

HJ

中华人民共和国国家生态环境标准

HJ 1190—2021

水质 灭菌生物指示物（枯草芽孢杆菌 黑色变种）的鉴定 生物学检测法

Water quality—Identification of biological indicator (*Bacillus subtilis* var. *niger*) for sterilization—Biological detection method

本电子版为正式标准文本，由生态环境部环境标准研究所审校排版。

2021-09-17 发布

2022-04-01 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	2
5 试剂和材料	2
6 仪器和设备	2
7 样品	3
8 分析步骤	3
9 结果与报告	6
10 灵敏性和特异性.....	6
11 质量保证和质量控制.....	6
12 废物处置	7
附录 A（规范性附录） 培养基和染色液.....	8
附录 B（规范性附录） 培养基和染色液使用说明及结果观察	14



前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》《中华人民共和国水污染防治法》，防治生态环境污染，改善生态环境质量，规范水中灭菌生物指示物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的鉴定方法，制定本标准。

本标准规定了鉴定水中灭菌生物指示物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的生物学方法，用于微生物实验室灭菌效果的评价。

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。

本标准主要起草单位：上海市环境监测中心。

本标准验证单位：浙江省生态环境监测中心、江苏省常州环境监测中心、华东师范大学、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 2021 年 9 月 17 日批准。

本标准自 2022 年 4 月 1 日起实施。

本标准由生态环境部解释。

水质 灭菌生物指示物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的鉴定 生物学检测法

警告：检测人员应采取必要的生物安全防护措施（包括但不限于一次性手套、口罩、防护服、防护眼镜、鞋套等防护用品）；检测时应做好无菌防护，在无菌操作设备内进行。

1 适用范围

本标准规定了鉴定水中灭菌生物指示物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的生物学方法。
本标准适用于微生物实验室灭菌效果的评价。

2 规范性引用文件

本标准引用了下列文件或其中的条款。凡是注明日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本标准。凡是未注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

《消毒技术规范》（原卫生部卫法监发〔2002〕282号）

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*

也称萎缩芽孢杆菌（*Bacillus atrophaeus*），在含酪氨酸的培养基上形成黑色素的革兰氏阳性芽孢杆菌。作为灭菌效果评价试验的指示菌种。

3.2

灭菌 sterilization

用物理或化学的方法杀灭全部微生物，包括致病和非致病微生物、芽孢和朊病毒蛋白，使之达到无菌保障水平。常用的灭菌方法有化学试剂灭菌（如环氧乙烷、甲醛等）、射线灭菌（如 γ 射线、电子束辐射等）、湿热灭菌、干热灭菌和过滤除菌等。

3.3

生物指示物 biological indicator

含有对特定灭菌过程具有一定耐受力的活微生物的生物制品。

注：生物指示物为特定灭菌过程是否满足杀灭指定数量微生物的必须条件提供信息，并规定该过程的置信水平。

4 方法原理

经灭菌处置后含枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢的水样通过孔径为 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琼脂培养基上，36 °C ± 1 °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并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后通过生化试验做进一步鉴定，能利用甘油和甘露糖，可还原硝酸盐和水解淀粉，不能利用苦杏仁苷和甘露醇，并确认为革兰氏阳性芽孢杆菌的特征菌落为枯草芽孢杆菌黑色变种，鉴定结果为阳性。

5 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准分析纯试剂，实验用水为蒸馏水。

- 5.1 酪氨酸琼脂培养基，见附录 A.1。
- 5.2 营养琼脂培养基，见附录 A.2。
- 5.3 淀粉培养基和碘液，见附录 A.3。
- 5.4 硝酸盐还原培养基和相关试剂，见附录 A.4。
- 5.5 甘油复红肉汤培养基，见附录 A.5。
- 5.6 甘露糖生化培养基，见附录 A.6。
- 5.7 甘露醇生化培养基，见附录 A.6。
- 5.8 苦杏仁苷生化培养基，见附录 A.7。
- 5.9 革兰氏染色液，见附录 A.8。
- 5.10 芽孢染色液，见附录 A.9。
- 5.11 阴性对照菌：如地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。
- 5.12 阳性对照菌：枯草芽孢杆菌黑色变种 (*Bacillus subtilis* var. *niger*)。
- 5.13 枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢悬液：按照《消毒技术规范》2.1.1.2.3 (2) 的规定制备，也可购买浓度范围在 10⁶ CFU/ml~10⁹ CFU/ml 之间的市售枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢悬液。
- 5.14 无菌滤膜：直径 50 mm，孔径 0.45 μm 的醋酸纤维滤膜。

按无菌操作要求包扎，经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min，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 次煮沸后需换水洗洗涤 2~3 次。也可采用市售的无菌滤膜。

- 5.15 石蜡质封口膜。
- 5.16 无菌水：取适量实验用水，经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min，备用。

注 1：5.1~5.10 的成分及制备方法见附录 A，也可使用市售商品化培养基或染色液；

注 2：5.11~5.12，建议购买由国内或国际菌种保藏机构保藏的遗传学特性得到确认和保证并可追溯的标准菌株。

6 仪器和设备

- 6.1 样品瓶：螺口带盖或磨口具塞的 250 ml、500 ml 广口玻璃瓶。
- 6.2 恒温培养箱：36 °C ± 1 °C。
- 6.3 高压蒸汽灭菌器：121 °C，可调。
- 6.4 pH 计：准确到 0.1 pH 单位或更高精度。也可使用 pH 精密试纸。
- 6.5 显微镜：物镜 4× 或 5×、10×、20×、40×，油镜 100×，目镜 10× 或 15×。
- 6.6 分析天平：实际分度值 0.0001 g。
- 6.7 培养皿：直径 90 mm。

- 6.8 过滤装置：配有砂芯滤器、圆筒形玻璃漏斗和真空泵，抽滤压力不低于-50 kPa。
- 6.9 接种环：直径 1 mm~3 mm。
- 6.10 镊子：不锈钢或一次性无菌塑料镊子。
- 6.11 刻度移液管：1 ml、10 ml。也可使用可调式移液器。
- 6.12 量筒：100 ml。
- 6.13 锥形瓶：100 ml。
- 6.14 酒精灯。
- 6.15 试管：10 ml。
- 6.16 无菌操作设备：无菌室、超净工作台、生物安全柜。
- 6.17 一般实验室常用仪器和设备。

注：试验前，移液管、样品瓶、培养皿、锥形瓶、试管、砂芯滤器、圆筒形玻璃漏斗等玻璃器皿应按无菌操作要求包扎，高压蒸汽灭菌器（6.3）中 121 °C 灭菌 20 min，烘干，备用。也可采用干热灭菌（135 °C~140 °C 灭菌 3 h~5 h，或 160 °C~170 °C 灭菌 2 h~4 h，或 180 °C~200 °C 灭菌 0.5 h~1 h）。

7 样品

7.1 样品采集

7.1.1 评价使用高温高压灭菌设备的灭菌效果时，取样品瓶（6.1），加入枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢悬液（5.13）及 200 ml 无菌水（5.16）使混合液中枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢终浓度达到 5×10^4 CFU/ml~ 5×10^5 CFU/ml。灭菌处置完毕后，取出样品瓶，对水样进行灭菌生物指示物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的检测。

7.1.2 评价使用其它灭菌设备的灭菌效果时，灭菌前取适量枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢悬液（5.13）加入灭菌设备，使水样中枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢终浓度达到 5×10^4 CFU/ml~ 5×10^5 CFU/ml。灭菌处置完毕后，从灭菌设备中采集水样，进行灭菌生物指示物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的检测。采样量一般为样品瓶容量的 80% 左右，不得用样品洗涤样品瓶。样品采集完毕后，迅速用无菌包装纸包扎样品瓶。

7.2 样品保存

样品采集后宜在 2 h 内检测，否则应在 10 °C 以下冷藏保存运输，但不得超过 6 h。实验室接收样品后，不能立即开展检测的，样品应在 4 °C 以下冷藏保存，并在 2 h 内检测。

注：宜使用生物安全周转箱进行样品周转。

8 分析步骤

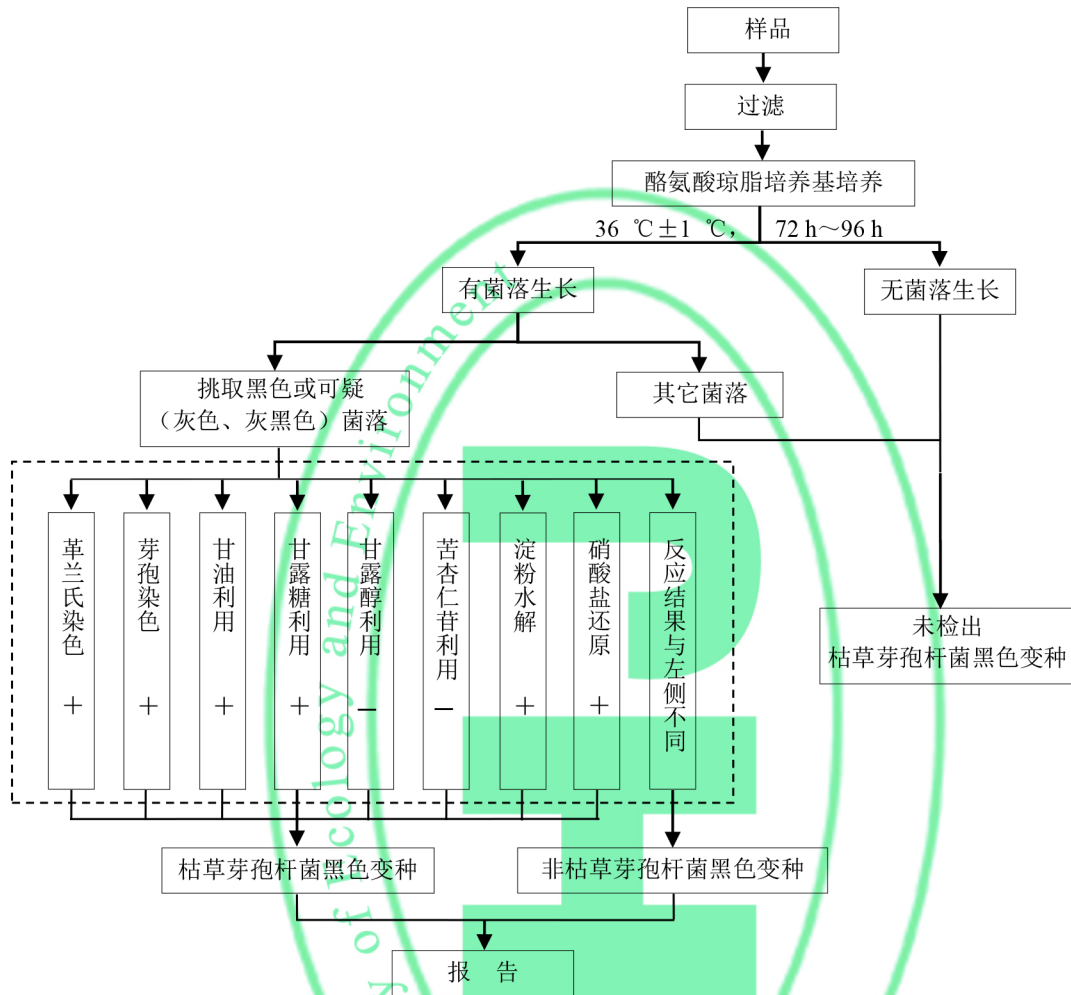
8.1 方法程序

样品中枯草芽孢杆菌黑色变种的检测程序见图 1。

8.2 样品过滤

用无菌镊子（6.10）以无菌操作夹取无菌滤膜（5.14）贴放在已灭菌的过滤装置（6.8）上，固定好过滤装置。将样品充分混匀后取 100 ml 抽滤，以无菌水（5.16）冲洗滤器内壁 2~3 次。样品过滤

完成后，继续抽吸约 5 s，关闭过滤装置真空泵开关。过滤前按无菌操作要求调节样品的 pH 值至 7.0~8.0。



“+”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

8.3 培养

8.3.1 用无菌镊子（6.10）夹取滤膜贴放在酪氨酸琼脂培养基（5.1）上，滤膜截留细菌的一面向上，另一面应与培养基完全贴紧，滤膜和培养基之间不得留有气泡，然后用石蜡质封口膜（5.15）封闭培养皿边缘，培养皿倒置放入恒温培养箱（6.2）内， $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ 培养 72 h~96 h。

8.3.2 培养 72 h 后，若培养基上有黑色或可疑（灰色、灰黑色）菌落生长，则挑取接种于营养琼脂培养基（5.2）上， $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ 培养 24 h，待鉴定，同时将已挑取菌落的酪氨酸琼脂培养基培养皿在 $2\text{ °C} \sim 5\text{ °C}$ 储存，以备必要时复查。若培养基上无黑色或可疑菌落生长，则延长培养时间至 96 h，仍无黑色或可疑菌落生长，则试验终止。

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（5.1）培养后观察。

8.4 鉴定

8.4.1 染色镜检

挑取黑色或可疑菌落（8.3.2），分别使用革兰氏染色液（5.9）和芽孢染色液（5.10）染色，操作步骤及结果观察见附录 B，然后镜检。枯草芽孢杆菌黑色变种革兰氏染色镜检结果见图 2 a），芽孢染色镜检结果见图 2 b）。枯草芽孢杆菌黑色变种为革兰氏阳性菌，营养细胞呈杆状，单个或呈短链状排列；芽孢中生、椭圆形、不膨大。

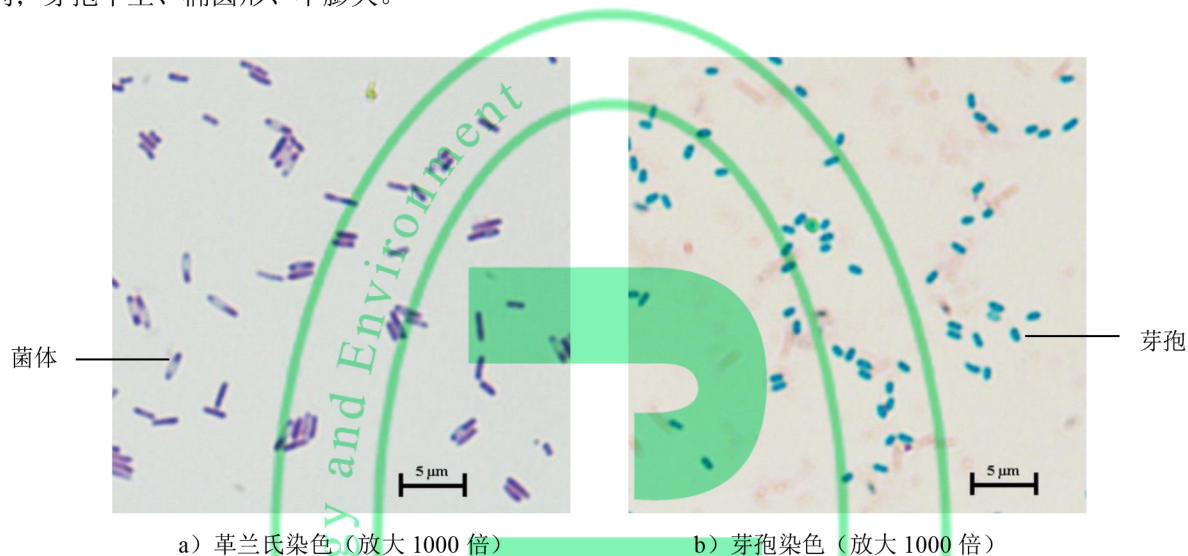


图 2 枯草芽孢杆菌黑色变种染色镜检图

8.4.2 生化试验

挑取黑色或可疑菌落（8.3.2），分别接种到淀粉培养基（5.3）、硝酸盐还原培养基（5.4）、甘油复红肉汤培养基（5.5）、甘露糖生化培养基（5.6）、甘露醇生化培养基（5.7）和苦杏仁苷生化培养基（5.8）上，操作步骤及结果观察见附录 B，若使用市售商品化培养基，则按使用说明书操作。

8.5 对照试验

8.5.1 空白对照

用无菌水（5.16）按照步骤 8.2 和 8.3 进行实验室空白对照试验。

培养 96 h 后平板培养基上应无菌落生长，否则，该次样品鉴定结果无效，应查明原因后重新采样和检测。

8.5.2 阴性及阳性对照

将阴性对照菌（5.11）和阳性对照菌（5.12）制成浓度为 40 CFU/L~600 CFU/L 的菌悬液，分别按照 8.2~8.4 步骤操作。阴性、阳性对照菌呈现的生化反应结果应与表 1 所列结果一致，否则该次样品鉴定结果无效，应查明原因后重新采样和检测。

表 1 阴性、阳性对照菌应呈现的生化反应结果

特征指标	推荐菌株	阴性对照菌	阳性对照菌
		地衣芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌黑色变种
酪氨酸琼脂培养基		乳白色菌落	黑色菌落
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。

9 结果与报告

9.1 结果判定

符合 8.4、8.5，可鉴定为枯草芽孢杆菌黑色变种，结果判定为阳性。

9.2 结果评价

100 ml 样品中检出枯草芽孢杆菌黑色变种，评价为灭菌不合格；100 ml 样品中未检出枯草芽孢杆菌黑色变种，评价为灭菌合格。

10 灵敏性和特异性

10.1 灵敏性

6 家实验室分别对枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢悬液（以芽孢计）高浓度（ 10^6 CFU/100 ml）、中浓度（ 10^4 CFU/100 ml）、低浓度（ 10^2 CFU/100 ml）样品进行方法灵敏性检测，结果显示枯草芽孢杆菌黑色变种的检出率均为 100%。

10.2 特异性

6 家实验室分别对枯草芽孢杆菌黑色变种阳性对照组和地衣芽孢杆菌阴性对照组进行方法特异性检测，结果显示阳性对照组枯草芽孢杆菌黑色变种的检出率为 100%，阴性对照组中枯草芽孢杆菌黑色变种的检出率为 0。

11 质量保证和质量控制

11.1 每批样品均应进行空白对照试验、阴性对照试验、阳性对照试验。

11.2 每 20 个样品或每批次样品（≤20 个/批）检测一个平行样，若平行样与原样品的结果不一致时，则本批次试验无效，需重新检测。

11.3 应使用有证标准菌株对每批次培养基进行质量检验。

12 废物处置

实验产生的废物经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min~30 min 后，依法委托具备相应资质的单位进行处置。



附录 A
(规范性附录)
培养基和染色液

A.1 酪氨酸琼脂培养基

A.1.1 成分

胰蛋白胨	0.5 g
葡萄糖	0.5 g
氯化钠	0.5 g
磷酸氢二钾	0.5 g
七水合硫酸镁	0.5 g
L-天冬酰胺	0.5 g
L-酪氨酸	0.5 g
干酪素	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 制备方法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水中，按配方顺序逐一加入营养成分，待一种成分溶解后加入另一种成分，调节 pH 值至 7.0 左右。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂融化，121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。待冷却至 50 °C~55 °C，每个培养皿内分别倾注 25 ml~30 ml 培养基，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 g~20 g
蒸馏水	1000 ml

A.2.2 制备方法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水中，调节 pH 值至 7.2~7.4。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂融化，121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。待冷却至 50 °C~55 °C，每个培养皿内分别倾注 15 ml~25 ml 培养基，待用。

A.3 淀粉培养基和碘液

A.3.1 淀粉培养基

A.3.1.1 成分

蛋白胨	5.0 g~10.0 g
酵母膏	1.0 g
牛肉膏	3.0 g
淀粉	2.0 g
琼脂	15 g~20 g
蒸馏水	1000 ml

A.3.1.2 制备方法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水中，调节 pH 值至 7.2~7.4。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂融化，121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。待冷却至 50 °C~55 °C，每个培养皿内分别倾注 15 ml~25 ml 培养基，待用。

A.3.2 碘液

A.3.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 ml

A.3.2.2 配制方法

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 硝酸盐还原培养基和相关试剂

A.4.1 硝酸盐还原培养基

A.4.1.1 成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
硝酸钾	1.0 g
蒸馏水	1000 ml

A.4.1.2 制备方法

溶解各成分于蒸馏水中，必要时加热，调节 pH 值至 7.0~7.6，分装于试管中，每管分装 4 ml~5 ml，121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min~20 min。

A.4.2 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 配制方法

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 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 配制方法

将二苯胺溶于浓硫酸中，缓慢转移至 20 ml 蒸馏水中稀释。

A.5 甘油复红肉汤培养基

A.5.1 成分

蛋白胨	20.0 g
甘油	10 ml
无水氯化镁	1.4 g
无水硫酸钾	10.0 g
碱性品红	1.0 g
蒸馏水	1000 ml

A.5.2 制备方法

取蛋白胨、无水氯化镁和无水硫酸钾加入蒸馏水中，微温溶解，调节 pH 值至 7.2~7.4，加入甘油，加热溶解，混匀，分装于试管中，每管 3 ml~4 ml，121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

A.6 甘露糖生化培养基/甘露醇生化培养基

A.6.1 成分

磷酸氢二铵	1.0 g
氯化钾	0.2 g
硫酸镁	0.2 g
酵母膏	0.2 g
琼脂	5 g~6 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 制备方法

将以上成分加热溶解，调节 pH 值至 7.0~7.2，分装于试管中，培养基高度约 4 cm~5 cm，112 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。其中，溴甲酚紫（0.04%）配制方法为：称取 0.1 g 溴甲酚紫，滴加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 1.85 ml，使之溶解，然后加蒸馏水定容至 250 ml。

A.7 苦杏仁苷生化培养基

A.7.1 成分

蛋白胨	5.0 g
溴甲酚紫（1.6%）	0.625 ml
牛肉膏	5.0 g
D-葡萄糖	0.5 g

HJ 1190—2021

琼脂	3 g~6 g
苦杏仁苷	0.005 g
蒸馏水	1000 ml

A.7.2 制备方法

将以上成分加热溶解,调节pH值至6.0~6.3,分装于试管中,每管3 ml~4 ml,121 °C灭菌10 min。其中,溴甲酚紫(1.6%)配制方法为:称取1.6 g溴甲酚紫,滴加无水乙醇使之溶解,然后用无水乙醇定容至100 ml。

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 配制方法

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 配制方法

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 配制方法

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 配制方法

将孔雀绿加入蒸馏水中充分振摇，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	0.5 g
蒸馏水	100 ml

A.9.2.2 配制方法

将番红加入蒸馏水中充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水定容至 100 ml。



附录 B

(规范性附录)

培养基和染色液使用说明及结果观察

B.1 淀粉培养基

B.1.1 操作

将待检菌接种于淀粉培养基 (A.3.1) 上, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d, 形成明显菌落后, 在平板培养基上滴加碘液 (A.3.2)。

B.1.2 结果观察

若平板培养基呈蓝黑色, 菌落周围如有不变色透明圈, 为淀粉水解阳性; 若平板培养基仍是蓝黑色, 为淀粉水解阴性。

B.2 硝酸盐还原培养基

B.2.1 操作

将待检菌接种于硝酸盐还原培养基 (A.4.1) 中, 置于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 1 d~5 d。每株菌接种 2 管作为平行, 另留 2 管不接种作为对照。取两支干净的空试管或在白色陶瓷比色板凹穴中倒入少许已培养 1 d~5 d 的培养液, 再各滴加 1 滴 A 液及 B 液 (A.4.2)。

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、棕色等表示有亚硝酸盐存在, 为硝酸盐还原阳性。如无红色出现, 可滴加 1~2 滴二苯胺试剂 (A.4.3), 此时如呈蓝色反应, 则表示培养液中仍有硝酸盐, 且无亚硝酸盐反应, 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

将待检菌接种于甘油复红肉汤培养基 (5.5) 中, 于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 甘露糖生化培养基/甘露醇生化培养基

B.4.1 操作

将待检菌分别穿刺接种于甘露糖生化培养基（5.6）和甘露醇生化培养基（5.7）， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养1 d~5 d后观察。

B.4.2 结果观察

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 苦杏仁苷生化培养基

B.5.1 操作

将待检菌穿刺接种于苦杏仁苷生化培养基（5.8）中， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养1 d~5 d后观察。

B.5.2 结果观察

培养后培养物呈黄色者为阳性，呈紫色者为阴性。

B.6 革兰氏染色液

B.6.1 操作

革兰氏染色按照以下步骤操作：

- 将菌落涂片，在火焰上固定，用结晶紫染液（A.8.1）染色1 min，水洗；
- 滴加革兰氏碘液（A.8.2），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（A.8.3），复染1 min，水洗、晾干、镜检。

B.6.2 结果观察

镜检，菌体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

芽孢染色按照以下步骤操作：

- 将生有芽孢的菌落涂片，火焰上固定，用饱和孔雀绿水溶液（A.9.1）染色10 min，水洗；
- 滴加0.5%番红溶液（A.9.2）复染30 s，水洗，晾干、镜检。

B.7.2 结果观察

镜检，菌体呈红色，芽孢呈绿色。