

寵物食品中微生物之檢驗方法－產氣莢膜梭菌之檢驗

Methods of Test for Pet Foods Microorganisms - Test of *Clostridium perfringens*

1. 適用範圍：本方法適用於寵物食品中產氣莢膜梭菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經增菌培養後，以選擇性培養基培養，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 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_3)、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($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、硫酸鎂($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、酚紅(phenol red)、棉子糖(raffinose)、氯化鈉、氯化鈷(cobalt chloride hexahydrate)、無水硫酸鎂(MgSO_4)、硝酸鉀(KNO_3)、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($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)、鋅粉、環絲胺酸(D-cycloserine)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、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。
- 2.3 器具及材料
 - 2.3.1 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
 - 2.3.2 乾熱滅菌器：能維持內部溫度在 $170 \pm 10^\circ\text{C}$ 者。
 - 2.3.3 高壓滅菌釜：可達 121°C 以上者。
 - 2.3.4 冰箱：能維持 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 者。
 - 2.3.5 培養箱：能維持內部溫差在 $\pm 1^\circ\text{C}$ 以內者。

- 2.3.6 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。
- 2.3.7 攪拌均質器或鐵胃：適用於無菌操作者。
- 2.3.8 電磁加熱攪拌器。
- 2.3.9 顯微鏡：位相差顯微鏡或能放大至 1000 倍之光學顯微鏡。
- 2.3.10 酸鹼度測定儀。
- 2.3.11 水浴：能維持水溫溫差在 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 以內者。
- 2.3.12 旋渦混合器。
- 2.3.13 厭氧缸或厭氧培養箱。
- 2.3.14 吸管輔助器或微量吸管。
- 2.3.15 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。
- 2.3.16 吸管尖：已滅菌，100 μL 及 1000 μL 。
- 2.3.17 容器：附螺旋蓋之玻璃、聚乙烯、鐵氟龍或其他能耐 121°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。
- 2.3.18 試管：附螺旋蓋， $16 \times 125 \text{ mm}$ 、 $16 \times 150 \text{ mm}$ 、 $20 \times 150 \text{ mm}$ 或其他適用者。
- 2.3.19 氣體包：適合厭氧菌培養者。
- 2.3.20 杜蘭發酵管(Durham fermentation tube)：外徑 $9 \times 22 \text{ mm}$ 或其他適用者。
- 2.3.21 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。
- 2.3.22 接種針及接種環(直徑約 3 mm)：鎳鉻合金、鉑鈦或鉻線材質，或可拋棄式者。
- 2.3.23 剪刀、藥勺、小刀及鑷子：可滅菌。
- 2.3.24 塗抹曲棒：可滅菌，或可拋棄式者。
- 2.3.25 無菌濾膜：孔徑 0.45 μm 以下之親水性濾膜。
- 2.3.26 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢者。
- 2.3.27 濾紙及褐色試藥瓶。
- 2.3.28 蠟筆或麥克筆：塗寫、劃記載玻片時使用。
- 2.3.29 研鉢、杵：研磨試藥用。

2.4 試劑

- 2.4.1 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°C滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.0 ± 0.2 。

2.4.2 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。

2.4.3 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。

2.4.4 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。

2.4.5 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。

2.4.6 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。

2.4.7 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。

2.4.8 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。

2.4.9 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。

2.4.10 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。

2.4.11 70%乙醇溶液

取 95%乙醇 737 mL，加蒸餾水使成 1000 mL。

2.4.12 2 M 碳酸鈉溶液

取碳酸鈉 21.2 g，溶於蒸餾水使成 100 mL。

2.5 革蘭氏染色液(Gram stain solution)^(註 1)

2.5.1 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。

2.5.2 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。

2.5.3 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。

2.6 培養基

2.6.1 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 ₃)	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±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。

2.6.2 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(proteose peptone)	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 ± 0.2 ，分取15 mL注入20 × 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°C滅菌15分鐘。

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

胱胺酸(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

於胱胺酸、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16×150 mm試管中，以121°C滅菌20分鐘後急速冷卻，最終pH值為7.1±0.2，使用時調製。

2.6.4 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。

2.6.5 乳糖-明膠培養基(Lactose-gelatin medium)

胰化蛋白胨(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

於胰化蛋白胨、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。

2.6.6 產芽孢培養液(Sporulation broth)

聚蛋白腯(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(MgSO ₄)	0.1 g
硫乙醇酸鈉(sodium thioglycollate)	1 g
磷酸氫二鈉(Na ₂ 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。

2.6.7 運動性-硝酸鹽培養基(Motility-nitrate medium, buffered)

牛肉抽出物(beef extract)	3 g
蛋白腯(peptone)	5 g
硝酸鉀(KNO ₃)	1 g
磷酸氫二鈉(Na ₂ HPO ₄)	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±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 × 150 mm試管中，以121°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。

2.6.8 史布雷氏發酵培養基(Spray's fermentation medium)

胰蛋白腯(tryptone)	10 g
新蛋白腯(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±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 × 125 mm試管中，以121°C滅菌15分鐘。

2.6.9 改良式 AE 產芽孢培養基(AE sporulation medium, modified)

聚蛋白腴(polypeptone)	10 g
酵母抽出物(yeast extract)	10 g
磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)	4.36 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	0.25 g
醋酸銨($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)	1.5 g
硫酸鎂($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	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 ± 0.1 ，再分取15 mL注入20 × 150 mm試管中，以121°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%氯化鈷溶液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。

2.6.10 改良式 Duncan-Strong 產芽孢培養基(Duncan-Strong sporulation medium, modified)

胨蛋白腴(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 。

2.7 檢液之調製^(註2)

以無菌操作稱取檢體 25 g，置於無菌鐵胃袋或已滅菌均質杯內。加 0.1%蛋白腴稀釋液 225 mL，均質 2 分鐘。將已均質化之檢體混合液供作檢液。

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。

2.8 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 2.7 節之檢液充分搖勻，並吸取 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。

2.9 分離培養

自 2.8 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±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。

2.10 鑑定試驗

2.10.1 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 2.9 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。產氣莢膜梭菌為革蘭氏染色陽性，肥厚之短桿狀。

2.10.2 鐵鹽-牛乳推定試驗(iron-milk presumptive test)

自 2.9 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。產氣莢膜梭菌為正反應(當劇烈發酵作用發生時，立即將試管取出，以免溢入水浴中)。

2.10.3 確定試驗

2.10.3.1 運動性試驗(Motility test)

自 2.9 節之 EY-TSC 培養基鉤菌，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。產氣莢膜梭菌為負反應。

2.10.3.2 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 2.10.3.1 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。產氣莢膜梭菌為正反應。

2.10.3.3 乳糖發酵試驗(Lactose fermentation test)

自 2.9 節之 EY-TSC 培養基鉤菌，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。產氣莢膜梭菌為正反應。

2.10.3.4 明膠液化試驗(Gelatin liquefaction test)

將 2.10.3.3 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。產氣莢膜梭菌為正反應。

2.10.3.5 產芽孢試驗(Sporulation test)

自 2.9 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，為可疑產氣莢膜梭菌。

2.10.3.6 碳水化合物發酵試驗(Carbohydrate fermentation test)

經 2.10.3.1 節～2.10.3.4 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梭菌時，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 2.9 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 2.10.3.6.1 節或 2.10.3.6.2 節以觀察其產酸及產氣情形。

2.10.3.6.1 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。產氣莢膜梭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。

2.10.3.6.2 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。產氣莢膜梭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。

2.11 判定：產氣莢膜梭菌陽性者，應符合下表所列之結果。

備註：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。

參考文獻

1. 食品微生物之檢驗方法-產氣莢膜桿菌之檢驗。112 年 2 年 9 日衛授食字第 1121900124 號公告修正。
2. 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>]

表、產氣英膜梭菌之生化反應

試驗	正反應 (+)	負反應 (-)	產氣英膜梭菌之反應 ^a
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 ^b	+
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	+

a：「+」表示 90%以上為正反應，「—」表示 90%以上為負反應。

b：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。

檢驗流程圖

