

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 0177—2011
代替 SN 0177—1992

出口食品中产气荚膜梭状 芽孢杆菌计数方法

Method for enumeration of *clostridium perfringens* in food for export

2011-09-09 发布

2012-04-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN 0177—1992《出口食品中产气荚膜梭状芽孢杆菌检验方法》。

本标准与 SN 0177—1992 相比,主要技术变化如下:

——变更为推荐性标准;

——检测方法部分参考了 ISO 7937:2004《食品和动物饲料微生物 产气荚膜梭状芽孢杆菌计数 菌落计数技术》内容,在标准中增加乳糖-亚硫酸盐试验作为确证试验,减除了含卵黄的 TSC 琼脂和 PY 培养基的使用;

——补充了商品化的全自动微生物鉴定仪。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:顾鸣、韩伟、谢小珏、王赢、陈立。

www.kinghunt.cn
凯恒生物

出口食品中产气荚膜梭状芽孢杆菌计数方法

1 范围

本标准规定了出口食品中产气荚膜梭状芽孢杆菌(*Clostridium perfringens*)的计数检验方法。本标准适用于出口食品中产气荚膜梭状芽孢杆菌的检验。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

SN/T 1538.1 培养基制备指南 第1部分:实验室培养基制备质量保证通则

SN/T 1538.2 培养基制备指南 第2部分:培养基性能测试实用指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

产气荚膜梭状芽孢杆菌 *clostridium perfringens*

在特定的选择性培养基上,细菌菌落生长呈现黑色特点(亚硫酸盐降解为硫化物而形成黑色沉淀物,并使菌落呈现黑色),分解乳糖产酸产气,48 h内能液化明胶的细菌。

4 设备和材料

4.1 无菌吸管:1.0 mL和10.0 mL,分刻度分别为0.1 mL和1.0 mL。

4.2 无菌培养皿:直径90 mm。

4.3 均质器及均质袋(或均质杯)。

4.4 恒温培养箱或厌氧培养箱: $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

4.5 恒温水浴锅: $46\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

4.6 厌氧发生装置。

4.7 放大镜和(或)菌落计数器。

4.8 光学显微镜 $10\times\sim 100\times$ 。

4.9 冰箱: $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

4.10 天平:感量0.1 g。

4.11 全自动微生物鉴定系统 VITEK compact¹⁾。

1) 由法国生物梅里埃公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效的产品。

5 培养基和试剂

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的分析实验室用水。

- 5.1 亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂(SC):见 A. 1。
- 5.2 液体硫乙醇酸盐培养基:见 A. 2。
- 5.3 乳糖亚硫酸盐培养基(LS):见 A. 3。
- 5.4 缓冲动力-硝酸盐培养基:见 A. 4。
- 5.5 亚硝酸盐检测试剂:见 A. 5。
- 5.6 锌粉。
- 5.7 乳糖-明胶培养基:见 A. 6。
- 5.8 蛋白胨水:见 A. 7。
- 5.9 VITEK 2 ANI 生化鉴定卡²⁾。

6 检验程序

产气荚膜梭状芽孢杆菌检验程序见图 1。

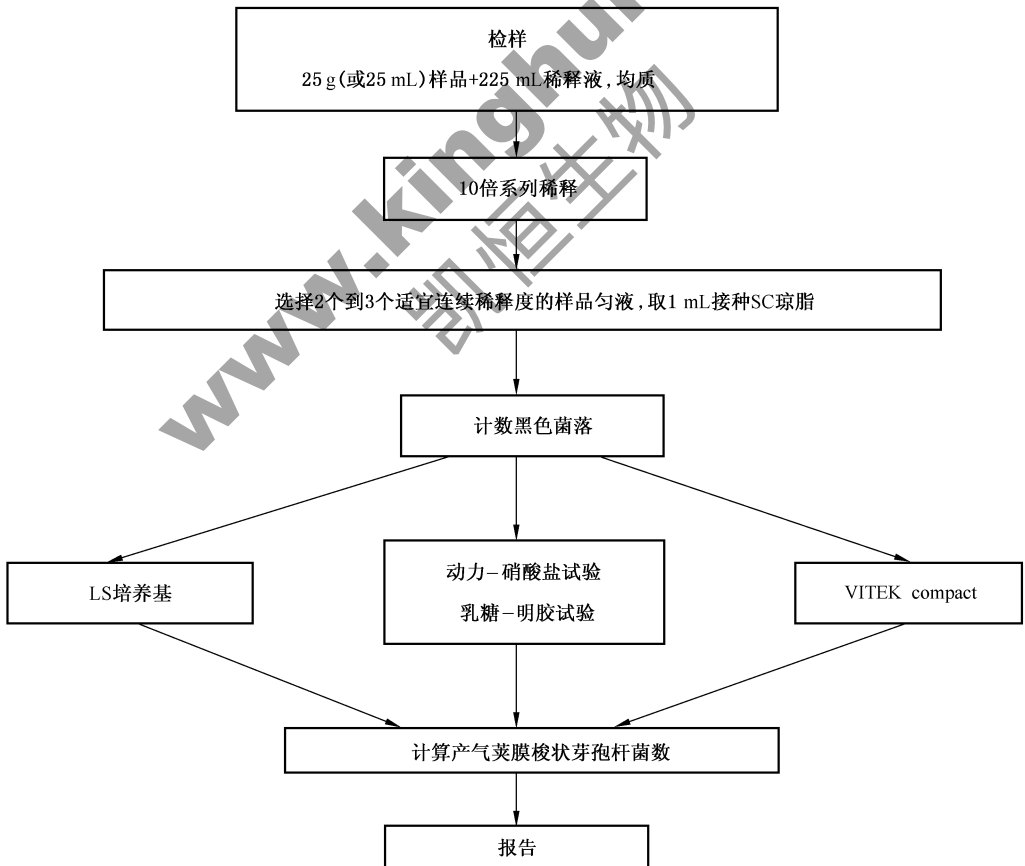


图 1 产气荚膜梭状芽孢杆菌的检验程序

2) 由法国生物梅里埃公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效的产品。

7 操作步骤

7.1 样品的稀释

7.1.1 无菌操作称取检样 25 g(mL)放入无菌均质器或均质袋中,加入 225 mL 蛋白胨水,均质,制成 1:10 样品匀液。

7.1.2 吸取 1:10 样品匀液 1 mL,加入到 9 mL 蛋白胨水中,混合均匀,制成 1:100 样品匀液。必要时,按此法将样品作进一步的 10 倍递增稀释。

7.2 接种与培养

7.2.1 选择 2 个~3 个适宜稀释度的样品匀液(液体样品可包括原液),每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液加入到两个无菌平皿内。

7.2.2 将 10 mL~15 mL 维持在 44 °C~47 °C 的 SC 琼脂倾注平皿,转动平皿使其混合均匀。待培养基凝固后,再覆盖上 10 mL SC 琼脂,待其完全凝固。

7.2.3 翻转平板,放入厌氧罐或其他适宜容器中,厌氧环境下 37 °C±0.5 °C 下培养 20 h±2 h。培养时间过长可能会导致平板颜色过黑。

7.3 平板计数

7.3.1 选取菌落数<150 CFU 的平板,计数每个平板上的黑色菌落数,记录稀释倍数。

7.3.2 每个平板挑取 5 个典型或可疑菌落(小于 5 个时应全部挑选)进行确证。

7.4 乳糖-亚硫酸盐试验确证

7.4.1 接种

将 SC 琼脂上的典型或可疑菌落接种到液体硫乙醇酸盐培养基中,厌氧环境下 37 °C±0.5 °C 下培养 18 h~24 h。以无菌吸管移取硫乙醇酸盐培养物 5 滴加入到乳糖-亚硫酸盐(LS)培养基中。46 °C 水浴中需氧条件下培养 18 h~24 h。

7.4.2 观察

观察倒管内有否气泡产生及试管底部是否变黑(亚硫酸铁沉淀),若倒管中四分之一以上充满气体并且有黑色沉淀物则可判定为阳性。当倒管中产生的气体不足四分之一时,立即以无菌吸管从先前的 LS 培养基中吸取 5 滴加到另一 LS 培养基试管中,46 °C 水浴培养 18 h~24 h,再次观察结果。

7.4.3 判读

在 SC 培养基中形成黑色菌落,同时 LS 培养基中反应阳性的细菌,可确认为产气荚膜梭状芽孢杆菌,除此之外应视为阴性。

7.5 动力-硝酸盐试验和乳糖-明胶液化试验确证

7.5.1 纯化

将 SC 琼脂上的典型或可疑菌落接种到液体硫乙醇酸盐培养基中,厌氧条件下 37 °C±0.5 °C 培养 18 h~24 h,划线接种 SC 琼脂平板,再覆盖上 10 mL SC 琼脂。待其完全凝固后,厌氧条件下 37 °C±0.5 °C 培养 18 h~24 h,获得纯培养菌落。如有必要,可重复上述步骤,以获得完全分离的,典型的黑色菌落。

7.5.2 接种

将挑取的纯菌落分别穿刺接种缓冲动力-硝酸盐培养基和乳糖-明胶培养基,厌氧条件下 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。

7.5.3 动力-硝酸盐试验观察

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,仅沿穿刺线生长。分别加 0.5 mL 试剂甲与 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。出现橙红色者,表明有菌株将硝酸盐还原成了亚硝酸盐。若 15 min 内未出现颜色变化,则添加少许金属锌粉,放置 10 min。如果加锌粉后出现橙红色,表明菌株不能还原硝酸盐。若出现微弱的亚硝酸盐反应(如:浅粉色)则应排除,因为产气荚膜梭状芽孢杆菌的反应比较剧烈而且迅猛。

7.5.4 乳糖-明胶试验观察

发现产气和培养基变黄色,表明乳糖发酵并产酸。将试管置 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷却 1 h,检查明胶液化情况。若培养基仍为固态,则需 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 再培养 24 h,再次检查明胶是否液化。

7.5.5 判读

在 SC 琼脂上形成黑色菌落,无动力的,通常会将硝酸盐还原为亚硝酸盐,分解乳糖产酸产气,48 h 内能液化明胶的细菌,确认为产气荚膜梭状芽孢杆菌。

7.6 自动微生物鉴定系统确证

如选择 VITEK compact,可从 SC 平板上挑选可疑菌落,用生理盐水制成浊度适当的菌悬液,使用 VITEK compact 全自动微生物鉴定系统进行鉴定。

7.7 判定

任何符合 7.4.3 或者 7.5.5 的判读确证或者经 7.6 的鉴定为产气荚膜梭状芽孢杆菌的菌落,确认为产气荚膜梭状芽孢杆菌。

8 结果报告

样品中产气荚膜梭状芽孢杆菌的计数,基于被证实为产气荚膜梭状芽孢杆菌菌落的百分数。

例如: 10^{-4} 稀释的平板中,平均有 85 个菌落,由 2 个平板上选取的 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状芽孢杆菌数,即为 $85 \times (8/10) \times 10\ 000 = 680\ 000\ \text{CFU}$ 。

根据计算结果报告检样中产气荚膜梭状芽孢杆菌数/g(mL)。

附录 A
(规范性附录)
培养基和试剂³⁾

A.1 亚硫酸盐-环丝氨酸(SC)琼脂

A.1.1 基础培养基

胰蛋白	15.0 g
酵母膏	5.0 g
大豆胨	5.0 g
焦亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)	1.0 g
柠檬酸铁铵	1.0g
琼脂	9.0 g~18.0 g

A.1.2 D-环丝氨酸溶液

溶解 4 g D-环丝氨酸于 100 mL 水中,过滤除菌。存放于 $3\text{ }^\circ\text{C}\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$,4 周内用完。

A.1.3 制备

将基础培养基各成分加热溶解在 1 000 mL 水中,调节 pH 使灭菌后室温下 $\text{pH}7.6\pm 0.2$,分装到适宜容量的烧瓶中,121 $^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。倒平皿前,将 100 mL 基础培养基冷却到 $44\text{ }^\circ\text{C}\sim 47\text{ }^\circ\text{C}$,加过滤除菌的 D-环丝氨酸溶液 1 mL。

当 SC 琼脂培养基平板被用来作纯化菌落时(动力-硝酸盐试验和乳糖-明胶试验)时,可直接取 15 mL 冷却到 $44\text{ }^\circ\text{C}\sim 47\text{ }^\circ\text{C}$ 的基础培养基倾注平板。

存放于 $5\text{ }^\circ\text{C}\pm 3\text{ }^\circ\text{C}$,可保存 2 星期。

A.2 硫乙醇酸盐液体培养基

胰酪胨	15.0 g
L-胱氨酸	0.5 g
D-葡萄糖	5.5 g
酵母膏	5.0 g
氯化钠	2.5 g
硫乙醇酸钠(或硫乙醇酸)	0.5 g
刃天青	0.001 g
琼脂	0.5 g~2.0 g

将各成分加热溶解在 1 000 mL 水中,调节 pH 使灭菌后室温下 $\text{pH}7.1\pm 0.2$,将培养基分装适宜的试管内,每管 10 mL,121 $^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。在使用前,此培养基中应加热煮沸 1 min 减氧。

3) 为保证培养基的质量,应按 SN/T 1538.1、SN/T 1538.2 的规定进行培养基的制备与性能测试。

A.3 乳糖亚硫酸盐培养基(LS)

A.3.1 基础培养基

胰酪胨	15.0 g
酵母膏	2.5 g
氯化钠	2.5 g
乳糖	10.0 g
L-半胱氨酸盐酸盐	0.3 g

A.3.2 焦亚硫酸钠溶液

将 1.2 g 无水焦亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)溶解在 100 mL 水中,过滤除菌,当天使用。

A.3.3 柠檬酸铁铵溶液

将 1.0 g 柠檬酸铁铵溶解在 100 mL 水中,过滤除菌,当天使用。

A.3.4 制备

将基础培养基各成分溶解在 1 000 mL 水中(如有必要可加热),调节 pH 使灭菌后室温下 $\text{pH}7.1 \pm 0.2$,分装至装有倒置小导管的试管中,每管 8 mL,121 °C 高压灭菌 15 min。若非配制当天使用,则在临用前需加热煮沸 1 min 减氧。存放于 $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$,4 周内用完。临用时每管添加 0.5 mL 焦亚硫酸钠溶液和 0.5 mL 柠檬酸铁铵溶液,当天使用。

A.4 缓冲动力-硝酸盐培养基

胰酪胨	5.0 g
牛肉膏	3.0 g
半乳糖	5.0 g
甘油	5.0 g
硝酸钾(KNO_3)	5.0 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	2.5 g
琼脂	1.5 g~5.0 g

将各成分加热溶解在 1 000 mL 水中,调节 pH 使灭菌后室温下 $\text{pH}7.3 \pm 0.2$,分装到适宜的试管内,每管 10 mL,121 °C 高压灭菌 15 min。若非配制当天使用,存放于 $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ 。临用前,沸水浴或者蒸汽加热 15 min,迅速冷却至培养温度。配制后 4 周内用完。

A.5 亚硝酸盐试剂

A.5.1 试剂甲

在 1 000 mL 5 mol/L 乙酸中溶解对氨基苯磺酸 8 g;通过滤纸过滤;存放在密封性良好的有塞棕色瓶(最好备有滴头),温度保持在 $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ 。

A.5.2 试剂乙

在 1 000 mL 5 mol/L 乙酸中溶解 α -苯酚 5 g。通过滤纸过滤;存放在密封性良好的有塞棕色瓶(最

备好有滴头),温度保持在 $5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

A.6 乳糖-明胶培养基

胰酪胨	15.0 g
酵母膏	10.0 g
乳糖	10.0 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	5.0 g
酚红	0.05 g
明胶	120.0 g

将各成分加热溶解在 1 000 mL 水中,调节 pH 使灭菌后室温下 $\text{pH}7.5\pm 0.2$,加入乳糖和酚红。分装到适宜的试管内,每管 10 mL。 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。若非配制当天使用,存放于 $5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。临用前,沸水浴或者蒸汽加热 15 min,迅速冷却培养温度。配制后 3 周内用完。

A.7 蛋白胨水

在 1 000 mL 水中溶解蛋白胨 1.0 g,调节 pH 使灭菌后室温下 $\text{pH}7.0\pm 0.1$ 。分装。 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

www.kinghunt.cn
凯恒生物