

# 肉和肉制品中肠杆菌科细菌的检测和计数

黄宇锋, 刘冬虹, 聂炎炎, 罗海英, 罗东辉, 侯向昶, 郭新东, 吴玉銮

(广州市质量监督检测研究院, 国家加工食品质量监督检验中心, 广州市食品安全检测技术重点实验室, 广州市食品安全风险动态监测与预警研究中心, 广东广州 510110)

**摘要:** 本文对七种阴性菌株和四种阳性菌株进行研究, 建立了肉和肉制品中肠杆菌科细菌检测和计数的方法, 并对新鲜肉、冷冻肉、冷藏肉和肉制品进行测定。实验结果发现: 冷藏、冷冻和新鲜肉的表层样品肠杆菌科细菌的检出量较高, 都超过了 110 MPN/g, 而深层样品肠杆菌科细菌的检出量较少, 大部分为 <0.3 MPN/g, 熟肉制品、香肠类、肉松、肉干类和腊制品中的肠杆菌科细菌的检出量都较少, 预加工肉制品中有少数样品的肠杆菌科细菌超过了 110 MPN/g。

**关键词:** 肉和肉制品; 肠杆菌科细菌; 检测; 计数

文章编号: 1673-9078(2013)2-409-412

## Detection and Enumeration of Enterobacteriaceae in Meat and Meat Products

HUANG Yu-feng, LIU Dong-hong, NIE Yan-yan, LUO Hai-ying, LUO Dong-hui

HOU Xiang-chang, GUO Xin-dong, WU Yu-luan

(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food Guangzhou) (Guangzhou Key Laboratory of Testing Technology for Food Safety, Guangzhou Research Center for Food Safety Risk Monitoring and Rapid Alert, Guangzhou Guangdong 510110, China)

**Abstract:** Seven negative strains and four positive strains were studied. And the counting method for the enterobacteriaceae in Meat and meat products was established. Fresh meat, frozen meat, chilled meat and meat products samples were tested. The result told that the surface of meat contained more enterobacteriaceae (>110 MPN/g), while the internal part of the meat contain little enterobacteriaceae (< 0.3 MPN/g). Cooked meat, sausage, dried meat floss, jerky, and bacon samples contained little enterobacteriaceae. Pre-processed meat samples may contained enterobacteriaceae for more than 110 MPN/g.

**Key word:** meat and meat products; enterobacteriaceae; detection; enumeration

肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 是一大群寄居在人和动物肠道中生物学性状相似的革兰氏阴性无芽孢的短小杆菌, 在自然界极为常见, 可随人及动物排泄物广泛分布于水、土壤和腐败的物质中<sup>[1]</sup>。肠杆菌科中包括对人致病性较强的鼠疫耶尔森菌和伤寒沙门氏菌以及常引起腹泻和肠道感染的埃希菌属、志贺菌属、沙门菌属、耶尔森菌属细菌。肉和肉制品营养丰富, 是人们广为消费的食品, 同时其也容易滋生各类有害细菌, 从而对人们的身体健康造成损害。因此, 借鉴参考国内外在肉和肉制品微生物学检验方面的相关标准与文献<sup>[2-9]</sup>, 加强我国肉和肉制品中肠杆菌科微生物检验技术的研究, 保障肉和肉制品的质量安全, 有着

收稿日期: 2012-12-26

基金项目: 广州市科技计划项目 ([2011]233-34)

作者简介: 黄宇锋, 硕士, 工程师, 研究方向为食品安全检测技术

通讯作者: 罗东辉, 博士, 高级工程师, 研究方向为食品安全及风险预警

极为重要的意义。本文主要探讨肉和肉制品中肠杆菌科细菌检测和计数的方法。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

新鲜肉、冷冻肉、冷藏肉和部分肉制品购自广州大型超市, 部分肉制品来自生产企业; 英国 OXOID 公司的 E.E 肉汤和 VRBG 琼脂; 其他培养基和试剂由广东环凯公司提供; 菌种购自广东省微生物研究所。

#### 1.2 检验方法 (MPN 技术)

##### 1.2.1 检测

试样和初始悬浮液: 固态样品称取试样 1 g, 液态样品量取试样 1 mL, 加入到 9 mL 的 BPW 溶液中混匀。根据检测限的要求, 转移恰当体积的溶液到灭菌的试管或容量瓶中。

非选择性前增菌: 把初始悬浮液置于 37 °C 培养

18 h±2 h。

选择性增菌：转移 1 mL 培养液至含有 10 mL 增菌培养基的试管中。37 °C 培养 24 h±2 h。继续往下做分离和筛选的程序。

### 1.2.2 计数（MPN 方法）

试样、初始悬浮液和进一步稀释：根据需要达到的准确度，在同一稀释度接种合适数量的烧瓶或试管（例如 3 支、5 支或 10 支烧瓶或试管）。作为常用法则，这项特殊技术要求每个稀释度有 3 个烧瓶或试管。用稀释剂来制备初始悬浮液和进一步的稀释液。为了制备初始悬浮液，取 1 g 固态样品或 1 mL 液态样品的试样加到 9 mL 的 BPW 中混匀，这就获得了  $10^{-1}$  的稀释液。取 1 mL  $10^{-1}$  稀释液加到 9 mL 的 BPW 就制备了进一步的稀释液。重复操作，则获得更多需要的 10 倍递增稀释液。各转移 10 mL  $10^{-1}$  稀释液到 3 支试管中，每次继续稀释液都各转移 1 mL 到 3 支含有 9 mL BPW 的试管中。

非选择性前增菌：把初始悬浮液和稀释液（共九支管）置于 37 °C 培养 18 h±2 h。

选择性增菌：转移 1 mL 培养液到含有 10 mL 增菌培养基的试管中，37 °C 培养 24 h±2 h。

### 1.2.3 分离和筛选

分离：使用接种环，从增菌培养基和每支培养试管蘸取少许菌液在选择性培养基平板表面上划板，37 °C 培养 24 h±2 h。

挑选菌落做鉴定：典型菌落的颜色从粉红到红或紫（有或没有沉淀光环）。从典型菌落生长良好的各个培养皿上选择一些典型菌落做次培养，以进行生化鉴定试验。如果菌落形态超过一种，则每种形态选择 1 个菌落做次培养。一些肠杆菌科细菌可能会使它们的菌落或者培养基脱色。因此，当没有典型的菌落存在时，选择发白的菌落做鉴定。

### 1.2.4 已选择菌落的次培养

将每一个选择做确证实验的菌落在营养琼脂平板上划线培养，37 °C 培养 24 h±2 h。从每个培养皿上挑取 1 个分离良好的菌落做生化确证实验。

### 1.2.5 生化确证实验

氧化酶反应：使用铂/铍接种环、接种针或玻棒，挑取分离良好的单菌落的一部分到润湿了氧化酶试剂的滤纸或商业性的圆盘上。不要使用镍/铬接种环、接种针。如果滤纸上的菌落在 10 s 之内没有变黑，则认为测试反应阴性。使用圆盘时参照生产商的说明。

发酵试验：用接种针挑取 9.5 中氧化酶反应阴性的同一菌落在葡萄糖琼脂试管中做穿刺试验。把试管置于 37 °C 培养 24 h±2 h。如果整支试管变黄，则认为反应

阳性。

### 1.2.6 结果表达

已确证的阳性试管：如果任何从培养液中选择的典型菌落，其氧化酶反应阴性，葡萄糖发酵阳性，则认为此培养液来源的试管是肠杆菌科细菌阳性试管。

检测方法：根据检测结果，显示在 x g 或者 x mL 试样中是否存在肠杆菌科细菌。

计数方法：根据每个稀释度阳性试管数计算 MPN 值。

## 1.3 检验方法（菌落计数方法）

### 1.3.1 试样、初始悬浮液和稀释液

如果是液态产品，则仅需要制备十倍稀释液；如果是其它产品，则制备初始悬浮液以及进一步的十倍稀释液。

### 1.3.2 接种和培养

取两个无菌平板，每个平板用灭菌的刻度吸管转移 1 mL 试样。如果是液态产品，则直接移取 1 mL 试样；如果是其它产品，则移取 1 mL 初始悬浮液。用新的灭菌刻度吸管分别吸取液态产品的 10 倍稀释液（ $10^{-1}$ ）和其它产品初始悬浮液的 10 倍稀释液（ $10^{-2}$ ）到两个新的灭菌平板中。用其它稀释度的稀释液重复该操作，每次用新的灭菌吸管稀释。

当制备的紫红胆汁葡萄糖琼脂（VRBG）在水浴锅中降温到 44 °C~47 °C 时，往每个平皿中倾注入约 10 mL 的培养基。从接种平皿到倾注培养基所间隔的时间不要超过 15 min。水平轻摇平皿，小心地混匀接种液和培养基，把平皿放置于阴凉表面，冷却凝固。

待混合物完全凝固后，再加入约 15 mL 的紫红胆汁葡萄糖琼脂（VRBG）形成覆盖层，以阻止菌落的过度生长并创造一个半厌氧的环境。培养基的制备和冷却。冷却凝固，如上所述。

倒置平板，放入培养箱中 37 °C 培养 24 h±2 h。

### 1.3.3 计数及挑选菌落做鉴定

典型菌落的颜色从粉红到红或紫（有或没有沉淀光环）。选择典型菌落数少于 150 个的平板，计算菌落数量。然后随机选择 5 个典型菌落做次培养，以进行生化鉴定试验。如果一个平板上一半或一半以上的琼脂表面都被长得太大的菌落覆盖，则这个平板是无效的。如果一个平板少于一半的琼脂表面被覆盖，则计算清晰部分的菌落数并进行推断以使数值对应于整个平板表面。一些肠杆菌科细菌可能会使它们的菌落或者培养基脱色。因此，当没有典型的菌落存在时，选择 5 个发白的菌落做鉴定。

### 1.3.4 已选择的菌落的次培养

将每一个用于确证实验的菌落在营养琼脂平板

上划线接种。37℃培养24h±2h。从每个培养皿上挑取1个分离良好的菌落做确证实验。

### 1.3.5 生化确证实验

氧化酶反应：使用铂/铍接种环、接种针或玻棒，挑取分离良好的单菌落的一部分到润湿了氧化酶试剂的滤纸或商业性的圆盘上。不要使用镍/铬接种环、接种针。如果滤纸上的菌落在10s之内没有变黑，则认为测试反应阴性。使用圆盘时参照生产商的说明。

发酵试验：用接种针挑取9.5中氧化酶反应阴性的同一菌落在葡萄糖琼脂试管中做穿刺试验。把试管置于37℃培养24±2h。如果整支试管变黄，则认为反应阳性。

### 1.3.6 结果表达

使用下述方程来计算每个平板上符合鉴定或者确证标准的菌落数。

$$a = \frac{b}{A} \times C$$

上述方程中，*b*是在接种菌落(A)中符合确证标准的菌落数；*C*是在平板上计数的假定疑似菌落数的总和。对计算结果四舍五入至最近的整数值。为此，如果小数点后的第一个数字小于5，则不修正前面的数字；如果小数点后的第一个数字大于或等于5，则把前面的数字加1。

举例如下。

计数已经产生下述结果：

-在第1稀释度(10<sup>-3</sup>)有：66和80个菌落；

-在第2稀释度(10<sup>-4</sup>)有：4和7个菌落。

挑选的菌落的检验已经完成：

-在66个菌落中，挑选了8个，其中6个符合标准，因此， $\alpha=50$ ；

-在80个菌落中，挑选了9个，其中6个符合标准，因此， $\alpha=53$ ；

-在7个菌落中，挑选了5个，其中4个符合标准，因此， $\alpha=6$ ；

-在4个菌落中，4个都符合标准，因此， $\alpha=4$ ；

$$N = \frac{\sum c}{v \times [n_1 + (0.1 \times n_2)] \times d} = \frac{50 + 53 + 6 + 4}{1 \times [2 + 0.1 \times 2] \times 10^{-2}} = \frac{113}{0.022} = 51364$$

用四舍五入法修正结果，则每毫升或每克产品中微生物的数量是51000或者5.1×10<sup>4</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株试验结果分析

我们分别对七种阴性菌株和四种阳性菌株进行了试验，试验结果见表1。

表1 标准菌株的试验结果

Table 1 The result of the reference culture

阴性菌株	试验结果	阳性菌株	试验结果
金黄色葡萄球菌, ATCC 6538	VRBG 琼脂	大肠埃希氏菌, ATCC 25922	VRBG 琼脂上有典
枯草芽孢杆菌, CMCC (B) 63501	上不长菌	伤寒沙门氏菌, CMCC (B) 50071	型菌落:
铜绿假单胞菌, ATCC 9027		痢疾志贺氏菌, CMCC (B) 50071	氧化酶试验 (-)
恶臭假单胞菌, 广临检-10		阪崎肠杆菌, CMCC (B) 51252	葡萄糖发酵 (+)
单核细胞增生李斯特菌, CMCC (B) 54002			
白色念珠菌, ATCC 10231			
副溶血性弧菌, VPL 4-90			

从试验结果可以看出，七种阴性菌株，金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、枯草芽孢杆菌(CMCC (B) 63501)、铜绿假单胞菌(ATCC 9027)、恶臭假单胞菌(广临检-10)、单核细胞增生李斯特菌(CMCC (B) 54002)、白色念珠菌(ATCC 10231)和副溶血性弧菌(VPL4-90)在VRBG琼脂上都不能生长；四种阳性菌株，大肠埃希氏菌(ATCC 25922)、伤寒沙门氏菌(CMCC (B) 50071)、痢疾志贺氏菌(CMCC (B) 50071)和坂崎肠杆菌(CMCC (B) 51252)在VRBG琼脂上有典型菌落生长，氧化酶试验呈阴性反应，葡萄糖发酵为阳性反应。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 冷藏、冷冻及新鲜肉的试验结果分析

冷藏、冷冻及新鲜肉的试验结果见表2。从试验结果可以看出，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，肠杆菌科细菌的检出量较高，都超过了110 MPN/g(或3.2×10<sup>2</sup> cfu/g)，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，所以肠杆菌科细菌的检出量较少，大部分为<0.3 MPN/g(或<10 cfu/g)。

### 2.3 部分肉制品的实验结果分析

从试验结果中可以看出，熟肉制品、香肠类、肉松、肉干类和腊制品中的肠杆菌科细菌的检出量都较少。而在预加工的肉制品中，少数样品的肠杆菌科细菌超过了110MPN/g(或7.0×10<sup>2</sup> cfu/g)。目前，定量



包装的熟肉制品总体质量较好，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，致使肠杆菌科细菌的检出量较少。预加工的肉制品由于没有经过最后的加工处理及包装，某些产品的肠杆菌科细菌检出量较高也比较合理。

表 2 冷藏、冷冻及新鲜肉的试验结果

Table 2 The result of cold meat, frozen meat and fresh meat

样品种类	样品名称	试验结果/(cfu/g)	试验结果/(MPN/g)
冷藏肉	表层样品		
	猪肉	2.2×10 <sup>4</sup>	>110
	鸡肉	8.3×10 <sup>4</sup>	>110
	牛肉	9.6×10 <sup>2</sup>	>110
	羊肉	2.1×10 <sup>3</sup>	>110
冷冻肉	表层样品		
	猪肉	<10	<0.30
	鸡肉	<10	<0.30
	牛肉	<10	<0.30
	羊肉	<10	<0.30
新鲜肉	表层样品		
	猪肉	6.6×10 <sup>4</sup>	>110
	鸡肉	3.2×10 <sup>2</sup>	>110
	牛肉	1.3×10 <sup>3</sup>	>110
	羊肉	5.8×10 <sup>3</sup>	>110
新鲜肉	深层样品		
	猪肉	<10	<0.30
	鸡肉	<10	<0.30
	牛肉	<10	<0.30
	羊肉	<10	<0.30
新鲜肉	表层样品		
	猪肉	2.8×10 <sup>4</sup>	>110
	鸡肉	1.2×10 <sup>5</sup>	>110
	牛肉	2.6×10 <sup>4</sup>	>110
	羊肉	4×10 <sup>3</sup>	>110
新鲜肉	深层样品		
	猪肉	<10	0.30
	鸡肉	<10	<0.30
	牛肉	<10	<0.30
	羊肉	<10	0.36

### 3 结论

肉和肉制品营养丰富，适于各类细菌的繁殖，同时又是人们日常的主要食品。目前，国内对肉和肉制品的微生物学检验主要还是 GB2726-2005《熟肉制品卫生标准》中规定的项目，并不能全面、细致地分析肉和肉制品中各类微生物的污染情况。因此，结合相

关的 ISO 等国际标准，我们加强了对肉和肉制品中的

各类微生物情况的分析研究，如：肠杆菌科细菌、假单胞菌、霉菌、酵母及大肠杆菌。实验表明，本方法的准确度、灵敏度和特异性都能较好地满足肉和肉制品中肠杆菌科细菌的检测和计数，准确可行。

表 3 部分肉制品的试验结果

Table 3 The result of some meat products

样品种类	样品名称	试验结果/(cfu/g)	试验结果/(MPN/g)
定量包装的熟肉制品	牛肉粒	<10	<0.30
	清香鸭掌	<10	<0.30
	鸡肾	<10	<0.30
	卤水鸭肾	<10	<0.30
	椒盐鸡腿	<10	<0.30
非定量包装的熟肉制品	烤鸡腿	<10	<0.30
	鸭腿	<10	<0.30
	烧鸡	1.8×10 <sup>3</sup>	>110
	鸭脖	<10	<0.30
	蒜香骨	<10	<0.30
肉松、肉干类	猪肉松	<10	7.5
	猪肉干	<10	<0.30
	牛肉干	<10	<0.30
	海苔猪肉松	<10	<0.30
	上海咸肉	<10	<0.30
腊制品	湘西腊肉	<10	1.5
	豉味五花腊肉	1.7×10 <sup>2</sup>	>110
	腊鸭腿	<10	<0.30
	牛肉丸	<10	15
	西式火腿肉浆	45	110
预加工肉制品	热狗肠肉浆	120	110
	羔羊肉涮片	7.0×10 <sup>2</sup>	>110

### 参考文献

- [1] 徐进,庞璐.食品安全微生物学指示菌国内外标准应用的比较分析[J].中国食品卫生杂志,2011,23(5):472-477
- [2] ISO 21528-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae-Part1:Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment [S]
- [3] ISO 21528-2 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae-Part2:Colony-count method[S]
- [4] 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[S]
- [5] 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[S]
- [6] ISO 7218:1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs-General rules for microbiological examinations[S]
- [7] 王龑,闫磊,曾庆祝.沙门氏菌的检测技术与方法[J].现代食品科技,2011,23(5):82-86
- [8] 张洁梅.食品微生物检验技术的研究进展[J].现代食品科技,2005,21(2):221-222
- [9] 张银旺,付有荣.肠杆菌科细菌生化鉴定系统的研制及评价[J].现代检验医学杂志,2007,22(4):9-11

[10]

现代食品科技