



中华人民共和国国家标准

GB 4789.2—2016

食品安全国家标准

食品微生物学检验 菌落总数测定

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会
国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB 4789.2—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 菌落总数测定

1 范围

本标准规定了食品中菌落总数(Aerobic plate count)的测定方法。
本标准适用于食品中菌落总数的测定。

2 术语和定义

菌落总数 aerobic plate count

食品检样经过处理,在一定条件下(如培养基、培养温度和培养时间等)培养后,所得每 g(mL)检样中形成的微生物菌落总数。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

- 3.1 恒温培养箱:36℃±1℃,30℃±1℃。
- 3.2 冰箱:2℃~5℃。
- 3.3 恒温水浴箱:46℃±1℃。
- 3.4 天平:感量为0.1g。
- 3.5 均质器。
- 3.6 振荡器。
- 3.7 无菌吸管:1mL(具0.01mL刻度)、10mL(具0.1mL刻度)或微量移液器及吸头。
- 3.8 无菌锥形瓶:容量250mL、500mL。
- 3.9 无菌培养皿:直径90mm。
- 3.10 pH计或pH比色管或精密pH试纸。
- 3.11 放大镜或/和菌落计数器。

4 培养基和试剂

- 4.1 平板计数琼脂培养基:见A.1。
- 4.2 磷酸盐缓冲液:见A.2。
- 4.3 无菌生理盐水:见A.3。

5 检验程序

菌落总数的检验程序见图1。

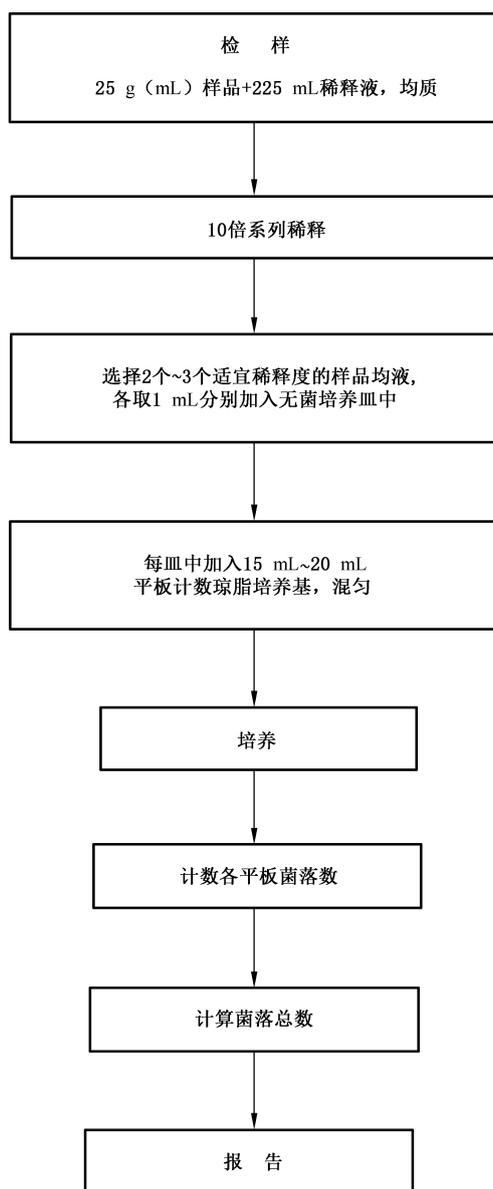


图 1 菌落总数的检验程序

6 操作步骤

6.1 样品的稀释

6.1.1 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, 8 000 r/min~10 000 r/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。

6.1.2 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。

6.1.3 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。

6.1.4 按 6.1.3 操作,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。

6.1.5 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 1 mL 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。

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

6.2 培养

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

6.2.2 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 6.2.1 条件进行培养。

6.3 菌落计数

6.3.1 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(colony-forming units,CFU)表示。

6.3.2 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。

6.3.3 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。

6.3.4 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。

7 结果与报告

7.1 菌落总数的计算方法

7.1.1 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内,计算两个平板菌落数的平均值,再将平均值乘以相应稀释倍数,作为每 g(mL)样品中菌落总数结果。

7.1.2 若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时,按式(1)计算:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

N ——样品中菌落数;

$\sum C$ ——平板(含适宜范围菌落数的平板)菌落数之和;

n_1 ——第一稀释度(低稀释倍数)平板个数;

n_2 ——第二稀释度(高稀释倍数)平板个数;

d ——稀释因子(第一稀释度)。

示例:

稀释度	1:100(第一稀释度)	1:1 000(第二稀释度)
菌落数(CFU)	232,244	33,35

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} = \frac{232 + 244 + 33 + 35}{[2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{544}{0.022} = 24\ 727$$

上述数据按 7.2.2 数字修约后,表示为 25 000 或 2.5×10^4 。

7.1.3 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。

7.1.4 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。

7.1.5 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。

7.1.6 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 300 CFU 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。

7.2 菌落总数的报告

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

7.2.2 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。

7.2.3 若所有平板上为蔓延菌落而无法计数,则报告菌落蔓延。

7.2.4 若空白对照上有菌落生长,则此次检测结果无效。

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

附 录 A 培养基和试剂

A.1 平板计数琼脂(plate count agar, PCA)培养基

A.1.1 成分

胰蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	2.5 g
葡萄糖	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将上述成分加于蒸馏水中,煮沸溶解,调节 pH 至 7.0 ± 0.2 。分装试管或锥形瓶,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 磷酸盐缓冲液

A.2.1 成分

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	34.0 g
蒸馏水	500 mL

A.2.2 制法

贮存液:称取 34.0 g 的磷酸二氢钾溶于 500 mL 蒸馏水中,用大约 175 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2,用蒸馏水稀释至 1 000 mL 后贮存于冰箱。

稀释液:取贮存液 1.25 mL,用蒸馏水稀释至 1 000 mL,分装于适宜容器中,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.3 无菌生理盐水

A.3.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中,121 °C 高压灭菌 15 min。



中华人民共和国国家标准

GB 4789.3—2016

食品安全国家标准

食品微生物学检验 大肠菌群计数

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会
国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB 4789.3—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》、GB/T 4789.32—2002《食品卫生微生物学检验 大肠菌群的快速检测》和 SN/T 0169—2010《进出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检测方法》大肠菌群计数部分。

本标准与 GB 4789.3—2010 相比,主要变化如下:

- 增加了检验原理;
- 修改了适用范围;
- 修改了典型菌落的形态描述;
- 修改了第二法平板菌落数的选择;
- 修改了第二法证实试验;
- 修改了第二法平板计数的报告。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 大肠菌群计数

1 范围

本标准规定了食品中大肠菌群(Coliforms)计数的方法。

本标准第一法适用于大肠菌群含量较低的食品中大肠菌群的计数;第二法适用于大肠菌群含量较高的食品中大肠菌群的计数。

2 术语和定义

2.1

大肠菌群 Coliforms

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胞杆菌。

2.2

最可能数 Most probable number;MPN

基于泊松分布的一种间接计数方法。

3 检验原理

3.1 MPN 法

MPN 法是统计学和微生物学结合的一种定量检测法。待测样品经系列稀释并培养后,根据其未生长的最低稀释度与生长的最高稀释度,应用统计学概率论推算出待测样品中大肠菌群的最大可能数。

3.2 平板计数法

大肠菌群在固体培养基中发酵乳糖产酸,在指示剂的作用下形成可计数的红色或紫色,带有或不带有沉淀环的菌落。

4 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

4.1 恒温培养箱: $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

4.2 冰箱: $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

4.3 恒温水浴箱: $46\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

4.4 天平:感量 0.1 g。

4.5 均质器。

4.6 振荡器。

4.7 无菌吸管: 1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)或微量移液器及吸头。

4.8 无菌锥形瓶:容量 500 mL。

4.9 无菌培养皿:直径 90 mm。

4.10 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

4.11 菌落计数器。

5 培养基和试剂

5.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨(lauryl sulfate tryptose, LST)肉汤:见 A.1。

5.2 煌绿乳糖胆盐(brilliant green lactose bile, BGLB)肉汤:见 A.2。

5.3 结晶紫中性红胆盐琼脂(violet red bile agar, VRBA):见 A.3。

5.4 无菌磷酸盐缓冲液:见 A.4。

5.5 无菌生理盐水:见 A.5。

5.6 1 mol/L NaOH 溶液:见 A.6。

5.7 1 mol/L HCl 溶液:见 A.7。

第一法 大肠菌群 MPN 计数法

6 检验程序

大肠菌群 MPN 计数的检验程序见图 1。

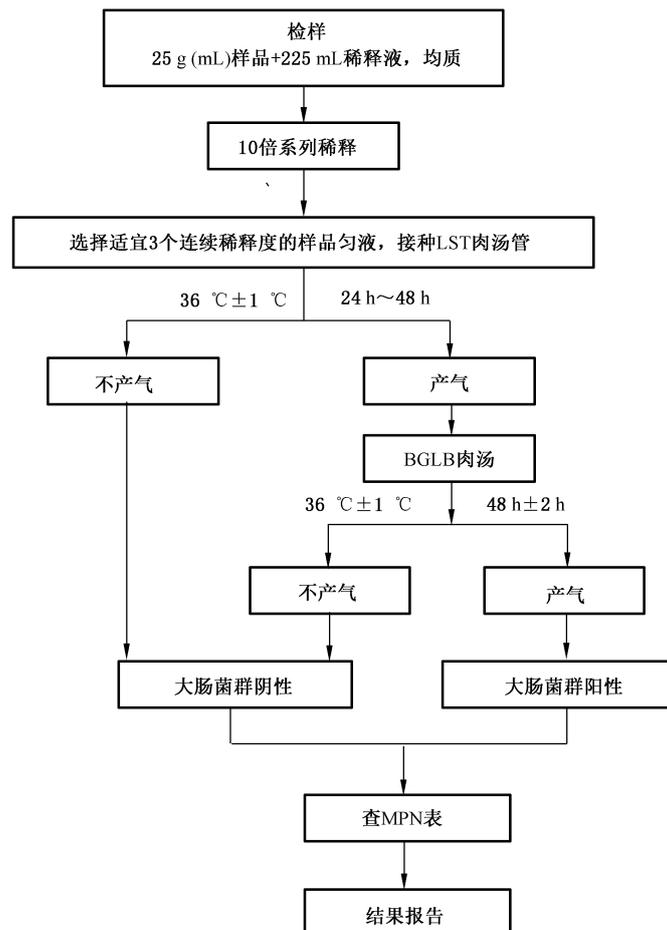


图 1 大肠菌群 MPN 计数法检验程序

7 操作步骤

7.1 样品的稀释

7.1.1 固体和半固体样品:称取 25 g 样品,放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内,8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min,或放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打 1 min~2 min,制成 1:10 的样品匀液。

7.1.2 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)或其他无菌容器中充分振摇或置于机械振荡器中振摇,充分混匀,制成 1:10 的样品匀液。

7.1.3 样品匀液的 pH 应在 6.5~7.5 之间,必要时分别用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调节。

7.1.4 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL,沿管壁缓缓注入 9 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌试管中(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 1 mL 无菌吸管反复吹打,使其混合均匀,制成 1:100 的样品匀液。

7.1.5 根据对样品污染状况的估计,按上述操作,依次制成十倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释 1 次,换用 1 支 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 15 min。

7.2 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 1 mL(如接种量超过 1 mL,则用双料 LST 肉汤),36 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h,观察倒管内是否有气泡产生,24 h ± 2 h 产气者进行复发酵试验(证实试验),如未产气则继续培养至 48 h ± 2 h,产气者进行复发酵试验。未产气者为大肠菌群阴性。

7.3 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 °C ± 1 °C 培养 48 h ± 2 h,观察产气情况。产气者,计为大肠菌群阳性管。

7.4 大肠菌群最可能数(MPN)的报告

按 7.3 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。

第二法 大肠菌群平板计数法

8 检验程序

大肠菌群平板计数法的检验程序见图 2。

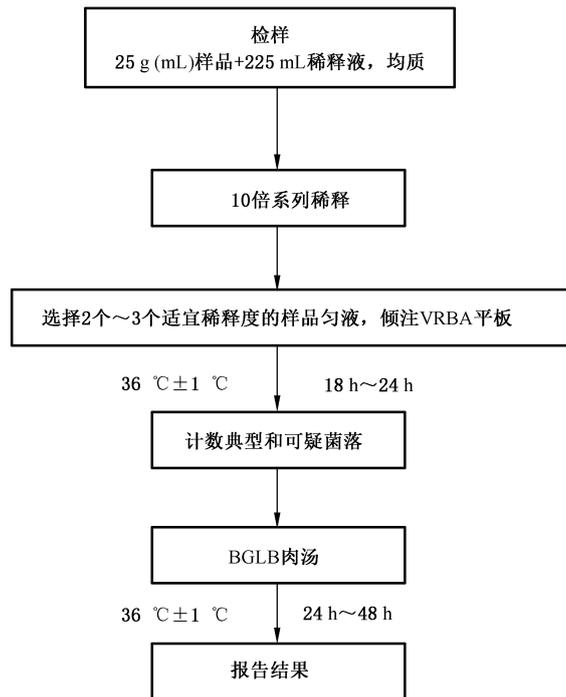


图2 大肠菌群平板计数法检验程序

9 操作步骤

9.1 样品的稀释

按 7.1 进行。

9.2 平板计数

9.2.1 选取 2 个~3 个适宜的连续稀释度, 每个稀释度接种 2 个无菌平皿, 每皿 1 mL。同时取 1 mL 生理盐水加入无菌平皿作空白对照。

9.2.2 及时将 15 mL~20 mL 融化并恒温至 46 °C 的结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)约倾注于每个平皿中。小心旋转平皿, 将培养基与样液充分混匀, 待琼脂凝固后, 再加 3 mL~4 mL VRBA 覆盖平板表层。翻转平板, 置于 36 °C ± 1 °C 培养 18 h~24 h。

9.3 平板菌落数的选择

选取菌落数在 15 CFU~150 CFU 之间的平板, 分别计数平板上出现的典型和可疑大肠菌群菌落(如菌落直径较典型菌落小)。典型菌落为紫红色, 菌落周围有红色的胆盐沉淀环, 菌落直径为 0.5 mm 或更大, 最低稀释度平板低于 15 CFU 的记录具体菌落数。

9.4 证实试验

从 VRBA 平板上挑取 10 个不同类型的典型和可疑菌落, 少于 10 个菌落的挑取全部典型和可疑菌落。分别移种于 BGLB 肉汤管内, 36 °C ± 1 °C 培养 24 h~48 h, 观察产气情况。凡 BGLB 肉汤管产气, 即可报告为大肠菌群阳性。

9.5 大肠菌群平板计数的报告

经最后证实为大肠菌群阳性的试管比例乘以 9.3 中计数的平板菌落数,再乘以稀释倍数,即为每 g(mL) 样品中大肠菌群数。例: 10^{-4} 样品稀释液 1 mL,在 VRBA 平板上有 100 个典型和可疑菌落,挑取其中 10 个接种 BGLB 肉汤管,证实有 6 个阳性管,则该样品的大肠菌群数为: $100 \times 6 / 10 \times 10^4 / \text{g(mL)} = 6.0 \times 10^5 \text{CFU/g(mL)}$ 。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。

附 录 A

培养基和试剂

A.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤

A.1.1 成分

胰蛋白胨或胰酪胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	2.75 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	2.75 g
月桂基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将上述成分溶解于蒸馏水中,调节 pH 至 6.8 ± 0.2 。分装到有玻璃小倒管的试管中,每管 10 mL。
121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 煌绿乳糖胆盐(BGLB)肉汤

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
乳糖	10.0 g
牛胆粉(oxgall 或 oxbile)溶液	200 mL
0.1%煌绿水溶液	13.3 mL
蒸馏水	800 mL

A.2.2 制法

将蛋白胨、乳糖溶于约 500 mL 蒸馏水中,加入牛胆粉溶液 200 mL(将 20.0 g 脱水牛胆粉溶于 200 mL 蒸馏水中,调节 pH 至 7.0~7.5),用蒸馏水稀释到 975 mL,调节 pH 至 7.2 ± 0.1 ,再加入 0.1% 煌绿水溶液 13.3 mL,用蒸馏水补足到 1 000 mL,用棉花过滤后,分装到有玻璃小倒管的试管中,每管 10 mL。121 °C 高压灭菌 15 min。

A.3 结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)

A.3.1 成分

蛋白胨	7.0 g
酵母膏	3.0 g
乳糖	10.0 g

氯化钠	5.0 g
胆盐或 3 号胆盐	1.5 g
中性红	0.03 g
结晶紫	0.002 g
琼脂	15 g~18 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

将上述成分溶于蒸馏水中,静置几分钟,充分搅拌,调节 pH 至 7.4 ± 0.1 。煮沸 2 min,将培养基融化并恒温至 $45\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倾注平板。使用前临时制备,不得超过 3 h。

A.4 磷酸盐缓冲液

A.4.1 成分

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	34.0 g
蒸馏水	500 mL

A.4.2 制法

贮存液:称取 34.0 g 的磷酸二氢钾溶于 500 mL 蒸馏水中,用大约 175 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,用蒸馏水稀释至 1 000 mL 后贮存于冰箱。稀释液:取贮存液 1.25 mL,用蒸馏水稀释至 1 000 mL,分装于适宜容器中, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.5 无菌生理盐水

A.5.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.6 1 mol/L NaOH 溶液

A.6.1 成分

NaOH	40.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制法

称取 40 g 氢氧化钠溶于 1 000 mL 无菌蒸馏水中。

A.7 1 mol/L HCl 溶液**A.7.1 成分**

HCl	90 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

移取浓盐酸 90 mL,用无菌蒸馏水稀释至 1 000 mL。

附录 B
大肠菌群最可能数(MPN)检索表

B.1 大肠菌群最可能数(MPN)检索表

每 g(mL) 检样中大肠菌群最可能数(MPN)的检索见表 B.1。

表 B.1 大肠菌群最可能数(MPN)检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	—	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1 000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1 000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2 000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1 100	180	4 100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1 100	420	—

注 1: 本表采用 3 个稀释度[0.1 g(mL)、0.01 g(mL)、0.001 g(mL)], 每个稀释度接种 3 管。
注 2: 表内所列检样量如改用 1 g(mL)、0.1 g(mL)和 0.01 g(mL)时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 0.01 g(mL)、0.001 g(mL)和 0.000 1 g(mL)时, 则表内数字应相应增高 10 倍, 其余类推。



中华人民共和国国家标准

GB 4789.4—2016

食品安全国家标准

食品微生物学检验 沙门氏菌检验

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会
国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB 4789.4—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》、SN 0170—1992《出口食品沙门氏菌属(包括亚利桑那菌)检验方法》、SN/T 2552.5—2010《乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第 5 部分:沙门氏菌检验》。

整合后的标准与 GB 4789.4—2010 相比,主要变化如下:

- 修改了检测流程和血清学检测操作程序;
- 修改了附录 A 和附录 B。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 沙门氏菌检验

1 范围

本标准规定了食品中沙门氏菌(*Salmonella*)的检验方法。

本标准适用于食品中沙门氏菌的检验。

2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

- 2.1 冰箱:2℃~5℃。
- 2.2 恒温培养箱:36℃±1℃,42℃±1℃。
- 2.3 均质器。
- 2.4 振荡器。
- 2.5 电子天平:感量0.1g。
- 2.6 无菌锥形瓶:容量500mL,250mL。
- 2.7 无菌吸管:1mL(具0.01mL刻度)、10mL(具0.1mL刻度)或微量移液器及吸头。
- 2.8 无菌培养皿:直径60mm,90mm。
- 2.9 无菌试管:3mm×50mm、10mm×75mm。
- 2.10 pH计或pH比色管或精密pH试纸。
- 2.11 全自动微生物生化鉴定系统。
- 2.12 无菌毛细管。

3 培养基和试剂

- 3.1 缓冲蛋白胨水(BPW):见A.1。
- 3.2 四硫磺酸钠煌绿(TTB)增菌液:见A.2。
- 3.3 亚硒酸盐胱氨酸(SC)增菌液:见A.3。
- 3.4 亚硫酸铋(BS)琼脂:见A.4。
- 3.5 HE琼脂:见A.5。
- 3.6 木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂:见A.6。
- 3.7 沙门氏菌属显色培养基。
- 3.8 三糖铁(TSI)琼脂:见A.7。
- 3.9 蛋白胨水、靛基质试剂:见A.8。
- 3.10 尿素琼脂(pH7.2):见A.9。
- 3.11 氰化钾(KCN)培养基:见A.10。
- 3.12 赖氨酸脱羧酶试验培养基:见A.11。
- 3.13 糖发酵管:见A.12。
- 3.14 邻硝基酚β-D半乳糖苷(ONPG)培养基:见A.13。
- 3.15 半固体琼脂:见A.14。

- 3.16 丙二酸钠培养基:见 A.15。
- 3.17 沙门氏菌 O、H 和 Vi 诊断血清。
- 3.18 生化鉴定试剂盒。

4 检验程序

沙门氏菌检验程序见图 1。

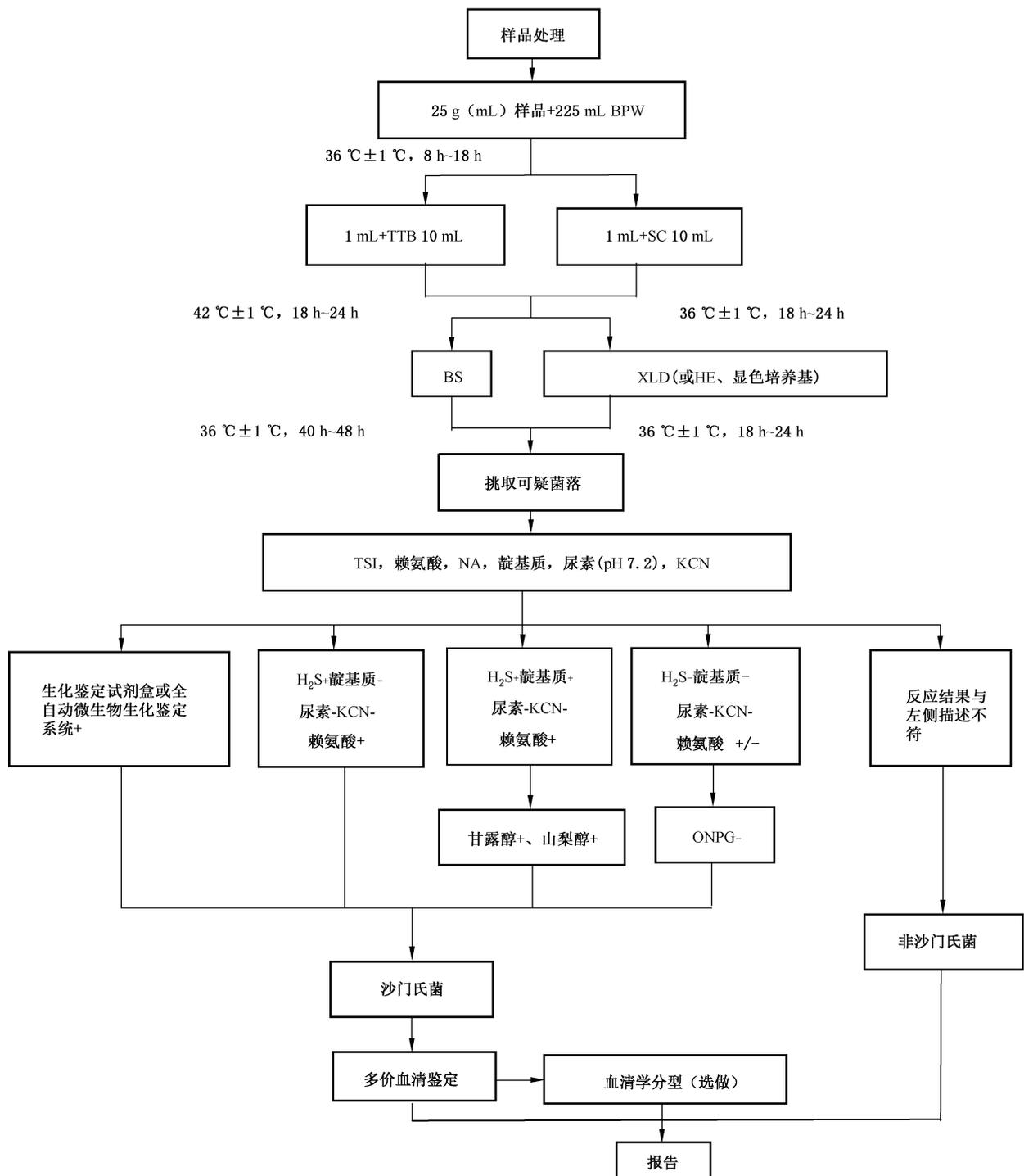


图 1 沙门氏菌检验程序

5 操作步骤

5.1 预增菌

无菌操作称取 25 g(mL)样品,置于盛有 225 mL BPW 的无菌均质杯或合适容器内,以 8 000 r/min~10 000 r/min均质 1 min~2 min,或置于盛有 225 mL BPW 的无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打 1 min~2 min。若样品为液态,不需要均质,振荡混匀。如需调整 pH,用 1 mol/L 无菌 NaOH 或 HCl 调 pH 至 6.8 ± 0.2 。无菌操作将样品转至 500 mL 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 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 8 h~18 h。

如为冷冻产品,应在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下不超过 15 min,或 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 不超过 18 h 解冻。

5.2 增菌

轻轻摇动培养过的样品混合物,移取 1 mL,转种于 10 mL TTB 内,于 $42\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。同时,另取 1 mL,转种于 10 mL SC 内,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

5.3 分离

分别用直径 3 mm 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 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分别培养 40 h~48 h(BS 琼脂平板)或 18 h~24 h(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。

表 1 沙门氏菌属在不同选择性琼脂平板上的菌落特征

选择性琼脂平板	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

5.4 生化试验

5.4.1 自选择性琼脂平板上分别挑取 2 个以上典型或可疑菌落,接种三糖铁琼脂,先在斜面划线,再于底层穿刺;接种针不要灭菌,直接接种赖氨酸脱羧酶试验培养基和营养琼脂平板,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h,必要时可延长至 48 h。在三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基内,沙门氏菌属的反应结果见表 2。

表2 沙门氏菌属在三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基内的反应结果

三糖铁琼脂				赖氨酸脱羧酶试验培养基	初步判断
斜面	底层	产气	硫化氢		
K	A	+(-)	+(-)	+	可疑沙门氏菌属
K	A	+(-)	+(-)	-	可疑沙门氏菌属
A	A	+(-)	+(-)	+	可疑沙门氏菌属
A	A	+/-	+/-	-	非沙门氏菌
K	K	+/-	+/-	+/-	非沙门氏菌

注：K：产碱，A：产酸；+：阳性，-：阴性；+(-)：多数阳性，少数阴性；+/-：阳性或阴性。

5.4.2 接种三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基的同时，可直接接种蛋白胨水（供做靛基质试验）、尿素琼脂（pH 7.2）、氰化钾（KCN）培养基，也可在初步判断结果后从营养琼脂平板上挑取可疑菌落接种。于 36 °C ± 1 °C 培养 18 h ~ 24 h，必要时可延长至 48 h，按表 3 判定结果。将已挑菌落的平板储存于 2 °C ~ 5 °C 或室温至少保留 24 h，以备必要时复查。

表3 沙门氏菌属生化反应初步鉴别表

反应序号	硫化氢 (H ₂ S)	靛基质	pH 7.2 尿素	氰化钾 (KCN)	赖氨酸脱羧酶
A1	+	-	-	-	+
A2	+	+	-	-	+
A3	-	-	-	-	+/-

注：+ 阳性；- 阴性；+/- 阳性或阴性。

5.4.2.1 反应序号 A1：典型反应判定为沙门氏菌属。如尿素、KCN 和赖氨酸脱羧酶 3 项中有 1 项异常，按表 4 可判定为沙门氏菌。如有 2 项异常为非沙门氏菌。

表4 沙门氏菌属生化反应初步鉴别表

pH 7.2 尿素	氰化钾 (KCN)	赖氨酸脱羧酶	判定结果
-	-	-	甲型副伤寒沙门氏菌（要求血清学鉴定结果）
-	+	+	沙门氏菌 IV 或 V（要求符合本群生化特性）
+	-	+	沙门氏菌个别变体（要求血清学鉴定结果）

注：+ 表示阳性；- 表示阴性。

5.4.2.2 反应序号 A2：补做甘露醇和山梨醇试验，沙门氏菌靛基质阳性变体两项试验结果均为阳性，但需要结合血清学鉴定结果进行判定。

5.4.2.3 反应序号 A3：补做 ONPG。ONPG 阴性为沙门氏菌，同时赖氨酸脱羧酶阳性，甲型副伤寒沙门氏菌为赖氨酸脱羧酶阴性。

5.4.2.4 必要时按表 5 进行沙门氏菌生化群的鉴别。

表5 沙门氏菌属各生化群的鉴别

项目	I	II	III	IV	V	VI
卫矛醇	+	+	—	—	+	—
山梨醇	+	+	+	+	+	—
水杨苷	—	—	—	+	—	—
ONPG	—	—	+	—	+	—
丙二酸盐	—	+	+	—	—	—
KCN	—	—	—	+	+	—

注：+表示阳性；—表示阴性。

5.4.3 如选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统,可根据 5.4.1 的初步判断结果,从营养琼脂平板上挑取可疑菌落,用生理盐水制备成浊度适当的菌悬液,使用生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定。

5.5 血清学鉴定

5.5.1 检查培养物有无自凝性

一般采用 1.2%~1.5% 琼脂培养物作为玻片凝集试验用的抗原。首先排除自凝集反应,在洁净的玻片上滴加一滴生理盐水,将待试培养物混合于生理盐水滴内,使成为均一性的混浊悬液,将玻片轻轻摇动 30 s~60 s,在黑色背景下观察反应(必要时用放大镜观察),若出现可见的菌体凝集,即认为有自凝性,反之无自凝性。对无自凝的培养物参照下面方法进行血清学鉴定。

5.5.2 多价菌体抗原(O)鉴定

在玻片上划出 2 个约 1 cm×2 cm 的区域,挑取 1 环待测菌,各放 1/2 环于玻片上的每一区域上部,在其中一个区域下部加 1 滴多价菌体(O)抗血清,在另一区域下部加入 1 滴生理盐水,作为对照。再用无菌的接种环或针分别将两个区域内的菌苔研成乳状液。将玻片倾斜摇动混合 1 min,并对着黑暗背景进行观察,任何程度的凝集现象皆为阳性反应。O 血清不凝集时,将菌株接种在琼脂量较高的(如 2%~3%)培养基上再检查;如果是由于 Vi 抗原的存在而阻止了 O 凝集反应时,可挑取菌苔于 1 mL 生理盐水中做成浓菌液,于酒精灯火焰上煮沸后再检查。

5.5.3 多价鞭毛抗原(H)鉴定

操作同 5.5.2。H 抗原发育不良时,将菌株接种在 0.55%~0.65% 半固体琼脂平板的中央,待菌落蔓延生长时,在其边缘部分取菌检查;或将菌株通过接种装有 0.3%~0.4% 半固体琼脂的小玻管 1 次~2 次,自远端取菌培养后再检查。

5.6 血清学分型(选做项目)

5.6.1 O 抗原的鉴定

用 A~F 多价 O 血清做玻片凝集试验,同时用生理盐水做对照。在生理盐水中自凝者为粗糙型菌株,不能分型。

被 A~F 多价 O 血清凝集者,依次用 O4;O3、O10;O7;O8;O9;O2 和 O11 因子血清做凝集试验。根据试验结果,判定 O 群。被 O3、O10 血清凝集的菌株,再用 O10、O15、O34、O19 单因子血清做凝集

试验,判定 E1、E4 各亚群,每一个 O 抗原成分的最后确定均应根据 O 单因子血清的检查结果,没有 O 单因子血清的要两个 O 复合因子血清进行核对。

不被 A~F 多价 O 血清凝集者,先用 9 种多价 O 血清检查,如有其中一种血清凝集,则用这种血清所包括的 O 群血清逐一检查,以确定 O 群。每种多价 O 血清所包括的 O 因子如下:

- O 多价 1 A, B, C, D, E, F 群 (并包括 6, 14 群)
- O 多价 2 13, 16, 17, 18, 21 群
- O 多价 3 28, 30, 35, 38, 39 群
- O 多价 4 40, 41, 42, 43 群
- O 多价 5 44, 45, 47, 48 群
- O 多价 6 50, 51, 52, 53 群
- O 多价 7 55, 56, 57, 58 群
- O 多价 8 59, 60, 61, 62 群
- O 多价 9 63, 65, 66, 67 群

5.6.2 H 抗原的鉴定

属于 A~F 各 O 群的常见菌型,依次用表 6 所述 H 因子血清检查第 1 相和第 2 相的 H 抗原。

表 6 A~F 群常见菌型 H 抗原表

O 群	第 1 相	第 2 相
A	a	无
B	g, f, s	无
B	i, b, d	2
C1	k, v, r, c	5, z15
C2	b, d, r	2, 5
D(不产气的)	d	无
D(产气的)	g, m, p, q	无
E1	h, v	6, w, x
E4	g, s, t	无
E4	i	

不常见的菌型,先用 8 种多价 H 血清检查,如有其中一种或两种血清凝集,则再用这一种或两种血清所包括的各种 H 因子血清逐一检查,以第 1 相和第 2 项的 H 抗原。8 种多价 H 血清所包括的 H 因子如下:

- H 多价 1 a, b, c, d, i
- H 多价 2 eh, enx, enz₁₅, fg, gms, gpu, gp, gq, mt, gz₅₁
- H 多价 3 k, r, y, z, z₁₀, lv, lw, lz₁₃, lz₂₈, lz₄₀
- H 多价 4 1, 2; 1, 5; 1, 6; 1, 7; z₆
- H 多价 5 z₄ z₂₃, z₄ z₂₄, z₄ z₃₂, z₂₉, z₃₅, z₃₆, z₃₈
- H 多价 6 z₃₉, z₄₁, z₄₂, z₄₄
- H 多价 7 z₅₂, z₅₃, z₅₄, z₅₅
- H 多价 8 z₅₆, z₅₇, z₆₀, z₆₁, z₆₂

每一个 H 抗原成分的最后确定均应根据 H 单因子血清的检查结果,没有 H 单因子血清的要两个 H 复合因子血清进行核对。

检出第 1 相 H 抗原而未检出第 2 相 H 抗原的或检出第 2 相 H 抗原而未检出第 1 相 H 抗原的,可

在琼脂斜面上移种 1 代~2 代后再检查。如仍只检出一个相的 H 抗原,要用位相变异的方法检查其另一个相。单相菌不必做位相变异检查。

位相变异试验方法如下:

简易平板法:将 0.35%~0.4% 半固体琼脂平板烘干表面水分,挑取因子血清 1 环,滴在半固体平板表面,放置片刻,待血清吸收到琼脂内,在血清部位的中央点种待检菌株,培养后,在形成蔓延生长的菌苔边缘取菌检查。

小玻管法:将半固体管(每管约 1 mL~2 mL)在酒精灯上溶化并冷至 50 °C,取已知相的 H 因子血清 0.05 mL~0.1 mL,加入于溶化的半固体内,混匀后,用毛细吸管吸取分装于供位相变异试验的小玻管内,待凝固后,用接种针挑取待检菌,接种于一端。将小玻管平放在平皿内,并在其旁放一团湿棉花,以防琼脂中水分蒸发而干缩,每天检查结果,待另一相细菌解离后,可以从另一端挑取细菌进行检查。培养基内血清的浓度应有适当的比例,过高时细菌不能生长,过低时同一相细菌的动力不能抑制。一般按原血清 1:200~1:800 的量加入。

小倒管法:将两端开口的小玻管(下端开口要留一个缺口,不要平齐)放在半固体管内,小玻管的上端应高出培养基的表面,灭菌后备用。临用时在酒精灯上加热溶化,冷至 50 °C,挑取因子血清 1 环,加入小套管中的半固体内,略加搅动,使其混匀,待凝固后,将待检菌株接种于小套管中的半固体表层内,每天检查结果,待另一相细菌解离后,可从套管外的半固体表面取菌检查,或转种 1% 软琼脂斜面,于 36 °C 培养后再做凝集试验。

5.6.3 Vi 抗原的鉴定

用 Vi 因子血清检查。已知具有 Vi 抗原的菌型有:伤寒沙门氏菌,丙型副伤寒沙门氏菌,都柏林沙门氏菌。

5.6.4 菌型的判定

根据血清学分型鉴定的结果,按照附录 B 或有关沙门氏菌属抗原表判定菌型。

6 结果与报告

综合以上生化试验和血清学鉴定的结果,报告 25 g(mL)样品中检出或未检出沙门氏菌。

附录 A 培养基和试剂

A.1 缓冲蛋白胨水(BPW)

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠(含 12 个结晶水)	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,搅混均匀,静置约 10 min,煮沸溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,高压灭菌 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min。

A.2 四硫磺酸钠煌绿(TTB)增菌液

A.2.1 基础液

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	3.0 g
碳酸钙	45.0 g
蒸馏水	1 000 mL

除碳酸钙外,将各成分加入蒸馏水中,煮沸溶解,再加入碳酸钙,调节 pH 至 7.0 ± 0.2 ,高压灭菌 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min。

A.2.2 硫代硫酸钠溶液

硫代硫酸钠(含 5 个结晶水)	50.0 g
蒸馏水	加至 100 mL
高压灭菌 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min。	

A.2.3 碘溶液

碘片	20.0 g
碘化钾	25.0 g
蒸馏水	加至 100 mL

将碘化钾充分溶解于少量的蒸馏水中,再投入碘片,振摇玻瓶至碘片全部溶解为止,然后加蒸馏水至规定的总量,贮存于棕色瓶内,塞紧瓶盖备用。

A.2.4 0.5%煌绿水溶液

煌绿	0.5 g
----	-------

蒸馏水	100 mL
-----	--------

溶解后,存放暗处,不少于 1 d,使其自然灭菌。

A.2.5 牛胆盐溶液

牛胆盐	10.0 g
-----	--------

蒸馏水	100 mL
-----	--------

加热煮沸至完全溶解,高压灭菌 121 °C,20 min。

A.2.6 制法

基础液	900 mL
-----	--------

硫代硫酸钠溶液	100 mL
---------	--------

碘溶液	20.0 mL
-----	---------

煌绿水溶液	2.0 mL
-------	--------

牛胆盐溶液	50.0 mL
-------	---------

临用前,按上列顺序,以无菌操作依次加入基础液中,每加入一种成分,均应摇匀后再加入另一种成分。

A.3 亚硒酸盐胱氨酸(SC)增菌液

A.3.1 成分

蛋白胨	5.0 g
-----	-------

乳糖	4.0 g
----	-------

磷酸氢二钠	10.0 g
-------	--------

亚硒酸氢钠	4.0 g
-------	-------

L-胱氨酸	0.01 g
-------	--------

蒸馏水	1 000 mL
-----	----------

A.3.2 制法

除亚硒酸氢钠和 L-胱氨酸外,将各成分加入蒸馏水中,煮沸溶解,冷至 55 °C 以下,以无菌操作加入亚硒酸氢钠和 1 g/L L-胱氨酸溶液 10 mL(称取 0.1 g L-胱氨酸,加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 15 mL,使溶解,再加无菌蒸馏水至 100 mL 即成,如为 DL-胱氨酸,用量应加倍)。摇匀,调节 pH 至 7.0±0.2。

A.4 亚硫酸铋(BS)琼脂

A.4.1 成分

蛋白胨	10.0 g
-----	--------

牛肉膏	5.0 g
-----	-------

葡萄糖	5.0 g
-----	-------

硫酸亚铁	0.3 g
------	-------

磷酸氢二钠	4.0 g
-------	-------

煌绿	0.025 g 或 5.0 g/L 水溶液 5.0 mL
----	------------------------------

柠檬酸铋铵	2.0 g
-------	-------

亚硫酸钠	6.0 g
琼脂	18.0 g~20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

将前三种成分加入 300 mL 蒸馏水(制作基础液),硫酸亚铁和磷酸氢二钠分别加入 20 mL 和 30 mL 蒸馏水中,柠檬酸铋铵和亚硫酸钠分别加入另一 20 mL 和 30 mL 蒸馏水中,琼脂加入 600 mL 蒸馏水中。然后分别搅拌均匀,煮沸溶解。冷至 80 °C 左右时,先将硫酸亚铁和磷酸氢二钠混匀,倒入基础液中,混匀。将柠檬酸铋铵和亚硫酸钠混匀,倒入基础液中,再混匀。调节 pH 至 7.5 ± 0.2 ,随即倾入琼脂液中,混合均匀,冷至 50 °C~55 °C。加入煌绿溶液,充分混匀后立即倾注平皿。

注:本培养基不需要高压灭菌,在制备过程中不宜过分加热,避免降低其选择性,贮于室温暗处,超过 48 h 会降低其选择性,本培养基宜于当天制备,第二天使用。

A.5 HE 琼脂(Hektoen Enteric Agar)

A.5.1 成分

蛋白胨	12.0 g
牛肉膏	3.0 g
乳糖	12.0 g
蔗糖	12.0 g
水杨素	2.0 g
胆盐	20.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	18.0 g~20.0 g
蒸馏水	1 000 mL
0.4% 溴麝香草酚蓝溶液	16.0 mL
Andrade 指示剂	20.0 mL
甲液	20.0 mL
乙液	20.0 mL

A.5.2 制法

将前面七种成分溶解于 400 mL 蒸馏水内作为基础液;将琼脂加入于 600 mL 蒸馏水内。然后分别搅拌均匀,煮沸溶解。加入甲液和乙液于基础液内,调节 pH 至 7.5 ± 0.2 。再加入指示剂,并与琼脂液合并,待冷至 50 °C~55 °C 倾注平皿。

注:①本培养基不需要高压灭菌,在制备过程中不宜过分加热,避免降低其选择性。

②甲液的配制

硫代硫酸钠	34.0 g
柠檬酸铁铵	4.0 g
蒸馏水	100 mL

③乙液的配制

去氧胆酸钠	10.0 g
蒸馏水	100 mL

④Andrade 指示剂

酸性复红	0.5 g
------	-------

1 mol/L 氢氧化钠溶液	16.0 mL
蒸馏水	100 mL

将复红溶解于蒸馏水中,加入氢氧化钠溶液。数小时后如复红褪色不全,再加氢氧化钠溶液 1 mL~2 mL。

A.6 木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂

A.6.1 成分

酵母膏	3.0 g
L-赖氨酸	5.0 g
木糖	3.75 g
乳糖	7.5 g
蔗糖	7.5 g
去氧胆酸钠	2.5 g
柠檬酸铁铵	0.8 g
硫代硫酸钠	6.8 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
酚红	0.08 g
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制法

除酚红和琼脂外,将其他成分加入 400 mL 蒸馏水中,煮沸溶解,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 。另将琼脂加入 600 mL 蒸馏水中,煮沸溶解。

将上述两溶液混合均匀后,再加入指示剂,待冷至 $50\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倾注平皿。

注:本培养基不需要高压灭菌,在制备过程中不宜过分加热,避免降低其选择性,贮于室温暗处。本培养基宜于当天制备,第二天使用。

A.7 三糖铁(TSI)琼脂

A.7.1 成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉膏	5.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
硫酸亚铁铵(含 6 个结晶水)	0.2 g
酚红	0.025 g 或 5.0 g/L 溶液 5.0 mL
氯化钠	5.0 g
硫代硫酸钠	0.2 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

除酚红和琼脂外,将其他成分加入 400 mL 蒸馏水中,煮沸溶解,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 。另将琼脂加入 600 mL 蒸馏水中,煮沸溶解。

将上述两溶液混合均匀后,再加入指示剂,混匀,分装试管,每管约 2 mL~4 mL,高压灭菌 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min 或 $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min,灭菌后制成高层斜面,呈桔红色。

A.8 蛋白胨水、靛基质试剂

A.8.1 蛋白胨水

蛋白胨(或胰蛋白胨)	20.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

将上述成分加入蒸馏水中,煮沸溶解,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 ,分装小试管, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.8.2 靛基质试剂

A.8.2.1 柯凡克试剂:将 5 g 对二甲氨基苯甲醛溶解于 75 mL 戊醇中,然后缓慢加入浓盐酸 25 mL。

A.8.2.2 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.8.3 试验方法

挑取小量培养物接种,在 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.9 尿素琼脂(pH 7.2)

A.9.1 成分

蛋白胨	1.0 g
氯化钠	5.0 g
葡萄糖	1.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
0.4%酚红	3.0 mL
琼脂	20.0 g
蒸馏水	1 000 mL
20%尿素溶液	100 mL

A.9.2 制法

除尿素、琼脂和酚红外,将其他成分加入 400 mL 蒸馏水中,煮沸溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 。另将琼脂加入 600 mL 蒸馏水中,煮沸溶解。

将上述两溶液混合均匀后,再加入指示剂后分装, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。冷至 $50\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$,加

入经除菌过滤的尿素溶液。尿素的最终浓度为 2%。分装于无菌试管内,放成斜面备用。

A.9.3 试验方法

挑取琼脂培养物接种,在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.10 氰化钾(KCN)培养基

A.10.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸二氢钾	0.225 g
磷酸氢二钠	5.64 g
蒸馏水	1 000 mL
0.5%氰化钾	20.0 mL

A.10.2 制法

将除氰化钾以外的成分加入蒸馏水中,煮沸溶解,分装后 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。放在冰箱内使其充分冷却。每 100 mL 培养基加入 0.5%氰化钾溶液 2.0 mL(最后浓度为 1:10 000),分装于无菌试管内,每管约 4 mL,立刻用无菌橡皮塞塞紧,放在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内,至少可保存两个月。同时,将不加氰化钾的培养基作为对照培养基,分装试管备用。

A.10.3 试验方法

将琼脂培养物接种于蛋白胨水内成为稀释菌液,挑取 1 环接种于氰化钾(KCN)培养基。并另挑取 1 环接种于对照培养基。在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 1 d~2 d,观察结果。如有细菌生长即为阳性(不抑制),经 2 d 细菌不生长为阴性(抑制)。

注:氰化钾是剧毒药,使用时应小心,切勿沾染,以免中毒。夏天分装培养基应在冰箱内进行。试验失败的主要原因是封口不严,氰化钾逐渐分解,产生氢氰酸气体逸出,以致药物浓度降低,细菌生长,因而造成假阳性反应。试验时对每一环节都要特别注意。

A.11 赖氨酸脱羧酶试验培养基

A.11.1 成分

蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL
1.6%溴甲酚紫-乙醇溶液	1.0 mL
L-赖氨酸或 DL-赖氨酸	0.5 g/100 mL 或 1.0 g/100 mL

A.11.2 制法

除赖氨酸以外的成分加热溶解后,分装每瓶 100 mL,分别加入赖氨酸。L-赖氨酸按 0.5%加入,

DL-赖氨酸按 1% 加入。调节 pH 至 6.8 ± 0.2 。对照培养基不加赖氨酸。分装于无菌的小试管内,每管 0.5 mL,上面滴加一层液体石蜡,115 °C 高压灭菌 10 min。

A.11.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取培养物接种,于 $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ 培养 18 h~24 h,观察结果。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。

A.12 糖发酵管

A.12.1 成分

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	3.0 g
磷酸氢二钠(含 12 个结晶水)	2.0 g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.12.2 制法

A.12.2.1 葡萄糖发酵管按上述成分配好后,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 。按 0.5% 加入葡萄糖,分装于有一个倒置小管的小试管内,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.12.2.2 其他各种糖发酵管可按上述成分配好后,分装每瓶 100 mL,121 °C 高压灭菌 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。

注:蔗糖不纯,加热后会自行水解者,应采用过滤法除菌。

A.12.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取小量培养物接种,于 $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ 培养,一般 2 d~3 d。迟缓反应需观察 14 d~30 d。

A.13 邻硝基酚 β -D 半乳糖苷(ONPG)培养基

A.13.1 成分

邻硝基酚 β -D 半乳糖苷(ONPG) (O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)	60.0 mg
0.01 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.5)	10.0 mL
1% 蛋白胨水(pH 7.5)	30.0 mL

A.13.2 制法

将 ONPG 溶于缓冲液内,加入蛋白胨水,以过滤法除菌,分装于无菌的小试管内,每管 0.5 mL,用橡皮塞塞紧。

A.13.3 试验方法

自琼脂斜面上挑取培养物 1 满环接种于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h~3 h 和 24 h 观察结果。如果 β -半乳糖苷酶产生,则于 1 h~3 h 变黄色,如无此酶则 24 h 不变色。

A.14 半固体琼脂

A.14.1 成分

牛肉膏	0.3 g
蛋白胨	1.0 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	0.35 g~0.4 g
蒸馏水	100 mL

A.14.2 制法

按以上成分配好,煮沸溶解,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 。分装小试管。121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。直立凝固备用。

注:供动力观察、菌种保存、H 抗原位相变异试验等用。

A.15 丙二酸钠培养基

A.15.1 成分

酵母浸膏	1.0 g
硫酸铵	2.0 g
磷酸氢二钾	0.6 g
磷酸二氢钾	0.4 g
氯化钠	2.0 g
丙二酸钠	3.0 g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.15.2 制法

除指示剂以外的成分溶解于水,调节 pH 至 6.8 ± 0.2 ,再加入指示剂,分装试管,121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.15.3 试验方法

用新鲜的琼脂培养物接种,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,观察结果。阳性者由绿色变为蓝色。

附录 B
常见沙门氏菌抗原

常见沙门氏菌抗原见表 B.1。

表 B.1 常见沙门氏菌抗原表

菌名	拉丁菌名	O 抗原	H 抗原	
			第 1 相	第 2 相
A 群				
甲型副伤寒沙门氏菌	<i>S. Paratyphi A</i>	<u>1</u> , 2, 12	a	[1, 5]
B 群				
基桑加尼沙门氏菌	<i>S. Kisangani</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	a	1, 2
阿雷查瓦莱塔沙门氏菌	<i>S. Arechavaleta</i>	4, [5], 12	a	1, 7
马流产沙门氏菌	<i>S. Abortusequi</i>	4, 12	—	e, n, x
乙型副伤寒沙门氏菌	<i>S. Paratyphi B</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	b	1, 2
利密特沙门氏菌	<i>S. Limete</i>	<u>1</u> , 4, 12, [27]	b	1, 5
阿邦尼沙门氏菌	<i>S. Abony</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12, 27	b	e, n, x
维也纳沙门氏菌	<i>S. Wien</i>	<u>1</u> , 4, 12, [27]	b	1, w
伯里沙门氏菌	<i>S. Bury</i>	4, 12, [27]	c	z ₆
斯坦利沙门氏菌	<i>S. Stanley</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12, [27]	d	1, 2
圣保罗沙门氏菌	<i>S. Saintpaul</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	e, h	1, 2
里定沙门氏菌	<i>S. Reading</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	e, h	1, 5
彻斯特沙门氏菌	<i>S. Chester</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	e, h	e, n, x
德尔卑沙门氏菌	<i>S. Derby</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	f, g	[1, 2]
阿贡纳沙门氏菌	<i>S. Agona</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	f, g, s	[1, 2]
埃森沙门氏菌	<i>S. Essen</i>	4, 12	g, m	—
加利福尼亚沙门氏菌	<i>S. California</i>	4, 12	g, m, t	[z ₆₇]
金斯敦沙门氏菌	<i>S. Kingston</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12, [27]	g, s, t	[1, 2]
布达佩斯沙门氏菌	<i>S. Budapest</i>	<u>1</u> , 4, 12, [27]	g, t	—
鼠伤寒沙门氏菌	<i>S. Typhimurium</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	i	1, 2
拉古什沙门氏菌	<i>S. Lagos</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	i	1, 5
布雷登尼沙门氏菌	<i>S. Bredeney</i>	<u>1</u> , 4, 12, [27]	l, v	1, 7
基尔瓦沙门氏菌 II	<i>S. Kilwa II</i>	4, 12	l, w	e, n, x
海德尔堡沙门氏菌	<i>S. Heidelberg</i>	<u>1</u> , 4, [15], 12	r	1, 2
印地安纳沙门氏菌	<i>S. Indiana</i>	<u>1</u> , 4, 12	z	1, 7

表 B.1 (续)

菌名	拉丁菌名	O 抗原	H 抗原	
			第 1 相	第 2 相
斯坦利维尔沙门氏菌	S.Stanleyville	<u>1</u> ,4,[5],12,[27]	z ₄ ,z ₂₃	[1,2]
伊图里沙门氏菌	S.Ituri	<u>1</u> ,4,12	z ₁₀	1,5
C1 群				
奥斯陆沙门氏菌	S.Oslo	6,7, <u>14</u>	a	e,n,x
爱丁堡沙门氏菌	S.Edinburg	6,7, <u>14</u>	b	1,5
布隆方丹沙门氏菌 II	S.Bloemfontein II	6,7	b	[e,n,x];z ₁₂
丙型副伤寒沙门氏菌	S.Paratyphi C	6,7,[Vi]	c	1,5
猪霍乱沙门氏菌	S.Choleraesuis	6,7	c	1,5
猪伤寒沙门氏菌	S.Typhisuis	6,7	c	1,5
罗米他沙门氏菌	S.Lomita	6,7	e,h	1,5
布伦登卢普沙门氏菌	S.Braenderup	6,7, <u>14</u>	e,h	e,n,z ₁₅
里森沙门氏菌	S.Rissen	6,7, <u>14</u>	f,g	—
蒙得维的亚沙门氏菌	S.Montevideo	6,7, <u>14</u>	g,m,[p],s	[1,2,7]
里吉尔沙门氏菌	S.Riggil	6,7	g,[t]	—
奥雷宁堡沙门氏菌	S.Oranieburg	6,7, <u>14</u>	m,t	[2,5,7]
奥里塔曼林沙门氏菌	S.Oritamerin	6,7	i	1,5
汤卜逊沙门氏菌	S.Thompson	6,7, <u>14</u>	k	1,5
康科德沙门氏菌	S.Concord	6,7	l,v	1,2
伊鲁木沙门氏菌	S.Irumu	6,7	l,v	1,5
姆卡巴沙门氏菌	S.Mkamba	6,7	l,v	1,6
波恩沙门氏菌	S.Bonn	6,7	l,v	e,n,x
波茨坦沙门氏菌	S.Potsdam	6,7, <u>14</u>	l,v	e,n,z ₁₅
格但斯克沙门氏菌	S.Gdansk	6,7, <u>14</u>	l,v	z ₆
维尔肖沙门氏菌	S.Virchow	6,7, <u>14</u>	r	1,2
婴儿沙门氏菌	S.Infantis	6,7, <u>14</u>	r	1,5
巴布亚沙门氏菌	S.Papuana	6,7	r	e,n,z ₁₅
巴累利沙门氏菌	S.Bareilly	6,7, <u>14</u>	y	1,5
哈特福德沙门氏菌	S.Hartford	6,7	y	e,n,x
三河岛沙门氏菌	S.Mikawasima	6,7, <u>14</u>	y	e,n,z ₁₅
姆班达卡沙门氏菌	S.Mbandaka	6,7, <u>14</u>	z ₁₀	e,n,z ₁₅
田纳西沙门氏菌	S.Tennessee	6,7, <u>14</u>	z ₂₉	[1,2,7]
布伦登卢普沙门氏菌	S.Braenderup	6,7, <u>14</u>	e,h	e,n,z ₁₅
耶路撒冷沙门氏菌	S.Jerusalem	6,7, <u>14</u>	z ₁₀	l,w

表 B.1 (续)

菌名	拉丁菌名	O 抗原	H 抗原	
			第 1 相	第 2 相
C2 群				
习志野沙门氏菌	<i>S. Narashino</i>	6,8	a	e, n, x
名古屋沙门氏菌	<i>S. Nagoya</i>	6,8	b	1,5
加瓦尼沙门氏菌	<i>S. Gatuni</i>	6,8	b	e, n, x
慕尼黑沙门氏菌	<i>S. Muenchen</i>	6,8	d	1,2
曼哈顿沙门氏菌	<i>S. Manhattan</i>	6,8	d	1,5
纽波特沙门氏菌	<i>S. Newport</i>	6,8,20	e, h	1,2
科特布斯沙门氏菌	<i>S. Kottbus</i>	6,8	e, h	1,5
茨昂威沙门氏菌	<i>S. Tshiongwe</i>	6,8	e, h	e, n, z ₁₅
林登堡沙门氏菌	<i>S. Lindenburg</i>	6,8	i	1,2
塔科拉迪沙门氏菌	<i>S. Takoradi</i>	6,8	i	1,5
波那雷恩沙门氏菌	<i>S. Bonariensis</i>	6,8	i	e, n, x
利齐菲尔德沙门氏菌	<i>S. Litchfield</i>	6,8	l, v	1,2
病牛沙门氏菌	<i>S. Bovismorbificans</i>	6,8,20	r, [i]	1,5
查理沙门氏菌	<i>S. Chailey</i>	6,8	z ₁ , z ₂₃	e, n, z ₁₅
C3 群				
巴尔多沙门氏菌	<i>S. Bardo</i>	8	e, h	1,2
依麦克沙门氏菌	<i>S. Emek</i>	8,20	g, m, s	—
肯塔基沙门氏菌	<i>S. Kentucky</i>	8,20	i	z ₆
D 群				
仙台沙门氏菌	<i>S. Sendai</i>	1,9,12	a	1,5
伤寒沙门氏菌	<i>S. Typhi</i>	9,12,[Vi]	d	—
塔西沙门氏菌	<i>S. Tarshyne</i>	9,12	d	1,6
伊斯特本沙门氏菌	<i>S. Eastbourne</i>	1,9,12	e, h	1,5
以色列沙门氏菌	<i>S. Israel</i>	9,12	e, h	e, n, z ₁₅
肠炎沙门氏菌	<i>S. Enteritidis</i>	1,9,12	g, m	[1,7]
布利丹沙门氏菌	<i>S. Blegdam</i>	9,12	g, m, q	—
沙门氏菌 II	<i>Salmonella II</i>	1,9,12	g, m, [s], t	[1,5,7]
都柏林沙门氏菌	<i>S. Dublin</i>	1,9,12,[Vi]	g, p	—
芙蓉沙门氏菌	<i>S. Seremban</i>	9,12	i	1,5
巴拿马沙门氏菌	<i>S. Panama</i>	1,9,12	l, v	1,5
戈丁根沙门氏菌	<i>S. Goettingen</i>	9,12	l, v	e, n, z ₁₅
爪哇安纳沙门氏菌	<i>S. Javiana</i>	1,9,12	L, z ₂₈	1,5

表 B.1 (续)

菌名	拉丁菌名	O 抗原	H 抗原	
			第 1 相	第 2 相
鸡-雏沙门氏菌	<i>S. Gallinarum-Pullorum</i>	<u>1</u> , 9, 12	—	—
E1 群				
奥凯福科沙门氏菌	<i>S. Okefoko</i>	3, 10	c	z ₆
瓦伊勒沙门氏菌	<i>S. Vejele</i>	3, {10}, {15}	e, h	1, 2
明斯特沙门氏菌	<i>S. Muenster</i>	3, {10}{15}{15, 34}	e, h	1, 5
鸭沙门氏菌	<i>S. Anatum</i>	3, {10}{15}{15, 34}	e, h	1, 6
纽兰沙门氏菌	<i>S. Newlands</i>	3, {10}, {15, 34}	e, h	e, n, x
火鸡沙门氏菌	<i>S. Meleagridis</i>	3, {10}{15}{15, 34}	e, h	1, w
雷根特沙门氏菌	<i>S. Regent</i>	3, 10	f, g, [s]	[1, 6]
西翰普顿沙门氏菌	<i>S. Westhampton</i>	3, {10}{15}{15, 34}	g, s, t	—
阿姆德尔尼斯沙门氏菌	<i>S. Amounderness</i>	3, 10	i	1, 5
新罗歇尔沙门氏菌	<i>S. New-Rochelle</i>	3, 10	k	1, w
恩昌加沙门氏菌	<i>S. Nchanga</i>	3, {10}{15}	l, v	1, 2
新斯托夫沙门氏菌	<i>S. Sinstorf</i>	3, 10	l, v	1, 5
伦敦沙门氏菌	<i>S. London</i>	3, {10}{15}	l, v	1, 6
吉韦沙门氏菌	<i>S. Give</i>	3, {10}{15}{15, 34}	l, v	1, 7
鲁齐齐沙门氏菌	<i>S. Ruzizi</i>	3, 10	l, v	e, n, z ₁₅
乌干达沙门氏菌	<i>S. Uganda</i>	3, {10}{15}	l, z ₁₃	1, 5
乌盖利沙门氏菌	<i>S. Ughelli</i>	3, 10	r	1, 5
韦太夫雷登沙门氏菌	<i>S. Weltevreden</i>	3, {10}{15}	r	z ₆
克勒肯威尔沙门氏菌	<i>S. Clerkenwell</i>	3, 10	z	1, w
列克星敦沙门氏菌	<i>S. Lexington</i>	3, {10}{15}{15, 34}	z ₁₀	1, 5
E4 群				
萨奥沙门氏菌	<i>S. Sao</i>	1, 3, 19	e, h	e, n, z ₁₅
卡拉巴尔沙门氏菌	<i>S. Calabar</i>	1, 3, 19	e, h	1, w
山夫登堡沙门氏菌	<i>S. Senftenberg</i>	1, 3, 19	g, [s], t	—
斯特拉特福沙门氏菌	<i>S. Stratford</i>	1, 3, 19	i	1, 2
塔克松尼沙门氏菌	<i>S. Taksony</i>	1, 3, 19	i	z ₆
索恩保沙门氏菌	<i>S. Schoeneberg</i>	1, 3, 19	z	e, n, z ₁₅
F 群				
昌丹斯沙门氏菌	<i>S. Chandans</i>	11	d	[e, n, x]
阿柏丁沙门氏菌	<i>S. Aberdeen</i>	11	i	1, 2
布里赫姆沙门氏菌	<i>S. Brijbhumi</i>	11	i	1, 5

表 B.1 (续)

菌名	拉丁菌名	O 抗原	H 抗原	
			第 1 相	第 2 相
威尼斯沙门氏菌	<i>S. Veneziana</i>	11	i	e, n, x
阿巴特图巴沙门氏菌	<i>S. Abaetetuba</i>	11	k	1, 5
鲁比斯劳沙门氏菌	<i>S. Rubislaw</i>	11	r	e, n, x
其他群				
浦那沙门氏菌	<i>S. Poona</i>	<u>1</u> , 13, 22	z	1, 6
里特沙门氏菌	<i>S. Ried</i>	<u>1</u> , 13, 22	z ₁ , z ₂₃	[e, n, z ₁₅]
密西西比沙门氏菌	<i>S. Mississippi</i>	<u>1</u> , 13, 23	b	1, 5
古巴沙门氏菌	<i>S. Cubana</i>	<u>1</u> , 13, 23	z ₂₉	—
苏拉特沙门氏菌	<i>S. Surat</i>	[1], 6, 14, [25]	r, [i]	e, n, z ₁₅
松兹瓦尔沙门氏菌	<i>S. Sundsvall</i>	[1], 6, 14, [25]	z	e, n, x
非丁伏斯沙门氏菌	<i>S. Hvittingfoss</i>	16	b	e, n, x
威斯敦沙门氏菌	<i>S. Weston</i>	16	e, h	z ₆
上海沙门氏菌	<i>S. Shanghai</i>	16	l, v	1, 6
自贡沙门氏菌	<i>S. Zigong</i>	16	l, w	1, 5
巴圭达沙门氏菌	<i>S. Baguida</i>	21	z ₁ , z ₂₃	—
迪尤波尔沙门氏菌	<i>S. Dieuoppeul</i>	28	i	1, 7
卢肯瓦尔德沙门氏菌	<i>S. Luckenwalde</i>	28	z ₁₀	e, n, z ₁₅
拉马特根沙门氏菌	<i>S. Ramatgan</i>	30	k	1, 5
阿德莱沙门氏菌	<i>S. Adelaide</i>	35	f, g	—
旺兹沃思沙门氏菌	<i>S. Wandsworth</i>	39	b	1, 2
雷俄格伦德沙门氏菌	<i>S. Riogrande</i>	40	b	1, 5
莱瑟沙门氏菌	<i>S. Lethe II</i>	41	g, t	—
达莱姆沙门氏菌	<i>S. Dahlem</i>	48	k	e, n, z ₁₅
沙门氏菌 III b	<i>Salmonella III b</i>	61	l, v	1, 5, 7

注：关于表内符号的说明：

{ } = { } 内 O 因子具有排他性。在血清型中 { } 内的因子不能与其他 { } 内的因子同时存在，例如在 O : 3, 10 群中当菌株产生 O : 15 或 O : 15, 34 因子时它替代了 O : 10 因子。

[] = O (无下划线) 或 H 因子的存在或不存在与噬菌体转化无关，例如 O : 4 群中的 [5] 因子。H 因子在 [] 内时表示在野生菌株中罕见，例如极大多数 *S. Paratyphi A* 具有一个位相 (a)，罕有第 2 相 (1, 5) 菌株。因此，用 1, 2, 12 : a : [1, 5] 表示。

 = 下划线时表示该 O 因子是由噬菌体溶原化产生的。



中华人民共和国国家标准

GB 4789.10—2016

食品安全国家标准

食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会
国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB 4789.10—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》、SN/T 0172—2010《进出口食品中金黄色葡萄球菌检验方法》、SN/T 2154—2008《进出口食品中凝固酶阳性葡萄球菌检测方法 兔血浆纤维蛋白原琼脂培养基技术》。

本标准与 GB 4789.10—2010 相比,主要变化如下:

——试验用增菌液统一为 7.5%氯化钠肉汤。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

1 范围

本标准规定了食品中金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的检验方法。

本标准第一法适用于食品中金黄色葡萄球菌的定性检验;第二法适用于金黄色葡萄球菌含量较高的食品中金黄色葡萄球菌的计数;第三法适用于金黄色葡萄球菌含量较低的食品中金黄色葡萄球菌的计数。

2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

- 2.1 恒温培养箱:36℃±1℃。
- 2.2 冰箱:2℃~5℃。
- 2.3 恒温水浴箱:36℃~56℃。
- 2.4 天平:感量0.1g。
- 2.5 均质器。
- 2.6 振荡器。
- 2.7 无菌吸管:1mL(具0.01mL刻度)、10mL(具0.1mL刻度)或微量移液器及吸头。
- 2.8 无菌锥形瓶:容量100mL、500mL。
- 2.9 无菌培养皿:直径90mm。
- 2.10 涂布棒。
- 2.11 pH计或pH比色管或精密pH试纸。

3 培养基和试剂

- 3.1 7.5%氯化钠肉汤:见A.1。
- 3.2 血琼脂平板:见A.2。
- 3.3 Baird-Parker 琼脂平板:见A.3。
- 3.4 脑心浸出液肉汤(BHI):见A.4。
- 3.5 兔血浆:见A.5。
- 3.6 稀释液:磷酸盐缓冲液:见A.6。
- 3.7 营养琼脂小斜面:见A.7。
- 3.8 革兰氏染色液:见A.8。
- 3.9 无菌生理盐水:见A.9。

第一法 金黄色葡萄球菌定性检验

4 检验程序

金黄色葡萄球菌定性检验程序见图1。

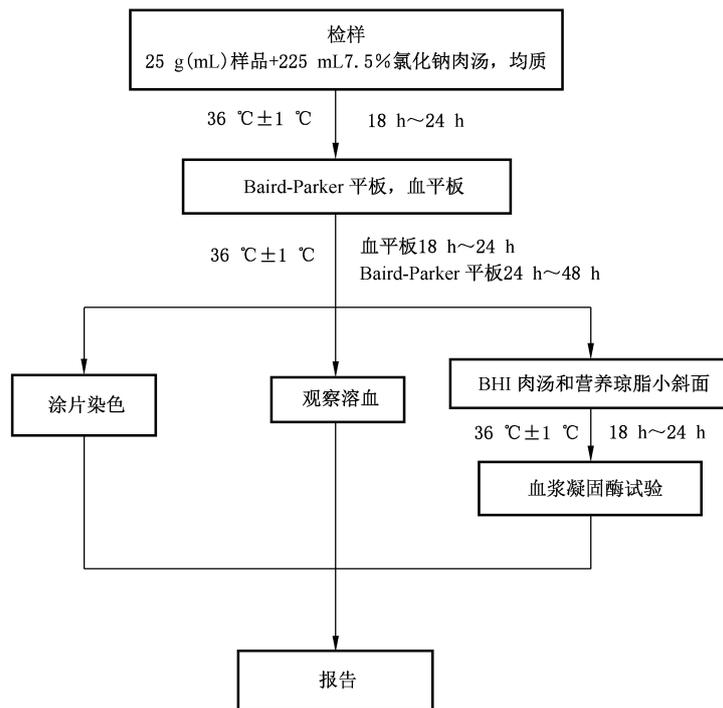


图 1 金黄色葡萄球菌检验程序

5 操作步骤

5.1 样品的处理

称取 25 g 样品至盛有 225 mL 7.5% 氯化钠肉汤的无菌均质杯内, 8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min, 或放入盛有 225 mL 7.5% 氯化钠肉汤无菌均质袋中, 用拍击式均质器拍打 1 min~2 min。若样品为液态, 吸取 25 mL 样品至盛有 225 mL 7.5% 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。

5.2 增菌

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

5.3 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 °C ± 1 °C 培养 18 h~24 h。Baird-Parker 平板 36 °C ± 1 °C 培养 24 h~48 h。

5.4 初步鉴定

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~3 mm, 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。

5.5 确证鉴定

5.5.1 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 $0.5\ \mu\text{m}\sim 1\ \mu\text{m}$ 。

5.5.2 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 5 mL BHI 和营养琼脂小斜面, $36\ \text{℃}\pm 1\ \text{℃}$ 培养 18 h~24 h。

取新鲜配制兔血浆 0.5 mL,放入小试管中,再加入 BHI 培养物 0.2 mL~0.3 mL,振荡摇匀,置 $36\ \text{℃}\pm 1\ \text{℃}$ 温箱或水浴箱内,每半小时观察一次,观察 6 h,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 5 mL BHI, $36\ \text{℃}\pm 1\ \text{℃}$ 培养 18 h~48 h,重复试验。

5.6 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。

6 结果与报告

6.1 结果判定:符合 5.4、5.5,可判定为金黄色葡萄球菌。

6.2 结果报告:在 25 g(mL)样品中检出或未检出金黄色葡萄球菌。

第二法 金黄色葡萄球菌平板计数法

7 检验程序

金黄色葡萄球菌平板计数法检验程序见图 2。

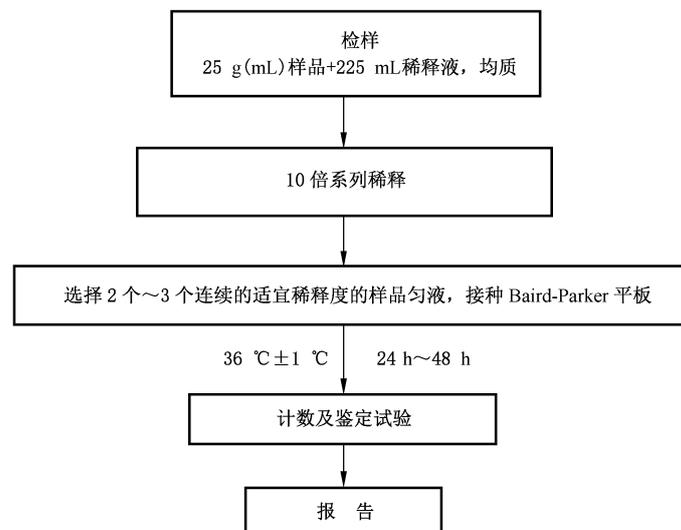


图 2 金黄色葡萄球菌平板计数法检验程序

8 操作步骤

8.1 样品的稀释

8.1.1 固体和半固体样品:称取 25 g 样品置于盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内,8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min,或置于盛有 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。

8.1.2 液体样品:以无菌吸管吸取 25 mL 样品置于盛有 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。

8.1.3 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 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌试管中(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 1 mL 无菌吸管反复吹打使其混合均匀,制成 1:100 的样品匀液。

8.1.4 按 8.1.3 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。

8.2 样品的接种

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 倍递增稀释的同时,每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液以 0.3 mL、0.3 mL、0.4 mL 接种量分别加入三块 Baird-Parker 平板,然后用无菌涂布棒涂布整个平板,注意不要触及平板边缘。使用前,如 Baird-Parker 平板表面有水珠,可放在 25 °C~50 °C 的培养箱里干燥,直到平板表面的水珠消失。

8.3 培养

在通常情况下,涂布后,将平板静置 10 min,如样液不易吸收,可将平板放在培养箱 36 °C±1 °C 培养 1 h;等样品匀液吸收后翻转平板,倒置后于 36 °C±1 °C 培养 24 h~48 h。

8.4 典型菌落计数和确认

8.4.1 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~3 mm,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。

8.4.2 选择有典型的金黄色葡萄球菌菌落的平板,且同一稀释度 3 个平板所有菌落数合计在 20 CFU~200 CFU 之间的平板,计数典型菌落数。

8.4.3 从典型菌落中至少选 5 个可疑菌落(小于 5 个全选)进行鉴定试验。分别做染色镜检,血浆凝固酶试验(见 5.5);同时划线接种到血平板 36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h 后观察菌落形态,金黄色葡萄球菌菌落较大,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。

9 结果计算

9.1 若只有一个稀释度平板的典型菌落数在 20 CFU~200 CFU 之间,计数该稀释度平板上的典型菌

落,按式(1)计算。

9.2 若最低稀释度平板的典型菌落数小于 20 CFU,计数该稀释度平板上的典型菌落,按式(1)计算。

9.3 若某一稀释度平板的典型菌落数大于 200 CFU,但下一稀释度平板上没有典型菌落,计数该稀释度平板上的典型菌落,按式(1)计算。

9.4 若某一稀释度平板的典型菌落数大于 200 CFU,而下一稀释度平板上虽有典型菌落但不在 20 CFU~200 CFU 范围内,应计数该稀释度平板上的典型菌落,按式(1)计算。

9.5 若 2 个连续稀释度的平板典型菌落数均在 20 CFU~200 CFU 之间,按式(2)计算。

9.6 计算公式

式(1):

$$T = \frac{AB}{Cd} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- T ——样品中金黄色葡萄球菌菌落数;
- A ——某一稀释度典型菌落的总数;
- B ——某一稀释度鉴定为阳性的菌落数;
- C ——某一稀释度用于鉴定试验的菌落数;
- d ——稀释因子。

式(2):

$$T = \frac{A_1B_1/C_1 + A_2B_2/C_2}{1.1d} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- T ——样品中金黄色葡萄球菌菌落数;
- A_1 ——第一稀释度(低稀释倍数)典型菌落的总数;
- B_1 ——第一稀释度(低稀释倍数)鉴定为阳性的菌落数;
- C_1 ——第一稀释度(低稀释倍数)用于鉴定试验的菌落数;
- A_2 ——第二稀释度(高稀释倍数)典型菌落的总数;
- B_2 ——第二稀释度(高稀释倍数)鉴定为阳性的菌落数;
- C_2 ——第二稀释度(高稀释倍数)用于鉴定试验的菌落数;
- 1.1 ——计算系数;
- d ——稀释因子(第一稀释度)。

10 报告

根据 9 中公式计算结果,报告每 g(mL)样品中金黄色葡萄球菌数,以 CFU/g(mL)表示;如 T 值为 0,则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。

第三法 金黄色葡萄球菌 MPN 计数

11 检验程序

金黄色葡萄球菌 MPN 计数检验程序见图 3。

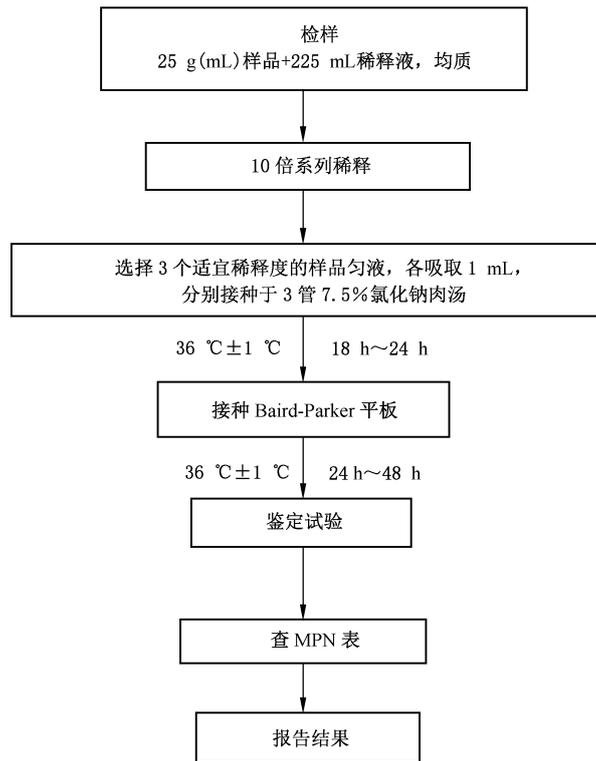


图 3 金黄色葡萄球菌 MPN 法检验程序

12 操作步骤

12.1 样品的稀释

按 8.1 进行。

12.2 接种和培养

12.2.1 根据对样品污染状况的估计,选择 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 倍递增稀释的同时,每个稀释度分别接种 1 mL 样品匀液至 7.5%氯化钠肉汤管(如接种量超过 1 mL,则用双料 7.5%氯化钠肉汤),每个稀释度接种 3 管,将上述接种物 36 °C ± 1 °C 培养,18 h ~ 24 h。

12.2.2 用接种环从培养后的 7.5%氯化钠肉汤管中分别取培养物 1 环,移种于 Baird-Parker 平板 36 °C ± 1 °C 培养,24 h ~ 48 h。

12.3 典型菌落确认

按 8.4.1、8.4.3 进行。

13 结果与报告

根据证实为金黄色葡萄球菌阳性的试管管数,查 MPN 检索表(见附录 C),报告每 g(mL)样品中金黄色葡萄球菌的最可能数,以 MPN/g(mL)表示。

附 录 A

培养基和试剂

A.1 7.5%氯化钠肉汤

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	75 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将上述成分加热溶解,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 ,分装,每瓶 225 mL,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 血琼脂平板

A.2.1 成分

豆粉琼脂(pH 7.5 ± 0.2)	100 mL
脱纤维羊血(或兔血)	5 mL~10 mL

A.2.2 制法

加热溶化琼脂,冷却至 50 °C,以无菌操作加入脱纤维羊血,摇匀,倾注平板。

A.3 Baird-Parker 琼脂平板

A.3.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
酵母膏	1.0 g
丙酮酸钠	10.0 g
甘氨酸	12.0 g
氯化锂(LiCl · 6H ₂ O)	5.0 g
琼脂	20.0 g
蒸馏水	950 mL

A.3.2 增菌剂的配法

30%卵黄盐水 50 mL 与通过 0.22 μm 孔径滤膜进行过滤除菌的 1%亚硝酸钾溶液 10 mL 混合,保存于冰箱内。

A.3.3 制法

将各成分加到蒸馏水中,加热煮沸至完全溶解,调节 pH 至 7.0 ± 0.2 。分装每瓶 95 mL, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。临用时加热溶化琼脂,冷至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$,每 95 mL 加入预热至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的卵黄亚碲酸钾增菌剂 5 mL 摇匀后倾注平板。培养基应是致密不透明的。使用前在冰箱储存不得超过 48 h。

A.4 脑心浸出液肉汤(BHI)

A.4.1 成分

胰蛋白质胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠($12\text{H}_2\text{O}$)	2.5 g
葡萄糖	2.0 g
牛心浸出液	500 mL

A.4.2 制法

加热溶解,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 ,分装 $16\text{ mm} \times 160\text{ mm}$ 试管,每管 5 mL 置 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min 灭菌。

A.5 兔血浆

取柠檬酸钠 3.8 g,加蒸馏水 100 mL,溶解后过滤,装瓶, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。兔血浆制备:取 3.8% 柠檬酸钠溶液一份,加兔全血 4 份,混好静置(或以 $3\ 000\text{ r/min}$ 离心 30 min),使血液细胞下降,即可得血浆。

A.6 磷酸盐缓冲液

A.6.1 成分

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	34.0 g
蒸馏水	500 mL

A.6.2 制法

贮存液:称取 34.0 g 的磷酸二氢钾溶于 500 mL 蒸馏水中,用大约 175 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2,用蒸馏水稀释至 1 000 mL 后贮存于冰箱。

稀释液:取贮存液 1.25 mL,用蒸馏水稀释至 1 000 mL,分装于适宜容器中, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.7 营养琼脂小斜面

A.7.1 成分

蛋白胨	10.0 g
-----	--------

牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g~20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内,加入 15%氢氧化钠溶液约 2 mL 调节 pH 至 7.3 ± 0.2 。加入琼脂,加热煮沸,使琼脂溶化,分装 13 mm×130 mm 试管,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.8 革兰氏染色液

A.8.1 结晶紫染色液

A.8.1.1 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.8.1.2 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.8.2 革兰氏碘液

A.8.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

A.8.2.2 制法

将碘与碘化钾先行混合,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.8.3 沙黄复染液

A.8.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.8.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.8.4 染色法

a) 涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染液,染 1 min,水洗。

- b) 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。
- c) 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。
- d) 滴加复染液,复染 1 min,水洗、待干、镜检。

A.9 无菌生理盐水

A.9.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.9.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中,121 °C 高压灭菌 15 min。

附录 B

葡萄球菌肠毒素检验

B.1 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,试验用水应符合 GB/T 6682 对一级水的规定。

B.1.1 A、B、C、D、E 型金黄色葡萄球菌肠毒素分型 ELISA 检测试剂盒。

B.1.2 pH 试纸,范围在 3.5~8.0,精度 0.1。

B.1.3 0.25 mol/L、pH 8.0 的 Tris 缓冲液:将 121.1 g 的 Tris 溶解到 800 mL 的去离子水中,待温度冷至室温后,加 42 mL 浓 HCL,调 pH 至 8.0。

B.1.4 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液:称取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.55 g (或 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.62 g)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.85 g (或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.73 g)、NaCl 8.7 g 溶于 1 000 mL 蒸馏水中,充分混匀即可。

B.1.5 庚烷。

B.1.6 10%次氯酸钠溶液。

B.1.7 肠毒素产毒培养基

B.1.7.1 成分

蛋白胨	20.0 g
胰消化酪蛋白	200 mg(氨基酸)
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
磷酸二氢钾	1.0 g
氯化钙	0.1 g
硫酸镁	0.2 g
菸酸	0.01 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.3±0.2	

B.1.7.2 制法

将所有成分混于水中,溶解后调节 pH,121 °C 高压灭菌 30 min。

B.1.8 营养琼脂

B.1.8.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g~20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

B.1.8.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内,加入 15%氢氧化钠溶液约 2 mL 校正 pH 至 7.3±0.2。

加入琼脂,加热煮沸,使琼脂溶化。分装烧瓶,121 °C高压灭菌 15 min。

B.2 仪器和设备

- B.2.1 电子天平:感量 0.01 g。
 B.2.2 均质器。
 B.2.3 离心机:转速 3 000g~5 000g。
 B.2.4 离心管:50 mL。
 B.2.5 滤器:滤膜孔径 0.2 μm。
 B.2.6 微量加样器:20 μL~200 μL、200 μL~1 000 μL。
 B.2.7 微量多通道加样器:50 μL~300 μL。
 B.2.8 自动洗板机(可选择使用)。
 B.2.9 酶标仪:波长 450 nm。

B.3 原理

本方法可用 A、B、C、D、E 型金黄色葡萄球菌肠毒素分型酶联免疫吸附试剂盒完成。本方法测定的基础是酶联免疫吸附反应(ELISA)。96 孔酶标板的每一个微孔条的 A~E 孔分别包被了 A、B、C、D、E 型葡萄球菌肠毒素抗体,H 孔为阳性质控,已包被混合型葡萄球菌肠毒素抗体,F 和 G 孔为阴性质控,包被了非免疫动物的抗体。样品中如果有葡萄球菌肠毒素,游离的葡萄球菌肠毒素则与各微孔中包被的特定抗体结合,形成抗原抗体复合物,其余未结合的成分在洗板过程中被洗掉;抗原抗体复合物再与过氧化物酶标记物(二抗)结合,未结合上的酶标记物在洗板过程中被洗掉;加入酶底物和显色剂并孵育,酶标记物上的酶催化底物分解,使无色的显色剂变为蓝色;加入反应终止液可使颜色由蓝变黄,并终止了酶反应;以 450 nm 波长的酶标仪测量微孔溶液的吸光度值,样品中的葡萄球菌肠毒素与吸光度值成正比。

B.4 检测步骤

B.4.1 从分离菌株培养物中检测葡萄球菌肠毒素方法

待测菌株接种营养琼脂斜面(试管 18 mm×180 mm)36 °C 培养 24 h,用 5 mL 生理盐水洗下菌落,倾入 60 mL 产毒培养基中,36 °C 振荡培养 48 h,振速为 100 次/min,吸出菌液离心,8 000 r/min 20 min,加热 100 °C,10 min,取上清液,取 100 μL 稀释后的样液进行试验。

B.4.2 从食品中提取和检测葡萄球菌毒素方法

B.4.2.1 牛奶和奶粉

将 25 g 奶粉溶解到 125 mL、0.25 M、pH8.0 的 Tris 缓冲液中,混匀后同液体牛奶一样按以下步骤制备。将牛奶于 15 °C,3 500g 离心 10 min。将表面形成的一层脂肪层移走,变成脱脂牛奶。用蒸馏水对其进行稀释(1:20)。取 100 μL 稀释后的样液进行试验。

B.4.2.2 脂肪含量不超过 40% 的食品

称取 10 g 样品绞碎,加入 pH 7.4 的 PBS 液 15 mL 进行均质。振摇 15 min。于 15 °C,3 500g 离心

10 min。必要时,移去上面脂肪层。取上清液进行过滤除菌。取 100 μL 的滤出液进行试验。

B.4.2.3 脂肪含量超过 40% 的食品

称取 10 g 样品绞碎,加入 pH 7.4 的 PBS 液 15 mL 进行均质。振摇 15 min。于 15 $^{\circ}\text{C}$, 3 500g 离心 10 min。吸取 5 mL 上层悬浮液,转移到另外一个离心管中,再加入 5 mL 的庚烷,充分混匀 5 min。于 15 $^{\circ}\text{C}$, 3 500g 离心 5 min。将上部有机相(庚烷层)全部弃去,注意该过程中不要残留庚烷。将下部水相层进行过滤除菌。取 100 μL 的滤出液进行试验。

B.4.2.4 其他食品可酌情参考上述食品处理方法。

B.4.3 检测

B.4.3.1 所有操作均应在室温(20 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$)下进行,A、B、C、D、E 型金黄色葡萄球菌肠毒素分型 ELISA 检测试剂盒中所有试剂的温度均应回升至室温方可使用。测定中吸取不同的试剂和样品溶液时应更换吸头,用过的吸头以及废液处理前要浸泡到 10% 次氯酸钠溶液中过夜。

B.4.3.2 将所需数量的微孔条插入框架中(一个样品需要一个微孔条)。将样品液加入微孔条的 A~G 孔,每孔 100 μL 。H 孔加 100 μL 的阳性对照,用手轻拍微孔板充分混匀,用黏胶纸封住微孔以防溶液挥发,置室温下孵育 1 h。

B.4.3.3 将孔中液体倾倒入含 10% 次氯酸钠溶液的容器中,并在吸水纸上拍打几次以确保孔内不残留液体。每孔用多通道加样器注入 250 μL 的洗液,再倾倒掉并在吸水纸上拍干。重复以上洗板操作 4 次。本步骤也可由自动洗板机完成。

B.4.3.4 每孔加入 100 μL 的酶标抗体,用手轻拍微孔板充分混匀,置室温下孵育 1 h。

B.4.3.5 重复 B.4.3.3 的洗板程序。

B.4.3.6 加 50 μL 的 TMB 底物和 50 μL 的发色剂至每个微孔中,轻拍混匀,室温黑暗避光处孵育 30 min。

B.4.3.7 加入 100 μL 的 2 mol/L 硫酸终止液,轻拍混匀,30 min 内用酶标仪在 450 nm 波长条件下测量每个微孔溶液的 OD 值。

B.4.4 结果的计算和表述

B.4.4.1 质量控制

测试结果阳性质控的 OD 值要大于 0.5,阴性质控的 OD 值要小于 0.3,如果不能同时满足以上要求,测试的结果不被认可。对阳性结果要排除内源性过氧化物酶的干扰。

B.4.4.2 临界值的计算

每一个微孔条的 F 孔和 G 孔为阴性质控,两个阴性质控 OD 值的平均值加上 0.15 为临界值。

示例:阴性质控 1=0.08

阴性质控 2=0.10

平均值=0.09

临界值=0.09+0.15=0.24

B.4.4.3 结果表述

OD 值小于临界值的样品孔判为阴性,表述为样品中未检出某型金黄色葡萄球菌肠毒素;OD 值大于或等于临界值的样品孔判为阳性,表述为样品中检出某型金黄色葡萄球菌肠毒素。

B.5 生物安全

因样品中不排除有其他潜在的传染性物质存在,所以要严格按照 GB 19489《实验室 生物安全通用要求》对废弃物进行处理。

附录 C

金黄色葡萄球菌最可能数(MPN)检索表

每 g(mL) 检样中金黄色葡萄球菌最可能数(MPN)的检索见表 C.1。

表 C.1 金黄色葡萄球菌最可能数(MPN)检索表

阳性管数			MPN	95%置信区间		阳性管数			MPN	95%置信区间	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	—	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1 000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1 000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2 000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1 100	180	4 100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1 100	420	—

注 1: 本表采用 3 个稀释度[0.1 g(mL)、0.01 g(mL)和 0.001 g(mL)]、每个稀释度接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1 g(mL)、0.1 g(mL)和 0.01 g(mL)时,表内数字应相应降低 10 倍;如改用 0.01 g(mL)、0.001 g(mL)、0.000 1 g(mL)时,则表内数字应相应增高 10 倍,其余类推。



中华人民共和国国家标准

GB 4789.18—2010

食品安全国家标准

食品微生物学检验 乳与乳制品检验

National food safety standard

Food microbiological examination: Milk and milk products

2010-03-26 发布

2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准代替 GB/T 4789.18-2003 《食品卫生微生物学检验 乳与乳制品检验》。

本标准与 GB/T 4789.18-2003 相比，主要变化如下：

- 修改了标准的中英文名称；
- 修改了“范围”和“规范性引用文件”；
- 修改了采样方案和各类乳制品的处理方法。

本标准所代替的历次版本发布情况为：

- GB 4789.18-1984、GB 4789.18-1994、GB/T 4789.18-2003。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 乳与乳制品检验

1 范围

本标准适用于乳与乳制品的微生物学检验。

2 规范性引用文件

本标准中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

3 设备和材料

3.1 采样工具

采样工具应使用不锈钢或其他强度适当的材料，表面光滑，无缝隙，边角圆润。采样工具应清洗和灭菌，使用前保持干燥。采样工具包括搅拌器具、采样勺、匙、切割丝、刀具（小刀或抹刀）、采样钻等。

3.2 样品容器

样品容器的材料（如玻璃、不锈钢、塑料等）和结构应能充分保证样品的原有状态。容器和盖子应清洁、无菌、干燥。样品容器应有足够的体积，使样品可在测试前充分混匀。样品容器包括采样袋、采样管、采样瓶等。

3.3 其他用品

包括温度计、铝箔、封口膜、记号笔、采样登记表等。

3.4 实验室检验用品

3.4.1 常规检验用品按 GB 4789.1 执行。

3.4.2 微生物指标菌检验分别按 GB 4789.2、GB 4789.3、GB 4789.15 执行。

3.4.3 致病菌检验分别按 GB 4789.4、GB 4789.10、GB 4789.30 和 GB 4789.40 执行。

3.4.4 双歧杆菌和乳酸菌检验分别按 GB/T 4789.34、GB 4789.35 执行。

4 采样方案

样品应当具有代表性。采样过程采用无菌操作，采样方法和采样数量应根据具体产品的特点和产品标准要求执行。样品在保存和运输的过程中，应采取必要的措施防止样品中原有微生物的数量变化，保持样品的原有状态。

4.1 生乳的采样

4.1.1 样品应充分搅拌均匀，混匀后应立即取样，用无菌采样工具分别从相同批次（此处特指单体的贮奶罐或贮奶车）中采集 n 个样品，采样量应满足微生物指标检验的要求。

4.1.2 具有分隔区域的贮奶装置，应根据每个分隔区域内贮奶量的不同，按比例从中采集一定量经混合均匀的代表性样品，将上述奶样混合均匀采样。

4.2 液态乳制品的采样

适用于巴氏杀菌乳、发酵乳、灭菌乳、调制乳等。取相同批次最小零售原包装，每批至少取 n 件。

4.3 半固态乳制品的采样

4.3.1 炼乳的采样

适用于淡炼乳、加糖炼乳、调制炼乳等。

4.3.1.1 原包装小于或等于 500 g (mL) 的制品：取相同批次的最小零售原包装，每批至少取 n 件。采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.3.1.2 原包装大于 500 g (mL) 的制品（再加工产品，进出口）：采样前应摇动或使用搅拌器搅拌，使其达到均匀后采样。如果样品无法进行均匀混合，就从样品容器中的各个部位取代表性样。采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.3.2 奶油及其制品的采样

适用于稀奶油、奶油、无水奶油等。

4.3.2.1 原包装小于或等于 1000 g (mL) 的制品：取相同批次的最小零售原包装，采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.3.2.2 原包装大于 1000 g (mL) 的制品：采样前应摇动或使用搅拌器搅拌，使其达到均匀后采样。对于固态制品，用无菌抹刀除去表层产品，厚度不少于 5 mm。将洁净、干燥的采样钻沿包装容器切口方向往下，匀速穿入底部。当采样钻到达容器底部时，将采样钻旋转 180°，抽出采样钻并将采集的样品转入样品容器。采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.4 固态乳制品采样

适用于干酪、再制干酪、乳粉、乳清粉、乳糖和酪乳粉等。

4.4.1 干酪与再制干酪的采样

4.4.1.1 原包装小于或等于 500 g 的制品：取相同批次的最小零售原包装，采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.4.1.2 原包装大于 500 g 的制品：根据干酪的形状和类型，可分别使用下列方法：（1）在距边缘不小于 10 cm 处，把取样器向干酪中心斜插到一个平表面，进行一次或几次。（2）把取样器垂直插入一个面，并穿过干酪中心到对面。（3）从两个平面之间，将取样器水平插入干酪的竖直面，插向干酪中心。（4）若干酪是装在桶、箱或其它大容器中，或是将干酪制成压紧的大块时，将取样器从容器顶斜穿到底进行采样。采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.4.2 乳粉、乳清粉、乳糖、酪乳粉的采样

适用于乳粉、乳清粉、乳糖、酪乳粉等。

4.4.2.1 原包装小于或等于 500 g 的制品：取相同批次的最小零售原包装，采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.4.2.2 原包装大于 500 g 的制品：将洁净、干燥的采样钻沿包装容器切口方向往下，匀速穿入底部。当采样钻到达容器底部时，将采样钻旋转 180°，抽出采样钻并将采集的样品转入样品容器。采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

5 检样的处理

5.1 乳及液态乳制品的处理

将检样摇匀，以无菌操作开启包装。塑料或纸盒（袋）装，用75%酒精棉球消毒盒盖或袋口，用灭菌剪刀切开；玻璃瓶装，以无菌操作去掉瓶口的纸罩或瓶盖，瓶口经火焰消毒。用灭菌吸管吸取25 mL（液态乳中添加固体颗粒状物的，应均质后取样）检样，放入装有225 mL灭菌生理盐水的锥形瓶内，振摇均匀。

5.2 半固态乳制品的处理

5.2.1 炼乳

清洁瓶或罐的表面，再用点燃的酒精棉球消毒瓶或罐口周围，然后用灭菌的开罐器打开瓶或罐，以无菌手续称取25 g检样，放入预热至45℃的装有225 mL灭菌生理盐水（或其他增菌液）的锥形瓶中，振摇均匀。

5.2.2 稀奶油、奶油、无水奶油等

无菌操作打开包装，称取25 g检样，放入预热至45℃的装有225 mL灭菌生理盐水（或其他增菌液）的锥形瓶中，振摇均匀。从检样融化到接种完毕的时间不应超过30 min。

5.3 固态乳制品的处理

5.3.1 干酪及其制品

以无菌操作打开外包装，对有涂层的样品削去部分表面封蜡，对无涂层的样品直接经无菌程序用灭菌刀切开干酪，用灭菌刀（勺）从表层和深层分别取出有代表性的适量样品，磨碎混匀，称取25 g检样，放入预热到45℃的装有225 mL灭菌生理盐水（或其他稀释液）的锥形瓶中，振摇均匀。充分混合使样品均匀散开（1 min~3 min），分散过程时温度不超过40℃。尽可能避免泡沫产生。

5.3.2 乳粉、乳清粉、乳糖、酪乳粉

取样前将样品充分混匀。罐装乳粉的开罐取样法同炼乳处理，袋装奶粉应用75%酒精的棉球涂擦消毒袋口，以无菌手续开封取样。称取检样25 g，加入预热到45℃盛有225 mL灭菌生理盐水等稀释液或增菌液的锥形瓶内（可使用玻璃珠助溶），振摇使充分溶解和混匀。

对于经酸化工艺生产的乳清粉，应使用pH 8.4±0.2的磷酸氢二钾缓冲液稀释。对于含较高淀粉的特殊配方乳粉，可使用α-淀粉酶降低溶液粘度，或将稀释液加倍以降低溶液粘度。

5.3.3 酪蛋白和酪蛋白酸盐

以无菌操作，称取25 g检样，按照产品不同，分别加入225 mL灭菌生理盐水等稀释液或增菌液。在对粘稠的样品溶液进行梯度稀释时，应在无菌条件下反复多次吹打吸管，尽量将粘附在吸管内壁的样品转移到溶液中。

5.3.3.1 酸法工艺生产的酪蛋白：使用磷酸氢二钾缓冲液并加入消泡剂，在pH 8.4±0.2的条件下溶解样品。

5.3.3.2 凝乳酶法工艺生产的酪蛋白：使用磷酸氢二钾缓冲液并加入消泡剂，在pH 7.5±0.2的条件下溶解样品，室温静置15 min。必要时在灭菌的匀浆袋中均质2 min，再静置5 min后检测。

5.3.3.3 酪蛋白酸盐：使用磷酸氢二钾缓冲液在pH 7.5±0.2的条件下溶解样品。

6 检验方法

6.1 菌落总数：按 GB 4789.2 检验。

6.2 大肠菌群：按 GB 4789.3 中的直接计数法计数。

- 6.3 沙门氏菌：按 GB 4789.4 检验。
 - 6.4 金黄色葡萄球菌：按 GB 4789.10 检验。
 - 6.5 霉菌和酵母：按 GB 4789.15 计数。
 - 6.6 单核细胞增生李斯特氏菌：按 GB 4789.30 检验。
 - 6.7 双歧杆菌：按 GB/T 4789.34 检验。
 - 6.8 乳酸菌：按 GB 4789.35 检验。
 - 6.9 阪崎肠杆菌：按 GB 4789.40 检验。
-



中华人民共和国国家标准

GB 4789.26—2013

食品安全国家标准

食品微生物学检验 商业无菌检验

2013-11-29 发布

2014-06-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准代替 GB/T 4789.26—2003 《食品卫生微生物学检验 罐头食品商业无菌的检验》。

本标准与 GB/T 4789.26—2003 相比主要变化如下：

- 修改了标准的名称；
- 修改了范围；
- 删除了规范性引用文件；
- 删除了术语和定义；
- 修改了设备和材料；
- 修改了培养基和试剂；
- 增加了检验程序图；
- 修改了检验步骤；
- 修改了结果判定；
- 修改了附录 A 和附录 B。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 商业无菌检验

1 范围

本标准规定了食品商业无菌检验的基本要求、操作程序和结果判定。
本标准适用于食品商业无菌的检验。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1 低酸性罐藏食品 low acid canned food

除酒精饮料以外，凡杀菌后平衡 pH 大于 4.6，水分活度大于 0.85 的罐藏食品，原来是低酸性的水果、蔬菜或蔬菜制品，为加热杀菌的需要而加酸降低 pH 的，属于酸化的低酸性罐藏食品。

2.2 酸性罐藏食品 acid canned food

杀菌后平衡 pH 等于或小于 4.6 的罐藏食品。pH 小于 4.7 的番茄、梨和菠萝以及由其制成的汁，以及 pH 小于 4.9 的无花果均属于酸性罐藏食品。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- a) 冰箱：2 °C~5 °C；
- b) 恒温培养箱：30 °C±1 °C；36 °C±1 °C；55 °C±1 °C；
- c) 恒温水浴箱：55 °C±1 °C；
- d) 均质器及无菌均质袋、均质杯或乳钵；
- e) 电位 pH 计（精确度 pH0.05 单位）；
- f) 显微镜：10 倍~100 倍；
- g) 开罐器和罐头打孔器；
- h) 电子秤或台式天平；
- i) 超净工作台或百级洁净实验室。

4 培养基和试剂

- 4.1 无菌生理盐水：见附录 A 中 A.1。
- 4.2 结晶紫染色液：见附录 A 中 A.2。
- 4.3 二甲苯。
- 4.4 含 4% 碘的乙醇溶液：4 g 碘溶于 100 mL 的 70% 乙醇溶液。

5 检验程序

商业无菌检验程序见图1。

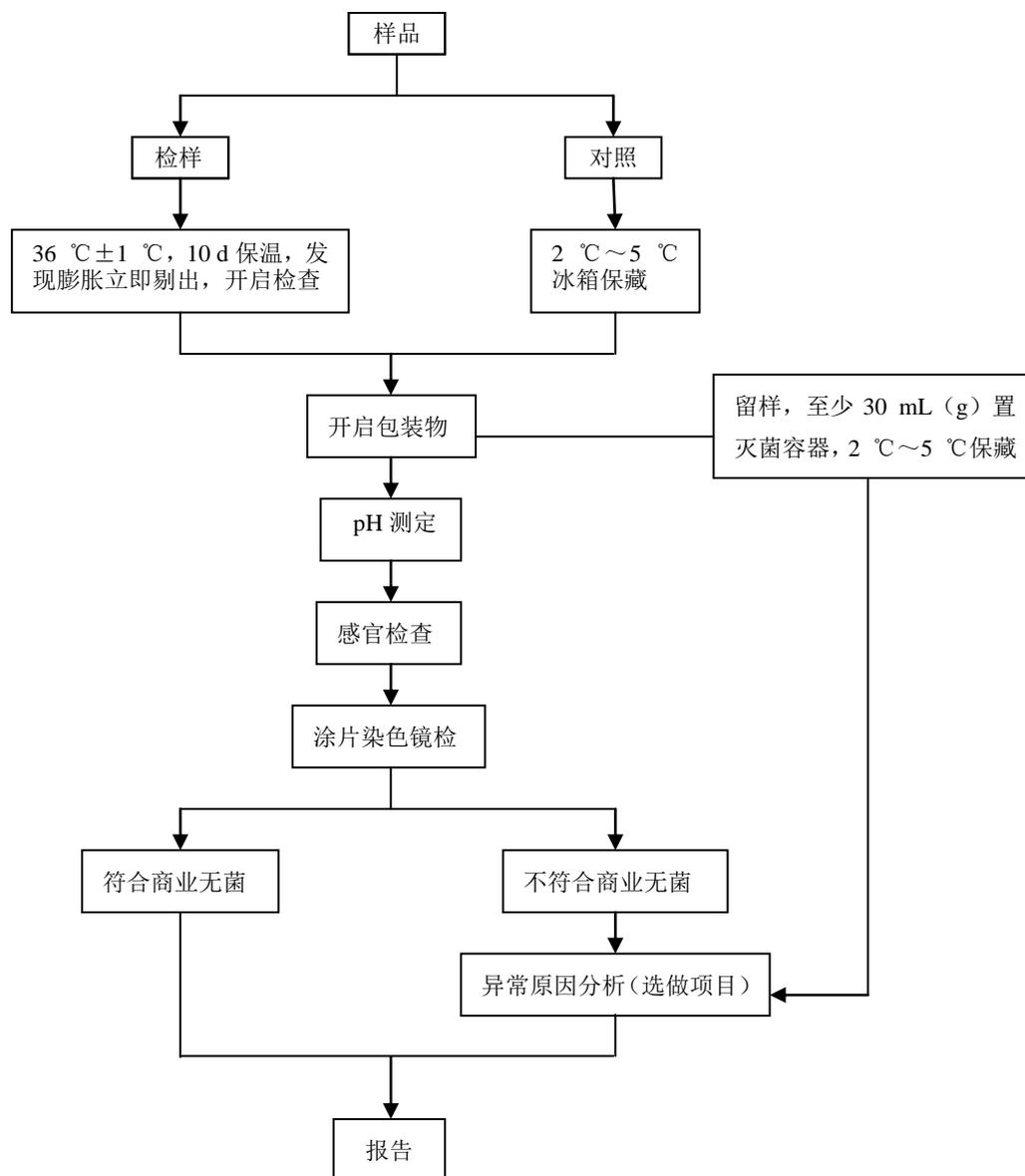


图1 商业无菌检验程序

6 操作步骤

6.1 样品准备

去除表面标签, 在包装容器表面用防水的油性记号笔做好标记, 并记录容器、编号、产品性状、泄漏情况、是否有小孔或锈蚀、压痕、膨胀及其他异常情况。

6.2 称重

1 kg 及以下的包装物精确到 1 g, 1 kg 以上的包装物精确到 2 g, 10 kg 以上的包装物精确到 10 g,

并记录。

6.3 保温

6.3.1 每个批次取 1 个样品置 2℃~5℃冰箱保存作为对照,将其余样品在 36℃±1℃下保温 10 d。保温过程中应每天检查,如有膨胀或泄漏现象,应立即剔出,开启检查。

6.3.2 保温结束时,再次称重并记录,比较保温前后样品重量有无变化。如有变轻,表明样品发生泄漏。将所有包装物置于室温直至开启检查。

6.4 开启

6.4.1 如有膨胀的样品,则将样品先置于 2℃~5℃冰箱内冷藏数小时后开启。

6.4.2 如有膨用冷水和洗涤剂清洗待检样品的光滑面。水冲洗后用无菌毛巾擦干。以含 4%碘的乙醇溶液浸泡消毒光滑面 15 min 后用无菌毛巾擦干,在密闭罩内点燃至表面残余的碘乙醇溶液全部燃烧完。膨胀样品以及采用易燃包装材料包装的样品不能灼烧,以含 4%碘的乙醇溶液浸泡消毒光滑面 30 min 后用无菌毛巾擦干。

6.4.3 在超净工作台或百级洁净实验室中开启。带汤汁的样品开启前应适当振摇。使用无菌开罐器在消毒后的罐头光滑面开启一个适当大小的口,开罐时不得伤及卷边结构,每一个罐头单独使用一个开罐器,不得交叉使用。如样品为软包装,可以使用灭菌剪刀开启,不得损坏接口处。立即在开口上方嗅闻气味,并记录。

注:严重膨胀样品可能会发生爆炸,喷出有毒物。可以采取在膨胀样品上盖一条灭菌毛巾或者用一个无菌漏斗倒扣在样品上等预防措施来防止这类危险的发生。

6.5 留样

开启后,用灭菌吸管或其他适当工具以无菌操作取出内容物至少 30 mL (g) 至灭菌容器内,保存 2℃~5℃冰箱中,在需要时可用于进一步试验,待该批样品得出检验结论后可弃去。开启后的样品可进行适当的保存,以备日后容器检查时使用。

6.6 感官检查

在光线充足、空气清洁无异味的检验室中,将样品内容物倾入白色搪瓷盘内,对产品的组织、形态、色泽和气味等进行观察和嗅闻,按压食品检查产品性状,鉴别食品有无腐败变质的迹象,同时观察包装容器内部和外部的情况,并记录。

6.7 pH 测定

6.7.1 样品处理

6.7.1.1 液态制品混匀备用,有固相和液相的制品则取混匀的液相部分备用。

6.7.1.2 对于稠厚或半稠厚制品以及难以从中分出汁液的制品(如:糖浆、果酱、果冻、油脂等),取一部分样品在均质器或研钵中研磨,如果研磨后的样品仍太稠厚,加入等量的无菌蒸馏水,混匀备用。

6.7.2 测定

6.7.2.1 将电极插入被测试样液中,并将 pH 计的温度校正器调节到被测液的温度。如果仪器没有温度校正系统,被测试样液的温度应调到 20℃±2℃的范围之内,采用适合于所用 pH 计的步骤进行测定。当读数稳定后,从仪器的标度上直接读出 pH,精确到 pH 0.05 单位。

6.7.2.2 同一个制备试样至少进行两次测定。两次测定结果之差应不超过 0.1 pH 单位。取两次测定

的算术平均值作为结果，报告精确到 0.05 pH 单位。

6.7.3 分析结果

与同批中冷藏保存对照样品相比，比较是否有显著差异。pH 相差 0.5 及以上判为显著差异。

6.8 涂片染色镜检

6.8.1 涂片

取样品内容物进行涂片。带汤汁的样品可用接种环挑取汤汁涂于载玻片上，固态食品可直接涂片或用少量灭菌生理盐水稀释后涂片，待干后用火焰固定。油脂性食品涂片自然干燥并火焰固定后，用二甲苯流洗，自然干燥。

6.8.2 染色镜检

对 6.8.1 中涂片用结晶紫染色液进行单染色，干燥后镜检，至少观察 5 个视野，记录菌体的形态特征以及每个视野的菌数。与同批冷藏保存对照样品相比，判断是否有明显的微生物增殖现象。菌数有百倍或百倍以上增长则判为明显增殖。

7 结果判定

样品经保温试验未出现泄漏；保温后开启，经感官检验、pH 测定、涂片镜检，确证无微生物增殖现象，则可报告该样品为商业无菌。

样品经保温试验出现泄漏；保温后开启，经感官检验、pH 测定、涂片镜检，确证有微生物增殖现象，则可报告该样品为非商业无菌。

若需核查样品出现膨胀、pH 或感官异常、微生物增殖等原因，可取样品内容物的留样按照附录 B 进行接种培养并报告。若需判定样品包装容器是否出现泄漏，可取开启后的样品按照附录 B 进行密封性检查并报告。

附录A

培养基和试剂

A.1 无菌生理盐水

A.1.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.1.2 制法

称取8.5 g氯化钠溶于1000 mL蒸馏水中，121 °C高压灭菌15 min。

A.2 结晶紫染色液

A.2.1 成分

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

A.2.2 制法

将1.0 g结晶紫完全溶解于95%乙醇中，再与1%草酸铵溶液混合。

A.2.3 染色法

将涂片在酒精灯火焰上固定，滴加结晶紫染液，染 1 min，水洗。

附录 B

异常原因分析（选做项目）

B.1 培养基和试剂

B.1.1 溴甲酚紫葡萄糖肉汤

B.1.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸膏	3.0 g
葡萄糖	10.0 g
氯化钠	5.0 g
溴甲酚紫	0.04 g（或 1.6%乙醇溶液 2.0 mL）
蒸馏水	1 000.0 mL

B.1.1.2 制法

将除溴甲酚紫外的各成分加热搅拌溶解，校正 pH 至 7.0 ± 0.2 ，加入溴甲酚紫，分装于带有小倒管的试管中，每管 10 mL， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 10 min。

B.1.2 庖肉培养基

B.1.2.1 成分

牛肉浸液	1000.0 mL
蛋白胨	30.0 g
酵母膏	5.0 g
葡萄糖	3.0 g
磷酸二氢钠	5.0 g
可溶性淀粉	2.0 g
碎肉渣	适量

B.1.2.2 制法

B.1.2.2.1 称取新鲜除脂肪和筋膜的碎牛肉 500 g，加蒸馏水 1000 mL 和 1 mol/L 氢氧化钠溶液 25.0 mL，搅拌煮沸 15 min，充分冷却，除去表层脂肪，澄清，过滤，加水补足至 1000 mL，即为牛肉浸液。加入 B.1.2.1 除碎肉渣外的各种成分，校正 pH 至 7.8 ± 0.2 。

B.1.2.2.2 碎肉渣经水洗后晾至半干，分装 15 mm×150 mm 试管约 2 cm~3 cm 高，每管加入还原铁粉 0.1 g~0.2 g 或铁屑少许。将 B.1.2.2.1 配制的液体培养基分装至每管内超过肉渣表面约 1 cm。上面覆盖溶化的凡士林或液体石蜡 0.3 cm~0.4 cm。 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min。

B.1.3 营养琼脂

B.1.3.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g

氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g~20.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

B.1.3.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内，加入 15% 氢氧化钠溶液约 2 mL，校正 pH 至 7.2~7.4。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化。分装烧瓶或 13 mm×130 mm 试管，121 °C 高压灭菌 15 min。

B.1.4 酸性肉汤

B.1.4.1 成分

多价蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸二氢钾	5.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

B.1.4.2 制法

将 B.1.4.1 中各成分加热搅拌溶解，校正 pH 至 5.0 ± 0.2 ，121 °C 高压灭菌 15 min。

B.1.5 麦芽浸膏汤

B.1.5.1 成分

麦芽浸膏	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

B.1.5.2 制法

将麦芽浸膏在蒸馏水中充分溶解，滤纸过滤，校正 pH 至 4.7 ± 0.2 ，分装，121 °C 灭菌 15 min。

B.1.6 沙氏葡萄糖琼脂

B.1.6.1 成分

蛋白胨	10.0 g
琼脂	15.0 g
葡萄糖	40.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

B.1.6.2 制法

将各成分在蒸馏水中溶解，加热煮沸，分装在烧瓶中，校正 pH 至 5.6 ± 0.2 ，121 °C 高压灭菌 15 min。

B.1.7 肝小牛肉琼脂

B.1.7.1 成分

肝浸膏	50.0 g
小牛肉浸膏	500.0 g

豚蛋白胨	20.0 g
新蛋白胨	1.3 g
胰蛋白胨	1.3 g
葡萄糖	5.0 g
可溶性淀粉	10.0 g
等离子酪蛋白	2.0 g
氯化钠	5.0 g
硝酸钠	2.0 g
明胶	20.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

B. 1. 7. 2 制法

在蒸馏水中将各成分混合。校正 pH 至 7.3 ± 0.2 ，121 °C 灭菌 15 min。

B. 1. 8 革兰氏染色液

B. 1. 8. 1 结晶紫染色液

B. 1. 8. 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

B. 1. 8. 1. 2 制法

将1.0 g结晶紫完全溶解于95%乙醇中，再与1%草酸铵溶液混合。

B. 1. 8. 2 革兰氏碘液

B. 1. 8. 2. 1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL

B. 1. 8. 2. 2 制法

将1.0 g碘与2.0 g碘化钾先行混合，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。

B. 1. 8. 3 沙黄复染液

B. 1. 8. 3. 1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

B. 1. 8. 3. 2 制法

将0.25 g沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

B.1.8.4 染色法

B.1.8.4.1 涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染液，染 1 min，水洗。

B.1.8.4.2 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。

B.1.8.4.3 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。

B.1.8.4.4 滴加复染液，复染 1 min，水洗、待干、镜检。

B.2 低酸性罐藏食品的接种培养（pH 大于 4.6）

B.2.1 对低酸性罐藏食品，每份样品接种 4 管预先加热到 100 °C 并迅速冷却到室温的庖肉培养基内；同时接种 4 管溴甲酚紫葡萄糖肉汤。每管接种 1 mL (g) ~2 mL (g) 样品(液体样品为 1 mL~2 mL，固体为 1 g~2 g，两者皆有时，应各取一半)。培养条件见表 B.1。

表 B.1 低酸性罐藏食品（pH>4.6）接种的庖肉培养基和溴甲酚紫葡萄糖肉汤

培养基	管数	培养温度 °C	培养时间 h
庖肉培养基	2	36±1	96~120
庖肉培养基	2	55±1	24~72
溴甲酚紫葡萄糖肉汤	2	55±1	24~48
溴甲酚紫葡萄糖肉汤	2	36±1	96~120

B.2.2 经过表 B.1 规定的培养条件培养后，记录每管有无微生物生长。如果没有微生物生长，则记录后弃去。

B.2.3 如果有微生物生长，以接种环沾取液体涂片，革兰氏染色镜检。如在溴甲酚紫葡萄糖肉汤管中观察到不同的微生物形态或单一的球菌、真菌形态，则记录并弃去。在庖肉培养基中未发现杆菌，培养物内含有球菌、酵母、霉菌或其混合物，则记录并弃去。将溴甲酚紫葡萄糖肉汤和庖肉培养基中出现生长的其他各阳性管分别划线接种 2 块肝小牛肉琼脂或营养琼脂平板，一块平板作需氧培养，另一平板作厌氧培养。培养程序见图 B.1。

B.2.4 挑取需氧培养中单个菌落，接种于营养琼脂小斜面，用于后续的革兰氏染色镜检；挑取厌氧培养中的单个菌落涂片，革兰氏染色镜检。挑取需氧和厌氧培养中的单个菌落，接种于庖肉培养基，进行纯培养。

B.2.5 挑取营养琼脂小斜面和厌氧培养的庖肉培养基中的培养物涂片镜检。

B.2.6 挑取纯培养中的需氧培养物接种肝小牛肉琼脂或营养琼脂平板，进行厌氧培养；挑取纯培养中的厌氧培养物接种肝小牛肉琼脂或营养琼脂平板，进行需氧培养。以鉴别是否为兼性厌氧菌。

B.2.7 如果需检测梭状芽胞杆菌的肉毒毒素，挑取典型菌落接种庖肉培养基作纯培养。36 °C 培养 5 d，按照 GB/T 4789.12 进行肉毒毒素检验。

B.3 酸性罐藏食品的接种培养（pH 小于或等于 4.6）

B.3.1 每份样品接种 4 管酸性肉汤和 2 管麦芽浸膏汤。每管接种 1 mL (g) ~2 mL (g) 样品(液体样品为 1 mL~2 mL，固体为 1 g~2 g，两者皆有时，应各取一半)。培养条件见表 B.2。

表 B.2 酸性罐藏食品 (pH≤4.6) 接种的酸性肉汤和麦芽浸膏汤

培养基	管数	培养温度 ℃	培养时间 h
酸性肉汤	2	55±1	48
酸性肉汤	2	30±1	96
麦芽浸膏汤	2	30±1	96

B.3.2 经过表 B.2 中规定的培养条件培养后,记录每管有无微生物生长。如果没有微生物生长,则记录后弃去。

B.3.3 对有微生物生长的培养管,取培养后的内容物的直接涂片,革兰氏染色镜检,记录观察到的微生物。

B.3.4 如果在 30℃ 培养条件下在酸性肉汤或麦芽浸膏汤中有微生物生长,将各阳性管分别接种 2 块营养琼脂或沙氏葡萄糖琼脂平板,一块作需氧培养,另一块作厌氧培养。

B.3.5 如果在 55℃ 培养条件下,酸性肉汤中有微生物生长,将各阳性管分别接种 2 块营养琼脂平板,一块作需氧培养,另一块作厌氧培养。对有微生物生长的平板进行染色涂片镜检,并报告镜检所见微生物型别。培养程序见图 B.2。

B.3.6 挑取 30℃ 需氧培养的营养琼脂或沙氏葡萄糖琼脂平板中的单个菌落,接种营养琼脂小斜面,用于后续的革兰氏染色镜检。同时接种酸性肉汤或麦芽浸膏汤进行纯培养。

挑取 30℃ 厌氧培养的营养琼脂或沙氏葡萄糖琼脂平板中的单个菌落,接种酸性肉汤或麦芽浸膏汤进行纯培养。

挑取 55℃ 需氧培养的营养琼脂平板中的单个菌落,接种营养琼脂小斜面,用于后续的革兰氏染色镜检。同时接种酸性肉汤进行纯培养。

挑取 55℃ 厌氧培养的营养琼脂平板中的单个菌落,接种酸性肉汤进行纯培养。

B.3.7 挑取营养琼脂小斜面中的培养物涂片镜检。挑取 30℃ 厌氧培养的酸性肉汤或麦芽浸膏汤培养物和 55℃ 厌氧培养的酸性肉汤培养物涂片镜检。

B.3.8 将 30℃ 需氧培养的纯培养物接种于营养琼脂或沙氏葡萄糖琼脂平板中进行厌氧培养,将 30℃ 厌氧培养的纯培养物接种于营养琼脂或沙氏葡萄糖琼脂平板中进行需氧培养,将 55℃ 需氧培养的纯培养物接种于营养琼脂中进行厌氧培养,将 55℃ 厌氧培养的纯培养物接种于营养琼脂中进行需氧培养,以鉴别是否为兼性厌氧菌。

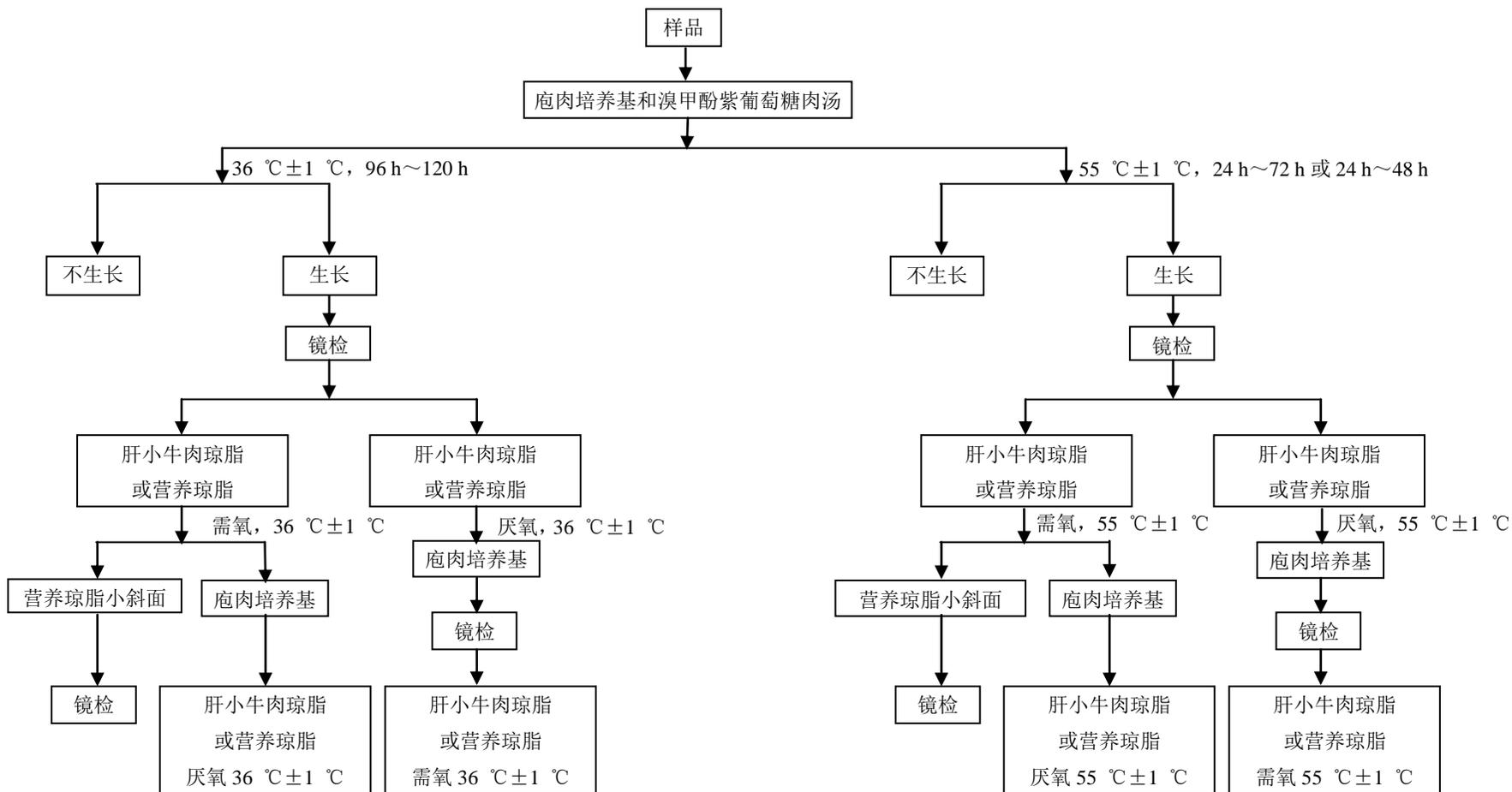


图 B.1 低酸性罐藏食品接种培养程序

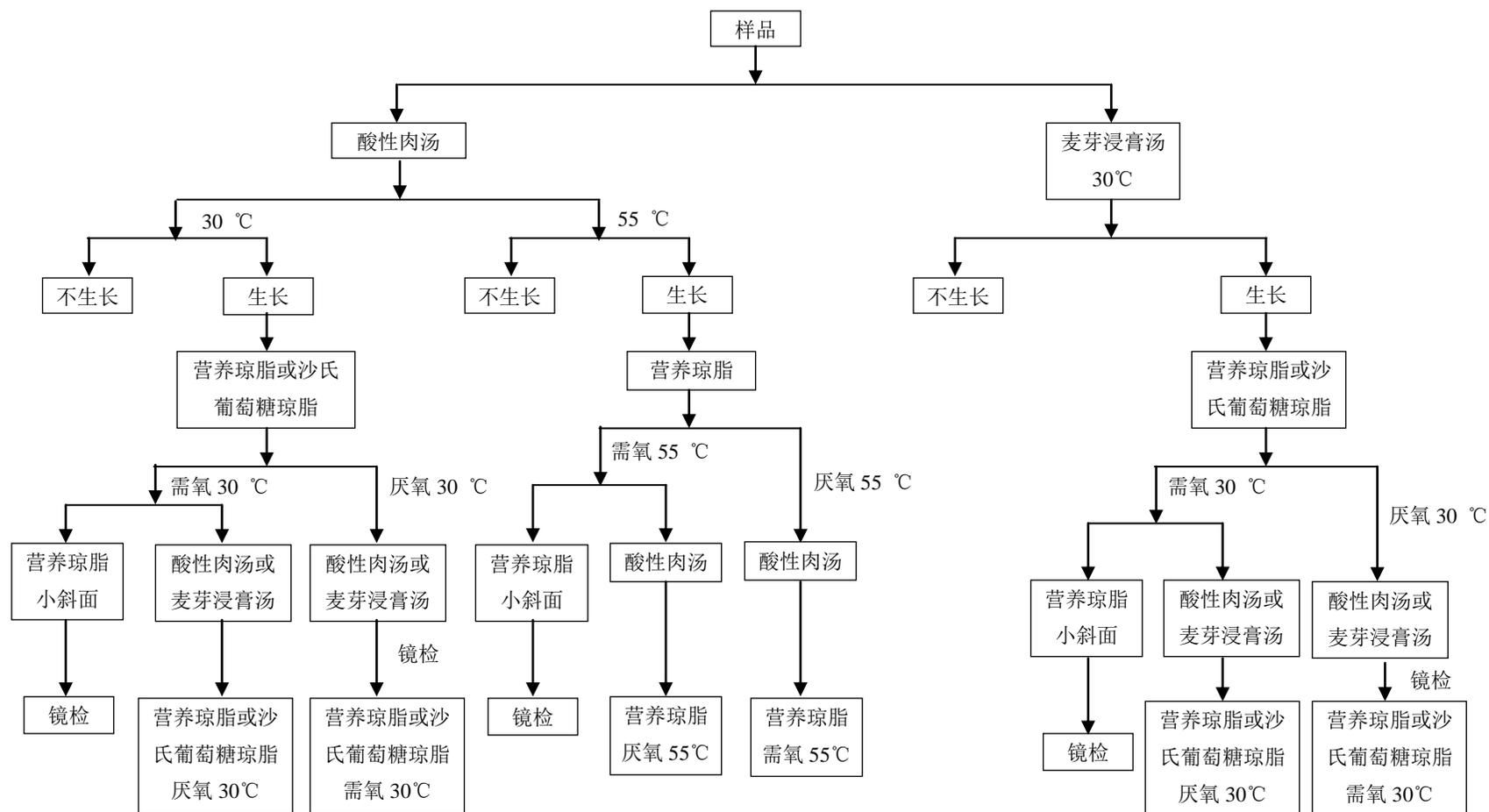


图 B.2 酸性罐藏食品接种培养程序

B. 3.9 结果分析

B. 3.9.1 如果在膨胀的样品里没有发现微生物的生长,膨胀可能是由于内容物和包装发生反应产生氢气造成的。产生氢气的量随储存的时间长短和存储条件而变化。填装过满也可能导致轻微的膨胀,可以通过称重来确定是否由于填装过满所致。

在直接涂片中看到有大量细菌的混合菌相,但是经培养后不生长,表明杀菌前发生的腐败。由于密闭包装前细菌生长的结果,导致产品的 pH、气味和组织形态呈现异常。

B. 3.9.2 包装容器密封性良好时,在 36 °C 培养条件下若只有芽胞杆菌生长,且它们的耐热性不高于肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*),则表明生产过程中杀菌不足。

B. 3.9.3 培养出现杆菌和球菌、真菌的混合菌落,表明包装容器发生泄漏。也有可能是杀菌不足所致,但在这种情况下同批产品的膨胀率将很高。

B. 3.9.4 在 36 °C 或 55 °C 溴甲酚紫葡萄糖肉汤培养观察产酸产气情况,如有产酸,表明是有嗜中温的微生物,如嗜温耐酸芽胞杆菌,或者嗜热微生物,如嗜热脂肪芽胞杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 生长。

在 55 °C 的庖肉培养基上有细菌生长并产气,发出腐烂气味,表明样品腐败是由嗜热的厌氧梭菌所致。

在 36 °C 庖肉培养基上生长并产生带腐烂气味的气体,镜检可见芽胞,表明腐败可能是由肉毒梭菌、生孢梭菌 (*C. sporogenes*) 或产气荚膜梭菌 (*C. perfringens*) 引起的。有需要可以进一步进行肉毒毒素检测。

B. 3.9.5 酸性罐藏食品的变质通常是由于无芽胞的乳杆菌和酵母所致。

一般 pH 低于 4.6 的情况下不会发生由芽胞杆菌引起的变质,但变质的番茄酱或番茄汁罐头并不出现膨胀,但有腐臭味,伴有或不伴有 pH 降低,一般是由于需氧的芽胞杆菌所致。

B. 3.9.6 许多罐藏食品中含有嗜热菌,在正常的储存条件下不生长,但当产品暴露于较高的温度 (50 °C~55 °C) 时,嗜热菌就会生长并引起腐败。嗜热耐酸的芽胞杆菌和嗜热脂肪芽胞杆菌分别在酸性和低酸性的食品中引起腐败但是并不出现包装容器膨胀。在 55 °C 培养不会引起包装容器外观的改变,但会产生臭味,伴有或不伴有 pH 的降低。番茄、梨、无花果和菠萝等类罐头的腐败变质有时是由于巴斯德梭菌 (*C. pasteurianum*) 引起。嗜热解糖梭状芽胞杆菌 (*C. thermosaccharolyticum*) 就是一种嗜热厌氧菌,能够引起膨胀和产品的腐烂气味。

嗜热厌氧菌也能产气,由于在细菌开始生长之后迅速增殖,可能混淆膨胀是由于氢气引起的还是嗜热厌氧菌产气引起的。化学物质分解将产生二氧化碳,尤其是集中发生在含糖和一些酸的食品如番茄酱、糖蜜、甜馅和高糖的水果的罐头中。这种分解速度随着温度上升而加快。

B. 3.9.7 灭菌的真空包装和正常的产品直接涂片,分离出任何微生物应该怀疑是实验室污染。为了证实是否实验室污染,在无菌的条件下接种该分离出的活的微生物到另一个正常的对照样品,密封,在 36 °C 培养 14 d。如果发生膨胀或产品变质,这些微生物就可能不是来自于原始样品。如果样品仍然是平坦的,无菌操作打开样品包装并按上述步骤做再次培养;如果同一种微生物被再次发现并且产品是正常的,认为该产品商业无菌,因为这种微生物在正常的保存和运送过程中不生长。

B. 3.9.8 如果食品本身发生混浊,肉汤培养可能得不出确定性结论,这种情况需进一步培养以确定是否有微生物生长。

B. 4 镀锡薄钢板食品空罐密封性检验方法

B. 4.1 减压试漏

将样品包装罐洗净，36℃烘干。在烘干的空罐内注入清水至容积的80%~90%，将一带橡胶圈的有机玻璃板放置罐头开启端的卷边上，使其保持密封。启动真空泵，关闭放气阀，用手按住盖板，控制抽气，使真空表从0 Pa升到 6.8×10^4 Pa（510 mmHg）的时间在1 min以上，并保持此真空度1 min以上。倾斜并仔细观察罐体，尤其是卷边及焊缝处，有无气泡产生。凡同一部位连续产生气泡，应判断为泄漏，记录漏气的时间和真空度，并标注漏气部位。

B.4.2 加压试漏

将样品包装罐洗净，36℃烘干。用橡皮塞将空罐的开孔塞紧，将空罐浸没在盛水玻璃缸中，开动空气压缩机，慢慢开启阀门，使罐内压力逐渐加大，直至压力升至 6.8×10^4 Pa并保持2 min。仔细观察罐体，尤其是卷边及焊缝处，有无气泡产生。凡同一部位连续产生气泡，应判断为泄漏，记录漏气开始的时间和压力，并标注漏气部位。



中华人民共和国国家标准

GB 4789.30—2016

食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会
国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB 4789.30—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》。

本标准与 GB 4789.30—2010 相比,主要变化如下:

- 增加了“第二法 单核细胞增生李斯特氏菌平板计数法”;
- 增加了“第三法 单核细胞增生李斯特氏菌 MPN 计数法”;
- 修改了范围。

食品安全国家标准

食品微生物学检验

单核细胞增生李斯特氏菌检验

1 范围

本标准规定了食品中单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)的检验方法。

本标准第一法适用于食品中单核细胞增生李斯特氏菌的定性检验;第二法适用于单核细胞增生李斯特氏菌含量较高的食品中单核细胞增生李斯特氏菌的计数;第三法适用于单核细胞增生李斯特氏菌含量较低(<100 CFU/g)而杂菌含量较高的食品中单核细胞增生李斯特氏菌的计数,特别是牛奶、水以及含干扰菌落计数的颗粒物质的食品。

2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

- 2.1 冰箱:2℃~5℃。
- 2.2 恒温培养箱:30℃ \pm 1℃、36℃ \pm 1℃。
- 2.3 均质器。
- 2.4 显微镜:10x~100x。
- 2.5 电子天平:感量0.1g。
- 2.6 锥形瓶:100mL、500mL。
- 2.7 无菌吸管:1mL(具0.01mL刻度)、10mL(具0.1mL刻度)或微量移液器及吸头。
- 2.8 无菌平皿:直径90mm。
- 2.9 无菌试管:16mm \times 160mm。
- 2.10 离心管:30mm \times 100mm。
- 2.11 无菌注射器:1mL。
- 2.12 单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)ATCC 19111 或 CMCC 54004,或其他等效标准菌株。
- 2.13 英诺克李斯特氏菌(*Listeria innocua*)ATCC 33090,或其他等效标准菌株。
- 2.14 伊氏李斯特氏菌(*Listeria ivanovii*)ATCC 19119,或其他等效标准菌株。
- 2.15 斯氏李斯特氏菌(*Listeria seeligeri*)ATCC 35967,或其他等效标准菌株。
- 2.16 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)ATCC 25923 或其他产 β -溶血环金葡萄菌,或其他等效标准菌株。
- 2.17 马红球菌(*Rhodococcus equi*)ATCC 6939 或 NCTC 1621,或其他等效标准菌株。
- 2.18 小白鼠:ICR 体重18g~22g。
- 2.19 全自动微生物生化鉴定系统。

3 培养基和试剂

- 3.1 含0.6%酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE):见A.1。

- 3.2 含 0.6% 酵母浸膏的胰酪胨大豆琼脂(TSA-YE):见 A.2。
 3.3 李氏增菌肉汤 LB(LB₁, LB₂):见 A.3。
 3.4 1% 盐酸吡啶黄(acriflavine HCl)溶液:见 A.3.2.1、A.3.2.2。
 3.5 1% 萘啶酮酸钠盐(naladixic acid)溶液:见 A.3.2.1、A.3.2.2。
 3.6 PALCAM 琼脂:见 A.4。
 3.7 革兰氏染液:见 A.5。
 3.8 SIM 动力培养基:见 A.6。
 3.9 缓冲葡萄糖蛋白胨水[甲基红(MR)和 V-P 试验用]:见 A.7。
 3.10 5%~8% 羊血琼脂:见 A.8。
 3.11 糖发酵管:见 A.9。
 3.12 过氧化氢试剂:见 A.10。
 3.13 李斯特氏菌显色培养基。
 3.14 生化鉴定试剂盒或全自动微生物鉴定系统。
 3.15 缓冲蛋白胨水:见 A.11。

第一法 单核细胞增生李斯特氏菌定性检验

4 检验程序

单核细胞增生李斯特氏菌定性检验程序见图 1。

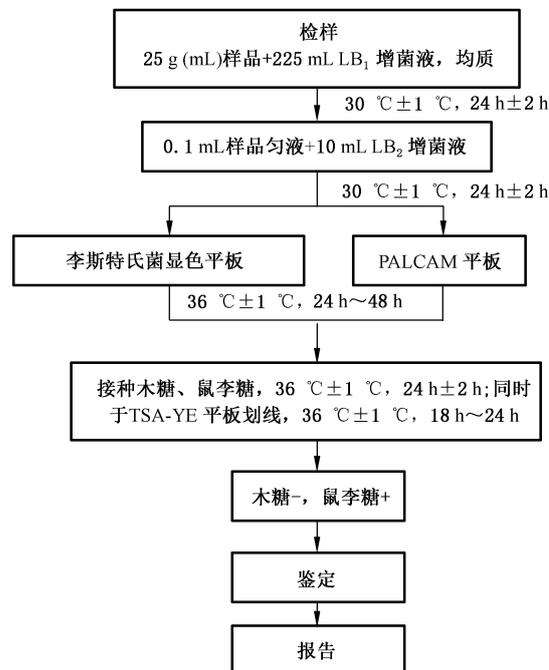


图 1 单核细胞增生李斯特氏菌定性检验程序

5 操作步骤

5.1 增菌

以无菌操作取样品 25 g(mL)加入到含有 225 mL LB₁ 增菌液的均质袋中,在拍击式均质器上连续均质 1 min~2 min;或放入盛有 225 mL LB₁ 增菌液的均质杯中,以 8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min。于 30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h,移取 0.1 mL,转种于 10 mL LB₂ 增菌液内,于 30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h。

5.2 分离

取 LB₂ 二次增菌液划线接种于李斯特氏菌显色平板和 PALCAM 琼脂平板,于 36 ℃±1 ℃培养 24 h~48 h,观察各个平板上生长的菌落。典型菌落在 PALCAM 琼脂平板上为小的圆形灰绿色菌落,周围有棕黑色水解圈,有些菌落有黑色凹陷;在李斯特氏菌显色平板上的菌落特征,参照产品说明进行判定。

5.3 初筛

自选择性琼脂平板上分别挑取 3 个~5 个典型或可疑菌落,分别接种木糖、鼠李糖发酵管,于 36 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h,同时在 TSA-YE 平板上划线,于 36 ℃±1 ℃培养 18 h~24 h,然后选择木糖阴性、鼠李糖阳性的纯培养物继续进行鉴定。

5.4 鉴定(或选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物鉴定系统等)

5.4.1 染色镜检:李斯特氏菌为革兰氏阳性短杆菌,大小为(0.4 μm~0.5 μm)×(0.5 μm~2.0 μm);用生理盐水制成菌悬液,在油镜或相差显微镜下观察,该菌出现轻微旋转或翻滚样的运动。

5.4.2 动力试验:挑取纯培养的单个可疑菌落穿刺半固体或 SIM 动力培养基,于 25 ℃~30 ℃培养 48 h,李斯特氏菌有动力,在半固体或 SIM 培养基上方呈伞状生长,如伞状生长不明显,可继续培养 5 d,再观察结果。

5.4.3 生化鉴定:挑取纯培养的单个可疑菌落,进行过氧化氢酶试验,过氧化氢酶阳性反应的菌落继续进行糖发酵试验和 MR-VP 试验。单核细胞增生李斯特氏菌的主要生化特征见表 1。

5.4.4 溶血试验:将新鲜的羊血琼脂平板底面划分为 20 个~25 个小格,挑取纯培养的单个可疑菌落刺种到血平板上,每格刺种一个菌落,并刺种阳性对照菌(单增李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌和斯氏李斯特氏菌)和阴性对照菌(英诺克李斯特氏菌),穿刺时尽量接近底部,但不要触到底面,同时避免琼脂破裂,36 ℃±1 ℃培养 24 h~48 h,于明亮处观察,单增李斯特氏菌呈现狭窄、清晰、明亮的溶血圈,斯氏李斯特氏菌在刺种点周围产生弱的透明溶血圈,英诺克李斯特氏菌无溶血圈,伊氏李斯特氏菌产生宽的、轮廓清晰的 β-溶血区域,若结果不明显,可置 4 ℃冰箱 24 h~48 h 再观察。

注:也可用划线接种法。

5.4.5 协同溶血试验 cAMP(可选项目):在羊血琼脂平板上平行划线接种金黄色葡萄球菌和马红球菌,挑取纯培养的单个可疑菌落垂直划线接种于平行线之间,垂直线两端不要触及平行线,距离 1 mm~2 mm,同时接种单核细胞增生李斯特氏菌、英诺克李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌和斯氏李斯特氏菌,于 36 ℃±1 ℃培养 24 h~48 h。单核细胞增生李斯特氏菌在靠近金黄色葡萄球菌处出现约 2 mm 的 β-溶血增强区域,斯氏李斯特氏菌也出现微弱的溶血增强区域,伊氏李斯特氏菌在靠近马红球菌处出现约 5 mm~10 mm 的“箭头状”β-溶血增强区域,英诺克李斯特氏菌不产生溶血现象。若结果不明显,可置 4 ℃冰箱 24 h~48 h 再观察。

注:5%~8%的单核细胞增生李斯特氏菌在马红球菌一端有溶血增强现象。

表 1 单核细胞增生李斯特氏菌生化特征与其他李斯特氏菌的区别

菌种	溶血反应	葡萄糖	麦芽糖	MR-VP	甘露醇	鼠李糖	木糖	七叶苷
单核细胞增生李斯特氏菌 (<i>L. monocytogenes</i>)	+	+	+	+/+	-	+	-	+
格氏李斯特氏菌 (<i>L. grayi</i>)	-	+	+	+/+	+	-	-	+
斯氏李斯特氏菌 (<i>L. seeligeri</i>)	+	+	+	+/+	-	-	+	+
威氏李斯特氏菌 (<i>L. welshimeri</i>)	-	+	+	+/+	-	V	+	+
伊氏李斯特氏菌 (<i>L. ivanovii</i>)	+	+	+	+/+	-	-	+	+
英诺克李斯特氏菌 (<i>L. innocua</i>)	-	+	+	+/+	-	V	-	+

注：+阳性；-阴性；V反应不定。

5.5 小鼠毒力试验(可选项目)

将符合上述特性的纯培养物接种于 TSB-YE 中,于 36 °C ±1 °C 培养 24 h,4 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用无菌生理盐水制备成浓度为 10¹⁰ CFU/mL 的菌悬液,取此菌悬液对 3 只~5 只小鼠进行腹腔注射,每只 0.5 mL,同时观察小鼠死亡情况。接种致病株的小鼠于 2 d~5 d 内死亡。试验设单增李斯特氏菌致病株和灭菌生理盐水对照组。单核细胞增生李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌对小鼠有致病性。

5.6 结果与报告

综合以上生化试验和溶血试验的结果,报告 25 g(mL)样品中检出或未检出单核细胞增生李斯特氏菌。

第二法 单核细胞增生李斯特氏菌平板计数法

6 检验程序

单核细胞增生李斯特氏菌平板计数程序见图 2。

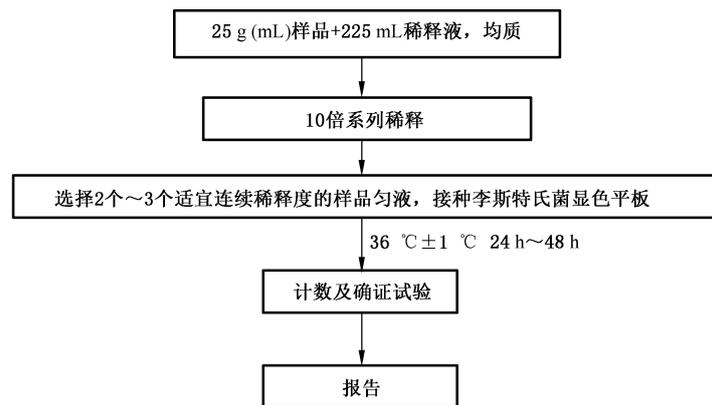


图 2 单核细胞增生李斯特氏菌平板计数程序

7 操作步骤

7.1 样品的稀释

7.1.1 以无菌操作称取样品 25 g(mL),放入盛有 225 mL 缓冲蛋白胨水或无添加剂的 LB 肉汤的无菌均质袋内(或均质杯)内,在拍击式均质器上连续均质 1 min~2 min 或以 8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min。液体样品,振荡混匀,制成 1:10 的样品匀液。

7.1.2 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 缓冲蛋白胨水或无添加剂的 LB 肉汤的无菌试管中(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 1 mL 无菌吸管反复吹打使其混合均匀,制成 1:100 的样品匀液。

7.1.3 按 7.1.2 操作程序,制备 10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释 1 次,换用 1 支 1 mL 无菌吸管或吸头。

7.2 样品的接种

根据对样品污染状况的估计,选择 2 个~3 个适宜连续稀释度的样品匀液(液体样品可包括原液),每个稀释度的样品匀液分别吸取 1 mL 以 0.3 mL、0.3 mL、0.4 mL 的接种量分别加入 3 块李斯特氏菌显色平板,用无菌 L 棒涂布整个平板,注意不要触及平板边缘。使用前,如琼脂平板表面有水珠,可放在 25 °C~50 °C 的培养箱里干燥,直到平板表面的水珠消失。

7.3 培养

7.3.1 在通常情况下,涂布后,将平板静置 10 min,如样液不易吸收,可将平板放在培养箱 36 °C ± 1 °C 培养 1 h;等样品匀液吸收后翻转平皿,倒置于培养箱,36 °C ± 1 °C 培养 24 h~48 h。

7.4 典型菌落计数和确认

7.4.1 单核细胞增生李斯特氏菌在李斯特氏菌显色平板上的菌落特征以产品说明为准。

7.4.2 选择有典型单核细胞增生李斯特氏菌菌落的平板,且同一稀释度 3 个平板所有菌落数合计在 15 CFU~150 CFU 之间的平板,计数典型菌落数。如果:

- 只有一个稀释度的平板菌落数在 15 CFU~150 CFU 之间且有典型菌落,计数该稀释度平板上的典型菌落;
- 所有稀释度的平板菌落数均小于 15 CFU 且有典型菌落,应计数最低稀释度平板上的典型

菌落；

- c) 某一稀释度的平板菌落数大于 150 CFU 且有典型菌落,但下一稀释度平板上没有典型菌落,应计数该稀释度平板上的典型菌落；
- d) 所有稀释度的平板菌落数大于 150 CFU 且有典型菌落,应计数最高稀释度平板上的典型菌落；
- e) 所有稀释度的平板菌落数均不在 15 CFU~150 CFU 之间且有典型菌落,其中一部分小于 15 CFU 或大于 150 CFU 时,应计数最接近 15 CFU 或 150 CFU 的稀释度平板上的典型菌落。

以上按式(1)计算。

- f) 2 个连续稀释度的平板菌落数均在 15 CFU~150 CFU 之间,按式(2)计算。

7.4.3 从典型菌落中任选 5 个菌落(小于 5 个全选),分别按 5.3、5.4 进行鉴定。

8 结果计数

$$T = \frac{AB}{Cd} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

- T ——样品中单核细胞增生李斯特氏菌菌落数；
- A ——某一稀释度典型菌落的总数；
- B ——某一稀释度确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数；
- C ——某一稀释度用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数；
- d ——稀释因子。

$$T = \frac{A_1B_1/C_1 + A_2B_2/C_2}{1.1d} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中：

- T ——样品中单核细胞增生李斯特氏菌菌落数；
- A_1 ——第一稀释度(低稀释倍数)典型菌落的总数；
- B_1 ——第一稀释度(低稀释倍数)确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数；
- C_1 ——第一稀释度(低稀释倍数)用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数；
- A_2 ——第二稀释度(高稀释倍数)典型菌落的总数；
- B_2 ——第二稀释度(高稀释倍数)确证为单核细胞增生李斯特氏菌的菌落数；
- C_2 ——第二稀释度(高稀释倍数)用于单核细胞增生李斯特氏菌确证试验的菌落数；
- 1.1 ——计算系数；
- d ——稀释因子(第一稀释度)。

9 结果报告

报告每 g(mL)样品中单核细胞增生李斯特氏菌菌数,以 CFU/g(mL)表示;如 T 值为 0,则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。

第三法 单核细胞增生李斯特氏菌 MPN 计数法

10 检验程序

单核细胞增生李斯特氏菌 MPN 计数法检验程序见图 3。

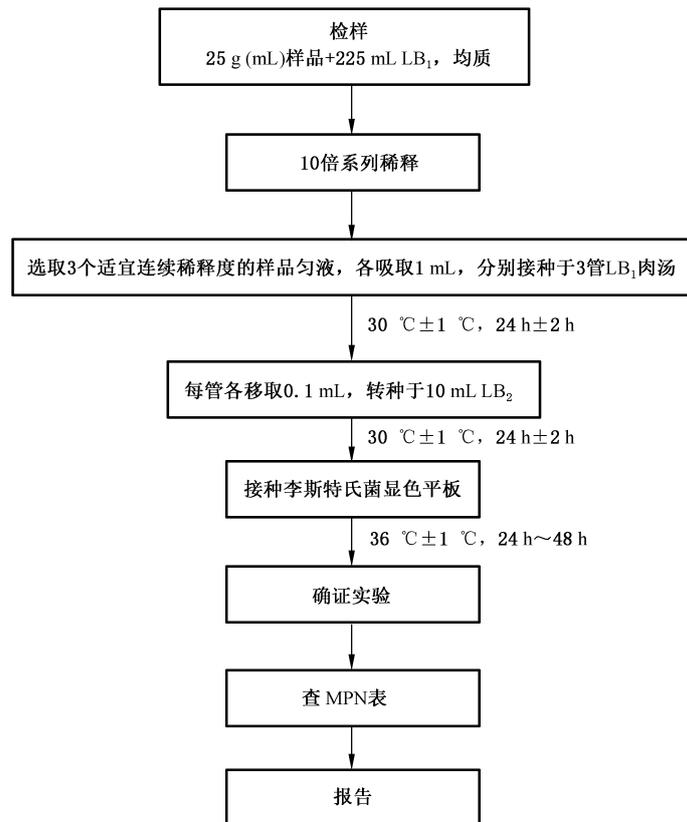


图3 单核细胞增生李斯特氏菌 MPN 计数程序

11 操作步骤

11.1 样品的稀释

按 7.1 进行。

11.2 接种和培养

11.2.1 根据对样品污染状况的估计,选取 3 个适宜连续稀释度的样品匀液(液体样品可包括原液),接种于 10 mL LB₁ 肉汤,每一稀释度接种 3 管,每管接种 1 mL(如果接种量需要超过 1 mL,则用双料 LB₁ 增菌液)于 30 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h。每管各移取 0.1 mL,转种于 10 mL LB₂ 增菌液内,于 30 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h。

11.2.2 用接种环从各管中移取 1 环,接种李斯特氏菌显色平板,36 °C ± 1 °C 培养 24 h ~ 48 h。

11.3 确证试验

自每块平板上挑取 5 个典型菌落(5 个以下全选),按照 5.3、5.4 进行鉴定。

12 结果与报告

根据证实为单核细胞增生李斯特氏菌阳性的试管管数,查 MPN 检索表(见附录 B),报告每 g(mL) 样品中单核细胞增生李斯特氏菌的最可能数,以 MPN/g(mL)表示。

附 录 A

培养基和试剂

A.1 含 0.6% 酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤 (TSB-YE)

A.1.1 成分

胰胨	17.0 g
多价胨	3.0 g
酵母膏	6.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将上述各成分加热搅拌溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,分装,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.2 含 0.6% 酵母膏的胰酪胨大豆琼脂 (TSA-YE)

A.2.1 成分

胰胨	17.0 g
多价胨	3.0 g
酵母膏	6.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

将上述各成分加热搅拌溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,分装,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.3 李氏增菌肉汤 (LB₁, LB₂)

A.3.1 成分

胰胨	5.0 g
多价胨	5.0 g
酵母膏	5.0 g
氯化钠	20.0 g
磷酸二氢钾	1.4 g

磷酸氢二钠	12.0 g
七叶苷	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

将上述成分加热溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,分装,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.3.2.1 李氏 I 液 (LB₁)225 mL 中加入:

1% 萘啶酮酸 (用 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液配制)	0.5 mL
1% 吡啶黄 (用无菌蒸馏水配制)	0.3 mL

A.3.2.2 李氏 II 液 (LB₂)200 mL 中加入:

1% 萘啶酮酸	0.4 mL
1% 吡啶黄	0.5 mL

A.4 PALCAM 琼脂

A.4.1 成分

酵母膏	8.0 g
葡萄糖	0.5 g
七叶甙	0.8 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
甘露醇	10.0 g
酚红	0.1 g
氯化锂	15.0 g
酪蛋白胰酶消化物	10.0 g
心胰酶消化物	3.0 g
玉米淀粉	1.0 g
肉胃酶消化物	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

将上述成分加热溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,分装,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.4.2.1 PALCAM 选择性添加剂

多粘菌素 B	5.0 mg
盐酸吡啶黄	2.5 mg
头孢他啶	10.0 mg
无菌蒸馏水	500 mL

A.4.2.2 制法

将 PALCAM 基础培养基溶化后冷却到 50 °C,加入 2 mL PALCAM 选择性添加剂,混匀后倾倒在无菌的平皿中,备用。

A.5 革兰氏染色液

A.5.1 结晶紫染色液

A.5.1.1 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.5.1.2 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.5.2 革兰氏碘液

A.5.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

A.5.2.2 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.5.3 沙黄复染液

A.5.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.5.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.5.4 染色法

A.5.4.1 涂片用火焰固定后滴加结晶紫染液,作用 1 min,水洗。

A.5.4.2 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。

A.5.4.3 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.5.4.4 滴加复染液,复染 1 min,水洗、待干、镜检。

A.6 SIM 动力培养基

A.6.1 成分

胰胨	20.0 g
多价胨	6.0 g

硫酸铁铵	0.2 g
硫代硫酸钠	0.2 g
琼脂	3.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制法

将上述各成分加热混匀,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,分装小试管,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.6.3 试验方法

挑取纯培养的单个可疑菌落穿刺接种到 SIM 培养基中,于 25 °C ~ 30 °C 培养 48 h,观察结果。

A.7 缓冲葡萄糖蛋白胨水(MR 和 VP 试验用)

A.7.1 成分

多价胨	7.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钾	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

溶化后调节 pH 至 7.0 ± 0.2 ,分装试管,每管 1 mL,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.7.3 甲基红(MR)试验

A.7.3.1 甲基红试剂

A.7.3.1.1 成分

甲基红	10 mg
95%乙醇	30 mL
蒸馏水	20 mL

A.7.3.1.2 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.7.3.1.3 试验方法

取适量琼脂培养物接种于缓冲葡萄糖蛋白胨水中,36 °C \pm 1 °C 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.7.4 V-P 试验

A.7.4.1 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.7.4.2 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.7.4.3 试验方法

取适量琼脂培养物接种于缓冲葡萄糖蛋白胨水中,36 °C±1 °C 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 °C±1 °C 继续培养 1 h 再进行观察。

A.8 血琼脂

A.8.1 成分

蛋白胨	1.0 g
牛肉膏	0.3 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	1.5 g
蒸馏水	100 mL
脱纤维羊血	5 mL~8 mL

A.8.2 制法

除新鲜脱纤维羊血外,加热溶化上述各组分,121 °C 高压灭菌 15 min,冷到 50 °C,以无菌操作加入新鲜脱纤维羊血,摇匀,倾注平板。

A.9 糖发酵管

A.9.1 成分

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	3.0 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.0 g
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.9.2 制法

A.9.2.1 葡萄糖发酵管按上述成分配好后,按 0.5% 比例加入葡萄糖,分装于有一个倒置小管的小试管内,调节 pH 至 7.4,115 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.9.2.2 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 高压灭菌 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,以无菌操作分装于含倒置小管的小试管中。或按照 A.9.2.1 葡萄糖发酵管的配制方法制备其他糖类发酵管。

A.9.3 试验方法

取适量纯培养物接种于糖发酵管,36 °C±1 °C 培养 24 h~48 h,观察结果,蓝色为阴性,黄色为

阳性。

A.10 过氧化氢酶试验

A.10.1 试剂

3%过氧化氢溶液:临用时配制。

A.10.2 试验方法

用细玻璃棒或一次性接种针挑取单个菌落,置于洁净玻璃平皿内,滴加3%过氧化氢溶液2滴,观察结果。

A.10.3 结果

于半分钟内发生气泡者为阳性,不发生气泡者为阴性。

A.11 缓冲蛋白胨水(BPW)

A.11.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.11.2 制法

加热搅拌至溶解,调节pH至 7.2 ± 0.2 ,121℃高压灭菌15 min。

附录 B

单核细胞增生李斯特氏菌最可能数(MPN)检索表

每 g(mL) 检样中单核细胞增生李斯特氏菌最可能数(MPN)检索表见表 B.1。

表 B.1 单核细胞增生李斯特氏菌最可能数(MPN)检索表

阳性管数			MPN	95%置信区间		阳性管数			MPN	95%置信区间	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	—	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1 000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1 000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2 000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1 100	180	4 100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1 100	420	—

注 1: 本表采用 3 个稀释度[0.1 g(mL)、0.01 g(mL)和 0.001 g(mL)]、每个稀释度接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1 g(mL)、0.1 g(mL)和 0.01 g(mL)时,表内数字应相应降低 10 倍;如改用 0.01 g(mL)、0.001 g(mL)、0.000 1 g(mL)时,则表内数字应相应增高 10 倍,其余类推。



中华人民共和国国家标准

GB 4789.40—2016

食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会
国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB 4789.40—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验》、SN/T 1632.1—2013《出口奶粉中阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)检验方法 第1部分:分离与计数》。

本标准与 GB 4789.40—2010 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 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验”;
- 修改了可疑菌落的挑取数量。

食品安全国家标准

食品微生物学检验

克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验

1 范围

本标准规定了食品中克罗诺杆菌属(*Cronobacter*)的检验方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品、乳和乳制品及其原料中克罗诺杆菌属的检验。

2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

- 2.1 恒温培养箱:25℃±1℃,36℃±1℃,44℃±0.5℃。
- 2.2 冰箱:2℃~5℃。
- 2.3 恒温水浴箱:44℃±0.5℃。
- 2.4 天平:感量0.1g。
- 2.5 均质器。
- 2.6 振荡器。
- 2.7 无菌吸管:1mL(具0.01mL刻度)、10mL(具0.1mL刻度)或微量移液器及吸头。
- 2.8 无菌锥形瓶:容量100mL、200mL、2000mL。
- 2.9 无菌培养皿:直径90mm。
- 2.10 pH计或pH比色管或精密pH试纸。
- 2.11 全自动微生物生化鉴定系统。

3 培养基和试剂

- 3.1 缓冲蛋白胨水(buffer peptone water,BPW):见A.1。
- 3.2 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素(modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium,mLST-Vm):见A.2。
- 3.3 阪崎肠杆菌显色培养基。
- 3.4 胰蛋白胨大豆琼脂(trypticase soy agar,TSA):见A.3。
- 3.5 生化鉴定试剂盒。
- 3.6 氧化酶试剂:见A.4。
- 3.7 L-赖氨酸脱羧酶培养基:见A.5。
- 3.8 L-鸟氨酸脱羧酶培养基:见A.6。
- 3.9 L-精氨酸双水解酶培养基:见A.7。
- 3.10 糖类发酵培养基:见A.8。
- 3.11 西蒙氏柠檬酸盐培养基:见A.9。

第一法 克罗诺杆菌属定性检验

4 检验程序

克罗诺杆菌属检验程序见图 1。

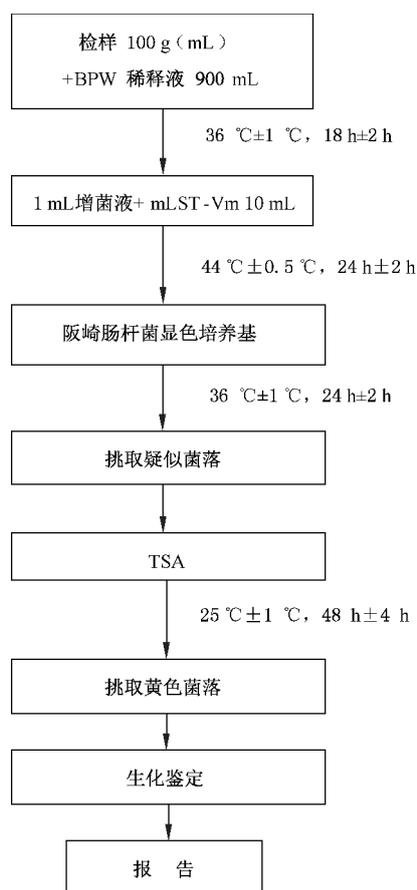


图 1 克罗诺杆菌属检验程序

5 操作步骤

5.1 前增菌和增菌

取检样 100 g(mL)置灭菌锥形瓶中,加入 900 mL 已预热至 44 °C 的缓冲蛋白胨水,用手缓缓地摇动至充分溶解,36 °C±1 °C 培养 18 h±2 h。移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤,44 °C±0.5 °C 培养 24 h±2 h。

5.2 分离

5.2.1 轻轻混匀 mLST-Vm 肉汤培养物,各取增菌培养物 1 环,分别划线接种于两个阪崎肠杆菌显色培养基平板,显色培养基须符合 GB 4789.28 的要求,36 °C±1 °C 培养 24 h±2 h,或按培养基要求条件

培养。

5.2.2 挑取至少 5 个可疑菌落,不足 5 个时挑取全部可疑菌落,划线接种于 TSA 平板。25 °C ± 1 °C 培养 48 h ± 4 h。

5.3 鉴定

自 TSA 平板上直接挑取黄色可疑菌落,进行生化鉴定。克罗诺杆菌属的主要生化特征见表 1。可选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统。

表 1 克罗诺杆菌属的主要生化特征

生化试验		特 征
黄色素产生		+
氧化酶		-
L-赖氨酸脱羧酶		-
L-鸟氨酸脱羧酶		(+)
L-精氨酸双水解酶		+
柠檬酸水解		(+)
发酵	D-山梨醇	(-)
	L-鼠李糖	+
	D-蔗糖	+
	D-蜜二糖	+
	苦杏仁甙	+
注: + > 99% 阳性; - > 99% 阴性; (+) 90% ~ 99% 阳性; (-) 90% ~ 99% 阴性。		

6 结果与报告

综合菌落形态和生化特征,报告每 100 g(mL)样品中检出或未检出克罗诺杆菌属。

第二法 克罗诺杆菌属的计数

7 操作步骤

7.1 样品的稀释

7.1.1 固体和半固体样品:无菌称取样品 100 g、10 g、1 g 各三份,分别加入 900 mL、90 mL、9 mL 已预热至 44 °C 的 BPW,轻轻振摇使充分溶解,制成 1 : 10 样品匀液,置 36 °C ± 1 °C 培养 18 h ± 2 h。分别移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤,44 °C ± 0.5 °C 培养 24 h ± 2 h。

7.1.2 液体样品:以无菌吸管分别取样品 100 mL、10 mL、1 mL 各三份,分别加入 900 mL、90 mL、9 mL 已预热至 44 °C 的 BPW,轻轻振摇使充分混匀,制成 1 : 10 样品匀液,置 36 °C ± 1 °C 培养 18 h ± 2 h。分别移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤,44 °C ± 0.5 °C 培养 24 h ± 2 h。

7.2 分离、鉴定

同 5.2 和 5.3。

8 结果与报告

综合菌落形态、生化特征,根据证实为克罗诺杆菌属的阳性管数,查 MPN 检索表,报告每 100 g (mL)样品中克罗诺杆菌属的 MPN 值(见表 B.1)。

附录 A 培养基和试剂

A.1 缓冲蛋白胨水(BPW)

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

加热搅拌至溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 , $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.2 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素(Modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium,mLST-Vm)

A.2.1 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨(mLST)肉汤

A.2.1.1 成分

氯化钠	34.0 g
胰蛋白胨	20.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸二氢钾	2.75 g
磷酸氢二钾	2.75 g
十二烷基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.1.2 制法

加热搅拌至溶解,调节 pH 至 6.8 ± 0.2 。分装每管 10 mL, $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.2.2 万古霉素溶液

A.2.2.1 成分

万古霉素	10.0 mg
蒸馏水	10.0 mL

A.2.2.2 制法

10.0 mg 万古霉素溶解于 10.0 mL 蒸馏水,过滤除菌。万古霉素溶液可以在 $0\text{ }^\circ\text{C} \sim 5\text{ }^\circ\text{C}$ 保存 15 d。

A.2.3 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素 (Modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium, mLST-Vm)

每 10 mL mLST 加入万古霉素溶液 0.1 mL, 混合液中万古霉素的终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

注: mLST-Vm 必须在 24 h 之内使用。

A.3 胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA)

A.3.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
植物蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

加热搅拌至溶解, 煮沸 1 min, 调节 pH 至 7.3 ± 0.2 , 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压 15 min。

A.4 氧化酶试剂

A.4.1 成分

<i>N,N,N',N'</i> -四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
蒸馏水	100 mL

A.4.2 制法

少量新鲜配制, 于冰箱内避光保存, 在 7 d 之内使用。

A.4.3 试验方法

用玻璃棒或一次性接种针挑取单个特征性菌落, 涂布在氧化酶试剂湿润的滤纸平板上。如果滤纸在 10 s 中之内未变为紫红色、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.5 L-赖氨酸脱羧酶培养基

A.5.1 成分

L-赖氨酸盐酸盐 (L-lysine monohydrochloride)	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

将各成分加热溶解, 必要时调节 pH 至 6.8 ± 0.2 。每管分装 5 mL, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压 15 min。

A.5.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-赖氨酸脱羧酶培养基,刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h,观察结果。L-赖氨酸脱羧酶试验阳性者,培养基呈紫色,阴性者为黄色,空白对照管为紫色。

A.6 L-鸟氨酸脱羧酶培养基

A.6.1 成分

L-鸟氨酸盐酸盐(L-ornithine monohydrochloride)	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH 至 6.8±0.2。每管分装 5 mL。121 ℃高压 15 min。

A.6.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-鸟氨酸脱羧酶培养基,刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h,观察结果。L-鸟氨酸脱羧酶试验阳性者,培养基呈紫色,阴性者为黄色。

A.7 L-精氨酸双水解酶培养基

A.7.1 成分

L-精氨酸盐酸盐(L-arginine monohydrochloride)	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH 至 6.8±0.2。每管分装 5 mL。121 ℃高压 15 min。

A.7.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-精氨酸脱羧酶培养基,刚好在液体培养基的液面下。30 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h,观察结果。L-精氨酸脱羧酶试验阳性者,培养基呈紫色,阴性者为黄色。

A.8 糖类发酵培养基

A.8.1 基础培养基

A.8.1.1 成分

酪蛋白(酶消化)	10.0 g
----------	--------

氯化钠	5.0 g
酚红	0.02 g
蒸馏水	1 000 mL

A.8.1.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH 至 6.8 ± 0.2 。每管分装 5 mL。121 °C 高压 15 min。

A.8.2 糖类溶液(D-山梨醇、L-鼠李糖、D-蔗糖、D-蜜二糖、苦杏仁甙)

A.8.2.1 成分

糖	8.0 g
蒸馏水	100 mL

A.8.2.2 制法

分别称取 D-山梨醇、L-鼠李糖、D-蔗糖、D-蜜二糖、苦杏仁甙等糖类成分各 8 g,溶于 100 mL 蒸馏水中,过滤除菌,制成 80 mg/mL 的糖类溶液。

A.8.3 完全培养基

A.8.3.1 成分

基础培养基	875 mL
糖类溶液	125 mL

A.8.3.2 制法

无菌操作,将每种糖类溶液加入基础培养基,混匀;分装到无菌试管中,每管 10 mL。

A.8.4 实验方法

挑取培养物接种于各种糖类发酵培养基,刚好在液体培养基的液面下。30 °C \pm 1 °C 培养 24 h \pm 2 h,观察结果。糖类发酵试验阳性者,培养基呈黄色,阴性者为红色。

A.9 西蒙氏柠檬酸盐培养基

A.9.1 成分

柠檬酸钠	2.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
磷酸二氢铵	1.0 g
硫酸镁	0.2 g
溴麝香草酚蓝	0.08 g
琼脂	8.0 g~18.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.9.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH 至 6.8 ± 0.2 。每管分装 10 mL,121 °C 高压 15 min,制成斜面。

A.9.3 实验方法

挑取培养物接种于整个培养基斜面,36℃±1℃培养24h±2h,观察结果。阳性者培养基变为蓝色。

附录 B

克罗诺杆菌属最可能数(MPN)检索表

每 100 g(mL) 检样中克罗诺杆菌属最可能数(MPN)的检索见表 B.1。

表 B.1 克罗诺杆菌属最可能数(MPN)检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
100	10	1		下限	上限	100	10	1		下限	上限
0	0	0	<0.3	—	0.95	2	2	0	2.1	0.45	4.2
0	0	1	0.3	0.015	0.96	2	2	1	2.8	0.87	9.4
0	1	0	0.3	0.015	1.1	2	2	2	3.5	0.87	9.4
0	1	1	0.61	0.12	1.8	2	3	0	2.9	0.87	9.4
0	2	0	0.62	0.12	1.8	2	3	1	3.6	0.87	9.4
0	3	0	0.94	0.36	3.8	3	0	0	2.3	0.46	9.4
1	0	0	0.36	0.017	1.8	3	0	1	3.8	0.87	11
1	0	1	0.72	0.13	1.8	3	0	2	6.4	1.7	18
1	0	2	1.1	0.36	3.8	3	1	0	4.3	0.9	18
1	1	0	0.74	0.13	2	3	1	1	7.5	1.7	20
1	1	1	1.1	0.36	3.8	3	1	2	12	3.7	42
1	2	0	1.1	0.36	4.2	3	1	3	16	4	42
1	2	1	1.5	0.45	4.2	3	2	0	9.3	1.8	42
1	3	0	1.6	0.45	4.2	3	2	1	15	3.7	42
2	0	0	0.92	0.14	3.8	3	2	2	21	4	43
2	0	1	1.4	0.36	4.2	3	2	3	29	9	100
2	0	2	2	0.45	4.2	3	3	0	24	4.2	100
2	1	0	1.5	0.37	4.2	3	3	1	46	9	200
2	1	1	2	0.45	4.2	3	3	2	110	18	410
2	1	2	2.7	0.87	9.4	3	3	3	>110	42	—

注 1: 本表采用 3 个检样量[100 g(mL)、10 g(mL)和 1 g(mL)],每个检样量接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1 000 g(mL)、100 g(mL)和 10 g(mL)时,表内数字应相应降低 10 倍;如改用 10 g(mL)、1 g(mL)和 0.1 g(mL)时,则表内数字应相应增高 10 倍,其余类推。

文件编号：WU-ISCMS-QM 20215977

版本号：V 2.0

受控状态：

分发号：

分子科学公共实验平台

质量管理文件

荧光光谱仪 Edinburgh Instruments
FS5 标准操作规程

2019 年 11 月 18 日发布

年 月 日实施

分子科学公共实验平台 发布

修订页

修订日期	版本号	修订说明	修订	审核	批准
2019.11.18	V1.0	发布试行	陈中	卢星宇	
2020.02.21	V1.1	完善优化内容	陈中		
2022.01.17	V2.0	完善优化内容	顾丹玉	陈银娟	卢星宇

分子科学公共实验平台

目 录

1. 目的	1
2. 范围	1
3. 职责	1
4. 光谱实验室人员职责和安全管理规范	1
5. 光谱实验室仪器设备管理规范	2
5.1 爱丁堡 FS5 荧光光谱仪使用制度	3
5.2 爱丁堡 FS5 荧光光谱仪预约制度	3
5.3 爱丁堡 FS5 荧光光谱仪培训考核制度	4
6. 内容	4
6.1 样品准备	5
6.2 开机和启动软件	5
6.3 仪器操作	6
6.4 发射光谱扫描	8
6.5 激发光谱扫描	8
6.6 透射光谱扫描	9
6.7 同步光谱扫描	9
6.8 三维荧光 Map 扫描	10
6.9 Multiple Scan	11
7. 相关/支撑性文件	12
8. 记录	12
附录 1. 固体样品支架更换步骤	13
附录 2. 粉末样品装样步骤	13

1. 目的

建立爱丁堡 FS5 荧光光谱仪的标准使用操作规程, 使其被正确、规范地使用。

2. 范围

本规程适用于所有使用爱丁堡 FS5 荧光光谱仪的用户。

3. 职责

3.1 用户: 严格按本程序操作, 发现异常情况及时汇报实验室技术员。

3.2 实验室技术员: 确保操作人员经过相关培训, 并按本规程进行操作。

3.3 文章致谢格式

根据学校指导意见, 使用各校级平台仪器设备表征产生的科研成果必须致谢平台。如果您在文章成果中使用了光谱、色质谱、磁共振波谱以及其他属于分子科学平台的仪器设备, 请务必在文末致谢分子科学公共实验平台。

英文文章致谢:

① Acknowledgement: The author thanks (Dr. XXX from) Instrumentation and Service Center for Molecular Sciences at Westlake University for (the assistance/discussion/supporting in) ... measurement/data interpretation.

② Coauthorship on the resulting publications would be appreciated if our staff make technical contributions (including but not limited to critical sample preparation, novel experiment designation and comprehensive data analyzation).

Affiliation address: "Key Laboratory of Precise Synthesis of Functional Molecules of Zhejiang Province, School of Science, Instrumentation and Service Center for Molecular Sciences, Westlake University, 18 Shilongshan Road, Hangzhou 310024, Zhejiang Province, China."

中文文章致谢:

① 致谢: 感谢西湖大学分子科学公共实验室平台 XXX 博士(或者 XXX 老师)在.....表征或数据分析上提供的帮助。

② 共同作者: 如果分子科学平台老师在您课题组样品表征或文章发表上有重要技术贡献(包括但不限于关键样品制备、新型实验设计和深度数据分析), 我们感谢您将相关老师列为共同作者, 作者单位地址如下: 西湖大学, 分子科学公共实验平台, 功能分子与精准合成浙江省重点实验室, 杭州, 310030, 浙江。

4. 光谱实验室人员职责和安全管理规范

- 4.1 相关人员进入实验室之前必须通过学校、中心和平台的安全考试或考核, 并严格遵守光谱实验室的各项安全注意警示标识。严禁无关人员进入实验室。
- 4.2 平台设备须经培训考核后方可操作, 严格遵守仪器操作规程并做好实验记录, 未经考核者严禁触碰和使用仪器。
- 4.3 请按制样要求进行测试或送样, 因样品不符合上机要求造成仪器损坏的, 无论独立上机或是委托测试, 都将由用户所在课题组承担责任。
- 4.4 实验室通道及消防紧急通道必须保持畅通, 所有实验人员应了解消防器材与紧急逃生通道位置, 并应掌握消防器材的正确操作。
- 4.5 使用化学试剂或药品前, 必须了解其物理化学性质、毒性及防护方法, 使用时必须进行个人防范措施。
- 4.6 使用液氮时应穿戴实验服、护目镜和防冻手套。
- 4.7 使用烘箱请先联系技术员, 烘箱用完请及时取走样品, 烘箱不可过夜操作。
- 4.8 使用实验室气瓶, 须经实验室技术员培训指导后方可操作。
- 4.9 严禁戴手套接触门把手。禁止随意丢弃实验废弃物。禁止将锐器、玻璃、枪头丢弃在常规垃圾箱中。
- 4.10 使用激光、射线设备及相关附件时, 应严格遵守设备操作规程, 在激光、射线设备附件未关闭之前, 禁止打开样品仓。使用射线设备时还需打开射线剂量报警器, 无关人员严禁进入控制区。
- 4.11 不可擅自做变温实验, 如有需求请务必联系技术员; 进行高温实验时须技术员在场方可进行。
- 4.12 实验室应保持整洁, 严禁摆放与实验无关的物品如食品和饮料。严禁在实验室进食与抽烟。严禁动物进入实验室。
- 4.13 个人 U 盘、移动硬盘等易带入病毒的存储设备不得与工作站电脑连接。
- 4.14 实验过程中如发现仪器设备及基础设施发生异常状况, 须及时向该仪器负责人或实验室负责人反馈。严禁擅自处理、调整仪器主要部件, 凡自行拆卸者一经发现将给予严重处罚。
- 4.15 保持实验室空气干燥, 在潮湿的季节应进行除湿, 至少每周检查一次除湿机是否有无积水。

5. 光谱实验室仪器设备管理规范

5.1 爱丁堡 FS5 荧光光谱仪使用制度

该仪器遵从学校“科研设施与公共仪器中心”对大型仪器设备实行的管理办法和“集中投入、统一管理、开放公用、资源共享”的建设原则，面向校内所有教学、科研单位开放使用；根据使用机时适当收取费用；并在保障校内使用的同时，面向社会开放。用户通过“共享管理系统”（以下简称大仪网）进行预约，并按照要求登记预约信息。送样预约要求如下：

1. 送样前与仪器负责老师沟通样品信息；
2. 测试结果请自行在大仪网送样记录中下载；
3. 样品如需回收请在测试后尽快取回，一周未取回平台将作化学废弃物处理。

5.2 爱丁堡 FS5 荧光光谱仪预约制度

为充分利用仪器效能、服务全校科研工作，根据测试内容与时间的不同，光谱实验室制定了 7*24 小时预约制度。根据预约制度可登陆大仪共享网站即时预约机时，包括周末；寒暑假及国庆假期将另行通知。

请严格遵守预约时间使用仪器，以免浪费机时。如需调换时间段，在技术员同意下可与其他使用者协商。因故不能在预约时间内测试者，请提前 30 分钟取消预约并通知技术员。恶意预约机时或有多次无故不遵预约时间的用户，实验室将进行批评教育、通报批评或取消上机资格等处罚。

预约时段		预约时间/每人	测试内容
周一至周日	自主测试 送样测试 维护/开发测试	无限制	1. 激发发射扫描 2. 透射光谱扫描 3. 同步光谱扫描 4. 三维荧光扫描 5. Multiply Scan

- (1) 校内使用者须经过技术员的实验操作培训，考核合格后方可上机使用；
- (2) 实验开始时务必在实验记录本上登记，结束时如实记录仪器状态；
- (3) 严禁擅自处理、拆卸、调整仪器主要部件。使用期间如仪器出现故障，使用者须及时通知技术员，以便尽快维修或报修，隐瞒不报者将被追究责任，加重处理；
- (4) 因人为原因造成仪器故障的（如硬件损坏），其导师课题组须承担维修费用；

- (5) 禁止在仪器工作站上删改原始数据, 不允许用 U 盘与移动硬盘直接拷贝。使用者应根据要求通过科研仪器网/数据服务器传送下载原始数据至本地电脑, 保存并做数据处理; 原始实验数据在本实验室电脑中保留 2 年。
- (6) 用户应保持实验区域的卫生清洁, 测试完毕请及时带走样品, 技术员不负责保管。使用者若违犯以上条例, 将酌情给予警告、通报批评、罚款及取消使用资格等惩罚措施。

5.3 爱丁堡 FS5 荧光光谱仪培训考核制度

校内教师、研究生均可提出预约申请, 由技术员安排时间进行培训, 培训内容包括仪器使用规章制度、送样须知及安全规范、基本硬件知识、标准操作规程 (自主测试) 及相应数据处理。

培训结束后, 两周内培训者需在管理人员监督下进行 3 次左右操作, 培训者根据自己的掌握程度, 联系技术员进行上机考核。初级考核合格后, 在管理人员监督下上机操作, 一周后复考;

实验室技术员认为培训者达到独立操作水平后, 给予培训者授权在所允许的范围内独立使用仪器。因人为操作错误导致仪器故障者, 除按要求承担维修费用之外, 还将给予重考惩罚、培训费翻倍等处罚。

对接受培训人员的核心要求:

- (1) 了解荧光光谱仪的基本原理及其应用的多学科背景知识;
- (2) 熟练掌握 Fluoracle 软件系统, 严格按照标准操作规程操作, 防止因人为操作不当造成仪器故障, 认真做好仪器的使用及故障记录。

6. 内容

***基理系统登陆

接入大仪网的仪器操作电脑均需要登陆基理锁屏界面。

- (1) 如图(a), 如界面显示“一卡通用户”, 请在 Account 输入预约者的一卡通账户, Password 栏输入相应账户密码, 点击 Submit;

注意: 如账号或密码输入错误, 请按键盘 Delete 键进行删除, 再重新输入; 禁止点击 Cancel, 否则仪器会自行关机。

- (2) 如图 (b), 如界面显示“LIMS User”, Account 显示 Administrator, 请与相关老师联系。



6.1 样品准备

- ① 溶液样品、薄膜样品、粉末样品均可测试。
- ② 溶液样品常量比色皿需 3 mL，微量比色皿约需 100 μL 溶液，溶液必须透光。
- ③ 粉末及薄膜样品的具体测试支架使用见附录。

重要提醒: 1) 送样人员必须对测试样品的合法性负责，未注明合法性和物理化学性质的样品不予测试。如测试过程中发现样品含毒品类非法样品，送样人将负法律责任。
 2) 由于用户的样品问题导致仪器异常或配件更换，所有责任将由用户及所在课题组或单位承担。

6.2 开机和启动软件

如图 6-1 所示，爱丁堡 FS5 荧光光谱仪的正面和右侧面，主机电源键在仪器右侧，开机时直接按下，即可打开仪器，显示图 6-2 的绿灯亮（左边）。



图 6-1 爱丁堡 FS5 荧光光谱仪的正面和右侧面

开电脑，登录大型仪器共享管理系统账号和密码。

打开软件 Fluoracle，注意打开软件和点亮氙灯是同步进行的（图 6-2 的右边白灯会亮），氙灯一般开机 20 分钟后保持稳定，不要频繁地打开和关闭软件。



图 6-2 电源开关显示灯和氙灯显示灯

软件初始化后，软件跳出 Signal Rate 对话框，可以开始实验。

6.3 仪器操作

本仪器只提供稳态荧光测试，瞬态荧光测试需在分子平台爱丁堡 FLS1000 稳态/瞬态荧光光谱仪上进行。

根据实验室需要，选择合适的固体样品支架，更换操作见附录 1 和附录 2。

如图 6-3，本仪器中光源【Source Light Path】和检测器【Detector Light Path】只有默认选择，无需调节。

【Signal Rate】对话框给出了三组信息，其中【Reference】为参比检测器的信号值，不能超过 4,000,000 a.u.，【Transmission】为吸收检测器的信号值，一般不能超过 2,000,000 a.u.

将 Excitation Wavelength 和 Emission Wavelength 的 Bandwidth（也就是狭缝）调到最小，一般为 0.01 或者 0.02，点击 Apply。

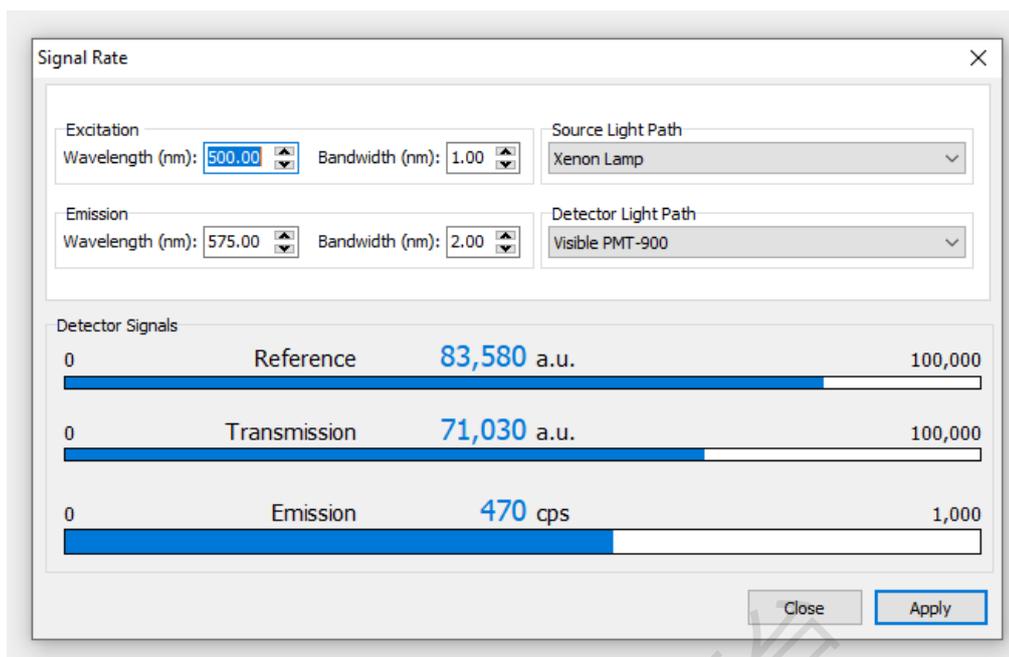


图 6-3 Signal Rate 对话框

将样品放入样品支架，固体样品测试需更换固体样品支架，具体操作见附录 1 和附录 2。固体样品容易产生散射信号，需要在发射端加高通滤光片，滤光片波长选择要大于激发波长（一般激发波长 Excitation Wavelength+15 nm），小于发射起始波长。

输入对应的 Excitation Wavelength (后续简写 Ex) 和 Emission Wavelength (后续简写 Em) 波长，调节 Ex 和 Em 狭缝，将 Emission 的信号调到合适值，Emission 信号强度不能超过 1,000,000 cps（一般调到 $10^5 \sim 10^6$ 即可）。

关闭【Signal Rate】，点击“λ”，选择测试方法 (图 6-4)。本仪器主要用到的测试方法包括【Emission Scan】、【Excitation Scan】、【Transmission Scan】、【Synchronous Scan】、【Emission Map】、【Synchronous Map】和【Multiple】。

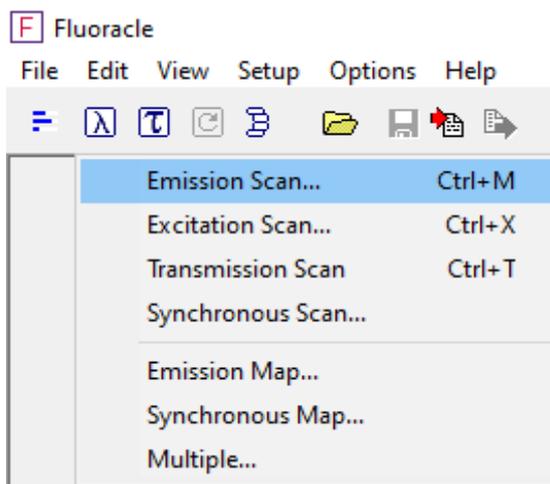


图 6-4 测试方法选择

6.4 发射光谱扫描

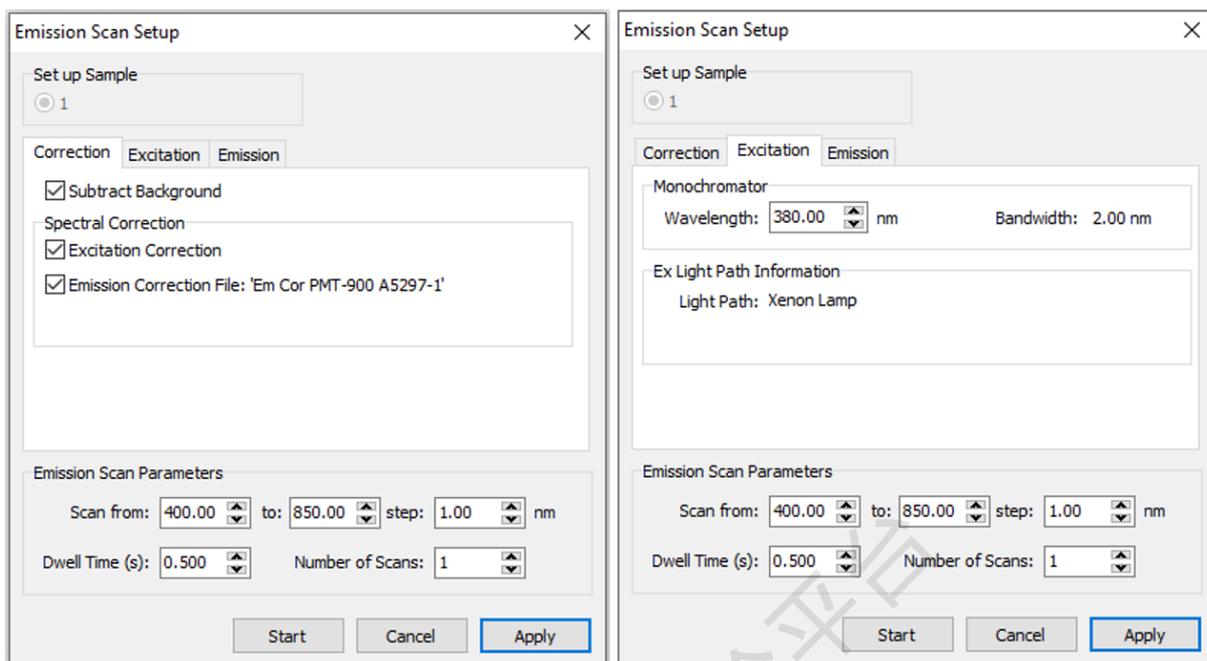


图 6-5 Emission Scan 参数设置

选中“λ”，点击【Emission Scan】，【Correction】校正文件全部勾选，勾选“Subtract Background”进行仪器背景信号矫正；“Excitation Correction”进行激发光源的校正；勾选“Emission Correction File”进行检测器校正。

在【Excitation】页面设置激发波长，【Emission】页面的参数设置为：

【Scan from】【to】分别设置起止波长；

【step】设置步进，一般为 0.5 nm 或者 1 nm，越大扫描越快；

【Dwell Time (s)】积分时间，一般设置 0.1s~0.5s，越大峰值越高；

【Number of Scans】扫描次数，最终的谱图是多次扫描的叠加。

设置完成后，点击【Start】，开始测试。

注意 1：狭缝只能在 Signal Rate 中设置。

注意 2：发射光谱的起始波长至少要大于激发波长 10 nm。

6.5 激发光谱扫描

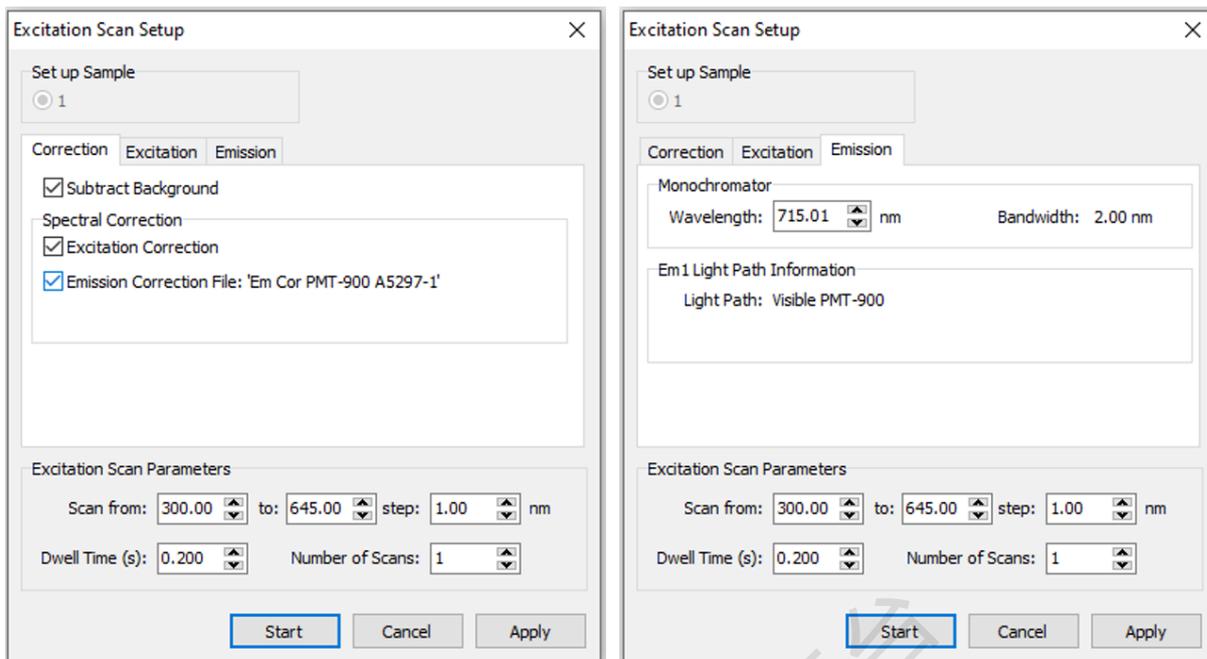


图 6-6 Excitation Scan 参数设置

选中“λ”，点击【Excitation Scan】，【Correction】校正文件全部勾选，勾选“Subtract Background”进行仪器背景信号矫正；“Excitation Correction”进行激发光源的校正（在激光光谱扫描中是必须的）；勾选“Emission Correction File”进行检测器校正。

在【Emission】页面设置好发射波长。

【Scan from】【to】 分别设置起止波长；

【step】设置步进，一般为 0.5 nm 或者 1 nm，越大扫描越快；

【Dwell Time (s)】积分时间，一般设置 0.1 s~0.5 s，越大峰值越高；

【Number of Scans】扫描次数，最终的谱图是多次扫描的叠加。

设置完成后，点击【Start】，开始测试。

注意：激发光谱的终止波长至少要小于发射波长 10 nm。

6.6 透射光谱扫描

【Transmission Scan】，测试吸收光谱。

需要测试空白溶液。设置方法和激发光谱以及发射光谱一样。

测试完成后，样品和空白谱线合并，点击【Analysis】中的【Absorption】转换成吸光度 Abs 值。

6.7 同步光谱扫描

同步荧光光谱是同时扫描激发和发射两个单色器波长。由测得的荧光强度信号与对应的激发波长（或发射波长）构成光谱图，称为同步荧光光谱。扫描过程中激发和发射

保持一定的差值。

【Synchronous Scan】，同步扫描。激发和发射同时变化，波长起始是Ex 侧波长，需要设置Offset，一般设置为10 nm。

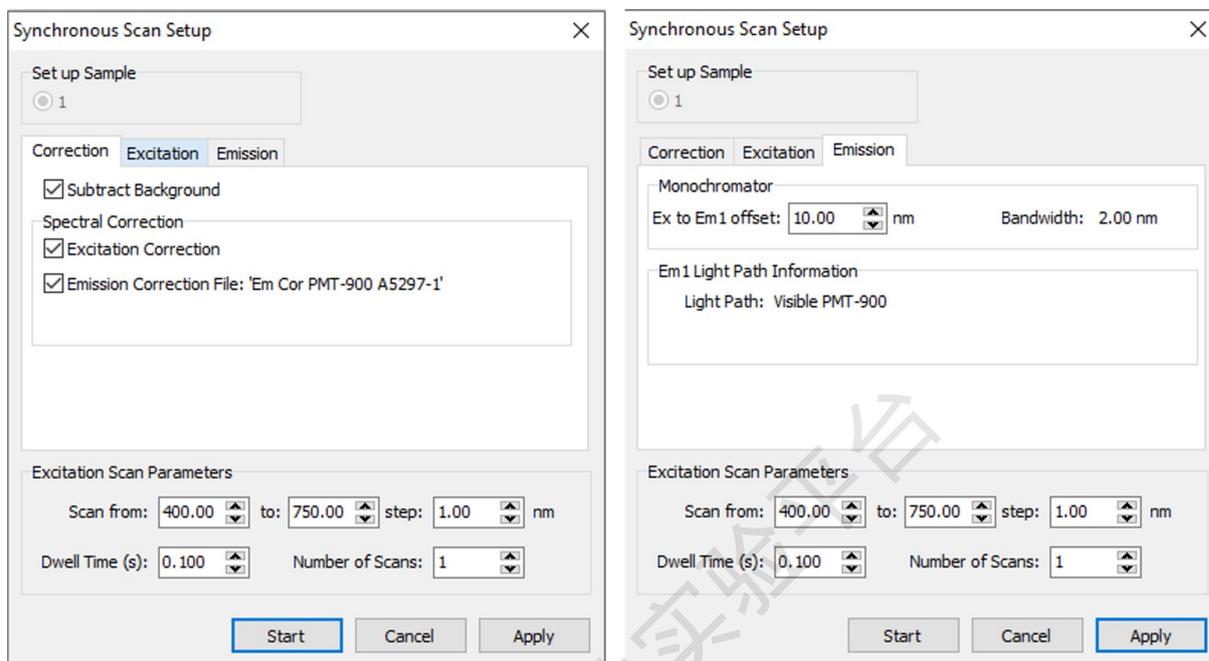


图 6-7 Synchronous scan 参数设置

6.8 三维荧光 Map 扫描

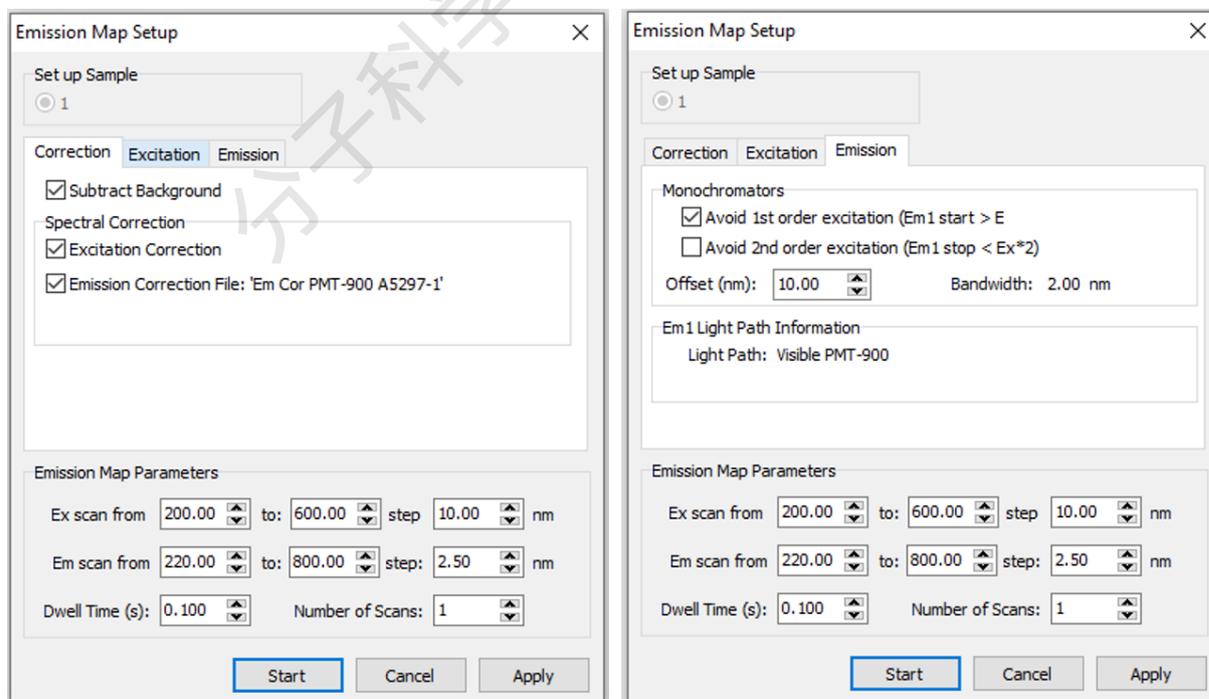


图 6-8 Emission Map 参数设置

【Emission Map】测试需要设置激发波长范围和发射波长范围，如图 6-8 所示，分别设置【Excitation】和【Emission】内的参数即可。为了避免在特殊的波长下光源对探测器造成伤害，需要勾选【Monochromators】的第一个选项 Avoid 1st order excitation，【Offset】的值至少为 10 nm，本仪器带自动滤光片，所以第二项不必勾选。

【Synchronous Map】的设置如图 6-9 所示，设置激发和发射范围。

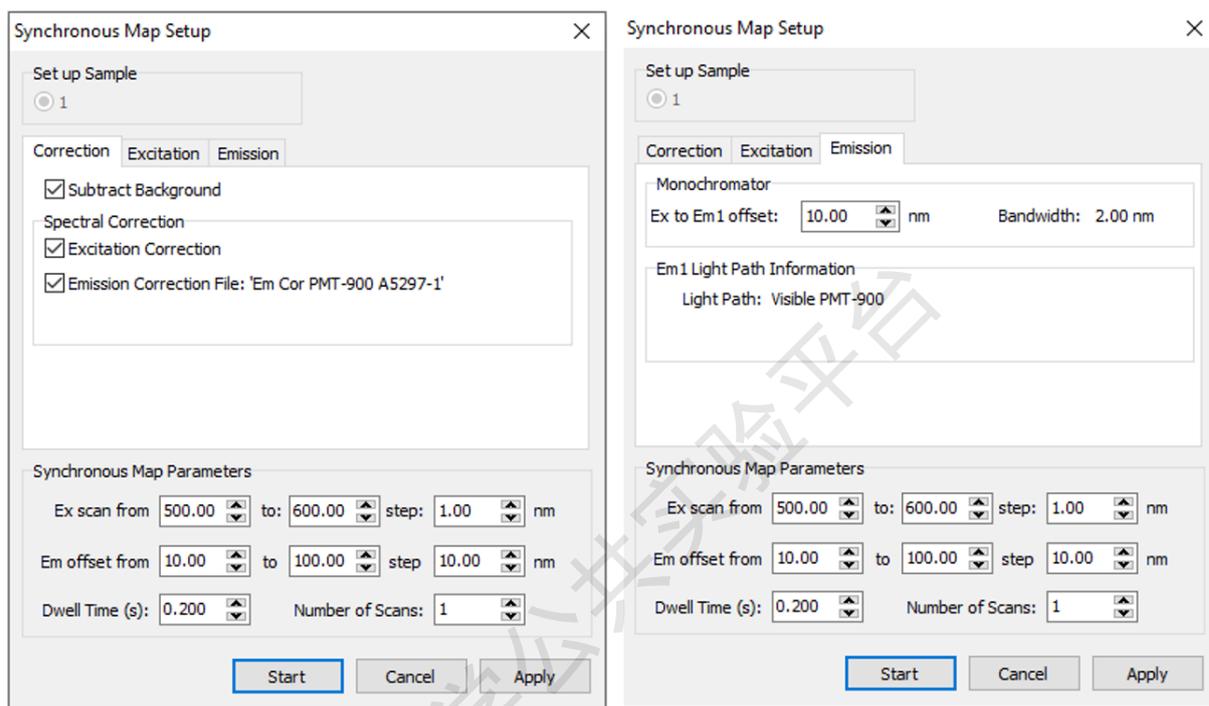


图 6-9 Synchronous Map 参数设置

6.9 Multiple Scan

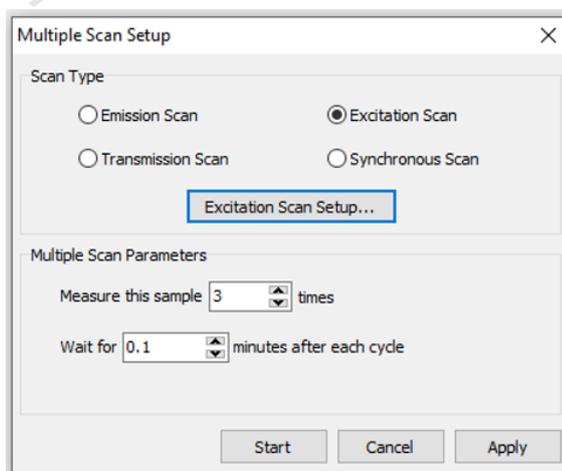


图 6-10 Multiple Scan 参数设置

多次扫描时，参数设置和前面每项扫描的一致，需要输入扫描次数。重复扫描，每次扫描的图，可以单独保存。

7. 相关/支撑性文件

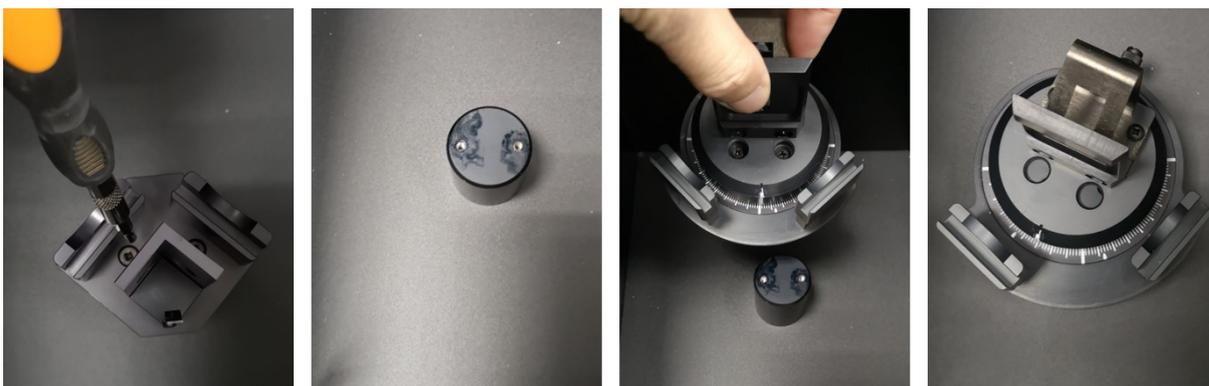
Q/WU FLHR001 文件编写规范

8. 记录

《仪器设备使用记录本》（科研实施与公共仪器中心通用版）

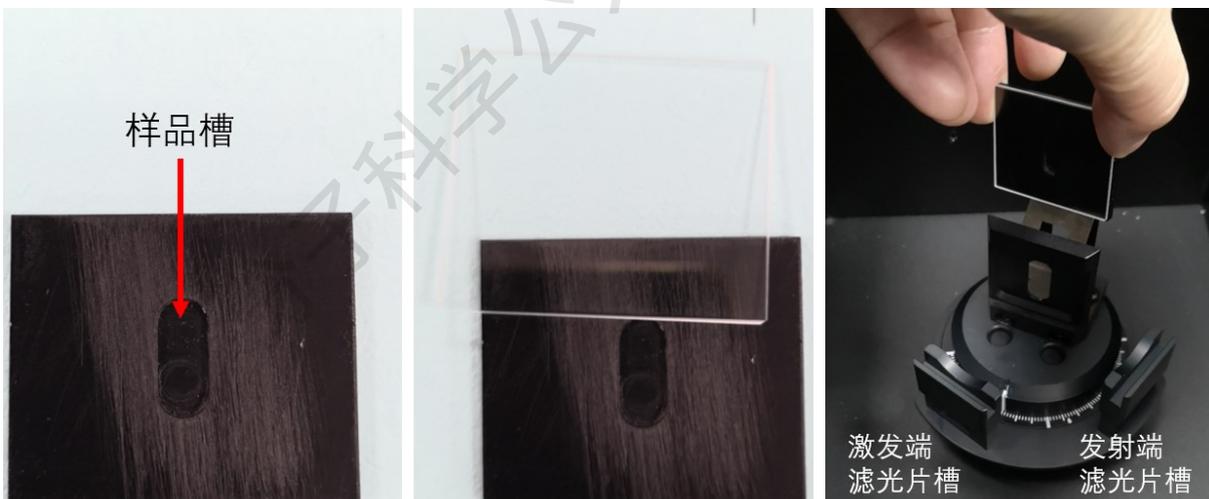
分子科学公共实验平台

附录 1. 固体样品支架更换步骤



- (1) 用螺丝刀将液体支架的两个螺丝拧下来。
- (2) 拿掉液体样品池，样品仓底部的底座有两个螺丝孔。
- (3) 将固体样品池的两个孔和底座的孔对齐，拧紧螺丝即可固定固体支架。
- (4) 固体支架可以在水平方向从 0 度到 180 度改变角度，选好角度后（一般选 30 和 60 度，一般不能选 90 度），支架背部有一个旋扭，拧紧后可以进行样品测试。

附录 2. 粉末样品装样步骤



- (1) 将粉末样品槽装满粉末。
- (2) 将石英玻璃盖在样品槽上。
- (3) 将石英玻璃和样品槽一同卡在固体样品支架的位置（如上图所示）。

仪器设备使用记录本										
仪器名称	日期	测试人	导师(PI)	测试内容	测试方式		仪器状态		机时 (起止时间)	联系电话
					送样	自主操作	使用前	使用后		

注意：使用前先检查仪器状况，正常方可操作，一旦测试使用，默认为测试前仪器状态正常，测试后记得取走样品再关机。紧急联系电话：18998382617，13656817706。

Nikon

共聚焦激光显微镜

A1 操作手册 (ver. 4.10)



尼康仪器（上海）有限公司

本规格可能会因为改进而发生更改，恕不另行通知。

目录

第 1 章	前言	3
基本篇		4
第 2 章	启动	5
第 3 章	显微镜操作方法	7
第 4 章	彩色图像的获取方法（标准探测器）	13
第 5 章	不易串色的多重染色图像获取方法（标准探测器）	18
第 6 章	共聚焦缩放图像的获取方法	22
第 7 章	ROI 扫描·CROP 扫描图像的获取方法	24
第 8 章	Z 序列图像的获取方法	27
第 9 章	Z 序列图像的获取方法（改变亮度的同时获取）	30
第 10 章	三维图像的建立方法	32
第 11 章	Slice View 图像以及 Projection 图像的建立方法	35
第 12 章	时间序列图像的获取方法	36
第 13 章	经时变化分析（Time Measurement）	38
第 14 章	光刺激成像的获取方法（检流计式扫描器·时间序列刺激）	40
第 15 章	图像显示功能	43
第 16 章	ND2 文件的抽出	47
第 17 章	ND2 文件的导出	48
第 18 章	关机	50
光谱篇		51
第 19 章	光谱图像的获取方法（光谱探测器）	52
第 20 章	光谱图像的分离（Unmixing）	57
第 21 章	Live Unmixing（Live 图像的光谱分离）	61
第 22 章	基于虚拟滤镜的图像获取方法（光谱探测器）	63
电动载物台篇		69
第 23 章	多点时间序列图像的获取方法	70
第 24 章	Large Image 的获取方法	72
高速篇		77
第 25 章	高速图像的获取方法（共振式扫描器）	78
第 26 章	高速 ZT 序列图像的获取方法（共振式扫描器）	82
第 27 章	光刺激同时成像的获取方法（共振式&检流式扫描器）	86
联系方式		89

1 前言

感谢惠购本公司的共聚焦激光显微镜 A1。

A1 是拥有众多优秀功能的共聚焦激光显微镜，相信一定能够为各位的研究作出贡献。为最大程度地发挥其优秀性能，请仔细阅读本手册。

本手册中还记载了选配部件。这些选配部件对系统构成有选择性，可能会对所购买的系统无效。此外，随着软件版本的不断更新，记述内容可能会与实际设备存在差异。如有疑问，请向本公司或出售本产品的商店咨询。

本系统为高级装置，在操作上有其特殊的步骤、条件等。请务必在充分了解操作步骤、条件的基础上使用。

此外，本公司从提高顾客满意度的观点出发，始终坚持聆听顾客的声音，以不断提高产品质量。使用时如果发现任何问题，烦请务必告知本公司。

本系统是作为共聚焦激光显微镜·荧光显微镜使用的装置，请勿将其用于除此以外的用途。

基本篇

A1 / Ti-E / PFS

电动载物台 · 压电 Z 轴载物台 · 强光灯

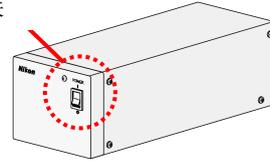
根据所使用的机型和选项设定，本说明中所涉及的某些功能可能无法使用。

2 启动

2.1 接通显微镜的电源。

(1) 接通电动载物台的电源。

电源开关



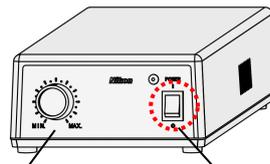
(2) 接通压电 Z 轴载物台的电源。

电源开关



(3) 接通卤素灯（目视透射光观察用灯）的电源。

调光旋钮



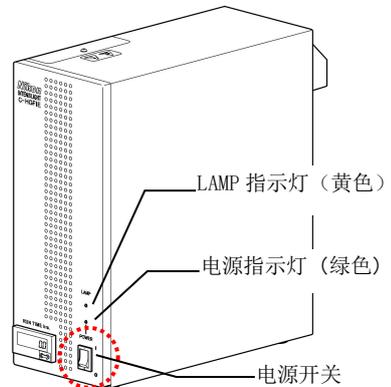
电源开关

(4) 接通水银灯（目视荧光观察用灯）的电源。

LAMP 指示灯（黄色）

电源指示灯（绿色）

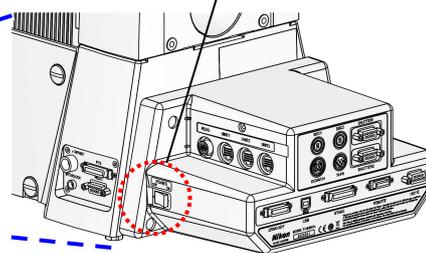
电源开关



(5) 接通显微镜主体的电源。

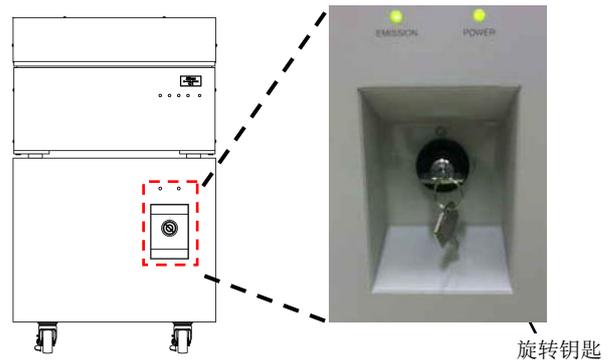


电源开关



2.2 接通激光发生器的电源。

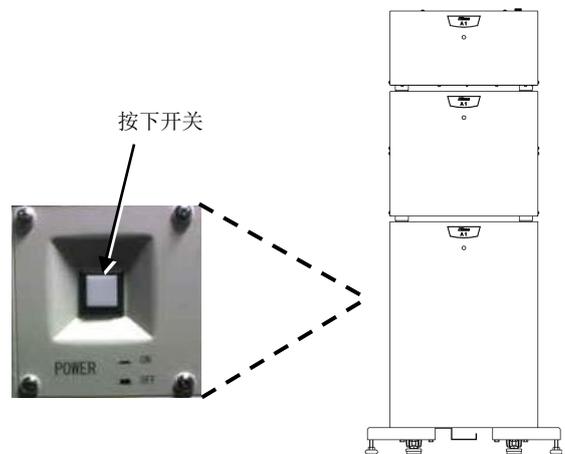
将钥匙从竖直插入的状态 (off) 顺时针旋转 90 度。



2.3 接通控制器的电源。

打开控制器主体侧面上的开关。

注： 开关被按下的状态为 “on”。



2.4 启动计算机。

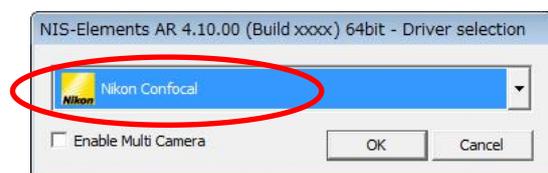


2.5 启动 “NIS-Elements” 软件。

(1) 点击  NIS-Elements AR 4.10.00 64-bit，启动 “NIS-Elements” 软件。

注： 在 Confocal 之外还连接有相机的情况下，将显示 “Driver selection” 对话框以供选择驱动程序。

选择 “Nikon Confocal”，点击 [OK] 按钮。



3

显微镜操作方法

3.1 Ti 遥控器 (Ti-RCP) 操作方法

Ti-RCP 为触摸面板，按下要切换的电动零部件的图标后将显示该电动零部件上安装的物品一览。从一览中选择要切换的物品。

使用功能按钮可以批量调用所需要的观察方法。

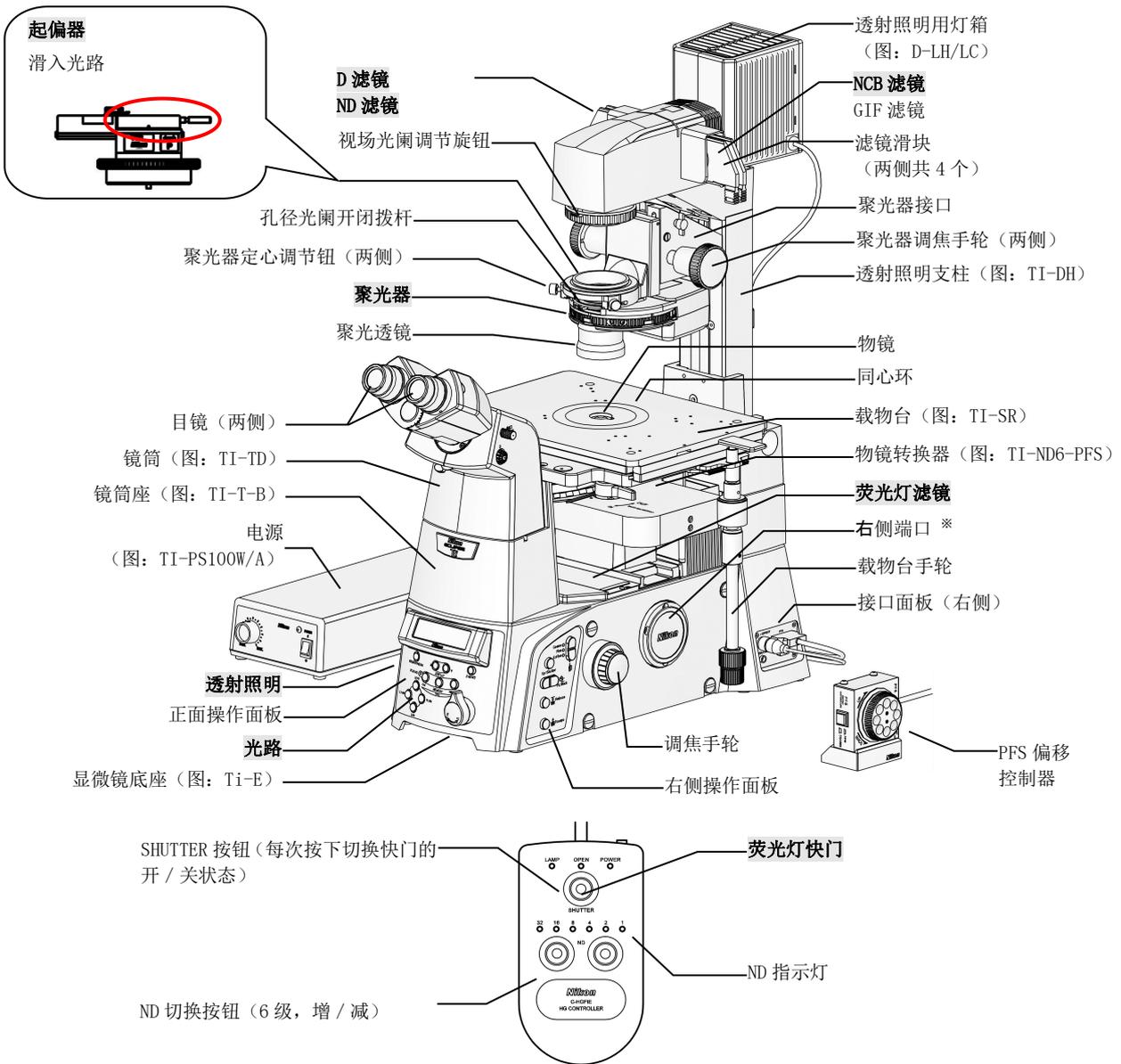
The diagram illustrates the Ti-RCP remote control interface and its various functions. At the top, a physical device is shown with a red dotted circle around the touch panel. Below it, the main control screen is displayed, showing various settings and icons. The screen is divided into several sections:

- 物镜的切换 (Objective Selection):** A grid of icons for different objectives (1-5) and a selection panel with minus, plus, and confirm buttons.
- 荧光滤镜的切换 (Fluorescence Filter Selection):** A grid of icons for different filters (1-5) and a selection panel with minus, plus, and confirm buttons.
- 聚光器的切换 (Condenser Selection):** A grid of icons for different condensers (1-5) and a selection panel with minus, plus, and confirm buttons.
- 光路的切换 (Light Path Selection):** A grid of icons for different light paths (E100, L100, R100, L80) and a selection panel with minus, plus, and confirm buttons.
- 透射照明的控制 (Transmission Illumination Control):** A series of screens showing the control of the transmission illumination. It starts with a "启动时的状态" (Startup State) screen, followed by a screen with "按下 CNTL DIA 后" (After pressing CNTL DIA), and then a screen with "透射照明的 ON/OFF" (Transmission Illumination ON/OFF) and "透射照明的电压" (Transmission Illumination Voltage) controls.

The main control screen displays various settings and icons, including:

- OBJ: Plan Fluor 100x/1.40 Oil
- FL1: G-2A TxRed
- EX: BA520 EX420-490
- ND: ND32
- E: E100
- CON: CON
- PIEZO: PIEZO
- INTSL: INTSL
- DIA: DIA
- VOLT: VOLT
- CNTL: CNTL
- SAVE: SAVE

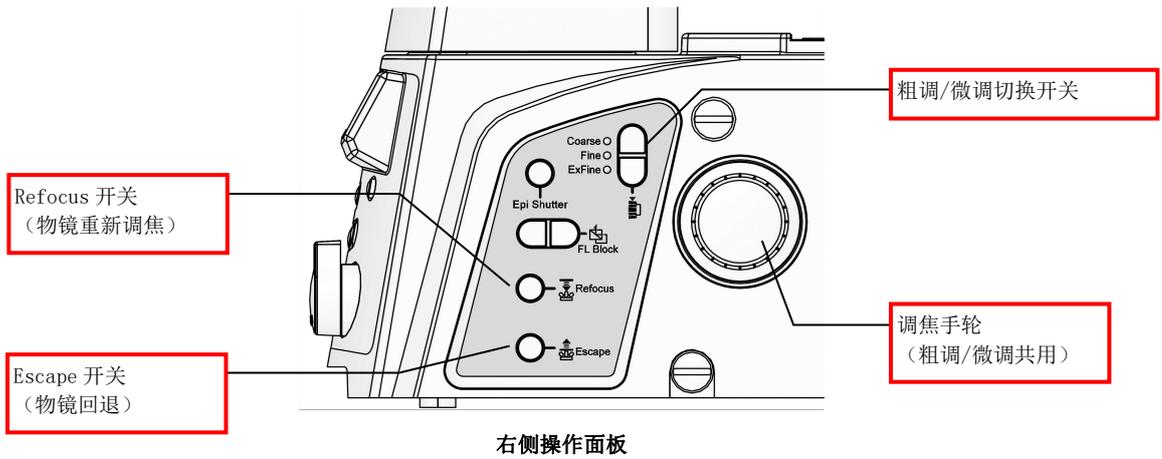
3.2 观察设定方法



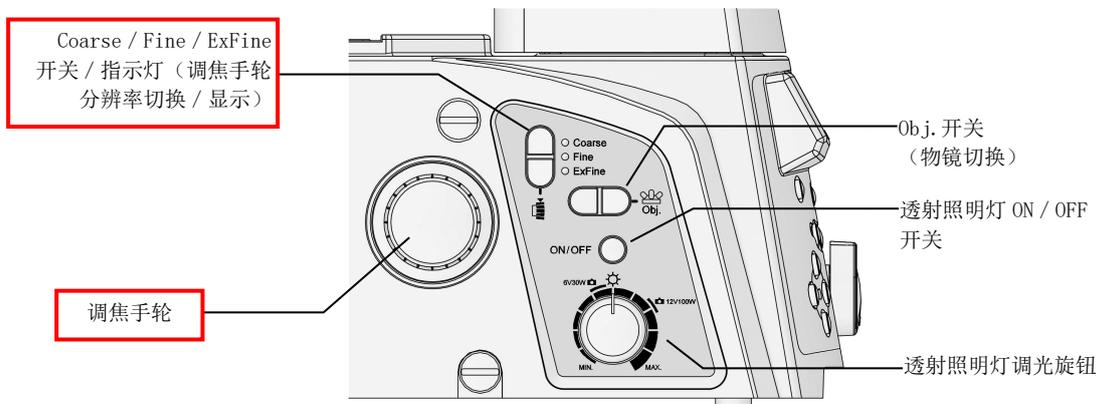
		透射光观察(DIC)	荧光观察	共聚焦观察
Ti-控制器※	光路	E100	E100	L100
	荧光灯滤镜	ANALY	DAPI 等	空白
	聚光器	N1 或 N2	不需要 (有也没关系)	不需要 (有也没关系) - 获取使用了激光的 DIC 图像时需要
	透射照明	On	Off	Off
HG 控制器	荧光灯快门	Off	On	Off
显微镜部	起偏器	需要	不需要 (有也没关系)	不需要 (有也没关系) - 获取使用了激光的 DIC 图像时需要
	D 滤镜 NCB 滤镜 ND 滤镜	需要	不需要 (有也没关系)	不需要 - 获取使用了激光的 DIC 图像时必须去除

※标记部分可通过 Ti-控制器的功能按钮批量调用。

3.3 Ti 显微镜主体操作面板说明



右侧操作面板



左侧操作面板

面板上的其他按钮可通过 Ti - 控制器进行操作。

3.4 HG 控制器操作方法…目视荧光观察用快门控制器

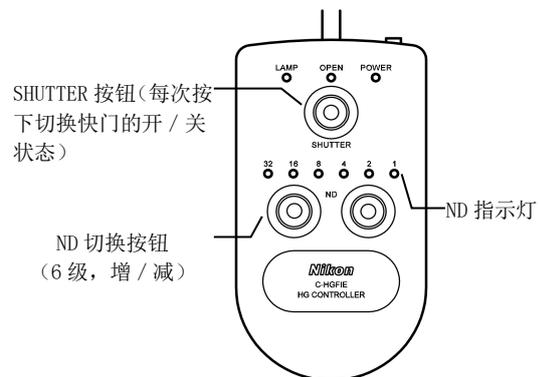
(1) 按下 SHUTTER 按钮，打开快门，进行荧光观察。

(Open: LED 亮灯, Close: LED 熄灭)

(2) 样本淬灭严重时，向 UP 方向按下 ND 切换按钮，减弱激发光以进行观察。

ND 分 1~32 级，数值越大，激发光越暗。

(3) 按下 SHUTTER 按钮，关闭快门，结束荧光观察。



3.5 摇杆控制器操作方法…电动载物台驱动用控制器

[1] 摇杆

使电动载物台向 XY 方向移动。

载物台将向摇杆的倾斜方向移动。载物台的驱动速度随摇杆倾斜角度而变。

[2] XY 载物台动作模式切换开关

位于摇杆顶端的旋转开关。

用于切换摇杆操作时的载物台驱动速度 (Coarse/Fine/ExFine)

[3] Constant Speed 开关

记忆载物台的移动速度，切换为定速模式。

驱动载物台时按下此开关，将记忆此时的驱动速度。

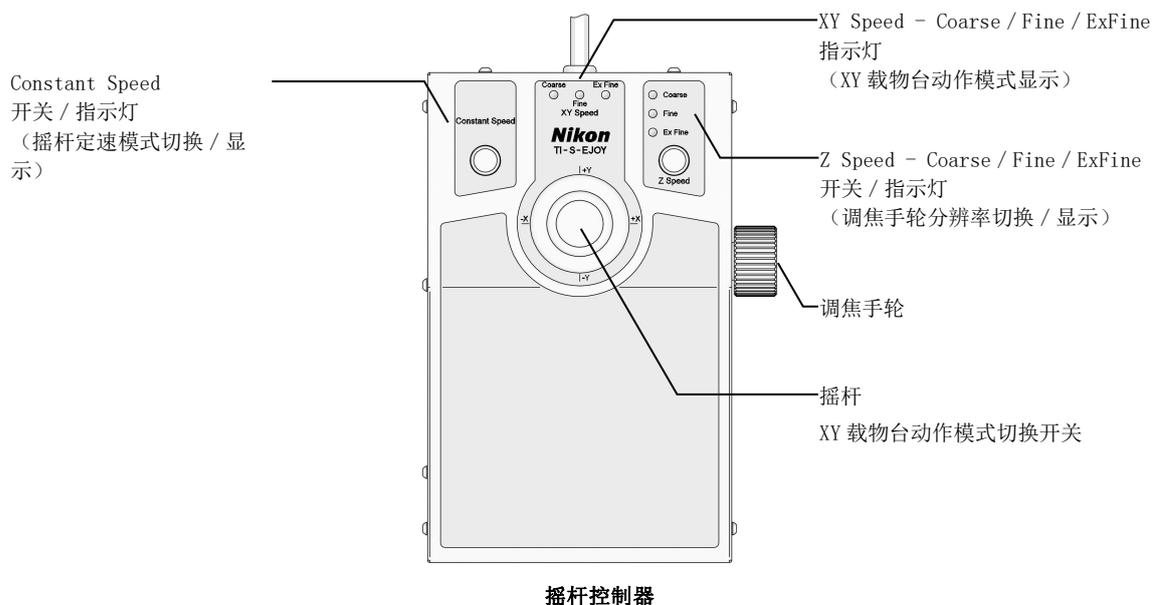
再次按下开关，定速模式即被解除。

[4] 调焦手轮

功能同显微镜附带的调焦手轮。

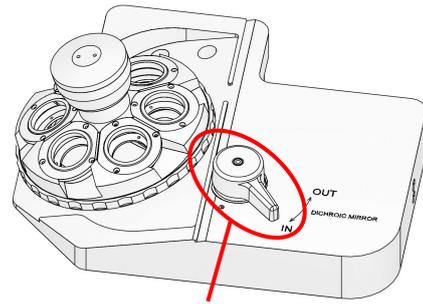
旋转手轮时，显微镜的焦点随之变化。

通过 Z Speed 开关，可切换粗调/微调使用。



3.6 完美调焦系统 (PFS) 操作方法 (使用正面操作面板)

- (1) 确认二向色镜插拔拨杆为 IN 状态。
- (2) 将要使用的物镜放入光路中, 使用显微镜的调焦手轮进行调焦, 使焦点与样本重合。
- (3) 按下操作面板的 PFS ON/OFF 按钮。
(PFS 的动作开始后, PFS ON/OFF 按钮绿色亮灯)

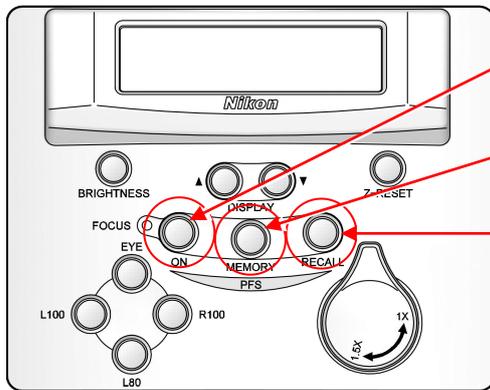


二向色镜插拔拨杆

- (4) 操作 PFS 移置控制器, 将焦点与需要进行焦点保持的位置重合, 开始观察。
PFS 的动作开始后, 无法通过显微镜主体的调焦手轮进行对焦操作。

偏移量的登录: 按下偏移量记忆按钮, 可以登录使用偏移旋钮调节的焦点位置

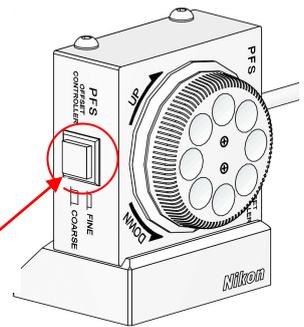
偏移量的再现: 按下调用按钮, 可以调用已登录的焦点位置



PFS ON/OFF 按钮

偏移量记忆按钮

偏移量调用按钮



移置旋钮粗/微调切换按钮

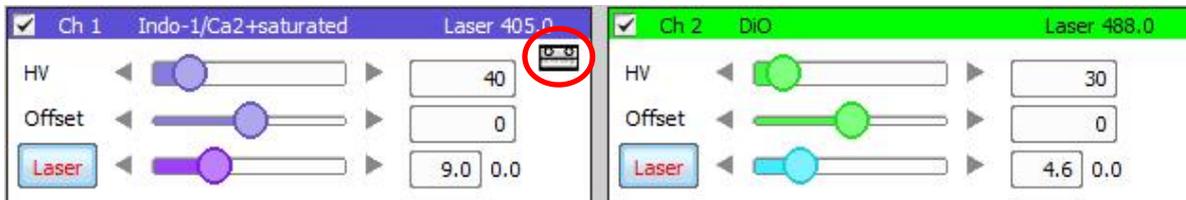
图 Ti-E 正面操作面板与移置控制器

3.7 A1 用遥控器

调节共聚焦图像时必需的操作（激光功率、检测器的灵敏度等的调节）可以通过遥控器进行。

- (1) 通过 **Channel Select 按钮** 选择控制对象通道。

当前对象通道可以通过 NIS-Elements 的 Camera Setting 的 Ch 中的  图标进行确认。



- (2) 按下 **Start/Stop 按钮**，开始扫描。

- (3) 边观察 Live 图像，边进行图像调节。

Laser Power 旋钮：

调节激光功率。向右旋转功率增加，向左旋转功率减少。

按下旋钮则是粗调/微调的切换。

PMT gain 旋钮：

调节检测器的灵敏度（HV）。向右旋转 HV 增加，向左旋转 HV 减少。

按下旋钮则是粗调/微调的切换。

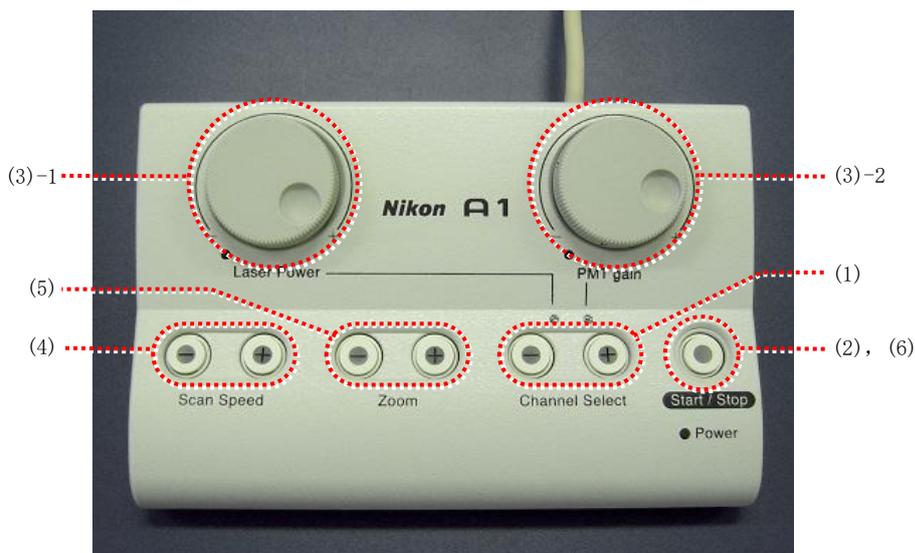
- (4) 根据需要进行扫描速度的调节。

Scan Speed 按钮： 调节扫描速度。按“+”速度增加，按“-”速度减少。

- (5) 根据需要进行缩放。

Zoom 按钮： 更改缩放倍率。按“+”放大，按“-”缩小。

- (6) 按下 **Start/Stop 按钮**，停止扫描。



A1 用遥控器

4

彩色图像的获取方法（标准探测器）

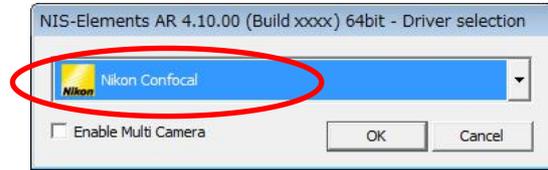
4.1 启动“NIS-Elements”软件。



(1) 点击 NIS-Elements AR，启动“NIS-Elements”软件。

注： 在 Confocal 之外还连接有相机的情况下，将显示“Driver selection”对话框以供选择驱动程序。

选择“Nikon Confocal”，点击[OK]按钮。



4.2 通过显微镜确认样本。

(1) 选择需要的观察方法。

按下 Ti 遥控器的功能按钮，选择需要的观察方法。

注： 为避免淬灭，请调小荧光灯快门。请同时使用 ND 滤镜寻找试料。淬灭



功能按钮
(观察方法以及 A1 选择按钮)

4.3 将光路切换到 A1。

有 Ti 遥控器时，按功能按钮[A1]，将光路切换到 A1。

没有 Ti 遥控器时，请将光路切换到 L100。

4.4 点击[Laser Inter Locked]按钮，解除闪烁状态，使激光可以通过软件起振。

注： 光路未切换到 A1 时，即使点击按钮也无法解除。



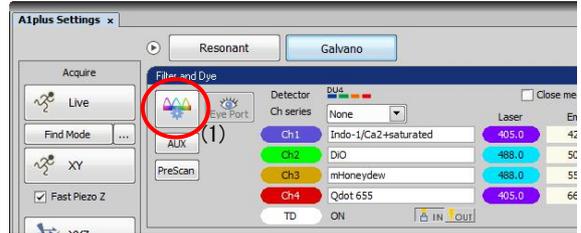
4.5 选择扫描模式。

选择 **Galvano** [Galvano]。

4.6 设定 Optical Path. (设定获取图像所需的共聚焦系统的光路)

确认设定内容。

(1) 点击  按钮, 启动 Optical path 画面。



(2) 点击  [DU4] 按钮, 选择标准探测器 (检测器)。

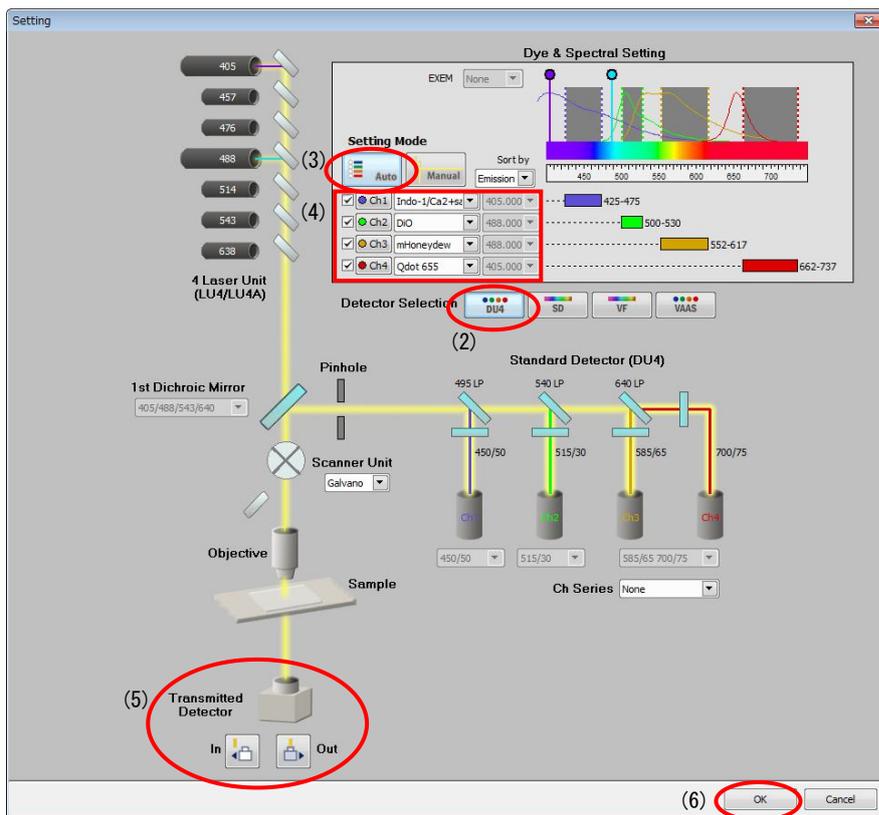
(3) 点击  [Auto] 按钮, 以自动模式设定 Optical Path。

(4) 勾选要使用的通道。

选择染料名。

点击各 ch 按钮 , 进行模拟色彩的设定。

(5) 要同时获取共聚焦图像和透射图像时, 点击  按钮, 使  进入光路。



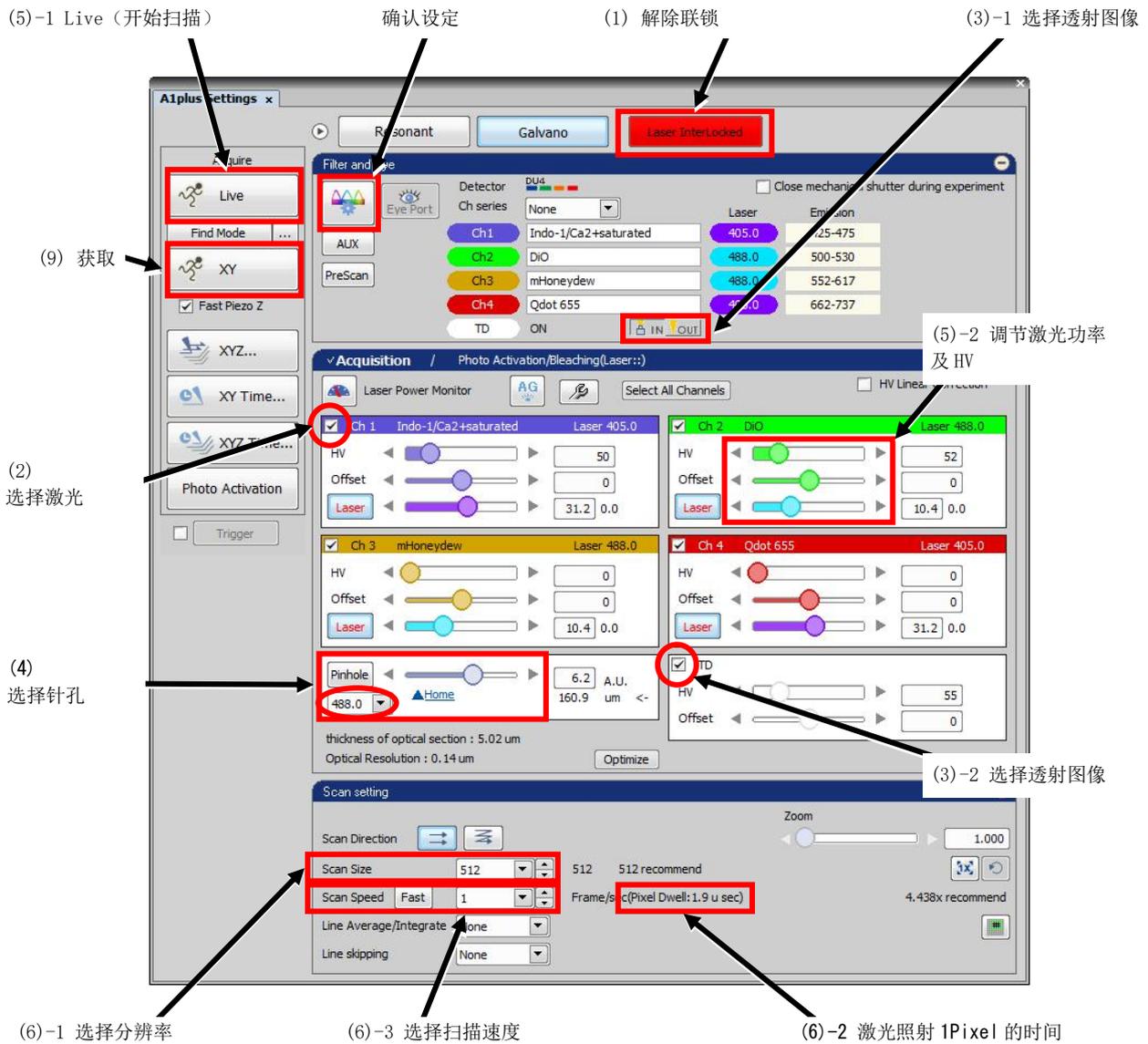
注: 要获取透射图像时, 请关闭显微镜上方的照明。

注: 透射探测器设置在透射光之前, 因此在透射探测器在光路中的情况下无法目视观察透射图像 (微分干涉 (DIC))。

需要目视观察透射图像时, 请将透射探测器从光路中移出。

(6) 点击 [OK] 按钮, 将自动设定 Optical Path。

4.7 决定图像获取条件，并获取图像。



(1) 点击 **Laser InterLocked** [Laser InterLocked]按钮，解除闪烁状态，使激光可以通过软件起振。

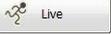
注：光路未切换到 A1 时，即使点击[Laser InterLocked]按钮也无法解除。

(2) 选择要使用的激光/通道。

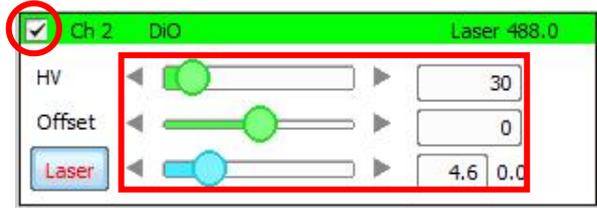
(3) 要同时获取共聚焦图像和透射图像时，点击 TD [IN]按钮，并勾选 TD 的勾选框。

注：要获取透射图像时，请关闭显微镜上方的照明。

(4) 在 Pinhole 的项目中选择要使用的激光波长。
 点击[▲Home]按钮，选择与物镜最匹配的针孔尺寸。

(5) 点击  [Live] 按钮，边观察图像边调节激光功率和检测器的灵敏度 HV。

- HV: 4ch 探测器的灵敏度
- Offset: 信号的偏移 (标准: 0)
- Laser: 激光功率

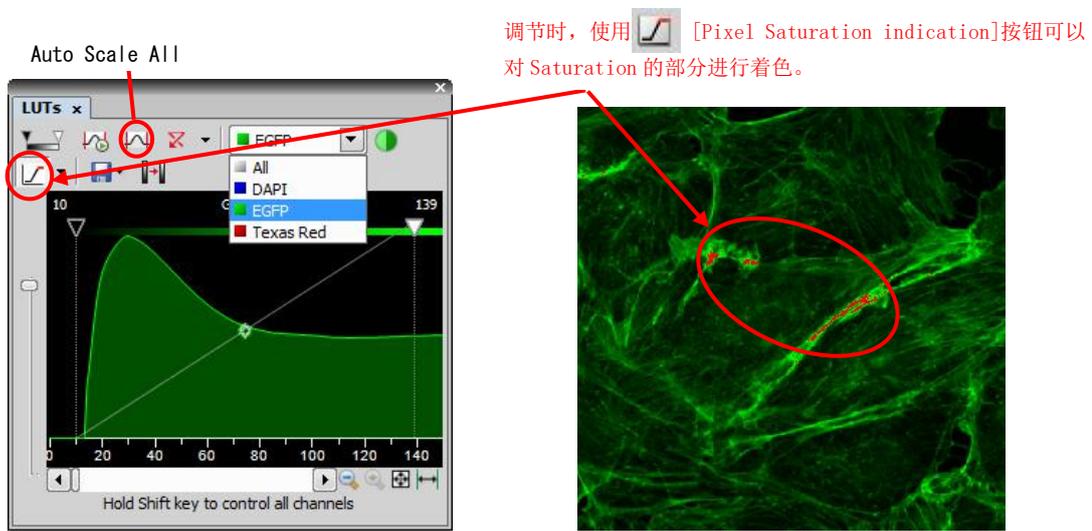


注: Offset 请以 0 为标准使用。

注: 调节时, 使用 LUTs 的  [Pixel Saturation indication] 按钮可有助于灵敏度的调节。

注: 图像显示较暗时, 点击  [Auto Scale All] 按钮可自动调节通道的对比度, 便于观察图像。

注: 调节时, 通过 [Live] 按钮的 ON/OFF (扫描的 ON/OFF) 可将淬灭减少到最低限度。



注: 未显示 LUTs 时, 鼠标右击软件上的灰色部分, 从弹出的菜单中选择 [Visualization Control] -> [LUTs] 以调出显示。

(6) 使用 Auto Gain (自动调节检测器灵敏度 HV 的功能, 以事先设定的饱和像素率为基础进行调节) 时, 请点击  [AG] 按钮。

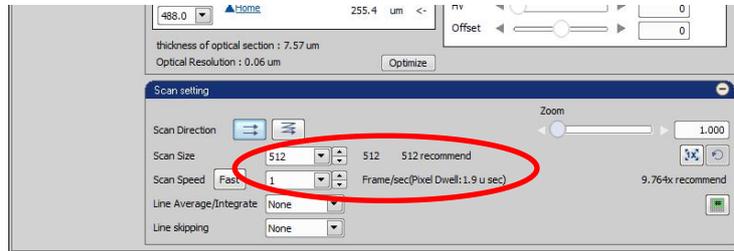
Auto Gain 失败的通道上会显示 “NG”, HV 的值恢复为执行 Auto Gain 前的值。可通过  [Auto Gain 设定] 按钮更改饱和像素率。需要设定最大值和最小值。

注意:

- 扫描执行过程中无法执行 Auto Gain。
- 2Ex1Em、1Ex2Emx2 线顺序时, 无法执行 Auto Gain。
- 设定为线扫描时无法执行 Auto Gain。
- Auto Gain 执行过程中, 请勿进行 Acquisition 画面下的手动调节和遥控器的调节操作。

- (7) 将像素数调整为所需要的分辨率。(512×512 等)
图像较暗时, 请降低扫描速度。

注: 请确认更改分辨率后的 Pixel Dwell。
Pixel Dwell 代表激光照射 1 个像素的时间。
数值越大, 获取的图像越明亮。



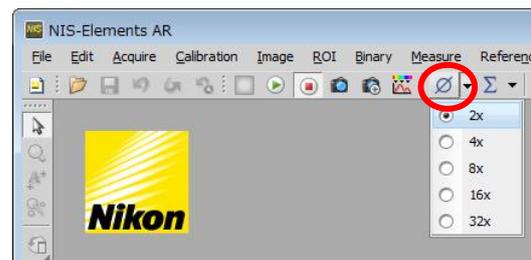
注: 在检流计扫描模式下选择了带状扫描区域时, Scan Speed 的下拉菜单中显示的扫描速度变为小数点显示。
此时的扫描速度仅供参考, 实际扫描速度可能会有所不同。

- (8) 根据需要进行 Average。
Average 是对同一图像进行多次扫描, 通过平均化来消除噪声的功能。
Average 分为逐 Frame 和逐 Line 扫描 2 种。

注: 进行 Average 可以减少噪声, 但帧率 (1 秒中内可获取的图像数) 会随之降低。

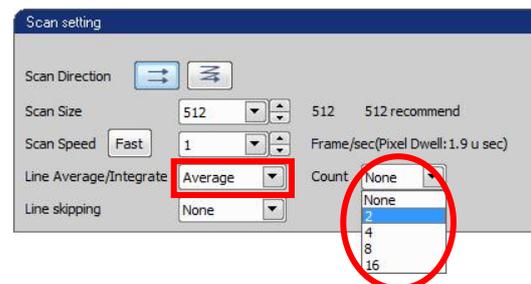
Frame Average:

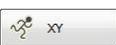
点击软件工具栏中的  按钮, 选择平均扫描次数。



Line Average:

在 Scan setting 画面的 [Line Average/Integrate] 中选择 [Average], 在 [Count] 中选择平均扫描次数。



- (9) 点击  [XY] 按钮以获取图像。

4.8 保存图像。

激活要保存的图像, 从菜单栏中选择 [File] -> [Save As] 以进行保存。

注: 建议以 nd2 文件格式进行保存。(将同时保存参数等条件。)

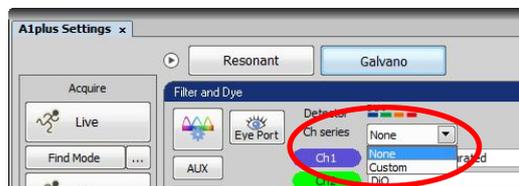
5

不易串色的多重染色图像获取方法（标准探测器）

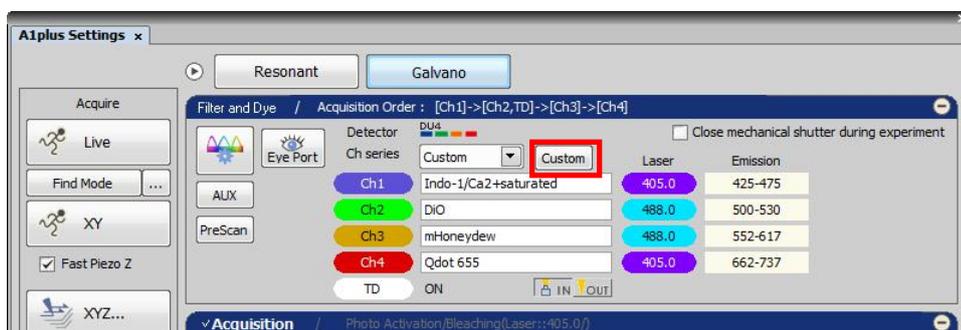
5.1 执行“彩色图像的获取方法”的步骤 4.1~4.6。

5.2 设定通道序列。

(1) 选择 Ch series 的 [Custom]。



(2) 点击 [Custom] 按钮，弹出 Line Channel Series Setup 对话框。



(3) 在 Line Channel Series Setup 对话框中，设定各通道的扫描顺序。

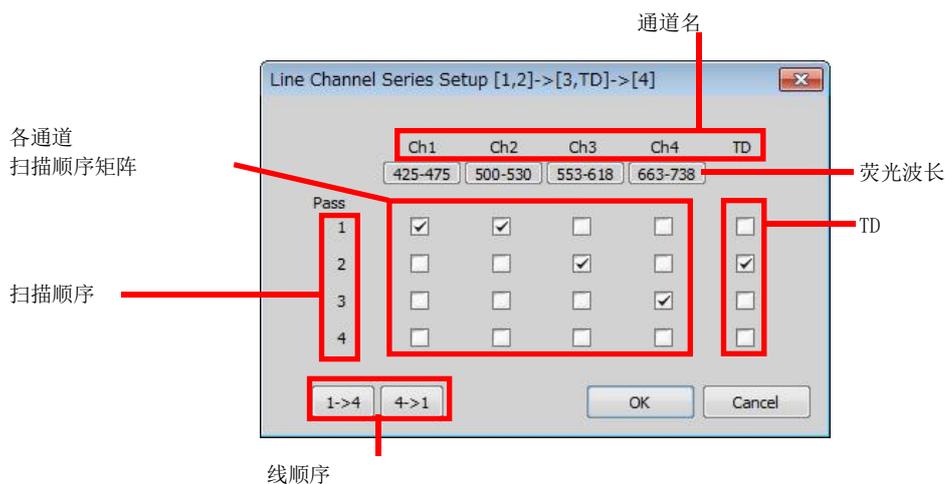
设定任意的扫描顺序时：

在各通道扫描顺序矩阵中，设定要扫描的通道的顺序。

使用线顺序时：

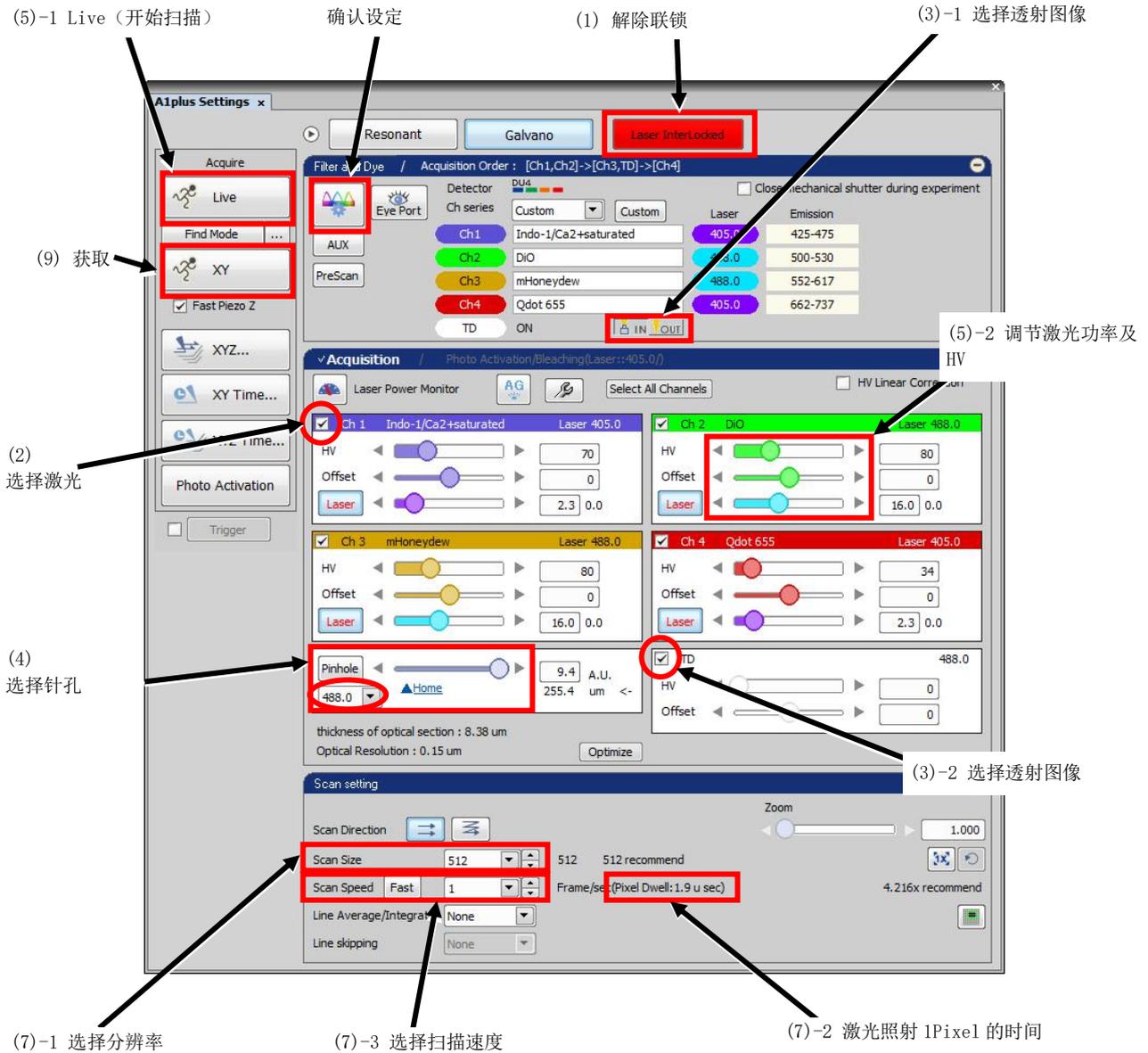
选择 [1->4] 按钮或 [4->1] 按钮。

各激光按顺序照射各扫描线，进行扫描。



注： 无法进行 TD（透射图像）单体的扫描，因此请务必设定为扫描顺序与其他通道同步。（例：按第 2 位的扫描动作以激光照射 Ch3 和 TD）

5.3 决定图像获取条件，并获取图像。



(1) 点击 **Laser InterLocked** [Laser InterLocked]按钮，解除闪烁状态，使激光可以通过软件起振。

注：光路未切换到 A1 时，即使点击[Laser InterLocked]按钮也无法解除。

(2) 选择要使用的激光/通道。

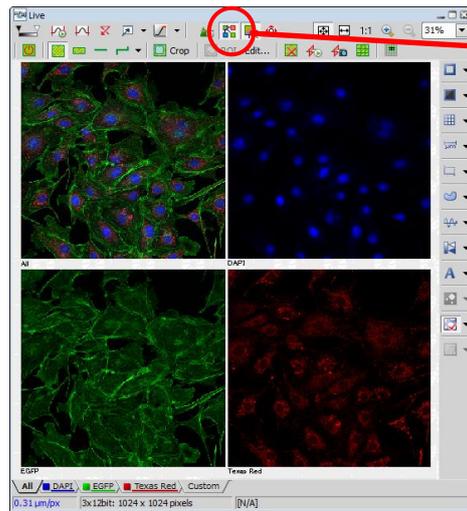
(3) 要同时获取共聚焦图像和透射图像时，点击 TD [IN]按钮，并勾选 TD 的勾选框。

注：要获取透射图像时，请关闭显微镜上方的照明。

(4) 在 Pinhole 的项目中选择**要使用的激光中最长的激光波长**。

点击[▲Home]按钮，选择与物镜最匹配的针孔尺寸。

(5) 点击  [Live] 按钮，边观察图像边调节激光功率和检测器的灵敏度 HV。



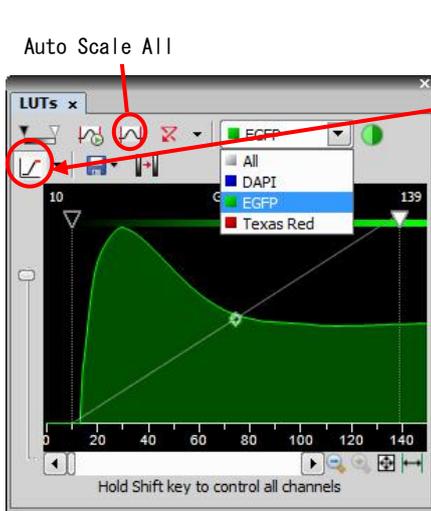
点击  [Split Channels] 按钮以切换到按通道分割显示（再次按下后将复原），可有助于各通道的调节。

注： Offset 请以 0 为标准使用。

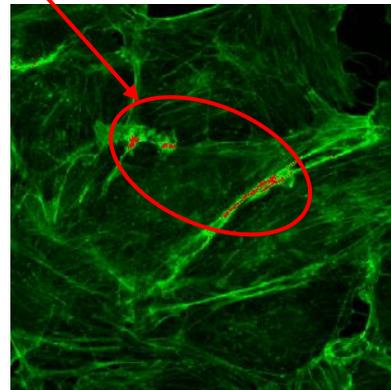
注： 调节时，使用 LUTs 的  [Pixel Saturation indication] 按钮可有助于灵敏度的调节。

注： 图像显示较暗时，点击  [Auto Scale All] 按钮可自动调节通道的对比度，便于观察图像。

注： 调节时，通过 [Live] 按钮的 ON/OFF（扫描的 ON/OFF）可将淬灭减少到最低限度。



调节时，使用  [Pixel Saturation indication] 按钮可以对 Saturation 的部分进行着色。



注： 未显示 LUTs 时，鼠标右击软件上的灰色部分，从弹出的菜单中选择 [Visualization Control] -> [LUTs] 以调出显示。

(6) 使用 Auto Gain（自动调节检测器灵敏度 HV 的功能，以事先设定的饱和像素率为基础进行调节）时，请点击  [AG] 按钮。

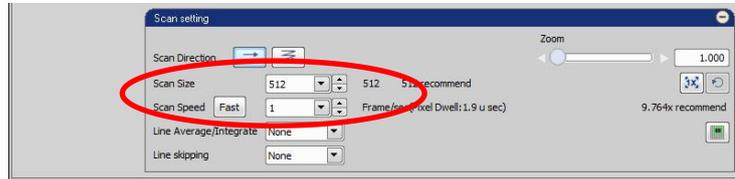
Auto Gain 失败的通道上会显示“NG”，HV 的值恢复为执行 Auto Gain 前的值。

可通过  [Auto Gain 设定] 按钮更改饱和和像素率。需要设定最大值和最小值。

- 注意：
- 扫描执行过程中无法执行 Auto Gain。
 - 2Ex1Em、1Ex2Emx2 线顺序时，无法执行 Auto Gain。
 - 设定为线扫描时无法执行 Auto Gain。
 - Auto Gain 执行过程中，请勿进行 Acquisition 画面下的手动调节和遥控器的调节操作。

- (7) 将像素数调整为所需要的分辨率。（512×512 等）
 图像较暗时，请降低扫描速度。

注： 请确认更改分辨率后的 Pixel Dwell。
 Pixel Dwell 代表激光照射 1 个像素的时间。
 数值越大，获取的图像越明亮。

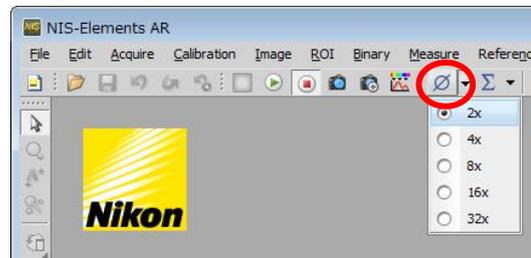


- (8) 根据需要进行 Average。
 Average 是对同一图像进行多次扫描，通过平均化来消除噪声的功能。
 Average 分为逐 Frame 和逐 Line 扫描 2 种。

注： 进行 Average 可以减少噪声，但帧率（1 秒中内可获取的图像数）会随之降低。

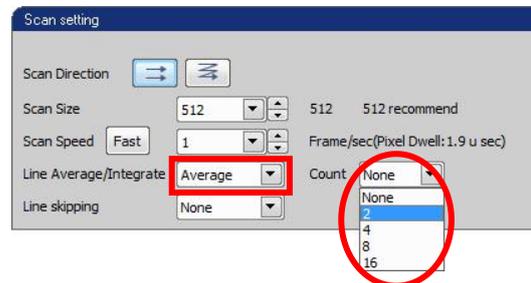
Frame Average:

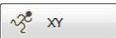
点击软件工具栏中的  按钮，选择平均扫描次数。



Line Average:

在 Scan setting 画面的 [Line Average/Integrate] 中选择 [Average]，在 [Count] 中选择平均扫描次数。



- (9) 点击  [XY] 按钮以获取图像。

5.4 保存图像。

激活要保存的图像，从菜单栏中选择 [File] -> [Save As] 以进行保存。

注： 建议以 nd2 文件格式进行保存。（将同时保存参数等条件。）

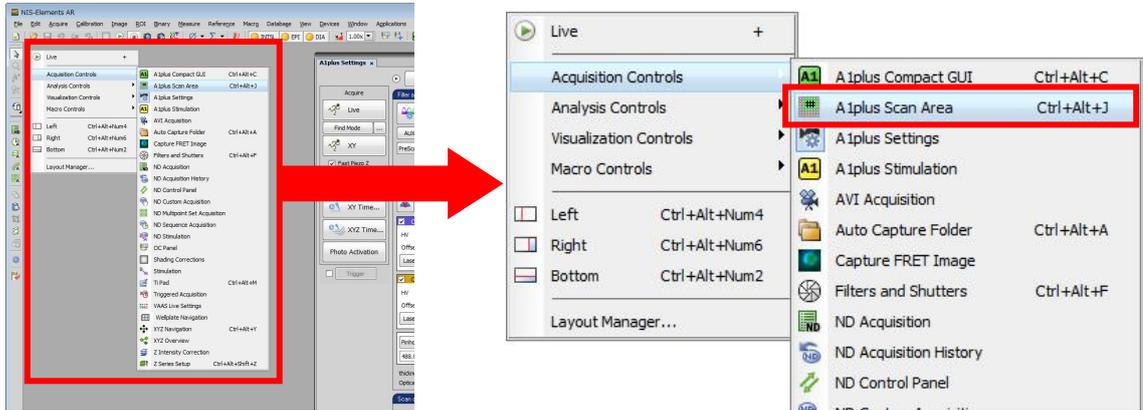
6

共聚焦缩放图像的获取

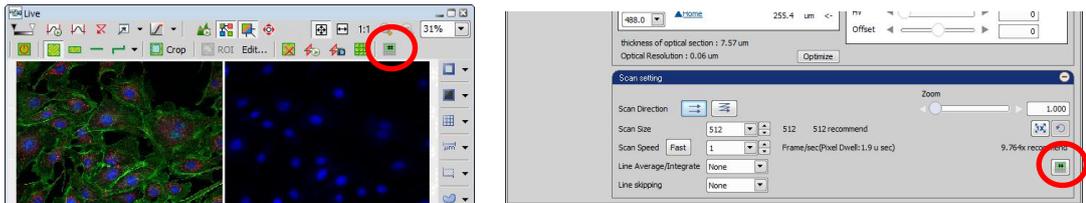
6.1 执行“彩色图像的获取方法”的步骤 4.1~4.7，决定图像的获取条件。

6.2 调出 Scan Area 窗口。

鼠标右击软件上的灰色部分，从弹出的菜单中选择[Acquisition Controls] -> [A1plus Scan Area]以调出窗口。



※ 点击 Live 窗口及 A1plus Settings 画面中显示的以下按钮也可以显示窗口。



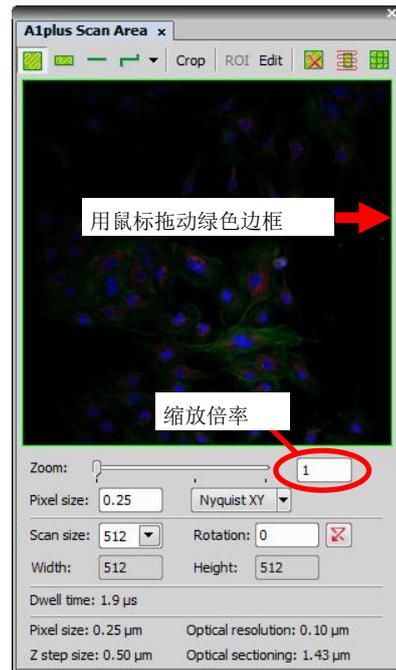
6.3 选择要缩放的区域。

点击 Scan Area 窗口中的  按钮，用鼠标拖动绿色边框，以缩小扫描区域。

在鼠标变为十字箭头的状态下移动边框，鼠标右击以决定扫描的位置。

可在 Zoom 中确认缩放倍率。

缩放区域点右键后，边框变绿，表示区域选定。

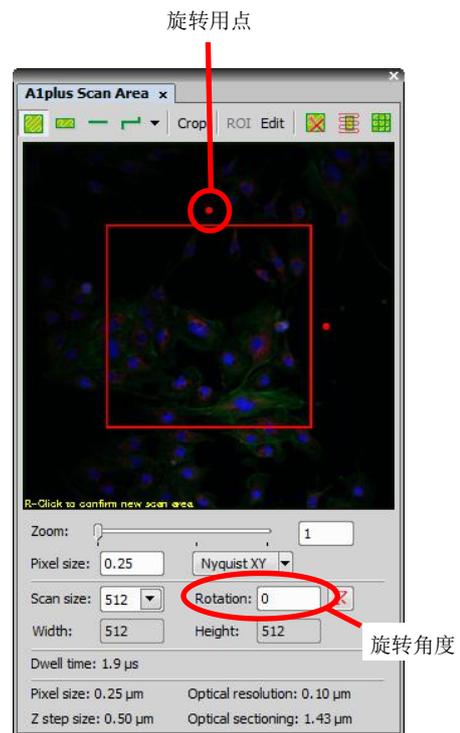


6.4 根据需要进行扫描区域的旋转。

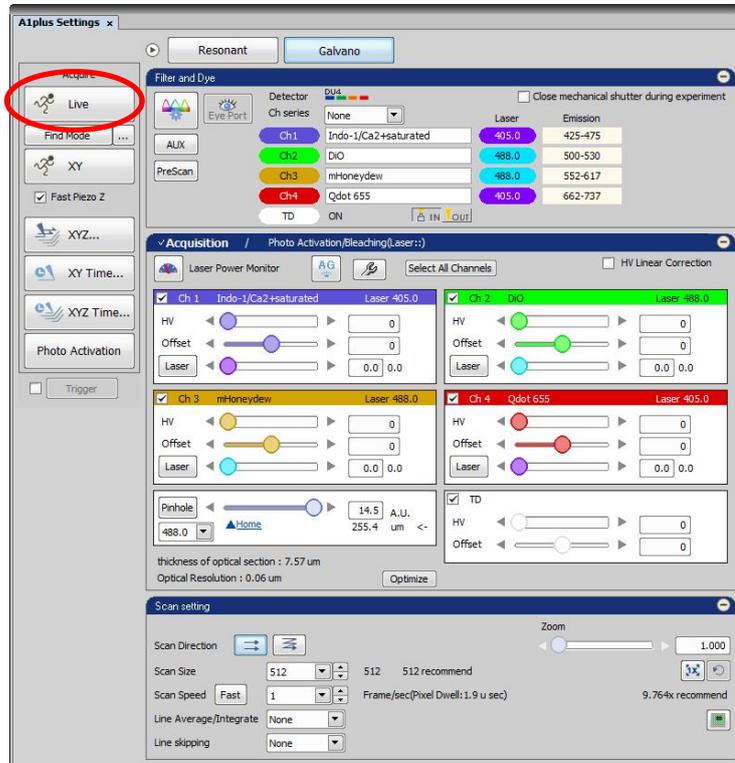
在绿色边框的旋转用点上拖动鼠标，可以进行扫描区域的旋转。

在 Rotation 中可以确认所设定的旋转角度。
旋转范围为 -90 度~90 度。

旋转区域点右键后，边框变绿，表示区域选定。



6.5 点击[Live]按钮，重新调节图像获取条件。



7

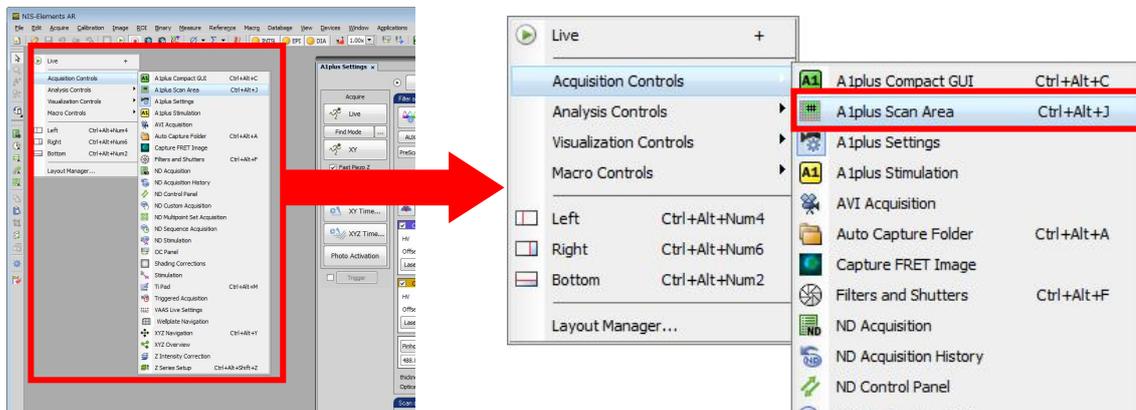
ROI 扫描 · CROP 扫描图像的获取方法

—

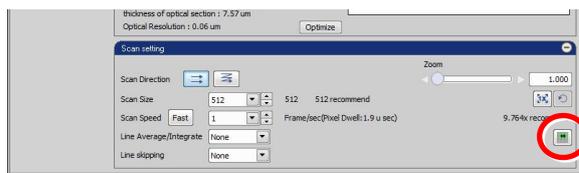
7.1 执行“彩色图像的获取方法”的步骤 4.1~4.6，决定图像的获取条件。

7.2 调出 Scan Area 窗口。

鼠标右击软件上的灰色部分，从弹出的菜单中选择[Acquisition Controls] -> [A1plus Scan Area]以调出窗口。



※ 点击 Live 窗口及 A1plus Settings 画面中显示的以下按钮也可以显示窗口。

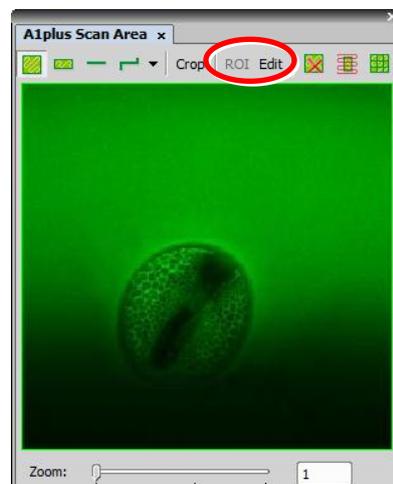
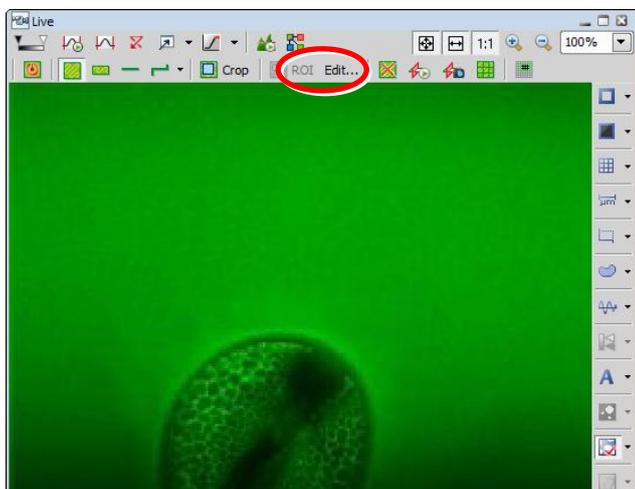


7.3 选择扫描区域。

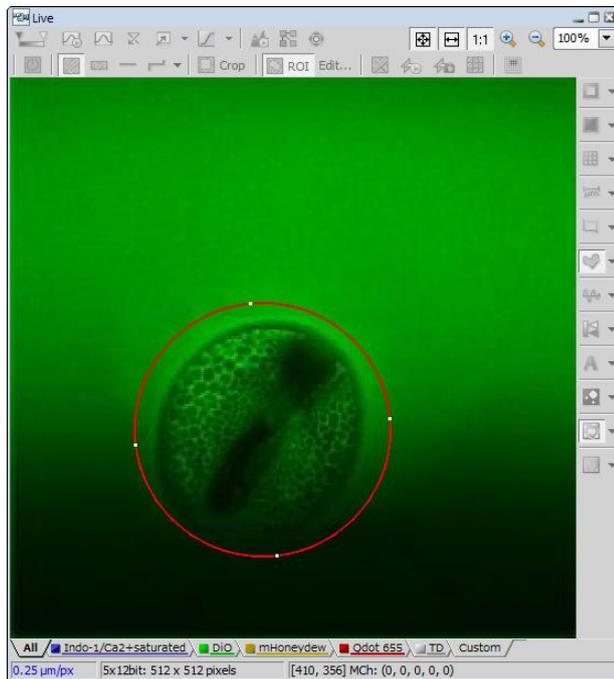
1) 【ROI 扫描时】… 虽然是对画面整体进行成像，但不会对 ROI 范围外的部分产生光照影响

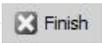
注：ROI 扫描时无法使用 Ch series。

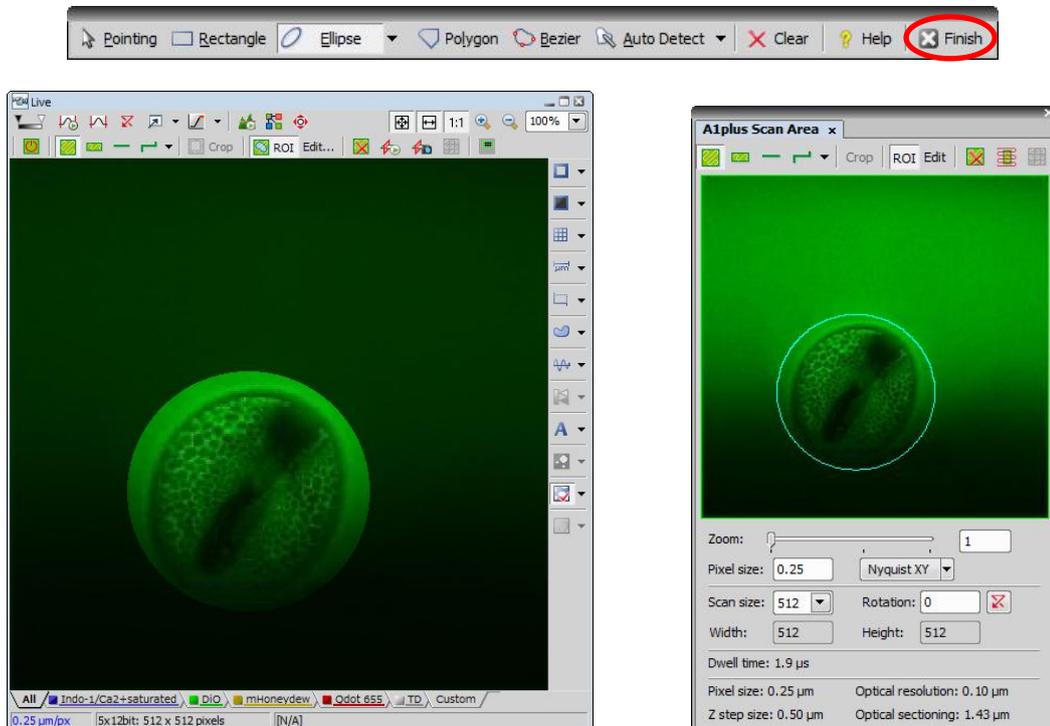
(1) 点击 Live 窗口或 Scan Area 窗口中的 ROI Edit [Edit]按钮，以显示[ROI editor]。



- (2) 使用  [ROI editor] 在 Live 窗口上描绘 ROI。
鼠标右击，正在编辑的 ROI 即被确定。



- (3) 点击  [Finish] 按钮退出 ROI Editor，Live 窗口中描绘的 ROI 将隐藏，扫描位置将被决定。
所描绘的 ROI 在 Scan Area 窗口中显示为淡蓝色边框。

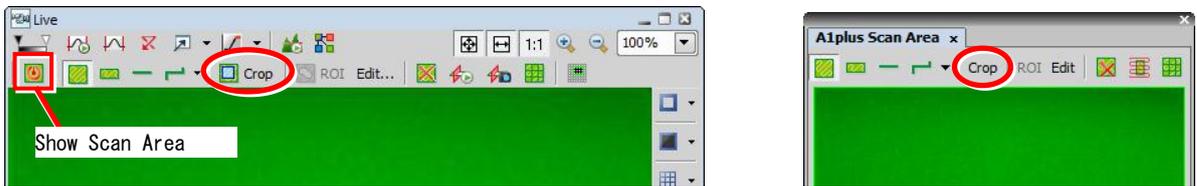


注： 在 Frozen 图像中描绘了 ROI 时，点击 Live 按钮后即执行 ROI。

2) 【CROP 扫描时】… 抽出所选择的部位（像素）进行成像

(1) 点击 Live 窗口或 Scan Area 窗口中的 **Crop** [Crop] 按钮。

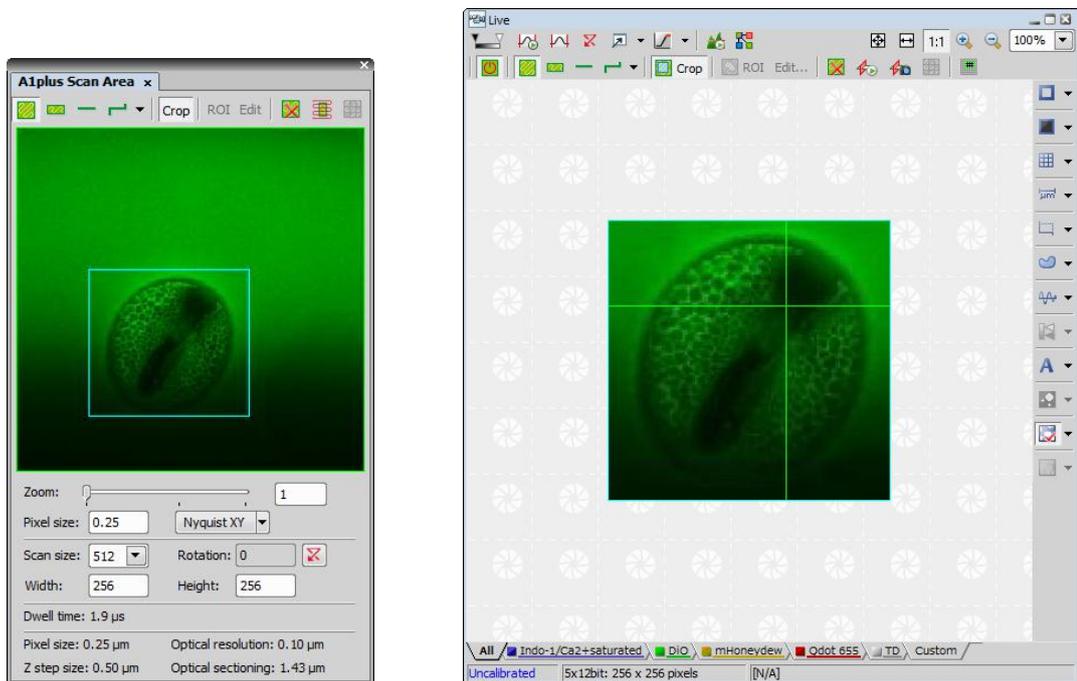
在 Live 窗口中描绘 Crop 时，事先将 [Show Scan Area] 按钮置于 ON。



(2) 在 Scan Area 窗口中，用鼠标拖动淡蓝色边框，以使其缩小。

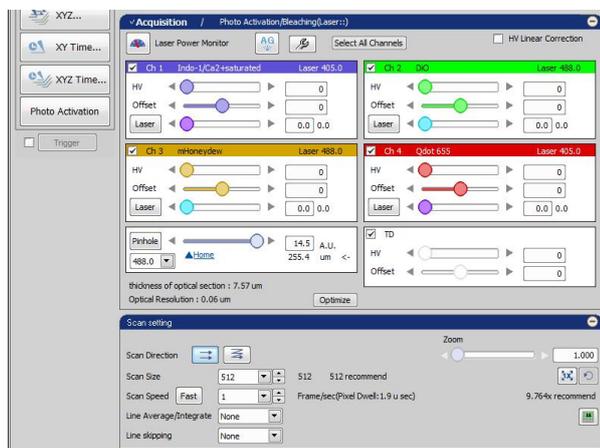
在鼠标变为十字箭头的状态下移动边框。（边框的尺寸和位置改变后，淡蓝色边框变为红色。）

鼠标右击以决定扫描的位置。



注：在 Frozen 图像中描绘了 Crop 时，点击 Live 按钮后即执行 Crop 扫描。

7.4 一边确认 Live 图像，一边重新调节图像获取条件。



8

Z 序列图像的获取方法

8.1 执行“彩色图像的获取方法”的步骤 4.1~4.7，决定图像的获取条件。

注：图像获取条件（激光功率以及检测器的灵敏度）的调节建议使用要获取的样本厚度中最明亮的焦平面来进行。可以防止各焦点下的图像饱和。

8.2 决定 Z 序列图像的获取范围。

(1) 点击  [XYZ...] 按钮，启动 Capture Z Series 对话框。

注：通过 Fast Piezo Z 的勾选与否来切换 Z 图像的获取模式。

勾选：速度优先模式

与指定的 Z 的行程无关，以速度为优先来获取图像。（仅限 Z Drive 选择为“Nikon A1 Piezo Z Drive”时有效）

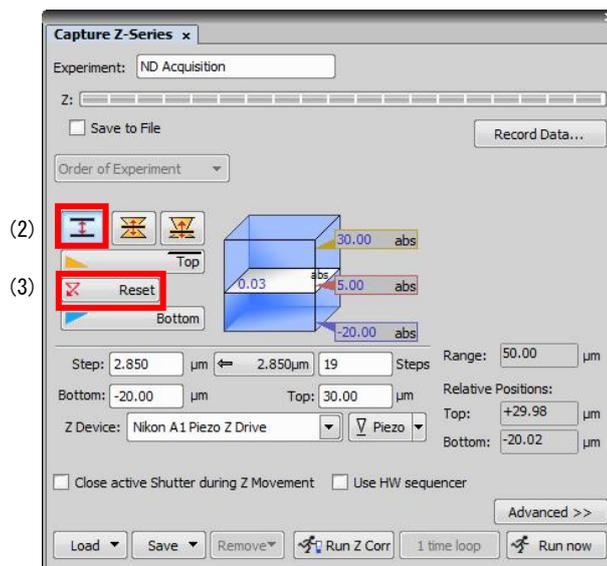
不勾选：行程优先模式

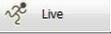
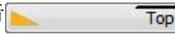
按指定的 Z 的行程获取图像。（行程优先模式需要 BNC 电缆。）



(2) 点击  [Defined top & bottom] 按钮。

(3) 点击  [Reset] 按钮。

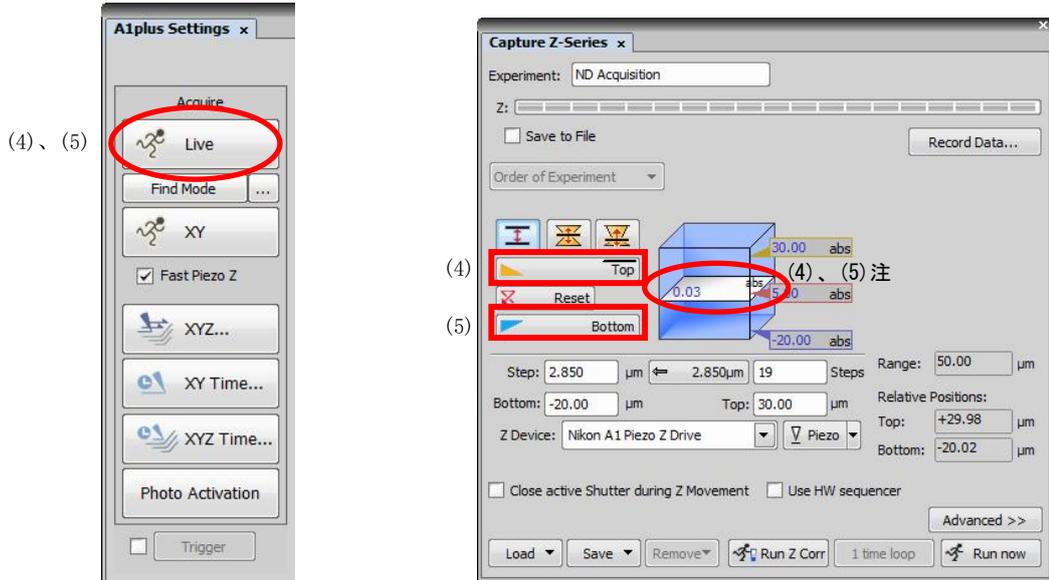


(4) 点击  [Live] 按钮, 边观察图像边转动显微镜的调焦手轮(微调模式), 点击  [Top] 按钮, 决定 Top。

注: 向立方体中的面的数值增加的方向转动调焦手轮。

(5) 点击  [Live] 按钮, 边观察图像边转动显微镜的调焦手轮(微调模式), 点击  [Bottom] 按钮, 决定 Bottom。

注: 向立方体中的面的数值减少的方向转动调焦手轮。

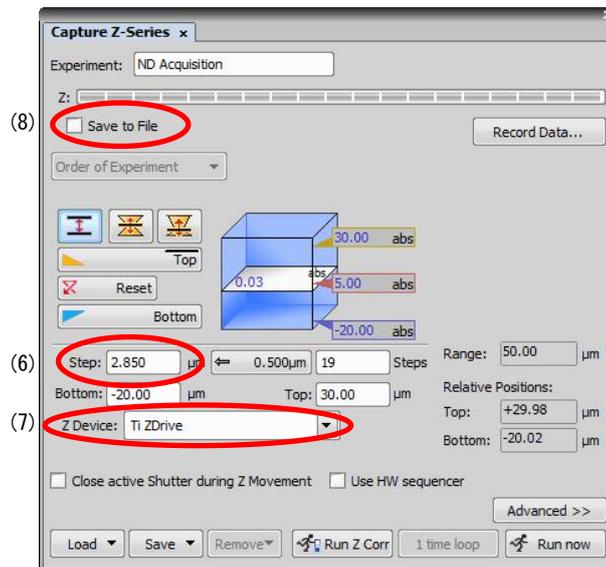


(6) 决定 Step。

(7) 在 Z Device 中选择[Ti ZDrive]。

(8) 根据需要, 选择[Save to File], 在保存的同时获取图像。

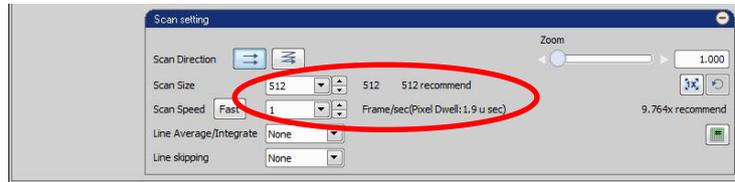
注: 保存格式为 nd2 格式。



8.3 获取 Z 序列图像。

- (1) 将像素数调整为所需要的分辨率。(512×512 等)
图像较暗时，请降低扫描速度。

注： 请确认更改分辨率后的 Pixel Dwell。
Pixel Dwell 代表激光照射 1 个像素的时间。
数值越大，获取的图像越明亮。

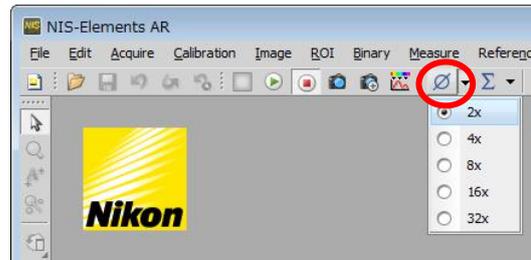


- (2) 根据需要进行 Average。
Average 是对同一图像进行多次扫描，通过平均化来消除噪声的功能。
Average 分为逐 Frame 和逐 Line 扫描 2 种。

注： 进行 Average 可以减少噪声，但帧率（1 秒中内可获取的图像数）会随之降低。

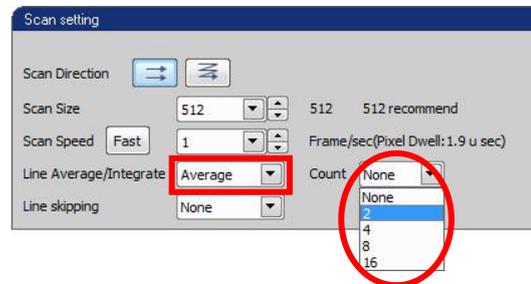
Frame Average:

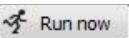
点击软件工具栏中的  按钮，选择平均扫描次数。

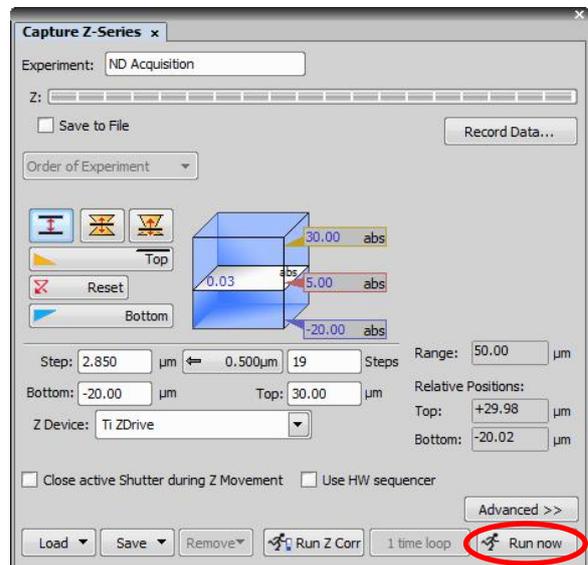


Line Average:

在 Scan setting 画面的 [Line Average/Integrate] 中选择 [Average]，在 [Count] 中选择平均扫描次数。



- (3) 点击  [Run now] 按钮，获取 Z 序列图像。

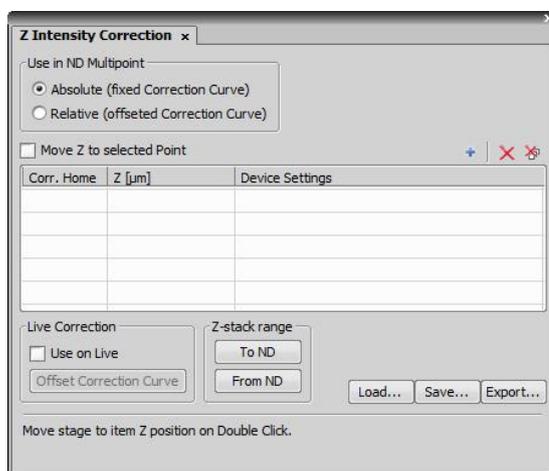


9

Z 序列图像的获取方法（改变亮度的同时获取）

9.1 调出 Z Intensity Correction 对话框。

鼠标右击软件上的灰色部分，从弹出的菜单中选择 [Acquisition Controls] -> [Z Intensity Correction] 以调出对话框。

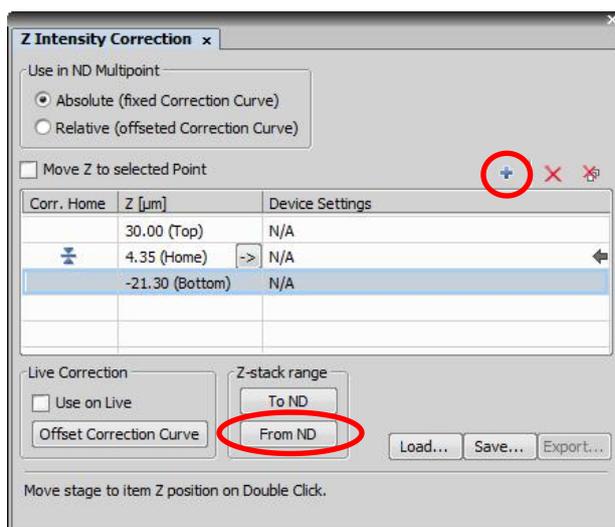


9.2 指定 Z 的位置，设定该位置的亮度。

(1) 点击 **From ND** 按钮，将 Z 的点记录到 Z 的项目中。

（点击该按钮后会自动记录 Top、Home、Bottom 的 3 点。

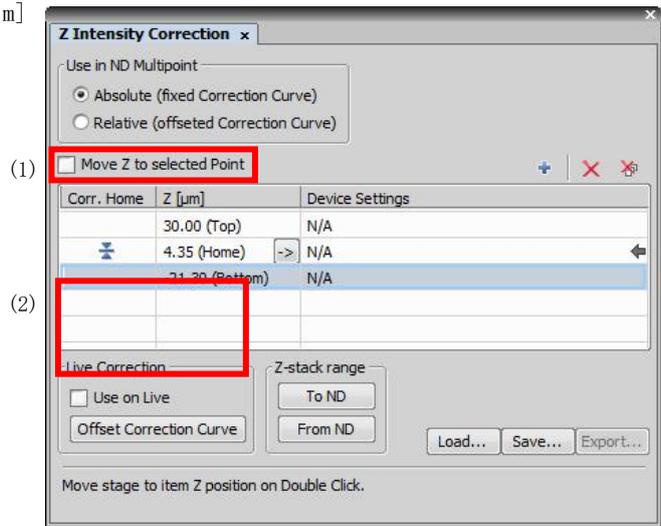
要设定除这 3 点以外的点时，在 Live 中边确认图像边点击 **+** 按钮，即可记录需要的点。）



9.3 登录各 Z 位置的激光功率、HV 等。

(1) 勾选 Move Z to selected Point, 双击 Z [μm] 栏的 Z 位置后, 焦点移动到已记载的 Z 位置。

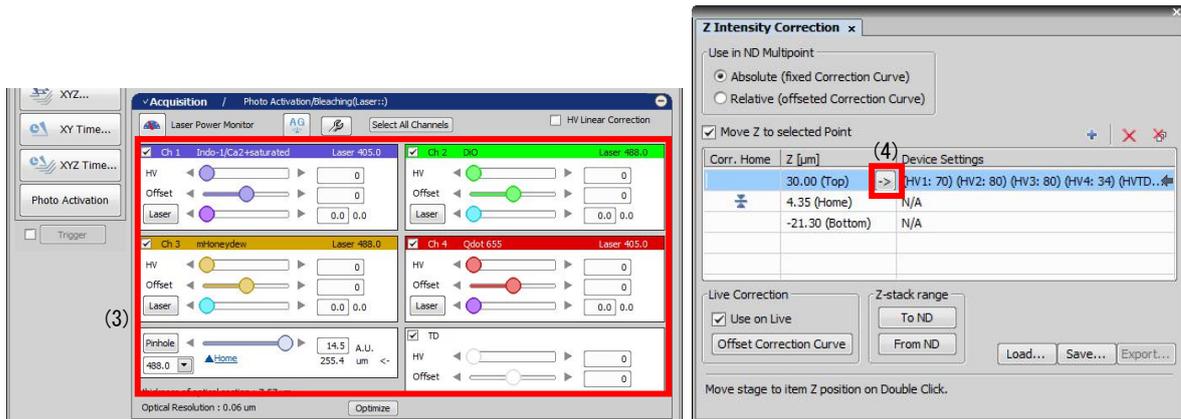
(2) 勾选 Live Correction 的 Use on Live。



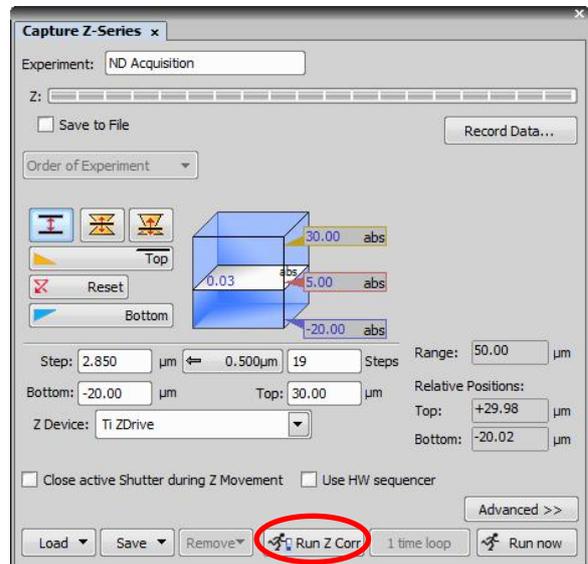
(3) 移动到需要调节亮度的 Z 位置, 进行 HV 与激光功率的调节。

(4) 要登录调节后的 HV 以及激光功率时请点击 。

各 Z 位置的亮度调节结束后, 退出 Z Intensity Correction 也没有关系。



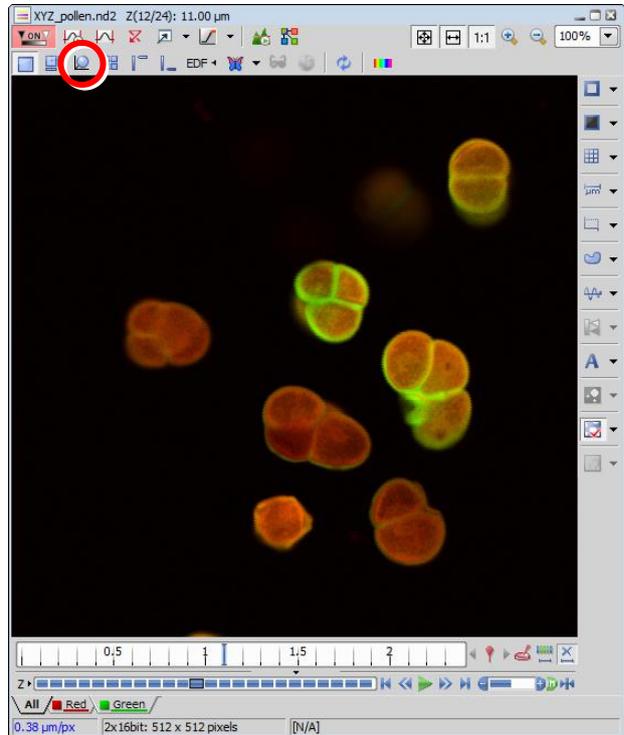
(5) 所有的登录结束后, 点击 Capture Z-Series 对话框的 [Run Z Corr] 按钮, 执行图像获取。



10 三维图像的创建方法

10.1 创建三维图像。

- (1) 点击 ，打开 Z 序列图像。
- (2) 点击  [Show Volume View]按钮，构筑三维图像。



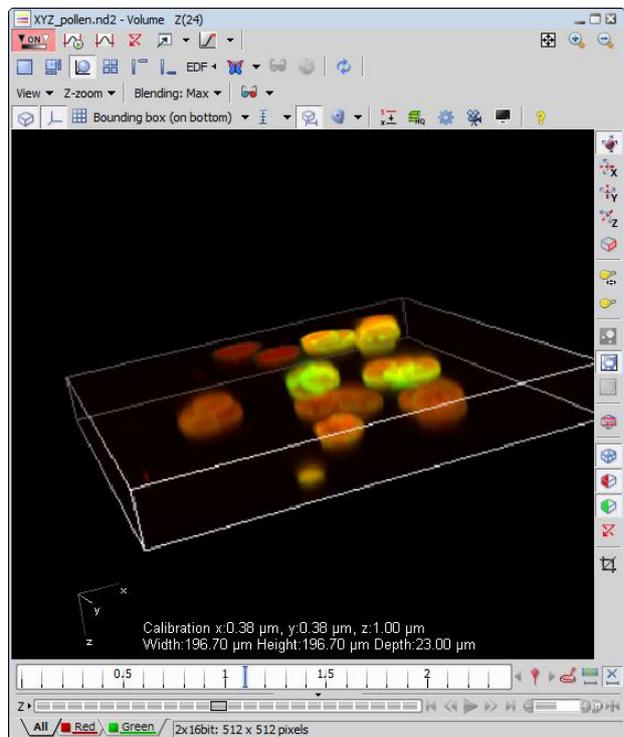
10.2 将所需角度的三维图像保存为 1 幅图像。

- (1) 用鼠标拖动三维图像的白色边框，以调节到所需的角度的。

注：“Ctrl+鼠标左键+鼠标拖动”切割剖面。
“鼠标右键+鼠标拖动”移动立体图像的显示位置。
旋转鼠标滚轮以进行缩放。

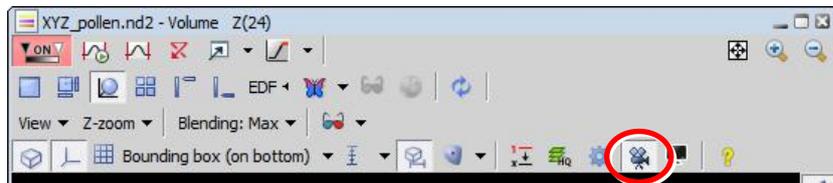
- (2) 从菜单栏中执行[Edit] -> [Create View Snapshot (8bit RGB)], 进行画面捕捉。

- (3) 从菜单栏中选择[File] -> [Save As], 以任意的文件格式 (jpg、tiff、bmp 等) 进行保存。

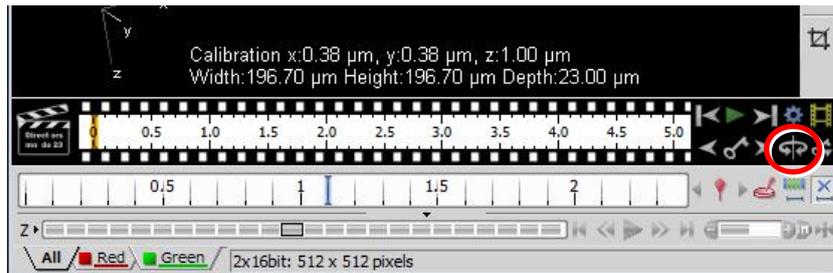


10.3 创建三维图像的旋转图像。

(1) 将  [Show Movie Maker]按钮置于 ON。

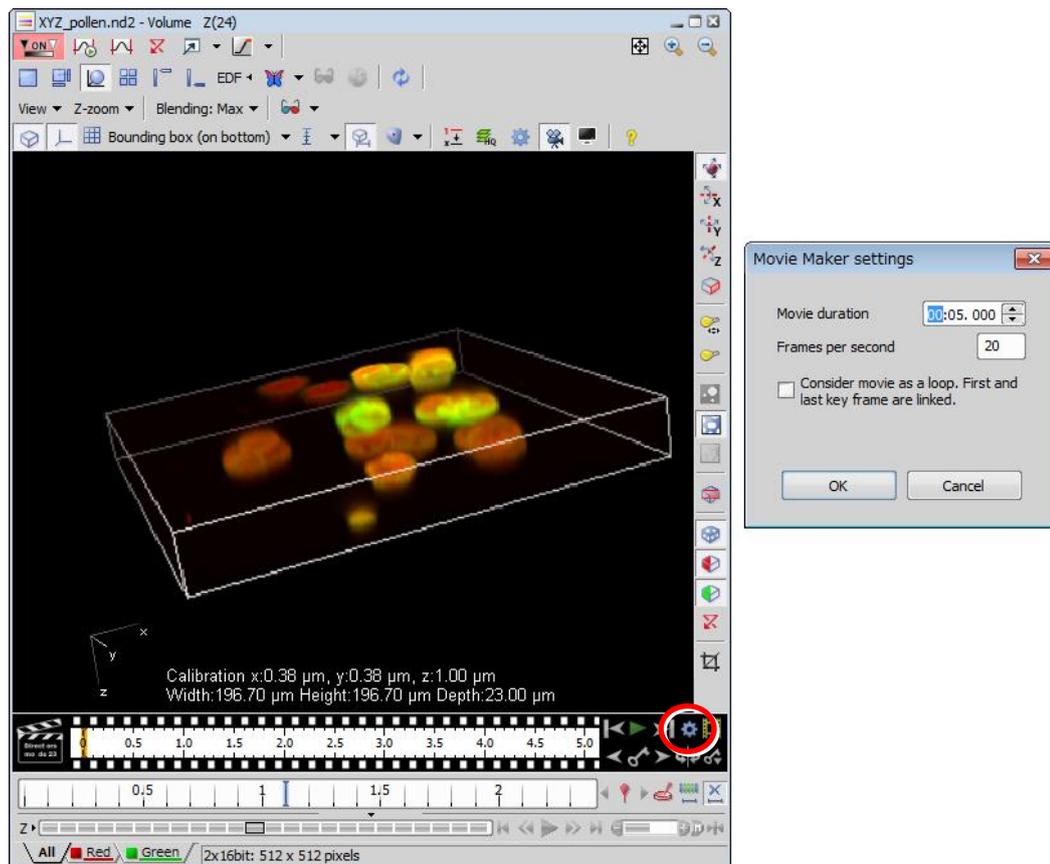


(2) 使用  [Presets]按钮选择旋转方向。



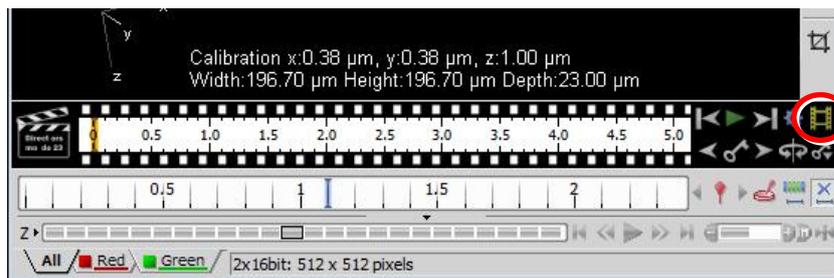
(3) 点击  [Settings]按钮，打开 Movie Maker settings 对话框。

指定播放时间 (Movie Duration) 和播放速度 (Frames per Second)，点击 [OK] 按钮。

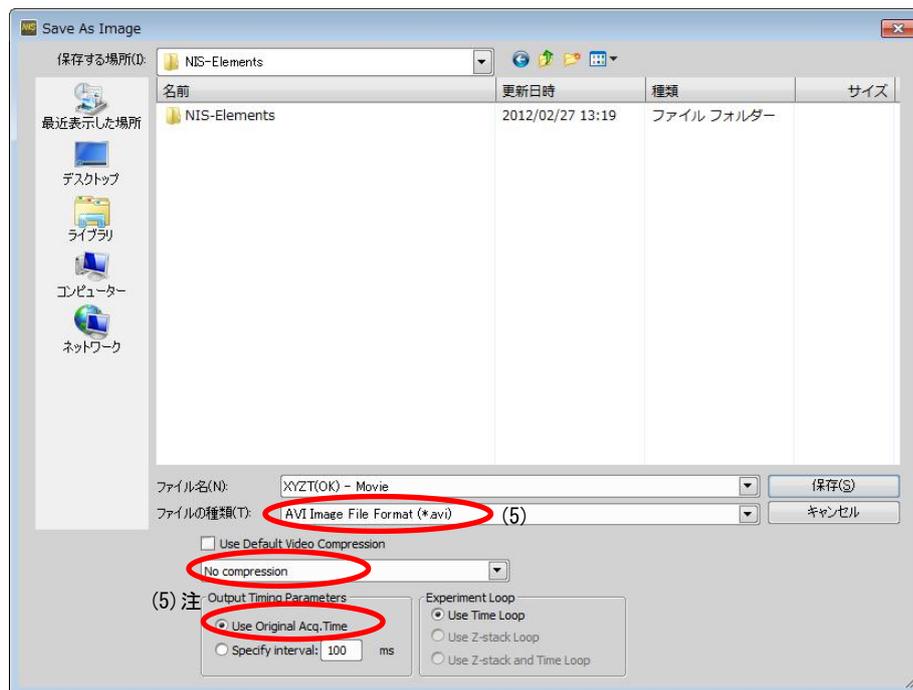


注： Frames per Second (fps) 是 1 秒钟内显示的图像数量。显示数量越多，画面过渡越平滑。首先请以 3~10fps 为基准使用。

(4) 点击  [Create Movie] 按钮，创建影像。



(5) 选择已得到的旋转图像，从菜单栏中选择 [File] -> [Save As] 以进行保存。
保存格式选择 avi。



注：avi 的压缩格式建议以 No Compression（不压缩）进行保存。

注：保存时请选择 Use Original Acq. Time。

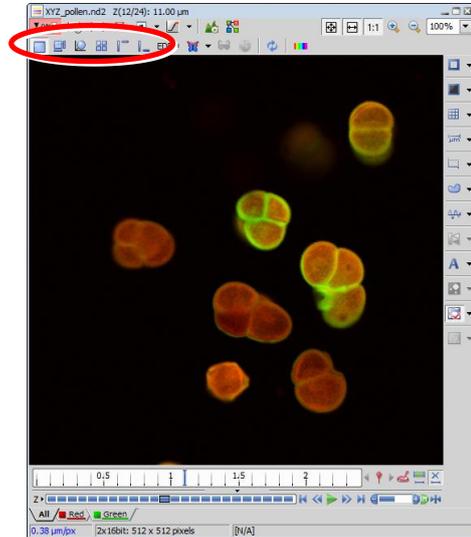
11

Slice View 图像以及 Projection 图像的创建方法

11.1 创建 Slice View 图像或 Projection 图像。

(1) 点击 ，打开 Z 序列图像。

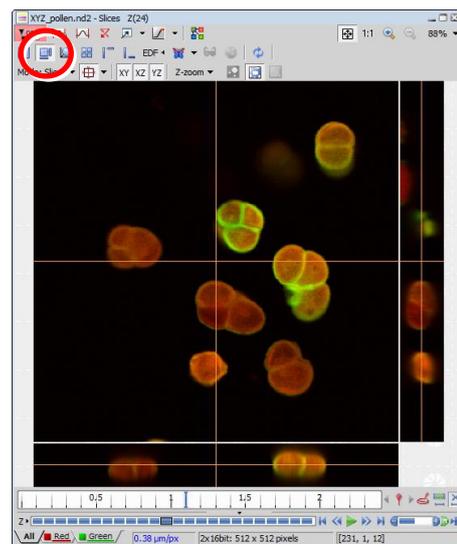
(2) 点击图像上方边框中的  按钮或  按钮，构筑图像。



 [Show Slices View]按钮:

显示任意位置的 XZ、YZ 剖面。

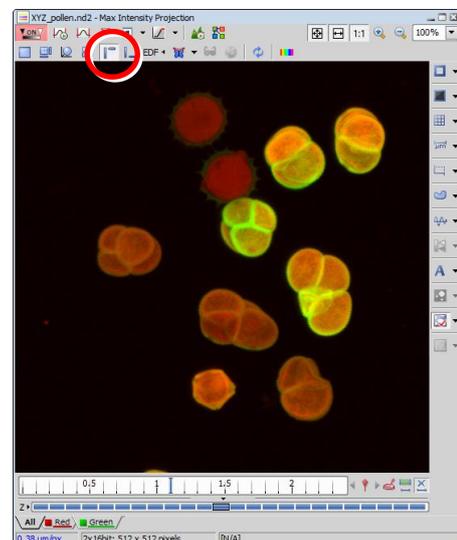
点击 ，可显示选择位置。请用鼠标拖动十字光标。



 [Show Maximum Intensity Projection]按钮:

从所有帧中选出亮度最大的像素以构筑 1 幅图像。

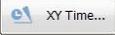
便于将有一定厚度的样本捕捉为平面图像。

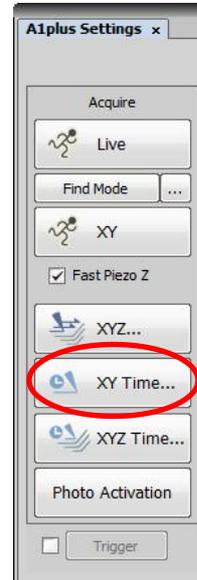


12 时间序列图像的获取方法

12.1 执行“彩色图像的获取方法”的步骤 4.1~4.6，决定图像的获取条件。

12.2 进行时间序列的时间设定。

(1) 点击  [XY Time]按钮，启动 Capture Timelapse 对话框。



(2) 决定时间间隔 (Interval) 和持续时间 (Duration)。

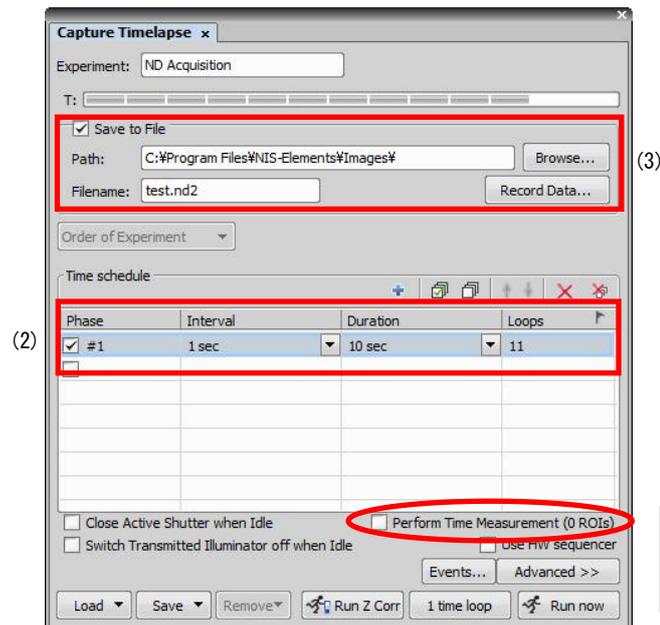
注：要以最高速度获取图像时，选择 No Delay (时间间隔)。

注：可创建多个 Phase。选择多个 Phase 可以进行可变时间推移 (中途改变时间间隔的时间推移)。

(3) 选择 [Save to File]，在保存的同时获取图像。

注：建议在保存的同时获取时间序列图像。

注：保存格式为 nd2 格式。



可以在执行时间序列的同时进行经时变化分析。

12.3 获取时间序列图像。

- (1) 将像素数调整为所需要的分辨率。(512×512 等)
 图像较暗时，请降低扫描速度。

注： 请确认更改分辨率后的 Pixel Dwell。
 Pixel Dwell 代表激光照射 1 个像素的时间。
 数值越大，获取的图像越明亮。



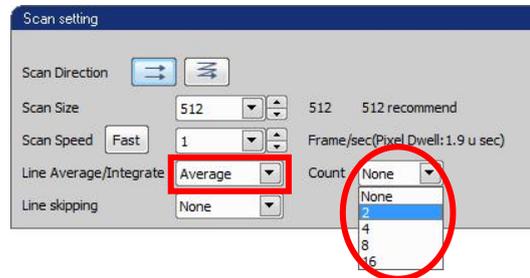
- (2) 根据需要进行 Average。
 Average 是对同一图像进行多次扫描，通过平均化来消除噪声的功能。
 Average 分为逐 Frame 和逐 Line 扫描 2 种。

注： 进行 Average 可以减少噪声，但帧率（1 秒中内可获取的图像数）会随之降低。

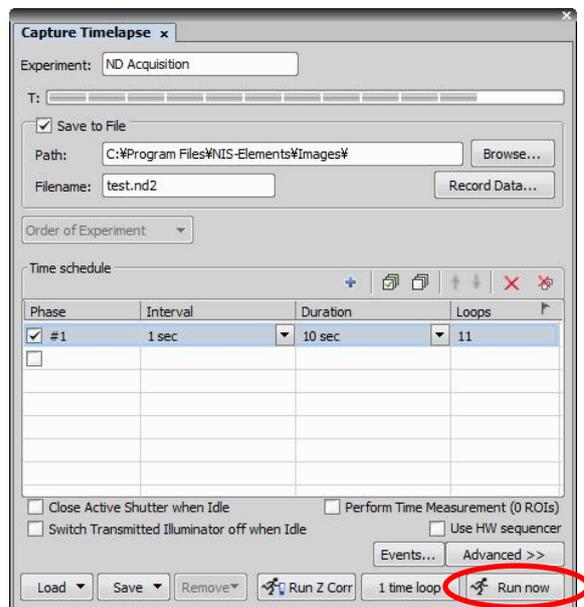
Frame Average:
 点击软件工具栏中的  按钮，选择平均扫描次数。



Line Average:
 在 Scan setting 画面的 [Line Average/Integrate] 中选择 [Average]，在 [Count] 中选择平均扫描次数。



- (3) 点击  [Run now] 按钮，获取时间序列图像。

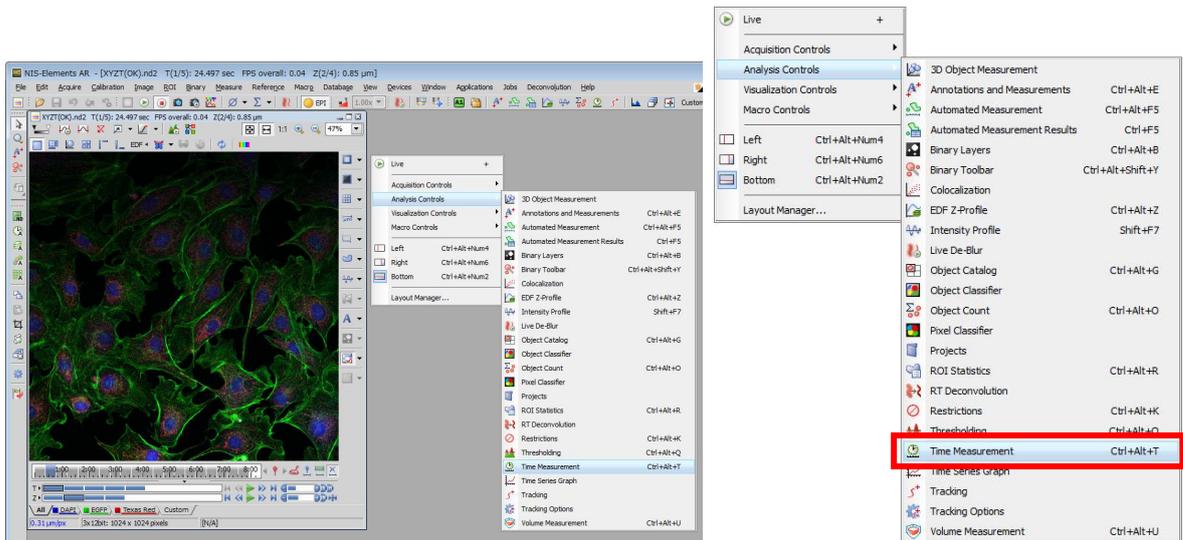


13 经时变化分析 (Time Measurement)

13.1 点击 ，打开时间序列图像。

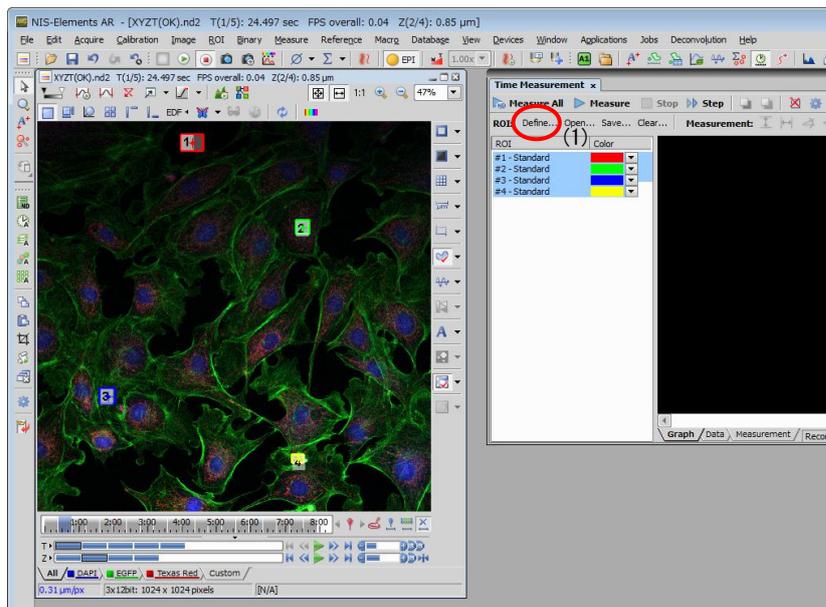
13.2 显示 Time Measurement。

软件上未显示 Time Measurement 时，鼠标右击软件上的灰色部分，从弹出的菜单中选择 [Analysis Controls] -> [Time Measurement] 以调出显示。



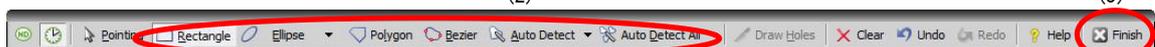
13.3 在图像上设定 ROI (Region Of Interest)。

- (1) 点击 **Define...** [Define] 按钮，启动 Define ROI 窗口。
- (2) 在图像上设定 ROI。
- (3) 点击 **Finish** [Finish] 按钮以结束设定。

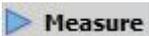
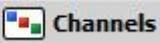


(2)

(3)

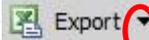


13.4 进行经时变化分析。

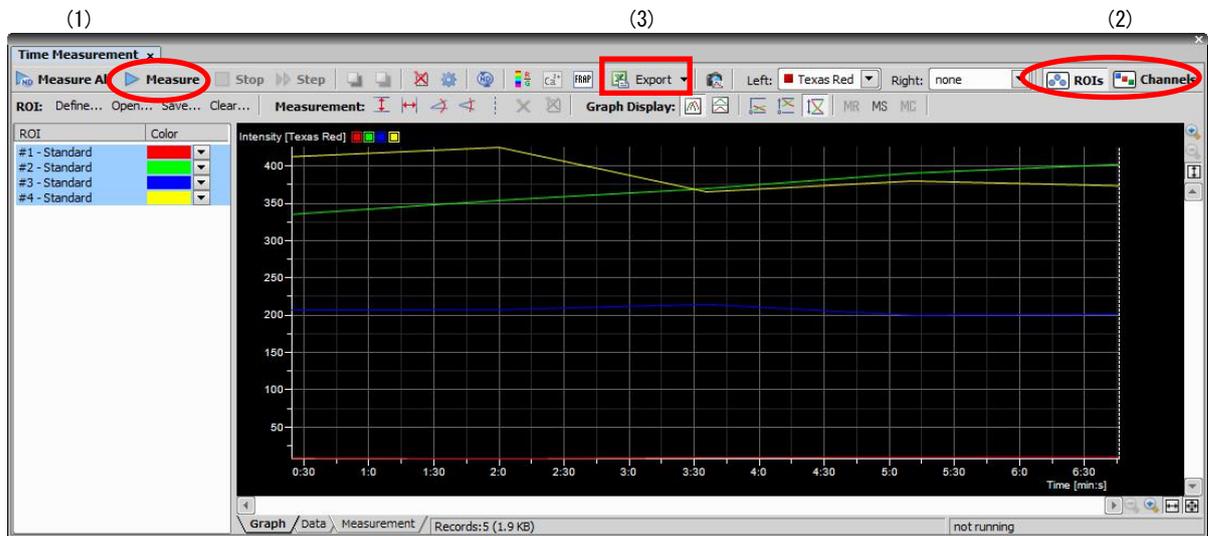
- (1) 点击  [Measure] 按钮，绘制图表。
- (2) 以  **ROIs**  **Channels** 中任何一种测量模式进行分析。

Multi ROIs: 可以显示多个 ROI 的经时变化
(每次只可选择 1 个通道)

Multi Dyes: 可以显示多个通道 (ALL、Custom) 的经时变化
(每次只可选择 1 个 ROI)

- (3) 点击  **Export** ，选择 Export Data，点击  **Export**  [Export] 按钮，可以保存为文本数据。

注： 无法保存为文本数据时，请从菜单栏中选择 [Edit] -> [Options] -> [Date export] -> [Global Settings]，勾选 [Export text files into folder]，指定保存路径。



13.5 Time Measurement 使用方法



选择要在图表中显示的 ROI。

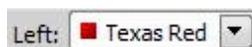
用鼠标点击要显示的 ROI。

按住 SHIFT 拖动鼠标可以选择多个 ROI。



 可以测量双线间的时间间隔。

 可以测量双线间的亮度差。



选择要在图表中显示的通道。

14

光刺激成像的获取方法 (检流计式扫描器 · 时间序列刺激)

14.1 执行“彩色图像的获取方法”的步骤 4.1~4.7，决定图像的获取条件。

注：使用 Ch series 时无法设定光刺激。Ch series 请选择为[None]。

14.2 设定要进行光刺激的位置。

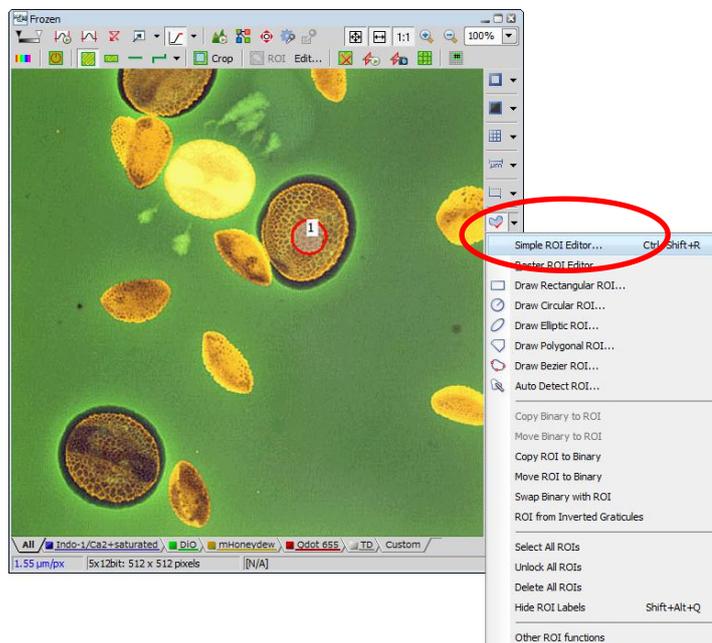
(1) 点击图像侧面边框上的  按钮，选择 Simple ROI Editor。

使用



在图像上绘制 ROI。

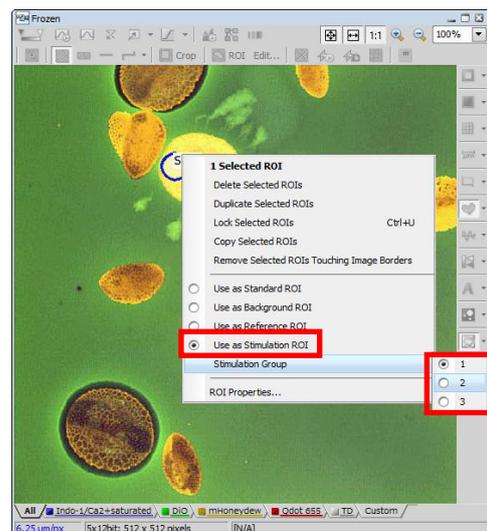
注：使用  Stim. Point 可实现点刺激。



(2) 在 ROI 上鼠标右击，从弹出的菜单中选择 [Use as Stimulation ROI]。

接着选择 [Stimulation Group]。

注：ROI 最多可分为 3 组。每个组中可设定多个 ROI。
通过对 ROI 进行分组，可设定不同的刺激条件。



14.3 进行刺激用激光的设置。

(1) 点击 Photo Activation，切换设定画面。

(2) 点击选项卡 1 (Stimulation Group1 的设置)。

(3) 选择刺激用的激光。

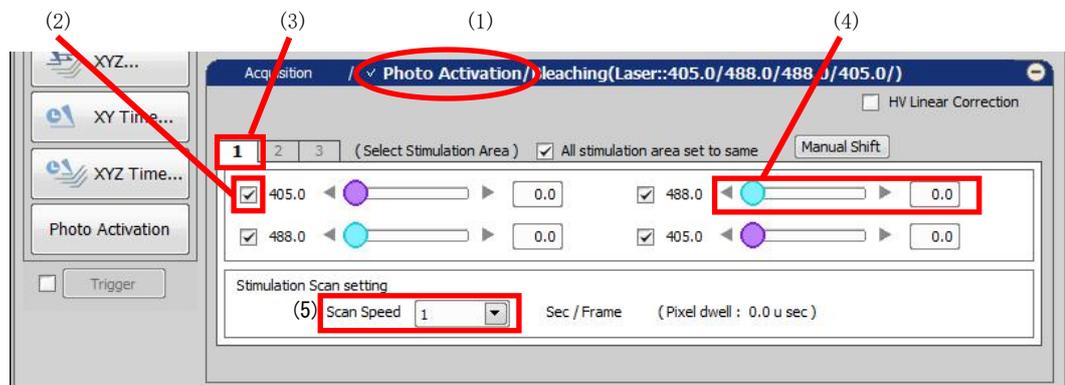
注： 可将所有激光都用于刺激。

(4) 操作激光功率滑动条，选择刺激时的激光功率。

(5) 选择刺激的扫描速度。

**注： 请将 Scan Speed 理解为 1 次刺激所需的时间。
选择 1 Sec/Frame 时，1 次刺激时间为 1 秒。**

(6) 有 Stimulation Group2、3 时，重复 (2)~(5) 的操作。



14.4 进行光刺激成像的时间序列的设置。

(1) 点击 [Photo Activation] [Photo Activation] 按钮，启动 ND Stimulation 窗口。



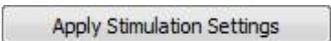
(2) 进行光刺激成像的时间设定。

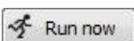
- Acq/Stim: 设定是进行图像获取还是光刺激。
- ROIs: 设定刺激用的 Stimulation Group。
- Interval: 设定图像获取 or 刺激的时间间隔。
- Duration: 设定图像获取 or 刺激的持续时间。
设定为 Loops 时, 将自动决定。
- Loops: 设定图像获取 or 刺激的执行次数。

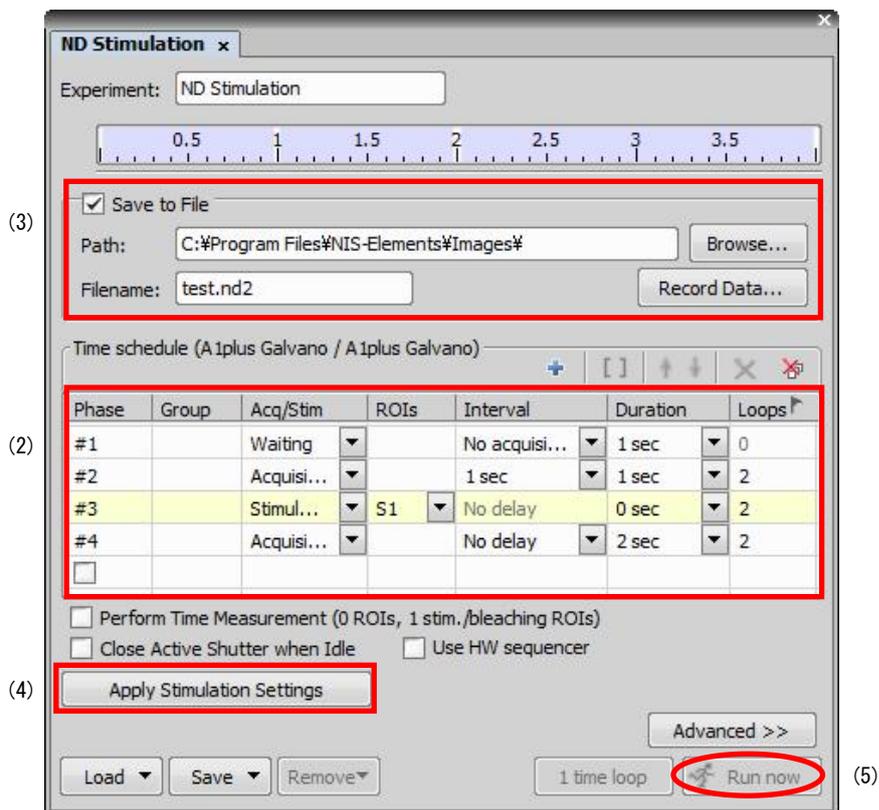
(3) 选择[Save to File], 在保存的同时获取图像。

注: 保存格式为 nd2 格式。

注: 建议在保存的同时获取时间序列图像。

(4) 点击  按钮, 读取光刺激成像的设定。

(5) 点击  [Run now]按钮, 执行光刺激成像。



15 图像显示功能

15.1 通道显示的切换

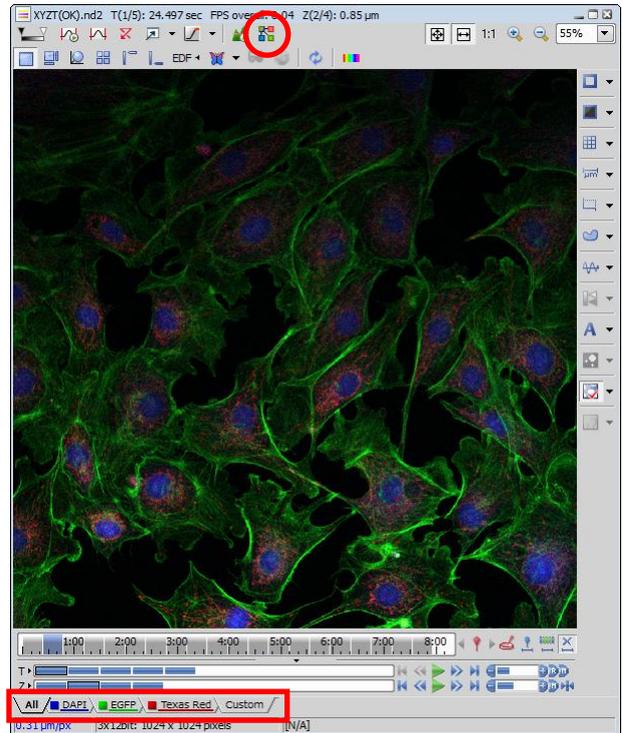
(1) 点击



在[Custom]选项卡中,可自由选择要重叠组合的图像。

在[Custom]选项卡中鼠标右击,从一览中选择图像。

(2) 点击  [Split Components]按钮,所有通道将一并显示。
再次点击后恢复原状。



15.2 多维图像的显示切换

(1) 点击



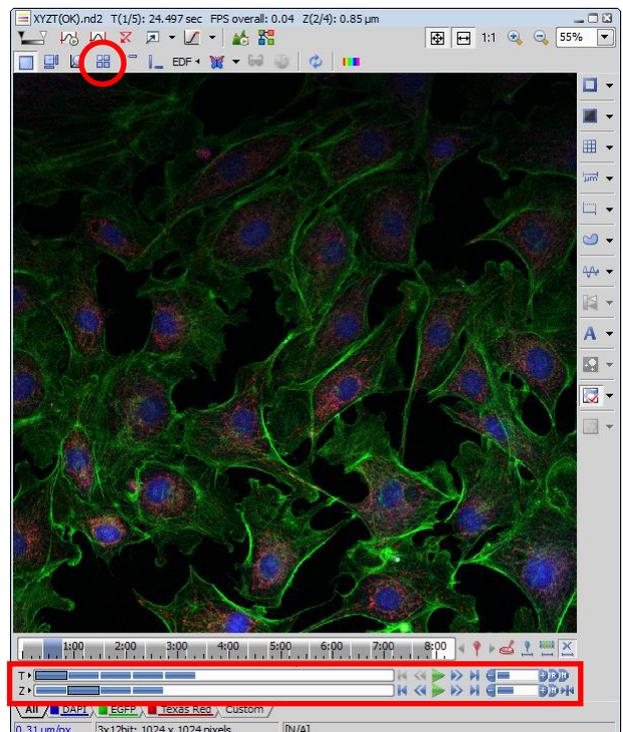
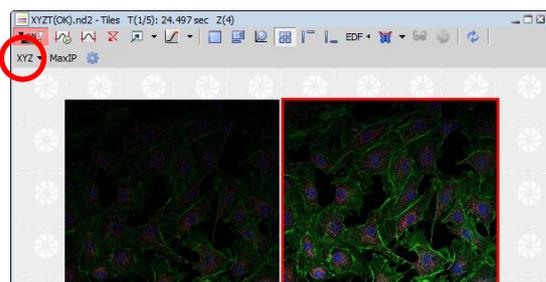
各项目的按钮,可浏览各序列图像。通过  或  移动到下一幅图像。

(2) 通过  播放(再次点击后停止),通过  调节播放速度。

 为实时播放(以实际获取图像时的速度播放), 为最快速度播放。

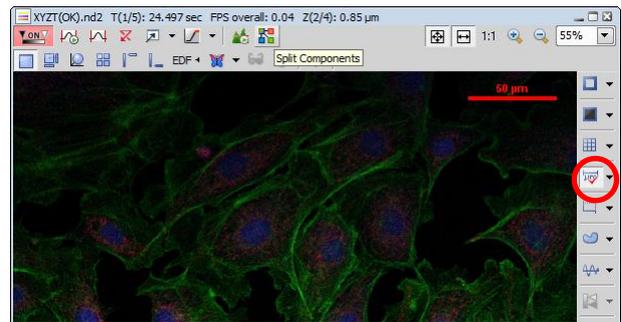
(3) 点击  [Show Tiled View]按钮,将平铺显示序列图像。

通过  按钮选择要进行平铺显示的序列图像。



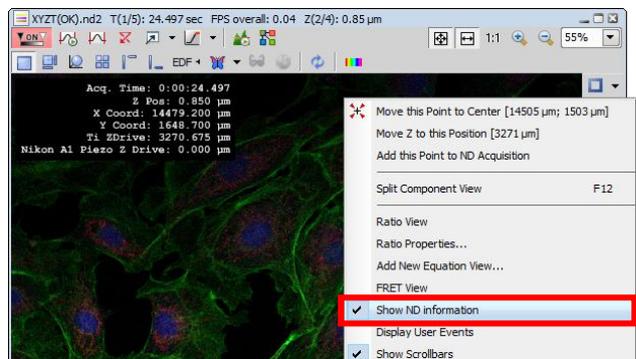
15.3 插入刻度

- 点击  [Show Scale]按钮，将在图像上显示刻度。（再次点击后隐藏）
 在刻度上鼠标右击，可以进行刻度编辑。
 取消 [Scale Properties] -> [Scale 选项卡] -> [Automatically adjust size]的勾选后，可以在 size 中更改要显示的刻度尺寸。
 此外还可更改刻度尺及文字的颜色和尺寸等。

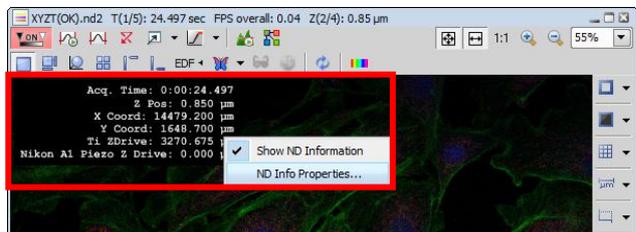


15.4 在时间推移图像中插入获取信息

- 在时间推移图像上鼠标右击，从弹出的菜单中选择 [Show ND information]后，将在图像上显示获取时的信息。



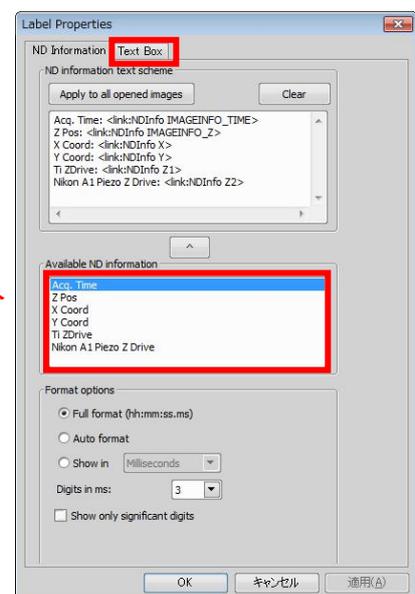
- 在显示的获取时信息上鼠标右击，从弹出的菜单中选择 [ND Info Properties]后，将显示 Label Properties 对话框。



- 选择 [Text Box]选项卡后，可以进行要显示的信息的添加/删除和显示字体、尺寸、颜色的更改。

- ※ 在显示信息的状态下保存为影像文件（从菜单栏中选择 [File] -> [Save As]，选择 avi 文件），将生成插入了获取时间的影像文件。

可以选择要插入的信息。



15.5 图像的保存方法

以下情况时，无法通过常用的保存方法（从菜单栏中选择[File] -> [Save As]）进行保存。

- (a) 要保存显示有刻度或测量结果的图像
- (b) 要通过 Slice View 或 Projection 等使用了 Z stack 图像的显示方法进行保存的图像

上述图像请使用以下方法进行保存。

- (1) 从菜单栏中选择[Edit] -> [Create View Snap Shot (8bit)]。
- (2) 将图像转换为 8bit 图像后临时保存。
- (3) 从菜单栏中选择[File] -> [Save As]，以任意文件格式进行保存。

15.6 读取图像获取条件的方法

可以从获取图像中读取获取时的拍摄条件（Optical path 画面的内容、Average 的次数等）。

- (1) 点击 ，打开要读取条件的图像（nd2）。
- (2) 在图像上右击，从弹出的菜单中选择[Reuse Camera Setting]。
- (3) 设定条件即被读取。

15.7 读取显微镜的控制状态的方法

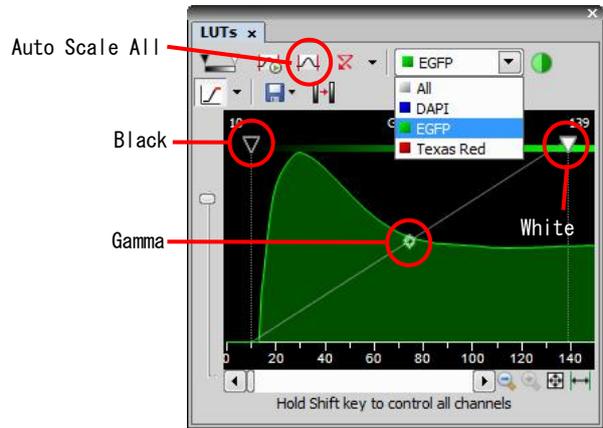
可以从获取图像中读取获取时的显微镜的控制状态。

- (1) 点击 ，打开要读取条件的图像（nd2）。
- (2) 在图像上右击，从弹出的菜单中选择[Reuse Device Setting]。
- (3) 控制状态即被读取。

15.8 调节对比度

鼠标右击软件上的灰色部分，从弹出的菜单中选择[Visualization Control] -> [LUTs]以调出 LUTs。

- (1) 点击  Auto Scale All，自动调节通道的对比度。
- (2) 要按通道调节对比度时，从一览中选择通道，拖动[Black]、[White]、[Gamma]按钮以进行条件。



LUTs

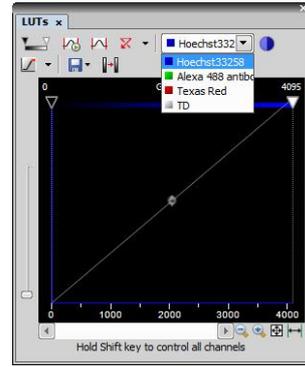
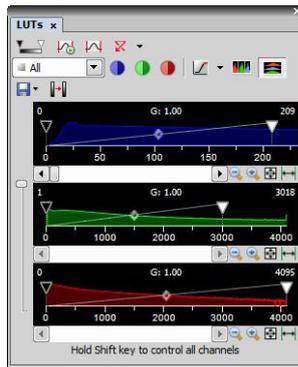
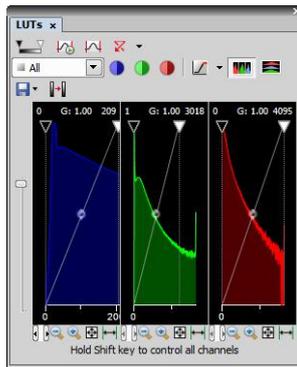
LUTs 的显示因通道数而异。

3 通道及以下...同时显示所有通道。

使用切换按钮  可切换显示的横/竖。

4 通道及以上...每次显示 1 个通道。

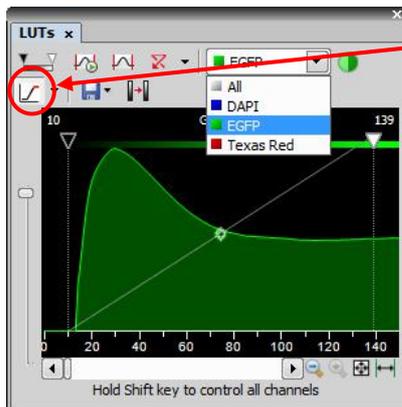
从下拉菜单中选择要显示的通道。



- (3) 点击  [Reset LUTs]按钮，将不进行对比度调节而退出。

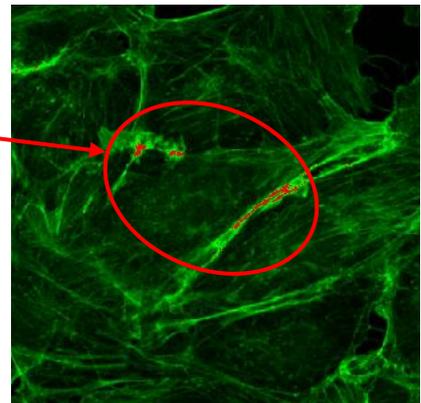
- (4) 点击  [Pixel Saturation indication]按钮，图像饱和的部分将显示为红色。

注：调节时，通过[Live]按钮的 ON/OFF（扫描的 ON/OFF）可将淬灭减少到最低限度。



Pixel Saturation indication

饱和的部分

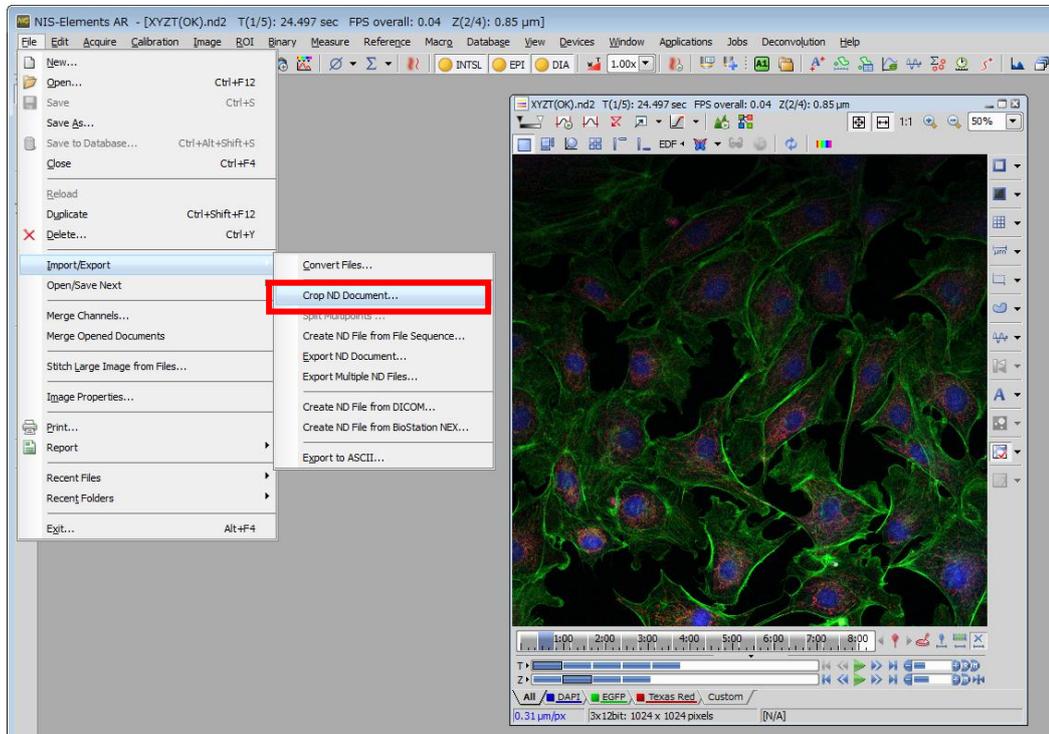


16 ND2 文件的抽出

以 nd2 文件格式对多维图像进行管理。可以只抽出任意维度的任意范围。

(1) 点击 ，打开 nd2 文件。

(2) 从菜单栏中选择 [File] -> [Import/Export] -> [Crop ND Document]。



(3) 指定要抽出的维度和范围。

(4) 点击 [Crop] 按钮，将生成新的 nd2 文件。

时间轴

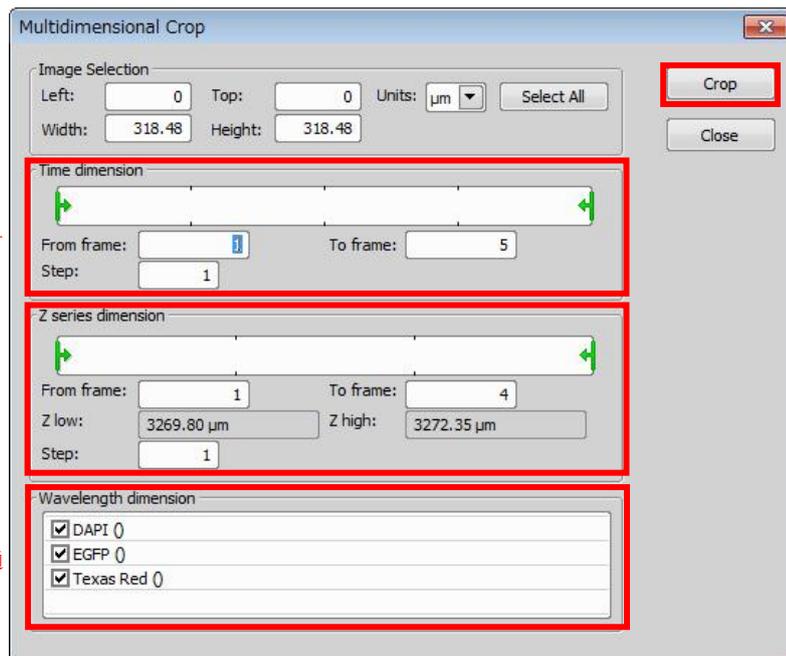
可以只选择任意的时间轴范围。

Z 轴

可以只选择任意的 Z 轴范围。

波长

可以只选择任意的通道。

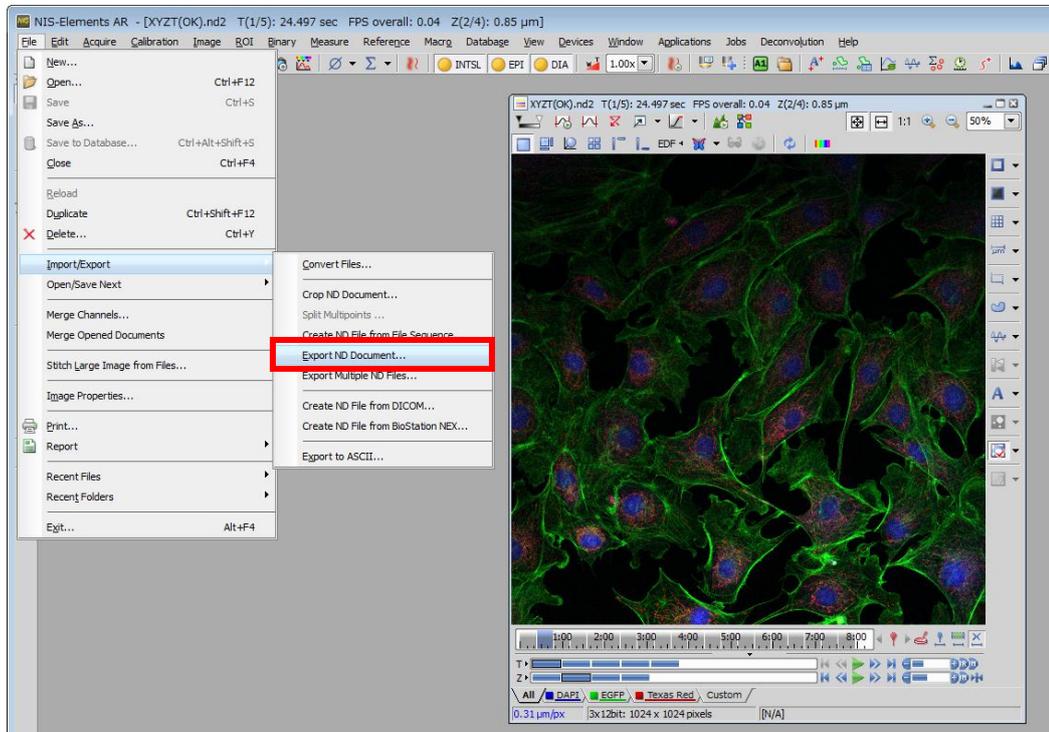


17 ND2 文件的导出

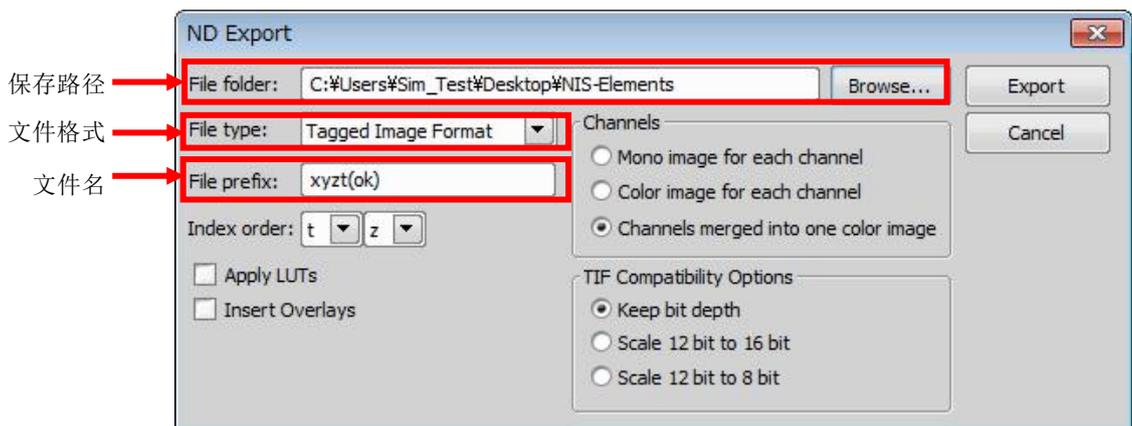
多维图像采用 NIS-Elements 独有的 nd2 文件格式进行保存，要使用其他软件进行浏览时，需要导出成 Tif 格式。

(1) 点击 ，打开 nd2 文件。

(2) 从菜单栏中选择 [File] -> [Import/Export] -> [Export ND Document]，启动 ND Export 窗口。



(3) 指定保存路径、文件名和文件格式。



(4) 选择转换的详情。

[Apply LUTs]:

要以通过 LUTs 进行了对比度编辑的图像进行转换时选择此项。

[Insert Overlays]:

要以插入了刻度尺或测量结果的图像进行转换时选择此项。

将只可保存重叠图像。

(5) 选择要保存的 Channel。

[Mono image]: 以黑白图像逐一保存各通道

[Color Image]: 以彩色图像逐一保存各通道

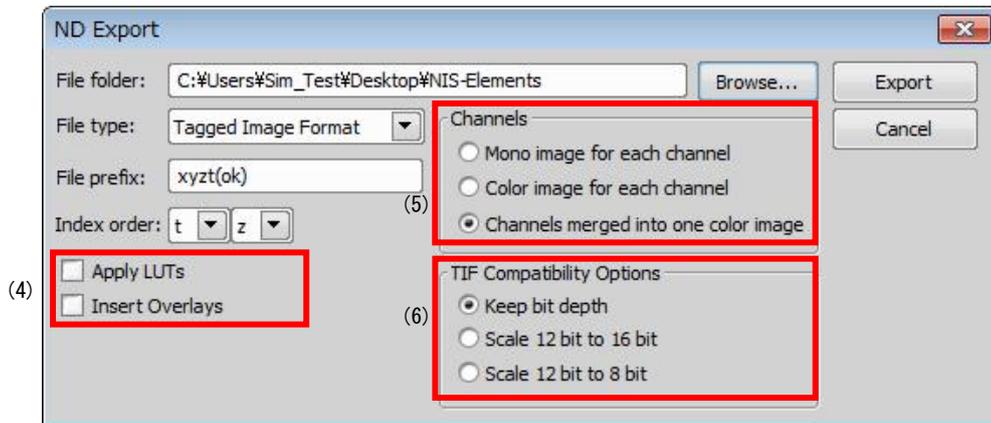
[Channels merged into color image]: 保存重叠图像

(6) 要保存为 TIFF 文件时，选择 TIF Compatibility (bit 转换)。

[Keep bit depth]: 以 12bit 格式保存

[Scale 12bit to 16bit]: 以 16bit 格式保存

[Scale 12bit to 8bit]: 以 8bit 格式保存



<Channel • TIF Compatibility Options • Insert Overlay 的组合>

	depth	12bit to 16bit	12bit to 8bit
Mono image	12bit	16bit	8bit
Color image	12bitRGB	16bitRGB	8bitRGB
Channel merged	Multi tif 12bit	Multi tif 16bit	Multi tif 8bit
Channel merged +Insert overlay	12bitRGB	16bitRGB	8bitRGB

Image: 各通道的图像

merged: 重叠图像

淡黄色: 彩色输出

时间推移图像中插入了获取时间的 tif 文件的输出

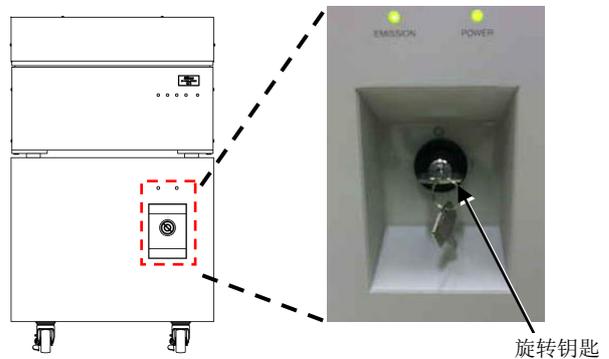
- (1) 在时间推移图像上鼠标右击，从弹出的菜单中选择 [Display ND Information] -> [Acq. Time]，在图像上显示获取时间。
- (2) 点击图像上方边框中的 1:1 按钮，将图像的显示尺寸设为 100% 显示。
- (3) 从菜单栏中选择 [Edit] -> [Create Full View Snapshot] 以进行画面捕捉。
- (4) 执行 ND2 文件的导出步骤 (1) ~ (3)，导出为 tif 文件。

18 关机

18.1 退出“NIS-Elements”软件。

18.2 切断激光发生器的电源。

将钥匙从水平插入的状态（on）逆时针旋转 90 度。



18.3 切断控制器的电源。

18.4 切断显微镜的电源。

- (1) 切断显微镜主体的电源。
- (2) 切断水银灯（目视荧光观察用灯）的电源。
- (3) 切断卤素灯（目视透射光观察用灯）的电源。
- (4) 切断压电 Z 轴载物台的电源。
- (5) 切断电动载物台的电源。

18.5 关闭计算机。

光谱篇

A1 / Ti-E / PFS

电动载物台·压电 Z 轴载物台·强光灯

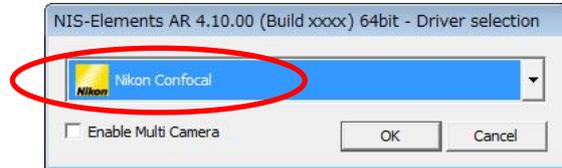
根据所使用的机型和选项设定，本说明中所涉及的某些功能可能无法使用。

19 光谱图像的获取方法（光谱探测器）

19.1 启动“NIS-Elements”软件。

- (1) 点击 ，启动“NIS-Elements”软件。

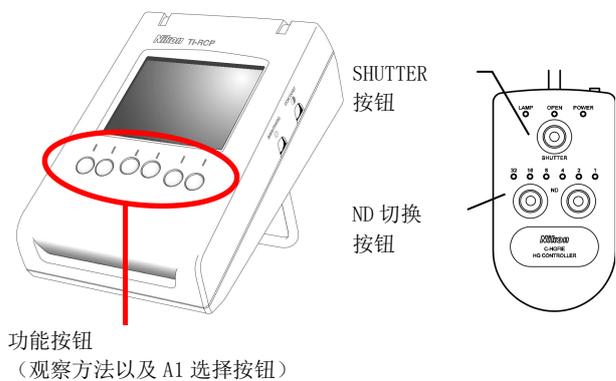
注：在 Confocal 之外还连接有相机的情况下，将显示“Driver selection”对话框以供选择驱动程序。
选择“Nikon Confocal”，点击[OK]按钮。



19.2 通过显微镜确认样本。

- (1) 选择需要的观察方法。
按下 Ti 遥控器的功能按钮，选择需要的观察方法。

注：为避免淬灭，请调小荧光灯快门。请同时使用 ND 滤镜寻找试料。



19.3 将光路切换到 A1。

有 Ti 遥控器时，按功能按钮[A1]，将光路切换到 A1。
没有 Ti 遥控器时，请将光路切换到 L100。

19.4 点击[Laser Inter Locked]按钮，解除闪烁状态，使激光可以通过软件起振。

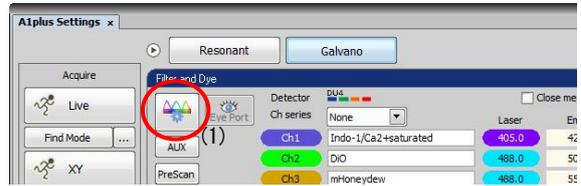
注：光路未切换到 A1 时，即使点击按钮也无法解除。



19.5 设定 Optical Path。（设定获取图像所需的共聚焦系统的光路）

确认设定内容。

(1) 点击  按钮，启动 Optical path 画面。



(2) 点击  [SD]按钮，选择光谱探测器（检测器）。

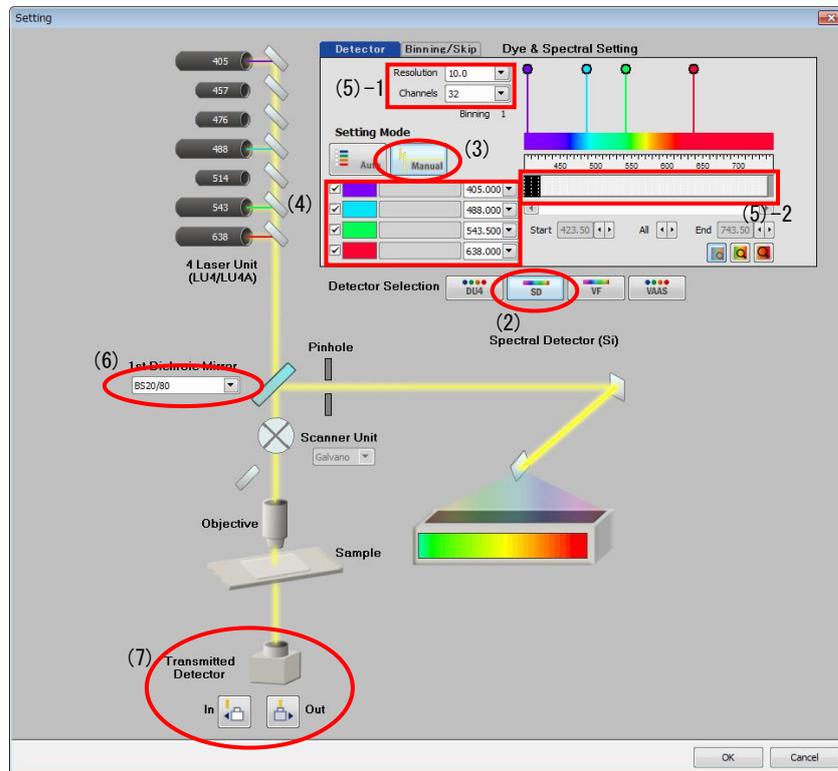
(3) 点击  [Manual]按钮，以手动模式设定 Optical Path。

(4) 勾选要使用的激光的通道。

(5) 选择要使用的波长分辨率（2.5、6、10nm）、通道数（1~32ch）和要获取的波长范围（拖动滑动条）。

(6) 选择 1stDM 为 BS20/80。

(7) 要同时获取光谱图像和透射图像时，请点击  按钮，使  进入光路。



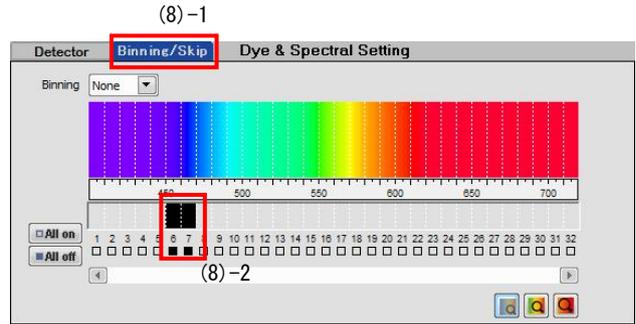
注： 要获取透射图像时，请关闭显微镜上方的照明。

注： 透射探测器设置在透射光之前，因此在透射探测器在光路中的情况下无法目视观察透射图像（微分干涉（DIC））。

需要目视观察透射图像时，请将透射探测器从光路中移出。

(8) 对于会直接检测到激光的通道，点击 Binning/Skip 选项卡中的通道跳越 ，以设定为不检测。

注： 受到激光的反射光照射的通道设有屏蔽（板），原本就不会获取通道数据。选择通道跳跃将有助于后续的光谱分析（数据量会有所减少）。



(9) 点击[OK]按钮，确定 Optical Path。



19.6 决定图像获取条件。

(3)-1 Live (开始扫描)

(1) 选择透射图像

(7) 获取

(3)-2 激光功率和 Si HV

(2) 选择针孔

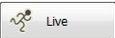
(1) 选择透射图像

(1) 要同时获取光谱图像和透射图像时，点击 TD [IN]按钮，并勾选 TD 的勾选框。

注： 要获取透射图像时，请关闭显微镜上方的照明。

(2) 在 Pinhole 的项目中选择要使用的激光中最长的激光波长。

点击 [▲Home]按钮，选择与物镜最匹配的针孔尺寸。

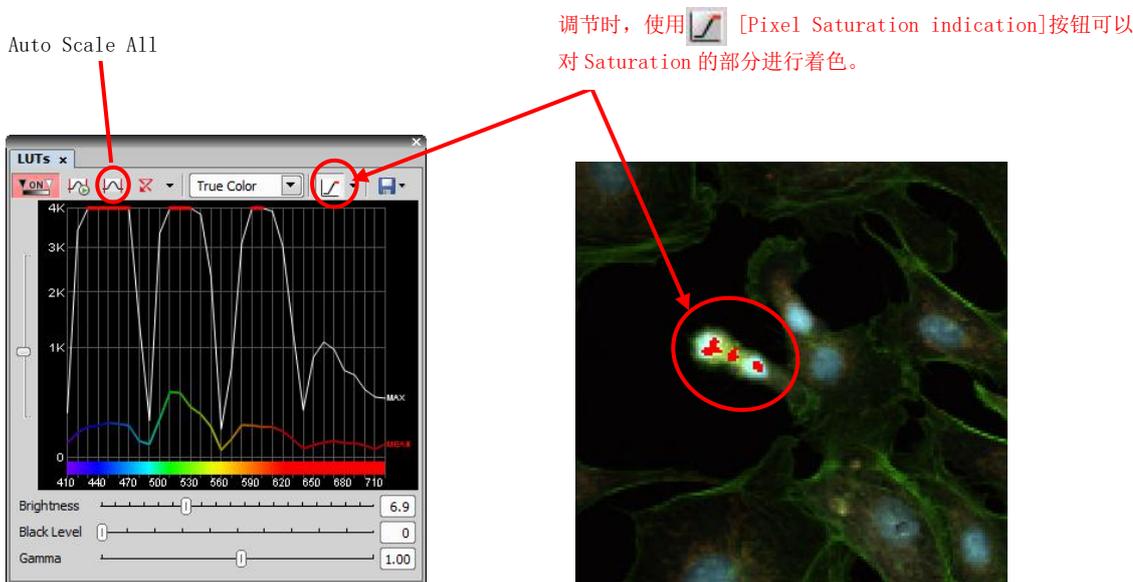
(3) 点击  [Live]按钮，边观察图像边调节激光功率和检测器的灵敏度 Si HV。

注： Si HV 对所有激光通用，请通过激光功率进行微调。

注： 调节时，使用 LUTs 的  [Pixel Saturation indication]按钮可有助于灵敏度的调节。

注： 图像显示较暗时，点击  [Auto Scale All]按钮可自动调节通道的对比度，便于观察图像。

注： 调节时，通过 [Live]按钮的 ON/OFF (扫描的 ON/OFF) 可将淬灭减少到最低限度。



注： 未显示 LUTs 时，鼠标右击软件上的灰色部分，从弹出的菜单中选择 [Visualization Control] -> [LUTs] 以调出显示。

(4) 使用 Auto Gain (自动调节检测器灵敏度 HV 的功能，以事先设定的饱和像素率为基础进行调节) 时，请点击  [AG]按钮。

Auto Gain 失败的通道上会显示“NG”，HV 的值恢复为执行 Auto Gain 前的值。

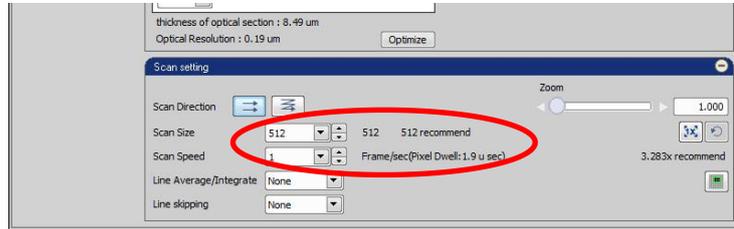
可通过  [Auto Gain 设定]按钮更改饱和和像素率。需要设定最大值和最小值。

注意：

- 扫描执行过程中无法执行 Auto Gain。
- 设定为线扫描时无法执行 Auto Gain。
- Auto Gain 执行过程中，请勿进行 Acquisition 画面下的手动调节和遥控器的调节操作。

(5) 将像素数调整为所需要的分辨率。(512×512 等)
 图像较暗时，请降低扫描速度。

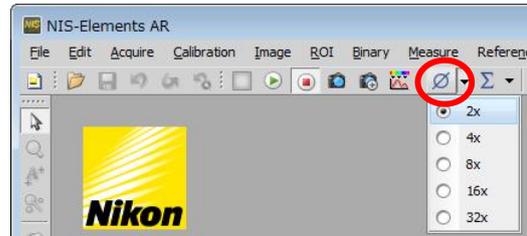
注： 请确认更改分辨率后的 Pixel Dwell。
 Pixel Dwell 代表激光照射 1 个像素的时间。
 数值越大，获取的图像越明亮。



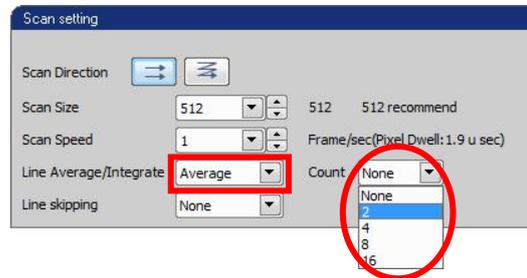
(6) 根据需要进行 Average。
 Average 是对同一图像进行多次扫描，通过平均化来消除噪声的功能。
 Average 分为逐 Frame 和逐 Line 扫描 2 种。

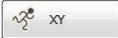
注： 进行 Average 可以减少噪声，但帧率（1 秒中内可获取的图像数）会随之降低。

Frame Average:
 点击软件工具栏中的  按钮，选择平均扫描次数。



Line Average:
 在 Scan setting 画面的 [Line Average/Integrate] 中选择 [Average]，在 [Count] 中选择平均扫描次数。



(7) 点击  [XY] 按钮以获取图像。

19.7 保存图像。

激活要保存的图像，从菜单栏中选择 [File] -> [Save As] 以进行保存。

注： 建议以 nd2 文件格式进行保存。（将同时保存参数等条件。）

20

光谱图像的分离 (Unmixing)

20.1 点击 ，打开光谱图像。

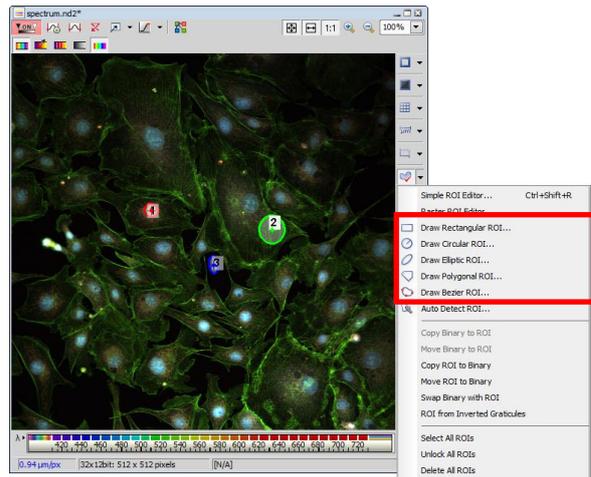
20.2 光谱分离方法

以下 3 种方法可以组合使用。

1) 利用 ROI 内光谱数据以分离光谱

(1) 点击图像的侧面边框上的  按钮，使用绘图工具在图像上绘制 ROI。

注： 请根据染料的数量指定只含有各独立的颜色的区域（2 处以上）。



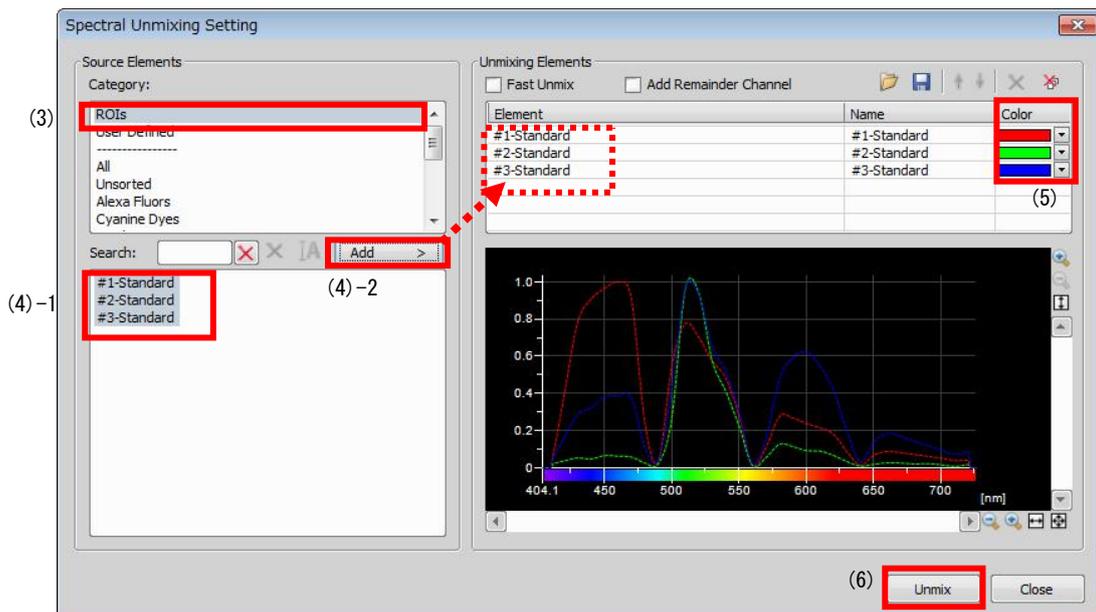
(2) 从菜单栏中选择 [Image] -> [Spectral Unmixing Setting]。

(3) 从 [Category] 栏中选择 [ROIs]。

(4) 选择用于进行光谱分离的 ROI，点击 [Add] 按钮，该 ROI 即被添加到 Unmixing Elements（右侧列表）中。

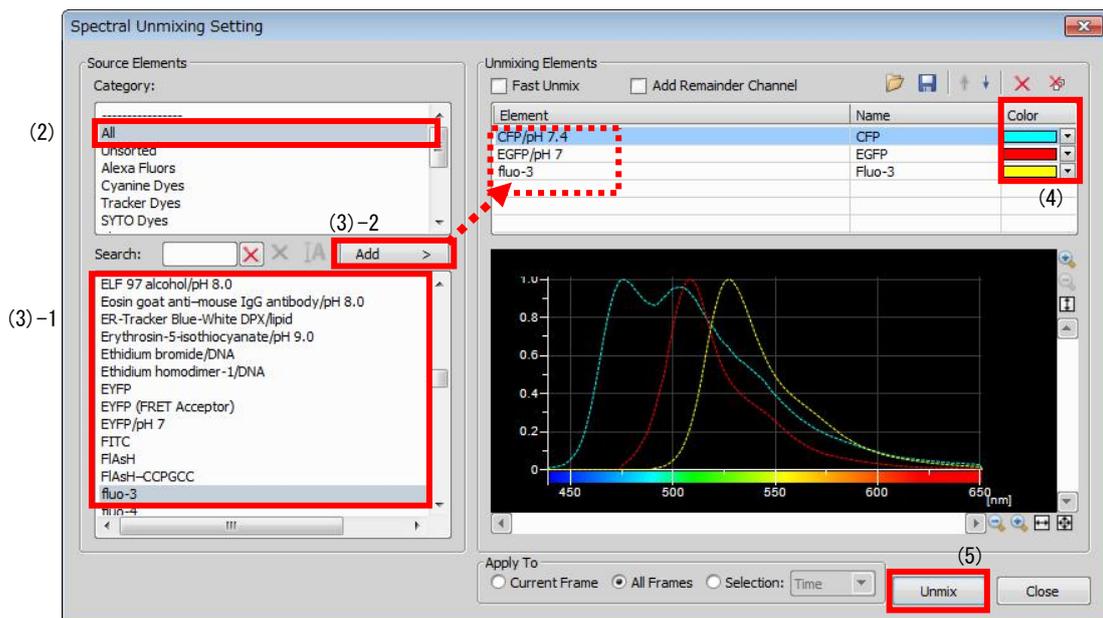
(5) 设定光谱分离后的伪色。

(6) 设定结束后，点击 [Unmix] 按钮以分离光谱。



2) 利用 Reference 数据以分离光谱

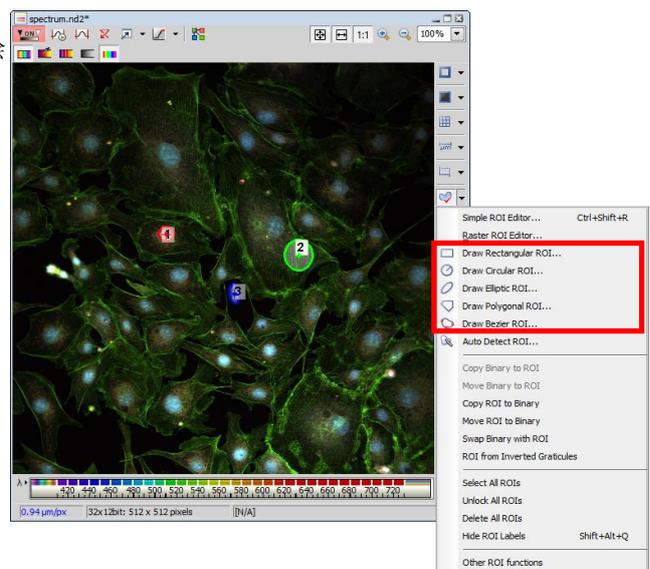
- (1) 从菜单栏中选择 [Image] -> [Spectral Unmixing Setting]。
- (2) 从 [Category] 栏中选择 [All]。
- (3) 选择用于进行光谱分离的试剂，点击 [Add] 按钮，该试剂即被添加到 Unmixing Elements (右侧列表) 中。
- (4) 设定光谱分离后的伪色。
- (5) 设定结束后，点击 [Unmix] 按钮以分离光谱。



3) 创建 Reference 数据以分离光谱

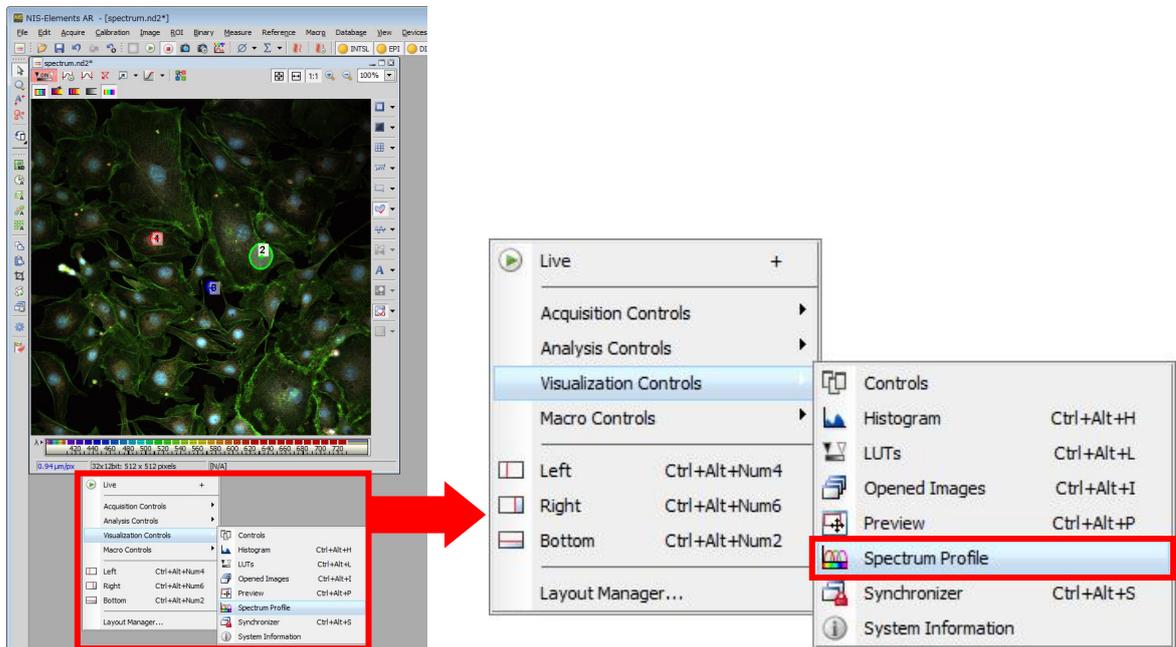
- (1) 将光谱数据保存为 Reference 数据。
 点击图像的侧面边框上的  按钮，使用绘图工具在图像上绘制 ROI。

注： 请仅指定单一染色的区域。

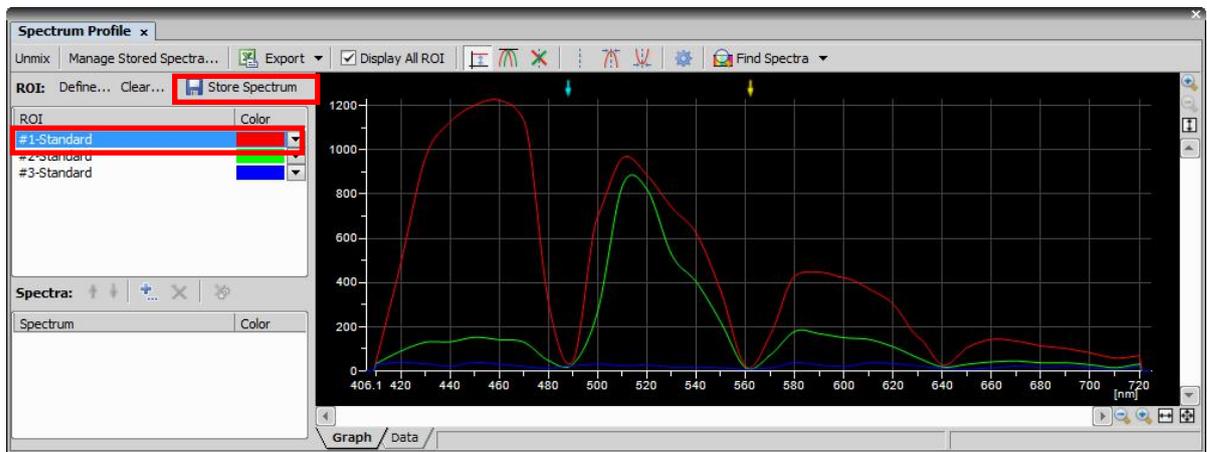


(2) 指定的 ROI 的光谱图表显示在 Spectrum Profile 中。

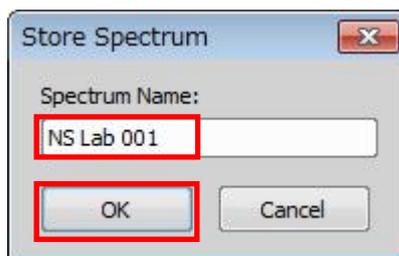
注： 软件上未显示 Spectrum Profile 时，鼠标右击软件上的灰色部分，从弹出的菜单中选择 [Visualization Controls] -> [Spectrum Profile] 以调出显示。



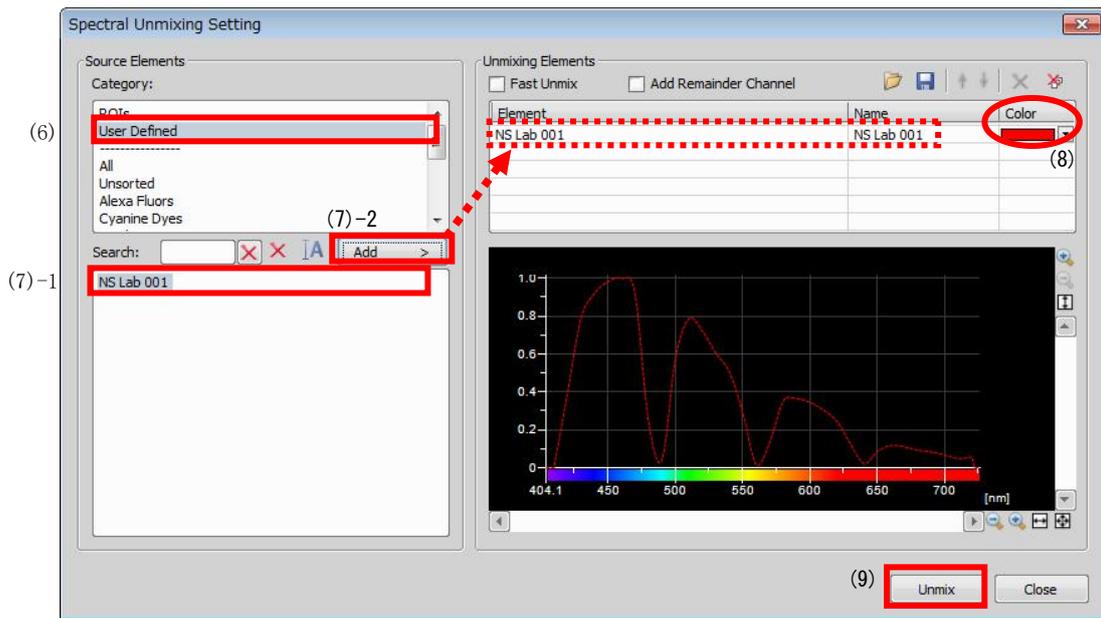
(3) 选择要保存的 ROI 的光谱图表，点击 Store Spectrum 。



(4) 在 [Spectrum Name] 栏中输入试剂名，点击 [OK] 按钮以保存光谱数据。



- (5) 从菜单栏中选择 [Image] -> [Spectral Unmixing Setting]。
- (6) 从 [Category] 栏中选择 [User Defined]。
- (7) 选择用于进行光谱分离的试剂 (先前保存的光谱数据)，点击 [Add] 按钮，该试剂即被添加到 Unmixing Elements (右侧列表) 中。
- (8) 设定光谱分离后的伪色。
- (9) 设定结束后，点击 [Unmix] 按钮以分离光谱。

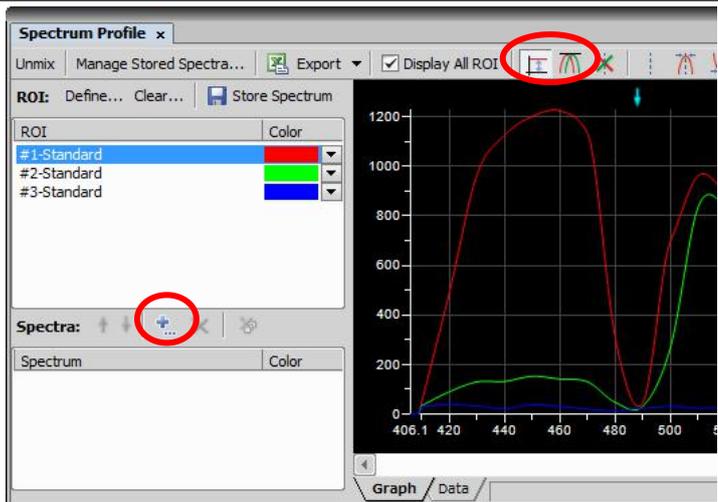


◎Spectrum Profile 使用方法


图表的 Y 轴以相对值表示。

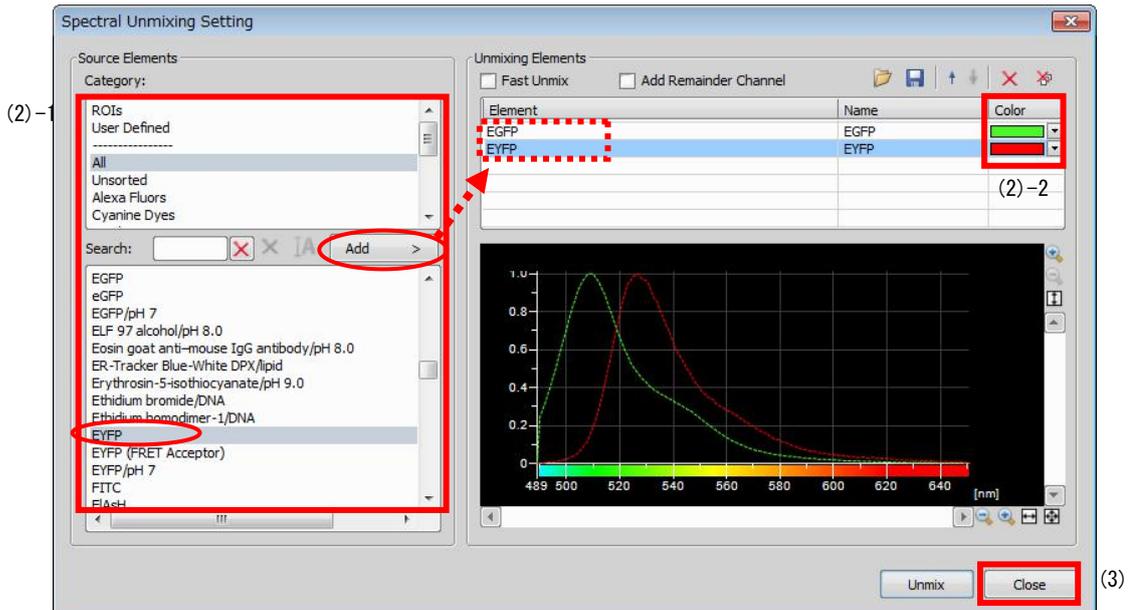

图表的 Y 轴以亮度值表示。


插入荧光灯制造商提供的光谱图表。
可在分析时作为参考。



21.1 进行用于光谱分离的 Reference 数据的设定。

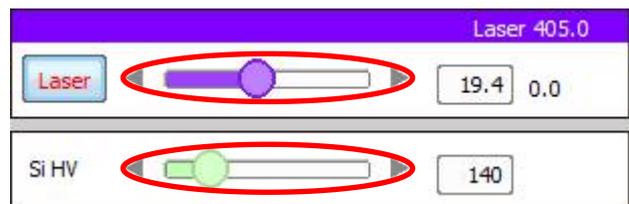
- (1) 从菜单栏中选择 [Image] -> [Spectral Unmixing], 调出 Spectral Unmixing Setting。
- (2) 按照“光谱图像的分离”的步骤, 从 [Category] 的 [ROIs]/[Users Defined]/[All] 数据中对用于分离的光谱进行设定。
- (3) 点击 [Cancel] 或 [Close] 按钮, 退出 Spectral Unmixing Setting。



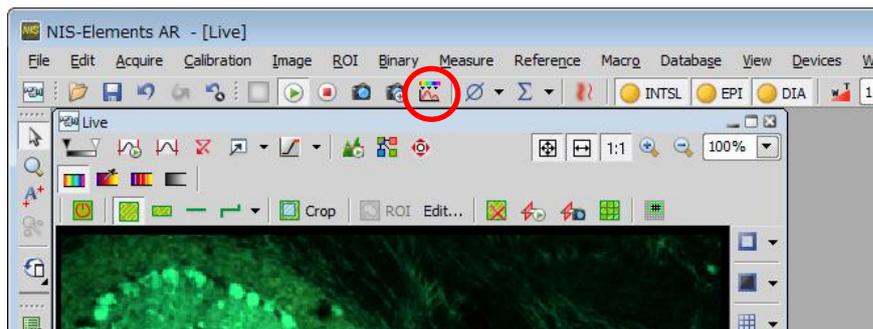
21.2 进行 Live 图像的光谱分离。

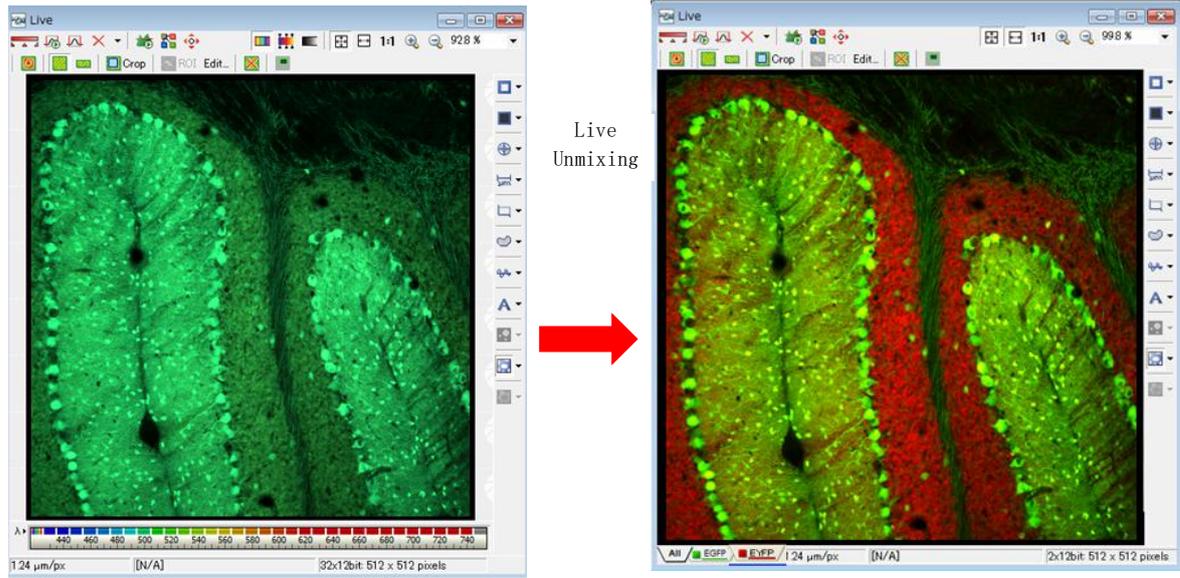
- (1) 点击 [Live] 按钮, 边观察图像边调节激光功率和检测器的灵敏度 Si HV。

注: Si HV 对所有激光通用, 请通过激光功率进行微调。



- (2) 点击 [Live Unmixing] 按钮, Live 图像被切换为 Unmix Live 图像。
- (3) 再次点击 [Live Unmixing] 按钮, 恢复为 Live 图像。

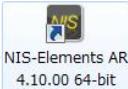




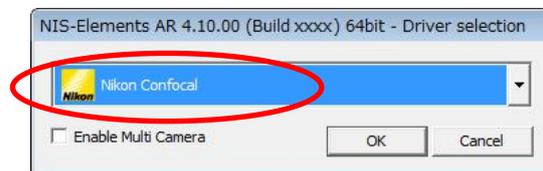
22

基于虚拟滤镜的图像获取方法 (光谱探测器)

22.1 启动“NIS-Elements”软件。

- (1) 点击 ，启动“NIS-Elements”软件。

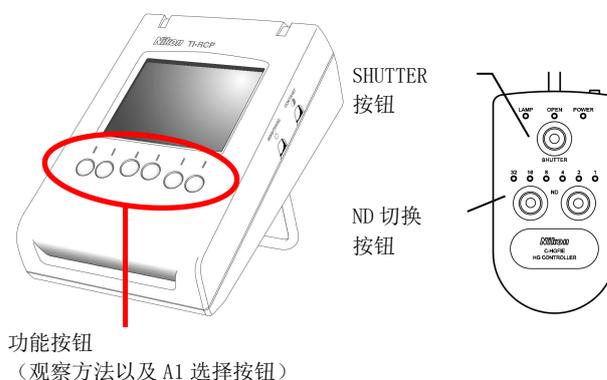
注： 在 Confocal 之外还连接有相机的情况下，将显示“Driver selection”对话框以供选择驱动程序。
选择“Nikon Confocal”，点击[OK]按钮。



22.2 通过显微镜确认样本。

- (1) 选择需要的观察方法。
按下 Ti 遥控器的功能按钮，选择需要的观察方法。

注： 为避免淬灭，请调小荧光灯快门。请同时使用 ND 滤镜寻找试剂。



22.3 将光路切换到 A1。

有 Ti 遥控器时，按功能按钮[A1]，将光路切换到 A1。
没有 Ti 遥控器时，请将光路切换到 L100。

22.4 点击[Laser Inter Locked]按钮，解除闪烁状态，使激光可以通过软件起振。

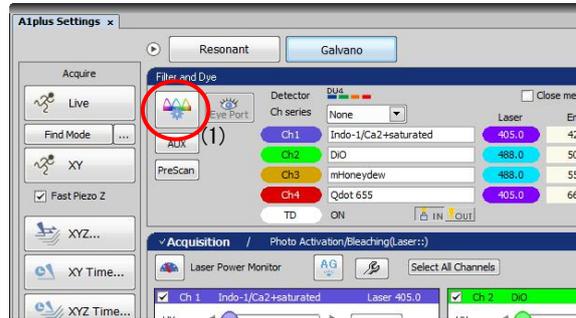
注： 光路未切换到 A1 时，即使点击按钮也无法解除。



22.5 设定 Optical Path. (设定获取图像所需的共聚焦系统的光路)

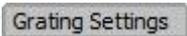
确认设定内容。

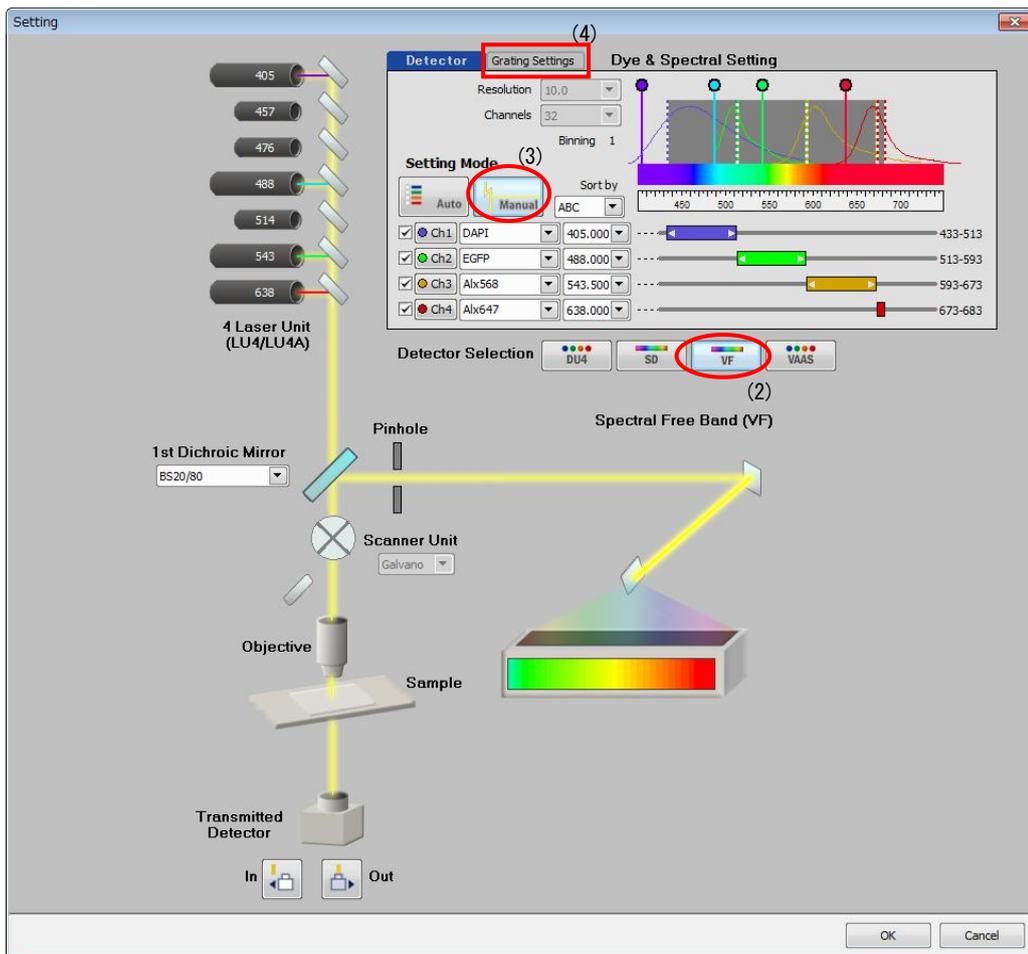
(1) 点击  按钮, 启动 Optical path 画面。



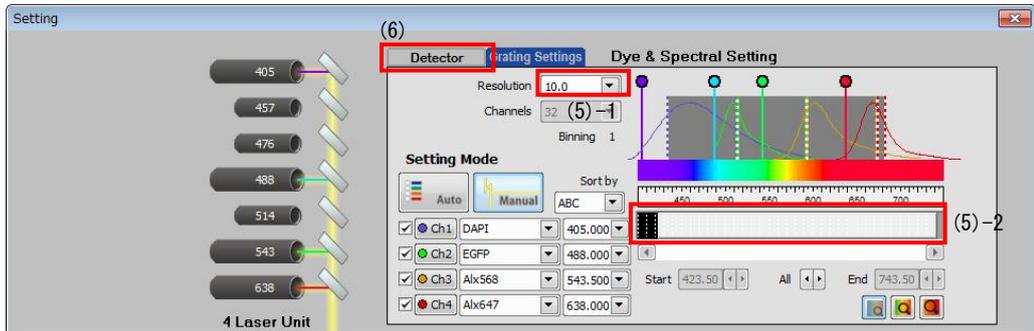
(2) 点击  [VF] 按钮, 将光谱探测器以虚拟滤镜模式使用。

(3) 点击  [Manual] 按钮, 以手动模式设定 Optical Path。

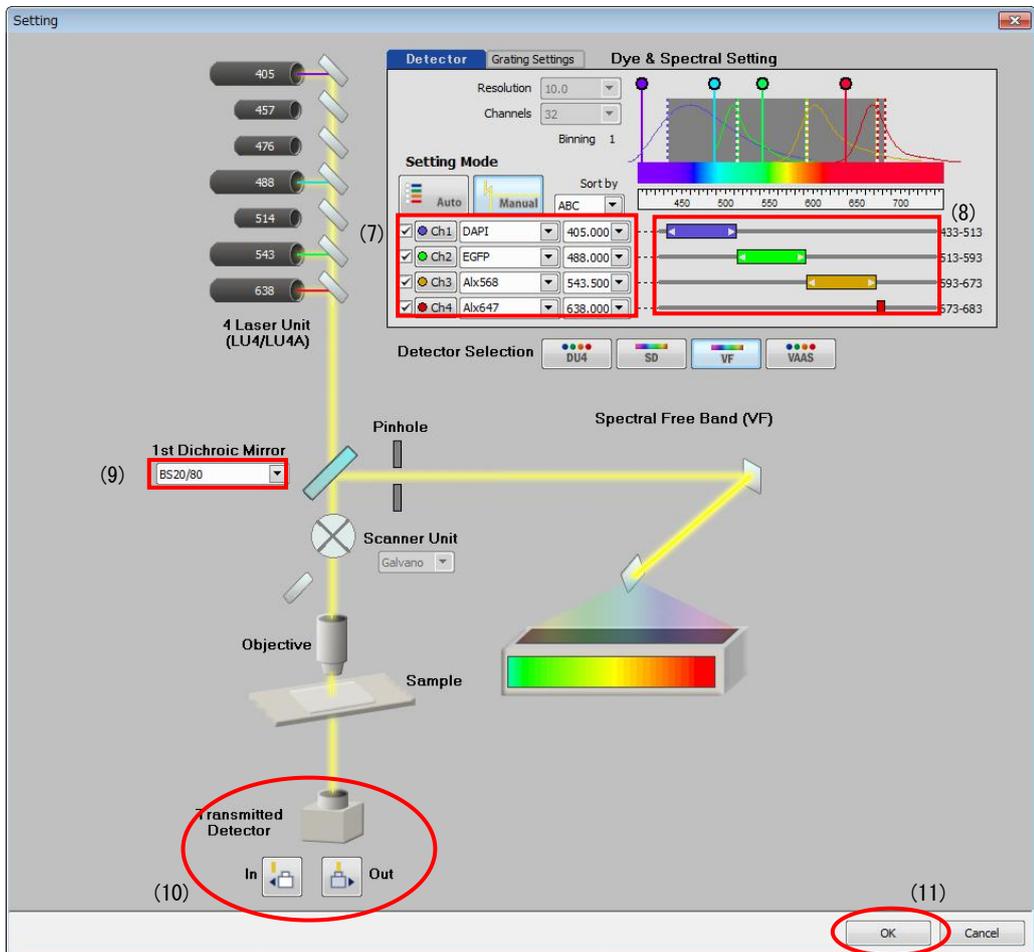
(4) 点击  [Grating Settings] 选项卡。



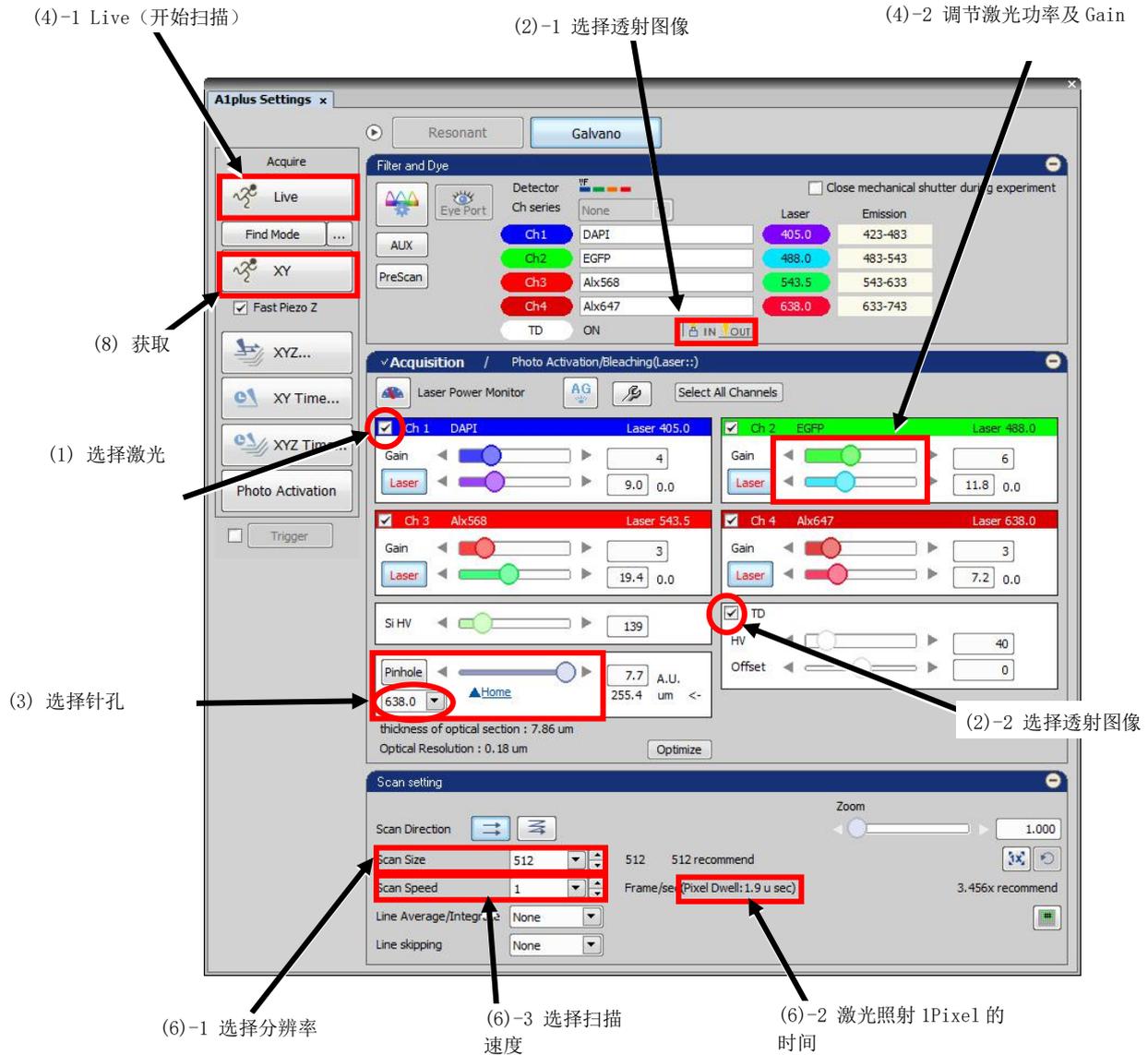
- (5) 选择要使用的波长分辨率 (2.5nm、6nm、10nm)、要获取的波长范围 (拖动滑动条)。
- (6) 点击 **Detector** [Detector] 选项卡, 进行余下的设定。



- (7) 选择要使用的激光。
- (8) 使 条伸缩以设定通道的检测范围。
- (9) 选择要使用的激光的组别的 1stDM。
- (10) 要同时获取荧光图像和透射图像时, 请点击 按钮, 使 进入光路。
- (11) 点击[OK]按钮, 确定 Optical Path。



22.6 决定图像获取条件。



(1) 选择要使用的激光/通道。

(2) 要同时获取光谱图像和透射图像时，点击 TD [IN] 按钮，并勾选 TD 的勾选框。

注：要获取透射图像时，请关闭显微镜上方的照明。

(3) 在 Pinhole 的项目中，从下拉菜单中选择要使用的激光波长。

点击[▲Home]按钮，选择与物镜最匹配的针孔尺寸。

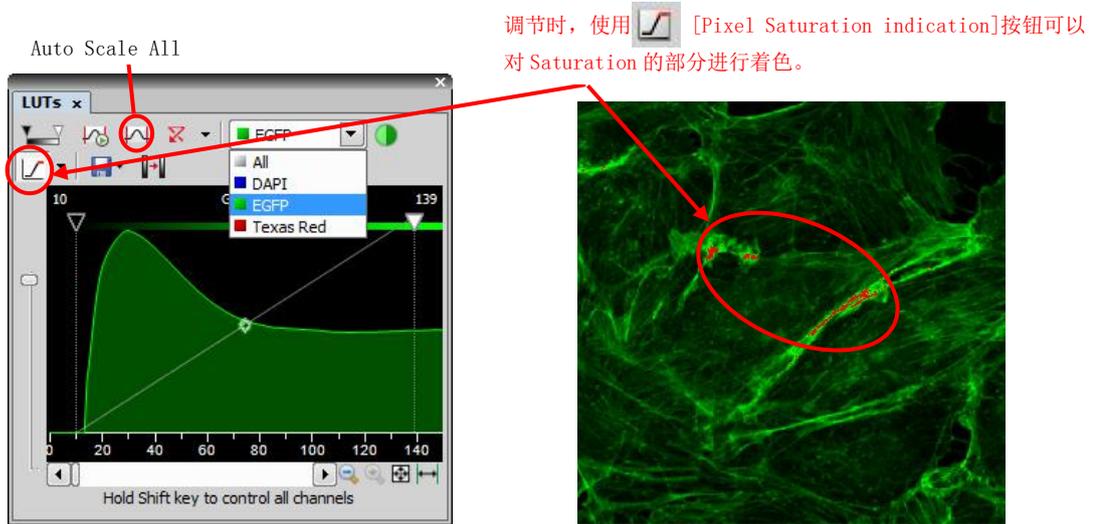
(4) 点击  [Live] 按钮，边观察图像边调节激光功率和检测器的灵敏度 Si HV、Gain。

注： Si HV 对所有激光通用，请通过激光功率进行微调。

注： 调节时，使用 LUTs 的  [Pixel Saturation indication] 按钮可有助于灵敏度的调节。

注： 图像显示较暗时，点击  [Auto Scale All] 按钮可自动调节通道的对比度，便于观察图像。

注： 调节时，通过 [Live] 按钮的 ON/OFF (扫描的 ON/OFF) 可将淬灭减少到最低限度。



注： 未显示 LUTs 时，鼠标右击软件上的灰色部分，从弹出的菜单中选择 [Visualization Control] -> [LUTs] 以调出显示。

(5) 使用 Auto Gain (自动调节检测器灵敏度 HV 的功能，以事先设定的饱和像素率为基础进行调节) 时，请点击  [AG] 按钮。

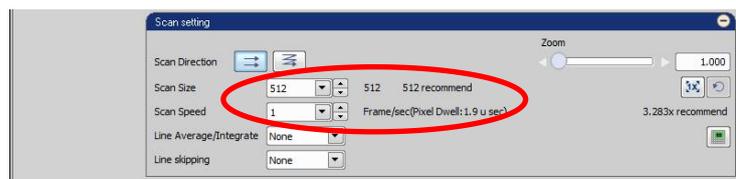
Auto Gain 失败的通道上会显示“NG”，HV 的值恢复为执行 Auto Gain 前的值。
可通过  [Auto Gain 设定] 按钮更改饱和像素率。需要设定最大值和最小值。

注意：

- 扫描执行过程中无法执行 Auto Gain。
- 设定为线扫描时无法执行 Auto Gain。
- Auto Gain 执行过程中，请勿进行 Acquisition 画面下的手动调节和遥控器的调节操作。

(6) 将像素数调整为所需要的分辨率。(512×512 等)
图像较暗时，请降低扫描速度。

注： 请确认更改分辨率后的 Pixel Dwell。
Pixel Dwell 代表激光照射 1 个像素的时间。
数值越大，获取的图像越明亮。



(7) 根据需要进行 Average。

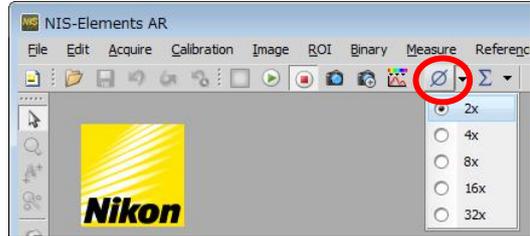
Average 是对同一图像进行多次扫描，通过平均化来消除噪声的功能。

Average 分为逐 Frame 和逐 Line 扫描 2 种。

注：进行 Average 可以减少噪声，但帧率（1 秒中内可获取的图像数）会随之降低。

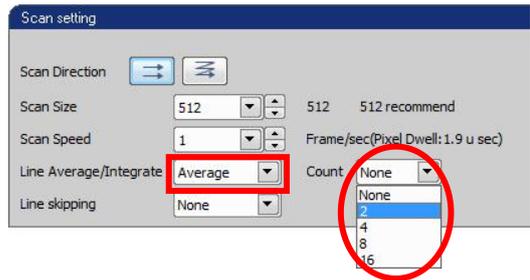
Frame Average:

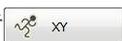
点击软件工具栏中的  按钮，选择平均扫描次数。



Line Average:

在 Scan setting 画面的 [Line Average/Integrate] 中选择 [Average]，在 [Count] 中选择平均扫描次数。



(8) 点击  [XY] 按钮以获取图像。

22.7 保存图像。

激活要保存的图像，从菜单栏中选择 [File] -> [Save As] 以进行保存。

注：建议以 nd2 文件格式进行保存。（将同时保存参数等条件。）

电动载物台篇

根据所使用的机型和选项设定，本说明中所涉及的某些功能可能不存在。

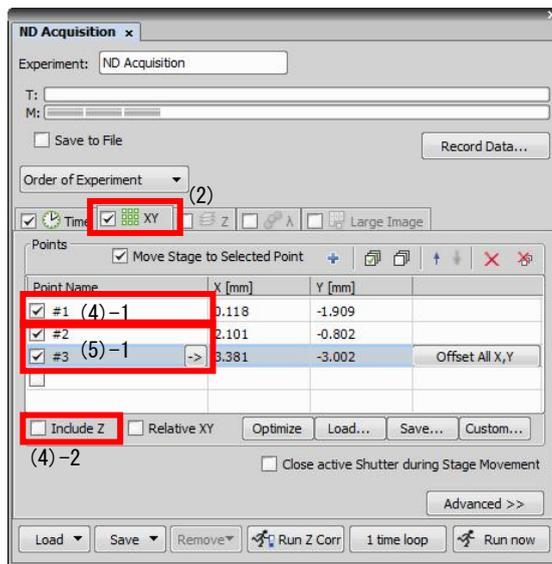
23

多点时间序列图像的获取方法

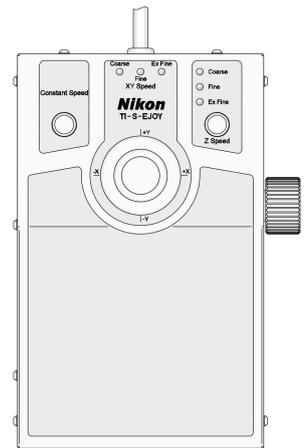
23.1 执行“彩色图像的获取方法”的步骤 4.1~4.7，决定图像的获取条件。

23.2 进行图像获取点的设定。

- (1) 点击  [XYZ Time...]按钮，启动 ND Acquisition 对话框。
- (2) 选择 [XY] 选项卡。
- (3) 操作电动载物台的摇杆，移动到要获取的点。（边观察 Live 图像边移动会比较方便）
- (4) 点击 Point Name，登录位置信息。
如果选择 Include Z，则 Z 位置也会被登录。可登录的有显微镜的 Z 位置或完美调焦系统的偏移值（要跟踪的焦点的位置）。
- (5) 重复上述步骤 (3)~(4)，登录所需要的点。



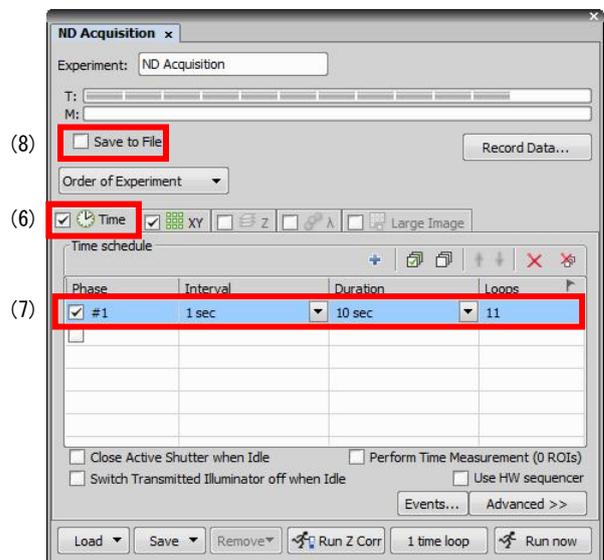
(3)、(5)-2 摇杆控制器



- (6) 选择 [Time] 选项卡。
- (7) 决定时间间隔 (Interval) 和持续时间 (Duration)。
- (8) 选择 [Save to File]，在保存的同时获取图像。

注：保存格式为 nd2 格式。

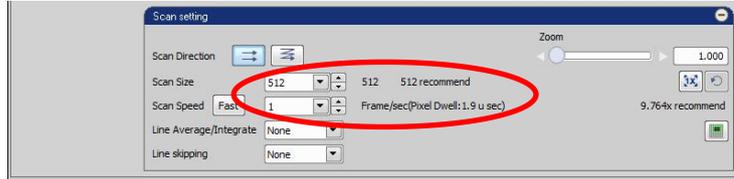
注：建议在保存的同时获取时间序列图像。



23.3 获取多点时间序列图像。

(1) 将像素数调整为所需要的分辨率。(512×512 等)

注： 请确认更改分辨率后的 Pixel Dwell。
 Pixel Dwell 代表激光照射 1 个像素的时间。
 数值越大，获取的图像越明亮。



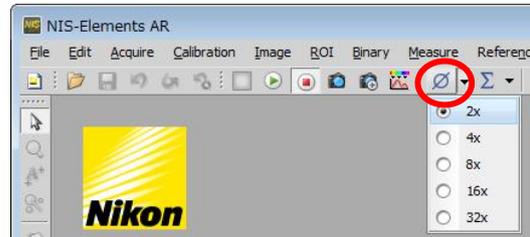
(2) 根据需要进行 Average。

Average 是对同一图像进行多次扫描，通过平均化来消除噪声的功能。
 Average 分为逐 Frame 和逐 Line 扫描 2 种。

注： 进行 Average 可以减少噪声，但帧率（1 秒中内可获取的图像数）会随之降低。

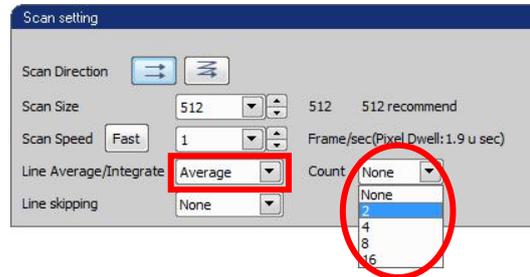
Frame Average:

点击软件工具栏中的  按钮，选择平均扫描次数。

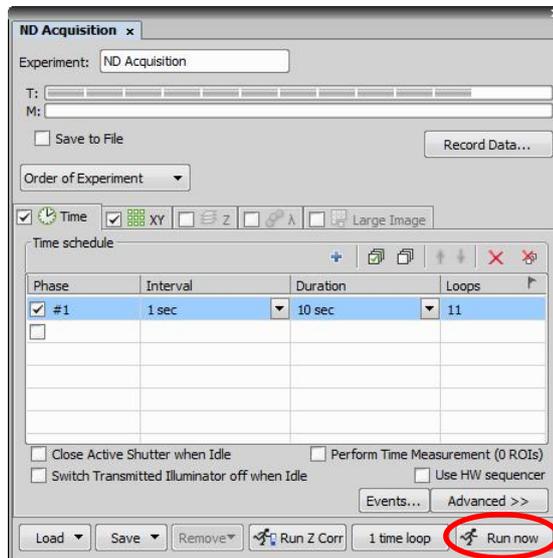


Line Average:

在 Scan setting 画面的 [Line Average/Integrate] 中选择 [Average]，在 [Count] 中选择平均扫描次数。



(3) 点击  Run now [Run now] 按钮，获取多点时间序列图像。



24

Large Image 的获取方法

24.1 执行“彩色图像的获取方法”的步骤 4.1~4.7，决定图像的获取条件。

24.2 要设定 Z series 时，事先进行 Z stack 的设置。

(1) 选择 ND Acquisition 对话框中的 Z Series。

(2) 点击  [Defined top & bottom]按钮。

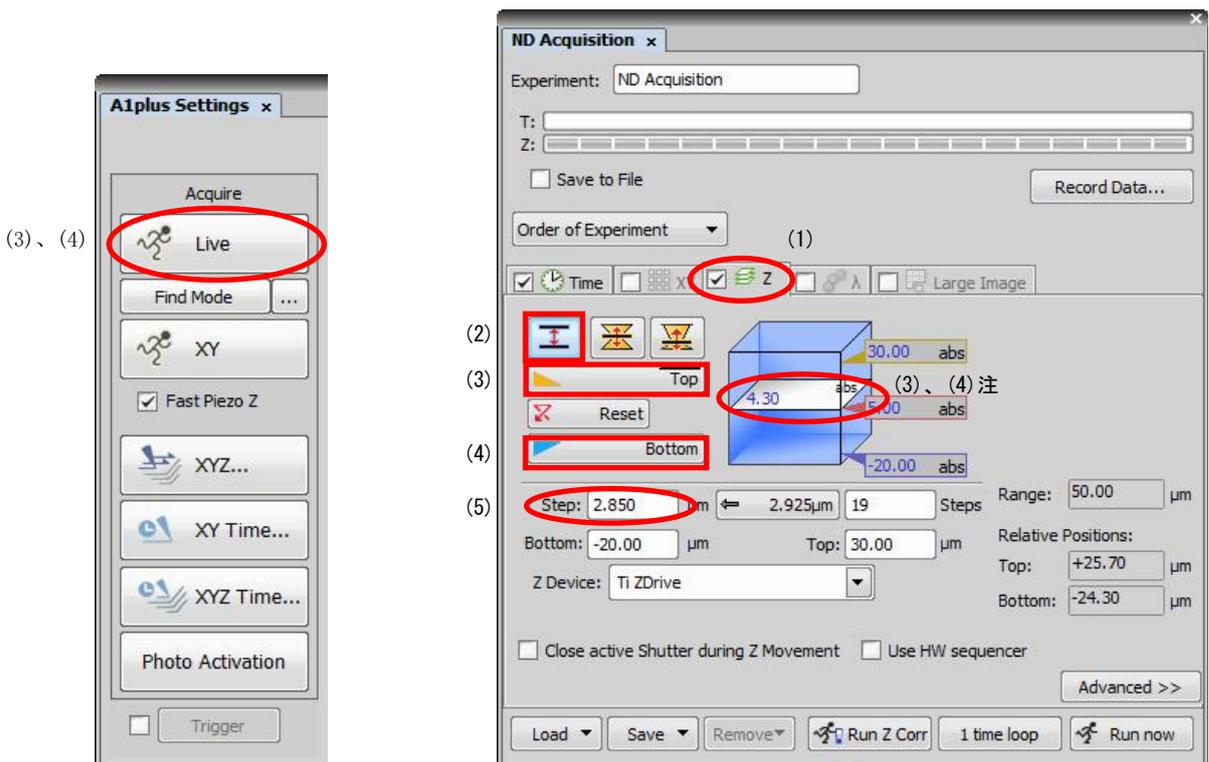
(3) 点击  [Live]按钮，边观察图像边转动显微镜的调焦手轮(微调模式)，点击  [Top]按钮，决定 Top。

注： 向立方体中的面的数值增加的方向转动调焦手轮。

(4) 点击  [Live]按钮，边观察图像边转动显微镜的调焦手轮(微调模式)，点击  [Bottom]按钮，决定 Bottom。

注： 向立方体中的面的数值减少的方向转动调焦手轮。

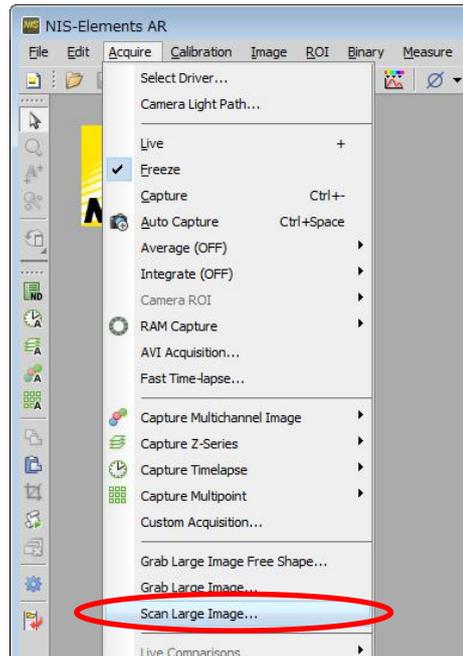
(5) 决定 Step。



(6) 关闭 ND Acquisition 对话框。

24.3 决定 Large Image 的获取范围。

- (1) 从菜单栏中选择 [Acquire] -> [Scan Large Image], 启动 Scan Large Image 窗口。



- (2) 设定要扫描的范围。

<选择了 Number of Fields in X and Y 时>

选择扫描范围的行列数。

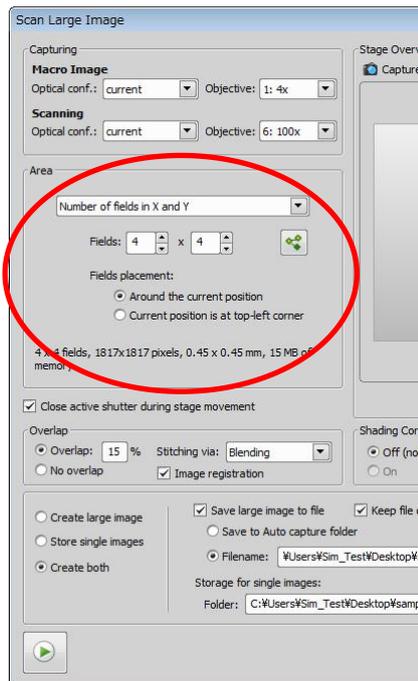
在 Fields Placement 中设定当前的视野在 Large Image 中所处的位置。

Around the current position: 已当前位置为中心进行扫描。

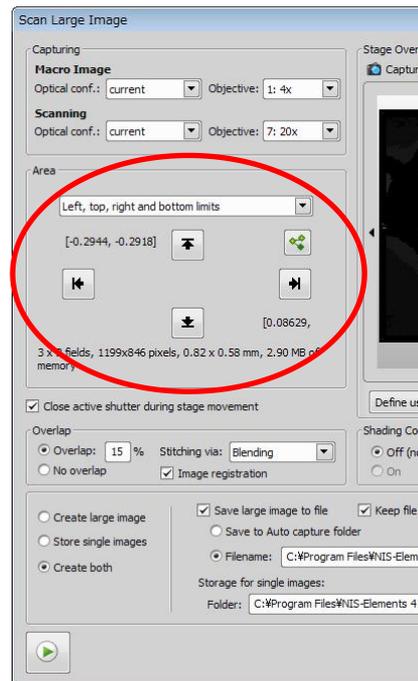
Current position is at top-left corner: 以当前位置为左上角进行扫描。

<选择了 Left, top, right and bottom limits 时>

选择上下左右的范围。



选择 Number of Fields in X and Y 时



选择 Left, top, right and bottom limits 时

24.4 进行 Large Image 的详细设定。

(1) 针对 Z Series 进行设定。

- None: 不设定 Z Series。
- Z Series: 反映在 ND Acquisition 对话框的 Z 选项卡中设定的值。（参照 24.2）
- Max IP: 创建 Max Intensity Projection。
- EDF: 创建 Extended Depth of Focus (EDF)。
- Z-drive: 选择要使用的 Z 设备。
- Order: 选择与 Z 的组合。

(2) 要在载物台移动时关闭快门的情况下，勾选[Close active shutter during stage movement]。

(3) 设定图像的重叠补偿。

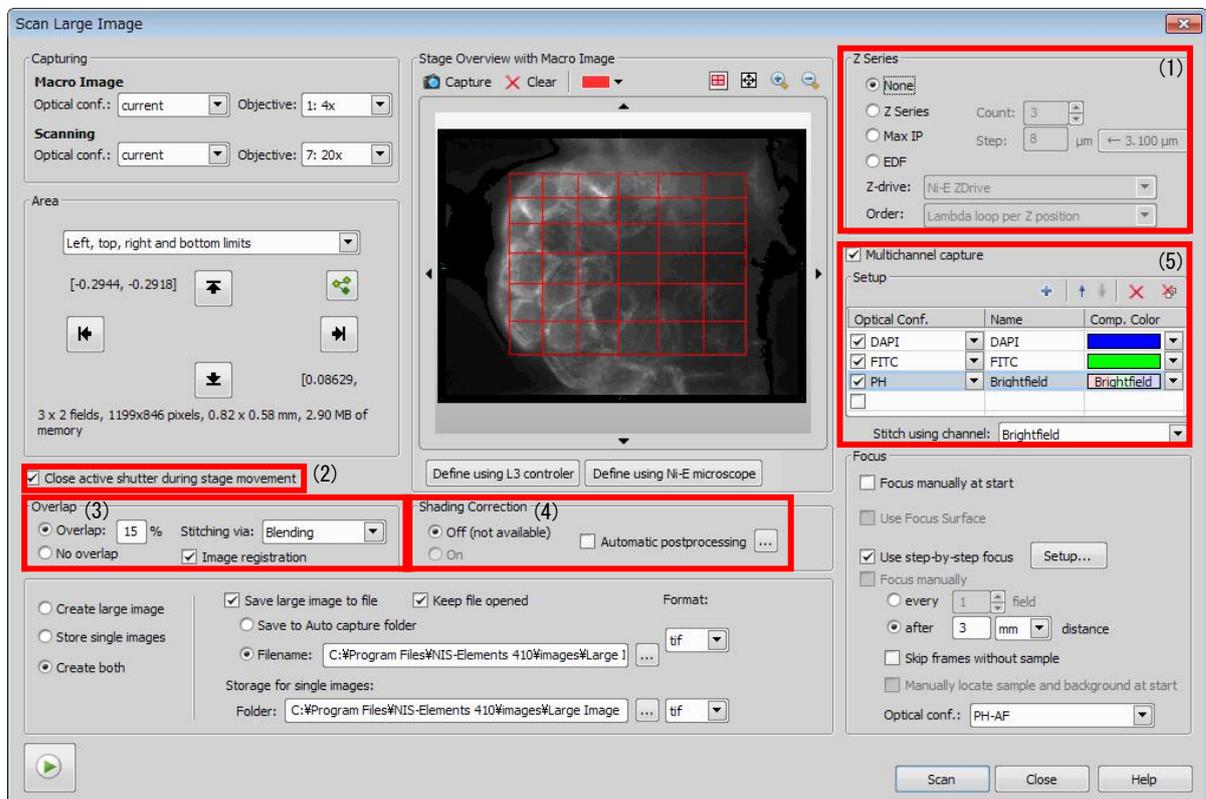
- Overlap: 设定图像的重叠补偿的比率。
- No overlap: 不进行图像的重叠补偿而合并图像。
- Stitching via: 选择图像的合并方法。
- Image registration: 进行图像的合并时，进行图像间的重叠补偿（位置补偿）。

(4) 选择有无阴影补偿。

- Automatic postprocessing: 自动进行获取图像的后期加工。

(5) 要获取多色图像时进行以下设定。

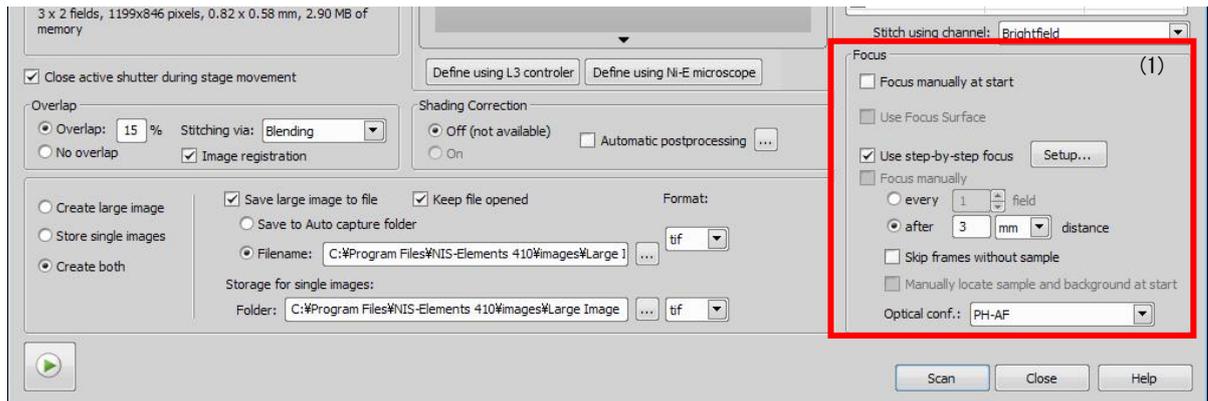
- Multichannel capture: 勾选即可获得多色图像。
- Optical Conf.: 选择要使用的光学构造。
- Stitch using channel: 选择在要获取的 λ 中以哪个波长为基准来叠加图像。



24.5 设定对焦方法。

(1) 在 Focus 中设定对焦方法。

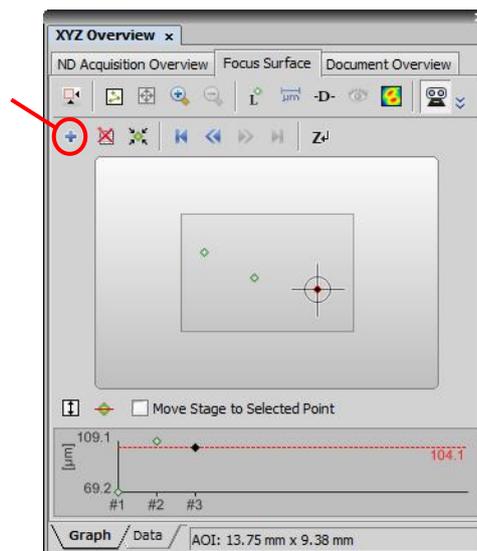
- Focus manually at start: 一开始手动进行对焦。
- Use Focus Surface: 扫描 Large Image 时通过 Focus Surface 功能实施自动对焦。
在 XYZ Overview 窗口的 Focus Surface 选项卡中登录了 3 个以上的点时有效。
- Use step-by-step focus: 决定重新对焦的图像数量。
- Focus manually: 调节显示倍率，使显示区与宏观画面相匹配。



注：对焦方法使用[Use Focus Surface]时，请按以下步骤进行 Focus Surface 的设定。

- 1) 从菜单栏中选择[Devices]->[Focus Surface Setup]，打开 XYZ Overview 窗口的 Focus Surface 选项卡。（请在打开 Scan Large Image 窗口前打开 XYZ Overview 窗口。）
- 2) 移动 XY 载物台、升降 Z，显示要登录的焦平面。
- 3) 点击[Add Point]按钮。
- 4) 重复上述步骤 1)~3)，登录 3 个以上的焦平面。

Add Point 按钮



24.6 保存设定，获取图像。

(1) 选择保存方法。

- Create large image: 创建 Large Image。
- Store single image: 保存逐一获取的图像。
- Create both: 同时保存上述 2 种图像。

(2) 选择保存路径和保存格式。

请勾选所需要的项目。

Save large image to file: 将 Large Image 保存为文件。

Keep file opened: 打开所保存的文件。

指定保存路径。(勾选[Save large image to file]时有效)

Save to Auto capture folder: 将 Large Image 保存在“Auto capture folder”中。

Filename: 指定 Large Image 的保存路径和文件名。

(默认文件名为“Large Image”。要更改文件名时, 请更改“Large Image”的部分)

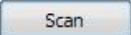
Format: 选择 Large Image 的文件格式, 有 nd2/tif 可选。

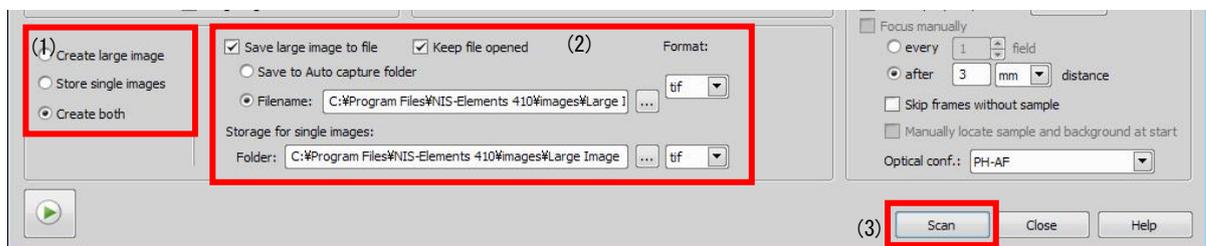
<保存方法选择为[Store single image]时>

Folder: 选择用于保存逐一获取的图像的文件夹。

Format: 选择逐一获取的图像的文件格式。

有 tiff、jp2、png、bmp、jpg 可选。

(3) 点击  按钮, 获取 Large Image 图像。



24.7 保存图像。

激活要保存的图像, 从菜单栏中选择[File] -> [Save As]以进行保存。

注: 建议以 nd2 文件格式进行保存。(将同时保存参数等条件。)

高速篇

A1 / Ti-E / PFS

电动载物台·压电 Z 轴载物台·强光灯

根据所使用的机型和选项设定，本说明中所涉及的某些功能可能无法使用。

25

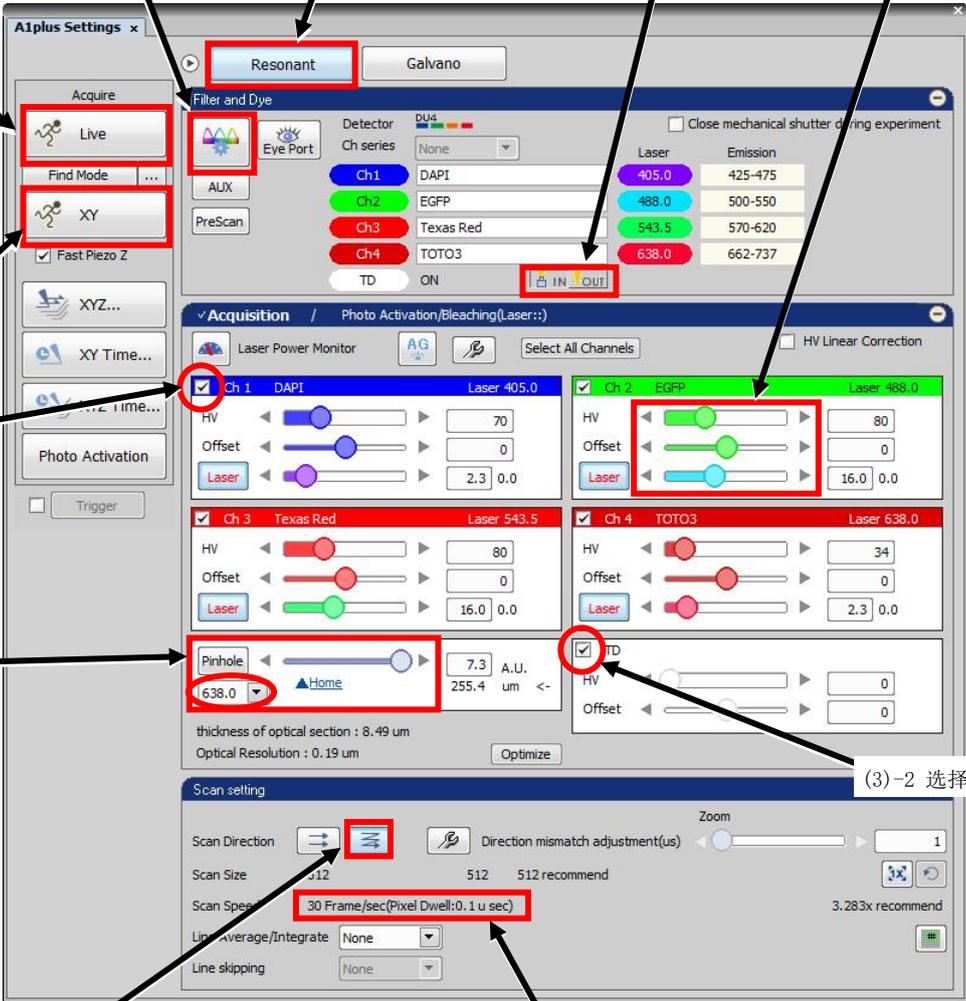
高速图像的获取方法（共振式扫描器）

25.1 执行“彩色图像的获取方法”的步骤 4.1~4.6。

25.2 选择扫描模式。

选择  [Resonant]。

25.3 决定图像获取条件。



The screenshot shows the A1plus Settings software interface with several components highlighted and annotated with Chinese text:

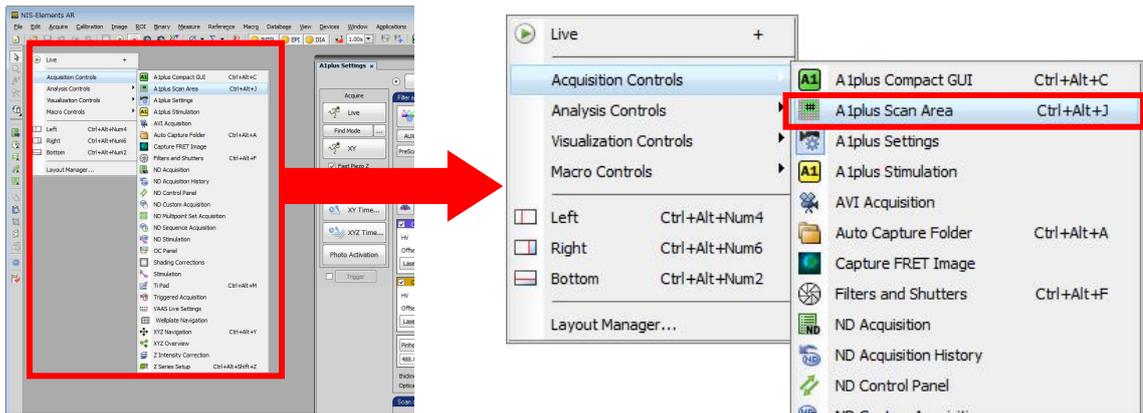
- (5)-1 Live (开始扫描)**: Points to the 'Live' button in the 'Acquire' section.
- (8) 获取**: Points to the 'Live' button.
- (2) 选择激光**: Points to the 'Ch 1 DAPI' checkbox in the 'Acquisition' section.
- (4) 选择针孔**: Points to the 'Pinhole' dropdown menu, which is set to '638.0'.
- 确认设定**: Points to the 'Resonant' button.
- 选择扫描模式**: Points to the 'Resonant' button.
- (3)-1 选择透射图像**: Points to the 'IN' button in the 'Filter and Dye' section.
- (5)-2 调节激光功率及 HV**: Points to the 'Laser' and 'HV' sliders for Ch 2 EGFP.
- (3)-2 选择透射图像**: Points to the 'TD' checkbox in the 'Acquisition' section.
- 激光照射 1Pixel 的时间**: Points to the 'Scan Speed' field, which is set to '30 Frame/sec(Pixel Dwell:0.1 u sec)'.

(1) 点击 ，选择往复扫描（以 30frame/second 的标准速度进行扫描）。

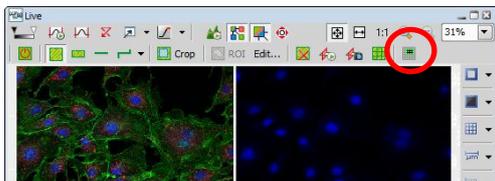
注：可以缩小扫描区域来实现更高速的扫描。
 点击 Scan Area 窗口中的  按钮，用鼠标拖动绿色边框，以缩小扫描区域。



注：软件上未显示 Scan Area 时，鼠标右击软件上的灰色部分，从弹出的菜单中选择 [Acquisition Controls] -> [A1plus Scan Area] 以调出显示。



※ 点击 Live 窗口或 A1plus Settings 画面中显示的以下按钮也可以显示 Scan Area。



扫描区域设定	X 分辨率	Y 分辨率	扫描速度与单位	
矩形扫描区域	512	512	30	Frame/sec
带状扫描区域 (X: Y=1: 1/2)	512	256	60	Frame/sec
带状扫描区域 (X: Y=1: 1/4)	512	128	120	Frame/sec
带状扫描区域 (X: Y=1: 1/8)	512	64	230	Frame/sec
带状扫描区域 (X: Y=1: 1/16)	512	32	420	Frame/sec
线扫描	512	1	7634	Line/sec

注：带状扫描区域 (512×32) 420fps 时，顶部 4 线的图像无法使用。

(2) 选择要使用的激光/通道。

(3) 要同时获取共聚焦图像和透射图像时，点击 TD [IN]按钮，并勾选 TD 的勾选框。

注：要获取透射图像时，请关闭显微镜上方的照明。

(4) 在 Pinhole 的项目中选择要使用的激光波长。

点击[▲Home]按钮，选择与物镜最匹配的针孔尺寸。

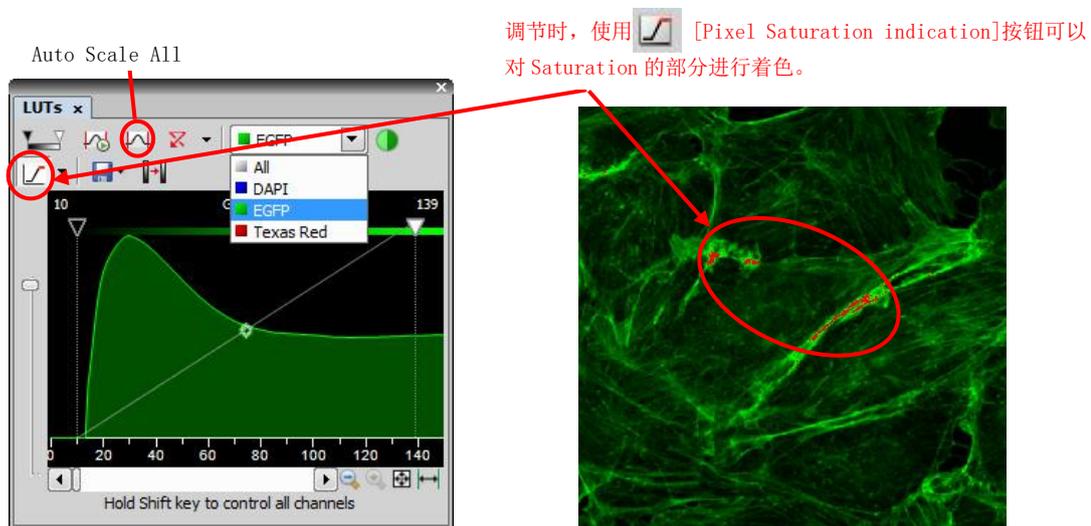
(5) 点击  [Live]按钮，边观察图像边调节激光功率和检测器的灵敏度 HV。

注：Offset 请以 0 为标准使用。

注：调节时，使用 LUTs 的  [Pixel Saturation indication]按钮可有助于灵敏度的调节。

注：图像显示较暗时，点击  [Auto Scale All]按钮可自动调节通道的对比度，便于观察图像。

注：调节时，通过[Live]按钮的 ON/OFF（扫描的 ON/OFF）可将淬灭减少到最低限度。



注：未显示 LUTs 时，鼠标右击软件上的灰色部分，从弹出的菜单中选择[Visualization Control] -> [LUTs]以调出显示。

(6) 使用 Auto Gain（自动调节检测器灵敏度 HV 的功能，以事先设定的饱和像素率为基础进行调节）时，请点击  [AG]按钮。

Auto Gain 失败的通道上会显示“NG”，HV 的值恢复为执行 Auto Gain 前的值。

可通过  [Auto Gain 设定]按钮更改饱和和像素率。需要设定最大值和最小值。

注意：

- 扫描执行过程中无法执行 Auto Gain。
- 2Ex1Em、1Ex2Emx2 线顺序时，无法执行 Auto Gain。
- 设定为线扫描时无法执行 Auto Gain。
- Auto Gain 执行过程中，请勿进行 Acquisition 画面下的手动调节和遥控器的调节操作。

(7) 根据需要进行 Average。

Average 是对同一图像进行多次扫描，通过平均化来消除噪声的功能。

Average 分为逐 Frame 和逐 Line 扫描 2 种。

注：进行 Average 可以减少噪声，但帧率（1 秒中内可获取的图像数）会随之降低。

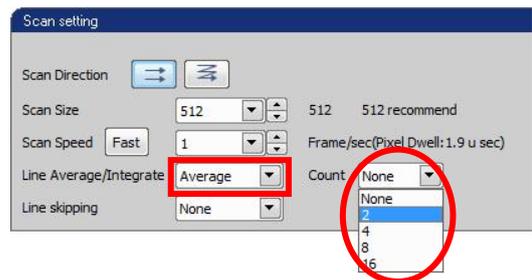
Frame Average:

点击软件工具栏中的  按钮，选择平均扫描次数。



Line Average:

在 Scan setting 画面的 [Line Average/Integrate] 中选择 [Average]，在 [Count] 中选择平均扫描次数。



(8) 点击  [XY] 按钮以获取图像。

25.4 保存图像。

激活要保存的图像，从菜单栏中选择 [File] -> [Save As] 以进行保存。

注：建议以 nd2 文件格式进行保存。（将同时保存参数等条件。）

26

高速 ZT 序列图像的获取方法（共振式扫描器）

26.1 执行“高速图像的获取方法”的步骤 25.1~25.3。

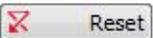
26.2 启动 ND Acquisition 对话框。

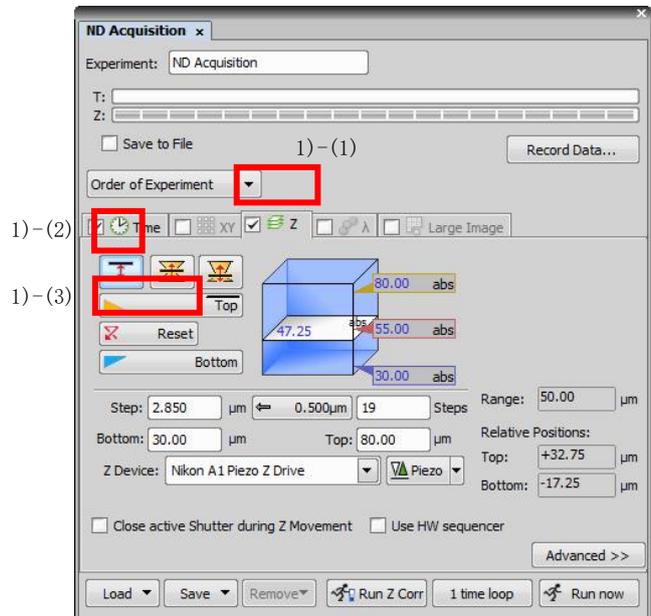
- (1) 点击  [XYZ Time...] 按钮，启动 ND Acquisition 对话框。

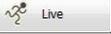
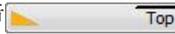


26.3 决定 ZT 序列图像的 Z 的获取范围。

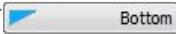
1) 不使用完美调焦系统

- (1) 点击 Z 选项卡。
- (2) 点击  [Defined top & bottom] 按钮。
- (3) 点击  [Reset] 按钮。



(4) 点击  [Live] 按钮, 边观察图像边转动显微镜的调焦手轮(微调模式), 点击  [Top] 按钮, 决定 Top。

注： 向立方体中的面的数值增加的方向转动调焦手轮。

(5) 点击  [Live] 按钮, 边观察图像边转动显微镜的调焦手轮(微调模式), 点击  [Bottom] 按钮, 决定 Bottom。

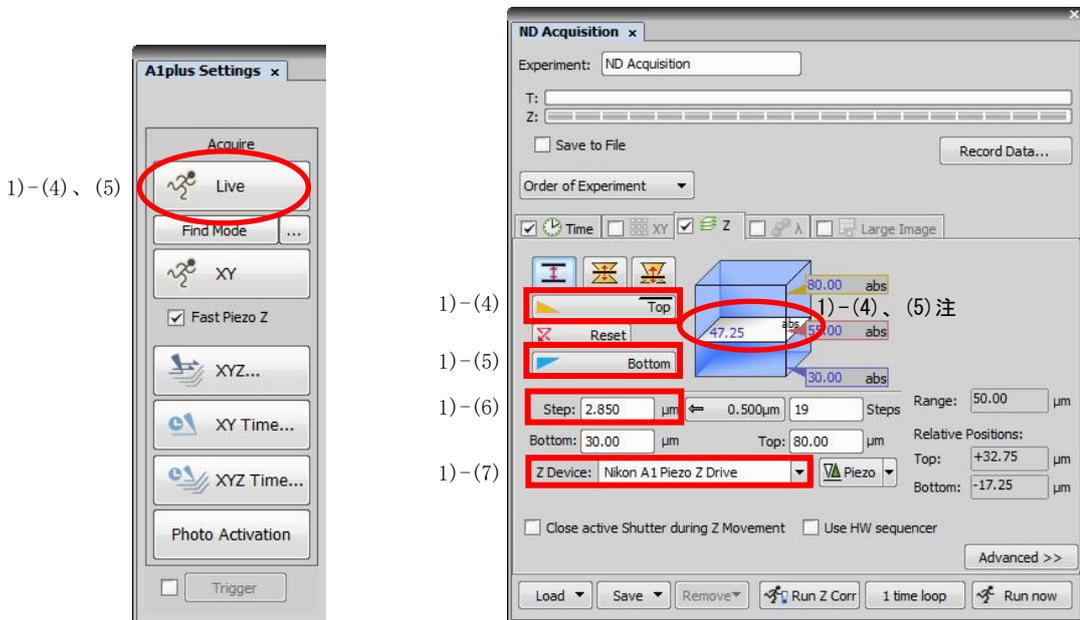
注： 向立方体中的面的数值减少的方向转动调焦手轮。

(6) 决定 Step。

(7) 在 Z Device 中选择[A1 Piezo Z Drive]。

**注： Piezo ZDrive 的驱动范围为 100 μm（常温时）。
请将总体范围设定为 100 μm 以内。**

注： 37 度环境下， Piezo ZDrive 的驱动范围为 50 μm 左右。



不使用完美调焦系统状态下的 ZT 序列图像的 Z 的获取范围的设定到此结束。
进至 26.4。

2) 使用完美调焦系统

(1) 启动完美调焦，使用偏移旋钮进行焦点的移动。

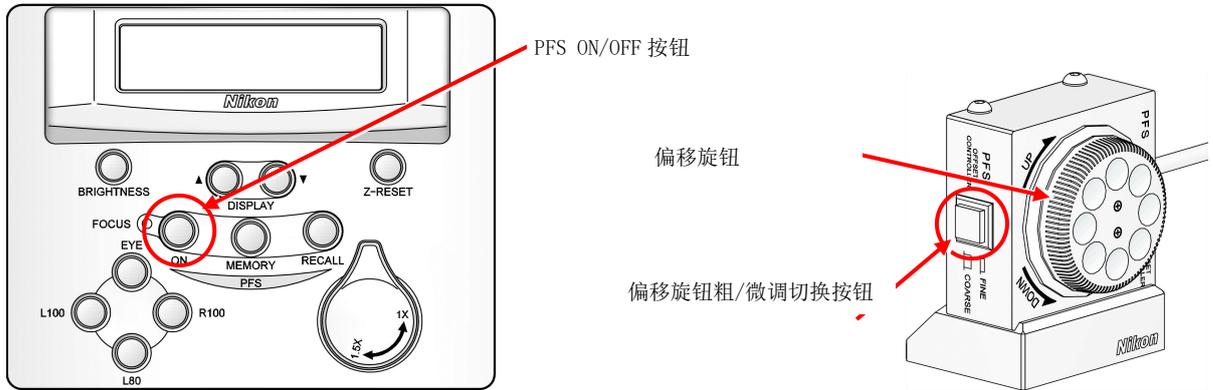


图 Ti-E 正面操作面板和移置控制器

(2) 点击 Z 选项卡。

(3) 点击 [Defined top & bottom] 按钮。

(4) 向立方体中的数值减少的方向转动偏移旋钮，决定样本底部（靠近物镜一侧）的位置。

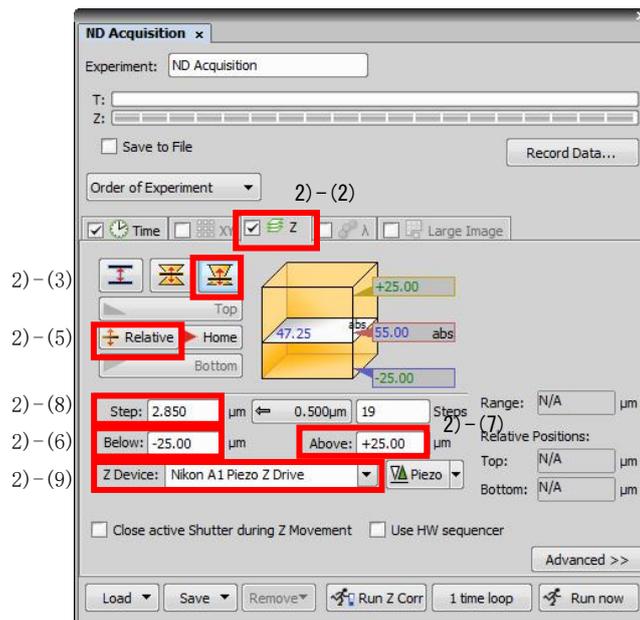
(5) 点击 Relative 。

(6) 在 Below 中输入 0。

(7) 在 Above 中输入样本的厚度数值。

(8) 决定 Step。

(9) 在 Z Device 中选择[A1 Piezo Z Drive]。

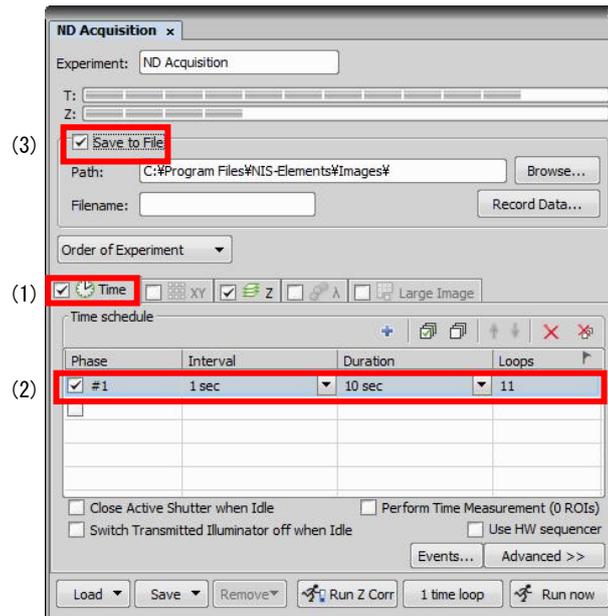


26.4 进行 ZT 序列图像的时间设定。

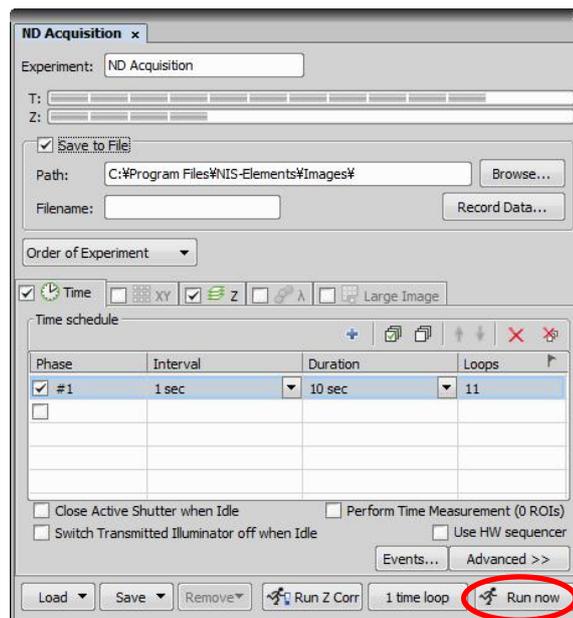
- (1) 点击 Time 选项卡。
- (2) 决定时间间隔（Interval）和持续时间（Duration）。
- (3) 选择[Save to File]，在保存的同时获取图像。

注： 保存格式为 nd2 格式。

注： 建议在保存的同时获取时间序列图像。



26.5 点击[Run Now]按钮，获取 ZT 序列图像。



27

光刺激同时成像的获取方法

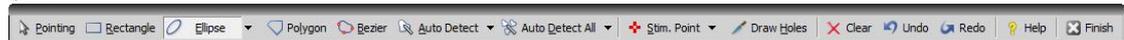
(共振式&检流式扫描器)

27.1 执行“高速图像的获取方法”的步骤 25.1~25.3。

27.2 设定要进行光刺激的位置。

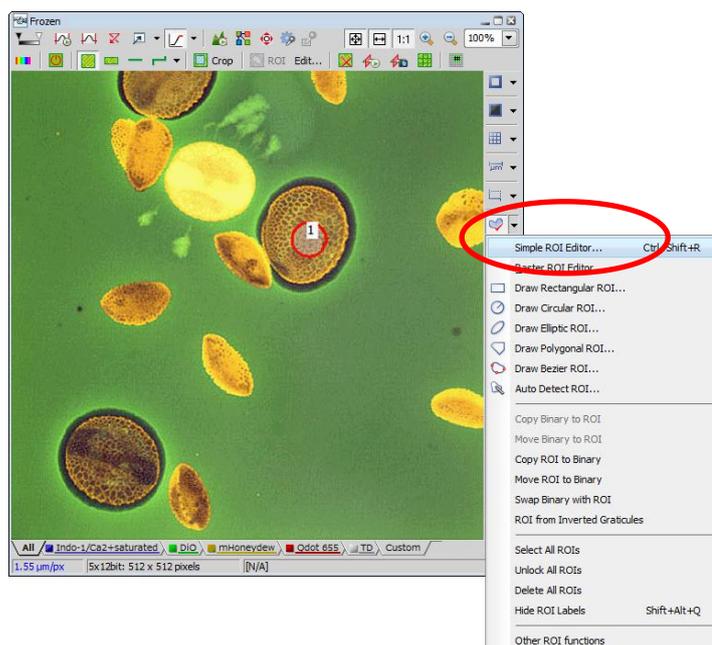
(1) 点击图像的侧面边框上的  按钮，选择 Simple ROI Editor。

使用



在图像上绘制 ROI。

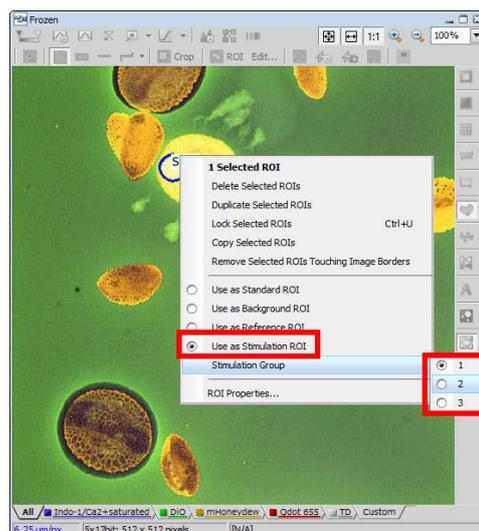
注：使用  **Stim. Point** 可实现点刺激。



(2) 在 ROI 上鼠标右击，从弹出的菜单中选择 [Use as Stimulation ROI]。

接着选择 [Stimulation Group]。

注：ROI 最多可分为 3 组。每个组中可设定多个 ROI。
通过对 ROI 进行分组，可设定不同的刺激条件。



27.3 进行刺激用激光的设定。

(1) 点击 Photo Activation，切换设定画面。

(2) 点击选项卡 1（Stimulation Group1 的设定）。

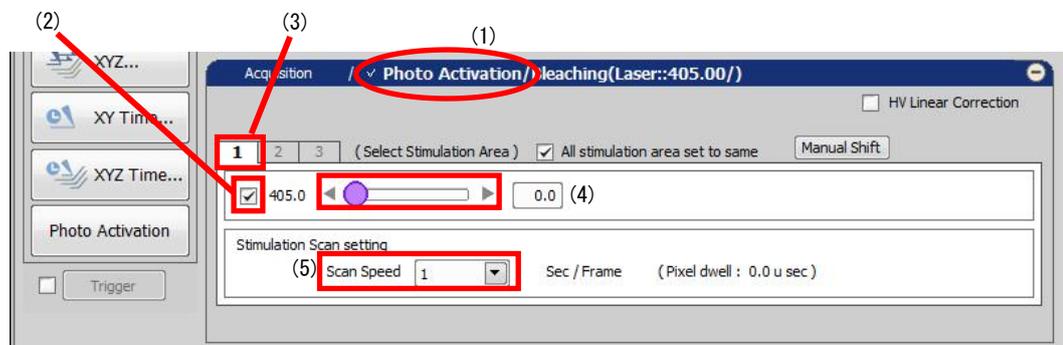
(3) 选择刺激用的激光。

注：同时光刺激观察时，可使用 405nm 和 488nm 激光。但是，要使用 488nm 激光，需要安装 488nm 同时刺激用滤镜。

(4) 操作激光功率滑动条，选择刺激时的激光功率。

(5) 选择刺激的扫描速度。

**注：请将 Scan Speed 理解为 1 次刺激所需的时间。
选择 1 Sec/Frame 时，1 次刺激时间为 1 秒。**



(6) 有 Stimulation Group2、3 时，重复 27.3 (2)~(5) 的操作。

27.4 进行光刺激成像的时间序列的设定。

(1) 点击 [Photo Activation] 按钮，启动 Simultaneous Stimulation 窗口。



(2) 进行刺激的时间设定。

- Wait: 设定到刺激开始为止的待机时间。
- Interval: 设定刺激的间隔。
- ROIs: 设定刺激用的 Stimulation Group。
- Duration: 设定刺激的持续时间。
设定为 Loops 时，将自动决定。
- Loops: 设定刺激的执行次数。

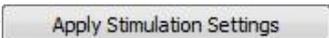
(3) 进行时间序列图像的时间设定。

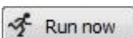
- Duration: 设定图像获取的持续时间。
设定为 Loops 时，将自动决定。
- Loops: 设定图像获取的执行次数。

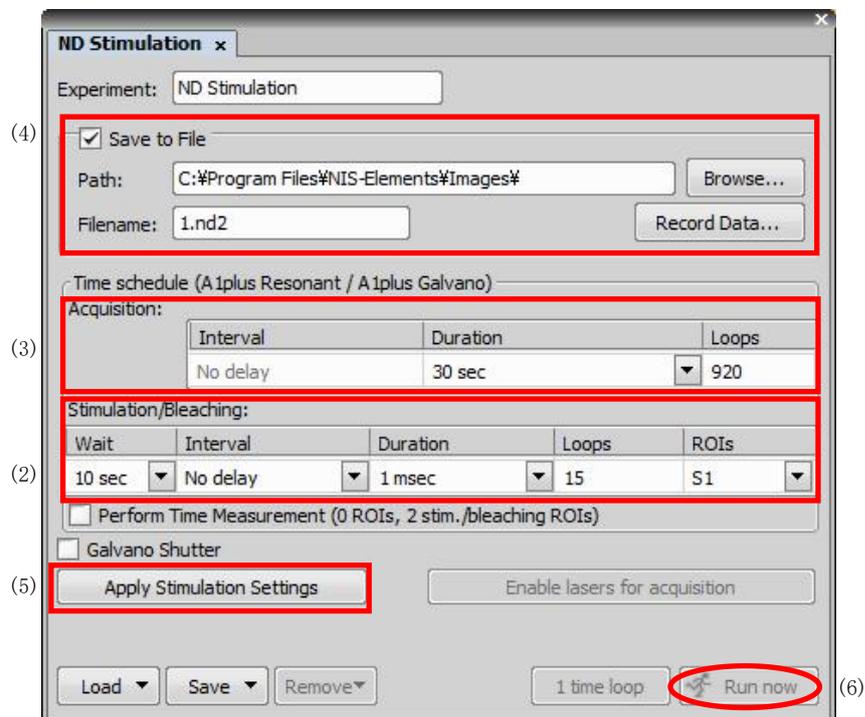
(4) 选择[Save to File]，在保存的同时获取图像。

注：保存格式为 nd2 格式。

注：建议在保存的同时获取时间序列图像。

(5) 点击  按钮，读取光刺激同时成像的设定。

(6) 点击  [Run now]按钮，执行光刺激同时成像。



联系方式

技术方面咨询

株式会社 Nikon Instech

生物科学营业本部 应用技术部

Tel. 03-3216-9163

担当营业咨询

株式会社 Nikon Instech

参照右表 外线电话一览

◇株式会社 Nikon Instech 外线电话一览◇

总部	03-3216-9164
札幌营业所	011-281-2535
名古屋营业所	052-709-6851
京都营业所	075-781-1170
关西分部	06-6394-8805
金泽营业所	076-233-2177
冈山营业所	086-801-5055
九州分部	092-611-1111
长崎营业所	095-844-2945
大分营业所	097-538-1439
熊本营业所	096-384-7007
宫崎办事处	0983-26-2552
鹿儿岛营业所	0995-44-7109

食品微生物检验技术实验指导书

韩明 陈林

广州城市职业学院食品系

2022.08

目 录

实验一 显微镜使用及微生物的染色及观察	1
实验二 培养基的配制技术	7
实验三 微生物的分离、纯化技术	10
实验四 食品微生物学检验 总则	16
实验五 食品卫生微生物学检验 菌落总数测定	22
实验六 食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定	28
实验七 食品卫生微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验	37
实验八 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验	55
实验九 食品卫生微生物学检验 志贺氏菌检验	78
实验十 食品卫生微生物学检验 乳酸菌检验	82
实验十一 食品卫生微生物学检验 霉菌和酵母计数	91
实验十二 食品卫生微生物学检验 乳与乳制品检验	97
实验十三 食品卫生微生物学检验 冷冻饮品、饮料检验	102
实验十四 食品卫生微生物学检验 糖果、糕点、蜜饯检验	104
实验十五 食品卫生微生物学检验 酒类检验	106
实验十六 食品卫生微生物学检验 调味品检验	108
实验十七 食品卫生微生物学检验 奶油检验	110
实验十八 食品卫生微生物学检验单核细胞增生李斯特氏菌检验	113
实验十九 食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验	123
附录:	133

实验一 显微镜使用及微生物的染色及观察

显微镜是微生物学工作者不可缺少的实验仪器,熟悉其原理及操作技术是微生物研究的必要手段。由于微生物形体微小,难以用肉眼观察其形态结构,必须借助显微镜才能更好地进行研究和利用。通常可将显微镜分为光学显微镜和非光学显微镜两大类。常见的光学显微镜有普通光学显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜等类型;非光学显微镜主要是指电子显微镜。普通光学显微镜是实验室常用的光学仪器。显微镜的性能与其放大率、物像观察时的明晰程度有关。

1. 显微镜结构

光学显微镜是由机械装置和光学系统两大部分组成(图 1-1)。

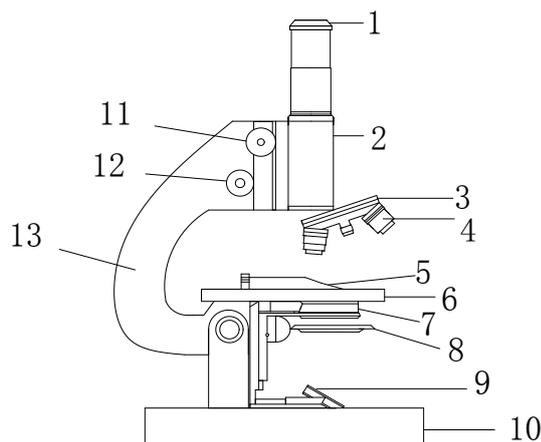


图 1-1 光学显微镜的结构

1.目镜; 2.镜筒; 3.物镜转换器; 4.物镜; 5.标本夹; 6.镜台; 7.聚光镜; 8.可变光阑; 9.反光镜; 10.镜台; 11.粗调节器; 12.细调节器; 13.镜臂

显微镜的总放大率是指物镜放大率和目镜放大率的乘积。物镜和目镜搭配不同,其分辨率也不同。例如用放大率为 40 倍的物镜($NA=0.65$)和放大率为 24 倍的目镜,虽然总放大率为 960 倍,其分辨的最小距离只有 $0.42\ \mu\text{m}$ 。若用放大率为 90 倍的油镜($NA=1.25$)和放大率为 10 倍的目镜,虽然总放大率为 900 倍,却能分辨 $0.22\ \mu\text{m}$ 的物体。

2. 实验材料

- (1) 菌种: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)
- (2) 溶液或试剂: 香柏油、二甲苯

(3) 其他器材：标本片、显微镜、擦镜纸。

3. 实验步骤

(1) 显微镜的安置与调试

A. 显微镜的安置：将显微镜置于平整的实验台上，保持镜座距实验台边缘约 3-4 cm。切忌单手拎提，应一手握住镜臂，一手托住底座，使显微镜保持直立、平稳。镜检时姿势要端正，使用显微镜时应双眼同时睁开观察，既可减少眼睛疲劳，也便于边观察边绘图记录。

B. 调节光源：显微镜的照明光源有安装在镜座内的内置光源及通过反光镜采集的外置光源两种。内置光源可通过调节电压以获得适当的照明亮度。外置光源指自然光或灯光，通常利用反光镜采集。使用反光镜时，应根据光源的强度及所用物镜的放大倍数选用凹面或平面镜，避免直射光源，可通过调节角度使视野内的光线均匀，亮度适宜，便于观察。

C. 调节目镜：目镜的调节常根据使用者的个人情况，调整双筒显微镜的目镜间距。在左目镜上一般还配有屈光度调节环，可适应眼距不同或两眼视力有差别的不同观察者。

D. 调节聚光器数值孔径值：调节聚光器虹彩圈值与物镜的数值孔径值相符或略低。有些显微镜的聚光器只标有最大数值孔径值，而没有具体的光圈数刻度。使用这种显微镜时可在样品聚焦后取下一目镜，从镜筒中一边看着视野，一边缩放光圈，调整光圈的边缘与物镜边缘黑圈相切或略小于其边缘。因为各物镜的数值孔径值不同，所以每转换一次物镜都应进行这种调节。

注意：在聚光器的数值孔径值确定后，若需改变光照强度，可通过升降聚光器或改变光源的亮度来实现。

(2) 显微观察

在目镜保持不变的情况下，使用不同放大规格的物镜所达到的分辨率及放大率都是不同的。对初学者而言，在进行显微观察时应遵循从低倍镜到高倍镜再到油镜的观察顺序，因低倍物镜视野较大，易发现目标及确定检查的位置。

A. 低倍镜观察：将金黄色葡萄球菌或枯草芽孢杆菌的染色玻片标本置于载物台上，用标本夹固定，移动载物台使观察对象处在物镜正下方。下降 10×物镜，使其接近标本，用粗调节器缓慢升起镜筒，使视野中的标本初步聚焦，继而用细调节器调节使图像清晰。通过移动载物台，认真观察标本各部位，按要求找到合适的目的物，仔细观察并记录所观察到的结果。

注意：在使用粗调节器聚焦物镜时，必须形成先从侧面注视小心调节物镜靠近标本，然后用目镜观察，慢慢调节物镜离开标本进行准焦的习惯，以免因一时大意而损坏镜头及标本。

B. 高倍镜观察：在低倍镜下找到合适的观察目标并将其移至视野中心，轻轻转动物镜转换器将高倍镜移至工作位置。从侧面观察，转动粗调节器，将镜筒徐徐放下，由目镜观察，仔细调节光圈，使光线明亮适宜。用粗调节器缓慢上升镜筒至物像出现，再用细调节器调节至物像清晰，找到适宜观察部位并将其移至视野中心，准备用油镜观察。对聚光器光圈及视野亮度进行适当调节后微调细调节器使物像清晰，利用推进器移动标本仔细观察并记录所观察

到的结果。

注意：当物像在一种物镜中已清晰聚焦后，转动物镜转换器将其他物镜转到工作位置进行观察时，物像将保持基本准焦的状态，此现象称为物镜的同焦。利用这种同焦现象，可保证在使用高倍镜或油镜等放大倍数高、工作距离短的物镜时仅用细调节器即可对物像清晰聚焦，从而避免由于使用粗调节器时的大意而损坏镜头或标本。

C. 油镜观察：在高倍镜下找到要观察的样品区域后，用粗调节器将镜筒升高，然后将油镜转到工作位置。在待观察的样品区域加香柏油，从侧面注视，转动粗调节器，缓慢降下镜筒，使油镜浸在香柏油中并接近标本。用目镜观察，进一步调节光线，转动粗调节器缓慢地提升油镜至物像出现，再用细调节器调节至物像清晰。如果油镜头已离开油面仍未找到物像，则有两种可能。一是油镜下降还未到位；二是油镜上升过快，必须再从侧面观察，将油镜降下，重复操作。将聚光器升至最高位置并开足光圈，若所用聚光器的数值孔径值超过 1.0，还应在聚光镜与载玻片之间加香柏油，保证其达到最大效能。

(3) 显微镜用毕后的处理

A. 上升镜筒，取下标本。

B. 用擦镜纸擦拭镜头上的香柏油，然后蘸少许二甲苯擦去镜头上残留的油迹，最后用干净的擦镜纸擦去残留的二甲苯。擦镜头时要顺着镜头直径方向擦，不能沿圆周方向擦。随后再用绸布擦净显微镜的金属部件。

注意：切忌用手或其他纸擦拭镜头，以免使镜头沾上污渍或产生划痕。

C. 用擦镜纸清洁其他物镜及目镜。

D. 将各部分还原，反光镜垂直于镜座，将物镜转成“八”字形，再向下旋。同时把聚光镜降到最低位置，以免物镜与聚光镜发生碰撞危险。

E. 染色玻片标本上的香柏油可用二甲苯使之溶解，再用吸水纸轻轻压在涂片上，吸掉二甲苯和香柏油，以免损坏涂片。

4. 实验报告

分别绘出在低倍镜、高倍镜及油镜下观察到的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、青霉菌的形态，包括在三种情况下视野中的变化，同时注明物镜放大倍数和总放大率。

简单染色和革兰氏染色技术

1. 实验目的

- (1) 学习微生物涂片、染色的基本技术，掌握细菌的简单染色法。
- (2) 了解革兰氏染色法的原理及其在细菌分类鉴定中的重要性。
- (3) 学习并初步掌握革兰氏染色法并能对结果进行正确判断。

2. 实验原理

染色是微生物学基本技术。细菌个体微小，比较透明，未经染色时在普通光学显微镜下

往往不易识别。染色法可使细菌细胞着色，与背景形成鲜明的对比，易于在显微镜下观察。

(1) 简单染色法

细菌的简单染色是指用单一染料处理菌体，该方法操作简便，易于掌握，适用于细菌一般形态的观察。

实验室常用碱性染料进行简单染色，这是因为：细菌在中性环境中一般带负电荷，碱性染料在电离时，染料离子带正电荷，因此碱性染料的染色部分很容易与细菌结合使细菌着色。经染色后的细菌细胞与背景形成鲜明的对比，在显微镜下更易于识别。常用的碱性染料有：美蓝、结晶紫、碱性复红等。

当细菌分解糖类产酸使培养基 pH 下降时，细菌所带正电荷增加，此时可用伊红、酸性复红或刚果红等酸性染料染色。

(2) 革兰氏染色法

革兰氏染色法是细菌学中重要的鉴别染色法。该染色法是 1884 年由丹麦病理学家 Christain Gram 创立，而后一些学者在此基础上做了某些改进。

革兰氏染色法是将细菌用初染液染色，加媒染剂媒染后，用脱色剂脱色，再用复染剂染色。根据此染色反应结果可将所有细菌分为革兰氏阳性和革兰氏阴性两大类。呈蓝紫色的为革兰氏阳性细菌，以 G^+ 表示；呈红色的为革兰氏阴性细菌，以 G^- 表示。细菌在革兰氏染色中的呈色差异是由两类细菌细胞壁结构和组成不同决定的。当用结晶紫初染后，所有细菌都被染成初染剂的蓝紫色。碘作为媒染剂，可增加染料和细胞的亲合力，与结晶紫结合形成结晶紫—碘复合物。当用脱色剂处理时，两类细菌的脱色效果不同。革兰氏阳性细菌的细胞壁主要由肽聚糖形成网状结构，其壁厚、类脂质含量低，用乙醇脱色时细胞壁脱水，使肽聚糖层的网状结构孔径缩小，透性降低，从而使结晶紫—碘复合物不易被洗脱而保留在细胞内，经脱色和复染后仍保留初染剂的蓝紫色。革兰氏阴性细菌则不同，由于其细胞壁肽聚糖层较薄，类脂含量高，当脱色处理时，类脂质被乙醇溶解，细胞壁透性增大，使结晶紫—碘复合物比较容易被洗脱出来，用复染剂复染后，细胞被染上复染剂的红色。

3. 实验材料

(1) 菌种：金黄色葡萄球菌，大肠杆菌

(2) 染料：草酸铵结晶紫液、革兰氏碘液、95% 乙醇、沙黄（番红）染液、美蓝染液。

(3) 其它：显微镜、载玻片、接种环、酒精灯、无菌水、香柏油、二甲苯、吸水纸、擦镜纸、洗瓶、纱布、玻片架等。

4. 操作步骤

(1) 细菌涂片的制作

涂片：用接种环从试管培养液中取一环菌，于载玻片中央涂成薄层即可，或先滴一小滴无菌水于载玻片中央，用接种环从斜面挑出少许菌体，与载玻片的水滴混合均匀，涂成一薄层，一般涂布直径 1 cm 大小范围为宜。

干燥：涂片后可自然干燥，也可在酒精灯上略加热，使之迅速干燥。

固定：固定的方法主要取决于用什么染色法，常用的有火焰固定法和化学固定法。火焰固定法的主要操作要领是：手持载玻片一端，涂片面向上，于火焰上通过 2-3 次，使细胞质凝固，以固定细菌的形态，并使其牢固附在载玻片上，不易脱落。（图 1-2）

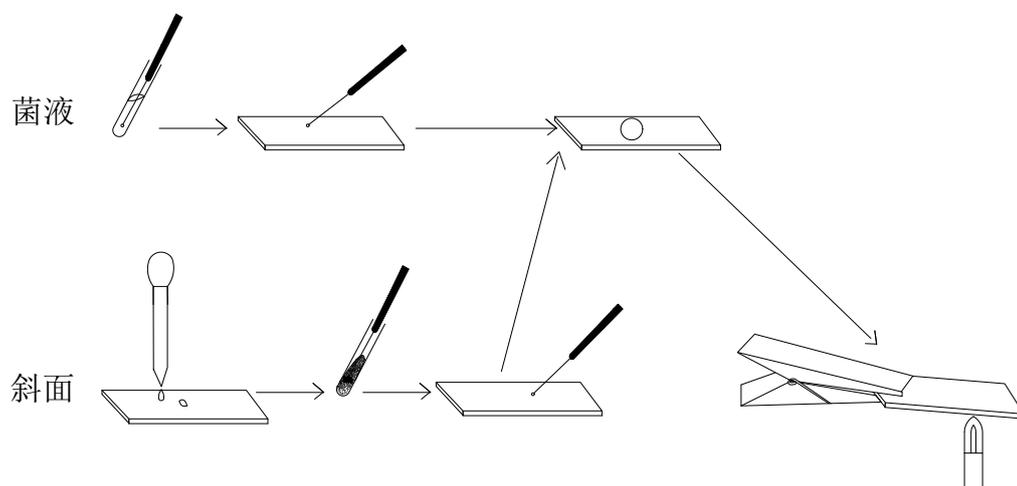


图 1-2 涂片、干燥和热固定

(2) 简单染色法

染色：滴加美蓝液（或其他染液）覆盖载玻片涂菌部位，染色时间随不同染色液而定。吕氏碱性美蓝染色液染 2-3 min，石炭酸复红染色液染 1-2 min。

水洗：夹住载玻片一端，斜置用细小的水流由上至下冲洗去多余的染液，直到流下的水无色为止。

干燥：自然风干，或用吸水纸吸去水分，或微微加热，以加快干燥。

镜检：待涂片完全干燥后用油镜观察。

(3) 革兰氏染色法

初染：草酸铵结晶紫染色 1-2 min，水洗。

媒染：用碘液冲去残水，并用碘液覆盖约 1 min，水洗。

脱色：用滤纸吸去玻片上残留的水分，将玻片倾斜，在白色背景下，用 95 %乙醇脱色，直至流出的乙醇无紫色时（约 15~30s），立即水洗，并吸干水分。

复染：用番红复染约 2 min，水洗。

镜检：干燥后用油镜观察。革兰氏阳性细菌呈蓝紫色，革兰氏阴性细菌呈红色。以分散开的细菌的革兰氏染色反应为准，过于密集细菌常由于脱色不完全而呈假阳性。

注意：脱色是革兰氏染色关键的一步，可直接用 95 %酒精冲洗脱色，直到流下的酒精接近无色为止。然后应立即用水冲洗，以避免脱色时间过长而影响最终染色结果。另外，挑

菌量、固定温度、染色时间也是影响结果的重要因素，只有通过反复实践，才能获得满意的实验结果。

5. 实验报告

列表简述 2 株细菌的染色观察结果，包括各菌的形状、颜色和革兰氏染色反应。

实验二 培养基的配制技术

1. 实验目的

- (1) 明确培养基的配制原理。
- (2) 掌握配制培养基的一般方法和步骤。

2. 基本原理（牛肉膏蛋白胨培养基）

牛肉膏蛋白胨培养基是一种应用最广泛和最普通的细菌基础培养基,有时又称为普通培养基。由于这种培养基中含有一般细菌生长繁殖所需要的最基本的营养物质,所以可供作微生物生长繁殖之用。基础培养基含有牛肉膏、蛋白胨和 NaCl。其中牛肉膏为微生物提供碳源、能量、磷酸盐和维生素,蛋白胨主要提供氮源和维生素,而 NaCl 提供无机盐。在配制固体培养基时还要加入一定量琼脂作凝固剂(琼脂通常不被微生物分解利用),琼脂在常用浓度下 96 °C 时溶化,实际应用时,一般在沸水浴中或下面垫以石棉网煮沸溶化,以免琼脂烧焦,溶化后在 45 °C 水浴暂存(琼脂在 40 °C 时凝固)。

牛肉膏蛋白胨培养基的配方如下:

牛肉膏	3.0 g
蛋白胨	10.0 g
NaCl	5.0 g
水	1000.0 mL
pH	7.4-7.6

3. 实验材料（以牛肉膏蛋白胨培养基配制为例）

- (1) 溶液或试剂: 牛肉膏、蛋白胨、NaCl、琼脂、1 mol/L NaOH, 1 mol/L HCl。
- (2) 其他材料: 试管、三角瓶、烧杯、量筒、玻璃棒、天平、药匙、高压蒸汽灭菌锅、pH 试纸、棉花塞、纱布、记号笔

4. 实验步骤（以牛肉膏蛋白胨培养基配制为例）

(1) 称量

按培养基配方比例依次准确称取牛肉膏、蛋白胨、NaCl 放入烧杯中。牛肉膏常用玻璃棒挑取,放在小烧杯或表面皿中称量,用热水溶化后倒入烧杯。也可放在称量纸上,称量后直接放入水中,稍微加热,牛肉膏便会与称量纸分离,取出称量纸即可。

注意:蛋白胨易受潮,在称取时动作要迅速。另外,称药品时严防药品混杂,称取一种药品后,将药匙洗净擦干后再称取另一种药品。或一把药匙称取一种药品。药品的瓶盖也注意不要盖错。

(2) 溶化

在上述烧杯中先加入少量水,用玻璃棒搅匀,然后在石棉网上加热使其溶解,或在磁力搅拌器上加热溶解。将药品完全溶解后,补充水分到所需的总体积,如果配制固体培养基时,

实验二 培养基的配制技术

将称好的琼脂放入已溶的药品中，再加热溶化，最后补足所损失的水分。用三角瓶盛固体培养基时，一般也可将一定量的液体培养基分装于三角瓶中，然后按 1.5-2.0 % 的量将琼脂直接加入各三角瓶中，不必加热溶化，在灭菌时使加热与溶化同步进行，节省时间。

注意在溶解琼脂时，要小心控制火力，以免培养基因沸腾而溢出容器。同时，需不断搅拌，以防琼脂糊底烧焦。配制培养基时，不可用铜或铁锅加热溶化，以免离子进入培养基中，影响细菌生长。

(3) 调 pH

在未调 pH 前，先用精密 pH 试纸测量培养基的原始 pH，如果偏酸，用滴管向培养基中逐滴加入 1 mol/L NaOH，一边加一边搅拌，并随时用 pH 试纸测其 pH，直至 pH 达 7.6。反之，用 1 mol/L HCl 逐滴进行调节。对于某些要求 pH 较精确的微生物，可用酸度计进行 pH 的调节。

调节 pH 时注意不要过度，因回调会影响培养基内各离子浓度。配制 pH 低的琼脂培养基时，若预先调好 pH 并在高压蒸汽下灭菌，则琼脂因水解不能凝固。因此，应将培养基的成分和琼脂分开灭菌后再混合，或在中性 pH 条件下灭菌，然后再调整 pH。

(4) 过滤

趁热用滤纸或多层纱布过滤，以利某些实验结果的观察。一般无特殊要求的情况下，这一步可省略。

(5) 分装

按实验要求，可将配制的培养基分装于试管或三角瓶内。（图 2-1）

A. 液体分装：分装高度以试管高度的 1/4 左右为宜。分装三角瓶的量则根据需要而定，一般以不超过三角瓶容积的一半为宜，如果是用于振荡培养的，则根据通气量的要求酌情减少。有的液体培养基在灭菌后，需要补加一定量的其他无菌成分如抗生素，则装量一定要准确。

B. 固体分装：分装试管，其装量不超过管高的 1/5，灭菌后制成斜面。分装三角瓶的量以不超过三角瓶容积的一半为宜。

C. 半固体分装：试管一般以试管高度的 1/3 为宜，灭菌后垂直待凝固。分装过程中，注意不要使培养基沾在管（瓶）口上，以免污染棉塞。

(6) 加塞

培养基分装完毕后，在试管口或三角瓶上塞好棉塞，以阻止外界微生物进入培养基内造成污染，并保证有良好的通气性能。

(7) 包扎

加塞后，将全部试管用麻绳捆好，再在棉塞外包一层牛皮纸，以防止灭菌时冷凝水润湿棉塞，最后用麻绳扎好。用记号笔注明培养基名称、配制日期、组别。三角瓶加塞后，外包牛皮纸，用麻绳以活结形式扎好，使用时容易解开，同样用记号笔注明培养基名称、配制日期、组别。

(8) 灭菌

将上述培养基以 0.103 Mpa, 121 °C, 20 min 高压蒸汽灭菌。

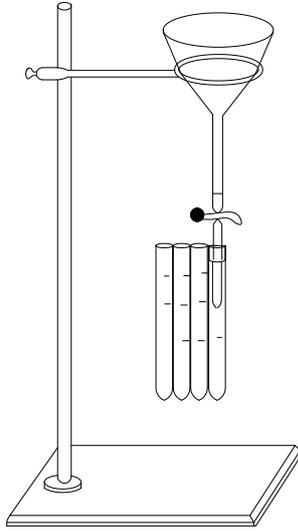


图 2-1 培养基分装

(9) 摆斜面

将灭菌的试管培养基冷却至 50 °C 左右, 将试管口一端倾斜搁在玻璃棒或其他合适高度的器具上, 搁置的斜面长度以不超过试管总长的一半为宜。(图 2-2)

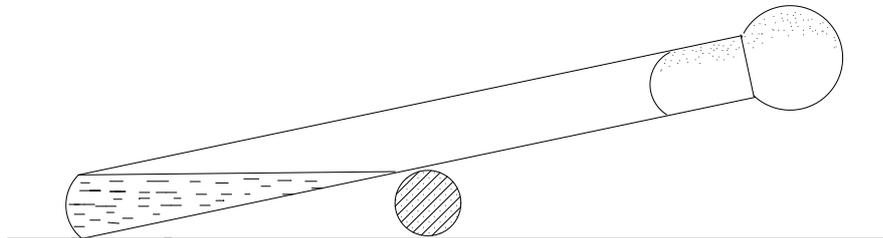


图 2-2 斜面的放置

(10) 无菌检查

将灭菌培养基放入 37 °C 的温室中保温 24-48 h, 以检查灭菌是否彻底。

5. 实验报告

实验三 微生物的分离、纯化技术

1. 分离技术

1.1 基本原理

从混杂的微生物群体中获得只含有某一种或某一株微生物的过程称为微生物的分离与纯化。常用方法有：

1.1.1 平板分离法

该方法操作简便，普遍用于微生物的分离纯化。主要包括稀释平板法和平板划线法。其基本原理如下：

(1) 选择适合于待分离微生物的生长条件，如营养、酸碱度、温度和氧等要求或加入某种抑制剂造成只利于该微生物生长，而抑制其他微生物生长的环境，从而淘汰一些不需要的微生物。

(2) 微生物在固体培养基上生长形成的单个菌落可以由一个细胞繁殖而成的集合体，因此可通过挑取单菌落而获得一种纯培养。获取单个菌落的方法可通过稀释涂布平板或平板划线等技术完成。

值得注意的是，从微生物群体中经分离生长在平板上的单个菌落并不能保证是纯培养。因此，纯培养的确定除了要观察菌落形态特征外，还要结合显微镜检测个体形态特征。有些微生物的纯培养要经过一系列的分离纯化过程和多种特征鉴定方法才能得到。

1.1.2 实验材料

2.1 样品：新鲜土壤。

1.1.2.2 培养基：灭菌的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(或淀粉琼脂培养基、马铃薯蔗糖培养基)。

1.1.2.3 无菌水：带有玻璃珠装有 45 mL 无菌水三角瓶、装有 9 mL 无菌水的试管。

2.4 其它：无菌培养皿、无菌吸管、无菌三角玻棒、台天平、记号笔、接种环、酒精灯、火柴、标签纸、胶水、水浴锅、5000 U/mL 链霉素液 0.5 %重铬酸钾液。

1.1.3 实验步骤

1.1.3.1 稀释分离法

(1) 倒平板：将牛肉膏蛋白胨培养基加热溶化，待冷却至 55 °C-60 °C 时倒平板，每种培养基设三个重复。

倒平板的方法：右手持溶化的培养基置于酒精灯旁，用左手将试管塞或瓶塞轻轻地拔出，保持试管或瓶口对着火焰。左手拿培养皿，利用大拇指和食指将皿盖在火焰附近打开一缝，迅速倒入培养基约 15 ml，盖好盖子后将培养皿平放在超净工作台上，轻轻摇动培养皿，使培养基均匀分布在培养皿底部，凝固备用。(图 3-1)

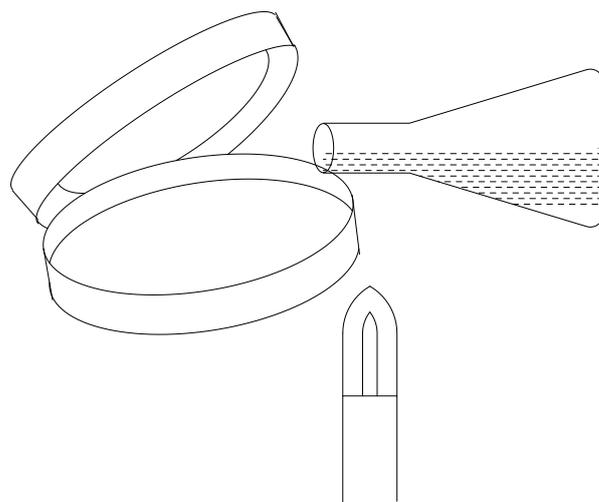


图 3-1 倒平板

(2) 制备土壤稀释液：称取土样 10 g，放入盛 90 mL 无菌水并带有玻璃珠的三角瓶中，振荡约 20 min，使土样中菌体或孢子均匀分散，制成 10^{-1} 稀释度的土壤稀释液。用一支 1mL 无菌吸管从中吸取 1 mL 土壤悬浮液加入盛有 9 mL 无菌水的试管中充分混匀，然后用无菌吸管从此试管中吸取 1 mL 加入另一盛有 9 mL 无菌水的试管中，混合均匀，以此类推分别配制成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 不同稀释度的土壤悬浮液。(图 3-2)

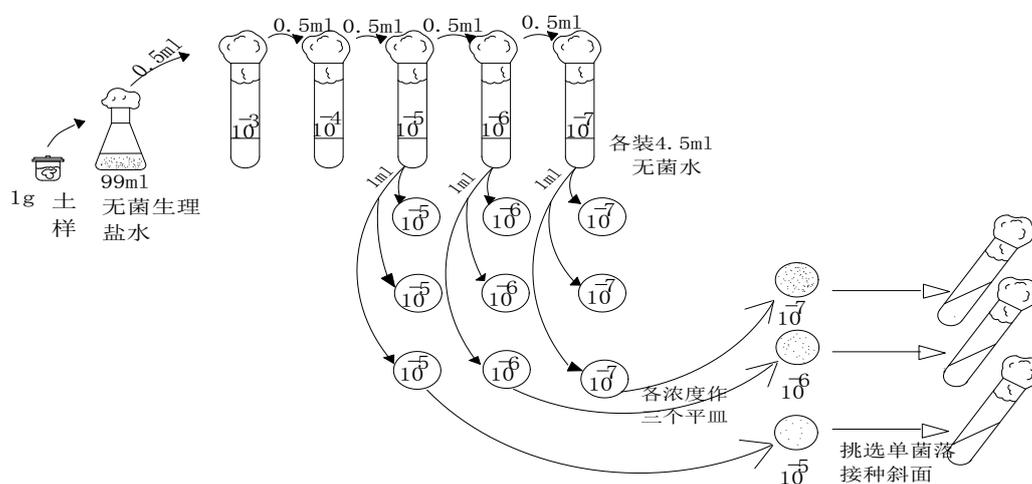


图 3-2 稀释分离示意图

(3) 涂布：将上述每种培养基的平板底面分别用记号笔写上 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 三种稀释度，然后用无菌吸管分别从 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 三管土壤稀释液中各吸取 0.1 mL 按记号放入平板中，用无菌玻璃棒按图 3-3 所示，在培养基表面轻轻地涂布均匀，室温下静置 5-10 min，使菌液吸附进培养基中。

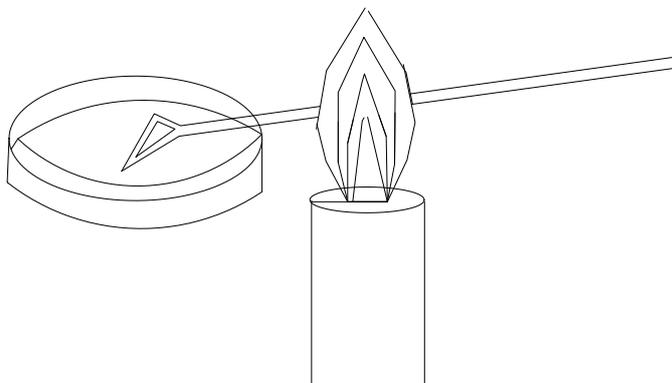


图 3-3 涂布分离法示意图

(4) 培养：将高氏 1 号琼脂培养基平板和马丁氏培养基平板倒置于 28 °C 温室中培养 3-5 d，牛肉膏蛋白胨琼脂培养基倒置于 37 °C 温室中培养 2-3 d。

(5) 挑菌落：将培养后长出的单菌落分别挑取少许细胞接种到上述三种培养基的斜面上，分别置于 28 °C、37 °C 温室培养，待菌落长出后，检查其特征是否一致，同时将细胞涂片染色后用显微镜检查是否为单一的微生物。若发现有杂菌，需再进行分离纯化，直到获得纯培养。

1.1.3.2 平板划线分离法

(1) 倒平板：按稀释分离法倒平板，并用记号笔标明培养基名称，土样编号和实验日期。

(2) 划线：在近火焰处，左手持培养皿，右手拿接种环在上述 10^{-1} 的土壤悬液中蘸一环，在平板上划线。划线的方法很多，但无论采用何种方法，其目的都是通过划线将样品在平板上进行稀释，使之形成单菌落。常用的划线方法有下列二种（图 3-4）：

A. 用接种环以无菌操作蘸取一环土壤悬液，在平板一边作第一次平行划线 3-4 条，再转动培养皿约 70°角，并将接种环上剩余菌液烧掉，待冷却后通过第一次划线部分作第二次平行划线，再用同样的方法通过第二次划线部分作第三次划线和通过第三次平行划线部分作第四次平行划线。划线完毕后，盖上培养皿盖，倒置于温室培养。

B. 将蘸有菌液的接种环在平板上作连续划线。划线完毕后，盖上培养皿盖，倒置于温室培养。

C. 挑菌落：同稀释分离法，一直到分离的微生物认为纯化为止。整个操作过程见图 3-5。

2. 接种

2.1 实验原理

微生物的接种技术是微生物学实验及研究的一项最基本的操作技术。接种是将纯种微生物在

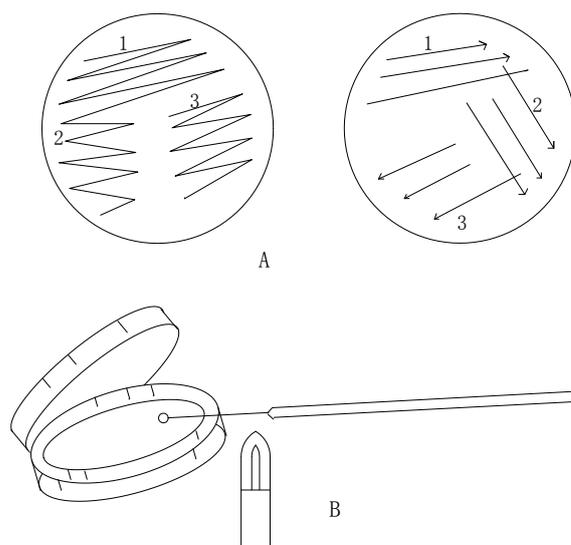


图 3-4 划线分析示意图

A.平板划线分离图；B.划线分离操作图

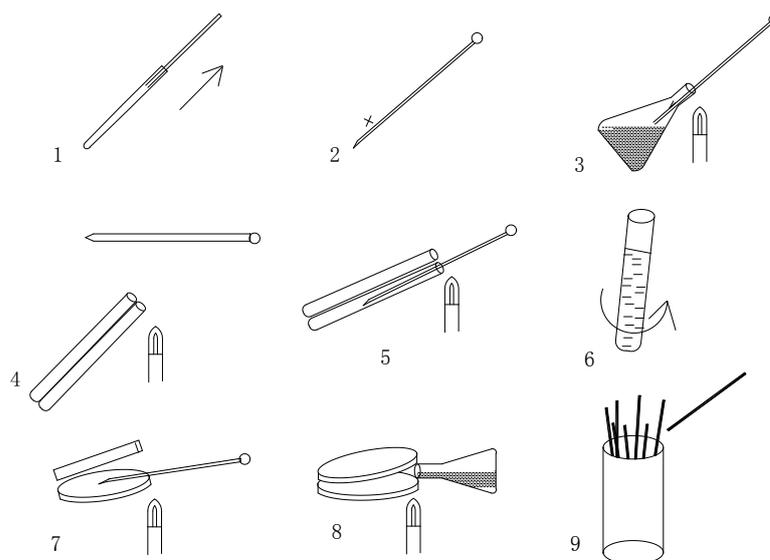


图 3-5 稀释分离无菌操作示意图

1.从包装纸套中取出无菌移液管；2.安装橡皮头，勿用手指触摸移液管；3.火焰旁取出土壤悬浮液；4.灼烧试管口及移液管口；5.在火焰旁对试管中土壤悬浮液进行稀释；6.混匀土壤稀释液；7.从最小稀释度开始，将稀释液加入无菌培养皿中；8.将溶化并冷却至 $45^{\circ}\text{C}\sim 50^{\circ}\text{C}$ 培养基倒入培养皿内；9.用完的移液管装入废弃物缸中浸泡消毒后灭菌洗涤。

无菌条件下移植到已灭菌并适宜该菌生长繁殖的培养基中。无菌操作是微生物接种技术的关键，为获得微生物的纯种培养，要求接种过程中必须严格进行无菌操作，一般要求在无菌室、超净工作台上进行。

常用的接种工具有接种针、接种环、玻璃棒等（图 3-6），灭菌方法见图 3-7。实验室常

用的接种方法有斜面接种、液体接种及穿刺接种等。

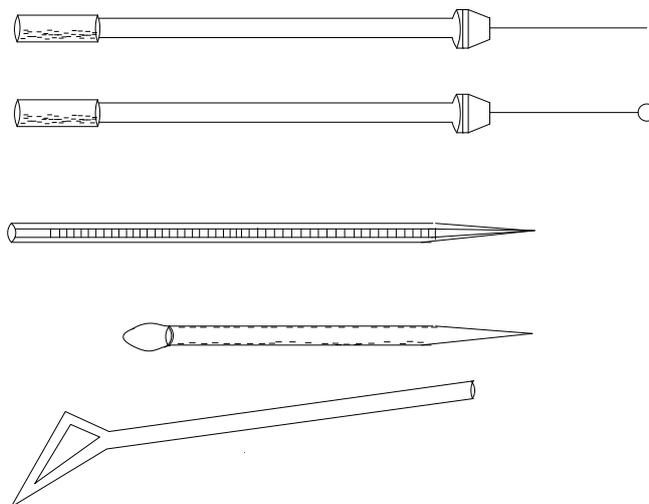


图 3-6 接种工具

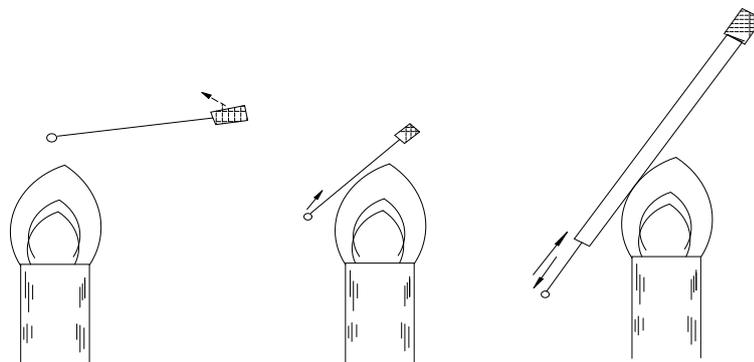


图 3-7 接种环（或针）灭菌

2.2 实验材料

- (1) 菌种：枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌；
- (2) 培养基：牛肉膏蛋白胨培养基（斜面、液体、半固体）；
- (3) 实验用具：接种环、接种针、无菌吸管、酒精灯等。

2.3 操作步骤

(1) 斜面接种：从生长良好的微生物斜面试管中挑取少量菌苔接种至空白斜面培养基上。

A. 在空白牛肉膏蛋白胨斜面试管上标明待接种的菌种名称、菌株号、日期和接种者。如贴标签则应在离试管口 1/3 处。

B. 点燃酒精灯。

C. 将菌种试管和空白斜面试管，用大拇指和其余四指握在左手中，试管底部放在手掌内并

使中指位于两试管间，斜面向上呈水平状，在火焰边用右手松动试管塞以利于接种时拔出。

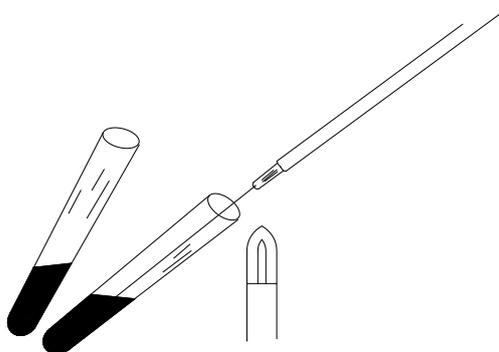


图 3-8 斜面接种

D. 右手拿接种环通过火焰灼烧灭菌，在火焰边用右手的手掌边缘和小指、小指和无名指分别夹持棉塞将其取出，并灼烧管口。

E. 将灭菌的接种环伸入接种试管中，先将接种环接触试管内壁或未长菌的培养基，使接种环的温度冷却，然后挑取少量菌苔。将接种环退出菌种试管，迅速伸入待接种的斜面试管，用接种环在斜面上自试管底部向上轻轻划波浪线。（图 3-8）

F. 接种环退出斜面试管后，用火焰灼烧试管口，在火焰边塞好试管。接种环应逐渐接近火焰再灼烧，如果接种环上沾的菌体较多时，应先将其在火焰边烤干，然后再灼烧，以免将未烧死的菌体飞溅出污染环境。接种病原菌时尤为必要。

（2）液体接种：从斜面菌种接种到液体培养基中。

A. 接种环、试管的灼烧灭菌与斜面接种相同。

B. 将蘸有菌种的接种环插入液体培养基中轻轻搅拌，使菌体分散于液体中。接种后塞好棉塞，轻摇培养基使菌体均匀分布，以利生长。

从液体培养基中接种到新鲜液体培养基时，需用无菌的移液管或滴管。在火焰旁将移液管伸入菌种内，吸取菌液，转接到待接种的培养基内，塞好棉塞，轻摇培养基使菌体均匀分布，以利生长。

（3）培养：将已接种的斜面培养基、液体培养基置于 28℃-30℃ 培养 2 d-3 d 后观察结果。

3 实验报告

实验四 食品微生物学检验 总则

食品安全国家标准

(GB 4789.1—2010)

食品微生物学检验 总则

National food safety standard

Food microbiological examination: General guidelines

2010-03-26 发布 2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准代替 GB/T 4789.1-2008 《食品卫生微生物学检验 总则》。

本标准与 GB/T 4789.1-2008 相比，主要修改如下：

——修改了标准的中英文名称；

——修改了检验方法的选择。

本标准所代替标准的历年版本发布情况为：

——GB 4789.1-1984、GB 4789.1-1994、GB/T 4789.1-2003、GB/T 4789.1-2008。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 总则

1 范围

本标准规定了食品微生物学检验基本原则和要求。

本标准适用于食品微生物学检验。

2 规范性引用文件

本标准中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本

适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

3 实验室基本要求

3.1 环境

3.1.1 实验室环境不应影响检验结果的准确性。

3.1.2 实验室的工作区域应与办公室区域明显分开。

3.1.3 实验室工作面积和总体布局应能满足从事检验工作的需要，实验室布局应采用单方向工作流程，避免交叉污染。

3.1.4 实验室内环境的温度、湿度、照度、噪声和洁净度等应符合工作要求。

3.1.5 一般样品检验应在洁净区域[包括超净工作台或洁净实验室]进行，洁净区域应有明显的标示。

3.1.6 病原微生物分离鉴定工作应在二级生物安全实验室（Biosafety level 2, BSL-2）进行。

3.2 人员

3.2.1 检验人员应具有相应的教育、微生物专业培训经历，具备相应的资质，能够理解并正确实施检验。

3.2.2 检验人员应掌握实验室生物检验安全操作知识和消毒知识。

3.2.3 检验人员应在检验过程中保持个人整洁与卫生，防止人为污染样品。

3.2.4 检验人员应在检验过程中遵守相关预防措施的规定，保证自身安全。

3.2.5 有颜色视觉障碍的人员不能执行涉及到辨色的实验。

3.3 设备

3.3.1 实验设备应满足检验工作的需要。

3.3.2 实验设备应放置于适宜的环境条件下，便于维护、清洁、消毒与校准，并保持整洁与良好的工作状态。

3.3.3 实验设备应定期进行检查、检定（加贴标识）、维护和保养，以确保工作性能和操作

安全。

3.3.4 实验设备应有日常性监控记录和使用记录。

3.4 检验用品

3.4.1 常规检验用品主要有接种环（针）、酒精灯、镊子、剪刀、药匙、消毒棉球、硅胶（棉）塞、微量移液器、吸管、吸球、试管、平皿、微孔板、广口瓶、量筒、玻棒及 L 形玻棒等。

3.4.2 检验用品在使用前应保持清洁和/或无菌。常用的灭菌方法包括湿热法、干热法、化学法等。

3.4.3 需要灭菌的检验用品应放置在特定容器内或用合适的材料（如专用包装纸、铝箔纸等）包裹或加塞，应保证灭菌效果。

3.4.4 可选择适用于微生物检验的一次性用品来替代反复使用的物品与材料（如培养皿、吸管、吸头、试管、接种环等）。

3.4.5 检验用品的储存环境应保持干燥和清洁，已灭菌与未灭菌的用品应分开存放并明确标识。

3.4.6 灭菌检验用品应记录灭菌/消毒的温度与持续时间。

3.5 培养基和试剂

3.5.1 培养基

培养基的制备和质量控制按照 GB/T 4789.28 的规定执行。

3.5.2 试剂

检验试剂的质量及配制应适用于相关检验。对检验结果有重要影响的关键试剂应进行适用性验证。

3.6 菌株

3.6.1 应使用微生物菌种保藏专门机构或同行认可机构保存的、可溯源的标准或参考菌株。

3.6.2 应对从食品、环境或人体分离、纯化、鉴定的，未在微生物菌种保藏专门机构登记注册的原始分离菌株（野生菌株）进行系统、完整的菌株信息记录，包括分离时间、来源，表型及分子鉴定的主要特征等。

3.6.3 实验室应保存能满足实验需要的标准或参考菌株，在购入和传代保藏过程中，应进行验证试验，并进行文件化管理。

4 样品的采集

4.1 采样原则

4.1.1 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。

4.1.2 应采用随机原则进行采样，确保所采集的样品具有代表性。

4.1.3 采样过程遵循无菌操作程序，防止一切可能的污染。

4.1.4 样品在保存和运输的过程中，应采取必要的措施防止样品中原有微生物的数量变化，保持样品的原有状态。

4.2 采样方案

4.2.1 类型

采样方案分为二级和三级采样方案。二级采样方案设有 n 、 c 和 m 值，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的限量值;

M : 微生物指标的最高安全限量值。

注 1: 按照二级采样方案设定的指标, 在 n 个样品中, 允许有 $\leq c$ 个样品其相应微生物指标检验值大于 m 值。

注 2: 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 $\leq c$ 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。

例如: $n=5$, $c=2$, $m=100$ CFU/g, $M=1\ 000$ CFU/g。含义是从一批产品中采集 5 个样品, 若 5 个样品的检验结果均小于或等于 m 值 (≤ 100 CFU/g), 则这种情况是允许的; 若 ≤ 2 个样品的结果 (X) 位于 m 值和 M 值之间 (100 CFU/g $< X \leq 1\ 000$ CFU/g), 则这种情况也是允许的; 若有 3 个及以上样品的检验结果位于 m 值和 M 值之间, 则这种情况是不允许的; 若有任一样品的检验结果大于 M 值 ($> 1\ 000$ CFU/g), 则这种情况也是不允许的。

4.2.2 各类食品的采样方案

按相应产品标准中的规定执行。

4.2.3 食源性疾病及食品安全事件中食品样品的采集

4.2.3.1 由工业化批量生产加工的食品污染导致的食源性疾病或食品安全事件, 食品样品的采集和判定原则按 4.2.1 和 4.2.2 执行。同时, 确保采集现场剩余食品样品。

4.2.3.2 由餐饮单位或家庭烹调加工的食品导致的食源性疾病或食品安全事件, 食品样品的采集按 GB 14938 中卫生学检验的要求, 以满足食源性疾病或食品安全事件病因判定和病原确证的要求。

4.3 各类食品的采样方法

采样应遵循无菌操作程序, 采样工具和容器应无菌、干燥、防漏, 形状及大小适宜。

4.3.1 即食类预包装食品

取相同批次的最小零售原包装, 检验前要保持包装的完整, 避免污染。

4.3.2 非即食类预包装食品

原包装小于 500 g 的固态食品或小于 500 mL 的液态食品, 取相同批次的最小零售原包装; 大于 500 mL 的液态食品, 应在采样前摇动或用无菌棒搅拌液体, 使其达到均质后分别从相同批次的 n 个容器中采集 5 倍或以上检验单位的样品; 大于 500 g 的固态食品, 应用无菌采样器从同一包装的几个不同部位分别采取适量样品, 放入同一个无菌采样容器内, 采

样总量应满足微生物指标检验的要求。

4.3.3 散装食品或现场制作食品

根据不同食品的种类和状态及相应检验方法中规定的检验单位,用无菌采样器现场采集5倍或以上检验单位的样品,放入无菌采样容器内,采样总量应满足微生物指标检验的要求。

4.3.4 食源性疾病及食品安全事件的食品样品

采样量应满足食源性疾病诊断和食品安全事件病因判定的检验要求。

4.4 采集样品的标记

应对采集的样品进行及时、准确的记录和标记,采样人应清晰填写采样单(包括采样人、采样地点、时间、样品名称、来源、批号、数量、保存条件等信息)。

4.5 采集样品的贮存和运输

采样后,应将样品在接近原有贮存温度条件下尽快送往实验室检验。运输时应保持样品完整。如不能及时运送,应在接近原有贮存温度条件下贮存。

5 样品检验

5.1 样品处理

5.1.1 实验室接到送检样品后应认真核对登记,确保样品的相关信息完整并符合检验要求。

5.1.2 实验室应按要求尽快检验。若不能及时检验,应采取必要的措施保持样品的原有状态,防止样品中目标微生物因客观条件的干扰而发生变化。

5.1.3 冷冻食品应在 45 °C 以下不超过 15 min, 或 2 °C~5 °C 不超过 18 h 解冻后进行检验。

5.2 检验方法的选择

5.2.1 应选择现行有效的国家标准方法。

5.2.2 食品微生物检验方法标准中对同一检验项目有两个及两个以上定性检验方法时,应以常规培养方法为基准方法。

5.2.3 食品微生物检验方法标准中对同一检验项目有两个及两个以上定量检验方法时,应以平板计数法为基准方法。

6 生物安全与质量控制

6.1 实验室生物安全要求

应符合 GB 19489 的规定。

6.2 质量控制

6.2.1 实验室应定期对实验用菌株、培养基、试剂等设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

6.2.2 实验室应对重要的检验设备(特别是自动化检验仪器)设置仪器比对。

6.2.3 实验室应定期对实验人员进行技术考核和人员比对。

7 记录与报告

7.1 记录

检验过程中应即时、准确地记录观察到的现象、结果和数据等信息。

7.2 报告

实验室应按照检验方法中规定的要求，准确、客观地报告每一项检验结果。

8 检验后样品的处理

8.1 检验结果报告后，被检样品方能处理。检出致病菌的样品要经过无害化处理。

8.2 检验结果报告后，剩余样品或同批样品不进行微生物项目的复检。

实验五 食品卫生微生物学检验 菌落总数测定

食品安全国家标准

(GB 4789.2—2010)

食品微生物学检验 菌落总数测定

National food safety standard

Food microbiological examination: Aerobic plate count

前 言

本标准代替GB/T 4789.2-2008《食品卫生微生物学检验 菌落总数测定》。

本标准与GB/T 4789.2-2008相比，主要修改如下：

- 修改了标准的中英文名称；
- 修改了菌落总数计算公式中的解释；
- 修改了培养基和试剂；
- 删除了第二法 菌落总数Petrifilm™ 测试片法。

本标准的附录A是规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB 4789.2-1984、GB 4789.2-1994、GB/T 4789.2-2003、GB/T 4789.2-2008。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 菌落总数测定

1 范围

本标准规定了食品中菌落总数（Aerobic plate count）的测定方法。

本标准适用于食品中菌落总数的测定。

2 术语和定义

2.1 菌落总数 aerobic plate count

食品检样经过处理，在一定条件下（如培养基、培养温度和培养时间等）培养后，所得每g（mL）检样中形成的微生物菌落总数。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

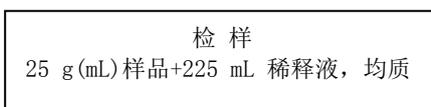
- 3.1 恒温培养箱：36 °C ± 1 °C，30 °C ± 1 °C。
- 3.2 冰箱：2 °C ~ 5 °C。
- 3.3 恒温水浴箱：46 °C ± 1 °C。
- 3.4 天平：感量为0.1 g。
- 3.5 均质器。
- 3.6 振荡器。
- 3.7 无菌吸管：1 mL（具0.01 mL 刻度）、10 mL（具0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。
- 3.8 无菌锥形瓶：容量250 mL、500 mL。
- 3.9 无菌培养皿：直径90 mm。
- 3.10 pH 计或pH 比色管或精密pH 试纸。
- 3.11 放大镜或/和菌落计数器。

4 培养基和试剂

- 4.1 平板计数琼脂培养基：见附录A 中A.1。
- 4.2 磷酸盐缓冲液：见附录A 中A.2。
- 4.3 无菌生理盐水：见附录A 中A.3。

5 检验程序

菌落总数的检验程序见图1。



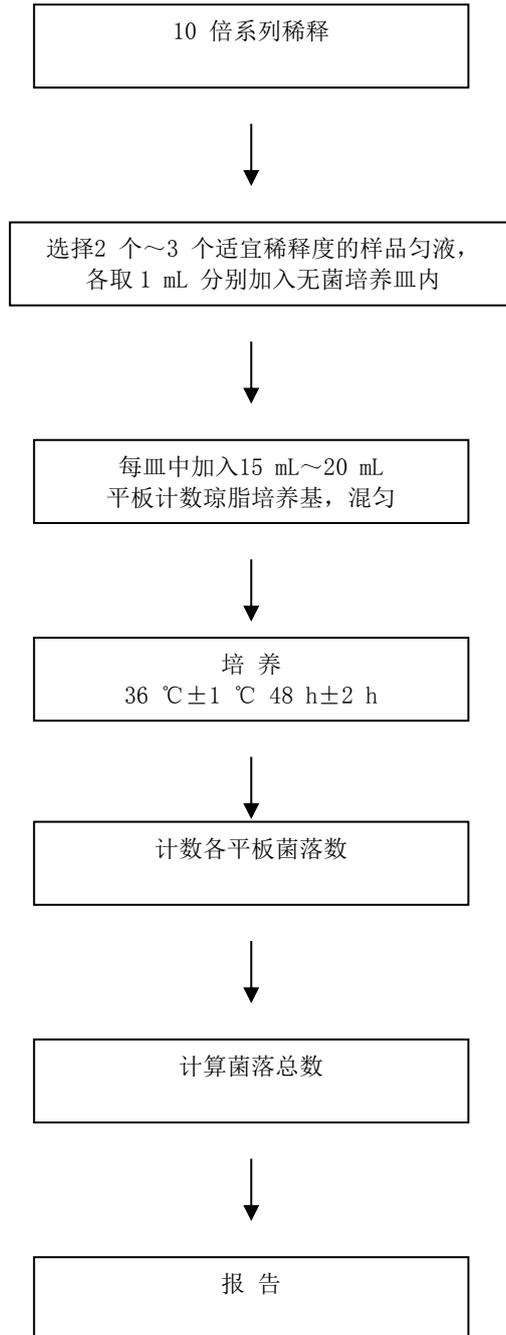


图1 菌落总数的检验程序

6 操作步骤

6.1 样品的稀释

6.1.1 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~10000 r/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。

6.1.2 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。

6.1.3 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。

6.1.4 按6.1.3 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。

6.1.5 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1 mL 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。

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

6.2 培养

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

6.2.2 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6.2.1 条件进行培养。

6.3 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（colony-forming units, CFU）表示。

6.3.1 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。

6.3.2 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。

6.3.3 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。

7 结果与报告

7.1 菌落总数的计算方法

7.1.1 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内，计算两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数，作为每g（mL）样品中菌落总数结果。

7.1.2 若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时，按公式（1）计算：

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2) d} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

实验五 食品卫生微生物学检验 菌落总数测定

N ——样品中菌落数；

ΣC ——平板（含适宜范围菌落数的平板）菌落数之和；

n_1 ——第一稀释度（低稀释倍数）平板个数；

n_2 ——第二稀释度（高稀释倍数）平板个数；

d ——稀释因子（第一稀释度）。

示例：

稀释度	1:100（第一稀释度）	1:1000（第二稀释度）
菌落数（CFU）	232, 244	33, 35

$$\begin{aligned}
 N &= \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0.1n_2) d} \\
 &= \frac{232+244+33+35}{([2+(0.1 \times 2)] \times 10^{-2})} = \frac{544}{0.022} = 24727
 \end{aligned}$$

上述数据按7.2.2数字修约后，表示为25000或 2.5×10^4 。

7.1.3 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。

7.1.4 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。

7.1.5 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。

7.1.6 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300 CFU 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。

7.2 菌落总数的报告

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

7.2.2 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。

7.2.3 若所有平板上为蔓延菌落而无法计数，则报告菌落蔓延。

7.2.4 若空白对照上有菌落生长，则此次检测结果无效。

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

附录A

(规范性附录)

培养基和试剂

A.1 平板计数琼脂 (plate count agar, PCA) 培养基

A.1.1 成分

胰蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	2.5 g
葡萄糖	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1000 mL

pH 7.0±0.2

A.1.2 制法

将上述成分加于蒸馏水中，煮沸溶解，调节pH。分装试管或锥形瓶，121 °C高压灭菌15 min。

A.2 磷酸盐缓冲液

A.2.1 成分

磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	34.0 g
蒸馏水	500 mL

pH 7.2

A.2.2 制法

贮存液：称取34.0 g的磷酸二氢钾溶于500 mL蒸馏水中，用大约175 mL的1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH，用蒸馏水稀释至1000 mL后贮存于冰箱。

稀释液：取贮存液1.25 mL，用蒸馏水稀释至1000 mL，分装于适宜容器中，121 °C高压灭菌15 min。

A.3 无菌生理盐水

A.3.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1000 mL

A.3.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1000 mL 蒸馏水中，121 °C高压灭菌 15 min。

实验六 食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定

食品安全国家标准

(GB 4789.3—2010)

食品微生物学检验 大肠菌群计数

National food safety standard

Food microbiological examination: Enumeration of coliforms

前 言

本标准代替 GB/T 4789.3-2008 《食品卫生微生物学检验 大肠菌群计数》。

本标准与 GB/T 4789.3-2008 相比，主要修改如下：

——修改了标准的中英文名称；

——“第二法 大肠菌群平板计数法”的平板菌落数的选择范围修改为“15 CFU~150 CFU”；

——删除了“第三法 大肠菌群 Petrifilm™测试片法”。

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 4789.3-1984、GB 4789.3-1994、GB /T 4789.3-2003、GB /T 4789.3-2008。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 大肠菌群计数

1 范围

本标准规定了食品中大肠菌群（Coliforms）计数的方法。

本标准适用于食品中大肠菌群的计数。

2 术语和定义

2.1 大肠菌群 coliforms

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胞杆菌。

2.2 最可能数 most probable number, MPN

基于泊松分布的一种间接计数方法。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

3.1 恒温培养箱：36 °C ± 1 °C。

3.2 冰箱：2 °C ~ 5 °C。

3.3 恒温水浴箱：46 ± 1 °C。

3.4 天平：感量 0.1 g。

3.5 均质器。

3.6 振荡器。

3.7 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。

3.8 无菌锥形瓶：容量 500 mL。

3.9 无菌培养皿：直径 90 mm。

3.10 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

3.11 菌落计数器。

4 培养基和试剂

4.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨（Lauryl Sulfate Tryptose, LST）肉汤：见附录 A 中 A.1。

4.2 煌绿乳糖胆盐（Brilliant Green Lactose Bile, BGLB）肉汤：见附录 A 中 A.2。

4.3 结晶紫中性红胆盐琼脂（Violet Red Bile Agar, VRBA）：见附录 A 中 A.3。

4.4 磷酸盐缓冲液：见附录 A 中 A.4。

4.5 无菌生理盐水：见附录 A 中 A.5。

4.6 无菌 1 mol/L NaOH：见附录 A 中 A.6。

4.7 无菌 1 mol/L HCl：见附录 A 中 A.7。

第一法 大肠菌群 MPN 计数法

5 检验程序

大肠菌群 MPN 计数的检验程序见图 1。

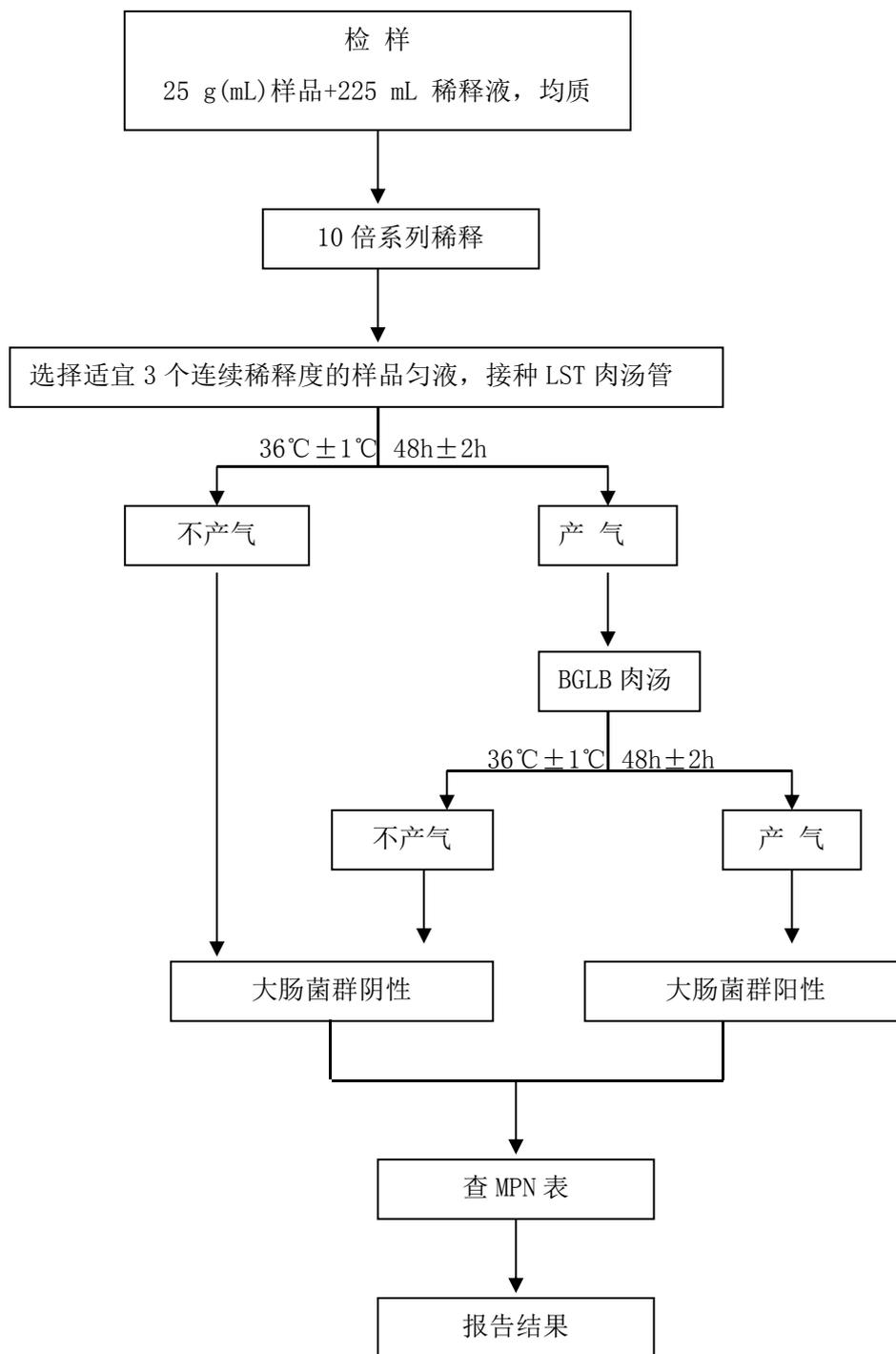


图 1 大肠菌群 MPN 计数法检验程序

6 操作步骤

6.1 样品的稀释

6.1.1 固体和半固体样品：称取 25 g 样品，放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的

实验六 食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定

无菌均质杯内，8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min，或放入盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min，制成 1:10 的样品匀液。

6.1.2 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。

6.1.3 样品匀液的 pH 值应在 6.5~7.5 之间，必要时分别用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调节。

6.1.4 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL，沿管壁缓缓注入 9 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌试管中（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 1 mL 无菌吸管反复吹打，使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

6.1.5 按上述操作，依次制成十倍递增系列稀释样品匀液。每递增稀释 1 次，换用 1 支 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 15 min。

6.2 初发酵试验

根据对样品污染状况的估计，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 1 mL（如接种量超过 1 mL，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，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。

6.3 复发酵试验

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。

6.4 大肠菌群最可能数（MPN）的报告

按 6.3 确证的大肠菌群 LST 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。

第二法 大肠菌群平板计数法

7 检验程序

大肠菌群平板计数法的检验程序见图 2。

8 操作步骤

8.1 样品的稀释

按 6.1 进行。

8.2 平板计数

8.2.1 选取 2 个~3 个适宜的连续稀释度，每个稀释度接种 2 个无菌平皿，每皿 1 mL。同时取 1 mL 生理盐水加入无菌平皿作空白对照。

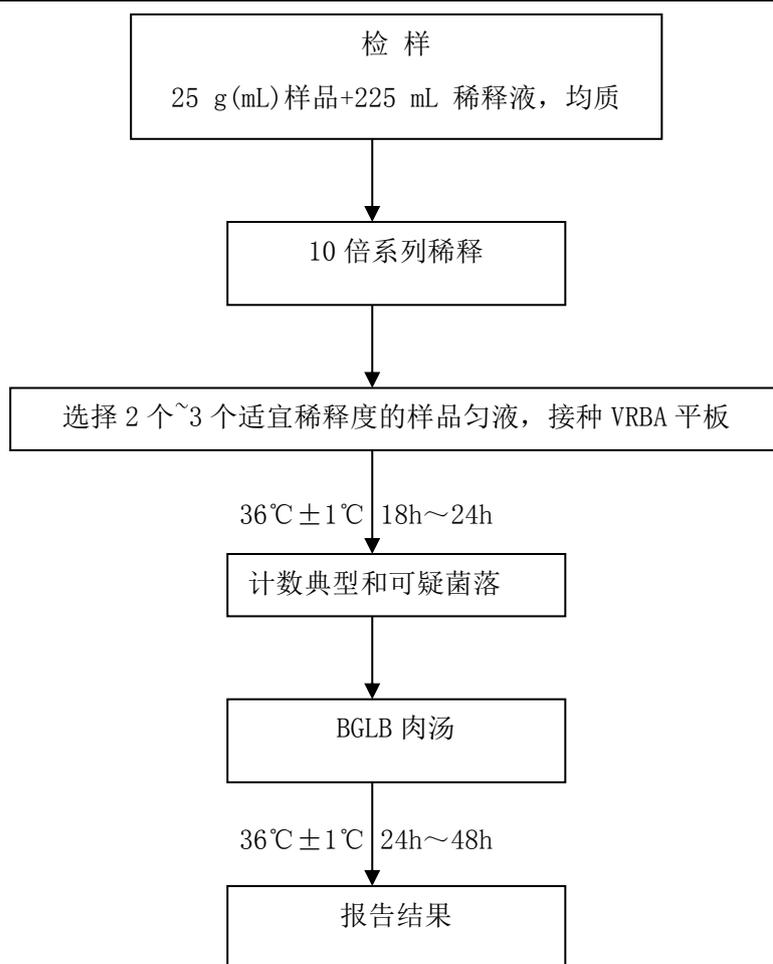


图2 大肠菌群平板计数法检验程序

8.2.2 及时将 15 mL~20 mL 冷至 46 °C 的结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA) 倾注于每个平皿中。小心旋转平皿, 将培养基与样液充分混匀, 待琼脂凝固后, 再加 3mL~4mLVRBA 覆盖平板表层。翻转平板, 置于 36°C ± 1°C 培养 18h~24h。

8.3 平板菌落数的选择

选取菌落数在 15 CFU~150 CFU 之间的平板, 分别计数平板上出现的典型和可疑大肠菌群菌落。典型菌落为紫红色, 菌落周围有红色的胆盐沉淀环, 菌落直径为 0.5 mm 或更大。

8.4 证实试验

从 VRBA 平板上挑取 10 个不同类型的典型和可疑菌落, 分别移种于 BGLB 肉汤管内, 36°C ± 1°C 培养 24h~48h, 观察产气情况。凡 BGLB 肉汤管产气, 即可报告为大肠菌群阳性。

8.5 大肠菌群平板计数的报告

经最后证实为大肠菌群阳性的试管比例乘以 8.3 中计数的平板菌落数, 再乘以稀释倍数, 即为每 g (mL) 样品中大肠菌群数。例: 10^{-4} 样品稀释液 1 mL, 在 VRBA 平板上有 100 个典型和可疑菌落, 挑取其中 10 个接种 BGLB 肉汤管, 证实有 6 个阳性管, 则该样品的大肠菌群

数为： $100 \times 6/10 \times 10^4/g (mL) = 6.0 \times 10^5 CFU/g (mL)$ 。

附录 A

(规范性附录)

培养基和试剂

A.1 月桂基硫酸盐胰蛋白胨 (LST) 肉汤

A.1.1 成分

胰蛋白胨或胰酪胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)	2.75 g
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	2.75 g
月桂基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	6.8 ± 0.2

A.1.2 制法

将上述成分溶解于蒸馏水中，调节 pH。分装到有玻璃小倒管的试管中，每管 10 mL。
121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 煌绿乳糖胆盐 (BGLB) 肉汤

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
乳糖	10.0 g
牛胆粉 (oxgall 或 oxbile) 溶液	200 mL
0.1% 煌绿水溶液	13.3 mL
蒸馏水	800 mL
pH	7.2 ± 0.1

A.2.2 制法

将蛋白胨、乳糖溶于约 500 mL 蒸馏水中，加入牛胆粉溶液 200 mL (将 20.0 g 脱水牛胆粉溶于 200 mL 蒸馏水中，调节 pH 至 7.0~7.5)，用蒸馏水稀释到 975 mL，调节 pH，再加入 0.1% 煌绿水溶液 13.3 mL，用蒸馏水补足到 1000 mL，用棉花过滤后，分装到有玻璃小倒管的试管中，每管 10 mL。121 °C 高压灭菌 15 min。

A.3 结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA)

A.3.1 成分

实验六 食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定

蛋白胨	7.0 g
酵母膏	3.0 g
乳糖	10.0 g
氯化钠	5.0 g
胆盐或 3 号胆盐	1.5 g
中性红	0.03 g
结晶紫	0.002 g
琼脂	15 g~18 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.4±0.1

A. 3.2 制法

将上述成分溶于蒸馏水中，静置几分钟，充分搅拌，调节 pH。煮沸 2 min，将培养基冷却至 45 °C~50 °C 倾注平板。使用前临时制备，不得超过 3 h。

A. 4 磷酸盐缓冲液

A. 4.1 成分

磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	34.0 g
蒸馏水	500 mL

pH 7.2

A. 4.2 制法

贮存液：称取 34.0 g 的磷酸二氢钾溶于 500 mL 蒸馏水中，用大约 175 mL 的 1 mol/L pH，用蒸馏水稀释至 1000 mL 后贮存于冰箱。

稀释液：取贮存液 1.25 mL，用蒸馏水稀释至 1000 mL，分装于适宜容器中，121°C 高压灭菌 15 min。

A. 5 无菌生理盐水

A. 5.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1000 mL

A. 5.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1000 mL 蒸馏水中，121°C 高压灭菌 15 min。

A. 6 1 mol/L NaOH

A. 6.1 成分

NaOH	40.0 g
蒸馏水	1000 mL

A. 6.2 制法

实验六 食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定

称取 40g 氢氧化钠溶于 1000 mL 蒸馏水中，121℃ 高压灭菌 15min。

A.7 1 mol/L HCl

A.7.1 成分

HCl	90 mL
蒸馏水	1000 mL

A.7.2 制法

移取浓盐酸 90 mL，用蒸馏水稀释至 1000 mL，121℃ 高压灭菌 15 min。

实验六 食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定

(规范性附录)

大肠菌群最可能数 (MPN) 检索表

B.1 大肠菌群最可能数 (MPN) 检索表

每 g (mL) 检样中大肠菌群最可能数 (MPN) 的检索见表 B.1。

表 B.1 大肠菌群最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

注1: 本表采用3个稀释度[0.1 g(mL)、0.01 g(mL)和0.001 g(mL)], 每个稀释度接种3管。

注2: 表内所列检样量如改用1g (mL)、0.1 g(mL)和0.01 g(mL)时, 表内数字应相应降低10倍; 如改用0.01 g(mL)、0.001 g(mL)、0.0001 g(mL)时, 则表内数字应相应增高10倍, 其余类推。

实验七 食品卫生微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

食品安全国家标准

(GB 4789.10—2010)

食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检

National food safety standard

Food microbiological examination: Staphylococcus aureus

前 言

本标准代替 GB/T 4789.10-2008《食品卫生微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》和 GB/T 4789.37-2008《食品卫生微生物学检验 金黄色葡萄球菌计数》。

本标准与 GB/T 4789.10-2008 和 GB/T 4789.37-2008 相比，主要修改如下：

- 修改了标准的中英文名称；
- 修改了范围；
- 规范了样品制备过程；
- 增加了计算公式中系数 1.1 的解释；
- 修改了附录 A 中胰酪胨大豆肉汤的名称，规范为 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤；
- 增加了第二法金黄色葡萄球菌 Baird-Parker 平板计数和第三法金黄色葡萄球菌 MPN 计数。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 是规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB 4789.10-84、GB 4789.10-1994、GB/T 4789.10-2003、GB/T 4789.10-2008。
- GB/T 4789.37-2008。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

1 范围

本标准规定了食品中金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）的检验方法。

本标准第一法适用于食品中金黄色葡萄球菌的定性检验；第二法适用于金黄色葡萄球菌含量较高的食品中金黄色葡萄球菌的计数；第三法适用于金黄色葡萄球菌含量较低而杂菌含量较高的食品中金黄色葡萄球菌的计数。

2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- 2.1 恒温培养箱：36 °C ± 1 °C。
- 2.2 冰箱：2 °C ~ 5 °C。
- 2.3 恒温水浴箱：37 °C ~ 65 °C。
- 2.4 天平：感量 0.1 g。
- 2.5 均质器。
- 2.6 振荡器。
- 2.7 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。
- 2.8 无菌锥形瓶：容量 100 mL、500 mL。
- 2.9 无菌培养皿：直径 90 mm。
- 2.10 注射器：0.5 mL。
- 2.11 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。

3 培养基和试剂

- 3.1 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤：见附录 A 中 A.1。
- 3.2 7.5%氯化钠肉汤：见附录 A 中 A.2。
- 3.3 血琼脂平板：见附录 A 中 A.3。
- 3.4 Baird-Parker 琼脂平板：见附录 A 中 A.4。
- 3.5 脑心浸出液肉汤(BHI)：见附录 A 中 A.5。
- 3.6 兔血浆：见附录 A 中 A.6。
- 3.7 稀释液：磷酸盐缓冲液：见附录 A 中 A.7。
- 3.8 营养琼脂小斜面：见附录 A 中 A.8。
- 3.9 革兰氏染色液：见附录 A 中 A.9。
- 3.10 无菌生理盐水：见附录 A 中 A.10。

第一法 金黄色葡萄球菌定性检验

4 检验程序

金黄色葡萄球菌定性检验程序见图 1。

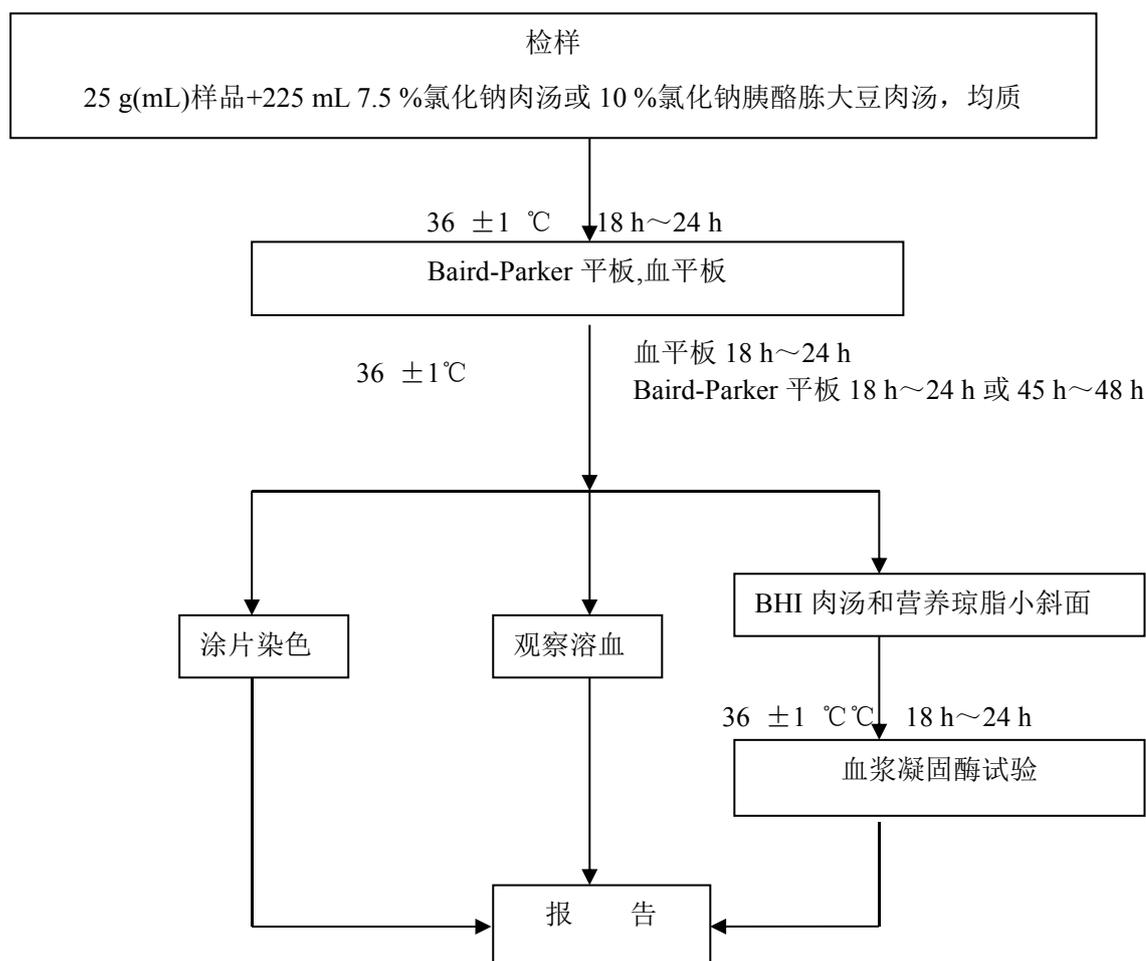


图 1 金黄色葡萄球菌检验程序

5 操作步骤

5.1 样品的处理

称取 25 g 样品至盛有 225 mL 7.5 %氯化钠肉汤或 10 %氯化钠胰酪胨大豆肉汤的无菌均质杯内，8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min，或放入盛有 225 mL 7.5 %氯化钠肉汤或 10 %氯化钠胰酪胨大豆肉汤的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min。若样品为液态，吸取 25 mL 样品至盛有 225 mL 7.5 %氯化钠肉汤或 10 %氯化钠胰酪胨大豆肉汤的无菌锥形瓶(瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠)中，振荡混匀。

5.2 增菌和分离培养

5.2.1 将上述样品匀液于 36 °C ± 1 °C 培养 18 h~24 h。金黄色葡萄球菌在 7.5%氯化钠肉汤中呈混浊生长，污染严重时在 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤内呈混浊生长。

5.2.2 将上述培养物，分别划线接种到 Baird-Parker 平板和血平板，血平板 36 °C ± 1 °C 培养 18 h~24。Baird-Parker 平板 36 °C ± 1 °C 培养 18 h~24 h 或 45 h~48 h。

实验七 食品卫生微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

5.2.3 金黄色葡萄球菌在 Baird-Parker 平板上，菌落直径为 2 mm~3 mm，颜色呈灰色到黑色，边缘为淡色，周围为一混浊带，在其外层有一透明圈。用接种针接触菌落有似奶油至树胶样的硬度，偶尔会遇到非脂肪溶解的类似菌落；但无混浊带及透明圈。长期保存的冷冻或干燥食品中所分离的菌落比典型菌落所产生的黑色较淡些，外观可能粗糙并干燥。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。挑取上述菌落进行革兰氏染色镜检及血浆凝固酶试验。

5.3 鉴定

5.3.1 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 0.5 μm ~1 μm 。

5.3.2 血浆凝固酶试验：挑取 Baird-Parker 平板或血平板上可疑菌落 1 个或以上，分别接种到 5 mL BHI 和营养琼脂小斜面，36 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

取新鲜配置兔血浆 0.5 mL，放入小试管中，再加入 BHI 培养物 0.2 mL~0.3 mL，振荡摇匀，置 36 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 温箱或水浴箱内，每半小时观察一次，观察 6 h，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 5 mL BHI，36 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~48 h，重复试验。

5.4 葡萄球菌肠毒素的检验

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。

6 结果与报告

6.1 结果判定：符合 5.2.3、5.3，可判定为金黄色葡萄球菌。

6.2 结果报告：在 25 g（mL）样品中检出或未检出金黄色葡萄球菌。

第二法 金黄色葡萄球菌 Baird-Parker 平板计数

7 检验程序

金黄色葡萄球菌平板计数程序见图 2。

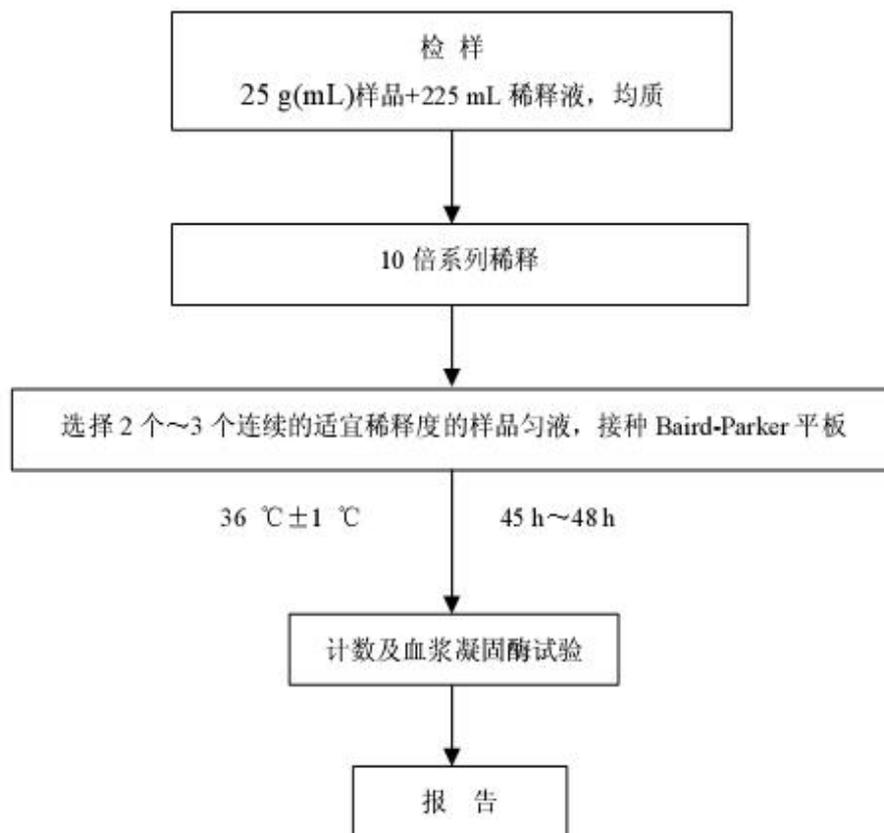


图 2 金黄色葡萄球菌 Baird-Parker 平板法检验程序

8 操作步骤

8.1 样品的稀释

8.1.1 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~10000 r/min 均质 1 min~2 min，或置盛有 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。

8.1.2 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。

8.1.3 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 1 mL 无菌吸管反复吹打使其混合均匀，制成 1:100 的样品匀液。

8.1.4 按 8.1.3 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。

8.2 样品的接种

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，每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液以 0.3 mL、0.3 mL、

0.4 mL 接种量分别加入三块 Baird-Parker 平板，然后用无菌 L 棒涂布整个平板，注意不要触及平板边缘。使用前，如 Baird-Parker 平板表面有水珠，可放在 25 °C~50 °C 的培养箱里干燥，直到平板表面的水珠消失。

8.3 培养

8.3.1 在通常情况下，涂布后，将平板静置 10 min，如样液不易吸收，可将平板放在培养箱 36 °C±1 °C 培养 1 h；等样品匀液吸收后翻转平皿，倒置于培养箱，36 °C±1 °C 培养，45 h~48 h。

8.4 典型菌落计数和确认

8.4.1 金黄色葡萄球菌在 Baird-Parker 平板上，菌落直径为 2 mm~3 mm，颜色呈灰色到黑色，边缘为淡色，周围为一混浊带，在其外层有一透明圈。用接种针接触菌落有似奶油至树胶样的硬度，偶尔会遇到非脂肪溶解的类似菌落；但无混浊带及透明圈。长期保存的冷冻或干燥食品中所分离的菌落比典型菌落所产生的黑色较淡些，外观可能粗糙并干燥。

8.4.2 选择有典型的金黄色葡萄球菌菌落的平板，且同一稀释度 3 个平板所有菌落数合计在 20 CFU~200 CFU 之间的平板，计数典型菌落数。如果：

a) 只有一个稀释度平板的菌落数在 20 CFU~200 CFU 之间且有典型菌落，计数该稀释度平板上的典型菌落；

b) 最低稀释度平板的菌落数小于 20 CFU 且有典型菌落，计数该稀释度平板上的典型菌落；

c) 某一稀释度平板的菌落数大于 200 CFU 且有典型菌落，但下一稀释度平板上没有典型菌落，应计数该稀释度平板上的典型菌落；

d) 某一稀释度平板的菌落数大于 200 CFU 且有典型菌落，且下一稀释度平板上有典型菌落，但其平板上的菌落数不在 20 CFU~200 CFU 之间，应计数该稀释度平板上的典型菌落；

以上按公式 (1) 计算。

e) 2 个连续稀释度的平板菌落数均在 20 CFU~200 CFU 之间，按公式 (2) 计算。

8.4.3 从典型菌落中任选 5 个菌落 (小于 5 个全选)，分别按 5.3.2 做血浆凝固酶试验。

9 结果计算：

公式 (1)：

$$T = \frac{AB}{Cd} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

T——样品中金黄色葡萄球菌菌落数；

A——某一稀释度典型菌落的总数；

B——某一稀释度血浆凝固酶阳性的菌落数；

C——某一稀释度用于血浆凝固酶试验的菌落数；

d——稀释因子。

公式 (2)：

$$T = \frac{A1B1/C1 + A2B2/C2}{1.1d} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

T ——样品中金黄色葡萄球菌菌落数；

A1——第一稀释度（低稀释倍数）典型菌落的总数；

A2——第二稀释度（高稀释倍数）典型菌落的总数；

B1——第一稀释度（低稀释倍数）血浆凝固酶阳性的菌落数；

B2——第二稀释度（高稀释倍数）血浆凝固酶阳性的菌落数；

C1——第一稀释度（低稀释倍数）用于血浆凝固酶试验的菌落数；

C2——第二稀释度（高稀释倍数）用于血浆凝固酶试验的菌落数；

1.1——计算系数；

d ——稀释因子（第一稀释度）。

10 结果与报告

根据 Baird-Parker 平板上金黄色葡萄球菌的典型菌落数，按 9 中公式计算，报告每 g(mL) 样品中金黄色葡萄球菌数，以 CFU/g(mL) 表示；如 T 值为 0，则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。

第三法 金黄色葡萄球菌 MPN 计数

11 检验程序

金黄色葡萄球菌 MPN 计数程序见图 3。

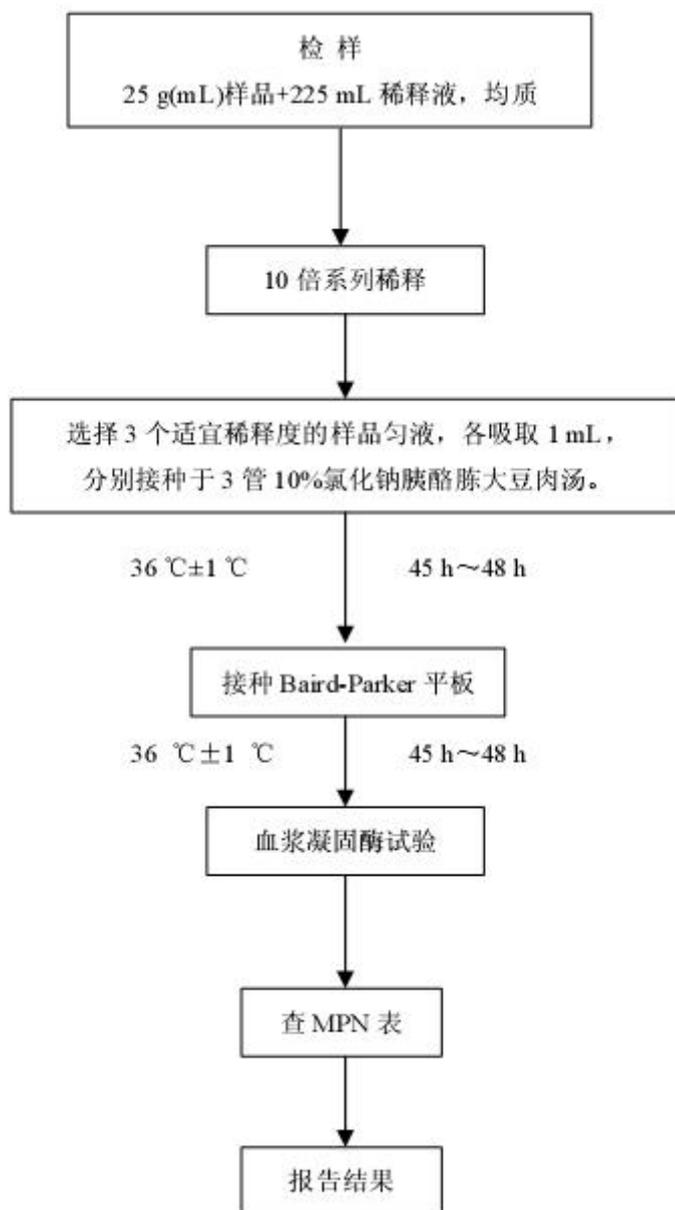


图 3 金黄色葡萄球菌 MPN 法检验程序

12 操作步骤

12.1 样品的稀释

按 8.1 进行。

12.2 接种和培养

12.2.1 根据对样品污染状况的估计, 选择 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, 每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液接种到 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤管, 每个稀释度接种 3 管, 将上述接种物于 36 °C ± 1 °C 培养 45 h ~ 48 h。

实验七 食品卫生微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

12.2.2 用接种环从有细菌生长的各管中，移取 1 环，分别接种 Baird-Parker 平板， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 45 h~48 h。

12.3 典型菌落确认

12.3.1 见 8.4.1。

12.3.2 从典型菌落中至少挑取 1 个菌落接种到 BHI 肉汤和营养琼脂斜面， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。进行血浆凝固酶试验，见 5.3.2。

13 结果与报告

计算血浆凝固酶试验阳性菌落对应的管数，查 MPN 检索表(见附录 C)，报告每 g(mL) 样品中金黄色葡萄球菌的最可能数，以 MPN/g (mL) 表示。

附录 A

(规范性附录)

培养基和试剂

A.1 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤

A.1.1 成分

胰酪胨（或胰蛋白胨）	17.0 g
植物蛋白胨（或大豆蛋白胨）	3.0 g
氯化钠	100.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
丙酮酸钠	10.0 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.3±0.2

A.1.2 制法

将上述成分混合，加热，轻轻搅拌并溶解，调节 pH，分装，每瓶 225 mL，121 °C 高压灭菌 15 min

A.2 7.5%氯化钠肉汤

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	75 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.4

A.2.2 制法

将上述成分加热溶解，调节 pH，分装，每瓶 225 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.3 血琼脂平板

A.3.1 成分

豆粉琼脂（pH7.4~7.6）	100 mL
脱纤维羊血（或兔血）	5 mL~10 mL

A.3.2 制法

加热溶化琼脂，冷却至 50 °C，以无菌操作加入脱纤维羊血，摇匀，倾注平板。

A.4 Baird—Parker 琼脂平板

A.4.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
酵母膏	1.0 g
丙酮酸钠	10.0 g
甘氨酸	12.0 g
氯化锂 (LiCl · 6H ₂ O)	5.0 g
琼脂	20.0 g
蒸馏水	950 mL
pH 7.0±0.2	

A.4.2 增菌剂的配法

30%卵黄盐水 50 mL 与经过除菌过滤的 1%亚硝酸钾溶液 10 mL 混合,保存于冰箱内。

A.4.3 制法

将各成分加到蒸馏水中,加热煮沸至完全溶解,调节 pH。分装每瓶 95 mL, 121 °C 高压灭菌 15 min。临用时加热溶化琼脂,冷至 50 °C,每 95 mL 加入预热至 50 °C 的卵黄亚硝酸钾增菌剂 5 mL 摇匀后倾注平板。培养基应是致密不透明的。使用前在冰箱储存不得超过 48 h。

A.5 脑心浸出液肉汤(BHI)

A.5.1 成分

胰蛋白质胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	2.5 g
葡萄糖	2.0 g
牛心浸出液	500 mL
pH 7.4±0.2	

A.5.2 制法

加热溶解,调节 pH,分装 16 mm×160 mm 试管,每管 5 mL 置 121 °C, 15 min 灭菌。

A.6 兔血浆

取柠檬酸钠 3.8 g,加蒸馏水 100 mL,溶解后过滤,装瓶,121 °C 高压灭菌 15 min。

兔血浆制备:取 3.8%柠檬酸钠溶液一份,加兔全血四份,混好静置 (或以 3000 r/min 离心 30 min),使血液细胞下降,即可得血浆。

A.7 磷酸盐缓冲液

A.7.1 成分:

磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	34.0 g
--	--------

实验七 食品卫生微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

蒸馏水	500 mL
-----	--------

pH 7.2

A.7.2 制法:

贮存液: 称取 34.0 g 的磷酸二氢钾溶于 500 mL 蒸馏水中, 用大约 175 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2, 用蒸馏水稀释至 1 000 mL 后贮存于冰箱。

稀释液: 取贮存液 1.25 mL, 用蒸馏水稀释至 1 000 mL, 分装于适宜容器中, 121 °C 高压灭菌 15 min。

A.8 营养琼脂小斜面

A.8.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g~20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.2~7.4

A.8.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内, 加入 15% 氢氧化钠溶液约 2 mL 调节 pH 至 7.2~7.4。加入琼脂, 加热煮沸, 使琼脂溶化, 分装 13 mm×130 mm 管, 121 °C 高压灭菌 15 min。

A.9 革兰氏染色液

A.9.1 结晶紫染色液

A.9.1.1 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.9.1.2 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.9.2 革兰氏碘液

A.9.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

A.9.2.2 制法

将碘与碘化钾先行混合, 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.9.3 沙黄复染液

A.9.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.9.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.9.4 染色法

- 涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染液，染 1 min，水洗。
- 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。
- 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。
- 滴加复染液，复染 1 min，水洗、待干、镜检。

A.10 无菌生理盐水

A.10.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.10.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中，121 °C 高压灭菌 15 min。

附录 B

(规范性附录)

葡萄球菌肠毒素检验

B.1 试剂和材料

除另有规定外，所用试剂均为分析纯，试验用水应符合 GB/T 6682 对一级水的规定。

B.1.1 A、B、C、D、E 型金黄色葡萄球菌肠毒素分型 ELISA 检测试剂盒。

B.1.2 pH 试纸，范围在 3.5~8.0，精度 0.1。

B.1.3 0.25 mol/L、pH8.0 的 Tris 缓冲液：将 121.1g 的 Tris 溶解到 800mL 的去离子水中，待温度冷至室温后，加 42 mL 浓 HCl，调 pH 值至 8.0。

B.1.4 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液：称取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.55g（或 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.62g）、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.85g（或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.73g）、NaCl 8.7g 溶于 1 000 mL 蒸馏水中，充分混匀即可。

B.1.5 庚烷。

B.1.6 10%次氯酸钠溶液。

B.1.7 肠毒素产毒培养基

B.1.7.1 成分

蛋白胨	20.0 g
胰消化酪蛋白	200 mg(氨基酸)
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
磷酸二氢钾	1.0 g
氯化钙	0.1 g
硫酸镁	0.2 g
菸酸	0.01 g
蒸馏水	1 000 mL

pH7.2~7.4

B.1.7.2 制法

将所有成分混于水中，溶解后调节 pH，121℃ 高压灭菌 30min。

B.1.8 营养琼脂

B.1.8.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g~20.0 g

蒸馏水 1 000 mL

B.1.8.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内,加入 15%氢氧化钠溶液约 2mL,校正 pH 至 7.2~7.4。加入琼脂,加热煮沸,使琼脂溶化。分装烧瓶,121℃高压灭菌 15min。

B.2 仪器和设备

B.2.1 电子天平:感量 0.01g。

B.2.2 均质器。

B.2.3 离心机:转速 3000 g~5000 g。

B.2.4 离心管:50 mL。

B.2.5 滤器:滤膜孔径 0.2 μm。

B.2.6 微量加样器:20 μL~200 μL、200 μL~1000 μL。

B.2.7 微量多通道加样器:50 μL~300 μL。

B.2.8 自动洗板机(可选择使用)。

B.2.9 酶标仪:波长 450 nm。

B.3 原理

本方法可用 A、B、C、D、E 型金黄色葡萄球菌肠毒素分型酶联免疫吸附试剂盒完成。本方法测定的基础是酶联免疫吸附反应(ELISA)。96 孔酶标板的每一个微孔条的 A~E 孔分别包被了 A、B、C、D、E 型葡萄球菌肠毒素抗体, H 孔为阳性质控,已包被混合型葡萄球菌肠毒素抗体, F 和 G 孔为阴性质控,包被了非免疫动物的抗体。样品中如果有葡萄球菌肠毒素,游离的葡萄球菌肠毒素则与各微孔中包被的特定抗体结合,形成抗原抗体复合物,其余未结合的成分在洗板过程中被洗掉;抗原抗体复合物再与过氧化物酶标记物(二抗)结合,未结合上的酶标记物在洗板过程中被洗掉;加入酶底物和显色剂并孵育,酶标记物上的酶催化底物分解,使无色的显色剂变为蓝色;加入反应终止液可使颜色由蓝变黄,并终止了酶反应;以 450 nm 波长的酶标仪测量微孔溶液的吸光度值,样品中的葡萄球菌肠毒素与吸光度值成正比。

B.4 检测步骤

B.4.1 从分离菌株培养物中检测葡萄球菌肠毒素方法

待测菌株接种营养琼脂斜面(试管 18 mm×180 mm)37℃培养 24 h,用 5 mL 生理盐水洗下菌落,倾入 60 mL 产毒培养基中,每个菌种接种一瓶,37℃振荡培养 48 h,振速为 100 次/min,吸出菌液离心,8000 r/min 20 min,加热 100℃,10 min,取上清液,取 100 μL 稀释后的样液进行试验。

B.4.2 从食品中提取和检测葡萄球菌毒素方法

B.4.2.1 乳和乳粉

将 25 g 乳粉溶解到 125 mL、0.25 mol/L、pH8.0 的 Tris 缓冲液中,混匀后同液体乳

一样按以下步骤制备。将乳于 15 °C，3500 g 离心 10 min。将表面形成的一层脂肪层移走，变成脱脂乳。用蒸馏水对其进行稀释（1：20）。取 100 μL 稀释后的样液进行试验。

B.4.2.2 脂肪含量不超过 40%的食品

称取 10 g 样品绞碎，加入 pH7.4 的 PBS 液 15 mL 进行均质。振摇 15 min。于 15 °C，3500g 离心 10 min。必要时，移去上面脂肪层。取上清液进行过滤除菌。取 100 μL 的滤出液进行试验。

B.4.2.3 脂肪含量超过 40%的食品

称取 10 g 样品绞碎，加入 pH7.4 的 PBS 液 15 mL 进行均质。振摇 15 min。于 15 °C，3500 g 离心 10 min。吸取 5 mL 上层悬浮液，转移到另外一个离心管中，再加入 5 mL 的庚烷，充分混匀 5 min。于 15 °C，3500 g 离心 5 min。将上部有机相（庚烷层）全部弃去，注意该过程中不要残留庚烷。将下部水相层进行过滤除菌。取 100 μL 的滤出液进行试验。

B.4.2.4 其它食品可酌情参考上述食品处理方法。

B.4.3 检测

B.4.3.1 所有操作均应在室温（20 °C~25 °C）下进行，A、B、C、D、E 型金黄色葡萄球菌肠毒素分型 ELISA 检测试剂盒中所有试剂的温度均应回升至室温方可使用。测定中吸取不同的试剂和样品溶液时应更换吸头，用过的吸头以及废液要浸泡到 10 %次氯酸钠溶液中过夜。

B.4.3.2 将所需数量的微孔条插入框架中（一个样品需要一个微孔条）。将样品液加入微孔条的 A~G 孔，每孔 100 μL。H 孔加 100 μL 的阳性对照，用手轻拍微孔板充分混匀，用粘胶纸封住微孔以防溶液挥发，置室温下孵育 1 h。

B.4.3.3 将孔中液体倾倒至含 10 %次氯酸钠溶液的容器中，并在吸水纸上拍打几次以确保孔内不残留液体。每孔用多通道加样器注入 250 μL 的洗液，再倾倒掉并在吸水纸上拍干。重复以上洗板操作 4 次。

本步骤也可由自动洗板机完成。

B.4.3.4 每孔加入 100 μL 的酶标抗体，用手轻拍微孔板充分混匀，置室温下孵育 1 h。

B.4.3.5 重复 B.4.3.3 的洗板程序。

B.4.3.6 加 50 μL 的 TMB 底物和 50 μL 的发色剂至每个微孔中，轻拍混匀，室温黑暗避光处孵育 30 min。

B.4.3.7 加入 100 μL 的 2 mol/L 硫酸终止液，轻拍混匀，30 min 内用酶标仪在 450 nm 波长条件下测量每个微孔溶液的 OD 值。

B.4.4 结果的计算和表述

B.4.4.1 质量控制

测试结果阳性质控的 OD 值要大于 0.5，阴性质控的 OD 值要小于 0.3，如果不能同时

满足以上要求，测试的结果不被认可。对阳性结果要排除内源性过氧化物酶的干扰。

B.4.4.2 临界值的计算

每一个微孔条的 F 孔和 G 孔为阴性质控，两个阴性质控 OD 值的平均值加上 0.15 为临界值。

示例：阴性质控 1=0.08

阴性质控 2=0.10

平均值=0.09

临界值=0.09+0.15=0.24

B.4.4.3 结果表述

OD 值小于临界值的样品孔判为阴性，表述为样品中未检出某型金黄色葡萄球菌肠毒素；OD 值大于或等于临界值的样品孔判为阳性，表述为样品中检出某型金黄色葡萄球菌肠毒素。

B.5 生物安全

因样品中不排除有其它潜在的传染性物质存在，所以要严格按照 GB19489 对废弃物进行处理。

附录 C

(规范性附录)

金黄色葡萄球菌最可能数 (MPN) 检索表

C.1 金黄色葡萄球菌最可能数 (MPN) 的检索见表

每 g(mL) 检样中金黄色葡萄球菌最可能数 (MPN) 的检索见表 C.1。

表C.1 金黄色葡萄球菌最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN	95%置信区间		阳性管数			MPN	95%置信区间	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

注 1: 本表采用 3 个稀释度[0.1 g(mL)、0.01 g(mL)和 0.001 g(mL)]、每个稀释度接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1 g (mL)、0.1 g(mL)和 0.01 g(mL)时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 0.01 g(mL)、0.001 g(mL)、0.0001 g(mL)时, 则表内数字应相应增高 10 倍, 其余类推。

实验八 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

食品安全国家标准

(GB 4789.4—2010)

食品微生物学检验 沙门氏菌检验

National food safety standard

Food microbiological examination: Salmonella

前 言

本标准代替 GB/T 4789.4-2008《食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.4-2008 相比，主要变化如下：

- 修改了标准的中英文名称；
- 修改了标准的范围；
- 修改了培养基和试剂；
- 修改了设备和材料；
- 修改了附录 A。

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准所代替的历次版本发布情况为：

- GB 4789.4-84、GB 4789.4-1994、GB/T 4789.4-2003、GB/T 4789.4-2008。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 沙门氏菌检验

1 范围

本标准规定了食品中沙门氏菌（*Salmonella*）的检验方法。

本标准适用于食品中沙门氏菌的检验。

2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- 2.1 冰箱：2℃～5℃。
- 2.2 恒温培养箱：36℃±1℃，42℃±1℃。
- 2.3 均质器。
- 2.4 振荡器。
- 2.5 电子天平：感量 0.1 g。
- 2.6 无菌锥形瓶：容量 500 mL，250 mL。
- 2.7 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。
- 2.8 无菌培养皿：直径 90 mm。
- 2.9 无菌试管：3 mm×50 mm、10 mm×75 mm。
- 2.10 无菌毛细管。
- 2.11 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。
- 2.12 全自动微生物生化鉴定系统。

3 培养基和试剂

- 3.1 缓冲蛋白胨水（BPW）：见附录 A 中 A.1。
- 3.2 四硫磺酸钠煌绿（TTB）增菌液：见附录 A 中 A.2。
- 3.3 亚硒酸盐胱氨酸（SC）增菌液：见附录 A 中 A.3。
- 3.4 亚硫酸铋（BS）琼脂：见附录 A 中 A.4。
- 3.5 HE 琼脂：见附录 A 中 A.5。
- 3.6 木糖赖氨酸脱氧胆盐（XLD）琼脂：见附录 A 中 A.6。
- 3.7 沙门氏菌属显色培养基。
- 3.8 三糖铁（TSI）琼脂：见附录 A 中 A.7。
- 3.9 蛋白胨水、靛基质试剂：见附录 A 中 A.8。
- 3.10 尿素琼脂（pH 7.2）：见附录 A 中 A.9。
- 3.11 氰化钾（KCN）培养基：见附录 A 中 A.10。
- 3.12 赖氨酸脱羧酶试验培养基：见附录 A 中 A.11。
- 3.13 糖发酵管：见附录 A 中 A.12。
- 3.14 邻硝基酚 β-D 半乳糖苷（ONPG）培养基：见附录 A 中 A.13。

实验八 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

- 3.15 半固体琼脂：见附录 A 中 A.14。
- 3.16 丙二酸钠培养基：见附录 A 中 A.15。
- 3.17 沙门氏菌 O 和 H 诊断血清。
- 3.18 生化鉴定试剂盒。

4 检验程序

沙门氏菌检验程序见图 1。

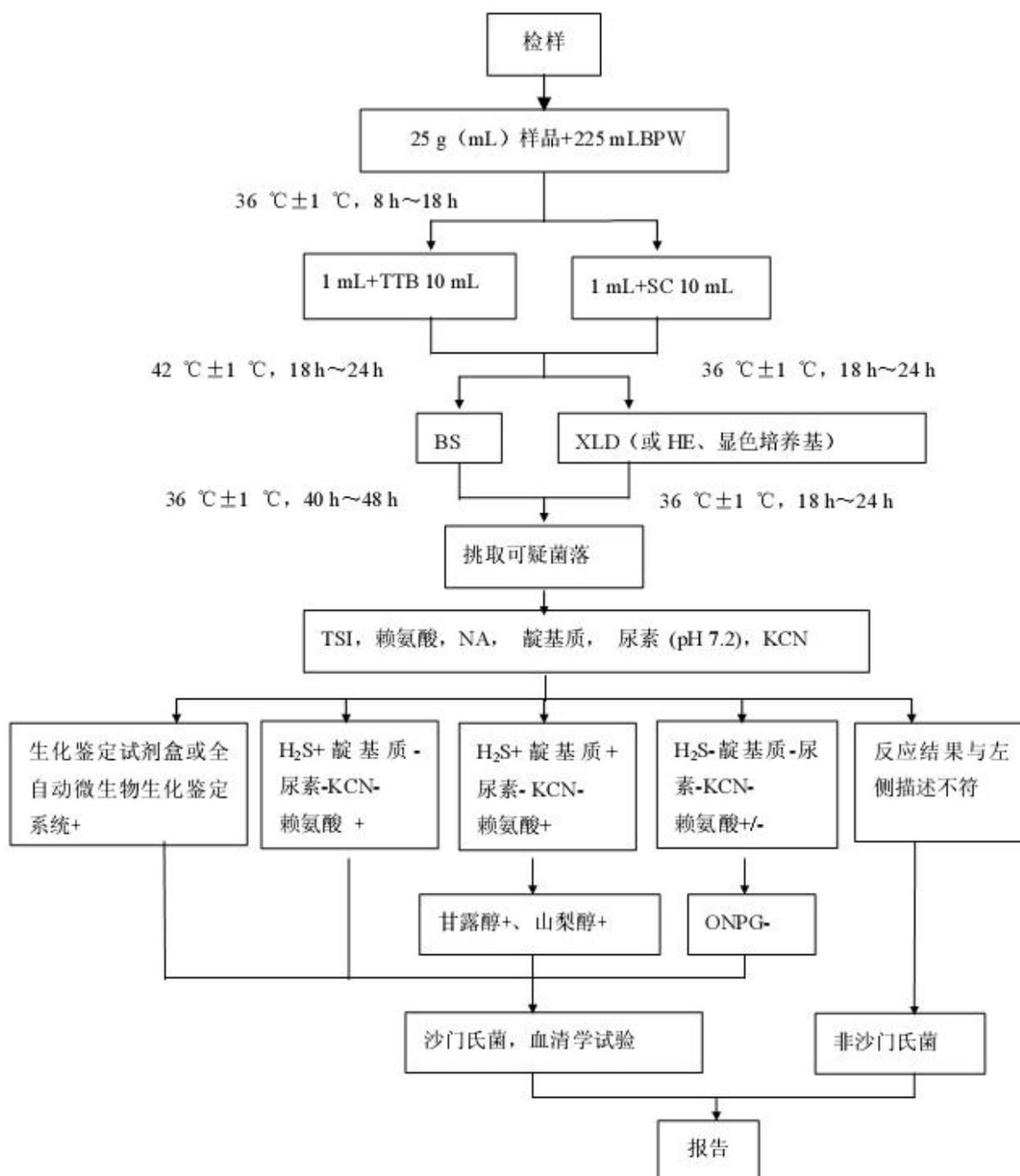


图 1 沙门氏菌检验程序

5 操作步骤

5.1 前增菌

称取 25 g (mL) 样品放入盛有 225 mL BPW 的无菌均质杯中, 以 8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min, 或置于盛有 225 mL BPW 的无菌均质袋中, 用拍击式均质器拍打 1 min~2 min。若样品为液态, 不需要均质, 振荡混匀。如需测定 pH 值, 用 1 mol/mL 无菌 NaOH 或 HCl 调 pH 至 6.8 ± 0.2 。无菌操作将样品转至 500 mL 锥形瓶中, 如使用均质袋, 可直接进行培养, 于 $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 8 h~18h。

如为冷冻产品, 应在 $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下不超过 15 min, 或 $2 \text{ }^{\circ}\text{C} \sim 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 不超过 18 h 解冻。

5.2 增菌

轻轻摇动培养过的样品混合物, 移取 1 mL, 转种于 10 mL TTB 内, 于 $42 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24

h。同时, 另取 1 mL, 转种于 10 mL SC 内, 于 $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

5.3 分离

分别用接种环取增菌液 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 $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 分别培养 18 h~24 h (XLD 琼脂平板、HE 琼脂平板、沙门氏菌属显色培养基平板) 或 40 h~48 h (BS 琼脂平板), 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。

表 1 沙门氏菌属在不同选择性琼脂平板上的菌落特征

选择性琼脂平板	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。

5.4 生化试验

5.4.1 自选择性琼脂平板上分别挑取 2 个以上典型或可疑菌落, 接种三糖铁琼脂, 先在斜面划线, 再于底层穿刺; 接种针不要灭菌, 直接接种赖氨酸脱羧酶试验培养基和营养琼脂平板, 于 $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h, 必要时可延长至 48 h。在三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基内, 沙门氏菌属的反应结果见表 2。

实验八 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

表 2 沙门氏菌属在三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基内的反应结果

三糖铁琼脂				赖氨酸脱羧酶试验培养基	初步判断
斜面	底层	产气	硫化氢		
K	A	+(—)	+ (—)	+	可疑沙门氏菌属
K	A	+(—)	+ (—)	—	可疑沙门氏菌属
A	A	+(—)	+ (—)	+	可疑沙门氏菌属
A	A	+/-	+/-	—	非沙门氏菌
K	K	+/-	+/-	+/-	非沙门氏菌

注：K：产碱，A：产酸；+：阳性，—：阴性；+(—)：多数阳性，少数阴性；+/-：阳性或阴性。

5.4.2 接种三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基的同时，可直接接种蛋白胨水（供做靛基质试验）、尿素琼脂（pH7.2）、氰化钾（KCN）培养基，也可在初步判断结果后从营养琼脂平板上挑取可疑菌落接种。于 36℃±1℃培养 18h~24h，必要时可延长至 48h，按表 3 判定结果。将已挑菌落的平板储存于 2℃~5℃或室温至少保留 24h，以备必要时复查。

表 3 沙门氏菌属生化反应初步鉴别表

反应序号	硫化氢 (H ₂ S)	靛基质	pH7.2 尿素	氰化钾 (KCN)	赖氨酸脱羧酶
A1	+	—	—	—	+
A2	+	+	—	—	+
A3	—	—	—	—	+/-

注：+阳性；—阴性；+/-阳性或阴性。

5.4.2.1 反应序号 A1：典型反应判定为沙门氏菌属。如尿素、KCN 和赖氨酸脱羧酶 3 项中有 1 项异常，按表 4 可判定为沙门氏菌。如有 2 项异常为非沙门氏菌。

表 4 沙门氏菌属生化反应初步鉴别表

pH7.2 尿素	氰化钾 (KCN)	赖氨酸脱羧酶	判定结果
—	—	—	甲型副伤寒沙门氏菌（要求血清学鉴定结果）
—	+	+	沙门氏菌Ⅳ或Ⅴ（要求符合本群生化特性）
+	—	+	沙门氏菌个别变体（要求血清学鉴定结果）

注：+表示阳性；—表示阴性

5.4.2.2 反应序号 A2：补做甘露醇和山梨醇试验，沙门氏菌靛基质阳性变体两项试验结果均为阳性，但需要结合血清学鉴定结果进行判定。

5.4.2.3 反应序号 A3：补做 ONPG。ONPG 阴性为沙门氏菌，同时赖氨酸脱羧酶阳性，甲型副伤寒沙门氏菌为赖氨酸脱羧酶阴性。

5.4.2.4 必要时按表 5 进行沙门氏菌生化群的鉴别。

表 5 沙门氏菌属各生化群的鉴别

项目	I	II	III	IV	V	VI
卫矛醇	+	+	-	-	+	-
山梨醇	+	+	+	+	+	-
水杨苷	-	-	-	+	-	-
ONPG	-	-	+	-	+	-
丙二酸盐	-	+	+	-	-	-
KCN	-	-	-	+	+	-

注：+表示阳性；-表示阴性。

5.4.3 如选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统，可根据 **5.4.1** 的初步判断结果，从营养琼脂平板上挑取可疑菌落，用生理盐水制备成浊度适当的菌悬液，使用生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定。

5.5 血清学鉴定

5.5.1 抗原的准备

一般采用 1.2%~1.5%琼脂培养物作为玻片凝集试验用的抗原。

O 血清不凝集时，将菌株接种在琼脂量较高的（如 2%~3%）培养基上再检查；如果是由于 Vi 抗原的存在而阻止了 O 凝集反应时，可挑取菌苔于 1 mL 生理盐水中做成浓菌液，于酒精灯火焰上煮沸后再检查。H 抗原发育不良时，将菌株接种在 0.55%~0.65%半固体琼脂平板的中央，俟菌落蔓延生长时，在其边缘部分取菌检查；或将菌株通过装有 0.3%~0.4%半固体琼脂的小玻管 1 次~2 次，自远端取菌培养后再检查。

5.5.2 多价菌体抗原（O）鉴定

在玻片上划出 2 个约 1 cm×2 cm 的区域，挑取 1 环待测菌，各放 1/2 环于玻片上的每一区域上部，在其中一个区域下部加 1 滴多价菌体（O）抗血清，在另一区域下部加入 1 滴生理盐水，作为对照。再用无菌的接种环或针分别将两个区域内的菌落研成乳状液。将玻片倾斜摇动混合 1 min，并对着黑暗背景进行观察，任何程度的凝集现象皆为阳性反应。

5.5.3 多价鞭毛抗原（H）鉴定

同 5.5.2。

5.5.4 血清学分型（选做项目）

5.5.4.1 O 抗原的鉴定

用 A~F 多价 O 血清做玻片凝集试验，同时用生理盐水做对照。在生理盐水中自凝者为粗糙形菌株，不能分型。

被 A~F 多价 O 血清凝集者，依次用 O4；O3、O10；O7；O8；O9；O2 和 O11 因

实验八 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

子血清做凝集试验。根据试验结果，判定 O 群。被 O3、O10 血清凝集的菌株，再用 O10、O15、O34、O19 单因子血清做凝集试验，判定 E1、E2、E3、E4 各亚群，每一个 O 抗原成分的最后确定均应根据 O 单因子血清的检查结果，没有 O 单因子血清的要两个 O 复合因子血清进行核对。

不被 A~F 多价 O 血清凝集者，先用 9 种多价 O 血清检查，如有其中一种血清凝集，则用这种血清所包括的 O 群血清逐一检查，以确定 O 群。每种多价 O 血清所包括的 O 因子如下：

O 多价 1 A, B, C, D, E, F, 群 (并包括 6, 14 群)

O 多价 2 13, 16, 17, 18, 21 群

O 多价 3 28, 30, 35, 38, 39 群

O 多价 4 40, 41, 42, 43 群

O 多价 5 44, 45, 47, 48 群

O 多价 6 50, 51, 52, 53 群

O 多价 7 55, 56, 57, 58 群

O 多价 8 59, 60, 61, 62 群

O 多价 9 63, 65, 66, 67 群

5.5.4.2 H 抗原的鉴定

属于 A~F 各 O 群的常见菌型，依次用表 6 所述 H 因子血清检查第 1 相和第 2 相的 H 抗原。

表 6 A~F 群常见菌型 H 抗原表

O 群	第 1 相	第 2 相
A	a	无
B	g, f, s	无
B	i, b, d	2
C1	k, v, r, c	5, z15
C2	b, d, r	2, 5
D (不产气的)	d	无
D (产气的)	g, m, p, q	无
E1	h, v	6, w, x
E4	g, s, t	无
E4	i	

不常见的菌型，先用 8 种多价 H 血清检查，如有其中一种或两种血清凝集，则再用这一种或两种血清所包括的各种 H 因子血清逐一检查，以第 1 相和第 2 项的 H 抗原。8 种多价 H 血清所包括的 H 因子如下：

H 多价 1 a, b, c, d, i

实验八 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

H 多价 2	eh, enx, enz15, fg, gms, gpu, gp, gq, mt, gz51
H 多价 3	k, r, y, z, z10, lv, lw, lz13, lz28, lz40
H 多价 4	1, 2; 1, 5; 1, 6; 1, 7; z6
H 多价 5	z4z23, z4z24, z4z32, z29, z35, z36, z38
H 多价 6	z39, z41, z42, z44
H 多价 7	z52, z53, z54, z55
H 多价 8	z56, z57, z60, z61, z62

每一个 H 抗原成分的最后确定均应根据 H 单因子血清的检查结果, 没有 H 单因子血清的要两个 H 复合因子血清进行核对。

检出第 1 相 H 抗原而未检出第 2 相 H 抗原的或检出第 2 相 H 抗原而未检出第 1 相 H 抗原的, 可在琼脂斜面上移种 1~2 代后再检查。如仍只检出一个相的 H 抗原, 要用位相变异的方法检查其另一个相。单相菌不必做位相变异检查。

位相变异试验方法如下:

小玻管法: 将半固体管 (每管约 1 mL~2 mL) 在酒精灯上溶化并冷至 50 °C, 取已知相的 H 因子血清 0.05 mL~0.1 mL, 加入于溶化的半固体内, 混匀后, 用毛细吸管吸取分装于供位相变异试验的小玻管内, 俟凝固后, 用接种针挑取待检菌, 接种于一端。将小玻管平放在平皿内, 并在其旁放一团湿棉花, 以防琼脂中水分蒸发而干缩, 每天检查结果, 待另一相细菌解离后, 可以从另一端挑取细菌进行检查。培养基内血清的浓度应有适当的比例, 过高时细菌不能生长, 过低时同一相细菌的动力不能抑制。一般按原血清 1:200~1:800 的量加入。

小倒管法: 将两端开口的小玻管 (下端开口要留一个缺口, 不要平齐) 放在半固体管内, 小玻管的上端应高出于培养基的表面, 灭菌后备用。临用时在酒精灯上加热溶化, 冷至 50 °C, 挑取因子血清 1 环, 加入小套管中的半固体内, 略加搅动, 使其混匀, 俟凝固后, 将待检菌株接种于小套管中的半固体表层内, 每天检查结果, 待另一相细菌解离后, 可从套管外的半固体表面取菌检查, 或转种 1% 软琼脂斜面, 于 37 °C 培养后再做凝集试验。

简易平板法: 将 0.35%~0.4% 半固体琼脂平板烘干表面水分, 挑取因子血清 1 环, 滴在半固体平板表面, 放置片刻, 待血清吸收到琼脂内, 在血清部位的中央点种待检菌株, 培养后, 在形成蔓延生长的菌苔边缘取菌检查。

5.5.4.3 Vi 抗原的鉴定

用 Vi 因子血清检查。已知具有 Vi 抗原的菌型有: 伤寒沙门氏菌, 丙型副伤寒沙门氏菌, 都柏林沙门氏菌。

5.5.4.4 菌型的判定

根据血清学分型鉴定的结果, 按照附录 B 或有关沙门氏菌属抗原表判定菌型。

6 结果与报告

实验八 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

综合以上生化试验和血清学鉴定的结果, 报告 25 g (mL) 样品中检出或未检出沙门氏菌。

附录 A

(规范性附录)

培养基和试剂

A.1 缓冲蛋白胨水 (BPW)

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠 (含 12 个结晶水)	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1000 mL

pH 7.2±0.2

A.1.2 制法

将各成分加入蒸馏水中, 搅混均匀, 静置约 10 min, 煮沸溶解, 调节 pH, 高压灭菌 121 °C, 15min。

A.2 四硫磺酸钠煌绿 (TTB) 增菌液

A.2.1 基础液

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	3.0 g
碳酸钙	45.0 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.0±0.2

除碳酸钙外, 将各成分加入蒸馏水中, 煮沸溶解, 再加入碳酸钙, 调节 pH, 高压灭菌 121 °C, 20 min。

A.2.2 硫代硫酸钠溶液

硫代硫酸钠 (含 5 个结晶水)	50.0 g
蒸馏水	加至 100 mL

高压灭菌 121 °C, 20 min。

A.2.3 碘溶液

碘片	20.0 g
碘化钾	25.0 g
蒸馏水	加至 100 mL

将碘化钾充分溶解于少量的蒸馏水中, 再投入碘片, 振摇玻瓶至碘片全部溶解为止, 然

实验八 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

后加蒸馏水至规定的总量，贮存于棕色瓶内，塞紧瓶盖备用。

A.2.4 0.5%煌绿水溶液

煌绿	0.5 g
蒸馏水	100 mL

溶解后，存放暗处，不少于 1d，使其自然灭菌。

A.2.5 牛胆盐溶液

牛胆盐	10.0 g
蒸馏水	100 mL

加热煮沸至完全溶解，高压灭菌 121 °C，20 min。

A.2.6 制法

基础液	900 mL
硫代硫酸钠溶液	100 mL
碘溶液	20.0 mL
煌绿水溶液	2.0 mL
牛胆盐溶液	50.0 mL

临用前，按上列顺序，以无菌操作依次加入基础液中，每加入一种成分，均应摇匀后再加入另一种成分。

A.3 亚硒酸盐胱氨酸（SC）增菌液

A.3.1 成分

蛋白胨	5.0 g
乳糖	4.0 g
磷酸氢二钠	10.0 g
亚硒酸氢钠	4.0 g
L-胱氨酸	0.01 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.0±0.2

A.3.2 制法

除亚硒酸氢钠和 L-胱氨酸外，将各成分加入蒸馏水中，煮沸溶解，冷至 55 °C 以下，以无菌操作加入亚硒酸氢钠和 1 g/L L-胱氨酸溶液 10 mL（称取 0.1 g L-胱氨酸，加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 15 mL，使溶解，再加无菌蒸馏水至 100 mL 即成，如为 DL-胱氨酸，用量应加倍）。摇匀，调节 pH。

A.4 亚硫酸铋（BS）琼脂

A.4.1 成分

蛋白胨	10.0 g
-----	--------

实验八 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

牛肉膏	5.0 g
葡萄糖	5.0 g
硫酸亚铁	0.3 g
磷酸氢二钠	4.0 g
煌 绿 0.025 g 或 5.0g / L 水溶液	5.0mL
柠檬酸铋铵	2.0 g
亚硫酸钠	6.0 g
琼 脂	18.0 g~20 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.5±0.2

A.4.2 制法

将前三种成分加入 300 mL 蒸馏水（制作基础液），硫酸亚铁和磷酸氢二钠分别加入 20 mL 和 30 mL 蒸馏水中，柠檬酸铋铵和亚硫酸钠分别加入另一 20 mL 和 30 mL 蒸馏水中，琼脂加入 600 mL 蒸馏水中。然后分别搅拌均匀，煮沸溶解。冷至 80 °C 左右时，先将硫酸亚铁和磷酸氢二钠混匀，倒入基础液中，混匀。将柠檬酸铋铵和亚硫酸钠混匀，倒入基础液中，再混匀。调节 pH，随即倾入琼脂液中，混合均匀，冷至 50°C~55°C。加入煌绿溶液，充分混匀后立即倾注平皿。

注：本培养基不需要高压灭菌，在制备过程中不宜过分加热，避免降低其选择性，贮于室温暗处，超过 48 h 会降低其选择性，本培养基宜于当天制备，第二天使用。

A.5 HE 琼脂（Hektoen Enteric Agar）

A.5.1 成分

蛋白胨	12.0 g
牛肉膏	3.0 g
乳糖	12.0 g
蔗糖	12.0 g
水杨素	2.0 g
胆盐	20.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	18.0 g~20.0 g
蒸馏水	1 000 mL
0.4% 溴麝香草酚蓝溶液	16.0 mL
Andrade 指示剂	20.0 mL
甲液	20.0 mL
乙液	20.0 mL

pH 7.5±0.2

A.5.2 制法

将前面七种成分溶解于 400 mL 蒸馏水内作为基础液;将琼脂加入于 600 mL 蒸馏水内。然后分别搅拌均匀,煮沸溶解。加入甲液和乙液于基础液内,调节 pH。再加入指示剂,并与琼脂液合并,待冷至 50 °C~55 °C 倾注平皿。

注:①本培养基不需要高压灭菌,在制备过程中不宜过分加热,避免降低其选择性。

②甲液的配制

硫代硫酸钠	34.0 g
柠檬酸铁铵	4.0 g
蒸馏水	100 mL

③乙液的配制

去氧胆酸钠	10.0 g
蒸馏水	100 mL

④ Andrade 指示剂

酸性复红	0.5 g
1mol/L 氢氧化钠溶液	16.0 mL
蒸馏水	100 mL

将复红溶解于蒸馏水中,加入氢氧化钠溶液。数小时后如复红褪色不全,再加氢氧化钠溶液 1mL~2 mL。

A.6 木糖赖氨酸脱氧胆盐 (XLD) 琼脂

A.6.1 成分

酵母膏	3.0 g
L-赖氨酸	5.0 g
木糖	3.75 g
乳糖	7.5 g
蔗糖	7.5 g
去氧胆酸钠	2.5 g
柠檬酸铁铵	0.8 g
硫代硫酸钠	6.8 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
酚红	0.08 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.4±0.2

A.6.2 制法

除酚红和琼脂外，将其他成分加入 400 mL 蒸馏水中，煮沸溶解，调节 pH。另将琼脂加入 600 mL 蒸馏水中，煮沸溶解。

将上述两溶液混合均匀后，再加入指示剂，待冷至 50 °C~55 °C 倾注平皿。

注:本培养基不需要高压灭菌，在制备过程中不宜过分加热，避免降低其选择性，贮于室温暗处。本培养基宜于当天制备，第二天使用。

A.7 三糖铁 (TSI) 琼脂

A.7.1 成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉膏	5.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
硫酸亚铁铵 (含 6 个结晶水)	0.2 g
酚红 0.025 g 或 5.0 g/L 溶液	5.0 mL
氯化钠	5.0 g
硫代硫酸钠	0.2 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1000 mL

pH 7.4±0.2

A.7.2 制法

除酚红和琼脂外，将其他成分加入 400 mL 蒸馏水中，煮沸溶解，调节 pH。另将琼脂加入 600 mL 蒸馏水中，煮沸溶解。

将上述两溶液混合均匀后，再加入指示剂，混匀，分装试管，每管约 2 mL~4 mL，高压灭菌 121 °C 10 min 或 115 °C 15 min，灭菌后置成高层斜面，呈桔红色。

A.8 蛋白胨水、靛基质试剂

A.8.1 蛋白胨水

蛋白胨 (或胰蛋白胨)	20.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.4±0.2

将上述成分加入蒸馏水中，煮沸溶解，调节 pH，分装小试管，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.8.2 靛基质试剂

A.8.2.1 柯凡克试剂: 将 5g 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.8.2.2 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.8.3 试验方法

挑取少量培养物接种, 在 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.9 尿素琼脂 (pH 7.2)

A.9.1 成分

蛋白胨	1.0 g
氯化钠	5.0 g
葡萄糖	1.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
0.4% 酚红	3.0 mL
琼脂	20.0 g
蒸馏水	1000 mL
20% 尿素溶液	100 mL
pH7.2±0.2	

A.9.2 制法

除尿素、琼脂和酚红外, 将其他成分加入 400 mL 蒸馏水中, 煮沸溶解, 调节 pH。另将琼脂加入 600 mL 蒸馏水中, 煮沸溶解。

将上述两溶液混合均匀后, 再加入指示剂后分装, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。冷至 $50\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$, 加入经除菌过滤的尿素溶液。尿素的最终浓度为 2%。分装于无菌试管内, 放成斜面备用。

A.9.3 试验方法

挑取琼脂培养物接种, 在 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.10 氰化钾 (KCN) 培养基

A.10.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸二氢钾	0.225 g
磷酸氢二钠	5.64 g

实验八 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

蒸馏水	1000 mL
0.5%氰化钾	20.0 mL

A.10.2 制法

将除氰化钾以外的成分加入蒸馏水中，煮沸溶解，分装后 121 °C 高压灭菌 15 min。放在冰箱内使其充分冷却。每 100 mL 培养基加入 0.5% 氰化钾溶液 2.0 mL（最后浓度为 1:10 000），分装于无菌试管内，每管约 4 mL，立刻用无菌橡皮塞塞紧，放在 4 °C 冰箱内，至少可保存两个月。同时，将不加氰化钾的培养基作为对照培养基，分装试管备用。

A.10.3 试验方法

将琼脂培养物接种于蛋白胨水内成为稀释菌液，挑取 1 环接种于氰化钾（KCN）培养基。并另挑取 1 环接种于对照培养基。在 36 °C ± 1 °C 培养 1 d ~ 2 d，观察结果。如有细菌生长即为阳性（不抑制），经 2 d 细菌不生长为阴性（抑制）。

注：氰化钾是剧毒药，使用时应小心，切勿沾染，以免中毒。夏天分装培养基应在冰箱内进行。试验失败的主要原因是封口不严，氰化钾逐渐分解，产生氢氰酸气体逸出，以致药物浓度降低，细菌生长，因而造成假阳性反应。试验时对每一环节都要特别注意。

A.11 赖氨酸脱羧酶试验培养基

A.11.1 成分

蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
蒸馏水	1000 mL
1.6% 溴甲酚紫-乙醇溶液	1.0 mL
L-赖氨酸或 DL-赖氨酸	0.5 g/100 mL 或 1.0 g/100 mL
pH	6.8±0.2

A.11.2 制法

除赖氨酸以外的成分加热溶解后，分装每瓶 100 mL，分别加入赖氨酸。L-赖氨酸按 0.5% 加入，DL-赖氨酸按 1% 加入。调节 pH。对照培养基不加赖氨酸。分装于无菌的小试管内，每管 0.5 mL，上面滴加一层液体石蜡，115 °C 高压灭菌 10 min。

A.11.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取培养物接种，于 36 °C ± 1 °C 培养 18 h ~ 24 h，观察结果。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。

A.12 糖发酵管

A.12.1 成分

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	10.0 g

实验八 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

氯化钠	3.0 g
磷酸氢二钠 (含 12 个结晶水)	2.0 g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1000 mL

pH 7.4±0.2

A.12.2 制法

A.12.2.1 葡萄糖发酵管按上述成分配好后, 调节 pH。按 0.5% 加入葡萄糖, 分装于有一个倒置小管的小试管内, 121 °C 高压灭菌 15 min。

A.12.2.2 其他各种糖发酵管可按上述成分配好后, 分装每瓶 100 mL, 121 °C 高压灭菌 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。

注: 蔗糖不纯, 加热后会自行水解者, 应采用过滤法除菌。

A.12.3 试验方法: 从琼脂斜面上挑取少量培养物接种, 于 36 °C ± 1 °C 培养, 一般 2 d ~ 3 d。迟缓反应需观察 14 d ~ 30 d。

A.13 ONPG 培养基

A.13.1 成分

邻硝基酚 β-D 半乳糖苷 (ONPG) (O-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)	60.0 mg
0.01 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5)	10.0 mL
1% 蛋白胍水 (pH 7.5)	30.0 mL

A.13.2 制法

将 ONPG 溶于缓冲液内, 加入蛋白胍水, 以过滤法除菌, 分装于无菌的小试管内, 每管 0.5 mL, 用橡皮塞塞紧。

A.13.3 试验方法

自琼脂斜面上挑取培养物 1 满环接种于 36 °C ± 1 °C 培养 1 h ~ 3 h 和 24 h 观察结果。如果 β-半乳糖苷酶产生, 则于 1 h ~ 3 h 变黄色, 如无此酶则 24 h 不变色。

A.14 半固体琼脂

A.14.1 成分

牛肉膏	0.3 g
蛋白胍	1.0 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	0.35g ~ 0.4 g
蒸馏水	100 mL

pH 7.4 ± 0.2

A.14.2 制法

实验八 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

按以上成分配好,煮沸溶解,调节 pH。分装小试管。121 °C 高压灭菌 15 min。直立凝固备用。

注:供动力观察、菌种保存、H 抗原位相变异试验等用。

A. 15 丙二酸钠培养基

A. 15.1 成分

酵母浸膏	1.0 g
硫酸铵	2.0 g
磷酸氢二钾	0.6 g
磷酸二氢钾	0.4 g
氯化钠	2.0 g
丙二酸钠	3.0 g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1000 mL

pH 6.8±0.2

A. 15.2 制法

除指示剂以外的成分溶解于水,调节 pH,再加入指示剂,分装试管,121 °C 高压灭菌 15 min。

A. 15.3 试验方法

用新鲜的琼脂培养物接种,于 36 °C±1 °C 培养 48 h,观察结果。阳性者由绿色变为蓝色。

附录 B
(规范性附录)
常见沙门氏菌抗原

B.1 常见沙门氏菌抗原

常见沙门氏菌抗原见表 B.1。

表 B.1 常见沙门氏菌抗原表

菌名	拉丁菌名	O 抗原	H 抗原	
			第 1 相	第 2 相
A 群				
甲型副伤寒沙门氏菌	<i>S. paratyphi A</i>	<u>1</u> ,2,12	a	[1,5]
B 群				
基桑加尼沙门氏菌	<i>S. kisangani</i>	<u>1</u> ,4,[5],12	a	1,2
阿雷查瓦莱塔沙门氏菌	<i>S. arechavaleta</i>	4,[5],12	a	1,7
马流产沙门氏菌	<i>S. abortusequi</i>	4,12	-	e,n,x
乙型副伤寒沙门氏菌	<i>S. paratyphi B</i>	<u>1</u> ,4,[5],12	b	1,2
利密特沙门氏菌	<i>S. limete</i>	<u>1</u> ,4,12,[27]	b	1,5
阿邦尼沙门氏菌	<i>S. abony</i>	<u>1</u> ,4,[5],12,27	b	e,n,x
维也纳沙门氏菌	<i>S. wien</i>	<u>1</u> ,4,12,[27]	b	1,w
伯里沙门氏菌	<i>S. bury</i>	4,12,[27]	c	z6
斯坦利沙门氏菌	<i>S. stanley</i>	<u>1</u> ,4,[5],12,[27]	d	1,2
圣保罗沙门氏菌	<i>S. saintpaul</i>	<u>1</u> ,4,[5],12	e,h	1,2
里定沙门氏菌	<i>S. reading</i>	<u>1</u> ,4,[5],12	e,h	1,5
彻斯特沙门氏菌	<i>S. chester</i>	<u>1</u> ,4,[5],12	e,h	e,n,x
德尔卑沙门氏菌	<i>S. derby</i>	<u>1</u> ,4,[5],12	f,g	[1,2]
阿贡纳沙门氏菌	<i>S. agona</i>	<u>1</u> ,4,[5],12	f,g,s	[1,2]
埃森沙门氏菌	<i>S. essen</i>	4,12	g,m	-
加利福尼亚沙门氏菌	<i>S. california</i>	4,12	g,m,t	[z67]
金斯敦沙门氏菌	<i>S. kingston</i>	<u>1</u> ,4,[5],12,[27]	g,s,t	[1,2]
布达佩斯沙门氏菌	<i>S. budapest</i>	<u>1</u> ,4,12,[27]	g,t	-
鼠伤寒沙门氏菌	<i>S. typhimurium</i>	<u>1</u> ,4,[5],12	i	1,2

实验八 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

拉古什沙门氏菌	S. Lagos	<u>1</u> , 4, [5], 12	i	1, 5
布雷登尼沙门氏菌	S. bredeney	<u>1</u> , 4, 12, [27]	l, v	1, 7
基尔瓦沙门氏菌 II	S. kilwa II	4, 12	l, w	e, n, x
海德尔堡沙门氏菌	S. heidelberg	<u>1</u> , 4, [15], 12	r	1, 2
印地安纳沙门氏菌	S. indiana	<u>1</u> , 4, 12	z	1, 7
斯坦利维尔沙门氏菌	S. stanleyville	<u>1</u> , 4, [5], 12. [27]	z ₄ , z ₂₃	[1, 2]
伊图里沙门氏菌	S. ituri	<u>1</u> , 4, 12	z ₁₀	1, 5
C1 群				
奥斯陆沙门氏菌	S. oslo	6, 7, <u>14</u>	a	e, n, x
爱丁堡沙门氏菌	S. edinburg	6, 7, <u>14</u>	b	1, 5
布隆方丹沙门氏菌 II	S. bloemfontein II	6, 7	b	[e, n, x]: z ₄₂
丙型副伤寒沙门氏菌	S. paratyphi C	6, 7, [Vi]	c	1, 5
猪霍乱沙门氏菌	S. choleraesuis	6, 7	c	1, 5
猪伤寒沙门氏菌	S. typhisuis	6, 7	c	1, 5
罗米他沙门氏菌	S. lomita	6, 7	e, h	1, 5
布伦登卢普沙门氏菌	S. braenderup	6, 7, <u>14</u>	e, h	e, n, z ₁₅
里森沙门氏菌	S. rissen	6, 7, <u>14</u>	f, g	-
蒙得维的亚沙门氏菌	S. montevideo	6, 7, <u>14</u>	g, m, [p], s	[1, 2, 7]
里吉尔沙门氏菌	S. riggil	6, 7	g, [t]	-
奥雷宁堡沙门氏菌	S. oranieburg	6, 7, 14	m, t	[2, 5, 7]
奥里塔蔓林沙门氏菌	S. oritamerin	6, 7	i	1, 5
汤卜逊沙门氏菌	S. thompson	6, 7, <u>14</u>	k	1, 5
康科德沙门氏菌	S. concord	6, 7	l, v	1, 2
伊鲁木沙门氏菌	S. irumu	6, 7	l, v	1, 5
姆卡巴沙门氏菌	S. mkamba	6, 7	l, v	1, 6
波恩沙门氏菌	S. bonn	6, 7	l, v	e, n, x
波茨坦沙门氏菌	S. potsdam	6, 7, <u>14</u>	l, v	e, n, z ₁₅
格但斯克沙门氏菌	S. gdansk	6, 7, <u>14</u>	l, v	z ₆
维尔肖沙门氏菌	S. virchow	6, 7, <u>14</u>	r	1, 2

实验八 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

婴儿沙门氏菌	<i>S.infantis</i>	6,7,14	r	1,5
巴布亚沙门氏菌	<i>S.papuana</i>	6,7	r	e, n, Z ₁₅
巴累利沙门氏菌	<i>S.bareilly</i>	6, 7,14	y	1, 5
哈特福德沙门氏菌	<i>S.hartford</i>	6, 7	y	e, n, x
三河岛沙门氏菌	<i>S.mikawasima</i>	6,7,14	y	e, n ,Z ₁₅
姆班达卡沙门氏菌	<i>S.mbandaka</i>	6, 7,14	Z ₁₀	e , n, Z ₁₅
田纳西沙门氏菌	<i>S.tennessee</i>	6, 7,14	Z ₂₉	[1, 2,7]
布伦登卢普沙门氏菌	<i>S.braenderup</i>	6, 7,14	e, h	e ,n, Z ₁₅
耶路撒冷沙门氏菌	<i>S.jerusalem</i>	6, 7,14	Z ₁₀	l ,w
C2 群				
习志野沙门氏菌	<i>S.narashino</i>	6.8	a	e, n, x
名古屋沙门氏菌	<i>S.nagoya</i>	6, 8	b	1,5
加瓦尼沙门氏菌	<i>S.gatuni</i>	6,8	b	e ,n ,x
慕尼黑沙门氏菌	<i>S.muenchen</i>	6,8	d	1, 2
曼哈顿沙门氏菌	<i>S.manhattan</i>	6, 8	d	1, 5
纽波特沙门氏菌	<i>S.newport</i>	6, 8,20	e, h	1,2
科特布斯沙门氏菌	<i>S.kottbus</i>	6,8	e, h	1, 5
茨昂威沙门氏菌	<i>S.tshiongwe</i>	6, 8	e, h	e , n ,Z ₁₅
林登堡沙门氏菌	<i>S.lindenburg</i>	6,8	i	1,2
塔科拉迪沙门氏菌	<i>S.takoradi</i>	6, 8	i	1, 5
波那雷恩沙门氏菌	<i>S.bonariensis</i>	6, 8	i	e, n ,x
利齐菲尔德沙门氏菌	<i>S.litchfield</i>	6, 8	l , v	1, 2
病牛沙门氏菌	<i>S.bovismorbificans</i>	6,8,20	r, [i]	1,5
查理沙门氏菌	<i>S.chailey</i>	6,8	Z ₄ ,Z ₂₃	e, n ,Z ₁₅
C3 群				
巴尔多沙门氏菌	<i>S.bardo</i>	8	e,h	1, 2
依麦克沙门氏菌	<i>S.emek</i>	8, 20	g ,m ,s	-
肯塔基沙门氏菌	<i>S.kentucky</i>	8,20	i	Z ₆

实验八 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

D 群				
仙台沙门氏菌	S.sendai	1,9, 12	a	1,5
伤寒沙门氏菌	S.typhi	9, 12, [Vi]	d	-
塔西沙门氏菌	S.tarshyne	9,12	d	1,6
伊斯特本沙门氏菌	S.eastbourne	1, 9, 12	e, h	1, 5
以色列沙门氏菌	S.israel	9, 12	e, h	e, n, z ₁₅
肠炎沙门氏菌	S.enteritidis	1,9,12	g, m	[1,7]
布利丹沙门氏菌	S.blegdam	9,12	g, m, q	-
沙门氏菌 II	Salmonella II	1, 9,12	g,m,[s],t	[1,5,7]
都柏林沙门氏菌	S.dublin	1, 9,12,[Vi]	g, p	-
芙蓉沙门氏菌	S.seremban	9,12	i	1, 5
巴拿马沙门氏菌	S.panama	1, 9,12	l, v	1,5
戈丁根沙门氏菌	S.goettingen 1	9, 12	l,v	e,n,z ₁₅
爪哇安纳沙门氏菌	S.javiana	1, 9,12	L,z ₂₈	1,5
鸡-雏沙门氏菌	S.gallinarum-pullorum	1, 9,12	-	-
E1 群				
奥凯福科沙门氏菌	S.okefoko	3,10	c	z ₆
瓦伊勒沙门氏菌	S.vejle	3, {10}, {15}	e, h	1,2
明斯特沙门氏菌	S.muenster	3, {10} {15} {15,34}	e, h	1,5
鸭沙门氏菌	S.anatum	3, {10} {15} {15,34}	e, h	1,6
纽兰沙门氏菌	S.newlands	3, {10}, {15,34}	e, h	e,n,x
火鸡沙门氏菌	S.meleagridis	3, {10} {15} {15,34}	e, h	l, w
雷根特沙门氏菌	S.regent	3, 10	f, g, [s]	[1,6]
西翰普顿沙门氏菌	S.westhampton	3, {10} {15} {15,34}	g, s, t	-
阿姆德尔尼斯沙门氏菌	S.amounderness	3,10	i	1, 5
新罗歇尔沙门氏菌	S.new-rochelle	3,10	k	l, w
恩昌加沙门氏菌	S.nchanga	3, {10} {15}	l, v	1,2
新斯托夫沙门氏菌	S.sinstorf	3,10	l, v	1, 5

实验八 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

伦敦沙门氏菌	S.london	3, {10} {15}	l, v	1,6
吉韦沙门氏菌	S.give	3, {10} {15} {15,34}	l, v	1,7
鲁齐齐沙门氏菌	S.ruzizi	3,10	l, v	e, n, z ₁₅
乌干达沙门氏菌	S.uganda	3, {10} {15}	l, z ₁₃	1,5
乌盖利沙门氏菌	S.ughelli	3, 10	r	1,5
韦太夫雷登沙门氏菌	S.weltevreden	3, {10} {15}	r	z ₆
克勒肯威尔沙门氏菌	S.clerkenwell	3,10	z	l, w
列克星敦沙门氏菌	S.lexington	3, {10} {15} {15,34}	z ₁₀	1,5
E4 群				
萨奥沙门氏菌	S.sao	1,3,19	e, h	e, n z ₁₅
卡拉巴尔沙门氏菌	S.calabar	1,3,19	e, h	l, w
山夫登堡沙门氏菌	S.senftenberg	1, 3,19	g, [s], t	-
斯特拉特福沙门氏菌	S.stratford	1, 3,19	i	1,2
塔克松尼沙门氏菌	S.taksony	1, 3,19	i	z ₆
索恩保沙门氏菌	S.schoeneberg	1,3,19	z	e, n, z ₁₅
F 群				
昌丹斯沙门氏菌	S.chandans	11	d	[e,n,x]
阿柏丁沙门氏菌	S.aberdeen	11	i	1,2
布里赫姆沙门氏菌	S.brijbhumi	11	i	1,5
威尼斯沙门氏菌	S.veneziana	11	i	e,n,x
阿巴特图巴沙门氏菌	S.abaetetuba	11	k	1,5
鲁比斯劳沙门氏菌	S.rubislaw	11	r	e,n,x
其他群				
浦那沙门氏菌	S.poona	1,13,22	z	1,6
里特沙门氏菌	S.ried	1,13,22	z ₄ , z ₂₃	[e,n,z ₁₅]
密西西比沙门氏菌	S.mississippi	1,13,23	b	1,5
古巴沙门氏菌	S.cubana	1,13,23	z ₂₉	-
苏拉特沙门氏菌	S.surat	[1],6,14, [25]	r,[i]	e,n,z ₁₅

实验八 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

松兹瓦尔沙门氏菌	S.sundsvall	[1],6,14,[25]	z	e,n, x
非丁伏斯沙门氏菌	S.hvittingfoss	16	b	e n x
威斯敦沙门氏菌	S.weston	16	e,h	z ₆
上海沙门氏菌	S.shanghai	16	l,v	1,6
自贡沙门氏菌	S.zigong	16	l,w	1,5
巴圭达沙门氏菌	S.baguida	21	z ₄ ,z ₂₃	-
迪尤波尔沙门氏菌	S.dieuoppeul	28	i	1,7
卢肯瓦尔德沙门氏菌	S.luckenwalde	28	z ₁₀	e ,n ,z ₁₅
拉马特根沙门氏菌	S.ramatgan	30	k	1,5
阿德莱沙门氏菌	S.adelaide	35	f,g	-
旺兹沃思沙门氏菌	S.wandsworth	39	b	1,2
雷俄格伦德沙门氏菌	S.riogrande	40	b	1,5
莱瑟沙门氏菌	S.lethe II	41	g, t	-
达莱姆沙门氏菌	S.dahlem	48	k	e,n, z ₁₅
沙门氏菌 IIIb	SalmonellaIIIb	61	l,v	1,5,7

实验九 食品卫生微生物学检验 志贺氏菌检验

(GB/T 4789.5 — 2003)

1 范围

本标准规定了食品中志贺氏菌的检验方法。

本标准适用于各类食品和食物中毒样品中志贺氏菌的检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 4789.28-2003 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

3 设备和材料

3.1 冰箱：0℃~4℃

3.2 恒温培养箱：36℃±1℃

3.3 显微镜：10×~100×。

3.4 均质器或灭菌乳钵

3.5 架盘药物天平：0g~500g，精确至0.5g

3.6 灭菌广口瓶：500mL

3.7 灭菌锥形瓶：500mL。

3.8 灭菌培养基：直径90mm

3.9 硝酸纤维素滤膜：150mm×50mm，φ0.45m。临用时切成两张，每张70mm×50mm，用铅笔划格，每格6mm×6mm。每行10格，分6行。灭菌备用。

4 培养基和试剂

4.1 GN增菌液：按GB/T 4789.28-2003中4.17规定

4.2 HE琼脂：按GB/T 4789.28-2003中4.21规定

4.3 SS琼脂：按GB/T 4789.28-2003中4.22规定

4.4 麦康凯琼脂：按GB/T 4789.28-2003中4.24规定

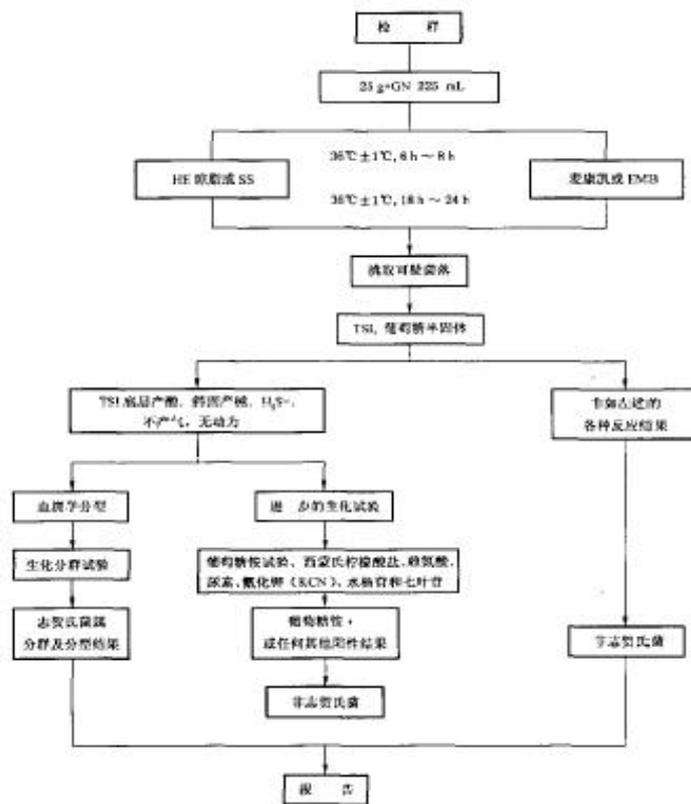
4.5 伊红美蓝琼脂（EMB）：按GB/T 4789.28-2003中4.25规定

4.6 三糖铁琼脂（TSI）：按GB/T 4789.28-2003中4.26、4.27规定

4.7 葡萄糖半固体管：按GB/T 4789.28-2003中4.31规定

- 4.8 半固体管：按 GB/T 4789.28 - 2003 中 4.30 规定
- 4.9 葡萄糖铵琼脂：按 GB/T 4789.28 - 2003 中 3.8 规定。
- 4.10 尿素琼脂（ pH7.2 ）：按 GB/T 4789.28 - 2003 中 3.15 规定。
- 4.11 西蒙氏柠檬酸盐琼脂：按 GB/T 4789.28 - 2003 中 3.5 规定。
- 4.12 氰化钾（ KCN ）培养基：按 GB/T 4789.28 - 2003 中 3.16 规定。
- 4.13 氨基酸脱羧酶试验培养基：赖氨酸、鸟氨酸及对照培养基，按 GB/T 4789.28 - 2003 中 3.12 规定。
- 4.14 糖发酵管：棉子糖、甘露醇、甘油、七叶苷及水杨苷，按 GB/T 4789.28 - 2003 中 3.2 规定。
- 4.15 5% 乳糖发酵管：按 GB/T 4789.28 - 2003 中 4.32 规定。
- 4.16 蛋白胨水、靛基质试剂：按 GB/T 4789.28 - 2003 中 3.13 规定。
- 4.17 志贺氏菌属诊断血清。

5 检验程序 志贺氏菌检验程序见图 1 。



6 操作步骤

6.1 增菌

以无菌操作取检样 25 g (mL)，加入装有 225 mLGN 增菌液的广口瓶内，固体食品用均质器以 8000 r/min-10000r/min 打碎 1 min，或用乳钵加灭菌砂磨碎，粉状食品用金属匙或玻璃棒研磨使其乳化，于 36 °C 培养 6h-8h。培养时间视细菌生长情况而定，当培养液出现轻微混浊时即应中止培养。

6.2 分离和初步生化试验

6.2.1 取增菌液 1 环，划线接种于 HE 琼脂平板或 SS 琼脂平板一个；另取 1 环划线接种于麦康凯琼脂平板或伊红美蓝琼脂平板一个，于 36 °C 培养 18h-24h，志贺氏菌在这些培养基上呈现无色透明不发酵乳糖的菌落。

6.2.2 挑取平板上的可疑菌落，接种三糖铁琼脂和葡萄糖半固体各一管。一般应多挑几个菌落，以防遗漏，经 36 °C 培养 18 h-24 h，分别观察结果。

6.2.3 下述培养物可以弃去：

- a) 在三糖铁琼脂斜面上呈蔓延生长的培养物；
- b) 在 18 h-24 h 内发酵乳糖、蔗糖的培养物；
- c) 不分解葡萄糖和只生长在半固体表面的培养物；
- d) 产气的培养物；
- e) 有动力的培养物；
- f) 产生硫化氢的培养物。

6.2.4 凡是乳糖、蔗糖不发酵，葡萄糖产酸不产气（福氏志贺氏菌 6 型可产生少量气体），无动力的菌株，可做血清学分型和进一步的生化试验。

6.3 血清学分型和进一步的生化试验

6.3.1 血清学分型

挑取三糖铁琼脂上的培养物，做玻片凝集试验。先用四种志贺氏菌多价血清检查，如果由于 K 抗原的存在而不出现凝集，应将菌液煮沸后再检查；如果呈现凝集，则用 A1、A2、B 群多价和 D 群血清分别试验。如系 B 群福氏志贺氏菌，则用群和型因子血清分别检查。福氏志贺氏菌各型和亚型的型和群抗原见表 1。可先用群因子血清检查，再根据群因子血清出现凝集的结果，依次选用型因子血清检查。

4 种志贺氏菌多价血清不凝集的菌株，可用鲍氏多价 1、2、3 分别检查，并进一步用 1-15 各型因子血清检查。如果鲍氏多价血清不凝集，可用痢疾志贺氏菌 3-12 型多价血清及各型因子血清检查。

表 1 福氏志贺氏菌各型和亚型的型抗原和群抗原

型和亚型	型抗原	群抗原	在群因子血清中的凝集		
			3, 4	6	7, 8
1a	I	1, 2, 4, 5, 9.....	+	-	-
1b	I	1, 2, 4, 5, 9.....	+	+	-
2a	II	1, 3, 4.....	+	-	-
2b	II	1, 7, 8, 9.....	-	-	+
3a	III	1, 6, 7, 8, 9.....	-	-	+

实验九 食品卫生微生物学检验 志贺氏菌检验

3b	III	1, 3, 4, 6.....	+	+	-
4a	IV	1, 3, 4.....	(+)	-	-
4b	IV	1, 3, 4, 6.....	+	+	-
5a	V	1, 3, 4.....	+	-	-
5b	V	1, 5, 7, 9.....	-	-	+
6	VI	1, 2, 4.....	(+)	-	-
X 变体	—	1, 7, 8, 9.....	-	-	+
Y 变体	—	1, 3, 4.....	+	-	-
注：+凝集；-不凝集；（）有或无。					

6.3.2 进一步的生化试验

在做血清学分型的同时，应做进一步的生化试验，即：葡萄糖铵，西蒙氏柠檬酸盐，赖氨酸和鸟氨酸脱羧酶，pHh7.2 尿素，氢化钾（KCN）生长，以及水杨苷和七叶苷的分解。除宋内氏菌和鲍氏 13 型为鸟氨酸阳性外，志贺氏菌属的培养物均为阴性结果。必要时还应做革兰氏染色检查和氧化酶试验，应为氧化酶阴性的革兰氏阴性杆菌。生化反应不符合的菌株，即使能与某种志贺氏菌分型血型发生凝集，仍不得判定为志贺氏菌属的培养物。

已判定为志贺氏菌属的培养物，应进一步做 5%乳糖发酵，甘露醇、棉子糖和甘油的发酵和靛基质试验。志贺氏菌属四个生化群的培养物，应符合该群的生化特性。但福氏 6 型的生化特性与 A 群或 C 群相似，见表 2。

表 2 志贺氏菌属四个群的生化特性

生化群	5%乳糖	甘露醇	棉子糖	甘油	靛基质
A 群：痢疾志贺氏菌	-	-	-	+	-/+
B 群：福氏志贺氏菌	-	+	+	-	(+)
C 群：鲍氏志贺氏菌	-	+	-	(+)	-/+
D 群：宋内氏志贺氏菌	+/(+)	+	+	d	-
注：+阳性；-阴性；-/+多数阴性，少数阳性；(+)迟缓阳性；d 有不同生化型。					

6.4 结果报告

综合生化和血清学的试验结果判定菌型并作出报告。

实验十 食品卫生微生物学检验

乳酸菌检验

食品安全国家标准

(GB 4789.35—2010)

食品微生物学检验 乳酸菌检验

National food safety standard

Food microbiological examination: Lactic acid bacteria

前 言

本标准代替 GB/T 4789.35-2008 《食品卫生微生物学检验 食品中乳酸菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.35-2008 相比，主要变化如下：

——修改了乳酸菌总数、乳杆菌、双歧杆菌和嗜热链球菌的计数方法。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

—— GB 4789.35-1996、GB/T 4789.35-2003、GB/T 4789.35-2008。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 乳酸菌检验

1 范围

本标准规定了含乳酸菌食品中乳酸菌（lactic acid bacteria）的检验方法。

本标准适用于含活性乳酸菌的食品中乳酸菌的检验。

2 规范性引用文件

本标准中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

3 术语和定义

3.1 乳酸菌 lactic acid bacteria

一类可发酵糖主要产生大量乳酸的细菌的通称。本标准中乳酸菌主要为乳杆菌属（*Lactobacillus*）、双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）和链球菌属（*Streptococcus*）。

4 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

4.1 恒温培养箱：36 °C ± 1 °C。

4.2 冰箱：2 °C ~ 5 °C。

4.3 均质器及无菌均质袋、均质杯或灭菌乳钵。

4.4 天平：感量 0.1 g。

4.5 无菌试管：18 mm × 180 mm、15 mm × 100 mm。

4.6 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。

4.7 无菌锥形瓶：500 mL、250 mL。

5 培养基和试剂

5.1 MRS（Man Rogosa Sharpe）培养基及莫匹罗星锂盐（Li-Mupirocin）改良 MRS 培养基：见附录 A 中 A.1。

5.2 MC 培养基（Modified Chalmers 培养基）：见附录 A 中 A.2。

5.3 0.5%蔗糖发酵管：见附录 A 中 A.3。

5.4 0.5%纤维二糖发酵管：见附录 A 中 A.3。

5.5 0.5%麦芽糖发酵管：见附录 A 中 A.3。

5.6 0.5%甘露醇发酵管：见附录 A 中 A.3。

5.7 0.5%水杨苷发酵管：见附录 A 中 A.3。

5.8 0.5%山梨醇发酵管：见附录 A 中 A.3。

5.9 0.5%乳糖发酵管：见附录 A 中 A.3。

5.10 七叶苷发酵管：见附录 A 中 A.4。

5.11 革兰氏染色液：见附录 A 中 A.5。

5.12 莫匹罗星锂盐 (Li-Mupirocin)：化学纯。

6 检验程序

乳酸菌检验程序见图 1。

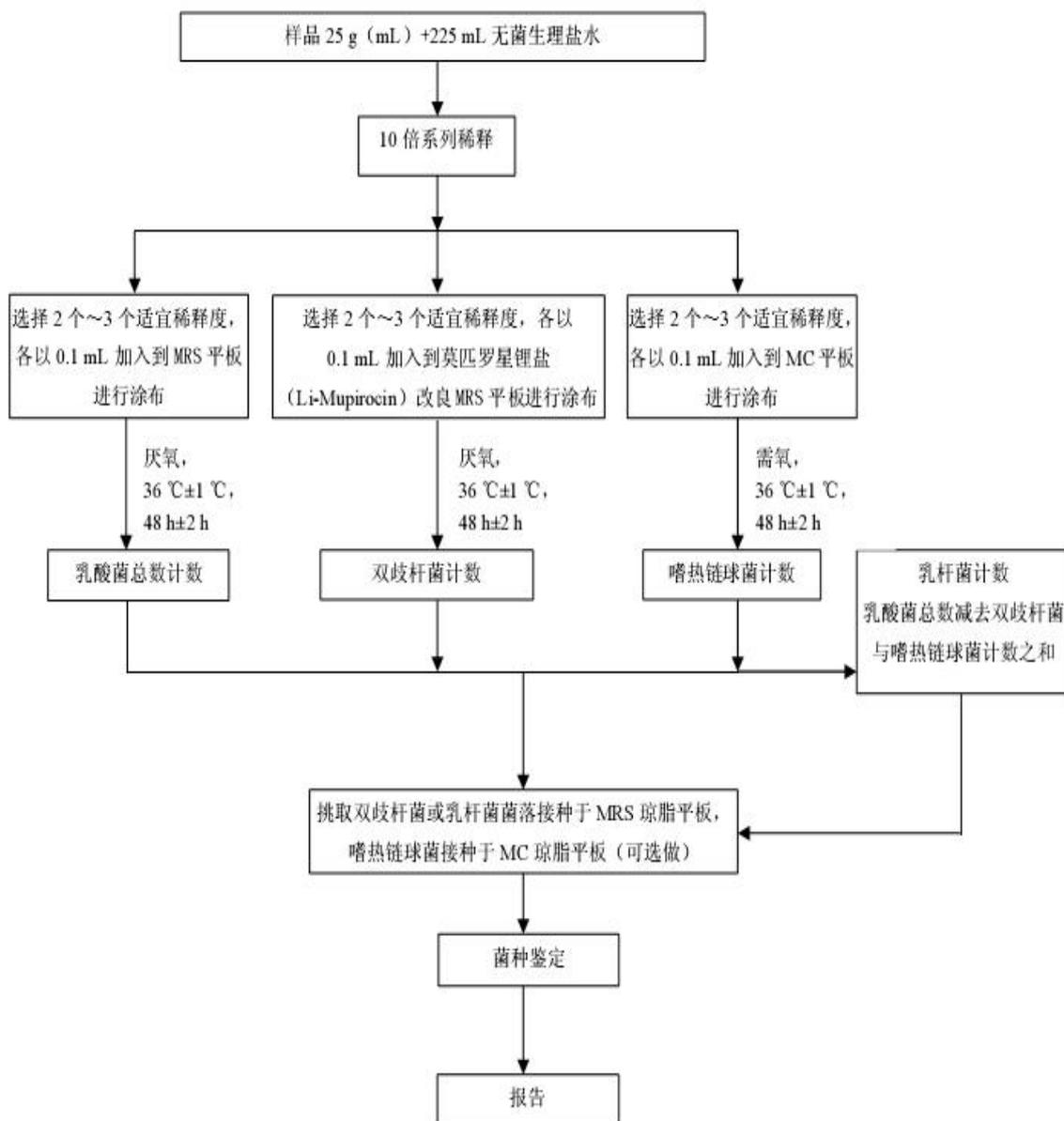


图 1 乳酸菌检验程序图

7 操作步骤

7.1 样品制备

7.1.1 样品的全部制备过程均应遵循无菌操作程序。

7.1.2 冷冻样品可先使其在 2 °C~5 °C 条件下解冻, 时间不超过 18 h, 也可在温度不超过 45 °C 的条件解冻, 时间不超过 15 min。

7.1.3 固体和半固体食品：以无菌操作称取 25 g 样品，置于装有 225 mL 生理盐水的无菌均质杯内，于 8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min，制成 1:10 样品匀液；或置于 225 mL 生理盐水的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min 制成 1:10 的样品匀液。

7.1.4 液体样品：液体样品应先将其充分摇匀后以无菌吸管吸取样品 25 mL 放入装有 225 mL 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，充分振摇，制成 1:10 的样品匀液。

7.2 步骤

7.2.1 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL，沿管壁缓慢注于装有 9 mL 生理盐水的无菌试管中（注意吸管尖端不要触及稀释液），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。

7.2.2 另取 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸头，按上述操作顺序，做 10 倍递增样品匀液，每递增稀释一次，即换用 1 次 1 mL 灭菌吸管或吸头。

7.2.3 乳酸菌计数

7.2.3.1 乳酸菌总数

根据待检样品活菌总数的估计，选择 2 个~3 个连续的适宜稀释度，每个稀释度吸取 0.1 mL 样品匀液分别置于 2 个 MRS 琼脂平板，使用 L 形棒进行表面涂布。36℃±1℃，厌氧培养 48 h±2 h 后计数平板上的所有菌落数。从样品稀释到平板涂布要求在 15min 内完成。

7.2.3.2 双歧杆菌计数

根据对待检样品双歧杆菌含量的估计，选择 2 个~3 个连续的适宜稀释度，每个稀释度吸取 0.1 mL 样品匀液于莫匹罗星锂盐 (Li-Mupirocin) 改良 MRS 琼脂平板，使用灭菌 L 形棒进行表面涂布，每个稀释度作两个平板。36℃±1℃，厌氧培养 48 h±2 h 后计数平板上的所有菌落数。从样品稀释到平板涂布要求在 15 min 内完成。

7.2.3.3 嗜热链球菌计数

根据待检样品嗜热链球菌活菌数的估计，选择 2 个~3 个连续的适宜稀释度，每个稀释度吸取 0.1 mL 样品匀液分别置于 2 个 MC 琼脂平板，使用 L 形棒进行表面涂布。36℃±1℃，需氧培养 48 h±2 h 后计数。嗜热链球菌在 MC 琼脂平板上的菌落特征为：菌落中等偏小，边缘整齐光滑的红色菌落，直径 2 mm±1 mm，菌落背面为粉红色。从样品稀释到平板涂布要求在 15 min 内完成。

7.2.3.4 乳杆菌计数

7.2.3.1 项乳酸菌总数结果减去 7.2.3.2 项双歧杆菌与 7.2.3.3 项嗜热链球菌计数结果之和即得乳杆菌计数。

7.3 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（colony-forming units, CFU）表示。

7.3.1 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。

7.3.2 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。

7.3.3 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。

7.4 结果的表述

7.4.1 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内，计算两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数，作为每 g (mL) 中菌落总数结果。

7.4.2 若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时，按公式（1）计算：

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

N——样品中菌落数；

∑C——平板（含适宜范围菌落数的平板）菌落数之和；

n₁——第一稀释度（低稀释倍数）平板个数；

n₂——第二稀释度（高稀释倍数）平板个数；

d——稀释因子（第一稀释度）。

7.4.3 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。

7.4.4 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。

7.4.5 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。

7.4.6 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 300 CFU 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。

7.5 菌落数的报告

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

7.5.2 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。

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

8 结果与报告

根据菌落计数结果出具报告，报告单位以 CFU/g (mL) 表示。

9 乳酸菌的鉴定（可选做）

9.1 纯培养

挑取 3 个或以上单个菌落，嗜热链球菌接种于 MC 琼脂平板，乳杆菌属接种于 MRS 琼脂平板，置 36 °C ± 1 °C 厌氧培养 48 h。

9.2 鉴定

9.2.1 双歧杆菌的鉴定按 GB/T 4789.34 的规定操作。

9.2.2 涂片镜检：乳杆菌属菌体形态多样，呈长杆状、弯曲杆状或短杆状。无芽胞，革兰氏染色阳性。嗜热链球菌菌体呈球形或球杆状，直径为 0.5 μm ~ 2.0 μm，成对或成链排列，无芽胞，革兰氏染色阳性。

9.2.3 乳酸菌菌种主要生化反应见表 1 和表 2。

表 1 常见乳杆菌属内种的碳水化合物反应

菌种	七叶苷	纤维二糖	麦芽糖	甘露醇	水杨苷	山梨醇	蔗糖	棉籽糖
干酪乳杆菌干酪亚种 (<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>)	+	+	+	+	+	+	+	-
德氏乳杆菌保加利亚种 (<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-
嗜酸乳杆菌 (<i>L. acidophilus</i>)	+	+	+	-	+	-	+	d
罗伊氏乳杆菌 (<i>L. reuteri</i>)	ND	-	+	-	-	-	+	+
鼠李糖乳杆菌 (<i>L. rhamnosus</i>)	+	+	+	+	+	+	+	-
植物乳杆菌 (<i>L. plantarum</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+

注：+表示 90% 以上菌株阳性；-表示 90% 以上菌株阴性；d 表示 11%~89% 菌株阳性；ND 表示未测定。

表 2 嗜热链球菌的主要生化反应

菌种	菊糖	乳糖	甘露醇	水杨苷	山梨醇	马尿酸	七叶苷
嗜热链球菌 (<i>S. thermophilus</i>)	-	+	-	-	-	-	-

注：+表示 90% 以上菌株阳性；-表示 90% 以上菌株阴性。

附录 A

(规范性附录)

培养基及试剂

A.1 MRS 培养基

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉粉	5.0 g
酵母粉	4.0 g
葡萄糖	20.0 g
吐温 80	1.0 mL
$K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	2.0 g
$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	5.0 g
柠檬酸三铵	2.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.05 g
琼脂粉	15.0 g
pH 6.2	

A.1.2 制法

将上述成分加入到 1000 mL 蒸馏水中, 加热溶解, 调节 pH, 分装后 121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。

A.1.3 莫匹罗星锂盐 (Li-Mupirocin) 改良 MRS 培养基

A.1.3.1 莫匹罗星锂盐 (Li-Mupirocin) 储备液制备: 称取 50mg 莫匹罗星锂盐 (Li-Mupirocin) 加入到 50 mL 蒸馏水中, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。

A.1.3.2 制法

将 A.1.1 成分加入到 950 mL 蒸馏水中, 加热溶解, 调节 pH, 分装后于 121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。临用时加热熔化琼脂, 在水浴中冷至 48 °C, 用带有 0.22 μm 微孔滤膜的注射器将莫匹罗星锂盐 (Li-Mupirocin) 储备液加入到熔化琼脂中, 使培养基中莫匹罗星锂盐 (Li-Mupirocin) 的浓度为 50 $\mu g/mL$ 。

A.2 MC 培养基

A.2.1 成分

大豆蛋白胨	5.0 g
牛肉粉	3.0 g
酵母粉	3.0 g
葡萄糖	20.0 g

乳糖	20.0 g
碳酸钙	10.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1000 mL
1%中性红溶液	5.0 mL
pH6.0	

A. 2. 2 制法

将前面 7 种成分加入蒸馏水中, 加热溶解, 调节 pH, 加入中性红溶液。分装后 121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。

A. 3 乳酸杆菌糖发酵管

A. 3. 1 基础成分

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
吐温 80	0.5 mL
琼脂	1.5 g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1.4 mL
蒸馏水	1000 mL

A. 3. 2 制法

按 0.5%加入所需糖类, 并分装小试管, 121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。

A. 4 七叶苷发酵管

A. 4. 1 成分

蛋白胨	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
七叶苷	3.0 g
柠檬酸铁	0.5 g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1.4 mL
蒸馏水	100 mL

A. 4. 2 制法

将上述成分加入蒸馏水中, 加热溶解, 121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。

A. 5 革兰氏染色液

A. 5. 1 结晶紫染色液

A. 5. 1. 1 成分

结晶紫	1.0 g
-----	-------

95%乙醇	20 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

A. 5. 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. 5. 2 革兰氏碘液

A. 5. 2. 1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

A. 5. 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. 5. 3 沙黄复染液

A. 5. 3. 1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

A. 5. 3. 2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A. 5. 4 染色法

A. 5. 4. 1 将涂片在酒精灯火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染 1 min，水洗。

A. 5. 4. 2 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。

A. 5. 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. 5. 4. 4 滴加复染液，复染 1 min。水洗、待干、镜检。

实验十一 食品卫生微生物学检验 霉菌和酵母计数

食品安全国家标准

(GB/T 4789.15—2010)

食品微生物学检验 霉菌和酵母计数

National food safety standard

Food microbiological examination: Enumeration of moulds and yeasts

前 言

本标准自实施之日起代替 GB/T 4789.15-2003《食品卫生微生物学检验 霉菌和酵母计数》。本标准与 GB/T 4789.15-2003 相比，主要修改如下：

- 修改了范围；
- 修改了检验程序和操作步骤；
- 修改了培养基和试剂；
- 修改了设备和材料；
- 修改了附录。

本标准的附录 A 为规范性附录，附录 B 为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB 4789.15-1984、GB 4789.15-1994、GB/T 4789.15-2003。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 霉菌和酵母计数

1 范围

本标准规定了食品中霉菌和酵母菌 (moulds and yeasts) 的计数方法。

本标准适用于各类食品中霉菌和酵母菌的计数。

2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- 2.1 冰箱：2 ℃~5 ℃。
- 2.2 恒温培养箱：28 ℃±1 ℃。
- 2.3 均质器。
- 2.4 恒温振荡器。
- 2.5 显微镜：10×~100×。
- 2.6 电子天平：感量 0.1 g。
- 2.7 无菌锥形瓶：容量 500 mL、250 mL。
- 2.8 无菌广口瓶：500 mL。
- 2.9 无菌吸管：1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)。
- 2.10 无菌平皿：直径 90 mm。
- 2.11 无菌试管：10 mm×75 mm。
- 2.12 无菌牛皮纸袋、塑料袋。

3 培养基和试剂

- 3.1 马铃薯-葡萄糖-琼脂培养基：见附录 A 中 A.1。
- 3.2 孟加拉红培养基：见附录 A 中 A.2。

4 检验程序

霉菌和酵母计数的检验程序见图 1。

5 操作步骤

5.1 样品的稀释

5.1.1 固体和半固体样品：称取 25 g 样品至盛有 225 mL 灭菌蒸馏水的锥形瓶中，充分振摇，即为 1:10 稀释液。或放入盛有 225 mL 无菌蒸馏水的均质袋中，用拍击式均质器拍打 2min，制成 1:10 的样品匀液。

5.1.2 液体样品：以无菌吸管吸取 25 mL 样品至盛有 225 mL 无菌蒸馏水的锥形瓶（可在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。

5.1.3 取 1 mL 1:10 稀释液注入含有 9 mL 无菌水的试管中，另换一支 1 mL 无菌吸管反复吹吸，此液为 1:100 稀释液。

5.1.4 按 5.1.3 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。

5.1.5 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 倍递增稀释的同时，每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液于 2 个无菌平皿内。同时分别取 1 mL 空白稀释液加入 2 个无菌平皿作空白对照。

5.1.6 及时将 15 mL~20 mL 冷却至 46 ℃的马铃薯-葡萄糖-琼脂或孟加拉红培养基（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。

5.2 培养

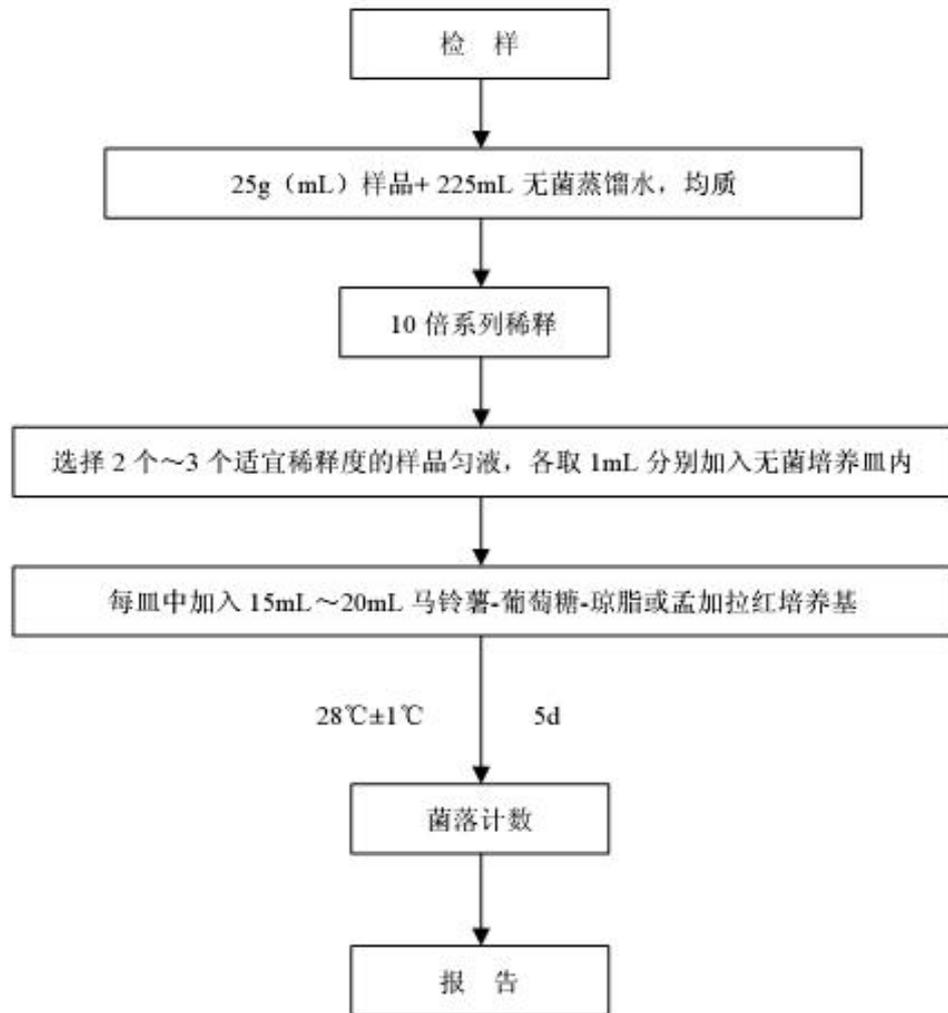


图 1 霉菌和酵母计数的检验程序

待琼脂凝固后，将平板倒置， $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 5d，观察并记录。

5.3 菌落计数

肉眼观察，必要时可用放大镜，记录各稀释倍数和相应的霉菌和酵母数。以菌落形成单位 (colony forming units, CFU) 表示。选取菌落数在 10 CFU~150 CFU 的平板，根据菌落形态分别计数霉菌和酵母数。霉菌蔓延生长覆盖整个平板的可记录为多不可计。菌落数应采用两个平板的平均数。

6 结果与报告

6.1 计算两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数计算。

6.1.2 若所有平板上菌落数均大于 150 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。

6.1.3 若所有平板上菌落数均小于 10 CFU，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

6.1.4 若所有稀释度平板均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算；如为原液，则以小于 1 计数。

6.2 报告

6.2.1 菌落数在 100 以内时，按“四舍五入”原则修约，采用两位有效数字报告。

6.2.2 菌落数大于或等于 100 时，前 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 代替位数来表示结果；也可用 10 的指数形式来表示，此时也按“四舍五入”原则修约，采用两位有效数字。

6.2.3 称重取样以 CFU/g 为单位报告，体积取样以 CFU/mL 为单位报告，报告或分别报告霉菌和/或酵母数。

附录 A

(规范性附录)

培养基和试剂

A.1 马铃薯-葡萄糖-琼脂

A.1.1 成分

马铃薯(去皮切块)	300 g
葡萄糖	20.0 g
琼脂	20.0 g
氯霉素	0.1 g
蒸馏水	1000 mL

A.1.2 制法

将马铃薯去皮切块，加 1000mL 蒸馏水，煮沸 10 min~20 min。用纱布过滤，补加蒸馏水至 1000 mL 加入葡萄糖和琼脂，加热溶化，分装后，121 °C 灭菌 20 min。倾注平板前，用少量乙醇溶解氯霉素加入培养基中

A.2 孟加拉红培养基

A.2.1 成分

蛋白胨	5.0 g
葡萄糖	10.0 g
磷酸二氢钾	1.0 g
硫酸镁(无水)	0.5 g
琼脂	20.0 g
孟加拉红	0.033 g
氯霉素	0.1 g
蒸馏水	1000 mL

A.2.2 制法

上述各成分加入蒸馏水中，加热溶化，补足蒸馏水至 1000 mL，分装后，121°C 灭菌 20 min。倾注平板前，用少量乙醇溶解氯霉素加入培养基中。

附录 B

(资料性附录)

霉菌直接镜检计数法

常用的为郝氏霉菌计测法，本方法适用于番茄酱罐头。

B.1 设备和材料

B.1.1 折光仪。

B.1.2 显微镜。

B.1.3 郝氏计测玻片：具有标准计测室的特制玻片。

B.1.4 盖玻片。

B.1.5 测微器：具标准刻度的玻片。

B.2 操作步骤

B.2.1 检样的制备：取定量检样，加蒸馏水稀释至折光指数为 1.3447~1.3460（即浓度为 7.9%~8.8%），备用。

B.2.2 显微镜标准视野的校正：将显微镜按放大率 90~125 倍调节标准视野，使其直径为 1.382 mm。

B.2.3 涂片：洗净郝氏计测玻片，将制好的标准液，用玻璃棒均匀的摊布于计测室，以备观察。

B.2.4 观测：将制好之载玻片放于显微镜标准视野下进行霉菌观测，一般每一检样观察 50 个视野，同一检样应由两人进行观察。

B.2.5 结果与计算：在标准视野下，发现有霉菌菌丝其长度超过标准视野（1.382mm）的 1/6 或三根菌丝总长度超过标准视野的 1/6（即测微器的一格）时即为阳性（+），否则为阴性（-），按 100 个视野计，其中发现有霉菌菌丝体存在的视野数，即为霉菌的视野百分数。

实验十二 食品卫生微生物学检验 乳与乳制品检验

食品安全国家标准

(GB 4789.18—2010)

食品微生物学检验 乳与乳制品检验

National food safety standard

Food microbiological examination: Milk and milk products

前 言

本标准代替 GB/T 4789.18-2003 《食品卫生微生物学检验 乳与乳制品检验》。

本标准与 GB/T 4789.18-2003 相比，主要变化如下：

- 修改了标准的中英文名称；
- 修改了“范围”和“规范性引用文件”；
- 修改了采样方案和各类乳制品的处理方法。

本标准所代替的历次版本发布情况为：

- GB 4789.18-1984、GB 4789.18-1994、GB/T 4789.18-2003。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 乳与乳制品检验

1 范围

本标准适用于乳与乳制品的微生物学检验。

2 规范性引用文件

本标准中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

3 设备和材料

3.1 采样工具

采样工具应使用不锈钢或其他强度适当的材料，表面光滑，无缝隙，边角圆润。采样工具应清洗和灭菌，使用前保持干燥。采样工具包括搅拌器具、采样勺、匙、切割丝、刀具（小刀或抹刀）、采样钻等。

3.2 样品容器

样品容器的材料（如玻璃、不锈钢、塑料等）和结构应能充分保证样品的原有状态。容器和盖子应清洁、无菌、干燥。样品容器应有足够的体积，使样品可在测试前充分混匀。样品容器包括采样袋、采样管、采样瓶等。

3.3 其他用品

包括温度计、铝箔、封口膜、记号笔、采样登记表等。

3.4 实验室检验用品

3.4.1 常规检验用品按 GB 4789.1 执行。

3.4.2 微生物指标菌检验分别按 GB 4789.2、GB 4789.3、GB 4789.15 执行。

3.4.3 致病菌检验分别按 GB 4789.4、GB 4789.10、GB 4789.30 和 GB 4789.40 执行。

3.4.4 双歧杆菌和乳酸菌检验分别按 GB/T 4789.34、GB 4789.35 执行。

4 采样方案

样品应当具有代表性。采样过程采用无菌操作，采样方法和采样数量应根据具体产品的特点和产品标准要求执行。样品在保存和运输的过程中，应采取必要的措施防止样品中原有微生物的数量变化，保持样品的原有状态。

4.1 生乳的采样

4.1.1 样品应充分搅拌混匀，混匀后应立即取样，用无菌采样工具分别从相同批次（此处特指单体的贮奶罐或贮奶车）中采集 n 个样品，采样量应满足微生物指标检验的要求。

4.1.2 具有分隔区域的贮奶装置，应根据每个分隔区域内贮奶量的不同，按比例从中采集一定量经混合均匀的代表性样品，将上述奶样混合均匀采样。

4.2 液态乳制品的采样

适用于巴氏杀菌乳、发酵乳、灭菌乳、调制乳等。取相同批次最小零售原包装，每批至少取 n 件。

4.3 半固态乳制品的采样

4.3.1 炼乳的采样

适用于淡炼乳、加糖炼乳、调制炼乳等。

4.3.1.1 原包装小于或等于 500 g (mL) 的制品：取相同批次的最小零售原包装，每批至少取 n 件。采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.3.1.2 原包装大于 500 g (mL) 的制品（再加工产品，进出口）：采样前应摇动或使用搅拌器搅拌，使其达到均匀后采样。如果样品无法进行均匀混合，就从样品容器中的各个部位取代表性样。采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.3.2 奶油及其制品的采样

适用于稀奶油、奶油、无水奶油等。

4.3.2.1 原包装小于或等于 1000 g (mL) 的制品：取相同批次的最小零售原包装，采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.3.2.2 原包装大于 1000 g (mL) 的制品：采样前应摇动或使用搅拌器搅拌，使其达到均匀后采样。对于固态制品，用无菌抹刀除去表层产品，厚度不少于 5 mm。将洁净、干燥的采样钻沿包装容器切口方向往下，匀速穿入底部。当采样钻到达容器底部时，将采样钻旋转 180°，抽出采样钻并将采集的样品转入样品容器。采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.4 固态乳制品采样

适用于干酪、再制干酪、乳粉、乳清粉、乳糖和酪乳粉等。

4.4.1 干酪与再制干酪的采样

4.4.1.1 原包装小于或等于 500 g 的制品：取相同批次的最小零售原包装，采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.4.1.2 原包装大于 500 g 的制品：根据干酪的形状和类型，可分别使用下列方法：（1）在距边缘不小于 10 cm 处，把取样器向干酪中心斜插到一个平表面，进行一次或几次。（2）把取样器垂直插入一个面，并穿过干酪中心到对面。（3）从两个平面之间，将取样器水平插入干酪的竖直面，插向干酪中心。（4）若干酪是装在桶、箱或其它大容器中，或是将干酪制成压紧的大块时，将取样器从容器顶斜穿到底进行采样。采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

4.4.2 乳粉、乳清粉、乳糖、酪乳粉的采样

适用于乳粉、乳清粉、乳糖、酪乳粉等。

4.4.2.1 原包装小于或等于 500 g 的制品：取相同批次的最小零售原包装，采样量不小于

5 倍或以上检验单位的样品。

4.4.2.2 原包装大于 500 g 的制品：将洁净、干燥的采样钻沿包装容器切口方向往下，匀速穿入底部。当采样钻到达容器底部时，将采样钻旋转 180°，抽出采样钻并将采集的样品转入样品容器。采样量不小于 5 倍或以上检验单位的样品。

5 检样的处理

5.1 乳及液态乳制品的处理

将检样摇匀，以无菌操作开启包装。塑料或纸盒（袋）装，用 75 %酒精棉球消毒盒盖或袋口，用灭菌剪刀切开；玻璃瓶装，以无菌操作去掉瓶口的纸罩或瓶盖，瓶口经火焰消毒。用灭菌吸管吸取 25 mL（液态乳中添加固体颗粒状物的，应均质后取样）检样，放入装有 225 mL 灭菌生理盐水的锥形瓶内，振摇均匀。

5.2 半固态乳制品的处理

5.2.1 炼乳

清洁瓶或罐的表面，再用点燃的酒精棉球消毒瓶或罐口周围，然后用灭菌的开罐器打开瓶或罐，以无菌手续称取 25 g 检样，放入预热至 45 °C 的装有 225 mL 灭菌生理盐水（或其他增菌液）的锥形瓶中，振摇均匀。

5.2.2 稀奶油、奶油、无水奶油等

无菌操作打开包装，称取 25 g 检样，放入预热至 45 °C 的装有 225 mL 灭菌生理盐水（或其他增菌液）的锥形瓶中，振摇均匀。从检样融化到接种完毕的时间不应超过 30 min。

5.3 固态乳制品的处理

5.3.1 干酪及其制品

以无菌操作打开外包装，对有涂层的样品削去部分表面封蜡，对无涂层的样品直接经无菌程序用灭菌刀切开干酪，用灭菌刀（勺）从表层和深层分别取出有代表性的适量样品，磨碎混匀，称取 25 g 检样，放入预热到 45 °C 的装有 225 mL 灭菌生理盐水（或其他稀释液）的锥形瓶中，振摇均匀。充分混合使样品均匀散开（1 min~3 min），分散过程时温度不超过 40 °C。尽可能避免泡沫产生。

5.3.2 乳粉、乳清粉、乳糖、酪乳粉

取样前将样品充分混匀。罐装乳粉的开罐取样法同炼乳处理，袋装奶粉应用 75%酒精的棉球涂擦消毒袋口，以无菌手续开封取样。称取检样 25 g，加入预热到 45 °C 盛有 225 mL 灭菌生理盐水等稀释液或增菌液的锥形瓶内（可使用玻璃珠助溶），振摇使充分溶解和混匀。对于经酸化工艺生产的乳清粉，应使用 pH 8.4±0.2 的磷酸氢二钾缓冲液稀释。对于含较高淀粉的特殊配方乳粉，可使用 α-淀粉酶降低溶液粘度，或将稀释液加倍以降低溶液粘度。

5.3.3 酪蛋白和酪蛋白酸盐

以无菌操作，称取 25 g 检样，按照产品不同，分别加入 225 mL 灭菌生理盐水等稀

液或增菌液。在对粘稠的样品溶液进行梯度稀释时，应在无菌条件下反复多次吹打吸管，尽量将粘附在吸管内壁的样品转移到溶液中。

5.3.3.1 酸法工艺生产的酪蛋白：使用磷酸氢二钾缓冲液并加入消泡剂，在 pH 8.4±0.2 的条件下溶解样品。

5.3.3.2 凝乳酶法工艺生产的酪蛋白：使用磷酸氢二钾缓冲液并加入消泡剂，在 pH 7.5±0.2 的条件下溶解样品，室温静置 15 min。必要时在灭菌的匀浆袋中均质 2 min，再静置 5 min 后检测。

5.3.3.3 酪蛋白酸盐：使用磷酸氢二钾缓冲液在 pH 7.5±0.2 的条件下溶解样品。

6 检验方法

6.1 菌落总数：按 GB 4789.2 检验。

6.2 大肠菌群：按 GB 4789.3 中的直接计数法计数。

6.3 沙门氏菌：按 GB 4789.4 检验。

6.4 金黄色葡萄球菌：按 GB 4789.10 检验。

6.5 霉菌和酵母：按 GB 4789.15 计数。

6.6 单核细胞增生李斯特氏菌：按 GB 4789.30 检验。

6.7 双歧杆菌：按 GB/T 4789.34 检验。

6.8 乳酸菌：按 GB 4789.35 检验。

6.9 阪崎肠杆菌：按 GB 4789.40 检验。

实验十三 食品卫生微生物学检验 冷冻饮品、饮料检验

(GB/T 4789.21 — 2003)

1 范围

本标准规定了冷冻饮品、饮料的检验方法。

本标准适用于冷冻饮品(冰淇淋、冰棍、雪糕和食用冰块)及饮料:果、蔬汁饮料、含乳饮料、碳酸饮料、植物蛋白饮料、碳酸型茶饮料、固体饮料、可可粉固体饮料、乳酸菌饮料、罐装茶饮料、罐装型植物蛋白饮料(以罐头工艺生产)、瓶(桶)装饮用纯净水、低温复原果汁等的检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

- GB/T 4789.1 食品卫生微生物学检验总则
- GB/T 4789.2 食品卫生微生物学检验菌落总数测定
- GB/T 4789.3 食品卫生微生物学检验大肠菌群测定
- GB/T 4789.4 食品卫生微生物学检验沙门氏菌检验
- GB/T 4789.5 食品卫生微生物学检验志贺氏菌检验
- GB/T 4789.10 食品卫生微生物学检验金黄色葡萄球菌检验
- GB/T 4789.15 食品卫生微生物学检验霉菌和酵母计数
- GB/T 16347 食品卫生微生物学检验乳酸菌饮料中乳酸菌检验

3 设备和材料

现场采样用品:按实际需要准备。见 GB/T 4789.2、GB/T 4789.3、GB/T 4789.4、GB/T 4789.5、GB/T 4789.10、GB/T 4789.15、GB/T 16347。

4 培养基和试剂

见 GB/T 4789.2、GB/T 4789.3、GB/T 4789.4、GB/T 4789.5、GB/T 4789.10、GB/T 4789.15、GB/T 16347。

5 操作步骤

5.1 样品的采集与送检

见 GB/T 4789.1

5.1.1 果蔬汁饮料、碳酸饮料、茶饮料、固体饮料:应采取原瓶、袋和盒装样品。

5.1.2 冷冻饮品：采取原包装样品。

5.1.3 样品采取后，应立即送检。如不能立即送检，应置冰箱保存。

5.2 样品采取数量

按 GB/T 4789.1 执行。

5.3 检样的处理

5.3.1 瓶装饮料：用点燃的酒精棉球烧灼瓶口灭菌，用石炭酸纱布盖好，塑料瓶口可用 75 % 棉球擦拭灭菌，用灭菌开瓶器将盖启开，含有二氧化碳的饮料可倒入另一灭菌容器内，口勿盖紧，覆盖一灭菌纱布，轻轻摇荡。待气体全部逸出后，进行检验。

5.3.2 冰棍：用灭菌镊子除去包装纸，将冰棍部分放入灭菌广口瓶内，木棒留在瓶外，盖上瓶盖，用力抽出木棒，或用灭菌剪子剪掉木棒，置 45 ℃ 水浴 30 min ，溶化后立即进行检验。

5.3.3 冰淇淋：放在灭菌容器内，待其溶化，立即进行检验。

5.4 检验方法

- 菌落总数测定：按 GB/T 4789.2 执行；
- 大肠菌群测定：按 GB/T 4789.3 执行；
- 沙门氏菌检验：按 GB/T 4789.4 执行；
- 志贺氏菌检验：按 GB/T 4789.5 执行；
- 金黄色葡萄球菌检验：按 GB/T 4789.10 执行；
- 霉菌和酵母计数：按 GB/T 4789.15 执行；
- 乳酸菌检验：按 GB/T 16347 执行。

实验十四 食品卫生微生物学检验 糖果、糕点、蜜饯检验

(GB/T 4789.24 — 2003)

1 范围

本标准规定了糖果、糕点、蜜饯的检验方法。

本标准适用于糖果、糕点（饼干）、蜜饯的检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 4789.1 食品卫生微生物学检验总则

GB/T 4789.2 食品卫生微生物学检验菌落总数测定

GB/T 4789.3 食品卫生微生物学检验大肠菌群测定

GB/T 4789.4 食品卫生微生物学检验沙门氏菌检验

GB/T 4789.5 食品卫生微生物学检验志贺氏菌检验

GB/T 4789.10 食品卫生微生物学检验金黄色葡萄球菌检验

GB/T 4789.15 食品卫生微生物学检验霉菌和酵母计数

3 设备和材料

3.1 现场采样用品

3.1.1 灭菌塑料袋。

3.1.2 灭菌镊子。

3.1.3 75%酒精棉球。

3.1.4 编号用蜡笔和纸。

3.2 实验检验用品

见 GB/T 4789.2、GB/T 4789.3、GB/T 4789.4、GB/T 4789.5、GB/T 4789.10、GB/T 4789.15。

4 培养基和试剂

见 GB/T 4789.2、GB/T 4789.3、GB/T 4789.4、GB/T 4789.5、GB/T 4789.10、GB/T 4789.15。

5 操作步骤

5.1 样品的采集与送检

糕点（饼干）、面包、蜜饯可用灭菌镊子夹取不同部位样品，放入灭菌容器内，糖果采

取原包装样品，采取后立即送检。

5.2 样品采取数量

按 GB/T 4789.1 执行。

5.3 检样的处理

5.3.1 糕点（饼干）、面包：如为原包装，用灭菌镊子夹下包装纸，采取外部及中心部位。如为带馅糕点，取外皮及内馅 25g，裱花糕点，采取奶花及糕点部分各一半共 25g 加入 225mL 灭菌生理盐水中，制成混悬液。

5.3.2 蜜饯：采取不同部位称取 25g 检样，加入加入 225mL 灭菌生理盐水中，制成混悬液。

5.3.3 糖果：用灭菌镊子除去包装纸，称取数块共 25g 加入预温至 45℃ 的灭菌生理盐水 225mL 中，溶化后检验。

5.4 检验方法

- 菌落总数测定：按 GB/T 4789.2 执行；
- 大肠菌群测定：按 GB/T 4789.3 执行；
- 沙门氏菌检验：按 GB/T 4789.4 执行；
- 志贺氏菌检验：按 GB/T 4789.5 执行；
- 金黄色葡萄球菌检验：按 GB/T 4789.10 执行；
- 霉菌和酵母计数：按 GB/T 4789.15 执行；

实验十五 食品卫生微生物学检验 酒类检验

(GB/T 4789.25-2003)

1 范围

本标准规定了酒精度低发酵酒的检验方法。

本标准适用于发酵酒中啤酒（鲜啤酒和熟啤酒）、果酒、黄酒、葡萄酒的检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 4789.1 食品卫生微生物学检验总则

GB/T 4789.2 食品卫生微生物学检验菌落总数测定

GB/T 4789.3 食品卫生微生物学检验大肠菌群测定

GB/T 4789.4 食品卫生微生物学检验沙门氏菌检验

GB/T 4789.5 食品卫生微生物学检验志贺氏菌检验

GB/T 4789.10 食品卫生微生物学检验金黄色葡萄球菌检验

3 设备和材料

3.1 现场采样用品

按实际需要准备。采样箱、记号笔、记录纸等。

3.2 实验室检验用品

见 GB/T 4789.2、GB/T 4789.3、GB/T 4789.4、GB/T 4789.5、GB/T 4789.10。

4 培养基和试剂

见 GB/T 4789.2、GB/T 4789.3、GB/T 4789.4、GB/T 4789.5、GB/T 4789.10。

5 操作步骤

5.1 样品的采集与送检

发酵酒样品的采样按 GB/T 4789.1 执行。

5.2 检样的处理

用点燃的酒精棉球烧灼瓶口灭菌，用石炭酸纱布盖好，塑料瓶口可用 75% 棉球擦拭灭菌，用灭菌开瓶器将盖启开，含有二氧化碳的饮料可倒入另一灭菌容器内，口勿盖紧，覆盖一灭菌纱布，轻轻摇荡。待气体全部逸出后，进行检验。

5.3 检验方法

- 菌落总数测定：按 GB/T 4789.2 执行；
- 大肠菌群测定：按 GB/T 4789.3 执行；
- 沙门氏菌检验：按 GB/T 4789.4 执行；
- 志贺氏菌检验：按 GB/T 4789.5 执行；
- 金黄色葡萄球菌检验：按 GB / T 4789 . 10 执行；

实验十六 食品卫生微生物学检验 调味品检验

(GB/T4789.22-2003)

1 范围

本标准规定了调味品的检验方法。

本标准适用于调味品(包括酱油、酱类和醋等以豆类及其他粮食作物为原料发酵制成的)及水产调味品的检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 4789.1 食品卫生微生物学检验总则

GB/T 4789.2 食品卫生微生物学检验菌落总数测定

GB/T 4789.3 食品卫生微生物学检验大肠菌群测定

GB/T 4789.4 食品卫生微生物学检验沙门氏菌检验

GB/T 4789.5 食品卫生微生物学检验志贺氏菌检验

GB/T 4789.7 食品卫生微生物学检验副溶血性弧菌检验

GB/T 4789.10 食品卫生微生物学检验金黄色葡萄球菌检验

3 设备和材料

3.1 现场采样用品

按实际需要准备。

3.2 实验室检验用品

见 GB/T 4789.2、 GB/T 4789.3、 GB/T 4789.4、 GB/T 4789.5、 GB/T 4789.7、 GB/T 4789.10。

4 培养基和试剂

见 GB/T 4789.2、 GB/T 4789.3、 GB/T 4789.4、 GB/T 4789.5、 GB/T 4789.7、 GB / T 4789.10 和 20~30%灭菌碳酸钠溶液。

5 操作步骤

5.1 样品的采集与送检

样品送往化验室后应立即检验或放置冰箱暂存。

5.2 样品采取数量

按 GB / T 4789.1 执行。

5.3 检样的处理

5.3.1 瓶装样品：用点燃的酒精棉球烧灼瓶口灭菌，用石炭酸纱布盖好，再用灭菌开瓶器将盖启开，袋装样品用 75 %棉球消毒袋口后进行检验。

5.3.2 酱类：用无菌操作称取 25g，放入灭菌容器内，加入 225mL 蒸馏水，吸取酱油 25mL，加入灭菌 225mL 蒸馏水，制成混悬液。

5.3.3 食醋：用 20~30%灭菌碳酸钠溶液调 pH 值到中性。

5.4 检验方法

- 菌落总数测定：按 GB / T 4789 .2 执行；
- 大肠菌群测定：按 GB / T 4789 .3 执行；
- 沙门氏菌检验：按 GB / T 4789 .4 执行；
- 志贺氏菌检验：按 GB / T 4789 .5 执行；
- 副溶血性弧菌检验：按 GB / T 4789 .7 执行；
- 金黄色葡萄球菌检验：按 GB / T 4789 .10 执行；

实验十七 食品卫生微生物学检验 奶油检验

本标准适用于从牛乳分离出的稀奶油，经杀菌、成熟、搅拌、压炼而成的脂肪制品。

1 样品的准备 样品应避免暴露在空气和阳光下，并尽可能迅速地进行分析。将采取的样品放在一个带盖的密闭的容器中，在 32~37℃水浴中溶化，经常从水浴中取出振荡，直到奶油成为均匀糊状液体，冷却至室温后待检。

2 检验方法

2.1 水分的测定

2.1.1 用具及其准备：同 GB 5413—85《乳粉公验方法》2.3.1 款。

2.1.2 于已恒重铝皿中称取样品 2 g（准确至 0.2 mg），置于 98~100℃烘箱中，干燥 1 h，取出，放入干燥器中，冷却 25min 或 30min，称重。再置于烘箱中干燥 1 h 后取出，冷却，称重。如此重复至前后两次重量差不超过 2 mg 为止。

计算同 GB 5413—85 2.3.2 款。试验平行误差不应大于 0.05%。

如用其他方法测定时，在测定结果后需注明所用方法。注：测水后的血和样品，应留作非脂固体用。

2.2 非脂固体的测定

2.2.1 仪器：2 号或 3 号细菌漏斗，洗净，在 100℃烘箱干燥后冷却，称重。

2.2.2 试剂：石油醚，分析纯，沸程 30~60℃。

2.2.3 方法

在已测水分后的样皿中加入 25ml 石油醚，用玻璃棒充分搅拌，将溶液及残渣都移入已恒重的细菌漏斗中。用 15~20ml 石油醚洗涤皿数次，洗液也并入漏斗中，在吸滤瓶中抽干，用洗瓶（瓶内装石油醚）洗去漏斗内外壁的脂肪。取出漏斗于 98~100℃烘箱中烘干，30min 后取出，冷却，称重。如此重复干燥、冷却、称重，直至前后两次重量相差小于 2 mg 为止。非脂固体按式（1）计算。

2.3 脂肪的测定

2.3.1 罗兹 哥特里法

2.3.1.1 仪器：同 GB 5413—85 2.4.1.1 项。

2.3.1.2 试剂

a. 乙醚：分析纯 b. 石油醚：分析纯，沸程 30~60℃

c. 95%乙醇。 d. 10%氢氧化铵溶液。

2.3.1.3 方法

称取样品约 1 g（准确至 0.2mg）于抽脂瓶中，加水 10ml，置于温水浴中，使脂肪熔

化，加入 1 ml 10% 的氢氧化铵溶液，充分摇匀。于 60℃ 水浴中加热 2 min，取出，摇匀。再加入 10 ml 乙醚，再加以摇匀，冷却后用乙醇和石油醚进行提取，其方法及结果计算同 GB 5413—85 2.4.1.3 项。

2.3.2 盖勃乳脂计法

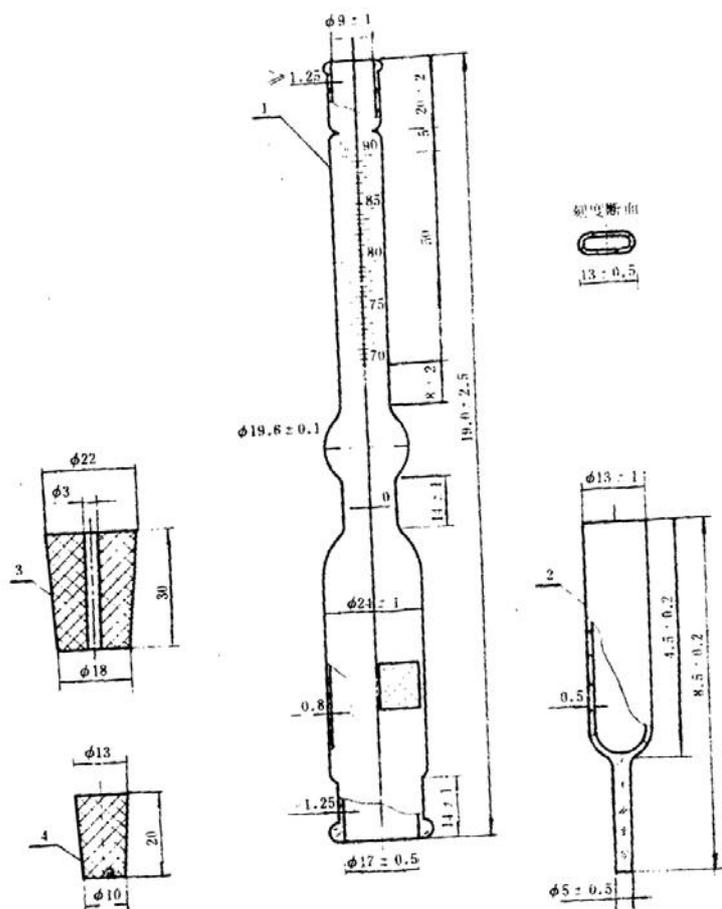
2.3.2.1 仪器：除盖勃奶油乳脂计外，其余同 GB 5413—85 2.4.2.1.1 内容。

2.3.2.2 试剂

- a. 硫酸：比重 1.60。
- b. 异戊醇：比重 0.8090~0.8115。

2.3.2.3 方法

在奶油乳脂计的称量管中，称取样品 4.5g（准确至 10 mg）。在奶油乳脂计中加入 2ml 水，18ml 比重 1.60 的硫酸。加 1 ml 异戊醇，将称量管严密地插入奶油乳脂计中，混合，于 80℃ 水浴加热使奶油完全溶解。离心 5 min（离心因数与奶粉相同），65℃ 保温 15min，读取脂肪柱所占刻度数。



2.4 酸度的测定

奶油酸度 ($^{\circ}\text{T}$) 以中和 100 g 奶油所消耗的 0.1 N 氢氧化钠溶液的毫升数计。

2.4.1 试剂

同 GB 5413—85 2.5.2 款。

2.4.2 方法

称取 10 g (准确至 0.01 g) 奶油, 加入中性乙醇、乙醚各 15ml, 加入 0.5% 酚酞指示剂 3 滴, 用 0.1N 的氢氧化钠溶液滴定至微红色, 1 min 内不褪色为止。

计算:

2.5 食盐的测定

2.5.1 试剂

2.5.1.1 0.1 N 硝酸银标准溶液: 称取约 17 g 硝酸银, 以水溶解后移入 1000ml 棕色容量瓶中, 用水稀释至刻度, 保存于暗处。

标定方法: 准确称取 0.15~0.16 g 氯化钠 (或氯化钾), 加水 30ml, 使之溶解后加 10% 铬酸钾指示剂 0.5 ml, 然后用制备的硝酸银溶液滴定至红砖色为止。

计算公式:

2.5.1.2 10% 铬酸钾。

2.5.2 方法

称取样品 1 g (准确至 1 mg), 置于分液漏斗中, 用 50 $^{\circ}\text{C}$ 温水洗涤不少于 5 次, 每次用 20~30ml, 将洗液一并转入 250 ml 容量瓶中, 冷却至 20 $^{\circ}\text{C}$ 稀释至刻度, 然后吸取 25ml 于 250ml 三角瓶中, 加 10% 铬酸钾 3 滴, 用 0.1 N 硝酸银标准溶液滴定到红砖色为止。

计算:

2.6 汞的测定

同 GB 5413—85 2.10 条。

2.7 六六六的测定

同 GB 5413—85 2.11 条。

2.8 滴滴涕的测定

同 GB 5413—85 2.11 条。

2.9 微生物的检验 奶油微生物的检验包括细菌总数、霉菌、大肠菌群和致病菌等, 按 GB 5408—85 《消毒牛乳》附录 B (补充件) 进行。

实验十八 食品卫生微生物学检验单核细胞增生李斯特氏菌检验

食品安全国家标准

(GB 4789.30—2010)

食品微生物学检验

单核细胞增生李斯特氏菌检验

National food safety standard

Food microbiological examination: *Listeria monocytogenes*

前 言

本标准代替 GB/T 4789.30-2008《食品卫生微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.30-2008 相比，主要变化如下：

- 修改了标准的中英文名称；
- 删除“第二法 全自动酶链荧光免疫分析仪筛选法”；
- 删除“第三法 全自动病原菌检测系统筛选法”。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准所代替标准的历年版本发布情况为：

- GB 4789.30-1994、GB/T 4789.30-2003、GB/T 4789.30-2008。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验

1 范围

本标准规定了食品中单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)的检验方法。

本标准适用于食品中单核细胞增生李斯特氏菌的检验。

2 设备和材料

除微生物实验室常规无菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

- 2.1 冰箱: 2 °C~5 °C。
- 2.2 恒温培养箱: 30 °C±1 °C、36 °C±1 °C。
- 2.3 均质器。
- 2.4 显微镜: 10×~100×。
- 2.5 电子天平: 感量 0.1 g。
- 2.6 锥形瓶: 100 mL、500 mL。
- 2.7 无菌吸管: 1 mL (具 0.01 mL 刻度)、10 mL (具 0.1 mL 刻度)。
- 2.8 无菌平皿: 直径 90 mm。
- 2.9 无菌试管: 16 mm×160 mm。
- 2.10 离心管: 30 mm×100 mm。
- 2.11 无菌注射器: 1 mL。
- 2.12 金黄色葡萄球菌 (ATCC25923)。
- 2.13 马红球菌 (*Rhodococcus equi*)。
- 2.14 小白鼠: 16 g~18 g。
- 2.15 全自动微生物生化鉴定系统。

3 培养基和试剂

- 3.1 含 0.6%酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤 (TSB-YE): 见附录 A 中 A.1。
- 3.2 含 0.6%酵母浸膏的胰酪胨大豆琼脂 (TSA-YE): 见附录 A 中 A.2。
- 3.3 李氏增菌肉汤 LB (LB1, LB2): 见附录 A 中 A.3。
- 3.4 1%盐酸吡啶黄 (acriflavine HCl) 溶液: 见附录 A 中 A.3.2.1。
- 3.5 1%萘啶酮酸钠盐 (naladixic acid) 溶液: 见附录 A 中 A.3.2.1。
- 3.6 PALCAM 琼脂: 见附录 A 中 A.4。
- 3.7 革兰氏染液: 见附录 A 中 A.5。
- 3.8 SIM 动力培养基: 见附录 A 中 A.6。
- 3.9 缓冲葡萄糖蛋白胨水[甲基红 (MR) 和 V-P 试验用]: 见附录 A 中 A.7。
- 3.10 5%~8%羊血琼脂: 见附录 A 中 A.8。

3.11 糖发酵管：见附录 A 中 A.9。

3.12 过氧化氢酶试验：见附录 A 中 A.10。

3.13 李斯特氏菌显色培养基。

3.14 生化鉴定试剂盒。

4. 检验程序

单核细胞增生李斯特氏菌检验程序见图 1。

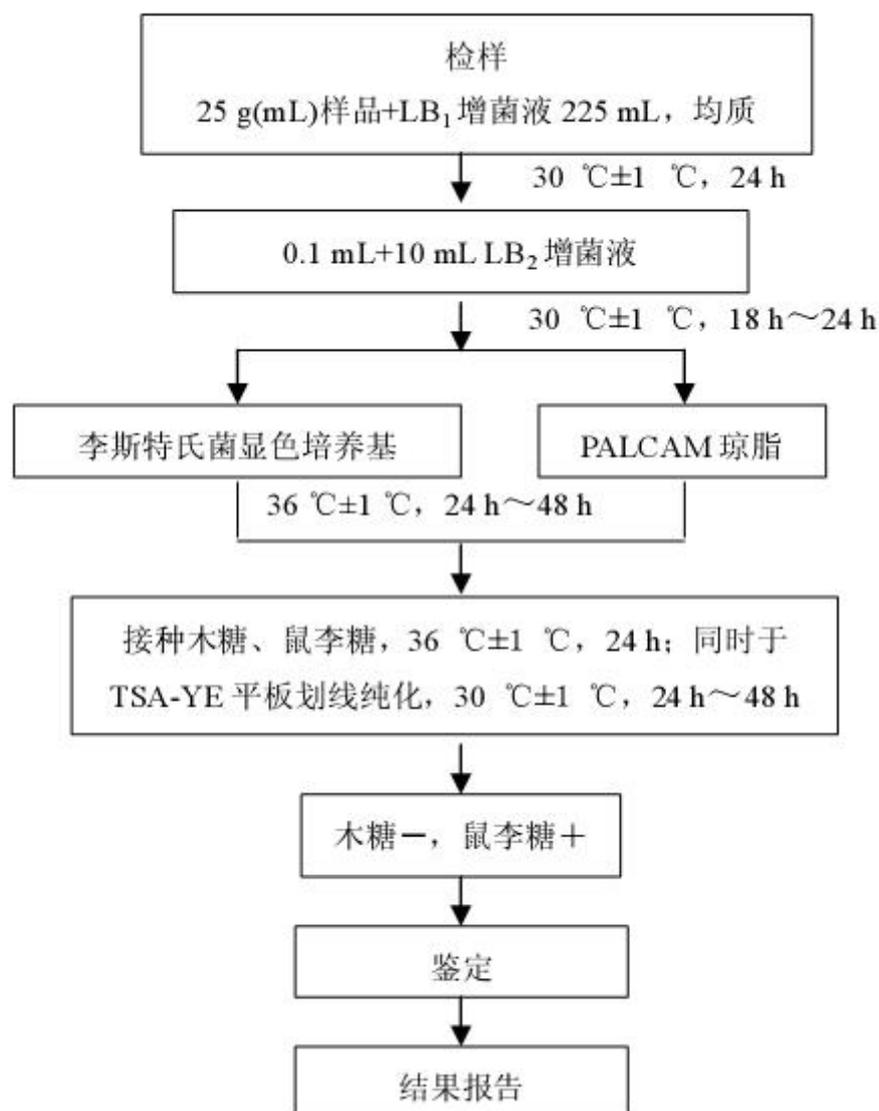


图 1 单核细胞增生李斯特氏菌检验程序

5 操作步骤

5.1 增菌

以无菌操作取样品 25 g (mL) 加入到含有 225 mL LB₁ 增菌液的均质袋中，在拍击式均质器上连续均质 1 min~2 min；或放入盛有 225 mL LB₁ 增菌液的均质杯中，8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min。于 30 °C ± 1 °C 培养 24 h，移取 0.1 mL，转种于 10 mL LB₂ 增菌液内，于 30 °C ± 1 °C 培养 18 h~24 h。

5.2 分离

取 LB2 二次增菌液划线接种于 PALCAM 琼脂平板和李斯特氏菌显色培养基上，于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~48 h，观察各个平板上生长的菌落。典型菌落在 PALCAM 琼脂平板上为小的圆形灰绿色菌落，周围有棕黑色水解圈，有些菌落有黑色凹陷；典型菌落在李斯特氏菌显色培养基上的特征按照产品说明进行判定。

5.3 初筛

自选择性琼脂平板上分别挑取 5 个以上典型或可疑菌落，分别接种在木糖、鼠李糖发酵管，于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h；同时在 TSA-YE 平板上划线纯化，于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~48 h。选择木糖阴性、鼠李糖阳性的纯培养物继续进行鉴定。

5.4 鉴定

5.4.1 染色镜检：李斯特氏菌为革兰氏阳性短杆菌，大小为 $(0.4\text{ }\mu\text{m}\sim 0.5\text{ }\mu\text{m})\times(0.5\text{ }\mu\text{m}\sim 2.0\text{ }\mu\text{m})$ ；用生理盐水制成菌悬液，在油镜或相差显微镜下观察，该菌出现轻微旋转或翻滚样的运动。

5.4.2 动力试验：李斯特氏菌有动力，呈伞状生长或月牙状生长。

5.4.3 生化鉴定：挑取纯培养的单个可疑菌落，进行过氧化氢酶试验，过氧化氢酶阳性反应的菌落继续进行糖发酵试验和 MR-VP 试验。单核细胞增生李斯特氏菌的主要生化特征见表 1。

表 1 单核细胞增生李斯特氏菌生化特征与其他李斯特氏菌的区别

菌种	溶血反应	葡萄糖	麦芽糖	MR VP	甘露醇	鼠李糖	木糖	七叶苷
单核细胞增生李斯特氏菌 (<i>L. monocytogenes</i>)	+	+	+	+/+	-	+	-	+
格氏李斯特氏菌 (<i>L. grayi</i>)	-	+	+	+/+	+	-	-	+
斯氏李斯特氏菌 (<i>L. seeligeri</i>)	+	+	+	+/+	-	-	+	+
威氏李斯特氏菌 (<i>L. welshimeri</i>)	-	+	+	+/+	-	V	+	+
伊氏李斯特氏菌 (<i>L. ivanovii</i>)	+	+	+	+/+	-	-	+	+
英诺克李斯特氏菌 (<i>L. innocua</i>)	-	+	+	+/+	-	V	-	+

注：+阳性；-阴性；V 反应不定。

5.4.4 溶血试验：将羊血琼脂平板底面划分为 20 个~25 个小格，挑取纯培养的单个可疑菌落刺种到血平板上，每格刺种一个菌落，并刺种阳性对照菌(单增李斯特氏菌和伊氏李斯特氏菌)和阴性对照菌(英诺克李斯特氏菌)，穿刺时尽量接近底部，但不要触到底面，同时避免琼脂破裂， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~48 h，于明亮处观察，单增李斯特氏菌和斯氏李斯特氏菌在刺种点周围产生狭小的透明溶血环，英诺克李斯特氏菌无溶血环，伊氏李斯特氏菌产生大的透明溶血环。

5.4.5 协同溶血试验 (cAMP)：在羊血琼脂平板上平行划线接种金黄色葡萄球菌和马红球菌，

挑取纯培养的单个可疑菌落垂直划线接种于平行线之间，垂直线两端不要触及平行线，于 30℃±1℃培养 24 h~48 h。单核细胞增生李斯特氏菌在靠近金黄色葡萄球菌的接种端溶血增强，斯氏李斯特氏菌的溶血也增强，而伊氏李斯特氏菌在靠近马红球菌的接种端溶血增强。

5.5 可选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统等对 5.3 中 3 个~5 个纯培养的可疑菌落进行鉴定。

5.6 小鼠毒力试验（可选择）

将符合上述特性的纯培养物接种于 TSB-YE 中，于 30℃±1℃培养 24 h，4000 r/min 离心 5 min，弃上清液，用无菌生理盐水制备成浓度为 10¹⁰ CFU/mL 的菌悬液，取此菌悬液进行小鼠腹腔注射 3 只~5 只，每只 0.5 mL，观察小鼠死亡情况。致病株于 2 d~5 d 内死亡。试验时可用已知菌作对照。单核细胞增生李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌对小鼠有致病性。

6 结果与报告

综合以上生化试验和溶血试验结果，报告 25 g（mL）样品中检出或未检出单核细胞增生李斯特氏菌。

附录 A

（规范性附录）

培养基和试剂

A.1 含 0.6%酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE)

A.1.1 成分

胰胨	17.0 g
多价胨	3.0 g
酵母膏	6.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1000 mL
pH 7.2~7.4	

A.1.2 制法

将上述各成分加热搅拌溶解，调节 pH，分装，121℃高压灭菌 15 min，备用。

A.2 含 0.6%酵母膏的胰酪胨大豆琼脂(TSA-YE)**A.2.1 成分**

胰胨	17.0 g
多价胨	3.0 g
酵母膏	6.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1000 mL
pH 7.2~7.4	

A.2.2 制法

将上述各成分加热搅拌溶解，调节 pH，分装，121 °C 高压灭菌 15 min，备用。

A.3 李氏增菌肉汤(LB1, LB2)**A.3.1 成分**

胰胨	5.0 g
多价胨	5.0 g
酵母膏	5.0 g
氯化钠	20.0 g
磷酸二氢钾	1.4 g
磷酸氢二钠	12.0 g
七叶苷	1.0 g
蒸馏水	1000 mL
pH 7.2~7.4	

A.3.2 制法

将上述成分加热溶解，调节 pH，分装，121 °C 高压灭菌 15 min，备用。

A.3.2.1 李氏 I 液 (LB1)225 mL 中加入：

1% 萘啶酮酸 (用 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液配制)	0.5 mL
1% 吡啶黄 (用无菌蒸馏水配制)	0.3 mL

A.3.2.2 李氏 II 液 (LB2)200 mL 中加入：

1% 萘啶酮酸	0.4 mL
1% 吡啶黄	0.5 mL

A.4 PALCAM**A.4.1 成分**

酵母膏	8.0 g
葡萄糖	0.5 g
七叶甙	0.8 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
甘露醇	10.0 g
酚红	0.1 g
氯化锂	15.0 g
酪蛋白胰酶消化物	10.0 g
心胰酶消化物	3.0 g
玉米淀粉	1.0 g
肉胃酶消化物	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2~7.4	

A.4.2 制法

将上述成分加热溶解，调节 pH，分装，121 °C 高压灭菌 15 min，备用。

A.4.2.1 PALCAM 选择性添加剂

多粘菌素 B	5.0 mg
盐酸吡啶黄	2.5 mg
头孢他啶	10.0 mg
无菌蒸馏水	500 mL

A.4.2.2 制法

将 PALCAM 基础培养基溶化后冷却到 50 °C，加入 2 mL PALCAM 选择性添加剂，混匀后倾倒在无菌的平皿中，备用。

A.5 革兰氏染色液**A.5.1 结晶紫染色液****A.5.1.1 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.5.1.2 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.5.2 革兰氏碘液

A.5.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

A.5.2.2 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.5.3 沙黄复染液**A.5.3.1 成分**

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.5.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.5.4 染色法

A.5.4.1 将纯培养的单个可疑菌落涂片，火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染 1 min，水洗。

A.5.4.2 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。

A.5.4.3 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.5.4.4 滴加复染液，复染 1 min，水洗、待干、镜检。

A.6 SIM 动力培养基**A.6.1 成分**

胰胨	20.0 g
多价胨	6.0 g
硫酸铁铵	0.2 g
硫代硫酸钠	0.2 g
琼脂	3.5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2	

A.6.2 制法

将上述各成分加热混匀，调节 pH，分装小试管，121 °C 高压灭菌 15 min，备用。

A.6.3 试验方法

挑取纯培养的单个可疑菌落穿刺接种到 SIM 培养基中，于 30 °C 培养 24 h~48 h，观察结果。

A.7 缓冲葡萄糖蛋白胨水(MR 和 VP 试验用)

A.7.1 成分

多肽	7.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钾	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.0	

A.7.2 制法

溶化后调节 pH，分装试管，每管 1 mL，121 °C 高压灭菌 15 min，备用。

A.7.3 甲基红 (MR) 试验**A.7.3.1 甲基红试剂****A.7.3.1.1 成分**

甲基红	10 mg
95 %乙醇	30 mL
蒸馏水	20 mL

A.7.3.1.2 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.7.3.1.3 试验方法

取适量琼脂培养物接种于本培养基，36 °C ± 1 °C 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.7.4 V-P 试验**A.7.4.1 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.7.4.2 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.7.4.3 试验方法

取适量琼脂培养物接种于本培养基，36 °C ± 1 °C 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 °C ± 1 °C 继续培养 4 h 再进行观察。

A.8 血琼脂**A.8.1 成分**

蛋白胨	1.0 g
牛肉膏	0.3 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	1.5 g

蒸馏水	100 mL
脱纤维羊血	5 mL~10 mL

A.8.2 制法

除新鲜脱纤维羊血外，加热溶化上述各组分，121 °C 高压灭菌 15 min，冷到 50 °C，以无菌操作加入新鲜脱纤维羊血，摇匀，倾注平板。

A.9 糖发酵管

A.9.1 成分

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	3.0 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.0 g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1000 mL

A.9.2 制法

A.9.2.1 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，调节 pH 至 7.4，115 °C 高压灭菌 15 min，备用。

A.9.2.2 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 高压灭菌 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.9.3 试验方法

取适量纯培养物接种于糖发酵管，36 °C ± 1 °C 培养 24 h~48 h，观察结果，蓝色为阴性，黄色为阳性。

A.10 过氧化氢酶试验

A.10.1 试剂

3% 过氧化氢溶液：临用时配制。

A.10.2 试验方法

用细玻璃棒或一次性接种针挑取单个菌落，置于洁净试管内，滴加 3% 过氧化氢溶液 2 mL，观察结果。

A.10.3 结果

于半分钟内发生气泡者为阳性，不发生气泡者为阴性。

实验十九 食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验

食品安全国家标准

(GB 4789.40—2010)

食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验

National food safety standard

Food microbiological examination: *Enterobacter sakazakii*

前 言

本标准代替 GB/T 4789.40-2008 《食品卫生微生物学检验 阪崎肠杆菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.40-2008 相比，主要变化如下：

——修改了标准的中英文名称；

——删除了附录 A 中 A.3。

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 4789.40-2008。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验

1 范围

本标准规定了食品中阪崎肠杆菌（*Enterobacter sakazakii*）的检验方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品、乳和乳制品及其原料中阪崎肠杆菌的检验。

2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- 2.1 恒温培养箱：25 ℃±1 ℃，36 ℃±1 ℃，44 ℃±0.5 ℃。
- 2.2 冰箱：2 ℃~5 ℃。
- 2.3 恒温水浴箱：44 ℃±0.5 ℃。
- 2.4 天平：感量 0.1 g。
- 2.5 均质器。
- 2.6 振荡器。
- 2.7 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）或微量移液器及吸头。
- 2.8 无菌锥形瓶：容量 100 mL、200 mL、2000 mL。
- 2.9 无菌培养皿：直径 90 mm。
- 2.10 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。
- 2.11 全自动微生物生化鉴定系统。

3 培养基和试剂

- 3.1 缓冲蛋白胨水（buffer peptone water, BPW）：见附录 A 中 A.1。
- 3.2 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素（modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium, mLST-Vm）：见附录 A 中 A.2。
- 3.3 阪崎肠杆菌显色培养基。
- 3.4 胰蛋白胨大豆琼脂（trypticase soy agar, TSA）：见附录 A 中 A.3。
- 3.5 生化鉴定试剂盒。
- 3.6 氧化酶试剂：见附录 A 中 A.4。
- 3.7 L-赖氨酸脱羧酶培养基：见附录 A 中 A.5。
- 3.8 L-鸟氨酸脱羧酶培养基：见附录 A 中 A.6。
- 3.9 L-精氨酸双水解酶培养基：见附录 A 中 A.7。
- 3.10 糖类发酵培养基：见附录 A 中 A.8。
- 3.11 西蒙氏柠檬酸盐培养基：见附录 A 中 A.9。

第一法 阪崎肠杆菌的检验

4 检验程序

阪崎肠杆菌检验程序见图 1。

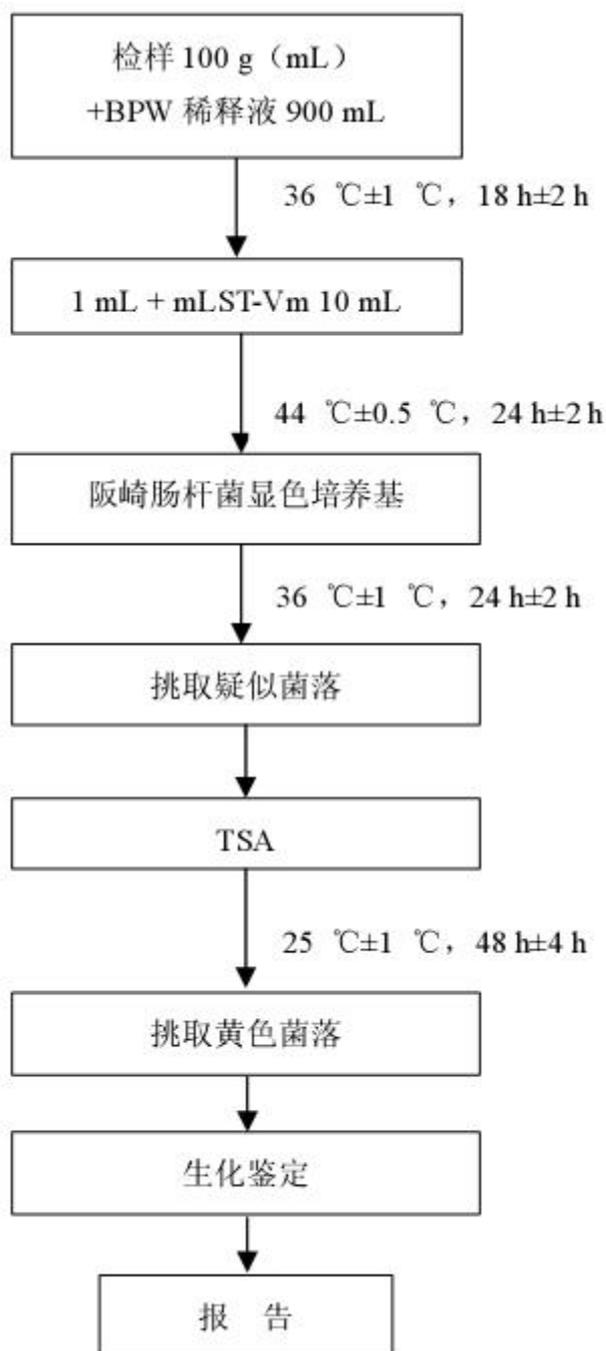


图 1 阪崎肠杆菌检验程序

5 操作步骤

5.1 前增菌和增菌

取检样 100 g (mL) 加入已预热至 44 °C 装有 900 mL 缓冲蛋白胨水的锥形瓶中，用

实验十九 食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验

手缓缓地摇动至充分溶解，36℃±1℃培养 18 h±2 h。移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤，44℃±0.5℃培养 24 h±2 h。

5.2 分离

5.2.1 轻轻混匀 mLST-Vm 肉汤培养物，各取增菌培养物 1 环，分别划线接种于两个阪崎肠杆菌显色培养基平板，36℃±1℃培养 24 h±2 h。

5.2.2 挑取 1 个~5 个可疑菌落，划线接种于 TSA 平板。25℃±1℃培养 48 h±4 h。

5.3 鉴定

自 TSA 平板上直接挑取黄色可疑菌落，进行生化鉴定。阪崎肠杆菌的主要生化特征见表 1。可选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统。

表 1 阪崎肠杆菌的主要生化特征

生化试验		特征
黄色素产生		+
氧化酶		-
L-赖氨酸脱羧酶		-
L-鸟氨酸脱羧酶		(+)
L-精氨酸双水解酶		+
柠檬酸水解		(+)
发酵	D-山梨醇	(-)
	L-鼠李糖	+
	D-蔗糖	+
	D-蜜二糖	+
	苦杏仁甙	+

注：+>99%阳性；->99%阴性；(+) 90%—99%阳性；(-) 90%—99%阴性。

6 结果与报告

综合菌落形态和生化特征，报告每 100 g (mL) 样品中检出或未检出阪崎肠杆菌。

第二法 阪崎肠杆菌的计数

7 操作步骤

7.1 样品的稀释

7.1.1 固体和半固体样品：无菌称取样品 100 g、10 g、1 g 各三份，加入已预热至 44℃ 分别盛有 900 mL、90 mL、9 mL BPW 中，轻轻振摇使充分溶解，制成 1:10 样品匀液，置 36℃±1℃培养 18 h±2 h。分别移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤，44℃±0.5℃培养 24 h±2 h。

7.1.2 液体样品：以无菌吸管分别取样品 100 mL、10 mL、1 mL 各三份，加入已预热至 44℃ 分别盛有 900 mL、90 mL、9 mL BPW 中，轻轻振摇使充分混匀，制成 1:10 样品匀液，置 36℃±1℃培养 18 h±2 h。分别移取 1 mL 转种于 10 mL mLST-Vm 肉汤，44℃±0.5℃培养 24 h±2 h。

7.2 分离、鉴定

同 5.2, 5.3。

8 结果与报告

综合菌落形态、生化特征, 根据证实为阪崎肠杆菌的阳性管数, 查 MPN 检索表, 报告每 100 g (mL) 样品中阪崎肠杆菌的 MPN 值 (见附录 B 中表 B.1)。

附录 A

(规范性附录)

培养基和试剂

A.1 缓冲蛋白胨水 (BPW)

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.2

A.1.2 制法

加热搅拌至溶解, 调节 pH, 121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素 (Modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium, mLST-Vm)

A.2.1 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨 (mLST) 肉汤

A.2.1.1 成分

氯化钠	34.0 g
胰蛋白胨	20.0 g
乳糖	5.0 g
磷酸二氢钾	2.75 g
磷酸氢二钾	2.75 g
十二烷基硫酸钠	0.1 g
蒸馏水	1000 mL

pH 6.8±0.2

A.2.1.2 制法

加热搅拌至溶解，调节 pH。分装每管 10 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2.2 万古霉素溶液

A.2.2.1 成分

万古霉素	10.0 mg
蒸馏水	10.0 mL

A.2.2.2 制法

10.0 mg 万古霉素溶解于 10.0 mL 蒸馏水，过滤除菌。万古霉素溶液可以在 0 °C ~ 5 °C 保存 15 天。

A.2.3 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤-万古霉素 (Modified lauryl sulfate tryptose broth-vancomycin medium, mLST-Vm)

每 10 mL mLST 加入万古霉素溶液 0.1 mL，混合液中万古霉素的终浓度为 10 μg/mL。

注：mLST-Vm 必须在 24 h 之内使用。

A.3 胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA)

A.3.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
植物蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.3±0.2

A.3.2 制法

加热搅拌至溶解，煮沸 1 min，调节 pH，121 °C 高压 15 min。

A.4 氧化酶试剂

A.4.1 成分

N,N,N',N'-四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
蒸馏水	100 mL

A.4.2 制法

少量新鲜配制，于冰箱内避光保存，在 7 d 之内使用。

A.4.3 试验方法

用玻璃棒或一次性接种针挑取单个特征性菌落，涂布在氧化酶试剂湿润的滤纸平板上。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.5 L-赖氨酸脱羧酶培养基

A.5.1 成分

L-赖氨酸盐酸盐 (L-lysine monohydrochloride)	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1000 mL
pH 6.8±0.2	

A.5.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 5 mL，121 °C 高压 15 min。

A.5.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-赖氨酸脱羧酶培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h，观察结果。L-赖氨酸脱羧酶试验阳性者，培养基呈紫色，阴性者为黄色。

A.6 L-鸟氨酸脱羧酶培养基

A.6.1 成分

L-鸟氨酸盐酸盐 (L-ornithine monohydrochloride)	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1000 mL
pH 6.8±0.2	

A.6.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 5 mL。121 °C 高压 15 min。

A.6.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-鸟氨酸脱羧酶培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h，观察结果。L-鸟氨酸脱羧酶试验阳性者，培养基呈紫色，阴性者为黄色。

A.7 L-精氨酸双水解酶培养基

A.7.1 成分

L-精氨酸盐酸盐 (L-arginine monohydrochloride)	5.0 g
酵母浸膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
蒸馏水	1000 mL

pH 6.8±0.2

A.7.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 5 mL。121 °C 高压 15 min。

A.7.3 实验方法

挑取培养物接种于 L-精氨酸脱羧酶培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h，观察结果。L-精氨酸脱羧酶试验阳性者，培养基呈紫色，阴性者为黄色。

A.8 糖类发酵培养基

A.8.1 基础培养基

A.8.1.1 成分

酪蛋白（酶消化）	10.0 g
氯化钠	5.0 g
酚红	0.02 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 6.8±0.2

A.8.1.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 5 mL。121 °C 高压 15 min。

A.8.2 糖类溶液（D-山梨醇、L-鼠李糖、D-蔗糖、D-蜜二糖、苦杏仁甙）

A.8.2.1 成分

糖	8.0 g
蒸馏水	100 mL

A.8.2.2 制法

分别称取 D-山梨醇、L-鼠李糖、D-蔗糖、D-蜜二糖、苦杏仁甙等糖类成分各 8 g，溶于 100 mL 蒸馏水中，过滤除菌，制成 80 mg/mL 的糖类溶液。

A.8.3 完全培养基

A.8.3.1 成分

基础培养基	875 mL
糖类溶液	125 mL

A.8.3.2 制法

无菌操作，将每种糖类溶液加入基础培养基，混匀；分装到无菌试管中，每管 10 mL。

A.8.4 实验方法

挑取培养物接种于各种糖类发酵培养基，刚好在液体培养基的液面下。30 °C ± 1 °C 培养 24 h ± 2 h，观察结果。糖类发酵试验阳性者，培养基呈黄色，阴性者为红色。

A.9 西蒙氏柠檬酸盐培养基

A.9.1 成分

实验十九 食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验

柠檬酸钠	2.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
磷酸二氢铵	1.0 g
硫酸镁	0.2 g
溴百里香酚蓝	0.08 g
琼脂	8.0 g~18.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	6.8±0.2

A.9.2 制法

将各成分加热溶解，必要时调节 pH。每管分装 10 mL，121 °C 高压 15 min，制成斜面。

A.9.3 实验方法

挑取培养物接种于整个培养基斜面，36 °C±1 °C 培养 24 h±2 h，观察结果。阳性者培养基变为蓝色。

附录 B

(规范性附录)

阪崎肠杆菌最可能数 (MPN) 检索表

B.1 阪崎肠杆菌最可能数 (MPN) 检索表

每 100 g (mL) 检样中阪崎肠杆菌最可能数 (MPN) 的检索见表 B.1。

表 B.1 阪崎肠杆菌最可能数 (MPN) 检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
100	10	1		下限	上限	100	10	1		下限	上限
0	0	0	<0.3	--	0.95	2	2	0	2.1	0.45	4.2
0	0	1	0.3	0.015	0.96	2	2	1	2.8	0.87	9.4
0	1	0	0.3	0.015	1.1	2	2	2	3.5	0.87	9.4
0	1	1	0.61	0.12	1.8	2	3	0	2.9	0.87	9.4
0	2	0	0.62	0.12	1.8	2	3	1	3.6	0.87	9.4
0	3	0	0.94	0.36	3.8	3	0	0	2.3	0.46	9.4
1	0	0	0.36	0.017	1.8	3	0	1	3.8	0.87	11
1	0	1	0.72	0.13	1.8	3	0	2	6.4	1.7	18
1	0	2	1.1	0.36	3.8	3	1	0	4.3	0.9	18
1	1	0	0.74	0.13	2	3	1	1	7.5	1.7	20
1	1	1	1.1	0.36	3.8	3	1	2	12	3.7	42
1	2	0	1.1	0.36	4.2	3	1	3	16	4	42
1	2	1	1.5	0.45	4.2	3	2	0	9.3	1.8	42
1	3	0	1.6	0.45	4.2	3	2	1	15	3.7	42
2	0	0	0.92	0.14	3.8	3	2	2	21	4	43
2	0	1	1.4	0.36	4.2	3	2	3	29	9	100
2	0	2	2	0.45	4.2	3	3	0	24	4.2	100
2	1	0	1.5	0.37	4.2	3	3	1	46	9	200
2	1	1	2	0.45	4.2	3	3	2	110	18	410
2	1	2	2.7	0.87	9.4	3	3	3	>110	42	--

注 1: 本表采用 3 个检样量[100 g(mL)、10 g(mL)和 1 g(mL)], 每个检样量接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1 000 g(mL)、10 g(mL)、和 1 g(mL)时, 表内数字应相应降低 10 倍; 如改用 10 g(mL)、1 g(mL)、和 0.1 g(mL) 时, 则表内数字应相应增高 10 倍, 其余类推。

附录:

中华人民共和国国家标准食品卫生微生物学检验染色法、培养基和试剂
(GB 4789.28-94)

1 主题内容与适用范围 本标准规定了各种染色法、培养基和试剂。本标准适用于食品和食物中毒样品中各类微生物的检验。

2 染色液配制及染色法

2.1 美蓝染色法

2.1.1 吕氏碱性美蓝染色液

美蓝	0.3g
95%乙醇	30mL
0.01%氢氧化钾溶液	100mL

将美蓝溶解于乙醇中，然后与氢氧化钾溶液混合。

2.1.2 染色法

将涂片在火焰上固定，待冷。滴加染液，染 **1~3min**，水洗，待干，镜检。

2.1.3 结果 菌体呈蓝色。

2.2 革兰氏染色法

2.2.1 结晶紫染色液

结晶紫	1g
95%乙醇	20mL
1%草酸铵水溶液	80mL

将结晶紫溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

2.2.2 革兰氏碘液

碘	1g
碘化钾	2g
蒸馏水	300mL

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**300mL**。

2.2.3 沙黄复染液

沙黄	0.25g
95%乙醇	10mL
蒸馏水	90mL

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

2.2.4 染色法

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

2.2.4.2 滴加革兰氏碘液，作用 **1min**，水洗。

2.2.4.3 滴加 **95%乙醇**脱色，约 **30s**；或将乙醇滴满整个涂片，立即倾去，再用乙醇滴满整个涂片，脱色 **10s**。

2.2.4.4 水洗，滴加复染液，复染 **1min**。水洗，待干，镜检。

2.2.5 结果 革兰氏阳性菌呈紫色。革兰氏阴性菌呈红色。

注：亦可用 **1:10** 稀释石炭酸复红染色液作复染液，复染时间仅需 **10s**。

2.3 耐酸性染色法(萋-倪二氏法)**2.3.1 石炭酸品红染色液**

碱性品红	0.3g
95%乙醇	10mL
5%酚水溶液	90mL

将品红溶解于乙醇中，然后与酚溶液混合。

2.3.2 3%盐酸-乙醇

浓盐酸	3mL
95%乙醇	97mL

2.3.3 复染液 吕氏碱性美蓝染色液。**2.3.4 染色法**

2.3.4.1 将涂片在火焰上加热固定，滴加石炭酸品红染色液，徐徐加热至有蒸气出现，但切不可使沸腾。染液如因蒸发减少时，应随时添加。染 **5min**，倾去染液，水洗。

2.3.4.2 滴加盐酸-乙醇脱色，直至无红色脱落为止(所需时间视涂片厚薄而定，一般为**1~3min**)，水洗。

2.3.4.3 滴加吕氏碱性美蓝染色液，复染 **30s~1min**，水洗，待干，镜检。

2.3.5 结果：耐酸性细菌呈红色，其他细菌、细胞等物质呈蓝色。

2.4 柯氏染色法**2.4.1 染色液**

- 2.4.1.1** **0.5%沙黄液。**
2.4.1.2 **0.5%孔雀绿液。**

2.4.2 染色法

2.4.2.1 将涂片在火焰上固定，滴加 **0.5%沙黄液**，并加热至出现气泡，约 **2~3min**，水洗。

2.4.2.2 滴加 **0.5%孔雀绿液**，复染 **40~50s**。水洗，待干，镜检。

2.4.3 结果：布氏杆菌呈红色，其他细菌及细胞呈绿色。

2.5 奥尔特氏荚膜染色法**2.5.1 染色液**

沙黄	3g
蒸馏水	100mL

用乳钵研磨溶解。

2.5.2 染色法

将涂片在火焰上固定，滴加染色液，并加热至产生蒸气后，继续染 **3min**。水洗，待干，镜检。

2.5.3 结果 炭疽芽胞杆菌菌体呈赤褐色，荚膜呈黄色。

2.6 瑞氏染色法**2.6.1 染色液**

瑞氏色素	0.1g
甲醇	60mL

用乳钵研磨溶解。

2.6.2 染色法

2.6.2.1 涂片待自然干燥后，滴加染色液，固定 **1min**。

2.6.2.2 加入等量蒸馏水(**pH6.5**)，染色 **3~5min**。

2.6.2.3 用蒸馏水冲洗，待干，镜检。

2.7 鞭毛染色法**2.7.1 染色液的配制**

2.7.1.1 甲液：称丹宁酸 **5g**、氯化高铁(**FeCl₃**)**1.5g**，溶于 **100mL** 蒸馏水中，待溶解后加入 **1%**的氢氧化

钠溶液 1mL 和 15%的甲醛溶液 2mL。

2.7.1.2 乙液：称 2g 硝酸银溶于100mL 蒸馏水中。

在 90mL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 10mL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，2~3d 基本无效。

2.7.2 染色法

在风干的载玻片上滴加甲液，4~6min 后，用蒸馏水轻轻冲净。再加乙液，缓缓加热至冒汽，维持约半分钟(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，干后镜检，菌体及鞭毛为深褐色到黑色。

2.8 碱性复红染色法

将 0.5g 碱性复红染料溶解于 20mL95%乙醇中，然后用蒸馏水稀释至 100mL。如有不溶物时，可用滤纸过滤，或静置后取上清液备用。

注：本染色液系用于苏云金芽胞内蛋白质毒素结晶的染色，藉以与蜡样芽胞杆菌相区别。

3 生化试验培养基和试剂

3.1 Hugh-Leifson 培养基(O/F 试验用)

3.1.1 成分

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

pH7.2

3.1.2 制法

将蛋白胨和盐类加水溶解后，校正 pH 至 7.2。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℃高压灭菌 15min，直立凝固备用。

3.1.3 试验方法 从斜面上挑取小量培养物作穿刺接种，同时接种两支培养基，其中一支于接种后滴加溶化的 1%琼脂液于表面，高度约 1cm，于 36±1℃培养。

3.1.4 结果

反应类型	开口的培养	
	基	基
发酵型(F)	产酸	产酸
氧化型(O)	不变	产酸
产碱型(A)	不变	不变

3.2 糖发酵管

3.2.1 成分

牛肉膏	5g
蛋白胨	10g
氯化钠	3g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	2g
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	12mL
蒸馏水	1 000mL

pH7.4**3.2.2 制法**

3.2.2.1 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,**121℃**高压灭菌 **15min**。

3.2.2.2 其他各种糖发酵管可按上述成分配好后,分装每瓶 **100mL**, **121℃**高压灭菌 **15min**。另将各种糖类分别配好 **10%**溶液,同时高压灭菌。将 **5mL** 糖溶液加入于 **100mL** 培养基内,以无菌操作分装小试管。

注:蔗糖不纯,加热后会自行水解者,应采用过滤法除菌。

3.2.3 试验方法:从琼脂斜面上挑取少量培养物接种,于 **36±1℃**培养,一般观察 **2~3d**。迟缓反应需观察 **14~30d**。

3.3 ONPG 培养基**3.3.1 成分**

邻硝基酚 β-D-半乳糖苷(ONPG)	60mg
0.01mol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.5)	10mL
1% 蛋白胨水(pH7.5)	30mL

3.3.2 制法

将 **ONPG** 溶于缓冲液内,加入蛋白胨水,以过滤法除菌,分装于 **10mm×75mm** 试管,每管**0.5mL**,用橡皮塞塞紧。

3.3.3 试验方法

自琼脂斜面上挑取培养物 **1** 满环接种,于 **36±1℃**培养 **1~3h** 和 **24h** 观察结果。如果 β-半乳糖苷酶产生,则于 **1~3h** 变黄色,如无此酸则 **24h** 不变色。

3.4 缓冲葡萄糖蛋白胨水(MR 和 VP 试验用)**3.4.1 成分**

磷酸氢二钾	5g
多胨	7g
葡萄糖	5g
蒸馏水	1 000mL

pH7.0**3.4.2 制法**

溶化后校正 **pH**,分装试管,每管 **1mL**,**121℃**高压灭菌 **15min**。

3.4.3 甲基红(MR)试验

自琼脂斜面挑取少量培养物接种本培养基中,于 **36±1℃**培养 **2~5d**,哈夫尼亚菌则应在 **22~25℃**培养。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。甲基红试剂配法:**10mg** 甲基红溶于 **30mL95%**乙醇中,然后加入 **20mL** 蒸馏水。

3.4.4 V-P 试验

用琼脂培养物接种本培养基中,于 **36±1℃**培养 **2~4d**。哈夫尼亚菌则应在 **22~25℃**培养加入 **6%** α-萘酚-乙醇溶液 **0.5mL** 和 **40%**氢氧化钾溶液 **0.2mL**,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℃**下培养 **4h** 再进行观察。

3.5 西蒙氏柠檬酸盐培养基**3.5.1 成分**

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

琼脂	20g
蒸馏水	1 000mL
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	40mL

pH6.8

3.5.2 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℃** 高压灭菌 **15min**。放成斜面。

3.5.3 试验方法

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

3.6 克氏柠檬酸盐培养基

3.6.1 成分

柠檬酸钠	3g
葡萄糖	0.2g
酵母浸膏	0.5g
单盐酸半胱氨酸	0.1g
磷酸二氢钾	1g
氯化钠	5g
0.2%酚红溶液	6mL
琼脂	15g
蒸馏水	1 000mL

3.6.2 制法

加热溶解，分装试管，**121℃** 高压灭菌 **15min**，放成斜面。

3.6.3 试验方法

用琼脂培养物接种整个斜面，在 **36±1℃** 培养 **7d**，每天观察结果。阳性者培养基变为红色。

3.7 丙二酸钠培养基

3.7.1 成分

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

pH6.8

3.7.2 制法

先将酵母浸膏和盐类溶解于水，校正 **pH** 后再加入指示剂，分装试管，**121℃** 高压灭菌 **15 min**。

3.7.3 试验方法

用新鲜的琼脂培养物接种，于 **36±1℃** 培养 **48h**，观察结果。阳性者由绿色变为蓝色。

3.8 葡萄糖铵培养基

3.8.1 成分

氯化钠	5g
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2g

磷酸二氢铵	1g
磷酸氢二钾	1g
葡萄糖	2g
琼脂	20g
蒸馏水	1 000mL
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	40mL
pH	6.8

3.8.2 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 15min，放成斜面。

3.8.3 试验方法 用接种针轻轻触及培养物的表面，在盐水管内做成极稀的悬液，肉眼观察不见混浊，以每一接种环内含菌数在 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 24h。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，易造成假阳性的结果。

3.9 马尿酸钠培养基

3.9.1 成分

马尿酸钠	1g
肉浸液	100mL

3.9.2 制法 将马尿酸钠溶解于肉浸液内，分装于小试管内，并于管壁画一横线。以标志管内液面高度，高压灭菌 121℃20min。

3.9.3 试剂

三氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)12g，溶于 2%盐酸溶液 100mL 中即成。

3.9.4 试验方法

用纯培养物接种，于 42℃培养 48h，观察培养液是否到达试管壁上记号处，如不足时，用蒸馏水补足至原量。经离心沉淀，吸取上清液 0.8mL，加入三氯化铁试剂 0.2mL，立即混合均匀，经 10~15min，观察结果。

3.9.5 结果：出现恒久之沉淀物为阳性。

3.10 营养明胶

3.10.1 成分

蛋白胨	5g
牛肉膏	3g
明胶	120g
蒸馏水	1 000mL

pH6.8~7.0

3.10.2 制法

加热溶解、校正至 pH7.4~7.6，分装小管，121℃高压灭菌 10min，取出后迅速冷却，使其凝固。复查最终 pH 应为 6.8~7.0。

3.10.3 试验方法

用琼脂培养物穿刺接种，放在 22~25℃培养，每天观察结果，记录液化时间。或放在 36±1℃培养，每天取出，放冰箱内 30min 后再观察结果。

3.11 苯丙氨酸培养基

3.11.1 成分

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

3.11.2 制法

加热溶解后分装试管，121℃高压灭菌 15min，使成斜面。

3.11.3 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，在 36±1℃培养 4h 或 18~24h。滴加10%三氯化铁溶液 2~3 滴，自斜面培养物上流下，苯丙氨酸脱氨酶阳性者呈深绿色。

3.12 氨基酸脱羧酶试验培养基

3.12.1 成分

蛋白胨	5g
酵母浸膏	3g
葡萄糖	1g
蒸馏水	1 000mL
1.6%溴甲酚紫-乙醇溶液	1mL
L-氨基酸或 DL-氨基酸	0.5 或 1g/100mL

pH6.8

3.12.2 制法

除氨基酸以外的成分加热溶解后，分装每瓶 100mL，分别加入各种氨基酸：赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸。L-氨基酸按 0.5%加入，DL-氨基酸按 1%加入。再行校正 pH 至 6.8。对照培养基不加氨基酸。分装于灭菌的小试管内，每管 0.5mL，上面滴加一层液体石蜡，

115℃高压灭菌 10min。

3.12.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取培养物接种，于 36±1℃培养 18~24h，观察结果。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。

3.13 蛋白胨水(靛基质试验用)

3.13.1 成分

蛋白胨(或胰蛋白胨)	20g
氯化钠	5g
蒸馏水	1 000mL

pH7.4

3.13.2 制法

按上述成分配制，分装小试管，121℃高压灭菌 15min。

3.13.3 靛基质试剂

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

3.13.3.2 欧-波试剂：将1g 对二甲氨基苯甲醛溶解于 95mL95%乙醇内。然后缓慢加入浓盐酸20mL。

3.13.4 试验方法

挑取少量培养物接种，在 36±1℃培养 1~2d，必要时可培养 4~5d。加入柯凡克试剂 约 0.5mL，轻摇试管，阳性者于试剂层呈深红色；或加入欧-波试剂约 0.5mL，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。

3.14 硫酸亚铁琼脂(硫化氢试验用)**3.14.1 成分**

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

pH7.4**3.14.2 制法**

加热溶解, 校正 **pH**, 分装试管, **115℃** 高压灭菌 **15min**, 取出直立俟其凝固。

3.14.3 试验方法

挑取琼脂培养物, 沿管壁穿刺, 于 **36±1℃** 培养 **1~2d**, 观察结果。产硫化氢者使培养基变为黑色。

注: 肠杆菌科细菌测定硫化氢的产生, 应采用三糖铁琼脂或本培养基。

3.15 尿素琼脂**3.15.1 成分**

蛋白胨	1g
氯化钠	5g
葡萄糖	1g
磷酸二氢钾	2g
0.4% 酚红溶液	3mL
琼脂	20g
蒸馏水	1 000mL
20% 尿素溶液	100mL

pH7.2±0.1**3.15.2 制法**

将除尿素和琼脂以外的成分配好, 并校正 **pH**, 加入琼脂, 加热溶化并分装烧瓶。**121℃** 高压灭菌 **15min**。冷至 **50~55℃**, 加入经除菌过滤的尿素溶液。尿素的最终浓度为 **2%** 最终 **pH** 应为 **7.2±0.1**。分装于灭菌试管内, 放成斜面备用。

3.15.3 试验方法

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

3.16 氰化钾(KCN)培养基**3.16.1 成分**

蛋白胨	10g
氯化钠	5g
磷酸二氢钾	0.225g
磷酸氢二钠	5.64g
蒸馏水	1 000mL
0.5% 氰化钾溶液	20mL

pH7.6**3.16.2 制法**

将除氰化钾以外的成分配好后分装烧瓶，121℃高压灭菌 15min。放在冰箱内使其充分冷却每 100mL 培养基加入 0.5% 氰化钾溶液 2.0mL(最后浓度为 1:10 000)，分装于 12mm × 100mm 灭菌试管，每管约 4mL，立刻用灭菌橡皮塞塞紧，放在 4℃ 冰箱内，至少可保存两个月。同时，将不加氰化钾的培养基作为对照培养基，分装试管备用。

3.16.3 试验方法

将琼脂培养物接种于蛋白胨水内成为稀释菌液，挑取 1 环接种于氰化钾(KCN)培养基。并另挑取 1 环接种于对照培养基。在 36±1℃ 培养 1~2d，观察结果。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)。

注：氰化钾是剧毒药物，使用时应小心，切勿沾染，以免中毒。夏天分装培养基应在冰箱内进行。试验失败的主要原因是封口不严，氰化钾逐渐分解，产生氢氰酸气体逸出，以致药物浓度降低，细菌生长，因而造成假阳性反应。试验时对每一环节都要特别注意。

3.17 硝酸盐培养基（硝酸盐还原试验用）

3.17.1 成分

硝酸钾	0.2g
蛋白胨	5g
蒸馏水	1 000mL

pH7.4

3.17.2 制法

溶解，校正 pH，分装试管，每管约 5mL，121℃ 高压灭菌 15min。

3.17.3 硝酸盐还原试剂

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

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

3.17.4 试验方法

接种后在 36±1℃ 培养 1~4d，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于立刻或数分钟内显红色。

注：本试验阴性的原因有三：细菌不能还原硝酸盐；亚硝酸盐继续分解，生成氨和氮；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。

3.18 氧化酶试验

3.18.1 试剂

3.18.1.1 1% 盐酸二甲基对苯二胺溶液：少量新鲜配制，于冰箱内避光保存。

3.18.1.2 1% α-萘酚-乙醇溶液。

3.18.2 试验方法

3.18.2.1 取白色洁净滤纸沾取菌落。加盐酸二甲基对苯二胺溶液一滴，阳性者呈现粉红色，并逐渐加深；再加 α-萘酚溶液一滴，阳性者于半分钟内呈现鲜蓝色。阴性于两分钟内不变色。

3.18.2.2 以毛细吸管吸取试剂，直接滴加于菌落上，其显色反应与以上相同。

3.19 细胞色素氧化酶试验

3.19.1 试剂

3.19.1.1 1% 盐酸二甲基对苯二胺溶液。

3.19.1.2 1% α-萘酚-乙醇溶液。

3.19.2 试验方法

取 37℃(或低于 37℃)培养 20h 的斜面培养物一支，将两种试剂各 2~3 滴，从斜面上端滴下，并将斜面略加倾斜，使试剂混合液流经斜面上的培养物。如系平板培养物，则可用试剂混合液滴在菌落上。

3.19.3 结果

于**2min**内呈现蓝色者为阳性。阳性培养物大多数于半分钟内出现强阳性反应，**2min**以后出现微弱或可疑反应均作为阴性结果。

3.20 过氧化氢酶试验

3.20.1 试剂

3%过氧化氢溶液：临用时配制。

3.20.2 试验方法

挑取固体培养基上菌落一接种环，置于洁净试管内，滴加**3%**过氧化氢溶液**2mL**，观察结果。

3.20.3 结果 于半分钟内发生气泡者为阳性，不发生气泡者为阴性。

3.21 过氧化物酶试验

3.21.1 试剂

3.21.1.1 2%儿茶酚溶液。

3.21.1.2 3%过氧化氢溶液。

3.21.2 试验方法 挑取固体培养基上菌落一接种环，置于洁净试管内，滴加**2%**儿茶酚溶液**1mL**及**3%**过氧化氢溶液**1mL**。静置于室温(**20℃**)中**30~60min**，观察结果。

3.21.3 结果 阳性反应，细菌变为黑褐色；阴性反应，细菌不变色。注：过氧化物酶的作用可受氰化钾的抑制。

3.22 磷酸盐缓冲液

3.22.1 储存液

磷酸二氢钾 **34g**

1mol/L 氢氧化钠溶液 **175mL**

蒸馏水 **825mL**

pH7.2

3.22.2 制法

先将磷酸盐溶解于**500mL**蒸馏水中，用**1mol/L**氢氧化钠溶液校正**pH**后，再用蒸馏水稀释至**1000mL**。

3.22.3 稀释液取储存液**1.25mL**，用蒸馏水稀释至**1000mL**分装每瓶**100mL**或每管**10mL**，**121℃**高压灭菌**15min**。

3.23 明胶磷酸盐缓冲液

3.23.1 成分

明胶 **2g**

磷酸氢二钠 **4g**

蒸馏水 **1000mL**

pH6.2

3.23.2 制法

加热溶解，校正**pH**，**121℃**高压灭菌**15min**。

3.24 乳酸-苯酚溶液

3.24.1 成分

苯酚 **10g**

乳酸(比重**1.21**) **10g**

甘油 **20g**

蒸馏水 **10mL**

3.24.2 制法 将苯酚在水中加热溶解，然后加入乳酸及甘油。

3.24.3 用途 检验真菌形态时用。

4 一般培养基和专用培养基

4.1 肉浸液肉汤

4.1.1 成分

绞碎牛肉	500g
氯化钠	5g
蛋白胨	10g
磷酸氢二钾	2g
蒸馏水	1 000mL

4.1.2 制法

将绞碎之去筋膜无油脂牛肉 **500g** 加蒸馏水 **1 000mL**，混合后放冰箱过夜，除去液面之浮油，隔水煮沸半小时，使肉渣完全凝结成块，用绒布过滤，并挤压收集全部滤液，加水补足原量。加入蛋白胨、氯化钠和磷酸盐，溶解后校正 **pH7.4~7.6** 煮沸并过滤，分装烧瓶，

121℃高压灭菌 **30min**。

4.2 肉浸液琼脂**4.2.1 成分**

肉浸液肉汤(pH7.4)	1 000mL
琼脂	17~20g

4.2.2 制法

加热溶化琼脂，分装烧瓶或试管，**121℃**高压灭菌 **30min**。根据需要，倾注平板或放成斜面。

4.3 牛肉(或牛心)消化汤**4.3.1 成分**

绞碎牛肉(或牛心)	1 000g
15%氢氧化钠溶液	27mL
胰蛋白酶	40mL
三氯甲烷	1mL
氯化钠	10g
蒸馏水	2 000mL

4.3.2 制法

4.3.2.1 称取碎牛肉，加蒸馏水，隔水加热到 **80℃**，维持 **15min**。

4.3.2.2 加氢氧化钠溶液，对 **pH** 试纸呈弱碱性，冷至 **40℃**。

4.3.2.3 加胰蛋白酶、氯仿，在 **36±1℃**放置 **4~5h**，每小时摇动一二次。

4.3.2.4 **4h** 后，吸取上层液 **5mL** 于试管中，加 **5%**硫酸铜溶液 **0.1mL**、**4%**氢氧化钠溶液 **5mL**，混合之。若呈红色，则不须再消化，可由温箱取出。

4.3.2.5 加入 **15%**乙酸溶液 **45mL**，对 **pH** 试纸呈酸性。

4.3.2.6 煮沸 **15min**，使胰蛋白酶破坏，冷后，放冰箱内一夜。

4.3.2.7 次日吸取上层清液，加氯化钠 **10g**，并加水补足原量，煮沸。

4.3.2.8 校正 **pH7.4~7.6**(加 **15%**氢氧化钠溶液约 **10mL**)，加热，用滤纸过滤，分装烧瓶，**121℃**高压灭菌 **20min**。注：①此培养基可作为琼脂培养基的基础，不需加蛋白胨。

②胰蛋白酶之配制：称取去脂绞碎的猪胰 **500g**，加入乙醇 **500mL**、蒸馏水 **1 500mL**，

混合之，装入玻塞瓶内。每日摇匀三次。**3d** 后，用绒布过滤挤出其汁，加盐酸至**0.05%**，放冰箱内保存备用。

4.4 血消化汤**4.4.1 成分**

绞碎猪胃	100g
绞碎猪血块	100g
蒸馏水	1 000mL
浓盐酸	10mL

4.4.2 制法

4.4.2.1 洗涤猪胃，除去油脂，保留胃粘膜，用绞肉机绞碎。

4.4.2.2 用绞肉机将猪血块绞碎。

4.4.2.3 将蒸馏水加热至 **55℃**，加入猪胃、猪血块和盐酸，置 **55℃** 水浴中 **24h**，时常加以摇动。

4.4.2.4 从水浴内取出，加入 **1mol/L** 碳酸钠溶液 **5mL**，煮沸 **10min**，置于冰箱内一夜。

4.4.2.5 吸取上层清液，加磷酸氢二钾 **1g**，加热至 **75℃**，加入 **1mol/L** 碳酸钠溶液 **45mL**，煮沸，校正 **pH7.2~7.4**。

4.4.2.6 用滤纸过滤，分装烧瓶，**121℃** 高压灭菌 **20min**。注：①本培养基不含糖可供作鉴别培养基之基础，不需加蛋白胨和氯化钠。

②**1mol/L** 碳酸钠溶液之配法：无水碳酸钠 **10.6g**，溶于 **1 000mL** 蒸馏水中。

4.5 豆粉琼脂**4.5.1 成分**

牛心消化汤(pH7.4~7.6) **1 000mL**

琼脂 **20g**

黄豆粉浸液 **50mL**

4.5.2 制法

将琼脂加在牛心消化汤内，加热溶解，过滤。加入豌豆粉浸液，分装每瓶 **100mL**，**121℃** 高压灭菌 **15min**。

4.5.2.1 豌豆粉浸液制法：取豌豆粉 **5g**、氯化钠 **10g**，加入蒸馏水 **100mL**。置**100℃** 水浴内加热**1h**，放于冰箱中过夜。吸取上清液即为豌豆浸液。

4.6 血琼脂**4.6.1 成分**

pH7.4~7.6 豆粉琼脂 **100mL**

脱纤维羊血(或兔血) **5~10mL**

4.6.2 制法

加热溶化琼脂，冷至 **50℃**，以灭菌手续加入脱纤维羊血，摇匀，倾注平板。亦可分装 灭菌试管，置成斜面。亦可用其他营养丰富的基础培养基配制血琼脂。

4.7 营养琼脂**4.7.1 成分**

蛋白胨 **10g**

牛肉膏 **3g**

氯化钠 **5g**

琼脂 **15~20g**

蒸馏水 **1 000mL**

4.7.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内，加入 **15%** 氢氧化钠溶液约 **2mL**，校正 **PH** 至 **7.2~7.4**。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化。分装烧瓶，**121℃** 高压灭菌 **15min**。注：此培养基可供一般细菌培养之用，可倾注平板或制成斜面。如用于菌落计数，琼脂量为 **1.5%**；如作成平板或斜面，则应为 **2%**。

4.8 营养肉汤**4.8.1 成分**

蛋白胨 **10g**

牛肉膏 **3g**

氯化钠 **5g**

蒸馏水 **1 000mL**

pH7.4

4.8.2 制法

按上述成分混合，溶解后校正 **pH**，分装烧瓶，每瓶 **225mL**，**121℃** 高压灭菌 **15min**。

4.9 乳糖胆盐发酵管**4.9.1 成分**

蛋白胨	20g
猪胆盐(或牛、羊胆盐)	5g
乳糖	10g
0.04% 溴甲酚紫水溶液	25mL
蒸馏水	1 000mL

pH7.4

4.9.2 制法

将蛋白胨、胆盐及乳糖溶于水中，校正 **pH**，加入指示剂，分装每管 **10mL**，并放入一个小倒管，**115℃** 高压灭菌 **15min**。

注：双料乳糖胆盐发酵管除蒸馏水中，其他成分加倍。

4.10 乳糖发酵管**4.10.1 成分**

蛋白胨	20g
乳糖	10g
0.04% 溴甲酚紫水溶液	25mL
蒸馏水	1 000mL

pH7.4

4.10.2 制法

将蛋白胨及乳糖溶于水中，校正 **pH**，加入指示剂，按检验要求分装 **30mL**、**10mL** 或 **3mL**，并放入一个小倒管，**115℃** 高压灭菌 **15min**。注：①双料乳糖发酵管除蒸馏水外，其他成分加倍。②**30mL** 和 **10mL** 乳糖发酵管专供酱油及酱类检验用，**3mL** 乳糖发酵管供大肠菌群证实试验用。

4.11 EC 肉汤**4.11.1 成分**

胰蛋白胨	20g
3号胆盐(或混合胆盐)	1.5g
乳糖	5g
磷酸氢二钾	4g
磷酸二氢钾	1.5g
氯化钠	5g
蒸馏水	1 000mL

4.11.2 制法

将上述成分混合，溶解后，分装有发酵倒管的试管中，**121℃** 高压灭菌 **15min**，最终 **pH** 为 **6.9±0.2**。

4.12 缓冲蛋白胨水(BP)**4.12.1 成分**

蛋白胨	10g
氯化钠	5g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9g
磷酸二氢钾	1.5g
蒸馏水	1 000mL

pH7.2

4.12.2 制法

按上述成分配好后以大烧瓶装，121℃高压灭菌 15min。临用时无菌分装每瓶 225mL。注：本培养基供沙门氏菌前增菌用。

4.13 氯化镁孔雀绿增菌液(MM)**4.13.1 甲液**

胰蛋白胨	5g
氯化钠	8g
磷酸二氢钾	1.6g
蒸馏水	1 000mL

4.13.2 乙液

氯化镁(化学纯)	40g
蒸馏水	100mL

4.13.3 丙液

0.4%孔雀绿水溶液。

4.13.4 制法

分别按上述成分配好后，121℃高压灭菌 15min 备用。临用时取甲液90mL、乙液 9mL、丙液0.9mL，以无菌操作混合即可。

注：本培养基亦称 **Rappaport 10(R10)**增菌液。

4.14 四硫磺酸钠煌绿增菌液(TTB)**4.14.1 基础培养基**

多肽或(月示)肽	5g
胆盐	1g
碳酸钙	10g
硫代硫酸钠	30g
蒸馏水	1 000mL

4.14.2 碘溶液

碘	6g
碘化钾	5g
蒸馏水	20mL

4.14.3 制法

将基础培养基的各成分加入蒸馏水中，加热溶解，分装每瓶 100mL。分装时应随时振 摇，使其中的碳酸钙混匀。121℃高压灭菌 15min 备用。临用时每 100mL 基础培养基中加入 碘溶液 2mL、0.1%煌绿溶液 1mL。

4.15 四硫磺酸钠煌绿增菌液(换用方法)**4.15.1 基础液**

蛋白胨	10g
牛肉膏	5g
氯化钠	3g
碳酸钙	45g
蒸馏水	1 000mL

将各成分加入于蒸馏水中，加热至约 70℃溶解，校正 pH 至 7.0±0.1，121℃高压灭菌20min。

4.15.2 硫代硫酸钠溶液

硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	50g
蒸馏水加至	100mL

4.15.3 碘溶液

碘片	20g
碘化钾	25g
蒸馏水	加至 100mL

将碘化钾充分溶解于最少量的蒸馏水中，加入碘片，振摇玻瓶至碘片全部溶解，再加入蒸馏水至规定量。贮于棕色玻瓶内，紧塞瓶盖备用。

4.15.4 煌绿水溶液

煌绿	0.5g
蒸馏水	100mL

存放暗处，不少于 **1d**，使其自然灭菌。

4.15.5 牛胆盐溶液

干燥的牛胆盐	10g
蒸馏水	10mL

煮沸溶解，**121℃** 高压灭菌 **20min**。

4.15.6 制备

基础液	900mL
硫代硫酸钠溶液	100mL
碘液	20mL
煌绿溶液	2mL
牛胆盐溶液	50mL

临用前，按上列顺序，以无菌操作依次加入于基础液中，每加入一种成分，均应摇匀 后再加入另一种成分。分装于灭菌瓶中，每瓶**100mL**。

4.16 亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC)**4.16.1 成分**

蛋白胨	5g
乳糖	4g
亚硒酸氢钠	4g
磷酸氢二钠	5.5g
磷酸二氢钾	4.5g
L-胱氨酸	0.01g
蒸馏水	1 000mL

4.16.2 1%L-胱氨酸-氢氧化钠溶液的配法：称取 L-胱氨酸 **0.1g**(或 DL-胱氨酸 **0.2g**)，加 **1mol/L** 氢氧化钠 **1.5mL**，使溶解，再加入蒸馏水 **8.5mL** 即成。

4.16.3 制法：将除亚硒酸氢钠和 L-胱氨酸以外的各成分溶解于 **900mL** 蒸馏水中，加热煮沸，俟冷备用。另将亚硒酸氢钠溶解于 **100mL** 蒸馏水中，加热煮沸，俟冷，以无菌操作与上液混合。再加入**1%L-胱氨酸-氢氧化钠溶液 1mL**。分装于灭菌瓶中，每瓶 **100mL**，pH 应为**7.0±0.1**。

4.17 GN 增菌液**4.17.1 成分**

胰蛋白胨	20g
葡萄糖	1g
甘露醇	2g
柠檬酸钠	5g
去氧胆酸钠	0.5g
磷酸氢二钾	4g
磷酸二氢钾	1.5g

氯化钠	5g
蒸馏水	1 000mL

pH7.0

4.17.2 制法

按上述成分配好，加热使溶解，校正 **pH**。分装每瓶 **225mL**，**115℃** 高压灭菌 **15min**。

4.18 肠道菌增菌肉汤

4.18.1 成分

蛋白胨	10g
葡萄糖	5g
牛胆盐	20g
磷酸氢二钠	8g
磷酸二氢钾	2g
煌绿	0.015g
蒸馏水	1 000mL

pH7.2

4.18.2 制法

按上述成分配好，加热使溶解，校正 **pH**。分装每瓶 **30mL**，**115℃** 高压灭菌 **15min**。

4.19 亚硫酸铋琼脂(BS)

4.19.1 成分

蛋白胨	10g
牛肉膏	5g
葡萄糖	5g
硫酸亚铁	0.3g
磷酸氢二钠	4g
煌绿	0.025g
柠檬酸铋铵	2g
亚硫酸钠	6g
琼脂	18~20g
蒸馏水	1 000mL

pH7.5

4.19.2 制法

4.19.2.1 将前面 5 种成分溶解于 **300mL** 蒸馏水中。

4.19.2.2 将柠檬酸铋铵和亚硫酸钠另用 **50mL** 蒸馏水溶解。

4.19.2.3 将琼脂于 **600mL** 蒸馏水中煮沸溶解，冷至 **80℃**。

4.19.2.4 将以上三液合并，补充蒸馏水至 **1 000mL**，校正 **pH**，加 **0.5%** 煌绿水溶液 **5mL**，摇匀。冷至 **50~55℃**，倾注平皿。

注：此培养基不需高压灭菌，制备过程不宜过分加热，以免降低其选择性。应在临用前 一天制备，贮存于室温暗处。超过 **48h** 不宜使用。

4.20 DHL 琼脂(Deoxycholate Hydrogen Sulfide Lactose Agar)

4.20.1 成分

蛋白胨	20g
牛肉膏	3g
乳糖	10g
蔗糖	10g
去氧胆酸钠	1g

硫代硫酸钠	2.3g
柠檬酸钠	1g
柠檬酸铁铵	1g
中性红	0.03g
琼脂	18~20g
蒸馏水	1 000mL

pH7.3

4.20.2 制法

将除中性红和琼脂以外的成分溶解于 400mL 蒸馏水中，校正 pH 再将琼脂于 600mL 蒸馏水中煮沸溶解，两液合并，并加入 0.5% 中性红水溶液 6mL，待冷至 50~55℃，倾注平板。

4.21 HE 琼脂(Hektoen Enteric Agar)

4.21.1 成分

(月示)豚	12g
牛肉膏	3g
乳糖	12g
蔗糖	12g
水杨素	2g
胆盐	20g
氯化钠	5g
琼脂	18~20g
蒸馏水	1 000mL
0.4% 溴麝香草酚蓝溶液	16mL
Andrade 指示剂	20mL
甲液	20mL
乙液	20mL

pH7.5

4.21.2 制法

将前面七种成分溶解于 400mL 蒸馏水内作为基础液；将琼脂加入于 600mL 蒸馏水内，加热溶解。加入甲液和乙液于基础液内，校正 pH。再加入指示剂，并与琼脂液合并，待冷至 50~55℃，倾注平板。

注：①此培养基不可高压灭菌。

②甲液的配制

硫代硫酸钠	34g
柠檬酸铁铵	4g
蒸馏水	100mL

②乙液的配制

去氧胆酸钠	10g
蒸馏水	100mL

②Andrade 指示剂

酸性复红	0.5g
1mol/L 氢氧化钠溶液	16mL
蒸馏水	100mL

将复红溶解于蒸馏水中，加入氢氧化钠溶液。数小时后如复红褪色不全，再加氢氧化钠溶液 1~2mL。

4.22 SS 琼脂**4.22.1 基础培养基**

牛肉膏	5g
(月示)胨	5g
三号胆盐	3.5g
琼脂	17g
蒸馏水	1 000mL

将牛肉膏、(月示)胨和胆盐溶解于**400mL** 蒸馏水中，将琼脂加入于**600mL** 蒸馏水中，煮沸使其溶解，再将两液混合，**121℃** 高压灭菌 **15min**，保存备用。

4.22.2 完全培养基

基础培养基	1 000mL
乳糖	10g
柠檬酸钠	8.5g
硫代硫酸钠	8.5g
10% 柠檬酸铁溶液	10mL
1% 中性红溶液	2.5mL
0.1% 煌绿溶液	0.33mL

加热溶化基础培养基，按比例加入上述染料以外之各成分，充分混合均匀，校正至 **pH7.0**，加入中性红和煌绿溶液，倾注平板。

注：①制好的培养基宜当日使用，或保存于冰箱内于 **48h** 内使用。

②煌绿溶液配好后应在 **10d** 以内使用。

③可以购用 **SS** 琼脂的干燥培养基。

4.23 WS 琼脂**4.23.1 成分**

(月示)胨	12g
牛肉膏	3g
氯化钠	5g
乳糖	12g
蔗糖	12g
十二烷基硫酸钠	2g
琼脂	15g
Andrade 指示剂	20mL
0.4% 溴麝香草酚蓝溶液	16mL
甲液	20mL
蒸馏水	1 000mL

pH7.0**4.23.2 制法**

除指示剂和甲液外，将其他成分加热溶解，不需消毒，校正 **pH** 后加入指示剂和甲液，倾注平板应呈草绿色。注：①供沙门氏菌分离用。

②**Andrade** 指示剂和甲液的配制均见 **HE** 琼脂。

4.24 麦康凯琼脂**4.24.1 成分**

蛋白胨	17g
(月示)胨	3g
猪胆盐(或牛、羊胆盐)	5g

氯化钠	5g
琼脂	17g
蒸馏水	1 000mL
乳糖	10g
0.01%结晶紫水溶液	10mL
0.5%中性红水溶液	5mL

4.24.2 制法

4.24.2.1 将蛋白胨、胨、胆盐和氯化钠溶解于 400mL 蒸馏水中，校正 pH7.2。将琼脂加入600mL 蒸馏水中，加热溶解。将两液合并，分装于烧瓶内，121℃高压灭菌 15min 备用。

4.24.2.2 临用时加热溶化琼脂，趁热加入乳糖，冷至 50~55℃时，加入结晶紫和中性红水溶液，摇匀后倾注平板。

注：结晶紫及中性红水溶液配好后须经高压灭菌。

4.25 伊红美蓝琼脂(ENB)

4.25.1 成分

蛋白胨	10g
乳糖	10g
磷酸氢二钾	2g
琼脂	17g
2%伊红 Y 溶液	20mL
0.65%美蓝溶液	10mL
蒸馏水	1 000mL

pH7.1

4.25.2 制法

将蛋白胨、磷酸盐和琼脂溶解于蒸馏水中，校正 pH，分装于烧瓶内，121℃高压灭菌15 min 备用。临用时加入乳糖并加热溶化琼脂，冷至 50~55℃，加入伊红和美蓝溶液，摇匀，倾注平板。

4.26 三糖铁琼脂(TSI)

4.26.1 成分

蛋白胨	20g
牛肉膏	5g
乳糖	10g
蔗糖	10g
葡萄糖	1g
氯化钠	5g
硫酸亚铁铵〔Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O〕	0.2g
硫代硫酸钠	0.2g
琼脂	12g
酚红	0.025g
蒸馏水	1 000mL

pH7.4

4.26.2 制法

将除琼脂和酚红以外的各成分溶解于蒸馏水中，校正 pH。加入琼脂，加热煮沸，以溶化琼脂。加入 0.2% 酚红水溶液12.5mL，摇匀。分装试管，装量宜多些，以便得到较高的底层。121℃高压灭菌15min。放置高层斜面备用。

4.27 三糖铁琼脂（换用方法）

4.27.1 成分

蛋白胨	15g
(月示)胨	5g
牛肉膏	3g
酵母膏	3g
乳糖	10g
蔗糖	10g
葡萄糖	1g
氯化钠	5g
硫酸亚铁	0.2g
硫代硫酸钠	0.2g
琼脂	12g
酚红	0.025g
蒸馏水	1 000mL

pH7.4**4.27.2 制法**

将除琼脂和酚红以外的各成分溶解于蒸馏水中，校正 **pH**。加入琼脂，加热煮沸，以溶化琼脂。加入**0.2%**酚红水溶液 **12.5mL**，摇匀。分装试管，装量宜多些，以便得到较高的底层。**121℃**高压灭菌**15min**，放置高层斜面备用。

4.28 克氏双糖铁琼脂(KI)**4.28.1 上层培养基成分**

血消化汤(pH7.6)	500mL
琼脂	6.5g
硫代硫酸钠	0.1g
硫酸亚铁铵	0.1g
乳糖	5g
0.2%酚红溶液	5mL

4.28.2 下层培养基成分

血消化汤(pH7.6)	500mL
琼脂	2g
葡萄糖	1g
0.2%酚红溶液	5mL

4.28.3 制法

4.28.3.1 取血消化汤按上层和下层的琼脂用量，分别加入琼脂，加热溶解。

4.28.3.2 分别加入其他各种成分。将上层培养基分装于烧瓶内；将下层培养基分装于灭菌 **12mm × 100mm** 试管内，每管约**2mL**。**115℃**高压灭菌 **10min**。

4.28.3.3 将上层培养基放在 **56℃**水浴箱内保温；将下层培养基直立放在室温内，使其凝固。

4.28.3.4 俟下层培养基凝固后，以无菌手续将上层培养基分装于下层培养基的上面，每管约**1.5mL**，放成斜面。

4.29 克氏双糖铁琼脂(换用方法)**4.29.1 成分**

蛋白胨	20g
牛肉膏	3g
酵母膏	3g

乳糖	10g
葡萄糖	1g
氯化钠	5g
柠檬酸铁铵	0.5g
硫代硫酸钠	0.5g
琼脂	12g
酚红	0.025g
蒸馏水	1 000mL

pH7.4**4.29.2 制法**

将除琼脂和酚红以外的各成分溶解于蒸馏水中，校正 **pH**。加入琼脂，加热煮沸，以溶化琼脂。加入 **0.2%酚红水溶液 12.5mL**，摇匀。分装试管，装量宜多些，以便得到比较高的底层。**121℃**高压灭菌 **15min**。放置高层斜面备用。

4.30 半固体琼脂**4.30.1 成分**

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

pH7.4**4.30.2 制法**

按以上成分配好，煮沸使溶解，并校正 **pH**。分装小试管。**121℃**高压灭菌 **15min**。直立凝固备用。

注：供动力观察、菌种保存、**H** 抗原位相变异试验等用。

4.31 葡萄糖半固体发酵管**4.31.1 成分**

蛋白胨	1g
牛肉膏	0.3g
氯化钠	0.5g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	0.1mL
葡萄糖	1g
琼脂	0.3g
蒸馏水	100mL

pH7.4**4.31.2 制法**

将蛋白胨、牛肉膏和氯化钠加入于水中，校正 **pH** 后加入琼脂加热溶解，再加入指示剂和葡萄糖，分装小试管，灭菌 **121℃15min**。

4.32 5%乳糖发酵管**4.32.1 成分**

蛋白胨	0.2g
氯化钠	0.5g
乳糖	5g
2%溴麝香草酚蓝水溶液	1.2mL
蒸馏水	100mL

pH7.4**4.32.2 制法**

除乳糖以外的各成分溶解于 50mL 蒸馏水内，校正 pH 将乳糖溶解于另外 50mL 蒸馏水内，分别灭菌 121℃15min，将两液混合，以无菌操作分装于灭菌小试管内。

注：在此培养基内，大部分乳糖迟缓发酵的细菌可于 1d 内发酵。

4.33 CAYE 培养基

此培养基附在肠毒素诊断试剂盒内，如无此培养基，亦可用 Honda 氏产毒肉汤。

4.34 Honda 氏产毒肉汤**4.34.1 成分**

水解酪蛋白	20g
酵母浸膏粉	10g
氯化钠	2.5g
磷酸氢二钠	15g
葡萄糖	5g
微量元素	0.5mL
蒸馏水	1 000mL

pH7.5**4.34.2 制法**

溶解后校正 pH，高压灭菌 121℃15min，待冷至 45~50℃时，加入林可霉素溶液，每毫升培养基内含 90 μg。

4.34.3 微量元素配方

硫酸镁	5g,
氯化铁	0.5g,
氯化钴	2g,
蒸馏水	100mL

4.35 Elek 氏培养基(毒素测定用)**4.35.1 成分**

胨	20g
麦芽糖	3g
乳糖	0.7g
氯化钠	5g
琼脂	15g
40%氢氧化钠溶液	1.5mL
蒸馏水	1 000mL

pH7.8**4.35.2 制法**

用 500mL 蒸馏水溶解琼脂以外的成分，煮沸，并用滤纸过滤。用 1mol/L 氢氧化钠校正 pH。用另外 500mL 蒸馏水加热溶解琼脂。将两液混合，分装试管 10mL 或 20mL。121℃高压

灭菌 15min。临用时加热溶化琼脂倾注平板。

4.36 氯化镁孔雀绿羧苄青霉素培养基

4.36.1 甲液:	胰蛋白胨	10g
	蒸馏水	1 000mL
乙液:	磷酸氢二钠	9.5g
	蒸馏水	1 000mL
丙液:	氯化镁(MgCl ₂ · 6H ₂ O)	40g

蒸馏水 400mL
以上分别在 121℃ 灭菌 15min。

丁液: 孔雀绿 0.2g
蒸馏水 100mL
戊液: 羧苄青霉素 1mg/mL

4.36.2 制法

取甲液 620mL、乙液 160mL、丙液 212mL 混合, 再加入丁液 6.4mL 和戊液 2.4mL, 即为1 000mL 培养基。分装灭菌烧瓶, 每瓶 100mL, 或灭菌试管 10mL。

4.37 胰蛋白胨水

4.37.1 成分

胰蛋白胨 10g
蒸馏水 1 000mL

pH7.0

4.37.2 制法

将上述成分溶解, 校正 pH。分装试管, 121℃ 高压灭菌 15min。

4.38 Rustigian 氏尿素培养液

4.38.1 成分

尿素 20.0g
酵母浸膏 0.1g
磷酸二氢钾(KH₂PO₄) 0.091g
磷酸氢二钠(Na₂HPO₄) 0.095g
酚红 0.01g
蒸馏水 1 000mL

4.38.2 制法

将上述成分于蒸馏水中溶解, 校正 pH 为 6.8 ± 0.2。不要加热, 过滤除菌, 无菌分装于灭菌小试管中, 每管为约 3mL。

4.38.3 用途 尿素酶试验用。

4.39 氯化钠结晶紫增菌液

4.39.1 成分

蛋白胨 20g
氯化钠 40g
0.01%结晶紫溶液 5mL
蒸馏水 1 000mL
pH9.0

4.39.2 制法

除结晶紫外, 其他按上述成分配好, 加热溶解。约加 30%氢氧化钾溶液 4.5mL, 校正 pH。加热煮沸, 过滤。再加入结晶紫溶液, 混合后分装试管。121℃ 高压灭菌 15min。

4.40 氯化钠蔗糖琼脂

4.40.1 成分

蛋白胨 10g
牛肉膏 10g
氯化钠 50g
蔗糖 10g
琼脂 18g
0.2%溴麝香草酚蓝溶液 20mL

蒸馏水 **1 000mL**
pH7.8

4.40.2 制法

将牛肉膏、蛋白胨及氯化钠溶解于蒸馏水中，校正 pH。加入琼脂，加热溶解，过滤。加入指示剂，分装烧瓶 100mL。121℃高压灭菌 15min 备用。临用前在 100mL 培养基内加入蔗糖 1g，加热溶化并冷至 50℃，倾注平板。

4.41 嗜盐菌选择性琼脂

4.41.1 成分

蛋白胨	20g
氯化钠	40g
琼脂	17g
0.01%结晶紫溶液	5mL
蒸馏水	1 000mL

pH8.7

4.41.2 制法

除结晶紫和琼脂外，其他按上述成分配好，校正 pH。加入琼脂，加热溶解。再加入结晶紫溶液，分装烧瓶，每瓶 100mL。

4.42 3.5%氯化钠三糖铁琼脂

4.42.1 成分

三糖铁琼脂	1 000mL
氯化钠	30g

4.42.2 制法

按4.26 或 4.27 配制三糖铁琼脂，再加入氯化钠 30g，分装试管，121℃高压灭菌 15min。放置高层斜面使用。

4.43 氯化钠血琼脂

4.43.1 成分

酵母膏	3g
蛋白胨	10g
氯化钠	70g
磷酸氢二钠	5g
甘露醇	10g
结晶紫	0.001g
琼脂	15g
蒸馏水	1 000mL

4.43.2 制法

调 pH8.0 加热 30min(不必高压)，待冷至 45℃左右时，加入新鲜人或兔血(5%~10%)混合均匀，倾注平皿。

4.44 嗜盐性试验培养基

4.44.1 成分

蛋白胨	2g
氯化钠	按不同量加
蒸馏水	100mL

pH7.7

4.44.2 制法

配制 2%蛋白胨水，校正 pH，共配制 5 瓶，每瓶 100mL。每瓶分别加入不同量的氯化钠；

(1)不加; (2)3g; (3)7g; (4)9g; (5)11g。待溶解后分装试管。121℃高压灭菌 15min。

4.45 3.5%氯化钠生化试验培养基

4.45.1 成分及制法

根据所需糖的种类按 3.2 配制。只是将氯化钠含量改为 3.5%，pH 为 7.7。

4.46 改变磷酸盐缓冲液(小肠结肠炎耶尔森氏菌专用)

4.46.1 成分

磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	8.23g
磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.2g
氯化钠(NaCl)	5.0g
三号胆盐	1.5g
山梨醇	20g

4.46.2 制法

将磷酸盐及氯化钠溶于蒸馏水中，再加入三号胆盐及山梨醇，溶解后校正 pH 为 7.6，分装试管，于 121℃高压灭菌 15min，备用。

4.47 CIN-1 培养基

4.47.1 基础培养基

胰胨	20.0g
酵母浸膏	2.0g
甘露醇	20.0g
氯化钠	1.0g
去氧胆酸钠	2.0g
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01g
琼脂	12.0g
蒸馏水	950mL

pH7.50 ± 0.1

将基础培养基高压灭菌。

4.47.2 Irgasan: 以 95%的乙醇作溶剂，溶解二苯醚，配成 0.4%的溶液，待基础液冷至 80℃时，加入 1mL 混匀。

4.47.3 冷至 50℃时，加入：

中性红(3mg/mL)	10.0mL
结晶紫(0.1mg/mL)	10.0mL
头孢菌素(1.5mg/mL)	10.0mL
新生霉素(0.25mg/mL)	10.0mL

最后不断搅拌着加入 10.0mL 的 10%氯化铈，倒平皿。

4.48 改良 Y 培养基

4.48.1 成分

蛋白胨	15.0g
氯化钠	5.0g
乳糖	10.0g
草酸钠	2.0g
去氧胆酸钠	6.0g
三号胆盐	5.0g
丙酮酸钠	2.0g
孟加拉红	40mg
水解酪蛋白	5.0g

琼脂	17.0g
蒸馏水	1 000mL

4.48.2 制法

将上述成分混合，于 121℃ 高压灭菌 15min，待冷至 45℃ 左右时，倾注平皿。最终 pH7.4 ± 0.1。

4.49 改良克氏双糖**4.49.1 成分**

蛋白胨	20g
牛肉膏	3g
酵母膏	3g
山梨醇	20g
葡萄糖	1g
氯化钠	5g
柠檬酸铁铵	0.5g
硫代硫酸钠	0.5g
琼脂	12g
酚红	0.025g
蒸馏水	1 000mL

pH7.4

4.49.2 制法

将除琼脂和酚红以外的各成分溶解于蒸馏水中，校正 pH。加入 0.02% 酚红水溶液 12.5mL，摇匀。分装试管，装量宜多些，以便得到比较高的底层。121℃ 高压灭菌 15min，放置高层斜面备用。

4.50 快速硫化氢(H₂S)试验琼脂**4.50.1 制法**

A 液：布氏杆菌肉汤	970mL
无水磷酸氢二钠	1.18g
无水磷酸二氢钾	0.23g
琼脂	2g

加热溶解，高压灭菌，121℃ 15min。加入 B 液 10% 硫酸亚铁(含 7H₂O)，C 液 10% 偏亚硫酸氢钠，D 液 10% 丙酮酸钠。

4.50.2 上述 B、C、D 溶液均新鲜配制，用除菌滤膜过滤。将此除菌溶液各 1mL 混合后再入 A 液中，无菌调 pH 到 7.3，无菌分装，每管 3mL，塞紧备用。

4.51 DNA 酶甲基绿琼脂(DTA)**4.51.1 成分**

DNA	2.0g
植物蛋白胨	5.0g
胰蛋白胨	15.0g
氯化钠	5.0g
琼脂(1.5%)	15.0g
蒸馏水	1 000mL

pH7.3

4.51.2 制法 称取各成分后，加水徐徐加热，避免形成饼溶性丝状物，121℃ 15min 高压。

4.51.3 甲基绿配制(MG)

配制 0.5% 的甲基绿水溶液。用等体积氯仿作 5~7 次抽提，直到氯仿层无色为止。过滤除菌，置 4℃ 保存。

4.51.4 每 100mL 灭菌溶化的 DTA 培养基加 1mL(MG)染料液, 甲基绿最终浓度为0.005%。

4.52 Cary-Blair 氏运送培养基

4.52.1 成分

硫乙醇酸钠	1.5g
磷酸氢二钠	1.1g
氯化钠	5g
琼脂	5g
蒸馏水	1 000mL
1%氯化钙溶液	19mL

pH8.4

4.52.2 制法

除氯化钙外, 其他均按上述成分配制, 加热溶解。冷至 50℃, 加入氯化钙溶液, 校正pH 到 8.4。分装试管, 每支 5mL, 或注入具有胶塞的瓶内。121℃高压灭菌 15min。

4.52.3 用途 作空肠弯曲杆菌、霍乱弧菌、沙门氏菌、志贺氏菌采样时用。注: 在该采样管中的标本, 只能保存 72h。

4.53 改良 Camp-BAP 培养基

4.53.1 成分

胰蛋白胨	10.0g
蛋白胨	10.0g
葡萄糖	1.0g
酵母浸膏	2.0g
氯化钠	5.0g
焦亚硫酸钠	0.1g
琼脂	15.0g
蒸馏水	1 000mL
硫乙醇酸钠	1.5g
万古霉素	10mg
多粘菌素 B	2 500 国际单位
两性霉素 B(Amphotericin B)	2mg
头孢霉素(Cephalosporin, 亦可用 ceporan)	15mg
脱纤维羊血	50mL

4.53.2 制法

4.53.2.1 除抗生素和羊血外, 将其他成分混合, 加热溶解, 校正 pH 到 7.0±0.2。装瓶, 每瓶 100mL。121℃高压灭菌 15min, 备用。此为布氏琼脂基础培养基。

4.53.2.2 临用前, 加热溶解基础琼脂, 冷至 60℃。每 100mL 基础琼脂中, 加入脱纤维羊血 5mL、抗生素混合液 0.5mL 及两性霉素 B、头孢霉素混合液 0.5mL, 摇匀, 倾注平板。

4.53.3 说明

4.53.3.1 两性霉素 B、头孢霉素混合液配法: 称两性霉素 B2mg 和头孢霉素 15mg 与无菌蒸馏水5mL 混合即成。

4.53.3.2 称量抗生素必须正确, 操作必须小心慎重。

4.54 Skirrow 氏培养基

4.54.1 成分

蛋白胨	15.0g
胰蛋白胨(tryptone)	2.5g
酵母浸膏	5.0g

氯化钠	5.0g
琼脂	15.0g
蒸馏水	1 000.0mL
甲氧苄氨嘧啶(trimethoprim, TMP)	5.0mg
万古霉素(vancomycin)	10.0mg
多粘菌素 B(polymyxin)	2 500.0 国际单位
冻溶马血	70.0ml

4.54.2 制法

4.54.2.1 除甲氧苄氨嘧啶、抗生素和冻溶马血外，将其他成分混合溶解。校正 pH7.4，装瓶 100mL。121℃高压灭菌 15min，备用。此即血琼脂基础培养基。

4.54.2.2 临用前，加热溶解基础培养基，冷至 60℃。每 100mL 基础培养基中，加入冻溶两次的马血 7mL 及 TMP、抗生素混合液 0.5mL，摇匀，倾注无菌平板。

4.54.3 用途 分离空肠弯曲菌之用。

4.54.4 说明

4.54.4.1 TMP、抗生素混合液配法：先配成乳酸 TMP 溶液，以乳酸 62mg(约 1~2 滴)混合于 10mL 灭菌蒸馏水中，然后再加入 TMP 溶液。

取乳酸 TMP 溶液 5mL，再加入万古霉素及多粘菌素 B，摇匀后，即成 TMP 抗生素混合液。

4.54.4.2 TMP、抗生素的作用

4.54.4.2.1 TMP(甲氧苄氨嘧啶，又称磺胺增效剂或抗菌增效剂)：为广谱抗菌剂，其抗菌谱与磺胺嘧啶相似，但对链球菌及大多数革兰氏阴性菌的抗菌作用较磺胺嘧啶强，与抗生素合用有协同作用，能增加杀菌和抑菌作用。

4.54.4.2.2 万古霉素：是窄谱抗菌素，仅对革兰氏阳性菌有较强的杀菌和抑菌作用，如溶血性链球菌、草绿色链球菌、肠球菌、金黄色葡萄球菌等。

4.54.4.2.3 多粘菌素B：仅限于对革兰氏阴性菌，如对产气杆菌、流感杆菌、痢疾杆菌等。

4.54.4.2.4 TMP 和抗生素称量必须正确，操作必须慎重小心。

4.55 TTC 琼脂

4.55.1 成分

胰蛋白胍(tryptone)	17.0g
大豆胨	3.0g
葡萄糖	6.0g
氯化钠	2.5g
硫乙醇酸钠	0.5g
琼脂	15.0g
L-胱氨酸-盐酸(L-Cys-HCl)	0.25g
亚硫酸钠	0.1g
1%氯化血红素溶液	0.5mL
1%维生素 K1 溶液	0.1mL
2, 3, 5-氯化三苯四氮唑(TTC)	0.4g
蒸馏水	1 000mL

4.55.2 制法

4.55.2.1 除 1%氯化血红素、维生素 K1 和 TTC 外，将其他成分混合，加热溶解。L-胱氨酸先用少量氢氧化钠溶解后加入，校正 pH7.2，然后加入预先配成的氯化血红素和维生素 K1，充分摇匀。装瓶，每瓶 100mL。121℃高压灭菌 15min，备用。

4.55.2.2 临用前，溶解基础琼脂，每 100mL 基础培养基中，加入 TTC40mg，充分摇匀，倾注无菌平

板。

4.55.3 说明

4.55.3.1 将可疑空肠弯曲菌接种于平板上，在微氧环境下，于 43℃ 培养 48h。阳性菌落呈紫红色，空肠弯曲菌呈阳性反应；胎儿和肠道弯曲菌呈阴性反应。

4.55.3.2 1%氯化血红素溶液和 1%维生素 K1 溶液配法：称取氯化血红素 1g 和 1mol/L 氢氧化钠 5mL 混合。再用蒸馏水稀释到 100mL，即为 1%氯化血红素溶液。称取维生素 K1 1g 和纯乙醇 99mL 混合，或用维生素 K1 针剂。

4.56 甘氨酸培养基

4.56.1 成分

布氏(<i>Brucella</i>)肉汤	1 000mL
琼脂	1.6g
甘氨酸(glycine)(又称氨基乙酸 aminoacetic acid)	10.0g

4.56.2 制法

将以上成分混合，加热溶解，校正 pH7.0 ± 0.2，分装 13mm × 100mm 试管，每支约 4mL 左右，121℃ 高压灭菌 15min，备用。

4.56.3 说明 空肠弯曲菌对甘氨酸有耐受性，穿刺接种于甘氨酸培养基中。置于微需氧环境下，在 43℃ 培养 48h。在培养基表面出现云雾状现象为阳性，胎儿弯曲菌空肠亚种为阳性结果。

4.57 改良磷酸盐缓冲液

4.57.1 成分

磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	8.23g
磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.20g
氯化钠(NaCl)	5.0g
蒸馏水	1000.0mL
山梨醇	10.0g
胆盐	1.5g

4.57.2 制法

将磷酸盐及氯化钠溶于蒸馏水中，再加入山梨醇及胆盐，溶解后，校正 pH 为 7.6，分装试管。于 121℃ 高压灭菌 15min，备用。

4.58 氯化镁孔雀绿肉汤

4.58.1 成分

1%胰胨水(高压灭菌)	156mL
1/15mol/L 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)溶液(高压灭菌)	40mL
40%(m/V)氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)水溶液(100℃ 煮沸数分钟)	53mL
0.2%孔雀绿溶液	1.6mL

4.58.2 制法 将上述几种溶液按列出的容量混合，即成氯化镁孔雀绿肉汤。分装试管，每管 10mL，于 4℃ 可保存 10 个月。如若配氯化镁孔雀绿羧苄青霉素肉汤，除上述几种溶液外，再配制 羧苄青霉素(carpenicillin)溶液(溶解 1mg 于 1mL 水中)，将此溶液与其他溶液混合，即成。

4.59 胰酪胨大豆肉汤

4.59.1 成分

胰酪胨(或胰蛋白胨)	17g
植物蛋白胨(或大豆蛋白胨)	3g
氯化钠	100g
磷酸氢二钾	2.5g
葡萄糖	2.5g
蒸馏水	1 000mL

4.59.2 制法

将上述成分混合，加热并轻轻搅拌并溶解，分装后，**121℃**高压灭菌 **15min**，最终 **pH7.3 ± 0.2**。

4.60 Baird-Parker 氏培养基**4.60.1 成分**

胰蛋白胨	10g
牛肉膏	5g
酵母膏	1g
丙酮酸钠	10g
甘氨酸	12g
氯化锂(LiCl ₆ · H ₂ O)	5g
琼脂	20g
蒸馏水	950mL

PH 7.5**4.60.2 增菌剂的配法**

30%卵黄盐水 **50mL** 与除菌过滤的 **1%**亚碲酸钾溶液 **10mL** 混合，保存于冰箱内。

4.60.3 制法

将各成分加到蒸馏水中，加热煮沸至完全溶解。冷至 **25℃**，校正 **pH**。分装每瓶 **95mL**，**121℃**高压灭菌 **15min**。临用时加热溶化琼脂，冷至 **50℃**，每 **95mL** 加入预热至 **50℃**的卵黄亚碲酸钾增菌剂 **5mL**，摇匀后倾注平板。培养基应是致密不透明的。使用前在冰箱储存不得超过 **48h**。

4.61 7.5%氯化钠肉汤**4.61.1 成分**

蛋白胨	10g
牛肉膏	3g
氯化钠	75g
蒸馏水	1 000mL

pH7.4

4.61.2 制法

将上述成分加热溶解，校正 **pH**，分装试管，**121℃**高压灭菌 **15min**。

4.6.2 匹克氏肉汤**4.62.1 成分**

含 1% 胰蛋白胨的牛心浸液	200mL
1 : 25 000 结晶紫盐水溶液	10mL
1 : 800 三氯化钠溶液	10mL
脱纤维兔血(或羊血)	10mL

4.62.2 制法 将上述已灭菌的各种成分，用无菌手续依次混合，分装于无菌试管内，每管约**2mL**，保存于冰箱内备用。

4.63 3.8%柠檬酸钠溶液**4.63.1 成分**

柠檬酸钠	3.8g
蒸馏水	100mL

4.63.2 制法

取柠檬酸钠 **3.8g**，加蒸馏水到 **100mL**，溶解后过滤，装瓶，**121℃**高压灭菌**15min**。注：兔(人)血浆制备：取 **3.8%**柠檬酸钠溶液一份加兔(或人)全血四份，混好静置之，则血球下降，即可得血浆进行试验。

4.64 甘露醇卵黄多粘菌素琼脂

4.64.1 成分

蛋白胨	10g
牛肉膏	1g
甘露醇	10g
氯化钠	10g
琼脂	15g
蒸馏水	1 000mL
0.2%酚红溶液	13mL
50%卵黄液	50mL
多粘菌素 B	100 国际单位/mL

pH7.4

4.64.2 制法

将前面五种成分加入于蒸馏水中，加热溶解，校正 **pH**，加入酚红溶液。分装烧瓶，每瓶**100mL**，**121℃**高压灭菌 **15min**。临用时加热溶化琼脂，冷至 **50℃**，每瓶加入 **50%卵黄液 5mL**及多粘菌素 **B10000**国际单位，混匀后倾注平板。

4.65 酪蛋白琼脂**4.65.1 成分**

酪蛋白	10g
牛肉膏	3g
磷酸氢二钠	2g
氯化钠	5g
琼脂	15g
蒸馏水	1 000mL
0.4%溴麝香草酚蓝溶液	12.5mL

pH7.4

4.65.2 制法

将除指示剂外的各成分混合，加热溶解(但酪蛋白不溶解)，校正 **pH**。加入指示剂，分装烧瓶，**121℃**高压灭菌 **15min**。临用时加热溶化琼脂，冷至 **50℃**，倾注平板。注：将菌株划线接种于平板上，如沿菌落周围有透明圈形成，即为能水解酪蛋白。

4.66 木糖-明胶培养基**4.66.1 成分**

胰胨	10g
酵母膏	10g
木糖	10g
磷酸氢二钠	5g
明胶	120g
蒸馏水	1 000mL
0.2%酚红溶液	25mL

pH7.6

4.66.2 制法

将除酚红以外的各成分混合，加热溶解，校正 **pH**。加入酚红溶液，分装试管，**121℃**高压灭菌**15min**，迅速冷却。

4.67 庖肉培养基**4.67.1 成分**

牛肉浸液	1 000mL
蛋白胨	30g

酵母膏	5g
磷酸二氢钠	5g
葡萄糖	3g
可溶性淀粉	2g
碎肉渣	适量

pH7.8

4.67.2 制法

4.67.2.1 称取新鲜除脂肪和筋膜的碎牛肉 **500g**，加蒸馏水 **1 000mL** 和 **1mol/L** 氢氧化钠溶液 **25mL**，搅拌煮沸 **15min**，充分冷却，除去表层脂肪，澄清，过滤，加水补足至 **1 000mL**。加入除碎肉渣外的各种成分，校正 **pH**。

4.67.2.2 碎肉渣经水洗后晾至半干，分装 **15mm × 150mm** 试管约 **2~3cm** 高，每管加入还原铁粉 **0.1~0.2g** 或铁屑少许。将上述液体培养基分装至每管内超过肉渣表面约 **1cm**。上面覆盖溶化的凡士林或液体石蜡 **0.3~0.4cm**。**121℃** 高压灭菌 **15min**。

4.68 卵黄琼脂培养基

4.68.1 成分

4.68.1.1 基础培养基

肉浸液	1 000mL
蛋白胨	15g
氯化钠	5g
琼脂	25~30g

pH7.5

4.68.1.2 50%葡萄糖水溶液。

4.68.1.3 50%卵黄盐水悬液。

4.68.2 制法

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

4.69 亚硫酸盐-多粘菌素-磺胺嘧啶琼脂(SPS)

4.69.1 成分

胰酶消化酪蛋白胨	15g
酵母膏	10g
柠檬酸铁	0.5g
琼脂	15g
蒸馏水	1 000mL
10%亚硫酸钠水溶液(新配)	5mL
0.12%多粘菌素 B 硫酸盐水溶液	10mL
1.2%磺胺嘧啶钠水溶液	10mL

pH7.0

4.69.2 制法：前面五种成分配合后加热溶解，校正 **pH**。分装每瓶 **100mL**，**121℃** 高压灭菌 **15min**。临用时加热溶化琼脂，冷至 **50℃**。按比例加入后 **3** 种溶液，摇匀，倾注平板。

4.70 液体硫乙醇酸盐培养基(FT)

4.70.1 成分

胰酶消化酪蛋白胨	15g
L-胱氨酸	0.5g
葡萄糖	5g
酵母膏	5g
氯化钠	2.5g

硫乙醇酸钠	0.5g
刃天青(Resazurin)	0.001g
琼脂	0.75g
蒸馏水	1 000mL

pH7.1**4.70.2 制法**

煮沸溶解, 冷却后校正 pH, 分装试管, 每管 10mL, 121℃ 高压灭菌 15min。临用前隔水煮沸 10min, 以驱除培养基中溶解的氧气, 迅速冷却。

4.71 含铁牛奶培养基**4.71.1 成分**

新鲜全脂牛奶	1 000mL
硫酸亚铁	1g
蒸馏水	50mL

4.71.2 制法

将硫酸亚铁溶解于蒸馏水中, 不断搅拌, 缓慢地加入于 1 000mL 牛奶中, 混匀。分装试管, 每管10mL, 121℃ 高压灭菌 15min。本培养基必须新鲜制备。

4.72 动力-硝酸盐培养基(A 法)**4.72.1 成分**

蛋白胨	5g
牛肉膏	3g
硝酸钾	1g
琼脂	3g
蒸馏水	1 000mL

pH7.0**4.72.2 制法**

加热溶解, 校正 pH。分装试管, 每管 10mL, 121℃ 高压灭菌 15min。

4.73 动力-硝酸盐培养基(B 法)**4.73.1 成分**

蛋白胨	5g
牛肉膏	3g
硝酸钾	5g
磷酸氢二钠	2.5g
半乳糖	5g
甘油	5g
琼脂	3g
蒸馏水	1 000mL

pH7.4**4.73.2 制法**

将以上各成分混合, 加热溶解, 校正 pH。分装试管, 121℃ 高压灭菌 15min。

4.74 血清肉汤

在肉浸液肉汤(3.1)中按 10 : 1 以无菌操作加马(或羊、兔)血清即为血清肉汤。

4.75 马丁氏肉汤**4.75.1 成分**

蛋白胨液	500mL
肉浸液	500mL

冰乙酸	6g
葡萄糖	10g

4.75.2 制法

4.75.2.1 将蛋白胨液500mL 与肉浸液500mL 混合, 加热至 80℃, 加冰乙酸 1mL, 摇匀, 再煮沸5min。

4.75.2.2 加 15%氢氧化钠溶液约 20mL, 校正 pH 至 7.2。

4.75.2.3 加乙酸钠 6g, 再校正 pH 至 7.2。

4.75.2.4 继续煮沸 10min, 用滤纸过滤。在每 1 000mL 肉汤内, 再加葡萄糖 10g。然后装瓶, 每瓶500mL。放置高压灭菌器内经 121℃灭菌 15min, 备用。

注: 蛋白胨液的制备: 取新鲜猪胃, 去脂绞碎。称取 350g 加 50℃左右蒸馏水 1 000mL, 充分摇匀。再加盐酸(化学纯, 比重 1.19)10mL, 经充分混合后, 置 56℃温箱中消化 24h(每小时搅拌 1~2 次), 消化完毕后, 加热, 用滤纸过滤, 备用。

4.76 明胶培养基

4.76.1 成分

蛋白胨	5g
牛肉膏	3g
明胶	120g
蒸馏水	1 000mL

4.76.2 制法

将上述成分混合, 置流动蒸气灭菌器内, 加热溶解, 校正 pH 至 7.0~7.2, 用绒布过滤。分装试管, 121℃灭菌 15min, 备用。

4.77 察氏培养基

4.77.1 成分

硝酸钠	3g
磷酸氢二钾	1g
硫酸镁(MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.5g
氯化钾	0.5g
硫酸亚铁	0.01g
蔗糖	30g
琼脂	20g
蒸馏水	1 000mL

4.77.2 制法

加热溶解, 分装后 121℃灭菌 20min。

4.77.3 用途 青霉、曲霉鉴定及保存菌种用。

4.78 高盐察氏培养基

4.78.1 成分

硝酸钠	2g
磷酸二氢钾	1g
硫酸镁(MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.5g
氯化钾	0.5g
硫酸亚铁	0.01g
氯化钠	60g
蔗糖	30g
琼脂	20g
蒸馏水	1 000mL

4.78.2 制法

加热溶解，分装后，**115℃**高压灭菌 **30min**。必要时，可酌量增加琼脂。

4.78.3 用途 分离霉菌用。**4.79 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)****4.79.1 成分**

马铃薯(去皮切块)	300g
葡萄糖	20g
琼脂	20g
蒸馏水	1 000mL

4.79.2 制法

将马铃薯去皮切块，加 **1 000mL** 蒸馏水，煮沸 **10~20min**。用纱布过滤，补加蒸馏水至**1 000mL**。加入葡萄糖和琼脂，加热溶化，分装，**121℃**高压灭菌 **20min**。

4.79.3 用途 分离培养霉菌。**4.80 马铃薯琼脂****4.80.1 成分**

马铃薯(去皮切块)	200g
琼脂	20g
蒸馏水	1 000mL

4.80.2 制法 同马铃薯葡萄糖琼脂。**4.80.3 用途** 鉴定霉菌用。**4.81 孟加拉红培养基****4.81.1 成分**

蛋白胨	5g
葡萄糖	10g
磷酸二氢钾	1g
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5g
琼脂	20g
1/3 000 孟加拉红溶液	100mL
蒸馏水	1 000mL
氯霉素	0.1g

4.81.2 制法 上述各成分加入蒸馏水中溶解后，再加孟加拉红溶液。另用少量乙醇溶解氯霉素，加入培养基中，分装后，**121℃**灭菌 **20min**。

4.81.3 用途 分离霉菌及酵母。**4.82 玉米粉琼脂****4.82.1 成分**

玉米粉	60g
琼脂	15~18g
蒸馏水	1 000mL

4.82.2 制法

将玉米粉加入蒸馏水中，搅匀，文火煮沸 **1h**，纱布过滤，加琼脂后加热溶化，补足水 量至 **1 000mL**。分装，**121℃**灭菌 **20min**。

4.82.3 用途

鉴定假丝酵母及霉菌。

4.83 大米粉培养基

4.83.1 制法

将不含荧光物质的粳米挑去杂质和变质米粒，磨成粗粉，分装后 **121℃** 高压灭菌 **20min**。

4.83.2 用途 霉菌产毒用。**4.84 亚硒酸盐煌绿增菌液****4.84.1 成分**

蛋白胨	5g
酵母浸膏	5g
甘露醇	5g
牛磺胆酸钠	1g
20%亚硒酸氢钠溶液	20mL
0.25mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0)	100mL
2%煌绿溶液	0.25mL
蒸馏水	900mL

4.84.2 制法

4.84.2.1 将前面四种成分溶解于蒸馏水中。

4.84.2.2 校正 **pH**，当用于干鸡蛋白样品时，**pH8.2 ± 0.1**；用于其他干蛋品时，**pH7.2 ± 0.1**；用于冰蛋品时 **pH7.0 ± 0.1**；**121℃** 高压灭菌 **15min**，放冷备用。

4.84.2.3 临用前加入灭菌的 **20%**亚硒酸氢钠溶液及磷酸盐缓冲液，复查混合液的 **pH**，必要时进行校正。

4.84.2.4 加入煌绿溶液定量分装于灭菌的烧瓶内，每瓶 **150mL**，于 **1~5d** 内使用。

注：①**20%**亚硒酸氢钠溶液 **121℃** 高压灭菌 **15min**。

②**0.25mol/L** 磷酸盐缓冲液(pH7.0)配法：

磷酸氢二钾(无水)	21.8g
磷酸二氢钾(无水)	17.1g
蒸馏水	1 000mL

121℃ 高压灭菌 **15min** 后备用。

4.85 煌绿肉汤增菌液**4.85.1 成分**

肉浸液肉汤(或牛肉膏汤)	1 000mL
磷酸氢二钾	1g
2%煌绿溶液	0.5~10mL

4.85.2 制法

4.85.2.1 将肉浸液肉汤加入磷酸氢二钾(原已有磷酸氢二钾者可不加)，校正 **pH**，分装烧瓶，每瓶 **100mL**，**121℃** 高压灭菌 **20min**。

4.85.2.2 **2%**煌绿水溶液于临用前配制。

4.85.2.3 按比例 [见 **GB4789.19-94**《食品卫生微生物学检验 蛋与蛋制品检验》]于肉汤内加入煌绿溶液，摇匀，备用。

注：①加入煌绿溶液时，肉汤温度不宜过高，一般以放冷为宜。

②煌绿的纯度不应低于 **93%**。

4.86 0.1%蛋白胨水稀释剂**4.86.1 成分**

蛋白胨	1g
蒸馏水	1 000mL

4.86.2 制法

溶解蛋白胨于蒸馏水中，校正 **pH** 至 **7.0**，**121℃** 灭菌 **15min**。

4.87 肠毒素产毒培养基**4.87.1 成分**

蛋白胨	20g
胰消化酪蛋白	200mg(氨基酸)
氯化钠	5g
磷酸氢二钾	1g
磷酸二氢钾	1g
氯化钙	0.1g
硫酸镁	0.2g
菸酸	0.01g
蒸馏水	1 000mL
琼脂	10~ 12g (固体透析培养用)

pH7.2~7.4

4.87.2 制法

除琼脂外将所有成分混于水中，溶解后调 pH7.2~7.4，如同固体透析培养法再加入琼脂，121℃高压灭菌 30min。

4.88 改良TJA培养基(改良番茄汁琼脂培养基)**4.88.1 成分**

番茄汁	50mL
酵母抽提液	5g
肉膏	10g
乳糖	20g
葡萄糖	2g
K ₂ HPO ₄	2g
吐温80	1g
乙酸钠	5g
琼脂	15g
水加至.1000mL	pH6.8±0.2

4.88.2 制法

番茄汁的制作：将新鲜番茄洗净，切碎(切勿捣碎)，放入三角烧瓶，置4℃冰箱8~12h，取出后用纱布过滤即成。如一次使用不完，可将其置入0℃冰箱，可保存四个月。使用时让其在常温下自然溶解。

制法：将所有成分加入蒸馏水中，加热溶解，校正pH6.8±0.2。分装烧瓶，高压灭菌121℃ 15~20min。临用时加热融化琼脂，冷至50℃时使用。

4.89 改良MC培养基**4.89.1 成分**

大豆蛋白胨	5g
牛肉浸膏	5g
酵母浸膏	5g

葡萄糖	20g
乳糖	20g
碳酸钙	10g
琼脂	15g
蒸馏水	1000mL
1%中性红溶液	5mL
硫酸多粘菌素B(酌情而加)10万国际单位	

4.89.2 制法

将前面7种成分加入蒸馏水中，加热溶解，校正pH6，加入中性红溶液。分装烧瓶，高压灭菌121℃15~20min。临用时加热融化琼脂，冷至50℃，酌情加或不加硫酸多粘菌素B(检样有胖听或开罐后有异味等怀疑有杂菌污染时，可加多粘菌素B，混匀后使用)。

4.90 0.1%美兰牛乳培养基

新鲜脱脂牛乳	90mL
1%美兰水溶液	10mL

4.91 6.5%氯化钠肉汤

肉浸液(PH7.6)	100mL
氯化钠	6g

4.92 pH9.6葡萄糖肉汤

普通肉汤校正pH9.6加入0.2%葡萄糖。

4.93 40%胆汁肉汤

pH7.6肉浸液	60mL
葡萄糖	0.12g
牛胆汁	40mL

4.94 淀粉水解培养基

4.94.1 配方

PH7.6肉浸液琼脂	90mL
羊血清	5mL
3%淀粉溶液	10mL

4.94.2 制法

4.94.2.1 将肉浸液琼脂溶化。

4.94.2.2 待冷至50℃左右以无菌操作加入淀粉溶液及无菌羊血清混合后，倾注平板。

4.95 精氨酸水解培养基

蛋白胨	0.1g
氯化钠	0.5g

磷酸氢二钾	0.6g
L精氨酸	1g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1.4mL
琼脂	0.3g
蒸馏水	100mL
pH7.2	

4.96 乳酸杆菌糖发酵管

4.96.1 基础成分

牛肉膏	5g
蛋白胨	5g
酵母浸膏	5g
吐温80	0.5mL
琼脂	1.5g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1.4mL
蒸馏水	1000mL

4.96.2 制法

4.96.2.1 按0.5%加入所需糖类，并分装小试管。

4.97 七叶苷培养基

蛋白胨	5g
磷酸氢二钾	1g
七叶苷	3g
枸橼酸铁	0.5g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1.4mL
蒸馏水	100mL

附加说明：本标准由卫生部卫生监督司提出。

本标准由卫生部食品卫生监督检验所负责起草。本标准主要起草人周桂莲、刘宏道。本标准由卫生部委托技术归口单位卫生部食品卫生监督检验所负责解释。

中华人民共和国卫生部 1994-03-18 批准，1994-09-01 实施。

改良 MC 培养基

成分

大豆蛋白胨 5g

牛肉浸膏 5g

酵母浸膏 5g

葡萄糖 20g

乳糖 20g

碳酸钙 10g

琼脂 15g

蒸馏水 1000mL

1%中性红溶液 5mL

硫酸多粘菌素 B（酌情而加）10 万国际单位

[编辑本段]制法

将前面 7 种成分加入蒸馏水中,加热溶解,校正 pH6,加入中性红溶液。分装烧瓶,高压灭菌 121℃ 15~20min。临用时加热融化琼脂,冷至 50℃,酌情加或不加硫酸多粘菌素 B（检样有胖听或开罐后有异味等怀疑有杂菌污染时,可加多粘菌素 B,混匀后使用）。

改良番茄汁琼脂培养基基础粉(TJA)

该培养基制成琼脂斜面,可作为食品中乳酸杆菌的生长培养用,也可用于乳酸杆菌的平板菌落计数。配合 SM0112 使用。



改良番茄汁琼脂培养基基础粉(TJA)

二、产品配方

产品名称	产品成分	成分组成(克/升)
改良番茄汁琼脂培养基基础粉	牛肉膏	10
	酵母浸出物	5

附录

(TJA)	乳糖	20
	葡萄糖	2
	磷酸氢二钾	2
	乙酸钠	5
	番茄汁粉	20
	琼脂	12

- 1、取本品 66g 加入 1000ml 蒸馏水中，加热溶解并不停地搅拌。
- 2、煮沸一分钟， 121 °C 高压灭菌 15 分钟。
- 3、冷却 45 -50 °C，加入 SM0112 添加剂，混匀后倾倒入平板。

《食品微生物学》实验指导书

编者：刘变芳

西北农林科技大学食品科学与工程学院

二〇〇九年五月

实验一 环境中微生物的检测

一、目的要求

了解环境中微生物的生存，初步建立从事微生物工作者必须具有的“无菌”概念，并认识微生物细胞的群体结构—菌落

二、基本原理

微生物个体微小，种类繁多且无处不有，但肉眼不可见。若用营养琼脂平板法进行检测，即可看到细胞繁殖后的群体结构，即菌落。不同的微生物形成的菌落性状不同，它是认识和鉴别各种微生物的依据之一。

一般细菌在肉汁营养琼脂上的菌落形态，可从形状、大小、色泽、光泽、隆起度、透明度、表面光滑或粗糙、边缘整齐或不规则等特征加以区别。

三、实验材料

牛肉膏蛋白胨琼脂平板培养基 5 副（供 4 人用）。

四、实验步骤

1. 编号 每人取牛肉膏蛋白胨琼脂平板培养基 1 副，用特种铅笔在皿盖上注明班、组号及操作处理号（同桌 4 人分别记以 1、2、3、4），另一副平板培养基皿盖上注以“CK”字样（对照），但不许打开皿盖。

2. 处理操作 打开皿盖按下列方法各自进行操作：

- (1) 在桌面上，使平板培养基于空气中暴露 5~10min，盖上皿盖。
- (2) 用手指在平板培养基表面轻压 3~5 点，盖上皿盖。
- (3) 口对平板培养基咳嗽几下，盖上皿盖。
- (4) 取头发 1 根，在平板培养基表面任一方向划线 3~5 条，盖上皿盖。

3. 培养 操作完毕，将 5 副培养皿重叠，倒置于 28℃ 温度下培养 2~3d。

4. 检查 取出培养皿，仔细观察各皿中的菌落形态，并统计出每皿菌落数。

五、实验报告

将实验结果填入表 1—1 中。

表 1—1 环境中微生物检测结果

皿号	菌落各数 (个/皿)	优势类群菌落特征 (选典型代表描述)							
		形状	大小 (mm)	色泽	光泽	高度	透明度	边缘状况	表面状况
1									
2									
3									
4									
CK									

*注：菌落特征描述

1. 形状：园状、丝状、不远见则状、假根状。
2. 大小：以直径 (mm) 表示。
3. 光泽：玻璃状、蜡质状、油脂状。
4. 高度：扁平、隆起、凸形、乳头形。
5. 透明度：透明、半透明、不透明。
6. 边缘状况：光滑、湿润、干燥、皱褶。

六、思考题

1. 各处理皿的菌落性状有何异同？
2. 环境中微生物检测结果说明什么问题？对你有何启示？

实验二 细菌运动性的观察

一、目的要求

学习水浸片和悬滴标本片的制作方法，观察细菌的运动。

二、基本原理

具鞭毛的细菌在液体中借助鞭毛的旋转，使菌体能定向的泳动。幼龄菌活泼，老龄菌运动性差或失去鞭毛不能运动，观察细菌的运动常采用水浸片或悬滴标本片。在显微镜下观察时，应减弱光照强度，并注意区分是细菌的真运动，还是因液体流动引起细菌随水流而动，或呈现无规则、原位颤动的布朗运动。

三、实验材料

1. 菌种 培养 24~36h 的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 菌悬液或枯草水 (枯草加水煮沸，加水许蛋白胨，适温培养)，或陈尿液。

2. 器材 凹室载玻片，载玻片，盖玻片，滴管，蒸馏水，吸水纸，擦镜纸，显微镜，双层瓶。

四、实验步骤

(一) 水浸片法

1. 制片 用滴管取菌悬液 (枯草水或陈尿液) 一小滴，置于干净的载玻片中央，以倾斜法加上盖玻片 (勿使产生气泡)。

2. 镜检 将载玻片置显微镜下，用低倍镜、高倍镜观察细菌运动的情况。

(二) 悬滴法

1. 制片 取凹室载玻片一张，于凹室周围涂一圈水膜；取干净的盖玻片一张，于中央滴一小滴菌悬液，小心而迅速的翻转盖玻片，使菌液保留园形水珠状。将盖玻片轻放于凹室的上面，使液滴空悬于室内，稍压，使盖玻片边缘与水膜密接，以减少菌液蒸发 (图 1—15)。

2. 镜检 标本片置于显微镜下，用低倍镜、高倍镜观察。

五、实验报告

绘出你观察的细菌运动位移轨迹示意图。

六、思考题

1. 显微镜下观察细菌运动时，为何应减弱光线？

2. 细菌的运动布朗运动有何区别？

实验三 显微镜的使用和细菌形态的观察

一、目的要求

学习并掌握显微镜油镜的使用技术及维护的基本知识。使用油镜观察细菌的几种基本形态。用悬滴法在高倍镜或油镜下观察细菌的运动。显微镜油镜使用的原理。

普通光学显微镜的构造

1. 光学部分：接目镜、接物镜、照明装置(聚光镜、虹彩光圈、反光镜等)。它使检视物放大,造成物象。

2. 机械部分:镜座、镜臂、镜筒、物镜转换器、载物台、载物台转移器、粗调节器、细调节器等部件.它起着支持 调节 固定等作用。

普通光学显微镜的放大倍数和分辨率

1. 放大倍数=接物镜放大倍数×接目镜放大倍数

2. 显微镜的分辨率 是表示显微镜辨析物体(两端)两点之间距离的能力,可用公式表示为:

$$D = \lambda / 2n \cdot \sin(\alpha / 2)$$

式中 D: 物镜分辨出物体两点间的最短距离。λ: 可见光的波长(平均 0.55 μm)n: 物镜和被检标本间介质的折射率。α: 镜口角(即入射角)。

普通光学显微镜油镜使用的原理:油镜,即油浸接物镜。当光线由反光镜通过玻片与镜头之间的空气时,由于空气与玻片的密度不同,使光线受到曲折,发生散射,降低了视野的照明度。若中间的介质是一层油(其折射率与玻片的相近),则几乎不发生折射,增加了视野的进光量,从而使物象更加清晰。

二、实验材料

显微镜(显微镜灯)、香柏油、二甲苯、擦镜纸、吸水纸等。细菌三种形态的染色标本。

三、实验程序

显微镜的使用

1. 用前检查: 零件是否齐全, 镜头是否清洁。
2. 调节光亮度
3. 低倍镜观察: 粗调、细调
4. 依次再进行中倍、高倍观察
5. 油镜观察: 高倍镜下找到清晰的物象后, 提升聚光镜, 在标本中央滴一滴香柏油, 使油镜镜头浸入香柏油中, 细调至看清物象为止。
6. 换片: 另换新片, 必须从第三条开始操作。

7. 用后复原：观察完毕，上悬镜筒，先用擦镜纸擦去镜头上的油，然后再用擦镜纸沾取少量二甲苯擦去残留的油，最后用擦镜纸擦去残留的二甲苯，后将镜体全部复原。

显微镜保养和使用中的注意事项：

1. 不准擅自拆卸显微镜的任何部件，以免损坏。
2. 镜面只能用擦镜纸擦，不能用手指或粗布，以保证光洁度
3. 观察标本时，必须依次用低、中、高倍镜，最后用油镜。当目视接目镜时，特别在使用油镜时，切不可使用粗调节器，以免压碎玻片或损伤镜面。
4. 观察时，两眼睁开，养成两眼能够轮换观察的习惯，以免眼睛疲劳，并且能够在左眼观察时，右眼注视绘图。
5. 拿显微镜时，一定要右手拿镜臂，左手托镜座，不可单手拿，更不可倾斜拿。
6. 显微镜应存放在阴凉干燥处，以免镜片滋生霉菌而腐蚀镜片。

思考题

- 1、油镜与普通物镜在使用方法上有何不同？应特别注意些什么？
- 2、使用油镜时，为什么必须用镜头油？镜检标本时，为什么先用低倍镜观察，而不是直接用高倍镜或油镜观察？

实验四 细菌的简单染色法

一、目的要求

学习细菌的简单染色法，观察细菌的形态特征。

二、基本原理

细菌个体小而透明，活细胞与水及玻璃的折光率相差无几，在普通光学显微镜下难以看清。若经染料染色后，增强了细胞折光性，借助颜色的反衬作用，就能看清它们有形状、大小和排列方式。

细菌细胞含核酸较多，故一般染色多用碱性染料，如碱性复红 (Basic fuchsin)、美蓝 (ethylene blue)、结晶紫 (Crystal violet)、孔雀绿 (Malachite green)、番红 (Safranin O) 等，染料需预先配成染液供使用。

简单染色法是用一种染料进行染色。此法仅能显示其形态，而不能辨别其构造。

三、实验材料

1. 菌种 培养 18~24h 的枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌 (*Bac. megathrium*)、或培养 48h 的四联微球菌 (*Micrococcus tetragenus*)、金色微球菌 (*Micrococcus aureus*)。

2. 器材 石炭酸复红液或美蓝染色液，或结晶紫染色液，或番红染色液，蒸馏水 (滴瓶装)，载玻片，接种环，酒精灯，火柴，洗瓶，染色盆，染色架，废物缸，吸水纸，擦镜纸，显微镜，双层瓶。

四、实验步骤

制作细菌标本的步骤：涂片→干燥→加热固定→冷却→染色→水洗→干燥→镜检。

1. 涂片 取干净载玻片一张放于染色架上。于载玻片两处分别滴加蒸馏水一小滴，以无菌操作法用接种环取斜面菌种菌体少许，放于载玻片一处的水滴中混匀，并涂成均匀的薄层；另一滴水同法放入第二种菌体涂匀 (图 1—7)。

2. 干燥 使涂片在空气中自然风干或在酒精灯焰高处 (距火焰 8~10cm) 微热烘干。

3. 加热固定 将干燥后的涂片用手拿住一端 (涂面向上)，以钟摆摆动速度通过酒精灯焰 2~3 次，使加热固定。目的是杀死细菌以增强细胞着色力，并使细胞粘着于载玻片上。

4. 染色 将载玻片放回染色架上，待冷却。任取染色剂一种，滴 1~2 滴于二处的涂面上进行染色。一般碱性复红染色 30s~1min，(或用美蓝染色 2~3min，或结晶紫染色 1min，或番红染色 2~3min)。

5. 水洗 染色完毕，手持染色架略呈倾斜状，用洗瓶从载玻片一端缓慢冲洗染液，让废液流入染色盆中。再用吸水纸吸去载玻片上的残留水滴，自然干燥。

6. 镜检 先用低倍镜寻找标本的最好部位，再换高倍镜、油镜观察，绘图。

图 1—15 细菌染色标本涂片制作过程

1. 接种环灭菌 2. 拔棉塞 3. 管口灭菌 4. 取菌

5. 管口灭菌 6. 加棉塞 7. 涂片 8. 接种环灭菌

五、实验报告

绘出你镜检的细菌细胞形态图 2~3 个，注明细菌名称及放大倍数。

六、思考题

1. 简单染色法的原理与步骤是什么？

2. 涂片的要点是什么？加热固定的目的何在？

实验五 细菌的革兰氏染色法

一、目的要求

了解革兰氏染色的原理，掌握革兰氏染色的方法以鉴别细菌。

二、基本原理

革兰氏染色法是细菌学中一种重要的鉴别染色法。其方法是，细菌涂片先经结晶紫初染，加媒染剂碘液处理，再以脱色剂酒精脱色，最后用复染剂番红复染。若细菌不被脱色而保留紫红色者，称为革兰氏阳性菌或正反应（用G⁺表示）；若被脱色而染上复染剂的粉红色者，称为革兰氏阴性菌或负反应（用G⁻表示）。革兰氏染色常受菌龄、培养基的pH的染色技术等的影响，一般采用幼龄菌为宜。

革兰氏染色机理虽然至今还不完全清楚，但显然与两类细菌的细胞壁成份和结构有密切关系。革兰氏阴性菌的细胞壁中含较多的类脂质，而肽聚糖含量较少。当用酒精脱色时，类脂质被溶解，从而增加了细胞壁的通透性，使初染后的结晶紫与碘的复合物易于渗出，结果细胞被脱色，经复染后则呈现复染剂的颜色。而革兰氏阳性菌细胞壁中肽聚糖含量多且交联度大，类脂质含量少，经酒精脱色后，肽聚糖层的孔径变小，通透性降低，因而细胞仍保留初染时的颜色。

三、实验材料

1. 菌种 培养 24h 的大肠杆菌 (*E. coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。
2. 器材 结晶紫染色液，路哥 (Lugol) 氏碘液，95%酒精，番红或石炭酸复红染色液，载玻片，接种环，酒精灯及其它染色、镜检用物。

四、实验步骤

革兰氏染色的程序为：

涂片→干燥→^{水洗}加热固定→^{水洗}冷却→^{水洗}结晶紫初染→碘液媒染→酒精脱色→番红复染
水洗
→干燥→镜检。

1. 涂片、固定 取干净载玻片一张放在染色架上，分别在载玻片的两处各滴一小滴蒸馏水，按无菌操作法用接种环分别取大肠杆菌与葡萄球菌少许，各涂于一处的水滴内（作好标记），涂匀、干燥、加热固定。

2. 染色 待涂片冷却后染色。先滴加结晶紫染色 1min，用水冲去染液，控净水，再滴加碘液媒染 1min，倾去碘液，水洗，以 95%酒精脱色 20~30s（严格掌握时间），水洗，最后滴加番红

复染 2~3min (或用石炭酸复红复染 30s), 水洗, 干燥。

3. 镜检 先用低倍镜寻找标本清晰部位, 再换油镜观察细胞形态及染色结果。

五、实验报告

绘出油镜下的细胞形态图, 注明细胞颜色, 说明染色反应。

六、思考题

1. 革兰氏染色法哪一步最关键? 为什么?
2. 革兰氏染色法为何要求用幼龄细胞进行染色?

实验六 细菌的荚膜染色法

一、目的要求

学习荚膜染色技术，观察细菌的荚膜形态。

二、基本原理

荚膜(Capsule)是某些细菌分泌于细胞壁外的一层粘性物质，具一定形状，其主要成分为多糖，它与染料亲合力很弱，不易着色；但荚膜通透性较好，某些染料可透过荚膜使菌体着色。因此，染色后要菌体周围有一浅色或无色的透明圈，即荚膜。

荚膜染色常采用负染色法，也称衬托染色法。此法使菌体和背景显色，来衬托出无色的荚膜。

荚膜易溶于水，故染色中尽量少用水。荚膜受热失水易引起皱缩变形，故不必加热固定。也可用酒精或甲醇进行固定。

三、实验材料

1. 菌种 在阿须贝(Ashby)无氮培养基上培养3~4d的褐球固氮菌(*Az. chroococcum*)、培养2d胶质芽孢杆菌(*B. mucilaginosus*)。

2. 器材 石炭酸复红液、黑色素液(或碳素墨水)，95%酒精，载玻片，接种环及其它染色、镜检用物。

四、实验步骤

方法一

1. 涂片 取干净载玻片一张，于中央滴加蒸馏水少许，用接种环以无菌操作法取菌体少许放入蒸馏水中混匀并涂成薄层，晾干。

2. 固定 滴加95%酒精一滴固定1min，倾去，晾干。

3. 染色 加石炭酸复红液染色1min，水洗，晾干。

4. 涂背景 于涂片一端滴少许(半滴)黑色素液，另取一张边缘光滑的载玻片，将其一端放于黑色素液滴中，以30°C角顺势向涂片另一端滑动(图1—16)，使涂片成一均匀薄层，自然干燥。

5. 镜检 在高倍镜或油镜下观察。细胞呈红色，背景淡灰色，中间显示无色的透明圈，即荚膜。

方法二

1. 涂片、染色 于载玻片中央一小滴石炭酸复红液，用接种环取菌体少许，放于石炭酸复红液液滴中，混匀并涂成薄层，自然干燥后，同上法涂抹黑色素液，晾干。

2. 镜检，方法同上。

方法三

1. 涂片 取干净载玻片一张，于中央滴加 1 小滴黑色素液，用接种环以无菌操作法取菌体少许放入黑色素液滴中充分混匀。

2. 加盖片 取洁净盖玻片一张，以倾斜式轻轻复盖于混合液上，然后在盖玻片上放一小片吸水纸（或滤纸），轻轻按压，以便吸收盖玻片周边多余的混合液。

3. 镜检 用低倍镜、高倍镜观察。背景黑色，细胞较暗，其周围呈现出明亮的透明圈，即荚膜。

五、实验报告

绘出细菌荚膜镜检图。

六、思考题

1. 荚膜染色法的原理是什么？

2. 荚膜染色中应注意的事项是什么？

实验七 细菌的芽孢染色法

一、目的要求

学习芽孢染色法，观察细胞芽孢的形态特征及着生位置。

二、基本原理

细菌的芽孢具有厚而致密的壁，通透性差，不易着色。普通染色法只能使细胞着色，而芽孢显示不着色的透明体，因而需用特殊的芽孢染色法。该法是采用着色力强或高浓度的染料，进行加温处理并延长染色时间，使菌体与芽孢均染上颜色，芽孢一旦着色就难以脱色。再通过脱色剂脱去菌体颜色而保留芽孢的颜色，然后再用复染剂复染菌体，使菌体与芽孢呈现不同的颜色，便于观察。

三、实验材料

1. 菌种 培养 24~30h 的枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌或 状芽孢杆菌 (*Bac. mycoides*)。
2. 器材 5%孔雀绿液，石炭酸复红液，酒精丙酮液，试管，木夹，载玻片及接种、染色、镜检用物。

四、实验步骤

方法一

1. 涂片 取干净载玻片一张，于中央滴蒸馏水少许，按无菌操作法取菌，涂片，风干，加热固定，冷却。
2. 初染 将涂片放在染色架上，于涂面处滴加孔雀绿染色液数滴。手持染色架，于灯焰高处徐徐加热至有蒸气冒出，随时补加染液覆盖涂面，防止沸腾或蒸干。维持 8~10min，水洗脱色，至无绿色出现为度。
3. 复染 用石炭酸复红液复染 30s~1min，水洗晾干。
4. 镜检 在低倍镜、油镜下观察。芽孢呈绿色，菌体呈红色。

方法二

1. 初染 取试管 1 支，加蒸馏水 7~8 滴，按无菌操作法用接种环挑取菌种 1 满环，混于蒸馏水中制成浓菌悬液。再于管中滴加等量的石炭酸复红液，用木夹夹好，于灯焰上加热近沸，维持 3~4min（加热近沸时应离开灯焰，管口向外，以防喷出）。
2. 涂片 用接种环取加热后的菌悬液 2~3 环，制成涂片、风干、加热固定、冷却。
3. 脱色 于涂片上滴加酒精丙酮液 1~2 滴，进行脱色 30s。

4. 复染 用 5%孔雀绿液复染 2~5min，水洗，晾干。

5. 镜检 油镜下观察。芽孢呈红色，菌体呈绿色。

五、实验报告

图示镜检芽孢杆菌的芽孢形状及着生位置，并注明染色结果。

六、思考题

芽孢杆菌属与梭状芽孢杆菌属的芽孢形状与着生位置有何异同？

实验八 放线菌形态及菌落特征的观察

一、目的要求

学习入线菌的制片方法，观察放线菌的细胞形态和菌落特征。

二、基本原理

放线菌是由菌丝组成的分枝丝状体，以链霉菌属 (*Streptomyces*) 的菌丝体最发达。菌丝可分为基内菌丝 (较细)、气生菌丝 (较粗)、孢子丝三种。放线菌发育到一定阶段，孢子丝即形成孢子。孢子丝有直形、波曲形、螺旋形 (左旋、右旋、密螺、疏螺之分)、轮生、单搓分枝等；孢子有球形、椭圆形、柱状或瓜子形、刺型、疣突型、毛发型等常成串排列或单个存在。这些特征是鉴定菌种的重要依据之一。

放线菌菌落特征：园形、较小、干燥、质地致密，表面粉粒状或茸毛状，有的呈同心环或辐射状。基内菌丝与培养基结合紧密，用针难以挑取。菌丝体与孢子常具有不同色素，故菌落正面与背成可显示相应颜色。有的种类散发有特殊气味。

三、实验材料

1. 菌种 细黄链霉菌 (5~6) (*Str. microflavus*)，灰色链霉菌 (*Str. griseus*)，天蓝色链霉菌 (*Str. coelicolor*) 的插片培养物或划线法培养的菌落。

2. 器材 石炭酸复红液或美兰染色液，载玻片，解剖针，镊子，无菌水管及接种、染色、镜检用物。

四、实验步骤

(一) 放线菌细胞形态的观察

方法一 插片法

1. 插片制作 用接种环取放线菌斜面培养管的菌体少许，放入无菌水管中制成孢子悬液，用无菌吸管取孢子悬液一滴，放入高氏 1 号平板培养基上，用无菌刮铲涂抹均匀后，将已消毒好的盖玻片，以 45°C 角插入培养基中 (如图 1—17) 置 28~30°C 下培养 4~5d。

还可采取先插盖玻片，再以接种环取孢子悬液接种于盖玻片与培养基相接的沿线处。

2. 制片 用镊子取插片一张，用吸水纸擦去生长较差一面的菌丝体，然后用镊子夹住盖玻片，使有菌面朝上，通过灯焰 2~3 次进行加热固定、冷却。

3. 染色 在盖玻片上滴加一滴石炭酸复红液染色 1min，水洗，干燥。

4. 镜检 取干净载玻片一张，将盖玻片染色面向下，放在载玻片中央，在低倍镜、高倍镜、

油镜下观察，辨认放线菌的菌丝体、孢子丝及孢子的形态及排列方式。

方法二 搭片法

1. 制片 用无菌接种小铲（竹制或金属制）在高氏一平板培养基上开挖两条宽约 **0.5cm** 左右平行槽，用接种环从放线菌斜面培养管上取面熟孢子接种于槽内边缘一侧，然后用无菌镊子夹取无菌盖玻片，轻轻搭放在接种后的槽面上轻压，每条槽可盖 **3~4** 片，于 **28℃** 下培养 **5~7d**（如图 1—18）。

2. 镜检 用镊子小心地取下盖玻片，放置于干净载玻片上，有菌的一面朝上，在低倍镜或高倍镜下观察丝自然生长形态及孢子丝等结构。

方法三 印片法

1. 菌落培养 采用平板划线法或涂抹法分离出孤立菌落。

2. 制片 取一张干净的载玻片，在灯焰上微热后放在染色架上；用解剖针切割一个完整的菌落（连同培养基一起），并以解剖针穿入培养基中小心的取出菌块，将菌落面紧贴在微热过的载玻片中央，轻轻按压，切忌不可滑动移位，然后再小心挑去菌块。

2. 加热固定 将载玻片通过灯焰 **2~3** 次，冷却。

3. 染色 滴加石炭酸复红液染色 **1min** 或美蓝液染色 **2~3min**，水洗，干燥。

4. 镜检 在低倍镜、高倍镜、油镜下观察。

（二）放线菌菌落特征的观察

观察放线菌的菌落，注意其大小、形状、色泽（正面与背面）、表面状况、干燥或湿润、气味有无等，描述其特征。

五、实验报告

1. 图示你观察的放线菌细胞形态，区分气生菌丝、孢子丝及孢子排列方式。

2. 记述几种放线菌的菌落的特征。

六、思考题

放线菌制片法与细菌制片法有何不同？

实验九 酵母菌形态及菌落特征的观察

一、目的意义

学习酵母菌的制片方法，观察酵母菌的形态及生殖方式，认识酵母菌的菌落特征。

二、基本原理

酵母菌是单细胞的真菌，细胞圆形、卵圆形或圆柱状，较细菌细胞大，具明显的细胞核和肝糖粒、脂肪粒等内含物。无性繁殖为主，有的种可形成芽簇或细胞互联呈假菌丝。此外尚有裂殖酵母进行裂殖。这些都是鉴定酵母菌菌种的重要依据。

观察酵母菌细胞时，常用路哥氏（Logol）碘液制成水浸片，以观察细胞形态并鉴别肝糖粒之存在；若区别死、活细胞时，可以美蓝液染色。由于活细胞的还原力强，美蓝着色后又被还原为无色，而死细胞则为蓝色。

酵母菌菌落特征：与细菌菌落相似。一般圆形，表面光滑、湿润、粘稠，用针易挑取，具油脂光泽，多数种为乳白色，少数种呈红色。

三、实验材料

1. 菌种 啤酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、红酵母（*Rhodotorula glutinis*）、裂殖酵母（*Schizosaccharomyces sp*）的斜面培养管和平板上的单菌落。

2. 器材 路哥氏碘液，载玻片，接种环及染色、镜检用物。

四、实验步骤

1. 制片 取干净载玻片一张，于中央滴加路哥氏碘液一滴，用接种环以无菌操作法取啤酒酵母菌体少许，放入碘液中混匀，然后在液滴上以倾斜式加盖玻片一张（勿使产生气泡），待用。

同法，分别制作红酵母与裂殖酵母的标本片，待用。

2. 镜检 用低倍镜、高倍镜观察三种酵母菌的细胞形态及生殖方式，绘图。

3. 菌落观察 仔细观察平板培养基上的单菌落，记述三种酵母菌的菌落特征。

五、实验报告

1. 图示镜检的酵母菌细胞形态及生殖方式。

2. 列表记述酵母菌的菌落特征。

六、思考题

你能准确地识别酵母菌与细菌的菌落吗？

实验十 霉菌形态及菌落特征的观察

一、目的要求

学习霉菌的制片方法，观察常见霉菌的细胞形态、构造和菌落特征。

二、基本原理

霉菌是丝状真菌的俗称。个体大且构造较复杂，菌丝一般无色透明，宽度在 3~10 μ m，有隔或无隔，在低倍镜或高倍镜下即可看清。菌体分为基内菌丝与气生菌丝，气生菌丝间生孢子。孢子形状、颜色、及着生部位及排列方式等是认识霉菌种类的依据。制片时，常用乳酸石炭酸棉蓝液，做成水浸片进行观察。这是霉菌制片中常用的固定液，它可使菌丝体分散，细胞不易变形，并具染色、杀菌作用。也可用插片法，搭片法等进行培养，均可取得满意效果。

菌落特征：一般较大，有固定形状，也有无定形的；菌丝体结构疏松可略致密，有呈绒毛状，有呈蛛网状或棉絮状；表面粉粒或粗粒状；不同种类因孢子颜色而菌落也呈相应的颜色；有的霉菌能分泌色素。

三、实验材料

1. 菌种 2^o波林 (Balling) 麦芽琼脂平板上培养 2~3d 的根霉 (*Rhizopus sp.*)、毛霉 (*Mucor sp.*)，在酸化的马铃薯蔗糖琼脂平板上培养 3~5d 的青霉 (*pemicillium sp.*)、曲霉 (*Aspergillus sp.*)。

2. 器材 乳酸石炭酸棉蓝液，解剖针、镊子及接种、染色、镜检用物。

四、实验步骤

(一) 霉菌细胞形态的观察

方法一 搭片法

1. 制片 用灭菌接种小铲（竹制或金属制）在马铃薯蔗糖琼脂平板上挖两条宽 0.5cm 的平行槽，将青霉等待观察的霉菌菌丝或孢子接种于槽缘一侧，用无菌镊子将灭菌盖玻片轻轻搭盖于平皿内的槽面上，每条槽可盖 3~4 片，每皿即 6~8 片，于 28 $^{\circ}$ C 下培养 2~3d。

2. 镜检 用镊子小心地将皿内的盖玻片取出，有菌的一面向上，放置于干净载玻片上，在低倍镜或高倍镜下观察，可见到菌体的自然发育情况及各部构造。

方法二 水浸片法

1. 制片 取干净载玻片一张，于中央滴加乳酸石炭酸棉蓝液一滴，用解剖针从菌落边缘

划取菌丝体一小块，放入乳酸石炭酸棉蓝液滴中，小心地加盖玻片一张，并轻压盖玻片（勿使产生气泡）。

2. 镜检 在低倍镜或高倍镜下观察。观察时注意菌丝有无隔膜，假根，足细胞等特殊构造，孢子形状，大小和着生方式。

方法三 载片培养法

1. 制片 在装有U形玻棒的无菌皿中，倒入3~4ml 无菌水，按无菌操作将灭过菌的载玻片放在U形玻棒上，用无菌吸管吸取融化并冷却至50℃左右的马铃薯蔗糖琼脂(含琼脂1%)培养基于载玻片放在培养基上，并轻压几下，置皿于28~30℃温度下培养。

2. 镜检 根据需要分别于培养不同天数，观察霉菌发育的全过程。可用低倍镜通培养皿盖观察其发育情况。

若要封片保存，先将载玻片取出放温箱中使蒸发去一部分水分，擦净熏片周边（勿使移动）再加一圈合成树脂，风干后即可长期保存。

（二）霉菌菌落特征的观察

认真观察根霉、毛霉、青霉、曲霉的菌落，记述其特征（形状、大小、表面状况、颜色及产色素与否等）。

五、实验报告

1. 绘出镜检的几种霉菌细胞形态构造图，注明各部构造名称。

2. 列表记述青霉、曲霉、根霉、毛霉的菌落特征。

六、思考题

霉菌制片中为何用乳酸石炭酸棉蓝液而不宜用水？

实验十一 微生物细胞大小的测定

一、目的要求

了解目镜测微尺和镜台测微尺的构造和使用原理；掌握微生物细胞大小的测定方法。

二、基本原理

微生物细胞的大小是微生物重要的形态特征之一。由于菌体很小，只能在显微镜下来测量。用来测量细胞大小的工具有目镜测微尺（简称目尺）和镜台测微尺（简称台尺）。

目镜测微尺是一块圆形玻片，在玻片中央把5mm长度刻成50等分（图1—20）或把10mm长度刻成100等分。测量时，将其放在接目镜中的隔板上来测量经显微镜放大后的细胞物象，由于在显微镜不同的接目镜和接物镜系统下，放大倍数不同，目镜测微尺每格所示长度随显微镜放大倍数而变人化。所以在使用前，须用镜台测微尺来校正，求出在显微镜某一接目镜和接物镜系统下，目镜测微尺一格的长度。

镜台测微尺（图1—21）形如载玻片，在中央的圆形盖片下，有一条长为1mm的刻度，精确等分为100格，每格长10um。故用已知长度的台尺校正目尺，即可求出目尺一格的长度。

三、实验材料

1. 菌种 巨大芽孢杆菌或杀螟杆菌染色片；酵母菌水浸片。
2. 器材 目镜测微尺，镜台测微尺，显微镜，双层瓶，擦镜纸。

四、实验步骤

（一）目尺校正

1. 将目镜测微尺小心地装入接目镜的隔板上，使刻度向下，把镜台测微尺置于载物台上，使刻度向上，用弹簧夹夹稳。

2. 先用低倍镜观察，调节工作距离，从视野中看清镜台测微尺的刻度后，移动推动器并转动目镜，使目镜测微尺的刻度和镜台测微尺的刻度平行。

3. 用推动器定位，使两尺重叠，先使两尺一端“0”刻度完全重合，再寻找两尺另一端的重合刻度，以两端的重合刻度线相距愈远愈好。

4. 数出两重合刻度间目镜测微尺的格数（N）和镜台测微尺的格数（N'）。已知台尺每格长度是10um，故目尺每格之长度X即可求得：

$$X = N' \times 10 = \frac{\text{两重合线间台尺格数} \times 10}{N}$$

两重合线间目尺格数

5. 先在低倍镜下校正后, 随即用推动器把台尺的刻度移到视野正中央, 然后更换高倍镜。
6. 同法校正正在高倍镜和油镜下目镜测微尺每格代表的长度。
7. 校正完毕, 取下镜台测微尺, 用一张擦镜纸蘸酒精乙醚液少许, 擦去油污, 再以另一张干净的擦镜纸轻轻擦去残留的酒精乙醚液, 然后装入盒内, 妥为保存。

(二) 细胞大小的测定

1. 将细菌染色片或酵母菌水浸片, 置于载物台上, 用低倍镜和高倍镜找到目的物, 把菌体分散均匀的部位移到视野中心。
2. 在高倍镜下, 测量酵母菌细胞的大小。在油镜下, 测量细菌细胞的大小。先量出菌体长和宽或直径占有目镜测微尺的格数, 再用校正的目镜测微尺每格长度, 计算出菌体长度和宽度, 计量单位以微米 (μm) 表示。同一涂片上, 任意测定 10~20 个菌细胞, 求其平均值, 即可代表该菌的大小。

五、实验报告

将实验结果记录于表 1—4, 表 1—5 中

表 1—4 台尺校正目尺结果

物镜	目尺格数	台尺格数	目尺校正值 ($\mu\text{m}/\text{格}$)
10 \times			
40 \times			
100 \times			

表 1—5 细菌大小测定记录 菌名_____

细胞数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Σ	平均
长																	
宽																	

结果计算 长 $\mu\text{m} = \text{长平均格数} \times \text{校正值}$

宽 $\mu\text{m} = \text{宽平均格数} \times \text{校正值}$

大小表示 宽 $\mu\text{m} \times$ 长 μm

六、思考题

1. 为什么目镜测微尺必须用镜台测微尺校正?

2. 在目镜放大倍数固定情况下，改变接物镜，由低倍、高倍到油镜，为什么测出目尺每格之长度愈来愈小。

实验十二 显微镜下直接测数法—血球计数板法

一、目的要求

了解血球计数板的构造、原理和计数方法，掌握显微镜下直接计数的技能。

二、基本原理

血球计数板测数，一般适用于含菌体较大的单细胞的悬浮液，如酵母菌、霉菌孢子等，若有杂菌或杂质，则较难辨认。对个体小的细菌也不易辨清，必要时，可采用彼德罗夫—霍瑟（Petroff-Hausser）细菌计数板，即可在油镜下计数。

血球计数板的构造和使用原理：（图 1—22）。

血球计数板为一特制的厚型载玻片，在其中部有三条玻璃台（a, b, a'），b 台上刻有一对每边长 1mm 的大方格，大方格各边分为 20 等分，因此 1mm² 的大方可知，等分为 400 个小方格（图 1—23）。a, a' 台比 b 台高出 0.1mm，所以加盖玻片后，从盖玻片到 b 台台面之高度（即液层深度）也是 0.1mm，由以上数据可得出：

$$\text{大方格面积} = 1\text{mm} \times 1\text{mm} = 1\text{mm}^2$$

$$\text{大方格体积} = 1\text{mm}^2 \times 0.1\text{mm} = 0.1\text{mm}^3$$

$$\text{一个小方格体积} = \frac{0.1}{400} \text{mm}^3 = \frac{1}{4000} \text{mm}^3$$

$$\text{已知：1ml 体积} = 10\text{mm} \times 10\text{mm} \times 10\text{mm} = 1000\text{mm}^3$$

$$\text{所以，1ml 体积中应含有小方格数} = \frac{1000\text{mm}^3}{\frac{1}{4000}\text{mm}^3}$$

$$= 1000 \times 4000$$

$$= 4 \times 10^6 \text{ 个小方格}$$

$$\text{即系数 } K = 4 \times 10^6$$

$$\text{因此，每 ml 菌悬液中含有细胞数} = K \times d \times \bar{N}$$

$$K: 4 \times 10^6$$

D: 菌液稀释倍数

\bar{N} : 一个小方格中细胞平均数。

由上可知，用血球计数板在显微镜下直接测数时，首先数出一个小方格（ $\frac{1}{4000} \text{mm}^3$ ）

均质菌液中的细胞数，然后根据公式求得 1ml 菌液中的细胞数。

三、实验材料

1. 测试样品 酵母菌液或细菌悬液。

2. 器材 血球计数板，盖玻片（22mm×22mm），无菌滴管，吸水纸，擦镜纸，显微镜等。

四、实验步骤

1. 准备工作

（1）取血球计数板一个，用无菌滴管吸取摇匀的菌悬液少许，滴在 b 玻璃台网格上，不要使 a, a' 玻璃台沾上菌液，以免加盖玻片后，造成 b 台上液层深度的误差。

（2）取干净的盖玻片一张，盖在 a, a' 玻璃台上，勿使产生气泡，使多余的菌液流入 a, b 和 a, a' 玻璃台间之液槽内，静置数分钟，使菌细胞沉积于平面上。

2. 镜检测数

（1）将血球计数板置载物台上夹稳，先用低倍镜找到方格位置，再用高倍镜测数，由于生活细胞的折光率和水的折光率相近，观察时应减弱光的高度。

（2）在高倍镜下，观察五个视野，每个视野任意计数五个小方格内之细胞数。位于小方格四边的压线细胞，只计两边，另两边不计；对于出芽的酵母，以芽体与细胞接近大小时，按二个菌体计数。然后求出一个小方格的细胞平均数（ \bar{N} ）。在观察时，应充分运用微动螺旋，以便观察到处于不同液层的细胞，以减少误差。

（3）测数完毕，取下盖玻片，用清水把血球计数板冲洗干净，用吸水纸轻轻吸去吸去台上附着的水分，再用擦镜纸小心地吸干计数板，注意勿使网格受到磨损，然后放入盒内保存。

3. 计算

将 \bar{N} 值代入公式，求出每 ml (g) 菌液中的细胞数。

五、实验报告

计算并报告所测样品每 ml (g) 的含菌数。

六、思考题

1. 系数 K 值是如何求得的？

2. 血球计数板的显微镜直接测数法有何优缺点？

实验十三 营养元素对微生物生长发育的影响

一、目的要求

了解微生物生长发育和营养元素的关系。

二、基本原理

微生物生长发育要求一定的营养条件，影响微生物生长发育的元素主要有碳、氮、磷、钾、硫、镁及微量元素。有的微生物还需从环境中获得维生素类物质。本实验通过几种含有不同成分的合成培养基，测试碳、磷、钾对微生物生长发育的影响。

三、实验材料

1. 菌种 黑曲霉 (*Aspergillus niger*)。

2. 器材 蔗糖、100g/L 的 NH_4NO_3 、 KH_2PO_4 、 NaH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KCl 、1g/L 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 ZnCl_2 、蒸馏水，pH 试纸，10% HCl ，培养管，无菌水管，量筒、烧杯，1ml 吸管，托盘天平，接种环，酒精灯。

四、实验步骤

1. 制备培养基 试验设计培养基五种。其组分见表 2—2。

表 2—2 测试营养元素的培养基组成

序号	培养基	蔗糖 (g)	NH_4NO_3 (g)	KH_2PO_4 (g)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g)	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	ZnCl_2	蒸馏水 (ml)
1	完全	7.5	0.3	0.1	0.1	微量	微量	100
2	缺碳	—	0.3	0.1	.01	微量	微量	100
3	缺氮	7.5	—	0.1	0.1	微量	微量	100
4	缺磷	7.5	0.3	0.1g KCl	0.1	微量	微量	100
5	缺钾	7.5	0.3	0.1g NaH_2PO_4	0.1	微量	微量	100

2. 按表 2~3 的组分，配制总量 25ml 的上述五种培养基。并以 10% HCl 调 pH 为 5.0 左右

3. 分装灭菌 配好后，将各号培养基分装入培养管中，每号 3 管，每管 8ml，做好标记。

在 0.1Mpa 下灭菌 20~30min，备用。

4. 孢子悬液制备 取无菌水管 1 支，用接种环从黑曲霉斜面菌种管中挑取菌体二环，放入水中，充分混匀，备用。

5. 接种 接无菌操作法用接种环取黑曲霉孢子悬液，接种于上述的各号培养基中，每管接入二环。

6. 培养 接种后，置培养管于 28℃ 温度下培养 5~7d。

表 2-3 一定体积的培养基中各药剂的组成量

体积 (ml)	蔗糖 (g)	含 100g/L 浓度的各成分需要量 (ml)				含 1g/L 各成分需要量 (ml)		蒸馏水 (ml)
		NH ₄ NO ₃	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	KCl	ZnCl ₂	FeSO ₄	
25	2	0.75	0.25	0.25	0.25	1 小滴	1 滴	24
50	4	1.5	0.5	0.5	0.5	1 小滴	2 滴	47
100	8	3	1	1	1	2 小滴	4 滴	94

7. 结果检查 培养好后，观察各号培养基中黑曲霉菌丝及孢子生长状况，并做好记录。

五、实验报告

将实验结果填入表 2-4 中。

表 2-4 营养元素对黑曲霉生长发育的影响

培养基	菌丝生长情况			孢子生长情况	
	有无沉淀	菌膜厚薄	菌膜色泽	生长状况	孢子疏密
完全					
缺碳					
缺氮					
缺磷					
缺钾					

记载符合：优+ + + , 良+ + + , 中+ + , 劣+ , 不发育-。

六、思考题

1. 培养基的 pH 值为何要加酸调至 5 左右？
2. 在缺碳培养基中黑曲霉生长有何特点？原因何在？

实验十四 氧对微生物生长的影响

一、目的要求

了解微生物生长与氧的关系，学习其测定方法。

二、基本原理

根据微生物与氧的关系，将微生物分为好气性微生物（包括微需气性微生物）、厌气性微生物和兼性厌气性微生物三大类。需氧性测定是细菌分类鉴定中的项目之一。实验室中常用深层琼脂培养法测定氧气对细菌生长的影响。

三、实验材料

1、菌种 根瘤菌(*Rhizobium* sp.)、大肠杆菌斜面菌种，巴氏芽孢梭菌(*Clostridium pasteurianum*)。

2、器材 葡萄糖牛肉膏蛋白胨琼脂培养基（含琼脂 10g/L，每管 12ml），无菌水管、吸管。

四、实验步骤

1、菌悬液制备 用接种环按无菌操作法取根瘤菌、巴氏芽孢梭菌、大肠杆菌 1~2 环分别放入三支无菌水管中制成菌悬液。

2、接种 取已融化并保温在 50℃左右的培养基 6 支，用无菌吸管分别吸取菌悬液 0.1ml 接种于培养管中，每种试验菌接种 2 个复管。接种后立即用手搓法（见实验二十七图 1-28）混匀，待冷凝。

3、培养 置培养管于 28℃下培养 3d。

4、结果检查 取出培养管，观察并记录氧气对几种细菌生长的影响。

五、实验报告

观察并记录几种细菌在培养基中的生长部位，将实验结果填入表 2-6 中。

表 2-6 几种微生物与氧的关系测定结果

菌名	根瘤菌	大肠杆菌	巴氏芽孢梭菌
生长状况			
呼吸类型			

注：专性好气性：只生长在培养基表面。专性厌气性：只生长在培养基底部。

兼性厌气性：生长在表面及整个培养基中。微需气性：在表面约 4mm 处生长最好。

六、思考题

分析以上三种细菌与氧的关系。

实验十五 渗透压对微生物生长发育的影响

一、目的要求

了解渗透压对微生物生长发育的影响，学习测定渗透压的方法。

二、基本原理

微生物生长受其基质渗透压的影响，一般细胞的渗透压约为 3~6 个大气压，除嗜盐微生物外，一般细菌在高渗透压溶液中易发生质壁分离，在低渗透压溶液内又易吸水过量而胀破。故适宜的渗透压是微生物正常生长发育的必要条件。微生物耐渗透压的能力随菌种而不同。在细菌鉴定中，常以耐盐性试验做为其特征之一。

三、实验材料

1、菌种 葡萄球菌、大肠杆菌、枯草杆菌、灵杆菌、黑曲霉、黄曲霉、根霉菌、酵母菌等的斜面菌种。

2、器材 无盐的牛肉膏蛋白胨溶液，豆芽汁溶液；9ml 无菌水管，1ml、10ml 无菌吸管，灭菌试管，小铝锅。

四、实验步骤

1、培养基配制（4 人一组）。

(1) 每组配制含 NaCl 5g/L、50g/L、100g/L、200g/L 的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基各 80ml，分装于 16 支试管中，每管 5ml，加棉塞，包扎，灭菌，并摆成斜面备用。

(2) 每组配制含蔗糖 3g/L、30g/L、300g/L、600g/L 的豆芽汁蔗糖琼脂培养基各 80ml，分装于 16 支试管中，每管 5ml，加棉塞，包扎，灭菌，并摆成斜面备用。

2、菌悬液制备 将供试菌分别编号，四种细菌编号为 B₁、B₂、B₃、B₄；四种真菌编号为 F₁、F₂、F₃、F₄。取无菌水管 8 支，编写相应号。按无菌操作法从供试菌斜面上取菌体或孢子少许，接入编号相同的无菌水管中制成菌悬液待用。

3、接种、培养 取含不同 NaCl 浓度的牛肉膏蛋白胨琼脂斜面，以划线法于斜面上接种各细菌悬液，重复 2 管；取含不同蔗糖浓度的豆芽汁斜面，以划线法于斜面上接种霉菌孢子悬液或酵母菌悬液，重复 2 管；做好标记，置 28℃ 培养。细菌于 2~3d 后检查，真菌于 4~5d 检查。

五、实验报告

将观察结果分别记入表 2-9、2-10 中。

表 2-9 NaCl 对细菌生长发育的影响

NaCl 浓度	5g/L	50g/L	100g/L	200g/L
---------	------	-------	--------	--------

B₁

B₂

B₃

B₄

表 2-10 蔗糖对真菌生长发育的影响

蔗糖浓度	3g/L	30g/L	300g/L	600g/L
F ₁				
F ₂				
F ₃				
F ₄				

注：记载符合-：不生长，+：生长，++：生长较好，+++：生长最好。

六、思考题

- 1、渗透压影响微生物生长发育的机理是什么？
- 2、通过实验你认为加工盐腌食品和蜜饯果品应选用的腌制溶液，其盐或糖的最低浓度应是多少？为什么？

实验十六 微生物间的拮抗作用

一、目的要求

学习拮抗作用的试验方法，观察微生物间的拮抗现象及抗生素的抗菌作用。

二、基本原理

拮抗作用是土壤微生物之间普遍存在的一种相互关系。它是某些微生物生命活动中产生的一种特异性代谢产物—抗生素，具有抑制或杀死另一些微生物的作用。能产生抗性素的微生物称为抗生素。衡量抗生素或抗生素抗菌作用的强弱，常以其对某些微生物产生拮抗作用所形成的抑菌圈的大小来表示。

三、实验材料

1、菌种 2° 波林麦芽汁琼脂平板上培养 3d 的青霉素、马铃薯葡萄糖琼脂平板上培养 3d 的 5406 放线菌、棉立枯病菌 (*Rhizoctoniasolani kuehn*)、葡萄球菌、大肠杆菌、萤光杆菌、变形杆菌 (*Proteus*) 等斜面菌种。

2、器材 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(每支 15ml), 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(每支 15ml), 青霉素, 链霉素, 无菌培养皿, 无菌水管, 无菌吸管, 无菌打孔器, 镊子、解剖针, 接种环, 接种针, 0.6cm 的园形滤纸片。

四、实验步骤

(一) 微生物间的拮抗试验

1、菌块法

(1) 5406 放线菌对棉立枯病菌的拮抗试验 取融化并保温在 50℃ 左右的马铃薯葡萄糖琼脂培养基管, 倾入无菌培养皿中, 使冷凝成平板。按无菌操作法用接种环挑取立枯病菌菌丝接种于平板中心; 再取 5406 放线菌菌块 3~4 块(用解剖针划取), 均匀分放在平板的 3~4 处, 然后将皿正放或倒置于 28℃ 下培养 4d。观察结果, 并测量抑菌圈的大小(图 2-2)。

(2) 青霉菌对葡萄球菌的抑菌效应 取融化并保温在 50℃ 左右的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基一管, 按无菌操作法接入 2~3 环葡萄球菌于培养基中, 轻轻摇动(以手搓法搓摇)后, 倾入无菌皿中。在未凝固前, 迅速取经灭菌打孔器制备的青霉菌块 2~3 块(用无菌打孔器在青霉菌平板上打孔制成), 小心放入培养基中(分 2~3 点放置), 使菌块与培养基凝固在一起。将皿置低温 10℃ 以下保持 12~14h, 使菌块中的抗菌素扩散后, 然后将皿倒置于 28℃ 下培养 3~4d, 观察青霉菌对葡萄球菌的拮抗现象, 并测定抑菌圈的直径。

2、平板划线法

(1) 细菌悬液的准备 用接种环按无菌操作法分别制备葡萄球菌、大肠杆菌、荧光杆菌、变形杆菌的菌悬液备用。

(2) 制平板 取融化并保温在 50℃左右的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基 1 管，倒入无菌培养皿中。在未凝固前，用镊子迅速取制好的条状青霉菌块一条（用灭菌刀片或用解剖针划制）放于皿的一侧，使其与培养基一起凝固。

(3) 接种 用接种环分别取已制好的细菌悬液，于平板上划一条直线，划线方向与青霉菌菌苔垂直，各线条之间保持一定距离，于皿底做好各菌的标记。将皿置于低温（10℃以下）下保持 12~14h，然后倒置移入 28℃下培养 3~4d。观察青霉菌对几种测试菌的拮抗作用（图 2-3）。

(二) 抗生素药剂的抑菌试验（滤纸片法）

1、抗生素标准液的配制 精确称取青霉素（P）、链霉素（S）已知含量的标准品，以磷酸缓冲液配制成 10、50、100、1000 单位的溶液放入 6cm 培养皿中，将灭过菌的圆形滤纸片数张分别浸入各浓度的药剂中。

2、制含菌平板 取融化并保温在 48℃左右的牛肉膏蛋白胨琼脂高层培养基 2 支，分别接入葡萄球菌和大肠杆菌 2 环，轻轻摇匀，迅速倒入无菌培养皿中，待冷凝成平板，做好标记。

3、加药剂 用无菌镊子由低浓度顺序分别夹取浸药滤纸片（控净药液并稍晾干），放在含菌平板的不同位置上，做好标记。

4、培养 将培养皿倒置于 28℃下培养 24~48h 后，观察结果。

5、结果检查 取出培养皿观察药剂对试验菌的抑菌作用，并测量抑菌圈大小（直径）。

五、实验报告

记录试验结果，分析微生物之间和抗生素对微生物的拮抗关系。

六、思考题

1、何谓拮抗作用？举例说明微生物间的拮抗关系。

2、拮抗作用在生产实践中有何意义？

实验十七 紫外线对微生物致死作用的试验

一、目的要求

了解紫外线的杀菌作用原理，学习其试验方法。

二、基本原理

紫外线对微生物有强烈的致死作用。波长 260nm 左右的紫外线杀菌力最强。其杀菌机制是短波的紫外线引起细胞蛋白质和核酸的光化学反应。但微生物对紫外线的吸收与剂量有关。剂量高低是由紫外灯的功率，照射距离与照射时间而定。高剂量使微生物致死，低剂量引起细胞发生变异，因此紫外线在微生物的诱变育种和消毒灭菌中有重要意义。

紫外线穿透力很弱，普通玻璃、薄纸、水层等均能防止其透过。故紫外线只限于进行物体表面或接种室的空气灭菌。经紫外线照射后的受损细胞，遇光则有光复活现象，故处理后的接种物应避光培养。

三、实验材料

1、菌种 培养 24~48h 的金黄色葡萄球菌、灵杆菌。

2、器材 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基，无菌水管，无菌培养皿，无菌吸管（1ml），无菌刮铲，灭菌图案纸（牛皮纸或黑纸），紫外灯。

四、实验步骤

1、制平板 取无菌培养皿 2 副，将已融化并冷却至 50℃ 左右的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基按无菌操作法倒入培养皿中，使冷凝成平板。

2、菌悬液制备 取无菌水管 2 支，以无菌操作法分别取葡萄球菌和灵杆菌各 1 环，接入无菌水管中充分摇匀，制成菌悬液。

3、接种 用无菌吸管吸取已制好的菌悬液各 0.1ml，分别接种于二个平板上，用无菌刮铲涂匀，随即用无菌镊子来取无菌图案纸一张，小心放于接种好的培养皿中央（图 4-2）。

4、紫外线处理 紫外灯箱先开灯预热 2~3min。再将上述培养皿置于紫外灯下，打开皿盖。在 30cm 距离处照射 5~8min，小心地取下图案纸，盖上皿盖。用黑布或厚纸遮盖，送入培养箱。

5、培养 将培养皿于 28~30℃ 温度下培养 48h。

6、结果检查 取出培养皿观察并分析平板上细菌生长的状况。

五、实验报告

记述并图示平板上细菌生长的状况。

六、思考题

- 1、紫外线菌的原理是什么？
- 2、紫外线照射时，为何要打开皿盖？

实验十八 化学药剂对微生物的影响

一、目的要求

了解化学药剂的杀菌和消毒作用，并掌握常用消毒剂的浓度和使用方法。

二、基本原理

一些化学药剂对微生物的生长有抑制或杀死作用。因此，在实验室和生产上常利用某些化学药剂进行杀菌或消毒。不同的药剂或同一药剂对不同微生物的杀菌能力不同。此外，药剂浓度、作用时间及环境条件不同，其效果也不同。应用前需进行试验，灵活选择。

三、实验材料

1、菌种 培养 24~38h 的大肠杆菌、葡萄球菌、枯草杆菌斜面菌种。

2、器材 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基，无菌培养皿无菌水管，无菌吸管（1ml），无菌刮铲，无菌镊子，直径 0.6cm 的无菌圆形滤纸片，1g/L HgCl₂，5g/L AgNO₃，5g/L CuSO₄，50g/L 石炭酸。

四、实验步骤

1、制平板 取无菌皿 3 副，将已融化并冷却至 50℃ 左右的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基按无菌操作法倒入培养皿中，使冷凝成平板。

2、制备菌悬液 取无菌水管 3 支，用接种环分别取大肠杆菌、葡萄球菌、枯草杆菌各 1~2 环接入无菌水管中，充分混匀，制成菌悬液。

3、接种 用无菌吸管分别吸取已制好的菌悬液 0.1ml 接种于平板上，用无菌刮铲涂匀。注意做好标记。

4、加药剂 用无菌镊子夹取滤纸片，分别浸蘸 1g/L HgCl₂、5g/L AgNO₃、5g/L CuSO₄ 和 5g/L 石炭酸溶液，稍风干，分别平铺于同一含菌平板上，注意药剂之间勿互相沾染。于培养皿背面做好标记。（图 2-5）。

5、培养 将培养皿置于 28℃ 下培养 48~72h。

6、结果检查 取出培养皿观察滤纸片周围有无抑菌圈产生，并测量抑菌圈之大小。

五、实验报告

将测量结果填于表 2-11 中，并分析比较各药剂的杀菌效能。

表 2-11 化学药剂对细菌的抑菌效果（抑菌圈直径 cm）

消毒剂	HgCl ₂ (1g/L)	AgNO ₃ (5g/L)	CuSO ₄ (5g/L)	石炭酸(50g/L)
大肠杆菌				

葡萄球菌				
枯草杆菌				

六、思考题

- 1、指出以上各化学药剂的抑菌机遇。
- 2、分析比较各药剂对试验菌的药效结果。

实验十九 淀粉水解试验

一、目的要求

了解淀粉水解的原理，学习淀粉水解试验方法，检测细菌是否具水解淀粉的能力。

二、基本原理

许多细菌产生淀粉酶，能水解培养基中的淀粉为无色糊精、麦芽糖、葡萄糖。淀粉水解后，遇碘不再变蓝，故可用以鉴定某菌是否具水解淀粉的能力。

三、实验材料

1、菌种 培养 24~48h 的大肠杆菌及枯草杆菌的斜面菌种。

2、器材 含淀粉的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基（每管 15ml）（附录一，36），路哥氏碘液、无菌培养皿。

四、实验步骤

1、制平板 取已融化并保温在 50℃ 的含淀粉牛肉膏蛋白胨琼脂培养基 2 支，分别倒入 2 副无菌培养皿中，静置，待冷凝成平板后，将皿倒置，使表面水分蒸发片刻。

2、接种 按无菌操作法用接种针挑取大肠杆菌和枯草杆菌菌体少许，等距排布点接于同一平板上，重复两皿（一般每皿可点种 3~5 个菌株）做好标记，28℃ 下培养 2~4d。

3、检查 形成菌落后，于平板上滴加碘液数滴，轻轻旋转培养皿，使碘液铺满全皿为度。若菌落周围出现无色透明圈，说明淀粉被水解；透明圈的大小，说明该菌水解淀粉能力的大小；反之，则示该菌不产淀粉酶，无水解淀粉的能力。（图 2—10）

五、实验报告

列表记录实验结果报告之。

六、思考题

淀粉水解的原理是什么？本方法是否适用于所有的微生物？

实验二十 石蕊牛奶试验

一、目的要求

了解石蕊牛奶产生变化的原理，学习细菌鉴定的方法。

二、基本原理

牛奶中主要含有乳糖和酪蛋白等，不仅是细菌生长发育的良好培养基，而且可用以测定细菌的生化特性。不同细菌对牛奶各成分的分解利用是不同的，常用石蕊作为酸碱指示剂和氧化还原指示剂。石蕊在中性时呈淡紫色，酸性时呈红色，碱性时呈蓝色，还原时自下而上地褪色变色。以此特征来鉴定细菌。

细菌对牛奶的作用有六种情况

1. 产酸—细菌发酵乳糖产酸，使石蕊变红
2. 产碱—细菌分解酪蛋白产生氨等碱性物质，使石蕊变蓝。
3. 胨化—细菌产生蛋白酶，使酪蛋白分解，故牛奶变得比较澄清而略为透明。
4. 酸凝固—细菌发酵乳糖产酸，使石蕊变红，当酸度很高时，可使牛奶凝固。
5. 凝乳酶凝固—有些细菌能产生凝乳酶，使牛奶中的酪蛋白凝固，此时牛奶常呈蓝色或不变色。
6. 还原—细菌生长旺盛，使培养基氧化还原电位降低，因而石蕊还原褪色。

以上所述 1—5 种反应情况中，石蕊均可还原。

三、实验材料

1. 菌种 培养 24h 的大肠杆菌，枯草杆菌斜面菌种。
2. 器材 石蕊牛奶培养基（附录一，37），接种环。

四、实验步骤

1. 接种培养 取石蕊牛乳培养基 6 管，除二管不接种作对照外，其余 4 管用接种环分别接入大肠和枯草杆菌，每菌重复 2 管。接种完毕，置 30℃ 下保温培养。
2. 结果检查 于 3d、5d、7d、14d 分别观察一次，记录结果。

五、实验报告

将观察结果填入表 2-14。

表 2-14 细菌对牛奶的作用结果

菌种	观察时间 (d)	颜色反应	凝乳	胨化	酸凝固	氧化还原	产气
----	-------------	------	----	----	-----	------	----

大 肠 杆 菌	1						
	3						
	5						
	7						
	14						
枯 草 杆 菌	1						
	3						
	5						
	7						
	14						

注：记载符号：有反应+，无反应-。颜色反应，氧化还原等用文字记录。

六、思考题

- 1、怎样区分细菌对牛奶作用的六种反应情况？
- 2、石蕊牛奶试验有何实践意义？

实验二十一 明胶水解试验

一、目的要求

了解明胶水解的原理，学习穿刺接种的方法。

二、基本原理

明胶是一种动物性蛋白，其水解（液化）是由于某些细菌能分泌蛋白酶使蛋白质降解之故。水解后其分子变小，虽然在低于 20℃ 的温度下，亦不再凝固。根据液化的程度，以判断细菌产酶能力的大小与液化特征，此实验是鉴定细菌的生理生化特征之一。

明胶培养基本身具有低于 20℃ 凝固为固体、高于 24℃ 则自行液化的特性，所以必须注意培养和观察的温度，如高于 24℃ 时，则需经低温处理。

三、实验材料

1、菌种 培养 24h 的大肠杆菌、枯草杆菌、灵杆菌斜面菌种。

2、器材 明胶柱状培养基（4.5ml），明胶琼脂高层培养基（每管装 15ml）附录一，27），无菌培养皿，酸性升汞液（附录七，1），接种针。

四、实验步骤

（一）穿刺法

1、接种培养 取明胶柱状培养基 8 管，除二管不接种作为对照外，其余 6 管用接种直针在柱状培养基中央，分别接入大肠杆菌，枯草杆菌，灵杆菌，每种菌重复二管。于 20℃ 温度下培养 2d、7d、15d 观察。若有的菌不能在 20℃ 生长，可于 30℃ 下培养后，放入冰箱或冰浴中，待对照管凝固后，才能观察液化程度。

2、结果检查 培养好后，轻轻拿出培养物（勿摇动），在 20℃ 以下的室温或经低温处理后，观察菌的生长与液化明胶的程度。若菌已生长，明胶表面无凹陷且为稳定的凝块，则为明胶水解阴性；如明胶凝块部分或全部在 20℃ 以下变为可流动的液体，则为明胶水解阳性；如菌已生长，明胶未液化，但明胶柱状表面菌苔下出现凹陷小窝（须与对照管比较，因培养时间过久水分失散，也会有凹陷）为轻度水解、按阳性记录。其液化类型记载见实验二十八图 1-35。

（二）明胶平板法

1、制平板 取已融化冷却至 50℃ 左右的明胶琼脂高层培养基 4 管，倒入 4 副无菌培养皿内，使冷凝成平板。

2、接种、培养 用接种针挑取待测菌，在平板上作等距离点接（每个平板可接 3~5

种菌，重复二皿)；另二皿不接种作对照。接种完毕，置 28℃下培养 2~3d。

3、结果检查 待菌落生长丰厚后取出平板，于皿中滴加 8~10ml 酸性升汞液，轻轻旋转培养皿使复盖均匀，放置 10~15min 进行观察。若菌落周围出现透明圈者记为阳性，说明该菌具有蛋白酶，能液化明胶。透明圈的大小表明酶活力的大小。未水解的明胶与汞盐作用形成白色沉淀，即示阴性。

注意事项：

①这种培养基适用于中温菌类蛋白酶活的测定。

②升汞试剂剧毒，用时应特别小心。

五、实验报告

将实验结果填于表 2-15。

表 2-15 细菌对明胶液化结果

菌种	明胶液化			
	2d	7d	15d	平板法
大肠杆菌				
枯草杆菌				
灵杆菌				
对 照				

六、思考题

明胶水解的原理是什么？试试验有何实践意义？

实验二十二 食品中微生物的检验

一、目的要求

学习并掌握食品中细菌总数和大肠菌群测定的基本方法，了解一些主要食品的卫生指标。

二、基本原理

食品中细菌污染的程度，反映了食品的一般卫生质量，以及食品在产、储、运、销过程中的卫生措施及管理情况。

细菌总数是指 1g 或 1ml 被检食品中，在一定的培养条件下所得的菌落总数。

大肠菌群指一群在 37℃，24h 能发酵乳糖，产酸、产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌。菌群主要来源于人畜粪便，故以此作为被粪便污染指标，来评价食品的卫生质量，具有广泛的卫生学意义。

食品中大肠菌群数系以 100ml (g) 检样内大肠菌群最近似数 (MPN) 来表示，其含义是指 100ml (g) 食品内含有大肠菌群数的实际数值 (表 7-3)。

三、实验材料

1、待检样品 表列食品之一。

2、器材 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基，乳糖胆盐发酵液管 (内倒置小管)，伊红美蓝琼脂平板，乳糖发酵液管 (内倒置小管) (附录一，58, 60~62)，灭菌生理盐水 (9ml、90ml、225ml 的 0.85%NaCl 溶液)，革兰氏染色液，均质器或研钵，无菌皿、无菌吸管 (1ml, 10ml)，显微镜，灭菌采样瓶 (管) 等。

主要食品卫生指标见表 7-3。

表 7-3 一些主要食品卫生指标 (微生物)

食品种类	细菌数个/ml (g)	大肠杆菌群最近似数	致病菌
酱类、醋类	<5000	<30, 醋不得检出	不得检出
腐乳类、豆豉、酱菜类		<30	不得检出
豆腐干、豆腐、豆腐片	<5000	<70	不得检出
凉粉	<500	<30	不得检出
消毒牛乳、甜炼乳	<3000	<40	不得检出
全脂奶粉	<5000	<40	不得检出
瓶装汽水、果汁饮料	<100	<5	不得检出
全啤酒	<1000	<50	不得检出
发酵酒 (熟啤酒、黄酒、黄酒、葡萄酒)	<50	<3	不得检出

罐头制品、微生物指标规定无致病菌及微生物引起的腐败现象。

四、实验步骤

1、细菌总数的测定

(1) 样品采集 不同的待检样其取样方法随样品而定。总原则是取样应有代表性，均匀性，典型性。应多点采样，且无菌操作。

(2) 样品稀释 取 10ml 无菌吸管以无菌操作法吸取液体样品 10ml 或以无菌称样纸称取固体样品 10g，加入盛 90ml 无菌生理盐水的三角瓶中，充分振荡 15min，再以 10 倍稀释法依次稀释为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} ... (稀释度以待检样污染程度而定)。

(3) 接种、培养 取 1ml 无菌吸管 3 支，分别吸取不同浓度的稀释液各 1ml，放入与稀释度编号相同的培养皿中，每个稀释度重复二皿，立即倒入已融化并保温以 50°C 左右的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基约 15ml，轻轻转动平皿使之混匀，静置冷凝成平板后，倒置于 37°C 培养 24h，取出计数。平皿内细菌菌落数乘以计数皿的稀释倍数，即得每毫升(克)样品所含细菌的总和。

菌落计烽的方法与原则见实验九十六。

2、大肠菌群的测定

(1) 检样的稀释 以无菌操作法取待检样 25ml(或 25g)，放于含有 225ml 灭菌生理盐水或其它稀释液的灭菌玻璃瓶内(瓶内预置适当数量的玻璃珠)或灭菌研钵内，经充分振荡或研磨制成 10^{-1} 的稀释液。固体检样最好用均质器，以 $8000\sim 10000\text{r}/\text{min}$ 的速度处理 1min，再做成 10^{-1} 稀释液。根据食品卫生标准要求或对待检样污染情况的估计，再依次稀释成 10^{-2} 10^{-5} 或更高。

(2) 乳糖发酵试验 将待检样品接种于乳糖胆盐发酵管内，接种量为 10ml 者，用双倍乳糖发酵管；1ml 以下者，用单倍乳糖发酵管。每一稀释度接种 3 管，置 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 温度下，培养 $24\pm 2\text{h}$ 。如所有乳糖胆盐发酵管都不产气，则可报告为大肠菌群阴性；如有产气者，则按下列程序进行。

(3) 分离培养 将产气的发酵管分别以划线法转接在伊红美蓝琼脂平板上，置 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 温度下，培养 $18\sim 24\text{h}$ ，取出观察菌落形态，并作革兰氏染色和证实试验。

(4) 证实试验(即复发酵试验)在上述平板上，挑取可疑大肠菌群落 1~2 个进行革兰氏染色，同时接种乳糖发酵管，置 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 温度下，培养 $24\pm 2\text{h}$ ，观察产物情况。凡乳糖管产气，革兰氏染色为阴性的无芽孢杆菌，即可报告为大肠菌群阳性；如乳糖管不产气或革兰氏染色阳性，则报告为大肠菌群阴性。

大肠菌群检验程序见图 7-2。

五、实验报告

1、根据证实为大肠菌群的阳性管数，按表 7-4 报告你所作的食品检样 100ml (g) 中的大肠菌群最近似数。

2、所测食品的细菌总数和大肠菌群最近似数是否符合卫生指标？

六、思考题

为什么食品中大肠菌群的检验要经过复发酵试验才能证实

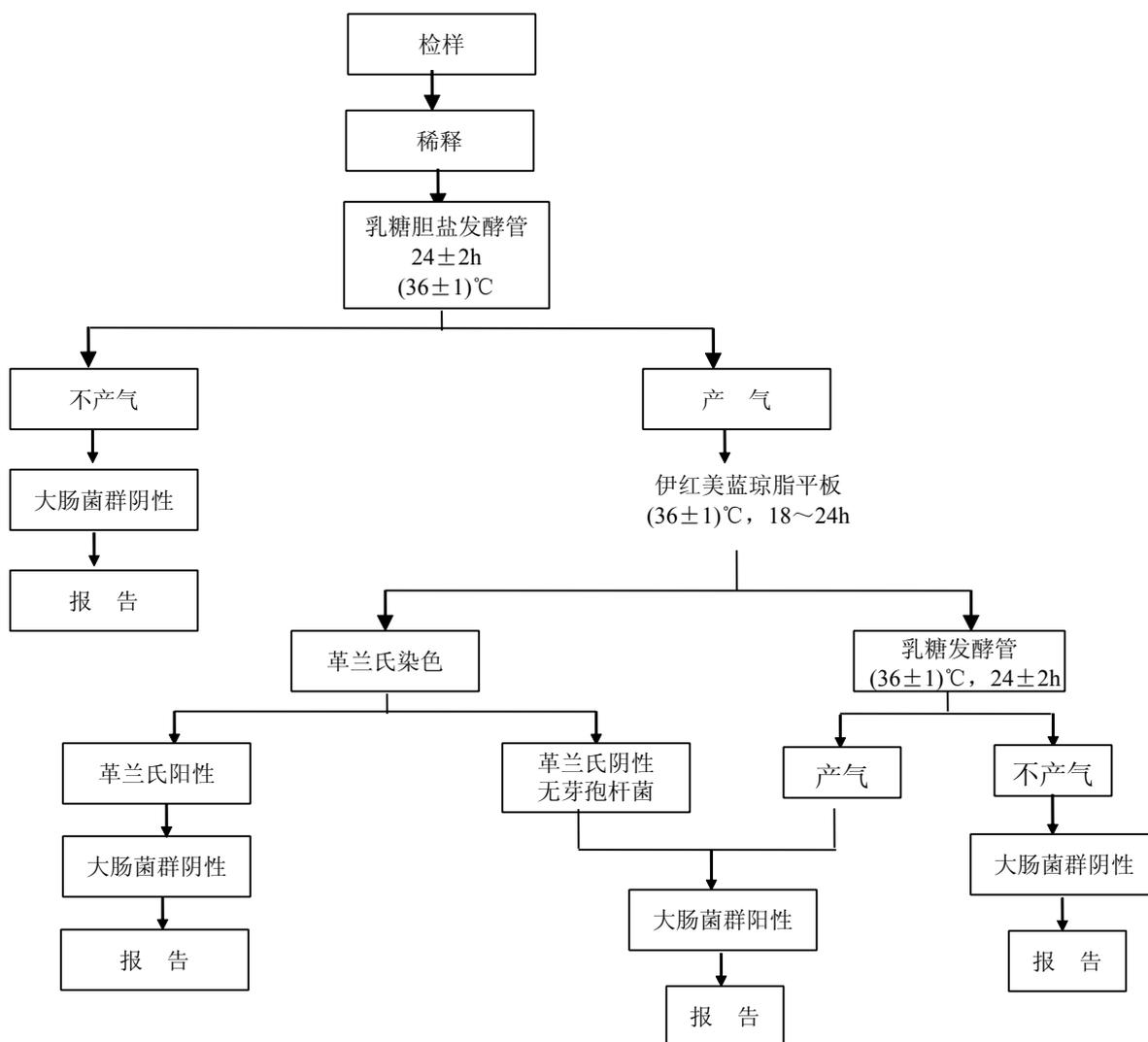


图 7-2 大肠菌群检验程序

表 7-4 大肠菌群最近似数 (M. P. N) 检索表

阳性管数	MPN	95%可信限
------	-----	--------

1ml (g) × 3	0. 1ml (g) × 3	0. 01ml (g) × 3	100ml (g)	上限	下限
0	0	0	<30		
0	0	1	30		
0	0	2	60	<5	90
0	0	3	90		
0	1	0	30	<5	130
0	1	1	60		
0	1	2	90		
0	1	3	120		
0	2	0	60		
0	2	1	90		
0	2	2	120		
0	2	3	160		
0	3	0	90		
0	3	1	130		
0	3	2	160		
0	3	3	190		

阳 性 管 数			MPN	95%可信限	
1ml (g) × 3	0. 11ml (g) × 3	0. 01ml (g) × 3	100ml (g)	上限	下限
	3	3			
1	0	0	40	<5	200
1	0	1	70	10	210
1	0	2	110		
1	0	3	150		
1	1	0	70	10	230
1	1	1	110	30	360
1	1	2	150		
1	1	3	190		
1	2	0	110	30	360
1	2	1	150		
1	2	2	200		
1	2	3	240		919
1	3	0	160		
1	3	1	200		
1	3	2	240		
1	3	3	290		

2	0	0	90	10	360
2	0	1	140	30	370
2	0	2	200		
2	0	3	260		
2	1	0	150	30	440
2	1	1	200	70	890
2	1	2	270		
2	1	3	340		
2	2	0	210	40	470
2	2	1	280	100	1500
2	2	2	350		
2	2	3	420		
2	3	0	290		
2	3	1	360		
2	3	2	440		
2	3	3	530		
3	0	0	230	40	1200
3	0	1	390	70	1300
3	0	2	640	150	3800
3	0	3	950		
3	1	0	430	70	2100
3	1	1	750	140	2300
3	1	2	1200	300	3800
3	1	3	1600		
3	2	0	930	150	3800
3	2	1	1500	300	4400
3	2	2	2100	350	4700
3	2	3	2900		
3	3	0	2400	360	13000
3	3	1	4600	710	24000
3	3	2	11000	1500	48000
3	3	3	>24000		

注：1、本表采用 3 个稀释度 1ml (g) 0.1ml (g) 0.01ml (g) 每稀释度 3 管。

1、表内所列检样量如改用 10ml (g), 1ml (g) 和 0.1ml (g) 时, 表内数字相应降低 10 倍, 如改用 0.1ml (g), 0.01ml (g) 和 0.001ml (g) 时, 则表内数字应增加 10 倍, 其余可类推。

荧光相关光谱仪使用流程

一、 样品要求

- 1、样品自发荧光或带有荧光标签，若样品标记荧光分子，标记效率在 0.8~1.2。
- 2、使用荧光光谱查看器查看样品的激发波长和发射波长。

激光器组合	DetetorA 探测范围 (nm)	DetetorB 探测范围 (nm)
488/561	500~550	592~624
561/638	575~618	> 650
488/638	500~550	> 650

3、实验前需计算样品的摩尔浓度，实验过程中带荧光标签样品浓度在 1~10nM 最佳，若实验所需样品浓度较高，可结合实际情况配制“低浓度荧光标记样品+高浓度未标记荧光样品”。

二、 仪器使用流程

1、清洗镜头

在镜头上滴加 30 μ l 无水乙醇，用擦镜纸沿同一方向轻轻擦拭镜头，勿来回擦拭。

2、使用标准品对光路进行校准、采集校准文件数据

- (1) 在镜头上滴加 30~50 μ l 水 (0.22 μ m 滤器过滤除菌的双蒸水、灭菌水)
- (2) 将盖玻片置于物镜上，盖玻片下的水完全覆盖镜头
- (3) 在盖玻片上滴加 30~50 μ l 标准品 (不同激光对应不同标准品)，对仪器进行针孔校准。

启动仪器→打开数据采集软件→建立项目文件夹→选择“Alignment”，打开激光器及探测器，设置激光功率，点击“Start”开始校准针孔。

激光器	校准品
488nm	Atto488
561nm	Alexa555
638nm	Atto655

(4) 针孔校准结束后，采集校准文件数据

选择“Calibration”，在 Data Save Seetings 中选择对应通道的校准品 (若使用探测器 A，则在左侧选择所用校准品；若使用探测器 B，则在右侧选择所用校准品)，步骤 (3)、(4) 所用校准品相同。建议单次采集 10s 数据，重复 10 次。

校准品	Fluorophore
Atto488	Atto488-carboxylic acid
Alexa555	Alexa 555
Atto655	Atto655-carboxylic acid

3、采集样品数据

更换盖玻片，并在盖玻片上滴加 20~50 μ l 样品，采集数据，单次采集时间和采集次数视实际情况设定。

4、实验结束、清洗镜头

实验完成后，移除盖玻片，并用擦镜纸沿同一方向轻轻擦拭镜头，吸走物镜上多余的水，并用无水乙醇再次清洗。

5、关机

注意：

1、校准文件 (Calibration) 和样品数据 (Experiment) 的采集过程中，需要保证激光功率一致。若样品数据采集过程中更改功率，则需补采相同功率下的校准文件。

2、实验过程中需要密切关注实时光强 (Intensity)，若总荧光强度超过 5×10^6 ，立即停止数据采集并关闭探测器，避免烧坏探测器。一般实验中荧光总光强在 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 最佳

3、若需要长时间采集样品数据 ($> 10\text{min}$)，样品可以适当多加一下，减少样品蒸发带来的影响。

4、滴加标准品/样品时，需将溶液垂直缓慢滴加在盖玻片上形成球形，不能出现气泡，样品应在镜头正上方。

5、实验过程中需保证物镜上有水，若水不够请及时补加，实验结束后需要将残留的水擦干；且物镜上只能滴加水。

6、建议每次实验前进行针孔校准；但实际上一周或更长时间做一次针孔校准也不影响实验结果。但一次实验未结束前，勿再次进行针孔校准。

三、 数据分析

1、校准文件拟合

打开数据分析软件，载入文件夹，双击选择校准文件，选择拟合模型及拟合起点后，对数据进行拟合，得到聚焦体积形状参数 S 、聚焦体积大小 V_d 。(一般 $3 < S < 10$, $V_d < 2fL$)，拟合结束后保存校准文件数据。

2、样品数据拟合

载入分析后的校准文件数据，选择需要分析的样品文件，选择拟合模型和拟合起点后，对数据进行拟合，得到一系列结果： N (聚焦体积内平均分子个数)、 T_{uaD} (分子通过聚焦体积的平均扩散时间)、 Λ (平均分子亮度)、 R_{hd} (流体动力学半径)、 D (扩散系数)、 C (浓度) 等参数。

(以上为荧光自相关数据分析，分子相互作用、荧光交相关分析等请参照说明书步骤)



Synergy H1多功能酶标仪

售后培训标准方案



基因有限公司



一. SynergyH1多功能酶标仪介绍

Synergy™ H1 是一款灵活的基于光栅系统的多功能微孔板检测仪，同时还可以通过选配滤光片系统而升级为全功能微孔板检测仪。该系统采用第三代光栅设计，可以 1nm 的步进精度任意选择激发和发射光波长。该系统支持顶部和底部荧光强度检测，UV-可见吸收光检测和高性能的化学发光检测。滤光片检测光路是一个完全独立的检测模块，拥有自己的光源和滤光片色镜光路系统。由于具有极佳的光学效率，该模块支持其他高端的检测模式如荧光偏振、时间分辨荧光、TR-FRET 和基于滤光片的发光比率检测(如 BRET)。同时还可以选配自动进样系统完成快速的加样检测实验，如离子通道分析和闪光分析等(如：Luciferase 或 ATP 分析)。为了使活细胞分析达到一个理想的生理环境，Synergy™ H1 还可以配合全新的气体控制装置对培养环境中的 CO₂ 和 O₂ 水平进行监控。

二. 系统安装条件

1. 电源：AC100V-240V（50Hz-60Hz），必须配有三极插座并保证良好接地。
2. 空间：水平桌面70cm * 65cm，上方空间高度不得低于60cm（若配有注射器模块，要求高度不低于90cm）。
3. 环境：温度在 18°C-40°C之间；相对湿度在 10%-85%之间；室内洁净无尘；同时不得有过强光照。

三. 培训所需条件

仪器设备： Synergy系列多功能酶标仪和已安装好软件的电脑。

试剂耗材： 培训之前与客户沟通确认，如客户要求培训时进行实验和真实样品的检测，需根据客户的具体实验方向和仪器的具体型号配置，确认两者是否匹配，并通知客户在培训前准备好相关样品，试剂及耗材。

注意：实验所需的样品，试剂及其耗材，均由客户自备！

四. 培训流程及时间安排

为保证培训效果，要求客户安排2—4名实验室长期工作人员参加培训，并指定一名仪器负责人，以后用户方面如有人员变动应自行负责内部培训。

培训流程：

- 1 仪器原理、技术特点和应用讲解
- 2 仪器操作讲解
- 3 分析软件操作讲解
- 4 使用标准品或符合要求的用户样本，演示仪器检测全过程（可选）
- 5 用户实际操作练习
- 6 常见问题讨论及系统维护介绍

培训时间：半天至一天

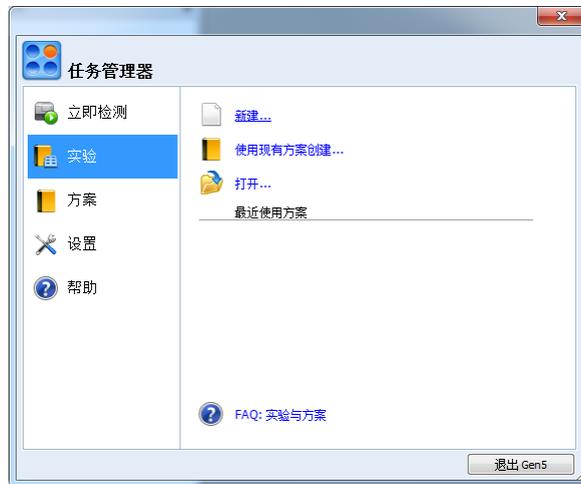


五. 仪器和软件操作流程

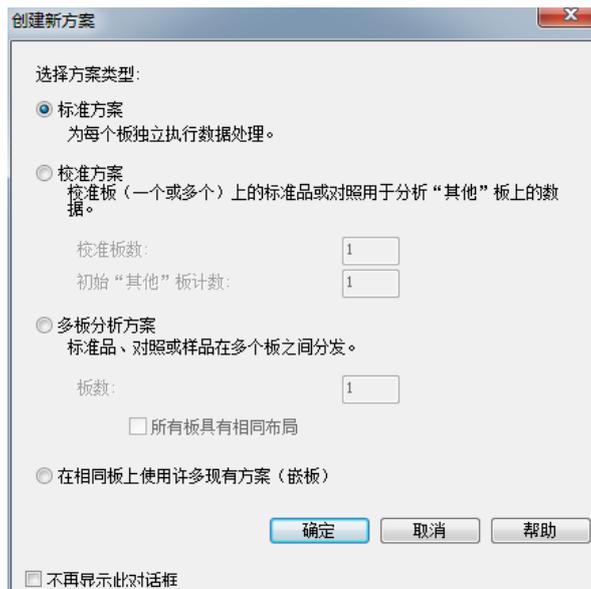
1. 简单介绍仪器厂家，仪器硬件组成部分，电源开关，孔板弹进弹出按钮。
2. 介绍仪器工作原理，主要是内部光路系统；介绍仪器主要应用方向。
3. 软件使用介绍
“方案”的建立

打开Gen5 CHS软件，自动弹出任务管理器，在任务管理器界面点击  实验，选择

 新建...



弹出“创建新方案”界面：

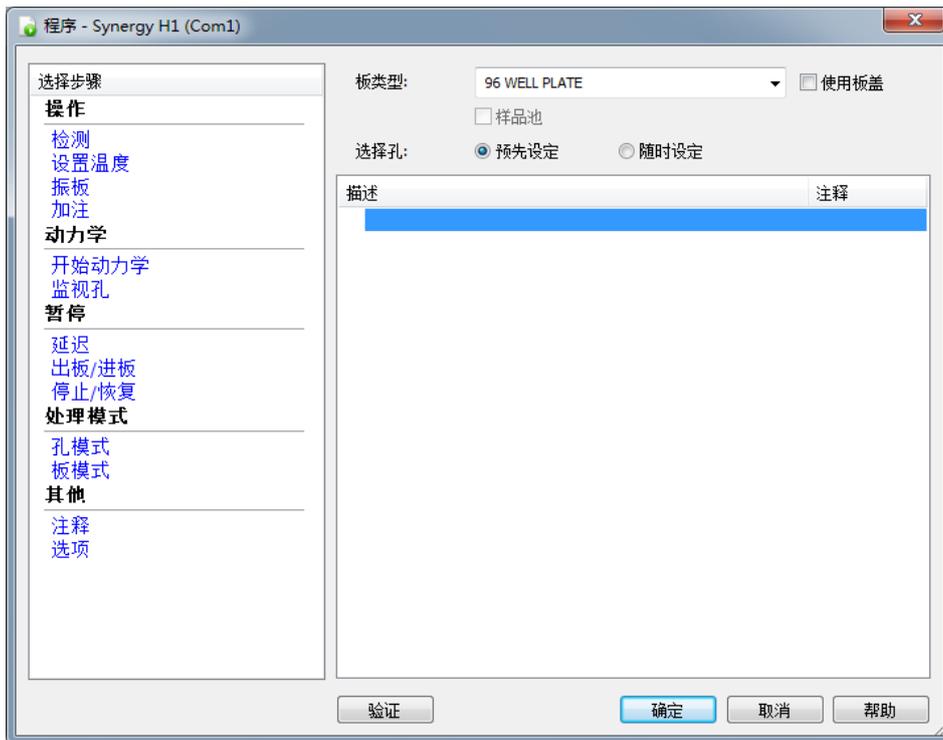


然后选择建立“标准方案”。

在界面左侧“文件”的“方案”中，有四个选项，如下图所示：

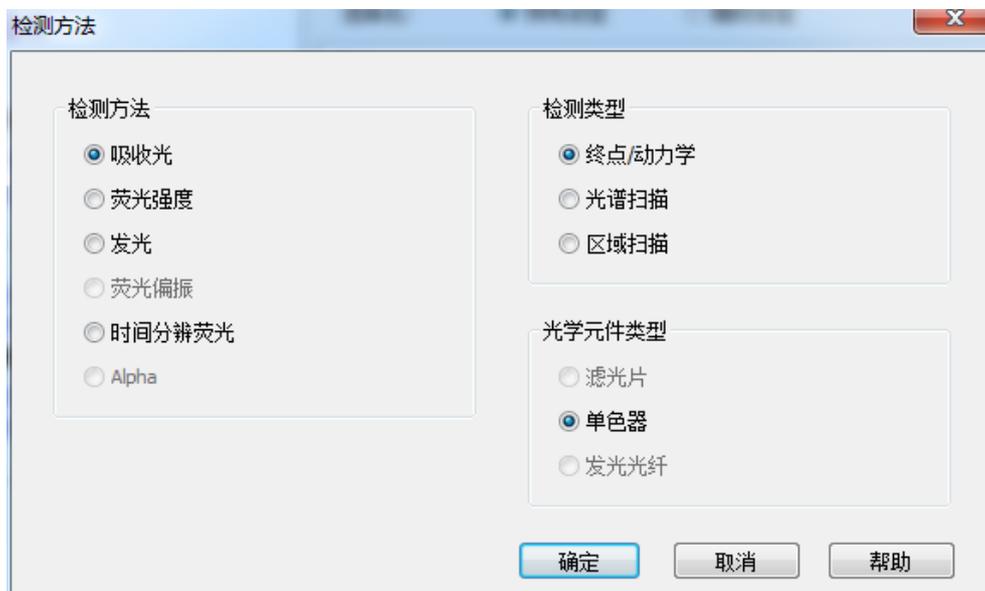


第一步：检测步骤设置，双击 程序，



“板类型”：在右侧的下拉框中选择酶标板的型号和类型。

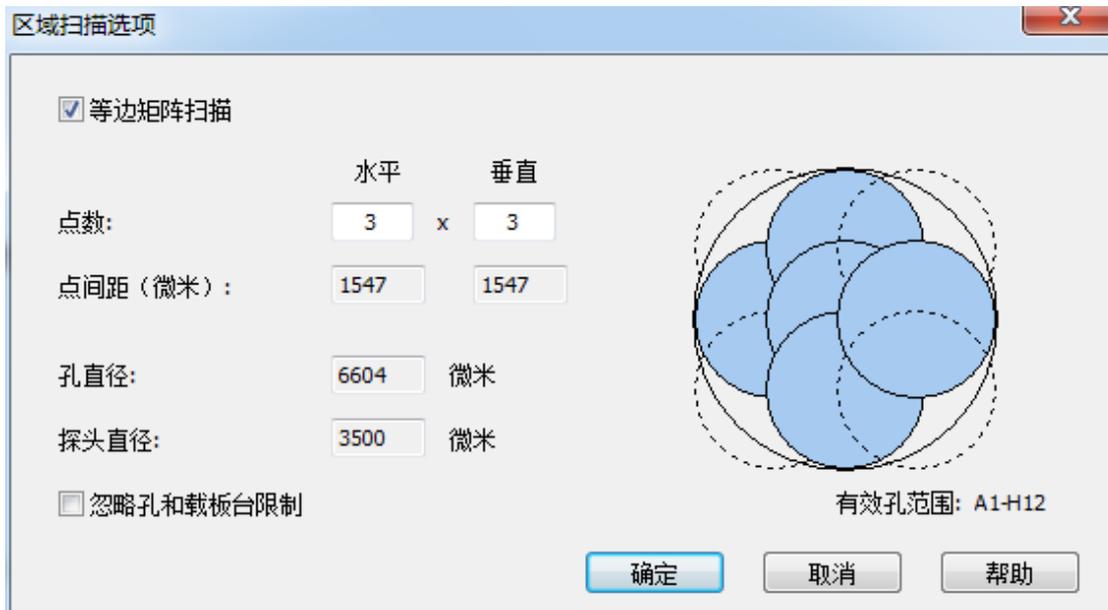
读板：在“选择步骤”中，单击 检测 按钮，选择检测类型，本型号仪器配备吸收光、荧光和发光模块。





“检测方法”：对你进行的检测类型进行选择（吸光/荧光/发光）

“检测类型”：对选择的检测类型定义方法（终点法/面积扫描法/光谱法）。区域扫描功能，点击右侧则弹出下面的对话框，选择扫描的矩阵。



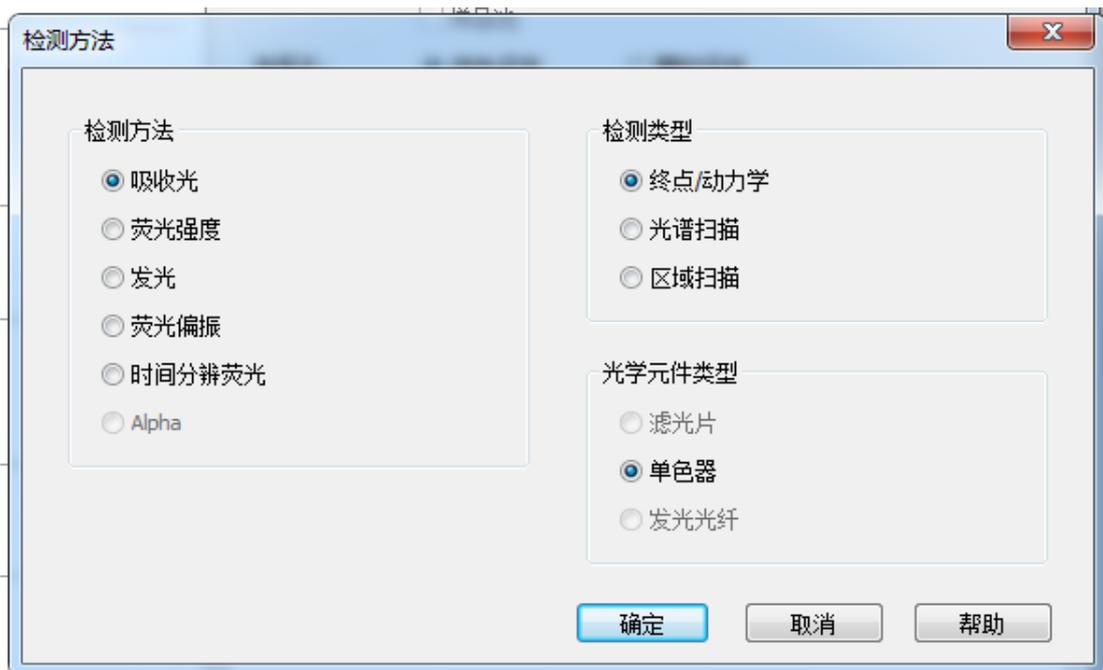
选择该功能可以对每个孔进行多次读数，读数的次数通过设置矩阵的大小来控制，读数次数越多准确度越高，但是读板的速度会降低。

1) **检测**：设置读板参数。

①吸收光检测：

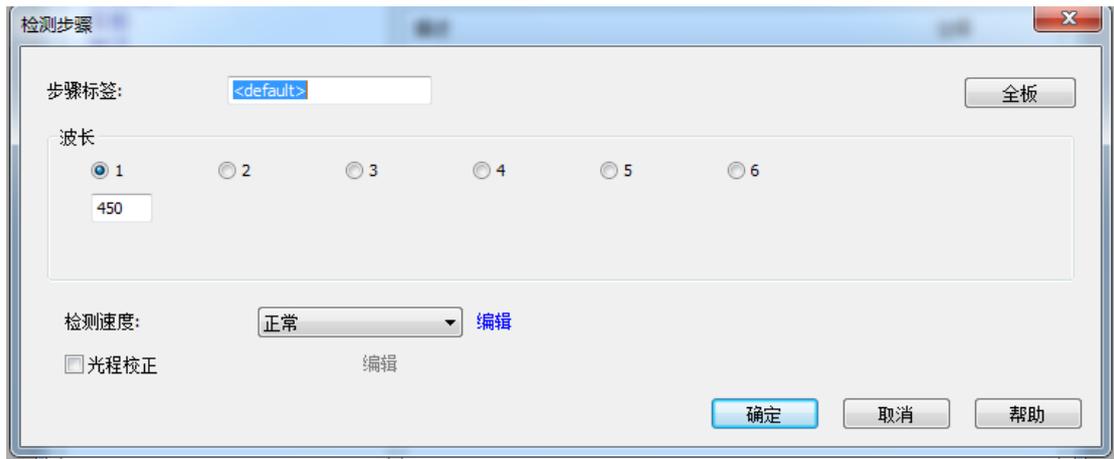
检测方法：

检测方法选择“吸收光”、检测类型选择“终点/动力学”，“光学元件类型”默认为“单色器”。





检测步骤:



“步骤标签”：对你所进行的读取步骤进行命名。

“全板”：选择要检测的孔（出现在不同步骤中，可以定义该步骤所对应的孔）。

“波长”：根据实验需要，选择合适的波长，一次可同时检测6个波长下的吸光值。

“检测速度”：定义阅读的速度（正常/扫描）。

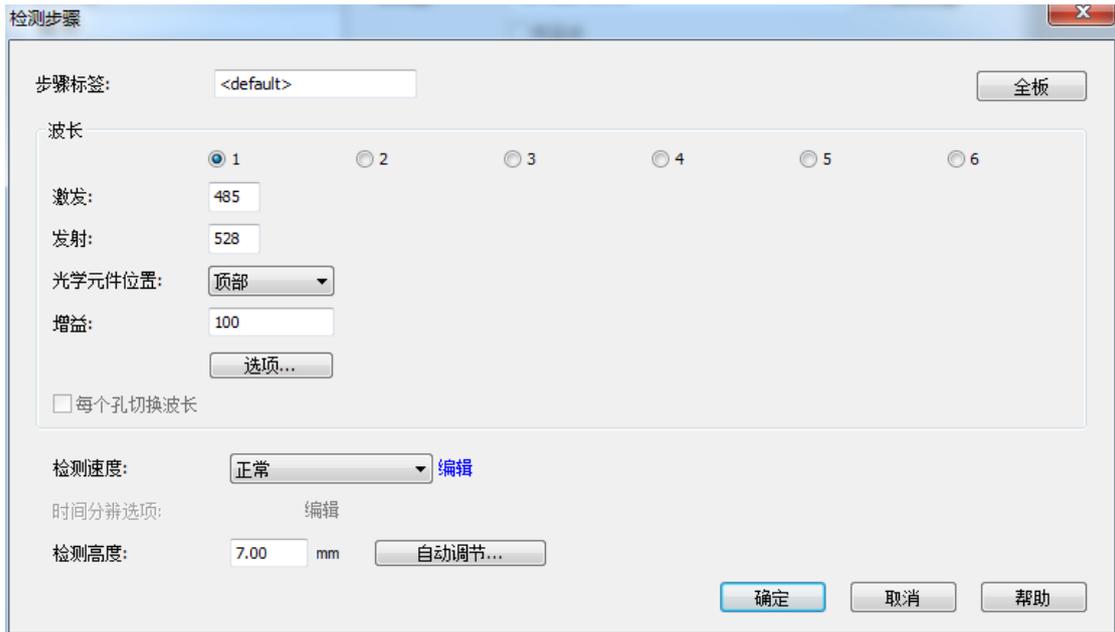
“光程校正”：如果需要用到光程校正的话，直接勾选该选项即可，软件会自动进行光程校正。需要注意的是，如果勾选了“光程校正”，则“波长”选项只能同时选择4个，因为其中两个被光程校正所使用的900nm和977nm占用。

②荧光检测:

检测方法选择“荧光”、检测类型选择“终点/动力学”，“光学元件类型”默认为“单色器”。



检测步骤:



“激发”：激发光波长的选择。

“发射”：发射光波长的选择。

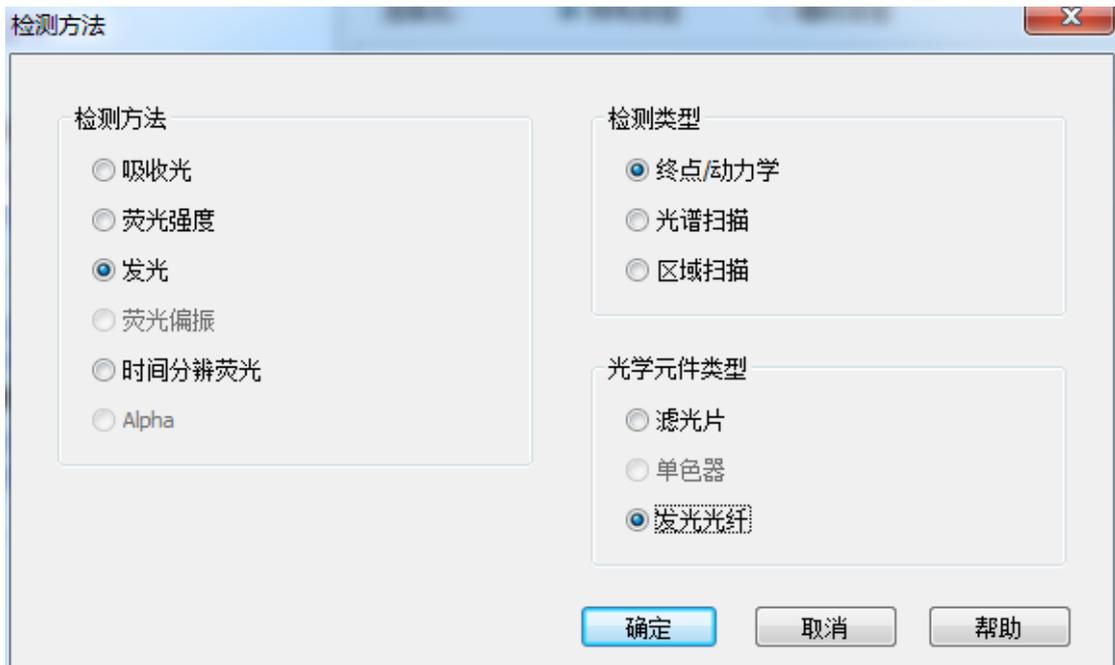
“光学元件位置”：选择“顶部”或“底部”。

“增益”：光电倍增管的增益值。可根据具体实验进行调节，或使用“自动增益调节”。

“每个孔切换波长”：当一个检测步骤中存在两组波长时，可勾选该选项。

③发光检测：

检测方法选择“发光”、检测类型选择“终点/动力学”，“光学元件类型”默认为“发光光纤”。





检测步骤:



使用发光光纤进行发光检测时，无需选择激发和发射波长。

“增益”：光电倍增管的增益值。可根据具体实验进行调节，或使用“自动增益调节”。

“积分时间”：可根据试剂盒提供的参数直接设置。

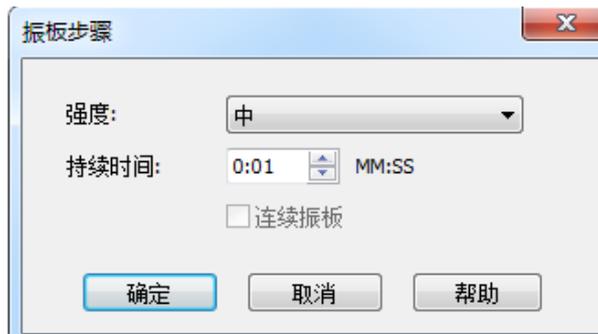
2) **设置温度** 温度设定，单击“设置温度”按钮。



“关闭温育器”：温度孵育关闭。

“打开温育器”：温度孵育打开，并设定时间，（并可选择是否预热）。

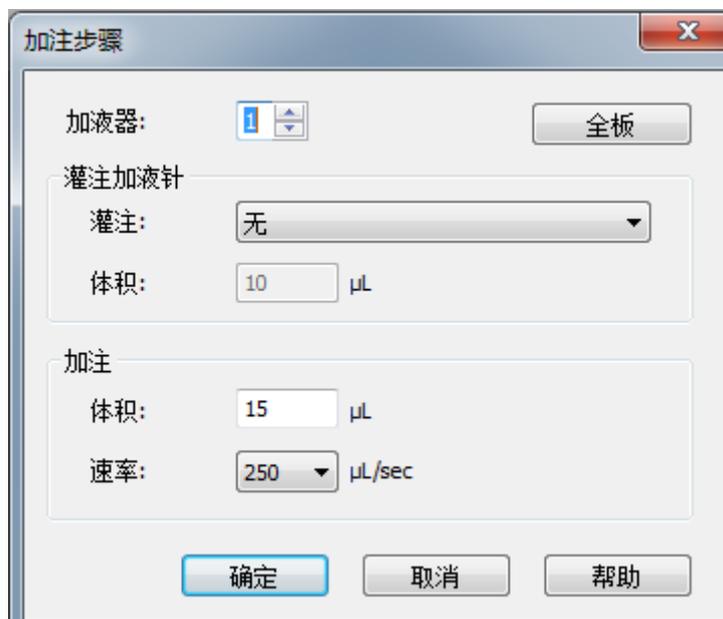
3) **振板**：振荡，单击“振板”按钮



“强度”：选择振荡的强度（低速、中速、高速、变速）。

“持续时间”：选择振荡的时间。

- 4) **加注**：分液装置（根据实验需要进行设置），单击“加注”按钮。



“加液器”：选择进样器（一般为两个），可以按照实验需要对进样器进行设置。

“灌注加液针”：选择是否需要将分液器的尖端充盈，防止空气的残留，并选择充盈的液体体积。

“加注”：选择进样的体积和进样的速度。

- 5) **开始动力学**：定义动力学检测，单击“开始动力学”按钮。



“运行时间”：运行时间。

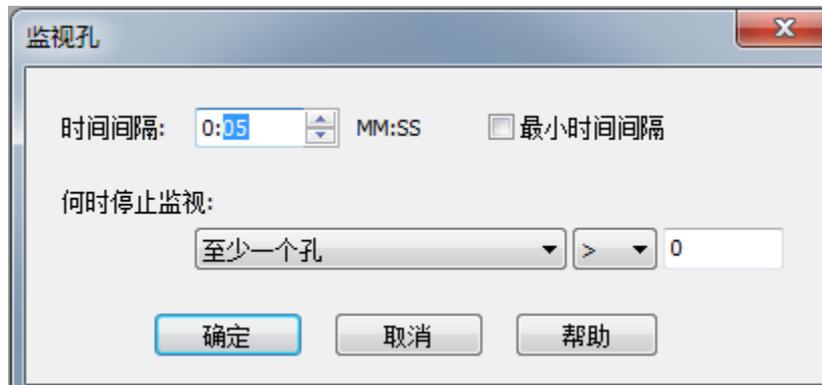


“时间间隔”：读数间隔。

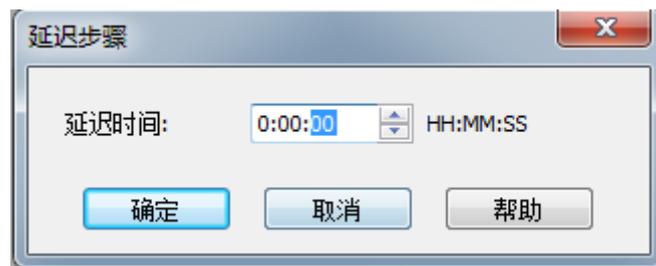
“检测”：读数次数。

“最小时间间隔”：选择最小读数间隔时间。

6) **监视孔**：对一个孔或者一组孔设置一个标准，只有当指定的孔达到标准，才会开始进行整板阅读。

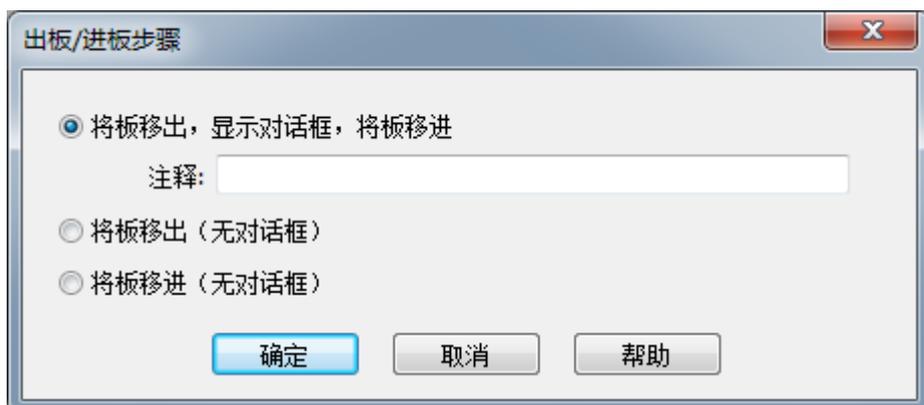


7) **延迟**：延时，单击“延迟”按钮。



“延迟时间”：选择在何步骤进行停顿以及停顿的时程。

8) **出板/进板**：酶标板的进出控制，单击“出板/进板”按钮，根据需要选择。

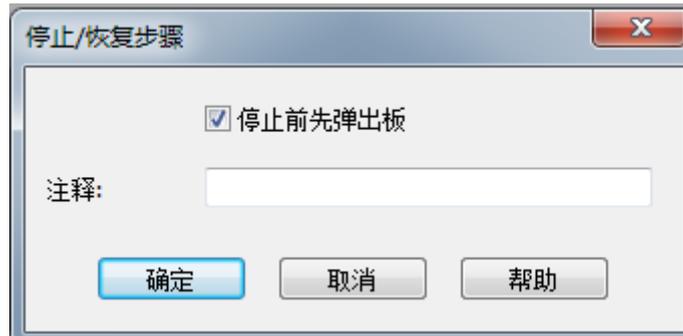


酶标板弹出，显示对话框（注释中填写对话），酶标板弹入。

酶标板弹出无对话框。

酶标板弹入无对话框。

9) **停止/恢复**：读数结束选择，是否选择结束前弹出酶标板并添加提示语。



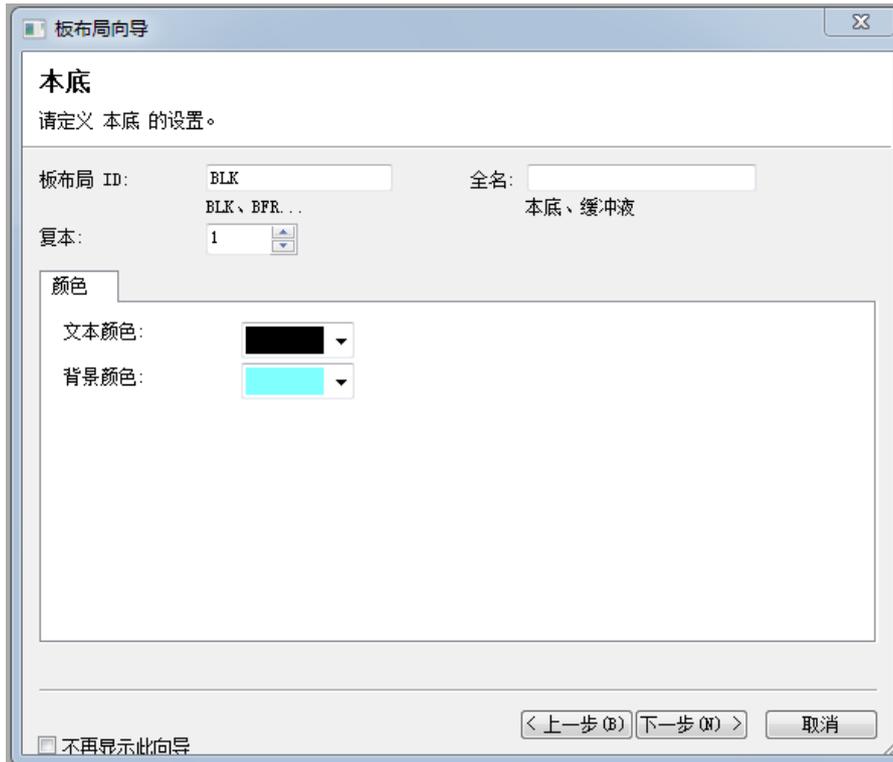
10) **验证**：对所编写的程序是否符合逻辑进行有效性的验证，如果不符合显示错误的问题在第几步。

注意：1以上10个步骤选择并不是每一个程序都要用到而是根据实验的具体需要进行任意的组合！

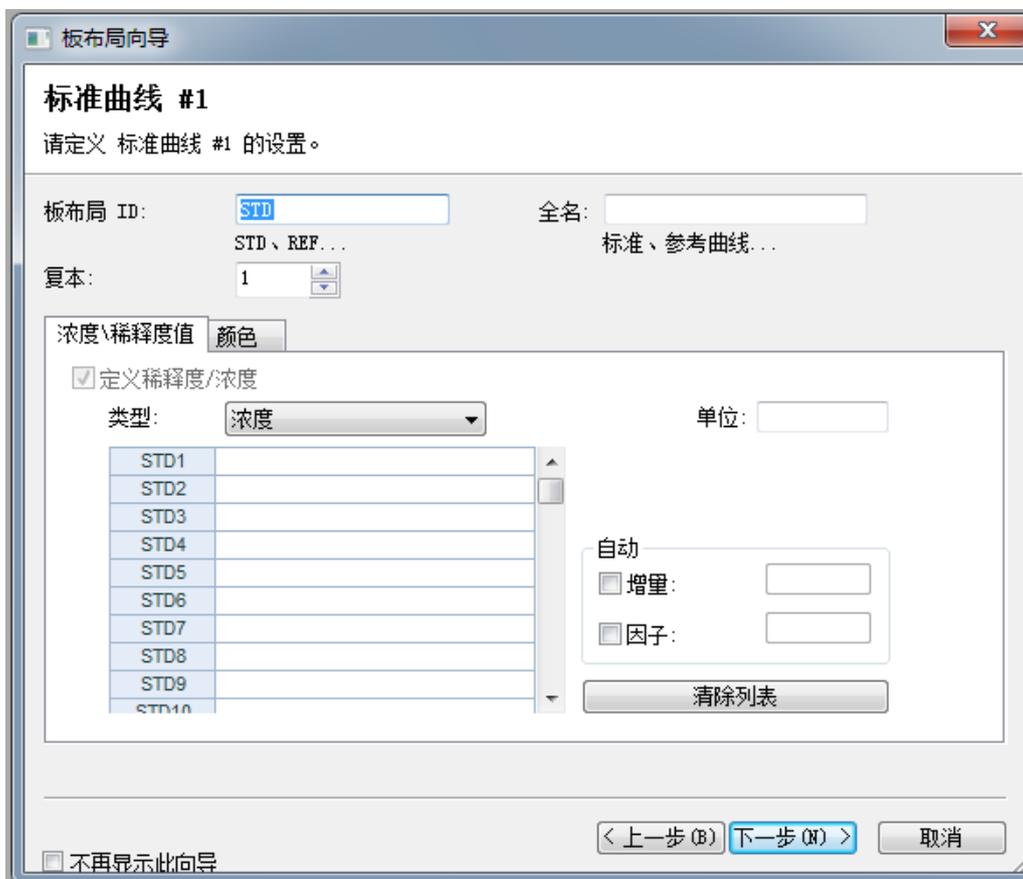
第二步：布板，选择  板布局。



选择检测孔的类型，有“本底”、“分析对照”、“标准曲线”、“样品”、“样品对照”等可供选择。



“复本”：输入样本的重复数。

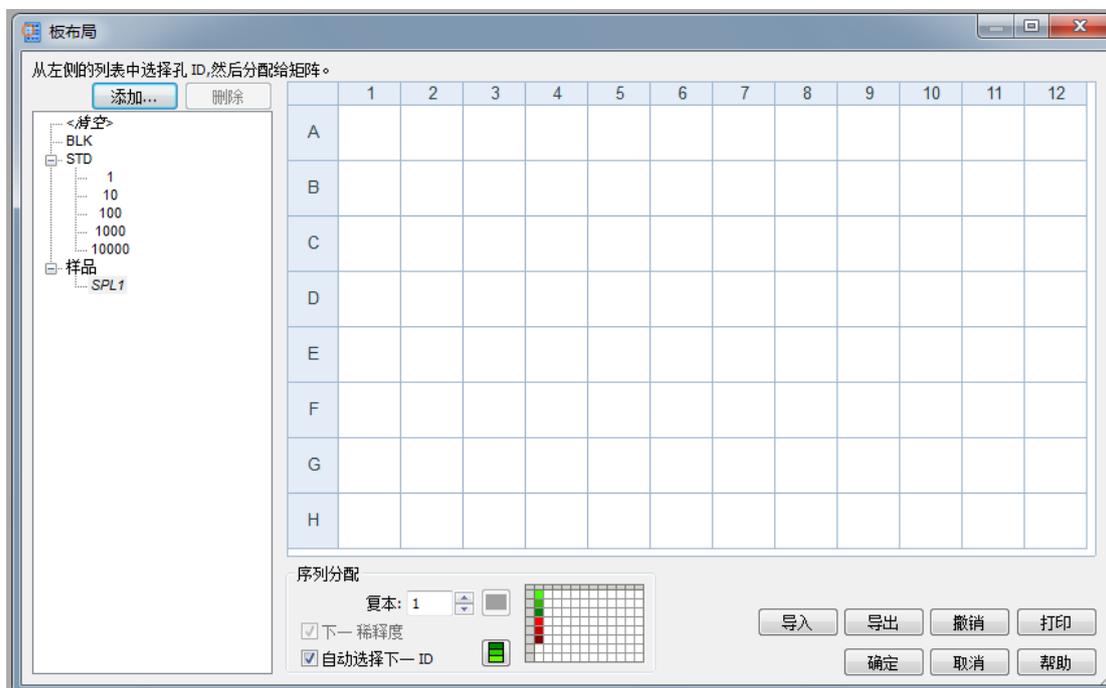




在“标准曲线”中，需要输入标准品的浓度和稀释关系。

“增量”：表示标准品间浓度差异。

“因子”：表示标准品稀释倍数。

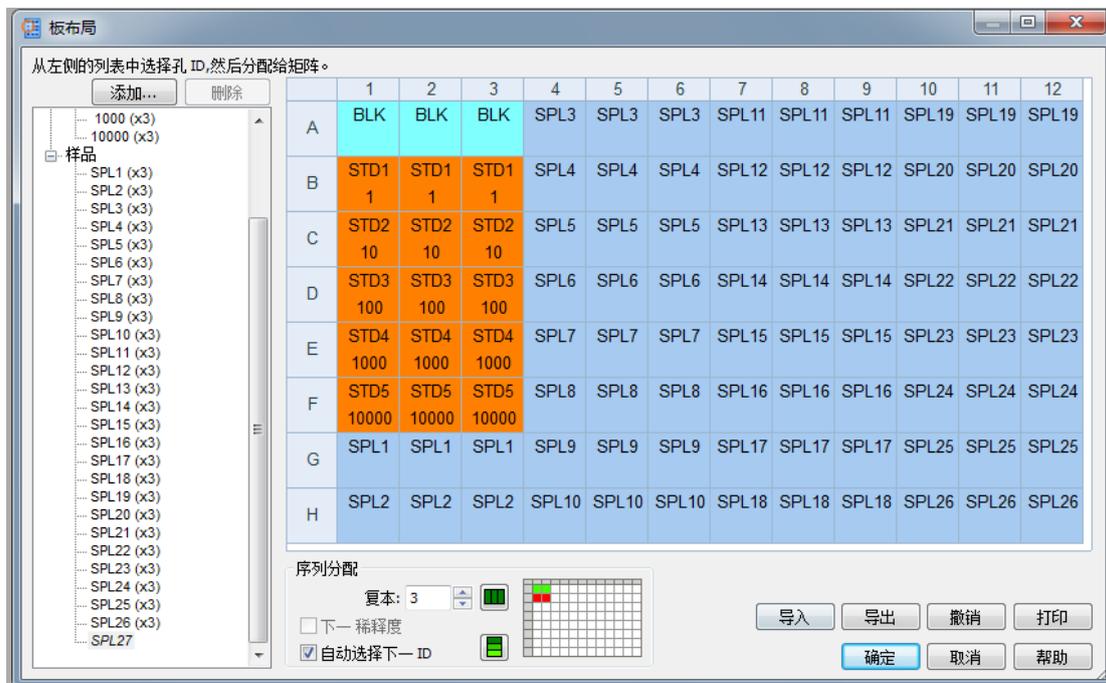


在左框中选择想要定义的孔的类型，然后在右侧空白的模式96孔板中进行点击排布。

“下一稀释度”： 稀释浓度自动递增。

“自动选择下一ID”： 样本编号自动递增。

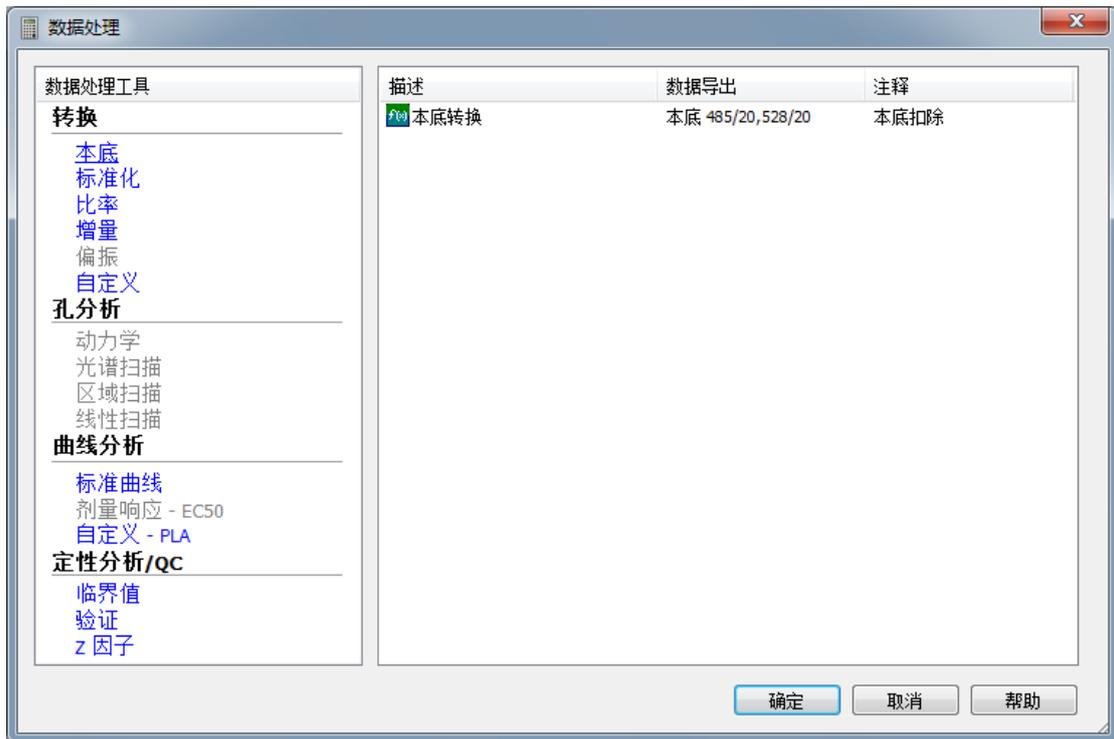
布好的平板图如下：



实验不同酶标板的排布也不尽相同，实验人员应按照实验的需求对酶标板进行排布。

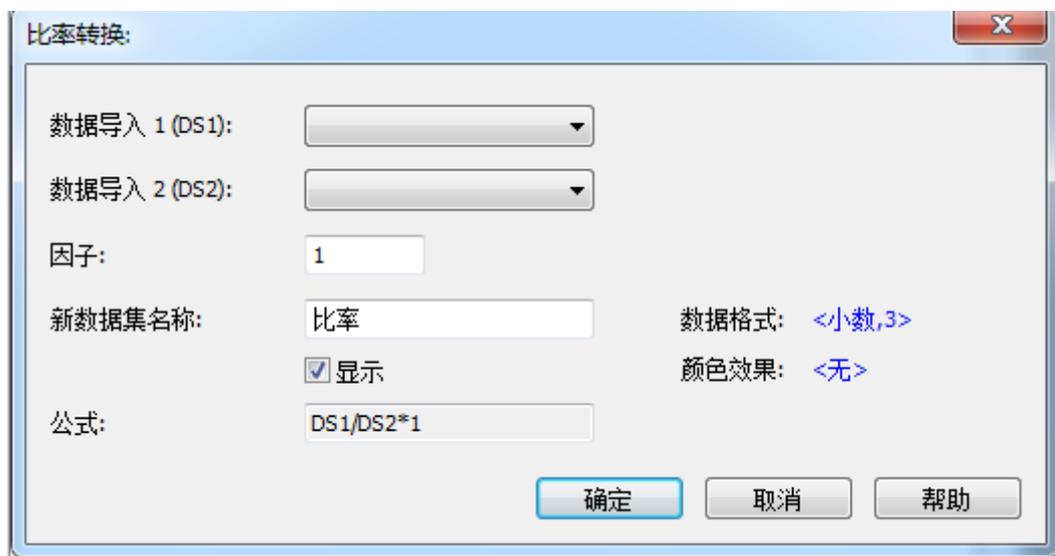


第三步：数据分析设置，选择 数据处理。



转换：使用软件自带的公式或客户自定义的公式对数据进行计算。

例：计算两个数据之间的比值，可选择 **比率**：



数据导入 1 (DS1)：选择某一数据作为DS1数据集。

数据导入 2 (DS2)：选择另一数据作为 DS2 数据集。

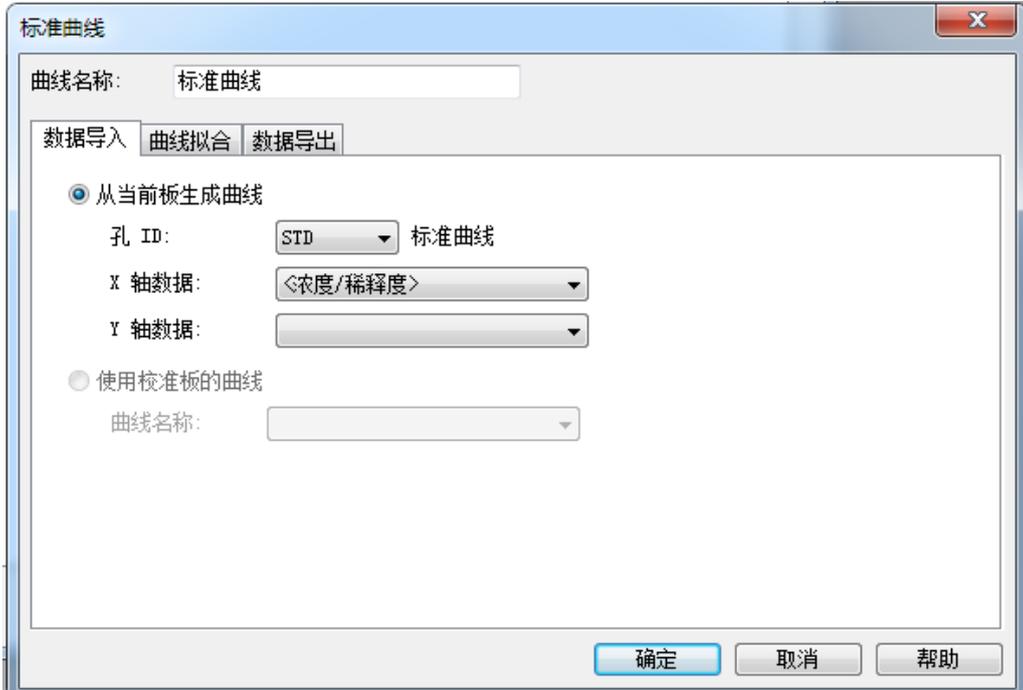
新数据集名称：为计算得到的数据命名。



孔分析：对动力学或光谱扫描等模式得到的数据进行分析。

曲线分析：对得到的数据进行曲线分析。

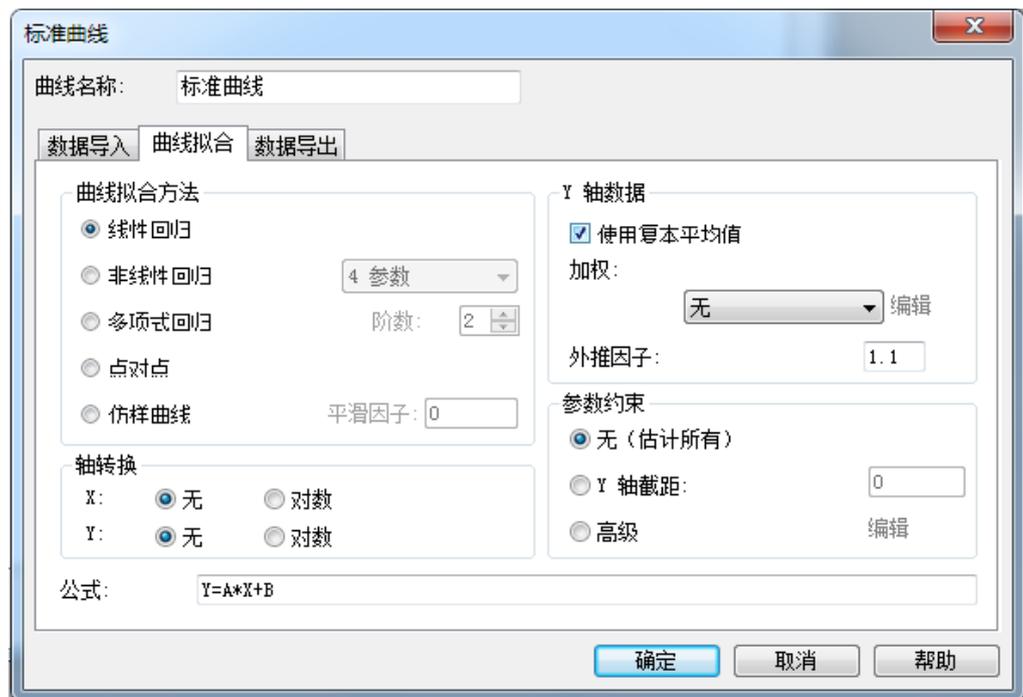
选择生成标准曲线的数据：



“X轴数据”：点击右边倒三角符号，弹出选择菜单，选择用作 X 轴的数据。

“Y轴数据”：点击右边倒三角符号，弹出选择菜单，选择用作 Y 轴的数据。

设置标准曲线的计算方式：



根据数据分析的需要，选择“曲线拟合方法”及“轴转换”等条件。

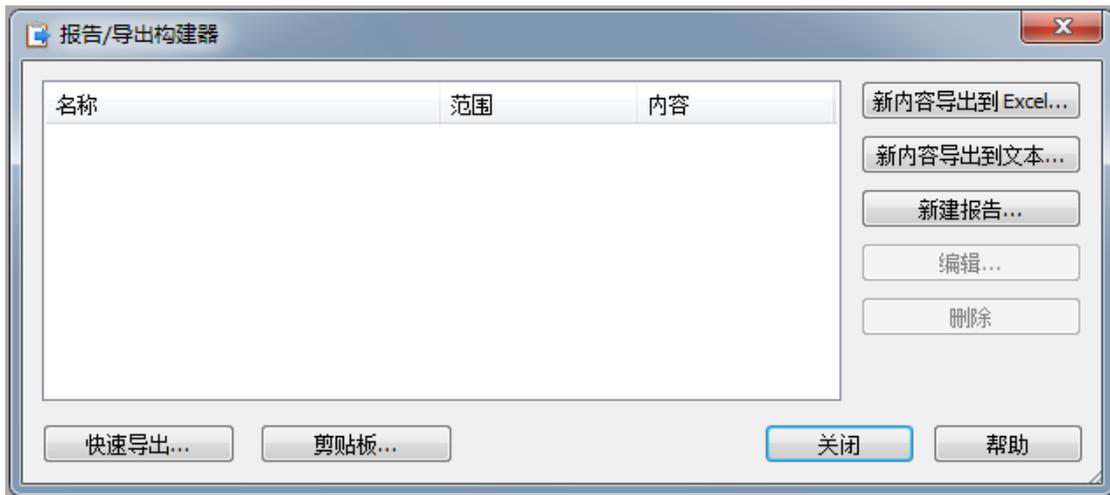


定性分析/QC:

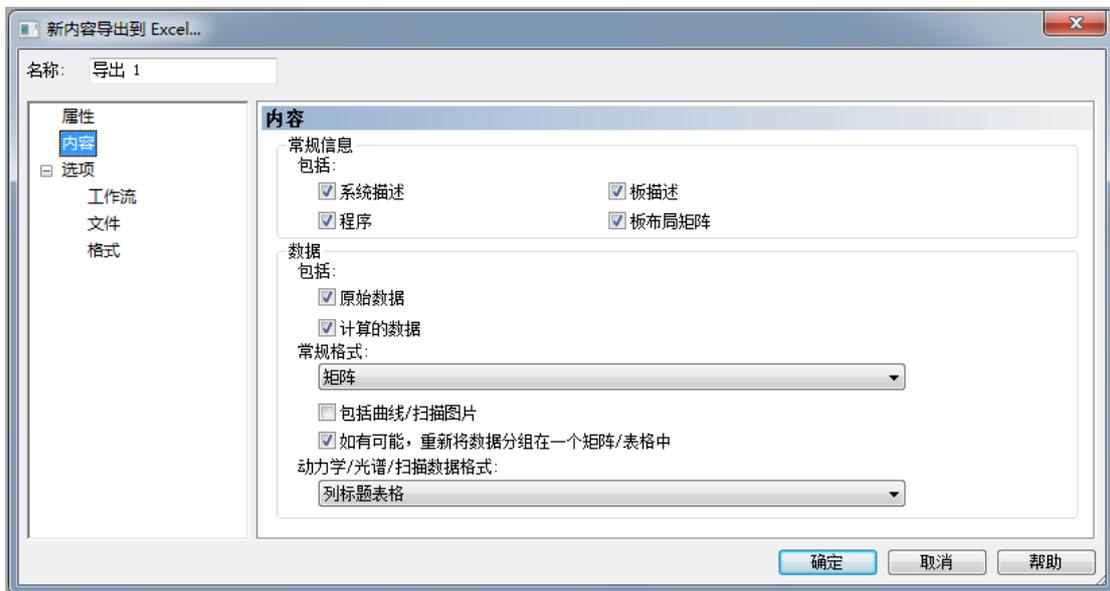
- 临界值 : 临界值设定界面
- 验证 : 检验值设置界面

第四步: 构建报告模板, 选择 报告/导出构建器。

选择 或 导出结果为 EXCEL 或 TEXT 格式的文件。



选择导出的内容。

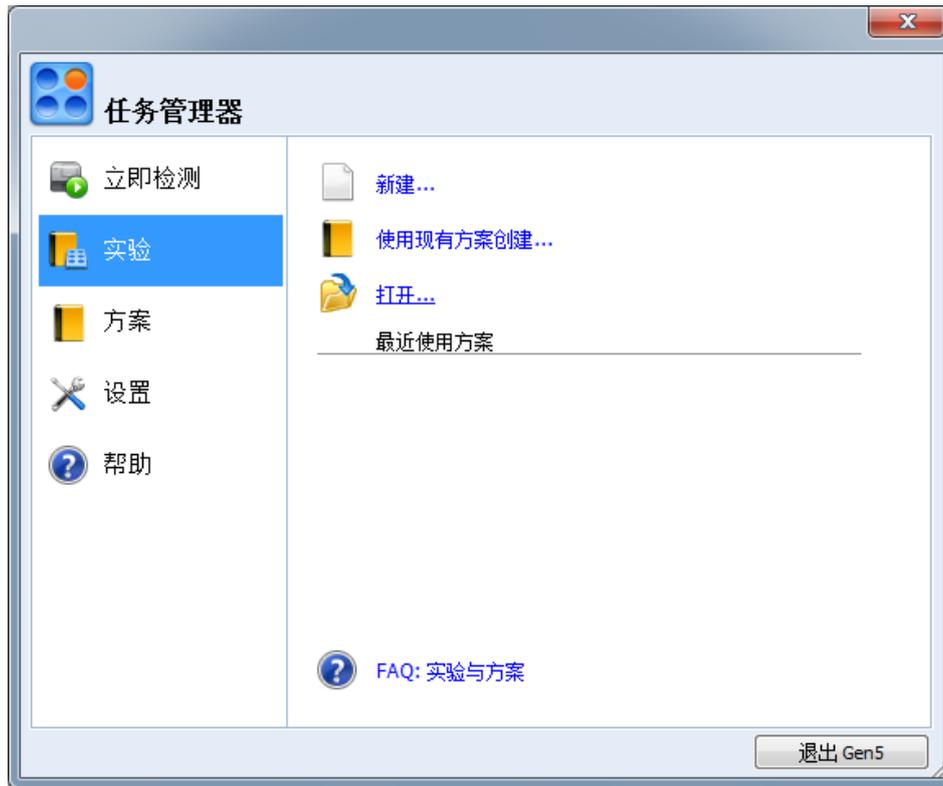


第五步: 保存程序

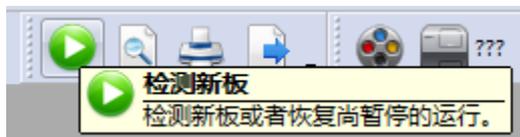
点击“文件”>“保存”>选择相应的路径, 输入程序名称, 保存程序。
以上五步由向导指引完成了一个方案的全部设置, 这五个步骤可以根据实验的要求进行个性化的组合, 使程序的设置满足实验的要求。



“实验”的建立，可以选择 新建... ,或 使用现有方案创建...



选择并打开相应方案后，点击 按钮，开始检测。



4. 由客户动手操作，完成一次模拟检测过程,包括：“方案”的编辑，“实验”的建立，检测开始。

注：如需更详细了解软件的各项功能，请查阅随机附带的手册！

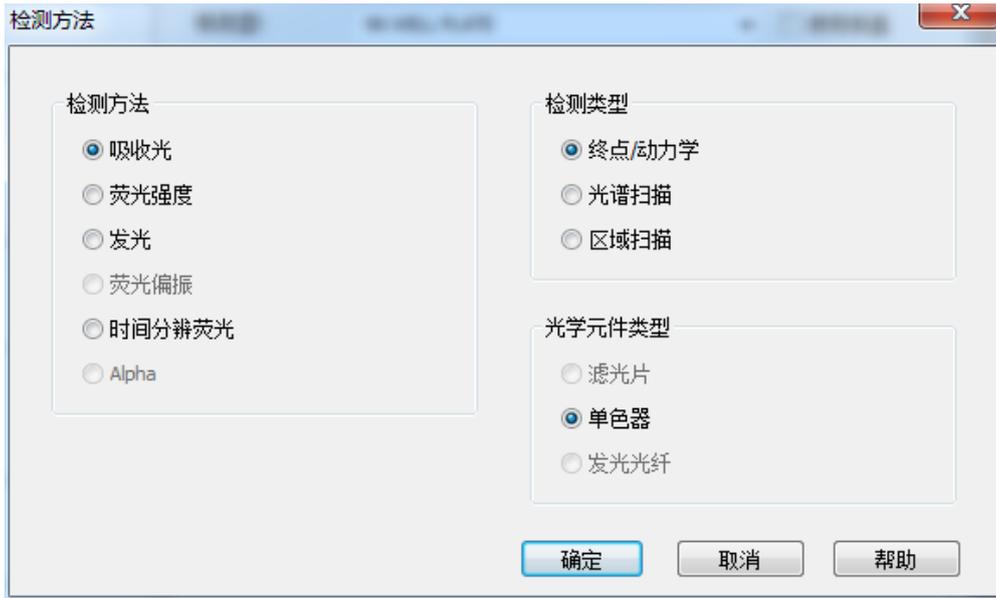
六. 常见应用举例

1、吸收光检测

① DNA 浓度测定

注意：请客户提前准备 UV 板。

检测方法选择“吸收光”，检测类型选择“终点/动力学”，光学元件类型默认为“单色器”。



在检测步骤中选择检测样品所需的波长。

② ELISA检测





2、荧光检测

使用单色器模块检测：

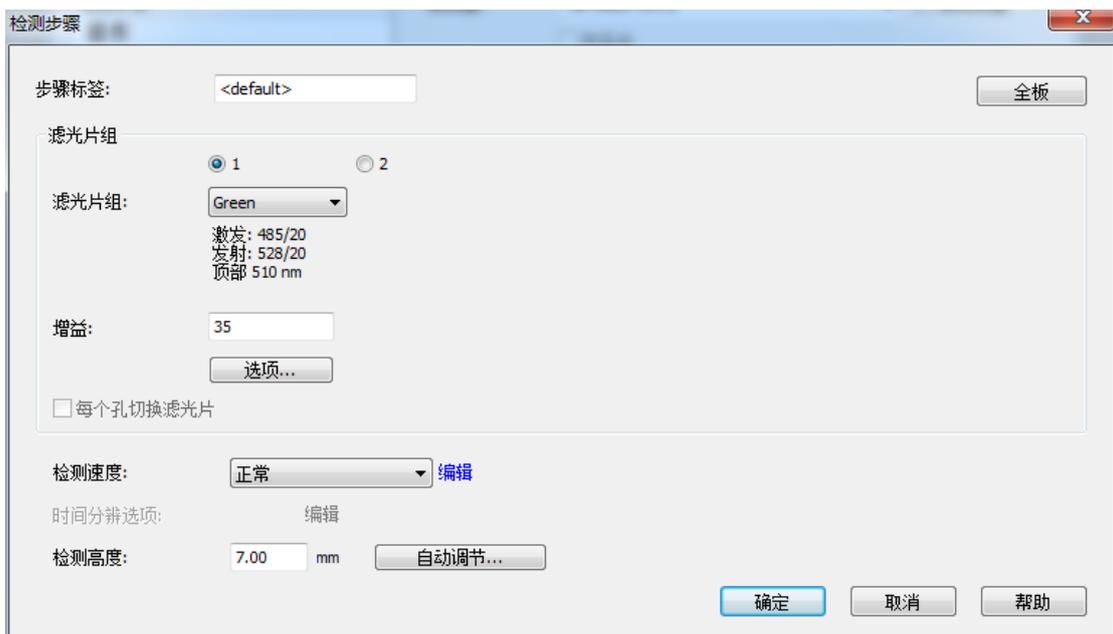
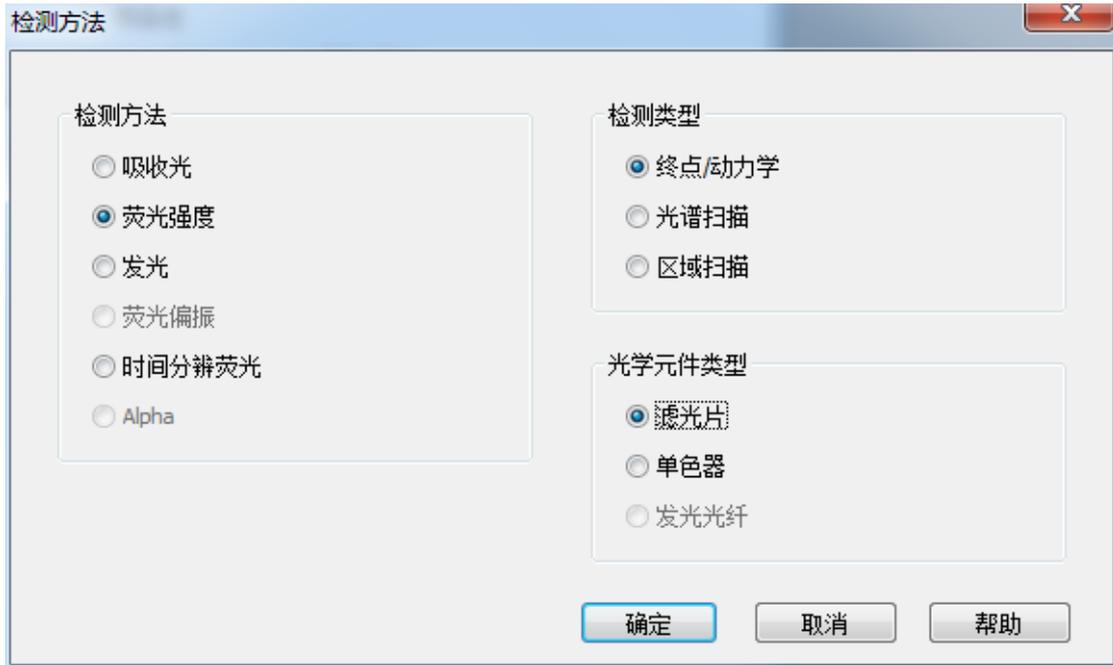
检测方法选择“荧光强度”，检测类型选择“终点/动力学”，光学元件类型为“单色器”。



根据实验需要，在“激发”和“发射”中需要的波长。

使用滤光片组模块检测：

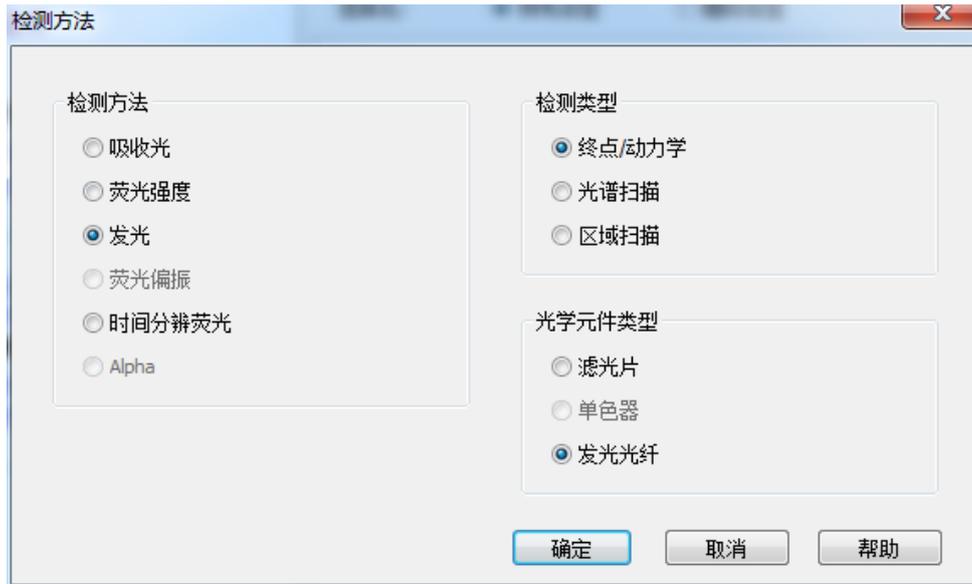
检测方法选择“荧光强度”，检测类型选择“终点/动力学”，光学元件类型为“滤光片”。



根据实验需要，选择合适的滤光片组即可。

3、发光检测

检测方法选择“发光”，检测类型选择“终点/动力学”，光学元件类型为“发光光纤”。



七. 日常维护方法及注意事项

不定期地清洁仪器外壳，需要去离子水或蒸馏水、清洁的无纺布和中性洗涤剂（可选）按以下步骤进行：

- 1、切断仪器电源，并拔下电源线。
- 2、将无纺布蘸水或洗涤剂（无纺布不得在水中浸泡）。
- 3、轻柔地擦拭仪器外壳。
- 4、若使用了洗涤剂，则用一块蘸有清水的无纺布再擦拭仪器外壳一遍。
- 5、用清洁且干燥的无纺布擦干所有潮湿的表面。

✓ 仅当有液体泼溅至仪器内部或实验中侦测到异常高的背景信号值时，才需要进行内部清洁操作。由于需拆机操作，不建议用户自行操作。

✓ 注意：若操作涉及到光学器件，不建议用户自行操作。