

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,其他成分量加倍。

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 稀释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。