

5.02 生药的微生物限度试验法

译者: sun.ge@126.com

December 2, 2006

生药的微生物限度试验法是在生药中存在的有繁殖能力的特定的微生物的定性和定量试验法。本试验法包括活菌数试验（好气性细菌及真菌）及特定微生物试验（肠内细菌与其它革兰氏阴性菌、大肠杆菌、沙门氏菌及金黄色葡萄球菌）。试验必须在避免引起外部的微生物污染的条件下施行，必须仔细操作。并且，当被检试料有抗菌作用或含有抗菌物质，任何这样的抗菌性质必须被稀释、过滤、中和或失活等手段除去。试料为随机从多个不同地点（或部分）采样的混合物。若试料用液体培养基稀释，试验应快速进行。并且，在试验过程中，必须十分注意防止生物危害。

1 活菌数试验

本试验测定在需氧条件下生长的中温性好气性细菌及真菌(霉菌及酵母)。低温菌、高温菌、好盐菌、厌气菌及需要特定生长成分的微生物，即使在试料中大量存在，也可能得出阴性结果。本试验法有稀释混匀平板法、涂布平板法、液体培养基逐级稀释法（最确数法）及膜过滤法四种。依照目的，采用适当的方法进行试验。如果自动化的方法与这里提供的方法相比，能够得出同等或更好的检出感度与精度，则也可以被采用。好气性细菌和真菌需要不同的培养基及培养温度。液体培养基逐级稀释法仅在细菌中应用。

试料的取样与制备

除非另有规定，采用以下方法取样，制备测定用试料。

- (1) 小形的生药，切断生药及粉末生药，粗混后，取50~250g作为试料。
- (2) 大形的生药粗混后，取250~500g作为试料，制备切断生药。
- (3) 单个质量在100g以上的生药取5个以上，作为试料，或将生药切断至适当大小，粗混后，取500g以上作为试料。必要时制备切断生药。
- (4) 液状的生药或制剂混合后取样。
- (5) 不溶性固形剂将不溶性物质磨碎成合适细粉后取样。

试料溶液的制备

使用pH7.2的磷酸缓冲液、pH7.0的氯化钠蛋白胨缓冲液，或使用液体培养基来分散或稀释试料。除非另有规定，通常，取10g或10mL试料，加入90mL上述缓冲液或培养基中，振摇混合使分散或溶解。分散后的试料需再振摇10分钟。再者，生药上附着的微生物回收率低的情况下，重复进行同样的操作，作为试料溶液。但是，也有由于试料的性质，不得不分散于比规定量大的缓冲液或液体培养基中，及使用不同量的试料的情况。调节试料溶液的pH 值为6~8。试料溶液必须在制备后1小时内使用。

液装制剂：取10mL试料，加入90mL上述缓冲液或液体培养基中，振摇混合作为试料溶液。但是，也有由于试料的性质，不得不分散于比规定量大的缓冲液或液体培养基中，及使用不同量的试料的情况。

不溶性固形剂：取10g试料，将不溶性物质磨碎成合适细粉，加入90mL上述缓冲液或液体培养基中，振摇混合作为试料溶液。但是，也有由于试料的性质，不得不分散于比规定量大的缓冲液或液体培养基中，及使用不同量的试料的情况。如有必要，使用机械搅拌器可能会使悬浊液均一分散得更好。可以加入适当的表面活性剂（比如0.1w/v%的吐温80）辅助溶解。

试验过程

(1) 稀释混匀平板法

本法使用直径9~10cm的培养皿。每一稀释级使用2枚以上的琼脂培养基平板。各吸取1mL的试料溶液或试料溶液的稀释液分注于无菌培养皿上。往皿中加入预先制备好的45°C以下保温的融化状态已灭菌琼脂培养基15~20mL，混合。使用SCD琼脂培养基检出好气性细菌。对于生药的组织片段组成的试料，或为了抑止真菌的生长，可以在琼脂培养基中添加好气性细菌细胞色素TTC 试液与抗真菌剂两性霉素B试液。如要添加TTC试液和两性霉素B试液，使用前直接在已灭菌的培养基中，每1mL加入TTC试液2.5~5mL，或两性霉素B试液2mL，混合。使用添加抗生素的Sabouraud葡萄糖琼脂培养基、添加抗生素的马铃薯葡萄糖琼脂培养基或者添加抗生素的GP琼脂培养基检出真菌。若霉菌在琼脂培养基上扩散，可在培养基中添加玫瑰红钠试液。每1L琼脂培养基中加入5mL玫瑰红钠试液，混合后，于121°C，15~20分钟高压蒸气灭菌即得。琼脂固化后，好气性细菌的平板于30~35°C，真菌的平板于20~25°C培养至少5天。在出现许多菌落的情况下，好气性细菌采用每皿菌落数300CFU以下的平板，真菌采用每皿菌落数100CFU以下的平板上的计数结果算出活菌数。如果在培养后5天以前的时间里能够获取一个稳定的计数值，也可以采用该计数值。

(2) 涂布平板法

本法为在固化干燥的琼脂培养基表面，注入0.05~0.2mL的试料溶液，用涂布棒等均匀涂布于表面的方法。培养皿的直径、使用琼脂培养基的种类与用量、添加的试药、培养的温度和时间及活菌的计数方法等，与稀释混匀平板法相同。

表5.02-1 微生物的最确数表

加入以下数量的试料的情况下， 观察到微生物生长的试管数			试料1g或1mL中相当 的微生物的最可能数
相当于0.1g 或0.1mL的试管	相当于0.01g 或0.01mL的试管	相当于1mg 或1uL的试管	
3	3	3	>1100
3	3	2	1100
3	3	1	500
3	3	0	200
3	2	3	290
3	2	2	210
3	2	1	150
3	2	0	90
3	1	3	160
3	1	2	120
3	1	1	70
3	1	0	40
3	0	3	95
3	0	2	60
3	0	1	40
3	0	0	23

(3) 液体培养基逐级稀释法（最确数法）

本法需要准备每支装有9~10mL液体SCD培养基的试管。各稀释级使用3支试管。对第1级的3支试管，每支各加入试料溶液1mL（含0.1g或0.1mL试料），即为10倍稀释的试管。下一步从10倍稀释的试管中各取1mL，分别加入3支试管中混合，即为100倍稀释的试管。再从100倍稀释的试管中各取1mL，分别加入3支试管中混合，即为1000倍稀释的试管。再者，若有稀释之必要则继续同样的操作。取各稀释级的稀释液1mL分别加入试管中，即为对照。上述试管于30~35℃培养不少于5天，对照试管应观察无微生物生长。若结果判定困难或结果含混，则取0.1mL接种至琼脂培养基或液体培养基中，于30~35℃培养24~72小时，判定有无生长。依照表5.02-1求出1g或1mL试料中相应的最确数。若第1列（含0.1g或0.1mL试料）观察到微生物生长的试管数为2及以下，则1g或1mL对应的微生物的最确数很可能在100以下。

(4) 膜过滤法

本法使用孔径0.45μm以下的适当材质的滤膜。滤膜直径建议为约50mm，但不同直径的也可以使用。滤膜、过滤装置、培养基必须全部仔细灭菌。通常，取20mL试料溶液（含2g试料），用2枚滤膜过滤，每枚10mL。必要时稀释预先制备的试料溶液。若微生物浓度高则稀释至1枚滤膜对应的菌

数为10~100CFU的期望水平。试料溶液滤过后，各滤膜用pH7.0的氯化钠蛋白胨缓冲液、pH7.2的磷酸缓冲液或要使用的液体培养基等洗液清洗过滤3次以上。每次清洗过滤洗液量约为100mL，但若滤膜直径不为50mm，则按照尺寸调整洗液的量。若试料含有脂类物质，则洗液中可添加吐温80等。滤过后，将1枚滤膜放在SCD琼脂培养基平板表面上，用作好气性细菌试验，将1枚滤膜放在Sabouraud葡萄糖琼脂培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基或GP琼脂培养基（全部添加抗生素）平板表面上，用作真菌试验。好气性细菌试验于30~35℃，真菌试验于20~25℃，不少于5天培养后，计算菌落数。如果在培养后5天以前能够获取一个稳定的计数值，那么也可以采用该计数值。

培养基性能试验及抗菌物质的确认试验

使用以下菌株或其同等品。使用SCD琼脂（？）培养基，细菌于30~35℃，*Candida albicans*于20~25℃培养。

<i>Escherichia coli</i>	NBRC 3972, ATCC 8739, NCIMB 8545等
<i>Bacillus subtilis</i>	NBRC 3134, ATCC 6633, NCIMB 8054等
<i>Staphylococcus aureus</i>	NBRC 13276, ATCC 6538, NCIMB 9518等
<i>Candida albicans</i>	NBRC 1393, NBRC 1594, ATCC 2091, ATCC 10231等

用pH7.0的氯化钠蛋白胨缓冲液或pH7.2的磷酸缓冲液分别稀释各培养液，制备1mL对应有50~200CFU左右活菌的菌悬液。将1mL菌悬液接种至要使用的培养基中，于指定温度培养5天，应观察到充分生长或确认回收到接种菌数。当试料存在下的菌数比无试料存在的菌数少1/5以下时，任何这样的效应必须被稀释、过滤、中和或失活等手段除去。为了验证培养基、稀释液的无菌性或试验是否为无菌操作，用pH7.0的氯化钠蛋白胨缓冲液或pH7.2的磷酸缓冲液作为试验对照。

2 特定微生物试验

本试验为测定肠内细菌与其他革兰氏阴性菌、大肠杆菌、沙门氏菌及金黄色葡萄球菌的试验。

试料的取样及制备

参照活菌数试验的试料的取样及制备项。

试料溶液的制备

除非另有规定，参照活菌数试验中的试料溶液的制备方法。当试料的制备是使用液体培养基的情况下，除非另有规定，使用该试验规定的培养

基。再者，需考虑试料中的抗菌物质的除去与试料的分散性，调整试料量与培养基量至适宜值。

试验过程

(1) 肠内细菌与其他革兰氏阴性菌

(i) 定性试验

取试料10g或10mL，加入90mL乳糖肉汤中，振摇混合使分散或溶解。取10mL接种至90mL 肠内细菌增菌肉汤Mossel培养基中，于35~37℃培养18~24小时。轻轻振摇培养液后，用接种环取1环培养液，划线于添加葡萄糖的VRB琼脂培养基表面，于35~37℃培养18~24小时。通常，若发现红色或带红色的菌落，则判定为阳性。

(ii) 定量试验

当定性试验确认有肠内细菌与其他革兰氏阴性菌时，取试料10g或10mL，加入90mL 乳糖肉汤中，振摇混合使分散或溶解。取试料溶液1mL（含0.1g或0.1mL试料），接种至9mL肠内细菌增菌肉汤Mossel培养基中，振摇混合。下一步取该稀释试料溶液1mL，接种至9mL肠内细菌增菌肉汤Mossel培养基中，振摇混合（含0.01g或0.01mL试料）。再取稀释试料溶液1mL，接种至9mL肠内细菌增菌肉汤Mossel培养基中，振摇混合（含1mg或1μL试料）。将上述试管于35~37℃培养18~24小时后，各取1环培养液，划线于添加葡萄糖的VRB琼脂培养基表面，于35~37℃培养18~24小时。若检出红色或带红色的菌落，则判定为阳性，依照表5.02-2求出菌数。

表5.02-2 定量试验判定基准			
不同量的各试料溶液的结果			判定（CFU/g或mL）
0.1g或0.1mL	0.01g或0.01mL	1mg或1μL	
+	+	+	10 ³ 以上
+	+	—	10 ² ~ 10 ³ 未滿
+	—	—	10 ¹ ~ 10 ² 未滿
—	—	—	10 ¹ 未滿

(2) 大肠杆菌

(i) 定性试验

取试料10g或10mL，加入90mL乳糖肉汤中，振摇混合，取其浊液或溶液1mL加入装有9~10mLEC培养基的发酵管中，于44.5±0.2℃的恒温水槽中培养24±2小时，若未产气则判定大肠杆菌阴性。若发现有气泡产生，则从产气的发酵管中取1环培养液，划线于EMB琼脂培养基表面，于30~35℃培养18~24小时。若EMB琼脂培养基上未发现有金属光泽的且透过光下呈蓝黑色的菌落，则判定为大肠杆菌阴性。上述平板上有疑似大肠杆菌的菌落

时，进行IMViC试验（吲哚试验、甲基红试验、V-P试验及柠檬酸盐利用试验），结果出现「++--」或「-+- -」模式时判定检出大肠杆菌。另外，也可以使用大肠杆菌快速测定培养基与工具包来确定。

(ii) 定量试验

液体培养基逐级稀释法（最确数法）

当定性试验确认大肠杆菌的存在时，准备各装有9~10mLEC培养基的发酵管。各稀释级使用3支试管。取试料10g或10mL，加入90mL乳糖肉汤中，振摇混合使分散或溶解，对第1级的3支发酵管，每支各加入试料溶液1mL（含0.1g或0.1mL试料），即为10倍稀释发酵管。下一步从10倍稀释发酵管中各取1mL，分别加入3支发酵管中混合，即为100倍稀释发酵管。再从100倍稀释发酵管中各取1mL，分别加入3支发酵管中混合，即为1000倍稀释的发酵管。取各稀释级的稀释液1mL分别加入发酵管中，即为对照。上述试管于44.5±0.2℃的恒温水槽中培养24±2小时，从产气的发酵管中取1环培养液，划线于EMB琼脂培养基表面，于30~35℃培养18~24小时。依照EMB琼脂培养基上生长的有金属光泽的菌落或是透过光下带有蓝黑色的革兰氏阴性菌的菌落出现的发酵管数，按表5.02-1求出最确数。

(3) 沙门氏菌

取试料10g或10mL，加入90mL乳糖肉汤培养基中，振摇混合使分散或溶解，于30~35℃培养24~72小时。若观察到生长，轻轻振摇培养液，然后分别吸取1mL接种至10mL的液体亚硒酸盐胱氨酸培养基、液体四硫磺酸盐培养基中，培养12~24小时。另外，液体亚硒酸盐胱氨酸培养基可用液体Rappaport培养基代替使用。培养后，分别从上述液体培养基中取培养液划线于亮绿琼脂培养基、XLD琼脂培养基及亚硫酸铋琼脂培养基中至少2种培养基表面，于30~35℃培养24~48小时。当出现表5.02-3所描述的革兰氏阴性杆菌的菌落时，用接种线取可疑菌落于TSI斜面琼脂培养基深部及表面接种，于35~37℃培养18~24小时。若存在沙门氏菌，则培养基深部变黄，斜面则仍为红色无变化。通常深部产气，产生或不产生硫化氢。若使用鉴定工具包中包括的详细的生化试验和血清学试验，能进行对沙门氏菌的识别和分类。

表5.02-3 选择培养基上的沙门氏菌形态学特征

培养基	菌落特征
亮绿琼脂培养基	小型、无色透明或不透明、白色至粉红色 常常环绕有一个粉红至红色的区域
XLD琼脂培养基	红色，中心有黑点或者没有
亚硫酸铋琼脂培养基	黑色或绿色

(4) 金黄色葡萄球菌

取试料10g或10mL，加入90mLSCD培养基或不含抗菌物质的适宜培养基中，振摇混合是分散或溶解。将含有试料的液体培养基于30~35℃培养24~48小时。培养后，取1mL 加入9mL添加7.5%氯化钠的SCD培养基中，于30~35℃培养24~48小时。若观察到生长，则分别取1环培养液，划线于Vogel-Johnson琼脂培养基、Baird-Parker琼脂培养基及甘露醇氯化钠琼脂培养基表面，于30~35℃培养24~48小时。若没有革兰氏阳性球菌的菌落与表5.02-4所描述的特征相附，则判定金黄色葡萄球菌阴性。若有疑似金黄色葡萄球菌的菌落则进行血浆凝固酶试验。用接种环取可疑菌落接种于装有0.5mL 哺乳类的血浆（最好来源于兔或马；可以加入适当的添加物）的试管中，于37±1℃恒温槽中培养，3小时后检查有无凝固，之后，至24小时每隔适当的时间观察有无凝固。同时进行血浆凝固反应的阳性及阴性对照试验。若没有观察到凝固，则判定金黄色葡萄球菌阴性。

表5.02-4 选择培养基上的金黄色葡萄球菌形态学特征

培养基	菌落特征
Vogel-Johnson琼脂培养基	黑色，环绕有一个黄色的区域
Baird-Parker琼脂培养基	黑色有光泽，环绕有一个透明的区域
甘露醇氯化钠琼脂培养基	黄色菌落，环绕有一个黄色的区域

培养基的性能试验及抗菌物质的确认试验

本试验将表5.02-5所述菌株于规定培养基中，于30~35℃培养18~24小时使用。下一步，用pH7.0的氯化钠蛋白胨缓冲液、pH7.2的磷酸缓冲液或该菌株指定的培养基等，配制1mL含相当于约1000CFU的活菌的溶液。当需要时，取含约1000CFU/mL的活菌的大肠杆菌、沙门氏菌及金黄色葡萄球菌的悬液各0.1mL混合，进行在试料存在和不存在下的培养基的有效性及是否存在抗菌物质等试验。

表5.02-5 培养基的有效性确认与特定微生物试验法的验证所使用的菌株及培养基

微生物	菌株名	培养基
大肠杆菌	NBRC 3972, ATCC 8739, NCIMB 8545 或与其同等的菌株	乳糖肉汤
沙门氏菌	无特定*	乳糖肉汤
金黄色葡萄球菌	NBRC 13276, ATCC 6538, NCIMB 9518 或与其同等的菌株	SCD培养基

*沙门氏菌以使用无病原性或弱病原性的菌株为宜。
最好不要使用*Salmonella typhi*。

再试验

若得出不确定的结果或含混的结果，取最初试验的2.5倍的试料量再次试验。试验方法与最初的试验方法相同，但按照试料增加的比例，增加培养基等的量。

3 缓冲液、培养基和试药

以下所述为微生物限度试验用的缓冲液、培养基和试药。含有相似营养成分，且对于试验对象微生物有类似的选择性及增殖性的其它培养基也可以使用。

(1) 缓冲液

- (i) 磷酸缓冲液，pH7.2
保存溶液：取磷酸二氢钾34g溶于约500mL水中。加入氢氧化钠试液约175mL，调节pH7.1~7.3，加水至1000mL，即为保存溶液。高压蒸气灭菌后，于冷处保存。用时，将保存溶液稀释800倍，于121℃灭菌15~20分钟。

- (ii) 氯化钠蛋白胨缓冲液，pH7.0
- | | |
|------------|--------|
| 磷酸二氢钾 | 3.56g |
| 磷酸氢二钠十二水合物 | 18.23g |
| 氯化钠 | 4.30g |
| 胨 | 1.0g |
| 水 | 1000mL |
- 混合所有成分，于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟。灭菌后的pH6.9~7.1，可添加0.1 ~ 1.0w/v%的吐温20或吐温80。

(2) 培养基

- (i) SCD琼脂培养基
- | | |
|------|--------|
| 酪蛋白胨 | 15.0g |
| 大豆胨 | 5.0g |
| 氯化钠 | 5.0g |
| 琼脂 | 15.0g |
| 水 | 1000mL |
- 混合所有成分，于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟。灭菌后的pH7.1~7.3。

- (ii) SCD培养基
- | | |
|-------|--------|
| 酪蛋白胨 | 17.0g |
| 大豆胨 | 3.0g |
| 氯化钠 | 5.0g |
| 磷酸氢二钾 | 2.5g |
| 葡萄糖 | 2.5g |
| 水 | 1000mL |

混合所有成分，于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟。灭菌后的pH7.1~7.5。

(iii) 添加抗生素的Sabouraud葡萄糖琼脂培养基

胨（动物组织制及酪蛋白制）	10.0g
葡萄糖	40.0g
琼脂	15.0g
水	1000mL

混合所有成分，于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟。灭菌后的pH5.4~5.8。

使用前每1L培养基直接加入青霉素钾0.10g与四环素0.10g作为灭菌溶液。作为青霉素钾与四环素的替代品，也可以每1L培养基中加入50mg氯霉素。

(iv) 添加抗生素的马铃薯葡萄糖琼脂培养基

马铃薯浸出物	4.0g
葡萄糖	20.0g
琼脂	15.0g
水	1000mL

混合所有成分，于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟。灭菌后的pH5.4~5.8。

使用前每1L培养基直接加入青霉素钾0.10g与四环素0.10g作为灭菌溶液。作为青霉素钾与四环素的替代品，也可以每1L培养基中加入50mg氯霉素。

(v) 添加抗生素的GP（葡萄糖蛋白胨）琼脂培养基

葡萄糖	20.0g
酵母浸出物	2.0g
硫酸镁七水合物	0.5g
磷酸二氢钾	1.0g
琼脂	15.0g
水	1000mL

混合所有成分，于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟。灭菌后的pH5.4~5.8。

使用前每1L培养基直接加入青霉素钾0.10g与四环素0.10g作为灭菌溶液。作为青霉素钾与四环素的替代品，也可以每1L培养基中加入50mg氯霉素。

(vi) 乳糖肉汤

肉浸出物	3.0g
明胶胨	5.0g
乳糖一水合物	5.0g
水	1000mL

混合所有成分，于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟。灭菌后的pH6.7~7.1。

灭菌后迅速冷却。

(vii) EC培养基

胨	20.0g
乳糖一水合物	5.0g
胆盐	1.5g
磷酸氢二钾	4.0g
磷酸二氢钾	1.5g
氯化钠	5.0g
水	1000mL

混合所有成分，于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟。灭菌后的pH6.8~7.0。
灭菌后迅速冷却。冷却后不要使用德汉氏小管中有气泡的试管。

(viii) EMB（曙红亚甲蓝）琼脂培养基

明胶胨	10.0g
磷酸氢二钾	2.0g
乳糖一水合物	10.0g
琼脂	15.0g
曙红Y	0.40g
亚甲蓝	0.065g
水	1000mL

混合所有成分，于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟。灭菌后的pH6.9~7.3。

(ix) 肠内细菌增菌肉汤Mossel培养基

明胶胨	10.0g
葡萄糖	5.0g
干燥牛胆汁	20.0g
磷酸二氢钾	2.0g
磷酸氢二钠十二水合物	8.0g
亮绿	0.015g
水	1000mL

混合所有成分，于100℃、30分钟加热后，迅速冷却。加热后的pH7.0~7.4。

(x) 添加葡萄糖的VRB（紫·红·胆酸）琼脂培养基

酵母浸出物	3.0g
明胶胨	7.0g
胆盐	1.5g
乳糖一水合物	10.0g
氯化钠	5.0g
葡萄糖	10.0g
琼脂	15.0g
中性红	0.030g
结晶紫	0.002g
水	1000mL

混合所有成分，煮沸使溶解。煮沸后的pH7.2~7.6。不要高压蒸气灭菌。

(xi) 液体亚硒酸盐胱氨酸培养基

明胶朊	5.0g
乳糖一水合物	4.0g
磷酸钠十二水合物	10.0g
亚硒酸钠	4.0g
L-胱氨酸	0.010g
水	1000mL

混合所有成分，加温溶解。最终pH6.8~7.2。不要灭菌。

(xii) 液体四硫磺酸盐培养基

酪蛋白朊	2.5g
肉制蛋白朊	2.5g
去氧胆酸钠	1.0g
碳酸钙	10.0g
硫代硫酸钠五水合物	30.0g
水	1000mL

煮沸含固体的上述溶液。使用当天，加入20mL水中溶有碘化钾5g及碘6g的溶液。再加入亮绿试液（1→1000）10mL，混合。之后不要加热培养基。

(xiii) Rappaport液体培养基

大豆朊	5.0g
氯化钠	8.0g
磷酸二氢钾	1.6g
孔雀绿	0.12g
氯化镁六水合物	40.0g
水	1000mL

将孔雀绿、氯化镁六水合物及其他成分分别溶于水中，于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟。灭菌后，混合使用。最终pH5.4~5.8。

(xiv) 亮绿琼脂培养基

朊（动物组织制及酪蛋白制）	10.0g
酵母浸出物	3.0g
氯化钠	5.0g
乳糖一水合物	10.0g
蔗糖	10.0g
酚红	0.080g
亮绿	0.0125g
琼脂	20.0g
水	1000mL

混合所有成分，煮沸1分钟。使用前直接于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟。灭菌后的pH6.7~7.1。冷却至约50℃分注于培养皿中。

(xv) XLD（木糖·赖氨酸·去氧胆酸）琼脂培养基

D-木糖	3.5g
L-赖氨酸盐酸盐	5.0g
乳糖一水合物	7.5g
蔗糖	7.5g
氯化钠	5.0g
酵母浸出物	3.0g
酚红	0.080g
去氧胆酸钠	2.5g
硫代硫酸钠五水合物	6.8g
柠檬酸铁铵	0.80g
琼脂	13.5g
水	1000mL

混合所有成分，煮沸使溶解。煮沸后的pH7.2~7.6。不要高压蒸气灭菌。避免过热。煮沸后，冷却至约50℃分注于培养皿中。

(xvi) 亚硫酸铋琼脂培养基

肉浸出物	5.0g
酪蛋白胨	5.0g
肉制蛋白胨	5.0g
葡萄糖	5.0g
磷酸钠十二水合物	4.0g
硫酸亚铁七水合物	0.30g
亚硫酸铋指示剂	8.0g
亮绿	0.025g
琼脂	20.0g
水	1000mL

混合所有成分，煮沸使溶解。煮沸后的pH7.4~7.8。不要高压蒸气灭菌。避免过热。煮沸后，冷却至约50℃分注于培养皿中。

(xvii) TSI（三糖铁）琼脂培养基

酪蛋白胨	10.0g
肉制蛋白胨	10.0g
乳糖一水合物	10.0g
蔗糖	10.0g
葡萄糖	1.0g
硫酸亚铁铵六水合物	0.20g
氯化钠	5.0g
硫代硫酸钠五水合物	0.20g
酚红	0.025g
琼脂	13.0g
水	1000mL

混合所有成分，煮沸使溶解后，分注于小试管中，于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟。灭菌后pH7.1~7.5。用做斜面琼脂培养基。另外，可在上述成分中加入肉浸出物或酵母浸出物3g，也可用柠檬酸铁铵代替硫酸亚铁铵六水合物使用。

(xviii) 添加7.5%氯化钠的SCD培养基

酪蛋白胨	17.0g
大豆胨	3.0g
氯化钠	75.0g
磷酸氢二钾	2.5g
葡萄糖	2.5g
水	1000mL

于(ii) SCD培养基(含5g氯化钠)中加入氯化钠70.0g, 混合所有成分, 于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟。灭菌后的pH7.1~7.5。

(xix) Vogel-Johnson琼脂培养基

酪蛋白胨	10.0g
酵母浸出物	5.0g
D-甘露醇	10.0g
磷酸氢二钾	5.0g
氯化锂	5.0g
甘氨酸	10.0g
酚红	0.025g
琼脂	16.0g
水	1000mL

混合所有成分, 煮沸1分钟使溶解后。于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟。冷却至45~50℃。灭菌后pH7.0~7.4。在其中加入已灭菌的亚硝酸钾溶液(1→100) 20mL, 混合。

(xx) Baid-Parker琼脂培养基

酪蛋白胨	10.0g
肉浸出物	5.0g
酵母浸出物	1.0g
氯化锂	5.0g
甘氨酸	12.0g
丙酮酸钠	10.0g
琼脂	20.0g
水	950mL

混合所有成分, 时时振摇加热, 煮沸1分钟。于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟后, 冷却至45~50℃。灭菌后pH6.6~7.0。在其中加入已灭菌的亚硝酸钾溶液(1→100) 10mL与50mL卵黄乳浊液, 轻轻混合后, 分注于培养皿中。卵黄乳浊液为按卵黄约30%, 生理盐水约70%的比例混合制备而成。

(xxi) 甘露醇氯化钠琼脂培养基

酪蛋白胨	5.0g
肉制蛋白胨	5.0g
肉浸出物	1.0g
D-甘露醇	10.0g
氯化钠	75.0g
酚红	0.025g
琼脂	15.0g
水	1000mL

混合所有成分，时时振摇加热，煮沸1分钟后，于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟。灭菌后pH7.2~7.6。

(3)试药·试液

- (i) 两性霉素B试液 两性霉素B粉末22.5mg溶解于9mL灭菌精制水中。
两性霉素B粉末 两性霉素B添加去氧胆酸钠， γ 射线灭菌。
- (ii) 胆盐 动物干燥胆汁制得的黄褐色粉末，由牛磺胆酸钠与甘氨酸胆酸钠组成，含45%以上的胆酸。5%水溶液的pH范围是5.5~7.5。
- (iii) TTC试液（2,3,5-三苯基-二氢-氯化四唑试液） 2,3,5-三苯基-二氢-氯化四唑0.8g溶于水中，至100mL。分装于小试管等后，于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟。避光保存。
- (iv) 玫瑰红钠试液 玫瑰红钠1g溶于水，至100mL。
玫瑰红钠 $C_{20}H_2Cl_4I_4Na_2O_5$ 〔特级〕红褐色粉末，溶于水中为紫红色。

(4)制备

- (i) 添加TTC的琼脂培养基的制备 使用前直接在已灭菌的琼脂培养基中，每1L添加TTC试液2.5~5mL（20~40mg/L），混合。
- (ii) 添加两性霉素B的琼脂培养基的制备 使用前直接在已于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟的琼脂培养基中，每1L添加两性霉素B试液2mL（5mg/L），混合。
- (iii) 添加玫瑰红钠的琼脂培养基的制备 在琼脂培养基中，每1L添加玫瑰红钠试液5mL（50mg/L），混合后，于121℃高压蒸气灭菌15~20分钟。