


QUALITY CONTROL ILLUSTRATION MANUAL OF MICROBIOLOGICAL DEHYDRATED MEDIA

微生物干粉培养基质控 图解手册

QUALITY CONTROL ILLUSTRATION MANUAL OF
MICROBIOLOGICAL DEHYDRATED MEDIA

李瑾 刘振 何艳玲 编著

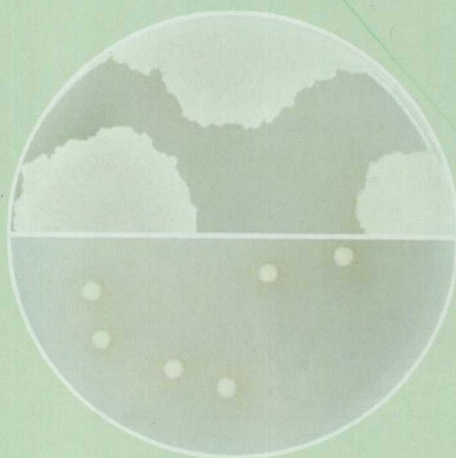
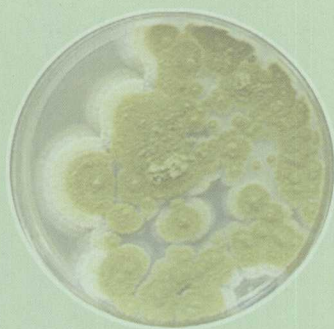


 北京科学技术出版社

微生物干粉培养基质控 图解手册

QUALITY CONTROL ILLUSTRATION MANUAL OF
MICROBIOLOGICAL DEHYDRATED MEDIA

李瑾 刘振 何艳玲 编著



图书在版编目(CIP)数据

微生物干粉培养基质控图解手册 / 李瑾, 刘振, 何艳玲编著. —北京:
北京科学技术出版社, 2007.1
ISBN 978-7-5304-2073-7

I. 微... II. ①李... ②刘... ③何... III. 微生物培养—培养基—图解
IV. Q93-335

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 154711 号

微生物干粉培养基质控图解手册

作 者: 李 瑾 刘 振 何艳玲
责任编辑: 张建国
责任校对: 黄立辉
封面设计: 郭 慧
内文制作: 樊润琴
出 版 人: 张敬德
出版发行: 北京科学技术出版社
社 址: 北京西直门南大街 16 号
邮政编码: 100035
电话传真: 0086-10-66161951(总编室)
0086-10-66113227 0086-10-66161952(发行部)
电子信箱: bjkjpress@163.com
网 址: www.bkjpress.com
经 销: 新华书店
印 刷: 北京博海升彩色印刷有限公司
开 本: 889mm × 1194mm 1/16
印 张: 17.25
千 字: 446 千
版 次: 2007 年 1 月第 1 版
印 次: 2007 年 1 月第 1 次印刷
ISBN 978-7-5304-2073-7/Q · 015

定 价: 150.00 元



京科版图书, 版权所有, 侵权必究。
京科版图书, 印装差错, 负责退换。



《微生物干粉培养基质控图解手册》

编 委 会

主 编：李 瑾 刘 振 何艳玲

编 委：（按姓氏笔画排列）

马 颖 于 奂 牛春莉

王陆迪 边凌淳 刘 沛

姚玉林 夏维维 唐慧林



前 言

自 1876 年德国细菌学家科赫首次采用体外培养的方法成功分离到致病微生物以来,微生物培养基在工业微生物育种、卫生检验检疫、环境监测等领域中的应用就日益发挥着巨大的作用。近年来,随着微生物检验工作的普及与推广,微生物培养基相关的研究和发展以及新型培养基的问世,培养基为此得到更为广泛的应用。本书旨在系统详细介绍日常检验常用微生物培养基的知识。

本书共分为三篇。第一篇包括两大部分,第一部分介绍了质控菌株、干粉培养基配制及使用可能出现的问题与分析;第二部分为干粉培养基各品种(约 160 余种)图片与文字的详细介绍,每个品种均包括用途、配方、原理、质量控制、配制方法、说明、注意事项以及培养基保存等方面。第二篇为配制干粉培养基常见原材料的质量控制方法。第三篇为微生物实验室常见染色及制片技术的介绍。

本书的最大特点之一是采用图文并茂的方式进行培养基相关知识的系统阐述,图片真实、清晰美观,在实际检验工作中具有很好的指导性。本书可为从事微生物检验或培养研究的工作人员参考之用。

最后,在此特别感谢中国检验检疫科学研究院北京陆桥技术有限责任公司的领导和同事们给予的大力支持和协作,尽管我们付出了巨大的努力,但限于能力,书中错误和遗漏在所难免,望读者予以指正以便日后再版加以更正。

李 瑾

2006 年 11 月于京

目 录

第一篇 干粉培养基	1
一、质控菌株	3
1. 质控菌株来源	3
2. 质控菌株的保藏	3
3. 质控菌株准备	4
二、培养基灭菌	6
1. 加热灭菌	6
2. 过滤除菌	7
3. 辐射	7
4. 化学试剂灭菌	8
三、干粉培养基配制	9
1. 使用干粉培养基需要注意的问题	9
2. 干粉培养基配制中的常见问题及原因	10
四、干粉培养基介绍	11
1. 60g/L 氯化钠蛋白胨水	11
2. 7.5%NaCl 肉汤	12
3. Baird-Parker 琼脂	13
4. BS 琼脂	16
5. Cary-Blair 氏运送培养基	18
6. CCDA 基础	19
7. DNA 酶琼脂	21
甲苯胺蓝 -DNA 酶琼脂	
8. EC 肉汤	24
mEC 肉汤	
9. Fraser/Half Fraser 肉汤基础	26
10. GN 增菌液	28
11. HE 琼脂	29
12. KF 链球菌琼脂	31
13. LB 肉汤	33
LB 营养琼脂	
14. 月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST)	35
十二烷基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST)	

15. Mueller-Hinton 琼脂 (MHA) ·····	36
16. 动力 - 吲哚 - 尿素酶培养基 (MIU) ·····	39
17. MKTTn 肉汤基础 ·····	41
18. MRS ·····	42
MRSA	
19. MR-VP 培养基 ·····	45
磷酸盐葡萄糖蛋白胨水培养基	
20. MUGal 肉汤基础 ·····	47
21. O/F 试验用培养基 ·····	49
22. PALCAM 培养基基础 ·····	51
23. Pfrizer 肠球菌选择性琼脂 (PSE 琼脂) ·····	53
24. 平板计数琼脂 (PCA) ·····	55
25. RVS 肉汤 ·····	56
氯化镁孔雀绿肉汤 (MM)	
26. SC 肉汤 ·····	58
27. SIM 培养基 ·····	60
28. SS 琼脂 ·····	62
29. T ₁ N ₁ 肉汤 ·····	64
T ₁ N ₁ 琼脂	
30. T ₁ N ₃ 肉汤 ·····	65
31. TCBS 琼脂 ·····	66
32. 胰蛋白胨大豆胨琼脂 (TSA) ·····	68
33. TTC 营养琼脂 ·····	70
34. V-P 半固体琼脂 ·····	71
35. WS 琼脂 ·····	73
36. XLD 琼脂 ·····	75
37. 阪崎肠杆菌显色培养基 ·····	77
38. 半固体动力培养基 ·····	79
39. 苯丙氨酸脱氨酶培养基 ·····	80
40. 丙二酸盐 (钠) 培养基 ·····	82
41. 布氏肉汤 ·····	84
布氏琼脂	
42. 产芽孢肉汤 ·····	86
43. 肠道菌计数琼脂 (VRBDA/VRBGA) ·····	87
44. 肠道菌增菌肉汤 ·····	89
45. 大肠杆菌 E. coli O157 显色培养基 ·····	91
46. 大肠杆菌显色培养基 ·····	92
47. 大肠菌群与大肠杆菌固体显色培养基 (ECCA) ·····	94
48. 大肠菌群、大肠杆菌检测液体显色培养基 (LECC) ·····	96
49. 胆硫乳琼脂 (DHL) ·····	98
50. 叠氮钠葡萄糖肉汤 ·····	100

51. 改良 Camp-BAP 琼脂	101
52. 改良 MC 培养基	103
53. 改良 Skirrow 氏琼脂基础	104
54. 改良番茄汁琼脂培养基基础 (改良 TJA 培养基)	106
55. 改良马丁氏液体培养基	108
改良马丁氏琼脂培养基	
56. 甘露醇发酵培养基	110
57. 甘露醇高盐琼脂	112
卵黄甘露醇高盐琼脂基础	
58. 甘露醇卵黄多粘菌素琼脂基础 (MYP Agar)	114
59. 高盐察氏琼脂	116
60. 哥伦比亚 (Columbia) 血琼脂基础	117
61. 缓冲蛋白胨水 (BPW)	119
改良缓冲蛋白胨水 (MBP)	
62. 弧菌显色培养基	122
63. 煌绿乳糖胆盐肉汤 (BGLB)	124
2% 胆盐亮绿乳糖培养液	
64. 霍乱双糖铁琼脂	125
65. 碱性蛋白胨水	128
66. 结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA)	129
67. 金黄色葡萄球菌显色培养基	131
68. 菌种保存培养基	132
69. 抗生素检定培养基 1 号 (高 pH)	134
抗生素检定培养基 1 号 (低 pH)	
抗生素检定培养基 2 号 (高 pH)	
抗生素检定培养基 2 号 (低 pH)	
抗生素检定培养基 3 号 抗生素检定培养基 4 号	
抗生素检定培养基 5 号 抗生素检定培养基 6 号	
抗生素检定培养基 7 号 抗生素检定培养基 8 号	
70. 克氏双糖铁 (KIA)	139
71. 赖氨酸铁琼脂	141
72. 氨基酸脱羧酶试验	143
——赖氨酸脱羧酶培养基	
73. 酪蛋白琼脂	145
74. 李氏菌选择性培养基 (MMA)	146
75. 李斯特氏菌显色培养基	148
76. 绿脓杆菌色素测定培养基	150
77. 氯化钠多粘菌素 B 肉汤基础 (SCPB)	152
78. 氯化钠结晶紫增菌液	153
79. 氯化钠三糖铁 (NaCl-TSI)	154
80. 氯化钠蔗糖琼脂	156

81. 卵磷脂吐温 80 营养琼脂	158
82. 马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA)	159
83. 麦康凯琼脂 (MacConkey Agar)	161
84. 麦芽浸膏肉汤	163
85. 玫瑰红钠琼脂 (RBA)	164
86. 锰盐营养琼脂	165
87. 孟加拉红培养基	167
88. 明胶液化培养基	168
89. 脑心浸液肉汤培养基 (BHI)	170
脑心浸液琼脂培养基	
90. 尿素酶琼脂基础	172
91. 牛津琼脂 (OXA)	174
92. 疱肉培养基基础	176
93. 品红亚硫酸钠琼脂 (Endo Agar)	178
94. 葡萄糖铵培养基	180
95. 葡萄糖半固体培养基	181
96. 庆大霉素琼脂	183
97. 去氧胆酸盐琼脂	185
98. 肉浸液肉汤培养基	187
葡萄糖肉浸液肉汤	
99. 乳酸杆菌琼脂培养基	189
乳酸杆菌肉汤培养基	
100. 乳糖胆盐发酵培养基	191
101. 乳糖复发酵培养基	193
102. 乳糖肉汤	194
103. 三糖铁琼脂 (TSI)	196
104. 沙门氏菌显色培养基	198
105. 沙氏琼脂	200
液体沙氏培养基	
106. 山梨醇麦康凯琼脂基础	202
107. 十六烷三甲基溴化铵琼脂	204
108. 四硫磺酸盐增菌液 (TTB)	206
109. 卫矛醇半固体琼脂	208
110. 西蒙氏枸橼酸盐琼脂	209
111. 硝酸盐氰化钾培养基基础 (不含氰化钾)	211
112. 血琼脂基础	213
113. 亚利桑那琼脂	215
114. 亚硫酸盐琼脂	217
115. 亚硒酸盐增菌液 [Selenite (F) Broth]	218
116. 液体硫乙醇酸盐培养基	220
117. 伊红美蓝琼脂 (EMB)	222

118. 胰蛋白胨大豆胨肉汤 (TSB)	224
119. 胰酪胨大豆多粘菌素 B 肉汤基础	225
120. 胰酪胨大豆酵母浸膏肉汤 (TSB-YE)	226
胰酪胨大豆酵母浸膏琼脂(TSA-YE)	
121. 乙酰胺琼脂	229
122. 吡啶 (靛基质) 培养基	231
胰蛋白胨水培养基	
123. 营养琼脂 (NA)	233
124. 营养肉汤	234
125. 玉米琼脂粉培养基	235
126. 真菌培养基	237
127. 中国蓝琼脂	238
第二篇 原材料	241
琼脂	243
蛋白胨	244
酪蛋白胨	246
牛肉浸粉	247
蛋白胨	248
大豆胨	248
酵母粉	249
胆盐	250
第三篇 染色	253
革兰氏 (Gram) 染色	255
芽孢染色	257
酵母菌与霉菌形态观察	258
干粉培养基中英对照索引表	260
参考文献	264

第一篇

干粉培养基

CHAPTER I DEHYDRATED CULTURE MEDIA

一、质控菌株

1. 质控菌株来源

中国普通微生物菌种保藏中心

China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC

中国科学院微生物研究所, 北京 (AS): 细菌、真菌

中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 (AS-IV): 病毒

中国医学微生物菌种保藏中心

National Center for Medical Culture Collections, NCMCC

中国医学科学院皮肤病研究所, 南京 (ID): 真菌

中国药品生物制品检定所, 北京 (NICPBP): 细菌

中国医学科学院病毒研究所, 北京 (IV): 病毒

工业微生物菌种保藏管理中心

China Center of Industrial Culture Collection, CICC

美国菌种保藏中心

American Type Culture Collection Center, ATCC

2. 质控菌株的保藏

(1) 保藏原则

用低温、干燥和隔绝空气等方法可以使微生物代谢能力降低。因此, 采用适宜的方法对菌种进行保藏, 可以确保菌种在一定时间内存活并且不被污染、不产生变异, 使菌种保持原有的活性以及生理生化等遗传特性。

(2) 普通菌种保藏方法

① 传代培养保藏法: 将菌种接种到适宜的培养基上, 培养后, 放置于4℃冰箱中保存, 并每隔一段时间进行传代。根据菌种生长的不同要求, 可分为斜面培养、穿刺培养和液体培养。

此方法是多数实验室常用的菌种保藏方法, 具有操作简单、使用方便的优点。但多次传代会使微生物发生变异, 而且污染杂菌的机会也相对较多。

② 液体石蜡保藏法: 此方法是传代培养的变相方法。在斜面培养物和穿刺培养物上面覆盖灭菌的液体石蜡, 一方面可以防止因培养基水分蒸发而引起菌种死亡, 另一方面可以阻止氧气进入, 从而适当延长保藏时间。但此方法对于某些可以同化烃类的微生物则不宜使用。

此方法实用而且效果好。而且制作简单, 不需要特殊设备, 不需要经常传代。但保存时必须直立放置, 所占位置较大, 不便于携带。

③真空冷冻干燥法：将菌种在极低温度（-70℃左右）下快速冷冻，然后利用减压使其中的水分升华，达到干燥的目的。微生物培养物经过该方法处理后处于一种低温、干燥、缺氧的条件下，因而他们代谢是相对静止的，可以保存较长时间。除不产孢子只产生菌丝体的丝状真菌不宜采用该方法外，其他如病毒、细菌、放线菌、酵母菌、丝状真菌等都可以采用该方法，且效果较好。一般真空冷冻干燥需加入保护剂，如牛乳、血清、糖类（葡萄糖、半乳糖、甘露醇、蔗糖、乳糖、蜜二糖、棉籽糖、糊精等）、甘油、山梨醇、氨基酸类（谷氨酸、精氨酸、苹果酸）、维生素C（抗坏血酸）、明胶、蛋白胨等一种或多种物质。

此方法是菌种保藏方法中最有效的方法之一，适用于菌种长期保存，一般可保存几年至十几年，但设备和操作要求都比较复杂。

④砂土管保藏法：将斜面上的新鲜培养物制成菌悬液或孢子悬液，然后将悬液无菌注入已灭菌好的砂土管中，使细胞或孢子吸附在砂子载体上。置于干燥器中干燥后加以保存。

此方法多用于能产生孢子的微生物如霉菌、放线菌的保存，可保存2年左右。

⑤液氮保存：将保存的菌种用保护剂制成菌悬液密封于安瓿瓶内，迅速冷冻后，贮藏于-150℃~-196℃的液氮超低温冰箱中。该方法优点是保藏时间长，有些菌种保存期达9年以上。

此方法除适宜于一般微生物的保藏外，对一些用冷冻干燥法都难以保存的微生物如支原体、衣原体、氢细菌、难以形成孢子的霉菌、噬菌体及动物细胞均可长期保藏，而且性状不变异。缺点是需要特殊设备。

3. 质控菌株准备

(1) 质控菌活化：将冰箱冻存的菌株接种到配制好的肉汤或平板/斜面琼脂培养基上，适宜条件下培养。

①常用的肉汤如下：

细菌：营养肉汤NB、胰蛋白胨大豆胨肉汤TSB、脑心浸液肉汤BHIB、胰蛋白胨大豆胨酵母浸膏肉汤TSB-YE

霉菌与酵母菌：真菌肉汤

乳酸菌：MRS

②常用的琼脂培养基如下：

细菌：营养琼脂NA、胰蛋白胨大豆胨琼脂TSA、脑心浸液琼脂BHIA、胰蛋白胨大豆胨酵母浸膏琼脂TSB-YE

霉菌与酵母菌：沙氏琼脂

乳酸菌：MRSA

(2) 菌悬液制备

①对于平板和斜面：挑取培养基上面的新鲜培养物加适量无菌生理盐水混合均匀，采用麦氏比浊（McFarland）或BaSO₄标准比浊管比浊制备菌悬液原液，使菌悬液满足 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ CFU/mL。

②对于肉汤：将肉汤中的新鲜培养物，用无菌生理盐水稀释，采用麦氏比浊（McFarland）或BaSO₄标准比浊管比较制备菌悬液原液，使菌悬液满足 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ CFU/mL。

【说明】

- (1) 对冻存的质控菌株，必须定期进行试验，以检查其生化特性，并观察其在平板或斜面上的菌落形态以确定其纯度；
- (2) 严格遵照实验室菌种保存规定，在可能的条件下，最好采用液氮保藏法保存菌种。
- (3) 麦氏 (McFarland) 浊度管制备

麦氏单位	1% 硫酸水溶液 mL	1% 氯化钡水溶液 mL	对应菌悬液浓度 CFU/mL	浊度国际单位
1	9.9	0.1	300×10^6	3
2	9.8	0.2	600×10^6	7
3	9.7	0.3	900×10^6	10
4	9.6	0.4	1200×10^6	12
5	9.5	0.5	1500×10^6	15
6	9.4	0.6	1800×10^6	—
7	9.3	0.7	2100×10^6	20
8	9.2	0.8	2400×10^6	—
9	9.1	0.9	2700×10^6	—
10	9.0	1.0	3000×10^6	30

注：①按照表中说明配制麦氏标准比浊管时，确保玻璃试管大小均一并耐腐蚀；

②按照表中的配制方法，需采用生理盐水制备菌悬液，然后与标准管比较。若估算肉汤中菌的浓度，则需要采用相应的无菌肉汤配制硫酸及氯化钡溶液。

【注意】

做好相应的防护措施，防止致病菌感染或污染环境。实验完毕后带菌器皿必须严格灭菌处理。



二、培养基灭菌

所谓灭菌是指采用物理、化学等方法将物体中所有的微生物包括细菌芽孢全部杀死或除去的措施，使其永久丧失生命活动的能力。

常用的灭菌方法有：加热灭菌、过滤除菌、辐射及化学试剂灭菌等。

1. 加热灭菌

加热灭菌的原理是使菌体细胞中的蛋白质在较高的温度下发生不可逆的变性，使得蛋白质的功能丧失，继而使菌体细胞的生命代谢活动受阻而死亡。加热灭菌的方式有两种：①干热灭菌；②湿热灭菌。

(1) 干热灭菌

干热灭菌的方法有：火焰灼烧法及干热空气灭菌法。

火焰灼烧法：指将物质放置火焰上灼烧，使微生物等有机物质化为灰烬的灭菌方法。这种方法一般应用于接种环、接种针、镊子等小的且耐高温的器械。

干热空气灭菌法：指将物质放置于干热灭菌箱等设备中，利用热空气达到杀灭或消除热原物质的方法。有些物质不便于湿热灭菌的可以采用干热灭菌的方法，如某些干粉物质（如 CaCO_3 等固体试药）、培养皿、吸管等。干热灭菌的条件要求是温度 $160\sim 180^\circ\text{C}$ ，时间 $2\sim 3\text{h}$ 。采用的生物指示剂是枯草芽孢杆菌黑色变种（*Bacillus subtilis* var. *niger*）。

(2) 湿热灭菌

湿热灭菌主要是通过煮沸或热蒸汽杀死微生物。在同一温度下，湿热灭菌比干热灭菌能力更强，其原因在于：①蒸汽的穿透力大；②湿热蒸汽可以释放潜热；③在湿热的条件下，菌体蛋白质更易凝固变性。

高压蒸汽灭菌：又称饱和蒸汽灭菌，是热力灭菌中最有效、应用最广泛的灭菌方法。单纯的加压不能灭菌，加压使水的沸点上升（见表1），提高了蒸汽的温度，从而达到灭菌的目的。当蒸汽压力上升到 0.1MPa 时，蒸汽温度可达 121°C 。在此高温下，连续 20min ，可将微生物，包括细菌芽孢全部杀死。该方法采用的生物指示剂为嗜热脂肪芽孢杆菌孢子（Spores of *Bacillus stearothermophilus*）。

高压灭菌时注意事项：

①使用前高压锅中加入适量去离子水或蒸馏水，以防止水垢形成，同时也可以缩短灭菌时间。

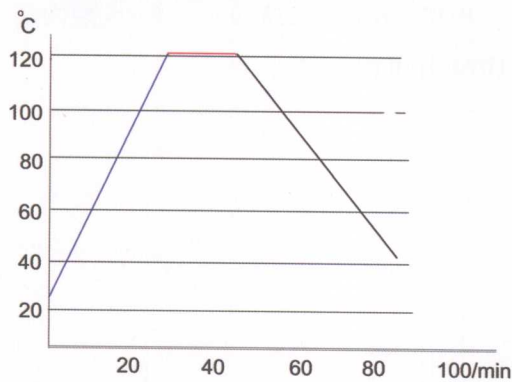
②待灭菌的物品应适当分装，不能排列过密，以保证灭菌的有效性和均一性。

③灭菌完毕，关闭热源。当压力降到 0.05MPa 以下，缓慢开启放气阀，以防止液体培养基因骤然减压而冲湿封口用的棉塞、牛皮纸等，当压力降到零时，应立即起盖，取出物品，避免因水蒸汽凝结滴到被灭菌的物品包装上造成染菌几率加大。

表1 蒸汽压力与蒸汽关系表

蒸汽压力(MPa)	蒸汽温度(°C)
0.00	100.0
0.025	107.0
0.050	112.0
0.075	115.5
0.100	121.0
0.150	128.0
0.200	134.5

高压蒸汽灭菌示意图(121°C / 15min)



2. 过滤除菌

过滤除菌指将带菌的液体或气体通过一个过滤装置,把真菌、细菌等微生物截留在过滤介质上,从而达到除菌的目的。有些物质如血清、酶、维生素、糖类、蛋白质、某些毒素等由于不耐热,用加热等方法处理极易变质,适宜采用此法除去微生物,它最大的优点是不破坏化学成分。

滤膜孔径大小是影响过滤除菌效果的主要因素。一般细菌过滤除菌采用 $0.2\mu\text{m}$ 孔径的滤膜;病毒和噬菌体过滤除菌采用 $0.01\sim 0.1\mu\text{m}$ 孔径的滤膜;球菌和杆菌采用 $0.1\sim 1\mu\text{m}$ 孔径的滤膜。

过滤除菌效果的好坏常采用LRV(log reduction value)值进行评价。

$$\text{LRV} = \lg N_0 - \lg N$$

N_0 为除菌前的微生物数量; N 为除菌后的微生物数量。

过滤除菌采用的生物指示剂为缺陷假单胞菌(*Pseudomonas diminuta*)。对于孔径为 $0.22\mu\text{m}$ 的滤膜而言,要求每平方厘米有效过滤面积的LRV应不小于7。

3. 辐射

辐射灭菌方法主要有非(致)电离辐射和(致)电离辐射两种。

紫外线照射法:紫外线照射是非(致)电离辐射,可引起微生物细胞DNA同一链上相邻的两个胸腺嘧啶形成二聚体,减弱双链间的氢键作用,引起双链结构扭曲变形,阻碍碱基间的正常配对,从而导致微生物的变异或死亡;如果照射引起微生物细胞DNA在互补的双链间形成TT二聚体,则会妨碍