
附件 3

《水质 灭菌指示微生物（枯草芽孢杆菌
黑色变种）的鉴定 生物学检测法
（征求意见稿）》编制说明

《水质 灭菌指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的鉴定 生物学检测法》

标准编制组

二〇一九年十月

项目名称：水质 灭菌指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的鉴定
生物学检测法

项目统一编号：2012-54

承担单位：上海市环境监测中心

编制组主要成员：汤琳、龚海燕、朱梦杰、李备军、汪琴、吴阿娜、
朱刚、怀红燕、刘丹青

标准所技术管理负责人：张虞

生态环境监测司项目负责人：张宗祥、李江

目 录

1	项目背景	1
1.1	任务来源	1
1.2	工作过程	1
2	标准制修订的必要性分析.....	2
2.1	监测意义	2
2.2	相关环保标准和环境工作的需要.....	4
3	国内外相关分析方法研究.....	6
3.1	主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究.....	6
3.2	国内相关分析方法研究.....	7
4	标准制修订的基本原则和技术路线.....	8
4.1	标准制订的基本原则.....	8
4.2	标准制定的技术内容.....	8
5	方法研究报告	10
5.1	方法研究目标.....	10
5.2	术语和定义.....	21
5.3	方法原理	22
5.4	干扰和消除.....	22
5.5	试剂和材料.....	22
5.6	仪器和设备.....	28
5.7	样品	28
5.8	分析步骤	29
5.9	结果与报告.....	34
5.10	稳定性与特异性.....	34
5.11	质量保证和质量控制.....	36
5.12	废物处理	36
6	方法验证	36
6.1	方法验证方案.....	36
6.2	方法验证过程.....	37
6.3	方法验证结论.....	38
7	与开题报告的差异说明.....	38
8	参考文献	38
附一	方法验证报告	43

《水质 灭菌指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种） 的鉴定 生物学检测法》编制说明

1 项目背景

1.1 任务来源

2012年4月，原国家环境保护部办公厅发布了《关于开展2012年度国家环境保护标准制修订项目工作的通知》（环办函〔2012〕503号），由上海市环境监测中心承担《水质 指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的测定 生物学检测法》项目的制订工作。项目统一编号为2012-54。

1.2 工作过程

1.2.1 成立标准编制组

任务下达后，上海市环境监测中心作为承担单位成立了标准编制组，成员以多年从事微生物监测工作的人员为主。

1.2.2 相关标准和文献资料调研

2012年，通过国内外相关分析方法比较研究，分析总结枯草芽孢杆菌黑色变种测定的技术特点和问题、技术发展趋势、新技术的可行性；结合相关法律、法规和政策的研究和分析，提出标准制修订的必要性，完成标准开题论证报告和标准草案的编写。

1.2.3 召开研讨会，研究建立标准方法，开展方法研究

按照标准制定要求，参考相关标准和资料，召开研讨会，就标准编制的重难点进行讨论，最终确立实验方案。于2012年~2014年开展了标准方法研究试验和适用性试验。

1.2.4 开题论证，确定标准制定的技术路线和原则

2014年4月7日，标准开题论证报告和标准草案通过了环保部科技标准司组织的开题论证会，并提出了修改建议：将标准适用范围确定为“含活性微生物废水经灭菌处置后，枯草芽孢杆菌黑色变种的测定”；调整检测方法程序，先筛查后鉴定；根据相关排放标准要求，确定合理的样品取样量。

1.2.5 落实专家意见，深入开展方法试验研究

2014年5月~2015年6月，根据开题论证意见，标准编制组按照《国家环境保护标准制修订工作管理办法》（国家环境保护总局2006年第41号）、《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）等文件的要求开展和增加相关试验；并准备实验室方法验证工作，着手编写《水质 指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的测定 生物学检测法》标

准征求意见稿及方法验证方案。

1.2.6 方法验证工作

2016年03月~2016年6月，组织6家有资质的实验室进行方法验证，于2016年6月收回所有的验证报告，随后进行了数据的汇总和整理分析工作，编制《水质 指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的测定 生物学检测法》验证报告。

1.2.7 标准征求意见稿和编制说明

2016年6月~2016年12月，完善《水质 指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的测定 生物学检测法》征求意见稿并编写标准编制说明。

1.2.8 标准研讨会

2017年1月13日，于北京召开了《水质 指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的测定 生物学检测法》标准编制工作的研讨会，经质询和讨论，形成意见：将适用范围修改为“本标准适用于含活性微生物废水经灭菌处置后的灭菌指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的生物学检测”；标准文本中3方法原理内容建议进一步详述；标准文本中4试剂和材料内容进行部分修改；标准文本的部分注解、引用等文字进行适当更正。

1.2.9 标准征求意见稿编制

2017年1月~2018年6月，修改完善《水质 指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的测定 生物学检测法》标准征求意见稿及编制说明，并进行了专家函审。

1.2.10 召开标准征求意见稿技术审查会并根据审查意见修改

根据生态环境保护部环境监测司要求，于2018年7月6日召开了《水质 指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的测定 生物学检测法》标准征求意见稿技术审查会，审查专家提出了将标准名称改为《水质 灭菌指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的鉴定 生物学检测法》，明确方法适用范围，完善方法原理、干扰和消除的表述，在样品采集中增加干扰和消除的步骤，补充芽孢染色镜检的描述和图例，质量保证和质量控制中细化试剂和培养基质量控制要求等审查意见，编制组根据专家审查意见，修改标准名称，对文本相应内容进行修改和补充。

2 标准制修订的必要性分析

2.1 监测意义

2.1.1 枯草芽孢杆菌黑色变种基本情况

“枯草芽孢杆菌黑色变种 *Bacillus subtilis* var. *niger*”，由美国的 Elizabeth 最先分离得到，因其在含酪氨酸的培养基上产棕黑色素而得名。1989年，Nakamura 依据 DNA 相似性研究，提议将包括“枯草芽孢杆菌黑色变种”在内的菌株划分为新的一个种，2001

年该种被学术界承认和接受，命名为“萎缩芽孢杆菌”。

Nakamura 将萎缩芽孢杆菌的形态特性归纳为：营养细胞杆状，单个或短链状排列，革兰染色为阳性；细胞宽 $0.5\mu\text{m}\sim 1.0\mu\text{m}$ ，长 $2.0\mu\text{m}\sim 4.0\mu\text{m}$ ，可运动；芽孢椭圆形、中生、不膨大。生化特性包括：好氧生长，V-P 反应阳性（V-P 培养基中培养，pH 范围为 5.3~5.7，DNA 浮力密度为 $1.6946\text{ g/cm}^3\sim 1.6966\text{ g/cm}^3$ ，G+C 含量为 41 mol%~43 mol%。产过氧化氢酶，不产氧化酶、硫化氢、吲哚、二羟丙酮；利用阿拉伯糖、果糖、葡萄糖、甘露糖醇、水杨苷、蔗糖、海藻糖和木糖发酵后产酸不产气，利用纤维二糖、半乳糖、麦芽糖、甘露糖、核糖、甲基戊糖和山梨糖醇产酸的过程不稳定。可将硝酸盐还原成亚硝酸盐，水解淀粉和酪蛋白，利用柠檬酸盐，消化吸收酪蛋白；不能利用丙酸盐，不能发酵乳糖和蜜二糖，不能分解蛋黄卵磷脂、吐温-80、尿素、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、苯基丙氨酸和酪氨酸；在石蕊牛乳中 pH 呈碱性。最适宜生长温度为 $28\sim 30^\circ\text{C}$ ，最高生长温度为 $50^\circ\text{C}\sim 55^\circ\text{C}$ ，最低生长温度为 $5\sim 10^\circ\text{C}$ ，在 pH 为 5.6 或 5.7，含 7%NaCl 条件下生长，在含有 0.001%的溶解酵素情况下，生长被抑制。

而本标准为了便于国内应用与识别，仍称“枯草芽孢杆菌黑色变种”，其分类地位见图 1，代表菌株编号 ATCC 9372。

- >细菌
 - >厚壁菌门
 - >杆菌
 - >芽孢杆菌目
 - >芽孢杆菌科
 - >芽孢杆菌属
 - >枯草芽孢杆菌群
 - >枯草芽孢杆菌黑色变种

图1 枯草芽孢杆菌黑色变种分类地位

2.1.2 检测意义

枯草芽孢杆菌黑色变种作为枯草芽孢杆菌亚种，本身不具有危害性，因能产生对热、紫外线、电离辐射和某些化学物质很强抗性的芽孢，可以作为消毒剂检测及灭菌质量控制方面的质量控制标准菌株进行应用。

《美国药典》将枯草芽孢杆菌黑色变种作为干热消毒、环氧乙烷控制的生物指示剂及用于医药物品消毒与无菌保证；《欧洲药典》将其作为杀菌法的生物指示剂；我国在《中国药典》、《消毒与灭菌效果的评价方法与标准》(GB 15981-1995)、《消毒技术规范》均将枯草芽孢杆菌黑色变种作为消毒灭菌指示微生物；英国、瑞士等国标准协会在健康产品相关的标准或与医疗器械相关的标准中已将该菌株作为环氧乙烷灭菌、干热灭菌和其它液体化学消毒剂的指示剂。

此外，枯草芽孢杆菌黑色变种也可作为炭疽杆菌的非致病性替代物，用于军事等方面研究；用于生产生物表面活性剂，在环境保护、有机物质处理和油回收等领域^[8]具有广泛的应用；用于芽孢形成、萌发、耐热机理等研究领域；在分布媒介、净化模拟及大范围过程开发

等领域也有着重要的研究意义。美国模式培养物保藏所将枯草芽孢杆菌黑色变种菌株的作用总结为：抗性测试、效力试验、环氧乙烷消毒、蒸汽消毒、介质测试、无菌测试及消毒控制。

综上所述，枯草芽孢杆菌黑色变种在消毒剂检测及灭菌质量控制方面具有广泛的应用，而本标准的制定，对水环境卫生安全的监测和评价十分关键。

2.2 相关环保标准和环境工作的需要

医疗废物监控的需要。为加强医疗废水排放的管理，有效截断各种传染病的传播途径，国务院颁布了《医疗废物管理条例》，明确规定医疗卫生机构产生的污水、传染病病人或者疑似传染病病人的排泄物，应当按照国家规定严格消毒，达到国家规定的排放标准，主要污染物应严格执行《污水综合排放标准》（GB 8978-1996）才可排放。《全国危险废物和医疗废物处置设施建设规划》第二章技术要求中指出，“小于 10 吨/日的医疗废物处置设施，必须做到杀菌、灭活、毁形和无害化，防止二次污染”。

病原废水监控的需要。2000 年 6 月由原建设部、国家环保总局、科技部联合发布的“关于印发《城市污水处理及污染防治技术政策》的通知”中规定：“为保证公共卫生安全，防止传染性疾病预防，城市污水处理设施应设置消毒设施”。此外，《城镇污水处理厂污染的排放标准》(GB 18918-2002)中首次将微生物指标列为基本控制指标，规定污水处理厂出水必须进行消毒处理，从而使我国污水处理标准的病理指标与国际接轨。目前，国内所有的污水处理厂必须设置消毒设施，常见的废水消毒处理方法见表 1。

表1 废水消毒方法比较

消毒方法	优点	缺点	费用	应用
加热消毒	杀菌彻底	耗能	贵	易
紫外线消毒	杀死营养细胞	悬浮物浓度、色度低，水层浅；不能提供剩余消毒能力	便宜	易
活性炭吸附消毒	去除细菌、病毒	去除率低	昂贵	易
氯化消毒	杀菌能力强，有持续灭菌的作用	杀菌效果受 pH 影响较大	成本低廉	主要用于饮用水消毒
二氧化氯消毒	杀菌能力强、消毒快而耐久	消毒成本较高	较贵	易
臭氧消毒	杀菌效果显著,作用迅速受水质影响小	消毒系统设备比较复杂	贵	易

病原微生物消毒监控的需要。《病原微生物实验室生物安全管理条例》、《实验室生物安全通用要求》（GB 19489）等有关规定，对涉及生物安全的废水、废液、废气等进行灭活灭菌后才能排放，灭活灭菌方法应符合《消毒技术规范》的规定。《中华人民共和国传染病防治法》、《病原微生物实验室生物安全管理条例》（国务院令 424 号）、《医院感染管理规范》等法律规范规定：污染物必须进行消毒、灭菌效果定期检测。常见病原菌灭菌条件见表 2。

表2 污水中各病原微生物的灭菌条件

病原体	在污水中存活时间/d	致死条件	
		温度/℃	时间/min
伤寒杆菌	24~27	60	10
痢疾杆菌	30~40	60	10~20
霍乱弧菌	5~12	60	10~20
肝炎病毒	70	—	—
结核杆菌	150	60	30
炭疽杆菌	80	50~55	60
口蹄疫病毒	—	60	30
埃可病毒-7	114	—	—
脊髓灰质炎病毒	90~120	—	—
钩端螺旋体	30	—	—
猪瘟病毒	—	50~60	15
绿脓杆菌	—	55	420

针对以上应用需求及枯草芽孢杆菌黑色变种的特点，其芽孢在 160℃±2℃干热条件下，存活时间≥3.9 min，杀灭时间≤19 min，D 值为 1.3 min~1.9 min；在环氧乙烷量为 600 mg/L±30 mg/L，温度为 54℃±2℃，相对湿度为 60%±10%条件下，菌片上芽孢存活时间应≥7.8 min，杀灭时间≤58 min，D 值为 2.6 min~5.8 min（参考《消毒技术规范》）。相关标准明确提出了枯草芽孢杆菌黑色变种的应用（见表 3）。2002 年版《消毒技术规范》规定：在医疗器械和日用品、紫外线消毒箱、微波灭菌柜、环氧乙烷灭菌器（灭菌与高水平灭菌）上，以枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢为生物指示剂，进行微生物杀灭试验检测；《消毒与灭菌效果的评价方法与标准》（GB 15981-1995）规定紫外线表面消毒和液体消毒剂消毒效果评价以枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢为生物指示剂。《高致病性病原微生物实验室污染物排放标准》和《病原微生物实验室污染物排放标准》中规定排放污染物中不得检出枯草芽孢杆菌黑色变种。

综上所述，正式由于枯草芽孢杆菌黑色变种在食品生产、医院消毒、病原废水控制等行业具有广泛应用，而相关环保制度标准却未对枯草芽孢杆菌黑色变种的检测做出详细说明和规范，使得本标准的制定更为迫切。

表3 各排放及评价标准中规定的枯草芽孢杆菌黑色变种限值

标准名称	规定
《消毒与灭菌效果的评价方法与标准》 (GB 15981-1995)	杀灭率≥99.9% (紫外线表面消毒)
	芽孢全部杀灭 (液体消毒剂消毒)
《消毒技术规范》(2002 版)	阴性对照应无菌生长
《高致病性病原微生物实验室污染物排放标准》(二次征求意见稿)	不得检出
《病原微生物实验室污染物排放标准》(征求意见稿)	不得检出

3 国内外相关分析方法研究

3.1 主要国家、地区及国际组织相关分析方法研究

经调研,国内外缺乏枯草芽孢杆菌黑色变种的检测标准,本标准方法参考相关研究进行制定。1946年,Smithet等通过显然的、可靠的颜色特征发现枯草芽孢杆菌黑色变种;1988年,Priest等通过大量的表现型分类调查研究,包括革兰氏染色和芽孢染色,对细胞和芽孢形态进行观察,同时结合菌落颜色,分离到枯草芽孢杆菌黑色变种;1989年,Nakamura等人采用DNA杂交技术、电泳技术和色素生成方法,分离出枯草芽孢杆菌黑色变种,并率先提出将其命名为萎缩芽孢杆菌;2001年,Fritze和Pukall率先采用Ribotyping DNA-DNA杂交技术和全自动微生物基因指纹鉴定系统来鉴定对枯草芽孢杆菌黑色变种;2004年,Burke等用16S rDNA序列分析和AFLP技术对“枯草芽孢杆菌黑色变种”进行鉴定;Stacey M. Broomall等用光学映像技术结合全基因测序全面分析“枯草芽孢杆菌黑色变种”。

随着分子生物学、遗传基因等技术的发展和应用,枯草芽孢杆菌黑色变种检测技术不断被开发,方法也愈加快捷和准确。从发展趋势分析,目前Ribotyping DNA-DNA杂交技术、全自动微生物基因指纹鉴定系统、16S rDNA序列分析和AFLP技术等检测技术正逐渐取代复杂的传统方法。表4简单介绍几种核酸检测技术的原理。

表4 几种核酸检测技术介绍

方法	原理	方法	应用范围
PCR 技术	DNA 聚合酶的酶促合反应	DNA 片段扩增	微生物测定
DNA G+ C 含量测定	细菌 DNA 中 G+C 含量的特异性	熔解温度 (Tm) 法或浮力密度法	细菌分类鉴定
16S rRNA 鉴定	细菌核糖体 RNA 基因高度保守且进化速度缓慢	PCR、rRNA 指纹图、BLAST 分析	菌种定型和近缘菌株的鉴定
16S rDNA	16SrDNA 中有多个区段具有保守性	PCR、DNA 测序	鉴定属以上相互关系

方法	原理	方法	应用范围
扩增片段长度多态性 (AFLP) 分析	测定基因组限制性片段的 DNA 指纹	PCR 和聚丙烯酰胺凝胶电泳	研究细菌属乃至株间的亲缘关系
限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析	不同种群基因组 DNA 限制性片段长度多态性	PCR 和琼脂糖凝胶电泳	细菌种间及种内株间的分型鉴定

3.2 国内相关分析方法研究

3.2.1 方法研究

我国现有的环境标准分析体系中, 枯草芽孢杆菌黑色变种的鉴定尚没有一种快速、简便的检测手段。

参考国内标准菌株鉴定方法, 主要为形态观察及生化鉴定结合, 或者再做进一步的分子鉴定。如《食品卫生微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验》(GB/T 4789.14-2003) 中蜡样芽孢杆菌的检测首先用选择培养基初步筛选菌落, 然后通过形态观察和生化试验进行进一步确认; 《饲料中嗜酸乳杆菌的微生物学检测》(GB/T 20191-2006) 中运用改良培养基选择培养嗜酸乳杆菌, 而后以部分生化试验进行确诊; 《饲用微生物制剂中枯草芽孢杆菌的检测》(GB/T 26428-2010) 中对枯草芽孢杆菌的检测采用形态观察和生化鉴定方法; 《枯草芽孢杆菌检测鉴定方法》(SN/T 2728-2010) 中鉴定枯草芽孢杆菌的方法是: 形态和生化鉴定, 再结合普通 PCR 或荧光 PCR 进行综合鉴定; 《饲料微生物添加剂 地衣芽孢杆菌》(NY/T 1461-2007) 中用菌体、菌落观察及理化特性检验进行地衣芽孢杆菌的鉴定。

借鉴相关文献中芽孢杆菌鉴定方法, 主要从分子基因角度进行鉴定。如杨霞等研究发现, 16S rRNA 基因序列具有保守性、普遍性, 以及稳定性, 使得 16S rRNA 基因序列分析的重现性极高, 基于当今分析技术的改进, 应用 16S rRNA 作为分子指标, 可以实现对微生物进行快速、微量、准确简便地分类鉴定和检测。马凯等也运用 16S rRNA 基因系统对中国工业微生物菌种保藏中心(CICC) 保藏的 30 株“地衣芽孢杆菌”系统发育分析, 表明: 16S rRNA 基因 5'端 500 bp 可以很好的代表全基因序列进行系统发育研究, 可用于区分地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌以及蜡样芽孢杆菌分支。王力庭等研究发现, *gyrB* 基因的直接测序可以作为枯草芽孢杆菌群内种的鉴定和分类。中国工业微生物菌种保存中心(CICC) 采用 *gyrA* 基因序列分析技术, 对中心保存的 36 株枯草芽孢杆菌群菌种进行系统发育分析, 发现 *gyrA* 基因序列分析对枯草芽孢杆菌群菌种的分辨率高于 16S rRNA 基因, 能更有效的应用于枯草芽孢杆菌群种间的鉴定区分, 有望成为工业用枯草芽孢杆菌群菌种鉴定的一个有力工具。

综合以上各类菌株鉴定方法, 国内学者在菌株鉴定的研究上倾向于 16S rRNA 或 DNA 亚基因进行基因检测与分析, 而国标对菌株的鉴定倾向于选择形态和生化鉴定方法。

本标准的方法制定, 以细菌分类学知识为基础, 参考《伯杰氏系统细菌学手册》及《饲料微生物制剂中枯草芽孢杆菌的检测》(GB/T 26428-2010)、《枯草芽孢杆菌检测鉴定方法》(SN 2728-2010) 等标准, 具有一定的可行性和科学性。

3.2.2 分析仪器、设备及新进展

传统的细菌分类鉴定, 主要根据形态学特征、生理生化反应特征、生态学特征以及血清

学反应、对噬菌体的敏感性等确定鉴定项目，进行一系列的观察和鉴定工作，但是传统的鉴定方法由于试验指标较多，操作复杂，费时费力，逐渐显现其不足，因此探索针对性的细菌生化鉴定项目和研发快速的检测产品成为现今微生物鉴定的两个重要方向。

20世纪60年代后，微生物领域开始出现自动化仪器。在生理生化方面，根据细菌不同的生物学性状和代谢产物的差异，逐步发展了微量快速培养基和微量生化反应系统，使原来缓慢、烦琐的手工操作变得快速、简单，并实现了自动化和机械化。80到90年代发展尤为迅速，80年代美国雅培公司MS-2进入中国，Biolog随后跟进，1985年第一台自动化细菌分析仪器Vitek-AMS进入中国，1999年底法国生物梅里埃公司推出VITEK2系统，从接种物稀释、密度计比较及卡冲填和封卡等步骤均实现了全自动化。目前，科研、检测领域使用的有VITEK全自动鉴定药敏分析仪（VITEK automated ID/AST system）、Phoenix-100全自动细菌鉴定药敏检测系统、MicroScan自动微生物鉴定及药敏测试系统、先德（Sensititre）微生物鉴定和药敏分析系统等。这些自动化系统具有先进和微机系统，只需极少的手工操作，具有从接种到检测的全自动最佳工作流程，符合实验室生物安全及提高工作效率的需要。

此外，微生物鉴定中许多分子实验同样可以借助高效鉴定系统来快速、准确地进行实验，如全自动微生物基因指纹鉴定系统，可通过全自动产生rRNA基因指纹来鉴定和鉴别微生物，将细菌从基因指纹水平上进行分型、同源性分析，以追溯细菌污染的源头；全自动DNA/RNA分析系统，系统采用毛细管电泳，每次可自动分析多达96个样本，实现高灵敏度，高分辨率的分析；此外，还有基因分析仪、高通量基因分析系统等。这些系统虽然使用便捷，但价钱昂贵，部分存在假阳性反应，还需要不断的发展和完善。

4 标准制修订的基本原则和技术路线

4.1 标准制订的基本原则

本标准依据《国家环境保护标准制修订工作管理办法》和《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）、《环境保护标准编制出版技术指南》（HJ 565-2010）、《标准化工作导则 第一部分：标准的结构和编写》（GB/T 1.1-2009）等文件的要求，以国内外标准及文献为基础而编制。本标准制定的主要原则是：

（1）方法准确可靠，满足各项方法特性指标的要求；

本标准制定的枯草芽孢杆菌黑色变种鉴定方法，需具有较好的特异性和稳定性。

（2）方法的检出限和测定范围满足相关环保标准和环保工作的要求；

新制定的方法最好能适应不同水体中枯草芽孢杆菌黑色变种的测定，且方法检出限最好能低于或等同于现行标准方法，以更好地满足相关环保标准和环保工作的要求。

（3）方法具有普遍适用性，易于推广使用。

新制定的方法需操作简便，在推广性和应用性上有相当的基础和前景，以便今后的推广使用。

4.2 标准制定的技术内容

枯草芽孢杆菌黑色变种在我国主要作为消毒灭菌指示菌来应用，但是缺乏标准化的检测

方法，本标准的制定以《伯杰细菌鉴定手册》（第八版）、《常见细菌系统鉴定手册》等著作和《食品卫生微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验》（GB/T 4789.14-2003）、《饲料中嗜酸乳杆菌的微生物学检测》（GB/T 20191-2006）、《饲用微生物制剂中枯草芽孢杆菌的检测》（GB/T 26428-2010）、《枯草芽孢杆菌检测鉴定方法》（SN/T 2728-2010）、《饲料微生物添加剂 地衣芽孢杆菌》（NY/T 1461-2007）等规范标准及本国实际情况，最终完成《水质 灭菌指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的鉴定 生物学检测法》标准。

结合本国实际情况，引用、参考国内外现有相关标准以及相关实验研究来完成本标准方法的制定。方法技术上，参考《饲料中嗜酸乳杆菌的微生物学检测》（GB/T 20191-2006）中运用改良培养基选择培养嗜酸乳杆菌的思路，研究酪氨酸培养基作为枯草芽孢杆菌黑色变种的显色培养基。参考《饲用微生物制剂中枯草芽孢杆菌的检测》（GB/T 26428-2010）、《枯草芽孢杆菌检测鉴定方法》（SN/T 2728-2010）确定枯草芽孢杆菌黑色变种的生化检测方法。最后采用市面上广泛使用的枯草芽孢杆菌黑色变种菌片进行方法适用性和准确性的研究。

《水质 灭菌指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的鉴定 生物学检测法》标准制定的技术路线，见图 2。

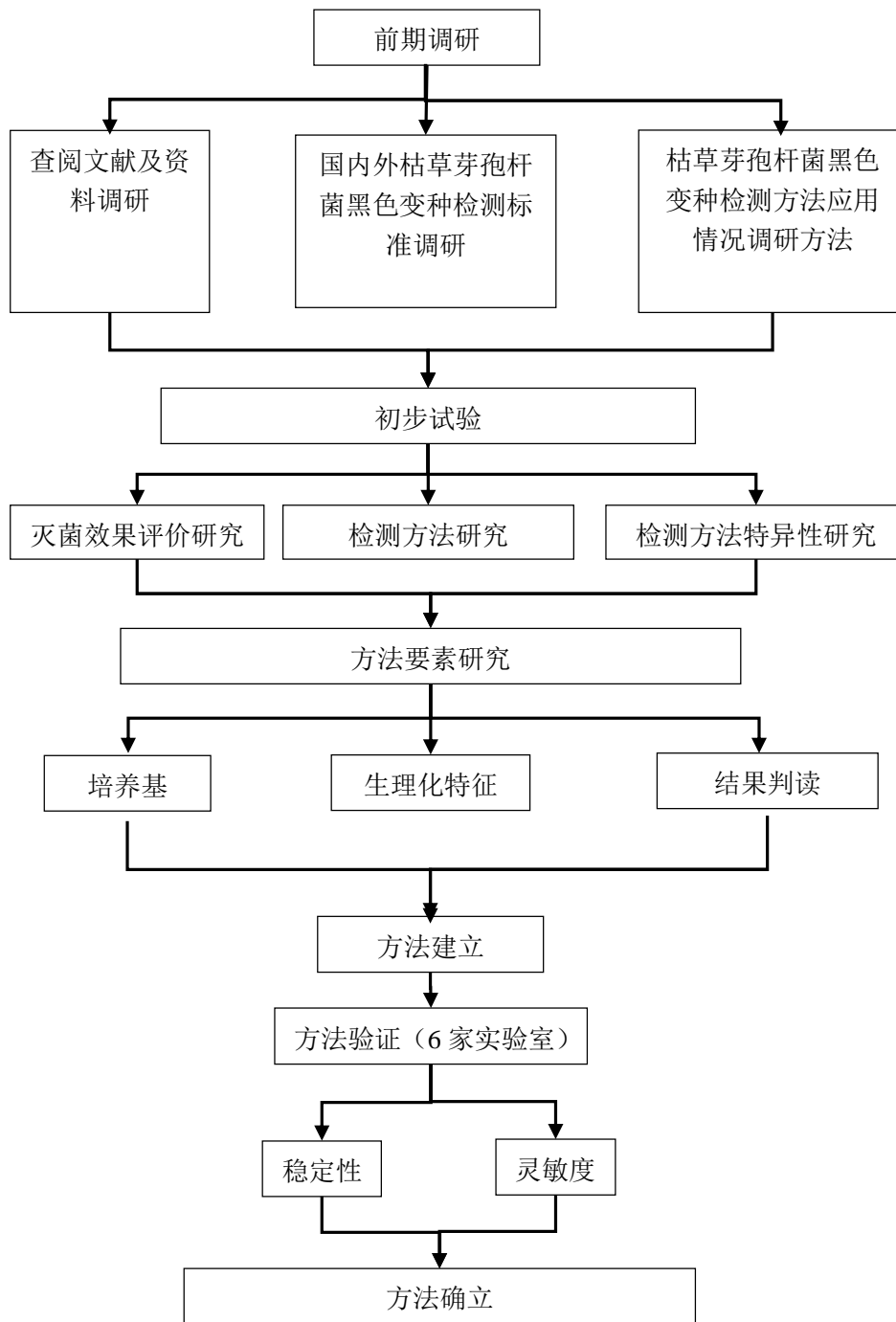


图2 标准编制的技术路线图

5 方法研究报告

5.1 方法研究目标

本标准规定了鉴定水中灭菌指示微生物的生物学检测方法。

本标准适用于经灭菌处置后废水中指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的鉴定。

通过方法研究和方法验证,确定枯草芽孢杆菌黑色变种生物学鉴定方法的可行性和适用性,建立简便、快速、准确的检测方法,并将方法标准化以期应用。

警告:操作时应按要求佩戴防护器具,做好无菌防护;实验室操作需在无菌操作设备内进行,避免吸入呼吸道或接触皮肤和衣物。

5.1.1 选择培养基的研究

根据《伯杰细菌鉴定手册》,枯草芽孢杆菌黑色变种可在含有酪氨酸的培养基中形成黑色色素,但色素形成不十分稳定。黑色素(melanin)是不溶于水和一般有机溶剂的多聚化合物,它的基础结构是一些共价交联的吲哚环。酪氨酸是合成黑色素的前体物,酪氨酸在酪氨酸氧化酶的催化作用下氧化生成二羟苯丙氨酸(多巴),继续氧化生成多巴醌,再进一步氧化闭环生成5,6-二羟吲哚,再转化成5,6-吲哚二醌,在酶的作用下,最后氧化聚合而形成黑色素。在此过程中起决定性作用的酶是酪氨酸酶。酪氨酸酶,又叫多酚氧化酶,是一种铜离子与酶蛋白相结合的金属酶,主要参与微生物中黑色素、多酚类物质形成的过程。酪氨酸酶同时具有加氧酶、氧化酶的功能,是生命体中合成黑色素的关键酶。

根据枯草芽孢杆菌黑色变种含有酪氨酸酶,能分解酪氨酸产生黑色素,故筛选出一种合适的选择培养基,使枯草芽孢杆菌黑色变种可以形成稳定的黑色色素,对枯草芽孢杆菌黑色变种的选择培养具有重要意义。

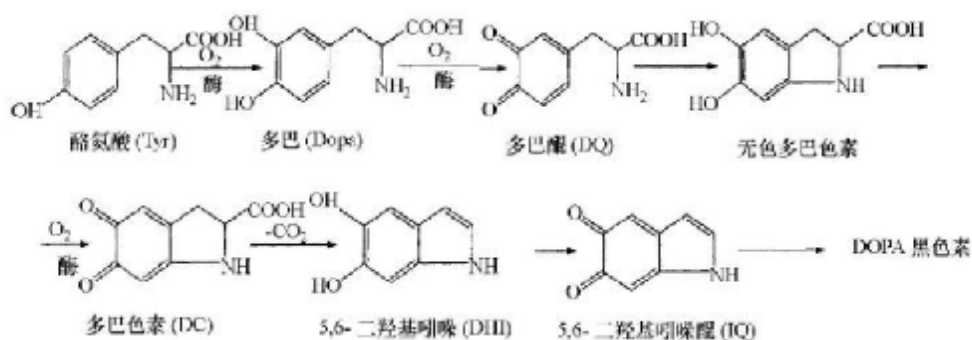


图3 黑色素的形成

参考 HIMEDIA 中 ISP medium No.7 (Tyrosine Agar) 培养基配方,结合枯草芽孢杆菌黑色变种生长所需营养物质,比较以下 1、2、3 号三种含酪氨酸的培养基(见表 5),筛选出能使枯草芽孢杆菌黑色变种产生稳定黑色素的培养基。

将枯草芽孢杆菌黑色变种(ATCC 9372-1)和枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢(ATCC 9372-2),分别划线接种于三种培养基,37℃培养观察。发现:3号培养基上枯草芽孢杆菌黑色变种于48小时后最先产生黑色素,72小时后,黑色素积聚,菌落呈黑色,整体逐渐变黑(见图4~图6);2号培养基上枯草芽孢杆菌黑色变种于72小时后开始产生黑色素,92小时后菌落整体渐变黑;1号培养基上7天后开始形成黑色菌落。

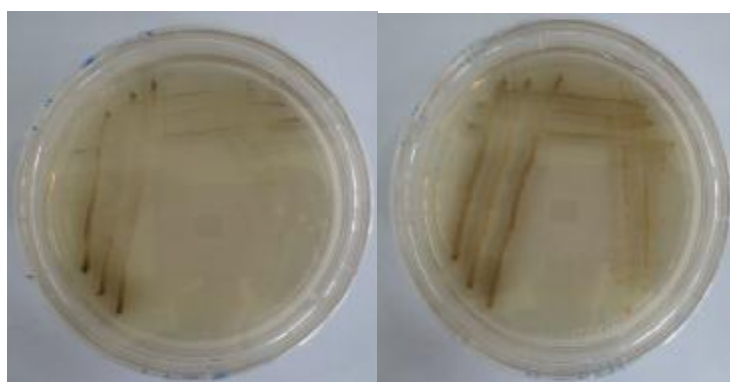
究其原因,因为1号培养基中微生物必须的营养物质碳源和氮源来源少,菌株生长缓慢,故分解利用酪氨酸能力弱;3号培养基成分上比2号培养基上增加了干酪素(又称酪蛋白,富含氨基酸),在保证适量碳源、氮源情况下,氨基酸的增加有利于枯草芽孢杆菌黑色变种

的生长，强化分解利用酪氨酸的能力。

综上所述，选用 3 号培养基作为枯草芽孢杆菌黑色变种的选择培养基，命名为酪氨酸培养基。

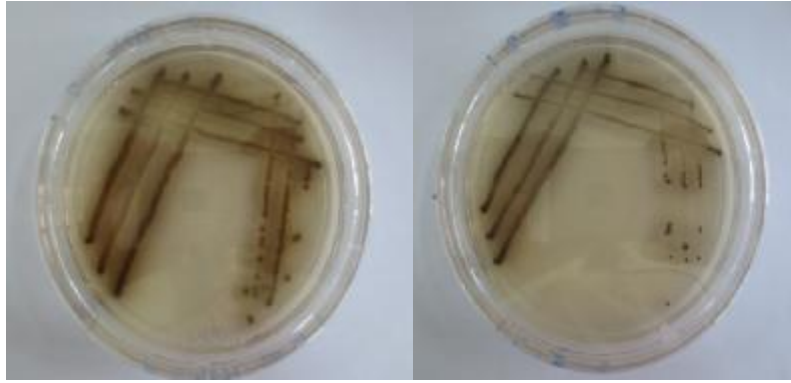
表5 含酪氨酸培养基配方

培养基	1 号	2 号	3 号
L-天冬酰胺 (g)	0.5	0.5	0.5
L-酪氨酸 (g)	0.5	0.5	0.5
胰蛋白胨 (g)	0	0.5	0.5
干酪素 (g)	0	0	0.5
葡萄糖 (g)	0	0.5	0.5
磷酸氢二钾 (g)	0.5	0.5	0.5
七水硫酸镁 (g)	0.5	0.5	0.5
氯化钠 (g)	0.5	0.5	0.5
琼脂 (g)	20	20	20
微量盐溶液 (ml)	1	1	1
蒸馏水 (ml)	1000	1000	1000



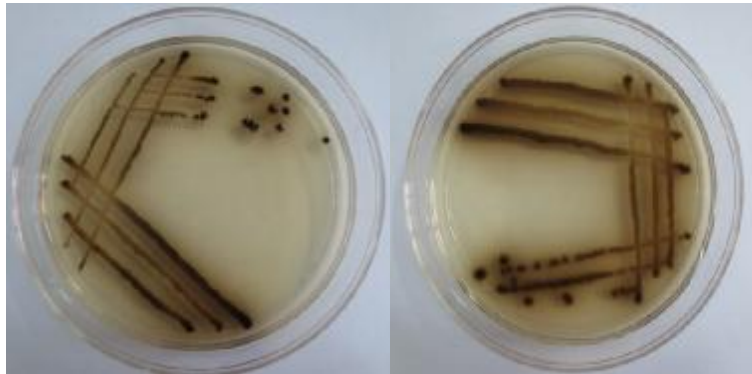
左 ATCC 9372-1；右 ATCC 9372-2

图4 枯草芽孢杆菌黑色变种 ATCC 9372 48 小时产黑色素特征 (3 号培养基)



左 ATCC 9372-1; 右 ATCC 9372-2

图5 草芽孢杆菌黑色变种 ATCC 9372 72 小时产黑色素特征 (3 号培养基)



左 ATCC 9372-1; 右 ATCC 9372-2

图6 枯草芽孢杆菌黑色变种 ATCC 9372 96 小时产黑色素特征 (3 号培养基)

5.1.2 生化鉴定方法研究

5.1.2.1 生理特征研究

枯草芽孢杆菌黑色变种作为枯草芽孢杆菌的一个亚种,属于芽孢杆菌科,为革兰氏阳性芽孢杆菌。故通过革兰氏染色和芽孢染色,可以区分产黑色素的非革兰氏阳性杆菌。

挑取黑色、灰色或灰黑色的特征菌落进行革兰氏染色和芽孢染色,进行菌体和芽孢形态观察。如果菌落颜色无法判断时,可进一步划线接种至酪氨酸琼脂培养基,在 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下培养72 h~96 h后观察。枯草芽孢杆菌黑色变种为革兰氏阳性菌,营养细胞杆状,单个或呈短链状排列;有芽孢,椭圆形,中生,不膨大。(见图7)



左革兰氏染色；右芽孢染色

图7 枯草芽孢杆菌黑色变种染色镜检结果

5.1.2.2 生化特征研究

为了便于生化检测项目的筛选，挑选应用较为广泛，环境中普遍存在，且与枯草芽孢杆菌黑色变种形态学较为相似的几种芽孢杆菌进行研究（见表6）。研究菌株和枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢悬液均购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

表6 供试芽孢菌株

中文名称	拉丁名称	来源	编号
枯草芽孢杆菌黑色变种	<i>Bacillus atrophaeus</i> (9372)	CICC 21608	9372-1
枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus subtilis</i>	CICC 10275	A
蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	CICC 10041	B
地衣芽孢杆菌	<i>Bacillus licheniformis</i>	CICC 21740	C
巨大芽孢杆菌	<i>Bacillus megaterium</i>	CICC 21080	D
嗜热脂肪芽孢杆菌	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	CICC 10142	E
短小芽孢杆菌	<i>Bacillus pumilus</i>	CICC 21088	F
环状芽孢杆菌	<i>Bacillus circulans</i>	CICC 10353	G
凝结芽孢杆菌	<i>Bacillus coagulans</i>	CICC 20138	H
枯草芽孢杆菌黑色变种的芽孢悬液	<i>Bacillus atrophaeus</i>	CICC	9372-2

本研究采用市售成品生化试剂（见表9）及自制生化试液对供试菌株进行数十项生化试验，旨在确定枯草芽孢杆菌黑色变种 ATCC 9372的生化谱。

（1）细菌微量生化试验

对供试菌株分别进行试验。微量生化鉴定管使用方法参照商品说明书，每种菌每个项目5个平行，重复做3次。

(2) 接触酶试验

具有过氧化氢酶的细菌，能催化过氧化氢生成水和新生态氧，可用来鉴别细菌的类型。对供试菌株按照接触酶试剂使用说明书进行接触酶试验，记录试验结果。

(3) 淀粉水解试验

某些细菌可以产生分解淀粉的酶，淀粉水解后遇碘不再变蓝色。

挑取少量供试菌株纯菌落在淀粉培养基平板上接菌，37℃培养2天。结果观察时，将碘试剂滴于培养基表面，若菌落周围出现无色透明环，为阳性；菌落周围无透明环且培养基呈蓝色则为阴性。

表7 主要试剂一览表

名称	厂家
硫化氢生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司
马尿酸盐生化管	
甘油生化鉴定管	
苦杏仁苷生化鉴定管	
阿拉伯糖生化鉴定管	
7%NaCl 生化鉴定管	
硝酸盐还原生化管	
水杨素生化鉴定管	
肌醇生化鉴定管	
侧金盏花醇生化鉴定管	
明胶生化鉴定管	
精氨酸双水解酶生化鉴定管	
鸟氨酸脱羧酶生化鉴定管	
赖氨酸脱羧酶生化鉴定管	
0.5% 美蓝牛乳生化鉴定管	
API 50CHB	上海梅里埃生物工程有限公司

通过10种生化试验，枯草芽孢杆菌黑色变种 ATCC 9372可与蜡样芽孢杆菌、地衣芽孢杆

菌、巨大芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、环状芽孢杆菌和凝结芽孢杆菌区别开来。枯草芽孢杆菌黑色变种 ATCC 9372和枯草芽孢杆菌在接触酶、硝酸盐还原、甘油利用、明胶液化、淀粉水解、阿拉伯糖利用、苦杏仁苷利用、7%NaCl 生长实验结果一致，但是，9372-1和9372-2能利用甘露糖，枯草芽孢杆菌不能利用甘露糖，9372-1和9372-2不能利用甘露醇，枯草芽孢杆菌能利用甘露醇，通过甘露糖和甘露醇利用试验结果成功区别枯草芽孢杆菌黑色变种和枯草芽孢杆菌。有效鉴定出枯草芽孢杆菌黑色变种 ATCC 9372。总体来看实验结果，10种菌都能通过1个或者多个生化实验结果差异以区分彼此，例如，枯草芽孢杆菌（A）通过甘油利用、淀粉水解、甘露醇利用实验结果可以和蜡样芽孢杆菌区别开来。

表8 供试菌株微量生化反应结果

项目	9372-1	9372-2	A	B	C	D	E	F	G	H
接触酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
甘油	+	+	-	-	+	+	+	±	□	+
明胶	+	+	+	+	+	±	+	+	-	-
淀粉水解	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
甘露糖	+	+	-	-	+	+	+	+	-	±
阿拉伯糖	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
苦杏仁苷	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
甘露醇	-	-	+	-	+	+	±	+	-	-
7%NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：+ 90%~100%的实验结果为阳性；- 90%~100%的实验结果为阴性；±大多数实验结果阳性；□大多数实验结果阴性。

（4）API 50 CHB 试验

法国梅里埃 API 是一系列微生物鉴定系统，始创于1970年。由于其简单、可靠和快速而广泛应用。国际上，API 系列产品已成为公认的鉴定细菌参考标准。API 50 CHB 试剂条含有50个生化试验微量孔，通过研究微生物对碳水化合物和其衍生物的发酵，对芽孢杆菌进行鉴定，它是一个快速、简便、标准化的鉴定系统。因此，本文选取用于鉴定芽孢杆菌 API 50 CHB 试剂条对供试菌株进行试验，意在研究枯草芽孢杆菌黑色变种对碳水化合物和其衍生物发酵特性。

（5）API 50CHB 试剂条

选用 API 50CHB 试剂条进行生化检测，API 50CHB 结果见表11。

API 50 CHB，利用49种糖酵解反应来鉴定芽孢杆菌，是芽孢杆菌分类的常用快速鉴定

工具。从实验结果中看出，枯草芽孢杆菌黑色变种 ATCC 9372被鉴定为枯草芽孢杆菌，从此结果看出，枯草芽孢杆菌黑色变种和枯草芽孢在糖发酵生化特征上极为相似，无法通过 API 50 CHB 进行快速鉴定。但在 API 50 CHB 鉴定软件中芽孢杆菌数据库能准确鉴定枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、嗜热芽孢杆菌、短小芽孢杆菌。此外，巨大芽孢杆菌、环状芽孢杆菌和凝结芽孢杆菌利用 API 50 CHB 芽孢杆菌鉴定系统鉴定时结果不能接受。

表9 供试菌株 API 50CHB 实验结果

项目	9372-1	9372-2	A	B	C	D	E	F	G	H
5 酮基葡萄糖酸钾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 酮基葡萄糖酸钾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
葡萄糖酸钾	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-
L-阿拉伯醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-阿拉伯醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-岩藻糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-岩藻糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-塔格糖	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
D-来苏糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-土伦糖	-	-	?	+	+	?	-	+	+	?
D-龙胆二糖	-	-	+	-	-	?	+	+	-	+
木糖醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
糖原	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
淀粉	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
D-棉子糖	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-
D-松三糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
菊粉	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
D-海藻糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-蔗糖	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D-密二糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-乳糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-麦芽糖	+	+	+	+	+	?	-	-	+	-
D-纤维二糖	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
水杨苷	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
七叶灵柠檬酸铁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARBULIN	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+
苦杏仁苷	-	-	-	-	+	?	-	+	?	-
N-乙酰葡萄糖胺	+	+	-	+	+	+	?	-	-	+

项目	9372-1	9372-2	A	B	C	D	E	F	G	H
甲基- α D-吡喃葡萄糖苷 (MDG)	+	+	+	-	+	?	-	-	-	-
甲基- α D-吡喃葡萄糖苷 (MDM)	-	-	-	-	-	-	?	-	-	?
山梨醇	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
甘露醇	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
肌醇	-	+	+	-	-	-	?	-	-	?
卫茅醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-鼠李糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-山梨糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-甘露糖	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
D-果糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-半乳糖	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
甲基- β D 吡喃木糖苷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-侧金盏花醇-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-木糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-木糖	-	-	+	-	?	-	?	-	-	?
D-核糖	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
L-阿拉伯糖	-	-	+	-	+	?	?	-	-	+
D-阿拉伯糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
赤藻糖醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
甘露醇	+	+	+	?	?	+	?	+	-	+
结果	枯草芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	不能接受	不能接受	短小芽孢杆菌	不能接受	不能接受
id%	65.2%	82.4%	99.4%	99.7%	97.7%	无	无	99.9%	无	无

(6) 生化试验总结

确定甘油、硝酸盐、淀粉、甘露糖、甘露醇、苦杏仁苷作为枯草芽孢杆菌黑色变种的生化鉴定项目。

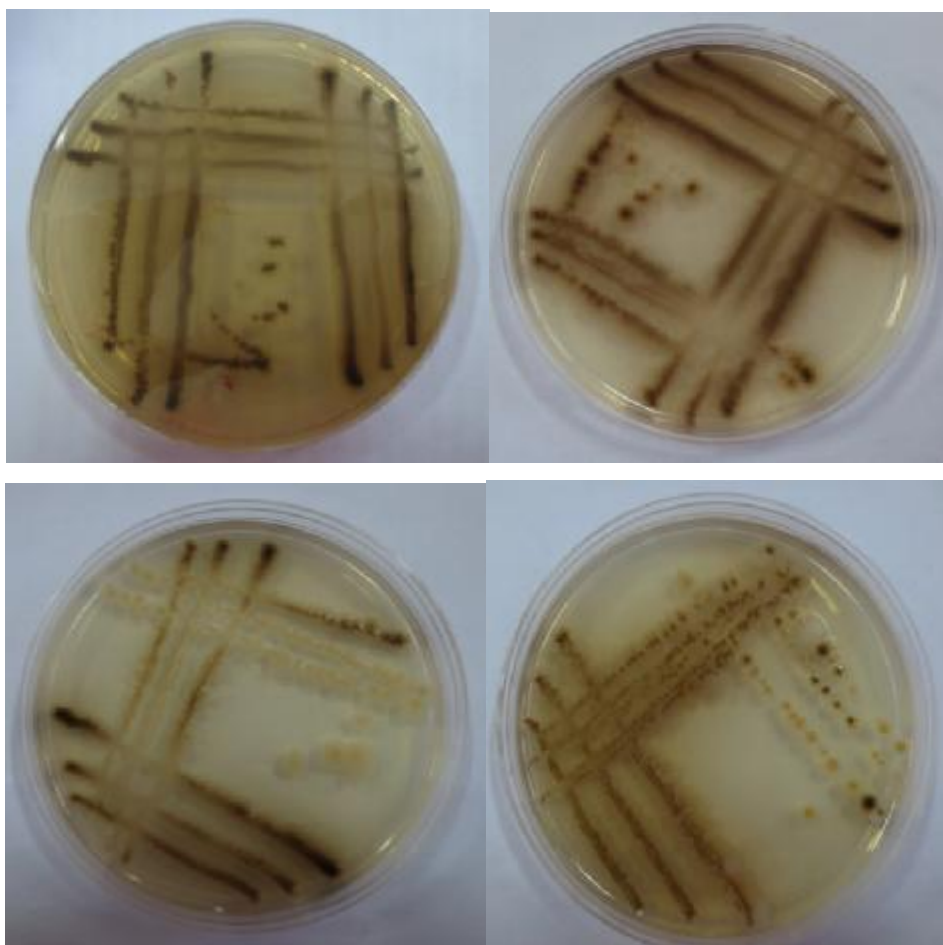
5.1.2.3 适用性讨论

实验菌株：市场上常用的4种枯草芽孢杆菌黑色变种生物指示剂，如表10。

表10 4种市场品牌枯草芽孢杆菌黑色变种生物指示剂

品牌	厂家	编号
富捷牌环氧乙烷灭菌 ATCC 9372 生物指示剂	杭州富捷生物技术有限公司	HF
鑫四环牌生物指示剂 ATCC 9372 菌片	北京鑫四环消毒技术开发有限公司	BX
鸿雍牌 ATCC 9372 生物指示剂	上海鸿雍生物科技有限公司	SH
3M 牌环氧乙烷灭菌生物培养指示剂	明尼达矿业制造（上海）国际贸易有限公司	3M

取各品牌枯草芽孢杆菌黑色变种生物指示剂于营养肉汤上37℃培养18 h~24 h，取菌液在酪氨酸培养基上划线37℃培养72 h，4种品牌枯草芽孢杆菌黑色变种均能在酪氨酸培养基上产生黑色素，见图8。



左上 BX（鑫四环牌枯草芽孢杆菌黑色变种）；右上 HF（富捷牌枯草芽孢杆菌黑色变种）
左下 3M（3M牌枯草芽孢杆菌黑色变种）； 右下 SH（鸿雍牌枯草芽孢杆菌黑色变种）

图8 枯草芽孢杆菌黑色变种菌落特征

挑取纯化枯草芽孢杆菌黑色变种进行生化实验，4种品牌枯草芽孢杆菌黑色变种生化实验结果如表11。

表11 4种市场品牌枯草芽孢杆菌黑色变种生物指示剂生化实验结果

项目	BX	HF	3M	SH
革兰氏阳性菌	+	+	+	+
芽孢	+	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+	+
甘油	+	+	+	+
淀粉水解	+	+	+	+
甘露糖	+	+	+	+

项目	BX	HF	3M	SH
苦杏仁苷	-	-	-	-
甘露醇	-	-	-	-

将实验结果与枯草芽孢杆菌黑色变种 ATCC 9372生化谱进行比对，BX、HF、SH、3M 生化实验结果表明4种品牌内含菌均为枯草芽孢杆菌黑色变种。结合4种品牌枯草芽孢杆菌黑色变种均能在酪氨酸培养基上产生黑色素这一生理特征，将4种品牌内含菌鉴定为枯草芽孢杆菌黑色变种。可见，该方法具有很好的适用性。

5.1.2.4 结果分析

根据《伯杰细菌鉴定手册》，对菌株的形态学进行仔细检查是鉴定的第一步，而细菌详细分类的典型做法是以生理学和生物化学实验结果为基础的。通过研究，枯草芽孢杆菌黑色变种的生化特点为：在酪氨酸培养基上产生黑色菌落，革兰氏染色阳性，产芽孢，能甘油利用、硝酸盐还原、淀粉水解、甘露糖利用，苦杏仁苷不利用、甘露醇不利用。

5.2 术语和定义

参考标准中有关芽孢杆菌的定义，结合枯草芽孢杆菌黑色变种的生理、生化特性，进行本标准枯草芽孢杆菌黑色变种的定义规定。

表12 芽孢杆菌定义比较汇总

来源	指标	定义
《伯杰氏细菌手册》	枯草芽孢杆菌黑色变种	在含有酪氨酸的培养基中形成黑色色素，色素形成不稳定。
SN 2728-2010	枯草芽孢杆菌	革兰氏阳性杆菌，芽孢杆菌科，芽孢杆菌属，内生孢子，接触酶阳性，发酵葡萄糖产酸，水解淀粉，不水解马尿酸盐，可还原硝酸盐，水解酪素，在55℃可生长的一群芽孢杆菌。
NY 1461-2007	地衣芽孢杆菌	属于芽孢杆菌科、芽孢杆菌属，菌体杆状，革兰氏阳性，有芽孢，中生。可抵抗不良环境条件，在饲料工业被制成微生物添加剂使用。
枯草芽孢杆菌黑色变种 ATCC 9372的特性及其应用	枯草芽孢杆菌黑色变种	属于芽孢杆菌属，营养细胞杆状，单个或呈短链状排列，细胞宽0.5~1.0 μm，长2.0~4.0 μm，革兰染色阳性；芽孢椭圆形，中生，不膨大，在胰酪大豆琼脂培养基上菌落表面光滑，不透明，圆形，该菌株最显著的标志就是在含有机氮培养基上菌落呈褐色或棕红色。
本标准	枯草芽孢杆菌黑色变种	可在含酪氨酸的培养基上形成黑色色素的革兰氏阳性芽孢杆菌，其营养细胞呈杆状，单个或呈短链状排列，芽孢椭圆形，中生，不膨大，能利用甘油、甘露糖，还原硝酸盐，水解淀粉，不能利用苦杏仁苷、甘露醇。

5.3 方法原理

灭菌处置后的废水通过孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤，细菌和芽孢被截留在滤膜上，然后将滤膜置于酪氨酸选择性培养基上，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h~96 h，枯草芽孢杆菌黑色变种产生的酪氨酸酶可分解利用酪氨酸形成黑色素，产生黑色的特征菌落。对特征菌落进行染色镜检和生化试验做进一步鉴定，枯草芽孢杆菌黑色变种为革兰氏阳性芽孢杆菌，营养细胞呈杆状，单个或呈短链状排列，芽孢椭圆形，中生，不膨大，能利用甘油、甘露糖，还原硝酸盐，水解淀粉，不能利用苦杏仁苷、甘露醇。根据结果报告检出或未检出枯草芽孢杆菌黑色变种。

5.4 干扰和消除

活性氯具有氧化性，能破坏微生物细胞内的酶活性，导致细胞死亡，可在样品采集时加入硫代硫酸钠溶液排除干扰。

重金属离子具有细胞毒性，能破坏微生物细胞内的酶活性，导致细胞死亡，可在样品采集时加入乙二胺四乙酸二钠溶液排除干扰。

5.5 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准和分析纯试剂，实验用水为新制备的蒸馏水或去离子水。

5.5.1 酪氨酸琼脂培养基（选择培养基）

参考 HIMEDIA 中 ISP medium No.7 (Tyrosine Agar) 培养基配方及 5.1.1 选择培养基研究结果，确定本标准培养基配方如下：

A 成分

A.1 组分 A

L-天冬酰胺	0.5 g
L-酪氨酸	0.5 g

A.2 组分 B

氯化钠	0.5 g
胰蛋白胨	0.5 g
干酪素	0.5 g
葡萄糖	0.5 g
磷酸氢二钾	0.5 g
七水硫酸镁	0.5 g
微量盐溶液	1 ml
琼脂	20 g
蒸馏水	1000 ml

其中微量盐溶液配方：

七水合硫酸亚铁	1.360 g
二水合氯化铜	0.027 g

六水合氯化钴	0.040 g
二水合钼酸钠	0.025 g
氯化锌	0.020 g
硼酸	2.850 g
四水合二氯化锰	1.800 g
酒石酸钠	1.770 g
蒸馏水	1000 ml

B 制法

加热溶解 B 组分后，再加入 A 组分，搅拌溶解，121℃灭菌 15min。调节 pH 至 7.0 左右。倒入无菌培养皿后待用，每皿 25 ml~30 ml。

5.5.2 营养琼脂培养基

A 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g~20.0 g
蒸馏水	1000 ml

B 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内，调节 pH 至 7.2~7.4。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化，121℃高压灭菌 15 min。

5.5.3 淀粉培养基

A 淀粉培养基

A.1 成分

蛋白胨	5 g~10 g
酵母浸膏	1 g
牛肉膏	3 g
淀粉	2 g
琼脂	15 g~20 g
蒸馏水	1000ml

A.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内，调节 pH 至 7.2~7.4。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化，121℃高压灭菌 20 min。倒平板备用。

B 试剂-碘液

B.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 ml

B.2 制法

将碘与碘化钾先行混合，加入蒸馏水少许充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至 300 ml。

C 接种

取待检菌株，接种于上述平板，适温培养。

D 观察

培养一定时间，形成明显菌落后，在平板上滴加碘液平板呈蓝黑色，菌落周围如有不变色透明圈，表示淀粉水解阳性；仍是蓝黑色为阴性。

5.5.4 硝酸盐培养基

A 培养基

肉汁胨培养基	1000 ml
KNO ₃	1.0 g
pH	7.0~7.6
每管分装 4 ml~5 ml，121℃蒸汽灭菌 15 min~20 min。	

B 试剂

B.1 格里斯氏 (Griess) 试剂

A 液：对氨基苯磺酸	0.5 g
稀醋酸（10%左右）	150 ml
B 液：α-萘胺	0.1 g
蒸馏水	20 ml
稀醋酸（10%左右）	150 ml

B.2 二苯胺试剂

将 0.5 g 二苯胺溶于 100 ml 浓硫酸中，用 20 ml 蒸馏水稀释。

C 接种

将测定菌接种于硝酸盐液体培养基中，置于适温培养 1 d~5 d。每株菌作 2 个重复，另留两管不接种作为对照。

D 操作

取两支干净的空试管或在比色瓷盘小窝中倒入少许培养 1 d~5 d 的培养液，再各滴加一滴 A 液及 B 液。

E 结果观察

当培养液中滴加 A 液、B 液后，溶液如变为粉红色、玫瑰红色、橙色、棕色等表示亚硝酸盐存在，为硝酸盐还原阳性。如无红色出现，可滴加一、二滴二苯胺试剂，此时如呈蓝色反应，则表示培养液中仍有硝酸盐，又无亚硝酸盐反应，表示无硝酸盐还原作用；如不呈蓝色反应，表示硝酸盐和形成的亚硝酸盐都已还原成其他物质，故仍按硝酸盐还原阳性处理。

5.5.5 甘油复红肉汤培养基

A 成分

蛋白胨	20 g
甘油	10 ml

无水氯化镁	1.4 g
无水硫酸钾	10 g
碱性品红	1.0 g
蒸馏水	1000 ml

B 制法

取蛋白胨、氯化镁和硫酸钾加入水中，微温溶解，调节 pH 至 7.3 ± 0.1 ，加入甘油，加热溶化，混匀，分装于试管， 121°C 高压灭菌 20 min。

C 操作

取被检菌接种于甘油复红肉汤培养基中，于 35°C 培养，观察 2 d~8 d。

D 结果观察

培养液颜色变为紫红色为阳性，表示甘油被细菌分解生成丙酮酸，丙酮酸脱去羧基为乙醛，乙醛与无色的复红生成深紫红色的醌式化合物；否则为阴性。

5.5.6 甘露糖/甘露醇生化培养基

A 成分

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1.0 g
KCl	0.2 g
MgSO_4	0.2 g
酵母膏	0.2 g
琼脂	5 g~6.0 g
甘露糖/甘露醇	10.0 g
蒸馏水	1000 ml
溴甲酚紫(0.04%)	15 ml

B 制法

将以上成分加热溶解，调节 pH 至 7.0~7.2，分装试管，培养基高度约 4 cm~5 cm， 112°C 蒸汽灭菌 30min。

C 操作

用菌株穿刺接种于上述培养基，适温培养，1 d~5 d 后观察。

D 结果观察

若培养后培养物变黄，表示产酸，为阳性；不变或变蓝（紫）则为阴性。

5.5.7 苦杏仁苷生化培养基

A 成分

蛋白胨	5 g
溴甲酚紫（1.6%）	0.625 ml
牛肉膏	5 g
D-葡萄糖	0.5 g
琼脂	3 g~6 g
苦杏仁苷	5 mg
蒸馏水	1000 ml

PH

6.0~6.3

B 制法

将以上成分加热溶解，调节 pH 至 6.0~6.3，分装小试管，每管 3 ml~4 ml，121℃ 灭菌 10 min。

C 操作

用菌株穿刺接种于上述培养基，适温培养，接种后封油。

D 结果观察

指示剂呈黄色者为阳性，呈紫色为阴性。

5.5.8 革兰氏染色液

A 试剂

A.1 结晶紫染色液

A.1.1 成分

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20 ml
1%草酸铵水溶液	80ml

A.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

A.2 革兰氏碘液

A.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 ml

A.2.2 制法

将碘与碘化钾先行混合，加入蒸馏水少许充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至 300 ml。

A.3 沙黄复染液

A.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 ml
蒸馏水	90 ml

A.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

B 操作

- 涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染液，染 1 min，水洗。
- 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。
- 滴加 95%乙醇脱色约 15 s~30 s，直至染色液被洗掉，不要过分脱色，水洗。
- 滴加沙黄复染液，复染 1 min，水洗、待干、镜检。

C 结果观察

革兰氏阳性菌呈蓝紫色，革兰氏阴性菌呈红色。

5.5.9 芽孢染色液

A 试剂

A.1 饱和孔雀绿水溶液

A.1.1 成分

孔雀绿	7.6 g
蒸馏水	100 ml

A.1.2 制法

将孔雀绿加入蒸馏水充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水定容至 100 ml。

A.2 0.5%番红溶液

A.2.1 成分

番红	0.5g
蒸馏水	100 ml

A.1.2 制法

将番红加入蒸馏水充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水定容至 100 ml。

B 操作

- 将生有芽孢的菌涂片，火焰上固定，用饱和孔雀绿水溶液染色10 min，水洗。
- 滴加0.5%番红溶液复染30 s，水洗，吸干。
- 镜检。

C 结果观察

芽孢呈绿色，菌体呈红色。

5.4.2~5.4.9可采用市售合格的商品化培养基或试剂。

5.5.10 硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)。

5.5.11 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na_2)。

5.5.12 硫代硫酸钠溶液： $\rho(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.10\text{g/ml}$ 。

硫代硫酸钠溶液 (0.10 g/ml)：称取硫代硫酸钠15.7g，溶于适量实验用水，定容至100 ml，临用现配。参考《水质 总大肠菌群和粪大肠菌群的测定 纸片法》HJ 755-2015。考虑到硫代硫酸钠 (CAS: 7772-98-7) 具有还原性，可被空气氧化，故硫代硫酸钠溶液是临用时配制。

5.5.13 乙二胺四乙酸二钠溶液： $\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})=0.15\text{g/ml}$ 。

称取EDTA- Na_2 15 g，溶于适量实验用水，定容至100 ml，此溶液保质期为30 d。参考《水质 总大肠菌群和粪大肠菌群的测定 纸片法》(HJ 755-2015)。

5.5.14 无菌水。

实验用水应满足《分析实验用水规格和实验方法》(GB/T 6682-2008)中三级水的要求，经121℃高压蒸汽灭菌20 min，备用。

5.5.15 无菌滤膜：直径 50mm，孔径 0.45 μm 的醋酸纤维滤膜。

参考《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》(HJ 347.1-2018)中规定：按无菌操作要求包

扎，经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min，晾干备用；或将滤膜放入烧杯中，加入实验用水，煮沸灭菌 3 次，15 min/次，前 2 次煮沸后需更换水洗涤 2~3 次。

5.5.16 封口膜。

5.6 仪器和设备

5.6.1 采样瓶：具螺旋帽或磨口塞的 500 ml 广口玻璃瓶。

5.6.2 恒温培养箱：允许温度偏差 36℃±1℃。

5.6.3 高压蒸汽灭菌器：121℃ 可调。

5.6.4 pH 计：准确到 0.1pH 单位。也可采用 pH 比色管或 pH 精密试纸。

5.6.5 显微镜：物镜 10×、20×、40×倍，油镜 100×倍，目镜 10×或 15×倍。

5.6.6 分析天平：感量 0.0001g。

5.6.7 培养皿：直径 90mm。

5.6.8 过滤装置：配有砂芯滤器和真空泵，抽滤压力勿超过-50kPa。

5.6.9 接种环。

5.6.10 镊子。

5.6.11 移液管：1 ml±0.01 ml、10 ml±0.1 ml。也可采用量筒或计量合格的可调式移液器。

5.6.12 量筒：100 ml。

5.6.13 三角瓶：100 ml。

5.6.14 酒精灯。

5.6.15 无菌操作设备：无菌室、超净工作台、生物安全柜。

5.7 样品

5.7.1 样品采集

点位布设及采样频次按照 HJ/T 91 和 HJ/T 494 的相关规定执行。

本标准规定：使用灭菌过的采样装置采集经灭菌处置后的含活性微生物废水样品，放入已经灭菌的采样瓶中，采样瓶不得用样品洗涤。

根据美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》（22 版）微生物检验部分的相关规定，①100 ml 水样加入硫代硫酸钠溶液[$\rho(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.10 \text{ g/ml}$] 0.1 ml 去除水样中余氯，以排除干扰；②100 ml 水样加入乙二胺四乙酸二钠（EDTA- Na_2 ）溶液[$\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O})=0.15 \text{ g/ml}$]0.3 ml 去除水样中重金属离子的干扰。

故本标准规定：如果采集的是含有活性氯的样品，需在采样瓶灭菌前加入硫代硫酸钠溶液，以除去活性氯对细菌的抑制作用（每 125 ml 容积加入 0.1 ml 的硫代硫酸钠溶液）；如果采集的是重金属离子含量较高的样品，则在采样瓶灭菌前加入乙二胺四乙酸二钠溶液，以消除干扰（每 125 ml 容积加入 0.3 ml 的乙二胺四乙酸二钠溶液）。

注：15.7 mg 硫代硫酸钠证去除样品中 1.5 mg 活性氯，硫代硫酸钠用量可根据样品实际活性氯量调整。

5.7.2 样品保存

各种水体，特别是地表水、废水水样，易受物理、化学或生物的作用，从采水到检验的时间间隔内会很快发生变化。因此，当水样不能及时运到实验室，或运到实验室不能立即进行分析时，必须采取相关措施。

根据《水和废水监测分析方法》（第四版）和 HJ 493 细菌类样品保存要求，采集好的水样应尽快运往实验室进行检验，采样后应 2 h 内检测。否则，应 10 °C 以下冷藏但不得超过 6 h。实验室接样后，不能立即开展检测的，将样品放入 0°C~4 °C 冷藏，在 2 h 内检测。

5.7.3 干扰和消除

根据美国《Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater》（22 版）微生物检验部分的相关规定，①100 ml 水样加入硫代硫酸钠溶液[$\rho(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0.10 \text{ g/ml}$] 0.1 ml 去除水样中余氯，以排除干扰；②100 ml 水样加入乙二胺四乙酸二钠（EDTA- Na_2 ）溶液[$\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 0.15 \text{ g/ml}$]0.3 ml 去除水样中重金属离子的干扰。其中，15.7 mg 硫代硫酸钠可保证去除水样中 1.5 mg 余氯，硫代硫酸钠溶液用量可根据样品实际余氯量调整。

本标准规定：如果是经加氯处理的废水样品，需在采样瓶灭菌前加入 0.4 ml 硫代硫酸钠溶液（4.13）；如果是重金属离子含量较高的废水样品，则在采样瓶灭菌前加入 1.2 ml 乙二胺四乙酸二钠（EDTA- Na_2 ）溶液，以消除干扰。酸性样品，需调节样品的 pH 值至 7.0~8.0。

5.8 分析步骤

5.8.1 方法程序

样品中枯草芽孢杆菌黑色变种的鉴定程序见下图 9。

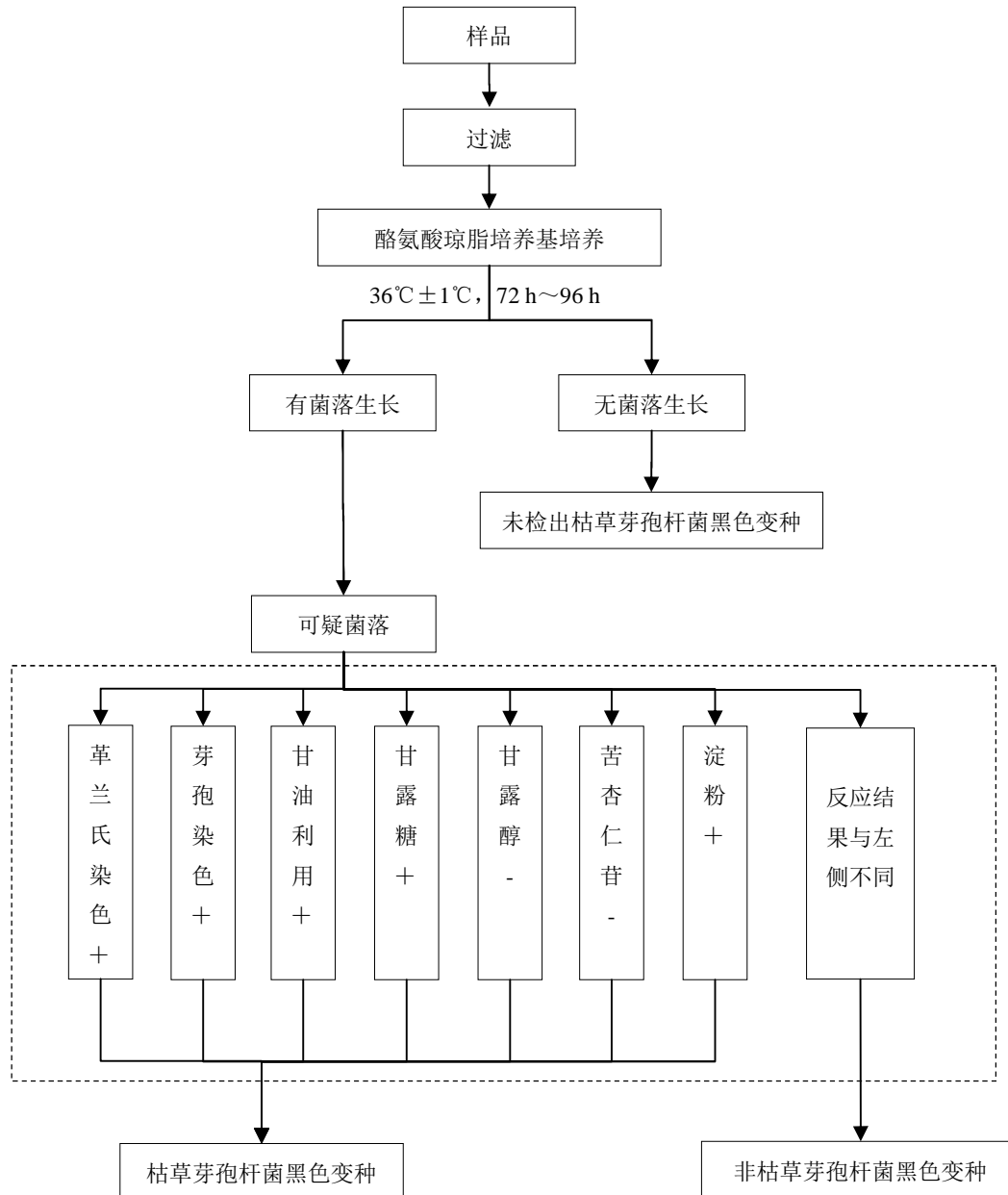


图9 枯草芽孢杆菌黑色变种检测流程

5.8.2 样品抽滤

参考《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》(HJ 347.1-2018)中“9.1 样品过滤”内容：用灭菌镊子以无菌操作夹取无菌滤膜贴放在已灭菌的过滤装置上，固定好过滤装置。将样品充分混匀后抽滤，以无菌水冲洗器壁 2~3 次。样品过滤完成后，再抽气约 5 s，关上开关。

本标准规定：用灭菌镊子以无菌操作夹取无菌滤膜贴放在已灭菌的过滤装置上，固定好过滤装置。将样品充分混匀后取 100 ml(高浓度样品可减少过滤样品量或将样品稀释)抽滤，以无菌水冲洗器壁 2~3 次。样品过滤完成后，再抽气约 5 s，关上开关。

5.8.3 样品培养

参考《水质 粪大肠菌群的测定 滤膜法》(HJ 347.1-2018)中“9.2 培养”内容：用灭菌镊子夹取滤膜移放在 MFC 培养基上，滤膜截留细菌面向上，滤膜应与培养基完全贴紧，两者间不得留有气泡，然后将培养皿倒置，放入恒温培养箱内， $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ 。

本标准规定：用灭菌镊子夹取滤膜移放在酪氨酸琼脂培养基上，滤膜截留细菌面向上，滤膜应与培养基完全贴紧，两者间不得留有气泡，然后用石蜡质封口膜封好培养皿，倒置培养皿，放入恒温培养箱内， $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $72\text{ h} \sim 96\text{ h}$ 。

培养 96h 后，如培养基上未有菌落生长，则试验终止；如培养基上有菌落生长，则挑取黑色的特征菌落于营养琼脂培养基上， $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h，待鉴定。同时将已挑菌落的酪氨酸琼脂培养基培养皿储存于 $2^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ ，以备必要时复查。

若菌落颜色无法判断时，可再次划线接种至酪氨酸琼脂培养基培养后观察；若菌落为灰色或灰黑色，可适当延长培养时间后观察，培养时间不超过 7 d。

(1) 培养温度研究

分析参考现有标准中(表 14) 枯草芽孢杆菌黑色变种的培养温度和培养时间，探讨枯草芽孢杆菌黑色变种在 $34^{\circ}\text{C} \sim 38^{\circ}\text{C}$ 培养 1d~7 d 的生长状况，见表 15。

表13 枯草芽孢杆菌黑色变种参考培养温度和培养时间

来源	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间 (h)	备注
《医院消毒供应中心 第三部分：清洗消毒及灭菌效果监测标准》(WS 310.3-2016)	36 ± 1	48	无菌生长时培养至第 7 日
《高致病性病原微生物实验室污染物排放标准》(征求意见稿)	35 ± 0.5	24 ± 2	枯草芽孢杆菌黑色变种 (<i>Bacillus Subtilis</i> ATCC.9372) 培养时：肉汤培养基， 37°C 震荡培养 24 h。
《病原微生物实验室污染物排放标准》(征求意见稿)	35 ± 0.5	24 ± 2	

表14 枯草芽孢杆菌黑色变种在不同温度、不同培养时间下的生长情况表

培养时间	温度				
	34°C	35°C	36°C	37°C	38°C
1 d	+	+	+	+	+
2 d	+	+	+	+	+
3 d	+	+	+	+	+
4 d	+	+	+	+	+
5 d	+	+	+	+	+

培养时间	温度				
	34℃	35℃	36℃	37℃	38℃
6 d	+	+	+	+	+
7 d	+	+	+	+	+

注：“+”代表菌落生长

根据表 15 可以发现，枯草芽孢杆菌黑色变种在 34℃~38℃ 下都能良好生长。此外，根据实验结果发现在培养第三天菌落都呈现了较为明显的黑色，故参考《医院消毒供应中心第三部分：清洗消毒及灭菌效果监测标准》（WS 310.3-2016），选择 36℃±1℃ 作为枯草芽孢杆菌黑色变种的培养温度。

（3）培养时间研究

枯草芽孢杆菌黑色变种从培养第二天菌落就开始呈现灰黑色，到第三天出现了较为明显的黑色，直至第四天已经出现了稳定的黑色菌落。故确定枯草芽孢杆菌黑色变种的培养时间为 72 h~96 h。

5.8.4 样品鉴定

5.8.4.1 染色镜检

根据《伯杰细菌鉴定手册》：对菌株的形态学进行仔细检查时鉴定中的第一步。枯草芽孢杆菌黑色变种作为枯草芽孢杆菌的一个亚种，属于芽孢杆菌科，为革兰氏阳性芽孢杆菌。故通过革兰氏染色和芽孢染色，可以区分其它产黑色素的非革兰氏阳性芽孢杆菌。

因此，挑取黑色特征菌落进行革兰氏染色和芽孢染色，进行菌体和芽孢形态观察。如果菌落颜色无法判断时，可进一步划线接种至酪氨酸琼脂培养基，在 36℃±1℃ 下培养 72 h~96 h 后观察。枯草芽孢杆菌黑色变种为革兰氏阳性菌，营养细胞杆状，单个或呈短链状排列；有芽孢，椭圆形，中生，不膨大。（见图 10）

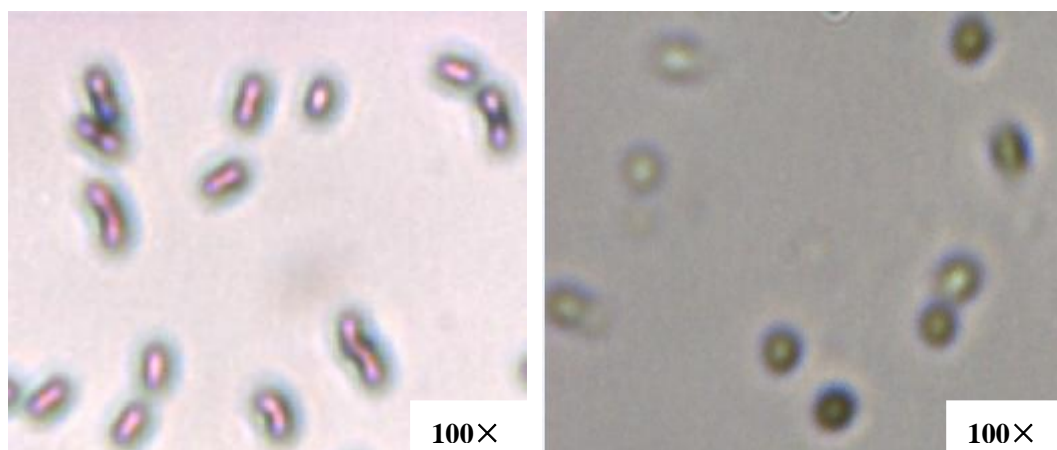


图 10 枯草芽孢杆菌黑色变种染色镜检图（左：革兰氏染色；右：芽孢染色）

本标准规定：挑取可疑菌落（菌落颜色无法判断时，可再次划线接种至酪氨酸琼脂培养

基后观察)，分别使用革兰氏染色液和芽孢染色液染色，具体操作及结果观察详见标准文本附录 B，若使用市售商品化试剂，则按说明书操作，然后镜检。

5.8.4.2 生化试验

根据《伯杰细菌鉴定手册》：细菌详细分类的典型做法是以生理学和生物化学实验结果为基础。根据5.1.2生化方法研究，确定甘油利用、硝酸盐还原、淀粉水解、甘露糖利用，苦杏仁苷不利用、甘露醇不利用为枯草芽孢杆菌黑色变种的生化特点。

挑取可疑菌落，分别接种到淀粉培养基、硝酸盐培养基、甘油复红肉汤培养基、甘露糖生化培养基、甘露醇生化培养基和苦杏仁苷生化培养基上，具体操作及结果观察详见附录 B，若使用市售商品化培养基，则按说明书操作。

5.8.5 对照试验

5.8.5.1 空白对照

用无菌水做实验室空白测定，培养后平皿应无菌生长，否则，该次样品测定结果无效，应查明原因后重新测定。

5.8.5.2 阴性及阳性对照

阴性、阳性菌株参考表 16。

将标准菌株制成浓度为 40CFU/L~600 CFU/L 的菌悬液，将菌悬液按标准文本中样品抽滤（9.2）和样品培养（9.3）要求操作，阳性菌株应呈现阳性反应；阴性菌株呈现阴性反应，否则，该次样品测定结果无效，应重新测定。

表15 阴性、阳性菌株生化反应结果

特征指标	阳性菌株	阴性菌株
	枯草芽孢杆菌黑色变种	地衣芽孢杆菌
酪氨酸培养基	黑色菌落	乳白色菌落
革兰氏染色	+	+
芽孢染色	+	+
甘油	+	+
硝酸盐还原	+	+
淀粉水解	+	+
甘露糖	+	+
苦杏仁苷	-	+
甘露醇	-	+

5.9 结果与报告

结果判定：符合 5.8.4、5.8.5，可鉴定为枯草芽孢杆菌黑色变种。

结果报告：样品中检出或未检出枯草芽孢杆菌黑色变种。

5.10 稳定性与特异性

5.10.1 稳定性

6 家实验室分别对自制的枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢悬液（按芽孢计）高浓度（ 10^6 个/100ml）、中浓度（ 10^4 个/100ml）、低浓度（ 10^2 个/100ml）进行菌种检测，检出率均为 100%，稳定性高。

参考《化学分析方法确认和验证指南》（GBT 27417-2017）中定性方法临界值的确定方法，同时考虑到微生物的特殊性，实验室内进行方法稳定性做了进一步研究。

取枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢悬液（ 10^8 /ml），依次十倍梯度稀释（芽孢均匀分布），配置成浓度为 10^2 /ml 芽孢悬液（经平板计数， 10^2 /ml 芽孢悬液中枯草芽孢杆菌黑色变种数量平均值为 550cfu/ml），再取 10ml 芽孢悬液（ 10^2 /ml）至 1000ml，即为浓度 550/100 ml 芽孢溶液，同样方法配置浓度为 5.5/100 ml 芽孢溶液，再将浓度为 5.5/100 ml 芽孢溶液的分别稀释 5 倍、3 倍得到 1/100ml、2/100ml 的浓度水样作为检测样品，按样品处理和生化检测方法进行枯草芽孢杆菌黑色变种的检测和鉴定。结果如下：

表16 枯草芽孢杆菌黑色变种检出限试验研究

浓度	平行	检出	检出率 (%)
10 ² /100 ml	1	+	100
	2	+	
	3	+	
	4	+	
	5	+	
	6	+	
	7	+	
	8	+	
	9	+	
	10	+	
10/100 ml	1	+	100
	2	+	
	3	+	
	4	+	
	5	+	
	6	+	

浓度	平行	检出	检出率 (%)
	7	+	
	8	+	
	9	+	
	10	+	
2/100 ml	1	+	100
	2	+	
	3	+	
	4	+	
	5	+	
	6	+	
	7	+	
	8	+	
	9	+	
	10	+	
1/100 ml	1	+	90
	2	+	
	3	+	
	4	+	
	5	+	
	6	+	
	7	+	
	8	+	
	9	+	
	10	-	
0/100 ml	1	-	0
	2	-	
	3	-	
	4	-	
	5	-	
	6	-	
	7	-	
	8	-	
	9	-	
	10	-	

由试验数据可知，当水样中枯草芽孢杆菌黑色变种的浓度为1/100 ml，其有效检出率也高达90%，具有非常好的稳定性和灵敏度。参考废水灭菌处理要求，废水中灭菌效果监测要求枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢的浓度达 $(2\sim 8)\times 10^4/\text{ml}$ ，本方法完全满足检测要求。

5.10.2 特异性

6家实验室分别对枯草芽孢杆菌黑色变种和地衣芽孢杆菌进行方法特异性检测，结果显示枯草芽孢杆菌黑色变种的检出率为100%，方法特异性强。

5.11 质量保证和质量控制

- (1) 每批样品按“9.5对照试验”进行全程序空白测定，定期使用有证标准菌株进行阳性、阴性对照试验。
- (2) 每20个样品或每批次样品（ ≤ 20 个/批）测定一个平行双样。
- (3) 对每批次培养基须使用有证标准菌株进行培养基质量检验。
- (4) 定期使用有证标准菌株/标准样品进行质量控制。

5.12 废物处理

实验产生的废弃物经121℃高压蒸汽灭菌20 min后处理。

6 方法验证

6.1 方法验证方案

6.1.1 参与方法验证的实验室、验证人员的基本情况

共有6家单位参加了方法验证工作，分别为江苏省环境监测中心、浙江省环境监测中心、江苏省常州环境监测中心（原常州市环境监测站）、上海市松江区环境监测站、上海市长宁区环境监测站和上海市青浦区环境监测站。参与验证人员相关信息见表17。

表17 方法验证单位及验证人员相关信息

姓名	职称	从事分析工作年限（年）	单位名称
张翔	工程师	10	常州市环境监测中心
张小琼	工程师	6	常州市环境监测中心
吴旦	工程师	12	常州市环境监测中心
于海燕	研究员	22	浙江省环境监测中心
顾卿	工程师	9	浙江省环境监测中心
张明	副教授	30	华东师范大学
徐佳丽	助理工程师	2	华东师范大学

姓名	职称	从事分析工作年限（年）	单位名称
李萍	工程师	22	上海市松江区环境监测站
夏秀芳	工程师	27	上海市松江区环境监测站
赵丹	助理工程师	4	上海市松江区环境监测站
俞晓蓓	工程师	11	上海市长宁区环境监测站
林杰	助理工程师	6	上海市长宁区环境监测站
潘枫燕	工程师	16	上海市青浦区环境监测站
钱晓霞	助理工程师	7	上海市青浦区环境监测站
陆晓怡	助理工程师	7	上海市青浦区环境监测站
康琦	助理工程师	4	上海市青浦区环境监测站

6.1.2 方法验证方案

参照《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）的要求，选择经灭菌处理和未经灭菌的添加枯草芽孢杆菌黑色变种废水、枯草芽孢杆菌黑色变种标准菌株、地衣芽孢杆菌标准菌株、模拟阳性样品（高、中、低三种浓度），于6家实验室进行方法验证。

验证所用的模拟样品均是采集某污水，人为添加枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢进行配置。如经灭菌处理和未经灭菌的添加枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢废水是通过采集某污水，按 10^6 个/100ml的浓度添加枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢，一份经过高压蒸汽灭菌处理，一份未作灭菌处理。

稳定性验证：6家实验室分别对自制的枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢悬液（按芽孢计）高浓度（ 10^6 个/100ml）、中浓度（ 10^4 个/100ml）、低浓度（ 10^2 个/100ml）进行菌种检测，检出率均为100%，方法稳定性高。

特异性验证：6家实验室分别对枯草芽孢杆菌黑色变种标准菌株（ATCC9372）、地衣芽孢杆菌标准菌株（CICC21740）进行检测，枯草芽孢杆菌黑色变种准确率100%，方法特异性强。

6.2 方法验证过程

参照《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》（HJ 168-2010）的规定，于2015年06月~2016年04月，组织验证试验，分别在浙江省环境监测站、常州市环境监测站、华东师范大学以及上海长宁区环境监测站、上海青浦区环境监测站和上海松江区环境监测站6家实验室进行验证。验证工作主要内容是灭菌效果评价验证和生化检测方法验证两部分内容。

（1）首先，通过筛选确定有资质和相关能力的方法验证单位，准备验证样品等，确定验证时间。在方法验证前，要通过各种交流形式让参加验证的操作人员都熟悉方法原理、操

作步骤及流程。验证过程中使用的仪器、设备、试剂等应符合方法的要求。

(2) 数据处理和分析。

(3) 《方法验证报告》见附一。

6.3 方法验证结论

本研究所建立的水中枯草芽孢杆菌黑色变种的生物监测方法包括消毒灭菌评价研究、和枯草芽孢杆菌黑色变种生化检测两部分内容，整个检测步骤简洁，方法特异性强，稳定性高，具有很强的操作性和可推广性。

验证试验数据表明：方法分析结果准确，再现性良好，是一个行之有效的检测方法，适合于评价含活性微生物废水的灭菌是否合格。

7 与开题报告的差异说明

优化了酪氨酸培养基配方，使枯草芽孢杆菌黑色变种能产生稳定黑色菌落；进行了用枯草芽孢杆菌黑色变种对活性废水经灭菌后的效果评价研究；进行了技术内容额外增加探讨了荧光 PCR 方法检测枯草芽孢杆菌黑色变种的分子方法。

8 参考文献

- [1] 陈蕾, 王倩, 张惠军. 芽孢杆菌最新分类研究进展[J]. 河南化工, 2011, 28(3): 14-18
- [2] Cohn, F. Untersuchungen ueber bakterien[J]. Beitrage zur Biologie der Planzen, 1875, (01): 127-224
- [3] Buchanan, R.E, N.E. Gibbons. 《伯杰细菌鉴定手册》[M]. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984
- [4] Smith, N. R, R. E. Gordon, F. E. Clark. Aerobic mesophilic spore-forming bacteria[M]. U.S. Washington, D.C: Miscellaneous Publication No. 559. U.S. Department of Agriculture, 1946
- [5] Gordon, R. E, W. C. Haynes, C. H. Pang. The genus Bacillus[M]. U.S. Washington, D.C: Agriculture Handbook No. 427. U.S. Department of Agriculture, 1973
- [6] Nakamura, L. K. Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1989, 39(3): 295-300
- [7] Alois, A, H. W. Michael. Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins[J]. Annual Review of Phytopathology, 1986, 24: 411-451
- [8] 胡源, 刘克武, 喻东等. 马铃薯酪氨酸酶的性质[J]. 化学研究与应用, 2005, 17(1): 55-57
- [9] Ito, S, K. Wakamatsu, H. Ozeki. Chemical analysis melanin and its application to the study the regulation of melanogenesis[J]. Pigment Cell Res, 2000, 8: 103-109
- [10] 王戈林, 宁华, 沈萍等. 酪氨酸酶基因工程菌产黑色素的发酵条件研究[J]. 中国医药工

-
- 业杂志, 1999, 30(4): 150-154
- [11] 柯冠群, 淳泽, 万波. 高产黑色素菌株的分离及鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(6): 760-762
- [12] 魏力. 一株海洋细菌的初步鉴定和相关功能基因(簇)的克隆[D]. 华中农业大学, 2007
- [13] Crippa, PR, V. Cristofolletti, N. Romeo. Melanin deduced from optical absorption and photoconductivity experiments[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1978, 538: 164-170
- [14] 宁华. 工程菌所产黑色素对生物大分子光保护作用的研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2001, 35: 85-88
- [15] Rozanowska, M, T. Sarma, E.J. Land, et al. Free radical scavenging properties of melanin: interaction of eu-and pheo-melanin models with reducing and oxidizing radicals[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26(5/6): 518-525
- [16] Montefiori, D.C, J. Zhou. Selective antiviral activity of synthetic soluble L-tyrosine and L-dopa melanins against human immunodeficiency virus in vitro[J]. *Antiviral Research*, 1991, 15(1): 11-25
- [17] 王玉洁, 黄玉屏, 阮丽芳等. Mel 基因在酿酒酵母菌中的克隆和表达[J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 43-47
- [18] 朱琳, 商倩倩, 游偲等. 一株产黑色素海洋细菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 海洋环境科学, 2011, 30(5): 686-688
- [19] 罗华东, 严加林, 余洋等. 马铃薯甲虫病原细菌分离及生防菌的筛选与鉴定[J]. 中国农业科学, 2012, 45(18): 3744-3754
- [20] 郑鸿飞, 孙谧, 王跃军等. 产酯酶海洋微生物的筛选、鉴定及系统发育分析[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(3): 68-73
- [21] Dalfard, A.B, K. Khajeh, M.R. Soudi, et al. Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39: 1409-1416
- [22] 韩松, 张守村, 黄晓艳等. 一株产铁载体内生细菌对尖孢镰刀菌的拮抗作用[J]. 西北植物学报, 2011, 31(5): 1039-1044
- [23] 薛鹏琦. 西藏生防芽孢杆菌鉴定及其脂肽化合物分析[D]. 南京农业大学, 2010
- [24] Fall, R, R.F. Kinsinger, K.A. Wheeler. A simple method to isolate biofilm-forming *Bacillus subtilis* and related species from plant roots[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007, 27: 372-379
- [25] 张纪中. 微生物分类[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990: 44-45
- [26] 潘风光, 柳增善, 刘海学. 地衣芽孢杆菌耐高温 α -淀粉酶基因工程菌的研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2005, 20(2): 160-163
- [27] 张辉, 李培军, 胡筱敏等. 固定化芽孢杆菌修复油污染地表水的研究[J]. 中国给水排水, 2007, 23(7): 28-31
- [28] 刘月英, 傅锦坤, 陈平等. 巨大芽孢杆菌 D01 吸附金(Au³⁺)的研究[J]. 微生物学报, 2000, 40(4): 425-429

-
- [29] Hino, S, P.W. Wilson. Nitrogen fixation by a facultative bacillus[J]. *Journal of Bacteriology*, 1958, 75(4): 403-408
- [30] 刘丽平, 白成, 宋映孜等. 纯化的苏云金杆菌 00-50-5 晶体和芽孢对甘蓝尺蠖的杀虫活性[J]. *热带农业科学*, 2012, 32(12): 55-58
- [31] 杨小妹. 活菌制剂治疗感染性腹泻的探讨及益生元的展望[J]. *药物不良反应杂志*, 2005
- [32] 刘燕. 猪益生性芽孢杆菌的筛选与特性研究[M]. 中国农业科学院, 2006
- [33] 魏红娟, 赵红立, 任尚申等. 凝结芽孢杆菌活菌制剂在手足口病中的应用[J]. *临床儿科杂志*, 2012, 30(4): 355-357
- [34] 张柯, 宁德刚, 徐卫东等. 枯草芽孢杆菌芽孢表面展示重组抗原疫苗研究进展[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(5): 134-137
- [35] 国家药典委员会. 中国药典(2010 版)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010
- [36] 吴忠红, 马晶, 王芸等. 耐盐促生细菌 Rs-198 的鉴定及其与 RS-5 混合培养研究[J]. *生物技术*, 2009, 19(3): 63-66
- [37] 涂彩虹. 黄曲霉拮抗菌分离鉴定、培养条件优化及其发酵上清液部分特性初步研究[D]. 四川农业大学, 2011
- [38] 王滨, 郑向梅, 崔龙等. API 在一次生物性突发公共卫生事件鉴定中的应用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2006, 16(06): 747-748
- [39] 姜华, 修玉萍, 郑音等. 碱蓬内生枯草芽孢杆菌分离鉴定及抑菌活性检测[J]. *辽宁师范大学学报(自然科学版)*, 2011, 34(4): 503-507
- [40] Halket, G, A.E. Dinsdale, N.A. Logan. Evaluation of the VITEK2 BCL card for identification of *Bacillus* species and other aerobic endosporeformers[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 50: 120-126
- [41] 石春芝, 陶天申. 芽孢杆菌的 DNA 碱基组分分析[J]. *河南农业大学学报*, 2000, 34(4): 315-317
- [42] 石春芝, 陶天申. 高效液相色谱法测芽孢杆菌的 DNA G+Cmol% [J]. *生物技术*, 2000, 10(5): 40-43
- [43] Robert, F.W. *Molecular Biology*[M]. The second edition .Boston: McGraw-Hill press, 2002
- [44] 何宏艳. 核酸杂交技术在食品微生物检验中的应用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(6): 767-768
- [45] 童英林. 核酸分子杂交技术在环境微生物研究中的应用[J]. 硅谷, 2011: 133-134
- [46] Roy, D, P. Ward, D. Vincent, et al. Molecular identification of potentially probiotic lactobacilli[J]. *Current Microbiology*, 2000, 40(1): 40-46
- [47] 赵臻莉, 王晓萍. 细菌鉴定的分子生物学方法[J]. *哈尔滨师范大学自然科学学报*, 2012, 28(4): 53-56
- [48] Fritze, D, R. Pukall. Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus* [J]. *Int J. Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 35-37

-
- [49] 朱飞舟, 陈利玉, 陈汉春. 16S rRNA 基因序列分析法鉴定病原细菌[J].中南大学学报(医学版), 2013, 38(10): 1035-1041
- [50] 宋兆齐, 王莉, 刘秀花. 河南省农田土壤芽孢杆菌的遗传多样性分析[J].河南农业科学, 2013, 42(9): 73-78
- [51] 张良, 吴华昌, 邓静. 利用 16S rRNA 序列鉴定分离自芽菜中的芽孢杆菌[J].中国酿造, 2012, 31(5): 82-84
- [52] 饶应福, 夏四清. 分子生物技术的环境工程微生物领域中的应用[J].环境污染治理技术与设备, 2005, 6(5): 63-66
- [53] 丁祥力, 王震, 陈薇. 枯草芽孢杆菌 WH-5 的分离鉴定及净水研究[J].湖南农业科学, 2012, (01): 15-19
- [54] 苏波, 康建平, 黄静. 16S rDNA 序列分析鉴定一株芽孢杆菌[J].食品与发酵科技, 2010, 46(5): 1-3
- [55] 吕建福, 李杰, 莫照兰. 海洋潮差区混凝土表面微生物 16S rDNA 分子鉴定[J].哈尔滨工程大学学报, 2010, 31(10): 1386-1392
- [56] 石磊. 生防萎缩芽孢杆菌 CAB-1 菌株几丁质酶基因的克隆和原核表达[D].河北农业大学, 2012
- [57] 刘勇, 李辉, 李金霞. 特异 PCR 方法对枯草芽孢杆菌群的鉴定区分[J]. 饲料工业, 2010, 31(4): 52-54
- [58] Reva, O.N, C. Dixelius, J. Meijer, et al. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 48(2): 249-259
- [59] Idriss, E.E, O. Makarewicz, A. Farouk, et al. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect[J]. Microbiology Ecology, 2002, 148: 2097-2109
- [60] 周宇燊. 分子标记发展简史[J]. 现代农业科技, 2000: 264-269
- [61] 张惠, 袁红朝, 朱亦君. 不同利用方式对红壤坡地微生物多样性和硝化势的影响[J]. 生态学杂志, 2011, 30(6): 1169-1176
- [62] 鞠秀芝, 杜胜利, 宗兆锋等. AFLP 技术及其常见问题与解决方案[J]. 天津农业科学, 2004, 10(4): 6-9
- [63] VOS, P, R. Hogers, M. Bleeker, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414
- [64] Burke, S.A, J.D. Wright, M.K. Robinson, et al. Detection of molecular diversity in *Bacillus atrophaeus* by amplified fragment length polymorphism analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(5): 2786-2790
- [65] 王梁燕, 洪奇华, 张耀洲. 实时定量 PCR 技术及其应用[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(1): 62-67
- [66] 熊建英. 荧光定量 PCR 快速检测登革 1 型病毒[D]. 南方医药大学, 2012
- [67] 程琳琳, 王芳, 吴琼. 微生物菌剂中 5 种芽孢杆菌实时荧光 PCR 鉴定[J]. 中国卫生检验

杂志, 2010, 20(2): 246-248

[68] 沈圣, 余娟, 腾毅等. TaqManTM 实时荧光 PCR 快速检测蜡样芽孢杆菌的初步研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(12): 1434-1436

[69] 张玲, 翟俊辉, 周冬生等. 荧光定量 PCR 快速炭疽芽孢杆菌的实验研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(11), 976-980

[70] 李太华. 实验室生物废水连续消毒灭菌处理系统[J]. 医药工程设计杂志, 2005, 26(5), 24-25

[71] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002

[72] Lensing, H, H. Oei. Investigations on the sporicidal and fungicidal activity of disinfectants[J]. Zentralbl Bakteriolog Mikrobiol Hyg, 1985, 181: 487-495

[73] 东秀珠, 蔡妙英等. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001

[74] Buttner, M.P, P. Cruz, L.D. Stetzenbach, et al. Evaluation of the biological sampling kit(BiSKit) for large-area surface sampling[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(12): 7040-7045

[75] 刘波, 李红, 姚栗等. 枯草芽孢杆菌黑色变种 ATCC 9372 的特性及其应用[J]. 中国消毒学杂志, 2009, 26(2): 236-237

[76] 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. GB/T 26428-2010 饲料微生物制剂中枯草芽孢杆菌的检测[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011

附一

方法验证报告

方法名称：水质 灭菌指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）
的鉴定 生物学检测法

项目主编单位：上海市环境监测中心

验证单位：华东师范大学、浙江省环境监测中心、常州市环境监测中心、上海市
松江区环境监测站、上海市长宁区环境监测站和上海市青浦区环境监
测站。

项目负责人及职称：汤琳（教授级高级工程师）

通讯地址：上海市徐汇区三江路55号 电话：021-24011766

报告编写人及职称：汤琳（教授级高级工程师）

报告日期：2016 年 8 月 1 日

1 原始数据

1.1 实验室基本情况

按照《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》(HJ 168-2010)的规定,组织了6家有资质的验证实验室对《水质 指示微生物(枯草芽孢杆菌黑色变种)的测定 生物学检测法》进行了方法验证。其中实验室1为常州市环境监测站,实验室2为浙江省环境监测中心,实验室3为华东师范大学,实验室4为上海市松江区环境监测站,实验室5为上海市长宁区环境监测站,实验室6为上海市青浦区环境监测站。

表 1-1 参加验证的人员情况登记表

编号	验证实验室	姓名	性别	年龄	职务或职称	所学专业	从事相关分析工作年限
1	常州市环境监测中心	张翔	男	31	工程师	生物技术	10
		张小琼	女	40	工程师	微生物	6
		吴旦	女	40	工程师	环境工程	12
2	浙江省环境监测中心	于海燕	女	48	研究员	环境学	22
		顾卿	男	36	工程师	微生物学	9
3	华东师范大学	张明	男	48	副教授	环境科学	30
		徐佳丽	女	27	助理工程师	环境科学	2
4	上海市松江区环境监测站	李萍	女	43	工程师	生物	22
		夏秀芳	女	50	工程师	环境工程	27
		赵丹	女	31	助理工程师	生物技术	4
5	上海市长宁区环境监测站	俞晓蓓	女	34	工程师	环境工程	11
		林杰	男	29	助理工程师	环境科学	6
6	上海市青浦区环境监测站	潘枫燕	女	38	工程师	应用化学	16
		钱晓霞	女	35	助理工程师	测控技术与仪器	7
		陆晓怡	女	31	助理工程师	环境工程	7
		康琦	女	28	助理工程师	生物技术	4

表 1-2 使用仪器情况登记表

编号	验证实验室	仪器名称	规格型号	仪器出厂编号	性能情况	备注
1	常州市环境监测中心	恒温培养箱	HERA THERM	20122030261002	正常	
		隔水式恒温培养箱	GSP-230	150309411005	正常	
		立式灭菌器	LMQ.C	20146794	正常	
		显微镜	Nikon 80i	/	正常	

编号	验证实验室	仪器名称	规格型号	仪器出厂编号	性能情况	备注
2	浙江省环境监测中心	高压蒸汽灭菌锅	GI 54DW	AA08N001	正常	
		电热恒温培养箱	DHP 9162	0810251041HH	正常	
		显微镜	LEICA S8APO	10446377	正常	
3	华东师范大学	立式压力蒸汽灭菌器	YXQ-LS-50SII	/	正常	
		培养箱	SP3000L	/	正常	
		电子显微镜	BH-2	/	正常	
4	上海市松江区环境监测站	隔水式电热恒温培养箱	GNP-9270BS	1009348026	正常	
		生化培养箱	BSP-100	12033	正常	
		显微镜	Primo star	3116021133	正常	
5	上海市长宁区环境监测站	压力蒸汽灭菌器	YXQ-LS-II	7934	正常	
		显微镜	CX41RF	9B03591	正常	
		培养箱	BINDER115	08-54290	正常	
6	上海市青浦区环境监测站	培养箱	Thermo 310	2076100559336	正常	
		培养箱	Thermo 310	2076100559337	正常	
		灭菌锅	GR-60	21703101182014 060044	正常	
		显微镜	BX43F	3E45044	正常	

表 1-3 使用试剂及溶剂登记表

编号	验证实验室	名称	生产厂家、规格	纯化处理方法	备注
1	常州市环境监测中心	硝酸盐还原生化管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		苦杏仁苷生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		甘露醇生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		甘露糖生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		甘油利用生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
2	浙江省环境监测中心	硝酸盐还原生化管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		苦杏仁苷生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		甘露醇生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		甘露糖生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		甘油利用生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
3	江苏省环境监测中心	硝酸盐还原生化管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		苦杏仁苷生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		甘露醇生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		甘露糖生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	

编号	验证实验室	名称	生产厂家、规格	纯化处理方法	备注
		甘油利用生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
4	上海市松江区环境监测站	硝酸盐还原生化管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		苦杏仁苷生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		甘露醇生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		甘露糖生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		甘油利用生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
5	上海市长宁区环境监测站	硝酸盐还原生化管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		苦杏仁苷生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		甘露醇生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		甘露糖生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		甘油利用生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
6	上海市青浦区环境监测站	硝酸盐还原生化管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		苦杏仁苷生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		甘露醇生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		甘露糖生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	
		甘油利用生化鉴定管	北京陆桥技术有限责任公司	/	

1.2 灭菌效果验证

1.2.1 灭菌效果评价验证

表 1-4 废水中枯草芽孢杆菌黑色变种的测试数据

验证单位：常州市环境监测中心

测试日期：2016.4.11~18

平行号	未经消毒灭菌处理废水	经消毒灭菌处理废水	备注
测定结果	1	+	-
	2	+	-
	3	+	-
	4	+	-
	5	+	-
	6	+	-

注：“+”代表有黑色菌落生长，“-”代表无菌落生长

表 1-5 废水中枯草芽孢杆菌黑色变种的测试数据

验证单位：浙江省环境监测中心

测试日期：2016.4.11~18

平行号		未经消毒灭菌处理废水	经消毒灭菌处理废水	备注
测定结果	1	+	-	
	2	+	-	
	3	+	-	
	4	+	-	
	5	+	-	
	6	+	-	
注：“+”代表有黑色菌落生长，“-”代表无菌落生长				

表 1-6 废水中枯草芽孢杆菌黑色变种的测试数据

验证单位：华东师范大学

测试日期：2015.7.6~13

平行号		未经消毒灭菌处理废水	经消毒灭菌处理废水	备注
测定结果	1	+	-	
	2	+	-	
	3	+	-	
	4	+	-	
	5	+	-	
	6	+	-	
注：“+”代表有黑色菌落生长，“-”代表无菌落生长				

表 1-7 废水中枯草芽孢杆菌黑色变种的测试数据

验证单位：上海市松江区环境监测站

测试日期：2015.11.2~9

平行号		未经消毒灭菌处理废水	经消毒灭菌处理废水	备注
测定结果	1	+	-	
	2	+	-	
	3	+	-	
	4	+	-	
	5	+	-	
	6	+	-	

平行号	未经消毒灭菌处理废水	经消毒灭菌处理废水	备注
注：“+”代表有黑色菌落生长，“-”代表无菌落生长			

表 1-8 废水中枯草芽孢杆菌黑色变种的测试数据

验证单位：上海市长宁区环境监测站

测试日期：2015.11.2~9

平行号	未经消毒灭菌处理废水	经消毒灭菌处理废水	备注
测定结果	1	+	-
	2	+	-
	3	+	-
	4	+	-
	5	+	-
	6	+	-
注：“+”代表有黑色菌落生长，“-”代表无菌落生长			

表 1-9 废水中枯草芽孢杆菌黑色变种的测试数据

验证单位：上海市青浦区环境监测站

测试日期：2015.11.2~9

平行号	未经消毒灭菌处理废水	经消毒灭菌处理废水	备注
测定结果	1	+	-
	2	+	-
	3	+	-
	4	+	-
	5	+	-
	6	+	-
注：“+”代表有黑色菌落生长，“-”代表无菌落生长			

1.2.2 灵敏度验证

表 1-10 模拟样品中枯草芽孢杆菌黑色变种的测试数据

验证单位： 常州市环境监测中心

测试日期： 2016.4.11~18

平行号		高浓度模拟样品 ($10^6/100$ ml)	中浓度模拟样品 ($10^4/100$ ml)	低浓度模拟样品 ($10^2/100$ ml)	备注
测定结果	1	+	+	+	
	2	+	+	+	
	3	+	+	+	
	4	+	+	+	
	5	+	+	+	
	6	+	+	+	
注：“+”代表有黑色菌落生长，“-”代表无菌落生长					

表 1-11 模拟样品中枯草芽孢杆菌黑色变种的测试数据

验证单位： 浙江省环境监测中心

测试日期： 2016.4.11~18

平行号		高浓度模拟样品 ($10^6/100$ ml)	中浓度模拟样品 ($10^4/100$ ml)	低浓度模拟样品 ($10^2/100$ ml)	备注
测定结果	1	+	+	+	
	2	+	+	+	
	3	+	+	+	
	4	+	+	+	
	5	+	+	+	
	6	+	+	+	
注：“+”代表有黑色菌落生长，“-”代表无菌落生长					

表 1-12 模拟样品中枯草芽孢杆菌黑色变种的测试数据

验证单位： 华东师范大学

测试日期： 2015.7.6~13

平行号		高浓度模拟样品 ($10^6/100$ ml)	中浓度模拟样品 ($10^4/100$ ml)	低浓度模拟样品 ($10^2/100$ ml)	备注
测定结果	1	+	+	+	
	2	+	+	+	
	3	+	+	+	

平行号		高浓度模拟样品 ($10^6/100$ ml)	中浓度模拟样品 ($10^4/100$ ml)	低浓度模拟样品 ($10^2/100$ ml)	备注
	4	+	+	+	
	5	+	+	+	
	6	+	+	+	
注：“+”代表有黑色菌落生长，“-”代表无菌落生长					

表 1-13 模拟样品中枯草芽孢杆菌黑色变种的测试数据

验证单位：上海市松江区环境监测站

测试日期：2015.11.2~9

平行号		高浓度模拟样品 ($10^6/100$ ml)	中浓度模拟样品 ($10^4/100$ ml)	低浓度模拟样品 ($10^2/100$ ml)	备注
测定结果	1	+	+	+	
	2	+	+	+	
	3	+	+	+	
	4	+	+	+	
	5	+	+	+	
	6	+	+	+	
注：“+”代表有黑色菌落生长，“-”代表无菌落生长					

表 1-14 模拟样品中枯草芽孢杆菌黑色变种的测试数据

验证单位：上海市长宁区环境监测站

测试日期：2015.11.2~9

平行号		高浓度模拟样品 ($10^6/100$ ml)	中浓度模拟样品 ($10^4/100$ ml)	低浓度模拟样品 ($10^2/100$ ml)	备注
测定结果	1	+	+	+	
	2	+	+	+	
	3	+	+	+	
	4	+	+	+	
	5	+	+	+	
	6	+	+	+	
注：“+”代表有黑色菌落生长，“-”代表无菌落生长					

表 1-15 模拟样品中枯草芽孢杆菌黑色变种的测试数据

验证单位：上海市青浦区环境监测站

测试日期：2015. 11. 2~9

平行号	高浓度模拟样品 (10 ⁶ /100 ml)	中浓度模拟样品 (10 ⁴ /100 ml)	低浓度模拟样品 (10 ² /100 ml)	备注
测定结果	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	+
	4	+	+	+
	5	+	+	+
	6	+	+	+

注：“+”代表有黑色菌落生长，“-”代表无菌落生长

1.3 检测方法验证

1.3.1 方法特异性的测试结果

表 1-16 方法特异性测试数据

验证单位：常州市环境监测中心

测试日期：2016. 4. 11~18

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解
枯草芽孢杆菌黑色变种	1	+	黑色	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	-	-	+
地衣芽孢杆菌	1	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/
	2	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/
	3	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/
	4	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/
	5	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/
	6	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/

注：“+”代表阳性反应，“-”代表阴性反应，“/”代表未进行试验

表 1-17 方法特异性测试数据

验证单位：浙江省环境监测中心

测试日期：2016. 4. 11~18

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解	
枯草芽孢杆菌黑色变种	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
地衣芽孢杆菌	1	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	2	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	3	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	4	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	5	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	6	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/

注：“+”代表阳性反应，“-”代表阴性反应，“/”代表未进行试验

表 1-18 方法特异性测试数据

验证单位：华东师范大学

测试日期：2015. 7. 6~13

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解	
枯草芽孢杆菌黑色变种	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
地衣芽孢杆菌	1	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	2	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	3	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	4	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	5	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	6	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解
注：“+”代表阳性反应，“-”代表阴性反应，“/”代表未进行试验										

表 1-19 方法特异性测试数据

验证单位：上海市松江区环境监测站

测试日期：2015. 11. 2~9

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解	
枯草芽孢杆菌黑色变种	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
地衣芽孢杆菌	1	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	2	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	3	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	4	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	5	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	6	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/

注：“+”代表阳性反应，“-”代表阴性反应，“/”代表未进行试验

表 1-20 方法特异性测试数据

验证单位：上海市长宁区环境监测站

测试日期：2015. 11. 2~9

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解	
枯草芽孢杆菌黑色变种	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
地衣	1	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解
芽孢杆菌	2	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/
	3	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/
	4	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/
	5	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/
	6	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/

注：“+”代表阳性反应，“-”代表阴性反应，“/”代表未进行试验

表 1-21 方法特异性测试数据

验证单位：上海市青浦区环境监测站
测试日期：2015. 11. 2~9

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解	
枯草芽孢杆菌黑色变种	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
地衣芽孢杆菌	1	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	
	2	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	
	3	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	
	4	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	
	5	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	
	6	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	

注：“+”代表阳性反应，“-”代表阴性反应，“/”代表未进行试验

1.3.2 方法稳定性的测试结果

表 1-22 方法稳定性测试数据

验证单位：常州市环境监测中心
测试日期：2016. 4. 11~18

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解	
高浓度模	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解	
拟样品 (10 ⁶ /100 ml)	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
中浓度模 拟样品 (10 ⁴ /100 ml)	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
低浓度模 拟样品 (10 ² /100 ml)	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+

注：“+”代表阳性反应，“-”代表阴性反应

表 1-23 方法稳定性测试数据

验证单位：浙江省环境监测中心
测试日期：2016.4.11~18

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解	
高浓度模 拟样品 (10 ⁶ /100 ml)	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
中浓度模 拟样品 (10 ⁴ /100 ml)	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解	
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
低浓度模拟样品 ($10^2/100$ ml)	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+

注：“+”代表阳性反应，“-”代表阴性反应

表 1-24 方法稳定性测试数据

验证单位：华东师范大学
测试日期：2015.7.6~13

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解	
高浓度模拟样品 ($10^6/100$ ml)	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
中浓度模拟样品 ($10^4/100$ ml)	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
低浓度模拟样品 ($10^2/100$ ml)	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解
注：“+”代表阳性反应，“-”代表阴性反应										

表 1-25 方法稳定性测试数据

验证单位：上海市松江区环境监测站

测试日期：2015.11.2~9

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解	
高浓度模拟样品 (10 ⁶ /100 ml)	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
中浓度模拟样品 (10 ⁴ /100 ml)	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
低浓度模拟样品 (10 ² /100 ml)	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
注：“+”代表阳性反应，“-”代表阴性反应											

表 1-26 方法稳定性测试数据

验证单位：上海市长宁区环境监测站

测试日期：2015.11.2~9

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解	
高浓度模	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解	
拟样品 (10 ⁶ /100 ml)	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
中浓度模 拟样品 (10 ⁴ /100 ml)	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
低浓度模 拟样品 (10 ² /100 ml)	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+

注：“+”代表阳性反应，“-”代表阴性反应

表 1-27 方法稳定性测试数据

验证单位：上海市青浦区环境监测站
测试日期：2015. 11. 2~9

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解	
高浓度模 拟样品 (10 ⁶ /100 ml)	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
中浓度模 拟样品 (10 ⁴ /100 ml)	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+

平行号	有无菌落	菌落颜色	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原	甘油	甘露糖	甘露醇	苦杏仁苷	淀粉水解	
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
低浓度模拟样品 ($10^2/100$ ml)	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+

注：“+”代表阳性反应，“-”代表阴性反应

2 方法验证数据汇总

2.1 灭菌效果验证汇总

表 2-1 灭菌效果评价结果汇总

实验室号	未经消毒灭菌废水		经消毒灭菌废水	
	结果	评价	结果	评价
1	+	不合格	-	合格
2	+	不合格	-	合格
3	+	不合格	-	合格
4	+	不合格	-	合格
5	+	不合格	-	合格
6	+	不合格	-	合格

注：“+”代表有黑色菌落生长，“-”代表无菌落生长

结论：对经过消毒灭菌和未经过消毒灭菌的废水进行枯草芽孢杆菌黑色变种黑色变种检测发现，消毒灭菌效果可以得到有效验证。

表 2-2 不同浓度的模拟样品检测结果汇总

实验室号	高浓度模拟样品 ($10^6/100$ ml)	中浓度模拟样品 ($10^4/100$ ml)	低浓度模拟样品 ($10^2/100$ ml)
1	+	+	+

实验室号	高浓度模拟样品 (10 ⁶ /100 ml)	中浓度模拟样品 (10 ⁴ /100 ml)	低浓度模拟样品 (10 ² /100 ml)
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+

注：“+”代表有黑色菌落生长，“-”代表无菌落生长

结论：对不同浓度的模拟样品进行消毒灭菌效果检测评价，发现有效检出率为 100%。

2.2 检测方法验证汇总

表 2-3 枯草芽孢杆菌黑色变种生化检测方法特异性结果汇总

	实验 室号	有无 菌落	菌落 颜色	革兰氏 染色	芽孢 染色	硝酸盐 还原	甘油	甘露 糖	甘露 醇	苦杏 仁苷	淀粉 水解
阳性 标准 菌株	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
阴性 标准 菌株	1	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	2	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	3	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	4	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	5	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/
	6	+	乳白	/	/	/	/	/	/	/	/

注：“+”代表阳性反应，“-”代表阴性反应，“/”代表未进行试验

结论：对枯草芽孢杆菌黑色变种和地衣芽孢杆菌进行检测，枯草芽孢杆菌黑色变种检测方法具有很强的特异性，检出率为 100%。

表 2-4 枯草芽孢杆菌黑色变种生化检测方法灵敏度结果汇总

浓度	实验 室号	有无 菌落	菌落 颜色	革兰氏 染色	芽孢 染色	硝酸盐 还原	甘油	甘露 糖	甘露 醇	苦杏 仁苷	淀粉 水解
高浓度 10 ⁶ /100 ml	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
中浓度 10 ⁴ /100 ml	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
低浓度 10 ² /100 ml	1	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	2	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	5	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+
	6	+	黑色	+	+	+	+	+	-	-	+

注：“+”代表阳性反应，“-”代表阴性反应

结论：对枯草芽孢杆菌黑色变种模拟浓度样品（高浓度 10⁶/100 ml、中浓度 10⁴/100 ml、低浓度 10²/100 ml）进行检测，枯草芽孢杆菌黑色变种检测方法具有很强的灵敏度，检出率为 100%。

3 方法验证结论

6 家实验室分别对自制的枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢悬液（按芽孢计）高浓度（10⁶ 个/100ml）、中浓度（10⁴ 个/100ml）、低浓度（10² 个/100ml）进行菌种检测，检出率均为 100%，方法特异性强，稳定性高。

本研究所建立的鉴定经灭菌处置的废水中灭菌指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的生物学检测方法，检测步骤简洁，方法特异性强，稳定性高，具有很强的操作性和可推广性。

验证试验数据表明：方法分析结果准确，再现性良好，是鉴定经灭菌处置的废水中灭

菌指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的一个行之有效的检测方法。