



中华人民共和国国家标准

GB 4789.44—2020

食品安全国家标准

食品微生物学检验 创伤弧菌检验

2020-09-11 发布

2021-03-11 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

食品安全国家标准

食品微生物学检验 创伤弧菌检验

1 范围

本标准规定了水产品中创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)的检验方法。
本标准适用于鱼、虾、蟹、贝类等水产品中创伤弧菌的检验。

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:36℃±1℃。
- 2.2 冰箱:2℃~5℃、7℃~10℃。
- 2.3 恒温水浴锅。
- 2.4 均质器或无菌研钵。
- 2.5 天平:感量0.1g。
- 2.6 PCR仪。
- 2.7 电泳仪或毛细管电泳仪。
- 2.8 凝胶电泳成像系统或紫外检测仪。
- 2.9 生物安全柜。
- 2.10 高速离心机(最大转速至少15 000 r/min)。
- 2.11 涡旋振荡器。
- 2.12 微量可调移液器(量程2.5 μL、10 μL、100 μL、1 000 μL)及配套吸头。
- 2.13 精密pH试纸或pH计。
- 2.14 无菌试管:规格18 mm×180 mm和15 mm×100 mm。
- 2.15 无菌吸管:规格1 mL(具0.01 mL刻度)和10 mL(具0.1 mL刻度)。
- 2.16 无菌锥形瓶:容量250 mL、500 mL和1 000 mL。
- 2.17 无菌培养皿:直径90 mm。
- 2.18 无菌手术剪、镊子、钳子等。
- 2.19 PCR反应管。

3 培养基和试剂

- 3.1 蛋白胨-氯化钠-纤维二糖-多黏菌素E(PNCC)增菌液:见A.1。
- 3.2 纤维二糖-多黏菌素E(CC)琼脂培养基:见A.2。
- 3.3 改良纤维二糖-多黏菌素B-多黏菌素E(mCPC)琼脂培养基:见A.3。
- 3.4 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂培养基:见A.4。
- 3.5 磷酸盐缓冲液(PBS):见A.5。
- 3.6 3%氯化钠三糖铁琼脂斜面:见A.6。

- 3.7 嗜盐性试验培养基:见 A.7。
- 3.8 3%氯化钠赖氨酸脱羧酶试验培养基:见 A.8。
- 3.9 3%氯化钠 MR-VP 培养基:见 A.9。
- 3.10 3%氯化钠溶液:见 A.10。
- 3.11 氧化酶试剂:见 A.11。
- 3.12 革兰氏染色液:见 A.12。
- 3.13 邻硝基酚-β-D-半乳糖苷(ONPG)试剂:见 A.13。
- 3.14 Voges-Proskauer(V-P)试剂:见 A.14。
- 3.15 细菌 DNA 提取试剂盒。
- 3.16 生化鉴定试剂盒。
- 3.17 PCR 反应配套试剂。
- 3.18 琼脂糖凝胶电泳配套试剂。
- 3.19 具有菌种保藏资质单位提供的创伤弧菌标准菌株。

4 检验程序

创伤弧菌检验程序见图 1。

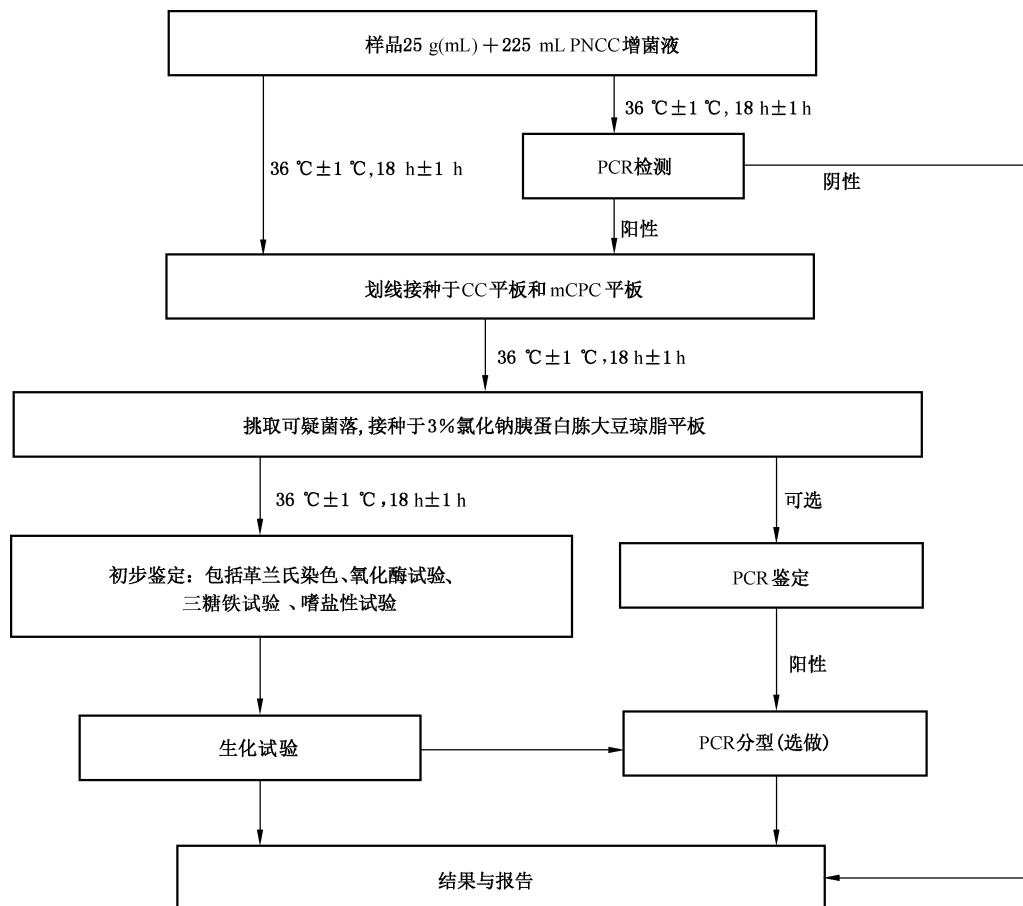


图 1 创伤弧菌检验程序

5 操作步骤

5.1 样品制备

5.1.1 新鲜样品采集后应于 3 h 内完成检验,若不能在规定时间内完成,则将样品置于 7 ℃~10 ℃条件下保存(因创伤弧菌在 4 ℃条件下极易形成活而不可培养的状态,因此样品勿放 4 ℃条件下),并尽可能在 24 h 内完成检验;冷冻样品应在不超过 45 ℃的温热条件下解冻,解冻时间不超过 15 min。

5.1.2 取样:鱼类和头足类取其表面组织、肠和鳃。贝类则取全部内容物(包括贝肉和体液)。甲壳类取整个动物或其中心部分(包括肠和鳃)。如为带壳贝类或硬壳甲壳类,则应先用流动自来水冲洗外壳并用滤纸吸干表面水分,然后无菌操作打开外壳,按上述要求取相应部分。

5.1.3 以无菌操作取上述处理后的样品 25 g,加入 PNCC 增菌液 225 mL,用旋转刀片式均质器以 8 000 r/min 均质 1 min,或用拍击式均质器均质 2 min,充分混匀制备成 1:10 的样品匀液。如无均质器,则将样品放入无菌乳钵中充分研磨,取磨碎后的样品 25 g 转入 500 mL 无菌锥形瓶中,加入 PNCC 增菌液 225 mL,充分振荡混匀,制备成 1:10 的样品匀液。

5.2 增菌

将 5.1.3 制备的 1:10 样品匀液于 36 ℃±1 ℃培养 18 h±1 h。

5.3 PCR 检测

PCR 实验环境条件和过程控制应参照 GB/T 27403《实验室质量控制规范 食品分子生物学检测》规定执行,下同。

5.3.1 DNA 模板的制备

在距离 PNCC 增菌液的液面下 1 cm 处吸取 1 mL 置于 1.5 mL EP 管中,9 000 r/min 离心 3 min,弃去上清液。向沉淀中加入 1 mL PBS 将其悬浮并充分清洗后,9 000 r/min 离心 3 min,弃去上清液,按此步骤反复清洗沉淀 2 次~3 次,弃去最后一遍上清液,加入 1 mL 无菌超纯水,100 ℃煮沸 10 min,继而 12 000 r/min 离心 5 min,上清液用于 PCR 分析。若不能及时分析则于-20 ℃保存备用。

也可以用商品化的 DNA 提取试剂盒按其说明书要求提取制备 DNA 模板。

5.3.2 PCR 扩增

5.3.2.1 引物

信息见表 1。

表 1 创伤弧菌 PCR 检测用引物信息

引物	序列	扩增片段长度/bp
<i>vvh</i> A-785F	5' CCG CGG TAC AGG TTG GCG CA 3'	519
<i>vvh</i> A-1303R	5' CGC CAC CCA CTT TCG GGC C 3'	

5.3.2.2 对照设置

每次 PCR 反应使用创伤弧菌标准菌株作为阳性对照,同时,使用除创伤弧菌之外的其他弧菌的标准菌株作为阴性对照,以灭菌去离子水作为空白对照。

5.3.2.3 PCR 反应体系

见表 2。

表 2 创伤弧菌 PCR 检测反应体系组成

试剂	反应体积/ μL
无菌超纯水	13.7
10 \times PCR 缓冲液	2.5
25 mmol/L MgCl_2	2.5
2.5 mmol/L dNTP	2.0
上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
DNA 模板	2.0
5 U/ μL <i>Taq</i> 酶	0.3
总体积	25.0

5.3.2.4 PCR 反应程序

预变性:94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min;变性:94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min;退火:62 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min;延伸:72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min;循环数:30;终延伸:72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min;电泳检测。若不能立即检测则 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

5.3.3 电泳

凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。用 0.5 \times TBE 缓冲液配制 1.5% 的琼脂糖凝胶(含 EB 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 或 Goldview 5 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ 或 Gelred 5 $\mu\text{L}/50\text{ mL}$ 等 DNA 染料),取 5 μL PCR 扩增产物与 1 μL 6 \times 核酸电泳上样缓冲液混合后,点样,同时有一孔加入 DNA 分子量标准(范围为 100 bp~1 000 bp)。根据以下公式:电泳槽正负极的距离(cm) \times 5 V/cm 计算并设置电压,使用 0.5 \times TBE 缓冲液恒压电泳,根据溴酚蓝的移动位置确定电泳时间,使用凝胶成像系统或紫外检测仪观察和记录结果。

5.3.4 结果判定

质控系统:阴性对照和空白对照均未出现扩增条带,阳性对照出现预期大小(519 bp)的扩增条带,则检测系统正常。否则,任一种对照如果出现非上述正常结果,应重做实验,同时排除污染因素。

阳性结果:在质控系统正常的情况下,待测样品出现预期大小(519 bp)的扩增条带,判定 PCR 结果为阳性。

阴性结果:在质控系统正常的情况下,待测样品未出现预期大小(519 bp)的扩增条带,判定 PCR 结果为阴性。

5.4 分离

用 10 μL 接种环在距离 PNCC 增菌液的液面下 1 cm 沾取一环增菌液,分别划线接种于 CC 和 mCPC 平板,于 36 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 18 h \pm 1 h。典型的创伤弧菌在 CC 和 mCPC 平板上的形态为:圆形、扁平,光照下呈透明或中心不透明但边缘透明的黄色至橘黄色菌落,菌落直径 1 mm~2 mm,菌落周围可出现(或不出现)黄色晕圈。

5.5 分纯培养

从 CC 平板和 mCPC 平板上各挑取至少 5 个创伤弧菌可疑菌落(少于 5 个时全选),分别接种于 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板,36℃±1℃培养 18 h±1 h 后用于后续鉴定。创伤弧菌在 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上的菌落形态为圆形、乳白色、湿润、隆起、直径 1 mm~2 mm。

5.6 鉴定

创伤弧菌可采用菌落特征结合生化特性或 PCR 方法进行鉴定。

5.6.1 菌落特征及生化特性

5.6.1.1 初步鉴定

该步骤用于创伤弧菌的初步鉴定,进行以下 4 项鉴定实验时,挑取的菌落应来自分纯后的同一个单菌落。

- 革兰氏染色镜检:从 5.5 中 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上挑取创伤弧菌疑似菌落进行革兰氏染色并镜检。创伤弧菌为革兰氏阴性,显微镜下菌体为棒状、弧状、卵圆状等多种形态,无芽胞。
- 氧化酶试验:用接种环从 5.5 中 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上挑取创伤弧菌疑似菌落适量,涂布在用氧化酶试剂润湿(如无菌滤纸)或滴有氧化酶试剂的白色或无色载体上(如载玻片)。如果涂菌部位在 10 s 之内变紫色(偶有蓝紫色),即为氧化酶试验阳性,不变色为氧化酶试验阴性。创伤弧菌为氧化酶试验阳性。
- 三糖铁试验:用接种针从 5.5 中 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上挑取创伤弧菌疑似菌落适量,转种于 3%氯化钠三糖铁琼脂斜面并穿刺底层(注意接种针不要触及试管底部),36℃±1℃培养 24 h 观察结果。创伤弧菌在 3%氯化钠三糖铁琼脂斜面中生长时试管底层变黄,无气泡,斜面颜色不变黄(偶有斜面颜色变黄现象)。
- 嗜盐性试验:用接种针从 5.5 中 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上挑取创伤弧菌疑似菌落,分别接种于含 0%、3%、6%、8%和 10%氯化钠的胰蛋白胨水中,36℃±1℃培养 24 h,观察液体的混浊情况。创伤弧菌在含 0%、8%和 10%氯化钠的胰蛋白胨水中不生长或微弱生长,胰蛋白胨水澄清透亮或稍混浊,而在含 3%和 6%氯化钠的胰蛋白胨水中生长旺盛,胰蛋白胨水混浊。

5.6.1.2 确证实验

将初步鉴定为创伤弧菌的疑似菌落接种在 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上,36℃±1℃培养 18 h±1 h 后,取纯培养物分别接种于含 3%氯化钠的赖氨酸脱羧酶试验培养基和 MR-VP 培养基中,36℃±1℃培养 24 h~48 h 后观察结果;另取少许纯培养物接种于 3%氯化钠三糖铁琼脂斜面,36℃±1℃培养 18 h 后用于 ONPG 试验。也可选择生化鉴定试剂盒进行鉴定。

创伤弧菌生化特性见表 3,与其他弧菌的鉴别见表 4。

表 3 创伤弧菌生化特性

试验项目	结果
革兰氏染色镜检	阴性,无芽胞
氧化酶	+

表 3 (续)

试验项目	结果
动力	+
D-纤维二糖	+
蔗糖	-
葡萄糖	+
分解葡萄糖产气	-
乳糖	+/-
硫化氢	-
赖氨酸脱羧酶	+
V-P	-
ONPG	+

注：+表示阳性；-表示阴性；+/-表示多数阳性。

表 4 创伤弧菌主要生化特性与其他弧菌的比较鉴别

名称	氧化酶	赖氨酸	精氨酸	鸟氨酸	明胶	脲酶	V-P	42℃	蔗糖	D-纤维二糖	乳糖	阿拉伯糖	D-甘露糖	D-甘露醇	ONPG	嗜盐性试验 NaCl 含量/%				
																0	3	6	8	10
创伤弧菌 <i>V.vulnificus</i>	+	+	-	V	+	-	-	+	-	+	+/-	-	+	V	+	-	+	+	-	-
副溶血性弧菌 <i>V.parahaemolyticus</i>	+	+	-	+	+	V	-	+	-	V	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
溶藻弧菌 <i>V.alginolyticus</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
霍乱弧菌 <i>V.cholerae</i>	+	+	-	+	+	-	V	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
拟态弧菌 <i>V.mimicus</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
河弧菌 <i>V.fluvialis</i>	+	-	+	-	+	-	-	V	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	V	-
弗氏弧菌 <i>V.furnissii</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
梅氏弧菌 <i>V.metschnikovii</i>	-	+	+	-	+	-	+	V	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	V	-

注：+表示阳性；-表示阴性；+/-表示多数阳性；V表示可变。

5.6.2 PCR 鉴定

本部分试验可替代 5.6.1 用于创伤弧菌的快速鉴定。

5.6.2.1 DNA 模板的制备

从 5.5 中 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上挑取创伤弧菌疑似菌落,转至 500 μ L 无菌超纯水中,充分混匀后制成肉眼可见的混浊菌悬液,煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液用于 PCR 分析。若不能及时分析则于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

也可以用商业化的 DNA 提取试剂盒按其说明提取制备 DNA 模板。

5.6.2.2 PCR 扩增和电泳

同 5.3.2 和 5.3.3。

5.6.2.3 结果判定

质控系统:阴性对照和空白对照均未出现扩增条带,阳性对照出现预期大小(519 bp)的扩增条带,则检测系统正常。否则,任一种对照如果出现非上述正常结果,应重做实验,同时排除污染因素。

阳性结果:在质控系统正常的情况下,待测样品出现预期大小(519 bp)的扩增条带,判定 PCR 结果为阳性,该菌株是创伤弧菌。

阴性结果:在质控系统正常的情况下,待测样品未出现预期大小(519 bp)的扩增条带,判定 PCR 结果为阴性,该菌株不是创伤弧菌。

5.7 创伤弧菌分型(选做)

5.7.1 DNA 模板的制备

取鉴定结果为创伤弧菌的菌株制备 DNA 模板,制备方法同 5.6.2.1。

5.7.2 PCR 扩增

5.7.2.1 引物

PCR 分型用引物信息见表 5。

表 5 创伤弧菌 PCR 分型用引物信息

目的基因	引物序列	片段长度/bp	备注
<i>vcgC</i>	F:5' AGC TGC CGA TAG CGA TCT 3'	97	毒力相关基因 <i>vcg</i> 分型
	R:5' TGA GCT AAC GCG AGT AGT GAG 3'		
<i>vcgE</i>	F:5' CTC AGA AAG GCT CAA TTG AC 3'	199	
	R:5' GAT TAA CGC TGT AAG GCC G 3'		
16S rRNA A	F:5' CAT GAT AGC TTC GGC TCA A 3'	285	
	R:5' CAC TAC CAC CTT CCT CAC GAC 3'		
16S rRNA B	F:5' GCC TAC GGG CCA AAG AGG 3'	839	
	R:5' CCT GCG TCT CCG CTG GCT 3'		

表 5 (续)

目的基因	引物序列	片段长度/bp	备注
<i>SerE</i>	F:5' TGT TGT TCTTGC CCA CTC TC 3'	665	血清 E 型和生物 II 型检测
	R:5' CGC GCT TAG ATT TCT CTC ACC 3'		
<i>Bt2</i>	F:5' AGA GAT GGA AGA AAC AGG CG 3'	344	
	R:5' GGA CAG ATA TAA GGG CAA ATG G 3'		

5.7.2.2 对照设置

每次 PCR 反应使用含有目的基因的创伤弧菌标准菌株作为阳性对照,同时,使用除创伤弧菌之外的其他革兰氏阴性菌标准菌株作为阴性对照,以灭菌去离子水作为空白对照。

5.7.2.3 PCR 反应体系

同表 2。

5.7.2.4 PCR 反应程序

预变性:94 °C、5 min;变性:94 °C、1 min;退火:55 °C(*vcg* 基因)、58 °C(16S rRNA 基因)、64 °C(*Bt2* 基因及 *SerE* 基因)1 min;延伸:72 °C、1 min;循环数:30 个循环(*vcg* 基因及 16S rRNA 基因)、35 个循环(*Bt2* 基因及 *SerE* 基因);终延伸:72 °C、5 min;电泳。若不能及时电泳检测,则将扩增产物于 4 °C 短期(1 d~2 d)储存。

5.7.3 电泳

同 5.3.3。

5.7.4 结果判定

质控系统:阴性对照和空白对照均未出现扩增条带,阳性对照出现预期大小的扩增条带,则检测系统正常。否则,任一种对照如果出现非上述正常结果,应重做实验,同时排除污染因素。

在质控系统正常的情况下,如果待测菌株出现 97 bp 大小的条带,则判定该株创伤弧菌为 *vcg* C 型;如果出现 199 bp 大小的条带,则判定该株创伤弧菌为 *vcg* E 型;

如果待测菌株出现 285 bp 大小的条带,则判定该株创伤弧菌为 16S rRNA A 型,如果出现 839 bp 大小的条带,则判定该株创伤弧菌为 16S rRNA B 型,如果同时出现 285 bp 大小和 839 bp 大小的两条带,则判定该株创伤弧菌为 16S rRNA A/B 型;

如果待测菌株出现 665 bp 大小的条带,则判定该株创伤弧菌为血清 E 型;如果待测菌株出现 344 bp 大小的条带,则判定该株创伤弧菌为生物 II 型。

6 结果与报告

根据菌落特征、生化特性或 PCR 鉴定结果,报告 25 g 样品中检出或未检出创伤弧菌。

附录 A 培养基和试剂

A.1 蛋白胨-氯化钠-纤维二糖-多黏菌素 E(PNCC)增菌液

A.1.1 溶液 1

A.1.1.1 成分

蛋白胨	50.0 g
氯化钠	10.0 g
蒸馏水	900.0 mL

A.1.1.2 制法

将 A.1.1.1 各成分溶于蒸馏水中,用 1 mol/L 盐酸溶液和 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 8.5±0.2,121 °C 高压灭菌 10 min。

A.1.2 溶液 2

A.1.2.1 成分

纤维二糖	0.8 g
多黏菌素 E	1 000 U
蒸馏水	100.0 mL

A.1.2.2 制法

将纤维二糖溶于蒸馏水中,轻微加热至完全溶解,冷却后加入抗菌素,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后备用。

将溶液 1 与溶液 2 混合即为 PNCC 增菌液。

A.2 纤维二糖-多黏菌素 E(CC)琼脂培养基

A.2.1 溶液 1

A.2.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉粉	5.0 g
氯化钠	20.0 g
溴麝香草酚蓝	0.04 g
甲酚红	0.04 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	900.0 mL

A.2.1.2 制法

将 A.2.1.1 中的各种成分溶于蒸馏水中,加热煮沸至完全溶解后,用 1 mol/L 盐酸溶液和 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.6 ± 0.2 ,冷却至 $48\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

A.2.2 溶液 2

A.2.2.1 成分

纤维二糖	10.0 g
多黏菌素 E	400 000 U
蒸馏水	100.0 mL

A.2.2.2 制法

将纤维二糖溶于 100.0 mL 蒸馏水中,轻微加热至完全溶解,冷却后加入抗菌素,用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌后备用。

将溶液 2 与溶液 1 混合后倾注平板。

A.3 改良纤维二糖-多黏菌素 B-多黏菌素 E(mCPC)琼脂培养基

A.3.1 溶液 1

A.3.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉粉	5.0 g
氯化钠	20.0 g
溴麝香草酚蓝	0.04 g
甲酚红	0.04 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	900.0 mL

A.3.1.2 制法

将 A.3.1.1 中的各种成分溶于蒸馏水中,加热煮沸至完全溶解后,用 1 mol/L 盐酸溶液和 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.6 ± 0.2 ,冷却至 $48\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

A.3.2 溶液 2

A.3.2.1 成分

纤维二糖	10.0 g
多黏菌素 B	100 000 U
多黏菌素 E	400 000 U
蒸馏水	100.0 mL

A.3.2.2 制法

将纤维二糖溶于 100.0 mL 蒸馏水中,轻微加热至完全溶解,冷却后加入抗菌素,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后备用。

将溶液 2 与溶液 1 混合后倾注平板。

A.4 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂

A.4.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
氯化钠	30.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.4.2 制法

将 A.3.1 中的各种成分溶于蒸馏水中,用 1 mol/L 盐酸溶液和 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.3 ± 0.2 ,121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.5 磷酸盐缓冲液(PBS)

A.5.1 成分

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	34.0 g
蒸馏水	500.0 mL

A.5.2 制法

贮存液:称取 34.0 g 的磷酸二氢钾溶于 500.0 mL 蒸馏水中,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液(约 175 mL)调节 pH 至 7.2,用蒸馏水稀释至 1 000.0 mL 后于冰箱贮存备用。

稀释液:取贮存液 1.25 mL,用蒸馏水稀释至 1 000.0 mL,分装于适宜容器中,121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.6 3%氯化钠三糖铁琼脂斜面

A.6.1 成分

蛋白胨	15.0 g
胰蛋白胨	5.0 g
牛肉粉	3.0 g
酵母粉	3.0 g
氯化钠	30.0 g
乳糖	10.0 g

蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
硫酸亚铁(FeSO_4)	0.2 g
酚红	0.024 g
硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0.3 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.6.2 制法

将 A.4.1 中的各种成分溶于蒸馏水中,用 1 mol/L 盐酸溶液和 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.4 ± 0.2 。121 °C 高压灭菌 15 min 后分装于试管中,制成斜面长 4 cm~5 cm、深度 2 cm~3 cm 的高层斜面备用。

A.7 嗜盐性试验培养基

A.7.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
氯化钠	按浓度不同依次加入相应量
蒸馏水	1 000.0 mL

A.7.2 制法

将 A.5.1 中的各种成分溶于蒸馏水中,用 1 mol/L 盐酸溶液和 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2 ± 0.2 后,分装到 300 mL 三角瓶中,每瓶 100 mL,共配制 5 瓶,分别加入不同量的氯化钠:(1)0 g;(2)3 g;(3)6 g;(4)8g;(5)10 g。继而将各个浓度氯化钠溶液分装至适当容量的试管中,每管 10 mL,121 °C 高压灭菌 15 min 备用。

A.8 3%氯化钠赖氨酸脱羧酶试验培养基

A.8.1 成分

蛋白胨	5.0 g
酵母粉	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.02 g
L-赖氨酸	5.0 g
氯化钠	30.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH	6.8 ± 0.2

A.8.2 制法

将 A.6.1 中除赖氨酸以外的其他成分溶于蒸馏水中,用 1 mol/L 盐酸溶液和 1 mol/L 氢氧化钠溶

液调节 pH 至 6.8 ± 0.2 , 再加入赖氨酸, 使其最终浓度达 0.5% (对照培养基不加赖氨酸), 分装小试管, 每管 0.5 mL, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.9 3%氯化钠 MR-VP 培养基

A.9.1 成分

多价蛋白胨	7.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)	5.0 g
氯化钠	30.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.9.2 制法

将 A.7.1 中的各种成分溶于蒸馏水中, 用 1 mol/L 盐酸溶液和 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 6.9 ± 0.2 , 分装试管, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.10 3%氯化钠溶液

A.10.1 成分

氯化钠	30.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.10.2 制法

将上述氯化钠溶于蒸馏水中, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.11 氧化酶试剂

A.11.1 成分

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

A.11.2 制法

氧化酶试剂应少量配制, 配制后于 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内避光保存, 并在 7 d 之内使用完毕。

A.12 革兰氏染色液

A.12.1 结晶紫染色液

A.12.1.1 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.12.1.2 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.12.2 革兰氏碘液

A.12.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL

A.12.2.2 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 300.0 mL。

A.12.3 沙黄复染液

A.12.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.12.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.12.4 染色法

A.12.4.1 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.12.4.2 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。

A.12.4.3 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.12.4.4 滴加复染液,复染 1 min。水洗、待干、镜检。

A.13 邻硝基酚-β-D-半乳糖苷(ONPG)试剂

A.13.1 成分

邻硝基酚-β-D-半乳糖苷(ONPG)	0.08 g
蒸馏水	15.0 mL
缓冲液	5.0 mL

A.13.2 制法

将 ONPG 在 36 °C ± 1 °C 的蒸馏水中充分溶解后,加入缓冲液,混匀后置 2 °C ~ 5 °C 冰箱保存,试验前,将所需用量的 ONPG 溶液加热至 36 °C ± 1 °C 后使用。

A.14 Voges-Proskauer(V-P)试剂

A.14.1 成分

甲液	
α-萘酚	5.0 g
无水乙醇	100.0 mL
乙液	
氢氧化钾	40.0 g
蒸馏水	100.0 mL

A.14.2 制法

甲液:将 5.0 g α-萘酚于 100.0 mL 无水乙醇中溶解。

乙液:将 40.0 g 氢氧化钾于适量蒸馏水中充分溶解后定容至 100.0 mL。

将制备的甲液和乙液分别保存于 2 °C~5 °C 冰箱。
