



中华人民共和国国家标准

GB/T 43722.1—2024

皮革 抗菌性能的测定 第1部分：膜接触法

Leather—Determination of antimicrobial activity—
Part 1: Film contact method

2024-03-15 发布

2024-10-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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。

本文件是 GB/T 43722《皮革 抗菌性能的测定》的第 1 部分。GB/T 43722 已经发布了以下部分：
——第 1 部分：膜接触法。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国轻工业联合会提出。

本文件由全国皮革工业标准化技术委员会(SAC/TC 252)归口。

本文件起草单位：通标标准技术服务(上海)有限公司、浙江通天星集团股份有限公司、大康控股集团有限公司、深圳市北测检测技术有限公司、上海应用技术大学、西南交通大学、广东省科学院微生物研究所(广东省微生物分析检测中心)、天创时尚股份有限公司、广东新虎威实业投资有限公司、江苏集萃先进纤维材料研究所有限公司、朗盛化学(中国)有限公司、博富科技股份有限公司、上海市徐汇区疾病预防控制中心、上海润河纳米材料科技有限公司、中国皮革制鞋研究院有限公司、中轻检验认证有限公司、中关村汇智抗菌新材料产业技术创新联盟。

本文件主要起草人：蒋红、陈健、胡静、徐晓玲、彭如群、徐祥进、刘志勇、廖武名、傅泽安、倪兼明、梁嘉俊、周家良、张瑜、廖宇涛、陶志清、桑军、任可帅、张迎增、朱青、周业华、钱子煜、谢小保、吴鹏。

引 言

皮革产品作为皮胶原蛋白质的加工产品,加工过程中使用的原辅料中含有大量的油脂、糖类等成分,是细菌、霉菌生长的良好营养源,再加上皮革结构的多孔性和极性结构使其容易吸湿,从而导致其在保存和使用过程容易受到微生物的侵入,不仅在皮革表面形成白色、蓝色、黄色或黑色的菌斑或色斑,而且还能向革内发展,使皮革的耐磨、强度和弹性等性能降低,严重影响其外观及使用性能。此外,随着人们对于预防疾病的意识不断增强,各类抗菌材料和产品成为人们关注的对象,明示或宣传有抗菌性能的皮革制品也逐渐成为决定市场竞争力的重要因素之一。

皮革产品根据其来源、加工过程等分为不同的类型。如根据表面吸水性的差异,可分为表面不吸水皮革和表面吸水性较强的皮革;根据皮革抗菌剂溶出性的不同,可分为非溶出型抗菌皮革和溶出型抗菌皮革等。皮革抗菌性能的测定可以根据皮革种类采用适合的检测方法。

GB/T 43722 旨在为皮革抗菌性能的测定提供依据,拟由四个部分构成。

- 第 1 部分:膜接触法。目的在于确立适用于表面不吸水皮革抗菌性能测定的定量试验方法。
- 第 2 部分:琼脂平皿扩散法。目的在于确立皮革抗菌性能测定的定性试验和评价方法。
- 第 3 部分:菌液吸收法。目的在于确立适用于表面吸水性很强的皮革抗菌性能测定的定量试验方法。
- 第 4 部分:振荡法。目的在于确立其他膜接触法和菌液吸收法不适用的皮革(尤其适用于使用了非溶出型抗菌剂的皮革)抗菌性能测定的定量试验方法。



皮革 抗菌性能的测定

第 1 部分：膜接触法

警示——本文件涉及的微生物可感染致病，操作人员应采取一切必要的防护措施，避免对人员和环境的危害。试验应由经过微生物学培训且具有实践经验的专业人员在具备处理微生物技术条件的实验室中进行。

1 范围

本文件描述了膜接触法测定皮革抗菌性能的定量试验方法。
本文件适用于不吸水皮革抗菌性能的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

QB/T 2707 皮革 物理和机械试验 试样的准备和调节

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗菌性能 antimicrobial activity

采用化学或物理方法杀灭或妨碍细菌和真菌生长繁殖，以减少其数量以及活性的能力。

[来源：WS/T 650—2019, 3.1, 有修改]

3.2

对照样 control sample

未经抗菌处理、用于验证试验微生物生长条件的样品。

4 原理

通过接种定量微生物至不吸水的皮革试样表面，用贴膜的方法使微生物均匀接触试样表面，经一定时间培养后，测定试样表面的活菌数，计算抗菌率，以此表示试样的抗菌性能。

5 仪器设备

5.1 恒温培养箱，控温精度为 $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.2 冷藏箱，温度能够保持在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.3 二级生物安全柜。

- 5.4 生物光学显微镜。
- 5.5 压力蒸汽灭菌器,温度能保持在 $(121\pm 2)^{\circ}\text{C}$,压力能保持在 $(103\pm 5)\text{kPa}$ 。
- 5.6 培养皿,直径为 90 mm。
- 5.7 紫外灯。
- 5.8 接种环,4 mm。
- 5.9 天平,精度为 $\pm 0.01\text{ g}$ 。
- 5.10 pH 计,精度为 ± 0.2 。
- 5.11 模刀,符合 QB/T 2707 的规定,内壁为 $(50\pm 2)\text{mm}\times(50\pm 2)\text{mm}$ 的矩形。

6 试剂和材料

- 6.1 除特殊说明外,所用试剂均为分析纯,试验用水应为蒸馏水或去离子水。
- 6.2 氢氧化钠(NaOH)溶液,0.1 mol/L。
- 6.3 盐酸(HCl)溶液,0.1 mol/L。
- 6.4 氯化钠(NaCl)溶液,0.85%(质量分数)。
- 6.5 无水磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)。
- 6.6 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。
- 6.7 乙醇溶液,70%(体积分数)。
- 6.8 磷酸缓冲液(PBS),将 2.83 g Na_2HPO_4 (6.5)和 1.36 g KH_2PO_4 (6.6)加入至 1 000 mL 蒸馏水中,待完全溶解后,用 NaOH 溶液(6.2)或 HCl 溶液(6.3)调节 pH 为 7.1~7.4,分装后置于压力蒸汽灭菌器中, $(121\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 条件下灭菌 15 min。
- 6.9 洗脱液,采用 D/E 中和肉汤(Dey-Engley Neutralizing Broth)作为洗脱液。将 5.0 g 胰蛋白胨、2.5 g 酵母粉、10.0 g 葡萄糖、1.0 g 硫代乙醇酸钠、6.0 g 硫代硫酸钠、2.5 g 亚硫酸氢钠、0.02 g 溴甲酚紫、7.0 g 卵磷脂、5.0 g 吐温-80,加入至 1 000 mL 蒸馏水中,置于锥形瓶中混合并在沸水浴中充分溶解。然后用 NaOH 溶液(6.2)或 HCl 溶液(6.3)调节 pH 为 7.0~7.2,分装后置于压力蒸汽灭菌器中, $(121\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 条件下灭菌 15 min。
- 6.10 覆盖膜,采用聚乙烯薄膜,尺寸为 $(40\pm 2)\text{mm}\times(40\pm 2)\text{mm}$,也可与试样尺寸相适应,厚度为 0.05 mm~0.10 mm。用乙醇溶液(6.7)浸泡 10 min,再用蒸馏水冲洗,自然晾干。也可使用均质袋切下的膜。
- 6.11 对照样,聚乙烯片材质,厚度 $<10\text{ mm}$,尺寸为 $(50\pm 2)\text{mm}\times(50\pm 2)\text{mm}$,与试样尺寸一致。也可使用均质袋切下的膜。

7 培养基

7.1 营养肉汤培养基(NB)

将 5.0 g 牛肉膏、10.0 g 蛋白胨和 5.0 g 氯化钠与 1 000 mL 蒸馏水混合,加热溶解,然后用 NaOH 溶液(6.2)或 HCl 溶液(6.3)调节 pH 为 7.0~7.2,分装后置于压力蒸汽灭菌器中, $(121\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 条件下灭菌 15 min。

7.2 营养琼脂培养基(NA)

将 5.0 g 牛肉膏、10.0 g 蛋白胨、5.0 g 氯化钠和 15.0 g 琼脂与 1 000 mL 蒸馏水混合,加热溶解,然后用 NaOH 溶液(6.2)或 HCl 溶液(6.3)调节 pH 为 7.0~7.2,分装后置于压力蒸汽灭菌器中, $(121\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 条件下灭菌 15 min。

7.3 马铃薯培养基(PDA)

将 5.0 g 马铃薯浸粉、20.0 g 葡萄糖、20.0 g 琼脂和 0.1 g 氯霉素与 1 000 mL 蒸馏水混合,加热煮沸至完全溶解,然后用 NaOH 溶液(6.2)或 HCl 溶液(6.3)调节 pH 为 5.8~6.2,分装后置于压力蒸汽灭菌器中,(121±2)℃条件下灭菌 15 min。

7.4 平板计数琼脂(PCA)

将 2.5 g 酵母粉、5.0 g 胰蛋白胨、1.0 g 葡萄糖和 15.0 g 琼脂与 1 000 mL 蒸馏水混合,加热溶解,然后用 NaOH 溶液(6.2)或 HCl 溶液(6.3)调节 pH 为 7.0~7.2,分装后置于压力蒸汽灭菌器中,(121±2)℃条件下灭菌 15 min。

8 试验菌种



8.1 菌种

试验菌种通常至少采用 3 种,如下所示。

——革兰氏阳性菌:金黄色葡萄球菌(细菌,ATCC 6538 或 CGMCC 1.2465)。

——革兰氏阴性菌:大肠杆菌(细菌,ATCC 8739 或 CGMCC 1.2463)。

——白色念珠菌(真菌,ATCC 10231 或 CGMCC 2.2086)。

也可根据客户要求选用其他菌种,应至少包括细菌和真菌,其中细菌种类至少含有 1 种革兰氏阳性和 1 种革兰氏阴性菌种,并在报告中注明试验菌种及编号。所有菌种均应由国家相应菌种保藏管理中心提供。选用其他菌种时,培养基成分、培养温度和培养方法可根据需要调整。

8.2 菌种保存

对于金黄色葡萄球菌和大肠杆菌,将菌种接种于 NA(7.2)斜面上,在(37±1)℃下培养 18 h~24 h;对于白色念珠菌,将菌种接种于 PDA(7.3)斜面上,在(28±1)℃下培养 24 h~48 h。然后置于 5℃~10℃下保存(不应超过 1 个月),作为斜面保存菌。

9 试验菌液的制备

9.1 接种液的制备

用 NaCl 溶液(6.4)稀释 NB 培养基,用于金黄色葡萄球菌培养的 NB 质量分数为 1%,用于大肠杆菌培养的 NB 质量分数为 0.2%,白色念珠菌采用磷酸缓冲液(PBS)配制。用 NaOH 溶液(6.2)或 HCl 溶液(6.3)调节 pH 为 7.0~7.2,分装后置于压力蒸汽灭菌器中,(121±2)℃条件下灭菌 15 min。为便于菌种分散可加入少量表面活性剂(如吐温-80 等)。

9.2 菌种活化

对于金黄色葡萄球菌和大肠杆菌,将斜面保存菌转接至 NA(7.2)平板上,在(37±1)℃下培养 18 h~24 h,再连续转接 1 次后(在 5 代以内)的新鲜菌种培养物(24 h 内培养物)用于菌悬液的制备;对于白色念珠菌,将斜面保存菌转接到马铃薯培养基(PDA)平板上,在(28±1)℃下培养 24 h~48 h,再连续转接 1 次后(在 5 代以内)的新鲜菌种培养物(48 h 内培养物)用于菌悬液的制备。

9.3 菌悬液的制备

用接种环(5.8)从 9.2 的新鲜菌种培养物上取 1 环~2 环新鲜菌种,加入到 20 mL 接种液(9.1)中,用显

显微镜观察法或其他合适的方法估计活菌数目,10 倍梯度稀释并选择菌液浓度为 2.5×10^5 CFU/mL ~ 10.0×10^5 CFU/mL 的稀释液作为试验菌液。该试验菌液冰冷 $3\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,在 4 h 内使用。

10 试样的准备

10.1 试样和对照样的取样

试样:用模刀从粒面切取 6 块尺寸为 $(50 \pm 2)\text{mm} \times (50 \pm 2)\text{mm}$ 的试样,试样厚度不应大于 5 mm。3 片用于“0”接触测试,3 片用于规定时间的接触测试。

若试样尺寸无法满足切取条件,可切取 6 块尺寸不小于 $(20 \pm 1)\text{mm} \times (20 \pm 1)\text{mm}$ 的试样,同时覆盖膜聚乙烯薄膜也相应减小。

对照样(6.11):6 片,3 片用于“0”接触测试,3 片用于规定时间的接触测试。

10.2 试样和对照样的灭菌

通常采用紫外灯处理灭菌,将试样和对照样的正反面在紫外灯下分别照射灭菌。也可选用其他适宜的灭菌方法,试样的灭菌处理应以不影响试样的抗菌性能为原则。如采用其他灭菌方法,应在试验报告中注明。

11 试验步骤

11.1 接种

将试样和对照样分别放入灭菌培养皿中,保持待测面向上,用移液管分别移取 0.4 mL 菌悬液(9.3),缓慢滴加到每个试样和对照样的待测面上,然后将聚乙烯薄膜(6.10)覆盖于菌液上,调节使菌液分散到整个聚乙烯薄膜,注意避免菌液从薄膜边缘溢出,盖上培养皿的上盖。每组试样做 3 个平行试验。

若试样尺寸较小,可移取 0.1 mL ~ 0.4 mL 菌悬液,使贴膜后试样表面的菌液中含菌数量达到 1.0×10^5 CFU/片 ~ 4.0×10^5 CFU/片。

有些试样表面很难防止菌液溢出,可通过增加惰性增稠剂(如质量分数为 0.1% ~ 0.3% 的琼脂等)以增加菌液的黏度,防止溢出,并在试验报告中注明。

如果因样品表面的花纹很难防止菌液溢出,可以通过“倒贴膜”的方法进行测试。试样尺寸调整为 $(40 \pm 2)\text{mm} \times (40 \pm 2)\text{mm}$,聚乙烯薄膜(6.10)尺寸为 $(50 \pm 2)\text{mm} \times (50 \pm 2)\text{mm}$ 。菌悬液(9.3)中增加惰性增稠剂以增加菌液的黏度,用移液管移取 0.4 mL 菌悬液,缓慢滴加到每个聚乙烯薄膜(6.10)表面,将试样待测面朝下,覆盖于菌液上,调节使菌液分散到整个试样,注意避免菌液从试样边缘溢出。如采用该方法,应在试验报告中注明。

11.2 培养

对于金黄色葡萄球菌和大肠杆菌,将接种后的试样和对照样在 $(37 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $\geq 90\%$ 的条件下培养 24 h;对于白色念珠菌,将接种后的试样和对照样在 $(28 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $\geq 90\%$ 的条件下培养 48 h。

11.3 活菌回收

11.3.1 “0”接触时间的洗脱

分别量取 20 mL 洗脱液(6.9)到 3 个“0”接触时间的试样和对照样中,充分洗脱后,取一定量的洗脱

液,用10倍稀释法系列稀释至合适稀释倍数。金黄色葡萄球菌和大肠杆菌接种于平板计数琼脂(PCA)中,每个稀释倍数制作两个平行样,在 $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 下培养24 h~48 h。白色念珠菌接种于马铃薯培养基(PDA)中,在 $(28\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 下培养48 h~72 h,然后进行活菌计数。

11.3.2 培养后的洗脱

分别量取20 mL洗脱液(6.9)到培养后的试样和对照样(11.2)中,充分洗脱后,取一定量的洗脱液,用10倍稀释法系列稀释至合适稀释倍数。金黄色葡萄球菌和大肠杆菌接种于平板计数琼脂(PCA)中,每个稀释倍数制作两个平行样,在 $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 下培养24 h~48 h。白色念珠菌接种于马铃薯培养基(PDA)中,在 $(28\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 下培养48 h~72 h,然后进行活菌计数。

如试验菌悬液(9.3)中增加惰性增稠剂以增加菌液的黏度,洗脱时需要采用机械搅拌,如均质、旋动或超声波振动等,需验证这些方法的回收有效性后方可采用。

注:对于厚度较大的皮革,适当增加洗脱液的用量,并在试验报告中注明。

11.4 菌落计数

用肉眼观察(必要时可用放大镜或菌落计数器),记录稀释倍数和相应的菌落数量,以CFU表示。

选取菌落数在30 CFU~300 CFU、无蔓延菌落生长的平板记录菌落总数。小于30 CFU的平板记录具体菌落数,大于300 CFU的可记录为多不可计。每个稀释倍数的菌落数取两个平板的平均数。

若平板有较大片状菌落生长时,不宜采用,应以无片状菌落生长的平板作为该稀释倍数菌落数;若片状菌落生长不到平板的一半,另一半中菌落分布比较均匀,可计算半个平板后乘以2,代表该平板中的菌落数。

当平板出现菌落间无明显界限的链状生长时,将每条单链作为一个菌落计数。

12 结果计算与表示



12.1 活菌数

试验结果以试样中的活菌数表示,按公式(1)进行计算:

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

式中:

N —— 每个试样的活菌数,单位为菌落形成单位每片(CFU/片);

C —— 菌落数平均值,单位为菌落形成单位(CFU);

D —— 稀释倍数;

V —— 洗脱液体积与计数时所取洗脱液体积的比值。

活菌数 N 的计算结果保留两位有效数字。在 V 为20的情况下,对菌落数小于1的情况活菌数试验结果记为小于20。

试验结果取3个试样中的活菌数的算术平均值,保留两位有效数字。当活菌数小于20时,用20进行平均值计算,保留两位有效数字。

12.2 试验的有效性

当试验同时满足以下3个条件时,则试验有效,否则应重新取样进行试验:

- 3个对照样的“0”接触时间的活菌数应符合(最高对数值-最低对数值)/平均活菌数值对数值 ≤ 0.2 的要求;
- 3个对照样“0”接触时间洗脱的菌落数平均值应在 1.0×10^5 CFU/片~ 4.0×10^5 CFU/片;
- 接种培养后每个对照样上的活菌数不应小于 1.0×10^4 CFU/片。

12.3 抗菌率

在试验有效的前提下,按公式(2)计算抗菌率,结果保留两位有效数字。

$$R = \frac{T_0 - T_1}{T_0} \times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

R ——抗菌率, %;

T_0 ——3个皮革试样“0”接触的活菌数平均值,单位为菌落形成单位每片(CFU/片);

T_1 ——3个皮革试样培养规定时间(11.2)后的活菌数平均值,单位为菌落形成单位每片(CFU/片)。

如果 $C_0 > T_0$,以 C_0 代替 T_0 。

C_0 ——3个对照样“0”接触的活菌数平均值,单位为菌落形成单位每片(CFU/片)。

13 试验报告

试验报告应包含以下内容:

- a) 本文件编号;
- b) 试样的类型、来源和名称;
- c) 试验菌种及编号;
- d) 试验结果,抗菌率;
- e) 与本文件规定方法的任何偏离。



参 考 文 献

- [1] GB/T 31402—2015 塑料 塑料表面抗菌性能试验方法
 - [2] QB/T 2881 鞋类和鞋类部件 抗菌性能技术条件
 - [3] WS/T 650—2019 抗菌和抑菌效果评价方法
 - [4] ISO 16187 Footwear and footwear components—Test method to assess antibacterial activity
 - [5] ASTM E2180 Standard test method for determining the activity of incorporated antimicrobial agent(s) in polymeric or hydrophobic materials
-