

# 光觸媒抗菌效能檢驗方法(TPIA-B1)

## 1. 摘要

本光觸媒抗菌效能檢驗方法，係以抗菌性試驗來評估光觸媒之原料或其加工製品之表面抗菌效果。在無光觸媒加工之試驗片及相同基材塗佈光觸媒之加工試驗片上，接種相同濃度的試驗菌液（金黃色葡萄球菌或大腸桿菌），進行明、暗兩種條件之培養後，計算其菌落數。在判定試驗條件成立後，計算其抗菌活性值以判定其抗菌效果。本檢驗方法可分辨出加工試驗片上因光觸媒而產生之抗菌效果與非光觸媒產生之抗菌效果。

## 2. 適用範圍

本方法測試樣品之型態可以為已披覆有光觸媒之元(組)件或產品，以及含光觸媒之溶膠或塗料。披覆光觸媒元(組)件或產品之基材可為塑膠、金屬、陶瓷、玻璃等不透水性基材，依樣品型態可分別製備測試片。

## 3. 送測樣品規格及測試片製備程序

### 3.1 披覆有光觸媒之元(組)件或產品；

3.1.1 由送測者自行於製品之平坦部位切取 $50\pm 2$  mm (厚度 $10\pm 1$  mm 以內)之正方形塊，作為標準尺寸之樣品測試片。送測樣品須標示單位面積所含有效光觸媒重量，並標示主要成分，是否添加酸劑、抗菌劑及奈米銀等可能干擾試驗結果之添加物，以及適用之前處理溫度等資訊。披覆有光觸媒之測試片(加工測試片)應準備8片，不含光觸媒之空白測試片(無加工測試片)亦準備8片。樣品與空白測試片(以下簡稱測試片)製備時，應注意避免微生物污染、製品間相互污染及髒污等問題。

3.1.2 將測試片先以超音波振盪清洗3次(每次10分鐘)後，再以 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘乾1小時。

3.1.3 以無水酒精紗布擦拭清洗測試片之後，接著將試驗面朝上置入無菌玻璃培養皿中蓋上蓋子，以 $160\sim 180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘乾1小時。

3.1.4 取出玻璃培養皿連同測試片，以光照度大於 $1\text{ mW/cm}^2$ 之 $365\text{ nm}$ 的UV光源照射至少8小時。

3.1.5 若此清淨處理會造成測試片軟化、表面塗裝溶解及成份溶出，進而影響到試驗結果的話，應改用其他的清淨方式，或可不經清淨處理直接測試。

### 3.2 含光觸媒之溶膠或塗料:

- 3.2.1 若樣品為含光觸媒之溶膠或塗料時，須由送測者自行依下列方法製備成測試片，以供檢測。
- 3.2.2 送測樣品必需標示其固含量及有效光觸媒含量，並標示主要成分，酸鹼度，是否添加酸劑、抗菌劑及奈米銀等可能干擾試驗結果之添加物，適用之固定化溫度等資訊。送測樣品可以下述程序固定化在  $50\pm 0.5$  mm 之正方形的磨砂玻璃試片上。
- 3.2.3 依據含光觸媒溶膠或塗料樣品所標示之有效光觸媒含量，取適當有效光觸媒之溶膠或塗料重量，置於鐵氟龍燒杯中備用。
- 3.2.4 將磨砂玻璃試片（空白玻片要先秤重）置於加熱板上（保持水平），溫度控制在  $60-80$  °C，將燒杯中的溶膠或塗料慢慢倒到玻片上，以玻棒將溶膠或塗料平均攤平在玻片上。倒入的速度要與溶劑蒸發的速度配合，勿使溶膠或塗料流出玻片。當玻片表面的溶劑蒸發後，關閉加熱開關。若所標示固定化溫度高於  $80$  °C，以其所標示之固定化溫度及時間加熱之。
- 3.2.5 玻片冷卻後，取下秤重，記錄光觸媒樣品的重量。
- 3.2.6 處理完成之測試片及空白磨砂玻璃為對照組試片，分別置入已滅菌之培養皿中，使用光照度  $1.0$  mW/cm<sup>2</sup> 之  $365$  nm 的 UV 光源照射 12 小時以上，冷卻至室溫備用。

### 4. 準備事項：

#### 4.1 儀器：

- 4.1.1 振盪培養箱
- 4.1.2 低(恆)溫培養箱
- 4.1.3 無菌操作台
- 4.1.4 微量吸注器
- 4.1.5 電動吸注器
- 4.1.6 滅菌釜
- 4.1.7 加熱攪拌器
- 4.1.8 酸鹼度(pH)測量儀
- 4.1.9 電子天平

4.1.10 水浴槽

4.1.11 烘箱

4.1.12 紫外線照射裝置(365 nm 之 UV 光源)

4.1.13 紫外線強度計

4.2 耗材：

4.2.1 無菌 9 cm (直徑)培養皿

4.2.2 養菌管、塑膠吸管、微量吸管

4.2.3 錫(鋁)箔紙

4.2.4 酒精燈

4.2.5 滅菌指示帶

4.2.6 鑷子以錫(鋁)箔紙包覆，高壓蒸氣滅菌、烘乾備用或是使用 95 %酒精浸泡過火後即可使用。

4.2.7 試管架

4.2.8 玻璃試管及各種玻璃器材(量筒、燒杯、血清瓶、三角錐形瓶、培養皿)

4.2.9 低密度聚乙烯薄膜(剪成  $45 \pm 2$  mm 之正方形)

4.2.10 接種環

4.2.11 無菌紗布

4.2.12 棉花(球)

4.3 培養基與試劑：

4.3.1 普通細菌培養基平板(Nutrient Agar) NA

肉濃縮物(Rinderextrakt)	6.0g
蛋白朊 (Pepton)	10.0 g
洋菜 (Agar)	15 g
氯化鈉(NaCl)	5.0g
去離子水(Deionized Water)	1000 ml

→可直接購入已配製好之培養基

→自行配製時，若 pH 非  $7.1 \pm 0.1$ ，則須以 1 N 氫氧化鈉(或 1 N 氫氯酸)試液調其 pH 值為  $7.1 \pm 0.1$ ，再經 121 °C 滅菌 15 分鐘後，待冷卻至 45~50 °C，在無菌操作下，倒(約 15-20 mL)入無菌之 9 cm (直徑)培養皿內，冷卻後成為 NA 平板培養基。

4.3.2 普通細菌培養基(Nutrient Broth) NB

肉濃縮物(Rinderextrakt)	6.0g
蛋白朊 (Pepton)	10.0 g
氯化鈉(NaCl)	5.0g
去離子水(Deionized Water)	1000 ml

→可直接購入已配製好之培養基

→自行配製時，若 pH 非  $7.1\pm 0.1$ ，則須以 1 N 氫氧化鈉(或 1 N 氫氯酸)試液調其 pH 值為  $7.1\pm 0.1$ ，再經 121 °C 滅菌 15 分鐘後備用。

#### 4.3.3 平板計數培養基 (Plate count agar, PCA Difco) PCA

胰化蛋白朊 (Tryptone)	5.0 g
酵母抽出物 (Yeast Extract)	2.5 g
葡萄糖 (Glucose)	1.0 g
洋菜 (Agar)	15 g
去離子水(Deionized Water)	1000 ml

溶解後分裝於血清瓶中，調其 pH 值為  $7.1\pm 0.1$ ，再經 121 °C 滅菌 15 分鐘後，置於 55 °C 之烘箱中備用。若平板計數培養基持續在室溫下保留於血清瓶中，則只限回溶一次使用。

#### 4.3.4 SCDLP 細菌培養基

酪蛋白蛋白朊	17.0 g
大豆製蛋白朊	3.0 g
氯化鈉	5.0 g
磷酸氫鉀	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
磷脂醯膽鹼	1.0 g
聚山梨醇酯 80	7.0 g
去離子水(Deionized Water)	1000 ml

溶解後分裝於血清瓶中，調其 pH 值為  $7.0\pm 0.2$ ，再經 121 °C 滅菌 20 分鐘後備用。

4.3.5 1/500 NB：取 1 mL NB 加入 499 mL 已滅菌之無菌去離子水。

4.3.6 磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，Sigma P-0662)

4.3.7 氫氧化鈉(NaOH，MERCCK 1.06498.)

4.3.8 配製 1N 氫氧化鈉溶液：取氫氧化鈉 40 g 於去離子水溶解後，再加去離子水到 1000 mL，保存備用。

4.3.9 無菌磷酸緩衝液：一般檢體通常使用無菌磷酸緩衝液作為稀釋液。取磷酸二氫鉀 34 g 溶於 500 mL 去離子水中，待完全溶解

後，以 1 N 氫氧化鈉 (NaOH) 溶液調節其 pH 值為  $7.2\pm 0.1$ ，然後加去離子水至全量為 1000 mL，經 121 °C 滅菌 20 分鐘後，貯存於 4 °C 冰箱中備用。

4.3.10 樣品稀釋液：取 4.3.9 之溶液 1.25 mL 加去離子水至全量為 1000 mL，測其 pH 值應為  $7.2\pm 0.2$ ，經 121 °C 滅菌 20 分鐘後，貯存於 4 °C 冰箱中備用。

4.4 試驗菌株：

4.4.1 革蘭氏陰性細菌：大腸桿菌(*Escherichia coli* IFO 3972，ATCC8739，或BCRC 11634)。

4.4.2 革蘭氏陽性細菌：金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* IFO 12732，ATCC6538P，或BCRC 10451)。

5. 測試步驟：

5.1 增殖菌株

5.1.1 將試驗菌株大腸桿菌及金黃色葡萄球菌分別劃於含NA培養基上，以  $35\pm 2$  °C 培養  $24\pm 2$  小時進行活化。

5.1.2 於已活化大腸桿菌及金黃色葡萄球菌之培養基上挑取單一菌落接種至 5 mL 之 NB 培養基中，以  $35\pm 2$  °C 培養  $24\pm 2$  小時。

5.1.3 以分光光度計在 600 nm 波長測定菌液之吸光值，再以 1/500 NB 將菌液稀釋成菌數為  $1.0\sim 5.0\times 10^5$  CFU 作為試驗菌液。

5.2 試驗操作

5.2.1 試驗菌液之接種

5.2.1.1 以微量吸管分別吸取 5.1.3 的兩株試驗菌液各 0.4 mL，滴於各測試片上，每一試驗條件進行二重複。

5.2.1.2 將低密度聚乙烯薄膜蓋至已滴菌液之測試片上，此時應注意勿使菌液由膜之邊緣溢出。

5.2.1.3 當測試片之形狀為非平面，被覆薄膜密著有困難時；或測試片為親水性或吸水性，即使未覆蓋上被覆薄膜，菌液已全面擴散於測試片上，則可省略此被覆薄膜之覆蓋動作。

5.2.1.4 當菌液全部都覆蓋上被覆薄膜且經輕壓後，於培養皿中放入以無菌去離子水沾溼之棉球，蓋上培養皿蓋子，如此即完成測試片之接種。

5.2.1.5 將接種之試驗菌液進行 10 倍序列稀釋，依步驟 5.2.4 測定其生菌數，即為接種隨即對照區(A)之生菌數。

## 5.2.2 明暗條件之試驗操作：

5.2.2.1 暗條件對照區：將完成兩株菌接種於加工（C<sub>0</sub>）及無加工測試片（B<sub>0</sub>）各2片的培養皿（兩種菌株共8片），移至25±2 °C培養箱內避光培養24±2小時。

5.2.2.2 明條件對照區：將完成兩株菌接種於加工（C<sub>1</sub>）及無加工測試片（B<sub>1</sub>）各2片的培養皿（兩種菌株共8片），移至25±2 °C培養箱內以紫外線照射（光照度0.1 ~ 1.0 mW/cm<sup>2</sup>），培養24±2小時。

5.2.2.3 明條件區之光源和測試片間存在的全部母材(如玻璃培養皿上蓋及被覆薄膜)，放在光度計的受光部上方，其光源的透過率必須有70%以上。

## 5.2.3 經明暗條件培養後測試片之洗出操作：

5.2.3.1 利用無菌鑷子取出無菌棉球，再將測試片與薄膜夾起，以10 mL之SCDLP細菌培養基沖洗測試片表面，將菌洗出。

5.2.3.2 洗出試驗菌液，再依步驟5.2.4立即測定洗出液之生菌數。

## 5.2.4 生菌數之檢測

5.2.4.1 以微量吸管吸取步驟 5.2.3.2 的洗出液各 1 mL 作為原液，並依 10 倍序列稀釋法稀釋至合適倍數。

5.2.4.2 從原液及各稀釋液中各取 1 mL (每個稀釋倍數進行二重覆)接種於無菌培養皿後，添加 45~50 °C 保溫之 PCA 培養基 15~20 mL，充分混合，然後蓋上蓋子室溫下放置。待培養基凝固後，倒置培養皿於 35±2 °C 恆溫箱培養 48±2 小時。

## 5.2.5 生菌數之計算

5.2.5.1 觀察並計數菌數：僅需計數 30-300 個菌落之培養皿，若 >300 個菌落以 TNTC (Too Numerous to Count) 表示。

5.2.5.2 測得之菌落數，利用下列公式計算出生菌數。生菌數平均值係以各測試片之 2 個生菌數測定值之算術平均，將有效數字 3 位經四捨五入取 2 位表示之。生菌數”<10”時，則以”10”來計算平均值。

$$N = C \times D \times V$$

其中 N：生菌數(1 個試驗片總生菌數平均值，以為 CFU: Colony Forming Unit 表示)

C：菌落數(計數 PCA 培養皿之菌落平均值)

D：稀釋倍數(分注序列稀釋液之稀釋倍數)

V：洗出用的 SCDLP 培養基之液量(10 mL)

## 6. 試驗結果判定

### 6.1 試驗成立之條件判定：

以下 4 項試驗成立之條件皆滿足時，可判定此試驗為有效。  
無法滿足全部條件時，可判定此試驗不成立，須再度重新進行試驗。

6.1.1 「接種隨即對照區(A)」之生菌數，應介於  $1.0 \sim 5.0 \times 10^5$  CFU 之範圍內。

6.1.2 針對「接種隨即對照區(A)」及「無加工測試片之暗條件對照區(B<sub>0</sub>)」之各二個生菌數而言，依下式執行計算，其計算值必須在 0.2 以下。

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

L<sub>max</sub>：生菌數對數值之最大值

L<sub>min</sub>：生菌數對數值之最小值

L<sub>mean</sub>：2 個生菌數對數值之平均值

6.1.3 「加工測試片之暗條件試驗區(C<sub>0</sub>)」經 24±2 小時培養後，生菌數平均值應大於  $1.0 \times 10^3$  CFU 以上。

6.1.4 「接種隨即對照區(A)之生菌數平均值」對「無加工測試片之暗條件對照區(B<sub>0</sub>)之生菌數平均值」及「無加工測試片之明條件對照區(B<sub>1</sub>)之生菌數平均值」的減少率必須為 90% 以下。

$$[(A - B_0) / A] \times 100\% \leq 90\%$$

$$[(A - B_1) / A] \times 100\% \leq 90\%$$

A：接種隨即對照區試驗菌液之生菌數平均值

B<sub>0</sub>：暗條件(對照)區無加工測試片經 24±2 小時培養後之生菌數平均值

B<sub>1</sub>：明條件(對照)區無加工測試片經 24±2 小時培養後之生菌數平均值

### 6.2 抗菌活性值之計算：

試驗成立時，依下列公式計算抗菌活性值。數值捨去小數點以下 2 位，以小數點以下 1 位表示之。

$$R = [\log(C_0/A) - \log(C_1/A)] = [\log(C_0/C_1)]$$

其中 R：抗菌活性值

A：接種隨即對照區試驗菌液之生菌數平均值

$C_0$ : 暗條件試驗區加工測試片經  $24 \pm 2$  小時培養後生菌數平均值

$C_1$ : 明條件試驗區加工測試片經  $24 \pm 2$  小時培養後生菌數平均值

### 6.3 抗菌效果：

抗菌加工製品之抗菌效果依據本檢測方法，計算抗菌活性值，即可作為判定抗菌效果之依據。

## 7. 試驗結果之記錄

7.1 記錄抗菌加工及無加工測試片之種類、尺寸大小、形狀、厚度。

7.2 記錄披覆薄膜之種類、尺寸大小、形狀。

7.3 記錄試驗菌種、菌株編號、試驗菌液接種量、試驗菌液生菌數。

7.4 試驗條件如光源種類、型號、與測試片之距離、測試片上方之 365 nm UV 光源之光照度及量測用的光度計型號等，應一併記錄於試驗結果內。

7.5 測試報告格式，可參考附件之測試報告範例。

## 8. 名詞解釋：

8.1 抗菌：抑制製品表面細菌增殖之狀態。

8.2 抗菌加工：以抗菌為目的之加工作業。

8.3 抗菌加工製品：實施抗菌加工之製品。

8.4 抗菌活性值：抗菌加工製品與無加工製品於接種試驗菌株培養後，兩者生菌數對數值之差值。

8.5 抗菌效果：由抗菌活性值來判斷抗菌加工製品之效果。

## 9. 參考資料

9.1 NIEA E101.01C—「環境微生物檢測通則I—細菌」。

9.2 行政院環保署，1999。CNS 10890 「食品微生物之檢驗法—生菌數之檢驗」，經濟部標準檢驗局，1991。

9.3 奈米協會「奈米光觸媒抗菌陶瓷面磚驗證規範草案」，2005。

9.4 財團法人石材工業發展中心，鍾曜榮博士提案。

9.5 台灣動物科技研究所，生物安全測試實驗室提案。

## 光觸媒抗菌效能檢驗測試報告範例

委託單位：XX 公司

檢測單位：XX 公司

台灣光觸媒產業發展協會認可證號：第 XX 號

中華民國實驗室認證體系(CNLA)認可證號：第 XX 號

中華民國 XX 年 XX 月 XX 日

委託單位：

連絡人：

收件日期：

電話：

統一編號：

傳真：

地址：

測試樣品名稱：

測試開始日期：

測試樣品編號：

測試完成日期：

測試項目：

結果：

光觸媒加工製品之表面抗菌效果。

在試驗菌株為大腸桿菌之試驗中，可符合試驗成立之4項條件，進一步計算其抗菌活性值為-0.32。

1. 測試目的：(含測試樣品之描述)

評估光觸媒加工製品之表面抗菌效果

2. 測試方法：

「台灣光觸媒產業發展協會」公告之檢驗方法(TPIA-B1)。

測試片種類： 形狀： 尺寸大小： 厚度：

披覆薄膜種類： 形狀： 尺寸大小：

光源種類： 型號： 與測試片距離： 光照度：

光度計型號：

3. 試驗菌株：

大腸桿菌(*Escherichia coli* IFO 3972, ATCC8739)

試驗菌液接種量：

4. 數據分析：(試驗成立條件判定)

條件	生菌數		平均值		$(L_{\max} - L_{\min})/L_{\text{mean}}$
	菌數	對數值	菌數平均值	對數值平均值	
A	$2.2 \times 10^5$	5.34	$2.7 \times 10^5$	5.43	0.03
	$3.2 \times 10^5$	5.51			
B <sub>0</sub>	$1.1 \times 10^7$	7.04	$1.1 \times 10^7$	7.04	0
	$1.1 \times 10^7$	7.04			
B <sub>1</sub>	$1.3 \times 10^7$		$1.3 \times 10^7$	--	--
	$1.2 \times 10^7$				
C <sub>0</sub>	$1.1 \times 10^6$	6.04	$7.6 \times 10^5$	5.83	--

	$4.2 \times 10^5$	5.62			
$C_1$	$1.3 \times 10^6$	6.11	$1.6 \times 10^6$	6.20	--
	$1.9 \times 10^6$	6.28			

- (1) 「接種隨即對照區(A)」試驗菌液之生菌數為  $2.7 \times 10^5$  CFU，介於  $1.0 \sim 5.0 \times 10^5$  CFU 之範圍內，故符合試驗成立之第 1 項條件。
- (2) 「接種隨即對照區(A)」及「無加工測試片之暗條件對照區(B<sub>0</sub>)」之各二個生菌數的  $(L_{\max} - L_{\min})/L_{\text{mean}}$  計算值分別為 0.03 及 0，均小於 0.2，故符合試驗成立之第 2 項條件。
- (3) 「加工測試片之暗條件試驗區(C<sub>0</sub>)」經培養後，生菌數平均值為  $7.6 \times 10^5$  CFU，大於  $1.0 \times 10^3$  CFU，故符合試驗成立之第 3 項條件。
- (4) 「接種隨即對照區(A)之生菌數平均值」對「無加工測試片之暗條件對照區(B<sub>0</sub>)之生菌數平均值」及「無加工測試片之明條件對照區(B<sub>1</sub>)之生菌數平均值」的減少率，計算後均為 90% 以下，故符合試驗成立之第 4 項條件。
- (5) 試驗成立之 4 項條件皆滿足，可判定此試驗為有效，並進行抗菌活性值之計算。

## 5. 結果判讀

經計算後之抗菌活性值為 -0.32

技術主管：\_\_\_\_\_ 品質主管：\_\_\_\_\_ 實驗室負責人：\_\_\_\_\_

(加蓋公司大小章)

### 備註：

1. 本分析結果僅對委託者所送測試樣品負責。
2. 未經同意，本測試報告不得摘要複製，但全文複製除外。

## 附件

### 抑菌值與抑菌率的參考對照表

抑菌值* (Antimicrobial activity)	抑菌率 (%)
NA**	-
1	90
2	99
3	99.9
4	99.99
5	99.999
6	99.9999

\*抑菌值 =  $\log(\text{對照組 24 小時菌數} / \text{樣品組 24 小時菌數})$

\*\*NA: 因樣品組菌數大於對照組菌數，無法計算其抑菌值

註: 若無提供對照組，則以空白組菌數代替對照組菌數