

肉和肉制品中假单胞菌的检验和计数

聂炎炎, 刘冬虹, 黄宇锋, 吴玉銮, 侯向昶, 蔡玮红

(广州市产品质量监督检验所, 国家加工食品质量监督检验中心, 广东 广州 510110)

摘要: 假单胞菌 (*Pseudomonas*) 是导致肉和肉制品腐败的优势菌。本试验对冷藏肉、冷冻肉、新鲜肉及各种肉制品进行了假单胞菌的检验和计数, 建立了肉和肉制品中假单胞菌的检验和计数方法。

关键词: 肉和肉制品; 假单胞菌; 检验; 计数

中图分类号: TS251.7; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)02-0184-04

Examination and Enumeration of *Pseudomonas* in Meat and Meat Products

NIE Yan-yan, LIU Dong-hong, HUANG Yu-feng, WU Yu-luan, HOU Xiang-chang, CAI Wei-hong

(National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food (Guangzhou), Guangzhou Product Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 510110, China)

Abstract: *Pseudomonas* mainly accounts for the rot of meat and meat products. Examination and enumeration of *Pseudomonas* in the refrigerated, frozen and fresh meat and different meat products were studied here and the corresponding methods were established.

Key words: meat and meat products; *Pseudomonas*; examination; enumeration

肉和肉制品具有丰富的营养成分, 是人们膳食营养的主要来源。但是具有丰富营养成分的肉类制品很容易受到微生物的污染而造成变质。肉与肉制品中的微生物主要来自牲畜生前感染和宰后污染。健康动物对微生物的入侵有完善的防御机制, 因此, 一般认为健康动物的内部组织是无菌的^[1]。有些微生物偶尔能够越过这些屏障而导致动物发生病变, 并有可能传播给消费者。生鲜肉中的微生物主要来自屠宰加工过程中屠体体表所带的灰尘、污垢以及肠道内容物和粪便等的污染。熟肉制品中腐败微生物菌相与原料的卫生状况、加工工艺、产品配方、贮藏条件等诸多因素有关。

假单胞菌 (*Pseudomonas*) 为革兰氏阴性, 直或微弯的杆状好氧性细菌, 无芽孢, 以极生鞭毛运动, 有少数种不运动。假单胞菌属分布很广, 在水、污水、土壤和空气中均存在, 有的种对人、动物或植物有致病性。假单胞菌常常是导致肉品腐败的优势菌, 假单胞菌属的荧光假单胞菌 (*Ps.fluorescens*)、莓实假单胞

菌 (*Ps.fragi*)、隆德假单胞菌 (*Ps.lundensis*) 是

收稿日期: 2007-10-29

通讯作者: 聂炎炎(1981-), 女, 助理工程师, 硕士, 主要从事微生物检验工作

最重要的肉制品腐败菌种^[2]。

目前, 我国尚未有肉和肉制品中假单胞菌的检验和计数方法的国家标准。为了填补这一空白, 国家加工食品质量监督检验中心(广州)承担了中国商业联合会下达的编号为 20032485-T-601, 名称为《肉和肉制品假单胞菌的计数》的国家标准的任务。我们在充分收集、认真研究国内外相关标准及资料的基础上, 等同采用了国际标准 ISO 13720: 1995^[3], 结合本实验室的条件和本方法的技术特点, 对多种不同类型的肉和肉制品进行了试验, 通过反复研究和分析, 建立了肉和肉制品中假单胞菌的检验和计数方法。

1 材料与方法

1.1 菌种和样品

菌种: 大肠埃希氏菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、伤寒沙门氏菌、痢疾志贺氏菌、单核细胞增生李斯特菌、白色念珠菌、铜绿假单胞菌和恶臭假单胞菌。以上菌种均购自广东省微生物研究所。试验用肉和肉制品样品购自超市。

1.2 培养基^[3]

1.2.1 CFC 琼脂

1.2.1.1 基础培养基

明胶蛋白胨 16.0 g, 酪蛋白胨 10.0 g, K₂SO₄ 10.0

g, MgCl₂ 1.4 g, 琼脂 12~18 g, 蒸馏水 1000 mL。pH 7.2±0.2, 121 °C 灭菌 15 min。

1.2.1.2 抑制溶液

十四烷三甲基溴化铵溶液 (A 溶液): 十四烷三甲基溴化铵 0.1 g, 水 100 mL。过滤除菌。

梭链孢素溶液 (B 溶液): 梭链孢素 0.1 g, 水 100 mL。过滤除菌。

头孢利定溶液 (C 溶液): 头孢利定 0.1 g, 水 100 mL。过滤除菌。

1.2.1.3 完全培养基 (CFC 琼脂)

基础培养基 100 mL, A 溶液 1 mL, B 溶液 1 mL, C 溶液 5 mL, 混合均匀, 保持在 47 °C 左右。倾倒入约 15 mL 完全培养基到无菌平皿, 待其凝固。临用前需干燥平板。

1.2.2 营养琼脂

1.2.3 Kligler 氏琼脂

1.2.4 氧化酶试剂

1.3 试验步骤^[3]

1.3.1 取样和试样的制备

取样和试样的制备方法参照 ISO 6887-2^[4]。

1.3.2 初悬液及十倍稀释液的制备

按照 ISO 6887-1^[5] 制备初悬液和进一步的十倍稀释液。

1.3.3 接种和培养

用灭菌吸管转移 0.1 mL 初悬液到两个 CFC 琼脂平板上。用其它稀释度的稀释液重复该操作。用无菌涂布棒均匀涂布整个平板。待平板表面干燥后反转平皿置 25 °C 的恒温箱中培养 48 h。

1.3.4 菌落的计数和选择

计算平板上的菌落数。并保留菌落数在 15~300 之间的平板。从保留的平板上任选 5 个菌落做确证试验。

1.3.5 确证试验

将选择用于确证试验的菌落划线接种于营养琼脂平板上, 置 25 °C 的恒温箱中培养 24 h。从每个营养琼脂平板上挑取一个分离良好的菌落进行以下生化试验。

取白色滤纸沾取氧化酶试剂, 用铂丝、玻璃或塑料棒 (镍/铬丝呈假阳性) 挑取营养琼脂平板上的培养物于滤纸上。当有氧化酶存在时, 在 5~10 s 内会出现紫罗兰色~紫色。如果 10 s 后颜色仍未变化, 则可以认为氧化酶试验结果为阴性。

取营养琼脂上的菌落同时在 Kligler 氏琼脂斜面划线, 并穿刺接种到琼脂底部, 于 25 °C 培养 24 h。氧化酶阳性, 同时在 Kligler 氏琼脂中穿刺培养时仅能在表面生长的菌落 (好氧型) 可以认为是假单胞菌的菌落。

1.4 结果表达^[3]

1.4.1 计数方法

经证实后, 计算每个平板上的菌落数 a , 用下列公式:

$$a = \frac{B}{A} \times C \quad (1)$$

此处 A 是选择用于证实的菌落数目。 B 为符合证实标准的菌落数目。 C 为计算的菌落总数。

用以下公式计算在试样中经证实的假单胞菌数 N , 作为从两个连续稀释度中得到的平均值。

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0.1n_2)d} \quad (2)$$

其中: $\sum a$ 为所有保留的平板上经证实后的菌落总数。 V 是每一平板上的接种体积, 按 mL 计数。 n_1 : 第一稀释度保留的平板数。 n_2 : 第二稀释度保留的平板数。 d : 相关于保留的第一稀释度的稀释因子。所得结果即为每毫升或每克产品中的假单胞菌数。用 $1.0 \sim 9.9 \times 10^x$ 表达结果。

如果在试样 (液体样品) 水平或初悬液 (其它产品) 水平的两个平板上的菌落数少于 15 个, 则每毫升或每克样品中的假单胞菌数表述为 $N=y$ (液体产品), 或 $N_E=y/d$ (其它产品)。如果在试样 (液体样品) 水平或初悬液 (其它产品) 水平的两个平板上不含菌落, 则结果表述为 <1 (液体产品) 或 $<1/d$ (其它产品)。

2 结果与讨论

2.1 标准菌株的试验结果

我们分别对七种阴性菌株和两种阳性菌株进行了试验, 试验结果见表 1。

从试验结果可以看出, 七种阴性菌株在 CFC 琼脂上都不能生长; 两种阳性菌株在 CFC 琼脂上生长状况良好, 氧化酶和 Kligler 氏琼脂的糖利用试验都呈阳性反应。试验结果没有出现假阳性或假阴性情况, 说明试验方法准确性较高, 特异性较强。

2.2 肉和肉制品的试验结果

我们对多种不同类型的肉和肉制品进行试验, 试验结果见表 2 和表 3。

表 1 标准菌株的试验结果

Table 1 Experiment results of standard strains

菌株种类	菌株编号	试验结果
阴性菌株	大肠埃希氏菌, ATCC 25922	CFC 琼脂上不长菌
	枯草芽孢杆菌, CMCC (B) 63501	CFC 琼脂上不长菌
	金黄色葡萄球菌, ATCC 6538	CFC 琼脂上不长菌
	伤寒沙门氏菌, CMCC (B) 50071	CFC 琼脂上不长菌
	痢疾志贺氏菌, CMCC (B) 50071	CFC 琼脂上不长菌
	单核细胞增生李斯特菌, CMCC (B) 54002	CFC 琼脂上不长菌
	白色念珠菌, ATCC 10231	CFC 琼脂上不长菌
阳性菌株	铜绿假单胞菌, ATCC 9027	CFC 琼脂上生长良好, 确证试验阳性
	恶臭假单胞菌, 广临检-10	CFC 琼脂上生长良好, 确证试验阳性

表 2 部分冷藏、冷冻及新鲜肉的试验结果

Table 2 Partical experiment results of refrigerated, frozen and fresh meat

样品种类	冷藏肉/(cfu/g)		冷冻肉/(cfu/g)		新鲜肉/(cfu/g)	
	表层样品	深层样品	表层样品	深层样品	表层样品	深层样品
猪肉	1.2×10^5	$<1 \times 10^2$	1.1×10^5	$<1 \times 10^2$	4.1×10^4	$<1 \times 10^2$
鸡肉	8.8×10^4	$<1 \times 10^2$	3.0×10^3	$<1 \times 10^2$	6.4×10^3	$<1 \times 10^2$
牛肉	8.0×10^4	$<1 \times 10^2$	4.0×10^4	$<1 \times 10^2$	1.4×10^4	$<1 \times 10^2$
羊肉	2.1×10^3	$<1 \times 10^2$	8.1×10^3	$<1 \times 10^2$	5.8×10^3	$<1 \times 10^2$

表 3 部分肉制品的试验结果

Table 3 Partical experiment results of meat products

样品种类	样品名称	试验结果/(cfu/g)	样品名称	试验结果/(cfu/g)	
定量包装的熟肉制品	牛肉粒	$<1 \times 10^2$	盐焗鸡腿	$<1 \times 10^2$	
	西式火腿	$<1 \times 10^2$	鸭肫(卤味)	$<1 \times 10^2$	
	清香鸭掌	$<1 \times 10^2$	麻辣鸭脖	$<1 \times 10^2$	
	培根	$<1 \times 10^2$	酱香鸭肉	$<1 \times 10^2$	
	鸡肉方火腿条	$<1 \times 10^2$	什菜鸡肉卷	$<1 \times 10^2$	
	牛肉火腿	$<1 \times 10^2$	野山泡椒凤爪	$<1 \times 10^2$	
	五香牛肉	$<1 \times 10^2$	川味凤爪	$<1 \times 10^2$	
	盐水鸭	$<1 \times 10^2$	酱鸡爪	$<1 \times 10^2$	
	鲜卤鸡翅	$<1 \times 10^2$	卤水鸭肾	$<1 \times 10^2$	
	双汇肘花	$<1 \times 10^2$	椒盐鸡腿	$<1 \times 10^2$	
	夏威夷风情烤肉	$<1 \times 10^2$	盐焗鸡爪	$<1 \times 10^2$	
	非定量包装的熟肉制品	烤鸡腿	1.7×10^3	鸭脖	$<1 \times 10^2$
		鸭腿	2.6×10^2	蒜香骨	$<1 \times 10^2$
烧鸡		2.5×10^3	卤凤爪	$<1 \times 10^2$	
香肠类	牛肉热狗肠	$<1 \times 10^2$	蘑菇热狗肠	$<1 \times 10^2$	
	爆炒肠	$<1 \times 10^2$	玉米热狗肠	$<1 \times 10^2$	
	香脆肠	$<1 \times 10^2$	菠萝热狗肠	$<1 \times 10^2$	
肉松、肉干类	猪肉松	$<1 \times 10^2$	牛肉干	$<1 \times 10^2$	
	猪肉干	$<1 \times 10^2$	海苔猪肉松	$<1 \times 10^2$	
腊制品	上海咸肉	$<1 \times 10^2$	金麒麟精制一级腊肠	$<1 \times 10^2$	
	湘西腊肉	$<1 \times 10^2$	腊鸭腿	$<1 \times 10^2$	
	金麒麟豉味五花腊肉	$<1 \times 10^2$			
预加工肉制品	牛肉丸	1.0×10^2	热狗肠肉浆	3.5×10^3	
	西式火腿肉浆	2.5×10^3	内蒙古草原羔羊肉涮片	$<1 \times 10^2$	

从冷藏、冷冻及新鲜肉的试验结果(见表2)可以看出,冷藏、冷冻和新鲜肉的表层样品由于屠宰、运输及贮藏过程中的各种污染,都有较大量的假单胞菌的检出。而深层样品由于没有受到外界环境的污染,加上健康动物的内部组织本身是无菌的,所以假单胞菌的检出量较少,都为 $<1 \times 10^2$ cfu/g。

从部分肉制品的试验结果(见表3)可以看出,定量包装的熟肉制品、香肠类、肉松、肉干类和腊制品类产品中假单胞菌的检出量都较少,大部分为 $<1 \times 10^2$ cfu/g。而在无定量包装的熟肉制品和预加工的肉制品中,有少数样品被检出有较大量的假单胞菌。目前,定量包装的熟肉制品总体质量较好,而且定量包装的熟肉制品经过一系列的加工过程,添加了山梨酸、亚硝酸钠等防腐剂,采用了真空包装,这些因素都使微生物的生长繁殖遭到破坏。而无定量包装的熟肉制品可能因为受到外界环境的污染,预加工的肉制品由于没有经过最后的加工处理及包装,检出较大量的假单胞菌也符合我们的预期。

3 结论

(1)对七种阴性菌株和两种阳性菌株进行了试验。结果表明七种阴性菌株在CFC琼脂上都不能生长;两种阳性菌株在CFC琼脂上生长状况良好,氧化酶和Kligler氏琼脂的糖利用试验都呈阳性反应。试验结果没有出现假阳性或假阴性情况,说明试验方法准确性较高,特异性较强。

(2)对冷藏肉、冷冻肉、新鲜肉、定量/非定量包装的熟肉制品、香肠类、肉松、肉干、腊制品和预加工的肉制品等多种不同类型的肉和肉制品进行了假单胞菌的检验和计数。通过反复研究和分析,建立了肉和肉制品中假单胞菌的检验和计数方法。

(3)本试验方法遵循先进性、科学性、实用性的原则,注重科学性和可操作性的结合,利于推广和应用。

参考文献

- [1] 李宗军,江汉湖.肉品微生态系统与肉类发酵剂研究[J].食品与发酵工业.2001,28:54-58
- [2] 张春江,王海燕.微生物引起的肉与肉制品的腐败[J].微生物与食品.2001,6:16-19
- [3] ISO 13720: 1995 Meat and meat products—Enumeration of *Pseudomonas* spp
- [4] ISO 6887-2 Microbiology of food and animal feeding stuffs—Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination—Part2: Specific rules for the preparation of meat and meat products
- [5] ISO 6887-1:1999 Microbiology of food and animal feeding stuffs—Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination—Part1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

(上接第130页)

- [1] Fred B. Soy isoflavones: a new and promising ingredient for the health foods sector [J].Food Research International, 2002,35:187-193
- [2] Xu X., Harris K. S., Wang H.J., S. Hendrichetal. Bio-availability of soybean isoflavones depends upon gut micro florain women [J]. Nutr.1995, 125:2307-2315
- [3] YAEL UNGAR, OLUWATOYIN F. OSUNDAHUNSI, EYAL SHIMONI. Thermal Stability of Genistein and Daidzein and Its Effect on Their Antioxidant Activity [J].J. Agric. Food Chem, 2003, 51:4394-4399
- [4] Huihua Huang, Hanhua Liang, Kin-Chor Kwok.Effect of thermal processing on genistein, daidzein and glycitein content in soymilk[J]. J Sci Agric. Food, 2006, 86:1110-1114
- [5] 程霜,杜凌云,牛梅菊,等.β-环糊精和染料木黄酮包合作用的研究[J].食品科学,2006,27(2):94-99
- [6] Eisen B, Ungar Y, Shimoni E. Stability of isoflavones in soy milk stored at elevated and ambient temperatures [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 2212-2215