

ICS 71.100.40

分类号: Y43

QB

中华人民共和国轻工行业标准

QB/T 5484—2020

食品及家庭用消毒剂、杀菌剂性能的 杀细菌活性评估试验

Test for the evaluation of bactericidal 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）]、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、杀菌剂性能的杀细菌活性评估试验

1 范围

本标准规定了一种检验食品及家庭用消毒剂、杀菌剂产品杀细菌性能的试验方法。

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。

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

杀细菌活性 bactericidal activity

在设定条件下使相关试验菌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细菌数，并计算活菌数减少的量，确定试样的杀细菌能力。

5 材料与试剂

5.1 试验菌

用以下 3 种菌体来评价杀菌活性：

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

若对特殊用途另有要求，可增选以下菌种：

- 沙门氏菌 ATCC 13311；
- 乳酸菌 DSM 6235；
- 粪大肠杆菌 DSM 6234。

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，应被试验室或菌种保藏中心自然培养保存 5 年。

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。

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 胰蛋白胨大豆琼脂（TSA）

用于保藏菌种和做活菌数计数。

- | | |
|-------|--------------|
| 胰蛋白胨 | 15.0 g |
| 大豆蛋白胨 | 5.0 g |
| 氯化钠 | 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 ± 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。

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 中可以找到对一些产品适合的中和剂。

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 1 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 1000 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。

硬水应该在无菌环境下配置，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）均需全部定量。

根据产品规定的使用条件选择干扰物。干扰物应是无菌的，在试验中要配制 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）

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 $(121\pm 3)^{\circ}\text{C}$ 下最短保留时间为 15 min。

对于干热灭菌法，干热灭菌器在 $(180\pm 5)^{\circ}\text{C}$ 下最短保留时间为 30 min，或在 $(170\pm 5)^{\circ}\text{C}$ 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 TSA 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 $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 或 $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。

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 。

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 细菌悬液和试验溶液的制备

7.1 细菌悬液

7.1.1 试验菌的肉汤培养基

肉汤培养基应符合所用菌种的培养条件。

7.1.2 试验菌的工作培养物

为制备试验菌的工作培养物，将源于肉汤培养基的培养物接种于 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。

7.1.3 试验菌悬液

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 1.5×10^5 CFU/mL \sim 5×10^5 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 $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$ 的水浴锅中，并于 2 h 内使用。

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 之间找到合适的数据。也可选用细菌浊度仪调整菌液浓度。

用稀释剂制备试验悬液的 10^{-3} 和 10^{-4} 稀释液，以便做试验菌悬液计数。混匀。各取每种稀释液 1.0 mL 两份，将每 1.0 mL 样品稀释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。

7.1.4 试验菌悬液计数 (N)

于 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 或 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下培养平皿 48 h。先用肉眼观察，点数菌落数，然后再用放大 5 \sim 10 倍的放大镜检查，以防遗漏。记下各平皿的菌落数后，求出同一稀释度各平皿生长的平均菌落数。若平皿中有连成片状的菌落或花点样菌落蔓延生长时，该平皿不宜计数。若片状菌落不到平皿中的一半，而其余一半中菌落数分布又很均匀，则可将此半个平皿菌落计数后乘以 2，以代表全皿菌落数。确定每一平皿的最高菌落数 V_c 。用所给的方法计算试验菌悬菌落数 (N)。

7.2 试验产品溶液

现配试验产品溶液及其稀释液，并在 1 h 内使用。若产品的稳定性较低，应缩短该时间。

在硬水中配制 3 个不同浓度的试验样品，其中包括活性范围的一浓度和非活性范围的一浓度。配制用于试验产品溶液的浓度应是该产品要求的试验浓度的 1.25 倍。

对于固体产品，至少称取 $1 \text{ g} \pm 10 \text{ mg}$ 产品于容量瓶中，并用硬水使其溶解。在容量瓶中，以体积比的形式用硬水制备随后的稀释液。

对于液体产品，在容量瓶中，以体积比的形式用硬水制备产品稀释液。

对于备用的产品，用水制备稀释液。当用硬水稀释产品时，稀释液应在物理上是均相稳定的。

8 试验步骤

8.1 试验条件的选择

依据产品的实际应用，选择作用温度、作用时间和干扰物。

a) 作用温度（以 $^\circ\text{C}$ 表示）：

- 必需测试温度为 20°C ；
- 增加的温度可从 4°C 、 10°C 或 40°C 中选择；
- 每一所选温度允许偏离的范围为 $\pm 1^\circ\text{C}$ 。

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 $\pm 10 \text{ s}$ （1 min 允许偏差为 $\pm 5 \text{ s}$ ）。

c) 试验菌种：

——5.1 描述的菌种。

d) 干扰物:

- 根据实际用途, 试验干扰物为洁净条件 (0.3 g/L 的牛血清白蛋白) 或污染条件 (3 g/L 的牛血清白蛋白) 下的牛血清白蛋白溶液;
- 在其他要求的情况下, 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, 产品不应引起任何沉淀物的形成。

8.2 评估产品杀菌效果的试验程序

8.2.1 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、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。

8.2.2 稀释-中和法

8.2.2.1 常规条件

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 $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 。

8.2.2.2 产品杀菌活性的试验步骤

用吸管移取干扰物 1.0 mL 至试管中, 加入含 1.5×10^8 CFU/mL $\sim 5 \times 10^8$ CFU/mL 的一种试验菌悬液 1.0 mL。若为食品及家庭清洁产品, 加入含 1.5×10^5 CFU/mL $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL 的一种试验菌悬液 1.0 mL。

立即开始计时, 混匀并将试管放入水浴中, 于要求的试验温度下恒温 2 min \pm 10 s。该时间结束后, 立即加入产品试验悬液 8.0 mL。再次开始计时, 混匀并将试管放入水浴中, 于试验温度下作用试验时间 \pm 10 s。

注: 当加入菌悬液时, 注意避免接触到试管壁的上部。

在作用时间结束前, 混匀。作用时间结束时, 移取试验混合物 1.0 mL 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, 立即分取两份 1.0 mL 中和混合物样品 (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 \sim 20 mL 冷却至 $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 的 TSA。

8.2.2.3 试验混合物计数

于 $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 或 $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 下, 培养平皿 20 h \sim 24 h, 弃去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。确定每一平皿的最高菌落数 V_c 。计算试验混合物菌落数 (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 产品杀菌活性的试验步骤

用吸管移取 1.0 mL 干扰物至试管内, 加入其中一种试验菌悬液 1.0 mL。

立即开始计时, 混匀, 并将试管置于水浴中, 于 $(\theta \pm 1) ^\circ\text{C}$ 恒温 2 min \pm 10 s。该时间段结束后,

加入其中一种产品试验溶液 8.0 mL。再次开始计时，混匀，并将试管置于水浴中，于 $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温适当的作用时间 $(t \pm 10)\text{ s}$ 。

在所选的作用时间结束前，混匀。在所选的作用时间内，吸取两份 1.0 mL 的样品试验混合物，并将每份样品移至不同的带有薄膜和含 50 mL 洗液的膜过滤装置内，立即过滤。要求转移和过滤的时间不应超过 1 min。若大于 1 min，应在试验报告中记录此时间。清洗时应用至少 150 mL 的洗液，但不应大于 500 mL。若洗液不是水，就再过滤 50 mL 水完成过滤。然后将薄膜移至 2 个不同的 TSA 平皿的表面培养计数。在特殊情况下，可将中和剂加入 TSA 中。

注：转移期间，当将薄膜置于 TSA 上时，注意保证薄膜上含细菌一面朝上，而且避免将空气引入薄膜和琼脂之间。

8.2.3.3 试验混合物计数

于 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 或 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 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。对未明显分离菌落的平皿不进行计数。对剩下的平皿再次计数。确定每一平皿的最高菌落数 V_c 。应用所给出的方法计算试验混合菌落数 (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 300 CFU/mL 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于的菌落，而且两个平皿所含菌落均应少于 300 CFU。若两个稀释度的平皿菌落数都在 15 CFU~300 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：

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 300 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 1 个平皿包括 15 个或更多菌落时，按公式 (2) 计算菌落数 (CFU/mL)：

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

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，其菌落数应符合：

- N 在 1.5×10^8 CFU/mL $\sim 5 \times 10^8$ CFU/mL 范围内（食品及家庭清洁产品 N 在 1.5×10^5 CFU/mL $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL 范围内）；
- N_V 在 6×10^2 CFU/mL $\sim 3 \times 10^3$ CFU/mL 范围内；
- A 和 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程序的菌落数；

C 是证实稀释-中和法或膜过滤试验的菌落数。

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) 和产品杀菌活性试验程序结束后的菌落数 (N_a)。

对于中和作用的验证，记录菌悬液的菌落数 (N_V)。

对于稀释-中和法的验证，记录稀释-中和法的菌落数 (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)。

在每一产品浓度及每一试验条件下，用公式 (3) 分别计算并记录对数值减少量 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 105（以菌落数值的减少量 R 计）或更多，试验条件为：5 min \pm 10 s、(20 \pm 1) $^{\circ}$ 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。对于食品及家庭用清洁产品，在要求的试验条件下以及当试验菌是大肠埃希氏菌和金黄色葡萄球菌时，已经证明了细菌的生存能力会降低 103（以菌落数值的减少量 R 计）或更多，其中试验条件为：5 min \pm 10 s、(20 \pm 1) $^{\circ}$ C 和洁净条件的试验条件下，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 6×10^2 CFU/mL \sim 3×10^3 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。对不再显示出明显分离菌落的平皿不进行计数。对其他的平皿再次计数。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) 都应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 3×10^3 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。

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 3×10^3 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 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.4.1.4 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 3×10^3 CFU/mL 菌悬液 1.0 mL。加菌悬液时开始计时, 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~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

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 $(\theta\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 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. 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 $(\theta\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 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, 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。

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 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。

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 $(\theta\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 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 但不大于 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 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

B.1 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。
-

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
杀细菌活性评估试验
QB/T 5484—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：155019·5519
印数：1—200册 定价：38.00元