

枯草芽孢杆菌检测鉴定方法

1 范围

本标准规定了枯草芽孢杆菌的形态学鉴定、生化鉴定以及 PCR、荧光 PCR 检测鉴定方法。
本标准适用于枯草芽孢杆菌检测鉴定。

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,仅注日期的版本使用于本文件。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

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

WS/T 230 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用

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 *Bacillus subtilis*

革兰氏阳性杆菌,芽孢杆菌科,芽孢杆菌属,内生孢子,接触酶阳性,发酵葡萄糖产酸,水解淀粉,不水解马尿酸盐,可还原硝酸盐,水解酪素,在 55℃可生长的一群芽孢菌。

4 人员防护

为了保护实验室人员的安全,应由具备资格的工作人员检测,所有培养物应小心处置。在对微生物菌剂的取样和检测过程中,按照 GB 19489 中的生物二级防护的规定执行。

5 主要试剂和培养基

除另有规定外,试剂为分析纯或生化试剂,试验用水应符合 GB/T 6682。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

5.1 营养琼脂:蛋白胨 10 g,牛肉浸膏 3.0 g,氯化钠 5.0 g,琼脂 15.0 g,1 L 蒸馏水,加热煮沸到完全溶解,调节 pH 7.3±0.1,121℃灭菌 15 min。

5.2 营养肉汤:蛋白胨 10 g,牛肉浸膏 3.0 g,氯化钠 5.0 g,1 L 蒸馏水,加热煮沸到完全溶解,调节 pH 7.3±0.1,121℃灭菌 15 min。

5.3 TE 缓冲液:10 mmol/L Tris,1 mmol/L EDTA,pH8.0。

5.4 10×PCR 缓冲液:100 mmol/L Tris-HCl(pH8.4),500 mmol/L 氯化钾(KCl),15 mmol/L 氯化镁(MgCl₂)。

5.5 TBE:54 g Tris,27.5 g 硼酸,800 mL 去离子水溶解,20 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)定容至 1 L。

6 主要仪器和设备

- 6.1 天平：精度为 0.1 g。
 6.2 恒温培养箱：30 °C ± 1 °C。
 6.3 恒温水浴锅。
 6.4 离心机：转数 12 000 r/min 以上。
 6.5 PCR 仪。
 6.6 荧光 PCR 仪。
 6.7 微量移液器和灭菌吸头：10 μL、20 μL、200 μL、1 000 μL。

7 样品制备、培养

以无菌操作将检样 25 g(mL)用灭菌生理盐水或磷酸盐缓冲溶液做成 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ 的稀释液，充分混匀。选择适宜的 2 个~3 个连续稀释度的菌液 1 mL 于灭菌平皿内，将冷却到 40 °C~50 °C 的营养琼脂倒入平皿，轻轻混匀，制成混板，每个稀释度做两个平行样。待培养基凝固后倒置于 30 °C ± 1 °C 恒温培养箱内培养 24 h~48 h。挑取平板上 3 个~5 个无色透明菌落进行形态学鉴定并挑单菌落转营养肉汤 30 °C ± 1 °C 恒温培养箱内增菌培养 18 h~24 h 后进行生化鉴定。

8 形态学及生化鉴定

8.1 革兰氏及芽孢染色

将第 7 章中平板上的菌落做涂片进行革兰氏和芽孢染色，镜检。

8.2 生化鉴定法

取菌液利用细菌微量生化鉴定管进行生化鉴定，每管 100 μL。

8.3 枯草芽孢杆菌形态学及生化特征

枯草芽孢杆菌为革兰氏阳性杆状细菌，细胞直径 < 1 μm，很少成链，鞭毛侧生，内生孢子，芽孢不膨大，不形成伴孢晶体。生化特征见表 1。

表 1 枯草芽孢杆菌生化特征

鉴定项目	枯草芽孢杆菌
接触酶	+
氧化酶	+
厌氧生长	—
VP 试验	+
VP < pH6	—/+
VP > pH7	—
甲基红试验	—/+
葡萄糖	+