

饮用天然矿泉水中产气荚膜梭菌检测国标方法的改进

潘宝怡, 吴清平, 彭飞艇, 周锦祯, 郭伟鹏

(广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东省华南应用微生物重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地, 广东省微生物研究所, 广东广州 510070)

摘要: 针对饮用天然矿泉水中产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 检测国家标准方法中, 滤膜上的菌落在亚硫酸盐-多粘菌素-磺胺嘧啶琼脂经 24 h 厌氧环境培养后黑色产生不明显的问题, 对检验方法进行改进。国标改进方法一: 按 GB/T 8538.4.55-2008 进行过滤后增加一步骤, 即用 SPS 培养基 (约 10 mL) 倾注于培养皿的膜上, 然后放置厌氧培养; 国标改进方法二: 按 GB/T 8538.4.55-2008 进行过滤后将滤膜反贴于 SPS 培养基上, 然后放置厌氧培养。对方法进行改进后, 国标改进方法一和国标改进方法二滤膜上的菌落经 24 h 厌氧环境培养后均有明显的黑色产生。国标方法黑色菌落不明显, 国标改进方法一和国标改进方法二产生的黑色菌落数与国标方法相比, 具有显著性差异 ($P < 0.01$)。国标改进方法一不但有利于产气荚膜梭菌黑色的产生, 而且容易挑取菌落做进一步试验。

关键词: 饮用矿泉水; 产气荚膜梭菌; 方法; 改进

文章编号: 1673-9078(2012)9-1236-1238

Improvement of Detection Method for *Clostridium Perfringens* in Drinking Natural Mineral Water of the National Standards

PAN Bao-Yi, WU Qing-Ping, PENG Fei-Ting, ZHOU Jin-Zhen, GUO Wei -Peng

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base), South China, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: The target colonies on the filtration membrane could not turn black obviously on sulfite - poly my xin - sulfadiazine agar after 24 h incubation in anaerobic conditions based on national standard method for the detection of *Clostridium perfringens* in drinking mineral water. To solve the above problem, the detection method was improved according to the methods of GB/T 8538.4.55-2008. After filtration, the SPS medium (10 mL) was poured on the membrane in the petri dish, and then placed in anaerobic conditions. Another improvement method was also based on the methods of GB/T 8538.4.55-2008. After filtration, the membrane was placed on the SPS culture medium at the reverse side, and then placed in anaerobic conditions. Using the two improved methods, the colonies of *C. perfringens* on the filtration membrane could turn black obviously after 24 h incubation in anaerobic conditions. Obvious difference was found in the number of black colonies using the two improved methods. The first improved method would make *C. perfringens* colonies turn black easily and obviously, and it also makes easy to pick colonies for further studies.

Key words: drinking mineral water; *Clostridium perfringens*; methods; improvement

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 为厌氧芽胞菌, 是引起食源性胃肠炎常见的病原菌。在《饮用天然矿泉水》(GB 8537-2008) 标准中要求为 0 CFU/50 mL^[1]。《饮用天然矿泉水检验方法》(GB 8538-2008) 中规定, 产气荚膜梭菌在亚硫酸盐-多粘菌素-磺胺嘧啶琼脂(以下简称 SPS) 上经 24 h 厌氧环境

收稿日期: 2012-04-26

基金项目: 广东省科技计划项目 (2009B030500003); 粤港关键领域重点突破项目 (2009Z52)

作者简介: 潘宝怡 (1983-), 女, 学士, 主要从事微生物安全检测技术研究

通讯作者: 吴清平 (1962-), 男, 博士, 研究员, 主要从事食品安全研究

培养后应形成黑色菌落, 然后取黑色菌落作为疑似菌落再做进一步的确认试验加以证实^[2], 但在实际操作中发现, 按照 GB/T 8538.4.55-2008 中产气荚膜梭菌的检测方法, 滤膜上的产气荚膜梭菌在 SPS 培养基上经 24 h 厌氧环境培养后无明显黑色菌落产生, 而如生长出来的为非黑色菌落, 则为非疑似菌落, 有可能导致漏检, 不能真实反映样品中产气荚膜梭菌的存在情况。为解决这个问题, 本文对标准中的检验方法进行了改进^[3,4]。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

产气荚膜梭菌 ATCC13124 为广东省微生物研究所保存株, 产气荚膜梭菌分离株为从水样中分离的经 API 鉴定过的阳性菌株。

1.1.2 主要仪器

Bug Box 厌氧工作站 (英国)。

1.1.3 主要试剂

亚硫酸盐-多粘菌素-磺胺嘧啶琼脂(SPS)、疱肉培养基和血平板等培养基均购自广东环凯微生物科技有限公司, 0.22 μm 滤膜购自 Millipore (美国)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌液制备

将标准菌株产气荚膜梭菌 ATCC13124 接种疱肉培养基培养, 然后在血平板上分区划线, 置厌氧环境培养, 直至出现产气荚膜梭菌明显的菌落特征。取增菌培养后的疱肉培养基至生理盐水作倍比稀释, 将菌落数控制在 10~100 CFU/mL。加 1 mL 经稀释后的菌液至 50 mL 的无菌水中作为人工污染水样备用。同样方法制备产气荚膜梭菌分离株的人工污染水样。

1.2.2 国标方法

分别取 50 mL 已添加产气荚膜梭菌 ATCC13124 和产气荚膜梭菌分离株的人工污染水样, 按 GB/T 8538.4.55-2008 用孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤, 然后将滤膜移至 SPS 琼脂培养基上, 倒置于 36 °C ± 1 °C 厌氧培养 24 h 观察结果。

1.2.3 国标改进方法一

同 1.2.2 方法分别将产气荚膜梭菌 ATCC13124 和产气荚膜梭菌分离株的人工污染水样进行过滤, 过滤完毕将滤膜移至 SPS 琼脂培养基上, 然后再用 SPS 培养基 (约 10 mL) 倾注于培养皿的膜上, 待培养基凝固后倒置于 36 °C ± 1 °C 厌氧培养 24 h 观察结果。

1.2.4 国标改进方法二

同 1.2.2 分别将产气荚膜梭菌 ATCC13124 和产气荚膜梭菌分离株的人工污染水样进行过滤, 过滤后将滤膜反贴于 SPS 培养基上, 然后放置厌氧培养。

1.2.5 实际样本检测

分别取 50 mL 实际水样按 1.2.2、1.2.3、1.2.4 所述进行检测。

2 结果与分析

采用不同的改进方法检测产气荚膜梭菌 ATCC13124 和产气荚膜梭菌分离株在 SPS 琼脂培养基的特征分别见图 1、图 2, 检测实际样本结果见图 3。

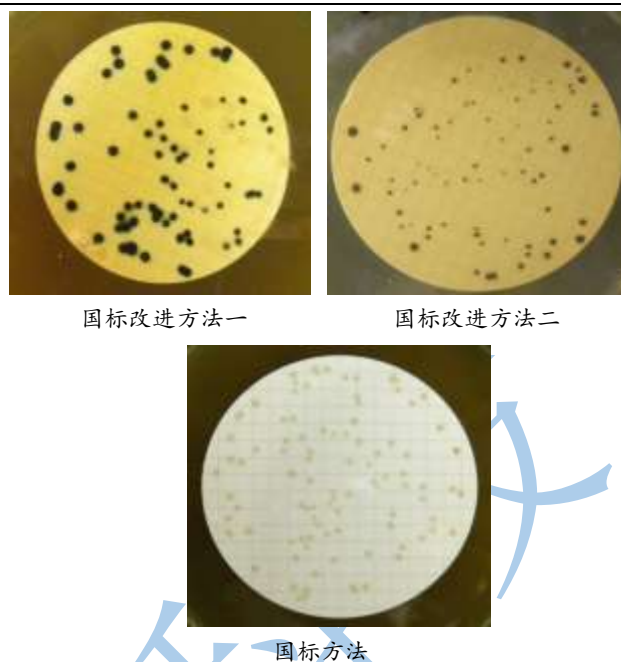


图 1 产气荚膜梭菌 ATCC13124 在 SPS 琼脂培养基上的特征

Fig.1 Features of *Clostridium perfringens* (ATCC13124) on SPS

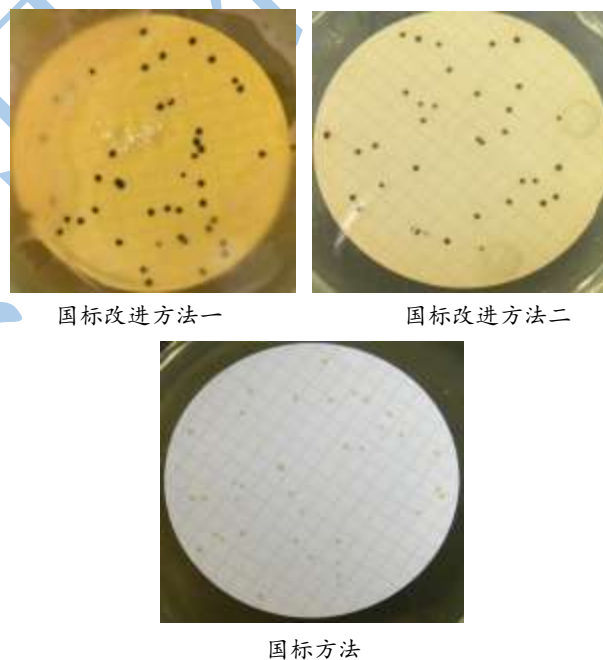


图 2 产气荚膜梭菌分离株在 SPS 琼脂培养基上的特征

Fig.2 Colony morphology of the isolate of *Clostridium perfringens* on SPS

由图 1 和图 2 可看出, 产气荚膜梭菌 ATCC13124 和产气荚膜梭菌分离株在 SPS 琼脂培养基厌氧培养 24 h 后, 国标方法无明显黑色菌落出现, 而国标改进方法一和国标改进方法二在 SPS 琼脂培养基上均可见明显的黑色菌落, 则黑色菌落作为疑似菌落按《饮用天然矿泉水检验方法》(GB/T 8538.4.55-2008) 做进一步的确证试验加以证实。

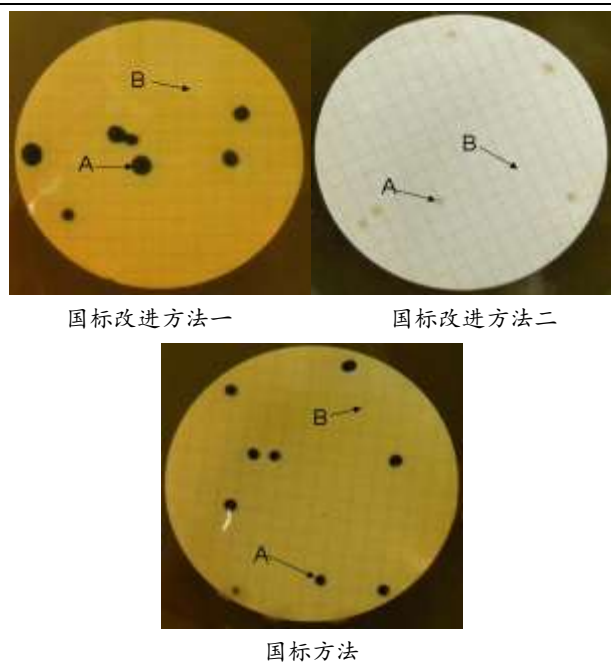


图3 实际样本中产气荚膜梭菌SPS琼脂培养基上的菌落特征

Fig.3 Colony morphology of *Clostridium perfringens* from actual samples on SPS

注：A 产气荚膜梭菌，B 非产气荚膜梭菌。

由图3可看出，国标方法中SPS琼脂培养基上菌落A、B均为非黑色菌落，而国标改进方法一和国标改进方法二中菌A均为黑色菌落，菌B均为淡黄色菌落，经进一步的鉴定菌A为产气荚膜梭菌，菌B非经鉴定为产气荚膜梭菌，国标改进方法一和国标改进方

法二则可把二种菌从形态上区别。

3 结论

3.1 产气荚膜梭菌具有还原亚硫酸盐的能力，把SPS琼脂培养基中的亚硫酸盐还原为硫化物，再与柠檬酸铁铵反应产生黑色沉淀，使菌落呈黑色^[5]。除产气荚膜梭菌外，其它的梭状芽孢杆菌则被磺胺嘧啶钠和多粘菌素B所抑制^[6,7]，因此黑色菌落具有一定的特征性。国标改进方法一按GB/T 8538.4.55-2008进行过滤后增加一步骤，用SPS培养基倾注于培养皿的膜上，然后放置厌氧培养，国标改进方法二按GB/T 8538.4.55-2008进行过滤后将滤膜反贴于SPS培养基上，然后放置厌氧培养24h后，产气荚膜梭菌ATCC13124和产气荚膜梭菌分离株均明显出现了黑色菌落。

3.2 国标方法无明显黑色菌落产生，国标改进方法一和国标改进方法二产生的黑色菌落数与国标方法相比，具有显著性差异(P<0.01)。从以上实验可以看出滤膜上的产气荚膜梭菌与SPS培养基直接接触，有利于黑色菌落的形成，且实际样本的检测亦证实了这一点。国标改进方法一和国标改进方法二均利于黑色菌落的形成，但由于国标改进方法二的滤膜是反贴于SPS培养基上，不易于挑取菌落做进一步的验证试验，因此，国标改进方法一更适于GB/T8538-2008《饮用天然矿泉水检验方法》中产气荚膜梭菌的检测。

表1 产气荚膜梭菌在SPS琼脂培养基上(厌氧培养24h)的特征

Table 1 Colony morphology of *Clostridium perfringens* on SPS (24h in anaerobic conditions)

方法	产气荚膜梭菌 ATCC13124		产气荚膜梭菌分离株菌落形态	
	菌落形态	黑色菌落数量/(CFU/50mL)	菌落形态	黑色菌落数量/(CFU/50mL)
国标改进方法一	黑色，圆形，中等大小 (菌落大小比国标方法大)	74±5*	黑色，圆形，中等大小 (菌落大小比国标方法略大)	44±4*
国标改进方法二	黑色，圆形，中等大小	75±4*	黑色，圆形，中等大小(菌落大小比国标方法略大)	42±3*
国标方法	淡黄色，圆形，中等大小	0	淡黄色，圆形，中等大小	0

注：国标改进方法一、国标改进方法二与国标方法比较，P均<0.01，具有显著性差异；国标改进方法一与国标改进方法比较，产气荚膜梭菌ATCC13124 P=0.83，产气荚膜梭菌分离株 P=0.30，P均>0.05，无显著性差异。

表2 实际样本中产气荚膜梭菌在SPS琼脂培养基上的特征

Table 2 Colony morphology of *Clostridium perfringens* from actual samples on SPS

方法	菌A(产气荚膜梭菌) 菌落形态	菌B(非产气荚膜梭菌) 菌落形态
国标改进方法一	黑色，圆形，中等大小(菌落大小比国标方法大)	淡黄色，圆形，较小
国标改进方法二	黑色，圆形，中等大小(菌落大小比国标方法略大)	淡黄色，圆形，较小
国标方法	淡黄色，圆形，中等大小	淡黄色，圆形，较小

(下转第1265页)

参考文献

- [1] GB8537-2008. 饮用天然矿泉水[S].
- [2] GB/T8538-2008. 饮用天然矿泉水检验方法[S].
- [3] 姚勇芳,方壮育. 食品中大肠菌群实际检测过程中关键问题

- 的探讨[J].现代食品科技,2008,11:1183-1185
- [4] 张淑红,吴清平,徐晓可,等.桶装水中铜绿假单胞菌检测方法的比较[J].现代食品科技,2011,11:1403-1405
- [5] 纪绍梅.微生物培养基质控与图解[M].北京科学技术出版社,2006
- [6] 陈天寿,严德喜,李根生,等.微生物培养基的制造与应用[M].中国农业出版社,1995
- [7] 姚积源,居建华,顾伟忠,等.产气荚膜梭菌检验培养基—改良 SPS 的研究[J].中国卫生检验杂志,2002,12(3):339

现代食品科技