

ICS 13.020

CCS A 01

团 体 标 准

T/ACEF 0**-20**

耐盐反硝化菌菌剂技术要求

Technical requirements for salt-tolerant denitrifying bacterial agent

(征求意见稿)

2026-□□-□□发布

2026-□□-□□实施

中 华 环 保 联 合 会 发布

目次

前 言	II
1 范围	3
2 规范性引用文件	3
3 术语和定义	3
4 分类	3
5 技术要求	4
6 试验方法	5
7 检验规则	7
8 标志、包装、运输与贮存	8

前言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分:标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件为首次发布。

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专利的责任。

本文件由华北电力大学提出。

本文件由中华环保联合会归口。

本文件主编单位：

本文件参编单位：

本文件主要起草人：

耐盐反硝化菌菌剂技术要求

1 范围

本文件规定了耐盐反硝化菌菌剂的术语与定义、剂型分类、技术要求、试验方法、检验规则、标志、包装、运输与贮存。

本文件适用于海水养殖尾水、化工高盐废水处理中使用的耐盐反硝化菌菌剂。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款，其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 20287 农用微生物菌剂

GB/T 19524 肥料中粪大肠菌群的测定

HJ 506-2009 水质 溶解氧的测定 电化学探头法

HJ/T 415 环保用微生物菌剂环境安全评价导则

HJ 776 水质 32 种元素的测定 电感耦合等离子体发射光谱法

NY/T 2321 微生物肥料产品检验规程

定量包装商品计量监督管理办法（2023 年）[国家市场监督管理总局令（2023）70 号]

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

耐盐反硝化菌 salt-tolerant denitrifying bacteria

耐受不小于 3.5% 的盐度，并将硝酸盐（ NO_3^- ）或亚硝酸盐（ NO_2^- ）还原为氮气（ N_2 ）或其他气态氮化物的微生物菌群。

3.2

反硝化活性 Denitrification activity

反硝化活性分为硝酸盐还原活性和亚硝酸盐还原活性，在盐度 3.5 %、30 °C、溶解氧 $\leq 0.2 \text{ mg/L}$ 条件下，单位质量（干重）菌剂在单位时间内还原硝酸盐氮（ NO_3^- -N）的量；

在盐度 3.5 %、30 °C、溶解氧 $\leq 0.2 \text{ mg/L}$ 条件下，单位质量（干重）菌剂在单位时间内还原亚硝酸盐氮（ NO_2^- -N）的量。

3.3

OD₆₀₀

T/ACEF 0**—20**

600 nm 波长处的吸光度；用于表征微生物菌悬液中细胞的浓度或密度，在本文件中，用于指示耐盐反硝化菌的生长量。

4 分类

4.1 功能分类

本菌剂适用于处理含有一定浓度硝酸盐氮（NO₃⁻-N）和亚硝酸盐氮（NO₂⁻-N）的高盐废水。其推荐处理的进水硝酸盐氮浓度范围为 10 mg/L-300 mg/L，亚硝酸盐氮浓度范围为 ≤50 mg/L。

4.2 产品分类

按剂型可分为液体剂型、粉剂剂型、颗粒剂型。

5 技术要求

5.1 外观

- 1) 液体剂型：均匀、澄清或略带浑浊的液体，无明显沉淀、悬浮物或异物，允许有少量菌体沉淀，摇动后易于分散。
- 2) 粉剂剂型：干燥、均匀的粉末状，无结块、无杂质、色泽均一。
- 3) 颗粒剂型：颗粒均匀，表面光滑或略有粗糙，无明显粉尘，无破碎粒、无杂质。

5.2 菌种与技术要求

- 1) 菌种鉴定/信息：生产耐盐反硝化菌剂所使用的菌种，应来源明确、分类清晰。生产企业须保有完整的菌种鉴定报告和谱系记录，并可接受核查。
- 2) 产品技术指标：耐盐反硝化菌剂技术指标应符合表 1 的规定。

表 1 耐盐反硝化菌剂技术指标

项目	液体剂型	粉剂剂型	颗粒剂型
有效活菌数 (亿/mL 或亿/g)	≥ 2.0	≥ 2.0	≥ 1.0
杂菌率 (%)	≤ 10.0	≤ 20.0	≤ 30.0
水分 (%)	-	≤ 20.0	≤ 30.0
pH	6.0 - 9.0	6.0 - 9.0	6.0 - 9.0
反硝化活性 (%)	≥ 70	≥ 70	≥ 70
耐盐度 (%)	≥ 3.5	≥ 3.5	≥ 3.5
溶解氧耐受范围 (mg/L)	≤ 0.2	≤ 0.2	≤ 0.2
保质期 (月)	6	12	12
反硝化碳源种类	乙酸钠、甲醇、甘油或葡萄糖	慢释碳源 (PCL、PLA、玉米芯、稻壳等)	慢释碳源 (PCL、PLA、玉米芯、稻壳等)

5.3 安全指标

耐盐反硝化菌安全指标应符合 HJ/T 415 的规定。

表 2 耐盐反硝化菌安全指标

项目	指标
急性经口毒性 (LD ₅₀)	> 5000 mg/kg 体重
急性皮肤刺激性	无刺激性
急性吸入毒性 (LC ₅₀)	> 2000 mg/m ³
砷 (以 As 计)	≤ 10 mg/kg
镉 (以 Cd 计)	≤ 10 mg/kg
铅 (以 Pb 计)	≤ 50 mg/kg
汞 (以 Hg 计)	≤ 5 mg/kg
粪大肠菌群数	不得检出

5.4 净含量

净含量应符合《定量包装商品计量监督管理办法》的规定，允许短缺量应符合国家相关要求。

6 试验方法

6.1 仪器设备、试剂

所需仪器设备包括 250 mL 血清瓶，电子天平，带丁基胶塞与铝盖恒温振荡器 (30 °C±1 °C, 150 r/min)，0.22 μm 水系滤膜，紫外分光光度计或离子色谱仪，反硝化培养基 (KNO₃ 0.72g/L, NaCl 35g/L, CH₃COONa 1.23g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2g/L, K₂HPO₄ 0.1g/L, 微量元素溶液 1 mL/L)，pH 7.2±0.2, 121°C 灭菌 20 min。

6.2 样品前处理

液体剂：取 20 mL 原菌液在 4 °C 条件下离心 10 min，去除上清液，加入 20 mL 无菌 3.5 % NaCl 溶液重悬沉淀，洗涤 2 次，去除原培养基残留取 10 mL 洗涤后菌悬液，经 0.22μm 滤膜抽滤，105 °C 烘干至恒重并测干重。

粉剂/颗粒剂：准确称取 1.00 g 于 100 mL 无菌 3.5 % NaCl 中，振荡 30 min 制成菌悬液；取 10 mL 菌悬液经 0.22 μm 滤膜过滤，105°C 烘干至恒重并测干重。

6.3 有效活菌数

耐盐反硝化菌有效活菌数 (N) 的测定按 GB 20287 执行，采用平板计数法。液体剂：摇匀后取 10 mL 液体剂至 90 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS) (含 3.5% NaCl) 中，制成 10⁻¹ 稀释液；

T/ACEF 0**—20**

粉剂/颗粒剂：称取 10.0 g 粉剂/颗粒剂至 90 mL PBS（含 3.5 % NaCl）中，200 r/min 振荡 30 min，制成 10^{-1} 稀释液。

选取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 三个稀释度，各取 100 μ L 均匀涂布于选择性平板，每个稀释度 3 个重复；同时用 PBS 做空白对照，平板倒置，30 $^{\circ}$ C 培养 72 h。30 $^{\circ}$ C 培养 72 h。选取菌落数 30-300 cfu 的平板，计数典型菌落（乳白色、边缘整齐、凸起、直径 1-2 mm，可辅以硝酸盐试纸周围出现气泡圈确认）。

有效活菌数 N（cfu/g 或 cfu/mL）按式（1）计算：

$$N = C / (V \times d) \quad (1)$$

式中

C —— 同一稀释度 3 个平板平均菌落数，cfu；

V —— 涂布体积，0.1 mL；

d —— 稀释倍数。

6.4 杂菌率

杂菌率按照 NY/T 2321 的规定执行。

6.5 水分

水分检测应按 GB 20287 的规定执行。

6.6 pH

使用 pH 计进行测量，每个样品重复三次，计算其平均值。

6.7 反硝化活性

1) 原理：在 3.5 wt % 盐度、30 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C、溶解氧 \leq 0.2 mg/L 条件下，将菌剂接种于以硝酸盐为唯一氮源的高盐反硝化培养基，振荡培养 48 h 后测定 NO_3^- -N 与 NO_2^- -N 浓度，计算无机氮去除率，即为反硝化活性 η 。

2) 培养基：硝酸盐反硝化培养基的制备方法同 6.1，命名为培养基 a；亚硝酸盐反硝化培养基的制备方法为 0.33 g/L NaNO_2 替换 KNO_3 ，其余步骤同 6.1，命名为培养基 b；两个培养基均 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。

3) 试验步骤：90 mL 培养基 a、b 分别 10 mL 菌悬液，通氮除氧、密封，在 30 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 48 h。在 0 h、48 h 取样经 0.22 μ m 滤膜过滤，分别测定 NO_3^- -N、 NO_2^- -N；和 NO_2^- -N。

4) 计算：

a) 硝酸盐还原率 η_n ：

$$\eta_n = (C_0\text{NO}_3 - C_t\text{NO}_3 - C_t\text{NO}_2) / C_0\text{NO}_3 \times 100 \% \quad (2)$$

b) 亚硝酸盐还原率 η_i :

$$\eta_i = (C_0\text{NO}_2 - C_t\text{NO}_2) / C_0\text{NO}_2 \times 100 \% \quad (3)$$

式中:

$C_0\text{NO}_3$ —— 0 h NO_3^- -N 浓度, mg/L;

$C_t\text{NO}_3$ —— 48 h NO_3^- -N 浓度, mg/L;

$C_t\text{NO}_2$ —— 48 h NO_2^- -N 浓度, mg/L;

$C_0\text{NO}_2$ —— 0 h NO_2^- -N 浓度, mg/L。

5) 结果表示: 以 η_n 与 η_i 中的较小值作为“反硝化活性 η ”, 保留至整数位; $\eta \geq 70\%$ 判定为符合要求, 并在报告中同时给出 η_n 、 η_i 及 NO_2^- -N 积累值。

6.8 耐盐度

耐盐度试验采用含 3.5%氯化钠的培养基 (CH_3COONa 1.23 g/L, KNO_3 0.72 g/L, K_2HPO_4 0.1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, 微量元素溶液 1 mL, pH 7 \pm 0.2) 中, 按 6.7 要求测定菌剂的反硝化活性, 或通过 OD_{600} 表征生长量。耐盐度范围以菌剂仍能正常生长, $\text{OD}_{600} \geq 0.1$ 或反硝化活性不小于 70% 的最高盐度为准。

6.9 溶解氧耐受范围

耐盐反硝化菌在溶解氧 (DO) > 0.2 mg/L 时会受到抑制, DO 控制与测定按 HJ 506, 测定菌剂反硝化活性降至 70% 时的临界 DO 值, 即为溶解氧耐受上限。

6.10 保质期

在规定的条件下, 产品保质期应满足表 1 的要求。

6.11 反硝化碳源种类

在规定的条件下, 碳源种类应满足表 1 的要求。

6.12 安全性

急性经口毒性 (LD_{50})、急性皮肤刺激性和急性吸入毒性 (LC_{50}) 应按 HJ/T 415 的规定执行; 砷 (As)、镉 (Cd)、铅 (Pb)、汞 (Hg) 的含量应按 HJ 776 的规定执行; 粪大肠菌群数应按 GB/T 19524.1 的规定执行。

7 检验规则

7.1 检验分类

产品的检验分为出厂检验和型式检验。

7.2 出厂检验

7.2.1 产品出厂前, 应由生产厂的质量检验部门按本文件的规定逐批进行检验, 检验合

T/ACEF 0**—20**

格并签发合格证后，方可出厂。

7.2.2 出厂检验项目包括：感官、有效活菌数、杂菌率、水分（仅对固体剂型）、pH值和净含量。

7.3 型式检验：

7.3.1 型式检验项目为本文件第5章“技术要求”中规定的全部项目。

7.3.2 正常情况下，每年至少进行一次型式检验。但有下列情况之一时，亦应进行型式检验：

- a) 新产品投产或老产品转厂生产的定型鉴定；
- b) 正式生产后，如原料、工艺、设备有重大改变，可能影响产品性能时；
- c) 产品停产超过一年后，恢复生产时；
- d) 出厂检验结果与上次型式检验有较大差异时；
- e) 国家质量监督机构或行业主管部门提出进行型式检验要求时。

7.4 组批与抽样

7.4.1 组批

以同一原料、同一配方、同一生产工艺、在同一生产线生产的包装完好的产品为一批。

7.4.2 抽样

抽样应具有代表性，采样工具应无菌。每批产品随机抽取样品不少于10个独立包装。总采样量固体产品不少于1000g，液体产品不少于1000mL。抽取的样品混匀后分为三份，一份用于检验，两份密封保存于阴凉处备查，备查样品保存期至少为产品保质期后三个月。

7.5 判定规则

判定规则如下：

- a) 当检测结果全部符合要求时，可判该批产品合格；
- b) 当检测结果有一项或一项以上不合格时，可加倍抽样复检，以复检结果为准；
- c) 当主要成分（有效活菌数）出现不合格时，直接判该批产品不合格。

8 标志、包装、运输与贮存

8.1 标志

8.1.1 产品标签

产品标签应标明产品名称、商标、规格、登记证号、所执行的标准编号、生产者名称、地址、联系方式；应在产品生产合格证或包装上标明生产日期或生产批号、产品耐盐浓度和pH范围、保质期。

8.1.2 图示标志

包装储运图示标志应符合 GB/T 191 的规定。

8.2 包装

- 1) 包装材料应无毒、无害、防潮、密封性好，不影响菌剂活性。
- 2) 液体菌剂宜采用聚乙烯桶或无菌瓶装；粉剂和颗粒菌剂宜采用铝箔袋、塑料袋或防潮纸箱包装。
- 3) 包装应完好、无破损、无泄漏，标签清晰牢固。

8.3 运输

运输过程中有遮盖物，防止日晒、雨淋及高温。气温超出 35 °C 或气温低于 0 °C 时采取适当措施，以保证产品质量。轻装轻卸，避免包装破损。

8.4 贮存

产品应贮存在阴凉、干燥、通风的库房内，不得露天堆放，以防日晒雨淋，避免不良条件的影响。
