



中华人民共和国国家标准

GB/T 26425—2010

饲料中产气荚膜梭菌的检测

Method for determination of *Clostridium perfringens* in feeds

(ISO 7937:2004, Microbiology of food and animal feeding stuffs—
Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens*—
Colony-count technique, MOD)

2011-01-14 发布

2011-07-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会发布

前　　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准使用重新起草法修改采用 ISO 7937:2004《食品和动物饲料的微生物学 产气荚膜梭菌计数的水平方法 菌落计数技术》(英文版)。

本标准与 ISO 7937:2004 相比在结构上有较多调整,附录 B 中列出了本标准与 ISO 7937:2004 的章条编号对照一览表。

本标准与 ISO 7937:2004 相比存在技术性差异,这些差异涉及的条款已通过在其外侧页边空白位置的垂直单线(|)进行了标识,附录 C 中给出了相应技术性差异及其原因的一览表。

本标准还做了下列编辑性修改:

- 删除了 ISO 7937:2004 的目次;
- 删除了 ISO 7937:2004 的引言;
- 删除了 ISO 7937:2004 的参考文献。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:广东省微生物分析检测中心。

本标准主要起草人:朱红惠、孙晓棠、羊宋贞、陈远良、张鲜姣。

饲料中产气荚膜梭菌的检测

1 范围

本标准规定了饲料中产气荚膜梭菌的检验方法。

本标准适用于饲料中产气荚膜梭菌的检测。

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 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB/T 14699.1 饲料 采样(GB/T 14699.1—2005,ISO 6497:2002, IDT)

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备(GB/T 20195—2006,ISO 6498:1998, IDT)

SN/T 1538.1—2005 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 1538.1—2005,ISO/TS 11133-1:2000,MOD)

SN/T 1538.2—2007 培养基制备指南 第2部分:培养基性能测试实用指南(SN/T 1538.2—2007,ISO/TS 11133-2:2003,MOD)

3 原理

3.1 在平板中接种特定量待测液体样品,或特定量其他类型待测样品初始悬液。在相同条件下接种待测样品或初始悬液的十倍梯度稀释物。浇注一层选择性培养基,凝固后再浇注一层此培养基覆盖。

3.2 平板于37℃厌氧培养20 h±2 h。

3.3 典型菌落计数。

3.4 典型菌落的数量用确证试验证实,进一步计算每毫升或每克试样中产气荚膜梭菌数。

4 稀释液、培养基及试剂

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂,实验室用水采用蒸馏水或去离子水,或相当纯度的水。

4.1 蛋白胨生理盐水稀释液:参见附录A中的A.1。

4.2 亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂(SC):参见附录A中的A.2。

注:该培养基原称为无卵黄胰蛋白胨-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂(TSC)。

4.3 液体硫乙醇酸盐培养基:参见附录A中的A.3。

4.4 乳糖亚硫酸盐(LS)培养基(可选):参见附录A中的A.4。

4.5 动力硝酸盐培养基(可选):参见附录A中的A.5。

4.6 硝酸盐还原试剂(可选):参见附录A中的A.6。

4.7 锌粉(可选):可选。

4.8 乳糖-明胶培养基(可选):参见附录A中的A.7。

5 设备和玻璃器皿

需配备微生物学常规设备和以下设备及玻璃器皿。

- 5.1 干热灭菌烘箱或湿热高压灭菌锅。
- 5.2 恒温培养箱:37 ℃±1 ℃。
- 5.3 厌氧培养装置或厌氧罐。
- 5.4 pH计:精度到±0.1个单位。
- 5.5 接种环、穿刺接种针:铂金丝或镍丝,一次性使用的无菌用品亦可,接种环直径约3 mm。
- 5.6 过滤除菌装置:用于溶液过滤除菌。
- 5.7 试管、锥形瓶、倒管:容积适当,试管16 mm×160 mm。
- 5.8 吸管:1 mL(具0.1 mL刻度),10 mL(具0.5 mL刻度)。
- 5.9 玻璃或塑料平板:直径9 cm~10 cm。
- 5.10 水浴锅:46 ℃±0.5 ℃,44 ℃~47 ℃可调。
- 5.11 橡胶吸耳球:必要时与具刻度的移液管一同用于配制硝酸盐还原试剂。

6 采样

实验室样品真实、具有代表性。采样工具,如铲子、匙、采样器、试管、广口瓶、剪子等,应是灭菌的。样品送到微生物检验室应越快越好。采样数量和方式按照GB/T 14699.1执行。

7 样品的制备

按照GB/T 20195进行试样的制备,样品制备后应尽快检验。

8 操作步骤

8.1 检样制备、初始悬液和十倍稀释

以无菌操作称取试样25 g(mL)加入225 mL蛋白胨生理盐水稀释液(4.1),均质1 min~2 min,制成1:10的稀释液。吸取1:10的稀释液1 mL,加入9 mL蛋白胨生理盐水稀释液,经充分混匀后制成1:100的稀释液。更高稀释度可按此方法操作。

8.2 接种和培养

用无菌移液管吸取1 mL初始悬液(若样品本身为液体,则直接吸取样液)加入到灭菌空平皿中央,每个样品做两个重复,每个平板浇注44 ℃~47 ℃水浴保温的SC培养基(4.2)10 mL~15 mL,柔和转动平板,使稀释液与培养基充分混匀。培养基凝固后,再于其上浇注10 mL的SC培养基,待其凝固后,将平板倒置于厌氧培养装置(5.3)内,37 ℃厌氧培养20 h±2 h。培养时间不宜过长,否则会导致平板过度黑化。

采用同样操作步骤进行1:100的稀释物的接种和培养,必要时可采用同样操作步骤进行更高适宜稀释物的接种和培养。

8.3 计数及菌落筛选

培养后,选择长有150个菌落以下的平板,最好选择连续稀释度的平板,计数每皿中黑色菌落。然

后从中选出 5 个黑色菌落用 8.4.1 或 8.4.2 中的任一种方法做确证试验。

8.4 确证试验

8.4.1 用 LS 培养基进行确证试验

注：因只有产气荚膜梭菌和不和谐梭菌(*Clostridium absonum*)这两种菌能在 LS 培养基(4.4)上 46 ℃培养下生长，故采用此法进行确证试验不需确保从 SC 培养基上选出的黑色菌落为纯培养即可转接至液体硫乙醇酸盐培养基进而转接到 LS 培养基上。

8.4.1.1 培养及转种

将每个选出的菌落接种至液体硫乙醇酸盐培养基(4.3),37 ℃厌氧培养 18 h~24 h 后,立即用灭菌移液管将 5 滴液体硫乙醇酸盐培养物转接到 LS 培养基中,水浴(5.10)中 46℃需氧培养 18 h~24 h。

8.4.1.2 鉴别

检查 LS 培养基中的倒管是否产气且是否呈黑色(为亚硫酸铁沉淀),LS 培养基变黑且产气超过 1/4 小倒管的可确认为阳性;若 LS 培养基变黑但产气不足 1/4 小倒管的,立即从中转接 5 滴至另一管 LS 培养基,于水浴中 46 ℃培养 18 h~24 h 后,同上判断是否阳性。

在 SC 培养基上形成特征性菌落,且用 LS 培养基确认为阳性的可认定为产气荚膜梭菌,其他情况均应判为阴性。

8.4.2 用动力硝酸盐培养基和乳糖-明胶培养基进行确证试验

8.4.2.1 概述

用此法进行确证需确保用于确证的菌落得到良好分离。平板表面出现过度生长或不可能选出良好分离的特征菌落时,应将 5 个特征菌落接种至预脱气的液体硫乙醇酸盐培养基,37 ℃厌氧培养 18 h~24 h 后,划线于 SC 基础琼脂平板(A.2.1)上,待划线干后,再覆盖 10 mL SC 基础琼脂,凝固后置 37 ℃厌氧培养 18 h~24 h 后,从每一平板中选取至少 1 个良好分离的特征菌落,必要时重复于 SC 基础琼脂上划线及培养,直至获得良好分离的黑色菌落。再如 8.4.2.2、8.4.2.3 和 8.4.2.4 所述进行确证试验。

8.4.2.2 动力硝酸盐培养基确证

将选出的菌落穿刺接种至新鲜脱气的动力硝酸盐培养基(4.5),37 ℃厌氧培养 24 h,观察接种线的生长情况,沿接种线周围呈扩散生长的为有动力,然后用有刻度的滴管和橡胶吸耳球滴加硝酸盐还原试剂(4.6)0.2 mL~0.5 mL,观察硝酸盐是否被还原,变红的为阳性。若 15 min 内无红色产生,加少量锌粉 10 min 后观察结果,此时若变红则表明无硝酸盐被还原,判为阴性。产气荚膜梭菌无动力,能将硝酸盐还原为亚硝酸盐。

警告:为了安全起见,滴加硝酸盐还原试剂应在通风橱中进行。

8.4.2.3 转种及乳糖-明胶培养基确证试验

将选出的菌落穿刺接种至新鲜脱气的乳糖-明胶培养基(4.8),37 ℃厌氧培养 24 h,观察是否发酵乳糖,发酵乳糖者产气且变黄(因产酸),5 ℃放置 1 h,据其是否凝固检查明胶液化与否。此培养基凝固者,接着再培养 24 h,以检查明胶液化与否。

8.4.2.4 鉴别

SC 培养基上形成黑色菌落,无动力,能还原硝酸盐,发酵乳糖产酸产气,48 h 内液化明胶者可判为

$$N = \frac{120 + 130}{1 \times 2 \times 10^{-4}} = \frac{250}{0.000\,2} = 1\,250\,000$$

报告每毫升或每克试样中含产气荚膜梭菌数量为 1.2×10^6 CFU/g(mL) 或 1 200 000 CFU/g(mL)。

9.2.2 经确证后的产气荚膜梭菌菌数很少的情况下计算方法与报告

9.2.2.1 仅液体测试样品原液或其他样品的初始悬液证实含产气荚膜梭菌，且均少于 15

仅液体测试样品原液或其他样品的初始悬液证实含产气荚膜梭菌，且均少于 15 时，按式(3)计算 1 mL 或 1 g 样品中的产气荚膜梭菌数 N_e 。

式中：

Ne ——样品中产气荚膜梭菌菌数；

Σa ——两个被选择平板中经确证后的产气荚膜梭菌菌落数的总和；

V ——平板的接种体积,单位为毫升(mL);

d ——稀释度的稀释因子(未经稀释的液体样品的*d*值为1)。

报告每毫升或每克试样中产气荚膜梭菌数量。

示例 1：

某固体样品初始悬液的菌落数分别为 8 和 6，则：

$$Ne = \frac{8+6}{1 \times 2 \times 10^{-1}} = \frac{14}{0.2} = 70$$

报告每克试样中含产气荚膜梭菌菌数为 70 CFU/g。

9.2.2.2 液体测试样品原液或其他样品的初始悬液经确证后不含产气荚膜梭菌

报告每毫升或每克试样中产气荚膜梭菌数量小于 $1/d$ (d 为液体测试样品原液或其他样品的初始悬液的稀释因子,未经稀释的液体样品 d 值为 1)。

附录 A
(资料性附录)
培养基和试剂

A. 1 蛋白胨生理盐水

A. 1. 1 成分

酪蛋白胨	1.0 g
氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 1. 2 制法

溶解各成分子水中,必要时加热。调整 pH 值,使培养基 pH 值在 25 °C 时为 7.0±0.2。

A. 2 亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂(SC)

A. 2. 1 基础培养基

A. 2. 1. 1 成分

蛋白胨	15.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
酵母粉	5.0 g
偏重亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)	1.0 g
柠檬酸铁铵 ¹⁾	1.0 g
琼脂	9.0 g~18.0 g ²⁾
蒸馏水	1 000 mL

A. 2. 1. 2 制法

各成分加热溶解,调整 pH 值,使培养基 pH 值在 25 °C 时为 7.6±0.2,分装,121 °C 灭菌 15 min,5 °C±3 °C 最多可保存 2 周。

某些情况下(见 8.4.2.1),可能应制备 SC 琼脂基础培养基平板用于动力硝酸盐培养基和乳糖-明胶培养基确证试验,因此,将约 15 mL 基础培养基浇注平板(水浴融解后冷却至约 44 °C~47 °C),使之凝固。平板干燥后立即使用。

A. 2. 2 D-环丝氨酸溶液

A. 2. 2. 1 成分

D-环丝氨酸 ³⁾	4.0 g
----------------------	-------

1) 此试剂含铁质量分数应不少于 15 %。

2) 据凝胶强度而定。

3) 仅能使用白色结晶粉末。

蒸馏水 100 mL

A. 2. 2. 2 制法

D-环丝氨酸溶于蒸馏水,过滤除菌。3 ℃±2 ℃最多可保存4周。

A. 2. 3 完全培养基

临用前,每100 mL灭菌的基础培养基(A. 2. 1)冷却至约44 ℃~47 ℃后,加入1 mL D-环丝氨酸溶液(A. 2. 2),立即浇注平板。

A. 2. 4 SC培养基质量保证和性能测试

选择性和生长率试验,见SN/T 1538. 1—2005。性能测试见SN/T 1538. 2—2007中的表B. 1[见TS(C)]。

A. 3 液体硫乙醇酸盐培养基

A. 3. 1 成分

酪蛋白胨	15.0 g
L-胱氨酸	0.5 g
D-葡萄糖	5.5 g
酵母粉	5.0 g
氯化钠	2.5 g
硫代乙醇酸钠	0.5 g
琼脂	0.5 g~2.0 g ⁴⁾
刃天青	0.001 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 3. 2 制法

加热溶解各成分,调整pH值,使培养基pH值在25 ℃时为7.1±0.2,分装每管10 mL,121 ℃高压灭菌15 min。使用前需脱气。

A. 3. 3 液体硫乙醇酸盐培养基质量保证和性能测试

选择性及生长率测定见SN/T 1538. 1—2005。性能测试见SN/T 1538. 2—2007中的表B. 4。

A. 4 乳糖亚硫酸盐(LS)培养基(可选)

A. 4. 1 基础培养基

A. 4. 1. 1 成分

酪蛋白胨	5.0 g
酵母粉	2.5 g
氯化钠	2.5 g
乳糖	10.0 g

4) 据琼脂凝胶强度而定。

L-半胱氨酸盐酸盐	0.3 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 4. 1. 2 制法

溶解各成分(必要时可煮沸溶解)。调整 pH 值,使培养基 pH 值在 25 ℃时为 7.1±0.2。分装至带有小倒管(Durham 小管)的试管中,每管 8 mL,121 ℃高压灭菌 15 min。3 ℃±2 ℃最多可保存 4 周。

A. 4. 2 焦亚硫酸钠溶液

A. 4. 2. 1 成分

无水焦亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)	1.2 g
蒸馏水	100 mL

A. 4. 2. 2 制法

将焦亚硫酸钠溶于蒸馏水中,过滤除菌。此溶液仅可当天使用。

A. 4. 3 柠檬酸铁铵溶液

A. 4. 3. 1 成分

柠檬酸铁铵	1 g
蒸馏水	100 mL

A. 4. 3. 2

将柠檬酸铁铵溶于蒸馏水中,过滤除菌。此溶液仅可当天使用。

A. 4. 4 完全培养基

培养基若非当天使用,临用前需迅速加热并冷却使之脱气。若培养基装于螺旋盖的瓶中,加热前松开瓶盖,冷却前则拧紧瓶盖。加焦亚硫酸钠溶液(A. 4. 2)和柠檬酸铁铵溶液(A. 4. 3)各 0.5 mL 至 8 mL 的基础培养基(A. 4. 1)中。完全培养基应当天使用。

A. 5 动力硝酸盐培养基(可选)

A. 5. 1 成分

酪蛋白胨	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)	1.0 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	2.5 g
琼脂	1.0 g~5.0 g ⁵⁾
蒸馏水	1 000 mL

5) 据琼脂凝胶强度而定。

A.5.2 制法

加热溶解,调整 pH 值,使培养基 pH 值在 25 ℃时为 7.3±0.2,分装,每管 10 mL,121 ℃高压灭菌 15 min。培养基若非当天使用,于 5 ℃±3 ℃保存,临用前水浴或蒸汽浴中加热 15 min 后迅速冷却至培养温度使之脱气。5 ℃±3 ℃最多可保存 4 周。

A.6 硝酸盐还原试剂(可选)

A.6.1 5-氨基-2-萘磺酸(5-2-ANSA)溶液

将 5-氨基-2-萘磺酸 0.1 g 溶解于 15 %(体积分数)的乙酸溶液 100 mL 中,滤纸过滤,贮存于带塞棕色瓶中(最好具球形滴器),5 ℃±3 ℃贮存。

A.6.2 磺胺酸溶液

将磺胺酸 0.4 g 溶于 15 %(体积分数)的乙酸溶液 100 mL 中,滤纸过滤,贮存于带塞棕色瓶中(最好具球形滴器),5 ℃±3 ℃贮存。

A.6.3 完全试剂的用法

临用前等比例混合以上两种溶液(A.6.1 及 A.6.2),多余试剂弃去。

A.7 乳糖-明胶培养基(可选)

A.7.1 成分

酪蛋白胨	15.0 g
酵母粉	10.0 g
乳糖	10.0 g
明胶	120.0 g
酚红	0.05 g
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

除乳糖和酚红外,溶解其余各成分,调整 pH 值,使培养基 pH 值在 25 ℃时为 7.5±0.2,加乳糖和酚红,分装,每管 10 mL,121 ℃高压灭菌 15 min。若当天不用,于 5 ℃±3 ℃保存。过期弃去。临用前,于沸水或流动蒸汽中加热 15 min,然后迅速冷却至培养温度。5 ℃±3 ℃最多可保存 3 周。

附录 B
(资料性附录)

本标准与 ISO 7937:2004 相比的结构变化情况

本标准与 ISO 7937:2004 相比在结构上有较多调整,具体章条编号对照情况见表 B.1。

表 B.1 本标准与 ISO 7937:2004 的章条编号对照情况

本标准章条编号	对应的国际标准章条编号
9.1~9.2	10.1
—	10.2
—	11
附录 A	5
A.1	5.1
A.2	5.2
A.2.1~A.2.4	5.2.1~5.2.4
A.3	5.3
A.3.1~A.3.3	5.3.1~5.3.3
A.4	5.4
A.4.1~A.4.4	5.4.1~5.4.4
A.5	5.5
A.5.1~A.5.2	5.5.1~5.5.2
A.6	5.6
A.6.1~A.6.3	5.6.1~5.6.3
A.7	5.8
A.7.1~A.7.2	5.8.1~5.8.2
A.7	5.8
附录 B	—
附录 C	—
—	附录 A

附录 C

(资料性附录)

本标准与 ISO 7937:2004 的技术性差异及其原因

表 C.1 给出了本标准与 ISO 7937:2004 的技术性差异及其原因。

表 C.1 本标准与 ISO 7937:2004 的技术性差异及其原因

本标准章条编号	技术性差异	原因
1	删除 ISO 7937:2004 范围中“适用于食品以及食品生产和食品处理过程中环境样品”	本标准只针对饲料
2	关于规范性引用文件,本标准做了具有技术性差异的调整,调整的情况集中反映在第 2 章“规范性引用文件”中,具体调整如下: ——删除 ISO 6887-1; ——删除 ISO 6887-2; ——删除 ISO 6887-3; ——删除 ISO 6887-4; ——删除 ISO 7218; ——删除 ISO 8261; ——用修改采用国际标准的 SN/T 1538. 1—2005,代替了 ISO/TS 11133-1; ——用修改采用国际标准的 SN/T 1538. 2—2007,代替了 ISO/TS 11133-2:2003; ——增加引用了 GB/T 8170; ——增加引用了 GB/T 14699. 1; ——增加引用了 GB/T 20195	删除的国际标准无对应的国内标准,为便于标准使用者使用,本标准将这些内容直接列出纳入本标准中;引用 SN/T 1538,便于标准使用者使用中文术语
4	只列出了培养基及试剂名称,将成分及配制方法转至附录 A 中	按 GB/T 20000. 1 要求,与我国标准版式保持一致
6	将 ISO 7937:2004 中采样按照相应的国际标准执行,如果没有标准可按双方达成的一致意见执行,改为按照国内标准 GB/T 14699. 1 执行	我国饲料采样有标准
7	将 ISO 7937:2004 中试样的制备按照相应的国际标准执行,如果没有标准可按双方达成的一致意见执行,改为按照国内标准 GB/T 20195 执行	便于标准使用者使用
8.1	将 ISO 7937:2004 中引用的 ISO 6887 相关内容列出,纳入本标准中	便于标准使用者使用
9	将 ISO 7937:2004 中引用的 ISO 7218 相关内容列出,纳入本标准中	便于标准使用者使用
—	删除 ISO 7937:2004 中 3 “术语和定义”的内容	按 GB/T 20000. 1 要求,与我国标准版式保持一致
—	删除 ISO 7937:2004 中 10. 2 “精密度”的内容	按 GB/T 20000. 1 要求,与我国标准版式保持一致

表 C. 1 (续)

本标准章条编号	技术性差异	原因
—	删除 ISO 7937:2004 中第 11 章检测报告要求“检测报告应当注明所使用的检测方法、培养温度及其结果。还需要提及在本标准中未涉及的所有操作步骤细节或所有可选步骤以及所有可能影响最终结果的细节。检测报告应当包含对完成检测样品的所有必要的信息。”	按 GB/T 20000.1 要求,与我国标准版式保持一致
附录 A	将培养基和试剂成分及配制方法由 ISO 7937:2004 中第 5 章转至本标准附录 A 中	按 GB/T 20000.1 要求,与我国标准版式保持一致,此内容属资料性内容,宜安排在标准附录中
—	删除 ISO 7937:2004 中“附录 A(资料性附录)实验室间比对试验数据”	按 GB/T 20000.1 要求,与我国标准版式保持一致
—	删除参考文献	按 GB/T 20000.1 要求,与我国标准版式保持一致