

**中华人民共和国农业行业标准**

NY/T 2296.1—2012

---

**细菌微生物农药 荧光假单胞杆菌  
第1部分：荧光假单胞杆菌母药**

**Bacterial pesticides—*Pseudomonas fluorescens*—  
Part 1: *Pseudomonas fluorescens* 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 2296《细菌微生物农药 荧光假单胞杆菌》为系列标准,分为两部分:

- 第1部分:荧光假单胞杆菌母药;
- 第2部分:荧光假单胞杆菌可湿性粉剂。

本部分为 NY/T 2296 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、浙江大学生物技术研究所。

本标准主要起草人:林荣华、姜辉、马忠华、袁善奎、尹燕妮、张宏军、曲蕊蕊、周艳明、胡承勇、马春英。

# 细菌微生物农药 荧光假单胞杆菌

## 第1部分:荧光假单胞杆菌母药

### 1 范围

本部分规定了细菌微生物农药荧光假单胞杆菌母药的要求、试验方法、检验与验收以及标志、标签、包装、贮运。

本部分适用于以活菌体为主要活性成分的粉状荧光假单胞杆菌母药。

### 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

**荧光假单胞杆菌母药** *Pseudomonas fluorescens technical concentrates(TK)*

由荧光假单胞杆菌纯菌种经发酵而获得的高含量菌粉,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)

是将荧光假单胞杆菌母药用水稀释后得到的菌液通过涂布的方法,让其单个菌体分散在琼脂平板上,待培养后每一活菌体形成一个菌落,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菌含量。

#### 3.3

**杂菌数** number of microbial contamination

荧光假单胞杆菌母药样品中,除荧光假单胞杆菌菌落以外的其他微生物菌落数之和。

#### 3.4

**杂菌率** frequency of microbial contamination

荧光假单胞杆菌母药样品中除了荧光假单胞杆菌外,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

荧光假单胞杆菌母药在室温和(或)低于室温下贮存一定时间后,产品的活菌含量占其标明值的相对百分率。

#### 4 要求

##### 4.1 外观

通常为土黄色至褐色粉末,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

荧光假单胞杆菌母药质量控制项目指标应符合表 1 要求。

表 1 荧光假单胞杆菌母药质量控制项目指标

项 目	指 标
含菌量,CFU/g	$\geq 5.0 \times 10^{11}$
杂菌率,%	$\leq 3$
pH	5.0~8.0
细度(通过 45 $\mu\text{m}$ 筛),%	$\geq 90$
干燥减量,%	$\leq 15$
贮存稳定性 <sup>a</sup> ,%	$\geq 80$
<sup>a</sup> 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,所述溶液均为水溶液。

##### 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 100g。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、16Sr RNA 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。

有效成分的特性参见附录 A。鉴别方法见附录 B。

##### 5.3 含菌量测定

###### 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  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ ,200  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ 。

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 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>

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<sub>1</sub> —— 第 1 个适宜稀释度的调查平板数;
- n<sub>2</sub> —— 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<sup>-8</sup>)的菌落数(CFU)为 220、215、210,第 2 稀释度(10<sup>-9</sup>)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<sub>1</sub> —— 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 2.1 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 12 个月或 20℃~25℃贮存 6 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 12 个月或 20℃~25℃恒温箱中放置 6 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,6 个月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:荧光假单胞杆菌+菌株编号。
- A.2 拉丁学名:*Pseudomonas fluorescens*。
- A.3 分类地位:细菌(Bacteria)、变形细菌门(Proteobacteria)、 $\gamma$ -变形细菌纲(Gamma Proteobacteria)、假单胞杆菌目(Pseudomonadales)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)。
- A.4 培养保存条件:最适生长温度为 28℃~30℃;适合培养基为营养琼脂(NA)或金氏 B 培养基(KBA);适宜贮存温度为 0℃~4℃。
- A.5 形态学特征:菌体细胞呈杆状,单个或两个连在一起,对数生长期大小为 0.7  $\mu\text{m}$ ~0.8  $\mu\text{m}$ ×2.3  $\mu\text{m}$ ~2.8  $\mu\text{m}$ ,不产生芽孢及荚膜,能运动;在营养琼脂培养基上,菌落圆形,表面光滑,湿润,有光泽,边缘整齐,乳脂色,半透明;培养物产生扩散性的荧光色素,特别是在缺铁培养基上。
- A.6 有效成分主要存在形式:活菌体。
- A.7 主要生物活性:抑菌(防病)。

**附录 B**  
(规范性附录)  
**形态学特征和生理生化鉴别方法**

**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)、超净工作台、高压灭菌锅、PCR 仪、离心机、凝胶成像系统、电泳仪、分光光度计、恒温培养箱、移液器、移液管、试管(15mL)及试管架、菌落计数仪(可选)、匀质器、L 形玻璃棒、培养皿(直径 9 cm)、载玻片和盖玻片等。

**B.2 形态学特征鉴别****B.2.1 色素生成的观察**

大多数荧光假单胞菌分泌可溶性黄绿色素,在波长 260 nm 下发射荧光,特别在缺铁和金氏 B 培养基中。在金氏 A 培养基中,某些荧光假单胞菌的菌株产生其他非荧光色素,特征性的蓝,绿或橙色吩嗪色素,脓青素(在中性或碱性培养基中呈蓝色,在酸性培养基中呈红色)。

营养琼脂培养基(NA):牛肉膏 3 g、蛋白胨 5 g、葡萄糖 5g~10 g、酵母浸膏 1 g、琼脂 15g~20 g、蒸馏水 1 000 mL、pH 7.2。

金氏 B 培养基(KBA):蛋白胨 20 g、甘油 10 g、磷酸氢二钾 1.5 g、七水硫酸镁 1.5 g、琼脂 17 g、蒸馏水 1 000 mL、pH 7.2。

金氏 A 培养基:蛋白胨 20 g、氯化镁 1.4 g、硫酸钾 10 g、甘油 10 g、琼脂 18 g、蒸馏水 1 000 mL、pH 7.4。

**B.2.2 3%氢氧化钾拉丝试验**

将 3%氢氧化钾滴在载玻片上,用牙签挑取培养 24 h 的菌落于其中轻轻搅拌,溶液变黏稠并能挑出丝的为阳性反应。以滴灭菌水于同一载玻片上重复同样步骤为阴性对照。

**B.2.3 革兰氏染色**

采用结晶紫草酸铵染色法。试剂配方如下:

a) 染剂:溶液 A:结晶紫 2 g 溶于 20 mL 95%乙醇。

溶液 B:草酸铵 0.8 g 溶于 30 mL 蒸馏水。

溶液 A 和溶液 B 分别配制后混合。

b) 碘液:将碘 1 g 和碘化钾 2 g 在研钵中充分研磨,溶于 300 mL 蒸馏水中,储存于棕色磨口瓶中待用。

c) 复染剂:用 95%乙醇将藏红配成 2.5%的溶液,取 10 mL 与 100 mL 蒸馏水混匀。

将培养 24 h 的菌株涂片固定,按以下步骤染色:

- 1) 结晶紫染剂染色 1 min,水冲洗;
- 2) 碘液处理 1 min;
- 3) 95%乙醇褪色 20 s 左右;
- 4) 吸干后用复染剂染色 10 s 左右;
- 5) 水洗,风干后镜检。

**B.2.4 鞭毛染色**

**B.2.4.1 采用西萨—基尔(Ceseres - Gill)染色法**

- a) 染媒剂:单宁酸 10 g、绿化铝·6H<sub>2</sub>O 18 g、氯化锌 10 g、碱性品红 1.5 g、60%酒精 40 mL 研钵中盛酒精 10 mL,加入以上各种成分,充分研磨混合后,再加入多余的酒精,使用蒸馏水稀释 2 倍,染色时过滤。
- b) 染液:苯酚品红  
 溶液 I:碱性品红 0.3 g、95%酒精 10 mL;  
 溶液 II:苯酚(结晶)5 g、蒸馏水 95 mL;  
 溶液 I 和溶液 II 分别配制后混合。
- c) 染色步骤:染媒剂过滤后,滤液滴在载玻片上,处理 5 min~7 min;用水轻轻洗去染媒剂,甩去载玻片上剩余的水,在空气中干燥后,再加苯酚品红染料染 5 min;水洗,在空气中干燥后镜检菌体和鞭毛呈红色。

**B.2.4.2 采用赖夫生染色法**

- a) 试剂:单宁酸 10 g、氯化钠 5 g、碱性品红 4 g  
 取以上混合物 1.9 g,溶解在 33 mL 的 95%乙醇中,加蒸馏水至 100 mL,调 pH 为 5.0,过滤。
- b) 染色步骤为:
  - 1) 用蜡笔在洁净载玻片上划四个 1.3 cm×2.0 cm 的长方形小格;
  - 2) 斜面培养 20 h~24 h 的菌苔上加灭菌水,室温下静置 20 min~30 min;
  - 3) 将载玻片斜放(倾斜 80°),用接种环在每小格顶端加一滴菌悬液,使其缓缓下流,流至小格底部时立即用吸水纸吸去,将载玻片风干;
  - 4) 加染剂于第一小格,经 5 s、10 s、15 s 后,分别在第二、三、四个小格中加染剂;
  - 5) 仔细观察染剂中很细沉淀物的产生,当第一和第二小格中已经产生沉淀时,立即用蒸馏水将载玻片上的染剂洗去;
  - 6) 载玻片在室温下自然风干,然后用油镜检视。

**B.3 生理生化特征鉴别**

荧光假单胞杆菌的生理生化特征见表 B.1。

**表 B.1 荧光假单胞杆菌及近似种的形态和生理生化特征**

序号	特征	荧光假单胞杆菌	绿针假单胞杆菌	致金假单胞杆菌	铜绿假单胞杆菌	恶臭假单胞杆菌
01	3% KOH 反应	+	+	+	+	+
02	革兰氏染色	G <sup>-</sup>				
03	鞭毛染色	极生,>1	极生,>1	极生,>1	极生,1	极生,>1
04	荧光色素	+	+	+	d	+
05	脓青素	-	-	-	d	-
06	吩嗪色素	绿	+	-	ND	-
		橙	-	-	+	d
07	41℃生长	-	-	-	+	-
08	好氧/厌氧	专性好氧	专性好氧	专性好氧	专性好氧	专性好氧
09	氧化酶	+	+	+	+	+
10	接触酶	+	+	+	+	+
11	PHB 颗粒染色	-	-	-	-	-
12	卵磷脂酶	d	+	d	-	-
13	反硝化	d	+	d	+	-
14	硝酸盐还原	ND	ND	+	ND	+
15	精氨酸双水解	+	+	+	+	+

表 B.1 (续)

序号	特征	荧光假单胞杆菌	绿针假单胞杆菌	致金假单胞杆菌	铜绿假单胞杆菌	恶臭假单胞杆菌	
16	明胶液化	+	+	+	+	-	
17	果聚糖产生	d	+	+	-	-	
18	淀粉水解	-	-	-	-	-	
19	碳素利用	葡萄糖	+	+	+	+	+
		海藻糖	+	+	+	-	-
		间-肌醇	+	+	+	-	-
		犍牛儿醇	-	-	-	+	-

注：“+”表示 90% 或以上的菌株为阳性；“-”表示 90% 或以上的菌株为阴性；“d”表示所有研究菌株的 10%~90% 为阳性；“ND”表示未开展过该项试验。

### B.3.1 好氧和厌氧测定

培养基配方为：蛋白胨 2 g、氯化钠 5 g、磷酸氢二钾 0.2 g、琼脂 3 g、蒸馏水 1 000 mL、溴百里蓝(1% 水溶液)3 mL、pH 7.1。

分装试管，每管 5 mL，灭菌后加入过滤灭菌的葡萄糖水溶液，终浓度为 1%。当琼脂凝固后用针刺接种(一直刺到管底)培养 24 h 的细菌，每一菌株取两管加一层灭菌石蜡油和凡士林等量混合物 1 mL，另两管则为开管(不加石蜡油—凡士林混合物)。两管不接菌也不加石蜡油—凡士林混合物和两管不接菌而加石蜡油—凡士林混合物的作为对照。27℃ 培养，经 1 d、2 d、4 d、7 d、14 d 后观察并记载结果。如果闭管和开管培养基均变黄者，为发酵产酸；若只有开管变黄为氧化产酸。好氧细菌只在开管的上部生长(颜色变黄)；兼性厌氧的细菌在开管的上下部都能生长；厌氧细菌则只能在开管的下部和封口的管中生长。

### B.3.2 氧化酶试验

在培养皿内放一张滤纸，滴 1% 的对-氨基二甲基苯胺盐酸盐(需现配)2 滴~3 滴，使滤纸湿润，用牙签挑生长 24 h 的菌落涂在滤纸上，若在 10 s 内变成紫色，则为阳性反应。

### B.3.3 接触酶试验

在 NA 斜面上培养 36 h 的菌茎上加 1 mL 3% 过氧化氢，立即观察有无气泡产生。有气泡时说明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在酶的作用下分解为 H<sub>2</sub>O 和 O<sub>2</sub>，为阳性反应。

### B.3.4 聚-β-羟基丁酸盐(PHB)颗粒染色

将菌株培养于 NA 或无机盐培养基(每 1 000 mL 含硫酸铵 0.2 g、氯化钾 0.2 g、七水硫酸镁、0.2 g、琼脂 17 g)，并加 DL-β-羟基丁酸盐(5 g/L)，pH 7.2。

苏丹黑 B 染色 PHB，过程如下：

- 配制苏丹黑 B 溶液(0.3 g 染料溶于 100 mL 70% 酒精中)，大部分染料溶解后，不时地摇动溶液，放置过夜，使用前过滤，染液较稳定，保存于加盖容器内(室温)可使用数月；
- 用 12 h~24 h 的培养物制成细菌涂片，空气中干燥后，加热固定；
- 苏丹黑 B 溶液染色 10 min~15 min(溶剂滴满玻片)；
- 除去载玻片上剩余的染剂，吸干，再用二甲苯冲洗载玻片后吸干(也可用水代替二甲苯)；
- 0.5% 藏红溶液或稀石碳酸复红溶液复染 30 s~60 s，水洗、吸干。用显微镜检查。PHB 颗粒呈蓝黑色或蓝灰色，而细胞质呈粉红色。

### B.3.5 卵磷脂酶试验

将鸡蛋表面用 70% 酒精灭菌，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后备用。取 18 h~24 h 的斜面或培养液中的菌体点种在上述平板上，28℃ 培养 24 h~48 h 后观察。菌落四周或下面出现黄色沉淀圈，表明卵磷脂分解生成脂肪，为卵磷脂酶阳性。

### B.3.6 反硝酸作用测定

在含硝酸钾的肉汁胨斜面上接种测试菌株,并用凡士林油(凡士林和液体石蜡为1:1)封管,封油的高度约1 cm。同时接种不含硝酸钾的肉汁胨培养基为对照。培养2 d~7 d,在含硝酸钾的培养基中有气泡产生为反硝化作用阳性。

### B.3.7 硝酸盐还原

硝酸盐培养液配方:蛋白胨10 g、硝酸钾1 g、蒸馏水1 000 mL。

测定亚硝酸盐用格里斯试剂(Griess-Ilosvary)测定法,试剂配方如下:

A液:对氨基苯磺酸0.5 g、稀醋酸(10%左右)150 mL;

B液: $\alpha$ -萘胺0.1 g、蒸馏水20 mL、稀醋酸(10%左右)150 mL;

测定硝酸根用二苯胺试剂,配法如下:称取二苯胺0.5 g,溶于100 mL浓硫酸中;用20 mL蒸馏水稀释。

测定方法:将细菌接种于分装为5毫升每管的培养液中,25℃培养,1 d、4 d、7 d、14 d、21 d时先在试管中加入A液、B液各一滴,溶液若变为粉红色、玫瑰红色、橙色、棕色等表示有亚硝酸盐出现,为硝酸盐还原阳性;同时,如果在试管中加一滴二苯胺后出现深蓝色,则表明仍有硝酸根存在,为硝酸盐还原阴性;若硝酸根和亚硝酸根均检测不到,说明硝酸盐被还原为其他物质,也为硝酸盐还原阳性。

### B.3.8 精氨酸双水解酶试验

培养基:蛋白胨1 g、氯化钠5 g、磷酸氢二钾0.3 g、酚红0.01 g、L-精氨酸盐酸盐10 g、琼脂3 g、蒸馏水1 000 mL、pH7.2(培养基为淡红色)。

每试管装培养基3 mL~4 mL,灭菌,冷却后,针刺接种细菌,直至培养基底部立即用灭菌凡士林油3 mL,3%琼脂封管,28℃培养观察结果。如果7 d之内培养基呈深红色(比原来培养基颜色明显加深),则为精氨酸双水解酶阳性,反之如颜色不变则为阴性。同时设不接菌的培养基为对照。

### B.3.9 明胶液化试验

培养基:蛋白胨5 g、明胶130 g、蒸馏水1 000 mL;

分装试管,每管5 mL,115℃灭菌20 min;针刺接种,以不接种的为对照,培养3 d、7 d、10 d、14 d、21 d、28 d后,放入4℃冰箱中半小时,观察菌的生长情况及明胶是否液化。

### B.3.10 果聚糖产生实验

培养基:蛋白胨10 g、牛肉浸膏3 g、蔗糖50 g、氯化钠5 g、琼脂15 g~20 g、蒸馏水1 000 mL、pH7.2。

同时用葡萄糖代替蔗糖作为对照,用培养36 h的细菌在培养基平板上划线,7 d内如只在蔗糖培养基上形成黏稠、圆形隆起为阳性反应;如未形成黏稠、圆顶菌落或在两种平板上都形成黏稠、圆顶菌落则为阴性反应。

### B.3.11 淀粉水解

用YNA培养基测定,配方为:酵母浸膏5 g、琼脂23 g、蒸馏水1 000 mL。

加入1%(W/V)马铃薯淀粉或0.2%(W/V)可溶性淀粉。121℃灭菌15 min,倒平板。凝固后用接种环蘸菌悬液划线,28℃培养,分别于5 d和10 d后洗去菌落,加入碘液,菌落处或其边缘未呈蓝紫色的为阳性反应,说明淀粉被水解。

### B.3.12 碳素化合物产酸试验

所用基本培养基为Dye培养基C,配方如下:磷酸氢二胺1 g、氯化钾0.2 g、七水硫酸镁0.2 g、酵母浸膏0.2 g、蒸馏水1 000 mL、琼脂15 g,调整pH为7.0,再加入15 mL 0.04%(W/V)溴甲酚紫溶液,121℃灭菌20 min。

所测定的碳水化合物配成浓的母液(10%),121℃灭菌20 min,然后加入上述培养液中,使终浓度为0.5%(W/V)。配成斜面或溶液使用。培养7 d、14 d。产酸时斜面变为黄色。观察葡萄糖斜面中有无

气泡产生。所测碳水化合物为葡萄糖、海藻糖、间-肌醇和牻牛儿醇。

---