

ICS 71.100.40

分类号: Y43

QB

中华人民共和国轻工行业标准

QB/T 5485—2020

食品及家庭用消毒剂、杀菌剂性能的 杀真菌活性评估试验

Test for the evaluation of basic fungicidal activity of chemical disinfectants and
antiseptics used in food and domestic

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消毒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[国家洗涤用品质量监督检验中心（太原）]、苏州世谱检测技术有限公司、表面活性剂和洗涤剂行业生产力促进中心。

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。

食品及家庭用消毒剂、杀菌剂性能的杀真菌活性评估试验

1 范围

本标准规定了一种检验食品及家庭用消毒剂、杀菌剂产品杀真菌活性的试验方法。

本标准适用于评价试样原样或用水稀释可形成均匀的、物理上稳定的食品及家庭用消毒剂、杀菌剂的杀真菌活性试验。

本标准至少适用于以下领域的产品：

a) 生产加工、分装过程和零售领域

奶和奶制品、肉和肉制品、海鲜和相关产品、蛋和蛋制品、动物饲料、饮料、水果蔬菜及其衍生物（包括糖、酒等）、面粉磨粉和烘焙物、动物饲料。

b) 公共区域和家庭领域

餐饮企业、公共场所、公共交通、学校、托儿所、商店、体育室、废物容器（垃圾桶等）、宾馆、居民住所、医院临床上的非敏感区域、办公室。

c) 其他行业领域

包装材料、生物技术（酵母、蛋白质、酶等）、制药学、化妆品和化妆品用具、织物、航天工业、计算机行业。

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 分析试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

下列定义适用于本文件。

3.1

杀真菌活性 fungicidal activity

在设定条件下使相关试验菌（酵母菌和霉菌孢子）的活菌细胞数降低的能力。

3.2

洁净条件 clean conditions

表面经过符合要求的清洁程序，并经确认后表面包含有最低水平的有机和/或无机物残留。

3.3

污染条件 dirty conditions

表面可能或包括有机和/或无机物残留。

4 方法提要

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

5 材料与试剂

5.1 试验菌

用以下两种菌体来评价杀真菌活性：

——白色念珠菌 ATCC 10231；

——黑曲霉菌 ATCC 16404。

若对特殊用途另有要求，可增选以下菌种：

——酿酒酵母 ATCC 9763；

——酿酒酵母（单倍体） DSM 70487。

5.2 培养基和试剂

5.2.1 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。

为了提高真菌繁殖能力，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。

5.2.2 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，则不必提前进行高压蒸汽灭菌。

注 2：亦可使用注射制剂用水。

5.2.3 麦芽浸粉琼脂（MEA）

麦芽浸粉琼脂，由以下成分组成：

麦芽浸粉 30.0 g

大豆蛋白胨 3.0 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 5.6 ± 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 MEA。

5.2.4 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 ± 0.2 。

5.2.5 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 中可以找到对一些试样适合的中和剂。

5.2.6 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。

注：在附录 C 中可以找到对一些产品适合的洗液相关信息。

5.2.7 硬水（用于产品稀释）

溶液 A：溶解 19.84 g 无水 MgCl_2 和 46.24 g 无水 CaCl_2 于水中，稀释至 1 000 mL。该溶液应在 4 °C～8 °C 下保存，最长保留时间为 1 个月。

溶液 B：溶解 35.02 g NaHCO_3 于水中，稀释至 1 000 mL。该溶液应在 4 °C～8 °C 下保存，最长保留时间为一个星期。

加 600 mL 水至含 6.0 mL 溶液 A 的 1 000 mL 容量瓶中，然后再加入 8.0 mL 溶液 B，用水稀释至 1 000 mL。在 (20 ± 1) °C 条件下，pH 应为 7.0 ± 0.2 。必要时可以用 1 mol/L 的 NaOH 和 1 mol/L 的 HCl 调节。

硬水应在无菌环境下配置，使用有效孔径不超过 0.45 μm 的过滤器过滤，并在 12 h 内使用。

5.2.8 干扰物

5.2.8.1 常规干扰物

离子组分（pH、钙镁硬度）和化学组分（矿物质、蛋白质、糖类、脂质类、洗涤剂等）均应全部定量。

根据产品规定的使用条件选择干扰物。干扰物应是无菌的，在试验中应配制 10 倍于其最后使用浓度的干扰物。在试验报告中应注明配制和消毒的方法以及组分。

5.2.8.2 牛血清白蛋白溶液

5.2.8.2.1 用于洁净环境

溶解牛血清白蛋白 0.30 g 于 100 mL 的水中，通过膜过滤法除菌，最终测试时的牛血清白蛋白浓度为 0.3 g/L。

5.2.8.2.2 用于污染环境

溶解牛血清白蛋白 3.00 g 于 100 mL 的水中，通过膜过滤法灭菌，最终测试时的牛血清白蛋白浓度为 3 g/L。

5.2.8.3 乳液（乳品店、牛奶工业等）

由 100 g 确保无抗生素或添加剂的脱脂奶粉，加 1 L 水溶解而成的复原乳溶液，制备如下：

在水中配制体积分数为 10.0 % 的复原乳溶液，于 (105 ± 3) °C 下灭菌 30 min 或 (121 ± 3) °C 下灭菌 5 min，得到的复原乳溶液最终浓度为 1.0 %（体积分数）。

5.2.8.4 酵母提取物（酿酒厂）

酵母提取物，制备如下：

配制 100 g/L 水溶液，用氢氧化钠调 pH 至 7.0 ± 0.2 ，于高压灭菌锅内灭菌。最终使用的酵母提取物浓度为 10 g/L。

5.2.8.5 蔗糖（饮料，不含酒精的饮料行业）

配制 100 g/L 蔗糖水溶液，然后用膜过滤法灭菌。最终使用的蔗糖浓度为 10 g/L。

5.2.8.6 pH 为 5.0 和 pH 为 9.0 的缓冲溶液（原位清洗）

在试验报告中应描述所使用的缓冲溶液及其 pH。测试中最终的 pH 应为 5.0 ± 0.2 或 9.0 ± 0.2 。

5.2.8.7 月桂基硫酸钠（化妆品工业）

配制 50 g/L 的月桂基硫酸钠水溶液，经高压灭菌锅灭菌。最终使用的月桂基硫酸钠浓度为 5 g/L。

6 设备和玻璃用品

6.1 常用的微生物试验设备及特殊设备

6.1.1 灭菌设备

对于湿热灭菌法，高压灭菌锅在 (121 ± 3) °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 ± 5) °C 下最短保留时间为 30 min，或在 (170 ± 5) °C 下最短

保留时间为 1 h，或在 $(160 \pm 5)^\circ\text{C}$ 下最短保留时间为 2 h。

6.1.2 水浴锅

能控制在 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、 $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ （用以保持溶化的 MEA 可倾注于平皿）以及增加的试验温度 $\pm 1^\circ\text{C}$ 。

6.1.3 培养箱

能控制在 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

6.1.4 pH 计

$(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 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。

6.1.5 秒表

6.1.6 涡流搅拌器

电动搅拌器或机械振动器。

6.1.7 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 μm 。

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。

6.1.8 冰箱

能控制在 2°C ~ 8°C 。

6.1.9 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。

6.1.10 培养皿

直径为 90 mm~100 mm，带盖。

6.2 玻璃用品

6.2.1 玻璃珠

粒径 3 mm~4 mm。

6.2.2 容器

试管或适当容量的烧瓶、容量瓶、锥形瓶。

7 真菌悬液和试验溶液的制备

7.1 真菌悬液

7.1.1 试验用菌的肉汤培养基

肉汤培养基应符合所用菌种的培养条件。

7.1.2 试验生物体的工作培养物

为制备白色念珠菌试验菌种的工作培养物，将源于母代的培养物接种于 MEA 斜面或平皿，于 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养得到第 1 代培养物，42 h~48 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 42 h~48 h。以同样的方法，由第 2 代培养物可制备第 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 72 h 的培养物，即将第一代培养物保留在培养箱内 72 h。

对黑曲霉菌仅使用将源于母代培养物接种于 MEA 斜面或平皿上 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 9 到 11 天的第 1 代培养物。

对于增加的菌种，在试验报告中应注明任何相对于培养真菌或制备真菌悬浮液所存在的偏差，并给

出理由。

7.1.3 试验菌悬液

7.1.3.1 白色念珠菌

白色念珠菌菌悬液制备过程如下：

取 10 mL 稀释剂，置于含适量玻璃珠的 100 mL 锥形瓶内。使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种，使真菌分散在稀释剂中。用机械振荡器振摇锥形瓶 3 min。吸取锥形瓶中的菌悬液，并移至另一试管。

用稀释液调整菌悬液中菌数为 1.5×10^7 CFU/mL \sim 5.0×10^7 CFU/mL，用任一适用的方法估测其 CFU/mL 数。保持菌悬液恒温于试验温度 θ 的水浴锅中，并于 2 h 内使用。对于食品及家庭用清洁产品，则调整菌悬液浓度为 1.5×10^5 CFU/mL \sim 5×10^5 CFU/mL，用稀释剂制备试验悬液的 10^{-3} 和 10^{-4} 稀释液，做试验菌悬液计数。

用分光光度计调整细菌数（波长约 620 nm，口径长为 10 mm 的比色管）。因此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。也可选用细菌浊度仪调整菌液浓度。

为便于计数，用稀释剂制备 10^{-5} 和 10^{-6} 试验悬液稀释液，混匀。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回算菌量。

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 \sim 20 mL 冷却至 $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的 MEA。

使用涂布平板法时，将每份 1.0 mL 样品均匀涂布于适当数量（至少两个）含 MEA 的干燥平皿表面培养与计数。

7.1.3.2 黑曲霉菌

黑曲霉菌菌悬液制备如下：

用玻璃棒或刮刀取培养的黑曲霉菌到含适量玻璃珠的 100 mL 锥形瓶（内含 0.05 % 聚山梨醇酯 80 10mL 的水溶液）内，用手轻摇 1 min，然后用振荡器震荡。

用 400 倍显微镜观察菌液中是否有菌丝片段和发芽的孢子，若出现出芽孢子，则此菌悬液不可用。若仅出现菌丝，转移悬液到离心管中，在离心机中以 2 000 r/min 离心 20 min，用稀释剂至少洗涤离心两次，若仍有菌丝，则重复洗涤至无菌丝。

用稀释液调整悬液中菌数为 1.5×10^7 CFU/mL \sim 5.0×10^7 CFU/mL，用任一适用的方法估测其 CFU 数。保持悬液恒温于试验温度的水浴锅中，并于 4 h 内使用。该菌悬液可以在冰箱中保存 2 d，再次使用前应检查有无孢子。

7.1.4 试验菌悬液计数

制备 10^{-5} 和 10^{-6} 的稀释液，分取 1.0 mL 接种于平皿内，加入 15 mL \sim 20 mL 冷却至 $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的 MEA 培养计数。若食品及家庭清洁产品，则制备 10^{-3} 和 10^{-4} 的稀释液。

白色念珠菌在 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 48 h，必要时延长至 72 h，计数。

黑曲霉菌在 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养平皿 42 h \sim 48 h。弃除任何不可计数的平皿。做平皿计数，确定形成菌落数。对黑曲霉菌需再培养平皿 42 h \sim 48 h，若菌落数还有增加，再进行 20 h \sim 24 h 培养，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。用给出的方法计算两种试验菌悬液的菌落数 (N)。

7.2 试样溶液

现配试样溶液及其稀释液，并在 60 min 内使用，若产品的稳定性较低，应缩短使用时间。

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。

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。

8 试验步骤

8.1 试验条件的选择

依据产品所考虑的实际应用，进行作用温度、作用时间和干扰物的选择，如下所示：

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 15 min。

增加的作用时间可从 1 min、5 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

对于杀真菌活性试验其试验菌为：白色念珠菌 ATCC 10231 和黑曲霉菌 ATCC 16404。

对于杀酵母菌活性试验其试验菌为：白色念珠菌。

如另有特殊要求的用途，可增选以下菌种，例如：

酿酒酵母 ATCC 9763；

酿酒酵母（单倍体） DSM 70487。

d) 干扰物：

根据实际用途，使用的试验干扰物为 0.3 g/L 的牛血清白蛋白溶液（洁净条件）或 3 g/L 的牛血清白蛋白溶液（污染条件）。

有其他要求的情况下，应根据产品的具体应用领域来选择干扰物。

在试验使用条件下，产品不应形成任何沉淀物。

8.2 评估产品杀真菌效果的试验程序

8.2.1 常规方法

选择的方法是稀释-中和法。采取以下步骤来确定合适的中和剂。使用合适的中和剂进行验证稀释-中和法，其中要根据试验经验和公布数据来选择中和剂。

若该中和剂未被证实，就要在稀释液或 0.0025 g/L 磷酸盐缓冲液中用选择的中和剂来重复证实试验，其中所选中和剂包括 30 g/L 的吐温 80、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。若两种中和剂都未被证实，那么就应用膜过滤法代替稀释-中和法。

应对每一试验菌种和选择的每一试验条件进行验证。

8.2.2 稀释-中和法

8.2.2.1 常规条件

在试验前，于温度控制在 $(\theta \pm 1)$ ℃的水浴锅中，使所有试剂（试验产品溶液、试验菌悬液、干扰物）恒温至测试温度 $(\theta \pm 1)$ ℃。中和剂和水恒温在 (20 ± 1) ℃。

8.2.2.2 产品杀真菌活性的试验步骤

用吸管移取干扰物 1.0 mL 至试管中，加入含 1.5×10^7 CFU/mL~ 5.0×10^7 CFU/mL 的一种试验菌悬液 1.0 mL（对于食品及家庭用清洁产品，加入菌悬液量为 1.5×10^5 CFU/mL~ 5×10^5 CFU/mL。立即开始计时，混匀并将试管放入水浴中， $(\theta \pm 1)$ ℃恒温 2 min±10 s。该时间段结束后，加入其中一种试样溶

液 8.0 mL。再次开始计时，混匀并将试管放入水浴中，恒温在 $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$ 下试验时间 $\pm 10\text{ s}$ 。

注：当加入菌悬液时，注意避免接触到试管壁的上部。

恰在作用时间结束前，混匀，移取试验混合物 1.0 mL 至含中和剂 8.0 mL 和水 1.0 mL 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 $\pm 10\text{ s}$ 后，立即分取两份 1.0 mL 试样中和混合物（中和剂、产品试验溶液、干扰物、试验菌悬液），将每 1.0 mL 样品液移至不同的培养皿中，并迅速加入 15 mL~20 mL 冷却至 $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的 MEA。

在特殊情况下，可将中和剂加入 MEA 中。

8.2.2.3 试验混合物的菌落计数

白色念珠菌在 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 24 h，弃除不可计数的平皿，剩余的平皿计数，确定形成的菌落数。对黑曲霉菌需再培养 20 h~24 h，对不能形成明显分离菌落的平皿不再计数，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，对两种菌，确定每一平皿的最高菌落数 V_c 。应用给出的方法计算试验混合物的菌落数 (N_a)。

8.2.3 膜过滤法

8.2.3.1 常规条件

在试验前，于控制温度在 $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$ 的水浴锅中，使所有试剂（试验产品溶液、试验菌悬液、干扰物）恒温至测试温度 $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$ 。使中和剂和水恒温在 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

8.2.3.2 产品杀真菌活性的试验步骤

移取 1.0 mL 干扰物至试管中，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 $\pm 10\text{ s}$ 。

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 $\pm 10\text{ s}$ 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 MEA 平板表面培养，转移期间，当将薄膜置于 MEA 上时，注意应保证真菌在薄膜的上边，而且应避免将空气引入薄膜和琼脂之间，培养完成后计数。

8.2.3.3 试验混合物 (N_a) 的计数

白色念珠菌培养 42 h~48 h。弃除不可计数的平皿。做平皿计数，确定菌落形成单位数。对黑曲霉菌需再培养平皿 20 h~24 h，若菌落数还有增加，再进行 20 h~24 h 培养，对不能形成明显分离菌落的平皿不进行计数。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。

对两种菌，确定每一平皿的最高菌落数 V_c 。应用所给出的方法计算试验混合物的菌落数 (N_a)。

8.3 稀释-中和法和膜过滤法的证实

按照附录 A，对涉及试验的中和剂或洗液、干扰物、硬水和试验条件来进行验证。

9 计算和结果的表达

9.1 菌落数 (CFU/mL) 的计算

9.1.1 试验菌悬液

试验菌悬液的计数：

只有少于 150 CFU 的平皿的才能用来计算菌落数。至少应有一个平皿包括 15 CFU 或更多菌落；至少应用两个平皿来计算菌落数，其中一个或两个平皿包括多数的菌落，而且两个平皿所含菌落均应少于

150 CFU。若两个稀释度的平皿菌落数都在 15 CFU~150 CFU 范围，就按加权平均数来计算菌落数。若只有一个稀释度的平皿属于该范围，就计算其算术平均数。

用公式（1），计算加权平均数：

$$\bar{N} = \frac{c}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

\bar{N} ——试验菌悬液菌落加权平均数；

c ——所考虑的所有平板上菌落数的总和；

n_1 ——所考虑的第一稀释液的平皿数；

n_2 ——所考虑的第二稀释液的平皿数；

d ——所考虑的与第一稀释液相应的稀释因子。

修约方式为，四舍六入五留双。将计算结果修约至两位有效数字，用科学计数法来表达。

示例：

$$\frac{168 + 215 + 14 + 25}{(2 + 0.1 \times 2)10^{-6}} = \frac{422}{2.2 \times 10^{-6}} \approx 1.9182 \times 10^8 \approx 1.9 \times 10^8 \text{ (CFU/mL)}$$

9.1.2 试验步骤和证实试验菌落计数

每个平皿菌落数少于 150 CFU 才可用来计算菌落数。应使用两个平皿的菌落数来计算。

当至少有一个平皿包括 15 CFU 或更多菌落时，用公式（2）计算菌落数：

$$N_a = \frac{c}{n \times d_1 \times V} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

N_a ——试验混合物的菌落数；

c ——所考虑的所有平板上菌落数的总和；

n ——所考虑的平板数；

d_1 ——与所考虑的稀释液相应的稀释因子；

V ——样品体积。对于稀释-中和法，样品体积为 1.0 mL。对于膜过滤试验，样品体积为 0.1 mL。

当所有计数平板的 CFU 数小于 15，应报告小于 1.5×10^2 CFU/mL ($<1.5 \times 10^2$ CFU/mL) 的试验混合物的活菌数。当所有计数平板的 CFU 大于 300，应报告大于 3×10^3 CFU/mL ($>3 \times 10^3$ CFU/mL) 的试验混合物的活菌数。

9.2 方法证实试验的菌落计数

对于每种试验材料，都要进行方法验证，菌落计数符合：

- N 在 1.5×10^7 CFU/mL~ 5×10^7 CFU/mL 间(对于食品及家庭用清洁产品 N 在 1.5×10^5 CFU/mL~ 5×10^5 CFU/mL 间；
- N_V 在 6×10^2 CFU/mL~ 1.5×10^3 CFU/mL 范围内；
- A 、 B 不小于 N_V 的 0.05 倍；
- C 不小于 B 的 0.5 倍。

其中：

N 是试验菌悬液的菌落数；

N_V 是验证菌悬液的菌落数；
 A 是证实试验条件的菌落数；
 B 是证实中和剂毒性或过滤控制的菌落数；
 C 是证实稀释-中和或过滤试验控制的菌落数。

9.3 结果的表达

对于每一试验菌种，记录试验菌悬液的菌落数（ N ）和试验步骤结束后产品杀真菌活性（ N_a ）的菌落数。

对于中和作用的证实，记录验证菌悬液的菌落数（ N_V ）。

对于稀释-中和法的证实，记录中和剂毒性控制的菌落数（ B ）和稀释中和作用控制的菌落数（ C ）。

对于膜过滤法的证实，记录过滤控制的菌落数（ B ）和过滤试验控制的菌落数（ C ）。

对于每一试验生物体和产品试验浓度的计算，按以下方法记录产品对生物体生存能力的降低程度（ R ）：

$$R = \frac{N \times 10^{-1}}{N_a} \dots\dots\dots (3)$$

10 结论

在要求的试验条件下[作用时间 15 min±10 s、温度（20±1）℃和洁净条件或污染条件，以及试验菌种是白色念珠菌和黑曲霉菌]，真菌的生存能力会降低 104（以菌落数值的减少量 R 计）或更多，说明试验产品在该试验浓度下具有杀真菌活性。

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；
 - 杀真菌活性的评价。
- f) 结论。
- g) 地点，日期和确认签字。

附录 A

(规范性附录)

稀释-中和与膜过滤方法的证实

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 6×10^2 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 MEA，于 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 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

A.4.1.1 概述

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.4.1.2 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 6×10^2 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 MEA，于 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 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.4.1.3 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 6×10^2 CFU/mL $\sim 3 \times 10^3$ CFU/mL 菌悬液 1.0 mL。开始加悬液时就计时，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 MEA。于 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 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.4.1.4 稀释-中和法的证实

取 1.0 mL 干扰物于无菌试管内，加入 1.0 mL 稀释剂。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 6×10^2 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 $30 \text{ min} \pm$

1min 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~20 mL 冷却至 $(45\pm1)^\circ\text{C}$ 的 MEA，于 $(30\pm1)^\circ\text{C}$ 下培养平皿 24 h。弃去不可计数的平皿，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

A. 4. 2. 1 概述

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

试验前，于控制在 $(\theta\pm1)^\circ\text{C}$ 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 $(\theta\pm1)^\circ\text{C}$ 。

A. 4. 2. 2 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 6×10^2 CFU/mL~ 3×10^3 CFU/mL 的菌悬液，置于无菌试管内。混匀，并于 $(\theta\pm1)^\circ\text{C}$ 水浴锅内保持 $2\text{ min}\pm10\text{ s}$ 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 $(\theta\pm1)^\circ\text{C}$ 的水浴锅内保持 $(t\pm10)\text{ s}$ 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 MEA 平板表面，当将薄膜置于 MEA 平板上时，应避免将空气引入薄膜和琼脂表面之间。于 $(\theta\pm1)^\circ\text{C}$ 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. 3 过滤程序的证实

取 A.2 配制的含 6×10^2 CFU/mL~ 3×10^3 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 MEA 平板表面，当将薄膜置于 MEA 平板上时，应避免将空气引入薄膜和琼脂表面之间。于 $(30\pm1)^\circ\text{C}$ 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. 4 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 $(\theta\pm1)^\circ\text{C}$ 水浴锅内保持 $(t\pm10)\text{ s}$ 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 6×10^2 CFU/mL~ 3×10^3 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 MEA 平皿的表面，当将薄膜置于 MEA 平板上时，应避免将空气引入薄膜和琼脂表面之间。于 $(30\pm1)^\circ\text{C}$ 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

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

可选用下列任一种作为常用洗液：

- 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。

也可使用满足实验要求的其他洗液。

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洗液：

- 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。

附 录 D
(资料性附录)
菌种编号代码

引用的菌种:

——白色念珠菌	ATCC 10231;
——黑曲霉菌	ATCC 16404;
——酿酒酵母	ATCC 9763;
——酿酒酵母 (单倍体)	DSM70487。

中 华 人 民 共 和 国
轻 工 行 业 标 准
食品及家庭用消毒剂、杀菌剂性能的
杀真菌活性评估试验
QB/T 5485—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) 85119832/38
网址：<http://www.chlip.com.cn>
Email：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：155019·5520

印数：1—200册 定价：38.00元