

ICS 73.080
Q 64
备案号:30024-2011

JC

中华人民共和国建材行业标准

JC/T 542—2010
代替JC/T 542—1994

滑石粉微生物学检验方法

Method of microbiology examination for talc powder

2010-11-22 发布

2011-03-01 实施

中华人民共和国工业和信息化部 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准代替JC/T 542—1994《滑石粉微生物学检验方法》，与JC/T 542—1994相比，主要技术变化如下：

- 在3.3供试液的制备方法中，将“生理盐水”修改为“pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液”；
- 将“霉菌和酵母菌数测定方法”修改为“真菌总数测定方法”(见第5章,1994年版的第5章)；
- 将“绿脓杆菌检验方法”修改为“铜绿假单胞菌检验方法”(见第7章,1994年版的第7章)；
- 将“绿脓杆菌试验”修改为“铜绿假单胞菌素试验”(见7.5.6,1994年版的7.5.6)；
- 将培养基和试剂中“虎红琼脂培养基”修改为“沙保罗琼脂培养基”(见5.3,1994年版的5.3)；
- 将附录中“虎红琼脂培养基的成分和制备方法”修改为“沙保罗琼脂培养基的成分和制备方法”(见附录A.2,1994年版的附录A.2)；
- 将附录中甘露醇发酵培养基成分中的“甘露醇”修改为“D-甘露醇”(见附录A.16,1994年版的A.16)；
- 将附录中多个培养基制法中的pH值,由单一定值修改为有偏差范围的取值(见附录A.3、A.9、A.10、A.11、A.12、A.13、A.16,1994年版的附录A中)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由中国建筑材料联合会提出。

本标准由全国非金属矿产品及制品标准化技术委员会(SAC/TC 406)归口。

本标准起草单位:咸阳非金属矿研究设计院。

本标准主要起草人:潘宇清、潘昱成。

本标准1994年首次发布,本版是第一次修订。

滑石粉微生物学检验方法

1 范围

本标准规定了滑石粉微生物学检验中的术语和定义、检验通则、细菌总数测定方法、真菌总数测定方法、大肠菌群和粪大肠菌群检验方法、铜绿假单胞菌检验方法、金黄色葡萄球菌检验方法。

本标准适用于医药、食品及化妆品用滑石粉中的微生物学检验。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

菌落总数 aerobic bacterial count

指样品经过处理,在一定条件下培养后(如培养基成分、培养温度、培养时间、pH值、需氧性质等),所得1g或1mL检样中所含菌落总数。所得结果,只包括一群本方法规定的条件下生长的嗜中温的需氧性菌落总数。

[《化妆品卫生规范》(2002版)中化妆品微生物检验方法,菌落总数定义2]

3 检验通则

3.1 取样及注意事项

3.1.1 每批滑石粉应随机抽两个或两个以上包装完好的单位,试样量不少于10g,以使检验结果具有代表性。

3.1.2 凡异常的供试品,则选取有疑问的样品进行检验。凡包装开启即可见霉变的,无需检验则可判为不合格。

3.1.3 在检验前,应严格保持包装的原有状态,并放在阴凉干燥处,防止因微生物再度繁殖而影响检验结果。凡原包装已启开,则不在其中取样。

3.1.4 样品的稀释,须在1h~2h内完成,以防止微生物繁殖或死亡。

3.1.5 微生物检验全过程,必须在无菌操作条件下进行。凡直接与样品接触的用具,均应事先灭菌并保持无菌。

3.1.6 从样品检出致病菌的报告发出之日起,该菌种需保存一个月备查,阴性样品可及时处理。

3.2 供试液制备的材料和仪器

3.2.1 天平:感量不大于0.1g。

3.2.2 三角烧瓶:300mL或500mL。

3.2.3 玻璃珠:Ø5mm。

3.2.4 量筒:100mL。

3.2.5 电炉。

3.2.6 高压消毒锅。

3.2.7 滤纸。

3.3 供试液的制备方法

准确称取10.0g试样,放入装有90mL稀释剂(pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液)和十几个玻璃珠的三角烧瓶中,经振摇制成1:10的试液备用。取用时必须混匀。

3.4 阳性菌株对照试验

3.4.1 每次检验,应同时进行阳性对照生长试验。

3.4.2 对照试验加入的已知活菌量,每批样品应控制在 50 个~100 个范围之内。

3.4.3 常用的阳性对照菌株,卫生部检定所编号:大肠杆菌 44102、绿脓杆菌 10104、金黄色葡萄球菌 26003 等。

3.4.4 做阳性菌株对照试验时,应注意安全,严格防止对照菌污染样品和环境。

4 细菌总数测定方法

4.1 方法原理

每种细菌有其一定的生理特性,生长时对营养、温度、时间、pH 值、需氧性等的要求均不相同。在实际培养中,不可能同时满足所有细菌的要求,因此只能测定在营养琼脂上发育的嗜中温性需氧及兼性厌氧的细菌菌落总数。

4.2 材料和仪器

4.2.1 恒温培养箱。

4.2.2 电热恒温水锅。

4.2.3 移液管:1 mL 及 10 mL。

4.2.4 平皿:∅90 mm。

4.2.5 试管:18 mm×200 mm。

4.2.6 试管架。

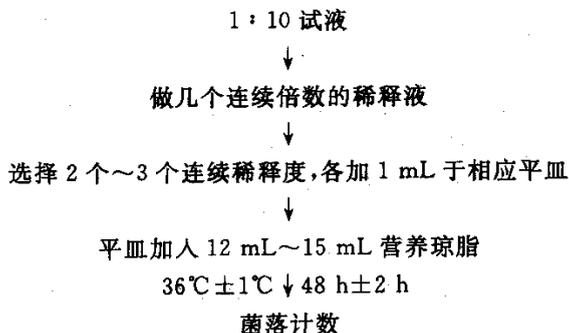
4.2.7 放大镜。

4.3 培养基和试剂

4.3.1 营养琼脂培养基。

4.3.2 生理盐水:定量分装于试管(每支试管内 9 mL)。

4.4 试验程序



4.5 试验步骤

4.5.1 试液稀释及培养

4.5.1.1 用 1 mL 移液管取 1 : 10 试液 1 mL,沿管壁加入盛有 9 mL 盐水的试管(管的尖端不要触及液面),振摇试管,做成 1 : 100 均匀稀释液。

4.5.1.2 另取 1 mL 移液管,按 4.5.1.1 操作制 10 倍递增稀释液,每次更换一支移液管,稀释至 10^{-3} ~ 10^{-5} 倍。

4.5.1.3 选择 2 个~3 个连续稀释度,用吸取该稀释度的移液管,移 1 mL 试液于平皿内,每个稀释度做 2 个~3 个平皿。

4.5.1.4 将预先放在 45℃±1℃ 恒温水浴中的营养琼脂培养基,加入平皿约 15 mL,并转动平皿混合均匀。同时再将营养琼脂 15 mL 倾斜加入装有 1 mL 不含试样的稀释剂平皿中,作为空白对照。

4.5.1.5 琼脂凝固后,翻转平皿,置 36℃±1℃ 培养箱内,保持 48 h±2 h 后取出,进行菌落计数。平皿

菌落数乘以稀释倍数,即为每克样品所含菌落总数。

4.5.2 计数方法

4.5.2.1 用肉眼观察,必要时用放大镜。

4.5.2.2 求出同一稀释度各平皿的菌落平均值。若平皿中有连成大片的菌落生长,该平皿不宜计数。若片状菌落不到平皿的一半,其余一半的分布又很均匀,可将此半个计数后乘以2,代表全皿。

4.5.2.3 选择平均菌落数在30~300之间的平皿,作为菌落总数的测定范围。当只有一个稀释度符合此范围,即以该平皿菌落数乘以稀释倍数(见表1中例1)。

4.5.2.4 有两个稀释度,平均菌落数均在30~300之间,则应求出两者菌落总数之比值决定。小于或等于2,报告其平均数;大于2,则报告其中较小的菌落数(见表1中例2、例3)。

4.5.2.5 所有稀释度,其平均菌落数均大于300个,则按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数(见表1中例4)。

4.5.2.6 所有稀释度的平均菌落数均小于30个,则按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数(见表1中例5)。

4.5.2.7 所有稀释度的平均菌数落均不在30个~300个之间,则以最接近30或300的乘以稀释倍数(见表1中例6)。

4.5.2.8 所有稀释度均无菌落生长,为每克小于10 CFU。

4.5.3 报告

菌落数在100以内,按实数值报告;大于100,采用二位有效数字乘以10的指数来表示,有效数字后面的数值用修约法处理。以CFU/g为计量单位。(CFU:菌落形成单位)

表1 菌落计数结果及报告方法

例次	不同稀释度的平均菌落数			两稀释度	菌落总数	报告方式
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	菌数之比	CFU/g	CFU/g
1	1 365	164	20	—	16 400	1.6×10 ⁴
2	2 760	295	46	1.6	38 000	3.8×10 ⁴
3	2 890	270	60	2.2	27 100	2.7×10 ⁴
4	不可计	4 650	513	—	513 000	5.1×10 ⁵
5	27	11	5	—	270	2.7×10 ²
6	不可计	305	12	—	30 500	3.1×10 ⁴

5 真菌总数测定方法

5.1 方法原理

真菌具有明显的细胞核,多数需氧,在偏酸含糖的培养基中,在较高湿度25℃~28℃的温度条件下生产良好。本方法根据这些生物特性,进行培养和菌落计数。

5.2 材料和仪器

5.2.1 恒温培养箱。

5.2.2 振荡器。

5.2.3 电热恒温水浴锅。

5.2.4 试管:15 mm×150 mm。

5.2.5 移液管:1 mL和10 mL。

5.2.6 平皿:∅90 mm。

5.2.7 生物显微镜。

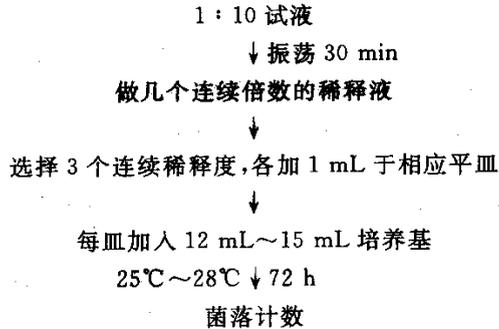
5.2.8 载玻片、盖玻片。

5.3 培养基和试剂

5.3.1 沙保罗琼脂培养基。

5.3.2 蒸馏水:定量分装于试管(每支试管 9 mL)。

5.4 试验程序



5.5 试验步骤

5.5.1 试液稀释及培养

5.5.1.1 将 1 : 10 试液置振荡器中,振荡 30 min,使真菌孢子充分散开。

5.5.1.2 按 4.5.1.1、4.5.1.2 中规定的稀释方法,将试液稀释至 10^{-1} ~ 10^{-4} 。

5.5.1.3 根据试样污染程度,选择 3 个连续稀释度,分别移 1 mL 稀释液于相应平皿中。每个稀释度做 2 个~3 个平皿。然后将预先放在水浴锅中的 $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的沙保罗琼脂培养基,分别加入约 15 mL,并转动平皿,混合均匀。同时按细菌总数测定中的方法,作空白对照。

5.5.1.4 待琼脂凝固后,倒置于 $25^{\circ}\text{C} \sim 28^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,保持 $72 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ 后取出,进行菌落计数。

5.5.2 计数方法

用肉眼观察,选择同一稀释度平均菌落数在 5 个~50 个之间的,乘以稀释倍数,作为真菌总数。计数和报告中所遇到的各种情况,按 4.5.2 的规则处理。

注:计数时,如不能肯定是真菌,可取培养物涂片,直接镜检或革兰氏染色后镜检。

6 大肠菌群和粪大肠菌群检验方法

6.1 方法原理

根据其所具有的生物学特性,如革兰氏阴性无芽胞杆菌,分别在 37°C 和 44°C 条件下,保持 24 h~48 h 能发酵乳糖、产酸、产气,并能在选择性培养基上产生典型菌落,能分解色氨酸,产生靛基质等。

6.2 材料和仪器

6.2.1 恒温培养箱。

6.2.2 电热恒温水浴。

6.2.3 试管及小倒管:15 mm×150 mm。

6.2.4 移液管:1 mL、10 mL。

6.2.5 平皿:∅90 mm。

6.2.6 pH 试纸。

6.2.7 生物显微镜。

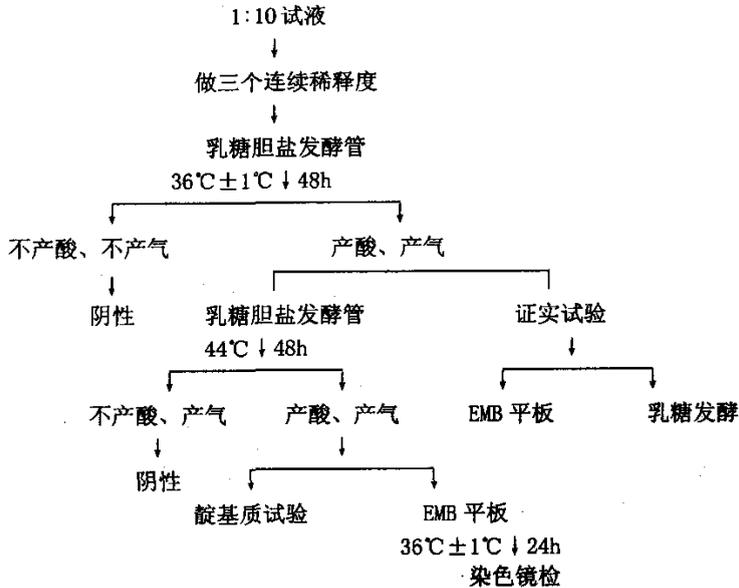
6.2.8 载玻片和盖玻片。

6.3 培养基和试剂

6.3.1 乳糖胆盐培养基。

- 6.3.2 乳糖发酵培养基液。
 6.3.3 伊红-美兰琼脂(EMB)。
 6.3.4 蛋白胨水。
 6.3.5 靛基质试剂。
 6.3.6 革兰氏染色。

6.4 试验程序



6.5 试验步骤

6.5.1 试液稀释

- 6.5.1.1 用 1:10 试液,按 4.5.1.1、4.5.1.2 中的方法做 10 倍递增稀释液。
 6.5.1.2 根据样品的污染情况,选择三个连续稀释度。

6.5.2 大肠菌群

6.5.2.1 将试液分别接种于预先装有 10 mL 乳糖胆盐培养基的试管内,每管 1 mL,每一稀释度接种 3 管,在 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,如所有试管内部不产酸、不产气,则可报告大肠菌群阴性。如有产气、产酸者则需按 6.5.2.2 进一步做证实试验。

6.5.2.2 划线接种于 EMB 平皿,在 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h 取出观察形态,挑取可疑菌落做染色镜检,同时做乳糖发酵试验,凡乳管产气、镜检为革兰氏阴性无芽胞杆菌,即可报告大肠菌群阳性。

6.5.3 粪大肠菌群

6.5.3.1 将第一次产酸、产气的乳糖胆盐培养物,分别以 1 mL 接种于各乳糖胆盐发酵管内,置于 $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 水浴锅,培养 24 h~28 h。如所有乳糖胆盐发酵管都不产酸、不产气,则可报告粪大肠菌群阴性;如产酸、产气,则进行 6.5.3.2~6.5.3.5 程序。

6.5.3.2 划线接种于 EMB 平皿,在 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h,同时接种于蛋白胨水,在置于 $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。

6.5.3.3 经培养后,在 EMB 平皿上,典型粪大肠菌群菌落,呈深紫黑色、圆形,边缘整齐,表面光滑湿润,常见有金属光泽。也有的呈紫黑色,不带或略带金属光泽,或粉紫色,中心较深的菌落。

6.5.3.4 挑取上述可疑菌落,涂片做革兰氏染色镜检。

6.5.3.5 在蛋白胨水培养液中,加入靛基质试剂 0.5 mL,阳性反应则液面呈现玫瑰红色,阴性反应液面呈试剂本色。

6.5.3.6 平皿上有典型菌落,经证实为革兰氏阴性短杆菌,靛基质试验阳性,则报告粪大肠菌群阳性。

7 铜绿假单胞菌检验方法

7.1 方法原理

根据本菌生物学特征,革兰氏阴性杆菌氧化酶试验阳性,能产生铜绿假单胞菌素。此外还能液化明胶,还原硝酸盐为亚硝酸盐,在 42℃ 条件下生长等,可与类似菌相区别。

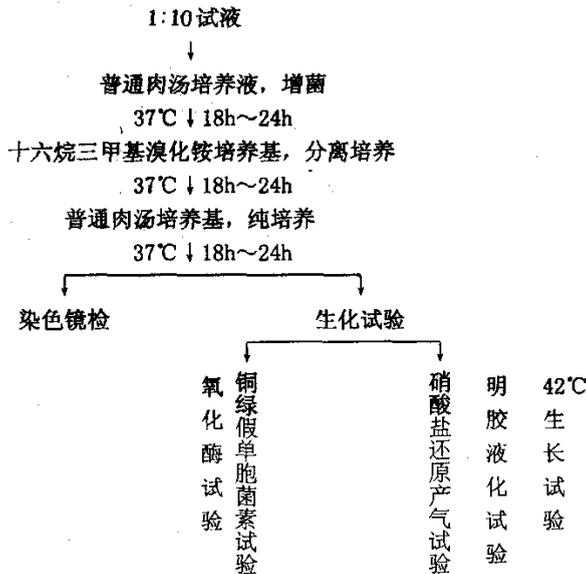
7.2 材料和仪器

- 7.2.1 恒温培养箱。
- 7.2.2 冰箱。
- 7.2.3 三角烧瓶:500 mL、300 mL。
- 7.2.4 试管:∅18 mm×200 mm。
- 7.2.5 平皿:∅90 mm。
- 7.2.6 移液管:1 mL、10 mL。
- 7.2.7 生物显微镜。
- 7.2.8 载玻片、盖玻片。
- 7.2.9 接种环及针。
- 7.2.10 酒精灯。

7.3 培养基和试剂

- 7.3.1 营养琼脂培养基(普通肉汤培养基)。
- 7.3.2 十六烷三甲基溴化铵培养基。
- 7.3.3 乙酰胺培养基。
- 7.3.4 铜绿假单胞菌色素测定用培养基。
- 7.3.5 明胶培养基。
- 7.3.6 硝酸盐蛋白胨水培养基。
- 7.3.7 1%的二甲基对苯二胺试液。
- 7.3.8 三氯甲烷(氯仿)。
- 7.3.9 1 mol/L 的盐酸。

7.4 试验程序



7.5 试验步骤

7.5.1 增菌:取1:10试液10 mL,放入装有90 mL普通肉汤培养液的三角烧瓶中,在37℃下培养18 h~24 h,有铜绿假单胞菌生长时,培养液表面多有一层薄菌膜,且呈黄绿色或蓝绿色。

7.5.2 分离培养:挑取增菌培养物,划线接种在十六烷三甲基溴化铵琼脂平皿上(也可划线接种在乙酰胺培养基上),在37℃下培养18 h~24 h。在培养基上,菌落扁平无定型、呈灰白色,向周边扩散或略有蔓延、表面湿润,周围的培养基常扩散有水溶性色素(在乙酰胺培养基上,菌落扁平、边缘不整齐,周围的培养基略带粉红色,而其他菌不生长)。

7.5.3 纯培养:挑取可疑铜绿假单胞菌的分离培养物菌落2个~3个放入肉汤培养基,在37℃下培养18 h~24 h。

7.5.4 染色镜检:挑取可疑菌落,涂片,革兰氏染色,经镜检为阳性者,进行氧化酶试验。

7.5.5 氧化酶试验:取一小块白色滤纸,放在平皿内,用玻璃棒挑取铜绿假单胞菌的可疑菌落,涂在滤纸上,加1滴新配制的二甲基对苯二胺试液(1%),30 s内出现粉红色或紫红色,为阳性;若培养物不变色,氧化酶试验为阴性。

7.5.6 铜绿假单胞菌素试验:取可疑菌落2个~3个,分别接种在铜绿假单胞菌素测定培养基上,在37℃下培养24 h,加入氯仿3 mL~5 mL,充分振荡使培养物中的铜绿假单胞菌素溶解于氯仿液内,待氯仿提取液呈蓝色时,用移液管将氯仿移到另一试管中,并加入1 mol/L的盐酸1 mL左右,振荡后静置片刻。如上层盐酸液内出现粉红色到紫红色时为阳性,说明样品中有铜绿假单胞菌素存在。

7.5.7 硝酸盐还原产气试验:挑取被检的纯培养物,接种在硝酸盐胨水培养基中,在37℃下培养24 h,观察结果。凡在硝酸盐胨水培养基内的小试管中有气体者,为阳性。表明该菌能还原硝酸盐,并将亚硝酸盐分解产生氧气。

7.5.8 明胶液化试验:取铜绿假单胞菌可疑菌落的纯培养物,穿刺接种在明胶培养基内,在37℃培养24 h,取出放入冰箱中在0℃~4℃下静置10 min~30 min,仍呈溶解状,为阳性;凝固不溶解者,为明胶液化试验阴性。

7.5.9 42℃生长试验:挑取纯培养物,接种在普通琼脂斜面培养基上,在42℃±1℃下培养24 h~48 h,铜绿假单胞菌素能生长,为阳性。

7.6 试验结果

试样经增菌、分离培养,证实为革兰氏阴性杆菌,氧化酶及铜绿假单胞菌素试验均为阳性者,样品判为有铜绿假单胞菌;铜绿假单胞菌素试验阴性,而液化明胶、硝酸盐还原产气和42℃生长试验皆为阳性时,仍判样品中有铜绿假单胞菌。

8 金黄色葡萄球菌检验方法

8.1 方法原理

根据本菌的特有形态及培养特性,应用Baird-parker平皿进行分离,该平皿中的氯化锂可抑制革兰氏阴性细菌生长,丙酮酸钠可刺激金黄色葡萄球菌生长,提高检出率,并利用分解甘露醇和血浆凝固酶等特征,进行鉴别。

8.2 材料与仪器

8.2.1 生物显微镜。

8.2.2 恒温培养箱。

8.2.3 离心机。

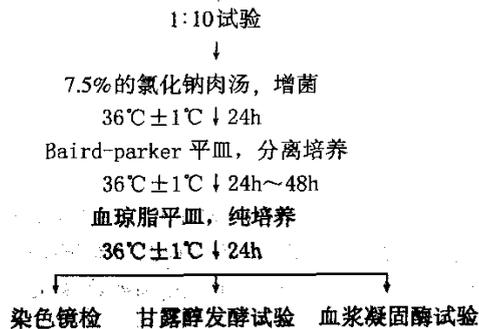
8.2.4 移液管:1 mL、10 mL。

8.2.5 试管:∅15 mm×150 mm。

8.2.6 三角烧瓶:500 mL或300 mL。

8.2.7 载玻片、盖玻片。

- 8.2.8 接种环或针。
- 8.2.9 酒精灯。
- 8.3 试剂和培养基
- 8.3.1 7.5%的氯化钠肉汤。
- 8.3.2 Baird-parker 平皿。
- 8.3.3 血琼脂培养平皿。
- 8.3.4 甘露醇发酵培养基。
- 8.3.5 盐水。
- 8.3.6 血浆。
- 8.4 试验程序



8.5 试验步骤

- 8.5.1 增菌:取 1:10 试液 10 mL,放入装有 90 mL 氯化钠(7.5%)肉汤的三角烧瓶中,在 36℃±1℃ 培养 24 h~48 h。Baird-parker 平皿上有圆形光滑凸起,湿润直径为 2 mm~3 mm,呈灰色到墨色,边缘色淡,周围呈一浑浊带,外层有一透明带。无 Baird-parker 培养基可划线接种在血琼脂平皿上培养。血琼脂平皿上的菌落呈金黄色,大而突起,圆形不透明,表面光滑,周围有溶血圈。
- 8.5.2 纯培养:从分离培养皿上挑取单个疑似菌落接种于血琼脂平皿上,在 36℃±1℃ 下培养 24 h。
- 8.5.3 染色镜检:挑取纯培养的疑似菌落进行涂片和革兰氏染色、镜检。金黄色葡萄球菌,为革兰氏阳性菌,排列成葡萄状,无芽胞、无荚膜。致病性葡萄球菌,菌体较小,直径约为 0.5μm~1μm。
- 8.5.4 甘露醇发酵试验:取纯培养菌落接种到甘露醇发酵培养基中,在 36℃±1℃ 培养 24 h。金黄色葡萄球菌能发酵甘露醇产酸,培养基呈红色。
- 8.5.5 血浆凝固酶试验:吸取 1:4 的新鲜兔血浆 0.5 mL,放入试管,加入待检的增菌 24 h 肉汤培养物 0.5 mL。混匀后放入 36℃±1℃ 的培养箱或水浴锅中,每半小时观察一次,24 h 之内呈现凝块,为阳性。同时用已知血浆凝固酶试验阳性和阴性菌株,作为对照。

8.6 试验结果

上述选择平皿上有可疑菌落生长,经染色镜检,证明为革兰氏阳性葡萄球菌,并能发酵,甘露醇产酸,血浆凝固酶试验阳性者,表明样品中有金黄色葡萄球菌。

附录 A

(资料性附录)

微生物学检验的有关培养基和试剂

A.1 营养琼脂培养基(肉汤琼脂培养基)

A.1.1 成分

- A.1.1.1 蛋白胨 10 g。
- A.1.1.2 氯化钠 5 g。
- A.1.1.3 琼脂 15 g。
- A.1.1.4 牛肉膏 3 g。
- A.1.1.5 蒸馏水 1 000 mL。

A.1.2 制法

将蛋白胨、氯化钠、琼脂、牛肉膏加到蒸馏水中,微温使溶,再加热煮沸,待琼脂完全溶化后,混匀,用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 值为 7.4 ± 0.2 ,过滤,分装于三角烧瓶,在 121°C 下,高压灭菌 20 min 后,贮存在 $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$ 冷暗处备用。

A.2 沙保罗琼脂培养基

A.2.1 成分

- A.2.1.1 蛋白胨 10 g。
- A.2.1.2 麦芽糖 40 g。
- A.2.1.3 琼脂 20 g。
- A.2.1.4 蒸馏水 1 000 mL。

A.2.2 制法

将上述成分溶于水,加热溶解,调 pH 值至 6.0 ± 0.2 ,分装在三角瓶或试管中,在 118°C 下灭菌,倾注平板或置斜面,无菌试验后备用。

A.3 乳糖胆盐培养基

A.3.1 成分

- A.3.1.1 蛋白胨 20 g。
- A.3.1.2 猪胆盐 5 g。
- A.3.1.3 乳糖 5 g。
- A.3.1.4 0.4% 溴甲酚紫水溶液 2.5 mL。
- A.3.1.5 蒸馏水 1 000 mL。

A.3.2 制法

将蛋白胨、猪胆盐及乳糖溶于蒸馏水中,调 pH 值为 $7.2 \sim 7.4$,加入指示剂(0.4% 溴甲酚紫水溶液)混匀,分装于有小倒管的试管中(见 A.12.2),在 115°C 下高压灭菌 20 min。

A.4 伊红-美兰(EMB)琼脂

A.4.1 成分

- A.4.1.1 蛋白胨 10 g。
- A.4.1.2 乳糖 10 g。
- A.4.1.3 磷酸二氢钾 2 g。

JC/T 542—2010

A. 4. 1. 4 琼脂 20 g。

A. 4. 1. 5 2%伊红水溶液 20 mL。

A. 4. 1. 6 0.5%美兰水溶液 13 mL。

A. 4. 1. 7 蒸馏水 1 000 mL。

A. 4. 2 制法

先将琼脂加到 900 mL 蒸馏水中,加热溶解,然后加入磷酸二氢钾、蛋白胨混匀,使之溶解,再以蒸馏水补足至 1 000 mL,调 pH 值为 7.2~7.4,分装于烧瓶内,在 121℃下高压灭菌 15 min 后备用。用时,加入乳糖并加热融化琼脂,在 60℃左右以无菌操作加入灭菌的伊红-美兰溶液,摇匀,倾注平皿使用。

A. 5 蛋白胨水

A. 5. 1 成分

A. 5. 1. 1 蛋白胨 20 g。

A. 5. 1. 2 氯化钠 5 g。

A. 5. 1. 3 蒸馏水 1 000 mL。

A. 5. 2 制法

将上述成分加热熔化,调 pH 值为 7.0~7.2,分装小试管,在 121℃下高压灭菌 15 min。

A. 6 靛基质试剂(柯凡克试剂)

A. 6. 1 成分

A. 6. 1. 1 戊醇 75 mL。

A. 6. 1. 2 对二甲氨基苯甲醛 5 g。

A. 6. 1. 3 浓盐酸 25 mL。

A. 6. 2 制法

将对二甲氨基苯甲醛加入戊醇中,搅动使之完全溶解,然后一滴一滴缓慢地加入盐酸 25 mL。

A. 7 革兰氏染色液

A. 7. 1 染液制备

A. 7. 1. 1 结晶紫染色液

A. 7. 1. 1. 1 成分

A. 7. 1. 1. 1. 1 结晶紫 1 g。

A. 7. 1. 1. 1. 2 95%乙醇 20 mL。

A. 7. 1. 1. 1. 3 1%草酸铵水溶液 80 mL。

A. 7. 1. 1. 2 制法

将结晶紫溶于乙醇中,然后与草酸溶液混合。

A. 7. 1. 2 革兰氏碘液

A. 7. 1. 2. 1 成分

A. 7. 1. 2. 1. 1 碘 1 g。

A. 7. 1. 2. 1. 2 碘化钾 2 g。

A. 7. 1. 2. 1. 3 蒸馏水 300 mL。

A. 7. 1. 2. 2 制法

将碘与碘化钾进行混合,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. 7. 1. 3 脱色液为 95%乙醇

A. 7. 1. 4 复染液

A.7.1.4.1 沙黄复染液

A.7.1.4.1.1 成分

- A.7.1.4.1.1.1 沙黄 0.25 g。
- A.7.1.4.1.1.2 95%乙醇 10 mL。
- A.7.1.4.1.1.3 蒸馏水 90 mL。

A.7.1.4.1.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.7.1.4.2 稀石碳酸复红液

A.7.1.4.2.1 成分

- A.7.1.4.2.1.1 碱性复红 10 g(研细)。
- A.7.1.4.2.1.2 95%乙醇 100 mL。
- A.7.1.4.2.1.3 5%石碳酸水溶液 90 mL。
- A.7.1.4.2.1.4 蒸馏水 90 mL。

A.7.1.4.2.2 制法

将碱性复红加入乙醇,放置 12 h,过滤。取滤液 10 mL,加入 5%石碳酸水溶液,混合;再取此液 10 mL 加入蒸馏水,即为 1:10 稀石碳酸复红液。

A.7.2 染色法

- A.7.2.1 将涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染色液,染 1 min,水洗。
- A.7.2.2 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。
- A.7.2.3 滴加 95%乙醇脱色,约 30 s。
- A.7.2.4 滴加复染液(沙黄),复染 1 min,水洗,待干,镜检

注:用稀石碳酸复红液复染,仅需 10 s。

A.7.3 染色结果

革兰氏阳性菌呈紫色,革兰氏阴性菌呈红色。

A.8 十六烷三甲基溴化铵培养基

A.8.1 成分

- A.8.1.1 牛肉膏 3 g。
- A.8.1.2 蛋白胨 10 g。
- A.8.1.3 氯化钠 5 g。
- A.8.1.4 十六烷三甲基溴化铵 0.3 g。
- A.8.1.5 琼脂 20 g。
- A.8.1.6 蒸馏水 1 000 mL。

A.8.2 制备

将除琼脂外的其他成分混合,加热溶解,调 pH 值为 7.4~7.6,加入琼脂,在 115℃ 下高压灭菌 20 min 后,制成平皿备用。

A.9 乙酰胺培养基

A.9.1 成分

- A.9.1.1 乙酰胺 10 g。
- A.9.1.2 氯化钠 5 g。
- A.9.1.3 无水磷酸氢二钾 1.39 g。
- A.9.1.4 无水磷酸二氢钾 0.73 g。

A. 9. 1. 5 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) 0.5 g。

A. 9. 1. 6 酚红 0.012 g。

A. 9. 1. 7 琼脂 20 g。

A. 9. 1. 8 蒸馏水 1 000 mL。

A. 9. 2 制法

除琼脂和酚红外,将其他成分加到蒸馏水中,加热溶解调 pH 值为 7.2~7.4,加入琼脂、酚红,在 121℃下高压灭菌 20 min 后,制成平皿备用。

A. 10 绿脓菌色素测定用培养基

A. 10. 1 成分

A. 10. 1. 1 蛋白胨 20 g。

A. 10. 1. 2 氯化镁 1.4 g。

A. 10. 1. 3 硫酸钾 10 g。

A. 10. 1. 4 琼脂 10 g。

A. 10. 1. 5 丙三醇(甘油)(化学纯) 10 g。

A. 10. 1. 6 蒸馏水 1 000 mL。

A. 10. 2 制法

将蛋白胨、氯化镁和硫酸钾加到蒸馏水中,加温使之溶解,调 pH 值为 7.2~7.4,加入琼脂和甘油,加热溶解,分装于试管内,在 115℃下高压灭菌 20 min 后,制成斜面备用。

A. 11 明胶培养基

A. 11. 1 成分

A. 11. 1. 1 牛肉膏 3 g。

A. 11. 1. 2 蛋白胨 5 g。

A. 11. 1. 3 明胶 120 g。

A. 11. 1. 4 蒸馏水 1 000 mL。

A. 11. 2 制法

取各成分加在蒸馏水中浸泡 20 min,随时搅拌加温使之溶解,调 pH 值为 7.2~7.4,分装于试管内,在 115℃下高压灭菌 20 min 后,直立放置,凝后备用。

A. 12 硝酸盐蛋白胨水培养基

A. 12. 1 成分

A. 12. 1. 1 蛋白胨 10 g。

A. 12. 1. 2 酵母浸膏 3 g。

A. 12. 1. 3 硝酸钾 2 g。

A. 12. 1. 4 亚硝酸钠 0.5 g。

A. 12. 1. 5 蒸馏水 1 000 mL。

A. 12. 2 制法

将蛋白胨和酵母浸膏加到蒸馏水中,加温使之溶解,调 pH 值为 7.2~7.4,煮沸过滤后补足液量,加入硝酸钾和亚硝酸钠,溶解混匀,分装到加有小倒管的试管中,在 115℃下高压灭菌 20 min 后备用。

A. 13 7.5%的氯化钠肉汤

A. 13. 1 成分

- A. 13. 1. 1 蛋白胨 10 g。
- A. 13. 1. 2 牛肉膏 3 g。
- A. 13. 1. 3 氯化钠 75 g。
- A. 13. 1. 4 蒸馏水 1 000 mL。
- A. 13. 2 制法

将上述成分放入蒸馏水中加热溶解,调 pH 值为 7.2~7.4,分装后在 121℃下高压灭菌 15 min。

A. 14 Baird-parker 平皿

- A. 14. 1 成分
- A. 14. 1. 1 胰蛋白胨 10 g。
- A. 14. 1. 2 牛肉膏 5 g。
- A. 14. 1. 3 酵母浸膏 1 g。
- A. 14. 1. 4 丙酮酸钠 10 g。
- A. 14. 1. 5 甘氨酸 12 g。
- A. 14. 1. 6 氯化锂(LiCl·6 H₂O) 5 g。
- A. 14. 1. 7 琼脂 20 g。
- A. 14. 1. 8 蒸馏水 950 mL。
- A. 14. 2 制法

将各成分加到蒸馏水中,加热煮沸完全溶解,冷至 25℃,调 pH 值为 7.0±0.2。分装每瓶 95 mL,在 121℃下高压灭菌 15 min。临用时,加热溶化,每 95 mL 加入预热至 50℃的卵黄亚碲酸钾增菌剂 5 mL,摇匀后倾注平皿。培养基应是致密不透明的。使用前在冰箱贮存不得超过 48 h。

注:增菌剂的配制:30%的卵黄生理盐水 50 mL,与除菌过滤 1%亚碲酸钾溶液 10 mL 混合,保存于冰箱内。

A. 15 血琼脂培养基

- A. 15. 1 成分
- A. 15. 1. 1 营养琼脂 100 mL;
- A. 15. 1. 2 脱纤维兔血浆 10 mL。
- A. 15. 2 制法

将营养琼脂加热溶化,待冷至 50℃左右,以无菌手续加入脱纤维兔血浆,摇匀,制成平皿,置冰箱内备用。

A. 15. 3 血浆制备

取 3.9%柠檬酸钠溶液(121℃灭菌 30 min)。每 1 份加入全血 4 份,混匀静置,在 2 000 r/min~3 000 r/min 的条件下,离心 3 min~5 min。血球下沉,取上面血浆。

A. 16 甘露醇发酵培养基

- A. 16. 1 成分
- A. 16. 1. 1 蛋白胨 10 g。
- A. 16. 1. 2 氯化钠 5 g。
- A. 16. 1. 3 D-甘露醇 10 g。
- A. 16. 1. 4 牛肉膏 5 g。
- A. 16. 1. 5 0.2%溴麝香草酚蓝溶液(指示剂) 12 mL。
- A. 16. 1. 6 蒸馏水 1 000 mL。
- A. 16. 2 制法

将蛋白胨、氯化钠、牛肉膏加到蒸馏水中,加热溶解,调 pH 值为 7.4±0.2,加入甘露醇和指示剂,混

匀后分装试管中,在 115℃下高压灭菌 20 min 后备用。

A. 17 乳糖发酵培养基

A. 17.1 成分

A. 17.1.1 蛋白胨水 2 g。

A. 17.1.2 氯化钠 3 g。

A. 17.1.3 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2 g。

A. 17.1.4 0.4%溴麝香草酚蓝液(BTB) 6 mL。

A. 17.1.5 乳糖 5 g。

A. 17.1.6 蒸馏水 1000 mL。

A. 17.2 制法

除乳糖和 BTB 外的其他成分,加在蒸馏水中,微湿溶解,调 pH 值为 7.4 ± 0.2 ,加入乳糖和 BTB,混匀,分别装于有倒管的试管内,每管约 5.0 mL,在 115℃下高压灭菌 20 min 后备用。
