



中华人民共和国国家标准

GB/T 14926.43—2001

实验动物 细菌学检测 染色法、培养基和试剂

Laboratory animal—Bacteriological monitoring—
Staining, media and reagents

2001-08-29 发布

2002-05-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

食品伙伴网<http://www.foodmate.net/>

前 言

本标准规定了实验动物微生物学检测的染色法、培养基和试剂。在以前的相关标准中对染色法、培养基和试剂的具体内容没有进行描述,基本上是引用 GB 4789.4—1994《食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验》、GB 4789.10—1994《食品卫生微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》、GB 4789.11—1994《食品卫生微生物学检验 溶血性链球菌检验》和 GB 4789.28—1994《食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂》中相关内容,给本标准的使用造成不便。为将染色法、培养基和试剂的配制方法和操作程序标准化并便于查找,特制定本标准。

本标准由中华人民共和国科学技术部提出并归口。

本标准起草单位:中国实验动物学会。

本标准主要起草人:李红、黄韧、范薇。

中华人民共和国国家标准

实验动物 细菌学检测 染色法、培养基和试剂

GB/T 14926.43—2001

Laboratory animal—Bacteriological monitoring
—Staining, media and reagents

1 范围

本标准规定了各种染色法、培养基和试剂。

本标准适用于小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠、兔、犬、猴的细菌学检测。

2 原理

实验动物微生物从培养基中摄取营养物质,维持正常的生长繁殖和代谢,其所含细胞物质能与各种染料结合,呈现不同颜色。

3 染色液的配制和染色法

3.1 革兰染色法

3.1.1 结晶紫染色液

结晶紫	1 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

将结晶紫在乳钵内研磨,用乙醇溶解,加入草酸铵水溶液混合,即可使用。

3.1.2 碘液

碘	1 g
碘化钾	2 g
蒸馏水	300 mL

将碘化钾与碘先用少量水溶解,待全部溶解后,加蒸馏水至 300 mL。

3.1.3 脱色液

95%乙醇

3.1.4 沙黄(番红)复染液

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

将沙黄在乳钵内研磨,用乙醇溶解,加入蒸馏水混合,即可使用。

3.1.5 染色法

3.1.5.1 涂片风干后在火焰上固定。

3.1.5.2 滴加结晶紫染色液,染色 1 min,流水冲洗,甩干。

- 3.1.5.3 滴加碘液,媒染 1 min,流水冲洗,甩干。
 3.1.5.4 滴加 95%乙醇脱色约 15~30 s,流水冲洗,甩干。
 3.1.5.5 滴加沙黄复红染液,染色 1 min,流水冲洗,甩干,风干或滤纸吸干后镜检。
 3.1.6 结果

使用油镜放大 1 000 倍观察,革兰阳性菌呈蓝紫色,革兰阴性菌呈红色。

3.2 姬姆萨染色法

3.2.1 姬姆萨染液

3.2.1.1 储存液

姬姆萨粉末	0.5 g
甘油(中性)	25 mL
甲醇	25 mL

将姬姆萨粉于研钵内,先加少许甘油研磨,至甘油加完为止,倒入棕色试剂瓶中,再用少量甲醇加入研钵内,逐渐将甘油洗下,倒入试剂瓶内,直至用甲醇洗净研钵体内甘油为止。并将剩余甲醇一并加入瓶中,塞紧瓶盖,充分摇匀,置 60℃ 温箱内 24 h 或室温一周后即可使用。

3.2.1.2 应用液

使用前储存液用 pH7.2~7.4 PBS10 倍稀释即成。

3.2.2 染色法

涂片或压印片风干后用甲醇固定 5 min 后滴加姬姆萨应用液,染色 20~30 min,用流水冲洗,甩干,风干或滤纸吸干后镜检。

3.2.3 结果

使用油镜放大 1 000 倍观察,组织、脓汁或红细胞呈红色,细菌呈紫色。

3.3 荚膜染色法

3.3.1 染色液

甲醛中加入 2% 印度黑汁;
 革兰染色液中的沙黄复染液。

3.3.2 染色法

3.3.2.1 取一接种环肉汤培养物于载玻片上,再取一接种环甲醛印度黑汁与其混匀,推成薄片,自然干燥后火焰固定。

3.3.2.2 滴加沙黄复染液,染色 30 s,吸去多余液体,干燥后油镜观察。

3.3.3 结果使用油镜放大 1 000 倍观察,细菌周围有透明带者为荚膜染色阳性。

3.4 支原体菌落染色法

3.4.1 染色液(Dienes 染色液)

美兰	2.5 g
刃天青(azure)	1.25 g
麦芽糖	10.0 g
苯甲酸	0.2 g
蒸馏水	100 mL

3.4.2 染色方法

临用前将染色液用蒸馏水稀释 100~300 倍,滴加到疑似有支原体菌落的平皿中,使其铺满个平皿,不断摇动,15 min 后倒掉染色液,用 pH7.4 PBS 洗 3 次。

3.4.3 结果

平皿置解剖镜或低倍镜下观察,支原体菌落呈蓝色,L 型细菌菌落在短时间内能染上蓝色,但 30~60 min 后褪色,呈无色。

3.5 乳酸酚棉蓝染色液

3.5.1 染色液

结晶酚	20 g
乳酸	20 mL
甘油	40 mL
蒸馏水	20 mL
棉蓝	0.05 g

除棉蓝外,其余成分混匀后水浴加热,充分搅拌直至完全溶解,然后加入棉蓝,混合均匀,必要时过滤,瓶装备用。

3.5.2 染色方法:取载玻片并加染色液数滴,用接种针(环)取培养物置于染色液中,然后加盖玻片,静置 10 min 后,吸去周围染液,用高倍镜检查。

3.5.3 结果:真菌菌体呈蓝色。

3.6 鞭毛染色液

3.6.1 染色液

3.6.1.1 甲液:单宁酸 5 g,氯化高铁(FeCl_3)1.5 g 溶于 100 mL 蒸馏水中,待溶解后加入 1% 的氢氧化钠溶液 1 mL 和 15% 的甲醛溶液 2 mL。

3.6.1.2 乙液:2 g 硝酸银溶于 100 mL 蒸馏水中。

在 90 mL 乙液中滴加浓氢氧化铵溶液,到出现沉淀后,再滴加使其变为澄清,然后用其余 10 mL 乙液小心滴加至澄清液中,至出现轻微雾状为止,(此为关键性操作,应特别小心),滴加氢氧化铵和用剩余乙液回滴时,要边滴边充分摇荡,染液当天配,当天使用。

3.6.2 染色法:在风干的载玻片上滴加甲液 4~6 mL 后,用蒸馏水轻轻冲净。再加乙液,缓缓加热至冒气,维持约 30 s(加热时注意勿使出现干燥面),在菌体多的部位可呈深褐色到黑色,停止加热,用水冲净,烘干镜检。

3.6.3 结果:用油镜放大 1 000 倍观察,菌体及鞭毛呈深褐色或黑色。

3.7 氢氧化钾二甲基亚砷液

3.7.1 成分

二甲基亚砷(DMSO)	40 mL
氢氧化钾	10~20 g
蒸馏水	60 mL

3.7.2 制法:将 DMSO 与蒸馏水混匀后加入氢氧化钾,置棕色瓶中备用。

4 一般培养基、选择性培养基和鉴定用培养基

4.1 牛肉浸液培养基

4.1.1 成分

新鲜除脂牛肉	500 g
氯化钠	5 g
蛋白胨	10 g
蒸馏水	1 000 mL

pH7.4~7.6

4.1.2 制法

将完全除去脂肪、肌腱和筋膜的牛肉 500 g,加蒸馏水 1 000 mL,充分搅拌后置 4℃ 冰箱过夜。次日煮沸 30 min,并不时搅拌。用绒布或多层纱布粗过滤,再用脱脂棉过滤即成。在滤液中加入其他成分溶解后用氢氧化钠溶液校正 pH 至 8.0,并煮沸 10 min,补充蒸馏水至 1 000 mL,pH 有明显下降时再矫

正至 7.6~7.8,最后用滤纸过滤,呈清晰透明、淡黄色液体,121℃灭菌 15 min 备用,此时的 pH 值应该是 7.4~7.6。

4.2 营养肉汤

4.2.1 成分

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.4

4.2.2 制法

将上述成分称量混合溶解于水中,校正 pH 至 7.4,分装于试管,每管 5 mL,121℃灭菌 15 min,置 4℃冰箱保存,两周内用完。

4.3 普通营养琼脂

4.3.1 成分

营养肉汤中加入 1.2%~1.5%的琼脂。

4.3.2 制法

煮沸溶解琼脂后 121℃灭菌 15 min,待冷至 50℃左右时倾注于无菌平皿,凝固后置 4℃冰箱保存,两周内用完。

4.4 血琼脂

4.4.1 成分

营养琼脂中加入 5%~10%的脱纤维羊血。

4.4.2 制法

待已灭菌的营养琼脂冷至 50℃左右时以无菌手续加入血液,轻轻摇匀后倾注于平皿,凝固后置 4℃冰箱保存,一周内用完。

4.5 半固体琼脂

4.5.1 成分

营养肉汤中加入 0.3%的琼脂。

4.5.2 制法

加热煮沸,待琼脂溶化后分装小试管,每管 2 mL,塞上透气塞,121℃灭菌 15 min,直立放置,冷却后 4℃冰箱保存,两周内用完。

4.6 DHL 琼脂(胆盐硫乳琼脂培养基)

4.6.1 成分

蛋白胨	20 g
牛肉膏	3 g
乳糖	10 g
蔗糖	10 g
去氧胆酸钠	1 g
硫代硫酸钠	2.3 g
枸橼酸钠	1 g
水解酪蛋白	5 g
枸橼酸铁铵	1 g
1%中性红	3 mL
琼脂粉	15 g

蒸馏水 1 000 mL
pH7.4

4.6.2 制法

除1%中性红溶液及琼脂外,上述成分混和,微温使溶解,调节pH值至7.4,加入琼脂,加热煮沸溶化后再加入中性红溶液,摇匀,冷至约50~55℃时倾注平皿。凝固后放置4℃冰箱保存,两周内用完。

4.7 SS琼脂

4.7.1 成分

蛋白胨 5 g
牛肉膏 5 g
乳糖 10 g
胆盐(3号) 3.5 g
枸橼酸钠(H₂O) 8.5 g
硫代硫酸钠 8.5 g
枸橼酸铁铵 1 g
1%中性红溶液 2.5 mL
0.1%亮绿溶液 0.33 mL
琼脂 5~20 g
蒸馏水 1 000 mL
pH7.0~7.2

4.7.2 制法

除中性红、亮绿及琼脂外,混和其他成分,加热溶解,调节pH值,加入琼脂,加热溶化,再加入中性红和亮绿摇匀,冷至约55~60℃时倾注平皿。凝固后放置4℃冰箱保存,一周内用完。

4.8 麦康凯琼脂

4.8.1 成分

蛋白胨 20 g
氯化钠 5 g
胆盐(猪、牛等) 5 g
乳糖 10 g
琼脂 15~20 g
1%中性红溶液 5 mL
蒸馏水 1 000 mL
pH7.2

4.8.2 制法

将上述成分(中性红和琼脂除外)混合,加热溶解,校正pH,加入琼脂,煮沸溶化后再加入中性红溶液,摇匀,115℃灭菌20 min,待冷至50~55℃时倾注平皿。凝固后置4℃冰箱保存,一周内使用。

4.9 亚硒酸盐增菌液(SF)

4.9.1 成分

蛋白胨 5 g
乳糖 4 g
磷酸氢二钠 4.5 g
磷酸二氢钠 5.5 g
亚硒酸氢钠 4 g
蒸馏水 1 000 mL

pH7.0~7.2

4.9.2 制法

先将亚硒酸盐加到 200 mL 蒸馏水中,充分摇匀溶解。混合其它成分,加入蒸馏水 800 mL,加热溶解,待冷却后两液混合,充分摇匀,校正 pH 值(调整磷酸盐缓冲对的比例来校正)。最后分装中试管,每管 5 mL,置水浴隔水煮沸 10~15 min,立即冷却,4℃冰箱保存,一周内使用。

4.10 李氏增菌肉汤(LB1、LB2)

4.10.1 成分

胰蛋白胨	5 g
多价胨	5 g
酵母浸膏	5 g
氯化钠	5 g
磷酸二氢钾	1.35 g
磷酸氢二钠	12 g
七叶苷	1 g
蒸馏水	1 000 mL

4.10.2 制法

将上述成分加热溶解,调 pH 至 7.2~7.4,分装,121℃15 min 灭菌。

LB1:

225 mL 中加入 1% 萘啶酮酸(用 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液配制) 0.45 mL
1% 吡啶黄(用灭菌蒸馏水配制) 0.27 mL

LB2:

200 mL 中加入 1% 萘啶酮酸 0.40 mL
1% 吡啶黄 0.50 mL

分装中试管,每管 5 mL。

4.11 改良的 Mc Bride 琼脂(MMA)

4.11.1 成分

胰蛋白胨	5 g
多价胨	5 g
牛肉膏	3 g
葡萄糖	1 g
氯化钠	5 g
磷酸氢二钠	1 g
苯乙醇	2.5 mL
无水甘氨酸	10 g
氯化锂	0.5 g
琼脂	15 g
蒸馏水	1 000 mL

pH7.2~7.4

4.11.2 制法

除琼脂外混合上述成分,加热溶解,校正 pH 后再加入琼脂,煮沸溶化,121℃灭菌 15 min,待冷却至 50~55℃时倾注平皿,凝固后冷藏备用。

4.12 Cary-Blair 氏运送培养基

4.12.1 成分

硫乙醇酸钠	1.5 g
磷酸氢二钠	1.1 g
氯化钠	5 g
琼脂	5 g
蒸馏水	1 000 mL
1%氯化钙溶液	9 mL
pH8.4	

4.12.2 制法

除氯化钙外混合其他成分,加热煮沸溶解,冷至50℃时加入氯化钙溶液,校正pH。分装中试管,每管5 mL,加胶塞,121℃灭菌15 min。

4.13 改良磷酸盐缓冲液

4.13.1 成分

磷酸氢二钠	8.23 g
磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	1.2 g
氯化钠	5 g
三号胆盐	1.5 g
山梨醇	20 g
蒸馏水	1 000 mL

4.13.2 制法

将磷酸盐及氯化钠溶于蒸馏水中,再加入其余成分,溶解后校正pH7.6,分装中试管,每管5 mL,121℃灭菌15 min备用。

4.14 CIN-1 培养基

4.14.1 基础培养基

胰蛋白胨	20 g
酵母浸膏	2 g
甘露醇	20 g
氯化钠	1 g
去氧胆酸钠	2 g
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01 g
琼脂	12 g
蒸馏水	950 mL

pH7.4~7.6

4.14.2 Irgasan:以95%乙醇作溶剂,溶解二苯醚,配成0.4%的溶液,待基础培养基冷至80℃时加入1 mL混匀。

4.14.3 冷至50℃时加入

中性红(3 mg/mL)	10 mL
结晶紫(0.1 mg/mL)	10 mL
头孢菌素(1.5 mg/mL)	10 mL
新生霉素(0.25 mg/mL)	10 mL

最后不断搅拌着加入10 mL10%氯化铯溶液,倾注平皿,凝固后冷藏备用。

4.15 改良Y培养基

4.15.1 成分

蛋白胨	15 g
-----	------

氯化钠	5 g
乳糖	10 g
草酸钠	2 g
去氧胆酸钠	6 g
三号胆盐	5 g
丙酮酸钠	2 g
孟加拉红	40 mg
水解酪蛋白	5 g
琼脂	17 g
蒸馏水	1 000 mL

4.15.2 制法

混合上述成分,加热煮沸溶解后 121℃ 灭菌 15 min,冷至 50~55℃ 时倾注平皿,凝固后冷藏备用。

4.16 葡萄糖蛋白胨琼脂(沙氏培养基)

4.16.1 成分

蛋白胨	10 g
葡萄糖	40 g
琼脂	18 g
蒸馏水	1 000 mL

4.16.2 制法

加热溶解调 pH 至 5.6,分装大号中试管,10 mL/管,116℃ 灭菌 30 min 后放成斜面,凝固后冷藏备用。

4.17 皮肤癣菌鉴别琼脂(DTM)

4.17.1 成分

蛋白胨	10 g
葡萄糖	20 g
酚红(0.2%)	6 mL
盐酸(0.6 mol/L)	6 mL
琼脂	18 g
蒸馏水	1 000 mL
抗生素:氯霉素	40 mg
或金霉素	100 mg
硫酸庆大霉素	100 mg

4.17.2 制法

除抗生素外,其他成分加热溶解调 pH 至 5.5,121℃ 灭菌 15 min 备用。将抗生素制备成溶液后,过滤除菌,使用前临时加入。在室温中制成斜面。

4.18 支原体半流体培养基

4.18.1 成分

含 0.3% 琼脂的支原体基础培养基(支原体液体培养基干粉,按使用说明称量、并加入 0.3% 琼脂,配制)	3.5 mL
马血清	1.0 mL
酵母浸出液	0.5 mL
青霉素添加液	0.25 mL
乙酸铀添加液	0.1 mL

4.18.2 制备方法:各种成分均需分别制备,使用时按上述比例混合。

4.18.2.1 含0.3%琼脂的支原体基础培养基:按使用说明书称量并加入琼脂,蒸馏水煮沸溶解,分装中试管,每管3.5 mL,用胶塞塞紧后灭菌4℃保存备用。

4.18.2.2 马血清:市售马血清经56℃30 min灭活后-20℃保存。

4.18.2.3 酵母浸出液:市售酵母浸出粉用蒸馏水配制成7%的溶液,0.22 μm滤膜过滤除菌,小量分装-20℃保存。使用时分装小试管,每管0.6~0.7 mL,用于咽及气管洗脱液的制备。

4.18.2.4 青霉素添加液:注射用青霉素钾盐或钠盐用灭菌蒸馏水配制成每毫升含1万U的溶液,小量分装-20℃保存。

4.18.2.5 乙酸铊添加液:乙酸铊1 g溶于100 mL灭菌蒸馏水中,小量分装-20℃保存。

4.18.3 使用:基础培养基溶化后置50℃水浴中,将马血清、青霉素添加液及乙酸铊添加液根据需要量按上述比例混合作为总添加液,取出冷至50℃的基础培养基,分别加入总添加液1.35 mL、用酵母浸出液制成的洗脱液0.5 mL,混匀后即可培养。

4.19 支原体液体培养基

4.19.1 成分

支原体基础培养基 (干粉,按使用说明书称量、配制)	3.5 mL
马血清	1.0 mL
酵母浸出液	0.5 mL
青霉素添加液	0.25 mL
乙酸铊添加液	0.1 mL

4.19.2 制法

支原体基础培养基:按使用说明书称量,加入蒸馏水煮沸溶解,分装中试管,每管3.5 mL,用胶塞塞紧后灭菌4℃保存备用。临用时将各种成分混匀即可。

4.20 支原体固体培养基

4.20.1 成分

支原体固体培养基基础 (干粉,按使用说明书称量、配制)	70 mL
马血清	20 mL
酵母浸出液	10 mL
青霉素添加液	5 mL
乙酸铊添加液	2.5 mL

4.20.2 制法

固体培养基基础冷至50℃时加入各种添加液,混匀后倾注无菌平皿,凝固后用保鲜袋包装后置4℃保存,一周内使用。

4.21 高盐甘露醇琼脂(SP)

4.21.1 成分

牛肉膏	1 g
蛋白胨或多价胨	10 g
氯化钠	75 g
甘露醇	10 g
酚红	0.025 g
琼脂	15 g
蒸馏水	1 000 mL

pH7.4

4.21.2 制法

除酚红和琼脂外混合上述成分,加热溶解,校正 pH 至 7.4,加入酚红,115℃灭菌 15 min,冷至 50~55℃时倾注平皿,凝固后冷藏,两周内使用。

4.22 葡萄糖肉浸液肉汤

4.22.1 成分

牛肉浸液培养基中加入 1%葡萄糖。

4.22.2 制法

待葡萄糖完全溶解后先后装中试管,每管 5 mL,115℃灭菌 20 min。也可用少量已灭菌的牛肉浸液溶解葡萄糖,过滤除菌后混合,摇匀,分装。

4.23 链球菌增菌肉汤

4.23.1 成分

胰蛋白胨	15 g
大豆胨	5 g
氯化钠	4 g
柠檬酸钠($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)	1 g
L-胱氨酸	0.2 g
D-葡萄糖	5 g
亚硫酸钠	0.2 g
三氯化钠	0.2 g
结晶紫	0.000 2 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.3~7.5

4.23.2 制法

除结晶紫外,将其它成分混合,加热溶解调 pH 至 7.3~7.5,加入结晶紫,混匀,分装,经 116℃,15 min 高压灭菌,以无菌手续加其余成分,摇匀,分装中试管,每管 5 mL,冷藏备用。

4.24 NAC 增菌液

4.24.1 成分

磷酸氢二钾	0.3 g
硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.3 g
蛋白胨	20 g
十六烷三甲基溴化铵	0.2 g
萘啶酮酸	15 mg
蒸馏水	1 000 mL
pH7.6	

4.24.2 制法

除十六烷三甲基溴化铵外,将上述成分混合、溶解,用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 7.4~7.5 后,加入十六烷三甲基溴化铵溶解后分装中试管,每管 5 mL,121℃灭菌 1 min,冷却后冷藏备用。

4.25 NAC 琼脂

4.25.1 成分

NAC 液体培养基	1 000 mL
琼脂	15 g

4.25.2 制法

将琼脂加入 NAC 液体培养基中,121℃灭菌 1 min,冷至 50~55℃,倾注平皿,凝固后冷藏备用。

4.26 改良 Camp-BAP 培养基

4.26.1 成分

4.26.1.1 基础培养基

胰蛋白胨	10 g
蛋白胨	10 g
葡萄糖	1 g
酵母浸膏	2 g
氯化钠	5 g
焦亚硫酸钠	0.1 g
硫乙醇酸钠	1.5 g
琼脂	15 g
蒸馏水	1 000 mL

4.26.1.2 抗生素添加剂

万古霉素	0.01 g
多粘菌素 B	2 500 IU
两性霉素 B	0.002 g
头孢菌素	0.015 g

4.26.1.3 脱纤维羊血 50 mL。

4.26.2 制法

混合基础培养基成分,加热溶解,校正 pH 至 7.0,分装,121℃灭菌 15 min,冷至 50℃时加入抗生素添加剂及脱纤维羊血,摇匀后倾注平皿,凝固后冷藏备用。

4.27 Skirrow 氏培养基

4.27.1 成分

4.27.1.1 基础培养基

蛋白胨	15 g
胰蛋白胨	5 g
酵母浸膏	5 g
氯化钠	5 g
琼脂	12 g
蒸馏水	1 000 mL

4.27.1.2 甲氧苄氨嘧啶(TMP)、抗生素

万古霉素	10 mg
多粘菌素 B	2 500 IU
甲氧苄氨嘧啶(TMP)	5 mg

4.27.1.3 脱纤维羊血 70 mL。

4.27.2 制法

4.27.2.1 TMP、抗生素添加液。

4.27.2.1.1 乳酸 62 mg(约 2 滴)加入 100 mL 灭菌蒸馏水中,然后加入 TMP100 mg,煮沸。

4.27.2.1.2 取上述溶液 5 mL 加入万古霉素和多粘菌素 B,摇匀后即成。

4.27.2.2 混合基础培养基各成分加热溶解,调 pH 至 7.2,分装,每瓶 100 mL,121℃15 min 灭菌,冷藏备用。临用前加热溶解,冷至 50℃时每 100 mL 中加入脱纤维羊血 7 mL,TMP、抗生素添加液 0.5 mL 摇匀,倾注平皿。

4.28 脑心浸液肉汤

4.28.1 成分

脑浸液干粉	12.5 g
心浸液干粉	5 g
胰蛋白胨	10 g
氯化钠	5 g
葡萄糖	2 g
磷酸二氢钠(无水)	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH7.4	

4.28.2 制法

混合上述成分,加热溶解后调整 pH 值,分装中试管,每管 5 mL,使用透气塞,121℃灭菌 15 min,冷却后冷藏,一周内使用。

4.29 硫乙醇酸钠肉汤

4.29.1 成分

酵母浸出粉	5 g
胰蛋白胨	15 g
葡萄糖	5.5 g
硫乙醇酸钠	0.5 g
氯化钠	25 g
刃天青	0.001 g
琼脂	0.5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH7.2	

4.29.2 制法

混合上述成分,煮沸溶解,调整 pH 值,分装中试管,每管 5 mL,使用不透气的胶塞,121℃灭菌 15 min,冷却后冷藏,一周内使用。

4.30 大豆蛋白胨肉汤

4.30.1 成分

胰酶消化酪蛋白	17 g
木瓜酶消化大豆粉	3 g
氯化钠	5 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH7.3	

4.30.2 制法

混合上述成分,加热溶解,调整 pH 值,分装中试管,每管 5 mL,使用透气塞,121℃ 15 min 灭菌,冷却后冷藏,一周内使用。

5 生化培养基和血清学试剂

5.1 糖醇发酵培养基

5.1.1 基础液成分

牛肉膏	5 g
蛋白胨	10 g
氯化钠	3 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2 g
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	12 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH7.4	

5.1.2 制法

在基础培养基中加入0.5%的葡萄糖、0.1%的其他糖醇,溶解后分装小试管,其中葡萄糖发酵管中倒置一个小管,115℃20 min 灭菌,冷却后冷藏备用。

5.2 氨基酸脱羧酶试验培养基

5.2.1 成分

蛋白胨	5 g
酵母浸出粉	3 g
葡萄糖	1 g
1.6%溴甲酚紫乙醇溶液	1 mL
蒸馏水	1 000 mL
L-氨基酸	0.5 g/100 mL
或 DL-氨基酸	1 g/100 mL
pH6.8	

5.2.2 制法

除氨基酸以外的成分混和,加热溶解后分装,每瓶100 mL,分别加入各种氨基酸:赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸,再校正 pH 至 6.8,同时用不加氨基酸培养基作对照。分装于灭菌的小试管内,每管3 mL,并加一层液体石蜡,121℃灭菌10 min。

5.3 苯丙氨酸培养基

5.3.1 成分

酵母浸膏	3 g
氯化钠	5 g
D,L-苯丙氨酸	2 g
(或 L-苯丙氨酸 1 g)	
琼脂	12 g
蒸馏水	1 000 mL
磷酸氢二钠	1 g

5.3.2 制法

将上述成分加热溶解,分装试管,121℃灭菌15 min,置成斜面。

5.3.3 试剂

10%三氯化铁溶液。

5.3.4 使用方法

挑取琼脂培养物沿斜面划线接种,(36±1)℃培养18~24 h。

5.3.5 结果观察

滴加10%三氯化铁溶液数滴,自斜面培养物上流下,培养物呈深绿色者为阳性。

5.4 蛋白胨水(靛基质试验用)

5.4.1 成分

多价胨	20 g
氯化钠	5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH7.4	

5.4.2 制法

按上述成分配制,分装小试管,121℃灭菌 15 min,冷藏备用。

5.4.3 靛基质试剂

5.4.3.1 柯凡克试剂:将 5 g 对二甲基氨基苯甲醛溶解于 75 mL 戊醇中,然后缓慢加入浓盐酸 25 mL。

5.4.3.2 欧-波试剂:将 1 g 对二甲基氨基苯甲醛溶解于 95 mL 乙醇中,然后缓慢加入浓盐酸 20 mL。

5.4.4 使用方法

用固体培养物或双糖铁或三糖铁培养物接种,(36±1)℃18~24 h 培养,必要时延长培养至 3 d。

5.4.5 结果观察

培养物中加入柯凡克试剂者,在两种溶液交界处呈红色为阳性;加入欧-波试剂者,在两种溶液交界处呈玫瑰红色为阳性。对弱阳性者可在培养物中加入少量二甲苯,充分混匀后再加入靛基质试剂。

5.5 缓冲葡萄糖蛋白胨水(甲基红和 VP 试验用)

5.5.1 成分

磷酸氢二钾	5 g
多价胨	7 g
葡萄糖	5 g
蒸馏水	1 000 mL

5.5.2 制法

混合上述成分,加热溶解后调 pH7.0,分装小试管,每管 1~2 mL,115℃灭菌 20 min,冷却后冷藏备用。

5.5.3 试剂

5.5.3.1 甲基红(MR)试剂:10 mg 甲基红溶于 30 mL 95%乙醇中,然后加入 20 mL 蒸馏水。

5.5.3.2 V-P 试剂:6%α-萘酚-乙醇溶液;40%氢氧化钾溶液。

5.5.4 使用方法

挑取琼脂培养物或三糖铁或双糖铁培养物接种,(36±1)℃培养 18~24 h。

5.5.5 结果观察

5.5.5.1 甲基红试验:培养物加入甲基红试剂一滴,立即变为鲜红色为阳性,黄色为阴性。

5.5.5.2 V-P 试验:培养物中加入 6%α-萘酚-乙醇溶液 0.5 mL,40%氢氧化钾溶液 0.2 mL,数分钟内出现红色为阳性,不变色为阴性。

5.6 尿素培养基

5.6.1 成分

蛋白胨	20 g
0.4%酚红溶液	3 mL
氯化钠	5 g
尿素	2 g
葡萄糖	1 g
蒸馏水	1 000 mL

5.6.2 制法

除指示剂外,用水溶解上述成分,煮沸,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节,然后加入指示剂,分装小试管,每管 1~2 mL,115℃灭菌 15 min,冷却后冷藏备用。也可将除尿素外的其他成分 121℃灭菌 15 min

后加入过滤除菌的尿素溶液。

5.6.3 使用方法

用固体培养物或双糖铁或三糖铁培养物接种, $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 18~24 h 培养。

5.6.4 结果观察

培养基由黄变红色为阳性。

5.7 硝酸盐培养基

5.7.1 成分

硝酸钾	0.2 g
蛋白胨	5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH7.4	

5.7.2 制法

将上述成分溶解混匀, 调 pH 至 7.4, 分装小试管, 每管 1~2 mL, 121°C 灭菌 15 min 备用。

5.7.3 硝酸盐还原试剂

5.7.3.1 甲液: 将 0.8 g 对氨基苯磺酸溶解于 100 mL 5 mol/L 乙酸溶液中。

5.7.3.2 乙液: 将 0.5 g α -萘胺溶解于 100 mL 5 mol/L 乙酸溶液中。

5.7.4 使用方法

用琼脂培养物或双糖铁或三糖铁培养物接种, $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 18~24 h。

5.7.5 结果观察

培养物中先加入甲液数滴, 再加入乙液数滴, 出现红色为阳性。

5.8 氧化酶试验

5.8.1 试剂

1% 盐酸二甲基对苯二胺水溶液, 少量新鲜配制, 于冰箱内避光保存, 一周内使用。

5.8.2 试验方法

取滤纸条粘取菌落, 加氧化酶试剂一滴, 30 s 内呈现红色至紫红色反应为阳性, 于 2 min 内不变色为阴性。注意: 不能用接种针挑取菌落, 只能用玻棒或竹签; 对弱阳性者应同时用绿脓杆菌做阳性对照, 用大肠埃希菌做阴性对照。

5.9 过氧化氢酶试剂

5.9.1 试剂

3% 过氧化氢溶液, 临时配制。

5.9.2 试验方法

用接种环挑取菌落于干净载玻片上, 滴加 3% 过氧化氢溶液适量, 于 30 s 内发生气泡者为阳性, 不产生气泡者为阴性。

5.10 克氏双糖铁(KI)

5.10.1 成分

蛋白胨	20 g
牛肉膏	3 g
酵母膏	3 g
乳糖	10 g
葡萄糖	1 g
氯化钠	5 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
硫代硫酸钠	0.5 g

琼脂	3 g
酚红	0.025 g
蒸馏水	1 000 mL
pH7.4	

5.10.2 制法

混合除琼脂和酚红的上述成分,加热溶解后校正 pH。加入琼脂,溶化后再加入 0.2% 酚红水溶液 12.5 mL,摇匀,分装小试管,每管 3 mL,115℃ 灭菌 20 min,趁热放置成高层斜面,凝固后冷藏备用。

5.10.3 使用方法

用接种针挑取菌落,先穿刺接种至高层底部,再沿穿刺线退出在斜面上划线,(36±1)℃ 培养 18~24 h。

5.10.4 结果观察

斜面和高层均变黄者为分解葡萄糖和乳糖;高层破碎者为产气;高层变黄而斜面不变或变红者为分解葡萄糖,不分解乳糖;高层沿接种线变黑者为硫化氢阳性。

5.11 三糖铁琼脂培养基(TSI)

5.11.1 成分

蛋白胨	15 g
示胨	5 g
牛肉膏	5.0 g
酵母膏	3.0 g
乳糖	3.0 g
蔗糖	10 g
葡萄糖	10 g
氯化钠	1.0 g
硫酸亚铁	5.0 g
硫代硫酸钠	0.2 g
酚红溶液	0.3 g
0.5% 酚红溶液	5 mL
琼脂	12 g
蒸馏水	1 000 mL
pH7.4	

5.11.2 制法

将上述成分(除琼脂和酚红外)混合,加热溶解后校正 pH,再加琼脂及酚红溶液,加热煮沸溶解。分装试管,每管 4 mL,经 115℃ 灭菌 20 min,立即置高层斜面,待凝固后经无菌试验备用。

5.11.3 使用方法

用接种针挑取菌落,先穿刺接种至高层底部,再沿穿刺线退出在斜面上划线,(36±1)℃ 培养 18~24 h。

5.11.4 结果观察

斜面和高层均变黄者为分解葡萄糖、蔗糖和乳糖;高层破碎者为产气;高层变黄而斜面不变或变红者为分解葡萄糖,不分解蔗糖和乳糖;高层沿接种线变黑者为硫化氢阳性。

5.12 乙酸铅纸条

5.12.1 制法

将滤纸剪成约 0.5 cm×10 cm 的长条,浸泡于 3% 乙酸铅水溶液中,以吸干水溶液为止。将该纸条置 37℃ 培养箱中烘干,装入试管中,121℃ 灭菌 15 min。

5.12.2 使用方法

悬空置于已接种的双糖铁或三糖铁或 SIM 培养管中, $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 18~24 h。注意: 勿使纸条接触培养基, 否则因纸条变湿而影响结果观察。

5.12.3 结果观察

纸条变黑者为硫化氢阳性。

5.13 SIM 培养基

5.13.1 成分

胰蛋白胨	20 g
多价胨	0.6 g
硫酸铁铵	0.2 g
硫代硫酸钠	0.2 g
琼脂	3 g
蒸馏水	1 000 mL

5.13.2 制法

混匀上述成分, 加热溶解, 调 pH7.2~7.4, 分装小试管, 每管 2~3 mL, 121°C 灭菌 15 min, 放成高层, 凝固后冷藏备用。

5.13.3 使用方法

用琼脂培养物穿刺接种, $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 18~24 h。

5.13.4 结果观察

沿接种线向周围生长者为动力阳性; 培养基沿接种线变黑者为硫化氢阳性; 滴加靛基质试剂, 在交界处出现红色者为靛基质阳性(参见靛基质试验)。

5.14 营养明胶

5.14.1 成分

蛋白胨	5 g
牛肉膏	3 g
明胶	120 g
蒸馏水	1 000 mL

5.14.2 制法

混合上述成分, 水浴加热溶解, 校正 pH7.0~7.2, 分装小试管, 每管 2~3 mL, 121°C 灭菌 15 min, 放成高层, 凝固后冷藏备用。

5.14.3 使用方法

挑取琼脂培养物穿刺接种, $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 18~24 h。

5.14.4 结果观察

培养物放 4°C 冰箱 1 h, 未见凝固者为明胶液化试验阳性; 凝固者为阴性。

5.15 胆汁-七叶苷培养基

5.15.1 成分

胰蛋白胨	1.5 g
七叶苷	0.1 g
琼脂	2 g
胆汁	2.5 mL
或胆盐	0.3 g
柠檬酸铁	0.2 g
蒸馏水	100 mL

pH6.4~6.6

5.15.2 制法

上述成分加热溶解,调 pH 至 6.4~6.6,分装试管,121℃ 灭菌 15 min,放成斜面备用。

5.15.3 使用方法

用固体培养物沿斜面划线接种,(36±1)℃ 培养 18~24 h。

5.15.4 结果观察

培养基呈黑色者为阳性,不变色者为阴性。

5.16 西蒙氏柠檬酸盐培养基

5.16.1 成分

氯化钠	5 g
硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.2 g
磷酸二氢铵	1 g
磷酸氢二钾	1 g
柠檬酸钠	5 g
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL

pH6.8

5.16.2 制法

先将盐类溶解于水中,再加入琼脂,加热溶化,然后加入指示剂,混匀后分装小试管,每管 2~3 mL,121℃ 灭菌 15 min,趁热放置成斜面,凝固后冷藏备用。

5.16.3 使用方法

用固体培养物沿斜面划线接种,(36±1)℃ 培养 18~24 h。

5.16.4 结果观察

培养基由绿变蓝者为阳性,不变色者为阴性。

5.17 丙二酸钠

5.17.1 成分

酵母浸膏	1 g
硫酸铵	2 g
磷酸氢二钾	0.6 g
磷酸二氢钾	0.4 g
氯化钠	2 g
丙二酸钠	3 g
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	12 mL
蒸馏水	1 000 mL

pH6.8

5.17.2 制法

除指示剂外,用水溶解上述成分,校正 pH 后再加入指示剂,分装小试管,每管 2~3 mL,121℃ 灭菌 15 min,趁热放成斜面,凝固后冷藏备用。

5.17.3 使用方法

用固体培养物沿斜面划线接种,(36±1)℃ 培养 18~24 h。

5.17.4 结果观察

培养基由绿变蓝者为阳性,不变色者为阴性。

5.18 马尿酸钠水解试验培养基

5.18.1 成分

马尿酸钠	1 g
肉浸液	100 mL

5.18.2 制法

将马尿酸钠溶解于肉浸液内,分装于小试管内,并于管壁内划一横线,121℃灭菌 20 min 备用。

5.18.3 试剂

三氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)12 g 溶于 2% 盐酸中,总量为 100 mL。

5.18.4 使用方法

将纯培养物接种于培养基中,于 42℃ 培养 48 h,取出用蒸馏水补充损失水分至刻度处,1 500 r/min 离心 5~10 min 后,吸取上清液 0.8 mL,加入三氯化铁试剂 0.2 mL,混合均匀,静置 10~15 min,然后观察结果。

5.18.5 结果观察

出现稳定不变的褐色沉淀为阳性。

5.19 TTC 琼脂

5.19.1 成分

胰蛋白胨	17 g
大豆胨	3 g
葡萄糖	6 g
氯化钠	2.5 g
硫乙醇酸钠	0.5 g
琼脂	15 g
L-胱氨酸-盐酸	0.25 g
亚硫酸钠	0.1 g
1% 氯化血红素溶液	0.5 mL
1% 维生素 K_1 溶液	0.1 mL
2,3,5-氯化三苯四氮唑(TTC)	0.4 g
蒸馏水	1 000 mL

5.19.2 制法

除 1% 氯化血红素、1% 维生素 K_1 和 TTC 外,混合其他成分,加热溶解。L-胱氨酸先用少量氢氧化钠溶液溶解后加入,校正 pH 至 7.2,然后加入 1% 氯化血红素、1% 维生素 K_1 溶液,摇匀,分装每瓶 100 mL,121℃ 灭菌 15 min,作为基础培养基备用。临用前每 100 mL 中加入 TTC 40 mg,充分摇匀,倾注平皿,凝固后冷藏备用。

5.20 1% 甘氨酸培养基

5.20.1 成分

胰蛋白胨	10 g
蛋白胨	10 g
葡萄糖	1 g
酵母浸膏	2 g
氯化钠	5 g
焦亚硫酸钠	0.1 g
硫乙醇酸钠	1.5 g
琼脂	1.6 g
甘氨酸	10 g

蒸馏水 1 000 mL

5.20.2 制法

混合上述成分,加热溶解,调 pH6.8~7.2,分装小试管,每管 2~3 mL,121℃灭菌 15 min,放成高层,凝固后冷藏备用。

5.20.3 使用方法

用接种针挑取菌落,穿刺接种,置微氧环境,42℃培养 48 h。

5.20.4 结果观察

空肠弯曲菌在培养基表面出现云雾状生长。

5.21 氰化钾培养基

5.21.1 成分

蛋白胨	10 g
氯化钠	5 g
磷酸二氢钾	0.225 g
磷酸氢二钠	4.5 g
蒸馏水	1 000 mL
5%氰化钾溶液	1.5 mL

pH7.6

5.21.2 制法

将除氰化钾以外的成分混合,溶解后调整 pH,121℃灭菌 15 min。待其充分冷却后每 100 mL 中加入 5%氰化钾溶液 0.15 mL,分装小试管,每管 2~3 mL,用灭菌胶塞塞紧。同时分装不加氰化钾的培养基,作为对照。培养基冷藏备用,可使用两个月。

5.21.3 使用方法

将琼脂培养物同时接种于氰化钾培养基和对照培养基,35℃培养 24~72 h。

5.21.4 结果观察

试验管和对照管均生长者为氰化钾试验阳性;对照管生长,而试验管不生长者为阴性。

5.22 葡萄糖铵培养基

5.22.1 成分

氯化钠	5 g
硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2 g
磷酸二氢铵	1 g
磷酸氢二钾	1 g
葡萄糖	2 g
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	40 mL

pH6.8

5.22.2 制法

先将盐类和糖溶解于水内,校正 pH,再加琼脂,加热溶化,然后加入指示剂,混合均匀后分装试管,121℃高压灭菌 15 min,放成斜面。

5.22.3 试验方法

用接种针轻轻触及培养物的表面,在盐水管内作成极稀的悬液,肉眼观察不见混浊,以每一种环内含菌数在 20~100 之间为宜。将接种环灭菌后挑取菌液接种,同时再以同法接种普通斜面一支作为对照。于(36±1)℃培养 24 h。阳性者葡萄糖铵斜面上有正常大小的菌落生长;阴性者不生长,但在对

照培养基上生长良好。如在葡萄糖铵斜面生长极微小的菌落可视为阴性结果。

注：容器使用前应用清洁液浸泡，再用清水、蒸馏水冲洗干净，并用新棉花做成棉塞，干热灭菌后使用。如果操作时不注意，有杂质污染时，易造成假阳性结果。
