

出口食品中产气荚膜梭状芽孢杆菌检验方法

Method for detection of clostridium perfringens in food for export

SN 0177—92
代替ZB X09 004—86

1 主题内容与适用范围

本标准规定了出口食品中产气荚膜梭状芽孢杆菌的检验方法。

本标准适用于出口食品的检验。

2 设备和材料

- 2.1 吸管1.0mL和10.0mL，分别具有0.1mL和1.0mL刻度。
- 2.2 菌落计数器。
- 2.3 均质器。
- 2.4 厌氧培养装置。
- 2.5 超低温冰箱。
- 2.6 恒温培养箱：36±1℃。
- 2.7 恒温水浴箱：46±1℃。
- 2.8 培养皿：90或100mm。
- 2.9 显微镜。

3培养基和试剂

- 3.1 胰—亚硫酸盐—环丝氨酸 (TSC)琼脂。
- 3.2 D—环丝氨酸溶液。
- 3.3 卵黄乳液。
- 3.4 缓冲动力—硝酸盐培养基。
- 3.5 乳糖—明胶培养基。
- 3.6 产芽孢肉汤。
- 3.7 多价蛋白胨—酵母膏 (PY)培养基。
- 3.8 硫乙醇酸盐液体培养基。
- 3.9 蛋白胨水。
- 3.10 亚硝酸盐试剂。
- 3.11 缓冲甘油—氯化钠溶液。

4 样品制备

- 4.1 样品的贮存和运送。

如不能立即进行检验时，应在样品中加等量缓冲甘油—氯化钠溶液 (液体食品应加双料的)。将样品作低温保存，直到检验。运送样品时，应使样品保持冷冻状态，并要避免容器破损。

- 4.2 制样

将样品解冻，取25g移入灭菌均质杯，加225mL蛋白胨水，以13 000r／min均质2min，如为液体样品，则取样25mL，加入盛有225mL稀释剂的500mL稀释瓶中，摇匀，吸取此1：10样品匀液10mL加于90mL蛋白胨水中，摇匀，制成1：100样品稀释液，必要时，按此法将样品作进一步的10倍递增稀释，如从10⁻³~10⁻⁶.....。

5 检验

- 5.1 平板计数法

倾注不含卵黄的TSC琼脂到10个灭菌平皿中，每皿约5mL，并迅速旋转平皿，使琼脂铺平。当琼脂凝固后，将每个平皿编号标记，以无菌操作，吸取稀释液样品1 mL分别加到每个琼脂平板表面中心。再向平皿中倾注不含卵黄的TSC琼脂15mL，缓慢地旋转平皿，使其与接种物混合均匀。

也可用灭菌L形玻璃棒，将0.1 mL样品稀释液均匀地涂布于含卵黄乳液的TSC琼脂上，将平板水平静置5~10min，使接种物被吸收。然后用不含卵黄的TSC琼脂10mL覆盖平板表层 (含卵黄的TSC琼脂最适于同时含有其他还原亚硫酸盐梭状芽孢杆菌的食品)。琼脂凝固后，将平板正置于厌氧罐内，于36±1℃培养。不含卵黄的TSC琼脂平板培养20h，含卵黄的TSC琼脂平板培养24h，取出平板，用肉眼观察生长情况和有无黑色菌落。挑选生长有20~200个黑色菌落的平板，用菌落计数器将黑色菌落计数并计算每克食品中产气荚膜梭状芽孢杆菌数。产气荚膜梭菌的菌落在含卵黄的培养基上呈黑色，并通常有2~4mm宽的白色沉淀环 (卵磷脂酶作用的结果)。但有少数菌株的卵磷脂酶反应较弱，或呈阴性。应对所有怀疑为产气荚膜梭菌的黑色菌落数进行计数，并按5.2条加以证实。

- 5.2 证实

从可计数的平板 (具20~200个菌落)中挑选10个典型菌落，分别接种到液体硫乙醇酸盐培养基试管中，36±1℃培养18~24h。取培养物涂片，作革兰氏染色，镜检，检查培养物的纯度和细菌形态。产气荚膜梭菌为革兰氏阳性，粗短的梭状芽孢杆菌。对于被污染的培养物可划线接种在含有卵黄的TSC琼脂平板上，于厌氧条件下36±1℃培养24h，以获得纯培养物。用3mm接种环，取液体硫乙醇酸盐纯培养物，或从TSC琼脂平板上分离到的单个菌落，穿刺接种缓冲动力—硝酸盐和乳糖—明胶培养基。以1mL液体硫乙醇酸盐培养物接种到产芽孢肉汤中，36±1℃培养24h。在透射光下检查缓冲动力—硝酸盐培养基试管中细菌沿穿刺线生长情况，有动力的菌株沿着穿刺线呈扩散生长。没有动力的菌株，仅沿着穿刺线生长。

加0.5 mL试剂甲和0.2 mL试剂乙于缓冲动力—硝酸盐培养基中以检查亚硝酸盐的存在。于15min内出现橙色者，表明有亚硝酸盐存在。如果不出现颜色变化，则加少许金属锌粉，放置10min。如果加锌粉后，不出现颜色变化，表明硝酸盐已完全还原成亚硝酸盐，亚硝酸盐又被分解成了氮和氢，如变为橙色，表明菌株不能还原硝酸盐。

检查乳糖—明胶培养基，如发现产气和培养基由红色变为黄色，表明乳糖发酵并产酸。将试管置5℃冷却1 h，检查明胶液化情况。如果培养基是固态，需36±1℃再培养24h，重复检查明胶是否液化。用产芽孢肉汤涂片作革兰氏染色，在显微镜下检查有无芽孢。如需对分离物作进一步检查，应将芽孢培养物于4℃存放。

无动力、革兰氏阳性，在TSC琼脂平板上产生黑色菌落，还原硝酸盐为亚硝酸盐，乳糖发酵产酸产气，在48h内液化明胶的杆菌，可初步认为是产气荚膜梭菌。可疑为产气荚膜梭菌而又符合上述特征的，必须做进一步证实试验。对不液化明胶或在其他方面不典型的分离物要接种液体硫乙醇酸盐培养基，36±1℃培养24h，进行涂片，作革兰氏染色，检查培养物的纯度，以0.1 mL液体硫乙醇酸盐培养物，接种到含1% 水杨甙和含1% 棉子糖的PY培养基各1管，观察产酸和产气，取1.0mL培养物放于试管中，加1~2滴0.04% 酚红溶液，检查是否产酸 (大多数产气荚膜梭菌，不发酵水杨甙，但同它密切相关的梭状芽孢菌，能迅速发酵水杨甙产酸产气)。再将此两种培养基培养48h，观察产酸情况。产气荚膜梭菌通常在含棉子糖的培养基中产酸，而同其密切相关的其他梭状芽孢菌却不能在含棉子糖的培养基中产酸。有少数产气荚膜梭菌菌株，在含水杨甙的PY培养基中产酸。

6结果解释及报告

样品中产气荚膜梭菌的计数，基于被证实为产气荚膜梭菌菌落的百分数 (例如，10⁻⁴稀释的平板中，平均有85个菌落，10个菌落中，有8个被证实为产气荚膜梭菌，那么每克食品中产气荚膜梭菌数，即为85× (8／10)×10 000：680 000)，报告产气荚膜梭状芽孢杆菌数／g (mL)。

注：用含卵黄的TSC平板计数时的稀释倍数比用不含卵黄的平板计数时的稀释倍数高10倍。

附 录 A

培养基和试剂的配制

(补充件)

A1 胰—亚硫酸盐—环丝氨酸 (TSC)琼脂

| | |
|--------------------------------|-------|
| 胰示 | 15.0g |
| 大豆胨 | 5.0g |
| 酵母膏 | 5.0g |
| 偏亚硫酸氢钠Csodlumbisulfite (meta)] | 1.0g |
| 柠檬酸铁铵 | 1.0g |
| 琼脂 | 20.0g |

加蒸馏水稀释到1 000mL，调至pH7.6±0.1，分装到500mL烧瓶中，每瓶250mL。121℃高压灭菌15min，倒平皿前，每250mL培养基 (50℃)中，加过滤除菌的0.5% D—环丝氨酸溶液20.0mL。

制作卵黄平板：加50% 卵黄乳液20mL到250mL含D—环丝氨酸培养基中，倾注到无菌平皿中，每皿约15mL。使用前应将平皿置室温使其干燥。

A2 D—环丝氨酸溶液

溶解1 gD—环丝氨酸于200 mL磷酸盐缓冲液 (c=0.05 mol／L) (pH8.0±0.1)中 (不加热)，经0.45 μm滤膜过滤除菌。

A3 卵黄乳液

用硬刷刷洗鲜蛋，沥干，放70% 乙醇中浸泡th。以无菌操作取出蛋黄，加等体积无菌0.85% 氯化钠溶液，混合置4℃贮存。

A4. 缓冲动力—硝酸盐培养基

| | |
|---|------|
| 牛肉膏 | 3.0g |
| 蛋白胨 | 5.0g |
| 硝酸钾 | 5.0g |
| 磷酸氢二钠 (Na ₂ HP0 ₄) | 2.5g |
| 半乳糖 | 5.0g |
| 甘油 | 5.0g |
| 琼脂 | 3.0g |

用蒸馏水溶解并稀释到1 000mL。调至pH7.3±0.1，分装试管，每管11 mL。121℃高压灭菌15 min。

A5 乳糖—明胶培养基

| | |
|---|--------|
| 胰示 | 15.0g |
| 酵母膏 | 10.0g |
| 乳糖 | 10.0g |
| 磷酸氢二钠 (Na ₂ HP0 ₄) | 5.0g |
| 酚 | 0.05g |
| 明胶 | 120.0g |

用蒸馏水溶解并稀释到1 000mL，调至pH7.5±0.1，加入乳糖和酚红。分装试管，每管10 mL。121℃高压灭菌15min。

A6 产芽孢肉汤

| | |
|---|-------|
| 多价胨 (polypeptone) | 15.0g |
| 酵母膏 | 3.0g |
| 可溶性淀粉 | 3.0g |
| 硫酸镁 | 0.1g |
| 硫乙醇酸钠 | 1.0g |
| 磷酸氢二钠 (Na ₂ HP0 ₄) | 11.0g |

用蒸馏水溶解并稀释到1 000mL，调至pH7.8±0.1，分装试管，每管15mL。121℃高压灭菌15min。

A7 多价蛋白胨—酵母膏 (PY)培养基

| | |
|-----|-------|
| 多价胨 | 20.0g |
| 酵母膏 | 5.0g |
| 氯化钠 | 5.0g |

用蒸馏水溶解并稀释到1 000mL，调至pH8.9±0.1，分装到带螺帽的试管内，每管9mL。121℃高压灭菌15min。

A8 硫乙醇酸盐液体培养基

| | |
|------------------------|-------|
| 胰酪胨 | 15.0g |
| L—胱氨酸 | 0.5g |
| 氯化钠 | 2.5g |
| 葡萄糖 | 5.0g |
| 酵母膏 | 5.0g |
| 硫乙醇酸钠 (或硫乙醇酸) | 0.5g |
| 刃天青钠溶液 (1：1000) (新鲜配制) | 1mL |
| 琼脂 | 0.75g |

将胱氨酸、氯化钠、葡萄糖、酵母膏和胰胨同1 000mL蒸馏水混合，并在阿诺氏消毒器或蒸气浴中加热，直至完全溶解，并加入硫乙醇酸钠或硫乙醇酸溶液，使溶解。如必要可用1 mol／L氢氧化钠调整pH，使消毒后的pH在7.1±0.2，加刃天青钠溶液，混合，将培养基分装到150mm×16mm螺旋盖试管内，每管10mL，121℃高压灭菌20min。

A9 蛋白胨水

在2 000mL蒸馏水中溶解蛋白胨2.0g，调至pH7.0±0.1。在200mL瓶中分装90mL，在500mL锥形瓶中分装225mL。121℃高压灭菌15min。

A10亚硝酸盐试剂

- a. 试剂甲

在1 000mL5mol／L乙酸中溶解对氨基苯磺酸8g；

- b. 试剂乙

在1 000mL5mol／L乙酸中溶解。一萘酚5g

A11 缓冲甘油—氯化钠溶液

在900mL蒸馏水中溶解氯化钠4.2g，加无水磷酸氢二钾12.4g，无水磷酸二氢钾4.0g和甘油100mL，混合，充分溶解。调至pH7.2。121℃高压灭菌15min。

配制双料缓冲甘油溶液 (20%)时，用甘油200mL和蒸馏水800mL。

附加说明：

本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出。

本标准由上海进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人吴仲梁。

本标准参考美国公职分析化学家协会 (AOAC)法定分析方法第14版，第46章，第46、092节 (1984年)。