

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2293.1—2012

细菌微生物农药 枯草芽孢杆菌 第1部分：枯草芽孢杆菌母药

**Bacterial pesticides—*Bacillus subtilis*—
Part 1: *Bacillus subtilis* technical concentrates(TK)**

2012-12-24 发布

2013-03-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

NY/T 2293《细菌微生物农药 枯草芽孢杆菌》为系列标准,分为两部分:

- 第1部分:枯草芽孢杆菌母药;
- 第2部分:枯草芽孢杆菌可湿性粉剂。

本部分为 NY/T 2293 的第1部分。

本部分按照 GB/T 1.1 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由农业部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位:农业部农药检定所、中国农业大学。

本标准主要起草人:袁善奎、姜辉、刘西莉、崔晓岚、黄中乔、林荣华、瞿唯钢、王一喆、胡承勇、王以燕。

细菌微生物农药 枯草芽孢杆菌

第1部分：枯草芽孢杆菌母药

1 范围

本部分规定了细菌微生物农药枯草芽孢杆菌母药的要求、试验方法、检验与验收以及标志、标签、包装、贮运。

本部分适用于以芽孢为主要活性成分的粉状枯草芽孢杆菌母药。

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 191 包装储运图示标志

GB/T 1601 农药 pH 值的测定方法

GB/T 1604 商品农药验收规则

GB/T 1605 商品农药采样方法

GB 3796 农药包装通则

GB/T 8170—2008 数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB/T 16150—1995 农药粉剂、可湿性粉剂细度测定方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

枯草芽孢杆菌母药 *Bacillus subtilis* technical concentrates(TK)

由枯草芽孢杆菌纯菌种经发酵而获得的高含量芽孢菌粉，通常情况下还会包含伴随发酵过程的少量生物组分和化学杂质。

3.2

菌落形成单位 colony forming units (CFU)

是将枯草芽孢杆菌母药用水稀释后得到的菌液通过涂布的方法，让其单个芽孢分散在琼脂平板上，待培养后每活芽孢形成一个菌落，即一个菌落形成单位(CFU)，通过肉眼观察菌落的数量来推算单位微生物农药样品中的活芽孢含量。

3.3

杂菌数 number of microbial contaminants

枯草芽孢杆菌母药样品中，除枯草芽孢杆菌菌落以外的其他微生物菌落数之和。

3.4

杂菌率 rate of microbial contaminants

枯草芽孢杆菌母药样品中除枯草芽孢杆菌外，其他菌(真菌和细菌等)量占总菌量的百分率。

3.5

贮存稳定性 storage stability

枯草芽孢杆菌母药在室温和(或)低于室温下贮存一定时间后,产品的活菌数占其标明值的相对百分率。

4 要求

4.1 外观

通常为灰白色或棕褐色粉状物,由于发酵基质的不同颜色偶有差异,但应为均匀疏松的粉末,不可有团块。

4.2 指标

枯草芽孢杆菌母药质量控制项目指标应符合表 1 要求。

表 1 枯草芽孢杆菌母药质量控制项目指标

| 项 目 | 指 标 |
|-------------------------------|---------------------------|
| 含孢量,CFU /g | $\geq 5.0 \times 10^{11}$ |
| 杂菌率,% | ≤ 3 |
| pH | 5.0~8.0 |
| 干燥减量,% | ≤ 6 |
| 细度(通过 45 μm 试验筛),% | ≥ 90 |
| 贮存稳定性 ^a ,% | ≥ 80 |
| ^a 为定期检验项目;3个月检测一次。 | |

5 试验方法

除另有说明,本方法所用试剂均为化学纯及以上,所用溶液均为水溶液。

5.1 抽样

按照 GB/T 1605 规定进行样品的采集,用随机数表法确定抽样的包装件,最终抽样量不少于 100 g。采样时应特别注意样品的代表性和避免污染,采样容器和采样工具应经过消毒灭菌,样品采集后应立即进行检验,若不能立即检验,可贮存在 4℃ 冰箱中。

5.2 菌种鉴别

根据代表菌株的形态学和生理生化特征进行菌种鉴别,并可辅助脂肪酸分析、Biolog、16SrRNA 序列分析等手段。当对鉴别结果有争议或需要进行法律仲裁检验时,应到具有菌种鉴定资质的单位,将待检菌株与模式菌种进行比对,出具菌种鉴定报告,作为仲裁依据。

有效成分的特征参见附录 A。鉴别方法见附录 B。

5.3 含孢量测定

5.3.1 方法提要

采用平板菌落计数法。将母药润湿、稀释后,均匀涂布在培养基平板上,待各芽孢菌体形成菌落后,统计菌落总数,以单位样品(g)中的菌落形成单位数(CFU)表示活芽孢含量(CFU/g)。

5.3.2 试剂和溶液

5.3.2.1 试剂:Tween-20 或 Triton X-100;

5.3.2.2 溶液:0.05% Tween-20 或 0.05% Triton X-100。

5.3.3 主要仪器、设备

5.3.3.1 天平:精度为 0.01 g;

5.3.3.2 移液器:20 μL ~200 μL ,200 μL ~1 000 μL ;

5.3.3.3 高压蒸汽灭菌器;

5.3.3.4 超净工作台;

- 5.3.3.5 恒温振荡器；
- 5.3.3.6 恒温培养箱。

5.3.4 实验步骤

5.3.4.1 样品的准备

在无菌操作条件下,将样品搅拌均匀,准确称取 3.0 g 样品,溶入 27.0 mL 的含 0.05% Tween-20 或 0.05% Triton X-100 的无菌水中浸泡 30 min 后,振荡 30 min,得到稀释 10 倍的样品溶液,标记为 0 号。然后参照表 2(以稀释 8 次为例)进行梯度稀释。

表 2 梯度稀释示例

| 编号 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 灭菌水体积, mL | 27.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 |
| 加入上一稀释浓度溶液的体积, mL | — | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 累计稀释倍数 | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁹ |

5.3.4.2 涂板计数

将上述各梯度稀释液分别吸取 100 μL 于 NA 平板上,并用曲玻棒均匀涂布在整个平板表面,每一稀释度做 3 次重复,然后置于 30℃ 下培养 24 h~48 h 后,选择适宜的稀释度,取菌落数在 30 个~300 个之间的平板进行计数。

5.3.5 计算方法

5.3.5.1 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内,则计算该稀释度 3 个重复平板菌落数的平均值,再将平均值乘以相应的稀释倍数,作为每 g 母药中的菌落数。如第 8 号稀释度 3 个平板的菌落数(CFU)分别为 50、51、49,则该母药的含孢量为:

$$N = [(50 + 51 + 49) / 3] \times 10^9 \times 10 = 5.0 \times 10^{11} \text{ CFU/g}$$

5.3.5.2 如有两个连续稀释度的平板菌落数均在适宜计数范围之内,则按式(1)计算。

$$N = \sum C / [(1 \times n_1 + 0.1 \times n_2) \times 0.1 \times d] \dots \dots \dots (1)$$

式中:

N ——单位样品(g)中的菌落数(CFU/g);

$\sum C$ ——平板(含适宜范围菌落数的平板)菌落数之和;

n_1 ——第 1 个适宜稀释度的调查平板数;

n_2 ——第 2 个适宜稀释度的调查平板数;

d ——第 1 稀释度的稀释因子。

示例:

如果第 1 稀释度(10⁻⁸)的菌落数(CFU)为 220、215、210,第 2 稀释度(10⁻⁹)的菌落数(CFU)为 30、32、34,则根据式(1)计算。

$$N = (220 + 215 + 210 + 30 + 32 + 34) / [(1 \times 3 + 0.1 \times 3) \times 0.1 \times 10^{-8}] = 2.24 \times 10^{11} \text{ CFU/g}$$

5.4 杂菌率的测定

按 5.3 方法进行测定,选择 NA 培养基检测样品中的细菌杂菌;选择 PDA 培养基检测样品中的真菌杂菌。然后统计总的可见杂菌菌落数量,杂菌率按式(2)计算。

$$X = \frac{N_1 + N_2}{N_1 + N_2 + N_3} \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

式中:

X ——杂菌率,单位为百分率(%);

N_1 ——细菌杂菌菌落数的总和,单位为 CFU;

N_2 ——真菌杂菌菌落数的总和,单位为 CFU;

N_3 ——有效成分枯草芽孢杆菌菌落数总和,单位为 CFU。

5.5 pH 的测定

按 GB/T 1601 的规定进行测定。

5.6 细度的测定

按 GB/T 16150—1995 中 2.2 的规定进行测定。

5.7 干燥减量的测定

5.7.1 仪器、设备

5.7.1.1 扁形称量瓶:直径 40 mm;

5.7.1.2 电热干燥箱:控温范围(50℃~200℃),误差±2℃;

5.7.1.3 干燥器。

5.7.2 试验步骤

称取试样 10 g(精确至 1 mg),置于预先恒重的称量瓶中,将此瓶放入 105℃±2℃ 的电热恒温干燥箱内干燥,1 h 后取出,在干燥器中冷却至室温,称重。

5.7.3 测定结果

干燥减量按式(3)计算。

$$W = \frac{m - m_1}{m} \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

式中:

W ——干燥减量,单位为百分率(%);

m ——试样的质量,单位为克(g);

m_1 ——干燥后试样的质量,单位为克(g)。

5.8 贮存稳定性

5.8.1 方法提要

将试样密闭放置于 5℃ 贮存 24 个月或 20℃~25℃ 贮存 12 个月后,对含孢量进行测定,计算其占标明值的百分率,要求不低于 80%。

5.8.2 仪器、设备

5.8.2.1 冰箱;

5.8.2.2 恒温箱:控温范围(0℃~50℃),控温误差±2℃;

5.8.2.3 玻璃瓶:带有密封盖或瓶塞,能充分保证其密封性。

5.8.3 试验步骤

将 20 g 试样放入玻璃瓶中,使其铺成平滑均匀层,密封后置于 5℃ 冰箱中放置 24 个月或 20℃~25℃ 恒温箱中放置 12 个月后按 5.3 方法测定样品中的含孢量,并计算其占标明值的百分率。

6 产品检验与验收

应符合 GB/T 1604 的规定。极限值的处理应按 GB/T 8170—2008 中 4.3.3 的要求进行。

7 标志、标签、包装、贮运

7.1 标志、标签

产品的标志、标签应符合 GB 3796 的规定,同时注明贮运条件。

7.2 包装

包装应符合 GB 3796 和 GB/T 191 的规定。

7.3 贮运

贮运时严防日晒及 35℃ 以上高温,置于阴凉干燥处。运输时,注意轻放,防止破损。不得与有毒有害物质混装、混运。

7.4 安全

在使用说明书或包装标签上应注明毒性、防护措施等。

7.5 保质期

在正常贮运条件下,质量保证期从生产日期算起,一年内产品含孢量不低于标明值的 80%。

附录 A
(资料性附录)
有效成分描述

A.1 中文通用名称:枯草芽孢杆菌+菌株编号。

A.2 拉丁学名:*Bacillus subtilis*。

A.3 分类地位:细菌(Bacteria);厚壁菌门(Firmicutes);芽孢杆菌纲(Bacilli);芽孢杆菌目(Bacillales);芽孢杆菌科(Bacillaceae);芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

A.4 形态学特征:菌体呈杆状,单个、成对或短链排列,大小为 $0.7\ \mu\text{m}\sim 0.8\ \mu\text{m}\times 2.0\ \mu\text{m}\sim 3.0\ \mu\text{m}$,无荚膜,周生鞭毛,能运动;芽孢 $0.6\ \mu\text{m}\sim 0.9\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}\sim 1.5\ \mu\text{m}$,椭圆到柱状,位于菌体中央或稍偏,芽孢形成后菌体不膨大;革兰氏染色阳性;菌落圆或不规则形,表面粗糙不透明,可以起皱,呈奶油色或污白色。

A.5 有效成分主要存在形式:芽孢。

A.6 主要生物活性:抑菌(防病)。

A.7 培养保存条件:最适生长温度为 $30^{\circ}\text{C}\sim 37^{\circ}\text{C}$;适合培养基为营养琼脂(NA)或营养肉汤(NB)培养基;适宜贮存温度为 $0^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ 。

附 录 B
(规范性附录)
菌种鉴别方法

B.1 主要仪器设备和材料

除常规微生物试验操作所需要的设备和培养条件外,其他还包括:天平(感量 0.000 1 g);生物显微镜(10×100 倍);高压灭菌锅;恒温培养箱;移液器;移液管;试管(15 mL)及试管架;菌落计数器(可选);匀质器;L-玻璃棒;培养皿(Φ9cm);载玻片;盖玻片等。

B.2 主要培养基和试剂**B.2.1 试剂**

结晶紫、乙醇、草酸氨、碘、碘化钾、丙酮、番红、过氧化氢、氢氧化钠、肌酸、D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露醇、溴甲酚紫、可溶性淀粉、对二甲基氨基苯甲醛、浓硫酸、浓盐酸、L-酪氨酸 0.5 g、FeCl₃、氯化钠、硝酸钾、α-萘酸、二苯胺、乙醚、马尿酸钠、柠檬酸钠、丙二酸钠等。

B.2.2 培养基

蛋白胨水培养液(pH7.6)、营养琼脂培养基(NA)(pH7.0~7.4)、营养肉汤培养基(NB)(pH7.0~7.4)、厌氧培养基、明胶培养基(pH7.2~7.4)、丙酸盐培养基(pH7.0~7.4)、柠檬酸盐培养基(pH7.0~7.4)、苯丙氨酸培养基(pH7.0),制备方法参见附录 C。

B.3 形态学特征鉴别**B.3.1 染色**

将在 NA 培养基上生长 18 h~24 h 的目标菌涂片,空气干燥(非热固定)后,进行革兰氏染色,蓝紫色为阳性,红色为阴性。

B.3.2 菌体观察

用生物显微镜观察菌体形态、鞭毛着生情况、运动情况及芽孢形态等。

B.3.3 菌落形态观察

在 NA 培养基上生长,30℃培养 48 h 后,观察菌落的形态和产色素等。

B.4 生理生化特征鉴别

枯草芽孢杆菌及其近似种的主要生理生化特征见表 B.1。

表 B.1 枯草芽孢杆菌及其近似种的主要生理生化特征

| 序号 | 特征 | 枯草芽孢杆菌 | 蜡质芽孢杆菌 | 地衣芽孢杆菌 | 巨大芽孢杆菌 | 球形芽孢杆菌 | 苏云金芽孢杆菌 |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| 01 | 接触酶反应 | + | + | + | + | + | + |
| 02 | 厌氧生长 | - | + | + | - | - | + |
| 03 | V-P 反应 | + | + | + | - | - | d |
| 04 | 产酸 | D-葡萄糖 | + | + | + | + | + |
| | | L-阿拉伯糖 | + | - | + | d | - |
| | | D-木糖 | + | - | + | d | - |
| | | D-甘露醇 | + | - | + | d | - |

表 B.1(续)

| 序号 | 特征 | | 枯草芽 孢杆菌 | 蜡质芽 孢杆菌 | 地衣芽 孢杆菌 | 巨大芽 孢杆菌 | 球形芽 孢杆菌 | 苏云金芽 孢杆菌 |
|----|------------|------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| 05 | 葡萄糖产气 | | — | — | — | — | — | — |
| 06 | 水解 | 明胶 | + | + | + | + | d | + |
| | | 淀粉 | + | + | + | + | — | + |
| 07 | 利用 | 柠檬酸盐 | + | + | + | + | d | + |
| | | 丙二酸盐 | — | ND | + | ND | ND | ND |
| 08 | 酪氨酸水解 | | — | + | — | d | — | d |
| 09 | 苯丙氨酸脱氨酶 | | — | — | — | d | + | — |
| 10 | 卵黄反应 | | — | + | — | — | — | d |
| 11 | 硝酸盐还原反应 | | + | + | + | d | — | + |
| 12 | 吲哚反应 | | — | + | — | — | — | — |
| 13 | 马尿酸反应 | | — | — | + | ND | ND | ND |
| 14 | pH | 5.7 | + | + | + | d | d | + |
| | | 6.8 | + | + | + | + | + | + |
| 15 | 7%NaCl生长反应 | | + | d | + | d | d | + |
| 16 | 55℃生长反应 | | — | — | + | — | — | — |

注：“+”为阳性反应，“—”为阴性反应；“d”表示可以出现“+”或“—”两种情况；“ND”表示未开展过该项试验。

B.4.1 接触酶反应:取少量 37℃下培养 24h 的斜面菌种,涂片在已滴加 3%过氧化氢的玻璃片上,如有气泡产生为阳性,无气泡则为阴性。

B.4.2 厌氧生长反应:用接种环将一小环新鲜菌培养物穿刺接种于厌氧培养基,30℃下培养 3 d 左右观察,仅在表面生长为阴性,如沿穿刺线生长或在下部生长为阳性。

B.4.3 V-P 反应:将菌种接入 NB 培养液中,37℃振荡培养 24 h,取培养液与 40%NaOH 等量混合,加少许肌酸(即 0.5 mg~1.0 mg)后,猛烈振荡,10 min 后若出现红色,则为 V-P 阳性反应。

B.4.4 产酸试验:分别配制含 10% D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露醇的水溶液,然后用等体积的蛋白胨水培养液稀释至浓度为 5%,并调节 pH 至 7.0,然后加入少许 0.04%溴甲酚紫溶液,并接入纯培养待检测菌株,37℃下培养 7d 后观察指示剂颜色的变化,若变黄,表示产酸;若有气泡产生说明产气。

B.4.5 淀粉水解试验:灭菌前在 NA 培养基中加入 0.2%可溶性淀粉,取新鲜斜面培养物点种于上述平板,30℃下培养 2 d~5 d 待形成明显菌落后,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。

B.4.6 明胶液化试验:将菌株接种于明胶培养基斜面上,于 20℃温箱中培养,2 d、7 d、10 d、14 d 和 30 d 在 20℃以下室温观察菌的生长情况和明胶是否液化。如菌已生长,明胶表面无凹陷且为稳定的凝块,则为明胶水解阴性;如明胶凝块部分或全部在 20℃以下变为可流动液体,则为明胶水解阳性。

B.4.7 柠檬酸盐利用试验:在柠檬酸盐培养基上划线接种,37℃培养 3 d~5 d,培养基为碱性(指示剂变蓝色或桃红色)者为阳性,否则为阴性。

B.4.8 丙酸盐利用试验:用幼龄菌种接种丙酸盐培养基,37℃培养 1 d~2 d,培养基由绿变蓝者为阳性;培养基不变色者为阴性。

B.4.9 酪氨酸水解试验:灭菌前在 NA 培养基中加入 0.5%的 L-酪氨酸,然后将测试菌接种于该培养基平皿上,培养 7 d~14 d,酪氨酸结晶被水解而变透明为阳性,否则为阴性。

B.4.10 苯丙氨酸脱氨酶试验:将菌株在苯丙氨酸培养基斜面上于 37℃培养 24 d,然后将 10% FeCl₃ 溶液滴 4 滴~5 滴于生长菌的斜面上,当斜面上和冷凝水中产生绿色时为阳性反应,即表明已经形成了

苯丙酮,不变则为阴性。

B. 4. 11 卵黄反应:将鸡蛋表面用70%酒精擦洗干净,在无菌条件下取卵黄加入等量的生理盐水,摇匀后,取10 mL悬液加入到融化的、约50℃~55℃的200 mL NA培养基中,然后制成卵黄平板过夜备用。取18 h~24 h的斜面或培养液中的菌体点种在上述平板上,37℃培养24 h~48 h后观察,如菌落四周或下面有不透明的圈出现,表示卵磷脂分解生成脂肪,说明卵磷脂酶阳性。

B. 4. 12 硝酸盐利用反应:灭菌前在NB培养液中加入0.1%的硝酸钾,调节pH至7.0~7.6。将菌株接种于硝酸盐液体培养基中,置室温培养1 d、3 d、5 d,当培养液中滴入A液、B液(参见附录C),如溶液变为粉红色、玫瑰红色、橙色、棕色等表示有亚硝酸盐存在,为硝酸盐还原阳性。如果无红色出现,可滴加1滴~2滴二苯胺试剂,此时如呈蓝色反应,则表示培养液中仍无硝酸盐,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,故仍应按硝酸盐还原阳性处理。

B. 4. 13 吲哚反应:将新鲜菌种接入蛋白胨水培养液中培养1 d、2 d、4 d、7 d,沿管壁缓缓加入3 mm~5 mm高的寇氏吲哚反应试剂于培养液表面,在液层界面发生红色,即为阳性反应。如颜色不明显,可加入4滴~5滴乙醚并摇匀,使乙醚分散于液体中,然后静止片刻,待乙醚浮至液面后再加吲哚试剂。

B. 4. 14 马尿酸盐水解反应:NB培养液中加入1%马尿酸钠,接入新鲜菌种,培养4周~6周后,取1 mL培养物与1.5 mL 50%硫酸混合,若出现结晶,则表示马尿酸盐形成安息香酸,为马尿酸盐水解阳性反应。

B. 4. 15 pH反应试验:用盐酸分别调节NB培养液的pH至5.7和6.8,然后接入新鲜菌液一环,同时接种普通NB培养液(pH 7.2)作对照。适温培养1 d~3 d后观察生长情况。该培养液要求十分澄清,pH应准确,最好用pH计调测。

B. 4. 16 NaCl反应试验:用灭菌试管配制含有7%氯化钠的NB培养液,然后在各试管中接种10微升菌液,37℃培养48 h后肉眼观察并记录菌的生长情况。

B. 4. 17 温度反应试验:将新鲜菌液接入NB培养液中,然后置于55℃温度下进行培养,并设不接菌培养液作对照,3 d后观察生长情况。

附 录 C
(资料性附录)
稀释液和培养基制备

C.1 稀释液

C.1.1 结晶紫混合液

甲液:结晶紫,2.0 g;乙醇(95%),20 mL;
乙液:草酸铵,0.80 g;蒸馏水,80 mL;
将甲乙两液相混,静置48 h后过滤使用。

C.1.2 碘液

碘,1.0 g;碘化钾,2.0 g;蒸馏水,300 mL。先用蒸馏水少量(3 mL~5 mL)溶解碘化钾,再投入碘片,待碘全部溶解后,加水稀释至300 mL。

C.1.3 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 -萘乙酸,0.1 g;蒸馏水,20 mL;稀醋酸(10%)左右,150 mL。

C.1.4 二苯胺试剂

二苯胺0.5 g溶于100 mL浓硫酸中,用20 mL蒸馏水稀释。

C.1.5 寇氏(Kovacs' reagent)吲哚试剂

对二甲苯氨基苯甲醛,8 g;乙醇,760 mL;浓盐酸,160 mL。

C.2 培养基

C.2.1 成分

C.2.1.1 蛋白胨水培养液(pH 7.6)

蛋白胨10 g,氯化钠5.0 g,蒸馏水,1 000 mL。

C.2.1.2 营养琼脂培养基(NA)(pH 7.0~7.4)

牛肉膏,3.0 g;蛋白胨,5.0 g;琼脂,20.0 g;蒸馏水,1 000 mL。

C.2.1.3 营养肉汤培养基(NB)(pH 7.0~7.4)

牛肉膏,3.0 g;蛋白胨,5.0 g;蒸馏水,1 000 mL。

C.2.1.4 厌养培养基

酪素水解物,20 g;NaCl,5 g;巯基醋酸钠,1 g;甲醛次硫酸钠,1 g;琼脂,15 g;蒸馏水,1 000 mL。

C.2.1.5 明胶培养基(pH 7.2~7.4)

蛋白胨,5 g;明胶,100 g~150 g;水,1 000 mL。

C.2.1.6 丙酸盐培养基(pH 7.0~7.4)

酵母膏,1.0 g;硫酸铵,2.0 g;磷酸氢二钾,0.6 g;磷酸二氢钾,0.4 g;NaCl,2.0 g;丙二酸钠,3.0 g;溴百里酚蓝,0.025 g,水,1 000 mL。

C.2.1.7 柠檬酸盐培养基(pH 7.0~7.4)

氯化钠,1.0 g;七水硫酸镁,0.2 g;磷酸二氢氨,0.5 g;柠檬酸钠,2 g;0.01%酚红液;1 000 mL。

C.2.1.8 苯丙氨酸培养基(pH 7.0)

酵母膏 3 g;磷酸氢二钠,1 g;氯化钠,5.0 g;琼脂,12 g;L-苯丙氨酸,1 g;水,1 000 mL。

C.2.2 制法

将上述成分溶解,分装于三角瓶中,塞上棉塞包扎好后于 $(121\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 下高压灭菌 20 min。
