

# 中华人民共和国国家标准

GB 4789.9—2025

## 食品安全国家标准 食品微生物学检验 空肠弯曲菌和结肠弯曲菌检验

2025-09-02 发布

2026-03-02 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会  
国家市场监督管理总局 发布

## 前 言

本标准代替 GB 4789.9—2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 空肠弯曲菌检验》。

本标准与 GB 4789.9—2014 相比,主要变化如下:

- 修改了标准的名称;
- 修改了标准的范围;
- 增加了实时荧光 PCR 鉴定方法和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定方法;
- 修改了设备和材料、培养基和试剂、检验程序、操作步骤;
- 修改了附录。

# 食品安全国家标准

## 食品微生物学检验

### 空肠弯曲菌和结肠弯曲菌检验

#### 1 范围

本标准规定了食品中空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)和结肠弯曲菌(*Campylobacter coli*)的检验方法。

本标准适用于食品中空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的检验。

#### 2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌、培养及分子检测设备外,其他设备和材料如下。

- 2.1 冰箱:2℃~8℃、-18℃~-20℃。
- 2.2 恒温培养箱:25℃±1℃、36℃±1℃、42℃±1℃。
- 2.3 拍击式均质器。
- 2.4 无菌带滤网均质袋。
- 2.5 电子天平:感量 0.1 g,感量 0.01 g,感量 0.001 g。
- 2.6 恒温水浴或金属浴装置:36℃~100℃。
- 2.7 振荡器。
- 2.8 无菌培养皿:直径 60 mm、90 mm。
- 2.9 无菌亲水性滤膜:直径 47 mm,孔径 0.45 μm。
- 2.10 微需氧培养装置:提供微需氧条件(5%氧气、10%二氧化碳和 85%氮气)。
- 2.11 显微镜:10×~1 000×。
- 2.12 低温高速离心机:8 000g~20 000g,4℃。
- 2.13 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。
- 2.14 实时荧光 PCR 仪。
- 2.15 实时荧光 PCR 反应管。
- 2.16 微量移液器及吸头:0.1 μL~2.5 μL、0.5 μL~10 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL。
- 2.17 无菌离心管:50 mL、100 mL 或更大容量。
- 2.18 螺口管:10 mL。
- 2.19 无菌接种环:1 μL、10 μL。
- 2.20 无菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)。
- 2.21 微生物生化鉴定系统。
- 2.22 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS)。

#### 3 培养基和试剂

- 3.1 0.1%蛋白胨水:见附录 A 中 A.1。

- 3.2 无菌生理盐水:见 A.2。
- 3.3 弯曲菌增菌液:见 A.3。
- 3.4 哥伦比亚血琼脂(Columbia blood agar):见 A.4。
- 3.5 卡玛丽血琼脂(Karmali blood agar):见 A.5。
- 3.6 氧化酶试剂:见 A.6。
- 3.7 3%过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)溶液:见 A.7。
- 3.8 吡啶乙酸酯纸片:见 A.8。
- 3.9 1 mol/L 硫代硫酸钠(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)溶液:见 A.9。
- 3.10 马尿酸钠水解试剂:见 A.10。
- 3.11 微生物生化鉴定试剂盒或微生物生化鉴定系统试剂。
- 3.12 实时荧光 PCR 检测试剂盒或检测试剂(2×实时荧光 PCR 缓冲溶液、dNTPs、Taq DNA 聚合酶和灭菌去离子水)。
- 3.13 空肠弯曲菌参比菌株[NPRC(S) 01.13897]或其他等效菌株。
- 3.14 结肠弯曲菌参比菌株[NPRC(S) 01.13898]或其他等效菌株。
- 3.15 乌普萨拉弯曲菌(*Campylobacter upsaliensis*)参比菌株[NPRC(S) 01.13899]或其他等效菌株。
- 3.16 海鸥弯曲菌(*Campylobacter lari*)参比菌株[NPRC(S) 01.13900]或其他等效菌株。

#### 4 检验程序

空肠弯曲菌和结肠弯曲菌检验程序见图 1。

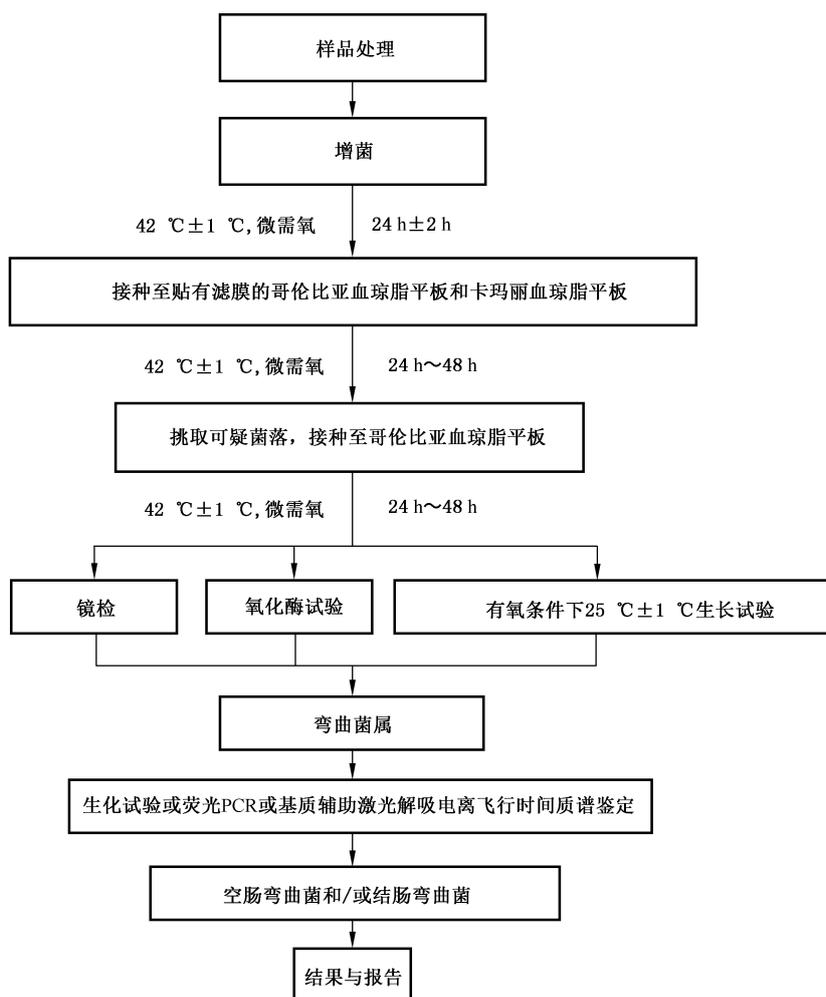


图 1 空肠弯曲菌和结肠弯曲菌检验程序

## 5 操作步骤

### 5.1 样品处理

#### 5.1.1 一般样品

取 25 g(mL) 样品[水果、蔬菜、水产品(贝类除外)取 50 g]加至装有 100 mL 无菌 0.1% 蛋白胨水的有滤网的均质袋中,用拍击式均质器均质 1 min~2 min(或者充分揉搓、振荡 5 min~10 min)后经滤网过滤至离心管中,滤过液以 12 000g 4 °C 离心 15 min 后弃去上清(可多次离心富集),用 1 mL 无菌生理盐水重悬沉淀,取 1 mL 的悬浮液加至盛有 9 mL 弯曲菌增菌液中增菌培养。

#### 5.1.2 整禽等样品

用 200 mL~400 mL 无菌 0.1% 蛋白胨水充分揉搓样品内外部,振荡 5 min~10 min 后用无菌纱布或通过有滤网的均质袋过滤至离心管中,滤过液以 12 000g 4 °C 离心 15 min 后弃去上清(可多次离心富集),用 1 mL 的无菌生理盐水重悬沉淀,取 1 mL 的悬浮液加至盛有 9 mL 弯曲菌增菌液中增菌培养。

### 5.1.3 贝类(已去壳)

取 100 g~200 g 样品放入无菌均质袋中,用拍击式均质器均质 1 min~2 min,取 25 g 内容物加至盛有 100 mL 无菌 0.1%蛋白胨水的有滤网均质袋中,用拍击式均质器均质 1 min~2 min(或者充分振荡 5 min~10 min)后经滤网过滤至离心管中,滤过液以 12 000g 4 ℃离心 15 min 后弃去上清(可多次离心富集),用 1 mL 无菌生理盐水重悬沉淀,取 1 mL 的悬浮液加至盛有 9 mL 弯曲菌增菌液中增菌培养。

### 5.1.4 液态蛋清或全蛋混合物

取 25 g(mL)样品于 75 mL 无菌 0.1%蛋白胨水中,充分混匀样品,将样品移至离心管中,20 000g 4 ℃离心 15 min 后弃去上清(可多次离心富集),用 1 mL 无菌生理盐水重悬沉淀,取 1 mL 的悬浮液加至盛有 9 mL 弯曲菌增菌液中增菌培养。

### 5.1.5 鲜乳和其他乳制品

若为液体乳制品,直接取 50 g;若为固体乳制品,切碎后取 50 g 加至盛有 100 mL 的无菌 0.1%蛋白胨水的有滤网均质袋中,用拍击式均质器均质 15 s~30 s 后经滤网过滤至离心管中。将液体乳制品或滤过液以 20 000g 4 ℃离心 30 min 后弃去上清(可多次离心富集),用 1 mL 无菌生理盐水重悬沉淀(避免带入脂质层),取 1 mL 的沉淀悬浮液加至 9 mL 的弯曲菌增菌液中增菌培养。

### 5.1.6 需表面涂拭检测的样品

用无菌生理盐水浸湿的无菌拭子擦拭检测样品的表面(面积至少 100 cm<sup>2</sup>),将拭子头剪落至盛有 9 mL 的弯曲菌增菌液中增菌培养。

### 5.1.7 水样

将 4 L 的水(对于氯处理的水,离心前每升水中加入 5 mL 浓度为 1 mol/L 的硫代硫酸钠溶液),12 000g 4 ℃离心 30 min 后弃去上清(可多次离心富集),用 1 mL 无菌生理盐水重悬沉淀,取 1 mL 沉淀悬浮液加至盛有 9 mL 的弯曲菌增菌液中增菌培养。

## 5.2 增菌

松开装有增菌液的螺口管管口,微需氧条件下,42 ℃±1 ℃培养 24 h±2 h。

## 5.3 分离

### 5.3.1 贴膜

哥伦比亚血琼脂平板和卡玛丽血琼脂平板平衡至室温后,用无菌镊子沿边缘部分夹取 0.45 μm 的无菌滤膜,分别贴在两种平板表面(在平板中央部位),使滤膜与培养基表面充分贴合。

### 5.3.2 加样

取 300 μL 的增菌液,分成 4 次~6 次(滴成 4 滴~6 滴,液滴尽量不要融合)滴加于滤膜表面(液滴位置要在滤膜边缘内),静置等待滤膜上的液滴充分透过滤膜(静置 45 min~60 min,微需氧或普通气体环境),无菌操作,揭掉滤膜。将平板翻转,微需氧条件下,42 ℃±1 ℃培养 24 h~48 h。

### 5.3.3 观察

培养 24 h~48 h 后,观察两种平板上的菌落形态。卡玛丽血琼脂平板上的可疑菌落通常为淡灰

色、不溶血、表面湿润有金属光泽；哥伦比亚血琼脂平板上的可疑菌落通常为灰白色、不溶血、表面湿润有光泽。两种血琼脂平板上的可疑菌落都可呈现分散凸起的菌落，边缘整齐、发亮。若 48 h 培养后细菌生长缓慢或菌落很小，可延长培养时间至 72 h，若培养 48 h 后无疑似菌落生长则判定结果为阴性。

## 5.4 鉴定

### 5.4.1 弯曲菌属的鉴定

#### 5.4.1.1 纯培养

挑取至少 5 个可疑菌落(少于 5 个全部挑取)，分别接种至哥伦比亚血琼脂平板上进行单菌落纯培养，微需氧条件， $42\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 24 h~48 h。按照 5.4.1.2~5.4.1.4 进行鉴定，结果符合表 1 的可疑菌落鉴定为弯曲菌属。

#### 5.4.1.2 形态观察

挑取可疑菌落进行革兰氏染色，镜检。

#### 5.4.1.3 氧化酶试验

挑取可疑菌落(不可使用含铁接种环)至氧化酶试剂润湿的滤纸上，如果在 10 s 内出现紫红色、紫罗兰或深蓝色判定结果为阳性。

#### 5.4.1.4 有氧条件下 $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生长试验

挑取可疑菌落，接种至哥伦比亚血琼脂平板上，有氧条件下  $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 48 h，观察细菌生长情况。

表 1 弯曲菌属鉴定

项目	弯曲菌属特性
形态观察	革兰氏阴性，菌体可呈 S 形、螺旋状或海鸥展翅状 <sup>a</sup>
氧化酶试验	阳性
有氧条件下 $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生长试验	不生长
<sup>a</sup> 有些菌株形态不典型。	

### 5.4.2 空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的鉴定

对于 5.4.1 中弯曲菌属的可疑菌落，可通过生化试验或者实时荧光 PCR 或者基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱的方法进行空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的鉴定。

#### 5.4.2.1 生化试验

##### 5.4.2.1.1 过氧化氢酶试验

挑取单菌落纯培养物，加至干净玻片上的 3% 过氧化氢溶液中，如果在 30 s 内出现气泡则判定结果为阳性。

##### 5.4.2.1.2 马尿酸钠水解试验

挑取单菌落纯培养物，加至盛有 0.4 mL 1% 马尿酸钠的试管中制成菌悬液。混合均匀后  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴或金属浴 2 h 或  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱温育 4 h(期间可取出混匀)。沿着试管壁缓缓加入 0.2 mL

茚三酮溶液(期间不可摇晃或者振荡试管),在 36 °C±1 °C 的水浴或金属浴中再温育 10 min 后判读结果。若出现深紫色则判定结果为阳性;若出现淡紫色或无颜色变化则判定结果为阴性。

5.4.2.1.3 吡啶乙酸酯水解试验

挑取单菌落纯培养物,加至吡啶乙酸酯纸片上,再滴加一滴无菌水。如果吡啶乙酸酯水解,则在 5 min~10 min 内出现深蓝色,判定结果为阳性;若无颜色变化则表示未发生水解,判定结果为阴性。

鉴定结果见表 2。

表 2 空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的鉴定

菌种	过氧化氢酶试验	马尿酸钠水解试验	吡啶乙酸酯水解试验
空肠弯曲菌( <i>C. jejuni</i> )	+	+	+
结肠弯曲菌( <i>C. coli</i> )	+	-	+
海鸥弯曲菌( <i>C. lari</i> )	+	-	-
乌普萨拉弯曲菌( <i>C. upsaliensis</i> )	-	-	+

注：“+”表示阳性;“-”表示阴性。

5.4.2.1.4 生化鉴定替代试验

对于 5.4.1 中弯曲菌属的可疑菌落,可使用微生物生化鉴定试剂盒或微生物生化鉴定系统等代替 5.4.2.1.1~5.4.2.1.3 进行鉴定。

5.4.2.2 实时荧光 PCR

5.4.2.2.1 试验环境与过程控制

PCR 试验环境条件和过程控制应按 GB/T 27403 规定的要求执行。

5.4.2.2.2 DNA 模板制备

挑取 5.4.1 中弯曲菌属可疑菌落的纯培养物加入盛有 500 μL 去离子水的离心管中,水浴或者金属浴 100 °C 保持 10 min,随后取出于室温冷却 2 min,8 000g~13 000g 离心 10 min,吸取上清液至新的无菌离心管内,作为 DNA 模板使用。提取后的 DNA 模板应置于 4 °C 供当天使用,否则应于 -20 °C 以下保存,并于 1 周内使用。

注:也可用细菌基因组提取试剂盒按说明书制备 DNA 模板。

5.4.2.2.3 引物及探针

引物及探针序列见表 3。

表 3 空肠弯曲菌和结肠弯曲菌实时荧光 PCR 鉴定检测引物及探针信息

菌种	目标基因	引物和探针名称	引物和探针序列(5'-3')
空肠弯曲菌 ( <i>C. jejuni</i> )	<i>cj0415</i> (566 bp-687 bp)	上游引物(CJF)	AACGATTTGAAAGTGCAGCAAA
		下游引物(CJR)	CGCACAGTATTGACAAGGAGCT
		探针(CJP)	FAM-CTTGACCATCAGGGTTTGTATAGCCACCTTTAG-BHQ1

表 3 空肠弯曲菌和结肠弯曲菌实时荧光 PCR 鉴定检测引物及探针信息 (续)

菌种	目标基因	引物和探针名称	引物和探针序列(5'-3')
结肠弯曲菌 ( <i>C. coli</i> )	<i>zupT</i> (50 bp-160 bp)	上游引物(CCF)	TGACCATCCTTGCCGGAC
		下游引物(CCR <sup>a</sup> )	TCACTCCRGCAGAAAAACCAAG
		探针(CCP)	VIC-CGCTATTGGTTCTGTGATA-MGB
<sup>a</sup> 序列中兼并碱基 R 为 A 或 G。			

## 5.4.2.2.4 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 4,如用等效商品化实时荧光 PCR 检测试剂盒或检测试剂则按照对应说明书进行操作。

表 4 空肠弯曲菌和结肠弯曲菌实时荧光 PCR 反应体系

试剂	工作液浓度	加入量/ $\mu$ L
2 $\times$ 实时荧光 PCR 缓冲溶液	—	12.5
dNTPs	0.2 mmol/L	0.5
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.25 U/ $\mu$ L	0.5
空肠弯曲菌上游引物(CJF)	0.2 $\mu$ mol/L	0.5
空肠弯曲菌下游引物(CJR)	0.2 $\mu$ mol/L	0.5
空肠弯曲菌探针(CJP)	0.4 $\mu$ mol/L	0.5
结肠弯曲菌上游引物(CCF)	0.2 $\mu$ mol/L	0.5
结肠弯曲菌下游引物(CCR)	0.2 $\mu$ mol/L	0.5
结肠弯曲菌探针(CCP)	0.4 $\mu$ mol/L	0.5
DNA 模板(10 ng~100 ng)	—	1.0
灭菌去离子水(Nuclease-free)	—	7.5
总体积	—	25.0

## 5.4.2.2.5 实时荧光 PCR 反应程序

预变性:94  $^{\circ}$ C、30 s;变性:94  $^{\circ}$ C、5 s,退火延伸:60  $^{\circ}$ C、30 s,40 个循环。分别以荧光基团 FAM(或者 VIC/HEX/CY5)标记空肠弯曲菌的探针 CJP、以荧光基团 VIC(或者 FAM/CY5/HEX)标记结肠弯曲菌的探针 CCP,在 60  $^{\circ}$ C 延伸阶段采集荧光信号。

## 5.4.2.2.6 实时荧光 PCR 对照设置

PCR 反应使用空肠弯曲菌参比菌株和结肠弯曲菌参比菌株的 DNA 模板作为阳性对照,使用海鸥弯曲菌参比菌株和乌普萨拉弯曲菌参比菌株的 DNA 模板作为阴性对照,以灭菌去离子水作为空白对照。

#### 5.4.2.2.7 实时荧光 PCR 结果判定

##### 5.4.2.2.7.1 结果有效性原则

同一次实验中需同时满足下列要求,则实时荧光 PCR 实验结果有效;否则实时荧光 PCR 实验结果无效,需重新进行实验:

- a) 空白对照:无荧光对数增长,相应的 Ct 值 $>40.0$ (或者无 Ct 值);
- b) 阴性对照:无荧光对数增长,相应的 Ct 值 $>40.0$ (或者无 Ct 值);
- c) 阳性对照:空肠弯曲菌的 *cj0415* 基因和结肠弯曲菌的 *zupT* 基因均有荧光对数增长,且荧光通道出现典型的扩增曲线,相应的 Ct 值 $<30.0$ 。

##### 5.4.2.2.7.2 实时荧光 PCR 结果判定

在符合实验结果有效性的原则下,若:

- a) 检测基因的 Ct 值 $<30.0$ ,则判定为该基因阳性;
- b) 检测基因的 Ct 值 $\geq 40.0$ ,则判定为该基因阴性;
- c) 检测基因的 Ct 值 $\geq 30.0$ 且 $<40.0$ ,应重新进行实时荧光 PCR 扩增实验。再次扩增后 Ct 值 $<40.0$ ,有典型的扩增曲线,且对照实验结果均正常,则可判定为该基因阳性。

#### 5.4.2.3 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定

对于 5.4.1 中弯曲菌属可疑菌落也可选用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱进行鉴定。

## 6 结果与报告

依据 5.4.2.1 或 5.4.2.2 或 5.4.2.3 实验结果,报告检样单位中检出或未检出空肠弯曲菌和/或结肠弯曲菌。

## 附 录 A

### 培养基和试剂

#### A.1 0.1%蛋白胨水

##### A.1.1 成分

蛋白胨	1.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH	7.1±0.2(25 ℃)

##### A.1.2 制法

将蛋白胨溶解于蒸馏水中,校正 pH 使培养基灭菌后冷却至 25 ℃时为 7.1±0.2,121 ℃灭菌 15 min 备用。

#### A.2 无菌生理盐水

##### A.2.1 成分

NaCl	8.5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

##### A.2.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶解于 1 000.0 mL 蒸馏水中,121 ℃灭菌 15 min 备用。

#### A.3 弯曲菌增菌液

##### A.3.1 基础培养基

##### A.3.1.1 成分

牛脑浸粉	12.5 g
牛心浸粉	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	4.0 g
磷酸二氢钠	2.5 g
氯化钠	5.0 g
丙酮酸钠	0.25 g
焦亚硫酸钠	0.25 g
硫酸亚铁(FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.25 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH	7.1±0.2(25 ℃)

##### A.3.1.2 制法

将 A.3.1.1 中的各种成分混匀,加热煮沸至完全溶解,校正 pH 使培养基灭菌后冷却至 25 ℃时为 7.1±0.2,121 ℃灭菌 15 min 备用。

### A.3.2 无菌脱纤维绵羊血

无菌操作条件下,将绵羊血倒入盛有灭菌玻璃珠的容器中,振摇约 10 min,静置后除去附有血纤维的玻璃珠即可。

### A.3.3 抗生素溶液

#### A.3.3.1 成分

万古霉素(vancomycin)	0.02 g
三甲氧苄胺嘧啶(trimethoprim)	0.015 g
两性霉素 B(amphotercin B)	0.015 g
利福平(rifampicin)	0.01 g
头孢哌酮(cefoperazone)	0.03 g
乙醇/灭菌水(50/50,体积比)	4.0 mL

#### A.3.3.2 制法

将 A.3.3.1 中各成分溶解于乙醇/灭菌水混合溶液中。

### A.3.4 完全培养基

#### A.3.4.1 成分

基础培养基	1 000.0 mL
无菌脱纤维绵羊血	50.0 mL
抗生素溶液	4.0 mL

#### A.3.4.2 制法

当基础培养基的温度约为 50 °C 时,无菌操作,加入 5.0 mL 的绵羊血和 4.0 mL 的抗生素溶液,混匀。按照 9.0 mL 每份分装入螺口管备用,2 °C~8 °C 避光保存不得超过 7 d。

## A.4 哥伦比亚血琼脂(Columbia blood agar)

### A.4.1 基础培养基

#### A.4.1.1 成分

胰酪胨或胰蛋白胨	10.0 g
牛心浸粉	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
酵母浸粉	5.0 g
玉米淀粉	1.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	13.0 g~15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH	7.3±0.2(25 °C)

#### A.4.1.2 制法

将 A.4.1.1 成分溶于蒸馏水中,校正 pH 使培养基灭菌后冷却至 25 °C 为  $7.3 \pm 0.2$ 。121 °C 灭菌 15 min,备用。

#### A.4.2 无菌脱纤维绵羊血

无菌操作条件下,将绵羊血倒入盛有灭菌玻璃珠的容器中,振摇约 10 min,静置后除去附有血纤维的玻璃珠即可。

#### A.4.3 完全培养基

##### A.4.3.1 成分

基础培养基	1 000.0 mL
无菌脱纤维绵羊血	50.0 mL

##### A.4.3.2 制法

当基础培养基的温度为 50 °C 左右时,无菌加入绵羊血,混匀。倾注 15 mL~20 mL 完全培养基于无菌 90 mm 平皿中或者 12 mL~13 mL 完全培养基于无菌 60 mm 平皿中,静置至培养基凝固。制备的平板未干燥时在室温放置不得超过 4 h,或在 2 °C~8 °C 冷藏不得超过 7 d。

#### A.5 卡玛丽血琼脂(Karmali blood agar)

##### A.5.1 基础培养基

##### A.5.1.1 成分

哥伦比亚琼脂基础	39.0 g
活性炭	4.0 g
氯化血红素	0.032 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH	$7.1 \pm 0.2(25\text{ °C})$

##### A.5.1.2 制法

将 A.5.1.1 成分溶于蒸馏水中,校正 pH 使培养基灭菌后冷却至 25 °C 为  $7.1 \pm 0.2$ 。121 °C 灭菌 15 min,备用。

##### A.5.2 无菌脱纤维绵羊血

无菌操作条件下,将绵羊血倒入盛有灭菌玻璃珠的容器中,振摇约 10 min,静置后除去附有血纤维的玻璃珠即可。

##### A.5.3 完全培养基

##### A.5.3.1 成分

基础培养基	1 000.0 mL
无菌脱纤维绵羊血	50.0 mL

### A.5.3.2 制法

当基础培养基的温度为 50 ℃左右时,无菌加入绵羊血,混匀。倾注 15mL~20 mL 完全培养基于无菌 90 mm 平皿中或 12mL~13 mL 完全培养基于无菌 60 mm 平皿中,静置至培养基凝固。制备的平板未干燥时在室温放置不得超过 4 h,或在 2 ℃~8 ℃冷藏不得超过 7 d。

## A.6 氧化酶试剂

### A.6.1 成分

四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
蒸馏水	100.0 mL

### A.6.2 制法

使用前将 A.6.1 中各成分溶于蒸馏水中。

## A.7 3%过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)溶液

### A.7.1 成分

30%过氧化氢(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )溶液	100.0 mL
蒸馏水	900.0 mL

### A.7.2 制法

吸取 100.0 mL 30%过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)溶液,溶于 900.0 mL 蒸馏水中,混匀,分装备用。

## A.8 吲哚乙酸酯纸片

### A.8.1 成分

吲哚乙酸酯	0.1 g
丙酮	1.0 mL

### A.8.2 制法

将吲哚乙酸酯溶于丙酮中,吸取 25 μL~50 μL 溶液于空白滤纸片上(直径为 0.6 cm~1.2 cm)。室温干燥,放入带有硅胶塞的棕色试管或瓶于 2 ℃~8 ℃保存。

## A.9 1 mol/L 硫代硫酸钠(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)溶液

### A.9.1 成分

硫代硫酸钠(无水)	160.0 g
碳酸钠(无水)	2.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

### A.9.2 制法

称取 160.0 g 无水硫代硫酸钠,加入 2.0 g 无水碳酸钠,溶于 1 000.0 mL 水中,缓缓煮沸 10 min,冷却。

## A.10 马尿酸钠水解试剂

## A.10.1 马尿酸钠溶液

## A.10.1.1 成分

马尿酸钠	10.0 g
磷酸盐缓冲液(PBS)组分:	
氯化钠	8.5 g
磷酸氢二钠	8.98 g
磷酸二氢钠	2.71 g
蒸馏水	1 000.0 mL

## A.10.1.2 制法

将马尿酸钠溶于磷酸盐缓冲溶液中,过滤除菌。无菌分装,每管 0.4 mL,于-20 °C 储存。

## A.10.2 3.5%(水合)茛三酮溶液(质量/体积)

## A.10.2.1 成分

(水合)茛三酮	1.75 g
丙酮	25.0 mL
丁醇	25.0 mL

## A.10.2.2 制法

将(水合)茛三酮溶解于丙酮/丁醇混合液中,2 °C~8 °C 避光保存不得超过 7 d。

---