

第十二期食品药品检验技术研习班

研习内容：培养基和试剂的质量要求

王丽霞
2024.11

培养基的实验室技术验收

- CNAS-CL01-A001:2022 《检测和校准实验室能力认可准则在微生物领域的应用说明》（6.6.2c）对检测结果有影响的关键培养基和试剂应进行技术验收。
- 对培养基进行技术验收是确保实验准确性和可靠性的必要步骤。通过严格按照规定的质量标准和验收程序进行操作，可以有效地评估和保证培养基的质量，从而为实验结果提供坚实的支撑。

内容

01

培养基和试剂的质量保证

02

测试菌株的保藏及使用

03

培养基和试剂的质量要求

04

培养基和试剂的性能测试方法

01

培养基和试剂的质量保证

培养基和试剂的质量保证

对每批培养基或试剂,应记录接收日期,并检查:

- 1.培养基或试剂的各种成分(核对)、添加成分名称(查找是否有配套试剂)及产品编号。
- 2.批号。
- 3.pH(适用于培养基)。
- 4.贮存信息和有效期。
- 5.标准要求及质控报告(打印)。
- 6.必要的安全和(或)危害数据。
- 7.产品合格证明材料。
- 8.包装的完整性。
- 9.其他必要的文件材料。

(一) 贮存的一般要求

应严格按照供应商提供的贮存条件、有效期和使用方法进行培养基和试剂的保存和使用。

(二) 商品化脱水合成培养基 及其添加成分的验收和贮存

验收应包括以下内容:

1. 容器密闭性检查。
2. 内容物的感官检查 (观察粉末或颗粒的流动性、均匀性、结块情况和色泽变化等,判断脱水培养基的质量变化。若发现培养基受潮或物理性状发生明显改变,则不应再使用)
3. 开封后的脱水合成培养基,其质量取决于贮存条件。

(三) 配制培养基用水

1. 试验用水的电导率在25℃时不应超过 $25\mu\text{S}/\text{cm}$ (相当于电阻率 $\geq 0.04\text{ M}\Omega/\text{cm}$),除非另有规定要求。
2. 试验用水的微生物污染不应超过 $10^3\text{CFU}/\text{mL}$ 。应按 GB 4789.2 定期检验微生物污染水平。
3. 《中国药典》二部714页 纯化水 微生物限度 要求 1ml供试品中需氧菌总数不得过100cfu。

(四) 称重和溶解

准确称量所需量的脱水合成培养基(佩戴口罩操作,以防吸入培养基粉末等有害物质),先加入适量的水,充分混合(注意避免培养基结块),然后加水至所需的量后适当加热,并重复或连续搅拌使其快速分散,含琼脂的培养基在加热溶解前应浸泡3min~5min。

(五) pH 的测定和调节

除特殊说明外,灭菌后pH 应在标准pH $\pm$ 0.2范围内。
一般使用浓度约为1mol/L的氢氧化钠溶液或盐酸溶液调节培养基的pH。

(六) 分装

将配好的培养基分装至适当容器中,培养基体积不应超过容器容积的2/3。

(七) 灭菌/除菌

●一般要求

培养基应采用**湿热灭菌法**或**过滤除菌法**,某些培养基如不适用湿热灭菌或过滤除菌的方式,则可使用**煮沸杀菌**方式处理。

1. 湿热灭菌

加热后采用适当的方式冷却,以防加热过度。这对于大容量和敏感培养基十分重要,例如含有煌绿的培养基。

2. 过滤除菌

过滤除菌可使用孔径为 $0.22\mu\text{m}$ 的无菌设备和滤膜过滤去除微生物。

(八) 培养基的使用

1. 琼脂培养基的熔化

将培养基放入沸水浴中或采用有相同效果的方法(如高压锅中的层流蒸汽)使之熔化。经过高压的培养基应尽量减少重新加热时间。熔化后的培养基放入 $47\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温装置中冷却保温(可根据实际培养基凝固温度适当提高恒温装置温度),直至使用,培养基达到 $47\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的时间与培养基的品种、体积和数量有关。熔化后的培养基应尽快使用,放置时间不应超过4h。琼脂培养基只能复溶一次。

2.培养基的脱氧

将培养基在使用前放到沸水浴或蒸汽浴中加热15min;加热时松开容器的盖子,加热后盖紧,并迅速冷却至使用温度(如液体硫乙醇酸盐培养基)。

3.添加成分的加入

待培养基冷却至 $47^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$ 时,加入平衡至室温的热不稳定添加成分,避免造成琼脂凝结或形成片状物。将加入添加成分的培养基缓慢充分混匀,尽快分装至待用的容器中。

4. 平板的制备和贮存

倾注熔化的培养基至平皿中(直径90mm 的平皿,通常要加入15mL ~20mL 琼脂培养基),使之在平皿中的厚度至少为3mm。将平皿盖好皿盖后放在水平平面,使琼脂冷却凝固。如果平板需贮存,或者培养时间超过48h或培养温度高于40℃,则需要倾注更多的培养基。

凝固后的培养基应立即使用或存放于暗处和(或)2℃~8℃冰箱的密封袋/平皿桶中,以防止培养基成分的改变。在平板底部或侧边做好标记,标记的内容包括名称、制备日期和(或)有效期。也可使用适宜的培养基编码系统进行标记。

5.培养基的弃置

- 所有污染和未使用的培养基弃置应采用安全的方式,并且要符合相关法律法规的规定。

02

测试菌株的保藏及使用

(一) 一般要求

为成功保藏及使用菌株,不同菌株应采用不同的保藏方法,可选择使用冻干保藏、超低温(不高于-70℃)冷冻保藏、液氮保藏或其他有效的保藏方法。

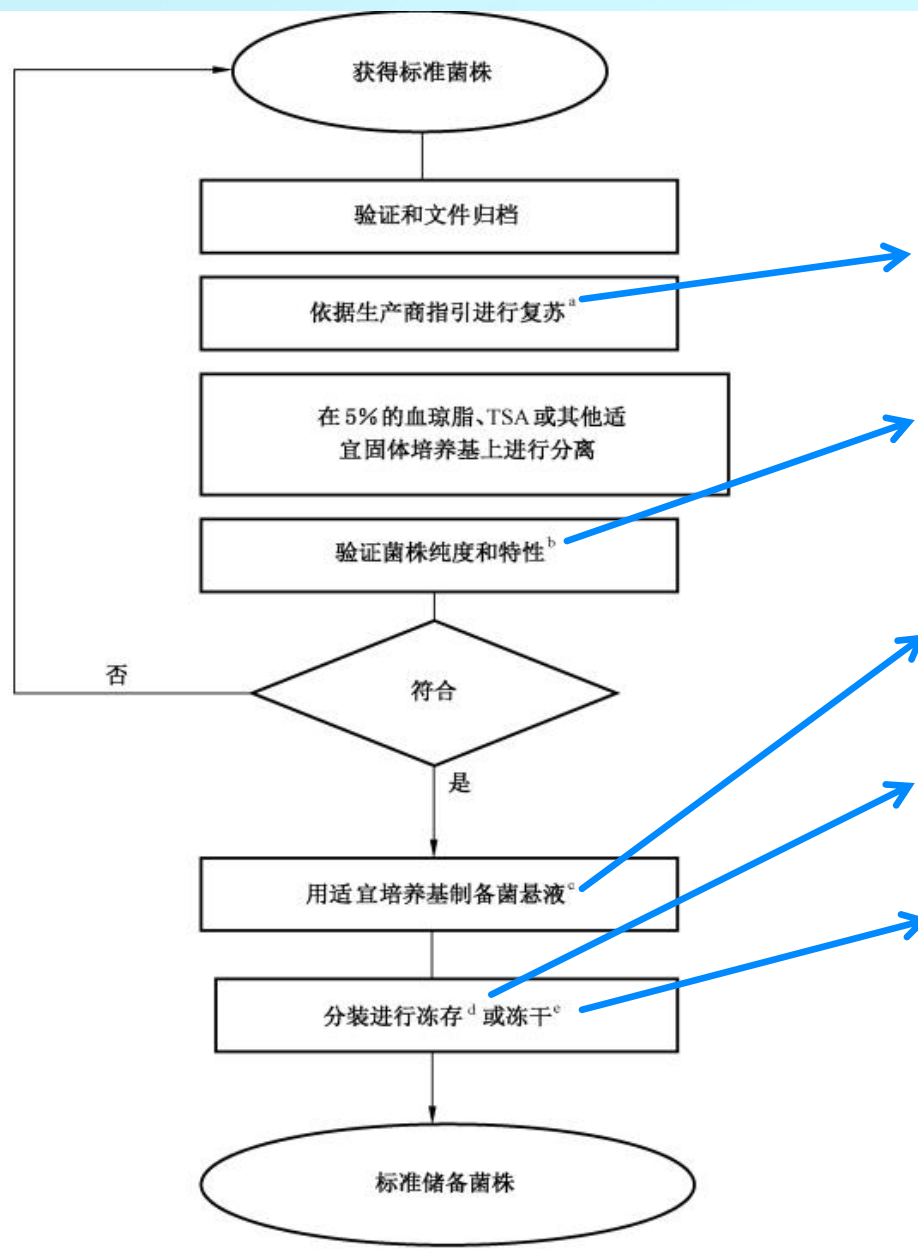
(二) 商业来源的测试菌株

对于从标准菌种保藏中心或其他有效认证的商业机构获得的原包装测试菌株,复苏和使用应按照制造商提供的使用说明进行。

(三) 实验室制备的标准储备菌株

- 1.用于性能测试的标准储备菌株,在保存和使用时应注意避免交叉污染,减少菌株突变或发生典型的特性变化;标准储备菌株应制备多份,并采用超低温(不高于 -70°C)或冻干的形式保存。在较高温度下贮存时间应缩短。
- 2.标准储备菌株用作培养基的测试菌株时应在记录中充分描述其生长特性。
- 3.标准储备菌株不能用于制备标准菌株。

(四) 制作标准储备菌株的流程图



a. 通常悬浮于营养肉汤中,培养适宜时间进行复苏。

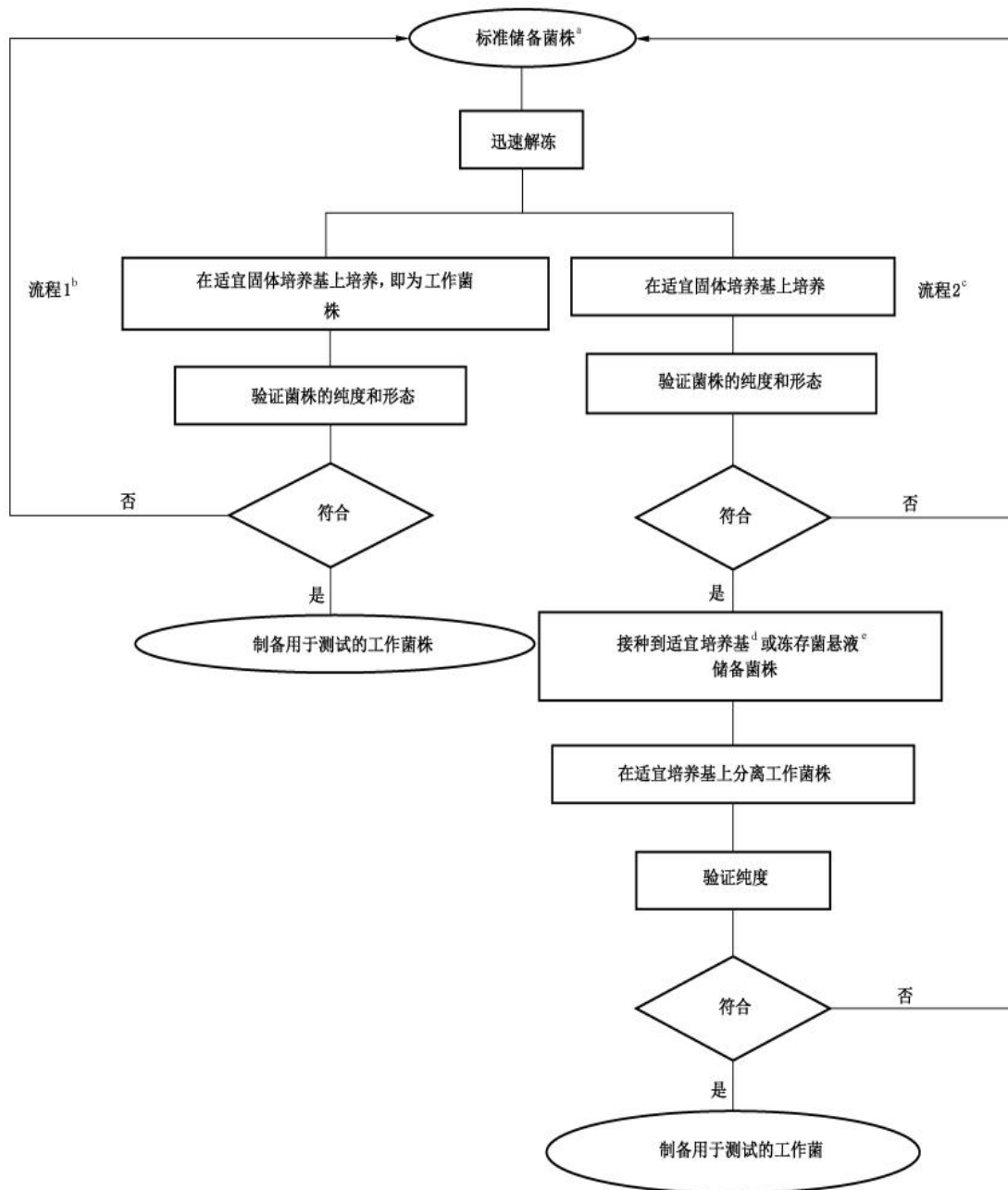
b. 验证菌落形态和革兰氏染色,或用生化试验进行鉴定。

c. 例如,BHI添加40%~60%甘油作为冷冻保护培养基。

d. 冻存管可含有多孔小珠子。

e. 在不高于-70 °C低温下冷冻保存可延长保存的时间,在较高温度下保存时间将缩短。

(五) 工作菌株



- 工作菌株由标准储备菌株制备。
- 工作菌株不能用于制作标准菌株、标准储备菌株或储备菌株。

03

培养基和试剂的质量要求

(一) 微生物学要求

1. 生长特性的一般要求

选择:

- 定量方法
- 半定量方法
- 定性方法

对每批成品培养基或试剂进行评价;

采用定量方法时,应使用参比培养基作为对照;采用半定量和定性方法时,使用能得到“阳性”结果的培养基作为对照。

T
S
A
参
比
培
养
基
质
控
标
准

项目	质控指标	质控条件	质控评定标准
理化	外观	—	为淡黄色粉末,灭菌后为淡黄色透明胶体
	pH	121 ℃ 高压灭菌 15 min 后,倾 倒平板,待室温凝固后测定	7.3±0.2
微生物	测试菌株 ^a	培养温度与培养时间	菌落形态
	莫氏克罗诺杆菌 CMCC(B)45407	25 ℃ ±1 ℃, 48 h ±2 h	生长良好,菌落黄色,圆形,表面 光滑,湿润
	大肠埃希氏菌 CMCC(B)44102	36 ℃ ±1 ℃, 24 h ±2 h	生长良好,菌落灰白色,圆形,表 面光滑,湿润
	金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003	36 ℃ ±1 ℃, 24 h ±2 h	生长良好,菌落淡黄色,圆形

项目	质控指标	质控条件	质控评定标准
微生物	枯草芽孢杆菌 CMCC(B)63501	36 ℃ ±1 ℃, 24 h ±2 h	生长良好,菌落灰白色,圆形, 干燥
	白色念珠菌 CMCC(F)98001	28 ℃ ±1 ℃, 72 h ~96 h	生长良好,菌落白色,圆形,表面 光滑,湿润
	黑曲霉 CMCC(F)98003	28 ℃ ±1 ℃, 72 h ~96 h	生长良好,产黑色孢子
	粪肠球菌 CMCC(B)32480	36 ℃ ±1 ℃, 24 h ±2 h	生长良好,菌落白色,圆形
	人参土芽孢杆菌 CMCC(B)63612	36 ℃ ±1 ℃, 48 h ±2 h	生长良好,菌落灰白色,圆形
	藤黄微球菌 CMCC(B)28001	36 ℃ ±1 ℃, 48 h ±2 h	生长良好,菌落浅黄色,圆形
	嗜热嗜脂肪地芽孢杆菌 CMCC(B)63509	56 ℃ ±1 ℃, 24 h ±2 h	灰白色,圆形,表面光滑,湿润

(二) 生长特性

- 1.生长率：按规定用适当方法将适量测试菌株的工作菌悬液接种至固体、半固体和液体培养基中。每种培养基上菌株的生长率应达到所规定的最低限值。
- 2.选择性：为定量评估培养基的选择性,应按照规定以适当方法将适量测试菌株的工作培养物接种至选择性培养基和参比培养基中,培养基的选择性应达到规定值。
- 3.生理生化特性(特异性)：确定培养基的菌落形态特征、鉴别特性,以获得培养基或试剂的基本特性。

04

四. 培养基和试剂的 性能测试方法

(一) 非选择性分离和计数培养基目标菌 生长率定量测试方法

(二) 选择性分离和计数培养基测试方法

(三) 非选择性增菌培养基半定量测试方法

(四) 选择性增菌培养基半定量测试方法

(五) 选择性液体计数培养基半定量测试方法

(六) 悬浮培养基和运输培养基定量测试方法

(一) 非选择性分离和计数固体培养基

目标菌生长率定量测试方法

1. 工作菌悬液的制备:

将标准储备菌株、储备菌株或工作菌株接种到非选择性肉汤培养过夜或采用其他方法,制备10倍系列稀释的菌悬液。进行生长率测试时,细菌和酵母菌每平板的接种水平50CFU~250CFU,霉菌每平板的接种水平为30CFU~150CFU。

2.接种：选择适宜稀释度的工作菌悬液0.1mL,均匀涂布接种于待测平板和参比平板。每一稀释度接种两个平板。也可使用螺旋涂布法或倾注法进行接种,并按标准规定的条件培养。

3.计算：参考 GB4789.2的要求,选择菌落数适中的平板进行计数,生长率按式(1)计算。

$$PR = NS / NO \cdots \cdots (1)$$

式中：

PR——生长率；

NS——待测培养基平板上的菌落总数平均值；

NO——参比培养基平板上的菌落总数平均值。

4.结果解释：非选择性分离和计数固体培养基上目标菌的生长率应不小于0.7。

■ 非选择性分离和计数固体培养基质量控制标准

培养基	状态	功能分类	质控指标	培养条件	测试菌株*	参比培养基	方法	质控评定标准	特征性反应
平板计数琼脂(PCA)	固体	非选择性计数	生长率	36℃±1℃ 48 h±2 h	大肠埃希氏菌 CMCC(B)43201 或 ATCC 25922	TSA	定量	PR≥0.7	—
					金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26305 或 ATCC 6538				
					枯草芽孢杆菌 CMCC(B)63542 或 ATCC 6633				

(二) 选择性分离和计数固体培养基测试方法

1. 目标菌生长率定量测试方法:

- (1) 目标菌在培养基上应呈现典型的生长。
- (2) 选择性分离固体培养基上目标菌的生长率一般应不小于0.5,最低应为0.1。
- (3) 选择性计数固体培养基上目标菌的生长率一般应不小于0.7。

2.非目标菌(选择性)半定量测试方法

(1) 工作菌悬液的制备:

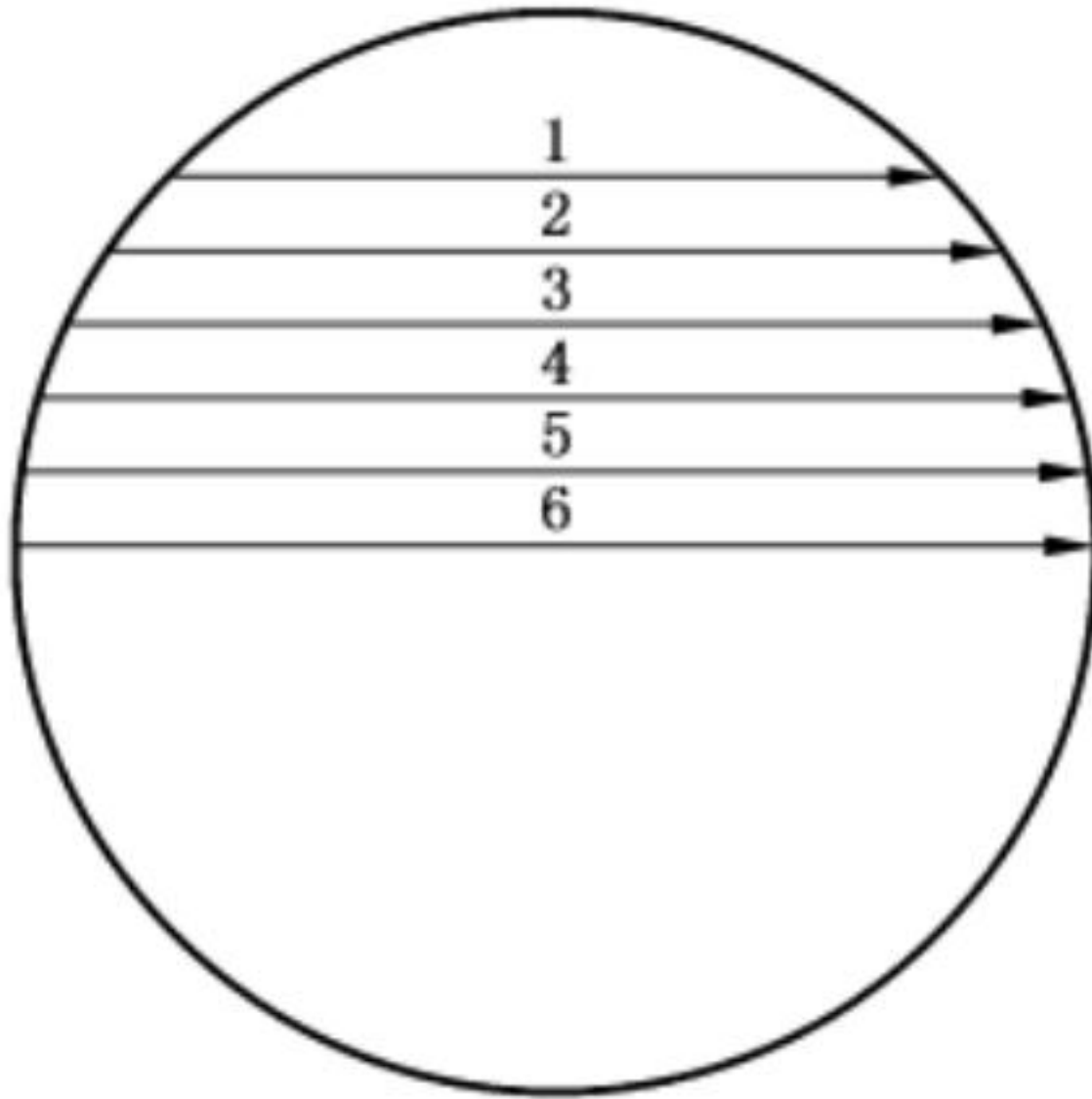
将标准储备菌株、储备菌株或工作菌株接种到非选择性肉汤,培养过夜作为工作菌悬液。

(2) 接种:

用1 μ L接种环取选择性测试工作菌悬液1环,在待测培养基表面划六条平行直线,同时接种两个平板,按标准规定的条件培养。

划线要求: 取一满环接种物,将接种环接触容器边缘3次可去除多余的液体。划线时,接种环与琼脂平面的角度应为 $20^{\circ} \sim 30^{\circ}$ 。接种环压在琼脂表面的压力和划线速度前后一致,整个划线应快速连续,移取液体培养物时应将接种环伸入培养液下部分以防止环上产生气泡或泡沫。

非目标菌半定量划线法接种模式图



(3) 计算:

培养后计算生长指数 G 。每条有比较稠密菌落连续生长的划线计为1分,每个培养皿上最多为6分。如果仅一半的线有稠密菌落生长,则计为0.5分。如果划线上没有菌落生长、生长量少于划线的一半或菌落生长微弱,则计为0分。记录每个平板的得分总和便得到 G 。

(4) 结果解释:

非目标菌的生长指数 G 一般小于或等于1,至少应小于5。

3.非目标菌(特异性)定性测试方法:

1. 工作菌悬液的制备(接种非选择性肉汤培养过夜)
2. 接种: 用1 μ L接种环取测试菌培养物在测试培养基表面进行分区划线。并按标准规定的培养条件培养平板。
3. 结果解释: 非目标菌不生长或微弱生长。

选择性分离和计数固体培养基质量控制标准

培养基	状态	功能分类	质控指标	培养条件	测试菌株*	参比培养基	方法	质控评定标准	特征性反应
木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂(XLD)	固体	选择性分离	生长率	36℃±1℃ 18 h~24 h	肠沙门氏菌肠亚种鼠伤寒血清型 CMCC(B)50976 或 ATCC 14028	TSA	定量	PR≥0.5	黑色菌落
					福氏志贺氏菌 CMCC(B)51572				无色菌落,无黑心
			选择性		金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26305 或 ATCC 6538	—	半定量	G≤1	—
Baird-Parker 琼脂	固体	选择性计数	生长率	36℃±1℃ 24 h~48 h	金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26305 或 ATCC 25923	TSA	定量	PR≥0.7	菌落黑色凸起,周围有一浑浊带,在其外层有一透明圈
			特异性		表皮葡萄球菌 CMCC(B)26069	—	定性	—	黑色菌落,无浑浊带和透明圈
			选择性		大肠埃希氏菌 CMCC(B)43201 或 ATCC 25922	—	半定量	G≤1	—

(三) 非选择性增菌培养基半定量测试方法

(1) 培养基的制备：将培养基分装试管,每管10mL。

(2) 工作菌悬液的制备：将标准储备菌株、储备菌株或工作菌株接种到非选择性肉汤培养过夜或采用其他制备方法,制备10倍系列稀释的菌悬液。

(3) 接种：在装有待测培养基的试管中接种10CFU~100CFU 的目标菌,接种体积不超过1mL,接种两个平行管。同时将1mL 菌悬液(与试管接种同一稀释度)倾注平板(或适宜稀释度0.1mL 涂布平板),接种两个平板,作接种量计数用。按标准方法中规定的培养时间和温度进行培养。

(4) 结果解释：目标菌的浊度值应为2。

用目测的浊度值(如0~2)评估培养基:

0表示无浑浊;

1表示轻微的浑浊;

2表示明显的浑浊。

非选择性增菌培养基质量控制标准

营养肉汤(NB)	液体	非选择性增菌	生长率	36℃±1℃ 18 h~24 h	大肠埃希氏菌 CMCC(B)43201	TSA	半定量	浑浊度 2 或菌成片状生长
					金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26305			
					枯草芽孢杆菌 CMCC(B)63542			

(四) 选择性增菌培养基半定量测试方法

1. 培养基的制备：将培养基分装试管,每管10mL。
2. 工作菌悬液的制备：细菌和酵母菌每平板的接种水平50CFU~250CFU,霉菌每平板的接种水平为30CFU~150CFU。
3. 接种

(1) 目标菌的接种

在装有待测培养基的试管中接种10CFU~100CFU 的目标菌,接种体积**不超过1mL**,同时接种两个平行管,混匀。将相同体积的目标菌菌悬液(与试管接种同一稀释度)倾注平板(或适宜稀释度0.1mL涂布平板),接种两个平板,作接种量计数用。按标准方法中规定的培养时间和温度进行培养。

(2) 非目标菌的接种

在装有待测培养基的试管中接种1000CFU~5000CFU 的非目标菌,接种**体积不超过1mL**,同时接种两个平行管,混匀。同时将1mL 菌悬液(比试管接种小10倍~100倍稀释度)倾注平板(或适宜稀释度0.1mL 涂布平板),接种两个平板,作接种量计数用。按标准方法中规定的培养时间和温度进行培养。

4. 培养液的接种

(1) 目标菌培养液的接种:

吸取10 μ L经培养后的目标菌培养液,均匀涂布或螺旋涂布接种到特定的选择性平板上。按标准方法中规定的培养时间和温度进行培养。

(2) 非目标菌培养液的接种:

吸取10 μ L经培养后的非目标菌培养液,均匀涂布或螺旋涂布接种到非选择性平板(如 TSA)上。并按标准规定的培养条件培养。

5. 计算和结果解释

目标菌在选择性平板上的菌落应 >10 CFU,则表示待测液体培养基的生长率良好; 非目标菌在非选择性平板上的菌落数 <100 CFU,则表示待测液体培养基的选择性为良好。

选择性增菌培养基质量控制标准

培养基	状态	功能分类	质控指标	培养条件	测试菌株*	接种计数培养基	方法	质控评定标准	特征性反应
四硫磺酸钠煌绿增菌液(TTB)	液体	选择性增菌	生长率	42℃±1℃ 18 h~24 h	肠沙门氏菌肠炎种鼠伤寒血清型 CMCC(B)50976 或 ATCC 14028	TSA	半定量	在 XLD 上 >10 CFU	菌落无色半透明， 有黑心
			选择性		大肠埃希氏菌 CMCC(B)43201 或 ATCC 25922			在 TSA 上 <100 CFU	—
					粪肠球菌 CMCC(B)32482 或 ATCC 29212				

(五) 选择性液体计数培养基半定量测试方法

- 1.培养基的制备：将培养基分装试管,每管10mL。
- 2.工作菌悬液的制备：制备成10 CFU~100 CFU/ml。
- 3.接种

(1) 目标菌的接种

在装有待测培养基的试管中接种10 CFU~100 CFU 的目标菌,接种体积不超过1mL,同时接种两个平行管,混匀。将相同体积的目标菌菌悬液(与试管接种同一稀释度)倾注平板,接种两个平板,作接种量计数用。按标准方法中规定的培养时间和温度进行培养。

(2) 非目标菌的接种

在装有待测培养基的试管中接种1000 CFU~5000 CFU的非目标菌,接种体积不超过1mL,同时接种两个平行管,混匀。同时将1mL 菌悬液(比试管接种小10倍~100倍稀释度)倾注平板(或适宜稀释度0.1mL 涂布平板),接种两个平板,作接种量计数用。按标准方法中规定的培养时间和温度进行培养。

4. 结果解释

用目测的浊度值(如0~2)评估培养基:

0表示无浑浊;

1表示轻微的浑浊;

2表示明显的浑浊。

并记录小导管收集气体的体积比。

选择性液体计数培养基质量控制标准

培养基	状态	功能分类	质控指标	培养条件	测试菌株*	接种计数培养基	方法	质控评定标准
月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤(LST)	液体	选择性 液体计数	生长率	36℃±1℃ 24 h~48 h	大肠埃希氏菌 CMCC(B)43201 或 ATCC 25922	TSA	半定量	浑浊度 2, 且气体充满管内 1/3
					弗氏柠檬酸杆菌 CMCC(B)48098 或 ATCC 43864			
			选择性		粪肠球菌 CMCC(B)32482 或 ATCC 29212			浑浊度 0(不生长)

(六) 悬浮培养基和运输培养基定量测试方法

1. 培养基的制备

将培养基分装试管,每管10mL。

2. 目标菌工作菌悬液的制备: 制备成100 CFU~1000 CFU/ml。

3. 接种

在装有待测培养基的试管中接种100 CFU~1000 CFU 的目标菌,同时接种两个平行管,混匀后,立即吸取1mL 待测培养基混合液用相应的培养基倾注平板,每管待测培养基接种一个平板。按标准方法中规定的培养时间和温度培养后,进行菌落计数。

剩余已接种菌液的待测培养基20℃~25℃下放置45min后,再吸取1mL 倾注平板,每管培养基接种一个平板,按标准方法中规定的培养时间和温度培养后,进行菌落计数。

4. 结果观察与解释

待测培养基中的菌落数变化应在±50%内。

悬浮培养基

悬浮培养基是指细胞在培养液中呈悬浮状态生长与增殖

培养基	状态	功能分类	质控指标	放置条件	测试菌株*	接种计数培养基	方法	质控评定标准
磷酸盐缓冲液 (PBS)	液体	悬浮培养基	生长率	20℃~25℃ 45 min	大肠埃希氏菌 CMCC(B)43201 或 ATCC 25922	TSA	定量	放置培养前后菌落数变化在±50%
					金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26305 或 ATCC 6538			

THANK
YOU

