

团 体 标 准

T/ZSA XXX-XXXX

抗菌不锈钢表面抗菌性能试验方法

Antibacterial stainless steel—Measurement of antibacterial activity on the
surface

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中关村标准化协会

发布

目 次

前 言..... III

引 言..... IV

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 1

4 材料..... 1

5 仪器..... 2

6 仪器灭菌和菌种保藏..... 3

7 检测步骤..... 3

8 试验结果..... 4

9 试验报告..... 5

参考文献..... 6

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。中关村标准化协会不承担识别这些专利的责任。

本标准由中关村标准化协会技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中关村标准化协会

引 言

抗菌不锈钢作为新型的结构功能一体化材料已被广泛应用于各个领域。为保证抗菌不锈钢的抗菌质量，快速真实有效检测出抗菌不锈钢的抗菌性能，特制定本文件。本文件主要基于抗菌材料对细菌的接触杀菌机制，提供抗菌不锈钢抗菌效果的评价方法。对于抗菌不锈钢的其他重要性能，如产品的理化性能和安全性可参考其他相关标准，在本文件中不作规定。

中关村标准化协会

抗菌不锈钢表面抗菌性能试验方法

警告：处理和操作具有潜在危险的微生物需要很高的技术能力，需遵守现行国家法律和条例，只有经过微生物学技术培训的人员才能进行这些检测工作。并应严格执行相关的消毒、灭菌和个人卫生规范程序。

1 范围

本文件规定了抗菌不锈钢的抗菌性能的评价方法。

本文件适用于抗菌不锈钢材料的抗菌性能检测，其他经抗菌处理的实体无孔合金材料的抗菌性能也可参照执行。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

以下术语和定义适用于本文件。

3.1

抗菌 antibacterial

制品表面杀灭或妨碍细菌生长繁殖及其活性的效果。

注：改写GB/T 31402—2015，定义3.1。

3.2

抗菌剂 antibacterial agent

通过表面抗菌处理或添加到制品而抑制细菌在制品表面生长的药剂。

注：改写GB/T 31402—2015，定义3.2。

3.3

抗菌不锈钢 antibacterial stainless steel

在普通不锈钢中添加一定量的金属抗菌剂，通过控制铸造、锻压、轧制以及热处理等过程，使其成为具有抗菌功能的不锈钢。

3.4

抗菌性能 antibacterial activity

经过抗菌处理后的制品和未经抗菌处理的制品在接种细菌培养后，得到的活菌数的差异。

注：改写GB/T 31402—2015，定义3.3。

4 材料

4.1 试验细菌

试验采用以下两种细菌：

- 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (菌株号 ATCC 6538)；
- 大肠埃希氏菌 *Escherichia coli* (菌株号 ATCC 8739)。

根据产品的使用要求，可选用其他菌种作为检验菌种，但菌种应由国家级菌种保藏管理中心提供，

并应在检测报告中注明及说明理由。

注：中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC) 是世界菌种保藏联合会 (WFCC) 成员，与金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 等同的国内菌株号为 CGMCC 1.2465，与大肠埃希氏菌 ATCC 8739 等同的国内菌株号为 CGMCC 1.2463。

4.2 试剂、溶液与培养基

所使用的水都应是蒸馏水或去离子水，通常为电导率小于 $1\mu\text{S}/\text{cm}$ 的二级水。

所有试剂都应是分析纯或微生物试验试剂。

4.2.1 消毒剂

75%乙醇溶液。

4.2.2 洗脱液

将 8.5g 氯化钠加入到 1000mL 蒸馏水中，搅拌均匀，制成生理盐水。然后置于高温高压蒸汽灭菌锅内， 121°C 灭菌 20min。如不立即使用，于 $5^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 保藏。不应使用存放一个月或以上的生理盐水。

4.2.3 培养基

4.2.3.1 营养肉汤

将 5.0g 牛肉膏、10.0g 蛋白胨和 5.0g 氯化钠加入 1000mL 蒸馏水中制备成溶液，用 $0.1\text{mol}/\text{L}$ NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0~7.2，然后置于高温高压蒸汽灭菌锅内， 121°C 灭菌 20 min。如不立即使用，于 $5^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 保藏。不应使用存放一个星期或以上的营养肉汤。

4.2.3.2 营养琼脂

1000mL 4.2.3.1 的营养肉汤中加入 15.0g 琼脂，加热融化，用 $0.1\text{mol}/\text{L}$ NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0~7.2，并置于高温高压蒸汽灭菌锅内， 121°C 灭菌 20min。如不立即使用，于 $5^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 保藏。不应使用存放一个月或以上的营养琼脂。

4.2.3.3 斜面培养基

将 6mL~10mL 加热溶解的营养琼脂加入到已高温高压灭菌（见 6.1）的旋盖试管中，将试管置于倾角约 15° 的位置，等待培养基凝固。如不立即使用，于 $5^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 保藏。不应使用存放一个月或以上的斜面培养基。

5 仪器

如无特别说明，使用以下器具和材料。

- 5.1 恒温试验箱：在设定温度下，温度波动不超过 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.2 压力蒸汽灭菌锅：能保持 $121^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的温度，保持 $103\text{kPa}\pm 5\text{kPa}$ 的压力。
- 5.3 带搅拌的水浴锅。
- 5.4 pH 计：精度 ± 0.2 。
- 5.5 天平：精度 $\pm 0.01\text{g}$ 。
- 5.6 移液器：灭菌移液管。
- 5.7 涡旋搅拌器。
- 5.8 超声波清洗器。
- 5.9 接种环：直径 4mm。
- 5.10 酒精灯。

5.11 培养皿：直径 90mm~100mm，灭菌后使用。

5.12 灭菌离心管。

5.13 灭菌三角瓶。

5.14 冷藏箱：保持 0℃~5℃ 的温度。

6 仪器灭菌和菌种保藏

6.1 高温高压灭菌

将物品放入压力蒸汽灭菌锅，于 121℃ 灭菌不少于 20min。

6.2 玻璃器皿的准备

以碱性或中性清洁剂清洗，然后用蒸馏水或者去离子水冲洗干净。使用前用压力蒸汽灭菌锅灭菌。

6.3 菌种保藏

将菌种接种于斜面培养基上，37℃±1℃ 下培养 24h 后，在 0℃~5℃ 下保藏，作为斜面保藏菌。不得使用转种超过 5 次或者转种间隔超过 1 个月的菌种。

7 检测步骤

7.1 检测原理

本方法基于抗菌材料对于细菌的接触杀菌理论，通过接种能够确保细菌与材料充分接触的菌悬液于待检样品上，经过一定时间的培养后，测得样品中的活菌数，并计算出样品的抗菌率。

7.2 细菌预培养

用无菌接种环将细菌从保藏菌种的培养基上转移到斜面培养基，在 37℃±1℃ 下培养 16h~24h。再用无菌接种环将此细菌转移到新鲜的斜面培养基上，在 37℃±1℃ 下培养 16h~20h。

7.3 样品的制备

7.3.1 对照样品

对照样品（样品A）为未经抗菌处理的普通不锈钢，样品标准尺寸为 10mm×10mm，厚度不大于 5mm，样品表面用 240#、400#、600#、800#、1000#、1500#、2000# 的水磨砂纸逐级打磨，每一级打磨相对于上一级打磨旋转 90°，以便将上一级磨痕磨掉。至少准备 6 片样品，3 片用于接种细菌后立即测试活菌数，3 片用于测量接种试验时间后的活菌数。

注：对于无法制备未经抗菌处理样品的情况，对照样品可以采用卫生级高密度聚乙烯（HDPE）注塑成型，标准尺寸为 10mm×10mm，厚度不大于 5mm，要求其本身不具有抗菌作用且对试验结果的判定无影响。。

7.3.2 抗菌不锈钢样品

抗菌不锈钢样品（样品B）为经抗菌处理的不锈钢，样品标准尺寸为 10mm×10mm，厚度不大于 5mm，样品表面用 240#、400#、600#、800#、1000#、1500#、2000# 的水磨砂纸逐级打磨，每一级打磨相对于上一级打磨旋转 90°，以便将上一级磨痕磨掉。至少准备 3 片样品。

7.3.3 样品消毒

样品在试验前应进行消毒，建议用消毒剂（75%乙醇溶液）进行超声清洗15min后，用无菌水冲洗，自然干燥。

7.4 菌悬液的制备

用接种环从 7.2 培养基上取少量（刮 1~2 环）新鲜细菌，加入到 5mL~8mL 无菌生理盐水中，确保细菌分散均匀，采用比浊法测试细菌浓度。随后依次做 10 倍递增稀释液，选择菌液浓度 1.0×10^7 CFU/mL ~ 5.0×10^7 CFU/mL 的稀释液作为试验用细菌接种悬液。

7.5 样品接种

将样品 A 和样品 B 分别放入 24 孔板中，用无菌枪头吸取 10 μ L 配制好的菌悬液滴加到每个孔中的样品表面上，铺展菌液确保细菌与样品表面的充分接触同时无明显厚度液膜在样品表面形成。

接种液应在表面充分铺展，并且在铺展的过程不应溢出。对于有些疏水性非常强的表面，可通过在接种液中添加表面活性剂（如含氟表面活性剂等）来增强表面的润湿性；对于有些亲水性非常强的表面，可通过减少菌液体积以适应试样表面，但菌液体积不应少于 5 μ L，并应增加接种液的细菌浓度来保证具有规定数量的细菌。

7.6 接种样品的培养

除特别说明外，含有接种试样的孔板，在 $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度 RH 大于 90% 的条件下培养 1h~4h，培养时间根据接种液体积及材料抗菌性能确定。根据在培养温度下测得的抗菌性能值来确定抗菌不锈钢的抗菌效果。

7.7 样品上的细菌回收

7.7.1 样品接种后即时测试

接种后，立即对已接种的 3 片样品 A 进行细菌回收，将样品连同其上菌液一同取出，放入离心管中，加入 3mL 的洗脱液稀释细菌悬液，充分涡旋振荡。以此种方法得到样品 A 上的即时接种活菌数。

7.7.2 样品接种培养后测试

根据 7.6 的程序培养后，按 7.7.1 对样品 B 和剩余的样品 A 表面的细菌进行回收处理，随后立即对回收的活菌进行计数（见 7.8）。

7.8 平板培养法测定活菌数

用无菌生理盐水（见 4.2.2）对按 7.7 处理过的细菌回收液进行 10 倍逐级稀释，用移液器从回收液和逐级稀释液中各吸取 0.1mL 加至营养琼脂培养基中，使用灭菌三角耙将菌液均匀涂布于琼脂培养基平板上，每种稀释度的溶液各涂布两个平板。倒置平板并置于 $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温箱中培养 24h~48h。到达时间点后，对菌落数在 30~300 的平板进行菌落计数，并记录相应的稀释倍数。如果 0.1mL 的洗脱液中的菌落数小于 30，则直接对该平板进行计数；如果所有平板中均没有菌落，则记为 <1。

8 试验结果

8.1 活菌数测定

对于每个试样，都按照式（1）来计算活菌数。

$$N=10 \times C \times D \times V \dots\dots\dots (1)$$

式中：

N ——每个试样每平方厘米的活菌数；

C ——两个平板培养基的平均菌落数；

D ——稀释倍数；

V ——用于洗脱的洗脱液体积。

计算每组试样回收活菌数的几何平均数并记录菌数时取 2 位有效数字，若某一稀释倍数的所有琼脂平板上都没有菌落，则将活菌计作 $< V$ （用于洗脱的洗脱液体积 mL）。计算平均数时，如各稀释度均没有菌数，则记录为 V 。

例如： $V=3\text{mL}$ ，计算所得平均数为 3。

8.2 试验有效的条件

当满足以下条件时，试验认定为有效，否则试验无效，应重新进行试验：

1) 同一样品 A 的 3 个即时接种回收活菌数应满足式 (2) 的要求：

$$(L_{\max} - L_{\min}) / L_{\text{mean}} \leq 0.3 \quad (2)$$

式中： $L_{\max}$ ——样品上最大回收活菌数的对数值；

$L_{\min}$ ——样品上最小回收活菌数的对数值；

L_{mean} ——样品上平均回收活菌数的对数值；

2) 样品 A 不应具有明显的抗菌作用；

3) 每个样品 A 经培养后的回收活菌数应均不小于样品 A 即时接种活菌数的 10%。

8.3 抗菌率的计算

在试验被认为有效的情况下，抗菌率按式 (3) 计算，结果保留到小数点后 1 位：

$$R = (A_m - B_m) / A_m \times 100 \% \quad (3)$$

式中：

R ——抗菌率；

A_m ——样品 A（或空白对照组）接种培养后的平均回收活菌数，单位为细菌数每片（CFU/片）；

B_m ——样品 B 接种培养后的平均回收活菌数，单位为细菌数每片（CFU/片）。

9 试验报告

试验报告应包括以下信息：

- 注明采用本文件；
- 经抗菌处理和未经抗菌处理的不锈钢材质、尺寸、形状和厚度；
- 试验用菌种和菌株号，如采用其他菌种需说明原因；
- 接种菌液的体积；
- 洗脱液的体积；
- 孵育时间；
- 抗菌性能值；
- 若采用了不同于本文件的一些操作，如清洗方法变更、菌液回收方法变更及培养温度不同时，均应详细说明；
- 实验室的名称等识别资料及实验室负责人的姓名和签字；
- 试验开始日期；
- 试验报告日期。

参考文献

- [1] GB/T 31402—2015 塑料 塑料表面抗菌性能试验方法
- [2] JIS Z 2801:2000 Antimicrobial products-Test for antibacterial activity and efficacy
- [3] ASTM E 1054 Standard test methods for evaluation of inactivators of antimicrobial agents
- [4] ISO/IEC 17025:2000 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- [5] Zhang, X. R., Yang, C. G. and Yang, K. Contact-killing of Cu-bearing stainless steel based on charge transfer caused by the microdomain potential difference, ACS Applied Materials & Interfaces, 12 (2020), pp. 361-372.