

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 683—2020

消毒试验用微生物要求

Requirements of microorganism for disinfection test

2020-07-20 发布

2021-02-01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、江苏省疾病预防控制中心、中国人民解放军疾病预防控制中心、北京市疾病预防控制中心、山东省疾病预防控制中心、黑龙江省疾病预防控制中心、广州海关技术中心。

本标准主要起草人：沈瑾、段弘扬、王林、张流波、徐燕、魏秋华、王佳奇、佟颖、崔树玉、李涛、李炎、林玲、吴晓松、于礼、孙惠惠、廖如燕、杨彬、韩杰、李俐、朱亭亭。

消毒试验用微生物要求

1 范围

本标准规定了消毒试验微生物、培养基、传代与保存、菌悬液和染菌载体制备的要求。

本标准所指消毒试验用微生物仅包括细菌、真菌、分枝杆菌和细菌芽胞，不涉及消毒试验用病毒及其他微生物的替代物（如酶、抗原、核酸等）。

本标准适用于各种消毒试验用微生物（除病毒和替代物外）的使用和保存。

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 18281.5 医疗保健产品灭菌 生物指示物 第5部分：低温蒸汽甲醛灭菌用生物指示物

GB/T 33417 过氧化氢气体灭菌生物指示物检验方法

GB/T 33419 环氧乙烷灭菌生物指示物检验方法

GB/T 33420 压力蒸汽灭菌生物指示物检验方法

消毒技术规范（2002年版） 卫生部（卫法监发〔2002〕282号）

3 试验微生物

3.1 来源

试验微生物来源于具有资质的菌种保藏机构，并能通过常规检测方法进行鉴定。

3.2 细菌

3.2.1 金黄色葡萄球菌

消毒试验以金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)作为细菌繁殖体中化脓性球菌的代表，试验常用菌种为ATCC 6538；消毒剂对皮肤消毒模拟现场试验时，用ATCC 27217。

3.2.2 大肠杆菌

消毒试验以大肠杆菌(*Escherichia coli*)作为细菌繁殖体中肠道菌的代表，试验常用菌种为8099；消毒剂对手消毒模拟现场试验时，用8099或NCTC 10538。

3.2.3 铜绿假单胞菌

消毒试验以铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)作为医院感染中最常分离的细菌繁殖体的代表，试验菌种为ATCC 15442。

3.2.4 白色葡萄球菌

消毒试验以白色葡萄球菌(*Staphylococcus albus*)作为空气中细菌的代表, 试验菌种为8032。

3.3 真菌

3.3.1 白色念珠菌

消毒试验以白色念珠菌(*Candida albicans*)作为致病性真菌的代表, 试验常用菌种为ATCC 10231。

3.3.2 黑曲霉菌

消毒试验以黑曲霉菌(*Aspergillus niger*)作为致病性真菌的代表, 试验常用菌种为ATCC 16404。

3.4 分枝杆菌

消毒试验以龟分枝杆菌脓肿亚种(*Mycobacterium chelonae subsp. abscessus*)、鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium subsp. avium*)或地分枝杆菌(*Mycobacterium terrae*)作为人结核分枝杆菌的代表, 试验用菌种为龟分枝杆菌脓肿亚种CMCC(B) 93326或ATCC 19977, 鸟分枝杆菌ATCC 15769, 地分枝杆菌ATCC 15755。

3.5 细菌芽胞

3.5.1 枯草杆菌黑色变种芽胞

消毒试验以枯草杆菌黑色变种芽胞(*Bacillus subtilis var. niger*)作为细菌芽胞的代表, 试验常用菌种为ATCC 9372; 用于指示干热灭菌效果时, 符合《消毒技术规范》(2002年版)的要求; 用于指示环氧乙烷灭菌效果时, 符合GB/T 33419的要求。

3.5.2 嗜热脂肪杆菌芽胞

嗜热脂肪杆菌芽胞(*Geobacillus stearothermophilus*)是灭菌效果指示菌, 菌种为ATCC 7953或SSI K31; 用于指示压力蒸汽灭菌效果时, 符合GB/T 33420的要求; 用于指示过氧化氢气体灭菌效果时, 符合GB/T 33417的要求; 用于指示低温蒸汽甲醛灭菌效果时, 符合GB 18281.5的要求。

3.5.3 短小杆菌芽胞

短小杆菌芽胞(*Bacillus pumilus*)是电离辐射灭菌或消毒的指示菌, 菌种为E 601或ATCC 27142, 符合《消毒技术规范》(2002年版)的要求。

3.6 其他

可根据消毒试验要求, 选择抗力相当的其他菌种进行试验。

4 培养基

4.1 选择相应培养基和试剂进行菌种的传代和培养, 消毒试验所需培养基和试剂见附录A。

4.2 实验室自行制备的固体斜面培养基和平板冷藏保存, 保存期不超过3个月, 如出现缺水、干裂等情况, 灭菌处理后销毁。实验室自行制备的液体培养基密封冷藏保存, 保存期不超过3个月, 如出现浑浊, 灭菌处理后销毁。

4.3 商品化平板、斜面和培养基按产品说明书储存并在有效期内使用。

5 传代与保存

5.1 复苏与传代

5.1.1 以无菌操作方式开启冻干菌种管，加入适量培养液（按菌种选择培养液，如细菌选择营养肉汤、白色念珠菌选择沙堡液体培养基、分枝杆菌选择苏通综合液体培养基、黑曲霉菌选择麦芽浸膏营养肉汤培养基），吹吸数次，使菌种融化分散。取含 5.0 mL~10.0 mL 相应培养液的试管，滴入少许菌种悬液，在适宜温度下培养至规定时间（一般为 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h、黑曲霉菌为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 42 h~48 h），此为第 1 代培养物。

5.1.2 用接种环取第 1 代培养物，或从菌种冻存管中取适量菌液/瓷珠，划线接种于相应培养基平板（按菌种选择培养基，如细菌选择营养琼脂培养基、白色念珠菌选择沙堡琼脂培养基、分枝杆菌选择改良罗氏培养基或其他商品化分枝杆菌专用复合琼脂培养基、黑曲霉菌选择麦芽浸膏琼脂培养基），在适宜温度下培养至规定时间（一般为 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h、分枝杆菌 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h、黑曲霉菌 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 42 h~48 h），此为第 2 代培养物。

5.1.3 挑取第 2 代培养物中典型菌落，接种于相应培养基斜面或平板（按菌种选择培养基斜面，如细菌选择营养琼脂斜面、白色念珠菌选择沙堡琼脂斜面、分枝杆菌选择改良罗氏培养基或其他商品化分枝杆菌专用复合琼脂斜面、黑曲霉菌选择麦芽浸膏琼脂培养基平板），在适宜温度下培养至规定时间（一般为 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h、分枝杆菌 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h、黑曲霉菌 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 42 h~48 h），此为第 3 代培养物。

5.1.4 取第 3 代培养物，接种于相应培养基斜面，在适宜温度下培养至规定时间，此为第 4 代培养物。

5.1.5 按上述方法培养至所需代数，传代时在试管上注明菌种名称、菌种号、代数及传代日期等基本信息。

5.2 保存

5.2.1 菌种斜面的保存

5.2.1.1 传代用菌种采用斜面冷藏保存。

5.2.1.2 将菌种接种在适宜的固体斜面培养基上，在适宜温度下培养至规定时间，生长充分后，转移至冰箱冷藏保存，以备实验传代用。此法用于实验用菌种的短期保存，随时检查其污染杂菌和变异等情况，发现异常，灭菌处理后销毁。

5.2.1.3 保存时间与菌种类型有关，一般存储时间不超过 9 周，铜绿假单胞菌和分枝杆菌不超过 6 周，如保存期内，斜面出现缺水、干裂等情况，灭菌处理后销毁。

5.2.2 菌种冻存管的保存

菌种可采用甘油、液体石蜡、瓷珠等方式冻存，根据其特性选择适宜冻存方法，常用方法参见附录 B。冻存管注明菌种名称、菌种号、冻存日期等基本信息。菌种冻存管在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存不宜超过 18 个月。可间隔一段时间，将菌种冻存管复苏后，重新冻存。

5.2.3 真空冷冻干燥保存

采用真空冷冻技术，将菌种冷冻干燥成菌粉后长期保存。菌种管注明菌种名称、菌种号、日期等基本信息， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保藏。

6 菌悬液的制备

6.1 细菌繁殖体悬液的制备

6.1.1 取第3代~第8代的营养琼脂培养基培养18 h~24 h的新鲜斜面培养物,用5.0 mL吸管吸取3.0 mL~5.0 mL稀释液(除酸性电解水用生理盐水外,其他均用胰蛋白胨生理盐水溶液)加入斜面试管内,反复吹吸,洗下菌苔。用5.0 mL吸管将洗脱液移至另一无菌试管中,用电动混匀器混合20 s,或在手掌上振打80次,使细菌悬浮均匀。

6.1.2 将制成的菌悬液,进行活菌培养计数,按其结果用稀释液稀释至所需浓度,悬液定量杀灭试验时,菌悬液浓度为 1×10^8 CFU/mL~ 5×10^8 CFU/mL。

6.1.3 细菌繁殖体悬液冷藏保存备用,当天使用。

6.1.4 怀疑有污染时,以菌落形态、革兰染色与生化试验等方法进行鉴定。

6.2 枯草杆菌黑色变种芽胞悬液的制备

6.2.1 以无菌操作方式开启菌种管,加入适量营养肉汤培养基,吹吸数次,使菌种融化分散。取含5.0 mL~10.0 mL营养肉汤培养基试管,滴入少许菌种悬液,置 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养18 h~24 h。用接种环取第1代培养的菌悬液,划线接种于营养琼脂培养基平板上,置 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养18 h~24 h。挑取上述第2代培养物中典型菌落,接种于营养肉汤培养基,置 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养18 h~24 h,即为第3代培养物。

6.2.2 用10.0 mL吸管吸取5.0 mL~10.0 mL第3代~5代的18 h~24 h营养肉汤培养物,接种于罗氏瓶(或细胞培养瓶)营养琼脂培养基表面,将其摇动使菌液布满培养基表面,将多余肉汤培养物吸出,罗氏瓶(或细胞培养瓶)置 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱内培养5 d~7 d。

6.2.3 用接种环取少许菌苔涂于玻片上,以改良芽胞染色法染色。改良芽胞染色法:用接种环取菌苔涂于玻片上,自然干燥后,通过火焰加热将菌固定于玻片上;将涂片放入平皿内,片上放两层滤纸,滴加足量的5.0%孔雀绿水溶液,将平皿盖好,置 $55 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热30 min。取出,去滤纸,用自来水冲去残留液;加0.5%沙黄水溶液,1 min后水洗,待干后镜检。芽胞呈绿色,菌体呈红色。在显微镜(油镜)下镜检,当芽胞形成率达90%以上时,即可进行以下处理。否则,继续在室温下放置一定时间,直至达到上述芽胞形成率后再进行以下处理。

6.2.4 加10.0 mL无菌蒸馏水于罗氏瓶(或细胞培养瓶)中,以L棒轻轻刮下菌苔,吸出,再加入5.0 mL无菌蒸馏水冲洗培养基表面,吸出。将两次吸出的菌悬液集中于含玻璃珠的无菌锥形烧瓶中,振摇5 min。

6.2.5 将烧瓶置 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴24 h,使菌自溶断链,分散成单个芽胞。

6.2.6 用无菌棉花或纱布过滤芽胞悬液,清除琼脂凝块。

6.2.7 将芽胞悬液置无菌离心管内,以3000 r/min速度离心30 min。弃上清液,加蒸馏水吹吸使芽胞重新悬浮。再离心和重新悬浮清洗,本步骤重复进行3遍。

6.2.8 将洗净的芽胞悬液放入含适量小玻璃珠的烧瓶内, $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴10 min(或 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴30 min),以杀灭残余的细菌繁殖体。待冷至室温后,摇匀分装后冷藏保存备用,有效使用期6个月。

6.2.9 芽胞悬液在使用时,先进行活菌培养计数。

6.2.10 怀疑有污染时,以菌落形态、革兰染色与生化试验等方法进行鉴定。

6.3 真菌悬液制备

6.3.1 白色念珠菌悬液的制备

6.3.1.1 取第3代~第6代的沙堡琼脂培养基斜面新鲜培养物(18 h~24 h),用5.0 mL吸管吸取3.0 mL~5.0 mL稀释液加入斜面试管内,反复吹吸,洗下菌苔。用5.0 mL吸管将洗脱液移至另一无菌试管中,用电动混匀器混合20 s,或者在手掌上振打80次,使白色念珠菌悬浮均匀。

6.3.1.2 将制成的菌悬液，进行活菌培养计数，按其结果用稀释液稀释至所需浓度，悬液定量杀灭试验时，菌悬液浓度为 1×10^7 CFU/mL \sim 5×10^7 CFU/mL。

6.3.1.3 菌悬液冷藏保存，当天使用。

6.3.1.4 怀疑有污染时，以菌落形态、革兰染色与生化试验等方法进行鉴定。

6.3.2 黑曲霉菌孢子悬液的制备

6.3.2.1 挑取第 2 代培养物中典型菌落，接种于麦芽浸膏营养肉汤培养基中，置 $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 42 h \sim 48 h，即为第 3 代培养物。

6.3.2.2 用 10.0 mL 吸管吸取 5.0 mL \sim 10.0 mL 第 3 代培养物，接种罗氏瓶，并摇动使菌液布满麦芽浸膏琼脂培养基表面，将多余肉汤培养物液体吸出，置 $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 42 h \sim 48 h。

6.3.2.3 向罗氏瓶培养物中加入 5.0 mL \sim 10.0 mL 0.05% (V/V) 吐温 80 生理盐水溶液，刮洗黑曲霉菌分生孢子于溶液中，将孢子悬液移入装有玻璃珠的三角瓶中，轻轻振摇 1 min，过滤除去菌丝后，显微镜下（400 倍）观察是否仍有菌丝存在，若有可经 5000 r/min \sim 6000 r/min 离心 20 min。再次在显微镜下（400 倍）观察，必要时重复上述步骤。

6.3.2.4 黑曲霉菌分生孢子悬液冷藏保存不超过 2 d，使用前，混合均匀，在显微镜下（400 倍）观察是否有孢子出芽，若有则不得使用。

6.3.2.5 将制成的菌悬液，进行活菌培养计数，按其结果用稀释液稀释至所需浓度，悬液定量杀灭试验时，菌悬液浓度为 1×10^7 CFU/mL \sim 5×10^7 CFU/mL。

6.4 分枝杆菌悬液制备

6.4.1 取第 3 代斜面培养物，在改良罗氏培养基或其他商品化分枝杆菌专用复合琼脂培养基斜面上连续传代，培养方法与第 3 代相同，取第 5 代 \sim 第 6 代的 72 h 新鲜培养物，用 5.0 mL 吸管吸取 3.0 mL \sim 5.0 mL 稀释液加入斜面试管内，反复吹吸，洗下菌苔。用 5.0 mL 吸管将洗脱液移至含有 6 g \sim 7 g 玻璃珠的无菌圆锥底试管中，用电动混匀器混合至少 5 min。将菌液吸入至另一试管内，制成菌悬液，冷藏保存，当天使用。

6.4.2 将制成的菌悬液，进行活菌培养计数，按其结果用稀释液稀释至所需浓度，悬液定量杀灭试验时，菌悬液浓度为 1×10^7 CFU/mL \sim 5×10^7 CFU/mL。

7 染菌载体的制备

7.1 载体根据消毒对象选择相应的材料，如手术器械选择不锈钢片，物体表面选择棉布片，非金属管腔选择聚四氟乙烯片（管），光滑表面可选择玻璃片等。常用的材料有金属、玻璃、滤纸、棉布、聚四氟乙烯等，金属载体一般用 12 mm 直径圆形金属片（厚 0.5 mm），其他材质载体一般为方形，大小 10 mm \times 10 mm，特殊试验可使用其他材质、形状的载体。评价气体、雾化等消毒方式时，不可使用布片和滤纸片等有吸附能力的载体。

7.2 所用载体（除滤纸片外）于染菌前，进行脱脂处理。脱脂方法如下：a) 将载体放在含碱性洗涤剂的水中煮沸 30 min；b) 以自来水洗净；c) 用蒸馏水煮沸 10 min；d) 用蒸馏水漂洗至 pH 呈中性；e) 晾干、熨平备用。

7.3 布片用 40 织纱的白平纹棉布制作。将脱脂后的布块按载体规定的大小抽去边缘一周的经纬纱各一根，按抽纱痕剪开。金属片以不锈钢制作，纸片以滤纸制作。

7.4 载体经压力蒸汽灭菌后，使用滴染法染菌。

7.5 染菌用菌悬液：菌悬液和芽胞悬液的制备按第 6 章进行，然后加入等量 3.0% 或 0.3% 的牛血清白蛋白。

- 7.6 滴染法染菌时，将经灭菌的载体平铺于无菌平皿内，用移液器逐个滴加菌液，必要时用接种环涂匀整个载体表面。置 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱或者室温干燥备用，黑曲霉菌染菌载体置于二级生物安全柜内干燥备用。
- 7.7 每个染菌载体的回收菌量为 1×10^6 CFU/个 $\sim 5 \times 10^6$ CFU/个。特殊染菌载体（如压力蒸汽灭菌生物指示物）的回收菌量符合相应标准的要求。
- 7.8 染菌载体冷藏保存，芽胞载体有效期 1 个月，其他染菌载体当天使用。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 稀释液

A.1.1 胰蛋白胨生理盐水溶液 (TPS)

胰蛋白胨	1.0 g
氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1000 mL

制成溶液，调pH至6.8~7.2 (20 °C)，于121 °C压力蒸汽灭菌20 min备用。

A.1.2 生理盐水

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1000 mL

制成溶液，于121 °C压力蒸汽灭菌20 min备用。

A.2 孔雀绿与沙黄芽胞染色液

5.0%孔雀绿水溶液
0.5%沙黄水溶液

A.3 有机干扰物

牛血清白蛋白	30.0 g 或 3.0 g
蒸馏水	1000 mL

溶解后用微孔滤膜（孔径为 0.45 μm）滤过除菌，冰箱冷藏保存备用。

A.4 营养琼脂培养基

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1000 mL

制成溶液，调pH至 7.2~7.4，于 121 °C压力蒸汽灭菌 20 min备用。

A.5 营养肉汤培养基

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	5.0 g

蒸馏水 1000 mL
制成溶液，调 pH 至 7.2~7.4，于 121 °C 压力蒸汽灭菌 20 min 备用。

A.6 胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA）

胰蛋白胨 15.0 g
大豆蛋白胨 5.0 g
氯化钠 5.0 g
琼脂 16.0 g
蒸馏水 1000 mL
制成溶液，调 pH 至 7.2~7.4，于 121 °C 压力蒸汽灭菌 20 min 备用。

A.7 沙堡琼脂培养基

葡萄糖 40.0 g
蛋白胨 10.0 g
琼脂 20.0 g
蒸馏水 1000 mL
制成溶液，调 pH 至 5.4~5.8，于 115 °C 压力蒸汽灭菌 30 min 备用。

A.8 沙堡液体培养基

葡萄糖 40.0 g
蛋白胨 10.0 g
蒸馏水 1000 mL
制成溶液，调 pH 至 5.4~5.8，于 115 °C 压力蒸汽灭菌 30 min 备用。

A.9 苏通综合液体培养基

磷酸二氢钾 0.50 g
硫酸镁（ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ） 0.50 g
柠檬酸铁铵 0.05 g
柠檬酸 2.0 g
甘油 60 mL
天冬素 4.0 g
蒸馏水 940 mL
加热溶解后，调 pH 至 7.2~7.4，过滤、分装，于 121 °C 压力蒸汽灭菌 30 min 备用。

A.10 改良罗氏培养基

味精（谷氨酸钠 95% 以上） 7.20 g
磷酸二氢钾 2.40 g
硫酸镁 0.24 g
柠檬酸镁 0.60 g
甘油 12 mL
马铃薯淀粉 30.0 g

2%孔雀绿	20 mL
全卵液	1000 mL
蒸馏水	600 mL

各盐类成分溶解后，加马铃薯淀粉，混匀，沸水锅内煮沸30 min~40 min(其间不时摇动，防凝块)，呈糊状，冷却后，加入经消毒纱布过滤的新鲜全卵液1000 mL，混匀。加2%孔雀绿20 mL，混匀，分装试管，每一试管加培养基7 mL，培养基斜面高度为培养基占试管底部的2/3处为宜；若制作培养基平板，则每皿加约30 mL~35 mL，置血清凝固器内凝固。

凝固器内温度至90 ℃后，放入分装好的培养基试管或平皿，以摆放两层为宜。待凝固器内温度达85 ℃~90 ℃，计时，凝固1 h~1.5 h后取出，冷却。无菌试验后放冰箱冷藏备用，一个月内使用。

A. 11 麦芽浸膏琼脂培养基 (MEA)

麦芽浸膏	30.0 g
大豆蛋白胨	3.0 g
琼脂	15.0 g
双蒸馏水	1000 mL

制成溶液，121 ℃ 20 min 压力蒸汽灭菌，灭菌后无菌调节 pH 至 5.4~5.8 备用。

A. 12 麦芽浸膏肉汤培养基 (MEB)

麦芽浸膏	20.0 g
双蒸馏水	1000mL

制成溶液，121 ℃ 20 min 压力蒸汽灭菌，灭菌后无菌调节 pH 至 6.7~7.1 备用。

附 录 B
(资料性附录)
菌种冻存方法

B.1 甘油冷冻管保存法

用无菌接种环刮取平板或琼脂斜面的培养物，放入装有无菌纯化水的试管中，通过接种环与试管壁间的摩擦，使细菌充分扩散到纯化水中，制备成菌悬液。向已制备好的菌悬液中加入等体积的无菌甘油（浓度20%），即为10%甘油菌悬液，轻轻振摇，充分混合后，分装于无菌小试管或冻存管，冷冻保存。

B.2 液体石蜡保存法

B.2.1 无菌液体石蜡的制备

选用优质化学纯液体石蜡，121 °C 30 min压力蒸汽灭菌后，置40 °C恒温箱中蒸发水分，备用。

B.2.2 液体石蜡管的制备

将菌种穿刺接种于半固体高层培养基中，在适宜条件下培养结束后，用无菌吸管吸取上述无菌液体石蜡至培养好的菌种管内，并使石蜡高出菌种表面约1 cm，使菌体与空气隔绝，并将试管直立，置于-20 °C冷冻或冷藏保存。

B.3 真空冷冻干燥法

B.3.1 准备安瓿管

用于冷冻干燥菌种保藏的安瓿管宜采用中性玻璃制造，可用长颈球形底安瓿管或管状安瓿管，将安瓿管清洗干净，烘干，管口塞好脱脂棉塞，121 °C灭菌30 min，备用。

B.3.2 菌悬液的制备及分装

在无菌条件下，用2 mL~3 mL脱脂牛乳将生长良好的纯菌培养物从斜面上洗脱下来，制成菌悬液，分装入安瓿管，每支安瓿管分装0.1 mL~0.2 mL。

B.3.3 预冻

-80 °C预冻1 h~2 h。

B.3.4 冷冻干燥

将冷冻后的安瓿管置于冷冻干燥机的干燥箱内，开始冷冻干燥，时间一般为8 h~20 h。终止干燥时间根据下列情况判断：a) 安瓿管内冻干物呈酥块状或松散片状；b) 真空度接近空载时的最高值；c) 选用1~2支对照管，其中加水与菌悬液同量，若对照管中水份已干燥，视为干燥完结。

B.3.5 封口

抽真空干燥后，取出安瓿管，接在封口用的玻璃管上，可用L形五通管继续抽气，约10 min即可达到26.7 Pa（0.2 mmHg）。于真空状态下，以煤气喷灯의 细火焰在安瓿管颈中央进行封口。

B.3.6 保藏

安瓿管保存在-20℃冰箱。

B.4 瓷珠冷冻保存法

按商品化菌种保存管说明书进行瓷珠冷冻保存。
