



中华人民共和国国家标准

GB 4789.13—2012

食品安全国家标准

食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验

2012-05-17 发布

2012-07-17 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准代替 GB/T 4789.13—2003 《食品卫生微生物学检验 产气荚膜梭菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.13—2003 相比，主要变化如下：

- 修改了标准的中文名称；
- 修改了样品制备过程；
- 修改了培养基与试剂；
- 修改了操作步骤；
- 修改了菌数计算部分；
- 增加了附录 A。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验

1 范围

本标准规定了食品中产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）的检验方法。
本标准适用于食品中产气荚膜梭菌的检验。

2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- a) 恒温培养箱：36℃±1℃；
- b) 冰箱：2℃～5℃；
- c) 恒温水浴箱：50℃±1℃，46℃±0.5℃；
- d) 天平：感量0.1g；
- e) 均质器；
- f) 显微镜：10×～100×；
- g) 无菌吸管：1 mL（具0.01 mL刻度）、10 mL（具0.1 mL刻度）或微量移液器及吸头；
- h) 无菌试管：18mm×180mm；
- i) 无菌培养皿：直径90 mm；
- j) pH计或pH比色管或精密pH试纸；
- k) 厌氧培养装置。

3 培养基和试剂

- 3.1 胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸（TSC）琼脂：见附录A中A.1。
- 3.2 液体硫乙醇酸盐培养基（FTG）：见附录A中A.2。
- 3.3 缓冲动力-硝酸盐培养基：见附录A中A.3。
- 3.4 乳糖-明胶培养基：见附录A中A.4。
- 3.5 含铁牛乳培养基：见附录A中A.5。
- 3.6 0.1%蛋白胨水：见附录A中A.6。
- 3.7 革兰氏染色液：见附录A中A.7。
- 3.8 硝酸盐还原试剂：见附录A中A.8。
- 3.9 缓冲甘油-氯化钠溶液：见附录A中A.9。

4 检验程序

产气荚膜梭菌检验程序见图 1。

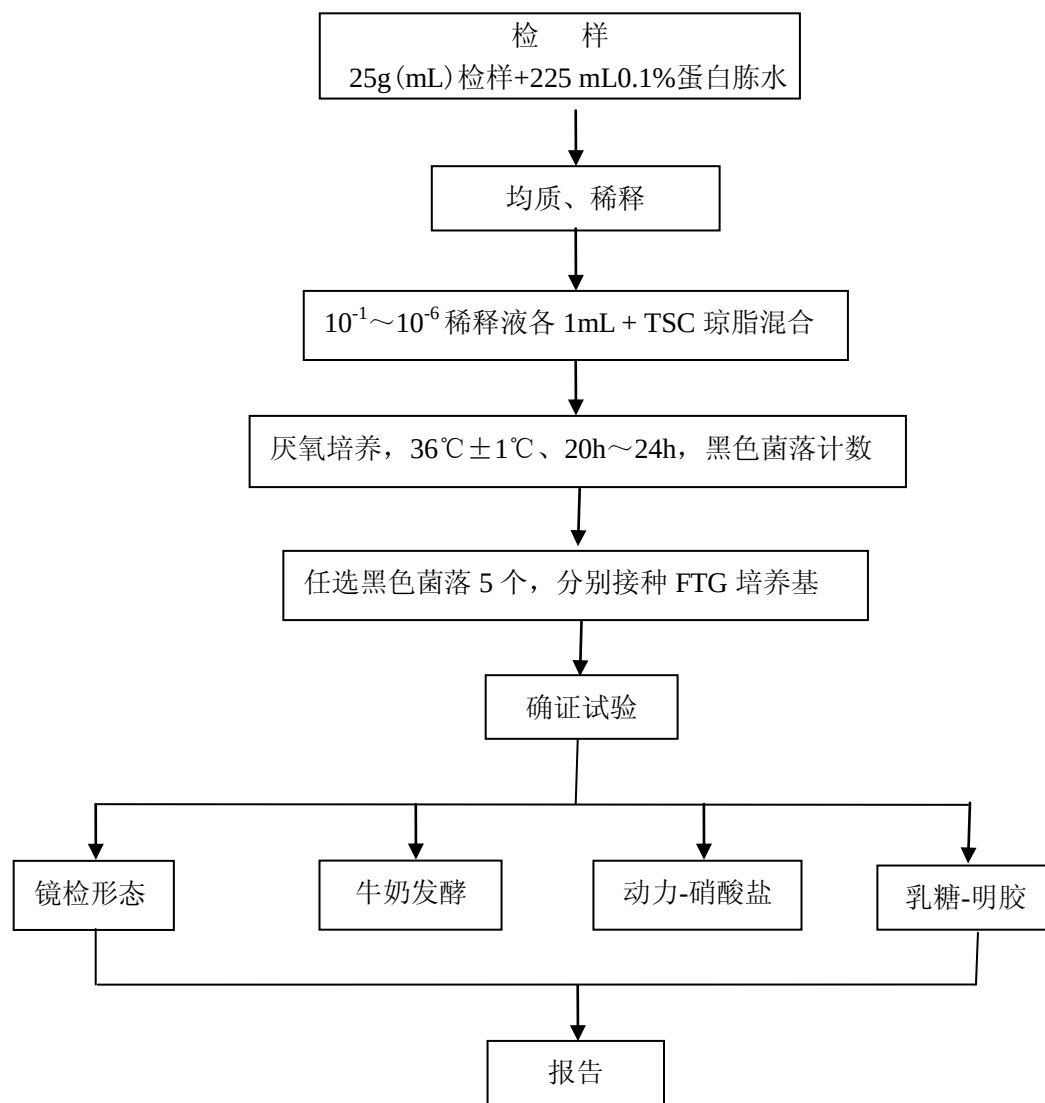


图 1 产气荚膜梭菌检验程序

5 操作步骤

5.1 样品制备

5.1.1 样品采集后应尽快检验，若不能及时检验，可在 2℃~5℃ 保存；如 8 h 内不能进行检验，应以无菌操作称取 25 g (mL) 样品加入等量缓冲甘油-氯化钠溶液（液体样品应加双料），并尽快至于 -60℃ 低温冰箱中冷冻保存或加干冰保存。

5.1.2 以无菌操作称取 25 g (mL) 样品放入含有 225 mL 0.1% 蛋白胨水（如为 5.1.1 中冷冻保存样品，室温解冻后，加入 200 mL 0.1% 蛋白胨水）的均质袋中，在拍击式均质器上连续均质 1 min~2 min；或置于盛有 225 mL 0.1% 蛋白胨水的均质杯中，8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min，作为 1:10 稀释液。

5.1.3 以上述 1:10 稀释液按 1 mL 加 0.1% 蛋白胨水 9 mL 制备 10^{-2} ~ 10^{-6} 的系列稀释液。

5.2 培养

5.2.1 吸取各稀释液 1 mL 加入无菌平皿内,每个稀释度做两个平行。每个平皿倾注冷却至 50 ℃ 的 TSC 琼脂(可放置于 50 ℃ $\pm$ 1 ℃ 恒温水浴箱中保温) 15 mL,缓慢旋转平皿,使稀释液和琼脂充分混匀。

5.2.2 上述琼脂平板凝固后,再加 10 mL 冷却至 50 ℃ 的 TSC 琼脂(可放置于 50 ℃ $\pm$ 1 ℃ 恒温水浴箱中保温)均匀覆盖平板表层。

5.2.3 待琼脂凝固后,正置于厌氧培养装置内,36 ℃ $\pm$ 1 ℃ 培养 20 h~24 h。

5.2.4 典型的产气荚膜梭菌在 TSC 琼脂平板上为黑色菌落。

5.3 确证试验

5.3.1 从单个平板上任选 5 个(小于 5 个全选)黑色菌落,分别接种到 FTG 培养基,36 ℃ $\pm$ 1 ℃ 培养 18 h~24 h。

5.3.2 用上述培养液涂片,革兰氏染色镜检并观察其纯度。产气荚膜梭菌为革兰氏阳性粗短的杆菌,有时可见芽孢体。如果培养液不纯,应划线接种 TSC 琼脂平板进行分纯,36 ℃ $\pm$ 1 ℃ 厌氧培养 20 h~24 h,挑取单个典型黑色菌落接种到 FTG 培养基,36 ℃ $\pm$ 1 ℃ 培养 18 h~24 h,用于后续的确证试验。

5.3.3 取生长旺盛的 FTG 培养液 1 mL 接种于含铁牛乳培养基,在 46 ℃ $\pm$ 0.5 ℃ 水浴中培养 2 h 后,每小时观察一次有无“暴烈发酵”现象,该现象的特点是乳凝结物破碎后快速形成海绵样物质,通常会上升到培养基表面。5 h 内不发酵者为阴性。产气荚膜梭菌发酵乳糖,凝固酪蛋白并大量产气,呈“暴烈发酵”现象,但培养基不变黑。

5.3.4 用接种环(针)取 FTG 培养液穿刺接种缓冲动力-硝酸盐培养基,于 36 ℃ $\pm$ 1 ℃ 培养 24 h。在透射光下检查细菌沿穿刺线的生长情况,判定有无动力。有动力的菌株沿穿刺线呈扩散生长,无动力的菌株只沿穿刺线生长。然后滴加 0.5 mL 试剂甲和 0.2 mL 试剂乙以检查亚硝酸盐的存在。15 min 内出现红色者,表明硝酸盐被还原为亚硝酸盐;如果不出现颜色变化,则加少许锌粉,放置 10 min,出现红色者,表明该菌株不能还原硝酸盐。产气荚膜梭菌无动力,能将硝酸盐还原为亚硝酸盐。

5.3.5 用接种环(针)取 FTG 培养液穿刺接种乳糖-明胶培养基,于 36 ℃ $\pm$ 1 ℃ 培养 24 h,观察结果。如发现产气和培养基由红变黄,表明乳糖被发酵并产酸。将试管于 5 ℃ 左右放置 1 h,检查明胶液化情况。如果培养基是固态,于 36 ℃ $\pm$ 1 ℃ 再培养 24 h,重复检查明胶是否液化。产气荚膜梭菌能发酵乳糖,使明胶液化。

6 结果与报告

6.1 典型菌落计数

选取典型菌落数在 20 CFU~200 CFU 之间的平板,计数典型菌落数。如果:

- 只有一个稀释度平板的典型菌落数在 20CFU~200CFU 之间,计数该稀释度平板上的典型菌落;
- 最低稀释度平板的典型菌落数均小于 20 CFU,计数该稀释度平板上的典型菌落;
- 某一稀释度平板的典型菌落数均大于 200 CFU,但下一稀释度平板上没有典型菌落,应计数该稀释度平板上的典型菌落;
- 某一稀释度平板的典型菌落数均大于 200 CFU,且下一稀释度平板上有典型菌落,但其平板上的典型菌落数不在 20 CFU~200 CFU 之间,应计数该稀释度平板上的典型菌落;
- 2 个连续稀释度平板的典型菌落数均在 20CFU~200CFU 之间,分别计数 2 个稀释度平板上的典型菌落。

6.2 结果计算

6.1 计数结果按公式(1)计算:

$$T = \frac{\sum(A \frac{B}{C})}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

T ——样品中产气荚膜梭菌的菌落数；

A ——单个平板上典型菌落数；

B ——单个平板上经确证试验为产气荚膜梭菌的菌落数；

C ——单个平板上用于确证试验的菌落数；

n_1 ——第一稀释度（低稀释倍数）经确证试验有产气荚膜梭菌的平板个数；

n_2 ——第二稀释度（高稀释倍数）经确证试验有产气荚膜梭菌的平板个数；

0.1——稀释系数；

d ——稀释因子（第一稀释度）。

6.3 报告

根据 TSC 琼脂平板上产气荚膜梭菌的典型菌落数，按照 6.2 中公式计算，报告每 g（mL）样品中产气荚膜梭菌数，报告单位以 CFU/g（mL）表示；如 T 值为 0，则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。

附录 A

培养基和试剂

A.1 胰胨亚硫酸盐-环丝氨酸（TSC）琼脂

A.1.1 基础成分

胰胨	15.0 g
大豆胨	5.0 g
酵母粉	5.0 g
焦亚硫酸钠	1.0 g
柠檬酸铁铵	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	900.0 mL
pH 7.6±0.2	

A.1.2 D-环丝氨酸溶液

溶解 1 g D-环丝氨酸于 200 mL 蒸馏水，膜过滤除菌后，于 4℃ 冷藏保存备用。

A.1.3 制法

将基础成分加热煮沸至完全溶解，调节 pH，分装到 500 mL 烧瓶中，每瓶 250 mL，121℃ 高压灭菌 15 min，于 50℃ ±1℃ 保温备用。临用前每 250 mL 基础溶液中加入 20 mL D-环丝氨酸溶液，混匀，倾注平皿。

A.2 液体硫乙醇酸盐培养基（FTG）

A.2.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
L-胱氨酸	0.5g
酵母粉	5.0 g
葡萄糖	5.0 g
氯化钠	2.5g
硫乙醇酸钠	0.5g
刃天青	0.001g
琼脂	0.75g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 7.1±0.2	

A.2.2 制法

将以上成分加热煮沸至完全溶解，冷却后调节 pH，分装试管，每管 10 mL，121℃ 高压灭菌 15 min。临用前煮沸或流动蒸汽加热 15 min，迅速冷却至接种温度。

A.3 缓冲动力-硝酸盐培养基

A.3.1 成分

蛋白胨	5.0 g
牛肉粉	3.0 g
硝酸钾	5.0 g
磷酸氢二钠	2.5g

半乳糖	5.0 g
甘油	5.0 mL
琼脂	3.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 7.3±0.2	

A. 3.2 制法

将以上成分加热煮沸至完全溶解，调节 pH，分装试管，每管 10 mL，121 ℃高压灭菌 15 min。如果当天不用，置 4 ℃左右冷藏保存。临用前煮沸或流动蒸汽加热 15 min，迅速冷却至接种温度。

A. 4 乳糖-明胶培养基

A. 4.1 成分

蛋白胨	15.0 g
酵母粉	10.0 g
乳糖	10.0 g
酚红	0.05g
明胶	120.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 7.5±0.2	

A. 4.2 制法

加热溶解蛋白胨、酵母粉和明胶于 1000 mL 蒸馏水中，调节 pH，加入乳糖和酚红。分装试管，每管 10 mL，121 ℃高压灭菌 10 min。如果当天不用，置 4 ℃左右冷藏保存。临用前煮沸或流动蒸汽加热 15 min，迅速冷却至接种温度。

A. 5 含铁牛乳培养基

A. 5.1 成分

新鲜全脂牛奶	1 000.0 mL
硫酸亚铁（FeSO ₄ ·7H ₂ O）	1.0 g
蒸馏水	50.0 mL

A. 5.2 制法

将硫酸亚铁溶于蒸馏水中，不断搅拌，缓慢加入 1000 mL 牛奶中，混匀。分装大试管，每管 10 mL，118 ℃高压灭菌 12 min。本培养基必须新鲜配制。

A. 6 0.1% 蛋白胨水

A. 6.1 成分

蛋白胨	1.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH 7.0±0.2	

A. 6.2 制法

加热溶解，调节 pH，121 ℃高压灭菌 15 min。

A. 7 革兰氏染色液

A. 7.1 结晶紫染色液

A. 7.1.1 成分

结晶紫	1.0g
-----	------

95%乙醇	20.0 mL
1%草酸铵水溶液	80.0 mL

A. 7.1.2 制法

将结晶紫完全溶于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

A. 7.2 革兰氏碘液

A. 7.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL

A. 7.2.2 制法

将碘与碘化钾先混合，加入蒸馏水少许振摇，待完全溶解后，再加入蒸馏水至 300 mL。

A. 7.3 沙黄复染液

A. 7.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A. 7.3.2 制法

将沙黄溶解于 95%乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A. 7.4 染色方法

涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染液，染色 1 min，水洗。滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。滴加 95%乙醇脱色约 15 s~30 s，直至染色液被洗掉，不要过分脱色，水洗。滴加沙黄复染液，复染 1 min，水洗、待干、镜检。

A. 8 硝酸盐还原试剂

A. 8.1 甲液（对氨基苯磺酸溶液）

在 1 000 mL 5 mol/L 乙酸中溶解 8 g 对氨基苯磺酸。

A. 8.2 乙液（ α -萘酚乙酸溶液）

在 1 000 mL 5 mol/L 乙酸中溶解 5 g α -萘酚。

A. 9 缓冲甘油-氯化钠溶液

A. 9.1 成分

甘油	100.0 mL
氯化钠	4.2 g
磷酸氢二钾（无水）	12.4 g
磷酸二氢钾（无水）	4.0 g
蒸馏水	900.0 mL
pH7.2 $\pm$ 0.1	

A. 9.2 制法

将以上成分加热至完全溶解，调节pH，121 ℃高压灭菌15 min。配制双料缓冲甘油溶液时，用甘油 200 mL和蒸馏水800 mL。