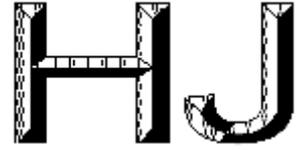


附件 2



中华人民共和国国家环境保护标准

HJ □□□-20□□

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

Water quality—Certification of sterilizing indicator microorganism (*B. subtilis* var. *niger*)—Biological detection method

（征求意见稿）

202□-□□-□□发布

202□-□□-□□实施

生态环境部 发布

目 次

前 言	ii
1 适用范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 方法原理	1
5 干扰和消除	2
6 试剂和材料	2
7 仪器和设备	2
8 样品	3
9 分析步骤	3
10 结果与报告	6
11 特异性和稳定性	6
12 质量保证和质量控制	7
13 废物处理	7
附录 A（规范性附录） 培养基和试剂	8
附录 B（规范性附录） 培养基和试剂使用说明	14

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》和《中华人民共和国水污染防治法》，保护生态环境，保障人体健康，规范水中灭菌指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的鉴定方法，制定本标准。

本标准规定了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。

本标准的附录A和附录B为规范性附录。

本标准首次发布。

本标准由生态环境部生态环境监测司、法规与标准司组织制订。

本标准起草单位：上海市环境监测中心。

本标准验证单位：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、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。

本标准生态环境部20□□年□□月□□日批准。

本标准自20□□年□□月□□日起实施。

本标准由生态环境部解释。

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

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。

1 适用范围

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的废水中指示微生物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的鉴定。

2 规范性引用文件

本标准引用了下列文件或其中的条款。凡是不注日期的引用文件，其有效版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

HJ 494 水质 采样技术指导

HJ/T 91 地表水和污水监测技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

枯草芽孢杆菌黑色变种 *Bacillus subtilis* var. *niger*

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。

4 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℃ 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 干扰和消除

5.1 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(8.1)时加入硫代硫酸钠溶液(6.13)消除干扰。

5.2 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(8.1)时加入乙二胺四乙酸二钠溶液(6.14)消除干扰。

6 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，实验用水应满足 GB/T 6682 中三级水的要求。

6.1 酪氨酸琼脂培养基。

6.2 营养琼脂培养基。

6.3 淀粉培养基。

6.4 硝酸盐培养基。

6.5 甘油复红肉汤培养基。

6.6 甘露糖生化培养基。

6.7 甘露醇生化培养基。

6.8 苦杏仁苷生化培养基。

6.9 革兰氏染色液。

6.10 芽孢染色液。

注：6.1~6.10 的成分及制法详见附录 A，其中 6.2~6.10 也可使用市售商品化培养基或试剂。

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

6.12 乙二胺四乙酸二钠 ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。

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

称取 15.7g 硫代硫酸钠(6.11)，溶于适量水中，定容至 100 ml，临用现配。

6.14 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 15 g 乙二胺四乙酸二钠(6.12)，溶于适量水中，定容至 100 ml，此溶液保质期为 30 d。

6.15 无菌滤膜：直径 50mm，孔径 0.45 μm 的醋酸纤维滤膜。

按无菌操作要求包扎，经 121 $^{\circ}\text{C}$ 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。

6.16 石蜡质封口膜。

6.17 无菌水：取适量实验用水，经 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 20 min，备用。

7 仪器和设备

7.1 采样瓶：具螺旋帽或磨口塞的 500 ml 广口玻璃瓶。

7.2 恒温培养箱：允许温度偏差 36 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

- 7.3 高压蒸汽灭菌器：121℃可调。
- 7.4 pH计：准确到0.1pH单位，或更高精度。也可使用pH比色管或pH精密试纸。
- 7.5 显微镜：物镜10×倍、20×倍、40×倍，油镜100×倍，目镜10×倍或15×倍。
- 7.6 分析天平：感量0.0001 g。
- 7.7 培养皿：直径90 mm。
- 7.8 过滤装置：配有砂芯滤器和真空泵，抽滤压力勿超过-50kPa。
- 7.9 接种环。
- 7.10 镊子。
- 7.11 移液管：1 ml±0.01 ml、10 ml±0.1 ml。也可使用计量合格的可调式移液器。
- 7.12 量筒：100 ml。
- 7.13 三角瓶：100 ml。
- 7.14 酒精灯。
- 7.15 无菌操作设备：无菌室或超净工作台、生物安全柜。

注：移液管、采样瓶、培养皿、三角瓶等玻璃器皿试验前要按无菌操作要求包扎，高压蒸汽灭菌器（7.3）121℃灭菌20 min，烘干，备用。

8 样品

8.1 样品采集

点位布设及采样频次按照HJ/T 494和HJ/T 91的相关规定执行。

采集微生物样品时，采样瓶（7.1）不得用样品洗涤，采集样品于灭菌的采样瓶中。

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（6.13），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（6.14），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（6.11）可去除样品中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。

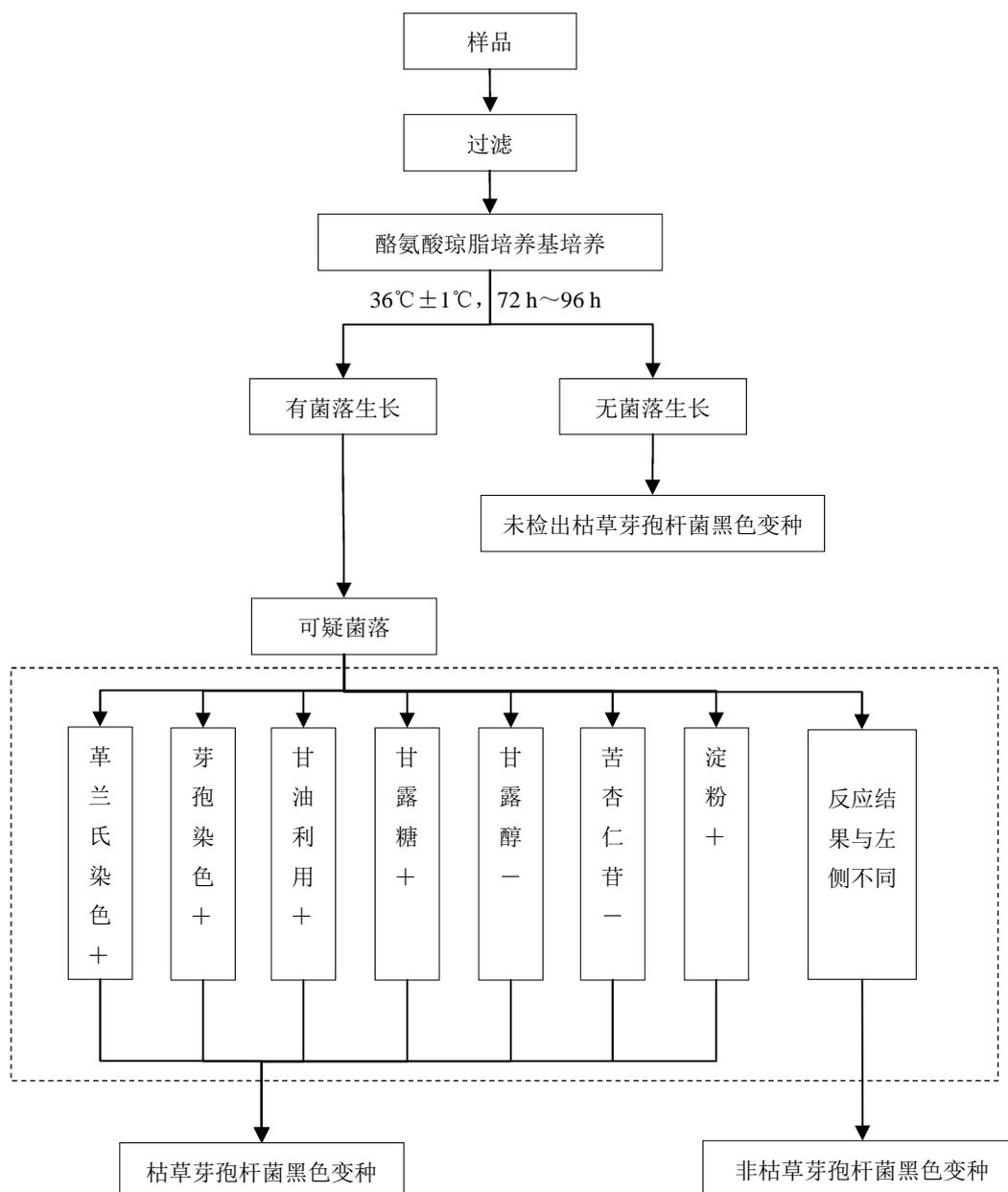
8.2 样品保存

采样后应在2 h内检测，否则，应10℃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，将样品于4℃以下冷藏并在2 h内检测。

9 分析步骤

9.1 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1。



注：“+”表示反应结果阳性，“-”表示反应结果阴性。

图1 枯草芽孢杆菌黑色变种检测流程

9.2 样品过滤

用灭菌镊子（7.10）以无菌操作夹取无菌滤膜（6.15）贴放在已灭菌的过滤装置（7.8）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（6.17）冲洗器壁 2~3 次。样品过滤完成后，再抽气约 5 s，关上开关。

9.3 培养

用灭菌镊子夹取滤膜移放在酪氨酸琼脂培养基（6.1）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（6.17）封好培养皿，倒置培养皿，放入恒温培养箱（7.2）内， $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h~96 h。

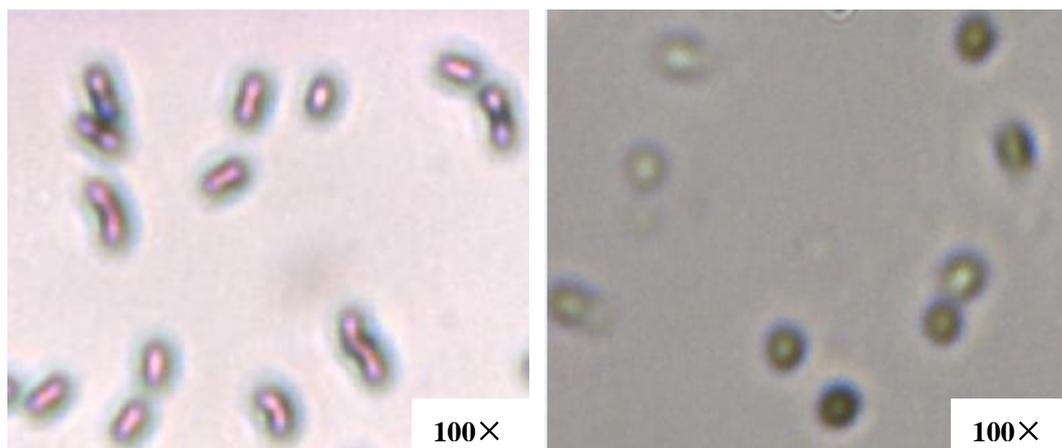
培养 96 h 后，如培养基上未有菌落生长，则试验终止；如培养基上有菌落生长，则挑取黑色的特征菌落于营养琼脂培养基（6.2）上， $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h，待鉴定。同时将已挑菌落的酪氨酸琼脂培养基培养皿储存于 $2^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ ，以备必要时复查。

注：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（6.1）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 7d。

9.4 鉴定

9.4.1 染色镜检

挑取可疑菌落（9.3），分别使用革兰氏染色液（6.9）和芽孢染色液（6.10）染色，具体操作及结果观察详见附录 B，若使用市售商品化试剂，则按说明书操作，然后镜检。



左——革兰氏染色；右——芽孢染色。

图 2 枯草芽孢杆菌黑色变种染色镜检图

9.4.2 生化试验

挑取特征菌落（9.3），分别接种到淀粉培养基（6.3）、硝酸盐培养基（6.4）、甘油复红肉汤培养基（6.5）、甘露糖生化培养基（6.6）、甘露醇生化培养基（6.7）和苦杏仁苷生化培养基（6.8）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。

9.5 对照试验

9.5.1 空白对照

每次试验都要用无菌水（6.17）按照步骤 9.2 和 9.3 进行实验室空白测定。

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。

9.5.2 阴性及阳性对照

将阳性菌株和阴性菌株制成浓度为40~600 CFU/L的菌悬液，分别按照9.2~9.4步骤操作，阴性、阳性菌株应呈现的生化反应结果应与表 1 给出的结果一致，否则，该次样品鉴定结果无效，应查明原因后重新鉴定。

表 1 阴性、阳性菌株应呈现的生化反应结果

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	灰色、灰黑色或黑色菌落	乳白色菌落
革兰氏染色	+	+
芽孢染色	+	+
淀粉水解	+	+
硝酸盐还原	+	+
甘油利用	+	+
甘露糖利用	+	+
甘露醇利用	-	+
苦杏仁苷利用	-	+

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。

10 结果与报告

结果判定：符合 9.4、9.5，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。

11 稳定性和特异性

11.1 稳定性

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

11.2 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标准菌株进行方法特异性检

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。

12 质量保证和质量控制

12.1 按照对照试验（9.5），每批样品均应进行空白对照试验，定期进行阴性及阳性对照试验定期使用有证标准菌株进行阴性、阳性对照试验。

12.2 每 20 个样品或每批次样品（ ≤ 20 个/批）测定一个平行双样。

12.3 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。

12.4 定期使用有证标准菌株/标准样品进行质量控制。

13 废物处理

实验产生的废物经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min 后，作为一般废物处理。

附录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 酪氨酸琼脂培养基

A.1.1 成分

A.1.1.1 组分 A

L-天冬酰胺	0.5 g
L-酪氨酸	0.5 g

A.1.1.2 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

A.1.2 制法

加热溶解组分 B 后, 再加入组分 A, 搅拌溶解, 调节 pH 至 7.0 左右。121℃灭菌 15 min。灭菌后的培养基倒入无菌培养皿, 每皿 25~30 ml, 待用。

A. 2 营养琼脂培养基

A. 2.1 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

A. 2.2 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 15 min。

A. 3 淀粉培养基

A. 3.1 成分

蛋白胨	5.0 g~10.0 g
酵母浸膏	1.0 g
牛肉膏	3.0 g
淀粉	2.0 g
琼脂	15.0 g~20.0 g
蒸馏水	1000ml

A. 3.2 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。

A. 3.3 试剂-碘液

A. 3.3.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 ml

A. 3.3.2 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. 4 硝酸盐还原培养基

A. 4. 1 硝酸盐培养基

A. 4. 1. 1 成分

肉汁胨培养基	1000 ml
KNO ₃	1.0 g

A. 4. 1. 2 制法

将KNO₃溶于肉汁胨培养基，调节pH至7.0~7.6，分装于试管，每管分装4 ml~5 ml，121℃蒸汽灭菌 15 min~20 min。

A. 4. 2 试剂-格里斯氏 (Griess) 试剂

A. 4. 2. 1 成分

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

A. 4. 2. 2 制法

将对氨基苯磺酸溶于稀醋酸中，制成 A 液；将 α-萘胺溶于稀醋酸中，用蒸馏水稀释，制成 B 液。

A. 4. 3 试剂-二苯胺试剂

A. 4. 3. 1 成分

二苯胺	0.5 g
浓硫酸 (98.3%)	100 ml
蒸馏水	20 ml

A. 4. 3. 2 制法

将二苯胺溶于浓硫酸中，用 20 ml 蒸馏水稀释。

A. 5 甘油复红肉汤培养基

A. 5.1 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

A. 5.2 制法

取蛋白胨、无水氯化镁和无水硫酸钾加入水中，微温溶解，调节 pH 至 7.2~7.4，加入甘油，加热溶化，混匀，分装于试管，121℃高压灭菌 20 min。

A. 6 甘露糖培养基/甘露醇培养基

A. 6.1 成分

(NH ₄) ₂ 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

A. 6.2 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℃蒸汽灭菌 30 min。

A. 7 苦杏仁苷培养基

A. 7.1 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

A. 7. 2 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。

A. 8 革兰氏染色液

A. 8. 1 结晶紫染色液

A. 8. 1. 1 成分

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20 ml
1%草酸铵水溶液	80 ml

A. 8. 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. 8. 2 革兰氏碘液

A. 8. 2. 1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 ml

A. 8. 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. 8. 3 沙黄复染液

A. 8. 3. 1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 ml
蒸馏水	90 ml

A. 8. 3. 2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A. 9 芽孢染色液

A. 9. 1 饱和孔雀绿水溶液

A. 9. 1. 1 成分

孔雀绿	7.6 g
蒸馏水	100 ml

A. 9. 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. 9. 2 0. 5%番红溶液

A. 9. 2. 1 成分

番红	0.5g
蒸馏水	100 ml

A. 9. 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。

附录 B

(规范性附录)

培养基和试剂使用说明及结果观察

B.1 淀粉培养基

B.1.1 操作

将待检菌株接种于淀粉培养基，适温培养。培养一定时间，形成明显菌落后，在平板上滴加碘液。

B.1.2 结果观察

平板呈蓝黑色，菌落周围如有不变色透明圈，为淀粉水解阳性；仍是蓝黑色为阴性。

B.2 硝酸盐培养基

B.2.1 操作

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。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。

B.2.2 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，为硝酸盐还原阴性；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。

B.3 甘油复红肉汤培养基

B.3.1 操作

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

B.3.2 结果观察

培养液颜色变为紫红色，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，为阳性；否则为阴性。

B. 4 甘露糖培养基/甘露醇培养基

B. 4.1 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。

B. 4.2 结果观察

若培养后培养物变黄，表示产酸，为阳性；不变色或变蓝（紫）为阴性。

B. 5 苦杏仁苷培养基

B. 5.1 操作

用菌株穿刺接种于苦心仁苷培养基，适温培养，接种后封油。

B. 5.2 结果观察

指示剂呈黄色者为阳性，呈紫色为阴性。

B. 6 革兰氏染色液

B. 6.1 操作

- a) 涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染液，染 1 min，水洗。
- b) 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。
- c) 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。
- d) 滴加沙黄复染液，复染 1 min，水洗、待干、镜检。

B. 6.2 结果观察

呈蓝紫色为革兰氏阳性菌，呈红色为革兰氏阴性菌。

B. 7 芽孢染色液

B. 7.1 操作

- a) 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。
- b) 滴加 0.5% 番红溶液复染 30 s，水洗，吸干。
- c) 镜检。

B. 7.2 结果观察

菌体呈红色，芽孢呈绿色。