

ICS 71.100.40

分类号: Y 43

QB

# 中华人民共和国轻工行业标准

QB/T 5482—2020

## 化学消毒剂与杀菌剂

### 基本消毒活性 试验方法和要求

Chemical disinfectants and antiseptics—Basic bactericidal activity

—Test method and requirements

2020-04-16 发布

2020-10-01 实施

中华人民共和国工业和信息化部 发布

## 前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由中国轻工业联合会提出。

本标准由全国食品用洗涤剂产品标准化技术委员会（SAC/TC 395）归口。

本标准起草单位：中国日用化学研究院有限公司[国家洗涤剂质量监督检验中心（太原）]、表面活性剂和洗涤剂行业生产力促进中心、苏州世谱检测技术有限公司。

本标准主要起草人：公培龙、姚晨之、李晓辉、李晓婷、李晓睿、孟丽君、卢剑。

本标准为首次发布。

# 化学消毒剂与杀菌剂 基本消毒活性 试验方法和要求

## 1 范围

本标准规定了一种检验化学消毒剂与杀菌剂产品基本消毒活性（杀细菌活性）的试验方法。

本标准适用于评价试样原样或用水稀释后可形成均匀的、物理上稳定的化学消毒剂与杀菌剂的基本消毒活性（杀细菌活性）。

## 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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

SN/T 1538.2 培养基制备指南 第2部分：培养基性能测试实用指南

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**杀细菌活性 bactericidal activity**

于设定条件下使相关试验菌的活菌细胞数降低的能力。

## 4 符号

下列符号适用于本文件。

*A*: 每毫升条件控制试验混合物所含菌落数。

*B*: 每毫升中和或过滤控制试验混合物所含菌落数。

*C*: 每毫升方法证实试验混合物所含菌落数。

*N*: 每毫升试验菌悬液所含菌落数。

*N<sub>a</sub>*: 每毫升试验混合物在作用时间结束后，以及中和或膜过滤之前每毫升所含的菌落数。

*N<sub>v</sub>*: 每毫升验证菌悬液所含菌落数。

*N<sub>0</sub>*: 混合物 *A*、*B* 与 *C* 在试验时间开始时每毫升所含菌落数。

*N<sub>0</sub>*: 每毫升试验混合物在作用时间开始时所含菌落数。

*V<sub>C</sub>* 值: 记录的所有试验数据均作为 *V<sub>C</sub>* 值。稀释-中和法中，*V<sub>C</sub>* 值为每 1.0 mL 混合物样液所形成菌落数；膜过滤法中，*V<sub>C</sub>* 值为每 0.1 mL 试验混合物及控制试验中每 1.0 mL 样液混合物所形成菌落数。

## 5 方法提要

将试样原样或用水稀释后的样品加入试验菌悬液，保持混合物于确定温度下作用一定时间，使试样的杀细菌作用被立即中和，然后确定样品中存活的菌落数，并计算活菌数减少的量，确定试样的杀细菌能力。

## 6 材料与试剂

### 6.1 试验菌

用以下菌种作为试验菌，评价杀细菌活性：

- 大肠埃希氏菌 ATCC 10536 或大肠杆菌 8099 或 ATCC 25922 或 ATCC 11229;
- 铜绿假单胞菌 ATCC 15442;
- 金黄色葡萄球菌 ATCC 6538。

这些试验菌要求的培养温度是 $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 或 $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。试验及其控制和证实期间,所有的培养应用相同的温度 $(36^{\circ}\text{C}$ 或 $37^{\circ}\text{C})$ 。

若使用增加的菌种,应在最佳生长条件下(温度、时间、空气、培养基)对其进行培养,并在试验报告中注明。若这些增加的试验菌在菌种保藏中心不是保密的,则说明它们的识别特征。除此,应被实验室或菌种保藏中心自然培养保存 5 y。

## 6.2 培养基与试剂

### 6.2.1 常规试剂

本标准中所有化学物质均指其无水盐,水合物形式作备用,当使用水合物形式时应调整所要求的质量。

试剂应是分析级别或适用于微生物,而且不含对试验菌有毒的或抑制作用的物质。

为了提高细菌繁殖能力,应使用商业上可用的脱水材料来制备培养基,严格遵守关于这些产品制备的生产说明书。

### 6.2.2 水

所用水应是 GB/T 6682 三级或以上的水,并于高压蒸汽灭菌锅内灭菌。

注 1: 若水被用于制备培养基并随后进行灭菌,则不必进行高压蒸汽灭菌。

注 2: 亦可使用注射制剂用水。

### 6.2.3 胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)

胰蛋白胨大豆琼脂由以下成分组成:

- 胰蛋白胨, 15.0 g;
- 大豆蛋白胨, 5.0 g;
- 氯化钠, (NaCl) 5.0 g;
- 琼脂, 15.0 g;
- 水定容至, 1 000 mL。

高压蒸汽灭菌锅内灭菌后,培养基的 pH 于 $(20\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 下测量应为 $7.2\pm 0.2$ 。

培养基制备应符合 SN/T 1538.2。

注: 为避免中和时遇到问题,必要时可将中和剂加入 TSA。

### 6.2.4 稀释液

胰蛋白胨氯化钠溶液做稀释液:

- 胰蛋白胨, 1.0 g;
- 氯化钠 (NaCl), 8.5 g;
- 水, 定容至 1 000 mL。

高压蒸汽灭菌锅内灭菌后,培养基的 pH 于 $(20\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 下测量应为 $7.0\pm 0.2$ 。

### 6.2.5 中和剂

按照附录 A 检验针对试验样品所用的中和剂。

注: 附录 B 中可以找到对一些产品适合的中和剂。

### 6.2.6 洗液(用于膜过滤法)

对基于试验样品的洗液进行验证,结果该洗液应是无菌的,且于试验所描述的试验条件下,与所用滤膜相符并具有透过滤膜的过滤能力。

## 7 设备和玻璃仪器

### 7.1 通则

使用下列方法的一种,对所有的玻璃仪器和能接触到培养基和试剂或样品的部分设备(除了无菌的)进行灭菌:

——湿热灭菌法,用高压蒸汽灭菌锅;

——干热灭菌法,用干热灭菌器。

### 7.2 常用微生物试验设备及特殊设备

#### 7.2.1 灭菌设备

对于湿热灭菌法,高压灭菌锅在 $(121\pm3)^{\circ}\text{C}$ 下最短保留时间为15 min。

对于干热灭菌法,干热灭菌器在 $(180\pm5)^{\circ}\text{C}$ 下最短保留时间为30 min,或在 $(170\pm5)^{\circ}\text{C}$ 下最短保留时间为1 h,或在 $(160\pm5)^{\circ}\text{C}$ 下最短保留时间为2 h。

#### 7.2.2 水浴锅

能控制在 $(20\pm1)^{\circ}\text{C}$ 、 $(45\pm1)^{\circ}\text{C}$ (用以保持溶化的TSA可倾注于平皿)以及增加的试验温度 $\pm1^{\circ}\text{C}$ 。

#### 7.2.3 培养箱

能控制在 $(36\pm1)^{\circ}\text{C}$ 或 $(37\pm1)^{\circ}\text{C}$ 。

#### 7.2.4 pH计

$(20\pm1)^{\circ}\text{C}$ 下,精度为0.1 pH。

注:使用穿孔电极或膜电极测量琼脂培养基的pH。

#### 7.2.5 秒表

#### 7.2.6 涡流搅拌器

电动搅拌器或机械振动器。

#### 7.2.7 过滤器

由与待过滤的物质相符的材料组成,应配备容积不小于50 mL的接液器。直径为47 mm~50 mm,孔径为0.45 $\mu\text{m}$ 。

能提供稳定的过滤流量,在20 s~40 s得到100 mL过滤液,使微生物均匀分布在膜上。

#### 7.2.8 冰箱

能控制在 $2^{\circ}\text{C}$ ~ $8^{\circ}\text{C}$ 。

#### 7.2.9 吸管

0.1 mL、1 mL和10 mL,或带有刻度的自动吸管或数字可调移液器及配套用一次性塑料吸头。

#### 7.2.10 培养皿

直径为90 mm~100 mm,带盖。

#### 7.2.11 玻璃珠

粒径3 mm~4 mm。

#### 7.2.12 容器

试管或适当容量的烧瓶、容量瓶、锥形瓶。

## 8 试验菌悬液与试样溶液的制备

### 8.1 试验菌悬液

#### 8.1.1 总则

对于每种试验菌,应制备两种不同的悬液:用于试验的“试验菌悬液”,用于控制和方法验证的“验证菌悬液”。

### 8.1.2 试验菌的保藏与母代培养物

制备试验菌及其母代培养物，应符合微生物保藏传代要求。

### 8.1.3 试验菌的工作培养物

为制备试验菌的工作培养物，将源于母代培养物接种于 TSA 斜面或平皿，并培养得到第 1 代培养物。18 h~24 h 后，用同样的方法由第 1 代培养物制备第 2 代培养物，并培养 18 h~24 h。以同样的方法，由第 2 代培养物制备第 3 代培养物。第 2 代和第 3 代培养物为工作培养物。

若在特定时间未得到第 2 代培养物，在随后的传代中可采用 48 h 的培养物，即将次培养物保留在培养箱 48 h。

对于增加的菌种，在试验报告中应注明任何相对于培养细菌或制备悬浮液的方法所存在的偏差，并给出理由。

### 8.1.4 试验菌悬液 ( $N$ )

取 10 mL 稀释剂，置于含适量玻璃珠的 100 mL 锥形瓶内，用接种环取数环工作培养菌至稀释剂中。接种环在锥形瓶壁与液面接触处涂抹以便移出菌，使细菌分散在稀释剂中。用机械振荡器振摇锥形瓶 3 min。吸取锥形瓶中的悬液，移至另一试管。用稀释液调整悬液中菌数为  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL~ $5 \times 10^8$  CFU/mL，用任一适用的方法估测其菌落数。保持悬液恒温于试验温度 ( $\theta \pm 1$ ) 的水浴锅中，并于 2 h 内使用。

用分光光度计调整菌落数（波长约 620 nm，口径长为 10 mm 的比色管）。每一实验室应对每一种试验菌进行数据校准，从而得到适合的光密度值，一般在 0.150 与 0.460 之间找到合适的数值，也可选择细菌浊度仪调整菌液浓度。

为便于计数，用稀释剂制备  $10^{-6}$  和  $10^{-7}$  试验菌悬液稀释液，混匀。分取每种稀释液 1.0 mL 的样品，一式两份，采用倾注平板法或者涂布平板法进行培养。

使用倾注平板法时，将每份 1.0 mL 样品移入不同的培养皿，并加入 15 mL~20 mL 冷却至  $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$  的 TSA。

使用涂布平板法时，将每份 1.0 mL 样品涂布于 TSA 平板（至少两个）表面培养与计数。

### 8.1.5 验证菌悬液 ( $N_v$ )

用稀释剂稀释试验菌悬液，以制备验证菌悬液，得到菌数为  $3.0 \times 10^2$  CFU/mL~ $1.6 \times 10^3$  CFU/mL。

为便于计数，用稀释剂制备  $10^{-1}$  稀释液，混匀。分取 1.0 mL 样品，采用倾注平板法或涂布平板法进行培养与计数。

### 8.1.6 试验菌悬液和验证菌悬液的培养与计数

置于  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  培养箱内培养  $(48 \pm 2)$  h，计数。记录每一平皿的确切菌落数，但若计数高于 330，则记录 >330，确定  $V_C$  值。

应用所给方法，计算试验菌悬液 ( $N$ ) 及验证菌悬液 ( $N_v$ ) 的菌落数。

## 8.2 试样溶液

试样溶液的浓度应是所需试验浓度的 1.25 倍，因为在试验及验证期间，试样溶液会被稀释至 80%。用水配制试样溶液，至少 3 个不同浓度，其中包括活性范围的浓度和非活性范围的浓度。

对于固体产品，应溶解得到所需产品，至少称取  $1.0 \text{ g} \pm 10 \text{ mg}$  产品于容量瓶中，用水稀释。在容量瓶中，以体积比的形式用水制备随后的稀释液（较低的浓度）。

对于液体产品，在容量瓶中，以体积比的形式用水制备产品稀释液。

现配试样溶液，并于 2 h 内用于试验。应得到物理上均相的制剂，其在整个程序中应是稳定的。若在执行程序期间，因深沉积物或絮状物的形成而出现可视的非均相现象，则应在试验报告中注明。

注：对沉淀物或絮状物中的微生物进行计数困难且不可靠。

在试验报告中，产品浓度应是试验所需浓度。以质量体积比或体积比形式报告试验浓度。

## 9 评价产品杀细菌活性的程序

### 9.1 常规要求

#### 9.1.1 试验条件

除了作用温度、作用时间和试验菌之外，可能需选择增加的试验条件如下：

##### a) 作用温度（以℃表示）

必需测试温度为 20℃；

增加的温度可从 4℃、10℃或 40℃中选择；

每一所选温度允许偏离的范围为±1℃。

##### b) 作用时间（以 min 表示）

必需测试时间为 5 min；

增加的作用时间可从 1 min、15 min、30 min 或 60 min 中选择，也可根据产品的实际使用情况选择测试时间；

每一所选作用时间允许偏离的范围为±10 s（1 min 允许偏差为±5 s）。

##### c) 试验菌种

必需试验菌为大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌；

可测试增加的菌种。

#### 9.1.2 试验方法的选择

所选方法为稀释-中和法时应确定合适的中和剂，使用一种中和剂进行稀释-中和法的证实试验，其中可根据试验经验和已公布的数据选择中和剂。

若该中和剂未被证实，则在稀释液或 0.002 5 mol/L 磷酸盐缓冲液中用选择范畴中的中和剂重复证实试验，其中可用中和剂包括以下组合，即 30 g/L 的吐温 80 g/L、30 g/L 的皂角苷、1 g/L 的 L-组氨酸、3 g/L 的卵磷脂、5 g/L 的硫代硫酸钠。

若两种中和剂均未被证实，可采用膜过滤法代替稀释-中和法。

注：特殊情况下，有必要将 TSA 中加入中和剂。

#### 9.1.3 证实与控制程序的通用说明

对每一种所用的试验菌及每一试验条件（作用温度、作用时间），执行控制与证实产品的杀菌或抑菌活性被中和或去除试验时，仅对试样的最高浓度进行试验。同时对试验用的中和剂或用于试验的洗液进行这些步骤（试验的条件控制、中和剂和过滤控制及方法证实）。若由于中和作用的问题，而需将用于证实与控制程序的中和剂加入 TSA，则用于试验的 TSA 也应包含等量的该中和剂。

#### 9.1.4 平衡温度

试验前，使用水浴将所有试剂（试样溶液，试验菌悬液，验证菌悬液，稀释剂，水）平衡到试验温度。检验所有试剂的温度，使其稳定在试验温度。中和剂、洗液和水应恒温于（20±1）℃。

#### 9.1.5 操作试验菌时的注意事项

加入试验菌悬液或验证菌悬液时，不应接触至试管的上部。

### 9.2 稀释-中和法

#### 9.2.1 常规条件

可同时进行试验和控制以及证实程序。

#### 9.2.2 杀菌试验

移取 1.0 mL 水至试管中，加入 1.0 mL 试验菌悬液，立即开始计时。混匀，并将试管放入水浴中，控制在所选温度，时间 2 min±10 s。

该时间结束后，加入 8.0 mL 试样悬液，立即开始计时。混匀，并将试管放入水浴中，控制在所选温度，至所选作用时间。在作用时间结束前，再次混匀。

该时间结束后,移取 1.0 mL 试验混合物样液 ( $N_a$ ),并移至含 8.0 mL 中和剂和 1.0 mL 水的试管内。混匀,并置于水浴中,恒温在  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。中和  $10 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$  后,立即混匀,分取两份 1.0 mL 已中和的试验混合物样液(包括中和剂、试样溶液、试验菌悬液),采用倾注平板法或涂布平板法进行培养。

使用倾注平板法时,将每份 1.0 mL 样品移入不同的培养皿,并加入 15 mL~20 mL 冷却至  $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$  的 TSA。

使用涂布平板法时,将每份 1.0 mL 样品涂布于 TSA 平板(至少两个)表面培养与计数。

### 9.2.3 试验的条件控制(A)

试验条件的证实。

可在大肠杆菌、铜绿假单胞菌或金黄色葡萄球菌中任选其一进行试验即可。

取 1.0 mL 水至试管中,加入 1.0 mL 验证菌悬液(可在大肠杆菌、铜绿假单胞菌或金黄色葡萄球菌中任选其一进行试验即可),立即开始计时。混匀,置于控制在所选温度的水浴内  $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ 。此时间结束后,加入 8.0 mL 水。开始加水时再次计时,混匀。

计时结束后,取 1.0 mL 混合物样液,一式两份,采用倾注平板法或涂布平板法培养计数。

### 9.2.4 中和剂控制(B)

证实中和剂无毒性。

吸取 8.0 mL 中和剂和 1.0 mL 水至无菌试管内,加入 1.0 mL 验证菌悬液,立即开始计时。混匀,控制在  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$  水浴内  $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ 。恰在作用时间结束前,立即混匀。

作用时间结束时,分取混合物样液 1.0 mL 采用倾注平板法或涂布平板法培养计数。

### 9.2.5 方法证实(C)

证实稀释-中和法。

吸取 1.0 mL 水至无菌试管中,加入 1.0 mL 稀释剂,开始计时。加入 8.0 mL 试验中浓度最高的试样溶液,混匀,移至控制在作用温度的水浴内,作用时间结束前,再次混匀。

作用时间结束后,移取 1.0 mL 的混合物至含 8.0 mL 中和剂的试管内,立即再次计时。混匀,将试管移至  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$  水浴内  $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ 。加入 1.0 mL 验证菌悬液,计时,混匀。将试管移至  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$  水浴内  $(30 \pm 1) \text{ min}$ 。恰在作用时间结束前,再次混匀。作用时间结束时,分取混合物样液 1.0 mL,采用倾注平板法或涂布平板法培养计数。

### 9.2.6 试验混合物以及控制试验和证实试验混合物的培养计数

培养平皿 20 h~24 h,弃除任何不可计数的平皿。做平皿计数,确定菌落形成单位数。再培养平皿 20 h~24 h,不再对不能形成明显分离菌落的平皿计数,对剩下的平皿计数。若菌数增加,只采用较高的数做进一步评价。

记录每一平皿的确切菌落数,但若计数高于 330,则记录>330,并确定  $V_C$  值。

计算试验混合物 ( $N_a$ ) 及证实试验混合物 (A、B 和 C) 的菌落数。

## 9.3 膜过滤法

### 9.3.1 常规条件

平行进行试验、控制和证实程序,并分别对每一试验条件进行该程序。

膜过滤器中配有孔径为  $0.45 \mu\text{m}$  的薄膜,直径为 47 mm~50 mm 漏斗,并装有 50 mL 洗液。试验报告中应记录所需过滤的时间(若特殊情况下多于 1 min)。当将薄膜移至琼脂平皿表面时,注意放置于平板上时应保证试验菌在薄膜的最上边,并且避免将空气引入薄膜与琼脂表面之间。

### 9.3.2 杀菌试验

移取 1.0 mL 水至试管中,加入 1.0 mL 试验菌悬液,立即开始计时。混匀,并将试管放入水浴中,控制在所选温度,时间  $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ 。

该时间结束后,加入 8.0 mL 试样悬液,立即开始计时。混匀,并将试管放入水浴中,控制在所选



温度，至所选作用时间。恰在作用时间结束前，再次混匀。

该时间结束后，移取 1.0 mL 试验混合物样液 ( $N_a$ )，并移至含 8.0 mL 中和剂和 1.0 mL 水的试管内。混匀，并置于水浴中，恒温在  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。中和 10 min  $\pm$  10 s 后，立即混匀。作用时间结束后，移取 0.1 mL 试验混合物样液 ( $N_a$ )，一式两份，并将每份 0.1 mL 样液移至不同的膜过滤器立即过滤。至少用 150 mL 洗液进行过滤，但不应超过 500 mL。若洗液不是水，过滤 50 mL 水完成本步骤。然后将每一薄膜移至不同 TSA 平板表面培养计数。

### 9.3.3 试验的条件控制 (A)

试验条件的证实。

可在大肠埃希氏菌或金黄色葡萄球菌或铜绿假单胞菌中任选其一进行试验即可。

移取 1.0 mL 水至试管中，加入 1.0 mL 试验菌悬液，立即开始计时。混匀，并将试管放入水浴中，控制在所选温度，时间 2 min  $\pm$  10 s。

该时间结束后，加入 8.0 mL 试样悬液，立即开始计时。混匀，并将试管放入水浴中，控制在所选温度，至所选作用时间。恰在作用时间结束前，再次混匀。

该作用时间结束后，分别移取 1.0 mL 该混合物“A”样液，并将每份 1.0 mL 样液移至不同的膜过滤器。立即过滤，并加入 50 mL 水。然后将每一薄膜移至不同 TSA 平板表面培养计数。

### 9.3.4 过滤控制 (B)

证实过滤程序。

移取 0.1 mL 验证菌悬液，一式两份，将每份 0.1 mL 样液移入不同膜过滤器内立即过滤。通过洗液过滤，至少用 150 mL 洗液进行过滤，但不应超过 500 mL。若洗液不是水，过滤 50 mL 水完成本步骤，然后将每一薄膜移至不同 TSA 平板表面培养计数。

### 9.3.5 方法证实 (C)

检验膜过滤法，对预先与产品作用的薄膜上的细菌计数。

吸取 1.0 mL 水至无菌试管中，加入 1.0 mL 稀释剂，开始计时。加入 8.0 mL 试验中浓度最高的试样溶液，混匀，移至控制在作用温度的水浴内，作用时间结束前，再次混匀。

作用时间结束后，移取 1.0 mL 的混合物至含 8.0 mL 中和剂的试管内，立即再次计时。混匀，将试管移至  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$  水浴内 5 min  $\pm$  10 s。加入 1.0 mL 验证菌悬液，计时，混匀。将试管移至  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$  水浴内  $(30 \pm 1)$  min。恰在作用时间结束前，再次混匀。

作用时间结束后，移取 0.1 mL 混合物一式两份，并将每份 0.1 mL 样液移入不同膜过滤器内立即过滤。通过洗液过滤，至少用 150 mL 洗液进行过滤，但不应超过 500 mL。然后用 50 mL 洗液覆盖薄膜，加入 0.1 mL 证实试验悬液，再次加入 50 mL 水立即过滤。然后将每一薄膜移至不同 TSA 平板表面培养计数。

### 9.3.6 试验混合物以及控制与证实试验混合物的培养计数

培养平皿 20 h  $\sim$  24 h。弃除任何不可计数的平皿。做平皿计数，确定菌落形成单位数。再培养平皿 20 h  $\sim$  24 h，不再对不能形成明显分离菌落的平皿计数，对剩下的平皿计数。若菌数增加，只采用较高的数做进一步评价。

记录每一平皿的确切菌落数，但若计数高于 165，则记录  $>165$ ，确定  $V_C$  值。

计算试验混合物 ( $N_a$ ) 及证实试验混合物 (A、B 和 C) 的菌落数。

## 10 计算

### 10.1 各参数的计算

#### 10.1.1 $V_C$ 值的确定

对琼脂平板上细菌计数的一般限制在 15 CFU  $\sim$  300 CFU 之间。本标准中，允许有 10% 的偏差，因

此限制范围在 14 CFU~330 CFU 之间。对于膜过滤法，最高限制 150 CFU，允许有 10% 的偏差即为 165 CFU。

样品（1 mL 或 0.1 mL）中计数越小，不稳定性就增强，因此可能导致随后的计算得到错误的结果，最低限制（14）就是以此为依据的。最低限制仅指样品（并不指对一个平皿来计算），例如，三个平皿，每 1 mL 样品分别含 3 CFU、8 CFU 以及 5 CFU，得到  $V_C$  值为 16。

最高限制（330 CFU，165 CFU）反映了所计的总菌落数不准确，以及因营养物质的消耗而生长受到抵制。这仅指对一个平皿计数，而非指样品。

根据含 1 mL 样品的平皿数确定并记录  $V_C$ ，以便计算试验菌悬液  $N$ ，验证菌悬液  $N_V$ ，和稀释-中和法中的所有计数。

若用多于一个含 1 mL 样品的平皿确定  $V_C$  值，则标注每一平皿的计数。

若一个平皿的计数高于 330 CFU，记录为 >330 CFU。若采用多于一个含 1 mL 样品的平皿，且其中至少有一个数高于 330 CFU，则记录  $V_C$  值为“>计数总和”（例如 >330 CFU、310 CFU、302 CFU，记录 >942 CFU）。

若  $V_C$  值小于 14 CFU，记录该数（按照 <14 CFU 计算菌落数）。

对于膜-过滤法，膜上的数为  $V_C$  值。

记录低于最低限制（14 CFU）或高于最高限制（165 CFU）的  $V_C$  值。

除  $N_a$  之外，仅考虑各个计数限制的  $V_C$  值，以进一步计算。

#### 10.1.2 $N$ 与 $N_0$ 的计算

试验菌悬液的两个稀释度，用公式（1）计算出菌落数的加权平均值：

$$N = \frac{C}{(n_1 + 0.1n_2)10^{-6}} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$N$ ——每毫升试验菌悬液所含菌落数，单位为 CFU/mL；

$C$ —— $V_C$  值总和，单位为 CFU；

$n_1$ ——较低稀释度（ $10^{-6}$ ）的  $V_C$  值的个数；

$n_2$ ——较高稀释度（ $10^{-7}$ ）的  $V_C$  值的个数。

将计算的结果采用四舍六入五留双，修约至两位有效数字，用科学计数法表达结果。

示例：

$$N = \frac{168 + 213 + 20 + 25}{(2 + 0.1 \times 2)10^{-6}} = \frac{426}{2.2 \times 10^{-6}} = 1.9363 \times 10^8 = 1.9 \times 10^8 \text{ (CFU/ml)}$$

$N_0$  是每毫升试验混合物在作用时间开始时所含菌落数。

#### 10.1.3 $N_a$ 的计算

$N_a$  是每毫升试验混合物在作用时间结束后，以及中和或膜过滤之前所含的菌落数。

用公式（2）计算  $N_a$ ：

$$N_a = 10c / n \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$N_a$ ——每毫升试验混合物在作用时间结束后，以及中和或膜过滤之前所含的菌落数，单位为 CFU/mL；

$c$ —— $V_C$  值总和，单位为 CFU；

$n$ —— $V_C$  值个数。

若相同条件下的  $V_c$  值中有一个或两个低于最低限制或高于最高限制，以“少于”或“多于”表达其结果。

例如：

a) 平行样  $V_c$  值：2，16

计算结果如下：

$$N_a = \frac{(<14+16) \times 10}{2} = i.e. <150$$

b) 平行样  $V_c$  值（膜过滤法）：>165，>165

计算结果如下：

$$N_a = \frac{(>165+>165) \times 10}{2} = i.e. <1650$$

c) 平行样  $V_c$  值（每 1.0mL 样液的两个涂布平板）：660，600

计算结果如下：

$$N_a = \frac{(>660+600) \times 10}{2} = i.e. <6300$$

#### 10.1.4 $N_v$ 与 $N_0$ 的计算

$N_v$  是每毫升验证菌悬液所含菌落数，用公式（3）计算：

$$N_v = 10c/n \dots\dots\dots (3)$$

式中：

$N_v$ ——每毫升验证菌悬液所含菌落数，单位为 CFU/mL；

$c$ —— $V_c$  值总和，单位为 CFU；

$n$ —— $V_c$  值个数。

$N_0$  是混合物 A、B 与 C 在试验时间开始时每毫升所含菌落数，用公式（4）计算：

$$N_0 = c/n \dots\dots\dots (4)$$

式中：

$N_0$ ——混合物 A、B 与 C 在试验时间开始时每毫升所含菌落数，单位为 CFU/mL；

$c$ —— $V_c$  值总和，单位为 CFU；

$n$ —— $V_c$  值个数。

#### 10.1.5 A、B 与 C 的计算

A、B 与 C 是试验的条件控制（A），中和剂控制或过滤控制（B），以及方法证实（C），在作用时间（A）结束时的每毫升所含菌落数，用公式（5）计算：

$$A、B、C = c/n \dots\dots\dots (5)$$

式中：

A——每毫升条件控制试验混合物所含菌落数，单位为 CFU/mL；

B——每毫升中和或过滤控制试验混合物所含菌落数，单位为 CFU/mL；

C——每毫升方法证实试验混合物所含菌落数，单位为 CFU/mL；

$c$ —— $V_c$  值总和，单位为 CFU；

$n$ —— $V_c$  值个数。

## 10.2 方法学的证实

### 10.2.1 加权平均数的控制

通过两个连续稀释度的加权平均数计算结果，两个结果的平均值之商不能高于 15，且不能低于 5。将低于最低限制的结果作为最低限制数（14 CFU）。将高于各个最高限制的结果作为最高限制数。

例：N： $10^{-6}$  稀释度：168+215 CFU/mL， $10^{-7}$  稀释度：20+<14 CFU/mL； $(168+215)/(20+14)=383/34=11$ ，其商在 5 与 15 之间。

### 10.2.2 基本范围

对于每种试验菌，要求：

$N$  在  $1.5 \times 10^8$  CFU ~  $5 \times 10^8$  CFU 之间， $(8.17 \leq \lg N \leq 8.70)$ ；

$N_0$  在  $1.5 \times 10^7$  CFU ~  $5 \times 10^7$  CFU 之间， $(7.17 \leq \lg N_0 \leq 7.70)$ ；

$N_{v0}$  在 30CFU ~ 160CFU 之间， $(3.0 \times 10^1 \text{ CFU} \sim 1.6 \times 10^2 \text{ CFU})$ ；

$A$ 、 $B$ 、 $C$  等于或大于  $0.5 \times N_{v0}$ ；

加权平均数的控制：商不能低于 5，且不能大于 15。

## 10.3 结果与准确性的表达

### 10.3.1 减少量

减少量（ $R = N_0 / N_a$ ）用对数表达。

对于每种试验菌，记录试验菌悬液的菌落数，以及试验后的菌落数。

在每一产品浓度及每一试验条件下，用公式（6）分别计算并记录对数值减少量（lg）：

$$\lg R = \lg N_0 - \lg N_a \dots\dots\dots (6)$$

式中：

$\lg R$ ——实验前后菌落对数值的减少量；

$\lg N_0$ ——实验前菌落的对数值；

$\lg N_a$ ——实验后菌落的对数值。

稀释-中和法与膜过滤法中的控制与证实试验，记录  $N_{v0}$ 、 $A$ 、 $B$  与  $C$  的结果及其与  $N_{v0}$  的比较。

### 10.3.2 活性与非活性试样溶液的控制

每次试验，至少有一个浓度可减少 5 个对数值或更多，以及至少有一个浓度减少量应少于 5 个对数值。

### 10.3.3 试验菌及细菌浓度限制

对于每种试验菌，记录通过试验（ $\lg R \geq 5$ ）的产品的最低浓度。（该浓度对于样品来说，在所选试验条件下能最可靠的反映产品的特性）。

### 10.3.4 精密度，重复性

以研究的数据为依据，进行统计分析确定方法的精密度，重复试验（重复 6 次，减少量需精确到  $\pm 1$ ）。也可根据所要求的精确度，确定重复试验的次数。

重复试验意味着独立制备试验菌悬液以及验证菌悬液，并进行试验程序。

## 10.4 结果说明-结论

在要求的试验条件下以及当试验菌是铜绿假单胞菌、大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌时，已经证明了细菌的生存能力会降低  $10^5$  或更多（ $\lg R \geq 5$ ），其中试验条件为：5 min  $\pm$  10 s、 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$  和洁净条件或污染条件，说明试验产品在该试验浓度下具有杀细菌活性。

## 11 试验报告

试验报告应至少说明以下的信息：

- a) 鉴定试验室级别；
- b) 样品识别：
  - 产品名称；
  - 批号；
  - 生产商；
  - 收样时间；
  - 储存条件；
  - 采用制造商对产品稀释剂的使用方法；
  - 活性物及其浓度（可选择）。
- c) 试验方法及其证实：
  - 使用稀释-中和法，应详尽说明中和剂的证实试验；
  - 使用膜过滤法，应详尽说明检验膜过滤法应用的步骤。
- d) 试验条件：
  - 分析时间；
  - 试验期间使用的产品稀释剂；
  - 产品试验浓度；
  - 作用时间（s）；
  - 试验温度（℃）；
  - 干扰物；
  - 混合物（硬水稀释的干扰物和产品）的稳定性；
  - 培养温度；
  - 中和剂或洗液；
  - 识别所用菌种。
- e) 试验结果：
  - 证实试验；
  - 杀细菌活性的评价。
- f) 结论；
- g) 地点，日期和确认签字。

附录 A  
(规范性附录)

稀释-中和和膜过滤方法的证实

A.1 方法提要

依据 A.4.1 稀释-中合法, 选择中和剂。若找不到合适的中和剂, 可使用膜过滤法。

A.2 菌悬液的制备

制备菌悬液, 用稀释剂稀释试验菌悬液, 得到菌数为  $6 \times 10^2$  CFU/mL  $\sim 3 \times 10^3$  CFU/mL。

用稀释剂制备  $10^{-1}$  稀释液, 以便做悬液计数。混匀。取  $10^{-1}$  稀释液 1.0 mL 样液两份, 并将每一份 1.0 mL 的样品转移至不同的培养皿内, 加入 15 mL  $\sim$  20 mL 冷却至  $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$  的溶化 TSA, 于  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  [或  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ] 下培养平皿 24 h。弃去任何不可计数的平皿, 做平皿计数, 确定每一平皿的菌落形成单位数。再培养平皿 24 h。不对不再显示出明显分离菌落的平皿进行计数。对剩下的平皿再次计数。确定每一平皿的最高菌落数。计算试验悬液的菌落数 ( $N_v$ ) (稀释因子为  $10^{-1}$  和体积为 1 mL)。

A.3 产品试样溶液的制备

配制的产品试样溶液浓度为其实际使用浓度的 1.25 倍。

A.4 证实试验

A.4.1 稀释-中和法

对每一选择的试验条件 (菌种、干扰物、温度、作用时间) 都要按如下程序进行操作。

试验前, 于控制在  $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$  的水浴锅中, 将所有试剂 (产品试样溶液、稀释剂、菌悬液、干扰物、中和剂、硬水) 恒温至试验温度  $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

a) 试验条件的证实:

取 1.0 mL 所选干扰物和 1.0 mL 按 A.2 配制的含  $6 \times 10^2$  CFU/mL  $\sim 3 \times 10^3$  CFU/mL 的菌悬液, 置于无菌试管内。混匀, 并于  $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$  水浴锅内保持  $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$  的时间, 之后, 加入 8.0 mL 硬水。开始加硬水时立即计时, 混匀, 于恒温在  $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$  的水浴锅内保持  $t \pm 10 \text{ s}$  的时间, 之后立即混匀, 取两份 1.0 mL 的混合物样液, 移至不同的培养皿内, 加入 15 mL  $\sim$  20 mL 冷却至  $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$  的 TSA, 于  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  [或  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ] 下培养平皿 24 h。弃去不可计数的平皿, 做平皿计数, 确定每一平皿的菌落形成单位数。再培养平皿 24 h, 确定每一平皿的最高菌落数, 应用所给出的方法计算菌落数。

b) 中和试剂的毒性检验:

将 8.0 mL 中和试剂和 1.0 mL 水置于无菌试管内, 加入 A.2 制备的含  $6 \times 10^2$  CFU/mL  $\sim 3 \times 10^3$  CFU/mL 菌悬液 1.0 mL。开始加悬液时计时, 混匀, 于  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$  水浴锅内保持  $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$  之后立即混匀, 取两份 1.0 mL 样品混合物样液, 转移至不同的培养皿内。加入 15 mL  $\sim$  20 mL 冷却至  $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$  的 TSA。于  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  [或  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ] 下培养平皿 24 h。弃去不可计数的平皿, 做平皿计数, 确定每一平皿的菌落形成单位数。再培养平皿 24 h, 确定每一平皿的最高菌落数, 应用所给出的方法计算菌落数。

c) 稀释-中和法的证实:

置 1.0 mL 干扰物于无菌试管内, 加入 1.0 mL 稀释剂。然后加入 A.3 配制的产品稀释液 8.0 mL, 同时开始计时。于  $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$  水浴锅内保持  $(t \pm 10) \text{ s}$  的时间。之后立即混匀, 取 1.0 mL 的混合物移至含 8.0 mL 中和剂的试管内, 水浴锅内保持  $10 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ , 之后加入按照 A.2 所配制的含  $6 \times 10^2$  CFU/mL  $\sim 3 \times 10^3$  CFU/mL 菌悬液 1.0 mL。加菌悬液时就开始计时, 混匀, 于  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$  水浴锅内保持  $(30 \pm 1) \text{ min}$  之后立即混匀, 分取两份 1.0 mL 样品混合物移至不同的培养皿内。加入 15 mL  $\sim$  20 mL

冷却至  $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$  的 TSA，于  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  [或  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ] 下培养平皿 24 h。弃去不可计数的平皿，做平皿计数，确定每一平皿的菌落形成单位数。再培养平皿 24 h，确定每一平皿的最高菌落数，应用所给出的方法计算菌落数。

#### A.4.2 膜过滤法

对每一试验条件（菌种、干扰物、稀释剂、作用时间、温度）都要按如下程序进行操作。

试验前，于控制在  $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$  的水浴锅中，将所有试剂（产品试样溶液、稀释剂、菌悬液、干扰物、洗液、硬水）恒温至试验温度  $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

##### a) 试验条件的证实：

取 1.0 mL 所选干扰物和 1.0 mL 按 A.2 配制的含  $6 \times 10^2$  CFU/mL  $\sim 3 \times 10^3$  CFU/mL 的菌悬液，置于无菌试管内。混匀，并于  $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$  水浴锅内保持  $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$  的时间，之后，加入 8.0 mL 硬水。开始加硬水时立即计时，混匀，于恒温在  $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$  的水浴锅内保持  $(t \pm 10) \text{ s}$  的时间，之后立即混匀，取两份 1.0 mL 的混合物样液，分别将样液移至不同的带有薄膜和含 50 mL 洗液的膜过滤器内，过滤，并用 50 mL 水清洗，然后将薄膜移至两个不同的 TSA 平板表面，当将薄膜置于 TSA 平板上时，要避免将空气引入薄膜和琼脂表面之间。于  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  [或  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ] 下培养平皿 24 h，弃去不可计数的平皿，做平皿计数，确定每一平皿的菌落形成单位数。再培养平皿 24 h，确定每一平皿的最高菌落数，应用所给出的方法计算菌落数。

##### b) 过滤程序的证实：

取 A.2 配制的含  $6 \times 10^2$  CFU/mL  $\sim 3 \times 10^3$  CFU/mL 样品菌悬液 1.0 mL，一式两份。并将每份样品移至不同的带有薄膜和含 50 mL 洗液的膜过滤器内，过滤，并用 50 mL 水清洗，然后将薄膜移至两个不同的 TSA 平板表面，当将薄膜置于 TSA 平板上时，应避免将空气引入薄膜和琼脂表面之间。于  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  [或  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ] 下培养平皿 24 h，弃去不可计数的平皿，做平皿计数，确定每一平皿的菌落形成单位数。再培养平皿 24 h，确定每一平皿的最高菌落数，应用所给出的方法计算菌落数。

##### c) 膜过滤法的证实：

取 1.0 mL 干扰物于无菌试管内，加入 1.0 mL 稀释剂，开始计时，同时加入 A.3 配制的产品稀释液 8.0 mL，混匀。于  $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$  水浴锅内保持  $t \pm 10 \text{ s}$  后立即混匀，分别吸取两份 1.0 mL 的样品混合物，并将每份样品移至不同的带有薄膜和含 50 mL 洗液的膜过滤器内，过滤，用至少 150 mL 但不多于 500 mL 的洗液清洗薄膜，然后用 50 mL 洗液覆盖薄膜，加入按 A.2 配制的含  $6 \times 10^2$  CFU/mL  $\sim 3 \times 10^3$  CFU/mL 菌悬液 0.1 mL，过滤，用 50 mL 水清洗，并将薄膜移至两个不同的 TSA 平皿的表面，当将薄膜置于 TSA 平板上时，应避免将空气引入薄膜和琼脂表面之间。于  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  [或  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ] 下培养平皿 24 h，弃去不可计数的平皿，做平皿计数，确定每一平皿的菌落形成单位数。再培养平皿 24 h，确定每一平皿的最高菌落数，应用所给出的方法计算菌落数。

附录 B  
(资料性附录)  
中和试剂

中和试剂

试验时可能会用到以下中和剂：

- 0.25 mol/L 磷酸盐缓冲液；
- 含 3 g/L 的卵磷脂；30 g/L 的吐温 80；5 g/L 的硫代硫酸钠；1 g/L 的 L-组氨酸；30 g/L 的皂角苷的 0.002 5 mol/L 磷酸盐缓冲液；
- 稀释至 5%（体积分数）或 0.5%（体积分数）的新鲜蛋黄；
- 含 30 g/L 的吐温 80；4 g/L 的月桂基硫酸钠；3 g/L 的卵磷脂的 0.002 5 mol/L 磷酸盐缓冲液；
- 含 5%（体积分数）的新鲜蛋黄；40 g/L 的吐温 80 的 0.002 5 mol/L 磷酸盐缓冲液；
- 含 7%（体积分数）的脂肪醇环氧乙烷缩合物；20 g/L 的卵磷脂；4%（体积分数）的吐温 80 的 0.002 5 mol/L 磷酸盐缓冲液；
- 含 4%（体积分数）的脂肪醇环氧乙烷缩合物；4 g/L 的卵磷脂的 0.002 5 mol/L 磷酸盐缓冲液；
- 含 30 g/L 的吐温 80；3 g/L 的卵磷脂；1 g/L 的 L-组氨酸的 0.002 5 mol/L 磷酸盐缓冲液；
- 甘氨酸，使产品缩合的作用；
- 含 30 g/L 的吐温 80；3 g/L 的卵磷脂的 0.002 5 mol/L 磷酸盐缓冲液；
- 50 mg/mL 的磷脂乳液；
- 含 0.5 g/L 或 5 g/L 的硫代硫酸钠的 0.002 5 mol/L 磷酸盐缓冲液；
- 含 0.8 g/L 或 1.5 g/L 的 L-组氨酸的 0.002 5 mol/L 磷酸盐缓冲液；
- 含 0.075%（体积分数）碘美拉酸（用 NaOH 调 pH 至 7）；
- 含 5 g/L 的硫代硫酸钠的 0.002 5 mol/L 磷酸盐缓冲液；
- 过氧化氢酶或过氧化酶
- 含 30 g/L 的吐温 80；30 g/L 的皂角苷；1 g/L 的 L-组氨酸；1 g/L 的半胱氨酸的 0.002 5 mol/L 磷酸盐缓冲液。

中和剂不限于以上种类，只要能够满足试验要求即可使用。



附 录 C  
(资料性附录)  
洗 液

C.1 常用洗液

洗液可以是下列任一种：

- 水；
- 稀释剂；
- 0.1%（体积分数）的吐温 80 水溶液；
- 0.5%（体积分数）的吐温 80 水溶液；
- 0.5%（体积分数）的吐温 80 和 0.7 g/L 的卵磷脂水溶液；
- 中和试剂；
- 缓冲溶液。

也可使用满足试验要求的其他洗液。

C.2 中和洗液

为了更准确计数，琼脂中可加入以下浓度的中和试剂：

- 含 0.7 g/L 的卵磷脂和 5%（质量分数）的吐温 80 的 10%（体积分数）水溶液；
  - 含 10 g/L 的卵磷脂和 5%（质量分数）的吐温 80 的 10%（体积分数）水溶液；
  - 含 1.5%（体积分数）的新鲜蛋黄和 5%（质量分数）的吐温 80 的 10%（体积分数）水溶液。
-

中 华 人 民 共 和 国  
轻 工 行 业 标 准  
化学消毒剂与杀菌剂  
基本消毒活性 试验方法和要求  
QB/T 5482—2020

\*

中国轻工业出版社出版发行  
地址：北京东长安街6号  
邮政编码：100740  
发行电话：(010)65241695  
网址：<http://www.chlip.com.cn>  
Email：[club@chlip.com.cn](mailto:club@chlip.com.cn)

轻工业标准化编辑出版委员会编辑  
地址：北京西城区月坛北小街6号院  
邮政编码：100037  
电话：(010)68049923

\*

版权所有 侵权必究  
书号：155019·5517

印数：1—200册 定价：38.00元