

牛肉中初始微生物来源分析

李娟¹, 卢士玲^{*1}, 仝旭¹, 熊堃¹, 刘战霞¹, 侯扶琴²

(1. 新疆石河子大学 食品学院,新疆 石河子 832000;2. 新疆喀尔万食品科技有限公司,新疆 石河子 832000)

摘要: 为了延长冷鲜牛肉保鲜期,减少初始腐败菌,采用菌落计数和聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术来分析肉牛屠宰车间空气以及相关屠宰工序中工人手、工具、冲淋水等菌相分布,确定出厂前牛肉主要污染工序和初始微生物来源。结果表明:出厂前牛肉主要携带约氏不动杆菌、巨型解酪球菌、葡萄球菌等,主要污染工序为去头蹄、分割工序,其中工人手、手套、刀、案板、镊子、手钩、传送带为主要污染源。

关键词: 肉牛屠宰工序;菌相;PCR-DGGE ;初始;污染源

中图分类号: TS 251.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2018)01—0100—07

Study on the Initial Microbial Source of Beef

LI Juan¹, LU Shiling^{*1}, TONG Xu¹, XIONG Kun¹, LIU Zhangxia¹, HOU Fuqin²

(1. The Food College of Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2. Xinjiang Calvin Wan Food Science and Technology Co., Ltd., Shihezi 832000, China)

Abstract: In order to extend the chilled beef shelf life and reduce initial spoilage bacteria of Calvin Wan Company, investigate the main pollution process and initial microbial source of beef becomes necessary. The distribution microbial in the air of cattle slaughterhouse and in the process of operation, such as the hands, tools and water, were analyzed by colony count and Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) technology. The results showed the initial microorganisms carried by beef is *Acinetobacter johnsonii*, *Staphylococcus* sp., *Macroccoccus caseolyticus* etc. The main contamination processing were head hoof and segmentation, the main source of environmental contamination in the pre production of beef is from abattoir worker's hands, gloves, knives, chopping blocks, Tweezers, hooks, conveyor belts.

Keywords: slaughter process, bacteria phase, PCR-DGGE, initial, pollution sources

肉制品是一种良好的培养基,可以为很多微生物提供生长必须的营养物质^[1]。一般情况下肉体的内表面是无菌的,然而在屠宰过程中相关操作会引起胴体污染。微生物污染从屠宰开始,微生物首先

接触胴体,然后再深入肌肉等深层组织^[2]。这种污染主要来源于动物的皮肤、毛发、蹄、粪便和内脏,其他来源为屠宰相关设备、工具、工人以及环境等^[3-5]。

动物屠宰过程中容易污染致病性细菌,包括沙

收稿日期: 2015-10-27

基金项目: 新疆生产建设兵团第八师科技项目(2014GY04)。

* 通信作者: 卢士玲(1976—),女,吉林德惠人,教授,工学博士,博士研究生导师,主要从事畜产品加工与质量安全研究。

E-mail: lushiling_76@163.com

引用本文: 李娟,卢士玲,仝旭,等. 牛肉中初始微生物来源分析[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(01):100-106.

门氏菌,大肠杆菌 O157:H7 和单增李斯特菌等^[6]。2010 年欧盟食源性疾病爆发这进一步引起了人们对食品安全问题的重视。肉类,特别是新鲜的肉类和新鲜的肉类产品,是引发食品安全问题重的要来源^[7]。

聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 技术可从样品中直接提取 DNA,能检测到难培养或不能培养的微生物且检测速度快,目前该技术已广泛应用于食品微生物种群群落研究。近年来将 PCR-DGGE 技术应用于研究畜禽屠宰过程中的菌相变化亦有报道^[8-9]。

作者利用 PCR-DGGE 技术对肉牛屠宰过程菌相分析,确定污染主要工序及主要来源,为有效控制原料牛肉微生物污染提供关键控制点依据,也为牛肉的减菌工作打下基础。

1 材料与方法

1.1 取样

取样地点为新疆石河子市喀尔万清真屠宰场。肉牛屠宰加工车间生产线现场取样,分别在放血、去头蹄、剥皮、去红白腔、劈半、修整、排酸取胴体的颈部和前胸肉其中放血取颈部肉,每个步骤随机抽取 3 头牛为一个样本。按照棉试纸检测规程以及空气、食品接触面微生物检测方法用 3~5 根蘸有无菌生理盐水的无菌棉签对肉牛毛皮、放血、去头蹄、剥皮、去红白腔、劈半、修整、分割等工序中的工人的手、手套、刀、镊子、手钩、传送带、案板等表面取样随后置于 10 mL 无菌生理盐水管中,将含有样品的试管放入有冰袋的取样箱中;利用空气沉降法用含有培养基的平板对屠宰间、排酸间、分割间的空气进行 3 个阶段采样;将屠宰场的冲淋水取 10 mL。所有样品 3 h 内送回实验室处理。

1.2 试剂与仪器

PCA 培养基、琼脂糖 Biowest、细菌基因组 DNA 提取试剂盒 TIANGEN、聚丙烯酰胺回收试剂盒:康为世纪生物科技有限公司产品;Neofuge 台式高速冷冻离心机:力康发展有限公司产品;D-37520 高速冷冻离心机:德国 LED 热电子产品公司;22331 小型高速冷冻离心机:Eppendorf AG 产品;PCR 仪:美国 Barloworld Scientific 有限公司产品;Bio-Rad Dcode apparatus DGGE 电泳仪、GelDoc2000 system 凝胶成像仪:美国 Bio-Rad 公司产品;DYY-

8C 水平电泳仪:北京市六一仪器厂产品;ZXRD-7-80 摇床:上海智诚有限公司产品;所用引物均由上海生工合成。

1.3 方法

1.3.1 肉牛屠宰工艺流程 宰前检验→起吊→屠宰→放血→冲淋→预剥皮→去头、蹄→剥皮→出红腔、出白腔→尿液检验→胴体劈半→宰后检验→胴体修整→称重→排酸→分割→终产品。

1.3.2 细菌总数的测定 肉样:无菌条件下取 25 g 肉样(两个平行),无菌剪刀剪碎,加入 225 mL 灭菌生理盐水,112 r/min 摇床振摇 30 min。取 1 mL 上清液进行 10 倍梯度稀释,选择合适的稀释梯度,每个稀释度 2 个重复,采用 PCA 培养基于 37 °C 培养 48 h^[10]。培养结束后计数,结果以 lg(CFU/g)表示。

棉签采取的样:涡旋混匀后直接吸取 1 mL 进行 PCA 菌落计数方法同上,结果以 lg(CFU/cm²)表示。

沉降法采取的空气样品:将平板中的培养基加入 225 mL 的灭菌生理盐水中进行 PCA 菌落计数方法同上,结果以 lg CFU 表示。

1.3.3 细菌总 DNA 提取 根据 Vitor^[11]等方法略有修改。肉样(无菌操作取 10 g 样品,无菌剪刀剪碎,放入 90 mL 灭菌生理盐水中),空气样品(将平板中的培养基加入 225 mL 的灭菌生理盐水中)112 r/min 摇床振摇 30 min,静置 5 min,取上清液 4 °C, 2 000 g 离心 5 min,取上清液于 4 °C, 10 000 g 离心 15 min,取沉淀于 1.5 mL 离心管中参照 DNA 提取试剂盒说明提取细菌总 DNA。所提取的 DNA 溶于 TE 缓冲液中,于-20 °C 贮藏备用。

对棉签采取的样品直接吸取 1 mL 于 1.5 mL 离心管中后续方法同上。

1.3.4 PCR 扩增 上游引物为带 GC 夹子的 U968,下游引物为 L1401。对细菌的 16S rRNA 的 V6-V8 区段进行 PCR 扩增,条带片段约为 450 bp;上游引物 GC-U968 为:5'-CGC CCG GGG CGC GCCCG GGC GGG GCGGG GCA CGG GGG GAA CGCGAA GAA CCTTAC-3';下游引物 L1401 为:5'-CGG TGT GTACAA GACCC-3';PCR 反应体系为 25 μL:DNA 模板 1 μL,GC-U968 和 L1401 各 1 μL,PCR Mix 12.5 μL,ddH₂O 9.5 mL;PCR 反应程序:94 °C 预变性 2 min,35 个循环(94 °C,30 s,60 °C,30 s,72 °C,30 min),最终 72 °C 延伸 5 min;

PCR 产物经质量分数 1.0% 琼脂糖电泳检测后于 -20 ℃ 贮藏备用。

1.3.5 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 参照 Wang^[12] 等方法稍作改动, 对细菌 16S rRNA 基因 V6-V8 的扩增产物分别进行 DGGE 分析。采用 Biorad Dcode apparatus 电泳仪, 聚丙烯酰胺胶质量浓度为 8 g/dL (丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺质量比为 37.5:1), 变性梯度为 38%~58% (100% 变性剂含有 7 mol/L 尿素和质量分数 40% 甲酰胺), 在 0.5xTAE 缓冲液中, 60 ℃ 恒温条件下, 200 V 电压下电泳 10 min, 85 V 电压下电泳 16 h。

电泳结束后, 将 DGGE 胶片用含 0.5 mg/L 溴化乙啶 (Ethidium bromide, EB) 染色 20 min。回收染液, 之后将 DGGE 胶片用 ddH₂O 漂洗 3 次, 每次 5 min。

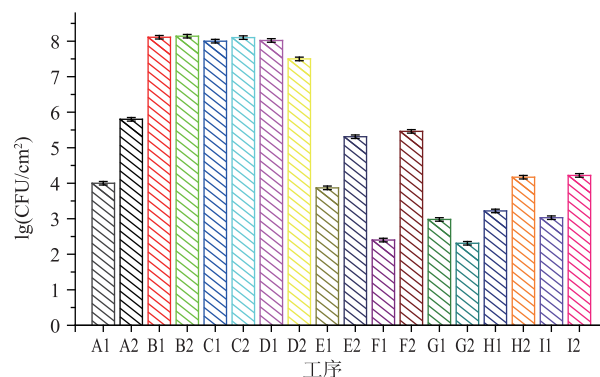
1.3.6 DNA 回收与纯化 将 EB 染色的 DGGE 胶片放置于紫外灯下用无菌手术刀切下不同位置的条带, 分别放入 1.5 mL 的灭菌离心管中, 用聚丙烯酰胺回收试剂盒回收胶条, 备用。

取 3 μL 回收的 DNA 为模板进行 16S rRNA V6-V8 区域扩增, 引物为 U968 (5'-AAC GCG AAG AAC CTTAC-3'), L1401 (5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3'), PCR 扩增程序同 1.3.4。产物经 1.0% 琼脂糖检验后送往北京华大基因测序部测序。登录 NCBI, 将所得序列与数据库中的已知序列进行相似性比对^[13]。

2 结果与分析

2.1 菌落总数

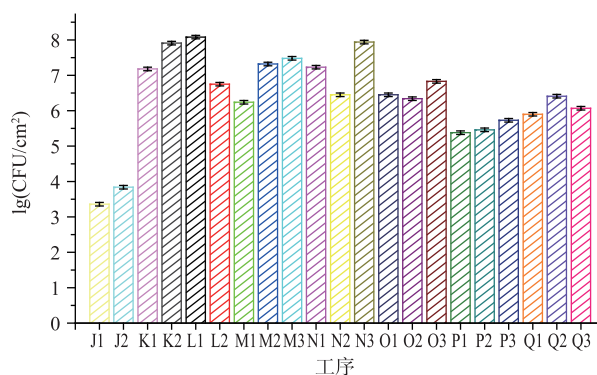
2.1.1 肉牛屠宰各工序点工具、工人手或手套表面微生物污染状况 由图 1 和图 2 可看出, 放血、剥皮、劈半、修整工序中操作前刀的菌落总数在 3.03~4.00 lg(CFU/cm²) 之间, 操作后刀的菌落数处于 3.84~5.80 lg(CFU/cm²) 之间; 剥皮、去红白腔工序中工人手或手套在操作前菌落数处于 2.40~3.22 lg(CFU/cm²), 操作后处于 4.17~5.46 lg(CFU/cm²); 放血工序点工人手表面和去头蹄工序点刀、工人手表面菌落数较高达到 8.00 lg(CFU/cm²) 左右; 修整工序工人手套、手钩菌落数处于 6.75~8.08 lg(CFU/cm²) 左右; 分割工序中传送带、案板、镊子、工人手套、刀随着分割进行菌落总数呈上升趋势, 菌落总数在 5.9~7.9 lg(CFU/cm²) 范围内。



A1.放血前刀; A2.放血后刀; B1.放血前手; B2.放血后手; C1.去头蹄前刀; C2.去头蹄后刀; D1.去头蹄前手; D2.去头蹄后手; E1.剥皮前刀; E2.剥皮后刀; F1.剥皮前手套; F2.剥皮后手套; G1.去红白腔前刀; G2.去红白腔后刀; H1.去红白腔前手; H2.去红白腔后手; I1.劈半前刀; I2.劈半后刀

图 1 放血、去头蹄、剥皮、去红白腔工序中工具及工人手菌落计数

Fig. 1 Counts total bacteria of workers hand and tools in the process of bloodletting, go head and hoof, peeling, remove offal



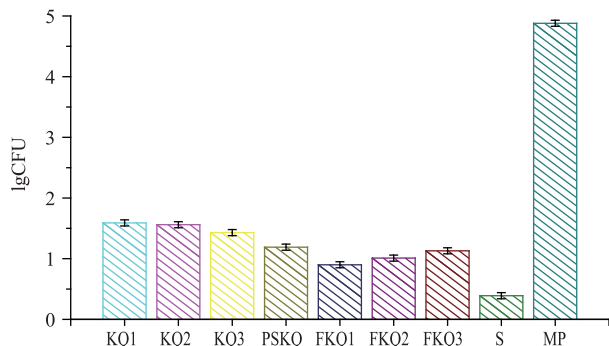
J1.修整刀前; J2.修整刀后; K1.修整手套前; K2.修整手套后; L1.修整手钩前; L2.修整手钩后; M1.传送带 0h; M2.传送带 1h; M3.传送带 2h; N1.分割案板 0h; N2.分割案板 1h; N3.分割案板 2h; O1.分割手套 0h; O2.分割手套 1h; O3.分割手套 2h; P1.分割镊子 0h; P2.分割镊子 1h; P3.分割镊子 2h; Q1.分割刀 0h; Q2.分割刀 1h; Q3.分割刀 2h

图 2 修整、分割工序中工具、工人手套菌落计数

Fig. 2 Counts total bacteria of workers gloves and tools in the process of trim and segmentation

2.1.2 冲淋水、牛毛皮和屠宰车间空气污染状况 由图 3 可见, 肉牛毛皮的菌落数为 4.88 lg(CFU/cm²); 冲淋水中的菌落数仅为 0.39 lg(CFU/mL); 屠宰间空气菌落数显著高于排酸间和分割间, 屠宰间

前、中、后空气菌落总数变化不显著;分割间空气初始菌落数较低仅为 $0.90 \lg(\text{CFU}/\text{cm}^2)$,随着分割进行空气中菌落数增加。说明在分割前用紫外对分割间进行杀菌是有效的,冲淋水中带有少量细菌造成污染相对较小,屠宰过程来自牛毛皮污染不容忽视。

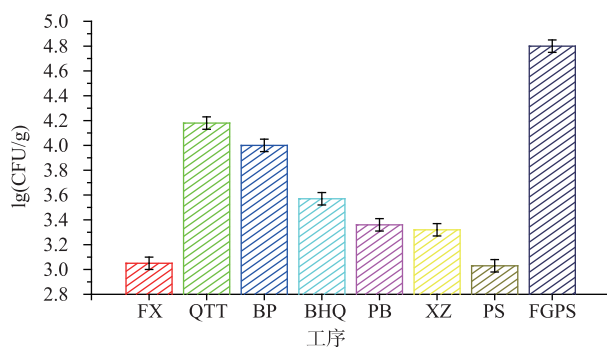


KQ1.屠宰间空气前;KQ2.屠宰间空气中;KQ3.屠宰间空气后;PSKQ.排酸间空气;FKQ1.分割间空气 0h;FKQ2.分割间空气 1h;FKQ3.分割间空气 2h;S.冲淋水;MP.牛毛皮

图3 冲淋水、牛毛皮和屠宰车间空气菌落计数

Fig. 3 Counts of total bacteria in Chonglin water, cattle fur and the air in processing plants

2.1.3 屠宰过程中牛肉微生物污染状况 由图4可知,牛肉在放血工序点的细菌总数仅为 $3.05 \lg(\text{CFU}/\text{g})$,在去头蹄工序肉中菌落数较高达到 $4.18 \lg(\text{CFU}/\text{g})$ 。在随后工序中菌落数逐渐降低,在排酸工艺点达到最低,但在分割工序中牛肉污染较严重菌落总数达到 $4.8 \lg(\text{CFU}/\text{g})$ 。说明在去头蹄、分割工序肉中微生物数量相对较高,排酸间因严格控制温度和湿度而且对进出人员有较高要求,严格的条件下使大多数微生物的生长繁殖受到抑制。



FX.放血;QTT.去头蹄;BP.剥皮;BHQ.去红白腔;PB.劈半;XZ.修整;PS.排酸;FGPS.分割肉

图4 屠宰过程中各工序牛肉菌落计数

Fig. 4 Counts of total bacteria of beef in the process of slaughter

2.2 PCR-DGGE 图谱结果及分析

从不同工序点取样进行 PCR-DGGE 结果如图5所示,对 DGGE 图谱上的条带割胶、扩增、测序,登录 NCBI 进行相似性比对,结果如表1所示。共回收得到 35 个条带有 26 种菌,由表1可知未知序列与已知序列相似性较高,结果可用。

图5(c)(泳道 b~h)表明,对比不同车间空气取样点的 PCR-DGGE 条带,葡萄球菌、约氏不动杆菌、气单胞菌存在于屠宰间和分割间空气,且屠宰间空气中还存在巨型解酪球菌,排酸间空气只出现气单胞菌且条带较弱。说明屠宰间、排酸间、分割间的空气菌相存在差异,且排酸间空气质量相对较好。

由图5(c)(泳道 i~j)可知,动物毛皮主要存在巨型解酪球菌、约氏不动杆菌、葡萄球菌、盐水球菌四种菌,冲淋水中出现约氏不动杆菌但条带较弱。

由图5(c)(泳道 k~r)可见,不同屠宰工序中牛肉主要含有约氏不动杆菌、葡萄球菌,在去头蹄、剥皮、去红白腔、修整、分割工序的牛肉中出现巨型解酪球菌,劈半工序和排酸肉只存在葡萄球菌条带非常弱,分割肉中未发现约氏不动杆菌。

图5(c)中字母标记的条带未回收成功,但可以看出排酸肉经过分割工序后条带较多,未知条带对应的微生物可能来自分割间空气、分割工序中工人所戴手套、刀、案板、传送带、镊子,也可能来自前期工序污染。

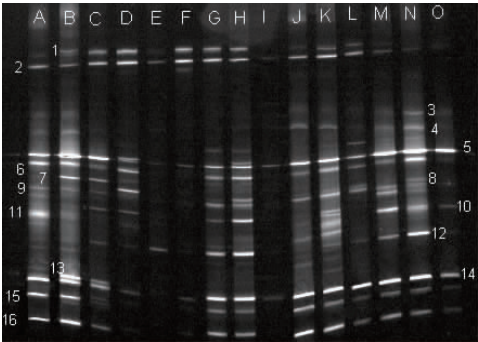
由图5(b)结果可知,放血后刀出现大肠杆菌、成团泛菌、肠模明串珠菌、肠杆菌菌属这与放血点工人手操作前后菌种组成具有较高相似性,克吕沃尔菌属、克雷伯氏菌属主要存在于工人手,工人手携带的 *Lelliottia amnigena* 菌在放血后消失却出现肠模明串珠菌,说明在此工序中工人手和所用刀存在交叉污染。去头蹄刀在去头蹄后减少了成团泛菌、克吕沃尔菌、克雷伯氏菌3种菌,可能转移到了牛肉和工人手上。气单胞存在于放血与去头蹄的刀及工人手上。剥皮所用的刀在剥皮后菌相差异极显著,肉体的内表面是无菌的,由于剥皮使牛内表面暴露,而此过程刀与内表面接触面积比较大,故刀上的菌转移到了牛肉上;沙门氏菌、成团泛菌存在于剥皮工序工人手,剥皮后工人手上的柠檬酸杆菌、克吕沃尔菌、克雷伯氏菌、气单胞菌消失但却出现了莫拉氏菌,此工序工人手会与牛内表、牛皮接

触,工人手即是污染源也是牛皮与牛肉表相互污染的传播介质。

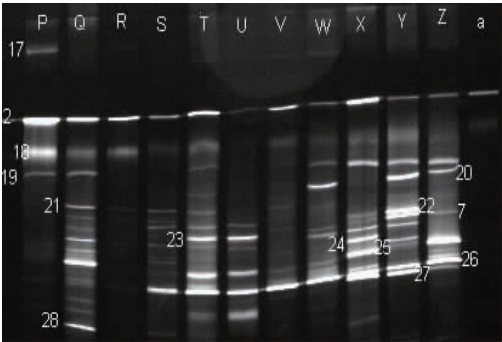
图 5(d)表明,出红白腔工艺点刀在出红白腔后出现肉杆菌,劈半刀在劈半后出现水栖菌属、*Jeotgalicoccus* sp.、恶臭假单胞、西宫皮肤球菌等,嗜冷菌存在于劈半与修整工序工具。出红白腔工序中刀和工人手微生物种类相对较少,由于该工序只有一人操作,因此人与人之间的交叉污染相对较少。劈半工序中工作人员不直接接触刀和牛肉,污染可能来源于牛肉和空气,整个过程会有流动水对刀清洗,也间接清洗了牛胴体。从修整工序可知修整工

序所用手钩在操作后种类增加明显,该工序要求工人用刀以手钩进行辅助对肉进行修整,虽然手钩与肉接触面积较小但其污染不容忽视。

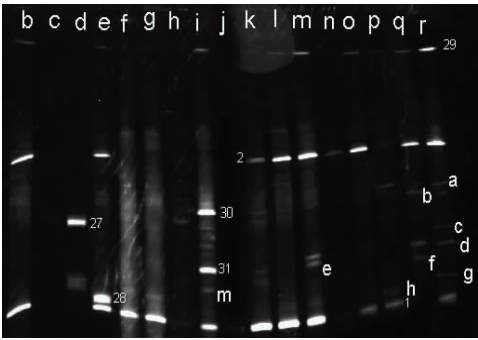
图 5(a)表明分割工序中约氏不动杆菌、水栖菌属、乳酸菌、恶臭假单胞、西宫皮肤球菌、成团泛菌、芽孢杆菌、巨型解酪球菌存在整个流程所涉及的工具及手套中,其中砷球菌、放线菌、肉杆菌在干净的案板上未发现,随着分割进行出现于案板上及工人手套上,大肠杆菌、溶血不动杆菌仅存在于传送带使用前期,盐水球菌仅存在于传送带使用后期。



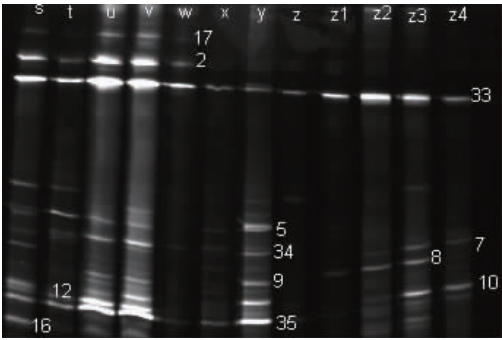
(a) A. 传送带2 h; B. 传送带1 h; C. 传送带0 h; D. 分割刀2 h; E. 分割刀1 h; F. 分割刀0 h; G. 分割镊子2 h; H. 分割镊子1 h; I. 分割镊子0 h; J. 分割手套2 h; K. 分割手套1 h; L. 分割手套0 h; M. 分割案板2 h; N. 分割案板1 h; O. 分割案板0 h



(b) P. 剥皮后手; Q. 剥皮前手; R. 剥皮后刀; S. 剥皮前刀; T. 去头蹄后手套; U. 去头蹄前手套; V. 去头蹄后刀; W. 去头蹄前刀; X. 放血后手; Y. 放血前手; Z. 放血后刀; a. 放血前刀



(c) b. 屠宰前空气; c. 屠宰中空气; d. 屠宰后空气; e. 分割空气0 h; f. 分割空气1 h; g. 分割空气2 h; h. 排酸间空气; i. 毛皮; j. 冲淋水; k. 放血肉样; l. 去头蹄肉样; m. 剥皮肉样; n. 劈半肉样; o. 红白腔肉样; p. 排酸肉肉样; q. 修整肉样; r. 分割排酸肉



(d) s. 修整后手钩; t. 修整前手钩; u. 修整后手; v. 修整前手; w. 修整后刀; x. 修整前刀; y. 劈半后刀; z. 劈半前刀; z1. 去红白腔后手; z2. 去红白腔前手; z3. 去红白腔刀后; z4. 去红白腔前刀

图 5 取样点 A ~ Z, a ~ z, z1 ~ z4 的 PCR-DGGE 图谱

Fig. 5 PCR-DGGE analysis of collected samples from sites A ~ Z, a ~ z, z1 ~ z4

表 1 DGGE 条带分离的主要细菌 16S rRNA 基因序列相似性比较

Table 1 Comparison of 16S rRNA gene sequences of major microbe in DGGE bands

条带编号	相似已知菌	相似性%	登录号
1,32	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99	KT886873
2,31	<i>Staphylococcus</i> sp.	100	KT886874
3,33	<i>Arsenicicoccus bolidensis</i>	98	KT886875
4	<i>Actinomycetales</i>	92	KT886876

续表 1

条带编号	相似已知菌	相似性/%	登录号
5	<i>Enhydrobacter</i> sp.	99	KT886877
6	<i>Lactococcus</i> sp.	99	KT886878
7	<i>Escherichia coli</i>	99	KT886879
8	<i>Carnobacterium</i> sp.	99	KT886880
9	<i>Pseudomonas putida</i>	99	KT886881
10,14	<i>Dermacoccus</i> sp.	99	KT886882
11,30	<i>Salinicoccus</i> sp.	99	KT886883
12,19,20	<i>Pantoea agglomerans</i>	100	KT886884
13	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	99	KT886885
15	<i>Bacillus</i> sp.	99	KT886887
16,29	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	99	KT886888
17	<i>Moraxella</i> sp.	99	KT886889
18	<i>Salmonella</i> sp.	98	KT886890
21	<i>Citrobacter</i> sp.	98	KT886891
22	<i>Lelliottia amnigena</i>	99	KT886892
23	<i>Kluyvera</i> sp.	99	KT886893
24	<i>Klebsiella</i> sp.	99	KT886894
25	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99	KT886895
26	<i>Enterobacter</i> sp.	99	KT886896
27,28	<i>Aeromonas</i> sp.	100	KT886897
34	<i>Jeotgaliococcus</i> sp.	99	KT886899
35	<i>Psychrobacter</i> sp.	99	KT886900

3 讨 论

作者直接提取样本中的 DNA, 利用 PCR-DGGE 技术来研究肉牛屠宰过程中的微生物污染。该技术在分析微生物菌群结构方面具有快速、准确等优势^[14-15]。通过该技术的应用, 分析屠宰工序点的菌群变化, 指示出不同工序点的菌种引入及消减, 对后期减菌技术的研究具有重要意义。

实验对肉屠宰过程中的微生物污染来源及污染工序进行了全面研究, 肉牛屠宰工序中的污染主要发生在去头蹄和分割工序, 主要污染源为与操作相关的刀、工人手、传送带、案板、镊子、工人所戴手套等, 这与张佳^[16]等研究表明初始剥皮操作和去脏操作是肉牛屠宰工序中造成胴体微生物污染的 2 个关键工序结果不同, 这可能是由于采样地点不同, 不同屠宰场操作不同等原因。屠宰工序的污染是影响原料肉品质的关键因素, 原料肉微生物污染控制作为 HACCP 体系的重要部分, 是公共卫生安全和肉品质量的重要保证用传统微生物培养方法

来研究肉牛屠宰工序微生物污染已有报道^[16-17]。

葡萄球菌存在于所有取样点, 大肠杆菌为屠宰工序工具及工人手上最常见的菌。牛毛皮中含有大量污染物会影响食品的健康生产, 研究证明牛皮中携带的约氏不动杆菌、葡萄球菌存在于整个屠宰过程。

劈半工序的和排酸工序对前后工序微生物数量和种类有很大影响, 因劈半工序整个过程会有流动水对刀进行清洗同时也对牛肉进行了一定程度的净化, 排酸工序因严格控制了温度及湿度抑制了大多数微生物生长。

本试验中某些菌种在不同工序点有阶段性出现或增多, 其中分割工序中的约氏不动杆菌、乳酸菌、砷球菌、放线菌、盐水球菌、西宫皮肤球菌、芽孢杆菌、溶血不动杆菌在其他车间和工序中未检出, 莫拉氏菌、沙门氏菌、成团泛菌、柠檬酸杆菌、*Lelliottia amnigena*、克吕沃尔菌、克雷伯氏菌、肠膜明串珠菌、*Enterobacter* sp. 主要存在于去头蹄工序和放血所用工具上在其他车间及工序中未检出。

4 结 语

1)屠宰间前、中、后空气菌落数在 1.43~1.59 lg(CFU/cm²)之间,主要存在葡萄球菌、约氏不动杆菌、气单胞。排酸间空气菌落为 1.19 lg(CFU/cm²),主要存在气单胞且 DGGE 条带较弱。约氏不动杆菌存在于分割间空气且分割间空气菌落数处于 0.9~1.13 lg(CFU/cm²)左右。说明空气中存在的悬浮微生物会对原料牛肉造成一定污染。

2)劈半工序减少了牛肉中的约氏不动杆菌、巨型解酪球菌等,排酸工序肉中的菌落总数仅为 3.03

lg(CFU/g)在所有工序的肉中最低且排酸过程葡萄球菌、巨型解酪球菌生长受到抑制。劈半工序中冲洗刀的流动水间接净化了牛胴体减少了微生物,排酸工序严格控制温度湿度以及严格控制进出工作人员的卫生,减少和抑制了微生物繁殖。

3)出厂前牛肉菌落总数高达 4.8 lg(CFU/g) 主要携带约氏不动杆菌、巨型解酪球菌、葡萄球菌以及未回收成功条带所对应的菌,这些污染菌主要来源于牛毛皮以及去头蹄、分割工序中工人手或手套、工具、传送带。

参考文献:

- [1] National advisory committee on microbiological criteria for foods. Ceneric HACCP for raw beef[Z]. Food microbial, 1993.
- [2] PIPEK P, HOU K, JELENI K J, et al. Microbial decontamination of beef carcasses by combination of steaming and lactic acid spray[J]. **Food Eng**, 2005, 67(3): 309-315.
- [3] AYRES J C. Microbiological implications in the handling slaughtering and dressing of meat animals [J]. **Advances in Food Research**, 1982, 6: 109-161.
- [4] DICKSON J S, ANDERSON M E. Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: a review[J]. **Food Protection**, 1992, 55: 133-140.
- [5] HANSSON I C, HAMILTON T E, FOSLUND K. Carcass quality in certified organic production compared with conventional livestock production[J]. **Vet Med**, 2000, 47: 111-120.
- [6] Norwegian Scientific Committee for Food Safety (NSCFS). A risk assessment of shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) in the Norwegian meat chain with emphasis on dry-cured sausages[S]. Panel on Biological Hazards, 2007.
- [7] EFSA. Scientific opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat(poultry)[Z]. EFSA Journal, 2012b.
- [8] WANG Huawei, LIU Fang, WANG Daoying, et al. Microflora changes of chilled duck at processing plants [J]. **Journal of Nanjing Agricultural University**, 2013, 36(1): 131-136. (in Chinese)
- [9] 于小乔. 屠宰和分割工序对真空包装冷却牛肉贮藏过程微生物多样性的影响[D]. 济南: 山东农业大学, 2012.
- [10] GB 4789.2—2010, 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
- [11] VITOR R, COSTA A M, FREITAS C S A A, et al. Comparison of DGGE and immuno histochemistry in the detection of TP53 variants in a Brazilian sample of sporadic breast tumors[J]. **Mol Biol Rep**, 2011, 38: 3351-3354.
- [12] Shanquan Wang, Jianzhong He. Two-step denaturing gradient gel electrophoresis (2S-DGGE), a gel-based strategy to capture full-length 16S rRNA gene sequences[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2012, 95: 1305-1312.
- [13] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHAFER A A, et al. Gapped blast and psiblast: a new generation of protein database search programs[J]. **Nucleic Acids Research**, 1997, 25: 3389-3402.
- [14] MUYZER G, WAAL E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex and microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. **Applied of Environment Microbiology**, 1993, 59: 695-700.
- [15] WU Junrui, YUE Xiqing, SHI Pu, et al. Diversity of lactic acid bacteria involved in Suan-Cai using PCR-DGGE [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(2): 127-130. (in Chinese)
- [16] ZHANG Jia, XU Yan, HUO Xiaowei, et al. Analysis of microbial contamination in beef cattle slaughter process and research on the technology of spraying[J]. **Meat Research**, 2011, 37(10): 209-213. (in Chinese)
- [17] ZWEIFEL C, FISCHER R, STEPHAN R. Microbiological contamination of pig and cattle carcasses in different small-scale swiss abattoirs[J]. **Meat Science**, 2008, 78: 225-231.