ICS 59.080.01
W 04

中华人民共和国国家标准

GB/T 20944.3—2008

纺织品　抗菌性能的评价
第3部分:振荡法

Textiles—Evaluation for antibacterial activity—
Part 3: Shake flask method

2008-04-29 发布　　2008-12-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会　发布

前　言

GB/T 20944《纺织品　抗菌性能的评价》分为三个部分：

——第1部分：琼脂平皿扩散法；

——第2部分：吸收法；

——第3部分：振荡法。

本部分为GB/T 20944的第3部分。

本部分由中国纺织工业协会提出。

本部分由全国纺织品标准化技术委员会基础分委会(SAC/TC 209/SC 1)归口。

本部分主要起草单位：深圳市北岳海威化工有限公司、国家纺织制品质量监督检验中心、上海市纺织科学研究院南方测试中心、中国人民解放军特种防护服装质量检测中心、杭州新华诺芙特卫生材料有限公司、浙江笑雪服饰有限公司、浙江浪莎袜业有限公司、中国针织工业协会。

本部分主要起草人：邹海清、王俊起、王友斌、刘晨、张华、倪济云、李洪、盛军棋、刘爱莲、王智。

本部分首次发布。

纺织品　抗菌性能的评价
第3部分:振荡法

1　范围

GB/T 20944的本部分规定了采用振荡法测定纺织品抗菌性能的定量试验和评价方法。

本部分适用于羽绒、纤维、纱线、织物,以及特殊形状的制品等各类纺织产品,尤其适用于非溶出型抗菌纺织产品。

本部分不涉及抗菌产品安全性的评价。

2　规范性引用文件

下列文件中的条款通过GB/T 20944的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB/T 12490　纺织品　色牢度试验　耐家庭和商业洗涤色牢度(GB/T 12490—2007,ISO 105-C06:1994,MOD)

3　术语和定义

下列术语和定义适用于GB/T 20944的本部分。

3.1

抗菌性能　antibacterial activity

纺织品所具有的能抑制织物上的细菌生长繁殖的性能。

3.2

对照样　control fabric

用于验证试验微生物生长条件的、不经任何处理的100%棉织物。

注:已被证明采用色牢度试验用的棉标准贴衬织物,经高温蒸煮和蒸馏水洗涤后作为对照样是合适的。

4　安全预防措施

安全须知:本试验所采用的试验菌能使人感染致病,应采取一切必要的预防措施,免除对人员和环境的危害,试验应由经过培训的人员进行。

5　原理

将试样与对照样分别装入一定浓度的试验菌液的三角烧瓶中,在规定的温度下振荡一定时间,测定三角烧瓶内菌液在振荡前及振荡一定时间后的活菌浓度,计算抑菌率,以此评价试样的抗菌效果。

6　试验器具

6.1　分光光度计:检测波长475 nm或660 nm适合于测试试验菌液的浓度。

6.2　恒温培养箱:温控精度为±1℃。

6.3　水浴锅:温度能保持在46℃±2℃。

6.4　恒温振荡器(摇床):温度精度为±1℃。

6.5 冰箱：温度能保持在5℃～10℃。

6.6 玻璃门冷藏箱：温度能保持在5℃～10℃。

6.7 高压灭菌锅：温度能保持在121℃，压力能保持在103 kPa。

6.8 带塞三角烧瓶：容量为250 mL。

6.9 培养皿：直径90 mm。

6.10 旋涡式振动器。

6.11 二级生物安全柜。

6.12 试管、吸管、烧瓶等实验室常用器具。

7 培养基和试剂

试验所用试剂应是分析纯的或适合于微生物试验用的。试验用水应是纯水，如蒸馏水。

注：建议使用现有商业化的脱水原料制备培养基，并严格按照相关产品制造商的使用说明操作。

7.1 营养肉汤

牛肉膏	3 g
蛋白胨	5 g
蒸馏水	（最终定容至）1 000 mL

灭菌后，pH值为6.8±0.2。

7.2 营养琼脂培养基

牛肉膏	3 g
蛋白胨	5 g
琼脂粉	15 g
蒸馏水	（最终定容至）1 000 mL

灭菌后，pH值为6.8±0.2。

7.3 沙氏琼脂培养基

葡萄糖	40 g
蛋白胨	10 g
琼脂粉	20 g
蒸馏水	（最终定容至）1 000 mL

灭菌后，pH值为5.6±0.2。

7.4 0.03 mol/L PBS（磷酸盐）缓冲液

磷酸氢二钠	2.84 g
磷酸二氢钾	1.36 g
蒸馏水	（最终定容至）1 000 mL

灭菌后，pH值为7.2～7.4，5℃～10℃保存备用。

8 试验菌种

8.1 菌种

革兰氏阳性细菌：金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*（ATCC 6538）；

革兰氏阴性细菌：大肠杆菌 *Escherichia coli*（8099或ATCC 11229、ATCC 8739、ATCC 29522三者中的一种），或肺炎克雷白氏菌 *Klebsiella pneumoniae*（ATCC 4352），根据需要选一种；

白色念珠菌 *Candida albicans*（ATCC 10231）。

注1：可使用加入世界菌种保藏联合会（WFCC）的菌种保藏机构提供的、与上述菌种等效的试验菌。

注2：如果需要，可采用其他的试验菌种，培养基成分、培养温度和培养方法应根据要求调整。

8.2 菌种转种及保存

冻干菌激活后接种斜面试管培养，然后贮存于冰箱（5℃～10℃），作为保存菌。每一个月应转种一次，转种后放于冰箱（5℃～10℃）保存，转种次数不应超过10代。若转种后保存时间超过一个月，不能用于下一次转种。

8.3 标识

对每个菌种应标注如下信息：

a） 供应冻干菌的菌种保藏机构名称；

b） 冻干菌的名称和编号；

c） 冻干菌的批号；

d） 冻干菌激活日期；

e） 保存菌的贮藏日期；

f） 保存菌的实验室编号。

9 试验菌液的准备

9.1 细菌菌液的培养和准备

9.1.1 两步预培养程序制备细菌接种菌悬液

从3代～10代的细菌保存菌种（8.2）试管斜面中取一接种环细菌，在营养琼脂平板（7.2）上划线。于37℃±1℃，培养18 h～24 h。用接种环从平板中挑出一个典型菌落，接种于20 mL营养肉汤（7.1）中。37℃±1℃，130 r/min，振荡培养18 h～20 h，即制成了接种菌悬液。菌液含量采用分光光度计法或稀释法测定，活菌数应达到1×10^{9} CFU/mL～5×10^{9} CFU/mL。此新鲜菌液应在4 h内尽快使用，以保证接种菌的活性。

9.1.2 细菌接种菌液的准备

用吸管从细菌悬液（9.1.1）中吸取2 mL～3 mL（参考数值。由此步骤调整接种活菌数目，大肠杆菌取下限，金黄色葡萄球菌取上限），移入装有9 mL营养肉汤（7.1）的试管中，充分混匀。吸取1 mL移入另一支装有9 mL营养肉汤（7.1）的试管中，充分混匀。吸取1 mL移入装有9 mL 0.03 mol/L PBS缓冲液（7.4）的试管中，充分混匀。吸取5 mL移入装有45 mL 0.03 mol/L PBS缓冲液（7.4）的三角烧瓶中。充分混匀，稀释至含活菌数目3×10^{5} CFU/mL～4×10^{5} CFU/mL（由此固定的4次稀释程序，此接种菌液中含有微量的营养肉汤），用来对试样接种。此接种菌液应在4 h内尽快使用，以保持接种菌的活性。

9.2 白色念珠菌菌液的培养和准备

9.2.1 两步预培养程序制备白色念珠菌接种菌悬液

从3代～10代的白色念珠菌保存菌种（8.2）试管斜面中取一接种环，在沙氏琼脂平板（7.3）上划线，于37℃±1℃，培养18 h～24 h。用接种环从平板中挑出典型的菌落，接种于沙氏琼脂培养基（7.3）试管斜面，37℃±1℃，培养18 h～24 h，得新鲜培养物，再往此试管中加入5 mL 0.03 mol/L PBS缓冲液（7.4）。反复吹吸，洗下新鲜菌苔。然后用5 mL吸管将洗脱液移至另一支无菌试管中，用旋涡式振动器混合20 s或在手上振摇80次，使其充分混匀，即制成了接种菌悬液。此菌悬液含量采用分光光度计法或稀释法测定，活菌数应达到1×10^{8} CFU/mL～5×10^{8} CFU/mL。此新鲜菌液应在4 h内尽快使用，以保证接种菌的活性。

9.2.2 白色念珠菌接种菌液的准备

用吸管从白色念珠菌悬液（9.2.1）中吸取2 mL～4 mL，移入装有9 mL 0.03 mol/L PBS缓冲液（7.4）的试管中，进行10倍系列稀释操作，充分混匀。吸取5 mL移入装有45 mL 0.03 mol/L PBS缓

冲液(7.4)的三角烧瓶中,充分混匀。稀释至含活菌数 2.5×10^5 CFU/mL～3×10^5 CFU/mL,用来对试样接种(可在此三角烧瓶中适量加入直径 2 mm～3 mm 的小玻璃球振摇,以利撞碎结块的菌团,使接种菌液更均匀)。此接种菌液应在 4 h 内尽快使用,以保持接种菌的活性。

10 试样的准备

10.1 样品洗涤

试样如需洗涤,应选用 10.1.1 或 10.1.2 的洗涤方法的一种进行操作,并在试验报告中注明采用的洗涤方法。

10.1.1 耐洗色牢度试验机洗涤方法

从抗菌织物大样中取 3 个小样(每个尺寸 10 cm×10 cm,剪成 2 块),按 GB/T 12490 中的试验条件 A1M 进行洗涤,采用 ECE 无磷标准洗涤剂。下述程序相当于 5 次洗涤:水温 40℃±3℃,洗涤剂浓度 0.2%,150 mL 溶液,钢珠 10 粒,洗 45 min。洗涤后取出试样,在 40℃±3℃和 100 mL 的水中清洗两次,每次 1 min。重复此程序,直至规定的洗涤次数。为防止残留的洗涤剂干扰抗菌性能测试,最后一个程序结束时充分清洗样品,然后晾干或烘干。

10.1.2 家用双桶洗衣机洗涤方法

从抗菌织物大样中取 20 g 以上的小样,试验条件为 40℃±3℃,浴比 1∶30, AATCC 1993 WOB 无磷标准洗涤剂浓度 0.2%。下述程序相当于 5 次洗涤(以 20 g 布样为例,实际试验应根据试样按比例增加水量及洗涤剂):在洗衣机中加入 40℃±3℃热水 6 L,试样 20 g 及陪洗织物 180 g,洗涤剂 12 g,开机洗涤 25 min。排水,6 L 自来水注洗 2 min。取出织物,离心脱水 1 min。再用 6 L 自来水注洗 2 min,取出织物,离心脱水 1 min。重复此程序,直至规定的洗涤次数。为防止残留的洗涤剂干扰抗菌性能测试,最后一个程序结束时应充分清洗样品,然后晾干或烘干。

10.2 试样

将抗菌织物样及对照样分别剪成约 5 mm×5 mm 大小的碎片,称取 0.75 g±0.05 g 作为一份试样,用小纸片包好。根据试验需要称取多份试样,每份试样均用小纸片包好。

未经抗菌处理织物样若需检测也按此规定剪碎、称量并用小纸片包好。

10.3 试样灭菌

将装有试样的小纸包放入高压灭菌锅,于 121℃、103 kPa 灭菌 15 min。备用。

若试样不宜采用高压蒸汽灭菌,可采用其他方法灭菌,但所用的灭菌方法不应影响抗菌性能和检测结果;对同一个检测样本的试样、对照样应采用同一种灭菌方法。

11 试验操作

11.1 试样及试剂装瓶

准备 9 个 250 mL 三角烧瓶。在其中 3 个烧瓶中各加入对照样 0.75 g±0.05 g,3 个烧瓶中各加入抗菌织物试样 0.75 g±0.05 g,另 3 个烧瓶不加试样作为空白对照。然后在每个烧瓶中各加入 70 mL±0.1 mL 0.03 mol/L PBS 缓冲液(7.4)。

若需要,可另增加 3 个三角烧瓶,各装入 0.75 g±0.05 g 未经抗菌处理织物试样,并各加入 70 mL±0.1 mL 0.03 mol/L PBS 缓冲液(7.4),以考察未经抗菌处理织物试样的相关性能。

注:空白对照用于观察试验菌的接种浓度,并观察试验菌在试验期内的活性,防止因其自身的衰减获得虚高的试验结果。

11.2 “0”接触时间制样

用吸管往 3 个对照样烧瓶和 3 个对照烧瓶中各加入 5 mL 接种菌液(9.1.2 或 9.2.2)。盖好瓶塞,

放在恒温振荡器上，在24℃±1℃，以250 r/min～300 r/min，振荡1 min ± 5 s，然后进行下一步“0”接触时间取样。

11.3 “0”接触时间取样

用吸管在“0”接触时间制样的6个烧瓶中各吸取1 mL±0.1 mL溶液，移入装有9 mL±0.1 mL 0.03 mol/L PBS缓冲液(7.4)的试管中，充分混匀。用10倍稀释法再进行1次稀释，充分混匀。吸取1 mL±0.1 mL移入灭菌的平皿，倾注营养琼脂培养基(7.2)或沙氏琼脂培养基(7.3)约15 mL。每个10^2稀释倍数的试管分别吸液制作两个平板作平行样。室温凝固，倒置平板，37℃±1℃培养24 h～48 h(白色念珠菌48 h ～72 h)。记录每个平板中的菌落数。

注：对照样接种“0”接触时间取样并倾注平板培养后，在此10^2稀释倍数平板中，金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的平均菌落数宜控制在200 CFU ～250 CFU的范围，白色念珠菌的平均菌落数宜控制在150 CFU ～200 CFU的范围，否则影响试验精确度。

11.4 定时振荡接触

用吸管往3个抗菌织物试样烧瓶中各加入5 mL接种菌液(9.1.2或9.2.2)，盖好瓶塞。已完成“0”接触时间取样且盖好瓶塞的另6个烧瓶不需再加接种液。再将此9个试样的烧瓶置于恒温振荡器上，在24℃±1℃，以150 r/min，振荡18 h。

注：若另增加了3个未经抗菌处理织物试样，则在此试样烧瓶中也各加入5 mL接种菌液(9.1.2或9.2.2)，并盖好瓶塞。与其他试样在相同条件振荡18 h。

11.5 稀释培养及菌落数的测定

到规定时间后，从每个烧瓶中吸取1 mL±0.1 mL试液，移入装有9 mL±0.1 mL 0.03 mol/L PBS缓冲液(7.4)的试管中，充分混匀。用10倍稀释法系列稀释至合适稀释倍数。用吸管从每个稀释倍数的试管中分别吸取1 mL±0.1 mL移入灭菌的平皿，倾注营养琼脂培养基(7.2)或沙氏琼脂培养基(7.3)约15 mL。每个稀释倍数的试管分别吸液制作两个平板作平行样。室温凝固，倒置平板，37℃±1℃培养24 h ～48 h(白色念珠菌48 h ～72 h)。

选择菌落数在30 CFU ～300 CFU之间的合适稀释倍数的平板进行计数。若最小稀释倍数平板中的菌落数＜30，则按实际数量记录；若无菌落生长，则菌落数记为“＜1”。

两个平行平板的菌落数相差应在15%以内，否则此数据无效，应重作试验。

12 结果的计算及评价

12.1 活菌浓度的计算

根据两个平板得到的菌落数，按式(1)计算每个试样烧瓶内的活菌浓度(保留两位有效数)。

$$K = Z \times R \qquad \cdots\cdots (1)$$

式中：

K——每个试样烧瓶内的活菌浓度(CFU/mL)；

Z——两个平板菌落数的平均值；

R——稀释倍数。

12.2 试验有效性的判断

根据式(2)计算试验菌的增长值F。对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌等细菌，当F大于或等于1.5；对白色念珠菌，当F大于或等于0.7，且对照烧瓶中的活菌浓度比接种时的活菌浓度增加时，试验判定为有效。否则试验无效，需重新进行试验。

$$F = \lg W_t - \lg W_0 \qquad \cdots\cdots (2)$$

式中：

F——对照样的试验菌增长值；

W_t——3个 对照样18 h振荡接触后烧瓶内的活菌浓度的平均值(CFU/mL)；

W_0——3 个对照样“0”接触时间烧瓶内的活菌浓度的平均值(CFU/mL)。

12.3 抑菌率的计算

振荡接触 18 h 后,比较对照样与抗菌织物(或未抗菌处理织物)试样烧瓶内的活菌浓度,按式(3)计算抑菌率(保留两位有效数)。

$$Y = \frac{W_t - Q_t}{W_t} \times 100\% \qquad \cdots\cdots(3)$$

式中:

Y——试样的抑菌率;

W_t——3 个 对照样 18 h 振荡接触后烧瓶内的活菌浓度的平均值(CFU/mL);

Q_t——3 个抗菌织物(或 3 个未抗菌处理织物)试样 18 h 振荡接触后烧瓶内的活菌浓度的平均值(CFU/mL)。

12.4 结果的表达

以抑菌率的计算值作为结果。当抑菌率计算值为负数时,表示为“0”;当抑菌率计算值≥0 时,表示为“≥0”。

12.5 抗菌效果的评价

对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的抑菌率≥70%,或对白色念珠菌的抑菌率≥60%,样品具有抗菌效果。

13 试验报告

试验报告应包括下列内容:

a) 试验是按本部分进行的;

b) 样品和对照样的描述;

c) 样品的预处理(例如,消毒、洗涤次数);

d) 试验菌种名称、编号及接种浓度;

e) 对照样的增长值 F,包括 W_t 和 W_0;

f) 试样的 Q_t;

g) 抑菌率;

h) 抗菌效果的评价;

i) 试验人员和试验日期;

j) 试样的洗涤方法;

k) 任何偏离本部分的情况。