

中华人民共和国国家标准

化妆品微生物标准检验方法 总 则

UDC 668.58 : 576
.85.07

GB 7918.1—87

Standard methods of microbiological
examination for cosmetics
General rules

1 样品的采集及注意事项

1.1 所采集的样品,应具有代表性,一般视每批化妆品数量大小,随机抽取相应数量的包装单位。检验时,应分别从两个包装单位以上的样品中共取 10g 或 10ml。包装量小的样品,取样量可酌减。

1.2 供检样品,应严格保持原有的包装状态。容器不应有破裂,在检验前不得启开,以防再污染。

1.3 接到样品后,应立即登记,编写检验序号,并按检验要求尽快检验。如不能及时检验,样品应放在室温阴凉干燥处,不要冷藏或冷冻。

1.4 若只有一个样品而同时需做多种分析,如细菌、毒理、化学等,则宜先取出部分样品作细菌检验,再将剩余样品作其他分析。

1.5 在检验过程中,从开封到全部检验操作结束,均须防止微生物的再污染和扩散,所用器皿及材料均应事先灭菌,全部操作应在无菌室内进行。或在相应条件下,按无菌操作规定进行。

1.6 如检出粪大肠菌群或其他致病菌,自报告发出起该菌种及被检样品应保存一个月备查。

2 供检样品的制备

2.1 培养基和试剂

2.1.1 生理盐水

| | |
|-----|--------|
| 氯化钠 | 8.5g |
| 蒸馏水 | 1000ml |

溶解后,分装到加玻璃珠的锥形瓶内,每瓶 90ml,121℃(15 lb)20min 高压灭菌。

2.1.2 SCDLP 液体培养基

| | | |
|-----|-------|--------|
| 成分: | 酪蛋白胨 | 17g |
| | 大豆蛋白胨 | 3g |
| | 氯化钠 | 5g |
| | 磷酸氢二钾 | 2.5g |
| | 葡萄糖 | 2.5g |
| | 卵磷脂 | 1g |
| | 吐温 80 | 7g |
| | 蒸馏水 | 1000ml |

制法:将上述成分混合后,加热溶解,调 pH 为 7.2~7.3 分装,121℃(15 lb)20min 高压灭菌。注意振荡,使沉淀于底层的吐温 80 充分混合,冷却至 25℃左右使用。

注:如无酪蛋白胨和大豆蛋白胨,也可用日本多肽代替。

2.1.3 灭菌液体石蜡。

2.1.4 灭菌吐温 80。

2.2 仪器

2.2.1 天平。

2.2.2 灭菌锥形瓶:内含玻璃珠及 90ml 稀释液。

2.2.3 灭菌刻度吸管:10ml、5ml。

2.2.4 水浴箱。

2.2.5 灭菌研钵及灭菌研棒。

2.2.6 均质器。

2.3 不同类型样品的检样制备

2.3.1 液体样品

2.3.1.1 水溶性的液体样品,可量取 10ml 加到 90ml 灭菌生理盐水中,如样品少于 10ml。仍按 10 倍稀释法进行。如为 5ml 则加 45ml 灭菌生理盐水,混匀后,制成 1:10 稀释液。

2.3.1.2 油性液体。取样品 10ml,先加 5ml 灭菌液体石蜡混匀,再加 10ml 灭菌的吐温 80,在 40~44℃水浴中振荡混合 10min,加入灭菌的生理盐水 75ml(在 40~44℃水浴中预温),在 40~44℃水浴中乳化,制成 1:10 的悬液。

2.3.2 膏、霜、乳剂半固体状样品

2.3.2.1 亲水性的样品,称取 10g,加到灭菌的带玻璃珠加有 90ml 灭菌生理盐水的锥形瓶中,充分振荡混匀,放 32℃水浴静置 15min。用其上清液作为 1:10 的稀释液。

2.3.2.2 疏水性的样品,称取 10g,放到灭菌的研钵中,加 10ml 灭菌液体石蜡,研磨成粘稠状,再加 10ml 灭菌吐温 80,研磨待溶解后,加 70ml 灭菌生理盐水,在 40~44℃水浴中充分混合,制成 1:10 稀释液。

2.3.2.3 固体样品,称取 10g,加到灭菌的生理盐水稀释瓶中,振荡混匀,使其分散混悬后,放 30~32℃水浴中,15min 后取出,充分振荡混合,再放到 30~32℃水浴中静置 15min,取上清液作为 1:10 的稀释液。

如有均质器,上述水溶性膏、霜、粉剂等,可称 10g 样品加 90ml 灭菌生理盐水,均质 1~2min;疏水性膏、霜及眉笔、口红等,称 10g 样品加 90ml SCDLP 液体培养基,或 1g 样品加 1ml 灭菌液体石蜡、1ml 灭菌吐温 80、7ml 灭菌生理盐水,均质 3~5min。

附加说明:

本标准由中国预防医学科学院环境卫生监测所归口。

本标准由“化妆品微生物标准检验方法”起草小组起草。

本标准主要起草人周淑玉。

本标准由中国预防医学科学院环境卫生监测所负责解释。

中华人民共和国国家标准

化妆品微生物标准检验方法 细菌总数测定

UDC 668.58 : 576
. 85.07

GB 7918.2—87

Standard methods of microbiological
examination for cosmetics
Standard plate count

细菌总数系指 1 g 或 1 ml 化妆品中所含的活菌数量。测定细菌总数可用来判明化妆品被细菌污染的程度,以及生产单位所用的原料、工具设备、工艺流程、操作者的卫生状况,是对化妆品进行卫生学评价的综合依据。

本标准采用标准平板计数法。

1 方法提要

化妆品中污染的细菌种类不同,每种细菌都有它一定的生理特性,培养时对营养要求,培养温度、培养时间、pH 值、需氧性质等均有所不同。在实际工作中,不可能做到满足所有菌的要求,因此所测定的结果,只包括在本方法所使用的条件下(在卵磷脂、吐温 80 营养琼脂上,于 37℃ 培养 48 h)生长的一群嗜中温的需氧及兼性厌氧的细菌总数。

2 培养基和试剂

2.1 生理盐水:见 GB 7918.1—87《化妆品微生物标准检验方法 总则》。

2.2 卵磷脂、吐温 80 - 营养琼脂培养基

| | | |
|-----|-------|--------|
| 成分: | 蛋白胨 | 20g |
| | 牛肉膏 | 3g |
| | 氯化钠 | 5g |
| | 琼脂 | 15g |
| | 卵磷脂 | 1g |
| | 吐温 80 | 7g |
| | 蒸馏水 | 1000ml |

制法:先将卵磷脂加到少量蒸馏水中,加热溶解,加入吐温 80 将其他成分(除琼脂外)加到其余的蒸馏水中,溶解。加入已溶解的卵磷脂、吐温 80,混匀,调 pH 值为 7.1~7.4,加入琼脂,121℃ (15 lb) 20 min 高压灭菌,储存于冷暗处备用。

3 仪器

- 3.1 锥形烧瓶。
- 3.2 量筒。
- 3.3 pH 计或精密 pH 试纸。
- 3.4 高压消毒锅。

- 3.5 试管。
- 3.6 灭菌平皿：直径9cm。
- 3.7 灭菌刻度吸管：10ml、2ml、1ml。
- 3.8 酒精灯。
- 3.9 恒温培养箱。
- 3.10 放大镜。

4 操作步骤

4.1 用灭菌吸管吸取1:10稀释的检样2ml,分别注入到两个灭菌平皿内,每皿1ml。另取1ml注入到9ml灭菌生理盐水试管中(注意勿使吸管接触液面),更换一支吸管,并充分混匀,使成1:100稀释液。吸取2ml,分别注入到两个灭菌平皿内,每皿1ml。如样品含菌量高,还可再稀释成1:1000,1:10000,……等,每种稀释度应换1支吸管。

4.2 将熔化并冷至45~50℃的卵磷脂、吐温80、营养琼脂培养基倾注平皿内,每皿约15ml,另倾注一个不加样品的灭菌空平皿,作空白对照。随即转动平皿,使样品与培养基充分混合均匀,待琼脂凝固后,翻转平皿,置37℃培养箱内培养48h。

5 菌落计数方法

先用肉眼观察,点数菌落数,然后再用放大5~10倍的放大镜检查,以防遗漏。记下各平皿的菌落数后。求出同一稀释度各平皿生长的平均菌落数。若平皿中有连成片状的菌落或花点样菌落蔓延生长时,该平皿不宜计数。若片状菌落不到平皿中的一半,而其余一半中菌落数分布又很均匀,则可将此半个平皿菌落计数后乘2,以代表全皿菌落数。

6 菌落计数及报告方法

6.1 首先选取平均菌落数在30~300之间的平皿,作为菌落总数测定的范围。当只有一个稀释度的平均菌落数符合此范围时,即以该平皿菌落数乘其稀释倍数(见表中例1)。

6.2 若有两个稀释度,其平均菌落数均在30~300个之间,则应求出两者菌落总数之比值来决定。若其比值小于或等于2,应报告其平均数,若大于2则报告其中较小的菌落数(见表中例2及例3)。

6.3 若所有稀释度的平均菌落数均大于300个,则应按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数报告之(见表中例4)。

6.4 若所有稀释度的平均菌落数均少于30个,则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数报告之(见表中例5)。

6.5 若所有稀释度的平均菌落数均不在30~300个之间,其中一个稀释度大于300个,而相邻的另一稀释度小于30个时,则以接近30或300的平均菌落数乘以稀释倍数报告之(见表中例6)。

6.6 若所有的稀释度均无菌生长,报告数为每克或每毫升小于10个。

6.7 菌落计数的报告,菌落数在10以内时,按实有数值报告之,大于100时,采用二位有效数字,在二位有效数字后面的数值,应以四舍五入法计算。为了缩短数字后面零的个数,可用10的指数来表示(见下表报告方式栏)。在报告菌落数为“不可计”时,应注明样品的稀释度。

细菌计数结果及报告方法

| 例次 | 不同稀释度的平均菌落数 | | | 两稀释度菌数之比 | 菌落总数 个/g 或 个/ml | 报告方式 个/g 或 个/ml |
|----|------------------|------------------|------------------|----------|--------------------|--------------------------------|
| | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | | | |
| 1 | 1365 | 164 | 20 | — | 16400 | 16000 或 1.6 × 10 ⁴ |
| 2 | 2760 | 295 | 46 | 1.6 | 38000 | 38000 或 3.8 × 10 ⁴ |
| 3 | 2890 | 271 | 60 | 2.2 | 27100 | 27000 或 2.7 × 10 ⁴ |
| 4 | 不可计 | 4650 | 513 | — | 513000 | 510000 或 5.1 × 10 ⁵ |
| 5 | 27 | 11 | 5 | — | 270 | 270 或 2.7 × 10 ² |
| 6 | 不可计 | 305 | 12 | — | 30500 | 31000 或 3.1 × 10 ⁴ |

附加说明：

本标准由中国预防医学科学院环境卫生监测所归口。

本标准由“化妆品微生物标准检验方法”起草小组起草。

本标准主要起草人周淑玉。

本标准由中国预防医学科学院环境卫生监测所负责解释。

中华人民共和国国家标准

化妆品微生物标准检验方法 粪大肠菌群

UDC 668.58 : 576
.85.07

GB 7918.3—87

Standard methods of microbiological
examination for cosmetics
Fecal coliforms

粪大肠菌群细菌来源于人和温血动物的粪便。检出粪大肠菌群表明该化妆品已被粪便污染，有可能存在其他肠道致病菌或寄生虫等病原体的危险。因此粪大肠菌被列为重要的卫生指标菌。

1 方法提要

根据粪大肠菌群所具有的生物特性，如革兰氏阴性无芽胞杆菌在 44℃ 培养 24~48h 能发酵乳糖产酸并产气，能在选择性培养基上产生典型菌落，能分解色氨酸产生靛基质。

2 培养基和试剂

2.1 乳糖胆盐培养基

| | | |
|-----|--------------|--------|
| 成分： | 蛋白胨 | 20g |
| | 猪胆盐 | 5g |
| | 乳糖 | 5g |
| | 0.4% 溴甲酚紫水溶液 | 2.5ml |
| | 蒸馏水 | 1000ml |

制法：将蛋白胨、胆盐及乳糖溶于蒸馏水中，调 pH 到 7.4，加入指示剂，混匀，分装试管（每支试管中加一个小倒管）。115℃ (10 lb) 20min 灭菌。

2.2 双倍浓度乳糖胆盐培养基

按上述乳糖胆盐培养基成分，蒸馏水量不变，其他分量加倍。

2.3 伊红美蓝(EMB)琼脂

| | | |
|-----|------------|--------|
| 成分： | 蛋白胨 | 10g |
| | 乳糖 | 10g |
| | 磷酸氢二钾 | 2g |
| | 琼脂 | 20g |
| | 2% 伊红水溶液 | 20ml |
| | 0.5% 美蓝水溶液 | 13ml |
| | 蒸馏水 | 1000ml |

制法：先将琼脂加到 900ml 蒸馏水中，加热溶解，然后加入磷酸氢二钾蛋白胨，混匀，使之溶解。再以蒸馏水补足至 1000ml。校正 pH 值为 7.2~7.4，分装于烧瓶内，121℃ (15 lb) 15 min 高压灭菌备用。临用时加入乳糖并加热融化琼脂。冷至 60℃ 左右以无菌手续加入灭菌的伊红美蓝溶液，摇匀。倾注平皿备用。

2.4 蛋白胨水(作靛基质试验用)

| | | |
|-----|------------|--------|
| 成分: | 蛋白胨(或胰蛋白胨) | 20g |
| | 氯化钠 | 5g |
| | 蒸馏水 | 1000ml |

制法:将上述成分加热熔化,调pH值为7.0~7.2,分装小试管,高压灭菌121℃(15 lb)15 min。

2.5 靛基质试剂

柯凡克试剂:将5g对二甲氨基苯甲醛溶解于75ml戊醇中,然后缓慢加入浓盐酸25ml。

试验方法:接种细菌于蛋白胨水中,于44℃培养24h。沿管壁加柯凡克试剂0.3~0.5ml,轻摇试管。阳性者于试剂层显深玫瑰红色。

注:蛋白胨应含有丰富的色氨酸,每批蛋白胨买来后,应先用已知菌种鉴定后方可使用。

2.6 革兰氏染色法

2.6.1 染液制备

2.6.1.1 结晶紫染色液:

| | |
|----------|------|
| 结晶紫 | 1g |
| 95%酒精 | 20ml |
| 1%草酸铵水溶液 | 80ml |

将结晶紫溶于酒精中,然后与草酸铵溶液混合。

2.6.1.2 革兰氏碘液:

| | |
|-----|-------|
| 碘 | 1g |
| 碘化钾 | 2g |
| 蒸馏水 | 300ml |

将碘与碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许,充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至300ml。

2.6.1.3 脱色液:95%乙醇。

2.6.1.4 复染液:

a. 沙黄复染液:

| | |
|-------|-------|
| 沙黄 | 0.25g |
| 95%酒精 | 10ml |
| 蒸馏水 | 90ml |

将沙黄溶解于酒精中,然后用蒸馏水稀释。

b. 稀石碳酸复红液:称取碱性复红10g,研细,加95%乙醇100ml,放置过夜,滤纸过滤。取该液10ml,加5%石碳酸水溶液90ml混合,即为石碳酸复红液。再取此液10ml加水90ml,即为稀石碳酸复红液。

2.6.2 染色法

2.6.2.1 将涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染色液,染1min,水洗。

2.6.2.2 滴加革兰氏碘液,作用1min,水洗。

2.6.2.3 滴加95%酒精脱色,约30s,或将酒精滴满整个涂片,立即倾去,再用酒精滴满整个涂片,脱色10s,水洗。

2.6.2.4 滴加复染液,复染1min,水洗,待干,镜检。

2.6.3 染色结果

革兰氏阳性菌呈紫色,革兰氏阴性菌呈红色。

注:如用1:10稀石碳酸复红染色液作复染液,复染时间仅需10s。

3 仪器

3.1 恒温水浴或隔水式恒温箱:44℃。

- 3.2 温度计。
- 3.3 显微镜。
- 3.4 载玻片。
- 3.5 接种环。
- 3.6 电炉。
- 3.7 锥形瓶。
- 3.8 试管。
- 3.9 小倒管。
- 3.10 pH 计或 pH 试纸。
- 3.11 高压消毒锅。
- 3.12 灭菌吸管。
- 3.13 灭菌平皿。

4 操作步骤

4.1 取 10ml 1:10 稀释的样品, 加到 10ml 双倍浓度的乳糖胆盐培养基中, 置 44℃ 培养箱中培养 24~48h, 如不产酸也不产气, 则报告为粪大肠菌群阴性。

4.2 如产酸产气, 划线接种到伊红美蓝琼脂平板上, 置 37℃ 培养 18~24h。同时取该培养液 1~2 滴接种到蛋白胨水中, 置 44℃ 培养 24h。

经培养后, 在上述平板上观察有无典型菌落生长。大肠菌群在伊红美蓝琼脂培养基上的典型菌落呈深紫黑色, 圆形, 边缘整齐, 表面光滑湿润, 常具有金属光泽。也有的呈紫黑色, 不带或略带金属光泽, 或粉紫色, 中心较深的菌落。亦常为大肠菌群, 均应注意挑选。

4.3 挑取上述可疑菌落, 涂片作革兰氏染色镜检。

4.4 在蛋白胨水培养液中, 加入靛基质试剂约 0.5ml, 观察靛基质反应。阳性者液面呈玫瑰红色; 阴性反应液面呈试剂本色。

5 检验结果报告

平板上有典型菌落, 并经证实为革兰氏阴性短杆菌, 靛基质试验阳性, 则可报告被检样品中检出粪大肠菌群。

附加说明:

本标准由中国预防医学科学院环境卫生监测所归口。

本标准由“化妆品微生物标准检验方法”起草小组起草。

本标准主要起草人周淑玉。

本标准由中国预防医学科学院环境卫生监测所负责解释。

中华人民共和国国家标准

化妆品微生物标准检验方法 绿 脓 杆 菌

UDC 668.58 : 576
.85.07

GB 7918.4—87

Standard methods of microbiological
examination for cosmetics
Pseudomonas aeruginosa

绿脓杆菌在自然界分布甚广,空气、水、土壤中均有存在。对人有致病力,常引起人皮肤化脓感染,特别是烧伤、烫伤、眼部疾病患者被感染后,常使病情恶化,并可引起败血症,因此,在化妆品卫生标准中规定不得检出绿脓杆菌。

1 方法提要

根据本菌生物学特征:革兰氏阴性杆菌,氧化酶阳性,能产生绿脓菌素。此外还能液化明胶,还原硝酸盐为亚硝酸盐,在42℃条件下生长等,可与类似菌相区别。

2 培养基和试剂

2.1 SCDLP 液体培养基

见 GB 7918.1—87《化妆品微生物标准检验方法 总则》。

2.2 十六烷三甲基溴化铵培养基

| | | |
|-----|-----------|--------|
| 成分: | 牛肉膏 | 3g |
| | 蛋白胨 | 10g |
| | 氯化钠 | 5g |
| | 十六烷三甲基溴化铵 | 0.3g |
| | 琼脂 | 20g |
| | 蒸馏水 | 1000ml |

制法:除琼脂外,将上述成分混合加热溶解,调pH为7.4~7.6,加入琼脂,115℃(101b) 20min 灭菌后,制成平板备用。

2.3 乙酰胺培养基

| | | |
|-----|--|--------|
| 成分: | 乙酰胺 | 10.0g |
| | 氯化钠 | 5.0g |
| | 无水磷酸氢二钾 | 1.39g |
| | 无水磷酸二氢钾 | 0.73g |
| | 硫酸镁(MgSO ₄ · 7H ₂ O) | 0.5g |
| | 酚红 | 0.012g |
| | 琼脂 | 20g |
| | 蒸馏水 | 1000ml |

制法:除琼脂和酚红外,将其他成分加到蒸馏水中,加热溶解,调pH为7.2,加入琼脂、酚红,121℃

(15 lb)20 min 高压灭菌后,制成平板备用。

2.4 绿脓菌色素测定用培养基

| | |
|---------|--------|
| 成分: 蛋白胨 | 20g |
| 氯化镁 | 1.4g |
| 硫酸钾 | 10g |
| 琼脂 | 18g |
| 甘油(化学纯) | 10g |
| 蒸馏水 | 1000ml |

制法:将蛋白胨、氯化镁和硫酸钾加到蒸馏水中,加温使溶解,调 pH 至 7.4,加入琼脂和甘油,加热溶解,分装于试管内,115℃(10 lb)20 min 高压灭菌后,制成斜面备用。

2.5 明胶培养基

| | |
|---------|--------|
| 成分: 牛肉膏 | 3g |
| 蛋白胨 | 5g |
| 明胶 | 120g |
| 蒸馏水 | 1000ml |

制法:取各成分加在蒸馏水中浸泡 20min,随时搅拌加温使溶解,调 pH 至 7.4,分装于试管内,经 115℃(10 lb)20 min 灭菌后,直立制成高层备用。

2.6 硝酸盐蛋白胨水培养基

| | |
|---------|--------|
| 成分: 蛋白胨 | 10g |
| 酵母浸膏 | 3g |
| 硝酸钾 | 2g |
| 亚硝酸钠 | 0.5g |
| 蒸馏水 | 1000ml |

制法:将蛋白胨和酵母浸膏加到蒸馏水中,加温使溶解,调 pH 为 7.2,煮沸过滤后补足液量,加入硝酸钾和亚硝酸钠,溶解混匀,分装到加有小倒管的试管中,115℃(10 lb)20 min 灭菌后备用。

2.7 普通琼脂斜面培养基

| | |
|---------|--------|
| 成分: 蛋白胨 | 10g |
| 牛肉膏 | 3g |
| 氯化钠 | 5g |
| 琼脂 | 15g |
| 蒸馏水 | 1000ml |

制法:除琼脂外,将其余成分溶解于蒸馏水中,调 pH 为 7.2~7.4,加入琼脂,加热溶解,分装试管,121℃(15 lb)15 min 高压灭菌后,制成斜面备用。

3 仪器

- 3.1 培养箱:37℃、42℃。
- 3.2 锥形烧瓶。
- 3.3 试管。
- 3.4 灭菌平皿。
- 3.5 灭菌刻度吸管。
- 3.6 显微镜。
- 3.7 载玻片。
- 3.8 接种针、接种环。

3.9 电炉。

3.10 高压消毒锅。

4 操作步骤

4.1 增菌培养：取 1:10 样品稀释液 10ml 加到 90ml SCDLP 液体培养基中，置 37℃ 培养 18~24h。如有绿脓杆菌生长，培养液表面多有一层薄菌膜，培养液常呈黄绿色或蓝绿色。

注：如无 SCDLP 液体培养基时，可用普通肉汤培养基。检验含防腐剂的化妆品时，在每 1000 ml 普通肉汤中加 1g 卵磷脂、7g 吐温 80。

4.2 分离培养：从培养液的薄菌膜处挑取培养物，划线接种在十六烷三甲基溴化铵琼脂平板上，置 37℃ 培养 18~24h。凡绿脓杆菌在此培养基上，其菌落扁平无定型，向周边扩散或略有蔓延，表面湿润，菌落呈灰白色，菌落周围培养基常扩散有水溶性色素，此培养基选择性强，大肠艾希氏菌不能生长，革兰氏阳性菌生长较差。

在缺乏十六烷三甲基溴化铵琼脂时也可用乙酰胺培养基进行分离，将菌液划线接种于平皿中，放 37℃ 培养 24h，绿脓杆菌在此培养基上生长良好，菌落扁平，边缘不整，菌落周围培养基略带粉红色，其他菌不生长。

4.3 染色镜检：挑取可疑的菌落，涂片，革兰氏染色，镜检为革兰氏阴性者应进行氧化酶试验。

4.4 氧化酶试验：取一小块洁净的白色滤纸片放在灭菌平皿内，用无菌玻璃棒挑取绿脓杆菌可疑菌落涂在滤纸片上，然后在其上滴加一滴新配制的 1% 二甲基对苯二胺试液，在 15~30s 之内，出现粉红色或紫红色时，为氧化酶试验阳性，若培养物不变色，氧化酶试验阴性。

4.5 绿脓菌素试验：取可疑菌落 2~3 个，分别接种在绿脓菌素测定用培养基上，置 37℃ 培养 24h，加入氯仿 3~5ml，充分振荡使培养物中的绿脓菌素溶解于氯仿液内，待氯仿提取液呈蓝色时，用吸管将氯仿移到另一试管中并加入 1N 的盐酸 1ml 左右，振荡后，静置片刻。如上层盐酸液内出现粉红色到紫红色时为阳性，表示被检物中有绿脓菌素存在。

4.6 硝酸盐还原产气试验：挑取被检的纯培养物，接种在硝酸盐胨水培养基中，置 37℃ 培养 24h，观察结果。凡在硝酸盐胨水培养基内的小倒管中有气体者，即为阳性，表明该菌能还原硝酸盐，并将亚硝酸盐分解产生氮气。

4.7 明胶液化试验：取绿脓杆菌可疑菌落的纯培养物，穿刺接种在明胶培养基内，置 37℃ 培养 24h，取出放冰箱 10~30min，如仍呈溶解状时即为明胶液化试验阳性，如凝固不溶者为阴性。

4.8 42℃ 生长试验：挑取纯培养物，接种在普通琼脂斜面培养基上，放在 41~42℃ 培养箱中，培养 24~48h，绿脓杆菌能生长，为阳性，而近似的荧光假单胞菌则不能生长。

5 检验结果报告

被检样品经增菌分离培养后，经证实为革兰氏阴性杆菌，氧化酶及绿脓菌素试验皆为阳性者，即可报告被检样品中检出有绿脓杆菌。如绿脓菌素试验阴性而液化明胶、硝酸盐还原产气和 42℃ 生长试验三者皆为阳性时，仍可报告被检样品中有绿脓杆菌。

附加说明：

本标准由中国预防医学科学院环境卫生监测所归口。

本标准由“化妆品微生物标准检验方法”起草小组起草。

本标准主要起草人周淑玉。

本标准由中国预防医学科学院环境卫生监测所负责解释。

中华人民共和国国家标准

化妆品微生物标准检验方法 金黄色葡萄球菌

UDC 668.58 : 576
.85.07

GB 7918.5—87

Standard methods of microbiological
examination for cosmetics
Staphylococcus aureus

金黄色葡萄球菌在外界分布较广，抵抗力也较强，能引起人体局部化脓性病灶，严重时可导致败血症，因此化妆品中检验金黄色葡萄球菌有重要意义。

1 方法提要

根据本菌特有的形态及培养特性，应用 Baird Parker 平板进行分离，该平板中的氯化锂可抑制革兰氏阴性细菌生长，丙酮酸钠可刺激金黄色葡萄球菌生长，以提高检出率，并利用分解甘露醇和血浆凝固酶等特征，以兹鉴别。

2 培养基和试剂

2.1 培养基

2.1.1 SCDLP 液体培养基

见 GB 7918.1—87《化妆品微生物标准检验方法 总则》。

2.1.2 7.5%的氯化钠肉汤

| | |
|---------|--------|
| 成分： 蛋白胨 | 10g |
| 牛肉膏 | 3g |
| 氯化钠 | 75g |
| 蒸馏水 | 1000ml |

制法：将上述成分加热溶解，调 pH 为 7.4，分装，121℃ (15 lb) 15 min 高压灭菌。

2.1.3 Baird Parker 平板

| | |
|---------------------------------|-------|
| 成分： 胰蛋白胨 | 10g |
| 牛肉膏 | 5g |
| 酵母浸膏 | 1g |
| 丙酮酸钠 | 10g |
| 甘氨酸 | 12g |
| 氯化锂 (LiCl · 6 H ₂ O) | 5g |
| 琼脂 | 20g |
| 蒸馏水 | 950ml |

pH7.0 ± 0.2

增菌剂的配制：30%卵黄盐水 50ml 与除菌过滤的 1%亚硝酸钾溶液 10ml 混合，保存于冰箱内。

制法：将各成分加到蒸馏水中，加热煮沸完全溶解，冷至 25℃ 校正 pH。分装每瓶 95ml，121℃ 高压

灭菌 15min。临用时加热溶化琼脂，每 95ml 加入预热至 50℃ 的卵黄亚硝酸钾增菌剂 5ml，摇匀后倾注平板。培养基应是致密不透明的。使用前在冰箱储存不得超过 48h。

2.1.4 血琼脂培养基

| | |
|------------|-------|
| 成分： 营养琼脂 | 100ml |
| 脱纤维羊血(或兔血) | 10ml |

制法：将营养琼脂加热溶化，待冷至 50℃ 左右以无菌手续加入脱纤维羊血，摇匀，制成平板，置冰箱内备用。

2.1.5 甘露醇发酵培养基

| | |
|---------------|--------|
| 成分： 蛋白胨 | 10g |
| 氯化钠 | 5g |
| 甘露醇 | 10g |
| 牛肉膏 | 5g |
| 0.2% 溴麝香草酚蓝溶液 | 12ml |
| 蒸馏水 | 1000ml |

制法：将蛋白胨、氯化钠、牛肉膏加到蒸馏水中，加热溶解，调 pH 7.4，加入甘露醇和指示剂，混匀后分装试管中，115℃ (10 lb) 20 min 灭菌备用。

2.1.6 兔(人)血浆制备

取 3.8% 柠檬酸钠溶液 [121℃ (15 lb) 30 min 灭菌] 1 份加兔(人)全血 4 份，混匀静置，2000~3000 r/min 离心 3~5min。血球下沉，取上面血浆。

3 设备和材料

- 3.1 显微镜。
- 3.2 培养箱。
- 3.3 离心机。
- 3.4 灭菌吸管：1ml, 5ml, 10ml。
- 3.5 灭菌试管。
- 3.6 载玻片。
- 3.7 酒精灯。

4 操作步骤

4.1 增菌：取 1:10 稀释的样品 10ml 接种到 90ml SCDLP 液体培养基中(如无此培养基也可用 7.5% 氯化钠肉汤)，置 37℃ 培养箱，培养 24h。

注：如无此培养基也可用 7.5% 氯化钠肉汤，检验含防腐剂的化妆品时，可在 1000 ml 此培养基中加 1 g 卵磷脂、7 g 吐温 80。

4.2 分离：自上述增菌培养液中，取 1~2 接种环，划线接种在 Baird Parker 氏培养基，如无此培养基也可划线接种到血琼脂平板，置 37℃ 培养 24~48h。在血琼脂平板上菌落呈金黄色，大而突起，圆形，不透明，表面光滑，周围有溶血圈。在 Baird Parker 氏培养基上为圆形，光滑，凸起，湿润，直径为 2~3mm，颜色呈灰色到黑色，边缘为淡色，周围为一混浊带，在其外层有一透明带。用接种针接触菌落似有奶油树胶的软度。偶尔会遇到非脂肪溶解的类似菌落，但无混浊带及透明带。挑取单个菌落分纯在血琼脂平板上，置 37℃ 培养 24h。

4.3 染色镜检：挑取分纯菌落，涂片，进行革兰氏染色，镜检。金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性菌，排列成葡萄状，无芽胞，无荚膜，致病性葡萄球菌，菌体较小，直径约为 0.5~1μm。

4.4 甘露醇发酵试验：取上述分纯菌落接种到甘露醇发酵培养基中，置 37℃ 培养 24h，金黄色葡萄球菌应能发酵甘露醇产酸。

4.5 血浆凝固酶试验

4.5.1 玻片法：取清洁干燥载玻片，一端滴加一滴灭菌生理盐水，另一端滴加一滴血浆，用接种环挑取待检菌落，分别在生理盐水及血浆中充分研磨混合。血浆与菌苔混悬液在 5min 内出现团块或颗粒状凝块时，而盐水滴仍呈均匀混浊无凝固现象者为阳性，如两者均无凝固现象则为阴性。凡玻片试验呈阴性反应或盐水滴与血浆滴均有凝固现象，再进行试管凝固酶试验。

4.5.2 试管法：吸取 1 : 4 新鲜血浆 0.5 ml，放入灭菌小试管中，再加入待检菌 24h 肉汤培养物 0.5ml。混匀，放 37℃ 温箱或水浴中，每半小时观察一次，24h 之内如呈现凝块即为阳性。同时以已知血浆凝固酶阳性和阴性菌株肉汤培养物及肉汤培养基各 0.5ml，分别加入灭菌小试管内 0.5ml 1 : 4 血浆混匀，做为对照。

5 检验结果报告

凡在上述选择平板上有可疑菌落生长，经染色镜检，证明为革兰氏阳性葡萄球菌，并能发酵甘露醇产酸。血浆凝固酶试验阳性者，可报告被检样品检出金黄色葡萄球菌。

附加说明：

本标准由中国预防医学科学院环境卫生监测所归口。

本标准由“化妆品微生物标准检验方法”起草小组起草。

本标准主要起草人刘以贤。

本标准由中国预防医学科学院环境卫生监测所负责解释。