

中華民國國家標準

C N S

紡織品－紡織產品抗菌活性 之測定

Textiles – Determination of
antibacterial activity of textile
products

CNS 13907(草-修
1110117):~~2021~~2023

中華民國 年 月 日制定公布
Date of Promulgation: - -

中華民國 年 月 日修訂公布
Date of Amendment: - -

本標準非經經濟部標準檢驗局同意不得翻印

目錄

節次	頁次
前言	3
1. 適用範圍	4
2. 引用標準	4
3. 用語及定義	4
4. 安全措施	5
5. 設備	5
5.1 分光光度計	5
5.2 培養箱	5
5.3 水浴	5
5.4 混拌機	5
5.5 拍擊式均質機	5
5.6 無塵實驗台	5
5.7 洗衣機	5
5.8 溫濕度試驗箱	5
5.9 螢光光度計	5
5.10 壓印裝置	65
5.11 冰箱	6
5.12 冷凍裝置	6
5.13 天平	6
5.14 過濾裝置	6
5.15 移液管(或稱吸量管)	6
5.16 試樣瓶	6
5.17 培養皿	6
5.18 玻璃棒	6
5.19 沸石或陶瓷珠	6
5.20 角錐瓶	6
5.21 裁切模板	6
5.22 拋棄式塑膠袋	6
5.23 鑷子	6
5.24 不鏽鋼圓筒	6
5.25 金屬網籃	76
5.26 鋁箔	76
5.27 往復式培養振盪機	7
5.28 滅菌釜	7
5.29 pH 計	7

(共 35 頁)

6. 試劑與培養基	7
6.1 水	7
6.2 胰蛋白大豆培養液	7
6.3 胰蛋白大豆瓊脂	7
6.4 移轉接種用瓊脂	8
6.5 營養培養液	8
6.6 蛋白胨鹽水	8
6.7 生理食鹽水	8
6.8 含卵磷脂與聚山梨醇酯 80 的大豆-酪蛋白營養液介質	98
6.9 振落細菌的懸浮液之稀釋緩衝液	109
6.10 中和溶液	109
6.11 計數用瓊脂	109
6.12 壓印用瓊脂	1140
6.13 細菌品種的低溫保護液	1140
6.14 ATP 標準試劑儲備溶液	1140
6.15 ATP 發光劑的緩衝溶液	1140
6.16 ATP 發光劑	1244
6.17 ATP 萃取劑	1244
6.18 ATP 去除劑	1244
6.19 製備 ATP 參比溶液的 SCDLP 或其他介質	1342
6.20 振落細菌之生理食鹽水	1342
7. 標準菌種	1342
7.1 菌種	1342
7.2 菌種活化(Restoration)與儲存	1342
8. 試驗步驟	1514
8.1 吸收法	1514
8.2 移轉法	1948
8.3 壓印法	2224
9. 抗菌效果的判斷	2624
10. 試驗報告	2624
附錄 A (規定)菌種編號	2725
附錄 B (規定)振落方法	2826
附錄 C (規定)平板計數法定量量測	2927
附錄 D (規定)螢光法定量量測	3028
附錄 E (參考)試驗範例	3230
附錄 F (參考)抗菌活性的效果	3735

前言

本標準係依據 2021 年發行之第 3 版 ISO 20743，不變更技術內容，制定成為中華民國國家標準者。

本標準係依標準法之規定，經國家標準審查委員會審定，由主管機關公布之中華民國國家標準。

依標準法第四條之規定，國家標準採自願性方式實施。但經各該目的事業主管機關引用全部或部分內容為法規者，從其規定。

本標準並未建議所有安全事項，使用本標準前應適當建立相關維護安全與健康作業，並且遵守相關法規之規定。

本標準之部分內容，可能涉及專利權、商標權與著作權，主管機關及標準專責機關不負責任何或所有此類專利權、商標權與著作權之鑑別。

1. 適用範圍

本標準規定測定所有抗菌紡織品(包括非織物不織布)測定抗菌性能之定量試驗法。本標準可適用於所有的紡織產品，包括布料、襯墊(wadding)、衣服的縫線與材料、被褥.bedclothes)、家居飾物及各種物品，不管其所使用的抗菌劑形式(有機、無機、天然或人造)或施用方式(內建、後處理或接枝聚合)。

本標準涵蓋 3 種測定抗菌性能的接種(inoculation)方法：

- (a) 吸收法(absorption method)：將試驗細菌懸浮液直接接種在紡織品上的評估方法。
- (b) 移轉法(transfer method)：將試驗細菌置於瓊脂平板上，再移轉至試片上之評估方法。
- (c) 轉壓印法(printing method)：將試驗細菌置在濾膜上，再壓印於試片上之評估方法。

譯注：此名稱請技術委員找出相關專業用語討論，暫時以壓印命之，討論完後全文照改。

備考：使用者可依據織物產品要使用的原訂用途與環境，以及紡織品性質中的表面性質，決定最適合的接種方法。

本標準同時規定細菌計數量測的菌落平板技術法(colony plate count method)與三磷酸腺核苷(adenosine triphosphate, ATP)發光法。

2. 引用標準

下列標準因本標準所引用，成為本標準之一部分。下列引用標準適用最新版(包括補充增修)。

CNS 15140 紡織品－紡織品試驗之家庭洗滌及乾燥程序

3. 用語及定義

下列用語及定義適用本標準。

3.1 控制組紡織品(control fabric)

確證試驗細菌生長情況及確證整個試驗所使用的紡織品。

備考：可使用與受測紡織品相同而無抗菌處理的紡織品，或無螢光增白劑或抑菌處整理的 100 %棉紡織品。

3.2 抗菌劑(antibacterial agent)

設計防止或減緩細菌生長、降低細菌數量或滅殺細菌的產品。

3.3 抗菌處理(antibacterial agent) antibacterial finish

設計防止或減緩細菌生長、降低細菌數量或滅殺細菌的處理。

3.4 抗菌活性(antibacterial activity)

抗菌處理(3.3)用於防止或減緩細菌生長、降低細菌數量或滅殺細菌的活性。

3.5 平板計數法(plate count method)

根據十倍稀釋法，以計數菌落數方式，計算經培養後所存在的細菌數之方法。

備考：此結果以菌落形成單位(Colony Forming Unit, CFU)表示。

3.6 發光法(luminescence method) 螢光法

量測含於細菌細胞中 ATP 量之方法。

備考：此結果以 ATP 之莫耳數表示。

3.7 中和劑(neutralizer)

用以鈍化、中和或消止抗菌劑(3.2)之抗菌性的化學試劑。

可去活性、中和或抑制抗菌劑...

4. 安全措施

本試驗方法會需要使用細菌。

該等試驗在使用微生物技術時，需要經訓練並有經驗的人員操作。

應遵守主管機關法規所考量的適當安全措施。

5. 設備

設備為一般實驗室試驗裝置，特殊裝置如下。

5.1 分光光度計

能量測波長 620 nm~660 nm 的光度計，或是 McFarland's 濁度計(nephelometer)。

5.2 培養箱

能維持恆溫在 37 °C±2 °C 或 20 °C±2 °C。

譯注：原文並無 20 °C±2 °C，但 8.3.4.2 節的溫濕度條件，要求在該培養箱中以 20 °C±2 °C 狀態調節，所以需要更改該節或增列此處溫度條件。

5.3 水浴

一個能維持恆溫在 46 °C±2 °C，另 ~~一~~一個能在 70 °C~90 °C 維持恆溫。

5.4 混拌機

會產生漩渦式振盪作用之混拌機。

5.5 拍擊式均質機(Stomacher) 鐵胃均質機

使用配合的一次性容器(無菌袋)時，能每秒鐘拍擊(6~8)次。

備考：此設備又稱鐵胃。

譯注：參考今日儀器型錄及華人知識百科：

<https://www.todays.com.tw/product-3a.asp?ser=2520&headpic=>

<https://www.easyatm.com.tw/wiki/拍擊式均質器>

5.6 無塵實驗台(Clean bench) 生物安全操作台

供微生物試驗用。

5.7 洗衣機

符合 CNS 16140 之規定。

譯注：本標準從頭到尾沒有用到洗衣機，只有一句 CNS 16140 規定方法洗滌，JIS 中亦無此項目，建議可以刪除。

5.8 溫濕度試驗箱

能維持相對濕度大於 70 % 高濕度環境條件之熱帶箱(tropical chamber)或其他容器。

5.9 螢光光度計

使用螢光試劑時，在 200 nm～600 nm 範圍，可以量測(10^{-12} ～ 10^{-7}) mole/L 的 ATP。

在 300 nm～650 nm

5.10 壓印裝置

能對試片施加 4 N 的力，並能以 3 s 的時間將試片旋轉 180°。

5.11 冰箱

能維持溫度在(2～8) °C的冰箱。

5.12 冷凍裝置

一個能調整至-70 °C以下，另一個能調整至-20 °C以下的裝置。

5.13 天平

具有解析度優於 0.01 g 及 0.1 mg 的天平。

精密..

5.14 過濾裝置

由具濾膜的上層容器與具抽氣口的下層容器組成。

5.15 移液管(或稱吸量管)

具有配合各用途的最適合體積；配備玻璃或塑膠製的吸管尖；具有 0.5 %或更佳的公差。

5.16 試樣瓶

30 mL 的玻璃瓶，具有螺紋瓶口，配備鐵氟龍或矽膠墊片及聚丙烯/聚碳酸酯或其他適合材料的瓶蓋。

5.17 培養皿

經過滅菌、由玻璃或塑膠製、直徑為(90～100) mm 或(55～60) mm。

5.18 玻璃棒

直徑約 18 mm。

5.19 沸石或陶瓷珠

直徑為(3～4) mm。

譯注：後面並未用玻璃珠而是陶瓷珠(7.2.2)。

5.20 角錐瓶

容量為 100 mL。

5.21 裁切模板

由可滅菌的材料製成(例：不鏽鋼或玻璃)，一個為直徑(38±1) mm，另一個為直徑(60±1) mm。

5.22 拋棄式塑膠袋 拋棄式無菌袋

適合盛裝食物產品的滅菌袋，用於其中一種試片振盪方法。

5.23 鑷子

由可滅菌的材料製成。

5.24 不鏽鋼圓筒

質量為(200±10) g，直徑為(35±1) mm。

5.25 金屬網籃

適用高溫高壓蒸氣處理滅菌處理。

5.26 鋁箔

5.27 往復式培養振盪機往復式振盪培養箱

5.28 滅菌釜

能以(121±1) °C及(103±5) kPa 滅菌。

溫度可達 121 °C 及壓力需達 103 kPa(15 lb/in²)。[參考生物醫療廢棄物滅菌效能測試方法—嗜熱桿菌芽孢測試法 (NIEA R356.00B) 滅菌條件]

<https://www.epa.gov.tw/nica/B19D7F051DCA45F0>

5.29 pH 計

具有玻璃電極。

6. 試劑與培養基

試驗所使用的試劑須為分析品質及/或適用微生物用途。

製備培養基時建議使用市售之脫水培養基，製備該類產品時須嚴格遵守製造廠商使用說明。

6.1 水

試驗所使用的水應為微生物培養用的分析級水，其為下列一種或多種方式處理之水：

所使用的水必須為無毒性或沒有抑制細菌的物質。

- (a) 新鮮蒸餾
- (b) 以離子交換處理
- (c) 以超過濾(Ultra-filtered)處理
- (d) 以逆滲透過濾處理

所使用的水必須為無毒性物質或會抑制細菌的物質。

6.2 胰蛋白大豆培養液(Tryptone soya broth,TSB)

依配方充分混合後，調整 pH 至(7.2±0.2)，再以滅菌釜(5.28)滅菌。其配方如下：

譯注：後續各節均以此方式改寫並以表格方式表示。

配方	用量	說明
胰朊(Tryptone) <u>胰化蛋白朊</u>	17 g	為胰酵素水解酪蛋白
大豆蛋白朊(Soya peptone)	3 g	為木瓜酵素水解大豆蛋白
氯化鈉(NaCl)	5 g	
葡萄糖(Glucose)	2.5 g	
磷酸氫二鉀(Dipotassium hydrogen phosphate)	2.5 g	
水	1,000 mL	

6.3 胰蛋白大豆瓊脂(Tryptone soya agar,TSA)

依配方充分混合後，調整 pH 至(7.2±0.2)，再以滅菌釜(5.28)滅菌。其配方如下：

配方	用量	說明
胰朊(Tryptone)	15 g	為胰酵素水解酪蛋白
大豆蛋白朊(Soya peptone)	5 g	為木瓜酵素水解大豆蛋白
氯化鈉(NaCl)	5 g	
洋菜(Agar)	15 g	
水	1,000 mL	

6.4 移轉接種用瓊脂(Agar for transfer)

依配方充分混合後，調整 pH 至(7.2±0.2)，再以滅菌釜(5.28)滅菌。其配方如下：

配方	用量	說明
胰朊(Tryptone)	0.75 g	為胰酵素水解酪蛋白
大豆蛋白朊(Soya peptone)	0.25 g	為木瓜酵素水解大豆蛋白
氯化鈉(NaCl)	5 g	
洋菜(Agar)	15 g	
水	1,000 mL	

6.5 營養培養液(Nutrient broth, NB)

依配方充分混合後，調整 pH 至(6.9±0.2)，再以滅菌釜(5.28)滅菌。其配方如下：

配方	用量	說明
牛肉汁(Beef extract)	3 g	
蛋白朊(peptone)	5 g	
水	1,000 mL	

6.6 蛋白朊鹽水(Nutrient broth, NB) Peptone salt solution

依配方充分混合後，調整 pH 至(6.9±0.2)，再以滅菌釜(5.28)滅菌。其配方如下：

配方	用量	說明
胰朊(Tryptone)	1 g	為胰酵素水解酪蛋白
氯化鈉(NaCl)	8.5 g	
水	1,000 mL	

譯注：ISO 20743:2021 中第一項為 peptone，疑為 Tryptone 之繕誤，JIS 日文版與英文版不一致，日文版顯示該項與 6.4 的第 1 項(Tryptone)相同。

6.7 生理食鹽水(Physiological saline)

依配方充分混合後，再以滅菌釜(5.28)滅菌。其配方如下：

配方	用量	說明
氯化鈉(NaCl)	8.5 g	

水	1,000 mL	
---	----------	--

6.8 含卵磷脂與聚山梨醇酯 80 的大豆-酪蛋白營養液介質(Soybean-Casein Digest Broth with Lecithin & Polysorbate 80 medium, 又稱 SCDLP 介質)

SCDLP 培養液(Soybean-Casein Digest Broth with Lecithin & Polysorbate 80 medium)

依配方充分混合後，調整 pH 至(7.2±0.2)，再以滅菌釜(5.28)滅菌。其配方如下：

配方	用量	說明
蛋白朊(Peptone)	17 g	水解酪蛋白
蛋白朊(Peptone)	3 g	水解大豆蛋白
氯化鈉(NaCl)	5 g	
磷酸氫二鉀(Dipotassium hydrogen phosphate)	2.5 g	
葡萄糖(Glucose)	2.5 g	
卵磷脂(Lecithin)	1 g	
聚山梨醇酯 80 (Polysorbate 80)	7 g	
水	1,000 mL	

如果中和力不足，可能要調整聚山梨醇酯 80 與卵磷脂的含量，或添加其他的中和劑，使用任何未規定的中和劑應記錄其名稱及濃度。

6.9 振落細菌的懸浮液之稀釋緩衝液

含有 0.037 %葡萄糖的 0.005 mole/L 磷酸二氫鈉緩衝溶液，其 pH 值為(7.2±0.2)。

6.10 中和溶液

依配方充分混合後，再以滅菌釜(5.28)滅菌。其配方如下：

配方	用量	說明
聚山梨醇酯 80 (Polysorbate 80)	30 g	
蛋黃卵磷脂(Egg-yolk lecithin)	3 g	
組胺酸鹽酸鹽(Histidine hydrochloride)	1 g	
肉或酪蛋白之蛋白朊(Meat or casein peptone)	1 g	
氯化鈉(NaCl)	4.3 g	
磷酸二氫鉀(Monopotassium phosphate)	3.6 g	
二水合磷酸氫二鉀(Disodium phosphate dihydrate)	7.2 g	
水	1,000 mL	

如果中和力不足，可能要調整聚山梨醇酯 80 與卵磷脂的含量，或添加其他的中和劑，使用任何未規定的中和劑應記錄其名稱及濃度。

6.11 計數用瓊脂(Enumeration agar, EA) 計數用瓊脂改為計數培養基

依配方充分混合後，調整 pH 至(7.2±0.2)，再以滅菌釜(5.28)滅菌。其配方如下：

配方	用量	說明
脫水酵母萃出物—(Dehydrated yeast extract)	2.5 g	
酪蛋白之蛋白腴(casein peptone)	5.0 g	
葡萄糖(Glucose)	1.0 g	
洋菜(Agar)	12 g~ 18 g	視產品凝膠強度調整
水	1,000 mL	

6.12 壓印用瓊脂(Agar for printing)

依配方充分混合後，再以滅菌釜(5.28)滅菌。其配方如下：

配方	用量	說明
洋菜(Agar)	20 g	
水	1,000 mL	

6.13 細菌品種的低溫保護液(Cryoprotective solution for bacterial species) 菌種保存 抗凍保護劑

冷凍時，應使用含有 150 g/L 甘油或 100 g/L 二甲亞砜的低溫保護液，並按下述方法製備：

於 1,000 mL 的 TSB(6.2)或 NB(6.5)中添加 150 g 甘油(Glycerol)或 100 mL 二甲亞砜(dimethylsulfoxide)，充分混合後，再以滅菌釜(5.28)滅菌。

含甘油的溶液，其混合溶液要以滅菌釜(5.28)滅菌。含二甲亞砜的溶液，其混合溶液要以 0.22 μm 濾膜滅菌。

任何市售產品，只要其為含甘油或二甲亞砜的低溫保護液或保存系統，並能將菌株以指定溶液的相同方式保存，該市售產品均可使用。

6.14 ATP 標準試劑儲備溶液(Stock solution of ATP standard reagent)

取 60.5 mg 三水合 5'-三磷酸腺核苷二鈉鹽(Adenosine-disodium 5'-triphosphate trihydrate)以水稀釋至最終體積 1,000 mL，得到濃度為 1×10^{-4} mol/L 的 ATP 標準試劑。

完成製備後，此溶液應置於密封的容器中，並於-20 °C以下低溫保存，自製備完成日起，此溶液逾六個月即不得使用。

適當的三水合 5'-三磷酸腺核苷二鈉鹽用量，可用個別市售產品的 ATP 含量計算。

6.15 ATP 發光劑螢光劑的緩衝溶液(Buffer solution for ATP luminescent reagent)

依配方以水稀釋至 1,000 mL，所得緩衝溶液之 pH 值為(7.5±0.2)，配方如下：

配方	用量	說明
N-[叁(羥甲)甲基]甘胺酸 N-[Tris (hydroxymethyl) methyl]glycine	1,117 mg	以水稀釋至 1,000 mL
二水合乙二胺四乙酸二鈉鹽(EDTA·2H ₂ O) Ethylenediamine disodium tetraacetate dihydrate	183 mg	
二水合醋酸鎂(Magnesium acetate tetrahydrate)	808 mg	
二硫蘇糖醇(DL-dithiothreitol)	6.7 mg	
糊精(Dextrin)	25,000 mg	
蔗糖(Sucrose)	925 mg	

6.16 ATP 發光劑(ATP luminescent reagent) 螢光素

配方如下：

配方	用量	說明
<u>螢光素酶</u> 螢光素酶-(Luciferase)	16.0 mg	EC 編號 1.13.12.7
螢蟲素(D-luciferin)	12.6 mg	
牛血清白蛋白(Bovine serum albumin)	56 mg	
緩衝溶液(Buffer solution)	30 mL	由 6.15 所配製

一旦完全溶解，使用前要在室溫下靜置 15 min，要在配製的 3 h 內使用。

當使用不同的 ATP 發光劑時，其成分應予以紀錄。

6.17 ATP 萃取劑(ATP extracting reagent)

此萃取劑之 pH 值為(12.0±0.5)，配方如下：

配方	用量	說明
N-[叁(羥甲)甲基]甘胺酸 N-[Tris (hydroxymethyl) methyl]glycine	45 mg	
10 %氯化苯銨水溶液 10 %aqueous benzalkonium chloride	0.2 mL	
水	9.8 mL	

當使用不同的 ATP 萃取劑時，其成分應予以紀錄。

6.18 ATP 去除劑(ATP eliminating reagent)

能在 15 min 內將 NB(6.5)中的 ATP 降至 10^{-13} mol/L 之試劑。

要在配製的 8 h 內使用。

此去除劑配方的 pH 為 6.0±0.5，配方如下：

配方	用量	說明
澱粉酶 澱粉酶—(Apyrase)	4.6 國際單位/mL	EC 編號 3.6.1.5
腺苷磷酸去胺 酶 Adenosine phosphate deaminase	46 國際單位/mL	EC 編號 3.5.4.6 或 3.5.4.17
蔗糖(Sucrose)	37 mg	
牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin)	20 mg	
0.05 mol/L 之一水合 2-嗎啉乙磺酸緩衝溶液	10 mL	2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate (MES)

當使用不同的 ATP 去除劑時，其成分應予以紀錄。

備考：有市售的試劑。

6.19 製備 ATP 參比溶液的 SCDLP 或其他介質 (SCDLP or other medium for preparing ATP reference solution)

以 SCDLP 介質(6.8)或其他介質 10 mL，加上 1 mL 的 ATP 去除劑(6.18)，混合後保持於(30~37) °C下 1 h，以防止微生物污染。

接著，將其移到(70~90) °C的水浴中 1 h，再放冷至室溫。以冷凍方式保存此溶液，並在 24 h 之內使用。

如果振落細菌的懸浮液添加中和劑，所得之 ATP 含量超過 10^{-11} mol/L，即須配製此 ATP 參比溶液。

6.20 振落細菌之生理食鹽水(Shake-out physiological saline)

依配方充分混合後，再以滅菌釜(5.28)滅菌。其配方如下：

配方	用量	說明
氯化鈉(NaCl)	8.5 g	
聚山梨醇酯 80 (Polysorbate 80)	2.0 g	
水	1,000 mL	

7. 標準菌種(reference strains)

7.1 菌種

在所有的抗菌活性試驗中，應使用下列菌種，菌種編號應符合附錄 A 所述。

(a) 金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)

(b) 肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)

7.2 菌種活化(Restoration)與儲存

7.2.1 菌種應依供應商的建議，將其活化與儲存。

另外，亦可使用 EN 12353 的方法保存。

7.2.2 陶瓷珠法

按照菌株(culture)所提供的建議，將冷凍乾燥的細菌菌種樣品「菌株」(bacterial strain=菌株)，重新懸浮於 5 mL 之 TSB(6.2)中。抽取懸浮液，將其分離至含 TSA(6.3)的培養皿(5.17)中，於(37±2) °C培養(18~24) h。

在含 TSA(6.3)的培養皿(5.17)中進行菌株純化分離。

培養後，使用培養皿分離出來的菌株，確認菌種的純度。

在確認純度後，製備儲備菌株(stock cultures)。

(a) 抽取 0.7 mL 的 TSB 懸浮液(broth culture)，將其攤平在含 TSA(6.3)的培養皿中，將平板(培養皿)上的菌株以(37±2) °C培養(18~24)h。

取 0.7 mL 的 TSB 懸浮液(broth culture)，塗抹在 TSA 平板培養基上，以(37±2)°C 培養(18~24)h。

譯注：broth culture 在 ISO 中只出現一次，溯其意，應為第一段之 TSB 懸浮液。另外，突然出現“平板”，其實是培養皿(下述亦同)。

(b) 在 TSA 平板培養基(培養皿)的表面加上 10 mL 的低溫保護液(6.13)，並以滅菌過的玻璃塗佈器(sterile glass spreader)將細菌細胞(cell)重新懸浮在溶液中。

已滅菌的玻璃塗抹棒

(c) 從瓊脂表面抽取懸浮的細菌細胞，以 100 mL 低溫保護液(6.13)稀釋，並在 20 °C培養 30 min。

(d) 使用移液管(5.15)抽取 1 mL 稀釋的懸浮液，移至裝有陶瓷珠(5.19)的低溫試樣瓶(5.16)中，搖振試樣瓶使懸浮的細菌細胞均勻分布在陶瓷珠上。

當低溫保護液含有二甲亞碲時，勿使其在室溫下停留超過 1 min。

當低溫保護液含有甘油時，使其在 20 °C下停留 30 min。

(e) 用滅菌過的移液管抽出多餘的低溫保護液，再將試樣瓶放進設定溫度-70 °C 以下的冷凍裝置(5.12)中。

譯注：接下來步驟沒交代是做什麼，經參考 JIS L1902:2015 之 7.2.2(g)，下面步驟係確認懸浮液中的活菌數，但為何要這一步，請微生物專業技術委員指導。

去除(e)標記併入(d)，後面(f)(g)往前遞補改為(c)(f)。

(f) 確認懸浮液中的活菌數

— 使用連續稀釋法(serial dilution method)製備稀釋度為 10^{-6} 及 10^{-7} 的懸浮液。(但是從哪裡取稀釋源，有可能是第一段的懸浮液)

— 每個稀釋的懸浮液各取樣 1.0 mL，移至個別的培養皿(5.17)中，添加(12~15) mL 的營養液(nutritive solution)，並放冷至(45±1) °C，在該菌種所指定的條件下培養(18~24) h。

添加(12~15) mL 至已降溫到(45±1)°C的計數培養基(6.11)

譯注：這裡沒有交代營養溶液為何，JIS L1902 為計數用瓊脂(6.11 的 EA)。

— 計數在平板上的菌株，以確定懸浮液中的菌株濃度低於 5×10^8 CFU/mL。

(g) 將低溫的試樣瓶保存於 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下的冷凍裝置中。

因(e)併入(d)是補充(d)的說明，所以保留(g) 將低溫的試樣瓶保存於 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下的冷凍裝置中，做法描述才完整。

譯注：這句 ISO 重複兩次，JIS 只在前面提過，在最後並沒有再提，事實上試樣瓶放入冷凍裝置，就沒再拿出來，所以，不應該「再」放一次。

7.2.3 甘油懸浮液法

(a) 製備細菌培養液(bacterial culture)

將盛有 5 mL 適當介質的 15 mL 培養試管(culture tube)，接種一個新鮮培養的菌落。通常在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培養 5 h 至過夜，直至細菌培養液達到生長曲線的對數後期或平穩期。

(b) 製備 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冷凍儲備菌種(frozen stock strain)

為了封存，準備有標記的滅菌低溫試樣瓶，供每一個要儲備在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下的菌種使用。每個低溫試樣瓶中放入 225 μL 的 80 %甘油，加入 1 mL 的細菌培養液，冷凍儲備菌種的甘油應為 15 %，使用漩渦混拌機(5.4)充分混合並且儲存於 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下的試管中。

(c) 製備 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的甘油工作儲備菌種(glycerol working stock)

以移液管抽取等量的 80 %甘油與細菌培養液置入有標記的聚丙烯試管，供每個要儲備於 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的菌種，作為液體甘油工作儲備菌種。將該等液體充分混合，避免形成冰晶，冰晶會降低細菌細胞的存活力，將試管放在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冷凍裝置中，如果可能，1 週後查核細菌細胞的存活力。

(d) 活化冷凍儲備菌種

使用滅菌的牙線棒，刮取 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下的冷凍儲備菌種固體碎片，然後將細菌細胞劃在適當的培養基上，使其活化，不得將冷凍儲備菌種解凍，因為每回冷凍-解凍都會造成細菌細胞的存活力喪失 50 %。

(e) 製備接種液

吸取(50~100) μL 的 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 工作儲備菌種，作為製備 5 mL 過夜菌株(overnight culture)的接種液。

譯注：此段用語多有不同，且在各段引用時亦有混淆，所以特別分段，以便標準閱讀。

8. 試驗步驟

8.1 吸收法

(參見附錄 E)

8.1.1 試驗菌種的培養

8.1.1.1 使用接種環取得儲備菌株所保存的菌種，劃在 EA(6.11)或 TSA(6.3)的平板上，並在 $(37\pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ $(37\pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培養(24~48) h。

將此平板存保持在 $(5\sim 10)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下，並須在製備日起的 1 周內使用。

8.1.1.2 將 20 mL 的 NB(6.5)或 TSB(6.2)營養液倒入 100 mL 的角錐瓶中，使用接種環取一個依 8.1.1.1 所培養的菌落，並將其接種在角錐瓶的營養液中，然後，以下列條件培養：

溫度：(37±2) °C。

搖振速率：110 次/min，幅度 3 cm，使用往復式培養振盪機(5.27)。

培養時間：(18~24) h。

8.1.1.3 將 20 mL 的 NB(6.5)或 TSB(6.2)營養液倒入 100 mL 的角錐瓶中，於其中將 8.1.1.2 所培養的接種液加入 0.4 mL，此接種液含有細菌濃度為(1~3) × 10⁸ CFU/mL 或 ATP 濃度為(1~3) × 10⁻⁶ mol/L，然後，以下列條件培養：

溫度：(37±2) °C。

搖振速率：110 次/min，幅度 3 cm，使用往復式培養振盪機(5.27)。

培養時間：(3±1) h。

培養後 CFU 之目標濃度：10⁷ CFU/mL

培養後 ~~TAP~~ATP 之目標濃度：10⁻⁷ mol/L

製備的接種液應以冰鎮方式儲存，並在 8 h 以內使用。

8.1.2 試驗接種液製備

在室溫將 8.1.1.3 所得之試驗菌種以水稀釋 20 倍後，藉由分光光度計或 McFarland's 濁度計(5.1)，以 NB(6.5)或 TSB(6.2)將細菌濃度調整到(1~3) × 10⁵ CFU/mL，或藉由螢光法，以 NB(6.5)或 TSB(6.2)將 ATP 的濃度調整到(1~3) × 10⁻⁹ mol/L。

製備的接種液應以冰鎮方式儲存，並在 4 h 以內使用。

8.1.3 試片製備

8.1.3.1 試片質量與形狀

8.1.3.1.1 取質量(0.40±0.05) g 並裁切為適當大小的試片。

8.1.3.1.2 取 6 個抗菌試驗樣品的試片，若可以，另取 6 個控制組紡織品(3.1)的試片或沒有抗菌處理的紡織品試片。

在接種後立即以 3 個控制組試片及 3 個抗菌試驗試片，在培養時間為零時測定，剩下的 6 個試片則在培養(18~24) h 後測定。

8.1.3.2 試片擺放

將每一片試片以下列適合受測樣品本質的方法，裝進個別的試樣瓶中。

(a) 如果試片有易於捲曲的傾向，或試片含有填料或羽絨，在試樣瓶內放一根玻璃棒(5.18)在試片上。或者，用線將試片兩端繫緊。

(b) 如果試片為紗，將紗整理為一束，然後在試樣瓶內放一根玻璃棒(5.18)在試片上。

(c) 如果樣品是取自地毯或類似結構的樣品，則切取毛圈，並在試樣瓶內放一根玻璃棒(5.18)在試片上。

如有需要，樣品可依 CNS 15140 或其他適當方法進行洗滌，並在最後一道洗滌時，樣品要以水潤洗，以去除清潔劑，使用非指定的方法時應予以紀錄。

8.1.3.3 滅菌

8.1.3.3.1 一般

如有疑似或發現污染，以滅菌釜(5.28)依下列步驟將試片滅菌。

8.1.3.3.2 滅菌步驟

- (a) 以鋁箔(5.26)將裝有試片的試樣瓶口部包裹起來。
- (b) 將包裹的試樣瓶置於金屬網籃(5.25)中。
- (c) 將試樣瓶蓋用鋁箔(5.26)包裹起來放進金屬網籃(5.25)中。
- (d) 以滅菌釜將瓶蓋與裝有試片的試樣瓶滅菌(15~20) min。
- (e) 滅菌後，取下鋁箔，將試樣瓶放在無菌工作台(5.6)或任何無空浮污染 (airborne contamination)的地方，讓瓶中的試片乾燥 60 min 以上，
- (f) 將試樣瓶蓋緊。

譯注：ISO 編碼太長，故簡化為括號加上編號。

當不能使用滅菌釜時，也可以用環氧乙烷氣體、 γ 射線或其他適當方法完成滅菌，如使用非滅菌釜的其他方法應予以紀錄。

8.1.4 試驗操作

8.1.4.1 試片的接種

精確吸取 0.2 mL 由 8.1.2 所製備的接種液，以接種培養液不會碰到試樣瓶表面的方式，在每個由 8.1.3.2 製備試片的幾個點上，並蓋緊試樣瓶。

8.1.4.2 接種後振落

6 個試樣瓶，其中 1 組放入控制組試片，1 組放入抗菌試驗用試片，在依 8.1.4.1 接種後，隨即在每個瓶中添加 20 mL 的 SCDLP 介質(6.8)、中和溶液(6.10)或振落細菌之生理食鹽水(6.20)，蓋緊試樣品並依附錄 B 以手動或混拌機(5.4)振落，或將試片轉移至無菌的拋棄式塑膠袋(5.22)以拍擊式均質機(5.5)振落。

8.1.4.3 培養

在(37±2) °C下將 6 個試樣瓶(3 個控制組試片，3 個受測試片)培養(18~24) h。

8.1.4.4 培養後振落

6 個試樣瓶，在 8.1.4.3 的培養後，每個試樣瓶添加 20 mL 之 SCDLP 介質(6.8)、中和溶液(6.10)或振落細菌之生理食鹽水(6.20)，蓋緊試樣品並依附錄 B 以手或混拌機(5.4)振落，或將試片轉移至無菌的拋棄式塑膠袋(5.22)以拍擊式均質機(5.5)振落。

8.1.4.5 計算細菌數或 ATP 量

8.1.4.5.1 一般

以附錄 C 或附錄 D 的定量法測得之細菌濃度與 ATP 濃度，依據公式(1)及公式(2)，求出 8.1.4.2 與 8.1.4.4 中之細菌數或 ATP 量。

譯注：8.1.4.2 與 8.1.4.4 並無指定或規定細菌數或 ATP 量，所以原文中有 specified 不翻譯。

備考：ATP 量測裝置會同時量測到存活與死亡的細菌。

8.1.4.5.2 細菌數

$$M = c_B \times 20 \dots\dots\dots (1)$$

其中， M ：每個試片的細菌數

c_B ：由附錄 C 所得的細菌濃度

20：振落溶液體積(mL)

8.1.4.5.3 APTATP 量

$$M' = c_{\text{APTATP}} \times 20 \dots\dots\dots (2)$$

其中， M' ：每個試片的 APTATP 量

c_{APTATP} ：由附錄 D 所得的 APTATP 濃度

20 振落溶液體積(mL)

8.1.5 試驗操作

8.1.5.1 以控制組試片判斷試驗效度(effectiveness)

當符合(a)、(b)及(c)或符合(a)、(b)及(d)的條件時，則可判斷此試驗為有效，當試驗判斷為無效，則應進行重試。

(a) 於 8.1.2 中所得之接種液濃度應為 $(1 \sim 3) \times 10^5$ CFU/mL，或 ATP 濃度應為 $(1 \sim 3) \times 10^{-9}$ mol/L。

(b) 接種後隨即測試的 3 個控制試片及培養後的 3 個控制試片，其細菌數或 ATP 量的常用對數最大值差應小於 1。

(c) 依據下列公式，在平板計數法中所得的成長值應為 1.0 以上。

(d) 依據公式(3)，在螢光法中所得的成長值應為 0.5 以上。

$$F = \log C_t - \log C_0 \dots\dots\dots (3)$$

其中， F ：控制組試片的成長值

$\log C_t$ ：3 個控制組試片在培養(18~24) h 後，細菌數或 APTATP 量的算數平均值。

$\log C_0$ ：3 個控制組試片在接種後立即得到的細菌數或 APTATP 量的算數平均值。

8.1.5.2 抗菌活性值之計算

當滿足下一段的條件，即可判斷此試驗為有效，當試驗判斷為無效，則應進行重試。

接種後隨即測試的 3 個抗菌試片及培養後的 3 個抗菌試片，其細菌數或 ATP 量的常用對數最大值之差應小於 2。

在確證此試驗時，接種後與培養後的二組抗菌試片之最大對數值差必須小於 2。如因中和劑無效而重新試驗，需要先從製造商處了解如何中和該抗菌劑。

譯注：這段是 ISO 比 JIS 多出來的部分，在附錄表 E.1 中並無此項目，惟 8.2.4.2 有這一句。本段第一句與上一段最後一句重複可刪除，第二句可以保留。

當試驗已判斷為有效，則依公式(4)以得到抗菌活性的值。如果 $C_0 > T_0$ ，則以 C_0 取代 T_0 。

$$A = (\log C_t - \log C_0) - (\log T_t - \log T_0) = F - G \dots\dots(4)$$

其中， A ：抗菌活性值

F ：控制組試片的成長值($F = \log C_t - \log C_0$)

G ：抗菌試片的成長值($G = \log T_t - \log T_0$)

$\log C_t$ ：3 個控制組試片在培養(18~24) h 後，細菌數或 ~~ATPAPT~~量的算數平均值。

$\log C_0$ ：3 個控制組試片在接種後立即得到的細菌數或 ~~ATPAPT~~量的算數平均值。

$\log T_t$ ：3 個抗菌試片在培養(18~24) h 後，細菌數或 ~~ATPAPT~~量的算數平均值。

$\log T_0$ ：3 個抗菌試片在接種後立即得到的細菌數或 ~~ATPAPT~~量的算數平均值。

8.2 移轉法

8.2.1 製備試驗接種液

8.2.1.1 試驗菌種培養

使用接種環取得儲備菌株所保存的菌種，劃在 TSA(6.3)的平板上，並在(37±1) °C培養(24~48) h。在培養後，從平板上取一個菌落，劃在另一個 TSA(6.3)的平板上，並在(37±1) °C培養(24~48) h。

備考：以第 2 次的移轉作為工作菌株。

如果菌株是在培養箱中(5.2)儲存 48 h，則在一天內不能完成接種時，後續接種亦可使用該 48 h 菌株，在這種情況下，進行試驗前，應製備新的下一代(第三代)24 h 菌株，惟不得使用第四代菌株。

將此平板保持在(5~10) °C下，並須在製備日起的 1 周內使用。

8.2.1.2 試驗接種液的製備

從第二次移轉的 TSA 平板上，以接種環取一個菌落，置於生理食鹽水(6.6)中，並以漩渦混拌機(5.4)充分混合，使用生理食鹽水(6.6)，藉由分光光度計或 McFarland's 濁度計(5.1)，將細菌濃度調整到(1~3) × 10⁸ CFU/mL，或者，藉由螢光法，將 ATP 的濃度調整到(2~6) × 10⁻⁷ mol/L。

使用生理食鹽水(6.6)將接種液的細菌濃度稀釋至(1~3) × 10⁶ CFU/mL，或將 ATP 濃度稀釋至(2~6) × 10⁻⁹ mol/L。最終的細菌數應以附錄 C 或附錄 D 的定量方法進行查核。

8.2.2 試片的製備

使用直徑(38±1) mm 的模板(5.21)切取試片。

試片不得含有任何接縫、布邊(selvages)、刺繡、拉鏈等。

須製備足夠數量的試片，以能提供重複試驗，同一批試片至少要有 0.5 m² 且不含布邊與重疊縫合處(stemming)。

如有需要，樣品可依 CNS 15140 或其他適當方法進行洗滌，並在最後一道洗滌後，樣品要以水潤洗，以去除清潔劑，如使用非指定的方法時應予以紀錄。

如試片有疑似或發現污染，以滅菌釜(5.28)將其滅菌。也可使用環氧乙烷氣體、 γ 射線或其他適當方法，並記錄在報告中。

8.2.3 試驗操作

8.2.3.1 接種至瓊脂板

製備 12 片瓊脂板(6.4)供轉移之用。接種 1 mL 的試驗接種液(8.2.1.2)至瓊脂板上，將接種的瓊脂板朝幾個方向傾斜，使培養液流遍板面，儘量吸掉過多的液體，將其靜置 5 min±30 s。

8.2.3.2 移轉至試片

分別製備 3 個控制組試片及 3 個抗菌試片供移轉後立即使用(6 個試片)及培養後使用(6 個試片)。將每個試片擺在瓊脂面(8.2.3.1)上，以 200 g 的不銹鋼圓筒(5.24)以向下的重量維持(60±5) s。將試片以轉移面朝上，放在直徑(55~60) mm 的培養皿(5.17)中，在溫濕度試驗箱(5.8)中以(37±2) °C 培養(18~24) h。

8.2.3.3 移轉後振落

移轉後立即將試片放進裝有 20 mL 中和溶液(6.10)之滅菌的拋棄式塑膠袋(5.22)或試樣瓶(5.16)中，依附錄 B 的規定以手動、混拌機(5.5)或拍擊式均質機(5.4)振落。

8.2.3.4 培養後振落

培養後將試片放進裝有 20 mL 中和溶液(6.10)之滅菌的拋棄式塑膠袋(5.22)或試樣瓶(5.16)中，依附錄 B 的規定以手動、混拌機(5.5)或拍擊式均質機(5.4)振落。

8.2.3.5 計算細菌數或 ATP 量

8.2.3.5.1 一般

用附錄 C 與附錄 D 定量法測得的細菌濃度或 ATP 濃度，依公式(5)及(6)求出 8.2.2.3 及 8.2.2.4 中之細菌數及 ATP 量。

8.2.3.5.1.2 細菌數

$$M = c_B \times 20 \dots\dots\dots(5)$$

其中， M ：每個試片的細菌數

c_B ：由附錄 C 所得的細菌濃度

20：振落溶液體積(mL)

8.2.3.5.13 ATP 量

$$M' = c_{\text{APTATP}} \times 20 \dots\dots\dots (6)$$

其中， M' ：每個試片的 **APTATP** 量

c_{APTATP} ：由附錄 D 所得的 **APTATP** 濃度

20：振落溶液體積(mL)

8.2.4 試驗結果**8.2.4.1 以控制組試片判斷試驗效度**

當符合(a)、(b)及(c)或符合(a)、(b)及(d)的條件時，則可判斷此試驗為有效，當試驗判斷為無效，則應進行重試。

(a) 於 8.2.1.2 中所得之接種液濃度應為 $(1 \sim 3) \times 10^6$ CFU/mL，或 ATP 濃度應為 $(1 \sim 3) \times 10^{-9}$ mol/L。

(b) 接種後隨即測試的 3 個控制試片及培養後的 3 個控制試片，其細菌數或 ATP 量的常用對數最大值差應小於 1。

(c) 依據下列公式，在平板計數法中所得的成長值應為 1.0 以上。

(d) 依據公式(7)，在螢光法中所得的成長值應為 0.5 以上。

$$F = \log C_t - \log C_0 \dots\dots\dots (7)$$

其中， F ：控制組試片的成長值

$\log C_t$ ：3 個控制組試片在培養(18~24) h 後，細菌數或 **APTATP** 量的算數平均值。

$\log C_0$ ：3 個控制組試片在轉移至控制組紡織物後，立即得到的細菌數或 **APTATP** 量之算數平均值。對數平均值

8.2.4.2 抗菌活性值之計算

當滿足下一段的條件，即可判斷此試驗為有效，當試驗判斷為無效，則應進行重試。

接種後隨即測試的 3 個抗菌試片及培養後的 3 個抗菌試片，其細菌數或 ATP 量的常用對數最大值之差應小於 2。

在確證此試驗時，接種後與培養後的二組抗菌試片，最大對數值差必須小於 2。如因中和劑無效而重新試驗，需要先從製造商處了解如何中和該抗菌劑。當試驗已判斷為有效，則依公式(8)以得到抗菌活性的值。

如果 $C_0 > T_0$ ，則以 C_0 取代 T_0 。

譯注：這句前面(8.1.5.2)有要求，JIS 中本段亦有規定。

$$A = (\log C_t - \log C_0) - (\log T_t - \log T_0) = F - G \dots\dots\dots (8)$$

其中， A ：抗菌活性值

F ：控制組試片的成長值($F = \log C_t - \log C_0$)

G ：抗菌試片的成長值($G = \log T_t - \log T_0$)

$\log C_t$: 3 個控制組試片在培養(18~24) h 後，細菌數或 APTATP 量的算數平均值。

$\log C_0$: 3 個控制組試片在接種後立即得到的細菌數或 APTATP 量的算數平均值。

$\log T_t$: 3 個抗菌試片在培養(18~24) h 後，細菌數或 APTATP 量的算數平均值。對數平均值

$\log T_0$: 3 個抗菌試片在接種後立即得到的細菌數或 APTATP 量的算數平均值。

8.3 壓印法

8.3.1 試驗菌種培養

8.3.1.1 使用接種環取得儲備菌株所保存的菌種，劃在 EA(6.11)或 TSA(6.3)的平板上，並在(37±1) °C培養(24~48) h。

將此平板存保持在(5~10) °C下，並須在製備日起的 1 周內使用。

8.3.1.2 將 20 mL 的 NB(6.5)倒入 100 mL 的角錐瓶中，使用接種環取出一個 8.3.1.1 平板上所培養的菌落，並將其接種在角錐瓶的營養液中，然後，以下列條件培養：
溫度：(37±2) °C。

搖振速率：110 次/min，幅度 3 cm，使用往復式培養振盪機(5.27)。

培養時間：(18~24) h。

8.3.1.3 將 20 mL 的 NB(6.5)倒入 100 mL 的角錐瓶中，於其中加入 8.3.1.2 所培養的接種液 0.4 mL，此接種液含有濃度為(1~3) × 10⁸ CFU/mL 的細菌或(1~3) × 10⁻⁶ mol/L 的 ATP，然後，以下列條件培養：

溫度：(37±2) °C。

搖振速率：110 次/min，幅度 3 cm，使用往復式培養振盪機(5.27)。

培養時間：(3±1) h。

培養後 CFU 或 TAP 之目標濃度：10⁷ CFU/mL 或 10⁻⁷ mol/L

製備的接種液應以冰鎮方式儲存，並在 8 h 以內使用。

8.3.2 試驗接種液的製備

以水稀釋 20 倍的 NB(6.5)，在室溫下將 8.3.1.3 所得之接種液，藉由分光光度計或 McFarland's 濁度計(5.1)，調整細菌濃度到(1~3) × 10⁷ CFU/mL，或藉由螢光法，調整 ATP 的濃度到(1~3) × 10⁻⁷ mol/L。

製備的接種液應以冰鎮方式儲存，並在 4 h 以內使用。

8.3.3 試片的製備

8.3.3.1 取樣

如有需要，樣品可依 CNS 15140 或其他適當方法進行洗滌，並在最後一道洗滌後，樣品要以水潤洗，以去除清潔劑，如使用非指定的方法時應予以紀錄。以直徑(60 ± 1) mm 的模板(5.21)切取 6 個控制組試片及 6 個抗菌試片。

備考：3 個控制組試片與 3 個抗菌試片係供試驗細菌壓印後，立即量測細菌數之用，剩餘的試片係供培養後量測細菌數之用(總共 6 個試片)。

8.3.3.2 試片之滅菌

將試片放在培養皿(5.17)中，蓋上鋁箔(5.26)後放進滅菌釜(5.28)中滅菌(15~20) min，滅菌後，取下鋁箔放在無塵工作台(5.6)上，或任何無空浮污染的地方乾燥 60 min 以上。

當不能使用滅菌釜時，也可以用環氧乙烷氣體、 γ 射線或其他適當方法完成滅菌，如使用非滅菌釜的其他方法應予以紀錄。

8.3.3.3 試片之濕度調節

倒入 10 mL 供壓印用的瓊脂(6.12)至培養皿(5.17)中，將沒有遮蓋的培養皿置在無塵工作台(5.6)上放冷固化，在避免結露下放冷至室溫，當瓊脂固化後，將培養皿倒扣，將試片放在培養皿的蓋子中，於溫濕度試驗箱(5.8)中，以(20 \pm 2) $^{\circ}$ C 及 70 % 相對濕度下，調節試片濕度(18~24) h。

8.3.4 試驗操作

8.3.4.1 試驗細菌的過濾

在無塵工作台(5.6)上，將濾膜放在經滅菌釜滅菌的過濾裝置。

在濾膜上倒入 5 mL 經稀釋 20 倍的 NB(6.5)，再添加於 8.3.2 中所製備的試驗接種液 2 mL，並在抽氣下過濾。在濾膜上的水消失後繼續抽氣約 1 min，

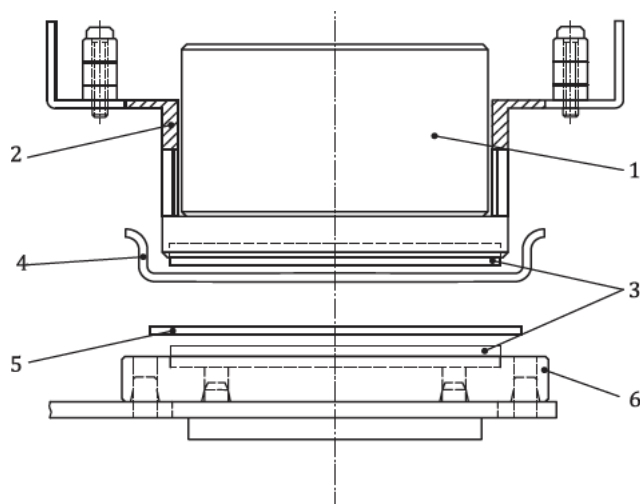
備考 1. 濾膜不能滅菌，因為滅菌會使孔口大小改變。

備考 2. 當使用過濾裝置時，將燒結玻璃或鐵氟龍(polytetrafluoroethylene)覆膜網放在濾膜下方，抽氣可使用抽氣設備、小型抽氣泵或其他簡單的抽氣設備。

8.3.4.2 試驗細菌的壓印

8.3.4.2.1 使用滅菌的鑷子(5.23)將搜集試驗細菌的濾膜從過濾裝置上取下，將有細菌的一面朝上，放在壓印裝置(5.10)的轉台上，如圖 1 所示。

8.3.4.2.2 使用滅菌的鑷子(5.23)從培養皿(5.17)中取出 8.3.3.3 的試片，面朝下放在濾膜上。



- 其中，1：(17 kg)重塊
 2：承重盤
 3：矽膠(直徑 42 mm)
 4：試片(直徑 60 mm)
 5：濾膜(直徑 47 mm)
 6：轉台(直徑 54 mm)(逆時鐘旋轉)

備考：此圖為壓印裝置(5.10)的側視圖，其外部尺度分別為長 170 mm、寬 160 mm 及高 150 mm。

圖 1 壓印裝置示意圖

8.3.4.2.3 在承重盤(weighting plate)上加上重塊，並以 3 s 的時間，將轉台朝一個方向轉動 180°，壓印濾膜上的細菌。

8.3.4.2.4 壓印完，隨即將試片以壓印表面朝上，移到含有 8.3.3.3 的瓊脂的培養皿蓋上，放在培養箱(5.2)中依 8.3.4.3 規定靜置(1~4) h。

譯注：8.3.4.2.4 的步驟與 8.3.4.3 重複，所以加上“依 8.3.4.3 規定”將其連貫。

8.3.4.3 培養試驗

在 8.3.4.2.4 的培養皿中，將壓印的試片放在培養箱中，以(20±2) °C、相對濕度 70 %以上，狀態調節(1±0.1) h、(2±0.1) h、(3±0.1) h 或(4±0.1) h，其培養時間係由規格要求所指定的試驗條件決定，並應列入紀錄。

8.3.4.4 壓印後振落

壓印後，隨即將每個 8.3.4.2 之 3 個控制組試片及 3 個抗菌試片，分別移轉至盛有 20 mL SCDLP 介質(6.8)的試樣瓶中，依附錄 B 之規定，以手動或混拌機(5.4)將每個試片上的細菌振落。

譯注：這裡參考 JIS，因為 ISO 只轉移控制組試片並不合理，8.3.3.1 的備考有說明，抗菌試片應在接種後立即測試。

8.3.4.5 培養後振落

培養後，將每個 8.3.4.3 之試片，分別移轉至盛有 20 mL SCDLP 介質(6.8)的試樣瓶中，依附錄 B 之規定，以手動或混拌機(5.4)將每個試片上的細菌振落。

8.3.4.6 計算細菌數或 ATP 量

8.3.4.6.1 一般

用附錄 C 與附錄 D 定量法測得的細菌濃度或 ATP 濃度，依公式(9)及(10)求出 8.3.4.4 及 8.3.4.5 中之細菌數及 ATP 量。

8.3.4.6.2 細菌數

$$M = c_B \times 20 \dots\dots\dots (9)$$

其中， M ：每個試片的細菌數
 c_B ：由附錄 C 所得的細菌濃度
 20 ：振落溶液體積(mL)

8.2.3.5.1 ATP 量

$$M' = c_{\text{APTATP}} \times 20 \dots\dots\dots (10)$$

其中， M' ：每個試片的 APTATP 量
 c_{APTATP} ：由附錄 D 所得的 APTATP 濃度
 20 ：振落溶液體積(mL)

譯注：CAPTATP 上方應有 “’ ”，ISO 有誤。

8.3.5 試驗結果

8.3.5.1 試驗效度判斷

當符合下列二項條件時，則可判斷此試驗為有效，當試驗判斷為無效，則應進行重試。

- (a) 壓印在控制組試片上的細菌濃度不得低於 $(1 \sim 3) \times 10^6$ CFU/mL，或 ATP 濃度應為 $(1 \sim 3) \times 10^{-11}$ mol/L。
- (b) 依據公式(11)，控制組試片的增減值應為 $+0.5 \sim -0.5$ 。

$$F = \log C_t - \log C_0 \dots\dots\dots (11)$$

其中， F ：控制組試片的增減值
 $\log C_t$ ：3 個控制組試片在培養(1~4) h 後，細菌數或 APTATP 量的算數平均值之常用對數。
 $\log C_0$ ：3 個控制組試片在壓印後，所得之立即細菌數或 APTATP 量的算數平均值之常用對數。

8.3.5.2 抗菌活性值之計算

當試驗已確定為有效，則依公式(12)以得到抗菌活性的值。

$$A = \log C_t - \log Tt \dots\dots\dots (12)$$

其中， A ：抗菌活性值
 $\log C_t$ ：3 個控制組試片在培養(1~4) h 後，細菌數或 APTATP 量的算數平均值之對數。
 $\log TtG_0$ ：3 個抗菌試片在培養(1~4) h 後，細菌數或 APTATP 量的算數平均值之對數。

9. 抗菌效果的判斷

所得的結果可以判斷附錄 F 所示之抗菌效果程度。

10. 試驗報告

試驗報告應包括下列事項。

- (a) CNS 總號。
- (b) 試片之詳細說明。
- (c) 試驗菌名稱。
- (d) 菌種編號。
- (e) 接種方法 。
- (f) 接種液濃度 。
- (g) 抗菌活性值 。
- (h) 定量量測方法 。
- (i) 與本標準之任何差異 。
- (j) 試驗日期 。

附錄 A
(規定)
菌種編號

A.1 一般

本試驗使用的細菌應與表 A.1 所列相同，其由國際菌種聯盟(World Federation of Culture Collection, WFCC)成員所保存，本標準所使用的菌種應將菌種編號併同供應源列於報告中。

A.2 細菌列表

表 A.1 試驗使用的細菌

細菌形式	國際菌種聯盟之資料中心編碼 (World Data Centre for Microorganisms, WDCM)
中文	
金黃色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	00193 http://refs.wdcm.org/browse/getinfo?sid=WDCM_00193
克留氏肺炎桿菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i> <u>改與章節 7.1(b)內容一致 -- 肺炎桿菌</u>	00192 http://refs.wdcm.org/search/searchkey
備考 1. 經過適當的確認後，亦可使用其他細菌。	
備考 2. 參見 WDCM(http://refs.wdcm.org/search)	

附錄 B
(規定)
振落方法

B.1 一般

共有三種將細菌從試片上振落的方法，以漩渦式混拌機(5.4)振落、以手振落及以拍擊式均質機振落(5.5)。

B.2 以漩渦式混拌機振落

以試樣瓶底部壓在漩渦式混拌機(5.4)的平板或橡膠座上，混拌 5 次，每次 5 s。

B.3 以手動振落

手持試樣瓶並以約 30 mm 的弧狀搖振 30 s。

B.4 以拍擊式均質機振落

將指定的拋棄式塑膠袋(5.22)置於拍擊式均質機(5.5)上，將塑膠袋的每一面啟動機器 1 min。

附錄 C
(規定)
平板計數法定量量測

C.1 一般

本附錄規定平板計數法定量量測之步驟。

C.2 試驗步驟

C.2.1 使用移液管(5.15)取試片的振落細菌懸浮液 1 mL，加入盛有 NB(6.5)或生理食鹽水(6.6)(9±0.1) mL 之試管中，並充分搖振。

C.2.2 用新的移液管(5.15)取此溶液 1 mL，加入另一個盛有(9±0.1) mL 介質之試管中，並充分搖振。連續重複此步驟並製備一系列的稀釋液，進行此稀釋共 5 次，如經當事人間協議，可進行更多次的稀釋。準確地將每種稀釋液移取 1 mL 至 2 個培養皿中。

C.2.3 用水浴(5.3)將約 15 mL 的 EA(6.11)或 TSA(6.5)加熱至(45~46) °C，倒入培養皿中並充分攪拌，維持在室溫，並在介質固化後倒扣培養皿，於(37±2) °C下培養(24~48) h。

C.2.4 培養後，計算一系列稀釋液中出现(30~300) CFU 之培養皿的菌落數。如果 1 mL 振落細菌溶液在培養皿中的存活細菌數少於 30，以該 CFU 數計算平均數，如果 1 mL 振落細菌溶液在培養皿中的存活細菌數少於 1，則該平均數為 1。

C.2.5 依公式 C.1 計算溶液中的細菌濃度。

$$C_B = Z \times R$$

其中， C_B ：細菌濃度(CFU/mL)

Z ：兩個培養皿上，1 mL 接種液的菌落數平均值

R ：稀釋倍數

附錄 D

(規定)

螢光法定量量測

改為 ATP 螢光反應檢測法

D.1 一般

本附錄規定螢光法的定量測定試驗步驟。

D.2 試驗步驟

D.2.1 校正曲線公式

D.2.1.1 製備 ATP 標準試劑(6.14)及稀釋介質，例：生理食鹽水(6.7)、SCDLP 介質(6.8)或其他適合的介質，及 3 個 ATP 濃度分別為 2×10^{-8} mol/L、 2×10^{-9} mol/L 及 2×10^{-10} mol/L 的稀釋溶液。

D.2.1.2 將上述每個溶液取 0.1 mL 分別置入不同的試管，在每個試管中加入 0.9 mL 的稀釋緩衝液(6.9)並充分搖振，再將每個溶液取 0.1 mL 置入不同的試管，將其做為量測稀釋標準試劑試樣。

D.2.1.3 將 0.1 mL 的生理食鹽水(6.7)、SCDLP 介質(6.8)或其他適合的介質，與 0.8 mL 的稀釋緩衝液(6.9)及 0.1 mL 的 ATP 去除劑(6.18)置入塑膠試管中，充分搖振後，取 3 份 0.1 mL 的溶液，分別置入 3 個試管中，將其靜置(5 ~ 30) min，並將其作為量測空白試樣。

D.2.1.4 在盛裝量測空白試樣的試管中，添加 0.1 mL 的 ATP 萃取劑(6.17)然後搖振，然後加入 0.1 mL 的 ATP 發光劑(6.16)，再次搖振後立即以螢光光度計(5.9)測定螢光量。

D.2.1.5 在盛裝量測稀釋標準試劑的試管中，從濃度最低的試管開始，添加 0.1 mL 的 ATP 萃取劑(6.17)並搖振，然後加入 0.1 mL 的 ATP 發光劑(6.16)，再次搖振後立即以螢光光度計(5.9)測定螢光量。

D.2.1.6 將 ATP 的濃度除以測定稀釋標準試劑(2×10^{-8} mol/L、 2×10^{-9} mol/L 及 2×10^{-10} mol/L)所得的螢光量平均值，並且記錄該值作為梯度 a 的平均值。

D.2.1.7 在下列校正曲線公式(D.1)中，代入梯度 a 及 $C_{ATP}=0$ ，可以得到係數 b 。

$$C_{ATP} = a \times X + b \dots\dots\dots (D.1)$$

其中， C_{ATP} ：ATP 濃度(mol/L)

X ：發光量(相對光度單位，RLU)

a ：線性校正曲線的梯度

b ：線性校正曲線在 $X = 0$ 時的係數

備考： C_{ATP} 及 X 間的相關係數 $R^2 \geq 0.9$ ，且其信心水準大於 0.95。

D.2.2 細菌懸浮液的 ATP 濃度

D.2.2.1 製備 1 個供 ATP 去除劑處理的試管及 3 個供量測的試管。

- D.2.2.2** 取 0.1 mL 振落細菌懸浮液、0.8 mL 稀釋緩衝液(6.9)及 0.1 mL 的 ATP 去除劑(6.18)至供 ATP 去除劑處理的試管中，並充分搖振。取幾份 0.1 mL 的振落細菌懸浮液至 3 個指定供量測的試管，使其靜置(5~30) min。
- D.2.2.3** 在每個供量測的試管中，添加 0.1 mL 的 ATP 萃取劑(6.17)並充分搖振，然後加入 0.1 mL 的 ATP 發光劑(6.16)，再次搖振後立即以螢光光度計(5.9)測定螢光量。
- D.2.2.4** 由 D.2.1.7 所得之 ATP 濃度(C_{ATP})，依公式(D.2)計算，可得振落細菌懸浮液的 ATP 濃度。

$$C_{ATP'} = \frac{C_{ATP}}{1000} \dots\dots\dots(D.2)$$

其中， $C_{ATP'}$ ：振落細菌懸浮液的 ATP 濃度(mol/mL)。

附錄 E
(參考)
試驗範例

E.1 吸收法

參見表 E.1 及 E.2。

表 E.1 以平板計數法測定之吸收法試驗範例

細菌(中文) (英文) 菌種編號	金黃色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC ©6538 TM		克留氏肺炎桿菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC ©4352 TM	
接種液濃度(CFU/mL)	1.2 × 10 ⁵		1.1 × 10 ⁵	
二組控制試片最大對數差(要求小於 1)	0 h	20 h	0 h	20 h
	0.4	0.3	0.5	0.4
二組抗菌試片最大對數差(要求小於 2)	0 h	20 h	0 h	20 h
	0.6	0.5	0.7	0.6
F 成長值 ($F = \log C_t - \log C_0$)	+ 2.7 (其中 $\log C_t = 7.0$; $\log C_0 = 4.3$)		+3.2 (其中 $\log C_t = 7.5$; $\log C_0 = 4.3$)	
G 成長值 ($G = \log C_t - \log T_t - \log C_0 + \log T_0$)	-1.0 (其中 $\log C_t = 3.2$; $\log C_0 = 4.2$; $\log T_t = 4.2$; $\log T_0 = 5.2$)		+0.7 (其中 $\log C_t = 4.9$; $\log C_0 = 4.2$; $\log T_t = 4.2$; $\log T_0 = 5.2$)	
抗菌活性值($A = F - G$)	3.8[2.7 - (-1) = 3.7]		2.6[3.2 - 0.7 = 2.5]	
測定方法	平板計數法			
樣品材料類型	100 %棉短襪			
滅菌方法	滅菌釜			
培養時間	20 h			

表 E.2 以螢光法測定之吸收法試驗範例

細菌(中文) (英文) 菌種編號	金黃色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC ©6538 TM		克留氏肺炎桿菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC ©4352 TM	
接種液濃度(CFU/mL)	1.2 × 10 ⁻⁹		1.9 × 10 ⁻⁹	
二組控制組試片最大對數差(要求小於 1)	0 h	20 h	0 h	20 h
	0.5	0.6	0.5	0.4
二組抗菌試片最大對數差(要求小於 2)	0 h	20 h	0 h	20 h
	0.5	0.7	0.6	0.8
<i>F</i> 成長值 ($F = \log C_t - \log C_0$)	+ 1.7 (其中 $\log C_t = -11.0$; $\log C_0 = -12.7$)		+2.1 (其中 $\log C_t = -10.4$; $\log C_0 = -12.5$)	
<i>G</i> 成長值 ($G = \log T_t - \log T_0$; $G = \log C_t - \log C_0$)	-0.8 (其中 $\log C_t = -13.6$; $\log C_0 = -12.8$)		-0.1 (其中 $\log C_t = -12.6$; $\log C_0 = -12.5$)	
抗菌活性值($A = F - G$)	2.6		2.2	
測定方法	螢光法			
樣品材料類型	100 %聚脂聚酯窗簾			
滅菌方法	環氧乙烷氣體			
培養時間	20 h			

E.2 吸收法

參見表 E.3 與 E.4。

表 E.3 以平板計數法測定之移轉法試驗範例

細菌(中文) (英文) 菌種編號	金黃色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC ©6538™		克留氏肺炎桿菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC ©4352™	
接種液濃度(CFU/mL)	2.2 × 10 ⁶		1.1 × 10 ⁶	
二組控制試片最大對數差(要求小於 1)	0 h	20 h	0 h	20 h
	0.3	0.4	0.2	0.3
二組抗菌試片最大對數差(要求小於 2)	0 h	20 h	0 h	20 h
	0.6	0.5	0.7	0.6
F 成長值 ($F = \log C_t - \log C_0$)	+ 2.9 (其中 $\log C_t = +8.5$; $\log C_0 = +5.6$)		+2.7 (其中 $\log C_t = +8.1$; $\log C_0 = +5.4$)	
G 成長值 ($G = \log T_t - \log T_0$; $G = \log C_t - \log C_0$)	-1.7 (其中 $\log C_t = +3.8$; $\log C_0 - \log T_0 = +5.5$)		-2.5 (其中 $\log C_t = +2.8$; $\log C_0 - \log T_0 = +5.3$)	
抗菌活性值($A = F - G$)	4.6		5.2	
測定方法	平板計數法			
樣品材料類型	100 %棉短襪			
滅菌方法	滅菌釜			
培養時間	22 h			

表 E.4 以螢光法測定之移轉法試驗範例

細菌(中文) (英文) 菌種編號	金黃色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC ©6538™		克留氏肺炎桿菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC ©4352™	
接種液濃度(CFU/mL)	3.2×10^{-9}		4.9×10^{-9}	
二組控制試片最大對數差(要求小於 1)	0 h	20 h	0 h	20 h
	0.5	0.6	0.4	0.3
二組抗菌試片最大對數差(要求小於 2)	0 h	20 h	0 h	20 h
	0.4	0.7	0.5	0.6
F 成長值 ($F = \log C_t - \log C_0$)	+ 3.1 (其中 $\log C_t = -9.1$; $\log C_0 = -12.2$)		+2.6 (其中 $\log C_t = -9.4$; $\log C_0 = -12.0$)	
G 成長值 ($G = \log T_t - \log T_0$ $G = \log C_t - \log C_0$)	-2.2 (其中 \log $C_t/T_t = -14.5$; $\log C_0 - \log T_0$ $= -12.3$)		-2.2 (其中 \log $C_t/T_t = -14.1$; $\log C_0 - \log T_0$ $= -11.9$)	
抗菌活性值($A = F - G$)	5.3		4.8	
測定方法	螢光法			
樣品材料類型	100 % 聚脂聚酯窗簾			
中和劑型式及濃度	5 % 蛋黃卵磷脂(總體積)			
滅菌方法	γ -射線			
培養時間	22 h			

E.2 壓印法

參見表 E.5 與 E.6。

表 E.5 以平板計數法測定之壓印法試驗範例

細菌(中文) (英文) 菌種編號	金黃色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC ©6538™	克留氏肺炎桿菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC ©4352™
濾膜上的細菌數(CFU)	3.0×10^7	3.6×10^7
壓印後隨即測得之控制試片細菌數(CFU)	4.2×10^6	6.4×10^6
抗菌活性值 ($A = \log C_t - \log T_t$)	1.7 ($\log C_t = +6.7$; $\log T_t = +5.0$)	1.1 ($\log C_t = +6.7$; $\log T_t = +5.6$)
測定方法	平板計數法	
樣品材料類型	100 %聚脂聚酯窗簾	
滅菌方法	滅菌釜	
培養時間	4 h	

譯注：全文沒有測定濾膜上的細菌數(CFU)步驟。(這問題請技術委員注意)

表 E.6 以螢光法測定之壓印法試驗範例

細菌(中文) (英文) 菌種編號	金黃色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC ©6538™	克留氏肺炎桿菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC ©4352™
濾膜上的螢光量(mol)	2.9×10^{-10}	1.7×10^{-10}
壓印後隨即測得之控制試片螢光量(CFU)	4.0×10^{-11}	3.0×10^{-11}
抗菌活性值 ($A = \log C_t - \log T_t$)	1.7 ($\log C_t = -10.4$; $\log C_0 = -12.1$)	1.1 ($\log C_t = -10.6$; $\log C_0 = -11.7$)
測定方法	螢光法	
樣品材料類型	100 %聚脂聚酯窗簾	
滅菌方法	環氧乙烷氣體	
培養時間	2 h	

附錄 F
(參考)
抗菌活性的效果

從試驗結果，可將表 F.1 所示當成試驗紡織品抗菌性質的效果。

表 F.1 抗菌性質的效果

抗菌值 (A)	抗菌性質的效果
$A < 2$	弱
$2 \leq A < 3$	明顯
$A \geq 3$	強

在試驗方法、操作人員、分析實驗室等諸多變數考量下，對於抗菌性質的效果，將抗菌值定為 2 以上，係考慮該大小在定義其抗菌效果是可以確定並定義為“顯著有效”。因為其他國家對抗菌效果的看法不同，所以，本附錄所提供的是參考訊息而非規定。

依據國家或國際標準

ISO 20743:2021 Textiles – Determination of antibacterial activity of textile products