

ICS 13.060.70, 13.060.25

G 77

备案号:37849—2013

# HG

## 中华人民共和国化工行业标准

HG/T 4323—2012

---

### 循环冷却水中军团菌的检测与计数

Detection and enumeration of legionella in circulating cooling water

2012-11-07 发布

2013-03-01 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。

本标准使用重新起草法参考 ISO 11731 : 1998《水质 军团菌的检测和计数》(英文)和 ISO 11731-2 : 2004《水质 军团菌的检测和计数-2 低菌数的直接膜过滤法》(英文)编制,与 ISO 11731 : 1998、ISO 11731-2 : 2004 的一致性程度为非等效。

本标准的附录 A 和附录 B 为规范性附录。

本标准由中国石油和化学工业联合会提出。

本标准由全国化学标准化技术委员会水处理剂分技术委员会(SAC/TC 63/SC 5)归口。

本标准起草单位:石家庄开发区德赛化工有限公司、上海轻工业研究所有限公司、石家庄市疾病预防控制中心、中海油天津化工研究设计院、中国石油化工股份有限公司北京北化院燕山分院。

本标准主要起草人:李勇广、李静、李云、张全、郇和生、李丽婕、芦云红、郭玉梅、叶素妹。

# 循环冷却水中军团菌的检测与计数

## 1 范围

本标准规定了循环冷却水中军团菌的检测与计数方法。

本标准适用于循环冷却水中军团菌的检测与计数,也适用于原水、生活用水及其他工业用水的军团菌的检测与计数。循环冷却水系统中沉积物和生物黏泥等相关样本中军团菌的检测也可参照本标准。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法(mod ISO 3696:1987)

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

GB/T 27405 实验室质量控制规范 食品微生物检测术语和定义

## 3 术语与定义

GB/T 27405 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

### 军团菌 *legionella*

是一类菌种的总称,为革兰阴性杆形菌,两端钝圆,有鞭毛,无芽孢和荚膜,大小为 $(0.3\sim 0.9)\mu\text{m}\times(2\sim 20)\mu\text{m}$ ,有41个种属、61个血清型。其中嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*, Lp)有15个血清型,是引起军团菌病的主要菌型。

## 4 安全

本标准规定的检测应符合 GB/T 27403 并应在二级隔离的生物实验室(BSL-2)完成,检出军团菌的样品及培养基应经过无害化处理。

## 5 方法提要

循环冷却水中军团菌数目一般达不到直接涂布检测的数目( $10^5$  cfu/L),应通过膜过滤或离心方式浓缩水样中的微生物。为了减少杂菌对军团菌生长的抑制作用,对浓缩的微生物进行酸处理或热处理。将浓缩后的试样或滤膜转移到对军团菌具有选择性的GVPC培养基上培养,生长的菌落为疑似军团菌。军团菌的典型特性是在活性炭-酵母提取液培养基(BCYE)生长而在L-半胱氨酸缺失的BCYE培养基(BCYE-Cys)不生长。利用这一特性将疑似军团菌在BCYE和BCYE-Cys两种培养基上进行培养,根据生长情况来确定是否为军团菌。另外,本标准中附录A给出了嗜肺军团菌的鉴定方法,在常规监测中可不进行嗜肺军团菌的鉴定,但是在军团菌疾病暴发时或有疑似病例时应进行嗜肺军团菌的鉴定。

## 6 试剂和材料

6.1 本标准所用试剂和水,在没有注明其他要求时,均指分析纯试剂和符合 GB/T 6682 三级水的规定。

6.2 活性炭-酵母提取液培养基(BCYE培养基):按附录B中B.1制备。

- 6.3 L-半胱氨酸缺失的 BCYE 培养基(BCYE-Cys 培养基):见附录 B 中 B.2。
- 6.4 选择性培养基(GVPC 培养基):按附录 B 中 B.3 制备。
- 6.5 酸缓冲液:按附录 B 中 B.4 制备。
- 6.6 Page'盐:按附录 B 中 B.5 制备。
- 6.7 氧化酶试剂:按附录 B 中 B.6 制备。
- 6.8 硝酸盐培养基:按附录 B 中 B.7 制备。
- 6.9 尿素琼脂:按附录 B 中 B.8 制备。
- 6.10 营养明胶:按附录 B 中 B.9 制备。
- 6.11 马尿酸水解试剂:按附录 B 中 B.10 制备。
- 6.12 军团菌胶乳凝集试剂盒。

## 7 仪器、设备

- 7.1 真空过滤系统。
- 7.2 微孔滤膜:直径为 47 mm~50 mm,孔径为 0.22  $\mu\text{m}$ ~0.45  $\mu\text{m}$ 。
- 7.3 黑色硝化纤维膜:直径为 47 mm~50 mm,孔径为 0.22  $\mu\text{m}$ ~0.45  $\mu\text{m}$ 。
- 7.4 接种环: $D$  3 mm。
- 7.5 超声波振荡器。
- 7.6 涂布器。
- 7.7 无菌平皿:直径为 90 mm~100 mm。
- 7.8  $\text{CO}_2$  培养箱:( $36\pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$ 。
- 7.9 紫外线灯:波长为 360 nm $\pm$ 20 nm。
- 7.10 无菌镊子。
- 7.11 低倍双目显微镜。
- 7.12 微量可调移液器:100  $\mu\text{L}$ ,300  $\mu\text{L}$ 。
- 7.13 离心机:转速为 0~800 0 r/min,带有 300 mL~500 mL 具螺旋盖的离心瓶。

## 8 水样采集

8.1 用无菌玻璃、聚乙烯或类似容器收集水样 100 mL~1000 mL,应详细记录样品的来源、体积和取样时间。为了减少循环冷却水中杀菌剂对检测的影响,应在系统投加杀菌剂之前取水样。如果水样含有氧化型杀菌剂,在采样前于无菌操作条件下,加入灭过菌的硫代硫酸钠,加入的量为每升水样约 0.1 g。

注:循环冷却水系统中黏泥、沉淀物或沉积物可用较小的无菌容器收集,存放时宜配螺旋盖。

8.2 水样采集后应立即送回实验室进行检测分析,运输时应避免光照。当天不能进行检测时,应在 2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$  的冷藏条件下存储或运输,最好在 2 d 内检测,最长不应超过 14 d。

## 9 检测

### 9.1 水样预处理

如果水样中军团菌的数量超过  $10^5$  cfu/L,可以直接涂布培养。当水样中军团菌的数量低于  $10^5$  cfu/L 时,应根据水样具体情况选用以下三种浓缩技术之一进行处理:浓缩水样中的军团菌可通过真空过滤、洗脱处理(9.1.1);如果样品是浑浊的、乳浊的或有颜色的,应采用离心处理(9.1.2);对于细菌含量较低的水样可以通过黑色硝化纤维膜过滤处理(9.1.3)。

水样处理所使用器具使用前均应进行灭菌处理。

#### 9.1.1 水样的真空过滤、洗脱处理

在真空过滤系统上安装微孔滤膜,取 200 mL~1 000 mL 水样过滤。过滤后取下滤膜,置于带盖的无菌容器中,用无菌剪刀剪碎,加 15 mL 无菌稀释液或无菌水,不断振荡至少 2 min 充分洗脱(也可将容器放入超声波振荡器中 2 min~10 min)。此即为制备好的试液。以下按 9.2~9.7 操作。

### 9.1.2 水样的离心处理

将(200±5) mL 摇匀后的浑浊水样注入容量为 300 mL~500 mL 的无菌离心瓶中,置于离心机中,于 6 000 r/min 下离心(10±1) min,或于 3 000 r/min 下离心(30±1) min。移去上层清液。将沉淀用无菌稀释液或无菌水稀释至 2 mL~20 mL,记录稀释体积。此即为制备好的试液。以下按 9.2~9.7 操作。

### 9.1.3 水样的黑色硝化纤维膜过滤

在真空过滤系统上安装黑色硝化纤维膜,取 5 mL~100 mL 水样过滤。为抑制杂菌的生长,样品过滤后用酸缓冲溶液处理黑色硝化纤维膜,加入 30 mL 酸缓冲液,静置 5 min 后过滤去除酸缓冲液,再用 20 mL Page'盐洗涤滤膜。以下按 9.3~9.7 操作。

## 9.2 制样

9.2.1 将经预处理制备好的试样(9.1.1 或 9.1.2)分成三份。其中一份不做处理,另两份分别采用热处理和酸处理方式处理。

9.2.2 热处理:移取 0.5 mL~1.5 mL 试液(9.1.1 或 9.1.2)于一无菌容器中,将其置于(50±1) °C 的水浴中放置(30±2) min。

9.2.3 酸处理:移取 1.0 mL~10 mL 试液(9.1.1 或 9.1.2)于一无菌容器中,加入与试液相同体积的酸缓冲液,调 pH 值至 2.2,轻轻摇匀,放置(5±0.5) min。

注:当试液浑浊时,将 1.0 mL~10 mL 的试样加入一个配有螺旋盖离心瓶中,离心分离。用无菌吸管将上层清液抽出至原体积的一半,再用涡流或剧烈混合的方法使沉积物重新悬浮。加入酸缓冲液补充至原始体积,并轻轻地摇匀,放置(5±0.5) min。

## 9.3 接种

### 9.3.1 采用真空过滤、洗脱处理或离心处理样品的接种

9.3.1.1 用 0.1 mL 未经处理试样(9.1.1 或 9.1.2),接种于一 GVPC 琼脂培养基平皿上。用一个无菌涂布器将接种液均匀涂布于平皿的整个表面。记录接种试样的量(mL)。

9.3.1.2 用 0.1 mL 刚出水浴的热处理试样(9.2.2),同上接种于第二个 GVPC 琼脂培养基平皿上。

9.3.1.3 用 0.1 mL 刚做完酸处理的酸处理试样(9.2.3),同上接种于第三个 GVPC 琼脂培养基平皿上。

### 9.3.2 采用黑色硝化纤维膜过滤样品的接种

用无菌镊子小心地将经 9.1.3 处理的黑色硝化纤维膜取下,将其平铺在 GVPC 培养基上(正面向上),应确保培养基和膜片之间没有气泡。

## 9.4 培养

将已接种的平板倒置放入含 2.5 % CO<sub>2</sub> 的培养箱中,(36±1) °C 培养 2~10 d。为确保培养箱内保持一定湿度,宜在培养箱底部或顶部放一盘水。若无需计数,则可减少培养天数至检出军团菌止,但不可少于 2 d。

## 9.5 检查平板

在 10 d 的培养期间,用显微镜在第三天和第四天观察两次,记录可疑军团菌菌落的数量。军团菌的生长很可能被其他菌掩盖或抑制,如果怀疑军团菌被抑制应重新处理水样进行培养;在平板上生长小于 300 个菌落为宜,如有强的生长背景时,应重新稀释样品或减少过滤的样品体积。典型的军团菌菌落通常是白-灰-蓝-紫,也可能出现棕色、粉色、灰绿色、深红色。军团菌表面光滑、边缘整齐,呈典型的毛玻璃状。在紫外光下有荧光,荧光的颜色有助于区分样品中军团菌的不同种类。为了避免军团菌的死亡,不能将平板长时间暴露在紫外线灯下。

9.6 疑似军团菌的确定

在 GVPC 培养基上次日生长的菌落均不是军团菌。从 GVPC 培养基上选择 2 d 后生长的至少 5 个疑似军团菌菌落(5 个以下全选)接种到 BCYE 和 BCYE-Cys 两块培养基上进行培养。如果有不同类型的疑似军团菌菌落,则每种类型至少要选择两个疑似菌落进行确证试验。在含 2.5 % CO<sub>2</sub> 的培养箱中 (36±1) °C 培养至少 2 d。凡在 BCYE 上生长而在 BCYE-Cys 上不生长的被确认为是军团菌菌落,记录每个平板的结果。

如需要鉴定是否为嗜肺军团菌,取 BCYE 培养基上菌落按附录 A 进行实验。

9.7 军团菌计数

记录在 GVPC 培养基上生长的疑似军团菌数  $P$ ,从疑似菌落中挑取 5 个进行确证,若有 3 个证实是军团菌,则  $3/5$  乘以 GVPC 培养基上疑似菌落数  $P$ 。

采用真空过滤、洗脱处理或离心处理的取三块 GVPC 培养皿中军团菌最大的菌落数乘以稀释倍数  $B$  为检测水样体积中的军团菌数  $M(\text{cfu})$ ;采用黑色硝化纤维膜过滤处理的直接计军团菌数  $M(\text{cfu})$ ;

水样中军团菌的数量以  $X$  表示,单位以  $\text{cfu}/500 \text{ mL}$  表示,按式(1)计算:

$$X = \frac{M}{V} \times 500 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$M$ ——检测水样中军团菌的数量,单位为菌落数( $\text{cfu}$ )(对于真空过滤、洗脱处理或离心处理的水样, $M = P \times$ 培养基上军团菌所占疑似军团菌的比例 $\times$ 稀释倍数 $B$ ;对于黑色硝化纤维膜过滤处理的水样, $M = P \times$ 培养基上军团菌所占疑似军团菌的比例);

$V$ ——检测水样的体积的数值,单位为毫升( $\text{mL}$ )。

10 结果与报告

10.1 经检测水样中不存在军团菌时,在检测报告中注明“未检出军团菌”。

10.2 经检测并确认存在军团菌,在检测报告中注明“检出军团菌”,并给出军团菌的数量  $X(\text{cfu}/500 \text{ mL})$ 。

10.3 鉴定为嗜肺军团菌的,在检测报告中注明“检出嗜肺军团菌”,进行血清分型鉴定的给出分型结果及相应的军团菌数量  $X(\text{cfu}/500 \text{ mL})$ 。

**附 录 A**  
**(规范性附录)**  
**嗜肺军团菌的鉴定**

**A. 1 总则**

嗜肺军团菌作为军团菌中重要检测对象,在特定情况下应进一步用生化培养和血清法鉴定军团菌是否是嗜肺军团菌。凡染色镜检为革兰阴性无芽孢杆菌。且生化培养:氧化酶(—/弱+),硝酸盐还原—,尿素酶—,明胶液化,水解马尿酸+,即可确定为嗜肺军团菌。

**A. 2 生化培养法判定嗜肺军团菌**

**A. 2.1 细菌形态观察:**对菌落进行革兰染色镜检。

**A. 2.2 氧化酶试验:**使用铂/铈接种环或玻璃棒,挑取可疑菌落到氧化酶试剂湿润的滤纸上,如果在10 s内出现紫红色、紫罗兰或深蓝色为阳性。

**A. 2.3 硝酸盐还原试验:**接种后在 $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养1 d~4 d,加入甲液和乙液各一滴,观察结果。硝酸盐还原为亚硝酸盐时会立刻或数分钟内显红色为阳性,否则为阴性。

注:本试验阴性的原因有三个:细菌不能还原硝酸盐;亚硝酸盐继续分解,生成氨和氮;培养基不适于细菌的生长。如欲检查培养基中硝酸盐是否未被分解,可再加入锌粉少许,可使硝酸盐还原为亚硝酸盐而呈现红色。

**A. 2.4 尿素酶试验:**挑取培养基培养物接种,在 $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 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。

**A. 2.5 明胶液化:**用纯培养物穿刺接种,放在 $22^\circ\text{C}\sim 25^\circ\text{C}$ 培养,每天观察结果,记录液化时间。或放在 $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养,每天取出,放冰箱内30 min后再观察结果,发生液化的为阳性。

**A. 2.6 马尿酸水解试验:**挑取菌落,加到盛有0.4 mL 1%马尿酸钠的试管中制成菌悬液。混合均匀后在 $36^\circ\text{C}$ 水浴中温育24 h。沿着试管壁缓缓加入0.2 mL茚三酮溶液,在 $36^\circ\text{C}$ 水浴中温育10 min后判读结果。若出现深紫色则为阳性;若出现淡紫色或没有颜色则为阴性。试验时为了避免假阴性需用标准菌株做阳性对照。

**A. 3 血清型鉴定**

除进行生化鉴定外,亦可做血清型鉴定。目前军团菌的血清有Lp1单价、Lp2~14多价和Lp species三种,当乳胶颗粒与含军团菌或者从相关的军团菌加热灭活的抗原的悬液混合后,发生免疫化学反应,使乳胶颗粒迅速凝集。在鉴定时需做阳性对照实验。

观察凝集结果,按表A.1进行判断:

表 A. 1

| 与1群测试试剂反应 | 与2~14群测试试剂反应 | 与种测试试剂反应 | 结果判断           |
|-----------|--------------|----------|----------------|
| +         | —            | —        | 嗜肺军团菌血清1群      |
| —         | +            | —        | 嗜肺军团菌血清2~14群   |
| —         | —            | +        | 存在军团菌(或非嗜肺军团菌) |
| —         | —            | —        | 不存在军团菌         |

**附 录 B**  
(规范性附录)  
培养基与试剂

**B.1 活性炭-酵母提取液培养基(BCYE 培养基)****B.1.1 成分**

|  |          |
|--|----------|
| 酵母提取液(Yeast extract)   | 10.0 g   |
| 琼脂   | 12.0 g   |
| 活性炭  | 2.0 g    |
| $\alpha$ -酮戊二酸,磷酸二氢钾   | 1.0 g    |
| ACES 缓冲液(N-2-乙酰胺基-2-乙胺磺酸)  | 10.0 g   |
| 氢氧化钾(KOH)  | 2.8 g    |
| L-半胱氨酸盐酸盐  | 0.4 g    |
| 焦磷酸铁[Fe <sub>4</sub> (P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>3</sub> ] | 0.25 g   |
| 水  | 1 000 mL |

**B.1.2 制法****B.1.2.1 半胱氨酸和焦磷酸铁的溶解**

分别用 10 mL 水溶解 0.4 g L-半胱氨酸盐酸盐和 0.25 g 焦磷酸铁,再用孔径为 0.2  $\mu$ m 的滤膜过滤除菌,储存于无菌容器中, -20  $^{\circ}$ C 保存不超过 3 个月。

**B.1.2.2 ACES 缓冲液**

将 ACES 颗粒加入到 500 mL 水中,45  $^{\circ}$ C~50  $^{\circ}$ C 水浴溶解。另取 480 mL 水溶解氢氧化钾,轻摇溶解,将两种溶液混匀。

**B.1.2.3 最终调节**

在溶解好的 980 mL ACES 缓冲液中,加入活性炭、酵母提取液和  $\alpha$ -酮戊二酸。用 0.1 mol/L KOH 溶液或 0.1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液调节 pH 值至 6.8 $\pm$ 0.2。加入琼脂,混合均匀后(121 $\pm$ 1)  $^{\circ}$ C 高压蒸汽灭菌 15 min。灭菌后用冷水浴冷却至 50  $^{\circ}$ C 左右,加入溶解好的 L-半胱氨酸盐酸盐溶液和焦磷酸铁溶液,混匀。

每皿倾注 20 mL 培养基于直径为 90 mm~100 mm 的平皿中制备平板,直径为 60 mm 的平皿用于过滤膜的培养。在室温为 25  $^{\circ}$ C 时,培养基最终 pH 值为 6.8 $\pm$ 0.2。

让平皿上的多余水分干燥,在 2  $^{\circ}$ C~8  $^{\circ}$ C 下于密封容器中避光储存一个月。

**B.2 L-半胱氨酸缺失的 BCYE 培养基(BCYE-Cys 培养基)**

除不加 L-半胱氨酸盐酸盐外,制备方法同 BCYE 培养基(B.1)。也可购买商品化的成品培养基和添加剂。

**B.3 选择性培养基(GVPC 培养基)**

注:此培养基是在 BCYE 培养基的基础上再加入三种抗生素及甘氨酸。

**B.3.1 选择性添加剂**

**警告:**放线菌酮具有肝毒性,在对粉末状化学制品进行操作时应戴手套和防尘口罩。

|         |             |
|---------|-------------|
| 甘氨酸     | 3 g/L       |
| 多黏菌素 B  | 80 000 IU/L |
| 万古霉素盐酸盐 | 0.001 g/L   |



放线菌酮 0.08 g/L

纳他霉素可代替放线菌酮

### B.3.2 抗生素添加剂的制备

**B.3.2.1** 取适量的多黏菌素 B(一般为 200 mg)溶解于 100 mL 水中,使其浓度为 14 545 IU/mL。混匀后进行膜过滤除菌。用无菌管进行分装,每管 5.5 mL,  $-25\text{ }^{\circ}\text{C} \sim -15\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。使用时,放至室温后再用。

**B.3.2.2** 取 20 mg 万古霉素盐酸盐溶解于 20 mL 水中,混匀后,进行膜过滤除菌。用无菌管进行分装,每管 1 mL,  $-25\text{ }^{\circ}\text{C} \sim -15\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。使用时,放至室温后再用。

**B.3.2.3** 取 2 g 放线菌酮溶解于 100 mL 水中,混匀后,进行膜过滤除菌。用无菌管进行分装,每管 4 mL,  $-25\text{ }^{\circ}\text{C} \sim -15\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。使用时,放至室温后再用。

**B.3.2.4** 以上抗生素添加剂冷冻保存最长时间为 6 个月。

### B.3.3 GVPC 培养基的制备

按照 B.1.2 BCYE 培养基的制备方法进行配制,在加入  $\alpha$ -酮戊二酸后,再加入 3 g 甘氨酸后调节 pH 值为  $6.8 \pm 0.2$ 。

在加入溶解后的 L-半胱氨酸盐酸盐和焦磷酸铁后,再加入三种抗生素添加剂(B.3.2),混匀。

## B.4 酸缓冲液

### B.4.1 成分

|     |           |
|-----|-----------|
| 盐酸  | 0.2 mol/L |
| 氯化钾 | 0.2 mol/L |

### B.4.2 制备

#### B.4.2.1 溶液 A:0.2 mol/L 盐酸

在 1 L 水中添加 17.4 mL( $\rho=1.18\text{ g/mL}$ , 35.4 %)或是 20 mL( $\rho=1.16\text{ g/mL}$ , 31.5 %)盐酸,混合。在  $(121 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$  高压蒸汽灭菌 15 min。

#### B.4.2.2 溶液 B:0.2 mol/L 氯化钾

在 1 L 水中溶解 14.9 g 氯化钾,混合,在  $(121 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$  高压蒸汽灭菌 15 min。

#### B.4.2.3 制备酸缓冲液

混合 3.9 mL 溶液 A 和 25 mL 溶液 B 制备酸缓冲液,用 1 mol/L 氢氧化钾调 pH 值到  $2.2 \pm 0.2$ ,置于具塞的玻璃瓶中,避光室温下放置不超过一个月。

## B.5 Page' 盐

### B.5.1 成分

|       |          |
|-------|----------|
| 氯化钠   | 0.120 g  |
| 七水硫酸镁 | 0.004 g  |
| 二水氯化钙 | 0.004 g  |
| 磷酸氢二钠 | 0.142 g  |
| 磷酸二氢钾 | 0.136 g  |
| 水     | 1 000 mL |

### B.5.2 制备

将上述化学试剂添加到水中,溶解、混合,在  $(121 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$  高压蒸汽灭菌 15 min。为了便于称量,可先制备 10 L 盐溶液,然后分装成小体积灭菌。

## B.6 氧化酶试剂

### B.6.1 成分

## HG/T 4323—2012

|            |        |
|------------|--------|
| 四甲基对苯二胺盐酸盐 | 1.0 g  |
| 水          | 100 mL |

### B.6.2 制法

使用前迅速将上述成分溶于水中。

## B.7 硝酸盐培养基

### B.7.1 成分

|      |          |
|------|----------|
| 硝酸钾  | 0.2 g    |
| 蛋白   | 5 g      |
| 水    | 1 000 mL |
| pH 值 | 7.4      |

### B.7.2 制法

溶解,校正 pH 值,分装试管,每管约 5 mL,(121±1)℃ 高压蒸汽灭菌 15 min。

### B.7.3 硝酸盐还原试剂

**B.7.3.1 甲液:**将对氨基苯磺酸 0.8 g 溶解于 100 mL 2.5 mol/L 乙酸溶液中。

**B.7.3.2 乙液:**将甲萘胺 0.5 g 溶解于 100 mL 2.5 mol/L 乙酸溶液中。

## B.8 尿素琼脂

### B.8.1 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     |
| 水          | 1 000 mL |
| 20 % 尿素溶液  | 100 mL   |
| pH 值       | 2.0±0.1  |

### B.8.2 制法

将除尿素和琼脂以外的成分配好,并校正 pH 值,加入琼脂,加热溶化并分装烧瓶。(121±1)℃ 高压蒸汽灭菌 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 值应为 7.2±0.1。分装于灭菌试管内,放成斜面备用。

## B.9 营养明胶

### B.9.1 成分

|      |          |
|------|----------|
| 蛋白胨  | 5 g      |
| 牛肉膏  | 3 g      |
| 明胶   | 120 g    |
| 水    | 1 000 mL |
| pH 值 | 6.8~7.0  |

### B.9.2 制法

加热溶解、校正 pH 值至 7.4~7.6,分装小管,(121±1)℃ 高压蒸汽灭菌 10 min,取出后迅速冷却,使其凝固。复查最终 pH 值应为 6.8~7.0。

**B.10 马尿酸水解试剂****B.10.1 1%马尿酸钠溶液****B.10.1.1 成分**

|      |        |
|------|--------|
| 马尿酸钠 | 1.0 g  |
| 水    | 100 mL |

**B.10.2 制法**

将马尿酸钠溶于水中,  $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$  高压蒸汽灭菌 15 min, 避光保存。

**B.10.3 3.5%(水合)茚三酮溶液(质量/体积)****B.10.3.1 成分**

|                    |        |
|--------------------|--------|
| (水合)茚三酮(ninhydrin) | 1.75 g |
| 丙酮                 | 25 mL  |
| 丁醇                 | 25 mL  |

**B.10.3.2 制法**

将(水合)茚三酮溶解于丙酮/丁醇混合液中。该溶液避光冷藏, 最多不超过 7 d。

---