

中华人民共和国国家标准

GB 4789.29—2020

食品安全国家标准 食品微生物学检验 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌 (椰毒假单胞菌酵米面亚种)检验

2020-09-11 发布

2021-03-11 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB/T 4789.29—2003《食品卫生微生物学检验 椰毒假单胞菌酵米面亚种检验》。

本标准与 GB/T 4789.29—2003 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 食品微生物学检验 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)检验”;
- 修改了范围;
- 修改了设备和材料;
- 修改了培养基和试剂;
- 修改了检验程序;
- 增加了结果报告;
- 增加了附录 A。

食品安全国家标准
食品微生物学检验
唐菖蒲伯克霍尔德氏菌
(椰毒假单胞菌酵米面亚种)检验

1 范围

本标准规定了食品中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)[*Burkholderia gladioli* (*Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans*)]的检验方法。

本标准适用于食品中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)的检验。

2 设备和材料

- 2.1 实验室常规灭菌设备。
- 2.2 冰箱:2℃~8℃、-20℃~-30℃。
- 2.3 恒温培养箱:26℃±1℃、36℃±1℃。
- 2.4 恒温水浴锅:46℃±1℃。
- 2.5 显微镜:10倍~100倍。
- 2.6 均质器。
- 2.7 离心机:3 000 r/min。
- 2.8 电子天平:感量 0.1 g。
- 2.9 比浊计。
- 2.10 锥形瓶:容量 100 mL、500 mL。
- 2.11 无菌培养皿:直径 90 mm、直径 150 mm。
- 2.12 无菌透明玻璃纸、滤纸。
- 2.13 无菌灌胃器:1 mL。
- 2.14 微生物生化鉴定系统。
- 2.15 小鼠:18 g~20 g,每一批次试验应使用同一品系的 KM 或 ICR 小鼠。

3 培养基和试剂

- 3.1 GVC 增菌液:见 A.1。
- 3.2 改良马铃薯葡萄糖琼脂(mPDA):见 A.2。
- 3.3 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA):见 A.2.1。
- 3.4 PCFA 培养基:见 A.3。
- 3.5 马铃薯葡萄糖半固体琼脂:见 A.4。
- 3.6 卵黄琼脂:见 A.5。
- 3.7 革兰氏染色液:见 A.6。
- 3.8 氧化酶试剂:见 A.7。

- 3.9 Hugh-Leifson 培养基(O/F 试验用):见 A.8。
- 3.10 蛋白胨水(靛基质试验用):见 A.9。
- 3.11 缓冲葡萄糖蛋白胨水(MR 和 V-P 试验用):见 A.10。
- 3.12 西蒙氏柠檬酸盐培养基:见 A.13。
- 3.13 苯丙氨酸培养基:见 A.14。
- 3.14 糖发酵管:见 A.15。
- 3.15 半固体琼脂:见 A.16。
- 3.16 抗 O 多价血清、型特异性因子血清(O-Ⅲ、O-Ⅳ、O-Ⅴ、O-Ⅵ、O-Ⅶ、O-Ⅷ)。
- 3.17 生化鉴定试剂盒。

4 检验程序

唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)检验程序见图 1。

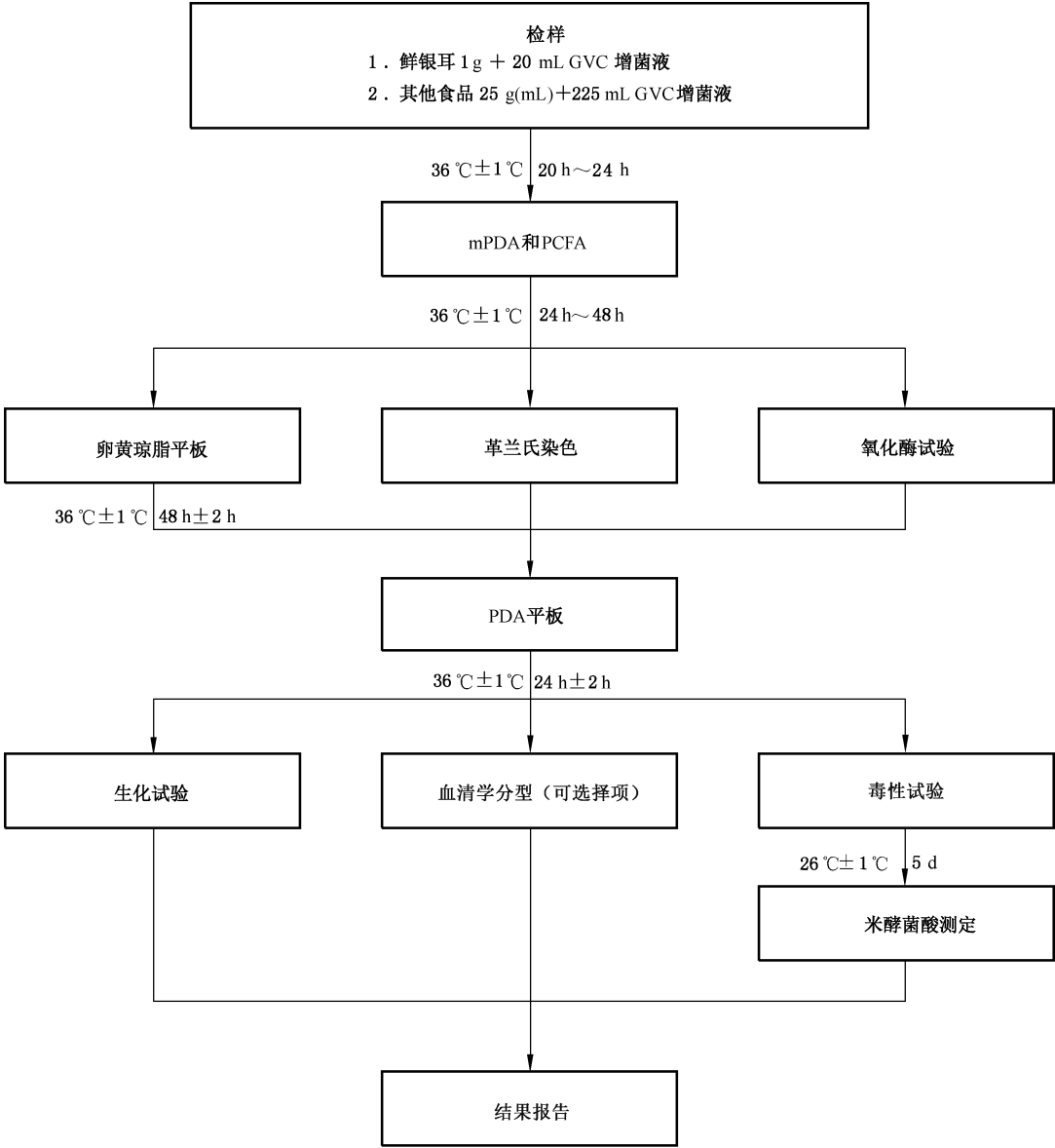


图 1 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)检验程序

5 操作步骤

5.1 样品处理

无菌操作称取 25 g(mL)样品,置入盛有 225 mL GVC 增菌液的无菌均质袋中(鲜银耳样品取 1 g,用剪刀剪碎,加入盛有 20 mL GVC 增菌液的无菌均质袋中),用拍击式均质器拍打 1 min~2 min;或置入盛有 225 mL GVC 增菌液的无菌均质杯中,以 8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min;若样品为液态,振荡混匀。

5.2 增菌

将上述样品增菌液置 36 ℃±1 ℃培养 20 h~24 h。

5.3 分离

用直径 3 mm 的接种环取增菌液一环,分别划线接种于 mPDA 平板和 PCFA 平板,36 ℃±1 ℃培养 24 h~48 h。观察各个平板上生长的菌落,各个平板上菌落特征见表 1。

表 1 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)在不同分离平板上的菌落特征

培养基	菌落特征
mPDA 平板	培养 24 h 后,菌落 1 mm~2 mm,紫色,光滑、湿润、边缘整齐;培养 48 h 后,部分菌落中心可有呈草帽状凸起
PCFA 平板	培养 24 h 后,菌落 0.5 mm~1 mm,灰白色,光滑、湿润、边缘整齐
卵黄琼脂平板	培养 24 h 后,菌落 2 mm~3 mm,表面光滑、湿润;培养 48 h 后,菌落周围形成乳白色混浊环,斜射光下可见菌落及周围培养基表面呈虹彩现象

5.4 初筛试验

自选择性琼脂平板上分别挑取 5 个以上典型或可疑菌落(低于 5 个全选),分区划线接种于卵黄琼脂平板,36 ℃±1 ℃培养。挑取培养 18 h~24 h 的菌落进行革兰氏染色及氧化酶试验。对于革兰氏染色阴性、氧化酶试验阴性的菌继续培养至 48 h±2 h,对于卵磷脂酶阳性,带有虹彩环的单个菌落,接种 PDA 平板,36 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h。

5.5 生化试验

从纯培养的 PDA 平板上挑取菌苔进行生化鉴定。唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)生化特征见表 2。可选择生化鉴定试剂盒或微生物生化鉴定系统。

表 2 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)生化特征

生化试验	特 征
O/F 试验(氧化型)	+
氧化	
葡萄糖	+

表 2(续)

生化试验	特 征
果糖	+
木糖	+
半乳糖	+
蔗糖	—
阿拉伯糖	+
甘露醇	+
侧金盏花醇	+
肌醇	+
卫茅醇	+
动力	+
卵磷脂酶	+
氧化酶	—
尿素	+
明胶液化	+
硝酸盐还原	+
柠檬酸盐利用	+
精氨酸	+
石蕊牛乳	+
靛基质	—
V-P	—
MR	—
苯丙氨酸脱氨酶	—
H ₂ S 产生	—
注：+表示阳性；—表示阴性。	

5.6 血清学分型(可选择项)

5.6.1 菌体抗原的制备

将 PDA 平板 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 的培养物用无菌生理盐水洗下,沸水浴($100\text{ }^{\circ}\text{C}$) 2 h ,
 $3\ 000\text{ r/min}$ 10 min 离心弃上清液,再用无菌生理盐水稀释至 $5 \times 10^8\text{ CFU/mL} \sim 1 \times 10^9\text{ CFU/mL}$
 菌悬液,作为凝集试验用抗原。

5.6.2 菌体抗原的鉴定

用多价血清做玻片凝集试验,同时用生理盐水做对照。与多价血清凝集者,依次用 O-Ⅲ、O-Ⅳ、O-V、O-Ⅵ、O-Ⅶ、O-Ⅷ因子血清做试管凝集试验。根据试验结果,判定菌体抗原型。在生理盐水中自凝者不能分型。生化特征符合,但不能与以上血清凝集者,需保留菌株做进一步鉴定。

5.7 毒性试验

5.7.1 产毒培养

将初步鉴定为唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)的菌株接种 PDA 平板, $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 培养 $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$, 用灭菌接种环刮取适量菌苔, 加到 3 mL 无菌生理盐水的试管中, 配成 1 麦氏浓度 (McFarland, MCF) 的菌悬液(约为 10^8 CFU/mL), 用无菌吸管吸取 0.5 mL, 滴在铺好无菌玻璃纸的直径 150 mm 马铃薯葡萄糖半固体平板上, 用无菌 L 棒涂布均匀, $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d。取下带菌的玻璃纸, 将半固体平板置于 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 流动蒸汽灭菌 30 min。室温冷却后, 置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim -30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。将冰冻好的半固体平板置室温融化, 用无菌吸管吸出冻融液, 经滤纸过滤至无菌试管或锥形瓶中(此为毒素粗提液), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

同时, 将未接种菌苔、铺好无菌玻璃纸的直径 150 mm 马铃薯葡萄糖半固体平板作为阴性对照, 按照同样的试验方法制备阴性对照粗提液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

5.7.2 毒力测定

取毒素粗提液或经 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸发后的 5 倍~10 倍浓缩液, 灌胃小鼠 3 只, 每只 0.5 mL, 观察至 7 d。若菌株产生米酵菌酸, 小鼠在灌胃后 20 min~24 h 内发病。主要症状为竖毛、萎靡不振、躁动, 继而行步蹒跚、肢体麻痹、瘫软、抽搐, 呈角弓反张状, 呼吸急促、死亡。

取阴性对照粗提液或经 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸发后的 5 倍~10 倍浓缩液, 灌胃小鼠 3 只, 每只 0.5 mL, 观察至 7 d。小鼠应健康存活。

5.7.3 米酵菌酸测定

毒力测定实验阳性时, 分别取毒素粗提液, 阴性对照粗提液, 按照 GB 5009.189 执行。

6 结果报告

生化试验符合且毒性试验阳性, 报告检出唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种); 生化试验和毒性试验有一项不符合, 报告未检出唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)。

附 录 A
培养基和试剂

A.1 GVC 增菌液

A.1.1 马铃薯葡萄糖水(PD 水)

A.1.1.1 成分

马铃薯(去皮)	300 g
葡萄糖	20 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.0±0.2

A.1.1.2 制法

称取 300 g 去皮马铃薯,切碎块,加 1 000 mL 蒸馏水,煮沸 10 min~20 min。用纱布过滤,补加蒸馏水至 1 000 mL。加入葡萄糖,加热溶化,分装,121 ℃ 高压 20 min。

A.1.2 龙胆紫水溶液

A.1.2.1 成分

龙胆紫	0.1 g
蒸馏水	100 mL

A.1.2.2 制法

取 0.1 g 龙胆紫,用少量蒸馏水溶解后,加蒸馏水,稀释到 100 mL,保存在棕色瓶内。使用前过滤除菌。

A.1.3 氯霉素溶液

A.1.3.1 成分

氯霉素	20.0 mg
蒸馏水	10 mL

A.1.3.2 制法

20.0 mg 氯霉素溶解于 10.0 mL 蒸馏水,过滤除菌。

A.1.4 GVC 增菌液

每 100 mL PD 水中加入龙胆紫水溶液 1.0 mL、氯霉素溶液 1.0 mL,混匀,分装后置于 4 ℃ 备用。混合液中龙胆紫和氯霉素的终浓度分别为 10 μg/mL 和 20 μg/mL。

A.2 改良马铃薯葡萄糖琼脂(Modified Potato Dextrose Agar, mPDA)

A.2.1 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)

A.2.1.1 成分

马铃薯(去皮)	300 g
葡萄糖	20 g
琼脂	15 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.0

A.2.1.2 制法

称取 300 g 去皮马铃薯,切碎块,加 1 000 mL 蒸馏水,煮沸 10 min~20 min。用纱布过滤,补加蒸馏水至 1 000 mL。加入葡萄糖和琼脂,加热溶化,分装,121 °C 高压灭菌 20 min。

A.2.2 龙胆紫水溶液

A.2.2.1 成分

龙胆紫	0.1 g
蒸馏水	100 mL

A.2.2.2 制法

取 0.1 g 龙胆紫,用少量蒸馏水溶解后,加蒸馏水,稀释到 100 mL,保存在棕色瓶内。使用前过滤除菌。

A.2.3 氯霉素溶液

A.2.3.1 成分

氯霉素	20.0 mg
蒸馏水	10 mL

A.2.3.2 制法

20.0 mg 氯霉素溶解于 10.0 mL 蒸馏水,过滤除菌。

A.2.4 改良马铃薯葡萄糖琼脂(mPDA)

临用时加热溶解 PDA 琼脂,冷却至 50 °C,每 100 mL PDA 中加入龙胆紫水溶液 1.0 mL、氯霉素溶液 1.0 mL,混匀后倾注平板。龙胆紫和氯霉素的终浓度分别为 10 µg/mL 和 20 µg/mL。

A.3 PCFA 培养基

A.3.1 成分

NH ₄ Cl	1 g
KH ₂ PO ₄	1.14 g

Na ₂ HPO ₄	0.7 g
NaCl	4 g
CaCl ₂	0.005 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.000 5 g
胱氨酸	0.01 g
葡萄糖	0.05 g
卫茅醇	15 g
琼脂粉	12 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.0±0.2

A.3.2 PCFA 基础培养基制法

将上述成分加热溶解后,调节 pH,115 ℃ 高压灭菌 15 min,备用。

A.3.3 选择性添加剂

硫酸多黏菌素 B:50 000 U
林肯霉素:30 000 U

A.3.4 制法

将 PCFA 基础培养基加热融化冷却至 50 ℃ 后,加入选择性添加剂,混匀后倾注无菌平皿中,备用。

A.4 马铃薯葡萄糖半固体琼脂

A.4.1 成分

马铃薯(去皮)	300 g
葡萄糖	20 g
琼脂	5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.0±0.2

A.4.2 制法

称取 300 g 去皮马铃薯,切碎块,加 1 000 mL 蒸馏水,煮沸 10 min~20 min。用纱布过滤,补加蒸馏水至 1 000 mL。加入葡萄糖和琼脂,加热溶化,分装,121 ℃ 高压 20 min。

A.5 卵黄琼脂

A.5.1 基础培养基成分

肉浸液	1 000 mL
蛋白胨	15 g
氯化钠	5 g
琼脂	25 g~30 g

pH 7.0±0.2

A.5.2 50%卵黄盐水悬液

A.5.3 卵黄琼脂的制备

制备基础培养基,分装每瓶 100 mL。121 ℃高压灭菌 15 min。临用时加热溶化琼脂,冷至 50 ℃,每瓶内加入 50%葡萄糖水溶液 2 mL 和 50%卵黄盐水悬液 10 mL~15 mL,摇匀,倾注平板。

A.6 革兰氏染色液

A.6.1 结晶紫染色液

A.6.1.1 成分

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

A.6.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

A.6.2 革兰氏碘液

A.6.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL

A.6.2.2 制法

将碘与碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许,充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

A.6.3 沙黄复染液

A.6.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.6.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.6.4 染色法

A.6.4.1 将涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染色液,染 1 min,水洗。

A.6.4.2 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。

A.6.4.3 滴加 95%乙醇脱色,约 15 s~30 s,直至染色液被洗掉,不要过分脱色,水洗。

A.6.4.4 滴加复染液,复染 1 min,水洗、待干、镜检。

A.7 氧化酶试剂

A.7.1 成分

N,N,N',N'-四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
蒸馏水	100.0 mL

A.7.2 制法

少量新鲜配制,于冰箱内避光保存,在 7 d 之内使用。

A.7.3 试验方法

取单个特征性菌落,涂布在氧化酶试剂湿润的滤纸上。如果滤纸在 10 s 之内未变为紫红色、紫色或深蓝色,则为氧化酶试验阴性,否则即为氧化酶实验阳性。

注:实验中切勿使用镍/铬材料。

A.8 Hugh-Leifson 培养基(O/F 试验用)

A.8.1 成分

蛋白胨	2 g
氯化钠	5 g
磷酸氢二钾	0.3 g
琼脂	4 g
葡萄糖	10 g
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	12 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.2±0.2

A.8.2 制法

将蛋白胨和盐类加水溶解后,校正 pH 至 7.2±0.2。加入葡萄糖、琼脂煮沸,溶化琼脂,然后加入指示剂。混匀后,分装试管,121 °C 高压 15 min,直立凝固备用。

A.8.3 试验方法

从斜面上挑取少量培养物作穿刺接种,同时接种两管培养基,其中一管于接种后滴加溶化的 1%液体石蜡于表面(高度约 1 cm),36 °C ±1 °C 培养。

A.8.4 结果

见表 A.1。

表 A.1 O/F 试验结果

反应类型	封口的培养基	开口的培养基
发酵型(F)	产酸	产酸

表 A.1 (续)

反应类型	封口的培养基	开口的培养基
氧化型(O)	不变	产酸
产碱型(A)	不变	不变

A.9 蛋白胨水(靛基质试验用)

A.9.1 成分

蛋白胨(或胰蛋白胨)	20 g
氯化钠	5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.4±0.2

A.9.2 制法

按上述成分配制,分装小试管,121 ℃高压 15 min。

A.9.3 靛基质试剂

- A.9.3.1 柯凡克试剂:将 5 g 对二甲氨基甲醛溶解于 75 mL 戊醇中,然后缓慢加入浓盐酸 25 mL。
- A.9.3.2 欧-波试剂:将 1 g 对二甲氨基苯甲醛溶解于 95 mL 95%乙醇内。然后缓慢加入浓盐酸 20 mL。

A.9.4 试验方法

挑取小量培养物接种,在 36 ℃±1 ℃培养 1 d~2 d,必要时可培养 4 d~5 d。加入柯凡克试剂约 0.5 mL,轻摇试管,阳性者于试剂层呈深红色;或加入欧-波试剂约 0.5 mL,沿管壁流下,覆盖于培养液表面,阳性者于液面接触处呈玫瑰红色。

注:蛋白胨中应含有丰富的色氨酸。每批蛋白胨买来后,应先用已知菌种鉴定后方可使用。

A.10 缓冲葡萄糖蛋白胨水(MR 和 V-P 试验用)

A.10.1 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
pH	7.0±0.2

A.10.2 制法

溶化后校正 pH,分装试管,每管 1 mL,121 ℃高压 15 min。

A.11 甲基红(MR)试验

A.11.1 甲基红试剂

A.11.1.1 成分

甲基红	10 mg
95%乙醇	30 mL
蒸馏水	20 mL

A.11.1.2 制法

10 mg 甲基红溶于 30 mL 95%乙醇中,然后加入 20 mL 蒸馏水。

A.11.2 试验方法

取适量琼脂培养物接种于本培养基,36℃±1℃培养 2 d~5 d。滴加甲基红试剂一滴,立即观察结果。鲜红色为阳性,黄色为阴性。

A.12 V-P 试验

A.12.1 6% α-萘酚-乙醇溶液

成分及制法:取 α-萘酚 6.0 g,加无水乙醇溶解,定容至 100 mL。

A.12.2 40%氢氧化钾溶液

成分及制法:取氢氧化钾 40 g,加蒸馏水溶解,定容至 100 mL。

A.12.3 试验方法

取适量琼脂培养物接种于本培养基,36℃±1℃培养 2 d~4 d。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。阳性反应立刻或于数分钟内出现红色,如为阴性,应放在 36℃±1℃继续培养 4 h 再进行观察。

A.13 西蒙氏柠檬酸盐培养基

A.13.1 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
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	40 mL
pH	7.0±0.2

A.13.2 制法

先将盐类溶解于水内,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 °C 高压 15 min。制成斜面。

A.13.3 试验方法

挑取少量琼脂培养物接种,36 °C ± 1 °C 培养 4 d,每天观察结果。阳性者斜面上有菌落生长,培养基由绿色转为蓝色。

A.14 苯丙氨酸培养基

A.14.1 成分

酵母浸膏	3 g
DL-苯丙氨酸(或 L-苯丙氨酸 1 g)	2 g
磷酸氢二钠	1 g
氯化钠	5 g
琼脂	12 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.0 ± 0.2

A.14.2 制法

加热溶解后分装试管,121 °C 高压 15 min,制成斜面。

A.14.3 试验方法

自琼脂斜面上挑取大量培养物,移种于苯丙氨酸琼脂,36 °C ± 1 °C 培养 4 h 或 18 h ~ 24 h。滴加 10% 三氯化铁溶液 2 滴 ~ 3 滴,自斜面培养物上流下,苯丙氨酸脱氨酶阳性者呈深绿色。

A.15 糖发酵管

A.15.1 成分

牛肉膏	5 g
蛋白胨	10 g
氯化钠	3 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2 g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	12 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.4 ± 0.2

A.15.2 制法

葡萄糖发酵管按上述成分配好后,按 0.5% 加入葡萄糖,分装于有一个倒置小管的小试管内,115 °C 高压 15 min。

其他各种糖发酵管可按上述成分配好后,分装,每瓶 100 mL,115 °C 高压 15 min。另将各种糖类分

别配好 10% 溶液,同时高压灭菌。将 5 mL 糖溶液加入于 100 mL 培养基内,以无菌操作分装小试管。

A.15.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取小量培养物接种,36 °C ±1 °C 培养,一般观察 2 d~3 d。迟缓反应需观察 14 d~30 d。

A.16 半固体琼脂

A.16.1 成分

蛋白胨	1 g
牛肉膏	0.3 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	0.35 g~0.4 g
蒸馏水	100 mL
pH	7.4±0.2

A.16.2 制法

按以上成分配好,煮沸使溶解,校正 pH。分装小试管。121 °C 高压 15 min。直立凝固备用。

注:供动力观察、菌种保存试验用。

A.17 硫酸亚铁琼脂(硫化氢试验用)

A.17.1 成分

牛肉膏	3 g
酵母浸膏	3 g
蛋白胨	10 g
硫酸亚铁	0.2 g
硫代硫酸钠	0.3 g
氯化钠	5 g
琼脂	12 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.4±0.2

A.17.2 制法

加热溶解,校正 pH,分装试管,115 °C 高压 15 min,直立凝固备用。

A.17.3 试验方法

挑取琼脂培养物,沿管壁穿刺,36 °C ±1 °C 培养 1 d~2 d,观察结果。产硫化氢者培养基变为黑色。

A.18 营养明胶

A.18.1 成分

蛋白胨	5 g
-----	-----

牛肉膏	3 g
明胶	120 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	6.8~7.0

A.18.2 制法

加热溶解、校正 pH 至 7.4~7.6,分装小管,121 °C 高压 10 min,取出后迅速冷却,使其凝固。复查最终 pH 应为 6.8~7.0。

A.18.3 试验方法

挑取琼脂培养物穿刺接种,22 °C~25 °C 培养,每天观察结果,记录液化时间。或放在 36 °C±1 °C 培养,每天取出,放冰箱(4 °C)内 30 min 后再观察结果。

A.19 尿素琼脂

A.19.1 基础培养基

A.19.1.1 成分

蛋白胨	1 g
氯化钠	5 g
葡萄糖	1 g
磷酸二氢钾	2 g
0.4% 酚红溶液	3 mL
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL

A.19.1.2 制法

将除琼脂以外的成分配好,加入琼脂,加热溶化后,121 °C 高压 15 min。

A.19.2 20% 尿素溶液

A.19.2.1 成分

尿素	2 g
蒸馏水	8 mL

A.19.2.2 制法

2 g 尿素溶解于 8 mL 蒸馏水,过滤除菌。

A.19.3 尿素琼脂

将 99 mL 高压灭菌后的基础培养基冷却至 50 °C~55 °C,加入 1 mL 过滤除菌的尿素溶液(终浓度为 2%),最终 pH 应为 7.2±0.2。分装于灭菌试管内,制成斜面备用。

A.19.4 试验方法

挑取琼脂培养物接种,36 °C±1 °C 培养 24 h,观察结果。尿素酶阳性者由于产碱而使培养基变为

红色。

A.20 精氨酸试验

A.20.1 成分

蛋白胨	5 g
酵母浸膏	3 g
葡萄糖	1 g
蒸馏水	1 000 mL
1.6%溴甲酚紫-乙醇溶液	1 mL
L-精氨酸	5 g
pH	6.8±0.2

A.20.2 制法

除 L-精氨酸以外的成分加热溶解后,每瓶分装 100 mL,加入 L-精氨酸 0.5 g(0.5%),校正 pH 至 6.8±0.2。对照培养基不加 L-精氨酸。每管分装 0.5 mL,上面滴加一层液体石蜡,115 ℃高压 10 min。

A.20.3 试验方法

挑取琼脂培养物接种,36 ℃±1 ℃培养 18 h~24 h。精氨酸脱羧酶阳性者因产碱,培养基呈紫色。阴性者无碱性产物,但因葡萄糖产酸而使培养基变为黄色。对照管呈黄色。

A.21 硝酸盐培养基

A.21.1 成分

硝酸钾	0.2 g
蛋白胨	5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.4±0.2

A.21.2 制法

溶解后,校正 pH,分装,每管 5 mL,121 ℃高压 15 min。

A.21.3 硝酸盐还原试剂

B.21.3.1 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。

B.21.3.2 乙液:将甲萘胺 0.5 g 溶解于 2.5 mol/L 乙酸溶液 100 mL 中。

A.21.4 试验方法

接种后于 36 ℃±1 ℃,培养 1 d,加入甲液和乙液各一滴,观察结果。硝酸盐还原为亚硝酸盐时立刻或数分钟内显红色。

注:本试验阴性的原因有三:①细菌不能还原硝酸盐;②亚硝酸盐继续分解,生成氨和氮;③培养基不适于细菌的生长。如欲检查培养基中硝酸盐是否未被分解,可再加入锌粉少许,可使硝酸盐还原为亚硝酸盐而呈现红色。

A.22 石蕊牛乳试验

A.22.1 成分

新鲜脱脂牛乳	100 mL
2%石蕊水溶液	100 mL

A.22.2 制法

将新鲜牛乳隔水煮沸 30 min,置于冰箱内一夜。3 000 r/min,离心 40 min。拨开乳脂,用吸管吸出下层乳汁于另一烧瓶内,加入石蕊溶液,分装于试管内,112.6 °C 高压 15 min。

A.22.3 试验方法

挑取培养物接种,37 °C 培养 18 h~24 h。

A.22.4 结果

牛乳中含有丰富的糖类及蛋白质,其中主要是乳糖和酪蛋白,一般细菌均能在其中生长。由于各种细菌对这些物质的分解能力不同,故可观察数种不同的反应。

- a) 产酸:因发酵乳糖而产酸,使指示剂变为粉红色。
 - b) 凝固:因产酸过多而使牛乳中的酪蛋白凝固。
 - c) 胨化:经凝固的酪蛋白继续水解为蛋白胨,此时牛乳培养基的上层液体变清,底部可留有未被完全胨化的酪蛋白。
 - d) 产碱:未能使乳糖发酵,因分解含氮物质,生成胺及氨,培养基变为碱性,指示剂变为蓝紫色。
-