

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 0.1 g；
- 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 胰胨-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。

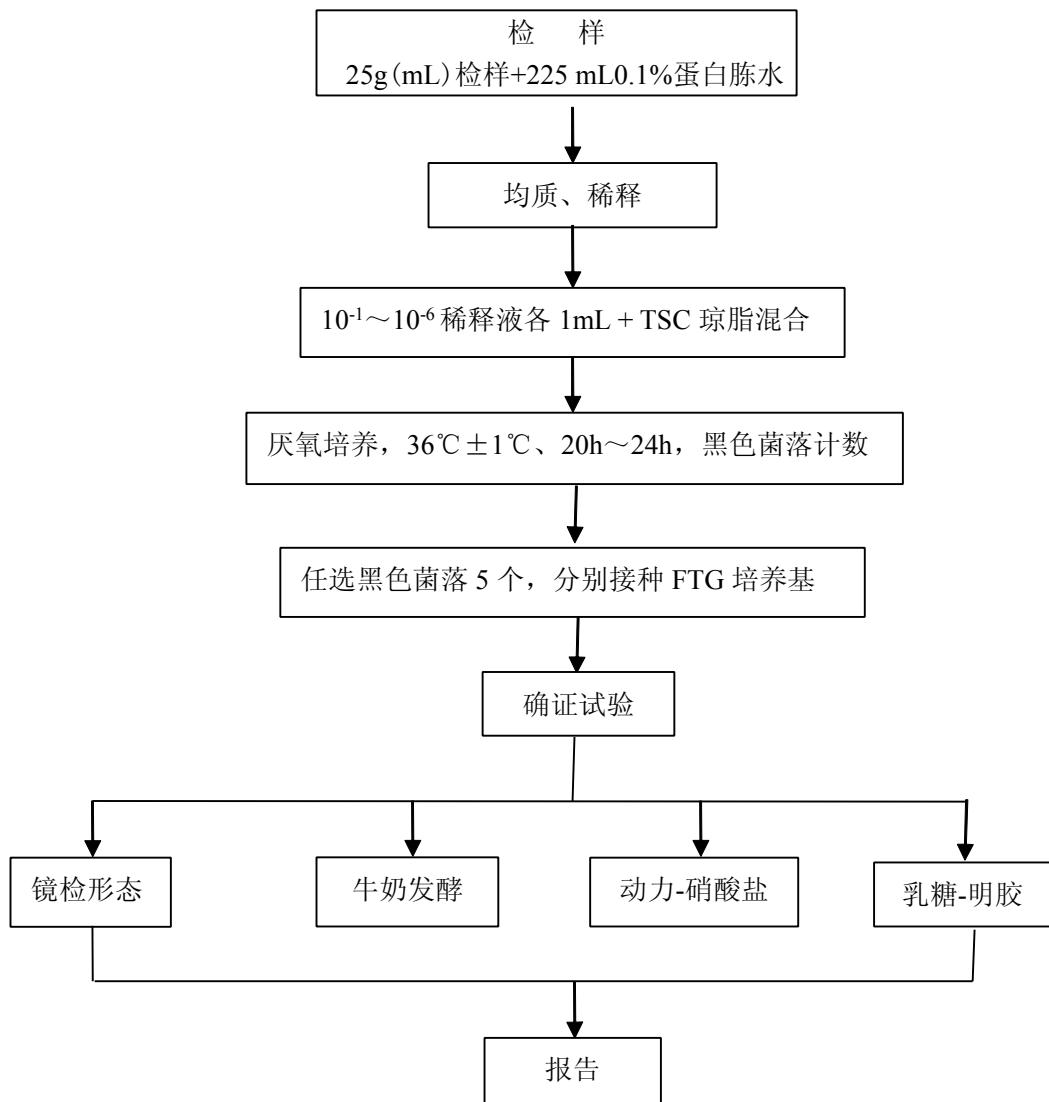


图 1 产气荚膜梭菌检验程序

## 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<sup>2</sup>~10<sup>6</sup> 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 ℃±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 ℃±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 ℃±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 ℃±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 ℃±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 ℃±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 ℃±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 ℃±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 ℃±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 ℃±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:

- a) 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;
- b) 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;
- c) 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;
- d) 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;
- e) 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:

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

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 gD-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 °C 高压灭菌 15 min。如果当天不用，置 4 °C 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 °C 高压灭菌 10 min。如果当天不用，置 4 °C 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 <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> 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 °C 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 °C 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（ $\alpha$ -萘酚乙酸溶液）

在1 000 mL 5 mol/L乙酸中溶解5 g $\alpha$ -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±0.1

##### A. 9.2 制法

将以上成分加热至完全溶解，调节pH，121 °C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。