



中华人民共和国国家标准

GB/T 8381.2—2005

饲料中志贺氏菌的检测方法

Determination of *Shigella* in feed

2005-09-05 发布

2006-02-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准参照采用 GB/T 4789.5《食品卫生微生物学检验 志贺氏菌检验》的有关内容。

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：国家饲料质量监督检验中心（北京）。

本标准主要起草人：饶正华、李丽蓓、杨曙明、苏晓鸥。

饲料中志贺氏菌的检测方法

1 范围

本标准规定了饲料中志贺氏菌的检测方法。

本标准适用于饲料中志贺氏菌的检测。

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 14699.1 饲料 采样

3 设备和材料

- 3.1 天平:感量1 g,最大称量1 000 g。
- 3.2 均质器或乳钵。
- 3.3 恒温培养箱。
- 3.4 显微镜。
- 3.5 灭菌广口瓶;500 mL。
- 3.6 灭菌三角烧瓶;500 mL,250 mL。
- 3.7 灭菌平皿;皿底直径90 mm。
- 3.8 载玻片。
- 3.9 酒精灯。
- 3.10 灭菌金属匙或玻璃棒。
- 3.11 接种棒,镍铬丝。
- 3.12 试管架。
- 3.13 硝酸纤维素滤膜;150 mm×50 mm,φ0.45 μm。临用时切成两张,每张70 mm×50 mm,用铅笔划格,每格6 mm×6 mm。每行10格,分6行。灭菌备用。

4 培养基和试剂

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水(或去离子水,或相当纯度的水)。

- 4.1 GN 增菌液;见附录 B 的 B.1 章。
- 4.2 HE 琼脂;见附录 B 的 B.2 章。
- 4.3 SS 琼脂;见附录 B 的 B.3 章。
- 4.4 麦康凯琼脂;见附录 B 的 B.4 章。
- 4.5 伊红美蓝琼脂(EMB);见附录 B 的 B.5 章。
- 4.6 三糖铁琼脂(TSI);见附录 B 的 B.6 章。
- 4.7 葡萄糖半固体管;见附录 B 的 B.7 章。
- 4.8 半固体管;见附录 B 的 B.8 章。
- 4.9 葡萄糖铵琼脂;见附录 B 的 B.9 章。
- 4.10 尿素琼脂(pH7.2);见附录 B 的 B.10 章。

- 4.11 西蒙氏柠檬酸盐琼脂;见附录 B 的 B.11 章。
- 4.12 氰化钾(KCN)培养基;见附录 B 的 B.12 章。
- 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,见附录 B 的 B.13 章。
- 4.14 糖发酵管;棉子糖、甘露醇、甘油、七叶苷及水杨苷,见附录 B 的 B.14 章。
- 4.15 5%乳糖发酵管;见附录 B 的 B.15 章。
- 4.16 蛋白胨水、靛基质试剂;见附录 B 的 B.16 章。
- 4.17 志贺氏菌属诊断血清。

5 试样的制备

进行微生物检验的饲料的采样和试样制备按 GB/T 14699.1 规定执行。实验室样品真实、具有代表性、在运输和贮存过程中没有发生损失或改变。

5.1 采样应在无菌操作下进行。

5.2 采样工具,如探子、铲子、匙、采样器、试管、广口瓶、剪刀等,必须是灭菌的。

5.3 根据样品种类如袋、瓶和罐装者,就取完整的未开封的。如果样品很大,则需用无菌采样器取样;样品是固体粉末,应边取边混和;是流体的,通过振摇混匀;样品送到微生物检验室越快越好,一般应不超过 3 h。如果路途遥远,可将试样于 0℃~5℃ 保存(如冰壶)。

6 操作步骤(见附录 A)

6.1 增菌

称取饲料试料 25 g,加入装有 225 mL GN 培养菌液(B.1)的 500 mL 广口瓶(3.5)内,于 36℃ 培养 6 h~8 h。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终止培养。

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(B.2)平板或 SS 琼脂(B.3)平板 1 个;另取 1 环划线接种于麦康凯琼脂(B.4)平板或伊红美蓝琼脂(B.5)平板 1 个,于 36℃ 培养 18 h~24 h,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(B.6)和葡萄糖半固体(B.7)各 1 管。一般应多挑几个菌落,以防遗漏,经 36℃ 培养 18 h~24 h,分别观察结果。

6.2.3 出现下述现象的培养物可以视为阴性:

- 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 4 种志贺氏菌多价血清(4.17)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…… | - | + | + |
| 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(B.9),西蒙氏柠檬酸盐(B.11),赖氨酸和鸟氨酸脱羧酶(B.13),pH7.2尿素(B.10),KCN生长(B.12),以及水杨苷和七叶苷的分解(B.14)。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清发生凝集,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(B.15),甘露醇、棉子糖和甘油的发酵(B.14)和靛基质试验(B.16)。志贺氏菌属4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。

附录 A
(规范性附录)
检验程序图

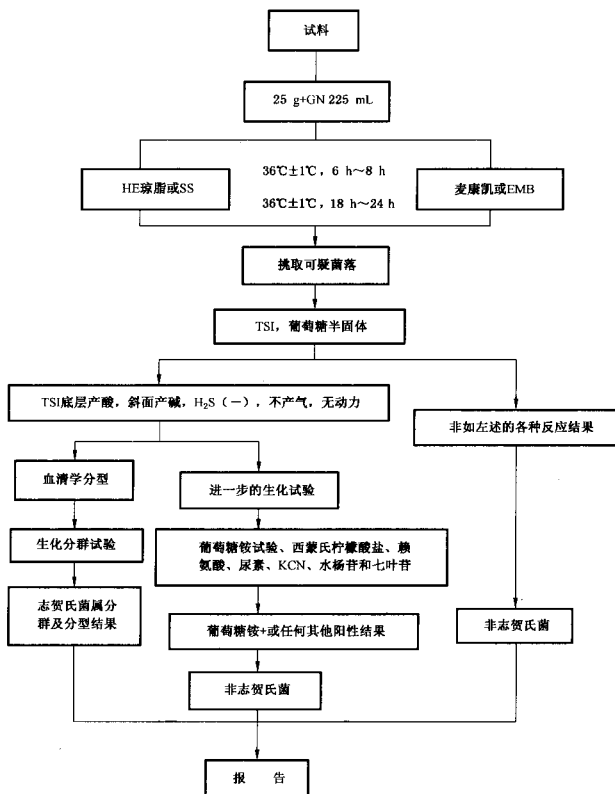


图 A.1 检验程序图

附 录 B
(规范性附录)
培养基和试剂制备

B.1 GN 增菌液**B.1.1 成分**

| | |
|-------|----------|
| 胰蛋白胨 | 20 g |
| 葡萄糖 | 1 g |
| 甘露醇 | 2 g |
| 柠檬酸钠 | 5 g |
| 去氧胆酸钠 | 0.5 g |
| 磷酸氢二钾 | 4 g |
| 磷酸二氢钾 | 1.5 g |
| 氯化钠 | 5 g |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |
| pH7.0 | |

B.1.2 制法

按上述成分配好,加热使溶解,校正 pH。分装每瓶 225 mL,115℃ 高压灭菌 15 min。

B.2 HE 琼脂(Hektoen Enteric Agar)**B.2.1 成分**

| | |
|---|----------|
| 豚豚 | 12 g |
| 牛肉膏 | 3 g |
| 乳糖 | 12 g |
| 蔗糖 | 12 g |
| 水杨素 | 2 g |
| 胆盐 | 20 g |
| 氯化钠 | 5 g |
| 琼脂 | 18~20 g |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |
| 0.4% 溴麝香草酚蓝溶液 | 16 mL |
| Andrade 指示剂:将酸性复红 0.5 g 溶于 100 mL 蒸馏水中,加入 氢氧化钠溶液[$c(\text{NaOH})=1 \text{ mol/L}$]16 mL,数小时后如复红褪色 不全,再加氢氧化钠溶液 1 mL~2 mL | 20 mL |
| 甲液:硫代硫酸钠 34 g,柠檬酸铁铵 4 g 溶于 100 mL 蒸馏水中 | 20 mL |
| 乙液:去氧胆酸钠 10 g 溶于 100 mL 蒸馏水中 | 20 mL |
| pH7.0 | |

B.2.2 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,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:此培养基不可高压灭菌。

B.3 SS琼脂**B.3.1 基础培养基**

| | |
|------|----------|
| 牛肉膏 | 5 g |
| 豚 豚 | 5 g |
| 三号胆盐 | 3.5 g |
| 琼 脂 | 17 g |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |

将牛肉膏、豚豚和胆盐溶解于400 mL蒸馏水中,将琼脂加入于600 mL蒸馏水中,煮沸使其溶解,再将两液混合,121℃高压灭菌15 min,保存备用。

B.3.2 完全培养基

| | |
|-----------|----------|
| 基础培养基 | 1 000 mL |
| 乳糖 | 10 g |
| 柠檬酸钠 | 8.5 g |
| 硫代硫酸钠 | 8.5 g |
| 10%柠檬酸铁溶液 | 10 mL |
| 1%中性红溶液 | 2.5 mL |
| 0.1%煌绿溶液 | 0.33 mL |

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48 h内使用。

注2:煌绿溶液配好后应在10日内使用。

注3:可以购用SS琼脂的干燥培养基。

B.4 麦康凯琼脂**B.4.1 成分**

| | |
|-------------|----------|
| 蛋白胨 | 17 g |
| 豚 豚 | 3 g |
| 猪胆盐(或牛、羊胆盐) | 5 g |
| 氯化钠 | 5 g |
| 琼 脂 | 17 g |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |
| 乳糖 | 10 g |
| 0.01%结晶紫水溶液 | 10 mL |
| 0.5%中性红水溶液 | 5 mL |

B.4.2 制法

B.4.2.1 将蛋白胨、豚豚、胆盐和氯化钠溶解于400 mL蒸馏水中,校正pH7.2。将琼脂加入600 mL蒸馏水中,加热溶解。将两液合并,分装于烧瓶内,121℃高压灭菌15 min备用。

B.4.2.2 临时时加热溶化琼脂,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。

B.5 伊红美蓝琼脂(EMB)**B.5.1 成分**

| | |
|-----------|----------|
| 蛋白胨 | 10 g |
| 乳糖 | 10 g |
| 磷酸氢二钾 | 2 g |
| 琼脂 | 17 g |
| 2%伊红 Y 溶液 | 20 mL |
| 0.65%美蓝溶液 | 10 mL |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |
| pH7.1 | |

B.5.2 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℃时,加入伊红 Y 和美蓝溶液,摇匀,倾注平板。

B.6 三糖铁琼脂(TSI)**B.6.1 成分**

| | |
|---|----------|
| 蛋白胨 | 20 g |
| 牛肉膏 | 5 g |
| 乳糖 | 10 g |
| 蔗糖 | 10 g |
| 葡萄糖 | 1 g |
| 氯化钠 | 5 g |
| 硫酸亚铁铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ | 0.2 g |
| 硫代硫酸钠 | 0.2 g |
| 琼脂 | 12 g |
| 酚红 | 0.025 g |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |
| pH7.4 | |

B.6.2 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 12.5 mL,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 15 min。放置高层斜面备用。

B.7 葡萄糖半固体管**B.7.1 成分**

| | |
|--------------|--------|
| 蛋白胨 | 1 g |
| 牛肉膏 | 0.3 g |
| 氯化钠 | 0.5 g |
| 1.6%溴甲酚紫酒精溶液 | 0.1 mL |
| 葡萄糖 | 1 g |
| 琼脂 | 0.3 g |
| 蒸馏水 | 100 mL |
| pH7.4 | |

B.7.2 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,121℃灭菌 15 min。

B.8 半固体管**B.8.1 成分**

| | |
|-------|------------|
| 蛋白胨 | 1 g |
| 牛肉膏 | 0.3 g |
| 氯化钠 | 0.5 g |
| 琼脂 | 0.35~0.4 g |
| 蒸馏水 | 100 mL |
| pH7.4 | |

B.8.2 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 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。

B.9 葡萄糖铵培养基**B.9.1 成分**

| | |
|-----------------------------|----------|
| 氯化钠 | 5 g |
| 硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 0.2 g |
| 磷酸二氢铵 | 1 g |
| 磷酸氢二钾 | 1 g |
| 葡萄糖 | 2 g |
| 琼脂 | 20 g |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |
| 0.2%溴麝香草酚蓝溶液 | 40 mL |
| pH6.8 | |

B.9.2 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 15 min,放成斜面。

B.9.3 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 $36^\circ C \pm 1^\circ C$ 培养 24 h。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。

B.10 尿素琼脂(pH7.2)**B.10.1 成分**

| | |
|-----|-----|
| 蛋白胨 | 1 g |
| 氯化钠 | 5 g |
| 葡萄糖 | 1 g |

| | |
|-----------|----------|
| 磷酸二氢钾 | 2 g |
| 0.4%酚红溶液 | 3 mL |
| 琼脂 | 20 g |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |
| 20%尿素溶液 | 100 mL |
| pH7.2±0.1 | |

B. 10.2 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 15 min。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。

B. 10.3 试验方法

挑取琼脂培养物接种,在 36℃±1℃ 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。

B. 11 西蒙氏柠檬酸盐培养基**B. 11.1 成分**

| | |
|---|----------|
| 氯化钠 | 5 g |
| 硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O) | 0.2 g |
| 磷酸二氢铵 | 1 g |
| 磷酸氢二钾 | 1 g |
| 柠檬酸钠 | 5 g |
| 琼脂 | 20 g |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |
| 0.2%溴麝香草酚蓝溶液 | 40 mL |
| pH6.8 | |

B. 11.2 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 15 min。放成斜面。

B. 11.3 试验方法

挑取少量琼脂培养物接种,于 36℃±1℃ 培养 4 d,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。

B. 12 氰化钾(KCN)培养基**B. 12.1 成分**

| | |
|-----------|----------|
| 蛋白胨 | 10 g |
| 氯化钠 | 5 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%氰化钾溶液 | 20 mL |
| pH7.6 | |

B. 12.2 制法

将除氰化钾以外的成分配好后分装烧瓶,121℃ 高压灭菌 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 12 mm × 100 mm 灭菌试管, 每管约 4 mL, 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。

B. 12.3 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 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)。

警告: 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。

B. 13 氨基酸脱羧酶试验培养基

B. 13.1 成分

| | |
|----------------|------------|
| 蛋白胨 | 5 g |
| 酵母浸膏 | 3 g |
| 葡萄糖 | 1 g |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |
| 1.6% 溴甲酚紫-乙醇溶液 | 1 mL |
| L-氨基酸或 DL-氨基酸 | 5 g 或 10 g |
| pH6.8 | |

B. 13.2 制法

除氨基酸以外的成分加热溶解后, 分装每瓶 100 mL, 分别加入各种氨基酸: 赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸。L-氨基酸按每瓶 100 mL 中加入 0.5 g 或 DL-氨基酸加入 1 g。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 0.5 mL, 上面滴加一层液体石蜡, 115℃ 高压灭菌 10 min。

B. 13.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取培养物接种, 于 36℃ ± 1℃ 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。

B. 14 糖发酵管

B. 14.1 成分

| | |
|---|----------|
| 牛肉膏 | 5 g |
| 蛋白胨 | 10 g |
| 氯化钠 | 3 g |
| 磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O) | 2 g |
| 0.2% 溴麝香草酚蓝溶液 | 12 mL |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |
| pH7.4 | |

B. 14.2 制法

B. 14.2.1 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 15 min。

B. 14.2.2 其他各种糖发酵管可按上述成分配好后, 分装每瓶 100 mL, 121℃ 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。

B. 14.3 试验方法

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

B. 15 5%乳糖发酵管

B. 15.1 成分

| | |
|------------|--------|
| 蛋白胨 | 0.2 g |
| 氯化钠 | 0.5 g |
| 乳糖 | 5 g |
| 2%溴麝香草酚蓝溶液 | 1.2 mL |
| 蒸馏水 | 100 mL |
| pH7.4 | |

B. 15.2 制法

除乳糖以外的各成分溶解于 50 mL 蒸馏水内，校正 pH。将乳糖溶解于另外 50 mL 蒸馏水内，分别于 121°C 高压灭菌 15 min，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 1 d 内发酵。

B. 16 蛋白胨水(靛基质试验用)

B. 16.1 成分

| | |
|------------|----------|
| 蛋白胨(或胰蛋白胨) | 20 g |
| 氯化钠 | 5 g |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |
| pH7.4 | |

B. 16.2 制法

将上述成分配制，分装小试管， 121°C 高压灭菌 15 min。

B. 16.3 靛基质试剂

B. 16.3.1 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。

B. 16.3.2 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。

B. 16.4 试验方法

挑取少量培养物接种，在 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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。