SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4624.2—2016

入境环保用微生物菌剂检测方法 第2部分：短小芽孢杆菌

Methods for examination of import microbial blends in the environmental protection— Part 2: *Bacillus pumilus*

2016-08-23 发布　　2017-03-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局　发布

前　言

SN/T 4624《入境环保用微生物菌剂检测方法》共分为17部分：

——第1部分：地衣芽孢杆菌；

——第2部分：短小芽孢杆菌；

——第3部分：巨大芽孢杆菌；

——第4部分：嗜酸氧化亚铁硫杆菌；

——第5部分：β型溶血性链球菌；

——第6部分：金黄色葡萄球菌；

——第7部分：沙门氏菌；

——第8部分：志贺氏菌；

——第9部分：致泻大肠埃希氏菌；

——第10部分：淡紫拟青霉；

——第11部分：雅致小克银汉霉；

——第12部分：哈茨木霉；

——第13部分：黄孢原毛平革菌；

——第14部分：焦曲霉；

——第15部分：解淀粉芽孢杆菌；

——第16部分：类产碱假单胞菌；

——第17部分：恶臭假单胞菌。

本部分为SN/T 4624的第2部分。

本部分按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：王芳、贾金生、张波、张明、李蓉娟。

入境环保用微生物菌剂检测方法 第2部分：短小芽孢杆菌

1 范围

SN/T 4624的本部分规定了入境环保用微生物菌剂符合性检验短小芽孢杆菌的形态学鉴定、生化鉴定、分子生物学检测方法。

本部分适用于入境环保用微生物菌剂符合性检验短小芽孢杆菌检测和鉴定。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 主要试剂和培养基

3.1 实验用水：应符合GB/T 6682中一级水的规格。

3.2 营养琼脂：见附录A中A.1。

3.3 营养肉汤：见A.2。

3.4 革兰氏染色法相关试剂：见A.3。

3.5 接触酶：见A.4。

3.6 氧化酶：见A.5。

3.7 糖发酵管：见A.6。

3.8 柠檬酸盐：见A.7。

3.9 硝酸盐还原：见A.8。

3.10 淀粉水解：见A.9。

3.11 明胶：见A.10。

3.12 TE缓冲液(pH 8.0)：见A.11。

3.13 1%～3%琼脂糖凝胶：见A.12。

3.14 25 mmol/L EDTA：见A.13。

3.15 3 mol/L醋酸钠：见A.14。

3.16 dNTP：dATP、dTTP、dGTP、dCTP。

3.17 TBE：见A.15。

3.18 *Taq* DNA聚合酶。

3.19 细菌基因组DNA提取试剂盒。

3.20 琼脂糖。

3.21 溴化乙锭。

3.22 DNA分子量标记：100 bp DNA ladder。

4 主要仪器和设备

4.1 电子天平(感量 0.01 g)。
4.2 恒温培养箱:36 ℃±1 ℃、50 ℃±1 ℃
4.3 恒温振荡培养箱:36 ℃±1 ℃。
4.4 恒温水浴锅。
4.5 台式冷冻离心机(最高转速 15 000 r/min)。
4.6 PCR 扩增仪。
4.7 生物显微镜:10×～100×。
4.8 厌氧培养装置:36 ℃±1 ℃。
4.9 微量移液器和灭菌吸头:10 μL、20 μL、200 μL、1 000 μL。
4.10 高压灭菌锅。
4.11 PCR 超净工作台。
4.12 电泳仪。
4.13 核酸/蛋白分析仪。
4.14 凝胶成像系统。
4.15 无菌培养皿:直径 90 mm。

5 样品制备、培养

5.1 以无菌操作取 1 g(mL)样品加入到 100 mL 生理盐水中混匀,移取 1 环菌连续划线接种 5 个营养琼脂平板,36 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h。取样过程中,在样品旁边放置 1 个营养琼脂平板作为空白对照。
5.2 挑取平板上 3～5 个白色或淡黄色、半透明或不透明、边缘光滑的菌落进行形态学鉴定。
5.3 挑取符合形态学特征单菌落转营养琼脂平板纯培养,36 ℃±1 ℃条件下培养 18 h～24 h;再从纯培养平板上挑取菌落接种营养肉汤,36 ℃±1 ℃条件下 180 r/min 振荡培养 18 h～24 h。

6 形态学鉴定

6.1 培养性状

短小芽孢杆菌在营养琼脂上的菌落颜色由白色到淡黄色,半透明到不透明,表面及边缘一般多为光滑。

6.2 形态特征

革兰氏染色及芽孢染色:将 5.2 中平板上的菌落做涂片进行革兰氏染色和芽孢染色,镜检。
短小芽孢杆菌为革兰氏阳性杆菌,菌体宽度 0.6 μm～0.7 μm,长度 2.0 μm～3.0 μm,内生孢子,芽孢不膨大,不形成伴胞晶体。

7 生化鉴定法

取 5.2 中菌液利用细菌微量生化鉴定管进行生化鉴定,每个生化管加入 100 μL 增菌肉汤。
短小芽孢杆菌生化特征见表 1。

表 1　短小芽孢杆菌生化特征

鉴定项目	短小芽孢杆菌
接触酶	+
氧化酶	+
厌氧生长	−
葡萄糖	+
木糖	+
L-阿拉伯糖	+
甘露醇	+
利用葡萄糖产气	−
利用柠檬酸盐	+
硝酸盐还原	−
50 ℃生长	+
pH 5.7 生长	+
7% NaCl 生长	+
淀粉水解	−
明胶液化	+

8　分子生物学检测

8.1　细菌模板 DNA 的提取

8.1.1　直接提取法

取 5.2 中菌液 2 mL 加到 2 mL 无菌离心管中，10 000 r/min 离心 2 min，尽量弃净上清，沉淀加入 TE100 μL、10 mg/mL 溶菌酶 100 μL，37 ℃温育 30 min，12 000 r/min 离心 2 min，沉淀加入 TE 缓冲液 600 μL 重悬，再加入 15 mg/mL 蛋白酶 K25 μL，55 ℃温育 1 h 后沸水浴 10 min，12 000 r/min 离心 5 min，取上清保存于−20 ℃以待检测。

8.1.2　有机溶剂提取法

取 5.2 中菌液 2 mL 加到 2 mL 无菌离心管中，10 000 r/min 离心 2 min，尽量弃净上清，沉淀加入 TE 缓冲液 570 μL 重悬，然后加入 10 mg/mL 溶菌酶 100 μL，37 ℃温育 30 min，再加入 10% SDS30 μL，65 ℃温育 10 min，加入等体积的酚混匀，12 000 r/min 离心 10 min，取上清移入一新离心管中，重复一次，两次酚抽提后取上清加等体积的酚/氯仿(1:1 体积比)混匀，12 000 r/min 离心 10 min，取上清再移入一新离心管中，加等体积的无水乙醇，1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠，轻缓颠倒混匀，12 000 r/min 离心 10 min，弃上清，沉淀用 500 μL 75%乙醇洗两次，离心管开盖室温放置数分钟使乙醇挥发，加入 100 μL 无菌水，−20 ℃保存以待检测。

8.1.3　试剂盒法

使用商品化的细菌基因组 DNA 提取试剂盒，具体提取操作参照说明书进行。选择商业化试剂盒

的原则是所提取的 DNA 质量好并且提取率高。

8.2 DNA 质量检测

将提取的 DNA 用 1.0%的琼脂糖凝胶(含溴化乙锭或等效染料)进行完整性检测。

采用分光光度法测定 DNA 的浓度和纯度。DNA 浓度(ng/μL)计算公式为:

$$\text{DNA 浓度} = OD_{260} \times 50 \times \text{核酸稀释倍数}$$

若 OD_{260}/OD_{280} 在 1.8～2.0 之间,表明 DNA 纯度较好,可用于 PCR 检测。

8.3 PCR 鉴定

8.3.1 引物序列

引物序列及扩增片段长度见表 2。

表 2 引物序列及扩增片段长度

名称	引物序列(5′-3′)	扩增片段大小
短小芽孢杆菌	GGTACTTGAGCTTCATATGGGTATGG TTCGCATCACGGGACATACCTG	133 bp

8.3.2 反应体系

PCR 反应体系见表 3。

表 3 PCR 反应体系

试剂名称	PCR 反应体系
10×PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})	2.5 μL
dNTP(2.5 mmol/L)	2 μL
Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.5 μL
正向引物和反向引物(10 μmol/ L)	各 1.0 μL
DNA 模板(50 ng～200 ng)	3.0 μL
双蒸水	补至 25 μL
注:反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。	

8.3.3 PCR 反应条件

94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,61 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,进行 30 个循环;72 ℃最后延伸 10 min。

使用不同 PCR 仪,可对参数作适当调整。

8.3.4 空白对照、阴性对照和阳性对照设置

阴性对照:非短小芽孢杆菌 DNA 为模板。

阳性对照:已知短小芽孢杆菌的 DNA(参见附录 B)或含有待测基因序列的质粒为模板。

空白对照:设两个,一是提取 DNA 时设置的提取空白对照(以等体积水代替样品),二是 PCR 反应

的空白对照(以水代替 DNA 模板)。

8.3.5 PCR 扩增产物的电泳检测

用电泳缓冲液(0.5×TBE)制备 2%琼脂糖凝胶,取 5 μL PCR 扩增产物,与 1 μL 上样缓冲液混合,进行点样,DNA marker(100 bp DNA ladder)作参照。3 V/cm～5 V/cm 恒压电泳,电泳 50 min～60 min,电泳检测结果用凝胶成像分析系统记录并保存。

8.3.6 PCR 扩增结果判定

8.3.6.1 对照结果

阳性对照:出现 133 bp 的扩增条带;
阴性对照:未出现特征条带;
空白对照:未出现特征条带。

8.3.6.2 检测结果

对照实验结果正常,待测样品出现 133 bp 扩增条带,则可判定该样品 PCR 扩增结果为阳性。
对照实验结果正常,待测样品未出现 133 bp 扩增条带,则可判定该样品 PCR 扩增结果为阴性。
对照实验结果异常,本次待测样品的结果无效,应重新做实验,并排除污染因素。

9 结果报告

当形态学鉴定、生化鉴定、分子生物学检测结果均符合时,报告检出短小芽孢杆菌。

当形态学鉴定、生化鉴定、分子生物学检测结果不符合时,建议重做。仍有不符合时,报告未检出短小芽孢杆菌。

附 录 A
（规范性附录）
培养基和试剂

A.1 营养琼脂培养基

A.1.1 成分

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g～20 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内，加入 15%氢氧化钠溶液约 2 mL 校正 pH 至 7.2～7.4。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化。分装烧瓶，121 ℃高压灭菌 15 min。

A.2 营养肉汤

A.2.1 成分

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

将各成分溶解于蒸馏水内，加入 15%氢氧化钠溶液校正 pH 至 7.2～7.4，加热煮沸，分装烧瓶，121 ℃高压灭菌 15 min。

A.3 革兰氏染色法

A.3.1 结晶紫染色液

结晶紫	1 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

将结晶紫溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

A.3.2 革兰氏碘液

碘	1 g
碘化钾	20 g

蒸馏水	300 mL

将碘与碘化钾先进行混合，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.3.3 沙黄复染液

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.3.4 染色法

A.3.4.1 将涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染 1 min，水洗。

A.3.4.2 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。

A.3.4.3 滴加 95%乙醇脱色，约 30 s；或将乙醇滴满整个涂片，立即倾去，再用乙醇滴满整个涂片，脱色 10 s。

A.3.4.4 水洗，滴加复染液，复染 1 min。水洗，待干，镜检。

A.3.5 结果

革兰氏阳性菌呈紫色。革兰氏阴性菌呈红色。

A.4 接触酶

A.4.1 成分

3%过氧化氢溶液

A.4.2 制法

挑取固体培养基上菌落一接种环，置于洁净试管内，滴加 3%过氧化氢溶液 2 mL，观察结果。

A.5 氧化酶

A.5.1 成分

1%盐酸二甲基对苯二胺溶液

1%α-萘酚乙醇溶液

A.5.2 制法

取白色洁净滤纸沾取菌落，加盐酸二甲基对苯二胺溶液一滴，阳性者呈现粉红色，并逐渐加深；再加α-萘酚乙醇溶液一滴，阳性者于半分钟内呈现鲜蓝色，阴性于两分钟内不变色。

以毛细吸管吸取试剂，直接滴加于菌落上，其显色反应与以上相同。

A.6 糖发酵管

A.6.1 成分

牛肉膏	5 g

蛋白胨	10 g
氯化钠	3 g
磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	2 g
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	12 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.4	

A.6.2 制法

葡萄糖发酵管按上述成分配好后，按0.5%加入葡萄糖，分装于有一个倒置小管的小试管内，121 ℃高压灭菌15 min。

其他各种糖发酵管可按上述成分配好后，分装每瓶100 mL，121 ℃高压灭菌15 min。另将各种糖类分别配好10%溶液，同时高压灭菌。将5 mL糖溶液加入于100 mL培养基内，以无菌操作分装小试管。

注：蔗糖不纯，加热后会自行水解者，采用过滤法除菌。

A.6.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取小量培养物接种，于36 ℃±1 ℃培养，一般观察2 d～3 d。迟缓反应需观察14 d～30 d。

A.7 利用柠檬酸盐

A.7.1 成分

氯化钠	5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
磷酸二氢铵	1 g
磷酸氢二钾	1 g
柠檬酸钠	5 g
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	40 mL
pH 6.8	

A.7.2 制法

先将盐类溶解于水内，校正pH，再加琼脂，加热溶化。然后加入指示剂，混合均匀后分装试管，121 ℃高压灭菌15 min。放成斜面。

A.8 硝酸盐还原

A.8.1 成分

硝酸钾	0.2 g
蛋白胨	5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.4	

A.8.2 制法

将上述配制好的溶液，校正 pH，分装试管，每管约 5 mL，121 ℃高压灭菌 15 min。

A.8.3 硝酸盐还原试剂

甲液：将对氨基苯磺酸 0.8 g 溶解于 2.5 mol/L 乙酸溶液 100 mL 中。

乙液：将甲萘胺 0.5 g 溶解于 2.5 mol/L 乙酸溶液 100 mL 中。

A.9 淀粉水解试验

A.9.1 成分

蛋白胨	5 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
可溶性淀粉	20 g
琼脂	15 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.4	

A.9.2 制法

用少量水先将可溶性淀粉溶解，其他成分溶化在蒸馏水中，校正 pH。115 ℃高压灭菌 15 min。

A.9.3 试验方法

将细菌划线接种于可溶性淀粉琼脂平板上，在 37 ℃培养 24 h。取出平板，在菌落处滴加碘液少许，观察。培养基呈深蓝色，说明淀粉未被水解，即淀粉酶阴性。能水解淀粉的细菌其菌落周围有透明的环（即淀粉酶阳性）。

A.10 明胶

A.10.1 成分

牛肉浸膏	3 g
蛋白胨	5 g
明胶	120 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.0	

A.10.2 制法

将前两种成分加热溶化到蒸馏水中，校正 pH。在 50 ℃～55 ℃缓慢加入明胶，边加边搅动，分装试管，每管 5 mL，115 ℃高压灭菌 15 min，制成高层。

A.10.3 试验方法

挑取 18 h～24 h 待试菌培养物，大量穿刺接种明胶高层，36 ℃培养 7 d～14 d，每天观察结果，看是

否液化，液化的为试验阳性。

A.11 TE 缓冲液(pH 8.0)

A.11.1 成分

Tris 碱	1.21 g
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	1.86 g
去离子水	1 000 mL

A.11.2 制法

在 800 mL 去离子水中，依次加入以上成分，调节 pH 至 8.0，用去离子水定容到 1 L，分装后 121 ℃高压灭菌 15 min。

A.12 1%～3%琼脂糖凝胶

A.12.1 成分

琼脂糖	1 g～3 g
0.5×TBE	100 mL

A.12.2 制法

在 100 mL 的 0.5×TBE 中，加入琼脂糖，在微波炉中加热熔化。待溶液冷却至 60 ℃左右，灌注模具冷却形成。

A.13 25 mmol/L EDTA

A.13.1 成分

$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	46.525 g
去离子水	1 000 mL

A.13.2 制法

在 800 mL 去离子水中，加入 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$，充分搅拌，用 NaOH 调节 pH 至 8.0，加去离子水定容到 1 L，分装后 121 ℃高压灭菌 15 min。

A.14 3 mol/L 醋酸钠

A.14.1 成分

$NaAc \cdot 3H_2O$	40.8 g
去离子水	100 mL

A.14.2 制法

在 40 mL 去离子水中，加入 $NaAc \cdot 3H_2O$，充分搅拌，用冰醋酸调节 pH 至 5.2，加去离子水定容到

100 mL,分装后 121 ℃高压灭菌 15 min。

A.15 TBE

A.15.1 成分

Tris	54.0 g
硼酸	27.5 g
去离子水	800 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	20 mL

A.15.2 制法

54 gTris,27.5 g 硼酸,800 mL 去离子水溶解,20 mL 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)定容至 1 L。

SN/T 4624.2—2016

附 录 B
（资料性附录）
短小芽孢杆菌基因序列（GenBank EF465530.1）

1 ctggctcagg acgaacgctg gcggcgtgcc taatacatgc aagtcgagcg gacagaaggg
61 agcttgctcc cggatgttag cggcggacgg gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcctgtaa
121 gactgggata actccgggaa accggagcta ataccggata gttccttgaa ccgcatggtt
181 caaggatgaa agacggtttc ggctgtcact tacagatgga cccgcggcgc attagctagt
241 tggtgaggta acggctcacc aaggcgacga tgcgtagccg acctgagagg gtgatcggcc
301 acactgggac tgagacacgg cccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttccgc
361 aatggacgaa agtctgacgg agcaacgccg cgtgagtgat gaaggttttc ggatcgtaaa
421 gctctgttgt tagggaagaa caagtgcaag agtaactgct tgcaccttga cggtacctaa
481 ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt
541 gtccggaatt attgggcgta aagggctcgc aggcggtttc ttaagtctga tgtgaaagcc
601 cccggctcaa ccggggaggg tcattggaaa ctgggaaact tgagtgcaga agaggagagt
661 ggaattccac gtgtagcggt gaaatgcgta gagatgtgga ggaacaccag tggcgaaggc
721 gactctctgg tctgtaactg acgctgagga gcgaaagcgt ggggagcgaa caggattaga
781 taccctggta gtccacgccg taaacgatga gtgctaagtg ttaggggttt tccgcccctt
841 agtgctgcag ctaacgcatt aagcactccg cctggggagt acggtcgcaa gactgaaact
901 caaaggaatt gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg
961 cgaagaacct taccaggtct tgacatcctc tgacaaccct agagataggg ctttcccttc
1021 ggggacagag tgacaggtgg tgcatggttg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt
1081 aagtcccgca acgagcgcaa cccttgatct tagttgccag cattcagttg ggcactctaa
1141 ggtgactgcc ggtgacaaac cggaggaagg tggggatgac gtcaaatcat catgcccctt
1201 atgacctggg ctacacacgt gctacaatgg acagaacaaa gggctgcgag accgcaaggt
1261 ttagccaatc ccacaaatct gttctcagtt cggatcgcag tctgcaactc gactgcgtga
1321 agctggaatc gctagtaatc gcggatcagc atgccgcggt gaatacgttc ccgggccttg
1381 tacacaccgc ccgtcacacc acgagagttt gc