

文章编号 :1009-038X(2003)05-0086-05

工厂中环境和海产品加工前后的微生物学检验

卢红梅, 张义明

(贵州工业大学 化学与生物工程学院, 贵州 贵阳 550003)

摘要:检测了 2 个海产品加工厂的环境及加工前后海产品样品的菌落总数(个/cm², 个/g 或个/mL)、李斯特氏菌和单核细胞增生李氏菌数(每 100 cm², 100 g 或 100 mL 样品的 MPN 数), 其结果如下: 2 个工厂对应样品的菌落总数及其分布规律相接近, 但李斯特氏菌和单核细胞增生李氏菌的出现率和数量却相差很大, 单核细胞增生李氏菌数都低于或远低于李斯特氏菌, 且单核细胞增生李氏菌与李斯特氏菌的数量和分布呈正相关, 加工后海产品中的李斯特氏菌和单核细胞增生李氏菌可能来自原料和加工过程, 环境中李斯特氏菌和单核细胞增生李氏菌主要来自原料。

关键词:菌落总数; 李斯特氏菌; 单核细胞增生李氏菌; 微生物学检验

中图分类号: TS 201.3

文献标识码: A

Microbiological Test of Environment and Seafood Samples before and after Processing

LU Hong-mei, ZHANG Yi-ming

(Chemical and Biological Engineering College, Guizhou University of Technology, Guizhou 550003)

Abstract: The environment samples and seafood samples before and after the starting of two seafood processing plants were tested in terms of aerobic bacterial count (CFU/cm², CFU/g or CFU/mL), *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* (per 100cm², 100g or 100ml sample's MPN determination), and the results showed the followings: The aerobic bacterial counts and the distribution in the samples obtained from the two plants were similar with each other, but the MPN determinations and distribution of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* were obviously different with each other; The amount of *Listeria monocytogenes* increased with the amount of *Listeria spp.*; The MPN determinations of *Listeria monocytogenes* were less or much less than those of *Listeria spp.*; The *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in the seafood product might come from the production process and the materials, and the materials resulted the higher MPN determinations in environment samples.

Key words: aerobic bacterial count; *Listeria spp.*; *Listeria monocytogenes*; microbiological test

单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*), 又名单核细胞增生李氏菌, 广泛地存在于各

种食品和环境。其中食品是最主要的传染源, 菌体是通过接触食物的表面而进入食物的^[1, 2]。单核

收稿日期 2003-04-05; 修回日期 2003-05-20.

作者简介: 卢红梅(1967-), 女, 重庆人, 副教授, 工学硕士。

万方数据

细胞增生李氏菌的检测普遍采用增菌、分离、鉴定等方法,目前已有多种方法对该菌进行分离、鉴定。作者采用 ISO(International Standard Organization) 11290—1 推荐的以 DFB(Demi-Fraser Broth)和 FB(Fraser Broth)为增菌液的二级增菌法^[3],FB 还是 USDA(United States Department of Agriculture)使用的第二级增菌液。由于增菌液的选择性及七叶苷被李斯特氏菌(*Listeria* spp.)利用后与铁离子产生的颜色反应,使得该法被广泛地使用^[4,5]。PALCAM 琼脂被 IDF(International Dairy Federation)推荐为单核细胞增生李氏菌的检测平板。PALCAM 中的化学药品和抗菌剂能抑制非李斯特氏菌的生长^[6]。由于菌体的溶血作用,可将单核细胞增生李氏菌、西尔李氏菌(*L. seeligeri*)在 EHA(Enhanced haemolysis agar)上与其它李斯特氏菌区分开^[7]。然后再通过对鼠李糖和木糖的不同利用,而将单核细胞增生李氏菌和西尔李氏菌区分开^[8]。

本试验的目的在于检测海产品加工前后及加工环境的菌落总数(Aerobic bacterial count)、单核细胞增生李氏菌、李斯特氏菌的数量及分布规律。

1 材料与方法

1.1 对照菌株

试验所用对照菌株为单核细胞增生李氏菌(*Listeria monocytogenes*) Scott A,血清型 4b,菌株为美国马萨诸塞州大学食品科学系 Dr. R. E Levin 所藏。

1.2 样品

从 2000 年 11 月到 2001 年 5 月,共分析了 2 个海产品加工厂的 104 个环境样品,50 个海产品和 12 个解冻冰冻虾仁的盐水样品。其中环境样品用无菌海绵取样法,海产品样品则是取加工前后的海产品。这 2 个工厂一个是取打捞上岸的海鱼腹部的肉,再将鱼皮剥去(1 号工厂);另一个则是将冰冻虾仁用盐水解冻、沥干后上浆、裹粉即可包装(2 号工厂)。

1.3 增菌液与增菌培养

根据 ISO11290—1 的两级增菌法,采用 DFB 和 FB 为增菌液^[3]。对于环境和海产品样品,采用 3 管最大可能数法(3 管 MPN 法)将每个样品与 DFB 按 1:10、1:100 和 1:1 000 的稀释度准备 3 组 9 个试样(若染菌程度较高,可增加稀释倍数),放入 37℃ 恒温室内培养 24、48 h,分别将颜色变黑的玻璃瓶或试管内的溶液混匀,吸取 0.1 mL 加入灭菌调配好的 9.9 mL FB 试管中,37℃ 恒温培养 48 h,对颜色

变黑的试管(阳性)进行下一步的分离操作。

1.4 选择性分离平板

将二级增菌液 FB 中的阳性样品(溶液变黑的试管)混匀,用划线法在 EHA^[7]和 PALCAM 琼脂平板^[6]上分离。在 37℃ 下培养 48 h,单核细胞增生李氏菌和西尔李氏菌都在血红色的 EHA 上呈 0.5~1.5 mm 左右的淡黄色菌落,菌落周围有透明圈,同时在紫外灯(366 nm)下所有李斯特氏菌呈现荧光。在 PALCAM 琼脂平板上,单核细胞增生李氏菌的菌落则呈直径为 0.5~1.5 mm、带灰绿色中心凹陷的黑色菌落,且菌落周围有较大的黑色区域。

1.5 菌株鉴定

参照对比菌株在各培养基上的特征,从 EHA 和 PALCAM 上分别挑选 5 个典型菌落按划线法在含 0.6 g/dL 酵母膏的胰酪胨大豆琼脂(TSAYE)^[8]上再次分离。经过 37℃、24 h 的培养,菌落应呈现均匀的半透明、微凸起、直径为 1.0~2.0 mm 的纯菌落,从 45° 倾角观察呈现淡蓝至蓝灰色。若菌落不纯,应挑选典型菌落再次分离。将 TSAYE 上的纯菌落再次接种到 EHA(来自 PALCAM)和 PALCAM(来自 EHA)以检查在不同培养基上菌落的典型性;利用 TSAYE 上的纯菌落可分析血清学类型(应为 1 型或 4 型)、革兰氏类型(应呈阳性)、有过氧化氢酶活性,镜检应呈短杆状和带翻转的运动性;同时将 TSAYE 上的菌体接种于 TSBYE 试管内,培养过夜,再接入紫色的碳水化合物肉汤^[8]中,37℃ 培养 5~7 d,单核细胞增生李氏菌由于可利用鼠李糖而使试管内的溶液从紫色变成黄色,由于不能利用木糖而使该试管紫色不变;西尔李氏菌对鼠李糖、木糖的利用则相反。

1.6 计数

1.6.1 琼脂平板计数 菌落总数的测定采用琼脂平板计数法,将 0.1 mL 不同稀释度的样品在 TSA^[8]上均匀涂布,20℃ 培养 3 d 后,在菌落计数机上计数,由平板菌落数和稀释度可算出样品的菌落总数(个/cm²、个/g 或个/mL)。

1.6.2 MPN 计数法 单核细胞增生李氏菌、李斯特氏菌的计数采用 3 管 MPN 法,样品按稀释度分的 3 组 9 个样(每组 3 个重复)中,海产品的量分别为 10、1、0.1 g,环境样品分别代表 10、1、0.1 cm² 的面积,盐水量分别为 10、1、0.1 mL。每个样品中只要出现一个或几个能被确定的单核细胞增生李氏菌就呈阳性,李斯特氏菌则根据 FB 试管呈阳性的个数来计算。若样品的染菌程度较大,可加大稀释度,使整个样品组中至少有一个为阴性,就可利用 3 管

MPN法的图表查出每100 g、100 cm²或100 mL样品的微生物数量。

2 结果与讨论

2.1 菌落总数

从表1、2可得出海产品加工厂环境与海产品加工前后的菌落总数及其分布规律。

2.1.1 对环境样品 从1号工厂的E4远低于E1, E2, E3; 2号工厂的E3远低于E1, E2, E4. 说明墙壁样品的菌落总数较其它样品低得多. 从1号工厂的E3远高于E1, E2, E4; 2号工厂的E1远高于E2, E3, E4. 说明无论温度的高低如何, 一直处于潮湿状

态的排水沟样的菌落总数较其它样(包括干燥的排水沟)高得多.

2.1.2 对海产品样 1号工厂和2号工厂海产品加工前后的菌落总数介于环境样品之间. 1号工厂海产品加工前后的菌落总数变化不大, 2号工厂除少数样外, 冰冻虾仁原料的菌落总数都高于加工后的样品, 解冻盐水的菌落总数与原料接近. 另外, 2号工厂原料加工前的菌落总数高于1号工厂的原料, 2个工厂产品的菌落总数很接近. 这说明原料经过加工后, 若加工前菌落总数不高, 加工后变化就不大, 若加工前菌落总数较高, 加工后有所降低, 也说明加工过程不会导致菌落总数的增加.

表1 1号工厂各样品的菌落总数

Tab.1 Aerobic bacterial count in plant # 1

个/cm², 个/g 或个/mL

日期	E1	E2	E3	E4	加工前	加工后	海产品种类
11/15/00	9.90×10^6	5.30×10^6	1.13×10^8	$< 1.00 \times 10^3$	5.0×10^3	2.70×10^4	螃蟹
11/29/00	8.20×10^6	4.70×10^6	5.60×10^8	$< 1.00 \times 10^3$	6.80×10^7	8.40×10^6	鳕鱼
12/13/00	1.50×10^5	$< 1.00 \times 10^4$	4.40×10^8	$< 1.00 \times 10^1$	4.60×10^4	4.00×10^4	比目鱼
12/27/00	6.50×10^4	3.10×10^4	3.60×10^8	< 10	NP	NP	NP
1/10/01	$< 1.00 \times 10^4$	$\sim 2.20 \times 10^3$	1.23×10^8	3.70×10^3	3.50×10^5	4.10×10^4	黑线鳕
1/24/01	5.50×10^5	$\sim 1.40 \times 10^4$	1.32×10^8	$\sim 3.00 \times 10^1$	4.70×10^4	$\sim 1.20 \times 10^4$	螃蟹
2/8/01	1.30×10^5	$< 1.00 \times 10^3$	1.60×10^9	$\sim 1.50 \times 10^1$	3.00×10^4	$\sim 7.60 \times 10^4$	螃蟹
02/22/01	$\sim 6.0 \times 10^3$	4.10×10^6	2.08×10^8	~ 20	1.47×10^5	$\sim 2.2 \times 10^4$	海鲈鱼
3/8/01	1.36×10^5	7.10×10^3	4.60×10^8	< 10	3.20×10^3	5.40×10^5	鳕鱼
3/21/01	< 1000	3.20×10^4	9.30×10^7	< 10	8.60×10^5	2.11×10^6	比目鱼
4/4/01	3.40×10^5	3.30×10^4	7.70×10^7	< 10	5.30×10^6	9.90×10^6	鲑鱼
4/19/01	8.70×10^5	8.30×10^3	9.50×10^6	~ 10	$\sim 7.00 \times 10^1$	$\sim 1.0 \times 10^1$	鳕鱼
5/2/01	8.80×10^4	5.20×10^4	7.00×10^7	~ 10	3.30×10^4	3.40×10^4	比目鱼

注: E1指螃蟹加工线前的排水沟(干燥); E2指鱼肉加工线旁的排水沟(干燥); E3指原料冷藏间内排水沟(潮湿); E4指通风道下螃蟹加工线旁的墙壁; NP指无样品。

表2 2号工厂各样品的菌落总数

Tab.2 Aerobic bacterial count in plant # 2

个/cm², 个/g 或个/mL

日期	E1	E2	E3	E4	加工前	加工后	盐水
11/15/00	8.50×10^8	2.60×10^8	$\sim 1.4 \times 10^4$	2.60×10^4	3.20×10^7	3.40×10^6	
11/29/00	2.22×10^8	9.40×10^5	$< 1.0 \times 10^3$	$< 1.0 \times 10^3$	9.30×10^5	6.60×10^5	
12/13/00	1.84×10^8	5.10×10^5	< 10	< 10	1.4×10^5	7.20×10^5	1.00×10^6
12/27/00	1.92×10^6	7.60×10^5	$\sim 1.0 \times 10^2$	3.10×10^4	NP	NP	NP
1/10/00	7.50×10^7	4.80×10^6	3.90×10^2	9.50×10^4	8.50×10^6	4.80×10^5	
1/24/01	2.90×10^8	2.90×10^6	$\sim 6.0 \times 10^2$	1.07×10^4	1.66×10^6	$\sim 6.00 \times 10^3$	NP
2/8/01	2.90×10^8	3.10×10^7	1.40×10^4	8.60×10^3	1.58×10^7	1.01×10^5	
2/22/01	5.00×10^7	4.00×10^6	$\sim 6.0 \times 10^2$	1.02×10^4	6.90×10^5	1.60×10^5	
3/8/01	7.50×10^6	5.50×10^6	$\sim 5.0 \times 10^1$	3.00×10^3	1.36×10^5	5.40×10^5	
3/21/01	1.36×10^7	5.10×10^6	8.00×10^3	1.31×10^5	5.30×10^4	3.60×10^6	
4/4/01	1.20×10^6	1.09×10^7	1.08×10^4	1.36×10^5	3.30×10^6	4.60×10^5	
4/19/01	8.60×10^5	3.60×10^6	1.40×10^4	1.84×10^5	1.05×10^7	9.00×10^5	

注: E1指解冻罐旁的排水沟(潮湿); E2指包装机旁的排水沟(干燥); E3指裹粉机旁的墙壁; E4指裹粉机的底座; NP指无样品。

万方数据

2.2 李斯特氏菌和单核细胞增生李氏菌

产品加工前后的李斯特氏菌和单核细胞增生李氏菌的数量及分布规律.

由表 3 和表 4 可得出海产品加工工厂的环境与海

表 3 1 号工厂每 100 cm² ,100 g 或 100 mL 样品中李斯特氏菌/单核细胞增生李氏菌的 MPN 数

Tab.3 MPN determinations for *Listeria spp./Listeria monocytogenes* in 100 cm² , 100 g or 100 mL sample in plant #1

日期	E1	E2	E3	E4	加工前	加工后	海产品种类
11/15/00	72/0	9.1/3.6	9.1/9.1	0/0	0/0	0/0	螃蟹
11/29/00	0/0	9.1/9.1	23/3.6	0/0	23/0	15/3.6	鲑鱼
12/13/00	3.6/0	0/0	43/3.6	0/0	0/0	0/0	比目鱼
12/27/00	0/0	0/0	11/7.3	0/0	NP	NP	NP
1/10/01	0/0	0/0	6.2/3	0/0	0/0	0/0	黑线鳕
1/24/01	3.6/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	螃蟹
2/8/01	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	15/0	螃蟹
02/22/01	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	3.6/0	海鲈鱼
3/8/01	3.6/0	3.6/0	0/0	0/0	0/0	0/0	鲑鱼
3/21/01	0/0	0/0	3.6/0	0/0	0/0	0/0	比目鱼
4/4/01	0/0	0/0	460/93	0/0	15/0	1100/0	鲑鱼
4/19/01	9.1/0	0/0	15/9.1	0/0	0/0	0/0	鲑鱼
5/2/01	3.6/0	0/0	3.6/0	0/0	3.6/0	23/0	比目鱼

注 :E1 指螃蟹加工线前的排水沟(干燥);E2 指鱼肉加工线旁的排水沟(干燥);E3 指原料冷藏间内排水沟(潮湿);E4 通风道下螃蟹加工线旁的墙壁;NP 指无样品.

表 4 2 号工厂每 100 cm² ,100 g 或 100 mL 样品中李斯特氏菌/单核细胞增生李氏菌的 MPN 数

Tab.2 MPN determinations for *Listeria spp./Listeria monocytogenes* in 100 cm² , 100 g or 100 mL sample in plant #2

日期	E1	E2	E3	E4	加工前	加工后	盐水
11/15/00	>24000/>24000	240/240	0/0	23/0	93/	440/0	72/0
11/29/00	>24000/>24000	390/390	0/0	0/0	2400/0	460/0	23/23
12/13/00	1100/64	93/0	0/0	0/0	>24000/0	460/3.6	1500/23
12/27/00	>24000/>24000	39/0	23/0	7.3/0	NP	NP	NP
1/10/00	460/460	460/0	0/0	23/3.6	36/0	240/3	9.1/0
1/24/01	23/23	460/1100	0/0	9.1/0	1100/3.6	150/0	NP
2/8/01	93/93	1500/1500	23/0	0/0	240/0	460/0	14/0
2/22/01	750/140	11000/23	0/0	0/0	21/0	240/0	240/0
3/8/01	6.2/0	240/23	0/0	3.6/0	43/15	360/9.1	7.2/3.6
3/21/01	240/93	1100/15	23/0	9.1/0	240/0	460/0	460/0
4/4/01	29/0	4600/93	0/0	9.1/0	1100/0	1100/0	240/0
4/19/01	93/93	1100/43	23/9.1	43/0	4600/0	4600/0	1100/0
5/2/01	43/3.6	1500/390	0/0	0/0	460/0	240/0	11000/0

注 :E1 指解冻罐旁的排水沟(潮湿);E2 指包装机旁的排水沟(干燥);E3 指裹粉机旁的墙壁;E4 指裹粉机的底座;NP 指无样品

2.2.1 对环境样品 与菌落总数的分布规律一致 2 个工厂墙壁样的李斯特氏菌和单核细胞增生李氏菌的出现率和数量都低于或远低于其它样品.特别是 1 号工厂,其 E4 的李斯特氏菌和单核细胞增生李氏菌的检出率为零.但 1 号工厂与 2 号工厂一直处于潮湿状态的排水沟样的李斯特氏菌和单核细胞增生李氏菌的出现率和数量却相差很远.2

个工厂中李斯特氏菌的出现率和数量明显高于同一样品的单核细胞增生李氏菌,且单核细胞增生李氏菌的数量随李斯特氏菌数量的增加而增加.

2.2.2 对海产品样品 2 号工厂海产品在加工前后及解冻盐水中李斯特氏菌的出现率为 100%,1 号工厂的在 30%左右,且数量上也要低得多;1 号工厂海产品在加工前单核细胞增生李氏菌的出现

率为零,加工后有检出,但很低,说明原料未感染单核细胞增生李氏菌,加工过程中有感染的可能但数量不大。2号工厂海产品在加工前后及解冻盐水中单核细胞增生李氏菌的出现率为30%左右,从其分布来看,单核细胞增生李氏菌的来源可能是原料、解冻盐水或加工过程。

3 结论

1) 比较2个工厂的所有样品,对应样品的菌落总数相接近,李斯特氏菌和单核细胞增生李氏菌的出现率和数量相差非常大,这主要来自原料的影响。

2) 对环境样品,菌落总数、李斯特氏菌数量和单核细胞增生李氏菌数量的分布规律都是墙壁最少,设备底座其次,干燥排水沟较多,而常常处于潮湿状态的排水沟最多。

3) 对海产品而言,其菌落总数、李斯特氏菌和单核细胞增生李氏菌的数量介于环境样品之间,单核细胞增生李氏菌的出现率和数量都低于或远低于李斯特氏菌。

4) 从海产品与环境间的关系上,在菌落总数方面相关性较小(可能未体现出来),但在李斯特氏菌和单核细胞增生李氏菌方面存在相互影响,即环境中的菌体在加工时可进入海产品,而海产品加工前(原料)的菌体量较大时,也能在环境中大量检出。

参考文献:

- [1] Beresford M R, Andrew P M, Shama G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environment[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 90: 1000-1005.
- [2] Birte Fonneshch Vogel, Hans Henrik Huss, Bente Oieni, *et al.* Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods[J]. *Applied And Environmental Microbiology*, 2001, 67(6): 2586-2595.
- [3] Johansson T, Ahola-Luttilla H, Pirhonen T, *et al.* Improved detection of *Listeria monocytogenes* in soft mould-ripened cheese[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88: 870-876.
- [4] Judy A Fraser, William H Sperber. Rapid detection of *Listeria spp.* in food environmental samples by esculin hydrolysis[J]. *Journal of Food Protection*, 1988, 51(10): 762-765.
- [5] Frank T Poysky, Rohinee N Paranjpye, Laura C Lashbrook. *et al.* Selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* from food[J]. *Journal of Food Protection*, 1993, 56(4): 326-329.
- [6] G Vlaemynek, V Lafarge, S Scotter. Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88: 430-441.
- [7] Beumer R R, M C Te Giffel, L J Cox. Optimization of haemolysis in enhanced haemolysis agar (EHA)-a selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1997, 24: 421-425.
- [8] 苏世彦. 食品微生物检验手册[J]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 169-174.

(责任编辑 李春丽)