

JJF

中华人民共和国国家计量技术规范

JJF × × × ×—202×

微生物标准物质研制用菌（毒）种 生物追溯性评价要求

**Biological Traceability Evaluation Requirements of Microorganisms
for Production of Reference Material**

202×-××-××发布

202×-××-××实施

国家市场监督管理总局发 布

微生物标准物质研制用菌 (毒) 种生物学追溯性评价 要求

JJF ××××—202×

Biology Traceability Evaluation

Requirements of Microorganisms

for Production of Reference Material

归口单位：全国标准物质计量技术委员会

主要起草单位：

参加起草单位：

本规范委托全国标准物质计量技术委员会负责解释

本规范主要起草人：

参加起草人：

国家标准物质计量技术委员会征求意见稿

目 录

引 言	4
1 范围	5
2 规范性引用文件	5
3 术语及定义	5
3.1 微生物标准物质 microbial reference material.....	6
3.2 菌（毒）种 microorganism strains	6
3.3 微生物标准物质候选菌（毒）种 candidate strains of microbial reference material	6
3.4 菌（毒）种生物学追溯性 biological traceability of microorganism strains	6
3.5 稳定性 stability.....	6
4 菌（毒）种生物追溯性评价要求基本原则	6
4.1 评价对象.....	6
4.2 评价范围.....	6
4.3 评价要素.....	6
5 菌（毒）种来源评价要求	7
5.1 菌（毒）种来源机构.....	7
5.2 菌（毒）种来源信息.....	7
5.3 评价结果判定.....	7
6 菌（毒）种生物标称特性评价要求	7
6.1 标称特性评价方法基本原则.....	7
6.2 标称特性评价项目方法.....	7
6.3 结果判定.....	8
7 菌（毒）种抗性评价要求	8
7.1 抗性评价方法基本原则.....	8
7.2 抗性评价项目方法.....	8
7.3 结果判定.....	9
8 菌（毒）种稳定性评价要求	9
8.1 稳定性评价基本原则.....	9
8.2 稳定性评价项目方法.....	10
8.3 结果判定.....	10
9 评价质量保证	10
9.1 评价过程质量保障要求.....	10
9.2 评价过程安全要求.....	11
附录 A:	12
附录 B:	13
附录 C:	16

引 言

微生物标准物质作为测量量值溯源与传递的载体，广泛应用于食品、药品、消毒产品等微生物相关领域的安全检测、仪器校准、质量控制、方法开发等工作。在微生物标准物质研制过程中微生物菌（毒）种的选用是十分关键的首要步骤，本文件的目的是规范微生物标准物质研制过程中选用菌（毒）种的生物学追溯性评价，保障微生物标准物质特性值的准确可靠与计量溯源性。

本规范以JJF 2307《微生物计数标准物质研制（生产）技术要求》、JJF 1342《标准物质研制（生产）机构通用要求》、WS/T 812《病原微生物菌（毒）种国家标准株评价技术标准》为指导原则。

本技术规范为首次发布。

国家标准物质计量技术委员会征求意见稿

微生物标准物质研制用菌（毒）种生物学追溯性评价要求

1 范围

本文件规定了微生物标准物质在研制过程中，在选用菌（毒）种时对细菌、真菌的生物学追溯性的评价要求，明确了评价项目、评价方法、判断标准和质量控制要点。

本文件适用于指导国家一级、二级微生物标准物质研制单位对微生物标准物质候选菌（毒）种开展的生物学评价工作。

2 规范性引用文件

本规范引用了下列文件：

JJF 1005 标准物质通用术语和定义

JJF 1265 生物计量术语及定义

JJF 1342 标准物质研制（生产）机构通用要求

JJF 1343 标准物质的定值及均匀性、稳定性评估

JJF 1854 标准物质计量溯源性的建立、评估与表达计量技术规范

JJF 2307 微生物计数标准物质研制（生产）技术要求

JJF 2308 标准物质研制（生产）实验室病原微生物生物安全通用要求

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

WS/T 315 人间传染的病原微生物菌（毒）种保藏机构设置技术标准

WS/T 805 临床微生物检验基本技术标准

WS/T 812 病原微生物菌（毒）种国家标准株评价技术标准

以上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，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。

3 术语及定义

JJF 1006、JJF 1265、JJF 2307和WS/T 812及以下术语和定义适用于本规范。

3.1 微生物标准物质 microbial reference material

具有足够均匀和很好地确定了微生物体中一种或多种特性或数量等量值的物质。

3.2 菌（毒）种 microorganism strains

有保存价值的，具有生物活性的微生物纯培养物。

[来源：WS/T 315—2025，3.1，有修改]

注：在本文件中指拟研制（生产）为微生物标准物质的细菌或真菌。

3.3 微生物标准物质候选菌（毒）种 candidate strains of microbial reference material

拟研制（生产）为微生物标准物质的原料菌（毒）种。

注：在本文件中指拟研制（生产）为微生物标准物质的细菌或真菌。

3.4 菌（毒）种生物学追溯性 biological traceability of microorganism strains

通过对菌（毒）种表型、免疫学、分子生物学及基因组学等分析手段，系统鉴定菌株的生物学特征，并依据这些特征完成来源追溯。

3.5 稳定性 stability

菌（毒）种在特定培养传代条件下，其生物标称特性保持可重复的能力。

4 菌（毒）种生物追溯性评价要求基本原则

4.1 评价对象

以拟研制（生产）为微生物标准物质的细菌、真菌为评价对象，在该候选菌（毒）种研制成为微生物标准物质前进行生物学追溯性评价。

4.2 评价范围

待评价菌（毒）种应符合 GB 19489、WS/T 812 和 JJF 2308 对菌（毒）种生物安全性的相关要求以及 JJF 1342、JJF2307 对微生物标准物质研制的相关要求。

4.3 评价要素

菌（毒）种生物追溯性评价要求分为必要评价项目和选择评价项目，其中，菌（毒）种来源评价和标称特性鉴定评价为必要评价项目，所有微生物标准物质在研制前应完成必要评价项目。菌（毒）种抗性测试评价和稳定性测试评价为选择评价项目，根据所研制微生物标准物质用途，选择项目进行评价。若所研制微生物标准物质在特性量值上无可抗性测试或稳定性测试需求可不进行评价。

5 菌（毒）种来源评价要求

菌（毒）种来源评价为必要评价项目，微生物标准物质候选菌（毒）种应为来源明确的标准菌（毒）株，或为与标准菌（毒）株所有相关特性等效、可追溯的派生菌（毒）株。

5.1 菌（毒）种来源机构

菌（毒）种来源机构应为国内外官方或公认的菌（毒）种保藏机构，如中国医学微生物菌种保藏管理中心（CMCC）、中国工业微生物菌种保藏管理中心（CICC）、国家病原微生物资源库（NPRC）、国家标准物质资源库（CNRM）、美国标准菌种保藏中心（ATCC）等。

5.2 菌（毒）种来源信息

菌（毒）种来源信息应包括菌（毒）种名称、来源宿主、保藏机构名称、菌（毒）株批号、有效期、保存条件、标称特性等信息（见附录 A《菌（毒）种来源信息资料表》）以及证明材料。来源为非菌（毒）种保藏机构的细菌或真菌，需在表格中填写与权威数据库同属菌（毒）种的比对信息。

5.3 评价结果判定

《菌（毒）种来源信息资料表》填写完整准确且与证明材料内容符合则判定为合格评价，若存在填写信息缺失、虚假，表格信息与证明材料不符合情况，判定为不合格评价。《菌（毒）种来源信息资料表》需作为微生物标准物质研制报告和定级申请时的核心附件供技术审评时核查。

6 菌（毒）种生物标称特性评价要求

6.1 标称特性评价方法基本原则

6.1.1. 标称特性评价方法应依据现行微生物学检验相关国家标准或规范进行试验，如 GB 4789 系列国家标准、《伯杰氏细菌学系统手册》等

6.1.2. 标称特性评价用菌（毒）种测试样本从来源菌（毒）株传代培养次数不得超过 5 次。

6.2 标称特性评价项目方法

菌（毒）种标称特性评价为必要评价项目，包含形态学鉴定、生理生化鉴定和分子生物学鉴定三种评价方法。

6.2.1 形态学评价要求

对于细菌，形态学鉴定应至少对菌落形成的形态、大小、颜色三项基础特征进行评价，在此基础上，可根据鉴定深度的需要，选择性评价菌落的边缘、表面、隆起度、透明度、质地及溶血性等特征，必要时可通过显微观察明确细胞的染色反应、形态、排列及特殊结构。对于真菌的形态学鉴定，应分别通过电镜观察或描述菌丝与孢子的特征结构。

6.2.2 生理生化评价要求

细菌、真菌的生化鉴定，须对其碳氮源利用与发酵能力、关键酶活性及特征性代谢产物和化学耐受性进行检测，可通过商用试剂盒或自动化微生物鉴定及药敏分析系统进行鉴定。

6.2.3 分子生物学评价要求

分子生物学鉴定应分析菌（毒）种特定保守基因（如 16S rRNA、ITS）的序列信息。操作应严格遵循核酸提取、PCR 扩增及测序等技术标准，获取高质量 DNA，使用特异性引物扩增靶基因，并对纯化后的产物进行双向测序，确保测序质量。最终应将所得序列与美国国家生物技术信息中心（NCBI）等权威数据库进行比对。

6.3 结果判定

形态学鉴定、生理生化鉴定和分子生物学鉴定的结果与《菌（毒）种来源信息资料表》登记结果一致则判定为合格，与《菌（毒）种来源信息资料表》信息不一致则为不合格。

7 菌（毒）种抗性评价要求

7.1 抗性评价方法基本原则

7.1.1. 菌（毒）种抗性评价方法应依据现行微生物学检验相关国家标准或规范进行试验。

7.1.2. 菌（毒）种抗性评价用菌（毒）种测试样本从来源菌（毒）株传代培养次数不得超过 5 次。

7.2 抗性评价项目方法

菌（毒）种抗性评价为选择评价项目，若该菌（毒）种拟研制的微生物标准物质其应用场景为抗干燥环境时应进行抗干燥评价；拟研制的微生物标准物质其应用场景为抗酸碱环境时应进行抗酸碱评价；拟研制的微生物标准物质其应用场景为耐高/低温

环境时应进行抗干燥评价；拟研制的微生物标准物质其应用场景为其他环境时应进行相应的抗性评价。若该菌（毒）种拟研制的微生物标准物质其应用场景无特殊环境要求时可不进行评价。

7.2.1 抗干燥评价要求

抗干燥评价应采用标准化的干燥胁迫方法，将定量菌（毒）种置于可控的干燥环境（明确温度、湿度与时间）中进行处理，处理后应通过规范的复苏程序与活性测定，通过计算其存活率作为评价其耐受能力与稳定性的核心依据。

7.2.2 抗酸碱评价要求

抗酸碱评价应采用标准化的酸碱耐受性试验方法，将定量菌（毒）种样本暴露于 pH 值明确可控的缓冲液或介质中，在规定温度与时间内进行处理并通过规范的复苏培养与活性测定，通过计算其存活率作为评价其对特定酸碱环境耐受能力与稳定性的核心依据。

7.2.3 耐高/低温评价要求

耐高/低温评价应采用标准化的温度胁迫方法，将定量菌（毒）种置于精确可控的高温或低温（明确温度、时间）环境中进行处理，处理后应立即通过规范的复苏程序与活性测定，通过计算其存活率作为评价其对极端温度耐受能力与稳定性的核心依据。

7.2.4 耐高/低温评价要求

菌（毒）种抗性测试评价应依据 WS/T 805 临床微生物检验基本技术等标准进行试验评价。

7.3 结果判定

菌（毒）种抗性评价的结果符合该菌（毒）种拟研制的微生物标准物质应用场景则判定为合格，菌（毒）种抗性评价的结果与该菌（毒）种拟研制的微生物标准物质应用场景不一致则判定为不合格。

8 菌（毒）种稳定性评价要求

8.1 稳定性评价基本原则

8.1.1. 菌（毒）种稳定性评价应以菌（毒）种初始批次作为参照，对传代次数超过 5 次的菌株进行稳定性评价。

8.1.2. 菌（毒）种抗性评价方法应依据现行微生物学检验相关国家标准或规范进行。

8.2 稳定性评价项目方法

菌（毒）种稳定性评价为选择评价项目，包含培养条件稳定性评价和标称特性稳定性评价。若该菌（毒）种拟研制的微生物标准物质的应用场景为传代后使用则应进行培养条件稳定性评价和标称特性稳定性评价。若该菌（毒）种拟研制的微生物标准物质其应用场景无传代使用要求可不进行评价。

8.2.1 培养条件稳定性评价要求

培养条件稳定性评价应将待评价菌（毒）种和初始批次菌（毒）种在相同的标准液体培养基中培养，每隔一定时间(如每小时)取样，通过测定光密度(OD600)或活菌计数(CFU/mL)来绘制生长曲线。比较两条生长曲线的延滞期时长、对数生长期斜率(生长速率)、稳定期最大菌液浓度和衰退期趋势。

8.2.2 标称特性稳定性评价要求

标称特性稳定性评价是对待评价菌（毒）种进行形态学鉴定、生理生化鉴定和分子生物学鉴定，评价方法分别参考本文件“6.2.1 形态学评价要求”、“6.2.2 生理生化评价要求”、“6.2.3 分子生物学评价要求”。

8.3 结果判定

培养条件稳定性结果判定通过待评价菌（毒）种的生长曲线与初始批次菌（毒）种生长曲线进行对比吗，生长速率和最大菌液浓度差异在±10%以内，且延滞期时间无显著延长，判定为合格；若生长曲线出现模式性改变，如延滞期显著延长、无法达到正常菌液浓度，表明菌株活力下降或适应不良，判定为不合格。

标称特性稳定性评价结果判定参考本文件“6.3 结果判定”进行。

9 评价质量保证

9.1 评价过程质量保障要求

微生物标准物质研制实验室对其所研制微生物标准物质选用菌（毒）种进行生物追溯性评价过程应进行质量保障，以确保实验测试结果的连贯性及其与特定标准的一致性。该程序应覆盖本文件涉及的所有评价项目和实验人员，该程序应包括以下方法：

a) 通过设计不同批次的重复性实验，系统收集数据，评估结果的准确度及稳定性，以充分的数据证据支撑评价结果可靠性；b) 评价时应同时使用已知的标准菌（毒）种（阳性对照）和/或空白培养基（阴性对照）进行平行实验，以确保染色、培养和观察过程的准确性。评价过程质量保障示例可参见附录 B、附录 C。

9.2 评价过程安全要求

评价检验过程应符合 GB 19489《实验室生物安全通用要求》，涉及病原微生物评价检验过程应符合 JJF 2308-2025《标准物质研制（生产）实验室病原微生物生物安全通用要求》。

国家标准物质计量技术委员会征求意见稿

附录 A:

菌（毒）种来源信息资料表

菌（毒）种名称 （中文）			
菌（毒）种名称 （外文）			
保藏机构名称		菌（毒）种编号	
提供形式		运输条件	
基本信息		特征信息	
来源宿主		细菌、真菌形态 学特征	
保藏时间		生理生化特征	
生物危害程度		核酸序列信息	
其他信息			

附录 B:

使用标准物质对菌（毒）种生物学标称特性评价过程质量保障示例

以拟研制金黄色葡萄球菌标准物质为例，该微生物标准物质候选菌（毒）种为金黄色葡萄球菌，应对金黄色葡萄球菌进行标称特性评价。选择国家标准物质资源共享平台中的金黄色葡萄球菌标准物质（GBW(E)091091）对评价过程质量进行保障。对 GBW(E)091091 中金黄色葡萄球菌同步进行形态学鉴定、生化鉴定和分子生物学鉴定。

① 形态学鉴定

菌落形态：复溶 GBW(E)091091 后挑取金黄色葡萄球菌单菌落接种在脑心浸液肉汤（BHI），37℃培养 8 小时，然后划线接种于 Baird-Parker 培养基（BP）平板。培养后菌落形态均呈圆形，表面光滑、凸起、湿润、菌落直径为 2 mm~3 mm，颜色黑色，有光泽，周围绕以不透明圈（图 1）。



图 1 金黄色葡萄球菌在 BP 平板上的形态特征

显微镜检：对菌株进行革兰氏染色，然后使用显微镜观察。金黄色葡萄球菌是典型的革兰氏阳性球菌，因此在显微镜下呈葡萄球状，无芽胞，无荚膜，显紫色，直径约为 0.5 μm ~1.0 μm （图 2）。

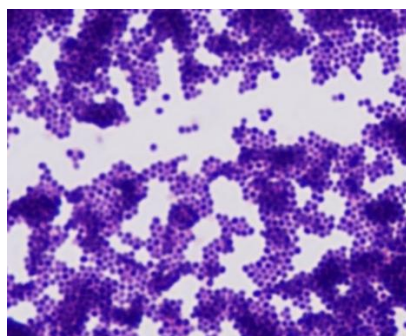


图 2 金黄色葡萄球菌革兰氏染色镜检图

② 生化鉴定

血浆凝固酶试验：在BP平板上挑取单菌落经革兰氏染色鉴定为革兰氏阴性杆菌，分别接种到BHI和营养琼脂（NA）小斜面，36℃±1℃培养18 h~24 h。取新鲜配制兔血浆放入小试管中，再加入BHI培养物，振荡摇匀置36℃±1℃温箱内，每半小时观察一次，观察6 h，发现呈现凝固且凝固体积大于原体积的一半，结果表明为金黄色葡萄球菌。

生化反应鉴定试纸条：结果如图 3 所示，阴性对照为阴性，右旋糖、D-果糖、右旋甘露糖、D-麦芽糖、D-乳糖（牛源）、D-海藻糖、D-甘露醇反应阳性，木糖醇、D-蜜二糖反应阴性，硝酸钾、β-萘基磷酸盐、丙酮酸钠反应阳性，D-棉子糖、D-木糖反应阴性，D-蔗二糖反应阳性，甲基 α-D-吡喃葡萄糖苷反应阴性，N-乙酰基葡萄糖胺、左旋精氨酸、尿素反应阳性。依据 API STAPH 编码手册索引确定为金黄色葡萄球菌。



图 3 生化反应鉴定试纸条

自动化微生物鉴定系统：将菌种样品在 NA 平板上划线培养，并使用鉴定系统进行生化鉴定。结果显示为金黄色葡萄球菌（图 4）。

选中的微生物				99% 概率 生物编码：010402063663231														Staphylococcus aureus 置信度：极好的鉴定			
生化试验详情																					
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	-				
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	+				
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-				
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	+				
38	dRIB	+	39	ILATk	+	42	LAC	-	44	NAG	-	45	dMAL	+	46	BACI	+				
47	NOVO	-	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-				
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-				
64	OPTO	+																			

图 4 自动化微生物鉴定系统测试结果

③分子生物学鉴定

DNA 提取：提取和纯化得到金黄色葡萄球菌菌株的基因组 DNA。

PCR 扩增：设计引物进行 PCR 扩增得到 16S rDNA 基因扩增产物。

测序：对纯化后的测定 16S rDNA 基因扩展产物进行双向测序、获得金黄色葡萄球菌 16S rDNA 序列。

金黄色葡萄球菌的 16S rDNA 序列如下：

TGCTATACATGCAGTCGAGCGAACGGACGAGAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAA
TACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCACTTATAG
ATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCATAGC
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAT
GAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGCAC
ATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTTAAAGTCTG
ATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGA
AGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGGGAAAGCGTGGGGATCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCC
CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCGTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAC
TCAAAGGAATTGACGGGG

比对：经 BLAST 比对后，与金黄色葡萄球菌参考菌株 DSM_20231 的 16S rDNA 基因相似度均 $\geq 99\%$ ，如表 1 所示。

表 1 金黄色葡萄球菌 BLAST 比对结果

细菌名称	同源率	bit score	E 值
<i>Staphylococcus aureus</i>	885/887 (99.775%)	1628	0.0

附录 C:

使用标准物质对菌（毒）种生物学抗性评价过程质量保障示例

本示例以拟研制过滤效率检测评价用金黄色葡萄球菌标准物质为例，因为拟研制微生物标准物质的应用场景为过滤效率检测评价，因此需要针对该应用场景对微生物标准物质候选菌（毒）种的生物学抗性进行评价。根据应用场景主要为干燥环境、温度环境、酸碱环境，因此需要进行抗干燥性、耐热性和抗酸性及抗碱性评价。

选用国家病原微生物资源库中金黄色葡萄球菌标准菌株（NPRC(S)01.8395）作为拟研制过滤效率检测评价用金黄色葡萄球菌的标准物质候选菌（毒）种，使用美国标准菌种保藏中心的金黄色葡萄球菌标准菌株（ATCC6538）进行评价质控，对两种菌进行抗干燥性、耐热性和抗酸性及抗碱性的对比实验。

1 抗干燥性

将金黄色葡萄球菌NPRC(S)01.8395、金黄色葡萄球菌ATCC6538、枯草芽孢杆菌（空白对照）划线接种于NA平板，37℃培养18~24h。随后挑取典型菌落，在液体培养取对数期的培养物离心后稀释至 1×10^8 CFU/mL。取菌液滴加至载体，菌液滴加量每片为（即 1×10^8 CFU/片），并用接种环涂匀整个载体表面，分别制备NPRC(S)01.8395、ATCC6538各6片（3片实验组，3片对照组）。染菌后，染菌载体置于生物安全柜内开通风干燥20 min，对照组密封放在4℃条件20 min下。之后进行菌片计数：用稀释液PBS为洗液洗菌，将菌洗下形成菌悬液，选择适宜稀释度进行平板计数，培养至规定时间，计数最终结果的菌落数。将求得的平均菌落值，再乘以稀释倍数，即得每毫升原样液中的菌量，单位为CFU/mL。结果如表1所示，标准物质候选菌（毒）种金黄色葡萄球菌NPRC(S)01.8395抗干燥性符合要求。

表 1 金黄色葡萄球菌干燥处理前后活菌计数（CFU/mL）

	金黄色葡萄球菌 NPRC(S)01.8395 (候选)	金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 (质控)	枯草芽孢杆菌 ATCC 9372 (空白对照)
对照组	1.6×10^6	1.3×10^6	7.6×10^4
干燥组	2.2×10^5	8.9×10^4	5.4×10^3
存活率	13.75%	6.85%	7.11%

2 耐热性

实验菌株的菌悬液浓度为 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ CFU/mL；将 TSB 培养基分成 3 组，各取 100 μ L 菌悬液分别加入 3 组 5mL TSB 培养基中；第 1 组在 45 $^{\circ}$ C 下培养，第 2 组在 50 $^{\circ}$ C 下培养，第 3 组在 37 $^{\circ}$ C 下培养作为阳性对照组，取 100 μ L 的胰蛋白胨生理盐水溶液（TPS）加入 TSB 中作为阴性对照组；培养 24 h 后各取 1 mL 培养液接种于 TSA 培养基中，使用平板活菌计数法计数活菌数，菌量较多的组用 10 倍稀释法稀释后计数；实验重复 3 次，将平均值作为最终活菌数并转换为对数值。结果显示，NPRC(S)01.8395 在耐热性方面均与 ATCC 6538 一致，不同培养条件下活菌浓度的对数如图 1 左所示，它们均可以在 45 $^{\circ}$ C 生存，活菌数数量级相同，标准物质候选菌（毒）种金黄色葡萄球菌 NPRC(S)01.8395 耐热性符合要求。

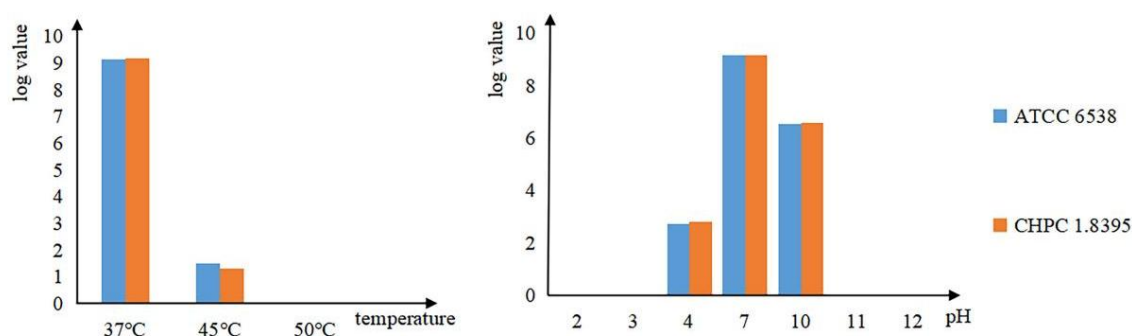


图 1 实验菌株在不同环境中的生长状况

3 抗酸性及抗碱性

在无菌条件下，使用酸度计调整 TSB 培养基的 pH 值到 pH=2、3、4 和 pH=10、11、12，以 pH=7 的 TSB 培养基作为对照，各取 5 mL 分装到 14mL 摇菌管中；用 TPS 将实验菌株的菌悬液浓度调整为 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ CFU/mL，取 100 μ L 菌悬液加入 5 mL 不同 pH 值的培养基中，同时每个 pH 值的培养基设置空白对照组，37 $^{\circ}$ C 培养 24 h；取 1 mL 培养后的液体接种于 TSA 培养基中，使用平板活菌计数法计数活菌数，菌量较多的组用 10 倍稀释法稀释后计数；实验重复 3 次，将平均值作为最终活菌数并转换为对数值。不同培养条件下活菌浓度的对数结果如图 1 右所示，所有菌株都能在 pH=4 和 pH=10 的 TSB 培养基中存活，且活菌数数量级相同，标准物质候选菌（毒）种金黄色葡萄球菌 NPRC(S)01.8395 抗酸性及抗碱性符合要求。