**第二部分 病原微生物及其培养基**

食物中毒：指摄入了含有生物性、化学性有害物质的食品或把有毒有害物质当作食品摄入后出现的非传染性的急性、亚急性疾病

**第一节** 沙门氏菌检验

沙门氏菌属是一群形态和培养特性都类似的肠杆菌科中的一个大属，也是肠杆菌科中最重要的病原菌属，它包括2000多个血清型。沙门氏菌常作为进出口食品和其他食品的致病菌指标。

一、生物学特性

（一）形态特征

* 沙门氏菌为革兰氏阴性较为细长的杆菌，(1-3)µm×(0.4-0.9) µm；不产生芽胞，一般无荚膜，但在粘液样变异时，可见菌体周围粘液层增厚。
* 除鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌外，其余都具有周身鞭毛，能运动，但也偶尔出现无鞭毛的变种和不运动变株。
* 除鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌及仙台、伤寒、甲型副伤寒等沙门氏菌外，绝大多数都具有纤毛，能吸附于细胞表面和凝集红血球。

（二）命名

沙门氏菌属内各种菌型的名称，大致有：①根据所致疾病命名；②根据首先发现的地区命名；③根据人名命名。

（三）培养特性

沙门氏菌为需氧或兼性厌氧菌，一般在普通琼脂培养基上生长良好，经37℃培养24h后呈圆形、光滑、湿润、半透明、边缘整齐、直径2mm～3mm；粗糙型菌落，边缘不整齐，表面干燥。

* 沙门氏菌最适生长温度为35℃～37℃，10h～42h能生长，最适生长pH为7.2～7.4。
* 在培养基中若加入硫代硫酸钠、胱氨酸、血清、葡萄糖、淀粉、脑心浸液、胶体硫或甘油等，均有助于本菌的生长。
* 沙门氏菌属按其生化特性，可分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ五个亚属，其中亚属Ⅲ又称为亚利桑那菌，它们在亚硫酸铅琼脂、DHL琼脂、HE琼脂和SS琼脂平板上培养特性各不相同。

（四）抗原结构

沙门氏菌具有复杂的抗原结构，一般可分为四种：菌体抗原，又称为O抗原；鞭毛抗原，又称为H抗原；表面抗原，又称为K抗原；菌毛抗原，又称为F抗原。

1. 菌体抗原（O抗原）

* 沙门氏菌的O抗原主要存在于细菌细胞壁的最外层，是多糖—类脂—蛋白质的复合物，简称脂多糖，也就是本属细菌的内毒素。
* O抗原很稳定，能耐热100℃达数小时。
* O抗原含有许多不同的多糖成分，分别以1，2，3…等阿拉伯数字表示，例如：猪霍乱沙门氏菌的O抗原有6、7。
* O抗原与抗O血清混合后，在56℃经4h～12h或37℃过夜，出现颗粒状不易摇散的**O凝集现象**。

2. 鞭毛抗原（H抗原）

* 沙门氏菌的H抗原存在于鞭毛上，化学成分为蛋白质，其特异性主要是由蛋白质多肽链上氨基酸的排列顺序及空间构型来决定的。
* H抗原对热不稳定，经加热60℃～70℃15min，或酒精及酸处理后即被破坏。
* 要使H抗原完全破坏，必须将培养物煮沸2.5h，短时间的加热仅能破坏其可凝性凝集结合力，但不能破坏其凝集产生的能力
* H抗原与抗H血清经56℃2h后，可出现疏松易于摇散的絮状凝集，称为H凝集。
* 具有鞭毛的细菌，经甲醛固定后，其菌体抗原全部被遮盖，故不能与菌体抗体（O抗体）发生凝集。
* H抗原可分为两相，第1相为特异相，用英文小写字母表示；第2相为非特异性相，用阿拉伯数字表示，但少数也有用英文字母来表示的。例如：猪伤寒沙门氏菌的H抗原第一相c，第二相1、5；
* 具有两相鞭毛抗原的细菌称为双相菌，仅具有一相鞭毛抗原的细菌称为单相菌。如甲型副伤寒沙门氏菌只具有1相抗原a。

3. 表面抗原（K抗原）

主要包括Vi抗原和M抗原。

（1）Vi抗原（微荚膜抗原，virulence）

* K抗原中的Vi抗原很重要，少数沙门氏菌如伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、都柏林沙门氏菌等具有Vi抗原。具有Vi抗原的细菌有抗吞噬作用和保护细菌避免相应抗体在补体参与下的溶菌作用，故毒力较强。
* Vi抗原由多糖所组成，很不稳定，不耐热，60℃ 30min、100℃ 5min、石炭酸处理或人工培养后易消失。含有Vi抗原的细菌悬浮液于无水乙醇或甘油中比较稳定，加热亦不易破坏。经甲醛处理后，Vi抗原含量虽然减少，但不完全消失。
* Vi抗原位于菌体的最表层，罩在O抗原的表面。因此具有Vi抗原的细菌，由于O抗原被Vi抗原所包围，可阻止O抗原与抗O血清发生凝集，O抗原不凝集，必须加热60℃30min或100℃5min破坏Vi抗原后，O抗原才能与抗O血清发生凝集。
* Vi抗原对鉴定伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、都柏林沙门氏菌很重要。
* 凡初步生化反应符合沙门氏菌，而不与A～F群（组）O多价血清或各单价血清凝集者，均应作Vi凝集试验。
* （2）M抗原
* 黏多糖成分，大多数沙门氏菌在某种状态下放置（如室温放置）或培养基中含甘油、高浓度盐时产生。
* M抗原能耐热60℃1h，加热100℃2h后，其可凝集性及抗体产生能力即被破坏，而凝集素结合能力仍然保存。用50％乙醇及1mol/L盐酸处理后，其抗原被灭活。经甲醛处理或60℃处理1h后的活菌抗原，能刺激机体产生M凝集素。
* 除乙型副伤寒沙门氏菌外，M抗原也可见于其他某些沙门氏菌，如鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、幕尼黑沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、鸭沙门氏菌，故在菌型鉴定上无特殊意义。

4. 菌毛抗原（F抗原）

* 沙门氏菌的菌毛有抗原性，用其免疫能获得高效价的血清。
* 60℃加热不能改变培养物的菌毛状态，这样处理的菌毛在相应的抗血清中仍能发生凝集，并能产生血细胞凝集反应。100℃lh或120℃30min处理后，乎全部细菌失去菌毛，离心后重新混悬于盐水中，不能再被抗原血清凝集。
* 菌毛凝集发生较迅速，呈云絮状，故易与鞭毛凝集混淆。
* 但不同之处是菌毛凝集不因0.005mol/L盐酸或50％酒精处理而消失。以1mol/L盐酸处理20h，能使它不再与抗菌毛血清凝集，并丧失其血细胞凝集性。

（五）抗原变异

1、H-O变异

* H－O变异指有动力的菌株(H型)丧失H抗原而成为无动力的变种(O型)，这些变种性质十分稳定，一般不能逆转。

2、S-T-R变异

* 这是指丧失O抗原，由光滑型(S型)过渡到T型或粗糙型(R型)的一种变异。
* T型菌含有一种新的对热稳定的抗原，称为T抗原。
* T型菌不含有正常的O抗原，是介于S—R型间的过渡形体，其形态光滑，与S型无法鉴别，但不被O血清凝集。

3、型体变异

* 型体变异指菌体抗原含量的改变，包括O型变异和V－W型变异。

（1）O变异

* 沙门氏菌以O抗原分群，其中某些次要抗原1、6和12可出现在一个以上的血清群内；
* 例如某些含有O－1 抗原的菌株平板，取单个菌落用特异的O－1血清分别鉴定则可发现：有的菌落可能含有大量O－l抗原，结果与O－l血清出现了明显凝集(+++)；而另一些菌株可能含有少量的O－1抗原，所以呈弱凝集反应(+)，甚至阴性。

（2）V－W变异

* 这是指失去Vi抗原的变异。
* 初次从患者分离到的具有Vi抗原的菌株称V菌株；
* V菌株在人工培养基上多次移种后，逐渐失去Vi抗原而变成W型菌株，但其O及H抗原不受影响，也就是说仍可与相应的O血清中发生凝集。

4、位相变异

* 位相变异是鞭毛抗原的一种质的改变。
* 这种变异在沙门氏菌中的双相菌中常有，而单相菌不发生这种变异，因而在双相菌鉴定时非常重要。通常在一个培养物内二相并存，一株双相菌移种至平板，l相与2相的菌落各占半数，但挑取单个菌落（第1相或2相)在培养基上多次移种后，其后代又可出现第1相与第2相菌落各半的情况，这种由一相变为另一相的变异，称为位相变异。
* 一株双相菌，如果分离H抗原为单相时，大多是因一相掩盖另一相抗原。此时可用诱导法促使另一相抗原出现，一般都可恢复为双相菌。

（六）抵抗力

* 沙门氏菌对热及外界环境的抵抗力属于中等。
* 60℃ 20min～30min即被杀死；
* 在普通水中虽不易繁殖，但可存活2周～3周；
* 在自然环境的粪便可生存1～2个月；
* 在冰箱中可生存3～4个月；在-25℃可存活10个月左右；在干燥的垫草中可存活8周～20周。
* 当水煮或油炸大块鱼、肉、香肠、肉饼时，若食品内部温度达不到足以杀死细菌的情况下，就会有细菌残留。
* 对化学药品的抵抗力较弱。
* 如以5％苯酚或1︰500升汞处理，5min可杀死；
* 胆盐、煌绿及孔雀绿等对本属细菌的抑制作用较大肠杆菌为小。常可用以制备选择性培养基；
* 对氯霉素敏感(目前发现，许多菌株都能抵抗一定浓度的硫胺类、土霉素和链霉素等药品)。

二、检验所需的培养基

1.前增菌：用无选择性的培养基使处于濒死状态的细菌恢复活力；

**BPW（缓冲蛋白胨水）**：

用于修复受损伤的沙门氏菌，但由于其不具有选择性，因此增菌时间过长会导致杂菌生长过多干扰鉴定结果，故建议最好控制在4h为好。

* 蛋白胨：10.0g（提供碳源和氮源满足细菌生长的需求）

氯化钠：5.0g（可维持均衡的渗透压）

磷酸氢二钠（含12个结晶水）：9.0g

作为缓冲剂

磷酸二氢钾：1.5g

蒸馏水：1000mL

其他条件：pH值7.2±0.2；25℃

2. 选择性增菌：使沙门氏菌优势繁殖，其它细菌受到抑制；

**TTB（四硫磺酸钠煌绿）增菌液**：

①基础液：

* 蛋白胨：10.0g

提供碳源、氮源和维生素满足细菌生长的需求

牛肉膏：5.0g

氯化钠：3.0g（可维持均衡的渗透压）

碳酸钙：45.0g（能中和细菌产酸及吸收有毒的代谢产物）

蒸馏水：1000mL

②硫代硫酸钠溶液：

硫代硫酸钠和四硫磺酸钠结合可抑制肠道共生菌(四硫磺酸钠是在培养基加入碘和碘化钾时形成)，而具有四硫磺酸钠还原酶的细菌能在此培养基中繁殖

* 硫代硫酸钠(含5个结晶水)：50.0g 蒸馏水：加至100mL

③碘溶液：

* 碘片20.0g 碘化钾：25.0g 蒸馏水：加至100mL

④0.5%煌绿水溶液：抑制大肠群菌和其它革兰氏阳性杆菌

* 煌绿：0.5g 蒸馏水：100mL

⑤牛胆盐溶液：抑制大肠群菌和其它革兰氏阳性杆菌。

* 牛胆盐：10.0g 蒸馏水：100mL

⑥制法：

* 基础液：900mL 硫代硫酸钠溶液：100mL 碘溶液：20.0mL

煌绿水溶液：2.0mL 牛胆盐溶液：50.0mL、

**SC（亚硒酸盐胱氨酸增菌液）**：

* 蛋白胨：5.0g（提供碳源和氮源满足细菌生长的需求）

乳糖：4.0g（可发酵的糖类） 磷酸氢二钠：10.0g（缓冲剂）

亚硒酸氢钠：4.0g（抑制革兰氏阳性菌和非沙门氏菌的大多数革兰氏阴性肠道菌）

L-胱氨酸：0.01g（还原剂） 蒸馏水：1000mL

3. 选择性平板分离培养（选择性培养基）：

**BS（亚硫酸铋琼脂）**：

* 蛋白胨：10.0g

提供碳源、氮源、维生素和矿物质

牛肉膏：5.0g

葡萄糖：5.0g（提供能源）

硫酸亚铁：0.3g（用于产生硫化氢，并与铁产生沉淀，使阳性培养物为具有金属光泽的棕色到黑色菌落）

磷酸氢二钠：4.0g（缓冲剂） 煌绿：0.025g或5.0g/L水溶液5.0mL

柠檬酸铋铵：2.0g

亚硫酸铋：指示剂，抑制革兰氏阳性菌和大肠菌群，但不影响沙门氏菌的生长

亚硫酸钠：6.0g

琼脂：18.0g~20.0g（培养基的凝固剂） 蒸馏水：1000mL

**HE琼脂**：

* 蛋白胨：12.0g

提供碳源、氮源、维生素和矿物质

牛肉膏：3.0g

乳糖：12.0g

为可发酵的糖类

蔗糖：12.0g

水杨素：2.0g

胆盐：20.0g（抑制革兰氏阳性菌） 氯化钠：5.0g（维持均衡的渗透压）

琼脂：18.0g~20.0g（培养基的凝固剂） 蒸馏水：1000mL

0.4%溴麝香草酚蓝溶液：16.0mL（pH指示剂，发酵糖产酸的菌落呈红色，不发酵糖的菌落为蓝绿色）

Andrade指示剂：20.0mL

* 酸性复红：0.5g（抑制革兰氏阳性菌）

1mol/L氢氧化钠溶液：16.0mL 蒸馏水：100mL

甲液：20.0mL（用于检测硫化氢的产生，使菌落中心呈黑色）

* 硫代硫酸钠：34.0g 柠檬酸铁铵：4.0g 蒸馏水：100mL

乙液：20.0mL

* 去氧胆酸钠：10.0g（抑制革兰氏阳性菌） 蒸馏水：100mL

**XLD（木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂）**：

* 酵母膏：3.0g（提供氮源、维生素、生长因子）

L-赖氨酸：5.0g

木糖：3.75g

为可发酵的糖类

乳糖：7.5g

蔗糖：7.5g

柠檬酸铁铵：0.8g

硫代硫酸钠可被某些细菌还原成H2S，与柠檬酸铁铵中的铁盐生成黑色硫化铁，使得产H2S的微生物菌落中心变黑。

硫代硫酸钠：6.8g

氯化钠：5.0g（维持均衡的渗透压） 琼脂：15.0g（培养基的凝固剂）

酚红：0.08g（pH指示剂，能够发酵木糖-蔗糖-乳糖产酸的微生物菌落及周围培养基显黄色）

去氧胆酸钠：2.5g（抑制革兰氏阳性菌） 蒸馏水：1000mL

4. 生化试验（生化培养基）：

**TSI（三糖铁琼脂）**：

* 蛋白胨：20.0g

提供氮源、维生素、矿物质

牛肉膏：5.0g

乳糖：10.0g

为可发酵糖类，其产酸时通过酚红指示剂测出，酸性呈黄色，碱性呈红色

蔗糖：10.0g

葡萄糖：1.0g

酚红：0.025g或5.0g/L溶液5.0mL（酸碱指示剂）

硫酸亚铁铵(含6个结晶水)：0.2g

硫代硫酸钠可被某些细菌还原为硫化氢，与硫酸亚铁中的铁盐生成黑色硫化铁

硫代硫酸钠：0.2g

氯化钠：5.0g（维持均衡的渗透压）

琼脂：12.0g（培养基的凝固剂。） 蒸馏水：1000mL

**蛋白胨水、靛基质试剂**：

①蛋白胨水：

* 蛋白胨(或胰蛋白胨)：20.0g（提供氮源，维生素，生长因子）

氯化钠：5.0g（维持均衡的渗透压） 蒸馏水：1000mL

②靛基质试剂：含有色氨酸酶的细菌，能分解蛋白胨中的色氨酸，形成靛基质（吲哚）。靛基质无色，当加入对二氨基苯甲醛试剂后，形成可见的深红色或玫瑰红色醌式化合物。

* 柯凡克试剂：阳性者于试剂层呈深红色
* 欧-波试剂：阳性者于液面接触处呈玫瑰红色

**尿素琼脂**（pH7.2）：尿素酶阳性者由于产碱而使培养基变为红色。

* 蛋白胨 ：1.0g（提供氮源满足细菌生长需要）

氯化钠：5.0g（维持稳定的渗透压） 葡萄糖：1.0g（为可发酵糖）

磷酸二氢钾：2.0g（缓冲剂） 0.4%酚红：3.0mL（指示剂）

琼脂：20.0g（凝固剂） 蒸馏水：1000mL 20%尿素溶液：100mL

**KCN（氰化钾培养基）**：

如有细菌生长即为阳性（不抑制），经2d细菌不生长为阴性（抑制）。

* 蛋白胨 10.0g（提供碳氮源、维生素和生长因子）

氯化钠5.0g（维持均衡的渗透压）

磷酸二氢钾0.225g

缓冲剂

磷酸氢二钠5.64g

蒸馏水1000mL

0.5%氰化钾：20.0mL（细菌呼吸酶系统的抑制剂，可与呼吸酶作用使酶失去活性，抑制细菌的生长，但有的细菌在一定浓度的氰化钾存在时仍能生长，以此鉴别细菌。）

**赖氨酸脱羧酶试验培养基**：

氨基酸脱羧酶阳性者由于产碱,培养基应呈紫色。阴性者无碱性产物,但因葡萄糖产酸而使培养基变为黄色。对照管应为黄色。

* 蛋白胨 ：5.0g

提供碳氮源、维生素和生长因子

酵母浸膏：3.0g

葡萄糖：1.0g（可发酵的糖类） 蒸馏水：1000mL

1.6%溴甲酚紫-乙醇溶液：1.0mL（为pH指示剂）

L-赖氨酸或DL-赖氨酸：0.5g/100mL或1.0g/100mL

**糖发酵管**：

在基础培养基加入各种糖类检测细菌发酵糖类的特性。（国标采用葡萄糖）。

* 牛肉膏： 5.0g

提供碳氮源、维生素和生长因子

蛋白胨：10.0g

氯化钠：3.0g（维持均衡的渗透压）

磷酸氢二钠(含12个结晶水) ：2.0g（缓冲剂）

0.2%溴麝香草酚蓝溶液：12.0mL（pH指示剂，酸性呈黄色，碱性呈蓝色）

蒸馏水：1000mL

**ONPG（邻硝基酚β-D 半乳糖苷培养基）**：

* 邻硝基酚β-D半乳糖苷(ONPG)：60.0mg

0.01mol/L磷酸钠缓冲液(pH7.5)： 10.0mL

1%蛋白胨水(pH7.5)： 30.0mL

**半固体琼脂**：

* 牛肉膏： 0.3g 蛋白胨：1.0g 氯化钠：0.5g

琼脂：0.35g~0.4g 蒸馏水：100mL

**丙二酸钠培养基**：

* 酵母浸膏 ：1.0g（提供碳氮源、维生素和生长因子）

硫酸铵：2.0g（提供氮源）

磷酸氢二钾：0.6g

缓冲剂

磷酸二氢钾：0.4g

氯化钠：2.0g（维持均衡的渗透压）

丙二酸钠：3.0g（细菌能利用丙二酸钠作为碳源，并将其分解成碳酸钠，则导致碱性增强）

0.2%溴麝香草酚蓝溶液：12.0mL（pH指示剂，酸性呈黄色，碱性呈蓝色）

蒸馏水：1000mL

三、致病原因

1.沙门氏菌能引起人和动物的疾病，主要是通过消化道传染。

2. 少量沙门氏菌一般不会引起中毒。中毒发生跟菌量、菌型、毒力大小以及个体差异有关。

3. 沙门氏菌性食物中毒一般认为进食大量活菌（105-106CFU/g）和毒素协同作用造成。

**第二节** 金黄色葡萄球菌的检验

一、生物学特性

（一）形态与染色

* 典型的葡萄球菌呈球形，直径0.4µm-1.2µm，致病性葡萄球菌一般较非致病性菌小，且各个菌体的大小及排列也较整齐。细菌繁殖时呈多个平面的不规则分裂，堆积成为葡萄串状排列。
* 在液体培养基中生长，常呈双球或短链状排列，易误认为链球菌。葡萄球菌无鞭毛及芽胞，一般不形成荚膜，易被碱性染料着色，G+，当衰老、死亡或被白细胞吞噬后常转为革兰氏阴性，对青霉素有抗药性的菌株也为革兰氏阴性。

（二）培养特性

* 营养要求不高，在普通培养基上生长良好。需氧或兼性厌氧，最适生长温度为37℃，最适pH值为7.4。
* 在普通营养琼脂平板上，培养24h-48h后，可形成圆形、凸起、边缘整齐、表面光滑、湿润、有光泽、不透明菌落。菌落直径通常在1mm-2mm，但也有大至4mm-5mm者。
* 金葡在Baird-Parker平板上菌落直径2-3mm，灰色到黑色，边缘淡色，周围有一浑浊带，外层有一透明圈。接种针接触有奶油至树脂硬度。偶见非脂肪溶解的类似菌落单位浑浊带和透明圈。
* 可产生不同色素，如金黄色、白色及柠檬色，这些色素为脂溶性，能溶于醇、乙醚、氯仿及苯等有机溶剂中，因不溶于水，故色素只限于培养物，而不外渗至培养基中。
* 色素的形成依培养条件而异：通常在22℃产生色素较多；于37℃培养后，再置室温1d-2d，色素产生明显；在固体培养基中含有碳水化合物、牛乳或血清等，色素形成最好，有O2及CO2环境下易形成色素，而在无O2环境中不形成色素。
* 耐盐性强，在含5％-10％的氯化钠培养基中能生长，在含有20％-30％二氧化碳的环境中培养，可产生大量的毒素。
* 在肉汤培养基中生长迅速，37℃24h培养后，呈均匀混浊生长，延长培养时间，管底出现少量沉淀，轻轻振摇，沉淀物上升，旋即消散，培养2d-3d后可形成很薄的菌环，在管底则形成多量粘稠沉淀。
* 在血琼脂平板上，形成的菌落较大，多数致病性菌株可产生溶血毒素，使菌落周围产生透明的溶血圈(β溶血)。

（三）生化特性

* 本属细菌大多数不能分解乳糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖。产酸不产气。
* 致病菌株能分解甘露醇，产酸。甲基红阳性，V—P为弱阳性，多数菌株能分解尿素产氨，还原硝酸盐，不产生吲哚。

（四）抗原构造

* 葡萄球菌经水解后，用沉淀法分析，可得到两种抗原成分：蛋白质抗原、多糖类抗原。

1. 蛋白质抗原

* 主要为葡萄球菌A蛋白(SPA)，为金黄色葡萄球菌的一种表面抗原，存在于细菌细胞壁的表面，90％以上的金黄色葡萄球菌有此抗原。
* SPA能抑制吞噬细胞的吞噬作用，对T、B细胞是良好的促分裂原。

2. 多糖类抗原

* 为半抗原，存在于细胞壁上，是金黄色葡萄球菌的一种重要抗原，具有型特异性。
* 其抗原决定簇为磷壁酸的核糖醇单位。
* 此抗原可用于葡萄球菌的分型。

（五）抵抗力

* 葡萄球菌抵抗力较强，为不形成芽胞的细菌中最强者。
* 在干燥的脓汁或血液中可存活数月。加热80℃ 30min才能杀死，煮沸可迅速使它死亡。
* 在5％石炭酸、0.1％升汞中10min-15min死亡。
* 对某些染料较敏感，1:100000-1:200000稀释的龙胆紫溶液能抑制其生长。
* 对磺胺类药物的敏感较低，对青霉素、红霉素和庆大霉素高度敏感。

二、检验所需培养基：

典型菌落：金黄色葡萄球菌在Baird-Parker平板上呈圆形，表面光滑、凸起、湿润、菌落直径为2 mm~3mm，颜色呈灰黑色至黑色，有光泽，常有浅色(非白色)的边缘，周围绕以不透明圈(沉淀),其外常有一清晰带。当用接种针触及菌落时具有黄油样黏稠感。有时可见到不分解脂肪的菌株，除没有不透明圈和清晰带外，其他外观基本相同。从长期贮存的冷冻或脱水食品中分离的菌落，其黑色常较典型菌落浅些，且外观可能较粗糙，质地较干燥。

（一）第一法：定性

1.增菌：

**7.5%氯化钠肉汤**：

* 蛋白胨：10.0g

提供碳源、氮源、维生素和矿物质

牛肉膏：5.0g

氯化钠：75g（较高含量的氯化钠提供较高的渗透压，抑制大多数非葡萄球菌的微生物。）

蒸馏水：1000mL

2.分离：

**血琼脂平板**：

* 豆粉琼脂(pH7.5±0.2)： 100mL 脱纤维羊血(或兔血)： 5mL~10mL

**Baird-Parker琼脂平板**：

①成分：

* 胰蛋白胨：10.0g

提供碳氮源、维生素和生长因子

牛肉膏：5.0g

酵母膏：1.0g

丙酮酸钠：10.0g

刺激葡萄球菌的生长

甘氨酸：12.0g

氯化锂(LiCl·6H2O)：5.0g（抑制非葡萄球菌微生物）

琼脂：20.0g（凝固剂） 蒸馏水：950mL

②增菌剂：

* 30%卵黄盐水：50mL（含有卵磷酯酶的葡萄球菌讲解卵黄使菌落产生透明圈，而脂酶作用则产生不透明沉淀环）

1%亚碲酸钾溶液：10mL（抑制非葡萄球菌微生物；金黄色葡萄球菌没有被抑制，其能将亚碲酸钾还原为碲在菌落中心呈黑色，易于观察。）

3.染色镜检：

**革兰氏染色液**：

涂片→固定→结晶紫色染色→水洗→碘液媒染→水洗→酒精脱色→沙黄复染→水洗→干燥→观察。

①结晶紫染色液：

* 结晶紫：1.0g 95%乙醇：20.0mL 1%草酸铵水溶液：80.0mL

②革兰氏碘液：

* 碘：1.0g 碘化钾：2.0g 蒸馏水：300mL

③沙黄复染液：

* 沙黄：0.25g 95%乙醇：10.0mL 蒸馏水：90.0mL

4.血浆凝固酶实验：

**BHI（脑心浸出液肉汤）**：

* 胰蛋白质胨：10.0g

提供氮源、维生素和生长因子

牛心浸出液：500mL

氯化钠：5.0g（维持均衡的渗透压）

磷酸氢二钠(12H2O)：2.5g（缓冲剂）

葡萄糖：2.0g（可为多种细菌提供能源）

**营养琼脂小斜面**：

* 蛋白胨：10.0g

提供碳源、氮源和维生素满足细菌生长的需求

牛肉膏：3.0g

氯化钠：5.0g（维持均衡的渗透压）

琼脂：15.0g~20.0g（凝固剂） 蒸馏水：1000mL

**兔血浆**：: 3.8%柠檬酸钠；兔全血

（二）第二法：Baird Parker平板法

1.稀释：

**PBS(磷酸盐缓冲液)**：

* 磷酸二氢钾(KH2PO4)： 34.0g 蒸馏水：500mL

**无菌生理盐水**：

* 氯化钠：8.5g 蒸馏水：1000mL

2.培养：**Baird-Parker琼脂平板**：（见第一法P9）

（三）第三法：MPN法

1.稀释：见第二法

2.增菌：见第一法

3.培养：**Baird-Parker琼脂平板**：（见第一法P9）

三、致病原因

1. 葡萄球菌食物中毒，是由葡萄球菌在繁殖过程中分泌到菌细胞外的肠毒素引起的。

2. A型肠毒素的毒力最强，摄入1µg即能引起中毒，而B型肠毒素摄入25µg才能引起中毒。

3. 葡萄球菌的致病力决定于细菌产生的毒素和酶的能力，毒素包括溶血毒素、杀白血球毒素、肠毒素，酶包括血浆凝固酶、溶纤维蛋白酶、透明质酸酶、脱氧核糖核酸酶

* 溶血毒素：多数致病菌株能产生该毒素，使血琼脂平板菌落周围出现溶血环，在试管中出现溶血反应。
* 肠毒素：金黄色葡萄球菌的某些菌株能产生引起急性肠胃炎的肠毒素，肠毒素为一种可溶性蛋白质，耐热，共分6型(A、B、C1．C2、D、E)，各型具有不同的血清学特性，其中以A型引起的食物中毒最多，B型和C型次之。
* 血浆凝固酶：这是一种能使含有枸橼酸钠或肝素抗凝剂的兔或人血浆发生凝固的酶。大多数致病性葡萄球菌产生此酶，而非致病性菌一般不产生。因此，凝固酶是鉴别葡萄球菌有无致病性的重要指标。
* 溶纤维蛋白酶：可使人、犬、豚鼠及家兔的已经凝固的纤维蛋白溶解。

第三节 志贺氏菌检验

志贺氏菌属(Shigella)是引起细菌性痢疾的病原细菌，通称痢疾杆菌。

一、生物学性状

（一）形态特性

* 志贺氏菌属的形态，与肠杆菌科细菌的形态相似。为革兰氏阴性短杆菌，两侧平行、末端钝圆，长约2µm～3µm，宽约0.5µm～0.7µm。
* 无荚膜、无鞭毛、不形成芽胞，无动力，是与沙门氏菌不同之处。

（二）培养特性

* 需氧或兼性厌氧菌，但厌氧培养时，生长较不旺盛。
* 营养要求不高，在普通培养基上易于生长。
* 最适温度为37℃左右，但在10℃～40℃范围内亦可生长，最适pH约为7.2。
* 志贺氏菌属的细菌发酵糖类和醇类的能力远比艾希氏菌属弱，但都能发酵葡萄糖，对侧金盏花醇、肌醇和水杨苷均不发酵，对其他糖类多为少数发酵。
* 在固体培养基上经培养18h～24h后，菌落圆形、透明、隆起并微凸、直径约2mm～3mm、表面光滑、湿润、边缘整齐。
* 在普通琼脂培养基上无色。
* SS培养基：37℃，18-24h，菌落无色半透明，中等或者较小菌落，边缘整齐，光滑，微隆起，无硫化斑。
* 志贺氏菌在SS和Mac上形成较小的，无色半透明不发酵乳糖的菌落；在HE上形成不发酵乳糖的深绿色菌落
* 选择性培养基上可呈现不同的颜色。

（三）抗原构造

1.菌体抗原（O抗原）：型特异性抗原和群特异性抗原

* 型特异性抗原：多糖抗原，光滑型菌株特有，区分菌种的型别。
* 群特异性抗原：由类脂，多糖蛋白组成，特异性较低，光滑型菌株次要抗原成分

2. 表面抗原（K抗原）

* 不耐热，存在于某些性分离菌株菌体表面，可阻止菌体抗原与相应免疫血清发生凝集。
* 某些菌型中表面抗原可决定细菌特异性。

（四）抵抗力

* 总体而言，志贺氏菌对环境抵抗能力比其他肠杆菌弱。
* 在外界环境中的生存力，宋内氏志贺氏菌最强、福氏志贺氏菌次之，而痢疾志贺氏菌最弱。
* 一般潮湿的土壤中能生存34d，37℃的水中存活20d，而在冰块中可存活3个月，粪便中的细菌在室温情况下(20℃左右)可存活11d。含有高浓度胆汁的培养基能抑制某些志贺氏菌株的生长。
* 日光直射30min可杀死，56℃～60 ℃只需19min可杀死，1％石炭酸中15min～30min可杀死。
* 对磺胺、链霉素和氯霉素敏感但很容易产生耐药性。

二、检验所需培养基

1.增菌：**志贺氏菌增菌肉汤-新生霉素**：

①志贺氏菌增菌肉汤：

* 胰蛋白胨：20.0g（提供氮源和生长因素）

葡萄糖：1.0g（可发酵糖）

磷酸氢二钾：2.0g

缓冲剂

磷酸二氢钾：2.0g

氯化钠：5.0g（维持稳定的渗透压）

吐温80(Tween 80)：1.5mL（封闭剂） 蒸馏水：1000.0mL

②新生霉素：抑制杂菌

* 新生霉素：25.0mg 蒸馏水：1000.0mL

2.分离：

**MAC（麦康凯）琼脂**：

* 蛋白胨：20.0g（提供碳氮源、维生素和生长因子）

乳糖：10.0g（可发酵的糖类）

3号胆盐：1.5g

抑制革兰氏阳性菌的生长

结晶紫：0.001g

氯化钠：5.0g（维持稳定的渗透压）

中性红：0.03g（pH指示剂，细菌发酵乳糖产酸时菌落呈粉红色并在菌落周围出现胆盐沉淀的浑浊圈。）

琼脂：15.0g（凝固剂）

蒸馏水：1000.0Ml

**XLD（木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂）**：见P5

3.初步生化试验

**TSI（三糖铁琼脂）**：见P5-P6

**营养琼脂斜面**：见P10

**半固体琼脂**：见P7

4.生化试验及附加生化试验

**葡萄糖铵培养基**：

* 氯化钠：5.0g（维持均衡的渗透压）

硫酸镁：(MgSO4·7H2O)：0.2g（提供生长必须的微量元素）

磷酸二氢铵：1.0g（能利用磷酸二氢铵作为唯一氮源且不需要尼克酸和氨基酸作为生长因子的微生物分解葡萄糖使培养基变酸性）

磷酸氢二钾：1.0g（缓冲剂） 葡萄糖：2.0g（提供碳源）

0.2%溴麝香草酚蓝水溶液：40.0mL（指示剂，产酸时培养基由绿色变为黄色；琼脂是培养基的凝固剂。）

琼脂：20.0g（凝固剂） 蒸馏水：1000.0mL

**尿素琼脂**：见P6

**β-半乳糖苷酶培养基**：

①液体法（ONPG法）:见P7

②平板法（X-Gal法）:

* 蛋白胨：20.0 g 氯化钠：3.0 g 琼脂：15.0 g

5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷(X-Gal)：200.0 mg 蒸馏水：1 000.0 mL

**氨基酸脱羧酶试验培养基**：见P6

**糖发酵管**：见P6-P7

**西蒙氏柠檬酸盐培养基**：

* 氯化钠：5.0 g（维持均衡的渗透压）

硫酸镁(MgSO4·7H2O)：0.2 g（镁离子是各种代谢中的辅因子）

磷酸二氢铵：1.0 g（磷酸二氢铵提供氮源）

磷酸氢二钾：1.0 g（缓冲剂） 柠檬酸钠：5.0 g（作为碳源）

0.2%溴麝香草酚蓝溶液：40.0 mL（pH指示剂，酸性呈黄色，碱性呈蓝色。当细菌可以利用铵盐作为唯一的氮源，同时利用柠檬酸盐作为唯一的碳源时，可在柠檬酸盐培养基上生长，分解柠檬酸钠，生成碳酸钠，使培养基产碱变蓝色。）

琼脂：20 g（凝固剂） 蒸馏水：1000.0 mL

**粘液酸盐培养基**：

①测试肉汤：

* 酪蛋白胨：10.0 g 溴麝香草酚蓝溶液：0.024 g

蒸馏水：1000.0 mL 粘液酸：10.0 g

②质控肉汤：

* 酪蛋白胨：10.0 g 溴麝香草酚蓝溶液：0.024 g

蒸馏水：1000.0 mL

**蛋白胨水、靛基质试剂**：见P6

三、致病原因

志贺氏菌的致病作用，主要是侵袭力和菌体内毒素，个别菌株能产生外毒素，常使人得痢疾及食物中毒。

1.侵染力：

* 志贺氏菌进入大肠后，由于菌毛的作用，粘附在大肠和回肠末端肠粘膜的上皮细胞上，继而在上皮层繁殖，扩散至邻近细胞及上皮下层。
* 目前认为不论是产生外毒素的还是只产生内毒素的志贺氏菌，必须侵入肠壁才能致病，非侵袭性痢疾杆菌突变菌株不能引起疾病。
* 因此，对粘膜组织的侵袭力是决定致病力的主要因素。

2.内毒素：

* 志贺氏菌属中各菌株都有强烈的内毒素。作用于肠壁，使通透性增高，从而促进毒素的吸收，引起一系列毒血症症状，如发热、神志障碍、甚至中毒性休克。
* 毒素破坏粘膜形成炎症、溃疡，呈现典型的痢疾脓血粘液便。
* 毒素作用于肠壁植物神经，使肠功能紊乱，肠蠕动共济失调和痉挛，尤其直肠括约肌最明显，因而发生腹痛、里急后重等症状。

3. 外毒素（肠毒素）：

* 痢疾志贺氏菌Ⅰ型和Ⅱ型能产生肠毒素，蛋白质，不耐热，使肠黏膜通透性增加，并导致血管内皮细胞损害。
* 痢疾志贺氏菌Ⅰ型突变菌株不产肠毒素但仍有侵袭力。

**第四节** 溶血性链球菌检验

一、生物学特性

（一）形态特征

* 革兰氏阳性菌；菌体呈球形或卵圆形，呈链状排列；无芽孢；无鞭毛；在血清肉汤中幼龄培养物形成荚膜，以后逐渐消失。

（二）培养特性

* 多数为需氧或兼性厌氧，少数为微需氧或专性厌氧；
* 对营养要求高，普通培养基不能良好生长，（需加血清液、腹水等）；
* 最适温度37℃， 最适pH值7.4-7.6；
* 在血清肉汤液体培养基中，多呈絮状或颗粒状沉淀生长（上清下浊）；
* 血平板上，形成灰白色，半透明或者半透明、表面光滑、有乳光圆形突起的细小菌落，直径0.5-0.75mm，针尖大小，菌落周围出现不同溶血现象。

（三）抵抗力

* 抵抗力不强。
* 对热敏感，60℃3分钟可杀死大部分链球菌；
* 对一般消毒剂敏感，在干燥尘埃中可存活数日；
* 乙型链球菌对青霉素、红霉素、氯霉素、四环素、磺胺均敏感。

二、检验所需培养基

1.增菌：

**改良胰蛋白胨大豆肉汤培养基**：

①基础培养基（胰蛋白胨大豆肉汤TSB）：

* 胰蛋白胨：17.0 g

提供氮源、维生素和生长因子

大豆蛋白：3.0 g

氯化钠：5.0 g（维持均衡的渗透压） 葡萄糖：2.5 g（提供碳源）

磷酸二氢钾（无水）：2.5 g（缓冲剂） 蒸馏水：1000.0 mL

②抗生素溶液：（抑制杂菌生长）

* 多黏菌素溶液
* 萘啶酮酸钠溶液

③完全培养基：

* 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)：1000.0 mL 多黏菌素溶液：10.0 mL

萘啶酮酸钠溶液：10.0 mL

2.分离：

**哥伦比亚CNA血琼脂平板**：

* 胰酪蛋白胨：12.0 g

动物组织蛋白消化液：5.0 g

提供碳氮源、维生素

酵母提取物：3.0 g

牛肉提取物：3.0 g

玉米淀粉：1.0 g（促进奈瑟氏菌的生长和增强链球菌的溶血特性）

氯化钠：5.0 g（维持均衡的渗透压）

多黏菌素：0.01 g

抑制杂菌生长

萘啶酸：0.01 g

琼脂：13.5 g（凝固剂） 蒸馏水：1000.0 mL

3.鉴定：

**哥伦比亚血琼脂**：

①基础培养基：

* 动物组织酶解：23.0 g（提供碳氮源、维生素和氨基酸）

淀粉：1.0 g（促进奈瑟氏菌的生长和增强链球菌的溶血特性）

氯化钠：5.0 g（维持均衡的渗透压）

琼脂：8.0 g ～18.0 g 18.0 g（凝固剂） 蒸馏水：1000.0 mL

②无菌脱纤维绵羊血

③完全培养基：

* 基础培养基：1000.0 mL
* 无菌脱纤维绵羊血：50.0 mL

**革兰氏染色液**：见P9

三、致病原因

溶血性链球菌致病性与毒素及其侵袭性酶有关。

1.毒素：

* 链球菌溶血素：溶解红细胞，杀害白细胞，毒害心脏。
* 致热外毒素：耐热，毒性大。
* 红疹毒素：外毒素，对热稳定，引起红疹。
* 杀白细胞素：是白细胞变形，破坏白细胞。

2.侵袭性酶：

* 链激酶：又称为纤维蛋白酶，激活后能使血液中纤维蛋白酶原原变成纤维蛋白酶，溶解血块或阻止血浆凝固，具有增强细菌在组织中的扩散作用。
* 透明质酸酶：又称扩散因子，能分解细胞间质的透明质酸，故能增加细菌的侵袭力，使病菌易在组织中扩散。

**第五节** 蜡样芽胞杆菌检验

一、生物学特性

（一）形态特性

* 革兰氏阳性大杆菌，芽孢卵圆形，多中央位，无荚膜有鞭毛。

（二）培养特性

* 兼性厌氧，生在温度20-45℃。对营养要求不高。
* 血琼脂平板上：先形成α溶血现象，培养时间长后出现β溶血。

（三）抗原特性

* 耐热性抗原，不耐热抗原，均未用于检验。

（四）抵抗力

* 营养体细胞抵抗力不强，芽孢抵抗力强。

二、检验所需培养基

**PBS**（磷酸盐缓冲液）：见P10

**MYP** (甘露醇卵黄多黏菌素)琼脂：

* 蛋白胨：10.0 g

提供氮源、维生素和生长因子

牛肉粉：1.0 g

D-甘露醇：10.0 g（可发酵糖类）

氯化钠：10.0 g（维持均衡的渗透压） 琼脂粉：12.0～15.0 g（凝固剂）

0.2 %酚红溶液：13.0 mL（pH指示剂，不发酵D—甘露醇产酸使菌落显红色）

50 %卵黄液：50.0 mL（卵黄含有卵磷脂，蜡样芽孢杆菌产生卵磷脂酶，在菌落周围产生沉淀环）

多黏菌素B：100,000 IU（抑制杂菌生长） 蒸馏水：950.0mL

**胰酪胨大豆多黏菌素肉汤**：

* 胰酪胨（或酪蛋白胨）：17.0g

提供氮源、维生素和生长因子

植物蛋白胨（或大豆蛋白胨）：3.0 g

氯化钠：5.0 g（维持均衡的渗透压）

无水磷酸氢二钾：2.5 g（缓冲剂） 葡萄糖：2.5 g（提供碳源）

多黏菌素B：100 IU/mL（抑制杂菌生长） 蒸馏水：1000.0 mL

**营养琼脂**：见P10

**动力培养基**：

* 胰酪胨（或酪蛋白胨）：10.0 g

提供碳氮源、维生素和生长因子

酵母粉：2.5 g

葡萄糖：5.0 g（可发酵糖） 无水磷酸氢二钠：2.5 g（缓冲剂）

琼脂粉：3.0 ～5.0g（凝固剂） 蒸馏水：1 000.0 mL

**硝酸盐肉汤**：

接种后在36℃±1℃培养24 h～72 h。加甲液和乙液各1滴，观察结果，阳性反应立即或数分钟内显红色。如为阴性，可再加入锌粉少许，如出现红色，表示硝酸盐未被还原，为阴性。反之，则表示硝酸盐已被还原，为阳性。

①成分：

* 蛋白胨：5.0 g（提供氮源和生长因子）

硝酸钾：0.2 g 蒸馏水：1 000.0 mL

②硝酸盐还原试剂：

* 甲液：将对氨基苯磺酸0.8 g溶解于2.5 mol/L乙酸溶液100 mL中。

乙液：将甲萘胺0.5 g溶解于2.5 mol/L乙酸溶液100 mL中。

**酪蛋白琼脂**：

* 酪蛋白：10.0 g（某些细菌产生酪蛋白酶可分解酪蛋白使菌落周围的培养基形成透明圈）

牛肉粉：3.0 g（提供氮源、维生素和生长因子）

无水磷酸氢二钠：2.0 g（缓冲剂）

氯化钠：5.0 g（维持均衡的渗透压）

琼脂粉：12.0～15.0 g（凝固剂）

蒸馏水：1 000.0 mL

0.4 %溴麝香草酚蓝溶液：12.5 mL（指示剂）

**硫酸锰营养琼脂培养基**：

* 胰蛋白胨：5.0 g

提供碳氮源、维生素和生长因子

酵母浸膏：5.0 g

3.08%硫酸锰（MnSO4·H2O）：1.0 mL（促进芽孢的生成）

磷酸氢二钾：4.0 g（缓冲剂） 葡萄糖：5.0 g（可发酵糖）

琼脂粉：12.0～15.0 g（凝固剂） 蒸馏水：1000.0 mL

**糖发酵管**：见P6-P7

**V-P培养基**：

用营养琼脂培养物接种于本培养基中，36℃±1℃培养48 h～72 h。加入6 %α-萘酚-乙醇溶液0.5 mL和40 %氢氧化钾溶液0.2 mL，充分振摇试管，观察结果，阳性反应立即或于数分钟内出现红色。如为阴性，应放在36 ℃±1 ℃培养4 h再观察。

* 蛋白胨：7.0 g

提供氮源、碳源

葡萄糖：5.0 g

磷酸氢二钾：5.0 g（缓冲剂）

氯化钠：5.0 g（维持均衡的渗透压） 蒸馏水：1000.0 mL

**TSSB** (胰酪胨大豆羊血)琼脂：

在30-32℃培养18-24小时，蜡样芽孢杆菌典型特征为在菌落周围呈现β型完全溶血的溶血环。

* 胰酪胨（或酪蛋白胨）：15.0g

提供氮源、维生素和生长因子

植物蛋白胨（或大豆蛋白胨）：5.0 g

氯化钠：5.0 g（维持均衡渗透压） 葡萄糖：2.5 g（可发酵糖）

无水磷酸氢二钾：2.5 g（缓冲剂）

琼脂粉：12.0～15.0 g（凝固剂） 蒸馏水：1000.0 mL

**溶菌酶营养肉汤**：

36℃±1℃培养24 h，蜡样芽胞杆菌在本培养基(含0.001％溶菌酶)中能生长。同时抑制其他菌生长。

* 牛肉粉：3.0 g 蛋白胨：5.0 g 蒸馏水：990.0 mL

0.1%溶菌酶溶液：10.0 mL（选择性培养）

**西蒙氏柠檬酸盐培养基**：见P12

**明胶培养基**：

* 蛋白胨5.0 g

提供氮源、维生素、矿物质

牛肉粉3.0 g

明胶120.0 g（某些含明胶酶的细菌水解明胶，使其液化而降低明胶的胶凝作用。）

蒸馏水1 000.0 mL

三、致病原因

可产生肠毒素，溶血素等。主要引起食物中毒的是肠毒素。

**第六节** 肉毒梭菌的检验

一、生物学特性

（一）形态特性

* 革兰氏阳性芽孢杆菌，周身鞭毛，无荚膜。
* 芽孢形状因菌型不同而不同。A、B型芽孢大于菌体，位于菌体近端，菌体呈现钥匙状或者球拍状。其他四型芽孢一般不超过菌体。

（二）培养特性

* 严格厌氧；对营养要求不高；最适生长温度28-37℃，最适生长pH值6.8-7.6，最适产毒pH为7.8-8.2。

二、检验所需培养基

**疱肉培养基**：

* 新鲜牛肉 500.0g（牛肉粒为变性肉蛋白质，含有较多的硫氢基团，硫氢基团起还原作用，为厌氧细菌提供良好的生长环境。）

蛋白胨30.0g

提供碳源、氮源、维生素和矿物质

酵母浸膏5.0g

可溶性淀粉2.0g

磷酸二氢钠5.0g（缓冲剂） 葡萄糖3.0g（提供碳源） 蒸馏水1000.0mL

**TPGYT** (胰蛋白酶胰蛋白胨葡萄糖酵母膏肉汤)：

基础成分(TPGY肉汤)：

* 胰酪胨： 50.0g

提供氮源、维生素和生长因子

蛋白胨：5.0g

酵母浸膏：20.0g

硫乙醇酸钠：1.0g（能有效降低氧化还原电位，防止过氧化物的积累对某些菌产生毒性，同时其硫氢基团有钝化含砷、汞及其它重金属防腐剂的抑菌作用）

葡萄糖：4.0g（提供碳源） 蒸馏水：1000.0mL 胰酶液

卵黄琼脂培养基：

* 酵母浸膏：5.0g

提供碳氮源、维生素和生长因子

胰胨：5.0g

䏡胨：20.0g

氯化钠：5.0g（维持均衡的渗透压） 琼脂：20.0g（凝固剂）

蒸馏水：1000.0mL

卵黄乳液：15Ml/100mL（产气荚膜梭菌具有卵磷脂酶分解卵磷脂生成不溶性甘油酯形成乳白色的混浊带。）

**明胶磷酸盐缓冲液**：

* 明胶：2.0g 磷酸氢二钠(Na2HPO4)： 4.0g 蒸馏水：1000.0mL

**革兰氏染色**：见P9

**胰蛋白酶溶液**：

* 胰蛋白酶(1∶250) ：10.0g 蒸馏水：100.0mL

**PBS(磷酸盐缓冲液)**：见P10

三、致病原因

肉毒毒素是神经毒素，经肠道吸收后，作用于外周神经末梢，植物神经末梢及颅脑神经，阻止神经递质乙酰胆碱的释放，造成肌肉麻痹和神经功能不全。

**第七节** 致泻大肠埃希氏菌的检验

一、生物学特性

（一）形态特性

* 革兰氏阴性无芽孢杆菌，多数菌株有表毛，能运动；周身菌毛；易被碱性染料染色。

（二）培养特性

* 需氧或兼性厌氧，对营养要求不高，最适生长温度37℃，最适pH值7.2-7.4。
* 血平板：部分菌株能产生β溶血。

（三）生化特性

* 发酵多种碳水化合物产酸产气；氨基酸脱羧作用。

（四）抗原结构

* 抗体抗原（O抗原）
* 鞭毛抗原（H抗原）
* 包膜抗原（K抗原）

二、检验所需培养基

**营养肉汤**：

* 蛋白胨 10.0g

提供碳源、氮源和维生素满足细菌生长的需求

牛肉膏3.0g

氯化钠5.0g（维持均衡的渗透压） 蒸馏水1000mL

**肠道菌增菌肉汤**：

* 蛋白胨：10.0g（提供蛋白质、维生素和氨基酸）

磷酸氢二钠：8.0g

缓冲剂

磷酸二氢钾：2.0g

牛胆盐：20.0g

选择性抑菌剂，抑制非肠杆菌科细菌的生长

煌绿：0.015g

葡萄糖：5.0g（提供碳源） 蒸馏水：1000Ml

**MAC（麦康凯）琼脂**：见P11

**EMB (伊红美蓝)琼脂**：

* 蛋白胨10.0g（提供碳源和氮源） 磷酸氢二钾(K2HPO4) 2.0g（缓冲剂）

2%伊红Y水溶液20.0mL

抑菌剂和pH指示剂，可抑制革兰氏阳性菌，在酸性条件下产生沉淀，形成紫黑色菌落或具黑色中心的外围无色透明的菌落。

0.5%美蓝水溶液13.0mL

琼脂15.0g（凝固剂） 乳糖10.0g（可发酵的糖类） 蒸馏水1000mL

**TSI**（三糖铁琼脂）：见P5-P6

**蛋白胨水、靛基质试剂**：见P6

**半固体琼脂**：见P7

**尿素琼脂**：见P6

**KCN**（氰化钾培养基）：见P6

**BHI**（脑心浸出液肉汤）：见P9-P10

三、致病原因：

毒素型食物中毒，外毒素包括不耐热肠毒素、耐热肠毒素。

**第八节** 大肠埃希氏菌O157∶H7/NM检验

一、生物学特性

（一）形态特性

* 革兰氏阴性菌无芽孢杆菌，有鞭毛，动力试验阳性。

（二）培养特性

* 在pH3-5条件可长期存活，产生致死性志贺菌毒素；
* SS培养基上菌落呈红色；MAC培养基上，菌落砖红色，圆形隆起，光滑湿润，边缘整齐。
* 三糖铁培养基全部变成黄色。

（三）生化反应

* 跟多数大肠杆菌一致。

（四）抵抗力

* 耐酸性较强；耐低温，可在冰箱长期存在；不耐热。

二、检验所需的培养基

**改良EC肉汤**(mEC+n)：

* 胰蛋白胨：20.0g（提供碳源、氮源） 乳糖：5.0g（可发酵的糖类）

3号胆盐：1.12g

抑制通常在食品中存在的杂菌

新生霉素钠盐溶液(20mg/mL) 1.0mL

K2HPO4·7H2O：4.0g

缓冲剂

KH2PO4：1.5g

NaCl：5.0g（维持均衡的渗透压） 蒸馏水1000mL

**改良山梨醇麦康凯(CT-SMAC)琼脂**：

①山梨醇麦康凯(SMAC)琼脂：

* 蛋白胨：20.0g（提供氮源、维生素和生长因子）

山梨醇：10.0g（可发酵的糖类） 氯化钠：5.0g（维持均衡的渗透压）

3号胆盐：1.5g

抑制革兰氏阳性菌

结晶紫：0.001g

中性红：0.03g（pH指示剂） 琼脂：15.0g（凝固剂） 蒸馏水：1000mL

②亚碲酸钾溶液：抑制非0157的大肠杆菌

* 亚碲酸钾：0.5g 蒸馏水：200mL

③头孢克肟溶液：抑制变形杆菌

* 头孢克肟1.0mg 95%乙醇200mL

④CT-SMAC制法：取1000mL灭菌融化并冷却至46℃±1℃的山梨醇麦康凯(SMAC)琼脂,加入1mL亚碲酸钾溶液和10mL头孢克肟溶液。

**TSI（三糖铁琼脂）**：见P5-P6

**营养琼脂**：见P10

**半固体琼脂**：见P7

**月桂基硫酸盐蛋白胨肉汤-MUG (LST-MUG)**：

* 胰蛋白胨：20.0g（提供碳源和氮源满足细菌生长的需求）

氯化钠：5.0g（维持均衡的渗透压） 乳糖：5.0g（可发酵的糖类）

磷酸氢二钾(K2HPO4)： 2.75g

缓冲剂

磷酸二氢钾(KH2PO4) ：2.75g

4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸苷(MUG) ：0.1g（大肠埃希氏杆菌含有的葡萄糖醛酸苷酶作用于MUG的β糖醛酸苷键，使其水解，释放的4-甲基伞形酮在366nm紫外灯下产生蓝白色荧光。而致病性大肠杆菌(包括O157：H7)不具有葡萄糖醛酸苷酶，因而不会产生荧光。）

十二烷基硫酸钠：0.1g（抑制非大肠菌群细菌的生长） 蒸馏水：1000mL

三、致病原因

1. 黏附因子：是引起附着和脱落损害的必要因子。

2. 毒素：

* 致死性志贺毒素：分I型、II型；具有神经毒性、肠毒性和细胞毒性。
* 溶血素：肠外疾病的重要毒力因子。

补充：

**第九节** 菌落总数

**平板计数琼脂(PCA)培养基**：

* 胰蛋白胨5.0g（提供碳源和氮源）

酵母浸膏 2.5g（提供B族维生素） 葡萄糖 1.0g（提供能源）

琼脂 15.0g（凝固剂） 蒸馏水 1000mL

**第十节** 大肠菌群的检验

**月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤**：

* 胰蛋白胨或胰酪胨：20.0g（提供碳源和氮源满足细菌生长的需求）

氯化钠：5.0g（维持均衡的渗透压）

乳糖：5.0g（大肠菌群可发酵的糖类）

磷酸氢二钾(K2HPO4) ：2.75g

缓冲剂

磷酸二氢钾(KH2PO4) ：2.75g

月桂基硫酸钠：0.1g（抑制非大肠菌群细菌的生长） 蒸馏水：1000mL

**煌绿乳糖胆盐(BGLB)肉汤**：

* 蛋白胨：10.0g（提供碳氮源） 乳糖：10.0g（可发酵糖类）

牛胆粉(oxgall或oxbile)溶液：200mL

抑制非肠杆菌科细菌

0.1%煌绿水溶液：13.3mL

蒸馏水：800mL

**结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)**：

* 蛋白胨：7.0g

提供碳氮源和微量元素

酵母膏：3.0g

乳糖：10.0g（可发酵的糖类）

氯化钠；5.0g（维持均衡的渗透压）

胆盐或3号胆盐：1.5g

抑制革兰氏阳性菌，特别抑制革兰氏阳性杆菌和粪链球菌

结晶紫：0.002g

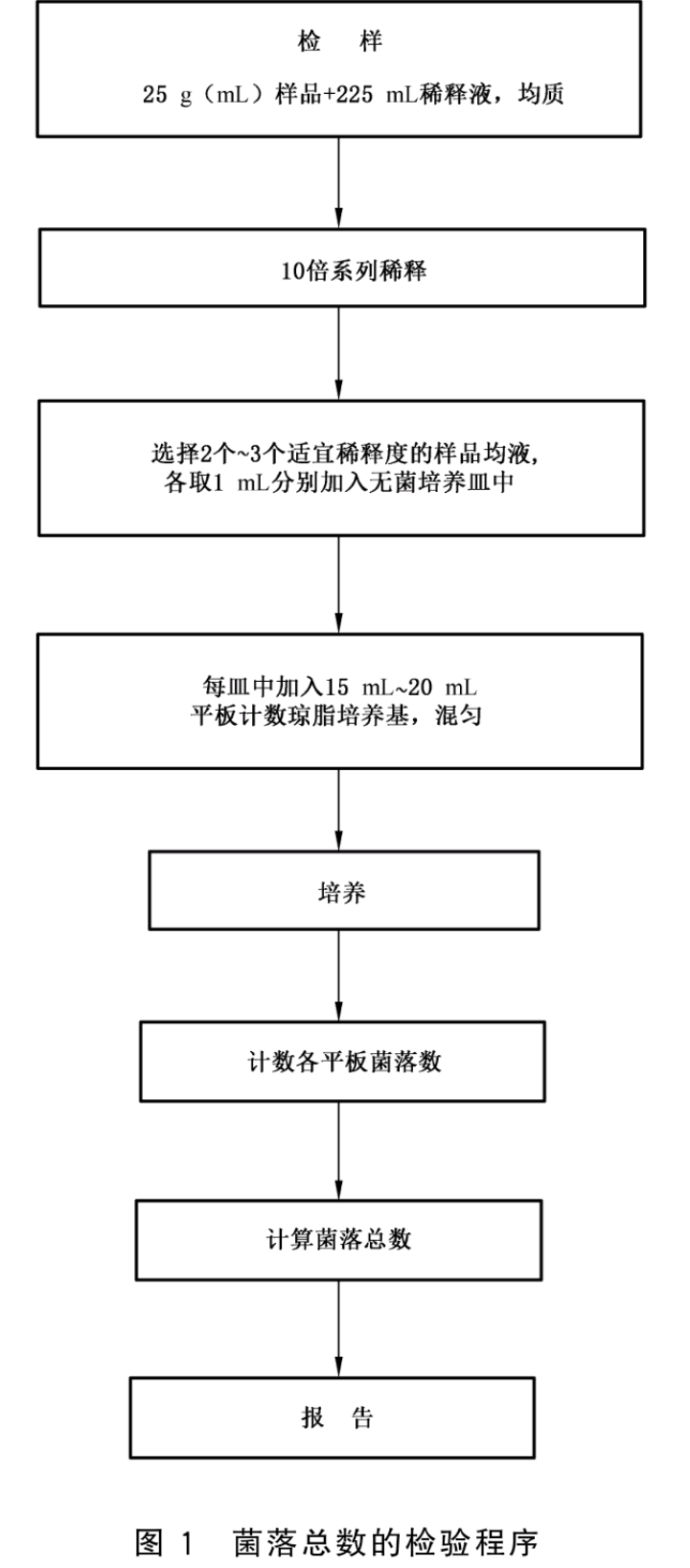
中性红：0.03g（pH指示剂）

琼脂：15g~18g（凝固剂）

蒸馏水：1000mL

**第三部分 四个实验**

一、菌落总数



操作步骤：

1. 样品的稀释

1.1 固体和半固体样品：称取25 g 样品置盛有225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内，8000 r/min～10000r/min 均质1 min～2 min，或放入盛有225 mL 稀释液的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打1 min～2 min，制成1:10的样品匀液。

1.2 液体样品：以无菌吸管吸取25 mL 样品置盛有225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶（瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠）中，充分混匀，制成1:10 的样品匀液。

1.3 用1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取1:10 样品匀液1 mL，沿管壁缓慢注于盛有9 mL 稀释液的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），振摇试管或换用1 支无菌吸管反复吹打使其混合均匀，制成1:100 的样品匀液。

1.4 按1.3 操作程序，制备10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释一次，换用1 次1 mL 无菌吸管或吸头。从制备样品匀液至样品接种完毕,全过程不得超过15min。

1.5 根据对样品污染状况的估计，选择2 个～3 个适宜稀释度的样品匀液（液体样品可包括原液），在进行10 倍递增稀释时，吸取1mL样品匀液于无菌平皿内，每个稀释度做两个平皿。同时，分别吸取1 mL空白稀释液加入两个无菌平皿内作空白对照。

1.6 及时将15 mL～20 mL 冷却至46 ℃的平板计数琼脂培养基（可放置于46 ℃±1 ℃恒温水浴箱中保温）倾注平皿，并转动平皿使其混合均匀。

2 培养

2.1 待琼脂凝固后，将平板翻转，36 ℃±1 ℃培养48 h±2 h。水产品30 ℃±1 ℃培养72h±3 h。

2.2 如果样品中可能含有在琼脂培养基表面弥漫生长的菌落时，可在凝固后的琼脂表面覆盖一薄层琼脂培养基（约4 mL），凝固后翻转平板，按2.1条件进行培养。

3.菌落计数

可用肉眼观察，必要时用放大镜或菌落计数器，记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落计数以菌落形成单位（CFU）表示。

3.1 选取菌落数在30 CFU～300 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于30 CFU 的平板记录具体菌落数，大于300 CFU 的可记录为多不可计。每个稀释度

的菌落数应采用两个平板的平均数。

接下页

3.2 其中一个平板有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数；若片状菌落不到平板的一半，而其余一半中菌落分布又很均匀，即可计算半个平板后乘以2，代表一个平板菌落数。

3.3 当平板上出现菌落间无明显界线的链状生长时，则将每条单链作为一个菌落计数。

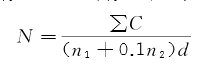
4. 结果与报告

4.1 菌落总数的计算方法

4.1.1 若只有一个稀释度平板在30-300CFU，则计算两平行平板的均数，

再乘以稀释倍数报告之

4.1.2 若有连续两个稀释度符合计数要求则按下公式

∑C：所有符合计数要求的平板菌落数和

N：菌落总数

n1：较低稀释度有效平板数

n2：较高稀释度有效平板数

d：较低稀释度的稀释倍数

4.1.3 若所有稀释度的平板上菌落数均大于300 CFU，则对稀释度最高的平板进行计数，其他平板可记录为多不可计，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。

4.1.4 若所有稀释度的平板菌落数均小于30 CFU，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

4.1.5 若所有稀释度（包括液体样品原液）平板均无菌落生长，则以小于1 乘以最低稀释倍数计算。

4.1.6 若所有稀释度的平板菌落数均不在30 CFU～300 CFU之间，其中一部分小于30 CFU 或大于300CFU 时，则以最接近30 CFU 或300 CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

4.2 菌落总数的报告

4.2.1 菌落数小于100 CFU 时，按“四舍五入”原则修约，以整数报告。

4.2.2 菌落数大于或等于100 CFU 时，第3位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前2位数字，后面用0 代替位数；也可用10的指数形式来表示，按“四舍五入”原则修约后，采用两位有效数字。

4.2.3 若所有平板上为蔓延菌落而无法计数，则报告菌落蔓延。

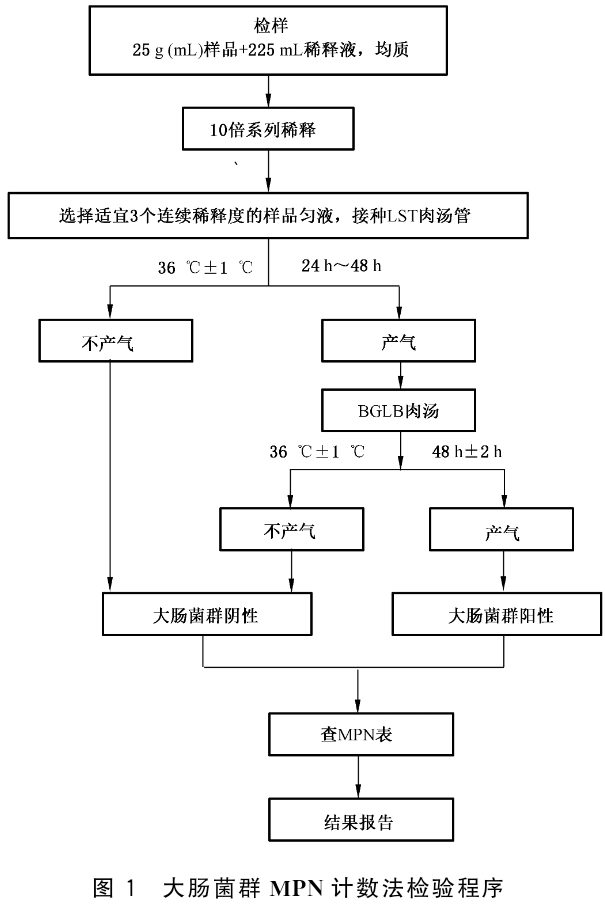
4.2.4 若空白对照上有菌落生长，则此次检测结果无效。

4.2.5 称重取样以CFU/g 为单位报告，体积取样以CFU/mL 为单位报告。

5.注意事项：

* 若样品中可能含有表面蔓延生长的菌落时，可在培基凝固后再覆盖一薄层培养基。
* 水产品置于30 ℃±1 ℃ 培养72h ±3h。

二、大肠菌群



操作步骤：

1.样品的稀释：见P21的1

2.初发酵试验

每个样品,选择3个适宜的连续稀释度的样品匀液(液体样品可以选择原液),每个稀释度接种3管月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤,每管接种1mL(如接种量超过1mL,则用双料LST肉汤),36℃±1℃ 培养24h±2h,观察倒管内是否有气泡产生,24h±2h产气者进行复发酵试验(证实试验),如未产气则继续培养至48h±2h,产气者进行复发酵试验。未产气者为大肠菌群阴性。

3.复发酵试验(证实试验)

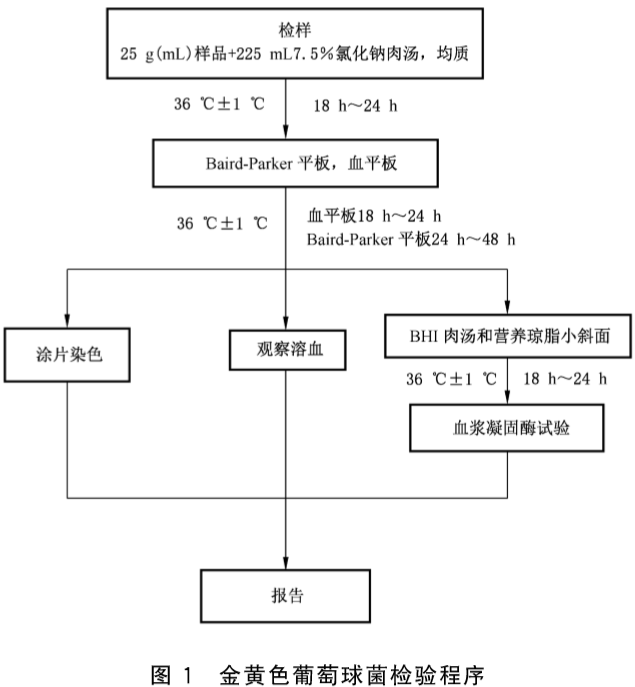
用接种环从产气的LST肉汤管中分别取培养物1 环,移种于煌绿乳糖胆盐肉汤(BGLB)管中,36℃±1℃培养48h±2h,观察产气情况。产气者,计为大肠菌群阳性管。

* 大肠杆菌发酵乳糖产酸后，胆盐与酸结合形成胆酸沉淀，培养基由绿色变成黄色。
* 产气量与倒管：在试验工作中，经常可以看到在发酵倒管内极微少的气泡（有时比小米粒还小），有时可以遇到在初发酵时产酸或沿管壁有缓缓上浮的小气泡。实验表明，大肠菌群的产气量，多者可以使发酵倒管全部充满气体，少者可以产生比小米粒还小的气泡。如果对产酸但未产气的乳糖发酵如有疑问时，可以用手轻轻打动试管，如有气泡沿管壁上浮，即应考虑可能有气体生，而应作进一步试验。

4.大肠菌群最可能数(MPN)的报告

按3确证的大肠菌群BGLB阳性管数,检索MPN 表(见附录B),报告每g(mL)样品中大肠菌群

的MPN 值。

三、金黄色葡萄球菌

卫生学意义：金黄色葡萄球菌可以产生肠毒素，食后能引起食物中毒。因此，检查食品中金黄色葡萄球菌有实际意义。

操作步骤：

1. 样品的处理

称取25g样品至盛有225mL7.5%氯化钠肉汤的无菌均质杯内,8000r/min~10000r/min均质1min~2min,或放入盛有225mL7.5%氯化钠肉汤无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打 1 min~2min。若样品为液态,吸取25mL样品至盛有225mL7.5%氯化钠肉汤的无菌锥形瓶(瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠)中,振荡混匀。

2.增菌

将上述样品匀液于36℃±1℃培养18h~24h。金黄色葡萄球菌在7.5%氯化钠肉汤中呈混浊生长

3.分离

将增菌后的培养物,分别划线接种到Baird-Parker平板和血平板,血平板36℃±1 ℃培养18h~24h。Baird-Parker平板36℃±1℃培养24h~48h。

4.初步鉴定

金黄色葡萄球菌Baird-Parker平板上呈圆形,表面光滑、凸起、湿润、菌落直径为2mm~3mm,颜色呈灰黑色至黑色,有光泽,常有浅色(非白色)的边缘,周围绕以不透明圈(沉淀),其外常有一清晰带。当用接种针触及菌落时具有黄油样黏稠感。有时可见到不分解脂肪的菌株,除没有不透明圈和清晰带外,其他外观基本相同。从长期贮存的冷冻或脱水食品中分离的菌落,其黑色常较典型菌落浅些,且外观可能较粗糙,质地较干燥。在血平板上,形成菌落较大,圆形、光滑凸起、湿润、金黄色(有时为白色),菌落周围可见完全透明溶血圈。挑取上述可疑菌落进行革兰氏染色镜检及血浆凝固酶试验。

5.确证鉴定

5.1 染色镜检:金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性球菌,排列呈葡萄球状,无芽胞,无荚膜,直径约为0.5μm~1μm。

5.2 血浆凝固酶试验:挑取Baird-Parker平板或血平板上至少5个可疑菌落(小于5个全选),分别接种到5mLBHI和营养琼脂小斜面,36℃±1℃培养18h~24h。

取新鲜配制兔血浆0.5mL,放入小试管中,再加入BHI培养物0.2mL~0.3mL,振荡摇匀,置36℃±1℃温箱或水浴箱内,每半小时观察一次,观察6h,如呈现凝固(即将试管倾斜或倒置时,呈现凝块)或凝固体积大于原体积的一半,被判定为阳性结果。同时以血浆凝固酶试验阳性和阴性葡萄球菌菌株的肉汤培养物作为对照。也可用商品化的试剂,按说明书操作,进行血浆凝固酶试验。结果如可疑,挑取营养琼脂小斜面的菌落到5mLBHI,36℃±1℃培养18h~48h,重复试验。

6.葡萄球菌肠毒素的检验(选做)

可疑食物中毒样品或产生葡萄球菌肠毒素的金黄色葡萄球菌菌株的鉴定,应按附录B检测葡萄球菌肠毒素。

7.结果与报告

7.1 结果判定:符合5.4、5.5,可判定为金黄色葡萄球菌。

7.2 结果报告:在25g(mL)样品中检出或未检出金黄色葡萄球菌。

四、沙门氏菌

1.卫生学意义

* 根据食品质量相关标准规定绝大多数食品中不得检出致病菌。
* 沙门氏菌病常在动物中广泛传播，人的沙门氏菌感染和带菌也非常普通。由于动物的生前感染或食品受到污染，均可使人发生食物中毒。世界各地食物中毒中，沙门氏菌性食物中毒占首位或者第二位。沙门氏菌能引起人和动物的疾病，主要是通过消化道传染。沙门氏菌食物中毒的症状是：急性胃肠炎，如呕吐、腹痛、腹泻和因细菌毒素引起的中枢神经系统症状（如发烧、头痛、有时有痉挛）。
* 沙门氏菌常作为进出口食品和其他食品的致病菌指标。因此，检查食品中的沙门氏菌极为重要。

2.检验程序

2.1 预增菌

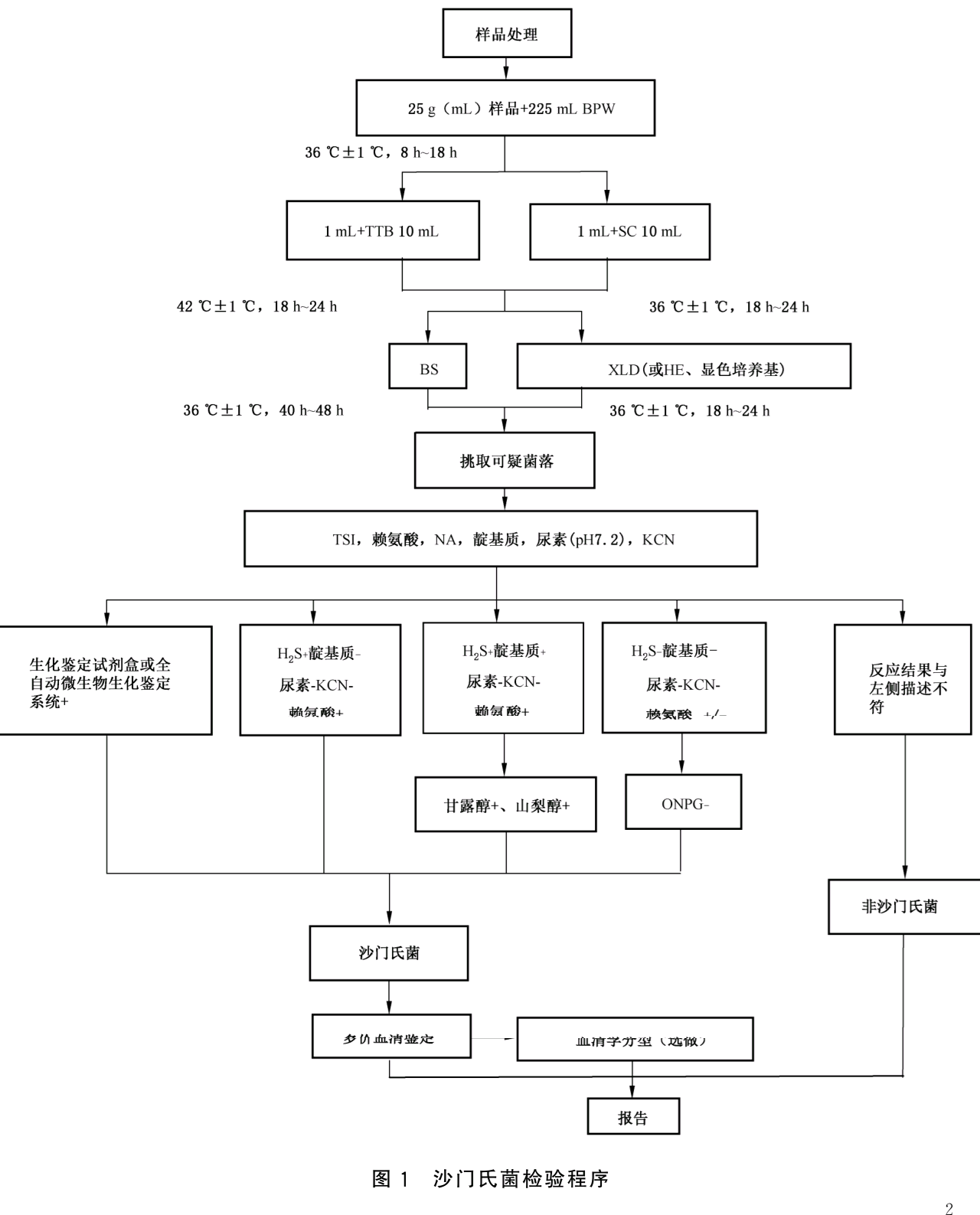
无菌操作称取25g(mL)样品,置于盛有225mLBPW 的无菌均质杯或合适容器内,以8000r/min~10000r/min均质1min~2min,或置于盛有225mLBPW 的无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打1min~2min。若样品为液态,不需要均质,振荡混匀。如需调整pH,用1mol/mL 无菌NaOH 或HCl调pH 至6.8±0.2。无菌操作将样品转至500mL锥形瓶或其他合适容器内(如均质杯本身具有无孔盖,可不转移样品),如使用均质袋,可直接进行培养,于36℃±1℃培养8h~18h。如为冷冻产品,应在45℃以下不超过15min,或2℃~5℃不超过18h解冻。

2.2 增菌

轻轻摇动培养过的样品混合物,移取1mL,转种于10mLTTB内,于42℃±1℃培养18h~24h。同时,另取1mL,转种于10mLSC内,于36℃±1℃培养18h~24h。

2.3分离

分别用直径3mm的接种环取增菌液1环,划线接种于一个BS琼脂平板和一个XLD琼脂平板(或HE琼脂平板或沙门氏菌属显色培养基平板),于36℃±1℃分别培养40h~48h(BS琼脂平板)或18h~24h(XLD琼脂平板、HE琼脂平板、沙门氏菌属显色培养基平板),观察各个平板上生长的菌落,各个平板上的菌落特征见表1。



|  |  |
| --- | --- |
| 选择性平板 | 沙门氏菌 |
| BS琼脂 | 菌落为黑色有金属光泽、棕褐色或灰色,菌落周围培养基可呈黑色或棕色;有些菌株形成灰绿色的菌落,周围培养基不变 |
| HE琼脂 | 蓝绿色或蓝色,多数菌落中心黑色或几乎全黑色;有些菌株为黄色,中心黑色或几乎全黑色 |
| XLD琼脂 | 菌落呈粉红色,带或不带黑色中心,有些菌株可呈现大的带光泽的黑色中心,或呈现全部黑色的菌落;有些菌株为黄色菌落,带或不带黑色中心 |
| 沙门氏菌属显色培养基 | 按照显色培养基的说明进行判定 |

表1 沙门氏菌属在不同选择性琼脂平板上的菌落特征

**第一部分**

**一 绪论**

**食物中毒**：指摄入了含有生物性、化学性有毒有害物质的食品或把有毒有害物质当做食品摄入后所出现的非传染性急性、亚急性疾病。

**食品微生物检验**：应用微生物学的理论与方法，研究外界环境和食品中微生物的种类、数量、性质、活动规律及其对人和动物健康的影响。

**食品微生物检验作用**——食品微生物检测是食品检测必不可少的重要组成部分。

1它是衡量食品安全质量的重要指标之一，也是判定被检食品能否食用的科学依据之一。

2通过食品微生物检测，可以判断食品加工环境及食品卫生情况，能够对食品被细菌污染的程度做出正确的评价，为各级政府对食品的监管工作提供科学依据，提供传染病和人类，动物的食物中市的防治措施。

3食品微生物检验贯彻“预防为主”的方针，可有效防止或者减少食物中毒相人盲共患病的发生，保障人民的身体健康;同时，它对提高产品质量，避免经济损失，保证出口等方面具有政治上和经济上的重大的意义。

**微生物检验指标**：菌落总数、大肠菌群、致病菌（根据不同的是食品产品种类不同或者样品特点不同要求的特定的致病菌）、酵母、霉菌。

**菌落总数：**食品检样经过处理，在一定条件下（如培养基、培养温度、培养条件等）培养后，所得每1g（mL）检样中形成的微生物菌落总数。计数以菌落形成单位（CFU）表示。

卫生学意义：①作为食品被微生物污染程度的标志。②可用来预测食品耐放程度和时间。③估测食品腐败状况。

**大肠菌群**：在一定培养条件下能发酵乳糖、产酸产气的需氧和兼性厌氧革兰氏阴性无芽孢杆菌。大肠菌群主要包括肠杆菌科的埃希氏菌属、柠檬酸菌属、克雷伯氏菌属和肠杆菌属，以埃希氏菌属为主。

表示方法：每100g或100ml检样中大肠菌群最近似数（MPN）来表示。

卫生学意义： ①作为食品被粪便污染的指示菌，食品中粪便的含量只要达到10－3mg/kg即可检出大肠菌群。②作为肠道致病菌污染食品的指标菌

**食品微生物检验样品采集**

样品的采集应遵循随机性、代表性的原则。

采样过程遵循无菌操作程序，防止一切可能 的外来污染。

采样方案

根据*检验目的、食品特点、批量、检验方法 、微生物的危害程度*等确定采样方案

采样方案分为*二级*和*三级*采样方案

检验指标对食品卫生的重要程度分成一般、中等和严重三档。

在中等或严重危害的情况下使用二级抽样方案， 对健康危害低的则建议使用三级抽样方案。

**三级采样**方案设有n、c、m和M值。

n:同一批次产品应采集的样品件数;

c:最大可允许超出m值的样品数;

m:微生物指标可接受水平限量值(三级采样方案)

M:微生物指标的最高安全限量值。

**二级采样**方案设有n、c和m值,

n:同一批次产品应采集的样品件数;

c:最大可允许超出 m 值的样品数;

m:最高安全限量值(二级采样方案);

按照二级采样方案设定的指标,在n个样品中, 允许有≤c个样品其相应微生物指标检验值大于 m 值。

按照三级采样方案设定的指标,在n个样品中, 允许全部样品中相应微生物指标检验值小于或等 于 m 值;允 许有≤c个样品其相应微生物指标检验 值在 m 值和 M 值之间;不允许有样品相应微生物 指标检验值大于 M 值。

**第三章**

**无菌技术**：指在微生物实验工作中，控制或防止各类微生物的污染及其干扰的一系列操作方法和有关措施。

**无菌环境**：指在环境中一切有生命活动的微生物的 营养细胞及其芽胞或孢子都不存在，包括无菌室、无菌柜、超净工作台等

**超净台的使用与保养:**

（1）风速保持在0.32-0.48米/秒;

（2）使用前开启紫外灯照射30分钟以上;

（3）让超净台预工作10~15分钟;

（4）使用完毕后，用70%酒精将台面和台内四周擦拭干净。

无菌器材：有灭菌器才和消毒器材两种

**消毒**：用较温和的理化因素，仅杀死物体表面或内部的一部分对人体有害的病原菌，而对被处理物体基本无害

**灭菌**：用强烈的理化因素使任何物体内外部的一切微生物永远丧失其生长繁殖能力。

**商业无菌：**指食品经过杀菌后，按照所规定的微生物检验方法，在所检食品中不含危害公共健康的致病菌和毒素；不含任何在产品储存、运输及销售期间能繁殖的微生物；在产品有效期内保持质量稳定和良好的商业价值。

**无菌操作目的**：（1）保证待检物品不被环境中微生物的污染；（2）防止被检微生物在操作中污染环境或感染操作人员。

**微生物接种与分离**

将微生物接到适于它生长繁殖的人工培养基上或活的生物体内的过程叫做接种。常用方法：平板涂布，平板划线，倾注平板，点植，穿刺，浸洗法。

**细菌培养方法**

**细菌对培养条**件的要求包括温度和气体，由于大多数细菌所需的温度均是35～37℃，所以细菌的培养方法仅以细菌对气体需求不同进行分类据此可将细菌培养分为三种，即需氧培养法、CO2培养法、厌氧培养法

需氧培养法：一般培养法，适合于需氧菌及兼性厌氧菌的培养。

CO2培养法：某些细菌(如脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌、布鲁杆菌、溶血链球菌等)分离时，需在5％～10％CO2环境中才能生长良好。CO2培养箱法（CO2钢瓶提供CO2），烛缸法（密闭干燥缸内蜡烛燃烧消耗氧气增加CO2），化学法（碳酸氢钠-盐酸法，反应发生CO2）

厌氧培养法：厌氧菌。如在液体培养基的表面加盖凡士林或蜡，或在液体培养基中加入碎肉块制成疱肉培养基等。此外，也可以利用物理或化学方法除去培养环境中的氧，以保证厌氧环境。

**微生物检验基础原理**

**细菌生长特性检查法**

**菌落：**由单个微生物细胞接种到适合的固体培养基上，在适合的环境条件下经过培养繁殖以后所形成的肉眼可见的细胞群体。菌落形成单位(CFU，Colony-Forming Units)指单位体积中的活菌个数。

一个单一的菌落原则上是由一株细菌生长繁殖而成，其特征代表了该菌种细菌的特性，生长特性观察的方法是将平皿培养物放在自然光或白炽灯光的前面，从不同角度进行观察。观察指标如下：

**1固体培养基**：

**菌落形状：**圆形、不整形、扁平、凸起、凹面

**菌落大小：**以mm计算。

**表面性状：**光滑、粗糙、有无光泽等。

**边缘情况：**整齐、不整齐、锯齿状等。

**颜色：**无色、白色、黄色、灰色等。

**透明度：**不透明、透明、半透明等。

**质地：**硬、软、脂状、磨状等。

**粘度：**奶油状、黏液状、膜状易碎等。

**乳化性：**指在生理盐水中，将一菌落在盐水中研磨形成均匀乳状或颗粒状的程度。

**菌落特殊形态区别：**

* 有荚膜的细菌菌落较大并且表面光滑，而没有荚膜的则表面较粗糙；
* 具有芽孢的细菌菌落表面常有褶皱并且不透明。
* 没有鞭毛不运动的细菌，特别是球菌，常形成较小、较厚、边缘较整齐的菌落；有鞭毛的细菌则较大而扁平，边缘波状、锯齿状等

**2液体培养基**

细菌在液体培养基中一般以培养18～24h，观察生长特性为好。细菌在液体中生长特性包括：

发育程度：以有无生长，微弱、中等、旺盛来表示。

浑浊度：有无浑浊以及浑浊的程度(一般以混、中等、微浑、透明表示)；均匀浑浊、有颗粒；絮状生长。

沉淀：细菌由于重力而下沉，如链球菌的链与链相互缠绕而下沉，出现肉眼可见的沉淀，而上层的液体仍清澈透明，或者由于发酵分解糖产生酸，而使基质中的蛋白质发生沉淀。

液体表面性状：有无表面生长以及生长的性状，如膜状(厚薄)、环状、皱状、是否光滑或呈颗粒状。

其他：有无色素，有无气味，有无产酸情况，有无气体产生

**3半固体培养基**

半固体培养基主要用于**细菌动力**的观察。

有动力的细菌在穿刺线处有生长线外，在穿刺线的周围均可见浑浊和细菌生长的小菌落；

无动力的细菌仅在穿刺线上有生长，周围的培养基透明清晰。

**细菌生化反应检查法**

由于细菌各自的酶系统不同，新陈代谢的产物也有所不同，而这些产物又各具有不同的生物化学特性。为此，可利用生物化学的方法来鉴别一些在形态和其它方面不易区别的细菌，这种试验称为细菌的生化反应试验。

检查方法：

1.在培养物中加入某种底物与指示剂，经接种、培养后，观察培养基的PH值变化。

2.在培养物中加入试剂，观察它们同细菌代谢产物所生成的颜色反应。

3.根据酶作用的反应特性，测定酶的存在。

4.根据细菌对理化条件和药品的敏感性，观察细菌的生长情况。

检查注意事项

1、待检菌应是新鲜培养物。培养18-24h。

2、待检菌应是纯种培养物。

3、遵守观察反应的时间。观察结果的时间，多为24或48小时。

4、应做必要的对照试验。

5、提高阳性检出率，至少挑取2-3个待检的疑似菌落分别进行试验。

**生化实验分类**：糖类代谢实验，氨基酸与蛋白质代谢实验，有机酸盐和铵盐代谢实验，酶类实验。

1. **糖类代谢实验**

* **糖(醇、苷)类发酵试验**

原理：不同细菌对各种糖、醇和糖苷发酵能力不同，该试验检查细菌对加在基础培养基中的特殊的糖发酵(降解)后产酸或产酸产气的能力。

培养基：糖发酵管

指示剂：酚红、溴麝香草酚蓝、溴甲酚紫和酸性复红等

结果：产酸则使培养基内指示剂呈酸性反应，产气则使得倒置小管出现气泡（固体培养基出现裂隙）。如若不分解则无任何反应。

注意事项：

•有些糖类，可因121℃高压蒸汽灭菌时水解变质，特别是在碱性溶液中更易被破坏，故含糖的培养基常用115℃，15min灭菌。亦可先将糖类单独配制成100～200g/L的水溶液，经115℃15min灭菌后，然后再以无菌操作的方法加入已灭菌的培养基中。此外，还可将糖的溶液用滤菌器进行滤过除菌，再加入培养基中。

•若应用微量发酵管，或要求培养时间较长时，应注意保持其周围的湿度，以免培养基干燥。

* **甲基红（MR）试验**

原理：该试验是检查细菌发酵葡萄糖产生并保持稳定的酸性终末产物和克服体系缓冲作用的能力

培养基：葡萄糖蛋白胨水(MR/VP培养基)。

试剂：甲基红指示剂

结果：使培养基表面甲基红试剂仍保持明显的红色(pH4.4)为阳性，培养基表面呈黄色(pH6.0)为阴性

* **伏普试验（V-P）**
* **β-半乳糖苷酶试验**

原理：细菌同时拥有渗透酶（P）和**β-**半乳糖苷酶才能分解乳糖。迟缓发酵细菌中若有产半乳糖苷酶的细菌存在，无色的ONPG试剂被水解，释放出黄色化合物邻位-硝基苯酚(ONP)

培养基：10g/L乳糖肉汤琼脂

试剂：邻硝基酚β-D-半乳糖苷(ONPG)液。

结果：如有β-半乳糖苷酶，一般在20～30min即呈现黄色者为阳性；如无此酶则24h不变色。

* **七叶苷水解试验**

原理：某些细菌(如粪链球菌)可水解七叶苷，生成葡萄糖和七叶素(为一种珊瑚状的白色结晶)。培养基中的柠檬酸铁试剂的二价铁离子可与七叶素起反应生成黑色的化合物沉淀，使培养基变黑。

培养基：七叶苷培养基

试剂：柠檬酸铁试剂

结果：培养基变黑色者为试验阳性，不变色为阴性。

* **石蕊牛乳试验**

原理：一种细菌在石蕊牛奶中可表现一种或几种代谢特性，每种代谢特性对一个特定细菌来说都是特异的。主要有五种表现①乳糖发酵；②石蕊还原；③凝固蛋白；④蛋白陈化(消化)；⑤气体产生。

有的细菌如产气荚膜梭菌，对牛乳具有强烈发酵反应，产酸、产气、凝固、胨化几乎同时发生。所产生的气体，可将培养基表层的凡士林冲至管口，牛乳可全被胨化变清，这种被称为“汹涌发酵”是为该菌所特有。

培养基：石蕊牛乳培养基

结果：

产酸：若发酵糖产酸，使石蕊指示剂变为粉红色。

产气：若发酵乳糖同时产气者，可冲开覆盖在培养基上的凡士林。

凝固：若发酵乳糖产酸甚多，可使酪蛋白凝固。

胨化：若将凝固的酪蛋白，继续水解成蛋白胨，此时牛乳培养基的上段则变清。

产碱：若不发酵乳糖，分解含氮物质，生成氨及胺，使培养基变碱性，石蕊指示剂变蓝紫色

1. **氨基酸与蛋白质代谢实验**

* **靛基质（Imdole）试验**

原理：某些细菌能分解蛋白胨中的色氨酸，生成吲哚，吲哚与对二甲基氨基苯醛结合，形成玫瑰吲哚，为红色化合物。

培养基：蛋白胨水。

试剂：Kovac试剂；欧氏试剂。

结果：两层液体交界处出现红色为阳性，无色为阴性。

* **硫化氢试验**

原理：某些细菌能分解培养基中的含硫氨基酸生成H2S，H2S可与加入培养基中的铅或铁离子生成黑色硫化物。

结果：琼脂穿刺法（沿管壁穿刺）培养基变黑色为阳性，醋酸铅试纸法试纸呈黑色为阳性。

* **尿素酶试验**

原理：有些细菌具有尿素分解酶，能分解尿素形成大量的氨,使培养基pH上升而变成碱性，使含有酚红指示剂的培养基变成红色。

培养基：尿素琼脂

结果：培养基变红为阳性，不变为阴性。

* **明胶液化试验**

原理：某些细菌产生明胶酶可使明胶分解，失去凝固力，使其由半固体转化为液体状态。

培养基：明胶培养基

结果：半固体培养基不再凝固为阳性。

注意事项：

1. 明胶在≤20℃时为固体，≥35℃时则为液体。从凝胶(固态)转变为液体大约在28℃。所以，明胶管在≥35℃下孵育时，在决定是否液化以前，必须先放在冰箱或冰浴中冷却一段时间。
2. 因细菌在培养基的表面生长引起液化，当明胶管还温热时不要摇动，否则液化的明胶与培养基液体混合，由此忽略阳性结果，造成假阴性。

* **苯丙氨酸脱氨酶试验**

原理：某些细菌产生苯丙氨酸脱氨酶，使苯丙氨酸脱去氨基，形成苯丙酮酸和游离氨，加入FeCl3试剂与苯丙酮酸螯合后出现绿色产物，随后绿色可褪去。

培养基：苯丙氨酸培养基

结果：须在5min内作出判断，出现绿色为阳性

* **氨基酸脱羧酶试验**

原理：细菌产生的脱羧酶可使氨基酸脱掉羧基，生成胺和CO2，胺可使培养基pH升高，用指示剂显示这个变化。

培养基：氨基酸脱羧酶培养基

结果：检测培养基由黄色变紫色为阳性，黄色为阴性，对照(无氨基酸)为黄色。

注意事项：本实验常有假阳性出现，假阳性系由蛋白胨中其他种氨基酸分解而造成，故必须同时接种对照管。

* **精氨酸双水解试验**
* **凝固血清消化试验**

原理：某些细菌产生一种胞外蛋白酶能液化凝固血清

培养基：吕氏血清培养基

结果：凝固血清发生液化为阳性

1. **有机酸盐和铵盐代谢实验**

* **柠檬酸盐利用试验**

原理：有些细菌能利用柠檬酸盐作为唯一的碳源，能在除柠檬酸盐外不含其他碳源的培养基上生长，分解柠檬酸盐，生成碳酸钠，使培养基变成碱性

指示剂：1%溴麝香草酚蓝(酒精溶液)或0.04%苯酚红10mL/1000mL水

培养基：柠檬酸盐培养基

结果：培养基由淡绿色变为深蓝色为阳性，不变色为阴性

* **马尿酸钠水解试验**

三氯化铁法：原理：B群链球菌具有马尿酸水解酶，可使马尿酸水解为苯甲酸和甘氨酸，苯甲酸与三氯化铁试剂结合形成苯甲酸铁沉淀

培养基:马尿酸钠培养基。

试剂：三氯化铁溶液

结果：出现稳定的沉淀物为阳性，轻摇后沉淀物溶解为阴性。

茚三酮法:原理：马尿酸被细菌分解后，形成苯甲酸及甘氨酸，甘氨酸在茚三酮的作用下，经氧化脱氨基反应，生成氨，CO2和相应的醛，而茚三酮则生成了还原型茚三酮。其中形成的氨和还原型茚三酮，与残留的茚三酮起反应，形成紫色化合物。

结果:出现紫色为阳性

* **丙二酸盐利用试验**

原理：某些细菌利用丙二酸盐作为唯一碳源时，丙二酸钠可被分解生成碳酸钠，使培养基变碱性。

培养基：丙二酸钠培养基。

指示剂：溴麝香草酚蓝

结果：培养基由绿色变为蓝色为阳性，颜色无变化为阴性。

1. **酶类实验**

* **氧化酶试验(Kovacs试验)**

原理：氧化酶(又称细胞色素氧化酶)是细胞色素呼吸酶系统的终末呼吸酶，能使还原型的细胞色素C氧化成氧化型的细胞色素C，氧化型细胞色素C又使对苯二胺氧化，生成红色的醌类化合物。

试剂：10g/L盐酸四甲基对苯二胺水溶液，或10g/L盐酸二甲基对苯二胺水溶液。

操作：取滤纸片蘸取待测菌落少许，加试剂一滴，观察颜色变化。也可用滴管吸取试剂，直接将一滴滴在待测菌菌落上，观察颜色变化

结果：阳性者立即呈现粉红色或红色，颜色逐渐变深至深紫色。

* **过氧化氢酶试验(触酶试验)**

原理：过氧化氢酶又称触酶，可使细菌代谢过程中的过氧化氢分解为水和氧。

试剂：新鲜配制的3％过氧化氢水溶液。

操作：挑取1环固体培养基上的待测菌菌落，放于洁净玻片上或试管内，滴加3％过氧化氢数滴，观察结果。实验时必须用18～24h新鲜培养物。陈旧培养物可能使触酶失活，出现假阴性结果。此外，不宜挑取血琼脂上的菌落，因红细胞内含有触酶，会导致假阳性结果。

结果：30s内有大量气泡产生者为阳性，无气泡产生者为阴性。

* **硝酸盐还原试验**

原理：某些革兰氏阴性杆菌在代谢过程中，能将培养基中的硝酸盐还原为亚硝酸盐，亚硝酸盐与醋酸作用，生成亚硝酸，亚硝酸与试剂中的对氨基苯磺酸反应生成重氮苯磺酸，再与α-萘胺结合，生成红色的N-α萘胺偶氮苯磺酸

结果：出现红色为阳性，无颜色变化为阴性。

* **过氧化物酶试验**

结果：阳性者于2min内呈现蓝色

* **脱氢酶试验**

结果：若第1管变白即为相应作用物的脱氢酶阳性，不变色为阴性。第2管与第3管为对照管，应不变色。

* **氧化三苯基四氮唑试验(TTC试验)**

结果：出现红色者为阳性，淡红色者为弱阳性，不变色者为阴性

* **脂酶试验**

原理：某些细菌产生卵磷脂酶，即α-毒素，在有钙离子存在时，能迅速分解卵磷脂，生成混浊沉淀状的甘油酯和水溶性的磷酰胆碱

结果：产生卵磷脂酶的细菌，培养3h后，在菌落周围形成乳白色混浊环，6h后扩散至5～6mm

* **磷酸酶试验**

原理：磷酸酶是一种单膦酸酯的水解酶，可使单磷酸酯水解，如用磷酸酚酞为基质，经磷酸酶水解后可释放出酚酞，在碱性环境中可呈红色

结果：如有酚酞释出，菌落即变为粉红色，显示阳性

* **DNA酶试验**

结果：菌落周围产生透明环为阳性，无透明环为阴性。

* **血浆凝固酶试验**

原理：金黄色葡萄球菌可产生凝固酶，使血浆中的纤维蛋白原转变为纤维蛋白，附着于细菌的表面，产生凝固。

凝固酶可分为两种，一种是与细胞壁结合的凝固酶，可用玻片法测定；另一种是菌体生成后释放于培养基中的游离凝固酶，可用试管法测出

玻片法：在玻片上分别滴加新鲜人或兔血浆及生理盐水各一滴，挑取待检菌的菌落，分别与血浆和生理盐水混合，立即观察结果，如血浆中有明显颗粒出现，而生理盐水中无自凝现象为阳性。

试管法：小试管3支内各加入l︰4稀释的新鲜人或兔血浆0.5ml，①其中一支加待检菌18～24h肉汤培养物0.5ml，②另一支加阳性菌株18～24h肉汤培养物0.5ml，③再一支加肉汤培养基0.5ml为阴性对照，轻振混匀。3支试管放37℃水浴中3～4h，观察结果。

结果：待检菌株管和阳性菌株管出现凝固，阴性对照管不出现凝固，为阴性