

ICS 67.220.20

分类号: X 38

QB

# 中华人民共和国轻工行业标准

QB/T 5483—2020

## 化学消毒剂与杀菌剂 杀真菌活性 试验方法和要求

Chemical disinfectants and antiseptics—Fungicidal 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。

本标准首次发布。

# 化学消毒剂与杀菌剂 杀真菌活性 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后可形成均匀的、物理上稳定的化学消毒剂与杀菌剂的杀真菌活性试验。

## 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

**杀酵母菌活性 yeasticidal activity**

在设定条件下使相关产品中酵母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。

## 6 材料与试剂

### 6.1 试验菌

用以下菌种作为试验菌，评价杀真菌活性：

——白色念珠菌 ATCC 10231；

——黑曲霉菌 ATCC 16404。

评价杀酵母菌能力时仅使用白色念珠菌即可。

这些试验菌要求的培养温度是  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。若使用增加的菌种，应在该菌种最佳生长条件下（温度、时间、空气、培养基）对其进行培养，并在试验报告中注明。

### 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。

#### 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 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  $5.6 \pm 0.2$ 。

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 MEA。

#### 6.2.4 稀释液

胰蛋白胨氯化钠溶液做稀释液：

——胰蛋白胨，（胰腺对酪蛋白的分解物），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，该洗液的结果应是无菌的，且在试验所描述的条件下，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  $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$  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。

#### 7.2.2 水浴锅

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

#### 7.2.3 培养箱

应控制在  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

#### 7.2.4 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。

#### 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  $\mu\text{m}$ 。

应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

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

#### 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

#### 8.1.3.1 白色念珠菌（酵母菌）

为制备白色念珠菌试验菌的工作培养物，将源于母代的培养物接种于 MEA 斜面或平皿，并培养得到第 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 1 代培养物保留在培养箱内 72 h。

#### 8.1.3.2 黑曲霉菌（霉菌）

仅使用将源于母代培养物接种于 MEA 斜面或平皿上培养 9 d~11 d 的第 1 代培养物。

#### 8.1.3.3 其他增加的菌种

其他增加的酵母菌和霉菌按各自要求进行培养使用。

### 8.1.4 试验菌悬液（ $N$ ）

#### 8.1.4.1 白色念珠菌

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。吸取锥形瓶中的悬液，并移至另一试管。

用稀释液调整悬液中菌数为  $1.5 \times 10^7$  CFU/mL~ $5.0 \times 10^7$  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。

用分光光度计调整细菌数（波长约 620 nm，口径长为 10 mm 的比色管）。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（ $45 \pm 1$ ）℃的 MEA。

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

#### 8.1.4.2 黑曲霉菌

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 的水溶液 10 mL）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，若出现发芽孢子，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  $1.5 \times 10^7$  CFU/mL~ $5.0 \times 10^7$  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的水浴锅中，并于 4 h 内使用。该菌悬液可以在冰箱中冷藏保存 2 d，再次使用前应检查有无孢子。

### 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

平皿培养 42 h~48 h。剔除不可计数的平皿，做平皿计数，确定菌落形成单位数。对黑曲霉菌需要继续培养 20 h~24 h，如菌落数还有增加，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，仅采用较高的数做进一步评价。

记录每一平皿的确切菌落数，当霉菌大于 165 时，记录>165，酵母菌大于 330 时，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，因为在试验及证实法期间，试样溶液会被稀释至 80%。

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，因生成沉淀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。

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。

注：对沉淀物或絮状物中的微生物进行计数困难且结果不可靠。

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 $^{\circ}\text{C}$ 表示）：

——必需测试温度为  $20^{\circ}\text{C}$ ；

——增加的温度可从  $4^{\circ}\text{C}$ 、 $10^{\circ}\text{C}$  或  $40^{\circ}\text{C}$  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 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  $\pm 10 \text{ s}$ （1 min 允许偏差为  $\pm 5 \text{ s}$ ）。

##### c) 试验菌种：

——对于杀真菌活性试验其试验菌为：白色念珠菌和黑曲霉菌；

——对于杀酵母菌活性试验其试验菌为：白色念珠菌；

——可测试增加的菌种。

#### 9.1.2 试验方法的选择（稀释-中和法或膜过滤法）

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  $0.0025 \text{ mol/L}$  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  $30 \text{ g/L}$  的吐温  $80 \text{ g/L}$ 、皂角苷  $30 \text{ g/L}$ 、L-组氨酸  $1 \text{ g/L}$ 、卵磷脂  $3 \text{ g/L}$ 、硫代硫酸钠  $5 \text{ g/L}$ 。

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，有必要将中和剂加入 MEA。

### 9.1.3 证实与控制程序的通用说明

对每种试验菌及每一试验条件（温度，作用时间），执行证实与控制试验。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 MEA，那么用于试验的 MEA 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，使其稳定在作用温度。中和剂、洗液和水应恒温于  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

### 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、条件控制以及验证程序。

### 9.2.2 试验步骤

杀真菌或酵母菌浓度的确定：

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  $10 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$  后，立即混匀，分取两份 1.0 mL 已中和的试验混合物样液 ( $N_a$ )（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 MEA。

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

### 9.2.3 试验条件控制 (A)

证实所选试验条件或检验试验条件下无任何致死效应。

可在黑曲霉菌和白色念珠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（ $30 \pm 1$ ）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验证试验混合物的培养计数

培养平皿 42 h~48 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。对黑曲霉菌需再培养平皿再培养 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，但若霉菌数多于 165，记录 >165，酵母菌计数多于 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 的漏斗，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 杀真菌或酵母菌浓度试验（ $N_a$ ）

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  $10 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$  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 平板表面培养计数。

### 9.3.3 试验条件控制（A）

证实所选试验条件或检验该试验条件下无任何致死效应。

可在黑曲霉菌和白色念珠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  $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ 。

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 MEA 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 MEA 平板表面培养计数。对黑曲霉菌试样，尽可能等分为 4 部分，每份都转移到一个独立的膜过滤装置中过滤，即分成 8 个薄膜来培养。

### 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真菌计数。

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  $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ 。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 MEA 平板表面培养计数。对黑曲霉菌试样，尽可能等分为 4 部分，每份都转移到一个独立的膜过滤装置中过滤，即分成 8 个薄膜来培养。

### 9.3.6 试验混合物以及控制与验证混合物的培养计数

白色念珠菌培养  $42 \text{ h} \sim 48 \text{ h}$ 。弃除不可计数的平皿。做平皿计数，确定菌落形成单位数。对黑曲霉菌应再培养平皿  $20 \text{ h} \sim 24 \text{ h}$ ，若菌落数还有增加，再进行  $20 \text{ h} \sim 24 \text{ h}$  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。

记录每一平皿的确切菌落数，但若霉菌数高于 55，记录 >55，酵母菌计数高于 165，则记录 >165，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

对琼脂平板上真菌计数的一般限制霉菌在  $15 \sim 150$  之间，酵母菌在  $15 \sim 300$  之间。本标准中，允许有 10% 的偏差，因此限制范围霉菌在  $14 \sim 165$  之间，酵母菌在  $14 \sim 330$  之间。至于膜上，最高限制是不同的：霉菌在 50，酵母菌在 150，即，允许有 10% 的偏差：霉菌在 55，酵母菌在 165。

根据含 1 mL 样品的平皿数确定并记录  $V_c$  值，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。

若已用多于一个含 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“大于计数总和”（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  $N_a$ ）。

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 或 55 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：

$$N = \frac{C}{(n_1 + 0.1n_2)10^{-5}} \dots\dots\dots (1)$$

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 ( $10^{-5}$ ) 的  $V_c$  值的个数；

$n_2$  —— 较高稀释度 ( $10^{-6}$ ) 的  $V_c$  值的个数；

$10^{-5}$  —— 与较低稀释度相应的稀释因子。

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：

$$N = \frac{139+154+14+17}{(2+0.1 \times 2)10^{-5}} = \frac{324}{2.2 \times 10^{-5}} \approx 1.4727 \times 10^7 \approx 1.5 \times 10^7 (\text{CFU/mL})$$

### 10.1.3 $N_a$ 的计算

用公式 (2) 计算  $N_a$ ：

$$N_a = \frac{10c}{n} \dots\dots\dots (2)$$

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每毫升所含的菌落数，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。

示例：

a) 平行  $V_c$  值：<14, 16

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

b) 平行  $V_c$  值（倾注平板 黑曲霉菌）：>165, >165

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

c) 平行  $V_c$  值（膜过滤 黑曲霉菌）：40, >55

$$N_a = \frac{(40+>55) \times 10}{2} = i.e. >475$$

d) 平行  $V_c$  值（每含 1.0 mL 样液的两个涂布平板 白色念珠菌）：>660, 600

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

### 10.1.4 $N_v$ 与 $N_{v0}$ 的计算

用公式 (3) (4) 计算  $N_v$  与  $N_{v0}$ ：

$$N_v = \frac{10c}{n} \dots\dots\dots (3)$$

$$N_{v0} = \frac{c}{n} \dots\dots\dots (4)$$

式中：

$N_v$  —— 验证菌悬液每毫升所含菌落数，单位为 CFU/mL；

$N_{v0}$  —— 混合物 A、B 与 C 在作用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  $A$ 、 $B$  与  $C$ ：

$$A、B、C = \frac{c}{n} \dots\dots\dots (5)$$

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应高于 15，且不应低于 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。

示例：

$N$ ： $10^{-6}$  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，进行检验：

—— $N$  在  $1.5 \times 10^7$  CFU ~  $5 \times 10^7$  CFU 之间， $7.17 \leq \lg N \leq 7.70$ ；

—— $N_0$  在  $1.5 \times 10^6$  CFU ~  $5 \times 10^6$  CFU 之间， $6.17 \leq \lg N_0 \leq 6.70$ ；

—— $N_{v0}$  在 30 CFU 与 160 CFU 之间， $3.0 \times 10^1$  CFU 与  $1.6 \times 10^2$  CFU<sup>2</sup>；

—— $A$ 、 $B$ 、 $C$  不小于  $0.5 \times N_{v0}$ ；

——加权平均数的控制：商不低于 5，且不大于 15。

## 10.3 结果

### 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  $N$ ，以及试验后的  $N_a$  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 ( $\lg$ )：

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

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 4 个对数值或更多，以及至少有一个浓度减少量应少于 4 个对数值。

### 10.3.3 试验菌及杀真菌/酵母菌浓度限制

#### 10.3.3.1 杀真菌浓度

对于每种试验菌，记录通过试验 ( $\lg R \geq 4$ ) 的产品的最低浓度。（该浓度对于样品来说，在所选试验条件下是最容易反映产品特性的）。

#### 10.3.3.2 杀酵母菌浓度

记录对白色念珠菌试验 ( $\lg R \geq 4$ ) 的产品的最低浓度，作为杀酵母菌的最佳浓度。

#### 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，宜重复本试验（重复6次，减少量需精确到±1）。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以及证实菌悬液，并进行试验程序。重复试验可能对试验菌要求很严格。

#### 10.4 结果说明-结论

##### 10.4.1 结论

##### 10.4.1.1 杀真菌活性

在本试验规定的条件下，白色念珠菌和黑曲霉活菌数量至少降低  $10^4$  或更多时（ $\lg R \geq 4$ ），就认为该产品具有杀真菌活性。

##### 10.4.1.2 杀酵母菌活性

在本试验规定的条件下，白色念珠菌数量至少降低  $10^4$  或更多时（ $\lg R \geq 4$ ），就认为该产品具有杀酵母菌活性。

#### 11 试验报告

试验报告应至少说明以下的信息：

a) 鉴定实验室级别；

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；

——杀酵母菌活性的评价。

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  $6 \times 10^2$  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 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

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) 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 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。

##### 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 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 C 的菌落数。

##### c) 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  $6 \times 10^2$  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±1)℃的 MEA，于 (30±1)℃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

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 ( $\theta \pm 1$ )℃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 ( $\theta \pm 1$ )℃。

##### 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~ $3 \times 10^3$  CFU/mL 的菌悬液，置于无菌试管内。混匀，并于 ( $\theta \pm 1$ )℃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 ( $\theta \pm 1$ )℃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 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±1)℃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~ $3 \times 10^3$  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 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±1)℃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 ( $\theta \pm 1$ )℃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~ $3 \times 10^3$  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 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±1)℃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

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  
杀真菌活性 试验方法和要求  
QB/T 5483—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：155019·5518

印数：1—200册 定价：45.00元