

食品微生物之檢驗方法－產氣莢膜桿菌之檢驗

Methods of Test for Food Microorganisms -

Test of *Clostridium perfringens*

第一部：產氣莢膜桿菌之分離、計數及鑑別

1. 適用範圍：本方法適用於食品中產氣莢膜桿菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經系列稀釋後，以選擇性培養基培養及計數之方法，或增菌培養後進行定性分析。
  - 2.1. 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，操作平台光度為100呎燭光，密閉室內換氣良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣。每15分鐘落菌數不得超過15 CFU/培養皿。
  - 2.2. 器具及材料
    - 2.2.1. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
    - 2.2.2. 乾熱滅菌器：能維持內部溫度在 $170 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 者。
    - 2.2.3. 高壓滅菌釜：可達 $121^{\circ}\text{C}$ 以上者。
    - 2.2.4. 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
    - 2.2.5. 培養箱：能維持內部溫差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
    - 2.2.6. 天平：可稱量到2000 g者，靈敏度為0.1 g，可稱量到100 g者，靈敏度為1 mg。
    - 2.2.7. 攪拌均質器或鐵胃：適用於無菌操作者。
    - 2.2.8. 電磁加熱攪拌器。
    - 2.2.9. 顯微鏡：位相差顯微鏡或能放大至1000倍之光學顯微鏡。
    - 2.2.10. 酸鹼度測定儀。
    - 2.2.11. 水浴：能維持水溫溫差在 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 以內者。
    - 2.2.12. 旋渦混合器。
    - 2.2.13. 厭氧缸或厭氧培養箱。
    - 2.2.14. 吸管輔助器或微量吸管。
    - 2.2.15. 吸管：已滅菌，1 mL吸管應有0.01 mL之刻度；5 mL及10 mL吸管應有0.1 mL之刻度。
    - 2.2.16. 吸管尖：已滅菌，100  $\mu\text{L}$ 及1000  $\mu\text{L}$ 。
    - 2.2.17. 容器：附螺旋蓋之玻璃、聚乙烯、鐵氟龍或其他能耐 $121^{\circ}\text{C}$

濕熱滅菌20分鐘以上之三角錐瓶、玻璃瓶或廣口瓶，或無菌袋。

- 2.2.18. 試管：附螺旋蓋，16 × 125 mm、16 × 150 mm、20 × 150 mm 或其他適用者。
- 2.2.19. 氣體包：適合厭氧菌培養者。
- 2.2.20. 杜蘭發酵管(Durham fermentation tube)：外徑9 × 22 mm或其他適用者。
- 2.2.21. 培養皿：已滅菌，內徑約90 mm，深度約15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮痕或其他缺點。
- 2.2.22. 接種針及接種環(直徑約3 mm)：鎳鉻合金、鉑鈹或鉻線材質，或可拋棄式者。
- 2.2.23. 剪刀、藥勺、小刀及鑷子：可滅菌。
- 2.2.24. 塗抹曲棒：可滅菌，或可拋棄式者。
- 2.2.25. 無菌濾膜：孔徑0.45 μm以下之親水性濾膜。
- 2.2.26. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢者。
- 2.2.27. 濾紙及褐色試藥瓶。
- 2.2.28. 蠟筆或麥克筆：塗寫、劃記載玻片時使用。
- 2.2.29. 研鉢、杵：研磨試藥用。
- 2.2.30. 試藥：95%乙醇、中性紅(neutral red)、水楊苷(salicin)、半乳糖(galactose)、可溶性澱粉(soluble starch)、甘油(glycerol)、冰醋酸、抗壞血酸鈉(sodium ascorbate)、沙黃O(safranin O)、乳糖(lactose)、亞硫酸氫鈉(NaHSO<sub>3</sub>)、刃天青鈉鹽(resazurin sodium salt)、胱胺酸(L-cystine)、草酸銨(ammonium oxalate)、氫氧化鈉、氫氧化銨、硫乙醇酸(thioglycollic acid)、硫乙醇酸鈉(sodium thioglycollate)、硫酸亞鐵(FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O)、硫酸鎂(MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O)、酚紅(phenol red)、棉子糖(raffinose)、氯化鈉、氯化鈷(cobalt chloride hexahydrate)、無水硫酸鎂(MgSO<sub>4</sub>)、硝酸鉀(KNO<sub>3</sub>)、結晶紫(crystal violet)、萘基乙二胺鹽酸鹽 [ *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride ]、溴瑞香草酚藍(bromothymol blue)、碘、碘化鉀、葡萄糖(glucose)、對-胺基苯磺酸(sulfanilic acid)、碳酸鈉(sodium carbonate)、醋酸銨(CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>)、鋅粉、環絲胺酸(D-cycloserine)、磷酸二氫鉀(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、磷酸氫二鈉(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、磷酸氫二鈉

( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )及檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate)均採用化學試藥級。大豆蛋白胨(soytone)、牛心(beef heart)、牛肉抽出物(beef extract)、明膠(gelatin)、胨蛋白胨(proteose peptone)、洋菜(agar)、胰化蛋白胨(tryptose)、胰蛋白胨(tryptone)、蛋白胨(peptone)、新蛋白胨(neopeptone)、聚蛋白胨(polypeptone)及酵母抽出物(yeast extract)採用微生物級。

### 2.2.31. 試劑

#### 2.2.31.1. 0.1%蛋白胨稀釋液(0.1% Peptone diluent)

取蛋白胨1 g，溶於蒸餾水1000 mL，分裝於容器，以 $121^\circ\text{C}$ 滅菌15分鐘，最終pH值為 $7.0 \pm 0.2$ 。

#### 2.2.31.2. 革蘭氏染色液(Gram stain solution)<sup>(註1)</sup>

##### (1)哈克氏(Hucker's)結晶紫液(初染劑)

溶液A：取結晶紫2 g，溶於95%乙醇20 mL。

溶液B：取草酸銨0.8 g，溶於蒸餾水80 mL。

將溶液A與溶液B混合，靜置24小時後以濾紙過濾，取濾液作為初染劑。

##### (2)革蘭氏碘液(媒染劑)

取碘化鉀2 g及碘1 g，於研钵研磨5~10秒，加蒸餾水1 mL研磨，次加蒸餾水5 mL研磨，再加蒸餾水10 mL，研磨至碘化鉀和碘完全溶解，移入褐色瓶中，再以適量蒸餾水洗滌研钵及杵後，洗液併入瓶中，加蒸餾水使成300 mL，作為媒染劑。

##### (3)哈克氏(Hucker's)複染液(複染劑)

取沙黃O 2.5 g，溶於95%乙醇100 mL，作為複染原液。使用時，取複染原液10 mL，加入蒸餾水90 mL，供作複染劑。

註1：革蘭氏染色液因放久可能失效，購買成品時，應注意其保存期限；自行配製者，應檢查其染色效果。

#### 2.2.31.3. 亞硝酸鹽試驗試劑(Nitrite test reagents)

試劑A：取對-胺基苯磺酸1 g，溶於5 N醋酸125 mL。

試劑B：取萘基乙二胺鹽酸鹽0.25 g，溶於5 N醋酸200 mL。

- 2.2.31.4. 0.66 M碳酸鈉溶液  
取碳酸鈉7.0 g，溶於蒸餾水使成100 mL，經無菌濾膜過濾後，注入已滅菌之容器中。
- 2.2.31.5. 0.32%氯化鈷( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )溶液  
取氯化鈷0.32 g，溶於蒸餾水使成100 mL，經無菌濾膜過濾後，注入已滅菌之容器中。
- 2.2.31.6. 1.5%抗壞血酸鈉溶液  
取抗壞血酸鈉1.5 g，溶於蒸餾水使成100 mL，經無菌濾膜過濾後，注入已滅菌之容器中。
- 2.2.31.7. 溴瑞香草酚藍試紙  
取溴瑞香草酚藍2 g，溶於蒸餾水使成1000 mL，以氫氧化銨使成微鹼性後，將直徑15 cm之濾紙浸入該溶液，取出自然乾燥後，貯存備用。
- 2.2.31.8. 0.04%溴瑞香草酚藍溶液  
取溴瑞香草酚藍0.2 g，溶於0.01 N氫氧化鈉溶液32 mL，再加蒸餾水使成500 mL。
- 2.2.31.9. 10%水楊苷溶液  
取水楊苷10 g，溶於蒸餾水使成100 mL，經無菌濾膜過濾後，注入已滅菌之容器中。
- 2.2.31.10. 10%棉子糖溶液  
取棉子糖10 g，溶於蒸餾水使成100 mL，經無菌濾膜過濾後，注入已滅菌之容器中。
- 2.2.31.11. 0.85%生理食鹽水  
取氯化鈉8.5 g，溶於蒸餾水1000 mL，分裝於試管中，以121°C滅菌15分鐘。
- 2.2.31.12. 逆相被動乳膠凝集(Reversed passive latex agglutination, RPLA)試劑套組：可檢驗產氣莢膜桿菌之腸毒素。
- 2.2.31.13. 70%乙醇溶液  
取95%乙醇737 mL，加蒸餾水使成1000 mL。
- 2.2.31.14. 2 M碳酸鈉溶液  
取碳酸鈉21.2 g，溶於蒸餾水使成100 mL。
- 2.2.32. 培養基
- 2.2.32.1. 胰化蛋白胨-亞硫酸鹽-環絲胺酸培養基  
(Tryptose-sulfite-cycloserine agar, TSC)

(a)基礎培養基(basal medium)

胰化蛋白胨(tryptose)	15 g
酵母抽出物(yeast extract)	5 g
大豆蛋白胨(soytone)	5 g
檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate)	1 g
亞硫酸氫鈉(NaHSO <sub>3</sub> )	1 g
洋菜(agar)	20 g
蒸餾水	900 mL

加熱沸騰溶解後，調整pH值至 $7.6 \pm 0.2$ ，分取250 mL 注入容器中，以121°C滅菌15分鐘。

(b)0.5%環絲胺酸溶液(0.5% D-cycloserine solution)

取環絲胺酸1 g，溶於蒸餾水200 mL，經無菌濾膜過濾後，濾液冷藏備用。

(c)無蛋黃胰化蛋白胨-亞硫酸鹽-環絲胺酸培養基

(egg yolk-free tryptose-sulfite-cycloserine agar, EY-free TSC)

將已滅菌之基礎培養基保持在50°C，於每250 mL徐徐加入0.5%環絲胺酸溶液20 mL，混合均勻。培養基倒入培養皿前，應搖動混合，使絮狀沈澱物分散均勻，搖動時應避免產生氣泡，每一培養皿約倒入6~7 mL (雙層培養基用)，於室溫下隔夜，使培養基之表面乾燥，冷藏備用。使用時應先檢查有無微生物之污染。

(d)50%蛋黃液(egg yolk emulsion)

雞蛋洗淨，浸入70%乙醇溶液1小時，以無菌針筒無菌操作取出蛋黃，加入等量之0.85%生理食鹽水，混勻，冷藏備用。

(e)蛋黃胰化蛋白胨-亞硫酸鹽-環絲胺酸培養基

(egg yolk tryptose-sulfite-cycloserine agar, EY-TSC)

將已滅菌之EY-free TSC培養基保持在45~50°C，於每250 mL徐徐加入50%蛋黃液20 mL，混合均勻。培養基倒入培養皿前，應搖動混合，使絮狀沈澱物分散均勻，搖動時應避免產生氣泡，每一培養皿倒入6~7 mL (雙層培養基用)或18 mL (單層培養基用)，以下操作與本節(c)相同。

### 2.2.32.2. 改良式肉質培養基(Cooked meat medium, modified)

#### (a)肉質培養基(Cooked meat medium)

牛心(beef heart)	454 g
胰蛋白胨(tryptone)	20 g
葡萄糖(glucose)	2 g
氯化鈉(NaCl)	5 g

#### (b)稀釋液

胰蛋白胨(tryptone)	10 g
硫乙醇酸鈉(sodium thioglycollate)	1 g
可溶性澱粉(soluble starch)	1 g
葡萄糖(glucose)	2 g
1%中性紅溶液(neutral red)	5 mL
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，調整pH值至 $6.8 \pm 0.2$ ，分取15 mL注入 $20 \times 150$  mm試管中。分取乾燥肉質培養基1 g，加入稀釋液15 mL，充分混合並靜置直至各粒狀成分皆濕透後，以 $121^\circ\text{C}$ 滅菌15分鐘。

### 2.2.32.3. 液態硫乙醇酸鹽培養基(Fluid thioglycollate medium, FTG)

胱氨酸(L-cystine)	0.5 g
氯化鈉(NaCl)	2.5 g
葡萄糖(glucose)	5 g
酵母抽出物(yeast extract)	5 g
胰蛋白胨(tryptone)	15 g
硫乙醇酸鈉或硫乙醇酸 (sodium thioglycollate or thioglycollic acid)	0.5 g
刃天青鈉溶液(resazurin, sodium solution 1:1000)	1 mL
洋菜(agar)	0.75 g
蒸餾水	1000 mL

於胱氨酸、氯化鈉、葡萄糖、酵母抽出物、胰蛋白胨及洋菜中加入蒸餾水1000 mL，加熱沸騰溶解後，再加入硫乙醇酸鈉或硫乙醇酸，溶解後調整pH值，加入刃天青鈉溶液，混合均勻。分取10 mL注入 $16 \times 150$  mm試管中，以 $121^\circ\text{C}$ 滅菌20分鐘後急速冷卻，最終pH值為 $7.1 \pm 0.2$ ，使用時調製。

- 2.2.32.4. 鐵鹽牛乳培養基(Iron milk medium, modified)
- |   |         |
|---|---------|
| 全脂鮮牛乳(fresh whole milk)                           | 1000 mL |
| 硫酸亞鐵( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) | 1 g     |
| 蒸餾水   | 50 mL   |
- 將硫酸亞鐵溶於蒸餾水後，再徐徐加入全脂鮮牛乳，並同時以電磁攪拌器混合均勻，分取11 mL注入16 × 150 mm試管中，以118°C滅菌12分鐘，使用時調製。
- 2.2.32.5. 乳糖-明膠培養基(Lactose-gelatin medium)
- |                      |         |
|----------------------|---------|
| 胰化蛋白胍(tryptose)      | 15 g    |
| 酵母抽出物(yeast extract) | 10 g    |
| 乳糖(lactose)          | 10 g    |
| 酚紅(phenol red)       | 0.05 g  |
| 明膠(gelatin)          | 120 g   |
| 蒸餾水                  | 1000 mL |
- 於胰化蛋白胍、酵母抽出物及乳糖中加入蒸餾水400 mL，加熱溶解，另於明膠中加入蒸餾水600 mL，並於50~60°C攪拌使之溶解。混合二溶液，調整pH值至7.5 ± 0.2，再加入酚紅。分取10 mL注入已裝有發酵管之16 × 150 mm試管中，以121°C滅菌10分鐘。配製完成之培養基於8小時內未使用者，使用前須先於50~70°C加熱2~3小時，以除去空氣。
- 2.2.32.6. 產芽孢培養液(Sporulation broth)
- |                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| 聚蛋白胍(polypeptone)                  | 15 g    |
| 酵母抽出物(yeast extract)               | 3 g     |
| 可溶性澱粉(soluble starch)              | 3 g     |
| 無水硫酸鎂( $\text{MgSO}_4$ )           | 0.1 g   |
| 硫乙醇酸鈉(sodium thioglycollate)       | 1 g     |
| 磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) | 11 g    |
| 蒸餾水                                | 1000 mL |
- 加熱溶解後，調整pH值至7.8 ± 0.1，再分取15 mL注入20 × 150 mm試管中，以121°C滅菌15分鐘。
- 2.2.32.7. 運動性-硝酸鹽培養基(Motility-nitrate medium, buffered)
- |                     |     |
|---------------------|-----|
| 牛肉抽出物(beef extract) | 3 g |
| 蛋白胍(peptone)        | 5 g |

硝酸鉀(KNO <sub>3</sub> )	1 g
磷酸氫二鈉(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.5 g
半乳糖(galactose)	5 g
甘油(glycerol)	5 mL
洋菜(agar)	3 g
蒸餾水	1000 mL

將各成分(洋菜除外)加熱溶解後，調整pH值至 $7.3 \pm 0.1$ ，再加入洋菜，加熱沸騰使其完全溶解並混合均勻後，分取11 mL注入 $16 \times 150$  mm試管中，以 $121^\circ\text{C}$ 滅菌15分鐘。配製完成之培養基於4小時內未使用者，使用前須先於沸水或蒸汽中加熱10分鐘後，於冷水中冷卻。

#### 2.2.32.8. 史布雷氏發酵培養基(Spray's fermentation medium)

胰蛋白胨(tryptone)	10 g
新蛋白胨(neopeptone)	10 g
硫乙醇酸鈉(sodium thioglycollate)	0.25 g
洋菜(agar)	2 g
蒸餾水	1000 mL

將各成分(洋菜除外)加熱溶解後，調整pH值至 $7.4 \pm 0.2$ ，再加入洋菜，加熱沸騰使其完全溶解並混合均勻後，分取9 mL注入已裝有發酵管之 $16 \times 125$  mm試管中，以 $121^\circ\text{C}$ 滅菌15分鐘。

#### 2.2.32.9. 改良式AE產芽孢培養基

(AE sporulation medium, modified)

聚蛋白胨(polypeptone)	10 g
酵母抽出物(yeast extract)	10 g
磷酸氫二鈉(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	4.36 g
磷酸二氫鉀(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.25 g
醋酸銨(CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> )	1.5 g
硫酸鎂(MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	0.2 g
蒸餾水	1000 mL

將各成分加熱溶解後，以2 M碳酸鈉溶液調整pH值至 $7.5 \pm 0.1$ ，再分取15 mL注入 $20 \times 150$  mm試管中，以 $121^\circ\text{C}$ 滅菌15分鐘。滅菌後，於每試管中加入已無菌過濾之10%棉子糖溶液0.6 mL、0.66 M碳酸鈉溶液0.2 mL及0.32%氣



化鈷溶液0.2 mL。測試1~2支試管之pH值，pH值應為7.8 ± 0.1。使用時先以蒸汽加熱10分鐘，冷卻後於每試管中加入已無菌過濾之1.5%抗壞血酸鈉溶液0.2 mL。

#### 2.2.32.10. 改良式Duncan-Strong產芽孢培養基

(Duncan-Strong sporulation medium, modified)

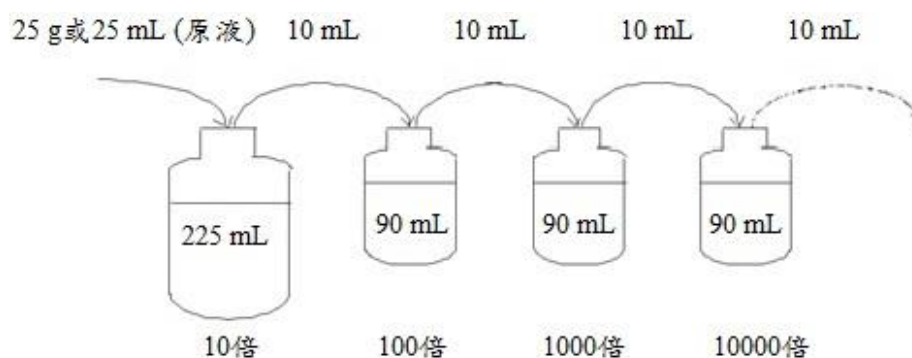
胨蛋白朊(proteose peptone)	15 g
酵母抽出物(yeast extract)	4 g
硫乙醇酸鈉(sodium thioglycollate)	1 g
磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	10 g
棉子糖(raffinose)	4 g
蒸餾水	1000 mL

將各成分加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘。使用時以已無菌過濾之0.66 M碳酸鈉溶液調整pH值至7.8 ± 0.1。

### 2.3. 檢液之調製<sup>(註2,3)</sup>

- 2.3.1. 固態檢體：將檢體適當切碎、混勻後，取25 g，加入0.1%蛋白朊稀釋液225 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。
- 2.3.2. 粉狀、粒狀或其他易於粉碎之檢體：使用已滅菌之藥勺或其他用具將檢體粉碎、混勻後，取25 g，加入0.1%蛋白朊稀釋液225 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。
- 2.3.3. 液態檢體：將檢體混勻後，取25 mL，加入0.1%蛋白朊稀釋液225 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。
- 2.3.4. 冷凍檢體：須解凍者，如冷凍魚肉、禽畜肉、蔬果、水餃等，應在冷藏之溫度下解凍(如2~5°C，18小時內即可解凍完全)；亦可使用較高溫度快速解凍(如45°C以下之水浴，15分鐘內解凍者)，解凍時應經常搖動檢體，以加速解凍。俟檢體解凍後，再予以適當切碎、混勻。不須解凍者，如食用冰塊、冰棒、冰淇淋等冰類製品，應先使成適當小塊，取25 g，加入0.1%蛋白朊稀釋液225 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。
- 2.3.5. 凝態及濃稠液態檢體：如布丁、煉乳等檢體，經適當攪拌混勻後，取25 g，加入0.1%蛋白朊稀釋液225 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。
- 2.3.6. 系列稀釋檢液：使用已滅菌之吸管，吸取上述之10倍稀釋檢液10 mL，加至0.1%蛋白朊稀釋液90 mL中，依序作成一系

列適當之100倍、1000倍、10000倍等稀釋檢液，其稀釋方法如下圖所示。



註2：處理含油脂量多、不易勻散及易起泡沫之檢體時，應加入適量已滅菌之乳化劑(如Tween 80，使其於檢液中濃度為1%)，並充分振搖，使之乳化。

註3：檢體總量不足25 g (mL)時，應依檢體量，添加適量之0.1%蛋白胨稀釋液，作成10倍稀釋檢液。

## 2.4. 鑑別試驗

### 2.4.1. 分離培養

#### 2.4.1.1. 直接平板法

2.4.1.1.1. 將2.3.節之稀釋檢液及(或)原液充分搖勻後，分別吸取1 mL注入已裝有EY-free TSC培養基之培養皿中，每一稀釋檢液及(或)原液至少作二重複，各培養皿中再倒入已冷卻至45~50°C之EY-free TSC培養基15 mL，迅即輕輕搖動，使稀釋檢液及(或)原液與培養基混合均勻，靜置待培養基凝固後，使成雙層培養基(double-layer medium)，正置於35°C厭氧培養20~24小時，觀察所形成菌落之生長狀態。若菌落為黑色則為可疑之產氣莢膜桿菌，鉤取可疑菌落接種於剛滅菌並急速冷卻之液態硫乙醇酸鹽培養基中，於35°C厭氧培養18~24小時。

2.4.1.1.2. 除2.4.1.1.1.節所述方法外，亦可將2.3.節之稀釋檢液及(或)原液充分搖勻後，分別吸取0.1 mL注入已裝有EY-TSC培養基之培養皿中，每一稀釋檢液及(或)原液至少作二重複，以曲玻棒均勻塗抹培養基表面，約5分鐘後再倒入已冷卻至45~50°C之EY-free TSC培養基10

mL，迅即輕輕搖動，使培養基均勻覆蓋，靜置待培養基凝固後，使成雙層培養基，正置於35°C厭氧培養20~24小時，觀察所形成菌落之生長狀態。菌落為黑色，通常外圍有2~4 mm不透明之白色環帶，則為可疑之產氣莢膜桿菌，鉤取可疑菌落接種於剛滅菌並急速冷卻之液態硫乙醇酸鹽培養基中，於35°C厭氧培養18~24小時。

#### 2.4.1.2. 增菌培養

將已滅菌之改良式肉質培養基以蒸汽或沸水加熱10分鐘，並靜置急速冷卻，立刻將2.3.節之10倍稀釋檢液及(或)原液充分搖勻，並各吸取2 mL分別注入3或4支上述之改良式肉質培養基中，於35°C厭氧培養24~48小時。如2.4.1.1.節之分離培養基上有可疑之產氣莢膜桿菌菌落生長時，則本節可省略。

#### 2.4.2. 菌株純化

自2.4.1.1.節之液態硫乙醇酸鹽培養基或2.4.1.2.節之改良式肉質培養基鉤取一接種環量之培養液，在EY-TSC培養基表面劃線後，於35°C厭氧培養 $24 \pm 2$ 小時，觀察所形成菌落之生長狀態。鉤取圓形、直徑約1~2 mm、呈黃灰色且外圍有2~4 mm不透明環帶之菌落，接種於剛滅菌並急速冷卻之液態硫乙醇酸鹽培養基中，於35°C厭氧培養24小時。

#### 2.4.3. 革蘭氏染色(Gram stain)

- (1)於載玻片上加適量0.85%生理食鹽水，以接種針(或環)適量鉤取2.4.2.節EY-TSC培養基生長之純化菌株，均勻塗抹成薄抹片，風乾後於火焰上迅速來回3~4次微熱固定，勿直接火烤。
- (2)初染：將已固定之抹片，用哈克氏結晶紫液染1分鐘後，水洗。
- (3)媒染：加革蘭氏碘液作用1分鐘後，水洗。
- (4)脫色：用95%乙醇洗至不再有紫色褪出時，再水洗，此步驟僅約30秒，惟視抹片之厚薄而定。
- (5)複染：用哈克氏複染液複染30秒後，水洗。
- (6)自然風乾。
- (7)鏡檢：呈現深紫色者為革蘭氏陽性菌，呈現淡紅色者為

革蘭氏陰性菌。產氣莢膜桿菌為革蘭氏染色陽性，肥厚之短桿狀。

#### 2.4.4. 鐵鹽-牛乳推定試驗(Iron-milk presumptive test)

自2.4.2.節生長良好之培養液中吸取1 mL，接種於鐵鹽牛乳培養基後，於46°C水浴培養2小時後，每隔1小時觀察是否發生劇烈發酵作用。於5小時內，牛乳迅速凝固且碎裂成海綿團而上升至培養基表面者為正反應，否則為負反應。產氣莢膜桿菌為正反應(當劇烈發酵作用發生時，立即將試管取出，以免溢入水浴中)。

#### 2.4.5. 確定試驗

##### 2.4.5.1. 運動性試驗(Motility test)

自2.4.2.節之EY-TSC培養基鈎菌，穿刺接種於運動性-硝酸鹽培養基約1/3深，於35°C厭氧培養24±2小時。沿穿刺線呈擴散狀生長或培養基呈混濁者為正反應，否則為負反應。產氣莢膜桿菌為負反應。

##### 2.4.5.2. 硝酸鹽還原試驗(Nitrate reduction test)

取亞硝酸鹽試驗試劑A 0.5 mL及試劑B 0.2 mL，加入2.4.5.1.節已培養24小時後之運動性-硝酸鹽培養基中，輕輕搖勻後觀察結果，於5分鐘內呈現紫色則為正反應，顏色無變化時加入少許鋅粉並靜置數分鐘而有紫色呈現時則為負反應，否則亦為正反應。產氣莢膜桿菌為正反應。

##### 2.4.5.3. 乳糖發酵試驗(Lactose fermentation test)

自2.4.2.節之EY-TSC培養基鈎菌，接種於乳糖-明膠培養基中，於35°C厭氧培養24小時，顏色由紅色變成黃色且有氣體產生者為正反應，否則為負反應。產氣莢膜桿菌為正反應。

##### 2.4.5.4. 明膠液化試驗(Gelatin liquefaction test)

將2.4.5.3.節已培養24小時之乳糖-明膠培養基取出，於5°C冰箱，經1小時而有液化現象者為正反應，否則為負反應。為負反應時，須再於35°C繼續厭氧培養24小時後，取出於5°C冰箱中放置1小時，再行觀察。產氣莢膜桿菌為正反應。

#### 2.4.5.5. 產芽孢試驗(Sporulation test)

自2.4.2.節之培養液吸取1 mL，接種於產芽孢培養液中，於35°C厭氧培養24小時後，作革蘭氏染色並鏡檢，其芽孢為橢圓形、偏中間位置者，為可疑產氣莢膜桿菌。

#### 2.4.5.6. 碳水化合物發酵試驗(Carbohydrate fermentation test)

經2.4.5.1.節~2.4.5.4.節試驗，其中有任何一項之試驗結果無法判定為可疑產氣莢膜桿菌時，則須進行碳水化合物發酵試驗。取三支已滅菌之史布雷氏發酵培養基於沸水或蒸汽中加熱以除去空氣，並急速冷卻。第一支試管立刻加入無菌之10%水楊苷溶液1 mL，第二支試管立刻加入無菌之10%棉子糖溶液1 mL，而第三支試管則不加任何溶液(作對照組用)，取2.4.2.節液態硫乙醇酸鹽培養基之增菌液各0.1 mL，分別加入上述三支試管中，於35°C厭氧培養24小時後，進行2.4.5.6.1.節或2.4.5.6.2.節以觀察其產酸及產氣情形。

2.4.5.6.1. 自培養24小時之三支試管各鉤取一接種環量之培養液，置於溴瑞香草酚藍試紙上，顏色無變化或呈現淺綠色者，表示產酸，且發酵管內有氣體產生者即為正反應，否則為負反應。對照組顏色應無變化，且無氣體產生。為負反應時，則繼續培養48小時後，再觀察結果。產氣莢膜桿菌對於水楊苷之反應為不產酸亦不產氣，對於棉子糖之反應為產酸。

2.4.5.6.2. 自培養24小時之三支試管各吸取培養液1 mL，分別置入另一試管中，再加入0.04%溴瑞香草酚藍溶液1或2滴，呈現黃色或淺綠色者表示產酸，且發酵管內氣體產生者即為正反應，否則為負反應。對照組顏色應無變化，且無氣體產生。為負反應時，則繼續培養48小時後，再觀察結果。產氣莢膜桿菌對於水楊苷之反應為不產酸亦不產氣，對於棉子糖之反應為產酸。

### 2.5. 判定

2.5.1. 產氣莢膜桿菌陽性者，應符合下表所列之結果。

試驗	正反應(+)	負反應(-)	產氣莢膜桿菌之反應 <sup>a</sup>
革蘭氏染色	深紫色、短桿菌、肥厚	淡紅色	+
鐵鹽-牛乳推定試驗	牛乳迅速凝固，且碎裂成海綿團而上升至培養基表面上之劇烈發酵作用	無劇烈發酵作用	+
運動性試驗	有擴散狀生長或培養基呈混濁	無擴散狀生長或培養基呈透明	-
硝酸鹽還原試驗	紫色	原色 <sup>b</sup>	+
乳糖發酵試驗	黃色、產氣	原色、不產氣	+
明膠液化試驗	呈液化現象	不呈液化現象	+
產芽孢試驗	芽孢為橢圓形、偏中間位置	營養菌體	+
水楊苷發酵試驗	產酸及(或)產氣	不產酸、不產氣	-
棉子糖發酵試驗	產酸	不產酸	+

<sup>a</sup>「+」表示90%以上為正反應，「-」表示90%以上為負反應。

<sup>b</sup>當無紫色產生時加入少許鋅粉，而呈現紫色者為負反應，否則亦為正反應。

2.5.2. 由2.5.1.節判定為產氣莢膜桿菌陽性者，依2.6.節計算其菌數。

## 2.6. 計數

2.6.1. 選取2.4.1.1.1.節或2.4.1.1.2.節每片含20~200個可疑菌落同一稀釋倍數之所有平板予以計數，有不同之可疑菌落時，亦應分別予以計數，其菌數之表示方式為CFU/g或CFU/mL。

2.6.2. 計算菌數時，每片平板選取10個可疑菌落，依2.5.1.節判定為產氣莢膜桿菌陽性者，再依確定之比率計算其菌數。各稀釋倍數中僅有一種稀釋倍數平板之菌落數為20~200個時，應以該稀釋倍數之所有平板之菌落數平均值乘其稀釋倍數、確定之比率及稀釋因子，即得其菌數；但有兩種稀釋倍數平板之菌落數在20~200個之間時，則應依下列公式計算之，但計算檢體中產氣莢膜桿菌菌數時應將該數字第三位數字四捨六入(當第三位數字為五時，遇第二位數字為奇數時進位，偶數時捨去)，使其有效數字為兩位。

檢體中產氣英膜桿菌之菌數(CFU/g或CFU/mL)

$$= \frac{\left(\frac{Aa + Ab}{2}\right) \times A \times \frac{Ya}{Xa} + \left(\frac{Ba + Bb}{2}\right) \times B \times \frac{Yb}{Xb}}{2} \times F$$

A、B：稀釋倍數

Aa、Ab：A稀釋倍數各平板之菌落數

Ba、Bb：B稀釋倍數各平板之菌落數

Xa、Xb：A及B稀釋倍數各平板之可疑菌落數

Ya、Yb：A及B稀釋倍數各平板之可疑菌落，依2.5.1.節判定為產氣英膜桿菌陽性者

F (稀釋因子)：當選取2.4.1.1.1.節之平板予以計數時，則F為1；而選取2.4.1.1.2.節之平板予以計數時，則F為10 (因2.4.1.1.2.節之平板，僅加入稀釋檢液或原液0.1 mL)

## 2.7. 腸毒素之檢驗

2.7.1. 菌株要保存或運送至其他實驗室檢驗者，應先將分離純化菌株接種於改良式肉質培養基中，於35°C厭氧培養24小時後，再於室溫厭氧培養24小時，並保存於4°C。檢驗時，將上述培養液旋渦混合，各取0.5 mL接種至2支液態硫乙醇酸鹽培養基10 mL中。一支試管於75°C加熱10分鐘，再於35°C厭氧培養18小時；另一支試管於35°C厭氧培養4小時。上述培養基接種至改良式AE或Duncan-Strong產芽孢培養基15 mL中。

2.7.2. 分離純化菌株直接進行腸毒素檢驗時，將菌株接種至液態硫乙醇酸鹽培養基中，於35°C培養4小時，再取0.75 mL接種至改良式AE或Duncan-Strong產芽孢培養基15 mL中。

2.7.3. 將已接種之產芽孢培養基，於35°C厭氧培養18~24小時。以位相差顯微鏡或抹片染色確認產芽孢情形。取部分已產孢之培養液以10000 ×g離心15分鐘，上清液以逆相被動乳膠凝集試劑套組檢驗產氣英膜桿菌腸毒素，操作方法依照各商品說明。

附註：如使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或生化試驗鑑定系統，其檢驗結果有爭議時，以本檢驗方法為準。

## 第二部：產氣莢膜桿菌之real-time PCR檢測

1. 適用範圍：本方法適用於產氣莢膜桿菌菌種基因之鑑別。
2. 檢驗方法：檢體之增菌液或經分離純化後之菌株，經DNA萃取後，以即時聚合酶鏈反應(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)進行鑑別之方法。

2.1. 工作環境：工作平台需寬敞、潔淨、光線良好。檢體前處理、檢體DNA抽取、real-time PCR試劑配製及檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。Real-time PCR試劑之配製應於生物安全操作櫃內進行。

### 2.2. 裝置

- 2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System，或同級品。
- 2.2.2. 高壓滅菌釜：可達121°C以上者。
- 2.2.3. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(classII)(含)以上者。
- 2.2.4. 加熱振盪器：具溫控及振盪功能。
- 2.2.5. 微量冷凍離心機：可達20000 ×g，並具4°C溫控功能。
- 2.2.6. 離心機：供各式微量離心管離心用。
- 2.2.7. 分光光度計：具波長260 nm、280 nm。
- 2.2.8. 冷藏冷凍設備：具冷藏及凍結(-20°C)功能。
- 2.2.9. 旋渦混合器。
- 2.2.10. 酸鹼度測定儀。
- 2.2.11. 天平：最大稱重量為2000 g，靈敏度為0.1 g；最大稱重量為100 g，靈敏度為1 mg。

### 2.3. 試藥

- 2.3.1. DNA抽取用：適用於革蘭氏陽性細菌DNA抽取之市售套組。
- 2.3.2. Real-time PCR用<sup>(註1)</sup>

#### 2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針

產氣莢膜桿菌鑑別基因(標的基因：cpa gene)

引子F：5'-AAAAGAAAGATTTGTAAGGCGCTTAT-3'

引子R：5'-CCCAAGCGTAGACTTTAGTTGATG-3'

探針P：5'-(FAM)-TGCCGCGCTAGCAACTAGCCTATGG-(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小85 bp



註1：合成之引子及探針，拆封後，以無菌去離子水稀釋成適當濃度，分裝後於-20°C貯存備用，另探針需避光保存。探針5'端採用6-carboxy-fluorescein (FAM)標記，3'端採用Black Hole Quencher-1 (BHQ1)標記。

#### 2.3.2.2. TaqMan® Fast Reagents Starter Kit (適用於Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System)

本試劑內含real-time PCR所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時添加引子、探針及待測檢體DNA。

2.3.3. 對照用物質：產氣莢膜桿菌參考菌株或其DNA。

#### 2.4. 器具及材料<sup>(註2)</sup>

2.4.1. 微量吸管：10 µL、20 µL、200 µL及1000 µL。

2.4.2. 吸管尖：已滅菌，10 µL、20 µL、200 µL及1000 µL。

2.4.3. 離心管：200 µL、600 µL、1.5 mL及2 mL。

2.4.4. Real-time PCR反應管：100 µL。

2.4.5. Real-time PCR 96孔反應盤：適用於Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System。

2.4.6. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL及2000 mL。

註2：使用之塑膠或玻璃器皿均為無DNase污染。

#### 2.5. Real-time PCR溶液之配製<sup>(註3)</sup>

Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System鑑別試驗用

5 µM引子F..... 2.0 µL

5 µM引子R..... 2.0 µL

10 µM探針P..... 0.5 µL

TaqMan® Fast Reagents Starter Kit..... 13.0 µL

檢體DNA溶液..... 2.0 µL

無菌去離子水..... 5.5 µL

總體積..... 25.0 µL

註3：Real-time PCR溶液應於冰浴中配製。

#### 2.6. 檢體DNA溶液之製備

##### 2.6.1. 檢體增菌液之DNA溶液製備

自第一部份2.4.1.節增菌液中吸取菌液1 mL，置入已滅菌之1.5 mL離心管，以15000 ×g離心3分鐘，去除上清液。

### 2.6.1.1. 直接煮沸法

將沉澱物加入無菌去離水1 mL，旋渦混合均勻，以15000 ×g 離心3分鐘，去除上清液，重複操作一次。續將沉澱物加入無菌去離子水1 mL，旋渦混合均勻，置入加熱振盪器中煮沸10分鐘，取出離心管，作為檢體 DNA 原液，於-20°C冷凍保存。

### 2.6.1.2. 抽取DNA法

採用適用於革蘭氏陽性細菌DNA抽取之市售套組，依套組操作說明步驟抽取DNA。抽取之DNA溶液收集至已滅菌之1.5 mL離心管，作為檢體DNA原液，於-20°C冷凍保存。

### 2.6.2. 分離菌株之DNA溶液製備

自培養基上鉤取一接種環之菌量，置入內含無菌去離子水1 mL之已滅菌1.5 mL離心管，旋渦混合均勻，煮沸10分鐘，取出離心管，待冷卻後以15000 ×g離心3分鐘，吸取上清液至另一已滅菌之1.5 mL離心管，作為檢體DNA原液，於-20°C冷凍保存。亦可依2.6.1.2.節進行檢體DNA原液之製備。

### 2.6.3. DNA濃度測定及純度判斷

取適量之檢體DNA原液，以無菌去離子水做適當倍數之稀釋，分別測定260 nm及280 nm之吸光值(O.D.)。以波長260 nm吸光值乘50 ng/μL及稀釋倍數，即為檢體DNA原液濃度。DNA溶液純度則以O.D.<sub>260</sub>/O.D.<sub>280</sub>比值作判斷，其比值宜介於1.7~2.0。

## 2.7. 鑑別試驗

### 2.7.1. Real-time PCR操作步驟

以無菌去離子水適當稀釋檢體DNA原液、引子及探針備用。取已滅菌之離心管，依照2.5.節配製real-time PCR溶液，並注入real-time PCR反應盤的反應孔中，再將real-time PCR反應盤置於離心機中，以200 ×g瞬間離心後，移入real-time PCR反應器，依下列條件進行反應<sup>(註4)</sup>。同時另製作正反應及負反應對照組。

步驟	溫度	時間
1.熱活化	95°C	2 min
2.最初變性	95°C	15 sec

3.黏接、延展

60°C

30 sec

步驟2至步驟3，共進行40個循環反應。

註4：上述測定條件分析不適時，可依所用之儀器設定適合之測定條件。

#### 2.7.2. Real-time PCR 螢光分析

檢體DNA經real-time PCR反應後，直接從real-time PCR反應器上之螢幕觀察探針所產生之螢光增幅曲線，即可判讀反應結果。同時另測試正反應及負反應對照組。

#### 2.7.3. 確認

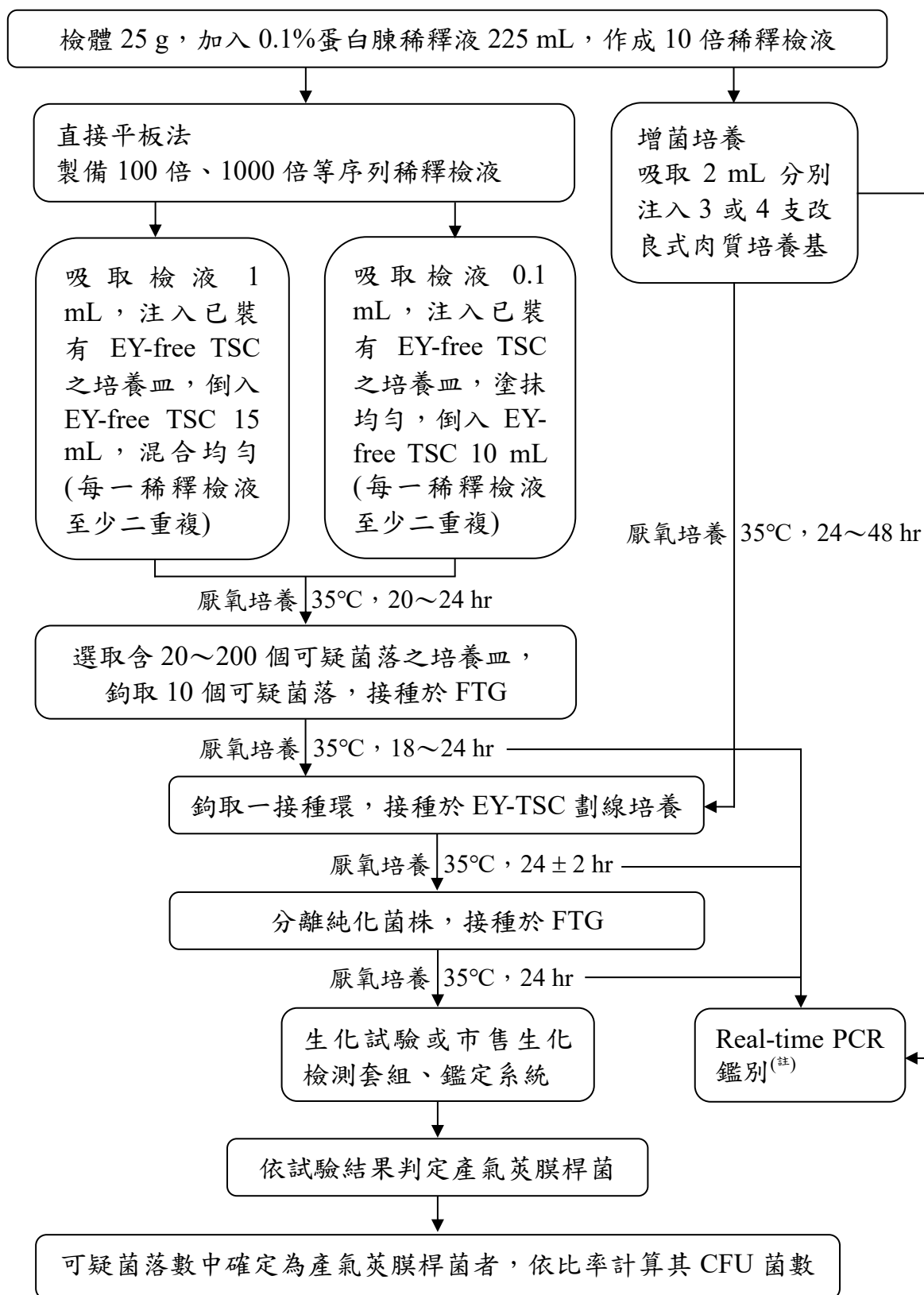
檢體DNA之real-time PCR增幅產物螢光分析圖與正反應對照組螢光分析圖進行相互比對，當檢體DNA與正反應對照組之real-time PCR螢光分析圖均出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該real-time PCR增幅產物為產氣莢膜桿菌之基因片段，可確認該檢體中含有產氣莢膜桿菌。

附註：第二部產氣莢膜桿菌之real-time PCR檢測可視需要執行。

#### 參考文獻

1. Rhodehamel, E. J. and Harmon, S. M. 2001. Chapter 16 *Clostridium perfringens*. Bacteriological Analytical Manual. [https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-16-clostridium-perfringens].
2. Chon, J. W., Park, J. S., Hyeon J. Y., Park, C., Song, K. Y., Hong, K. W., Hwang I. G., Kwak, H. S. and Seo, K. H. 2012. Development of real-time PCR for the detection of *Clostridium perfringens* in meats and vegetables. J. Microbiol. Biotechnol. 22: 530-534.

## 檢驗流程圖



註：可依檢體含菌量情況自行探討接續real-time PCR之步驟及增菌時間，以達快速鑑別目的。