

动物性食品卫生学

实习指导

中国人民解放军兽医大学

1991.8

目 录

实 验 一	菌落总数测定	(1)
实 验 二	大肠菌群最近似数 (M P N) 的测定	(6)
实 验 三	沙门氏菌检验	(13)
实 验 四	肉类联合加工企业的教学参观与屠畜的宰前检验	(37)
实 验 五	猪的宰后检验技术	(40)
实 验 六	牛的宰后检验技术	(55)
实 验 七	污水中溶解氧、生化需氧量、化学需氧量的测定	(65)
实 验 八	囊尾蚴生活力的测定	(71)
实 验 九	食肉旋毛虫检验	(75)
实 验 十	宰禽场实习	(80)
实 验 十一	宰兔场实习	(84)
实 验 十二	肉新鲜度的综合检验	(87)
实 验 十三	肉与肉制品中挥发性盐基氮的测定	(98)
实 验 十四	肉类罐头的常规检验	(101)
实 验 十五	肉与肉制品中氯化物含量的测定	(110)
实 验 十六	肉制品中亚硝酸盐的测定	(112)
实 验 十七	食用动物性油脂的卫生检验	(114)
实 验 十八	禽蛋和鱼的兽医卫生检验	(123)
实 验 十九	鱼类组胺的测定	(135)
实 验 二十	牛乳检验方法	(137)
实 验 二十一	病畜肉的生化学检验	(143)
实 验 二十二	生肉种类鉴别	(148)

实验一 菌落总数测定

菌落总数是指食品检样经过处理，在一定条件下培养后，所得 1g 或 1 ml 检样中含细菌菌落的总数。

菌落总数主要作为判定食品被污染程度的标志，也可以应用这一方法观察细菌在食品中繁殖的动态，以便对被检样品进行卫生学评价时提供依据。

每种细菌都有它一定的生理特性。培养时应用不同的营养条件及其他生理条件（如温度、培养时间、pH、需氧性质等）去满足其要求，才能分别将各种细菌都培养出来。但在实际工作中，一般都只用一种常用的方法去作细菌菌落总数的测定，所得结果，只包括一群能在营养琼脂上发育的嗜中温性需氧菌的菌落总数。

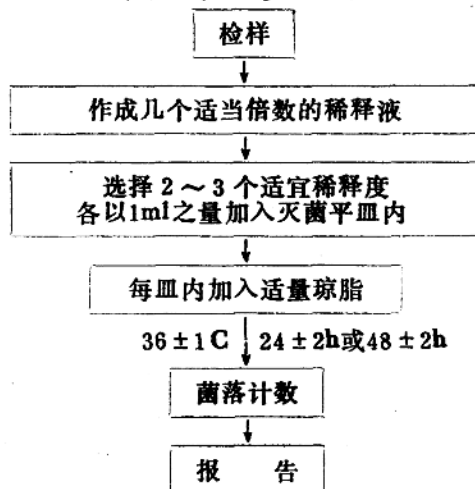
实 验 目 的

- 一、掌握动物性食品的菌落总数测定方法、菌落计数和报告方式。
- 二、了解各种动物性食品的菌落总数标准。

实 验 内 容

- 一、检样的采取及处理。
- 二、菌落总数测定的操作方法。
- 三、菌落计数和报告方式。

实 验 步 骤



一、检样稀释及培养

1. 以无菌操作, 将检样 25g (或 25ml) 剪碎放于含有 225ml 灭菌生理盐水或其他稀释液的灭菌玻璃瓶内 (瓶内预置适当数量的玻璃珠) 或灭菌乳钵内, 经充分振摇或研磨作成 1:10 的均匀稀释液。

固体检样在加入稀释液后, 最好置灭菌均质器中以 $8000 \sim 10000 \text{ r/min}$ 的速度处理 1 min, 作成 1:10 的均匀稀释液。

2. 用 1 ml 灭菌吸管吸取 1:10 稀释液 1 ml, 沿管壁徐徐注入含有 9 ml 灭菌生理盐水或其他稀释液的试管内 (注意吸管尖端不要触及管内稀释液), 振摇试管混合均匀, 作成 1:100 的稀释液。

3. 另取 1 ml 灭菌吸管, 按上项操作顺序, 作 10 倍递增稀释液, 如此每递增一次, 即换用 1 支 1 ml 灭菌吸管。

4. 根据食品卫生标准要求或对标本污染情况的估计, 选择 2~3 个适宜稀释度, 分别在作 10 倍递增稀释的同时, 即以吸取该稀释度的吸管 1 ml 移稀释液于灭菌平皿内, 每个稀释度作两个平皿。

5. 稀释液移入平皿后, 应及时将凉至 46°C 营养琼脂培养基 (可放置水 $46 \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴保温) 注入平皿约 15ml, 并转动平皿使混合均匀。同时将营养琼脂培养基倾入加有 1 ml 稀释液 (不含样品) 的灭菌平皿内作空白对照。

6. 待琼脂凝固后, 翻转平板, 置 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 温箱内培养 $24 \pm 2 \text{ h}$ (肉、水产、乳和蛋品为 $48 \pm 2 \text{ h}$) 取出, 计算平板内菌落数目, 乘以稀释倍数, 即得每克 (或毫升) 样品所含菌落总数。

二、菌落计数方法

作平板菌落计数时, 可用肉眼观察, 必要时用放大镜检查, 以防遗漏。在记下各平板的菌落数后, 求出同稀释度的各平板平均菌落数。

三、菌落计数的报告

1. 平板菌落数的选择

选取菌落数在 30~300 之间的平板作为菌落总数测定标准。一个稀释度使用两个平板, 应采用两个平板平均数, 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 2 以代表全皿菌落数。

2. 稀释度的选择

(1) 应选择平均菌落数在 30~300 之间的稀释度, 乘以稀释倍数报告之 (见表例 1)。

(2) 若有两个稀释度, 其生长的菌落数均在 30~300 之间, 则视二者之比如何来决定, 若其比值小于 2, 应报告其平均数; 若大于 2 则报告其中较小的数字 (见表例 2 及 3)。

(3) 若所有稀释度的平均菌落数均大于 300, 则应按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数报告之 (见表例 4)。

(4) 若所有稀释度的平均菌落数均小于 30, 则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数报告之 (见表例 5)。

(5) 若所有稀释度均无菌落生长, 则以小于 ($<$) 1 乘以最低稀释倍数报告之 (见表例 6)。

(6) 若所有稀释度的平均菌落数均不在 30~300 之间, 其中一部分大于 300 或小于 30 时, 则以最接近 30 或 300 的平均菌落数乘以稀释倍数报告之 (见表例 7)。

3. 菌落数的报告

菌落数在 100 以内时, 按其实有数报告; 大于 100 时, 采用二位有效数字, 在二位有效数字后面的数值, 以四舍五入方法计算。为了缩短数字后面的零数, 也可用 10 的指数来表示 (见表“报告方式”栏)。

稀释度选择及菌落数报告方式

例次	稀 释 液 及 菌 落 数			两稀释液之比	菌落总数 (个/g或个/ml)	报 告 方 式 (个/g或个/ml)
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}			
1	多不可计	164	20	—	16400	16000或 1.6×10^4
2	多不可计	295	46	1.6	37750	38000或 3.8×10^4
3	多不可计	271	60	2.2	27100	27000或 2.7×10^4
4	多不可计	多不可计	313	—	313000	310000或 3.1×10^5
5	27	11	5	—	270	270或 2.7×10^2
6	0	0	0	—	$<1 \times 10$	<10
7	多不可计	305	12	—	30500	31000或 3.1×10^4

附: 各类动物性食品菌落总数的卫生标准 (个/g)

(一) 肉蛋制品

食 品 类 别	国 家 标 准 号	指 标	
		出 厂	销 售
灌 肠 类	GB2725—81	$\leq 30,000$	$\leq 50,000$
酱卤肉类	GB2726—81	$\leq 30,000$	$\leq 80,000$
烧烤肉类	GB2727—81	$\leq 35,000$	$\leq 50,000$
肴 肉	GB2728—81	$\leq 30,000$	$\leq 50,000$
肉 松	GB2729—81	$\leq 30,000$	
冰鸡全蛋	GB2749—81	$\leq 10^6$	
冰鸡蛋黄	GB2751—81	$\leq 10^6$	
鸡全蛋粉	GB2754—81	$\leq 50,000$	
鸡蛋黄粉	GB2755—81	$\leq 50,000$	

(二) 水产品

食品类别	国家标准号	指标	
		一级鲜度	二级鲜度
黄花鱼	GB2733—81	$\leq 10,000$	$\leq 10^5$
带鱼	GB2734—81	$\leq 10,000$	$\leq 10^5$
青、草、鲢、鲤鱼	GB2736—81	$\leq 10,000$	$\leq 10^5$
鳊鱼	GB2739—81	$\leq 1,000$	$\leq 10,000$
河虾	GB2740—81	$\leq 5 \times 10^4$	$\leq 10^7$
对虾	GB2741—81	$\leq 10^5$	$\leq 5 \times 10^5$
牡蛎(海蛎子)	GB2742—81		$\leq 10^7$
梭子蟹	GB2743—81		$\leq 10^5$
花蛤	GB2744—81		$\leq 10^7$

(三) 乳与乳制品

食品类别	国家标准号	指标		
		特级	一级	二级
新鲜生牛乳				
供加工乳制品	GBn33—77		$\leq 5 \times 10^5$	
供消毒牛乳及加工淡炼乳用			≤ 10	
消毒牛乳	GB5408—85		≤ 30000	
全脂乳粉	GB5410—85	≤ 20000	≤ 30000	≤ 50000
脱脂乳粉	GB5411—85	≤ 20000	≤ 30000	≤ 50000
全脂加糖乳粉	GB5412—85	≤ 20000	≤ 30000	≤ 50000
稀奶油	GB5414—85	≤ 30000	≤ 50000	≤ 100000
奶油	GB5415—85	≤ 20000	≤ 30000	≤ 50000
全脂加糖炼乳	GB5417—85	≤ 15000	≤ 30000	≤ 50000

器材与试剂

一、器材

1. 温箱: $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 。
2. 冰箱: $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 。
3. 恒温水浴: $46 \pm 1^\circ\text{C}$ 。
4. 天平。
5. 电炉: 可调式。

6. 吸管：容量为1ml和10ml，标有0.1ml单位的刻度。
7. 广口瓶或三角烧瓶：容量为500ml。
8. 玻璃珠：直径为5 mm。
9. 平皿：皿底直径为9 cm。
10. 试管：18×200 mm。
11. 酒精灯。
12. 均质器或乳钵。
13. 试管架。
14. 灭菌刀或剪刀。
15. 灭菌镊子。
16. 酒精棉球。
17. 登记簿。
18. 玻璃蜡笔。

二、培养基和试剂

1. 营养琼脂培养基：

(1) 成分：

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	15~20 g
蒸馏水	1000ml

(2) 制法：将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内，加入15%氢氧化钠溶液约2 ml，校正pH至7.2~7.4。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化。分装烧瓶，121℃高压灭菌15min。

2. 75%乙醇。

3. 生理盐水或其他稀释液：定量分装于玻璃瓶和试管内，灭菌。

注：此培养基可供一般细菌培养之用，可倾注平板或制成斜面。如用于菌落计数，琼脂量为1.5%；如作成平板或斜面，则应为2%。

李爱民

实验二 大肠菌群最近似数 (MPN) 的测定

大肠菌群系指一群在37℃24小时能发酵乳糖、产酸产气、需氧和兼性厌氧性革兰氏阴性、无芽胞杆菌。它包括肠杆菌中的4个菌属，即艾希氏菌属，枸橼酸杆菌属，克雷伯氏菌属和肠杆菌属。这一菌群主要来源于人畜粪便，故以此做为粪便污染指标，来评价食品的卫生质量具有广泛的卫生意义。

大肠菌群最近似数 (MPN) 是指在100克 (或毫升) 食品中大肠菌群最可能的数字。检查大肠菌群数一方面表明样品中有无粪便污染，另一方面还可以根据数量多少，判定食品被污染的程度。

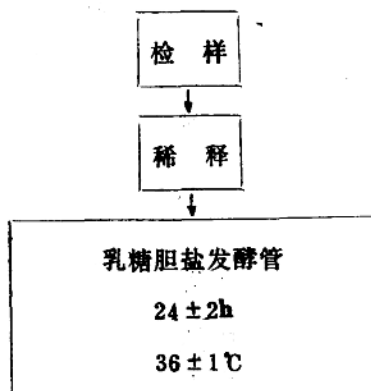
实 验 目 的

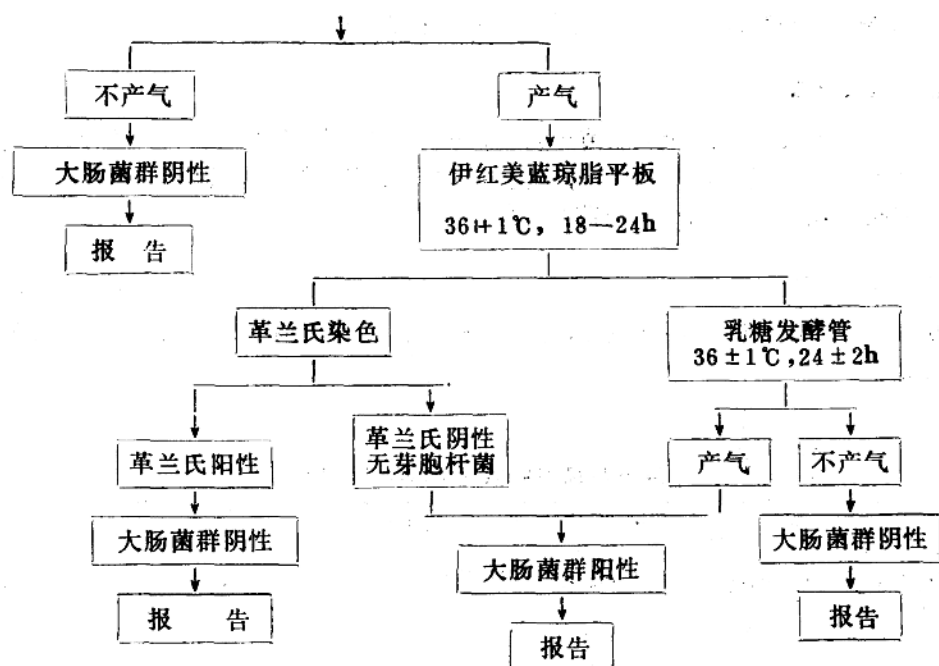
- 一、掌握动物性食品的大肠菌群最近似数测定的方法。
- 二、了解各类动物性食品大肠菌群数的国家标准。

实 验 内 容

- 一、大肠菌群测定的操作方法。
- 二、大肠菌群测定结果的报告。

实 验 步 骤





一、检样稀释

1. 以无菌操作将检样25ml (或25g) 放于含有 225ml 灭菌生理盐水或其他稀释液的灭菌玻璃瓶内 (瓶内预置适当数量的玻璃珠) 或灭菌乳钵内, 经充分振摇或研磨作成 1:10 的均匀稀释液。固体检样最好用均质器, 以 8000~10000r/min 的速度处理 1min 作成 1:10 的均匀稀释液。

2. 用 1ml 灭菌吸管吸取 1:10 稀释液 1ml, 注入含有 9ml 灭菌生理盐水或其他稀释液的试管内, 振摇试管混匀, 作成 1:100 的稀释液。

3. 另取 1ml 灭菌吸管, 按上项操作依次作 10 倍递增稀释液, 每递增稀释一次, 换 1 支 1ml 灭菌吸管。

4. 根据食品卫生标准要求或对检样污染情况的估计, 选择三个稀释度, 每个稀释度接种 3 管。

二、乳糖发酵试验

将待检样品接种于乳糖胆盐发酵管内, 接种量在 1ml 以上者, 用双料乳糖胆盐发酵管, 1ml 及 1ml 以下者, 用单料乳糖胆盐发酵管。每一稀释度接种 3 管, 置 36±1℃ 温箱内, 培养 24±2h, 如所有乳糖胆盐发酵管都不产气, 则可报告为大肠菌阴性, 如有产气者, 则按下列程序进行。

三、分离培养

将产气的发酵管分别转种在伊红美蓝琼脂平板上, 置 36±1℃ 温箱内, 培养 18~

24h, 然后取出, 观察菌落形态, 并作革兰氏染色和证实试验。

四、证实试验

在上述平板上, 挑取可疑大肠菌群菌落 1~2 个进行革兰氏染色, 同时接种乳糖发酵管, 置 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 温箱内培养 $24 \pm 2\text{h}$, 观察产气情况。凡乳糖管产气、革兰氏染色为阴性的无芽胞杆菌, 即可报告为大肠菌群阳性。

五、报 告

根据证实为大肠菌群阳性的管数, 查 MPN 检索表, 报告每 100ml(g) 大肠菌群的最可能数。

大肠菌群最可能数 (MPN) 检索表

阳 性 管 数			MPN 100ml(g)	95%可信限	
1ml(g) × 3	0.1ml(g) × 3	0.01ml(g) × 3		下 限	上 限
0	0	0	<30	< 5	90
0	0	1	30		
0	0	2	60		
0	0	3	90		
0	1	0	30	< 5	130
0	1	1	60		
0	1	2	90		
0	1	3	120		
0	2	0	60		
0	2	1	90		
0	2	2	120		
0	2	3	160		
0	0	0	90		
0	1	1	130		
0	2	2	160		
0	3	3	190		
1	0	0	40	<5 10	200 210
1	0	1	70		
1	0	2	110		
1	0	3	150		

续表

阳 性 管 数			MPN 100ml(g)	95%可信限	
1 ml(g)×3	0.1ml(g)×3	0.01ml(g)×3		下 限	上 限
1	1	0	70	10	230
1	1	1	110	30	360
1	1	2	150		
1	1	3	190		
1	2	0	110	30	360
1	2	1	150		
1	2	2	200		
1	2	3	240		
1	3	0	160		
1	3	1	200		
1	3	2	240		
1	3	3	290		
2	0	0	90	10	360
2	0	1	140	30	370
2	0	2	200		
2	0	3	260		
2	1	0	150	30	440
2	1	1	200	70	890
2	1	2	270		
2	1	3	340		
2	2	0	210	40	470
2	2	1	280	100	1500
2	2	2	350		
2	2	3	420		
2	3	0	290		
2	3	1	360		
2	3	2	440		
2	3	3	530		
3	0	0	230	40	1200
3	0	1	390	70	1300
3	0	2	640	150	3800
3	0	3	950		

续表

阳 性 管 数			MPN 100ml(g)	95%可信限	
1 ml(g) × 3	0.1ml(g) × 3	0.01ml(g) × 3		下 限	上 限
3	1	0	430	70	2100
3	1	1	750	140	2300
3	1	2	1200	300	3800
3	1	3	1600		
3	2	0	930	150	3800
3	2	1	1500	300	4400
3	2	2	2100	350	4700
3	2	3	2900		
3	3	0	2400	360	13000
3	3	1	4600	710	24000
3	3	2	11000	1500	48000
3	3	3	>24000		

注：① 本表采用 3 个稀释度 [1ml(g)、0.1ml(g)和 0.01ml(g)]，每稀释度 3 管。

② 表内所列检样量如改用 10ml(g)、1ml(g)和 0.1ml(g)时，表内数字应相应降低 10 倍；如改用 0.1ml(g)、0.01ml(g)和 0.001ml(g)时，则表内数字应相应增加 10 倍。其余可类推。

附：各类动物性食品大肠菌群的卫生标准(个/100g)

食 品 类 别	国 家 标 准 号	指 示	
		出 厂	销 售
灌 肠 类	GB2725—81	≤40	≤150
酱 卤 肉 类	GB2726—81	≤70	≤150
烧 烤 肉 类	GB2727—81	≤40	≤100
肴 肉	GB2728—81	≤70	≤150
肉 松	GB2729—81	≤40	
酸 牛 乳	GB2746—81	≤90	
冰 鸡 全 蛋	GB2749—81	≤1.1 × 10 ⁷	
冰 鸡 蛋 黄	GB2751—81	≤1.1 × 10 ⁷	
鸡 全 蛋 粉	GB2754—81	≤110	
鸡 蛋 黄 粉	GB2755—81	≤40	

器材与试剂

一、器材

1. 温箱: $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 。
2. 水浴: $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。
3. 天平。
4. 显微镜。
5. 均质器或乳钵。
5. 温度计。
7. 平皿。
8. 试管。
9. 吸管。
10. 载玻片。

二、培养基及试剂:

1. 乳糖发酵管

(1) 成分:

蛋白胨	20 g
乳糖	10 g
0.04% 溴甲酚紫水溶液	25ml
蒸馏水	1000ml

pH7.4

(2) 制法: 将蛋白胨及乳糖溶于水中, 校正 pH, 加入指示剂, 按检验要求分装 30ml、10ml 或 3ml, 并放入一个小倒管, 115°C 高压灭菌 15min。

注: ①双料乳糖发酵管除蒸馏水外, 其他成分加倍。

②30ml 和 10ml 乳糖发酵管专供酱油及酱类检验用, 3ml 乳糖发酵管供大肠菌群证实试验用。

2. 乳糖胆盐发酵管

(1) 成分:

蛋白胨	20 g
猪胆盐 (或牛、羊胆盐)	5 g
乳糖	10 g
0.04% 溴甲酚紫水溶液	25ml
蒸馏水	1000ml

pH7.4

(2) 制法: 将蛋白胨、胆盐及乳糖溶于水中, 校正 pH, 加入指示剂, 分装每管 10ml, 并放入一个小倒管, 115°C 高压灭菌 15min。

注: 双料乳糖胆盐发酵管除蒸馏水外, 其他成分加倍。

3. 伊红美蓝琼脂 (EMB)

(1) 成分:

蛋白胨	10 g
乳糖	10 g
磷酸氢二钾	2 g
琼脂	17 g
2%伊红Y溶液	20ml
0.65%美蓝溶液	10ml
蒸馏水	1000ml

pH7.1

(2) 制法: 将蛋白胨、磷酸盐和琼脂溶解于蒸馏水中, 校正 pH, 分装于烧瓶内, 121℃高压灭菌 15min 备用。临用时加入乳糖并加热溶化琼脂, 冷至 50~55℃, 加入伊红和美蓝溶液, 摇匀, 倾注平板。

4. 蛋白胨水 (见沙门氏菌检验)。
5. 靛基质试剂 (见沙门氏菌检验)。
5. 革兰氏染色液 (见沙门氏菌检验)。

李爱民

实验三 沙 门 氏 菌 检 验

沙门氏菌病常在动物中广泛传播，人的沙门氏菌感染和带菌也非常普遍。由于动物的生前感染或食品受到污染，均可使人发生食物中毒。在世界各地的食物中毒中，沙门氏菌食物中毒常占首位或第二位。

食品中沙门氏菌的含量较少，且常由于食品加工过程使其受到损伤而处于濒死的状态。故为了分离食品中的沙门氏菌，必须将增菌方线作某些改进。同时，由于分类学的改变，过去所称“亚利桑那菌属”现已与沙门氏菌属合并，列为亚属Ⅱ，因此，分离与鉴定的方法作了相应的改变。

实 验 目 的

掌握沙门氏菌的检验程序和方法。

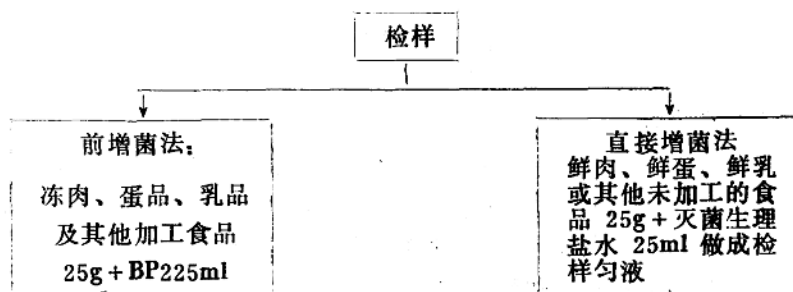
实 验 内 容

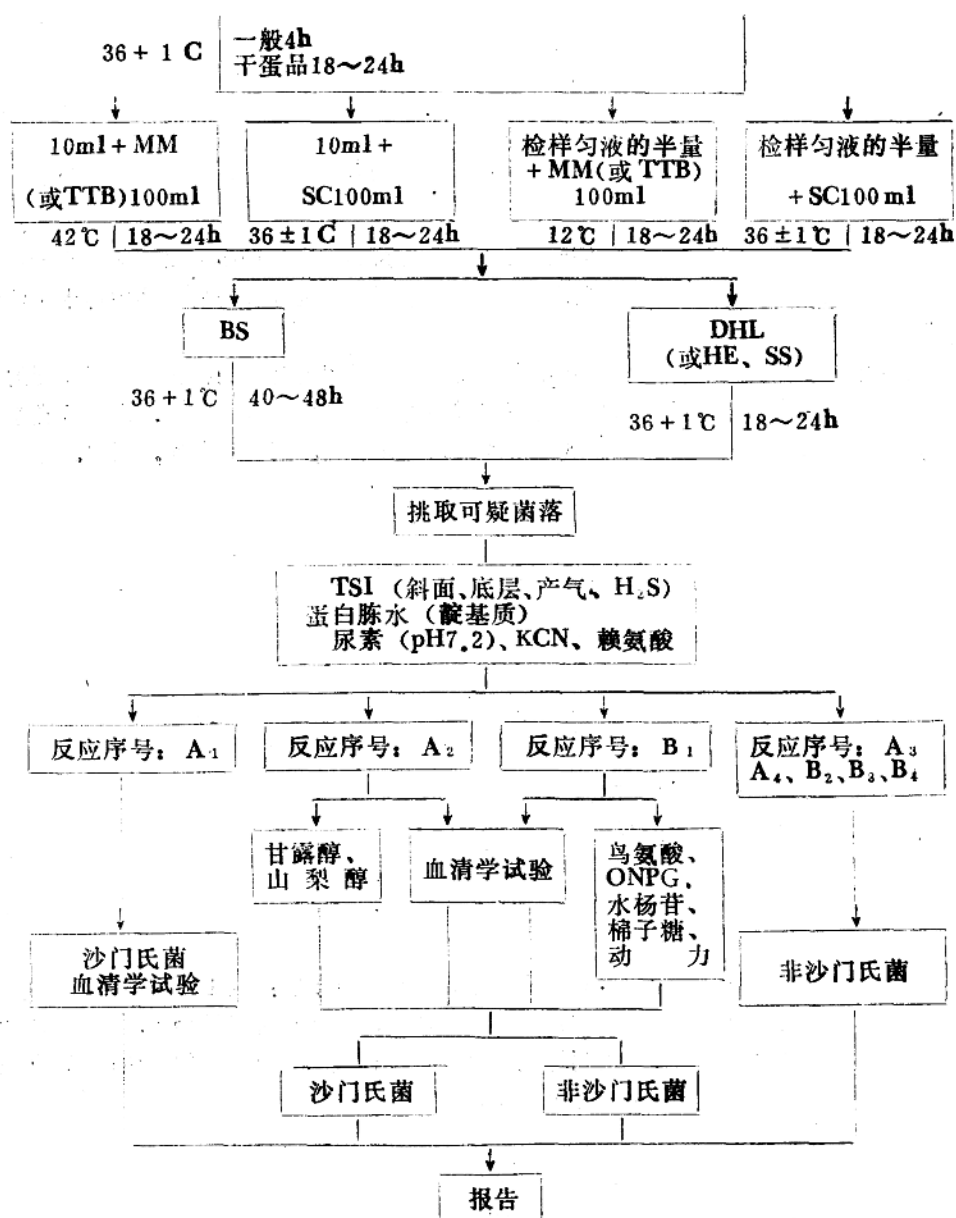
- 一、沙门氏菌检验的操作方法。
- 二、沙门氏菌检验结果的报告。

实 验 步 骤

目前用于食品中沙门氏菌的检验方法，包括五个基本步骤：（1）前增菌，用无选择性的培养基使处于濒死状态的沙门氏菌恢复其活力；（2）选择性增菌，使沙门氏菌得以增殖，而大多数的其他细菌受到抑制；（3）选择性平板分离沙门氏菌；（4）生化试验，鉴定到属；（5）血清学分型鉴定。

检验程序如下：





一、前增菌和增菌

冻肉、蛋品、乳品及其他加工食品均应经过前增菌。各称取检样 25 g，加在装有 225ml 缓冲蛋白胨水的 500ml 广口瓶内。固体食品可先应用均质器，以 8000~10000r/min 打碎 1min，或用乳钵加灭菌砂磨碎，粉状食品用灭菌匙或玻棒研磨使乳化。于 36 ± 1 °C 培养 4 h (干蛋品需培养 18~24h)，移取 10ml，转种于 100ml 氯化镁孔雀绿增菌液或

四硫磺酸钠煌绿增菌液内，于42℃培养18~24h。同时，另取10ml，加入于100ml亚硝酸盐脱氨酸增菌液内，于36±1℃培养18~24h。

鲜肉、鲜蛋、鲜乳或其他未经加工的食品不必经过前增菌。各取25g (25ml) 加入灭菌生理盐水25ml按前法做成检样匀液，取其半量接种于100ml氯化镁孔雀绿菌液或四硫磺酸钠煌绿增菌液内，于42℃培养24h；另半量接种于100ml亚硝酸盐脱氨酸增菌液内，于36±1℃培养18~24h。

二、分 离

取增菌液1环，划线接种于亚硫酸铋琼脂平板一个和DHL琼脂平板（或HE琼脂平板、或SS琼脂平板）一个。两种增菌液可同时划线接种在同一个平板上。于36±1℃分别培养18~24h（DHL、HE、SS）或40~48h（BS）。观察各个平板上生长的菌落，沙门氏菌属Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ、Ⅴ和亚属Ⅲ在各个平板上的菌落特征见表1。

表1 沙门氏菌属各亚属在各种选择性琼脂平板上的菌落特征

选择性琼脂平板	亚属Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ、Ⅴ	亚属Ⅲ（即亚利桑那菌）
亚硫酸铋琼脂	产硫化氢菌落为黑色有金属光泽、棕褐色或灰色，菌落周围培养基可呈黑色或棕色；有些菌株不产生硫化氢，形成灰绿色的菌落，周围培养基不变	黑色有金属光泽
DHL琼脂	无色半透明；产硫化氢菌落中心带黑色或几乎全黑色	乳糖迟缓阳性或阴性的菌株，与亚属Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ、Ⅴ相同；乳糖阳性的菌株为粉红色，中心带黑色
HE琼脂	蓝绿色或蓝色；多数菌株产硫化氢，菌落中心黑色或几乎全黑色	乳糖阳性的菌株为黄色，中心黑色或几乎全黑色；乳糖迟缓阳性或阴性的菌株为蓝绿色或蓝色，中心黑色或几乎全黑色
SS琼脂	无色半透明；产硫化氢菌株有的菌落中心带黑色，但不如以上培养基明显	乳糖迟缓阳性或阴性的菌株，与亚属Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ、Ⅴ相同；乳糖阳性的菌株为粉红色，中心黑色，但中心无黑色形成时与大肠艾希氏菌不能区别

三、生化试验

（一）挑取选择性琼脂平板上的可疑菌落，接种三糖铁琼脂。一般应多挑几个菌