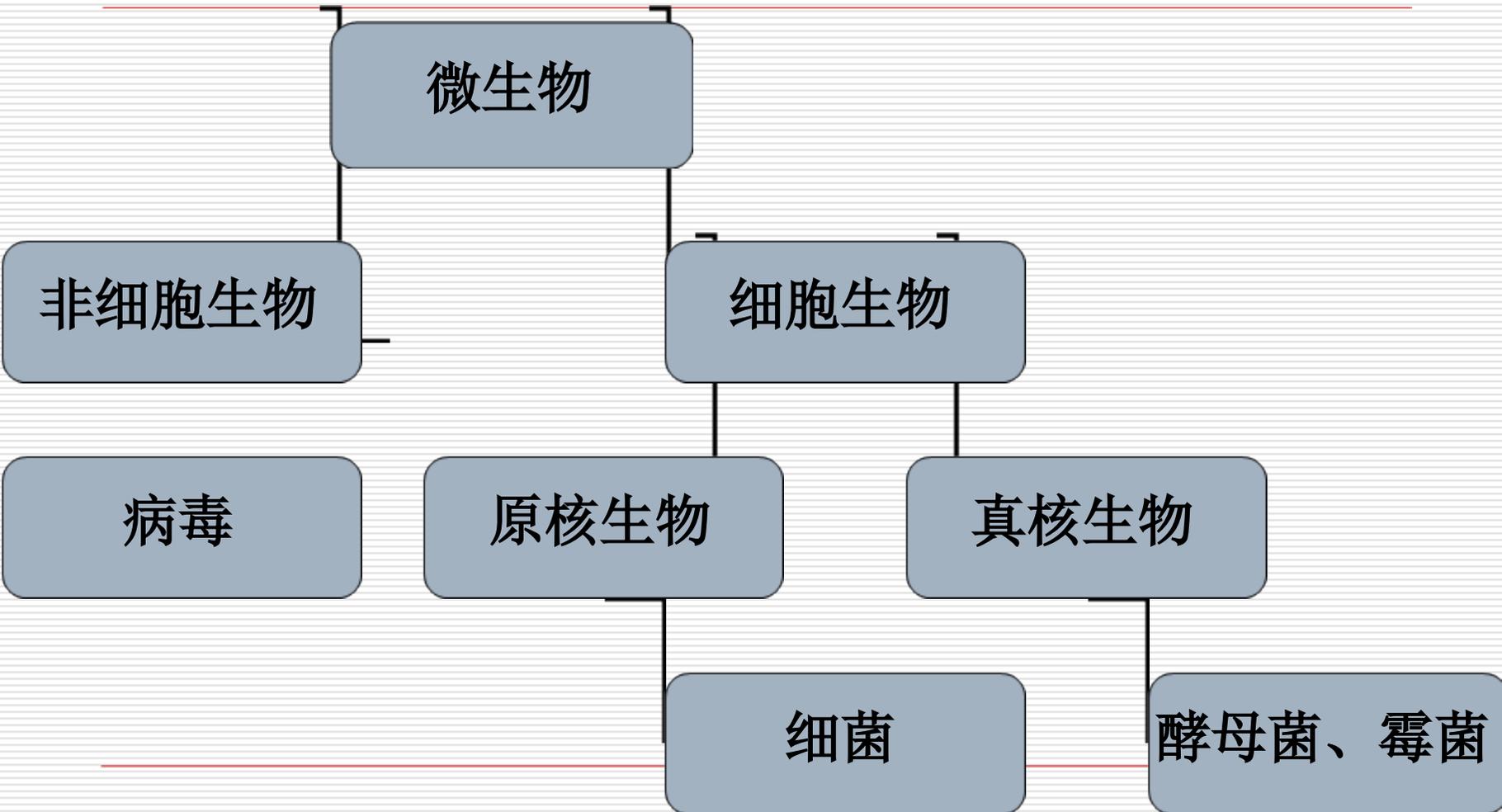
赵亮

TEL:18698416879

微生物的定义

微生物:是一群形体细小、结构简单、人肉眼看不见,必须借助于光学显微镜、电子显微镜放大几百倍、几千倍甚至几万倍才能看到的生物。

食品微生物检测所涉及的类群



微生物的特性

- ▣ 1 个体微小，结构简单
 - ▣ 2 分布广，种类多
 - ▣ 3 繁殖快，数量大
 - ▣ 4 易于变异，适应力强
 - ▣ 5 易于培养，代谢活力强
-

食品生产微生物控制

污染源：土壤，水源，空气，人及动物。

1. 内源性污染：凡是作为食品原料的动植物体在生活过程中，由于本身带有的微生物而造成食品的污染称为内源性污染，也称第一次污染。
 2. 外源性污染：食品在生产加工、运输、贮藏、销售、食用过程中，通过水、空气、人、动物、机械设备及用具等而使食品发生微生物污染称外源性污染，也称第二次污染。
-

食品生产过程中污染原因

- 1、禽畜在宰杀前就是病禽、病畜。
 - 2、刀具、砧板及用具不洁，生熟交叉感染。
 - 3、卫生状况差，蚊蝇滋生。
 - 4、食品从业人员带菌污染食物。
 - 5、食品在生产过程中暴露在空气中，受到空气中微生物污染。
-

食品加工各个环节的微生物检测与控制：

1. 设施设备的卫生
 2. 机械器具的卫生
 3. 从业人员的个人卫生
 4. 控制微生物的繁殖
 5. 日常的微生物监测监控
 6. 合理配备动态空气杀菌设备
-

食品检验样品的采集

采样原则：

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. 应采用随机原则进行采样，确保所采集的样品具有代表性。
3. 采样过程遵循无菌操作程序，防止一切可能的污染。

注：固体样品或冷冻食品取样还应注意检样目的，若需检验食品污染情况，可取表层样品；若需检验其品质情况，应再取深部样品。

采样方案

- ▣ 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的限量值;
- ▣ 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。

各类食品的采样方法

1. 即食类预包装食品

取相同批次的最小零售原包装，检验前要保持包装的完整，避免污染。

2. 非即食类预包装食品

原包装小于500 g的固态食品或小于500 mL的液态食品，取相同批次的最小零售原包装；大于500 mL的液态食品，应在采样前摇动或用无菌棒搅拌液体，均质后分别从相同批次的n个容器中采集5倍或以上检验单位的样品；大于500 g的固态食品，应用无菌采样器从同一包装的几个不同部位分别采取适量样品，放入同一个无菌采样容器内，采样总量应满足微生物指标检验的要求。

3. 散装食品或现场制作食品

根据不同食品的种类和状态及相应检验方法中规定的检验单位，用无菌采样器现场采集5倍或以上检验单位的样品，放入无菌采样容器内，采样总量应满足微生物指标检验的要求。

4. 食源性疾并及食品安全事件的食品样品

采样量应满足食源性疾并诊断和食品安全事件病因判定的检验要求。

食品微生物检样的操作方法

▮ 样品种类

样品可分大样、中样、小样三种。

▮ 操作方法

根据样品，如袋装、瓶装或罐装食品，应采用完整的未开封的样品；检样是冷冻

食品，应保持冷冻状态（可放在冰内、冰箱的冰盒内或低温冰箱保存），非冷冻

食品需在0~5℃中保存。

- 1 液体样品的采样：将样品充分混匀，无菌操作开启包装，用100ml无菌注射器抽取，放入无菌容器。
 - 2 半固体样品的采样：无菌操作开启包装，用灭菌勺子从几个部位挖取样品，放入无菌容器。
 - 3 固体样品的采样：大块整体食品应用无菌刀具和镊子从不同部位取样，应兼顾表面和深度，注意样品代表性；小块大包装食品应从不同部位的小块上切取样品，放入无菌容器。样品是固体粉末，应边取样边混合。
-

食品微生物检样的采集

- 4 冷冻食品的采样：大包装小块冷冻食品的采样按小块个体采取；大块冷冻食品可以用无菌刀从不同部位削取样品或用无菌小手锯从冷冻上锯取样品，也可以用无菌钻头钻取碎样品，放入无菌容器。

 - 5 生产工序监测采样
 - 车间用水：自来水样从车间各水龙头上采取冷却水，汤料从车间容器不同部位用100ml无菌注射器抽取。
 - 车间台面、用具及加工人员手的卫生监测：用板孔5cm²无菌采样板及5支无菌擦拭手部25cm²面积。
 - 车间空气采样：将5个直径90mm的普通营养琼脂平板分别置于车间的四角和中部，打开平皿盖5min，然后盖上平板送检。
-

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，采样人应清晰填写采样单（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）。
-

采集样品的贮存和运输

- ▣ 采样后，应将样品在接近原有贮存温度条件下尽快送往实验室检验。运输时应保持样品完整。如不能及时运送，应在接近原有贮存温度条件下贮存。
-

注意事项

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。
。
 2. 实验室应按要求尽快检验。若不能及时检验，应采取必要的措施保持样品的原有状态，防止样品中目标微生物因客观条件的干扰而发生变化。
 3. 冷冻食品应在45 °C以下不超过15 min，或2 °C~5 °C不超过18 h 解冻后进行检验。
-

检验方法的选择

1. 应选择现行有效的国家标准方法。
 2. 食品微生物检验方法标准中对同一检验项目有两个及两个以上定性检验方法时，应以常规培养方法为基准方法。
 3. 食品微生物检验方法标准中对同一检验项目有两个及两个以上定量检验方法时，应以平板计数法为基准方法。
-

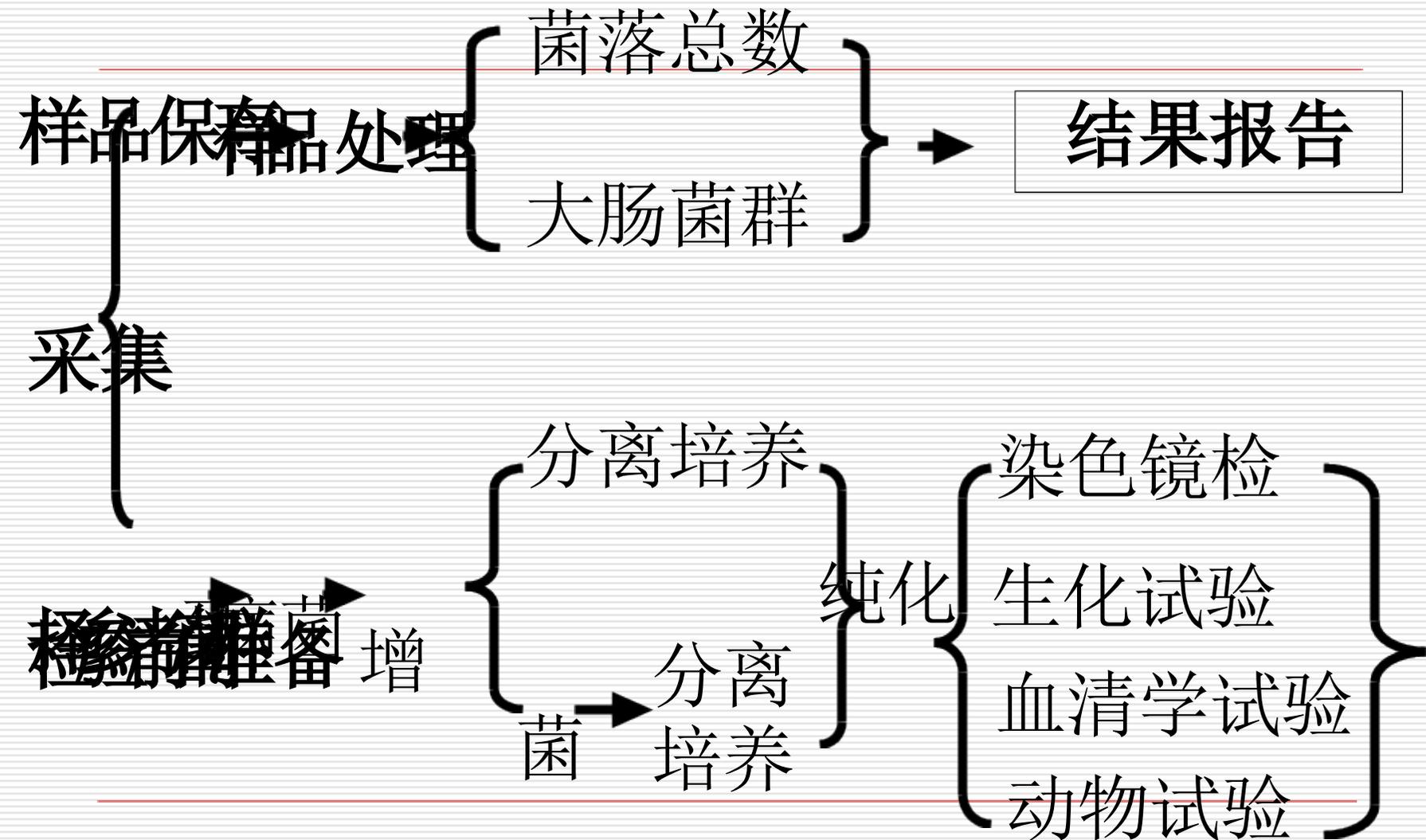
实验室生物安全要求及质量控制

1. 实验室应定期对实验用菌株、培养基、试剂等设置阳性对照、阴性对照和空白对照。
 2. 实验室应对重要的检验设备（特别是自动化检验仪器）设置仪器比对。
 3. 实验室应定期对实验人员进行技术考核和人员比对。
-

食品微生物检验的任务和内容

- 食品微生物检验的指标就是根据食品卫生的要求，从微生物学的角度，对不同食品所提出的与食品有关的具体指标要求。我国卫生部颁布的食品微生物指标有菌落总数、大肠菌群和致病菌三项。
 - 菌落总数（个/1g、1cm、1cm²）：清洁状态的标志；预测食品可能存放的期限。
 - 大肠菌群(MPN/100ml)：较为理想的粪便污染的指标菌群；作为肠道致病菌污染食品的指示菌。
 - 致病菌(不得检出)：沙门氏菌、肉毒梭菌、志贺氏菌、变形杆菌、副溶血性弧菌、葡萄球菌、
 - 其它指标：微生物指标还应包括病毒和寄生虫等。
-

食品微生物检验的一般步骤



食品微生物检验一般流程



无菌取样



样品均质



样液稀释



样品接种



恒温培养



结果观察

菌落总数测定

GB 4789.2—2010

- ▣ 定义：是指食品检样经过处理,在一定条件下培养后（如培养基、培养温度、pH值和培养时间等），所得1g或1mL检样中形成的细菌菌落总数,以CFU/g（mL）来表示。
-

-
- 按国家标准方法规定，即在需氧情况下， $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 $48 \pm 2 \text{ h}$ ，能在平板计数琼脂上生长发育的细菌菌落总数。所以厌氧或微需氧菌、有特殊营养要求的以及非嗜中温的细菌，由于现有条件不能满足其生理需求，故难以繁殖生长。
-

菌落总数的测定

——平板菌落计数法 注意事项

- 检验中所用玻璃器皿，如培养皿，吸管、试管等必须是完全灭菌的，并在灭菌前彻底洗涤干净，不得残留有抑菌物质。
 - 充气饮料应在无菌条件下进行排气；酸性样品用经过灭菌的20~30%碳酸钠溶液调整pH值至中性；高盐样品应用灭菌蒸馏水进行稀释。
 - 在作10倍递增稀释中，吸管插入检样稀释液内不能低于液面2.5cm；吸入液体时，应先高于吸管刻度，然后提起吸管尖端离开液面，将尖端贴于玻璃瓶或试管的内壁使吸；当用吸管将检样稀释液加至另一装有9mL空白稀释液的试管内时，应小心沿管壁加入，不要触及管内稀释液，以防吸管尖端外侧部分粘附的检液也混入其中。
 - 为了防止细菌增殖及产生片状菌落，在检液加入平皿后，应在20分钟内向皿内倾入琼脂，并立即使其与琼脂混和均匀。
 - 计数表示方法：CFU /ml
-

所需培养基及试剂

1. 平板计数琼脂培养基成分

胰蛋白胨 5.0 g

酵母浸膏 2.5 g

葡萄糖 1.0 g

琼脂 15.0 g

蒸馏水 1000 mL

pH 7.0±0.2

2. 磷酸盐缓冲液

磷酸二氢钾 (KH₂PO₄) 34.0 g

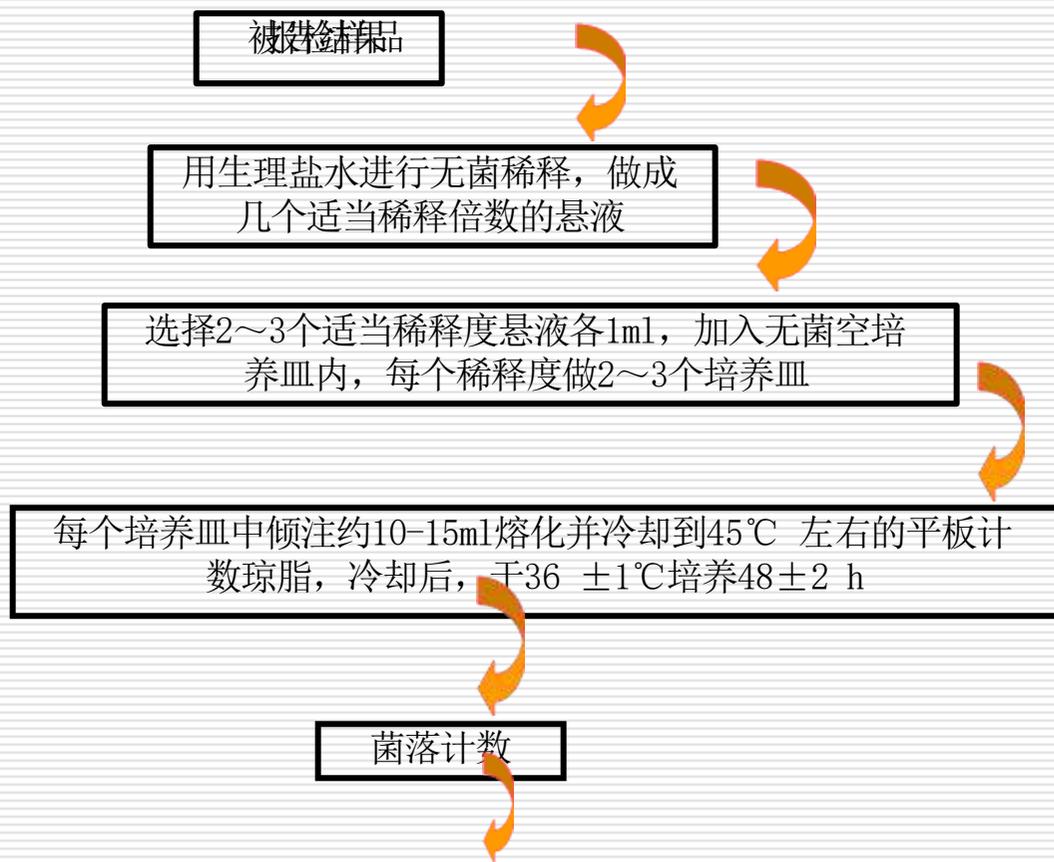
蒸馏水 500 mL

pH 7.2

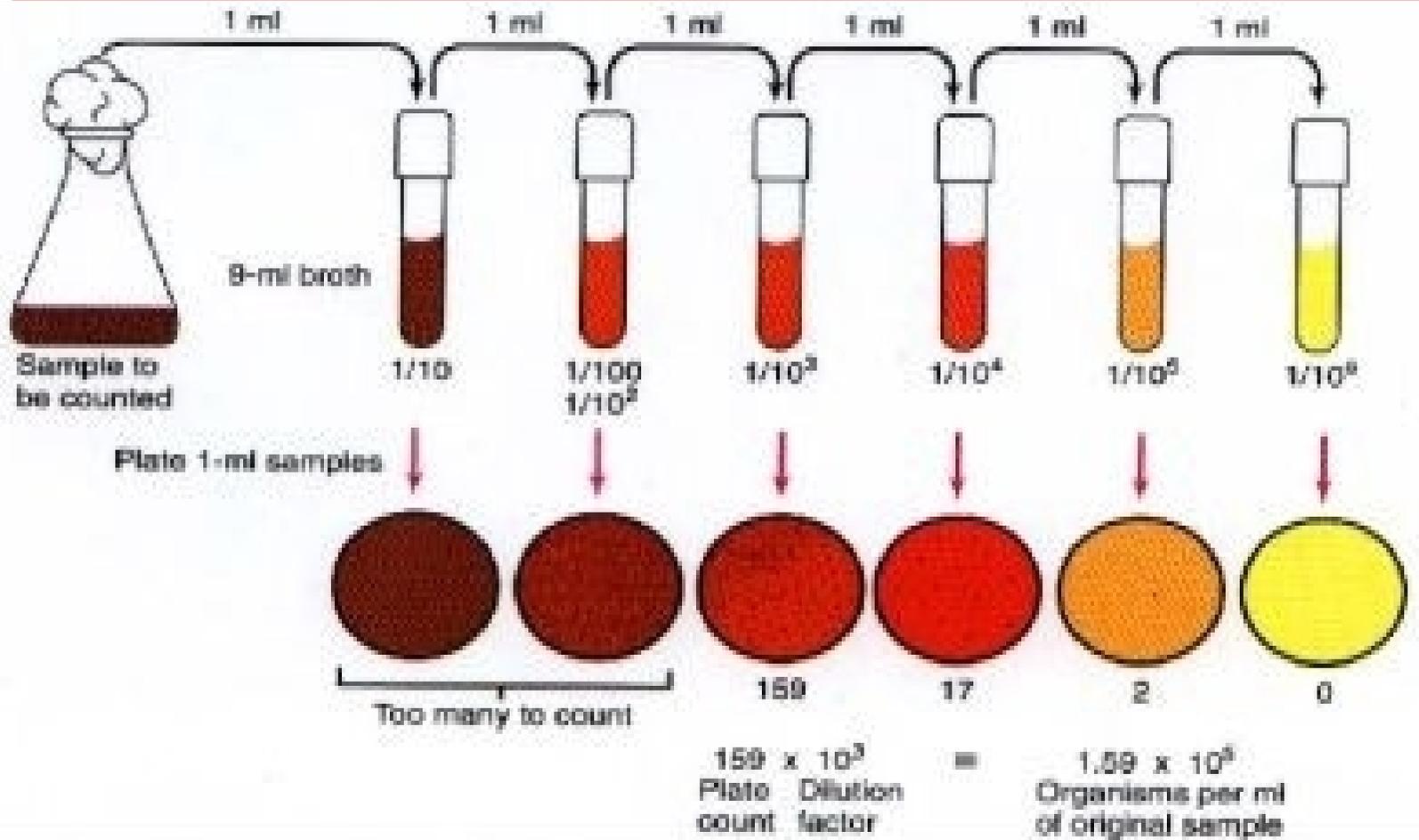
3. 0.85~0.9%无菌生理盐水

菌落总数的测定

—平板菌落计数法 程序



样品稀释流程



菌落总数结果



菌落计数方法

- ▣ 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。菌落计数以菌落形成单位（colony-forming units, CFU）表示。
 - ▣ 选取菌落数在30 CFU~300 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于30 CFU 的平板记录具体菌落数，大于300 CFU 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。
-

菌落总数的计算方法

计算公式：

$$N = \sum C / (n_1 + 0.1n_2) d$$

- ▣ N——样品中菌落数；
 - ▣ $\sum C$ ——平板（含适宜范围菌落数的平板）菌落数之和；
 - ▣ n_1 ——第一稀释度（低稀释倍数）平板个数；
 - ▣ n_2 ——第二稀释度（高稀释倍数）平板个数；
 - ▣ d——稀释因子（第一稀释度）。
-

计数结果注意事项

- ▣ 选取菌落数在30 CFU~300 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于30 CFU 的平板记录具体菌落数，大于300 CFU 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。若所有稀释度的平板上菌落数均大于300 CFU，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。
 - ▣ 若所有稀释度的平板菌落数均小于30 CFU，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。
 - ▣ 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。
 - ▣ 若所有稀释度的平板菌落数均不在30 CFU~300 CFU 之间，其中一部分小于30 CFU 或大于300CFU 时，则以最接近30 CFU 或300 CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。
 - ▣ 四舍五入保留前两位数字后面用0代替。
 - ▣ 称重取样以CFU/g 为单位报告，体积取样以CFU/mL 为单位报告。
-

试样 例次	稀释度			选定计数稀释度	菌量 /(个/g 或mL)
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴		
1	380	52	18	10 ⁻³	5.2x10 ⁴
2	526	205	32	10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ (1.56)	2.6x10 ⁵
3	271	60	12	10 ⁻² (2.2)	2.7x10 ⁴
4	284	152	37	10 ⁻² , 10 ⁻³	9.0x10 ⁴
5	26	12	5	10 ⁻²	2.6x10 ³
6	无法计数	568	312	10 ⁻⁴	3.1x10 ⁶

平均菌落数

菌落总数的测定

——平板菌落计数法 菌落总数记录报告

产品名称		生产车间		班次	
生产日期		抽样日期		检验日期	
细菌总数					
检验依据					
培养基 接种	营养琼脂培养基			结果报告数 (个/g或ml)	
	A	B	平均数		
1					
10-1					
10-2					
10-3					
10-4					
10-5					
空白					
备注					
检验员:	日期:	复核:	日期:		

大肠菌群计数

GB 4789.3—2010

大肠菌群**MPN**的概念及意义

大肠菌群系指一群在**37°C**24小时能发酵乳糖、产酸、产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌。该菌主要来源于人畜粪便，故以次作为粪便指标来评价食品的卫生质量，具有广泛的卫生学意义。

大肠菌群

VIP METHOD
PATHOGEN TEST
ASSURANCE
SIMPL
L-2 TEST

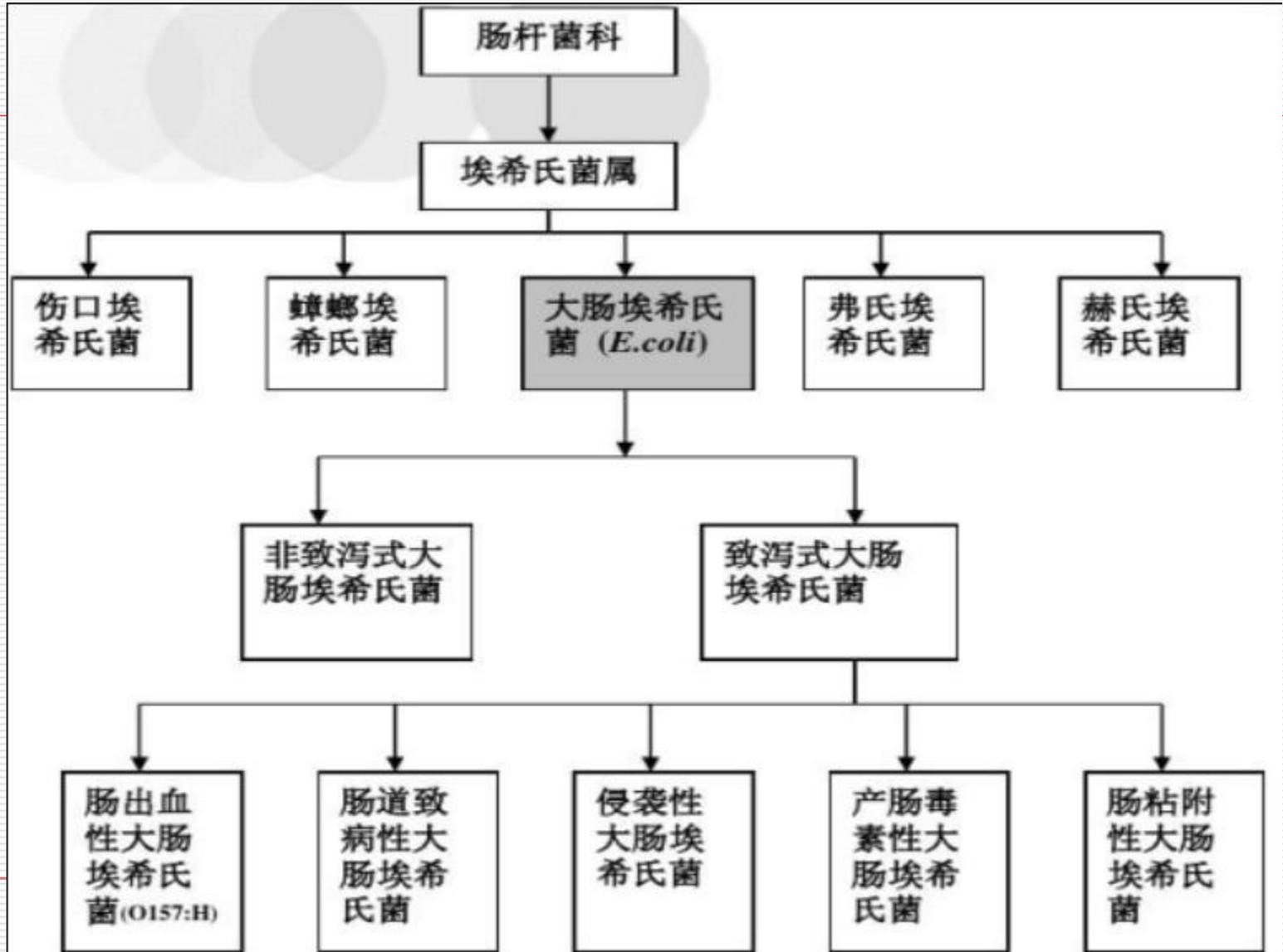
Total Coliform

Fecal Coliform

E. coli

大肠菌群不是**细菌学上的分类命名**，而是根据卫生学方面的要求，提出的与粪便污染有关的细菌，即作为食品、水体等是否受过人畜粪便污染的指示菌，这些细菌在生化及血清学方面并非完全一致。根据进一步的生化试验，可将这群细菌再分为大肠艾希氏菌（俗称大肠杆菌）、弗氏柠檬酸杆菌、肺炎克雷伯氏菌和阴沟肠杆菌等。

大肠杆菌介绍



第一法 大肠菌群MPN 计数法

- 食品中大肠菌群数系以每100g（或ml）检样内大肠菌群最近似数（the most probable number 简称MPN）表示。
-

所需培养基及试剂

1. 月桂基硫酸盐胰蛋白胨（LST）肉汤

胰蛋白胨或胰酪胨 20.0 g，氯化钠 5.0 g，乳糖 5.0 ，磷酸氢二钾（K₂HPO₄） 2.75 ，磷酸二氢钾（KH₂PO₄） 2.75 g，月桂基硫酸钠 0.1 ，蒸馏水 1 000 mL。

pH 6.8±0.2

2. 煌绿乳糖胆盐（BGLB）肉汤

蛋白胨 10.0 g，乳糖 10.0 ，牛胆粉（oxgall或oxbile）溶液 200 m，0.1%煌绿水溶液 13.3 m，蒸馏水 800 mL

pH 7.2±0.1

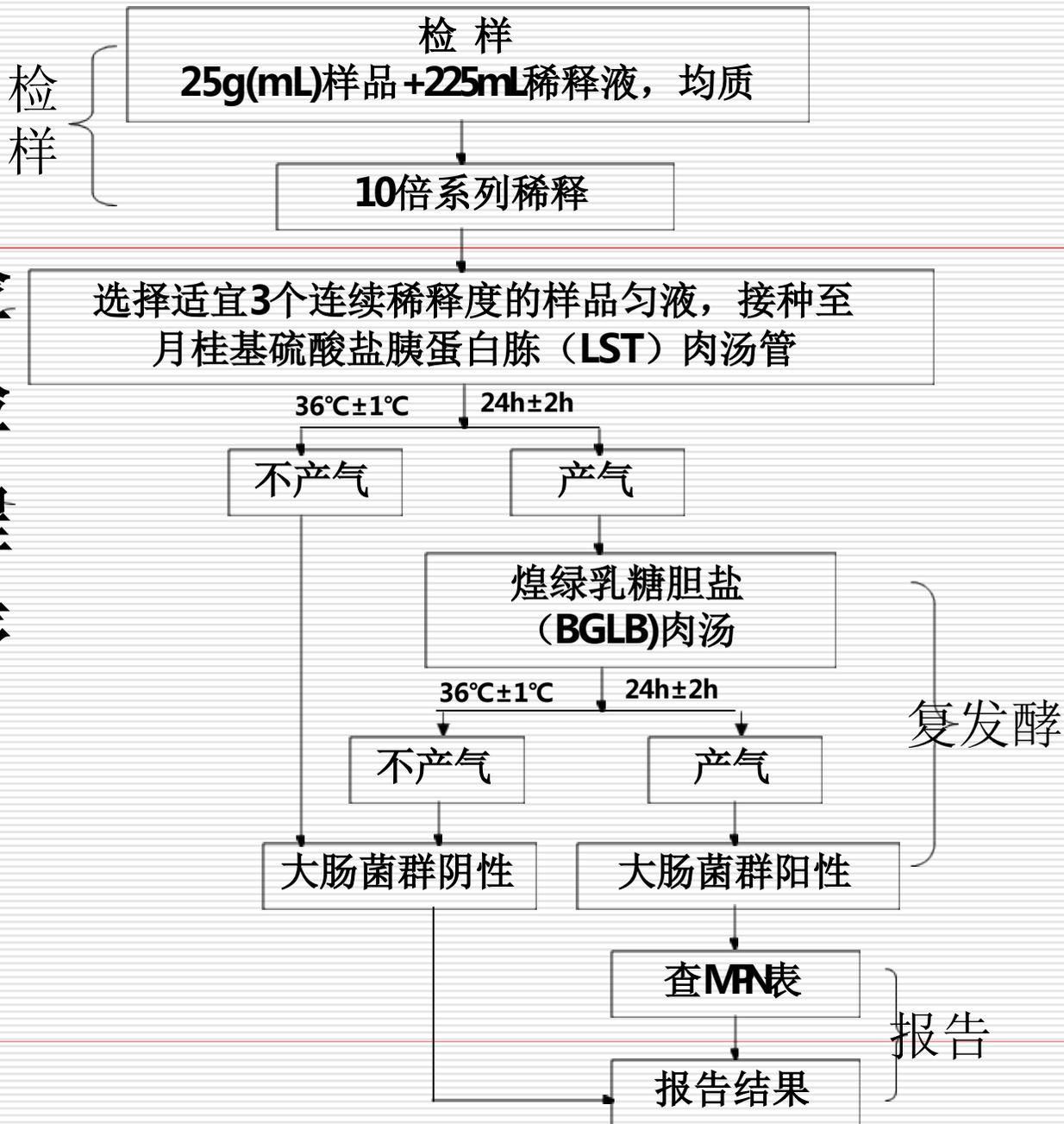
3. 结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA)

蛋白胨 7.0 g, 酵母膏 3.0, 乳糖 10.0 g氯化, 5.0 g胆盐或3号胆盐, 1.5 g中性红 0.03, 结晶紫 0.002, 琼脂 15 g~18, 蒸馏水 1 000 mL

pH 7.4±0.1

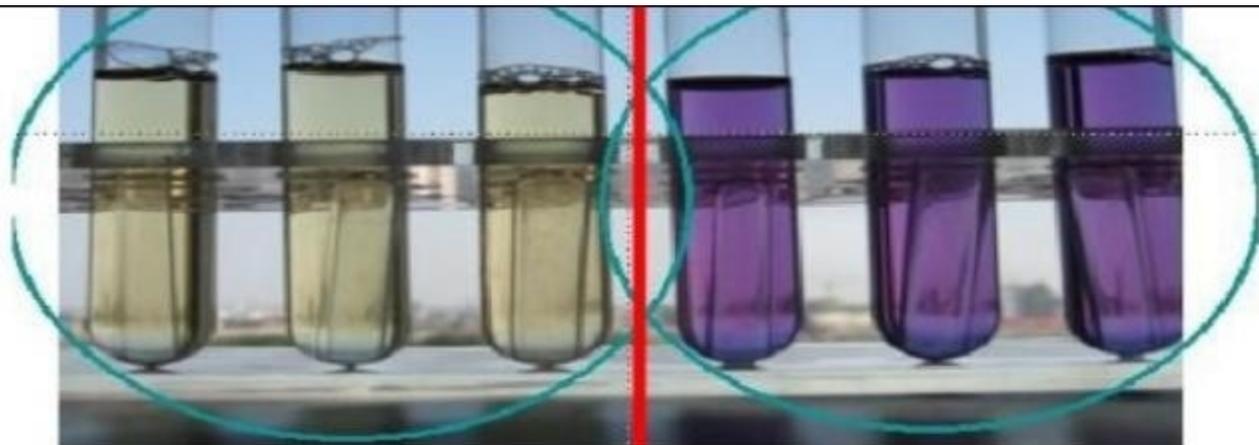
4. 磷酸盐缓冲液; 无菌生理盐水; 1 mol/L NaOH 和1 mol/L HCl

初
检
发
酵
程
序



初发酵及复发酵产气结果

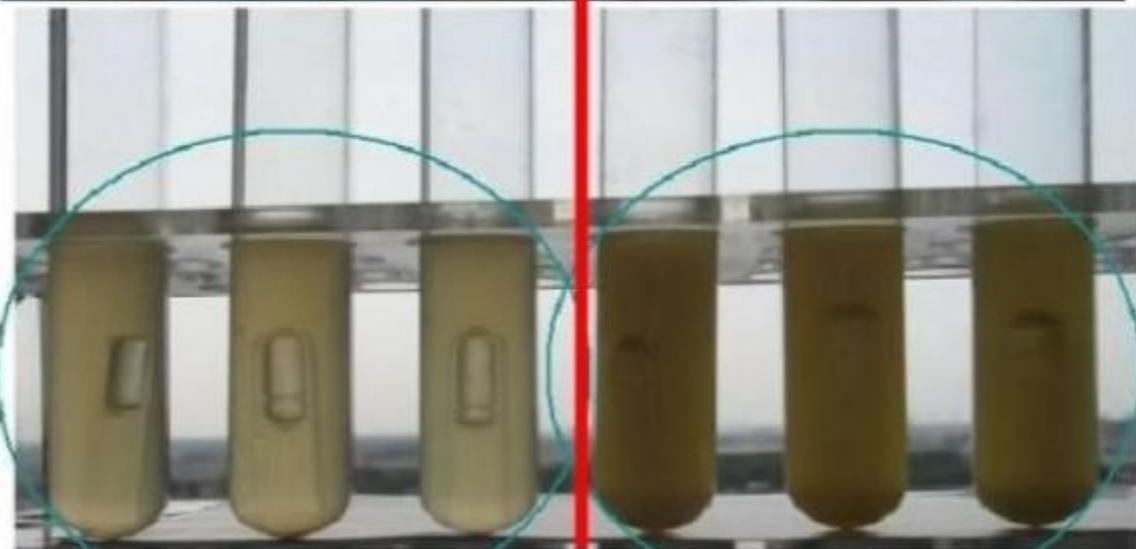
LST



乳糖胆盐肉汤

CONTR

Re



初 发 酵

- ▮ 双料管**3支**
 - ▮ 单料管**6支**
 - ▮ 装有**0.85%**灭菌生理盐水的锥形瓶**1个**
 - ▮ 装有**9mL 0.85%**灭菌生理盐水的试管**1支**（注：样品为固体时需要）
-

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/318105131021006056>