

## 概要

本规格是在工业标准化的基础上，经过日本工业标准调查会的审查，由通商产业大臣制定的日本工业规格。

日本工业标准——抗菌加工产品-抗菌试验方法，抗菌效果

序文：与生活相关的新功能加工产品座谈会记录：平成10年12月在所谓的抗菌加工指示书上表示，本规格是为了对抗菌加工产品抗菌效果的评价方法规范化而制定的日本工业规格。但是，本规格只是对抗菌加工产品及其重要的抗菌效果及试验方法做的规定，对其安全性，抗菌效果的持续性等等请参照“抗菌加工产品指示书”。

### 1、试用范围

本规格是针对抗菌加工产品(含中间产品)表面细菌的抗菌性试验方法及抗菌效果的规定。

### 2、参考文件

下列标准和条款通过本标准的引用成为本标准，版本更新的标准适用本标准。

JIS K0950 塑料杀菌碟

JIS K0970 按钮式液体用微量体积计

JIS K3800 二级的生物安全装置

JIS K8101 乙醇（99.5）（试剂）

JIS K8150 盐酸

JIS K8180 盐酸（试剂）

JIS K8263 琼脂（试剂）

JIS K8576 氢氧化钠（试剂）

JIS K9007 磷酸二氢钾

JIS K9017 磷酸二钾

JIS K9012 纺织产品的抗菌性实验方法

JIS R3505 玻璃材质的体积计

### 3、定义

本标准使用了如下定义和术语

A) 抗菌 抑制产品表面细菌繁殖

B) 杀菌 抗菌的最终效果

Page 1 / Total 8

C) 抗菌产品 进行抗菌加工的产品

D) 抗菌活性值 加工产品和未加工产品进行细菌接种培养后的细菌数进行对比后的差值

《参考 JIS L1902 抗菌活性值评估与判定》

E) 抗菌效果 从抗菌活性值判断抗菌加工产品的效果

4、抗菌效果 抗菌加工产品的抗菌效果，根据本规格的试验方法得出，抗菌活性值为2.0以上。另外，根据当事人之间的协定，2.0上下的数值均可以。

### 5、试验方法

5.1 纤维产品的试验方法 纺织品的试验方法，同JIS L1902的规定8（定量试验）

5.2 塑料制品等的试验方法 本试验方法适用于塑料制品，金属制品，陶瓷制品等纤维制品以外的制品。根据制品的用途，形状等纺织品的试验方法5.1测试方法也可以用。

5.2.1 试验用的细菌 试验用的细菌种类，根据如下所示，进行各项试验

A) 黄色葡萄球菌

B) 大肠菌

使用菌种如表1所示。使用表1所示保存部门以外分售的菌株的情况下，分售部门为国际微生物株保存联盟（WFCC: WORLD FEDERATION OF CULTURE COLLECTION）或者日本微生物株保存联盟（JSCC: JAPAN SOCIETY OF CULTURE COLLECTION）加盟的部门，并且和表1同一系列的菌株。

表1 试验用细菌的菌株

细菌的种类	菌株的保存号码	保存菌株的部门
黄色葡萄球菌	ATCC6538P FDA209P IFO12732	美国菌种收藏协会 食物和药剂管理部门 发酵研究所
大肠杆菌	ATCC8739 IFO3972	美国菌种收藏协会 发酵研究所

### 5.2.2 药品、材料及器具

本规格所试用的药品，材料及器具没有特别的规定，如下所示均可

乙醇 (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) JIS K8101规定的1级以上的物品

浓缩牛肉 微生物试验用的物品

蛋白胨 微生物试验用的物品

氯化钠 (NaCl) JIS K8150规定的特级物品

精制水 适合第13修正日本药局方的基准的物品

Page 2 / Total 8

JIS\_Z\_2801: 2000\_Antimicrobial\_products\_-\_Test\_for\_antimicrobial

琼脂 JIS K8263规定的特级以上的物品

酵母膏 微生物试验用的物品

胰化蛋白胨 微生物试验用的物品

葡萄糖 微生物试验用的物品

酪素胨 微生物试验用的物品

大豆胨 微生物试验用的物品

蛋黄素

非离子表面活性剂

磷酸二氢钾

磷酸二钾

氢氧化钠

盐酸

棉花塞

白金圈 尖端大约一个4mm的环点

消毒器 使保持温度在160至180°C

高压灭菌器 能保持120°C和103KPa 的压力

安全装置 性能按照或等价于JIS K 3800

净化台

吸管 精确度能达到或等价于JIS K 0970或JIS R 3505A 级

培养器 保持温度±1°C

陪替氏培养皿 内径90mm的玻璃器皿或是按JIS K 0950中指定规定规格NO.90A/90B

兜布袋 微生物测试

兜包 微生物测试

薄膜 不能影响微生物生长和吸水、厚度不定，但可以粘着使用。

### 5.2.3 杀菌方法

#### A) 干热杀菌

将杀菌对象放入160~180°C的干热杀菌器，保持30~60分钟(1)。

注1干热杀菌完成后，杀菌的绵塞，包装物等被水浸湿时，器具不可再用。

#### B) 高压蒸汽杀菌

将水倒入高压杀菌器，把杀菌物放在铁丝网上，盖上高压杀菌器的盖子，加热，温度达到121°C(压力相当103KPa)后保持15~20分钟。加热停止，自然冷却到100°C以下后，打

Page 3 / Total 8

JIS\_Z\_2801: 2000\_Antimicrobial\_products\_-\_Test\_for\_antimicrobial

开排气，排去蒸汽，打开盖子，取出杀菌后的物品，必要的情况下，用干净的钳子夹到安全的橱柜内冷却。高压杀菌器要防止受到污染，加工药剂的污染，为了保持干净，有必要的情况下可以放到中性洗涤剂中洗净，再用水充分清洗。

### C) 火焰杀菌

将杀菌物放到气体或者酒精的火焰中，如果是使用试管的话，放置2-3秒。

### D) 准备测试器具

试验试管、烧瓶等玻璃用具，用强碱或者中性洗涤剂仔细清洗，再用水充分清洗后干燥，加热杀菌，或者高压蒸汽杀菌。

### 5.2.4 其它培养基

培养基等使用如下所示组合。另外，如果是同一组合的话，可以使用市场上销售的产品。

#### a) 细菌悬浊液用营养肉汤

准备精制水或者离子交换水1000ml，肉的提炼物3.0g，蛋白胨10.0g，氯化钠5.0g，放入烧瓶里混合，充分溶解后，用氢氧化钠或者盐酸溶液进行调整PH值，使PH值在7.0-7.2之间(25°C)，必要的情况下，可以注入试管内，塞上绵栓，进行高压蒸汽杀菌。调至完成后，不马上使用的放到5-10°C的温度下保存。不能使用调至超过一个月以上的细菌悬浊液用营养肉汤。

#### b) 营养琼脂培养基

准备精制水或者离子交换水1000ml，肉的提炼物5.0g，蛋白胨10.0g，氯化钠5.0g，琼脂粉15.0g，放入烧瓶里混合，放到沸腾的水浴中加热至全部溶解后，用氢氧化钠或者盐酸溶液进行调整PH值，使PH值在7.0-7.2之间(25°C)，塞上绵栓，进行高压蒸汽杀菌。调至完成后，不马上使用的放到5-10°C的温度下保存。不能使用调至超过一个月以上的营养琼脂培养基。

#### c) 平板计数琼脂/标准琼脂培养基

准备精制水或者离子交换水1000ml，酵母提炼物2.5g，蛋白胨5.0g，葡萄糖1.0g，琼脂粉15.0g，放入烧瓶里混合，放到沸腾的水浴中加热至全部溶解后，用氢氧化钠或者盐酸溶液进行调整PH值，使PH值在7.0-7.2之间(25°C)，塞上绵栓，进行高压蒸汽杀菌。调至完成后，不马上使用的放到5-10°C的温度下保存。不能使用调至超过一个月以上的标准琼脂培养基。

#### d) 斜面培养基

重新把溶解后的b)的营养琼脂培养基6-10ml注入试管内，塞上绵栓高压蒸汽杀菌。杀菌完成后，把试管放在干净的室内保持15°倾斜，让试管内的物质凝固。调至后，不马上使用的放到5-10°C的温度下保存。没有加入浓缩水溶解的，先溶解，等凝固再使用。不能使用调至超过一个月以上的斜面培养基。

#### e) SCDLP 肉汤

准备精制水或者离子交换水1000ml，酪素胨17.0g，大豆胨3.0g，氯化钠5.0g，磷酸氢氧二化钠2.5g，葡萄糖2.5g，卵磷脂1.0g，放入烧瓶内混合，充分溶解后，添加非离子表面活性剂7.0g并溶解。用氢氧化钠或者盐酸溶液进行调整PH值，使PH值在7.0-7.2

Page 4 / Total 8

JIS\_Z\_2801: 2000\_Antimicrobial\_products\_-\_Test\_for\_antimicrobial

之间(25°C)，必要的情况下，注入试管或者三角锥瓶中，塞上绵栓进行高压蒸汽杀菌。调制后，不马上使用的放到5-10°C的温度下保存。不可使用调至超过一个月的SCDLP（液体培养基）。

#### f) 磷酸缓冲液

准备磷酸二氢钾34.0g放到烧瓶内，添加精制水或者离子交换水500ml进行混合，充分溶解后，用氢氧化钠或者盐酸溶液进行调整PH值，使PH值在7.0-7.2之间(25°C)。进而，添加精制水或者离子交换水使之达到1000ml。必要的情况下，注入试管或者三角锥瓶中，塞上绵栓进行高压蒸汽杀菌。不可使用调至超过一个月的磷酸缓冲液培养基。

#### g) 磷酸盐缓冲生理盐水溶液

用生理盐水（0.85%氯化钠溶液）800倍的量稀释磷酸溶液，必要的情况下，注入试管或者三角锥瓶中，塞上绵栓进行高压蒸汽杀菌。不可使用调至超过一个月的磷酸盐缓冲液。

### 5.2.5 菌种准备

移植无菌的测试菌种，有必要时使用安全装置。一方面持斜面培养基和储存的菌种准备移植，另一方面持白金圈的手把，用这只手拔出棉塞，然后用火焰对测试管口和白金圈进行消毒，用白金圈的顶端粘浓缩水到新的斜面培养基上并冷却它，用白金圈从培养基表面挖部分菌种并铺平在新的斜面培养基上，铺成条状。并对管口用火焰进行再次消毒，塞住棉塞保持原状。消毒白金圈，在35±1°C下接种培养24-48小时，后储存在5-10°C环境下，一个月内进行移植，培养基的转移不能超过10次，从最初的菌种管理部门获得计算。此外，当最后一次移植起超过一个月或是更多，以下移植不能被使用。

#### 图1 细菌移转

备注2：如图1所示，用白金圈的尖端插入浓缩水中，后分散菌种，使用白金圈拉一条斜直线到上部，再次插入白金圈到浓缩水中拉Z字形到上部。

备注：菌种的保存符合相关协会规定。菌种获取的机构必须是国际菌种保藏中心（WFCC）的成员或日本菌种保藏协会（JSCC）的成员。

#### 5.2.6测试

菌种无菌处理，注意器械、人员、工作环境的无菌处理，必要的情况下使用无菌箱。

##### A) 细菌培养

菌培养

使用白金圈从原菌种移植到斜面培养基，在 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养16-24小时，然后从此接

Page 5 / Total 8

JIS\_Z\_2801: 2000\_Antimicrobial\_products\_-\_Test\_for\_antimicrobial

种体使用白金圈接种到另一个斜面培养基，在 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下培养16-20小时。

##### B) 准备测试片

备测试片

把被测试片切成标准 $5\text{cm}^2$ 厚度（3）为1cm的正方形，准备6片没有处理的测试片（5）和3片抗菌测试片（4），如果未处理过的测试片不好准备，可以使用5.2.2的薄膜替代，避免测试片间的相互污染，尽量从产品本身切取测试片，如因产品形状问题不能准备，可以采用相同的加工工艺方法生成测试片。

备注3 如果被测试产品测试片不好准备，测试片尺寸没有特别规定，只要能被薄膜覆盖 $400 - 1600\text{mm}^2$ 即可。

备注4 测试片从没有处理过和产品中切除。

备注5 6个未处理的测试片中，使用3个测试片接种后马上测试活性细胞数值，另外3个计算接种24小时后的活细胞数。

##### C) 测试片清洗

试片清洗

用纱布或脱脂棉粘上酒精擦拭2-3次，充分干燥。

如果经过处理后测试表面变软、表层分开，如果影响实验结果，样片清洗会导致软化、表面涂层溶解及溶出，应该避免清洗，或用没有清洗的测试片，也可用其它适合的方式清洁。

##### D) 测试接种体准备

用精制水稀释细菌悬浊液用营养肉汤，调整PH值为6.8-7.2之间，用高压蒸汽杀菌，使用量为1/500NB（营养肉汤）取约1/500量的预培养菌种在平面均匀疏散，并在显微镜下观测数量。或者用其它方法，适当稀释1/500的营养肉汤让细菌数量是 $2.5 \times 10^5$ 细胞每毫升，使用这种溶液当做接种体。如果接种体没有马上使用，在 $0^{\circ}\text{C}$ 保存并在4小时内使用。

##### E) 测试接种体的接种

在接种过程中，将各个试验片分别放入灭菌的平皿中，实验测试面朝上（6）。然后将0.4 毫升的试验菌液滴到每个试验片上（7），再用薄膜（8）覆盖，压平以使菌液散开然后盖上盖子，注意不能让试验菌液溢出薄膜。如图2

图2 滴接种体到测试表面并用薄膜覆盖

备注6 测试表面是指抗菌产品表面，不能用横截面。

备注7 测试片接种体的量根据测试接种表面的面积不同分开使用不同的比率接种体，即

Page 6 / Total 8

JIS\_Z\_2801: 2000\_Antimicrobial\_products\_-\_Test\_for\_antimicrobial

使测试片是标准片，测试片很湿，像陶瓷，瓷砖，瓷釉，s玻璃，也许少许倾斜，这个接种体就会溢出薄膜。在这种情况下，接种体的量就可以减少到1/4的标准量。如果接种体被减少，被接种在每个测试片上的细胞数量为 $1.0-4.0 \times 10^5$ 类似于标准的测试片。这种情况测试接种体量不能按照D)的规定，但是可以从被接种体的接种量计算。

备注8 薄膜的标准尺寸为正方形 $40\text{mm} \pm 2\text{mm}$ 。如果测试片不是标准的尺寸，调整使薄膜能覆盖到测试片内的 $2.5\text{mm}$ 。不行，调整薄膜的尺寸不小 $400\text{mm}^2$ 。再次，因测试产品的不平整形状等问题不能很好让薄膜吸附在上面，如因测试产品会亲水或吸水问题这个过程可以考虑不用薄膜。

##### f) 测试片的接种体培养

三个未处理的测试片和三个抗菌测试片在无菌器皿中进行24小时  $\pm 1$ 小时的接种体培养，温度为 $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 相对湿度为不少于90%下进行。

参考信息：

抗菌产品的抗菌有效性从抗菌产品在一定的测试条件下测试中获得的抗菌活性值来评估，但是特定条

件温度也要考虑抗菌产品的实际使用环境条件。

#### g) 菌洗液洗脱 (9)

1) 三个未经处理的测试片在接种接种体后马上用菌洗液洗脱，用薄膜盖住并用已灭菌的镊子把测试片放置于已灭菌的兜带中，注意不要让接种体溢出，用吸管加入10ml的SCDLP营养肉汤，用手或抽取器充分按摩履盖物和测试片，立刻着手计算在洗脱液中的活细胞数量。

2) 接种体培养后的测试片同1) 的方法进行洗脱，并计算出活细胞数量。

备注9 洗出来的细菌，如果有其它更好的方法也可以使用，如果因为产品特性或是尺寸等原因用10ml的SCKLP肉汤不能洗脱，可以增加洗脱量。

#### h) 琼脂平皿培养法活细胞数计算

用吸管取1ml的洗脱液，把它放置在有9ml的磷酸盐缓冲液中，充分混合，然后从这个测试管中用新的吸管吸取1ml测试液到另外一个9ml磷酸盐缓冲液中充分混合，重复这个动作，准备稀释成10倍的溶液。分配1ml的洗液和各种稀释液到无菌平皿中，在每个平皿中加入15-20ml平板计数琼脂加热到 46-48 °C并充分混合，平皿加上盖子，放入标准室温环境中，凝固后把培养基翻过来，在室温35±1°C的情况下培养40至48小时。经过培养后，计算稀释平皿中的细菌落数，是否有30到300菌落数出现，如果用1ml的洗脱液洗脱在平板琼脂中细菌数少于30，然后计算这个盘子的细菌数量。如果在这个平板琼脂中没有任何菌种生成，记录为< 1，进一步，如果细菌的数量没有和稀释率成相反的比例，就要考虑抗菌剂对菌种培养形成的影响。然后决定使用灭活剂或稀释物不影响菌种形成的抗菌剂方法来计算活细胞数量。

参考：菌落数其它方法，参考微生物试验法（平板培养法（贴膜法）日本药学会编制卫生试验法注解2000）；污染指标菌1细菌数食品卫生指针微生物局监制

#### 5.2.7 活菌数的计算

活菌数的计算： $N = (C \times D \times V)$

其中 N: 每个样片活菌数；

Page 7 / Total 8

JIS\_Z\_2801: 2000\_Antimicrobial\_products\_-\_Test\_for\_antimicrobial

Page 8 / Total 8

C: 菌落数；（器皿中被收集的细菌数）

D: 稀释倍数，

V: 用于洗脱的SCDLP 培养液的体积（ml）；

保留二个有效数字记录活细胞数，第三位数字采用四舍五入。被移植的细胞数< 1被记录为10（使用10ml量的情况）。确定了活细胞数的平均植后，三个测试片的细胞活性值表述为二位有效数字，第三位采用四舍五入。当活细胞数小于10，考虑活细胞数平均数为10。

#### 5.2.8测试结果

A 测试有效性条件的判定。

当如下三个条件都得到满足时，这个测试判定有效，除了所有条件都满足才判定该实验有效，否则重做。

1) 如

下公式是计算未处理的测试片在接种接种体后马上测试的活细胞数量对数值。

$$(L_{max} - L_{min}) / (L_{mean}) \leq 0.2$$

$L_{max}$  最大活性细胞对数值

$L_{min}$  最小活性细胞对数值

$L_{mean}$  三个测试片活性细胞平均对数值

2) 未处理的测试片在接种后马上测试的活细胞值范围在 $1.0 - 4.0 \times 10^5$

3) 所有3片未经处理的测试片经过24小时细菌培养后活细胞数不少于 $1.0 \times 10^3$ 如果是薄膜使用在未处理的产品上时，3片测试片在24小时后活细胞数不能少于 $1.0 \times 10^4$ 。

B 当测试有效，按照公式计算抗菌活性值，保留小数位一个数，第二位小数位用四舍五入。

$$R = \log(B/A) - \log(C/A) = \log(B/C)$$

式中：R:抗菌活性值

A:无抗菌加工试验片接种后直接得到的活性细胞数平均值；

B:无抗菌加工试验片接种后放置24h 得到的活性细胞数平均值；

C:抗菌加工试验片接种后放置24h 得到的活性细胞数平均值；

