



中华人民共和国国家标准

GB/T 24404—2009/ISO 21149:2006

化妆品中需氧嗜温性细菌的检测和计数法

Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria in cosmetics

(ISO 21149:2006, Cosmetics—Microbiology—Enumeration and
detection of aerobic mesophilic bacteria, IDT)

2009-09-30 发布

2009-12-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准等同采用 ISO 21149:2006《化妆品 微生物学 需氧嗜温性细菌的检测和计数》(英文版)。

本标准等同翻译 ISO 21149:2006。

为便于使用,本标准做了下列编辑性修改:

a) 删除国际标准的前言。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D 均为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出。

本标准由全国进出口食品安全检测标准化技术委员会(SAC/TC 445)归口。

本标准起草单位:中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中华人民共和国河南出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:顾鸣、韩伟、苗丽、赵宏、杨捷琳、靳海彤。

化妆品中需氧嗜温性细菌的检测和计数法

1 范围

本标准规定了化妆品中需氧嗜温性细菌的常规检测和计数方法,可经需氧培养后对琼脂培养基上的菌落数计数,或检查经增菌后有无细菌生长。

本标准可能不适用于某些难溶于水的产品和清洁类用品等样品的检验,可用被证实具有相同效果其他试验方法替代。必要时,可选用本标准的参考文献中列举的确证方法对检测和计数的微生物进行确证。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

ISO 21148 化妆品 微生物学 微生物检验通则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

需氧嗜温性细菌 aerobic mesophilic bacteria

在本标准规定的需氧条件下生长的嗜温性细菌。

注:在该条件下,酵母菌、霉菌等其他类型的微生物也可能生长。

3.2

产品 product

实验室获得用于检测的化妆产品部分。

3.3

样品 sample

检测中用于制备初悬液的产品部分(至少 1 g 或 1 mL)。

3.4

初悬液 initial suspension

一定体积的溶液(稀释剂、中和剂、肉汤或其混合物)制成的样品悬液或溶液。

3.5

样品稀释液 sample dilution

用于制备初悬液的稀释液。

4 原则

4.1 一般性原则

本方法涉及非选择性琼脂培养基上的菌落计数,或是增菌后有无细菌生长。样品中可能抑制细菌生长的物质应被中和,以便于检测存活的细菌。无论何种情况和使用何种方法,对产品抑菌性能的中和效果都应被检查和确认。

4.2 平板计数法

平板计数法包括以下步骤:

- 使用特定培养基,制备倾注平板或涂布平板,然后将一定量产品的初悬液或稀释液接种到平板中;
- 将平板在有氧条件下 $32.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $72\text{ h} \pm 6\text{ h}$;
- 计数菌落形成单位(CFU),并计算每 mL 或每 g 产品中需氧嗜温性细菌的数量。

4.3 膜过滤法

膜过滤法包括以下步骤:

- 按验证过的步骤(见 13.3.4),将一定量制备好的样品悬液,通过事先由少量无菌稀释剂润湿的过滤装置进行过滤处理和清洗,然后将过滤膜移至特定琼脂培养基的表面(见 ISO 21148);
- 在有氧条件下,置 $32.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $72\text{ h} \pm 6\text{ h}$;
- 计数菌落形成单位(CFU),并计算每毫升(mL)或每克(g)产品中需氧嗜温性细菌的数量。

4.4 经增菌处理后检测细菌

增菌后细菌的检测包括以下步骤:

- 将一定量初悬液加入到非选择性液体培养基(含有合适的中和剂和/或溶剂)中,置 $32.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,至少培养 20 h;
- 将一定量的上述增菌液接种到非选择性琼脂培养基上;
- 在有氧条件下 $32.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、培养 48 h~72 h;
- 检查细菌生长情况,结果表达为每份质量或体积的样品中需氧嗜温性细菌“阳性/阴性”。

5 稀释剂、中和剂和培养基

5.1 原则

通常的规格要求在 ISO 21148 中已有详细描述。配制用水为蒸馏水或纯净水在 ISO 21148 中也有详细规定。下列稀释剂、中和剂和培养基适用于需氧嗜温性细菌的检测,其他证实有效的稀释剂、中和剂和培养基也可用于本标准。

5.2 中和稀释剂和稀释剂

5.2.1 原则

稀释剂用于分散样品,如果样品含有抑菌性物质,稀释剂中可添加中和剂。在检测前应该确认中和剂的效果(见第 13 章);有关合适的中和剂信息在附录 A 有介绍。

5.2.2 中和稀释剂

5.2.2.1 酪蛋白消化物-大豆卵磷脂-吐温 20 培养基(SCDLP 20 肉汤)

5.2.2.1.1 成分

胰酶消化的酪蛋白	20.0 g
大豆卵磷脂	5.0 g
吐温 20	40.0 mL
水	960.0 mL

5.2.2.1.2 制备

将吐温 20 溶于 960 mL 水中,在 $49\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热混匀;然后加入胰酶消化的酪蛋白和大豆卵磷脂,持续加热 30 min 溶解;混合均匀后分装至合适的容器中,置 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min 后,在室温下调整 pH 值至 7.3 ± 0.2 。

5.2.2.2 其他中和稀释剂

适当情况下也会用到其他中和剂,参见附录 A 和附录 B。

5.2.3 稀释剂

5.2.3.1 液体 A

5.2.3.1.1 成分

动物性蛋白胨	1.0 g
水	1 000 mL

5.2.3.1.2 制备

将 1 g 蛋白胨溶于 1.0 L 水中,加热并持续搅拌溶解;混合均匀后分装至合适容器中,置 121 °C 高压灭菌 15 min。灭菌后,在室温下调整 pH 值为 7.1 ± 0.2 。

5.2.3.2 其他稀释剂

适当情况下也会用到其他稀释剂,参见附录 C。

5.3 细菌悬液稀释剂(胰蛋白胨盐溶液)

5.3.1 成分

胰蛋白胨	1.0 g
氯化钠	8.5 g
水	1 000 mL

5.3.2 制备

将上述成分溶解在水中,加热并持续搅拌,混合均匀后分装至合适容器中,置 121 °C 高压灭菌 15 min 后,在室温下调整 pH 值至 7.0 ± 0.2 。

5.4 培养基

5.4.1 原则

培养基应按如下方法配制,或按照制造商所介绍的方法使用脱水培养基。当合成培养基的成分和(或)使用范围与这里给出的配方相同时也可使用。

5.4.2 计数用培养基

5.4.2.1 大豆酪蛋白消化物琼脂培养基(SCDA)或胰胨大豆琼脂斜面(TSA)

5.4.2.1.1 成分

胰酶消化的酪蛋白	15.0 g
大豆粉木瓜蛋白酶消化物	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

5.4.2.1.2 制备

将上述成分或完全脱水培养基溶解在水中,加热搅拌溶解;然后分装在合适的容器中;置 121 °C 高压灭菌 15 min 后,在室温下调整 pH 值至 7.3 ± 0.2 。

5.4.2.2 其他计数用培养基

适当情况下也会用到其他培养基,参见附录 D。

5.4.3 检测用培养基

5.4.3.1 原则

在进行选择时,增菌肉汤和琼脂培养基可用于细菌检测。增菌肉汤用于分散样品并增加初始微生物的数量。若待测样品具有抑菌性时,在增菌肉汤中可添加中和剂。

5.4.3.2 增菌肉汤:Eugon LT 100 肉汤

5.4.3.2.1 原则

这种培养基包含具有中和样品中抑制性物质的成分(卵磷脂和吐温 80)和分散剂(辛基酚聚醚 9)。

5.4.3.2.2 成分

胰酶消化的酪蛋白	15.0 g
大豆粉木瓜蛋白酶消化物	5.0 g
L-胱氨酸	0.7 g
氯化钠	4.0 g
亚硫酸钠	0.2 g
葡萄糖	5.5 g
卵磷脂	1.0 g
吐温 80	5.0 g
辛基酚聚醚 9	1.0 g
水	1 000 mL

5.4.3.2.3 制备

将吐温 80、辛基酚聚醚 9 和卵磷脂先后溶解在沸腾的水中,直至完全溶解;再边加热搅拌边加入其他成分进行溶解;然后将培养基分装在合适的容器中。置 121 °C 高压灭菌 15 min 后,在室温下调整 pH 值至 7.0 ± 0.2 。

5.4.3.3 检测用琼脂培养基

5.4.3.3.1 Eugon LT 100 琼脂培养基

5.4.3.3.1.1 成分

胰酶消化的酪蛋白	15.0 g
大豆粉木瓜蛋白酶消化物	5.0 g
L-胱氨酸	0.7 g
氯化钠	4.0 g
亚硫酸钠	0.2 g
葡萄糖	5.5 g
卵磷脂	1.0 g
吐温 80	5.0 g
辛基酚聚醚 9	1.0 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

5.4.3.3.1.2 制备

将吐温 80、辛基酚聚醚 9 和卵磷脂先后溶解在沸腾的水中,直至完全溶解;再边加热搅拌边加入其他成分进行溶解,轻轻搅拌避免飞溅;然后将培养基分装在合适的容器中;置 121 °C 高压灭菌 15 min 灭菌后,在室温下调整 pH 值至 7.0 ± 0.2 。

5.4.3.3.2 其他检测用琼脂培养基

其他可使用的培养基可参见附录 D。

5.4.4 标准菌株培养用琼脂培养基

使用大豆酪蛋白消化物琼脂培养基(SCDA)或胰酪大豆琼脂斜面(TSA)(5.4.2.1)。

6 仪器设备及玻璃器皿

仪器、设备和玻璃器皿见 ISO 21148。

7 微生物菌种

为了验证中和剂的功效,分别使用了革兰氏阴性和阳性¹⁾²⁾的两种标准菌株:

——铜绿假单胞菌 ATCC 9027(等效菌株:CIP 82.118、NCIMB 8626、NBRC 13275、KCTC 2513 或其他等效的国家收藏标准菌株);

——金黄色葡萄球菌 ATCC³⁾ 6538(等效菌株:CIP¹⁾ 4.83、NCIMB⁴⁾ 9518、NBRC⁵⁾ 13276、KCTC²⁾ 1916 或其他等效的国家收藏标准菌株)。

其他可供选择的革兰氏阴性菌株有:大肠杆菌 ATCC 8739(等效菌株:CIP 53.126、NCIMB 8545、NBRC 39722、KCTC 2571 或其他等效的国家收藏标准菌株)。

应按照标准菌株供应商提供的操作方法复苏菌种。

菌种应按 EN 12353 要求保存在实验室中。

8 化妆品产品和实验室样品的处理

如果待测的化妆品在室温下保藏的话,在分析前后不需要对产品(3.2)和样品(3.3)进行孵育、冷藏和冷冻处理。

待测化妆品的抽样见 ISO 21148,样品的分析按照 ISO 21148 的要求和下列步骤进行。

9 步骤

9.1 一般建议

使用无菌材料、仪器和无菌操作技术来制备样品、初悬液和稀释液。样品初悬液从完成制备到接种培养基内的时间不能超过 45 min,除非程序或文件中有特别注明。

9.2 初悬液的制备

9.2.1 原则

在检测中,使用至少 1 g 或 1 mL 的混合均匀的产品来制备样品初悬液。

注:S 代表样品准确的质量或体积。

初悬液通常是 1:10 的样品稀释液。如果存在重度污染和(或)1:10 的稀释液仍存在抑菌性,就需要更大量的稀释液或增菌肉汤。

9.2.2 水溶性产品

依照方法的要求,将化妆品样品(S)加入到适当体积的中和稀释剂(5.2.2)、稀释剂(5.2.3)或增菌肉汤(5.4.3.2)中。

注:稀释倍数为 d 。

9.2.3 非水溶性产品

将化妆品样品(S)加入到装有适量促溶剂(例:吐温 80)的合适容器中。将样品分散在促溶剂中,按照方法的要求,加入适量(例:9 mL)的中和稀释剂(5.2.2)、稀释剂(5.2.3)或增菌肉汤(5.4.3.2)中。

注:稀释倍数为 d 。

9.3 计数方法

9.3.1 稀释计数

通常,初悬液是最初始的计数稀释度。依照产品污染的预期程度,如果必要的话,可使用相同的稀释剂将初悬液进行连续稀释,制成系列梯度的稀释液(例:1:10 稀释度)。

1) CIP:法国巴斯德研究所菌种保藏中心。

2) KCTC:韩国典型菌种保藏中心。

3) ATCC:美国标准生物物品收藏中心。

4) NCIMB:英国食品工业与海洋细菌菌种保藏中心。

5) NBRC:日本技术评价研究所生物资源中心。

一般计数方法至少需要两个培养皿。但在常规检测中或同一种样品的梯度稀释中或参考以前的结果时,可以只使用一只培养皿。

9.3.2 平板计数法

9.3.2.1 倾注平板法

在直径为 85 mm~100 mm 的培养皿中,加入 1 mL 初悬液和样品稀释液(见第 13 章),倒入 15 mL~20 mL 琼脂培养基(5.4.2)(保存在不超过 48 °C 的水浴中)。如果使用更大的培养皿,倒入的琼脂培养基的量应相应增加。

小心旋转或倾注平板以使初悬液和(或)样品稀释液与培养基充分混合。在室温下,将培养皿放置于水平面上使平皿中的混合物凝固。

9.3.2.2 涂布平板法

在直径为 85 mm~100 mm 的培养皿中,加入 15 mL~20 mL 混合好的琼脂培养基(5.4.2)(保存在不超过 48 °C 的水浴中)。如果使用较大的培养皿,琼脂培养基的量应相应增加。将培养皿放入微生物箱或培养箱中使其冷却凝固。然后,将不少于 0.1 mL 的初悬液和(或)确认制备好的样品稀释液(见第 13 章),涂布在培养基的表面。

9.3.2.3 膜过滤法

使用表面孔径小于 0.45 μm 的滤膜。将适量的初悬液和样品稀释液(见第 13 章)(不少于 1 g 或 1 mL 的产品为宜)加到滤膜上,立即过滤和洗膜(按照确认的步骤进行,见第 13 章)。将滤膜转移至琼脂培养基的表面(5.4.2)。

9.3.2.4 培养

除非有其他规定,通常倒置平板放入 32.5 °C $\pm$ 2.5 °C 的培养箱中,培养 72 h $\pm$ 6 h 后,立即计数平板上的菌落数,如果不能立即计数,可将平板保存在冰箱内,但保存时间不得超过 24 h。

注:在某些情况中,产品内存在影响菌落计数的潜在物质时,则可以使用保存于冰箱中的具有相同样品稀释度和琼脂培养基的平行平板与培养过的平板进行比较。

9.4 增菌

9.4.1 原则

使用增菌肉汤(5.4.3.2)制备初悬液(见 9.2)时,选择下列步骤进行确认(见第 13 章)。

9.4.2 样品培养

9.4.2.1 原则

用肉汤(5.4.3.2)制备的初悬液,置 32.5 °C $\pm$ 2.5 °C 下培养至少 20 h。

9.4.2.2 次培养

使用灭菌移液管,将 0.1 mL~0.5 mL 培养后的初悬液移至装有大约 15 mL~20 mL 的适合的选择性培养基(5.4.2.1)的表面(培养皿直径 85 mm~100 mm)。如果使用较大的培养皿,琼脂培养基的量应相应增加。

9.4.2.3 培养

翻转培养平板(或者等到加入的悬液被琼脂吸收后再翻转),置 32.5 °C $\pm$ 2.5 °C 下培养 48 h~72 h。

10 菌落计数(平板计数和膜过滤法)

培养后,计算菌落数:

——培养皿中应有 30 CFU~300 CFU,如果低于 30 CFU,见 12.2.3。

——在滤膜上应有 15 CFU~150 CFU,如果低于 15 CFU,见 12.2.3。

11 生长的检测(增菌法)

增菌液移至琼脂培养板进行培养后,检查琼脂表面,记录有无细菌生长。

12 结果表示

12.1 平板菌落计数的计算方法

计算样品(S)中的细菌数量 N ,按式(1)、式(2)、式(3)计算:

$$N = m/(V \times d) \quad \dots\dots\dots(1)$$

$$N = c/(V \times d) \quad \dots\dots\dots(2)$$

$$N = \bar{X}_c/(V \times d) \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

m ——平行样菌落计数的算术平均数;

V ——每个平皿中接种物的体积,单位为毫升(mL);

d ——在合适计数范围内的最低稀释度的稀释倍数;

c ——单个平板上的菌落数;

$\bar{X}_c$ ——两个连续稀释度的菌落计数的加权平均数。

$\bar{X}_c$ 按式(4)计算:

$$\bar{X}_c = \sum c/(n_1 + 0.1n_2) \quad \dots\dots\dots(4)$$

式中:

$\sum c$ ——两个连续稀释度的所有平板的总菌落数;

n_1 ——在合适计数范围内的最低稀释度的平板数;

n_2 ——在合适计数范围内的第二个稀释度的平板数。

计算结果保留两位有效数字。如果最后一位数字小于5,则前一位数字无须更改,如果最后一位数字大于5,则前一位数字加一位。逐步进行,直至得到两位有效数字,注意得到的数字 N 。

12.2 说明

12.2.1 应充分考虑平板计数法固有的变异性。当两个结果之间的差异超过50%,或者用log表示超过0.3,即认为这两个结果存在差异。

为了计数的精确性,只计数平皿上菌落数在30~300之间或滤膜上菌落在15~150之间的培养皿。按照所采用的方法检查不同稀释倍数下的菌落数(见第13章)。

12.2.2 当平板上菌落数在30~300之间或膜上菌落数在15~150之间,结果表示如下[这里 S 表示样品(9.2)的质量或体积]:

——若 S 至少为1 g或1 mL,且 V 至少为1 mL,那么每毫升或每克样品中需氧嗜温性细菌的数量 = N/S ;

——若 S 少于1 g或1 mL,且/或 V 低于1 mL,那么样品中需氧嗜温性细菌(注意用于检测的样品的量应计算在 S 和 V 之内)的数量 = N 。

将结果表示为1.0至9.9之间的数字乘以10的幂指数(见12.3.1、12.3.2、12.3.3和12.3.7)。

12.2.3 当平板上菌落数低于30或者膜上菌落数低于15,结果表示如下:

——若 S 至少为1 g或1 mL,且 V 至少为1 mL,那么每毫升或每克样品中需氧嗜温性细菌的估算数量 = N/S ;

——若 S 少于1 g或1 mL,且/或 V 低于1 mL,那么样品中需氧嗜温性细菌(注意用于检测的样品的量应计算在 S 和 V 之内)的估算数量 = N 。

S 表示样品的质量或体积(9.2)。

将结果表示为1.0至9.9之间的数字乘以10的幂指数(见12.3.4、12.3.5和12.3.6)。

12.2.4 当没有观察到有菌落生长时,结果表示如下:

——每毫升或每克样品中需氧嗜温性细菌的数量低于 $1/d \times V \times S$ (S 至少为1 g或1 mL);

——样品 S 中需氧嗜温性细菌的数量低于 $1/d \times V$ (注意用于检测的样品的量应计算在 S 和 V 之内) (S 少于1 g或1 mL)。

d 为初悬液(9.2)的稀释倍数且 V 为 1(平板技术法和膜过滤法)或 0.1(涂布平板法)(见 12.3.8)。

12.3 举例

12.3.1 例 1 一个稀释度两个平板

$S=1$ g 或 1 mL; $V=1$; 计数可得: 稀释度为 10^{-1} 、38 和 42。

根据式(1):

每毫升或每克样品中需氧嗜温性细菌的数量 $N=m/(V \times d)=40/(1 \times 10^{-1})=40/0.1=400$ 或 4×10^2 。

12.3.2 例 2 一个稀释度一个平板

$S=1$ g 或 1 mL; $V=1$; 计数可得: 稀释度为 10^{-1} 、60。

根据式(2):

每毫升或每克样品中需氧嗜温性细菌的数量 $N=c/(V \times d)=60/(1 \times 10^{-1})=60/0.1=600$ 或 6×10^2 。

12.3.3 例 3 两个稀释度两个平板

$S=1$ g 或 1 mL; $V=1$; 计数可得: 稀释度为 10^{-2} 、235 和 282; 稀释度为 10^{-3} 、31 和 39。

根据式(3):

每毫升或每克样品中需氧嗜温性细菌的数量 $N=\bar{X}_c/(V \times d)=(235+282+31+39)/(2+0.1 \times 2) \times 10^{-2}=587/0.022=26\ 682$ 。

将上述结果进行数字修约, 结果为每毫升或每克样品中需氧嗜温性细菌的数量是 27 000 或 2.7×10^4 。

12.3.4 例 4 一个稀释度两个过滤膜

$S=1$ g 或 1 mL; $V=1$; 计数可得: 稀释度为 10^{-1} 、18 和 22。

根据式(1):

每毫升或每克样品中需氧嗜温性细菌的数量 $N=m/(V \times d)=20/(1 \times 10^{-1})=20/0.1=200$ 或 2×10^2 。

12.3.5 例 5 一个稀释度一个过滤膜

$S=1$ g 或 1 mL; $V=1$; 计数可得: 稀释度为 10^{-1} 、65。

根据式(2):

每毫升或每克样品中需氧嗜温性细菌的数量 $N=c/(V \times d)=65/(1 \times 10^{-1})=65/0.1=650$ 或 6.5×10^2 。

12.3.6 例 6 两个稀释度两个过滤膜

$S=1$ g 或 1 mL; $V=1$; 计数可得: 稀释度为 10^{-1} 、121 和 105; 稀释度为 10^{-2} 、15 和 25。

根据式(3):

每毫升或每克样品中需氧嗜温性细菌的数量 $N=\bar{X}_c/(V \times d)=(121+105+15+25)/(2+0.1 \times 2) \times 10^{-1}=266/0.22=1\ 209$ 。

将上述结果约整为每毫升或每克样品中需氧嗜温性细菌的数量是 1 200 或 1.2×10^3 。

12.3.7 例 7 一个稀释度两个平板

$S=1$ g 或 1 mL; $V=1$; 计数可得: 稀释度为 10^{-1} 、28 和 22。

根据式(1):

$N=m/(V \times d)=25/(1 \times 10^{-1})=25/0.1=250$ 。

每毫升或每克样品中需氧嗜温性细菌的估算数量为 250 或 2.5×10^2 。

12.3.8 例 8

$S=1$ g 或 1 mL; $V=1$; 计数可得: 稀释度为 10^{-1} 、0 和 0。

根据式(1):

$$\begin{aligned} N &\leq 1/(V \times d) \\ &\leq 1/(1 \times 10^{-1}) \\ &\leq 1/0.1 \\ &\leq 10. \end{aligned}$$

每毫升或每克样品中需氧嗜温性细菌的估算数量低于 10。

12.3.9 例 9

$S=1$ g 或 1 mL; $V=1$; 计数可得: 稀释度为 10^{-1} 、0 和 3。

根据式(1):

$$\begin{aligned} N &\leq m/(V \times d) \\ &\leq 1.5/(1 \times 10^{-1}) \\ &\leq 1.5/0.1 \\ &\leq 15. \end{aligned}$$

每毫升或每克样品中需氧嗜温性细菌的估算数量低于 15。

12.4 增菌后检测

具有生长的情况下(见第 11 章), 结果表示为“样品 S 中存在需氧嗜温性细菌”, 然后使用其中一种推荐方法(见 9.3)进行计数。如果没有检测到生长(见第 11 章), 结果表示为“样品 S 中不存在需氧嗜温性细菌”。

13 产品的抑菌性的中和处理

13.1 原则

以下不同试验说明微生物可以在分析条件下生长。常用于证明化妆品抑菌性的两种菌株(见第 7 章)被确认对抑菌物质具有较广泛的敏感性。

13.2 接种物的制备

在试验前, 每种菌株都应先接种在大豆酪蛋白琼脂培养基(SCDA)或其他合适(非选择性、非中性)培养基上, 置 $32.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。为了收集细菌培养物, 使用灭菌接种环, 刮取培养基表面细菌重新悬浮于稀释液中, 以获得细菌悬浮液(5.3), 使用分光光度计调整细菌浓度约为 1×10^8 CFU/mL, 此细菌悬液及其稀释液需在 2 h 内使用。

13.3 计数方法的验证

13.3.1 原则

将样品液(初悬液或者因为产品的抑菌性过强或溶解性过低制成的样品稀释液)与每个细菌菌株的稀释液混匀、中和后, 将中和液移至培养皿或过滤膜上, 经培养后, 与不含有样品的对照组进行菌落特性和菌落数的比较。

如果菌落数在不足对照组的 50% ($0.3 \log$) 以下, 则需要调整内容(稀释剂、中和剂或混合肉汤, 参见附录 A)。应充分考虑平板计数法固有的变异性。当两个结果之间的差异超过 50%, 或者用 $\log$ 表示超过 0.3, 即认为这两个结果存在差异。接种的标准菌不生长说明该检测方法无效, 除非认为产品的微生物污染是不同的。

13.3.2 倾注平板法的验证

将 9 mL 初悬液和(或)用中和稀释剂稀释的样品稀释液与 1 mL 含有 1 000 CFU/mL~3 000 CFU/mL 的微生物菌悬液混合。移取 1 mL 至培养皿(最好有平行样)中, 倒入 15 mL~20 mL 混匀的琼脂培养基(5.4.2)(保存在不超过 $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的水浴中)。平行设立一个使用相同稀释剂和相同微生物

菌悬液,但不含有样品的对照平板。置 $32.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~72 h 后,计数平板上菌落数,并比较检测平板与对照平板的菌落数。如果计数结果至少是对照平板的 50%(0.3 log) 以上,可以确认 1:10 稀释(使用 1 mL 初悬液)时的稀释液和计数方法是有效的。

13.3.3 涂布平板法的验证

将 9 mL 用中和稀释剂(或其他,见 5.1)稀释的初悬液与 1 mL 含有 10 000 CFU/mL~30 000 CFU/mL(使用 0.5 mL 或 1 mL 涂布时可更少)的微生物菌悬液混合,取至少 1 mL 涂布在凝固的琼脂培养基表面(5.2)(最好有平行样)。平行制备一个使用相同稀释剂和相同微生物菌悬液但不含有样品的对照平板。置 $32.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~72 h 后,计数平板上菌落数,并与对照平板上的菌落数进行比较。如果计数结果至少是对照组的 50%(0.3 log) 以上,可以确认 1:10 稀释(使用 1 mL 初悬液)时的稀释液和计数方法是有效的。

13.3.4 膜过滤法的验证

将适量初悬液或检测中使用的样品稀释液(见 9.3.2.3)与适量的大约 100 CFU 的微生物标准悬浮液混合。混合液立即膜过滤,并且使用一定量的水(5.1)、稀释剂(5.2.3)或中和稀释剂(5.2.2)洗涤滤膜,将滤膜转移至合适的琼脂培养基(5.4.2)的表面。平行地制备一个相同条件下不含有样品的对照样品,在相同条件下过滤和清洗。置 $32.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,培养 24 h~72 h 后,计数膜上菌落数,并与对照样品的菌落数进行比较。如果计数结果至少是对照组的 50%(0.3 log),可以确认膜过滤方法和稀释剂是有效的。

13.4 增菌检测方法的验证

13.4.1 步骤

制备含有每种标准菌株悬液、最终浓度为 100 CFU/mL~500 CFU/mL 的 9 mL 细菌悬液稀释液(5.3);为了计数标准菌悬液中最终活的细菌浓度,移取 1 mL 菌悬液至培养皿中,倾注 15 mL~20 mL 琼脂培养基(5.4.2)(保存在不超过 $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的水浴中)。置 $32.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,培养 20 h~24 h。在试管或烧瓶内加入一定量的增菌肉汤(5.4.3.2),制备与检测时相同条件的样品初悬液双份(至少 1 g 或 1 mL 产品),在一个(确认试验)的试管内,无菌接种入 0.1 mL 标准菌悬液。混匀后,确认试验试管与对照试管均置于 $32.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,培养 20 h~24 h。使用无菌移液管从每个试管或烧瓶中,移取 0.1 mL~0.5 mL(与检测条件相同)至含有大约 15 mL~20 mL 琼脂培养基培养皿(直径 85 mm~100 mm)中。置 $32.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,培养 24 h~72 h。

13.4.2 结果的说明

对每个细菌菌株,检查并确认其悬浮液含 100 CFU/mL~500 CFU/mL 的细菌。

如果有细菌生长的特征,中和检测方法的验证定义如下:

- 对金黄色葡萄球菌:培养物颜色为黄色;
- 对铜绿假单胞菌:在确认平板上接种物的颜色为绿色到黄色菌落,在对照平板上不生长。

当在对照平板上有细菌生长(污染产品)时,如果接种的细菌在确认平板上可以恢复生长,可以认为中和检测方法验证是有效的。

13.5 验证结果的解释

验证平板上细菌不生长,表明抗菌活性依然存在,并且有必要对方法的条件进行修改。可通过增加营养肉汤的量、保持相同的样品数量或者在营养肉汤中添加足量的失活剂,或者结合适当的修改来进行完善,以保证细菌生长。尽管添加适当的失活剂和增加肉汤量,上述可培养微生物还是有可能不能复壮,这表明本标准材料提供的信息可能不适合这类微生物。

14 检测报告

检测报告应列出以下内容:

- 1) 产品完整鉴定所需要的全部信息;

- 2) 使用方法；
- 3) 结果；
- 4) 制备初悬液的所有详细操作步骤；
- 5) 方法中中和剂和培养基使用的描述；
- 6) 方法的验证,即使分开进行的测试；
- 7) 本文件中没有指出的或被认为非强制的部分,以及影响结果的任何细节。

附 录 A
(资料性附录)

针对防腐剂抑菌活性的中和剂和漂洗剂

表 A.1 针对防腐剂抑菌活性的中和剂和漂洗剂

防腐剂	中和剂	中和剂及漂洗液配方(膜过滤法)
酚类化合物 对羟基苯甲酸酯, 苯基乙醇, 苯胺	卵磷脂,吐温 80, 脂肪酸环氧乙烷聚 合物,非离子型表 面活性剂	吐温 80,30 g/L+卵磷脂,3 g/L。 脂肪酸环氧乙烷聚合物,7 g/L+卵磷脂,20 g/L+吐温 80,4 g/L。 D/E 中和培养基 ^a 漂洗液:蒸馏水;蛋白胨,1 g/L+氯化钠,9 g/L;吐温 80,5 g/L。
季胺类化合物, 阳离子表面活性剂	卵磷脂,皂角苷, 吐温 80,十二烷基 硫酸钠,脂肪酸环 氧乙烷聚合物	吐温 80,30 g/L+十二烷基硫酸钠,4 g/L+卵磷脂,3 g/L。 吐温 80,30 g/L+皂角苷,30 g/L+卵磷脂,3 g/L。 D/E 中和培养基 ^a 漂洗液:蒸馏水;蛋白胨,1 g/L+氯化钠,9 g/L;吐温 80,5 g/L。
甲醛 乙醛	甘氨酸,组氨酸	卵磷脂,3 g/L+吐温 80,30 g/L+L-组氨酸,1 g/L。 吐温 80,30 g/L+皂角苷,30 g/L+L-组氨酸,1 g/L+L-半胱氨酸,1 g/L。 D/E 中和培养基 ^a 漂洗液:吐温 80,3 g/L+L-组氨酸,0.5 g/L。
氧化物	硫代硫酸钠	硫代硫酸钠,5 g/L。 漂洗液:硫代硫酸钠,3 g/L。
异噻唑啉酮,咪唑	卵磷脂,皂角苷, 胺,硫醇,亚硫酸氢 钠,β-巯基乙醇	吐温 80,30 g/L+皂角苷,30 g/L+卵磷脂,3 g/L。 漂洗液:蛋白胨,1 g/L+氯化钠,9 g/L;吐温 80,5 g/L。
双胍	卵磷脂,皂角苷, 吐温 80	吐温 80,30 g/L+皂角苷,30 g/L+卵磷脂,3 g/L。 漂洗液:蛋白胨,1 g/L+氯化钠,9 g/L;吐温 80,5 g/L。
金属盐类(Cu, Zn, Hg),有机汞类	重硫酸钠, L-巯基半胱氨酸 β-巯基乙醇	β-巯基乙醇,0.5 g/L 或 5 g/L。 L-半胱氨酸,0.8 g/L 或 1.5 g/L。 D/E 中和培养基 ^a 漂洗液:β-巯基乙醇,0.5 g/L。
^a D/E 中和肉汤(Dey/Engley 中和肉汤),参见附录 D。		

附 录 B
(资料性附录)
其他中和稀释剂

B.1 原则

如果其他的中和稀释剂经过检查和验证也可用于制备样品初悬液,以下所列较适合应用的中和稀释剂配方。有关中和剂的材料可参见附录 A。

B.2 Eugon LT 100 液体肉汤

见 5.4.3.2。

B.3 酪蛋白胨卵磷脂聚山梨醇脂肉汤**B.3.1 成分**

酪蛋白胨	1.0 g
卵磷脂	0.7 g
吐温 80	20.0 g
水	980 mL

B.3.2 制备

经加热、搅拌和溶解上述成分,冷却至 25 °C 装入合适的容器中,置 121 °C 高压灭菌 15 min;灭菌后,在室温下调整 pH 值至 7.2±0.2。

B.4 改良 Letheen 肉汤**B.4.1 成分**

蛋白胨(肉酶消化产物)	20.0 g
酪蛋白胰酶消化物	5.0 g
牛肉膏	5.0 g
酵母膏	2.0 g
卵磷脂	0.7 g
吐温 80	5.0 g
氯化钠	5.0 g
亚硫酸氢钠	0.1 g
水	1 000 mL

B.4.2 制备

将吐温 80 和卵磷脂先后溶解在沸腾的水中,直至完全溶解。经加热、搅拌加入其他成分进行溶解。然后将培养基分装在合适的容器中,置 121 °C 高压灭菌 15 min 后,在室温下调整 pH 值至 7.2±0.2。

附 录 C
(资料性附录)
其他稀释剂

C.1 原则

如果其他的稀释剂经过检查和验证也可用于制备样品初悬液,以下所列较适合应用的稀释剂配方。

C.2 缓冲蛋白胨水(pH 7)

C.2.1 成分

牛肉胨	1.0 g
氯化钠	4.3 g
磷酸二氢钾	3.6 g
磷酸氢二钠二水化合物	7.2 g
水	1 000 mL

C.2.2 制备

将上述成分溶解在沸腾的水中。混匀,冷却至 25 ℃装入合适容器中,置 121 ℃高压灭菌 15 min 后,在室温下调整 pH 值至 7.1 ± 0.2 。

附 录 D

(资料性附录)

其他培养基

D.1 原则

如果其他的稀释剂经过检查和验证也可用于制备样品初悬液。以下所列较适合应用的其他培养基。

D.2 计数用琼脂培养基

D.2.1 Eugon LT 100 琼脂培养基

见 5.4.3.3.1。

D.2.2 LT 100 琼脂

D.2.2.1 成分

胰酶消化的酪蛋白	15.0 g
大豆粉木瓜蛋白酶消化物	5.0 g
氯化钠	5.0 g
卵磷脂	1.0 g
吐温 80	5.0 g
辛基酚聚醚 9	1.0 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

D.2.2.2 制备

将吐温 80、辛基酚聚醚 9 和卵磷脂先后溶解在沸腾的水中,直至完全溶解;经加热、轻轻搅拌加入其他成分进行溶解,然后将培养基分装在合适的容器中。置 121 °C 高压灭菌 15 min 后,在室温下调整 pH 值至 7.0 ± 0.2 。

D.2.3 添加大豆酪蛋白消化物琼脂培养基(添加 SCD 肉汤琼脂)

D.2.3.1 成分

酪蛋白胨	17.0 g
大豆蛋白胨	3.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

D.2.3.2 制备

将所有成分或干粉培养基先后溶解在沸腾的水中,直至完全溶解。然后将培养基分装在合适的容器中,置 121 °C 高压灭菌 15 min 后,在室温下调整 pH 值至 7.2 ± 0.2 。

D.3 增菌肉汤

D.3.1 改良 Lethen 肉汤^[5]

见第 B.4 章。

D.3.2 大豆酪蛋白消化物卵磷脂吐温 80 培养基(SCDLP 80 肉汤)

D.3.2.1 成分

酪蛋白胨	17.0 g
大豆蛋白胨	3.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
卵磷脂	1.0 g
吐温 80	7.0 g
水	1 000 mL

D.3.2.2 制备

将所有成分或干粉培养基先后溶解在沸腾的水中,直至完全溶解。然后将培养基分装在合适的容器中,置 121 °C 高压灭菌 15 min 后,在室温下调整 pH 值至 7.2 ± 0.2 。

D.3.3 D/E 中和肉汤(Dey/Engley 中和肉汤)

D.3.3.1 成分

葡萄糖	10.0 g
大豆卵磷脂	7.0 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	6.0 g
吐温 80	5.0 g
酪蛋白胨胰酶消化物	5.0 g
NaHSO_3	2.5 g
酵母膏	2.5 g
巯基乙酸钠	1.0 g
溴甲酚紫	0.02 g
水	1 000 mL

D.3.3.2 制备

将所有成分或干粉培养基先后溶解在沸腾的水中,直至完全溶解。然后将培养基分装在合适的容器中,置 121 °C 高压灭菌 15 min 后,在室温下调整 pH 值至 7.6 ± 0.2 。

D.4 检测用大豆酪蛋白消化物卵磷脂吐温 80 琼脂培养基(SCDLPA)

D.4.1 成分

酪蛋白胨	15.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
卵磷脂	1.0 g
吐温 80	7.0 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

D.4.2 制备

经加热、搅拌溶解上述成分,分装到合适容器中,置 121 °C 高压灭菌 15 min 后冷却,在室温下调整 pH 值至 7.0 ± 0.2 。

参 考 文 献

- [1] Microbiology Guidelines. 2001 published by the Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association.
- [2] Microbiological Examination of non-sterile products. 4th edition. 2002 published by the European Pharmacopoeia.
- [3] J. P 14. General tests—Microbial limit test. 2001 published by the Japanese Pharmacopoeia.
- [4] USP 28. Microbial limit test 61. 2005 published by the U. S. Pharmacopoeia.
- [5] Bacteriological Analytical Manual. 8th edition. 1995 published by the U. S. Food and Drug Administration.
- [6] SINGER, S. The use of preservative neutralizers in diluents and plating media. Cosmetics and Toiletries. 102. December 1987. p. 55.
- [7] EN 1040-6 Chemical disinfectants and antiseptics—Basic bactericidal activity—Test method and requirements (phase 1).
- [8] ISO 18415-7 Cosmetics—Microbiology—Detection of specified microorganisms (Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans) and non-specified microorganisms.
- [9] ISO 18416-7 Cosmetics—Microbiology—Detection of Candida albicans.
- [10] ISO 21150-7 Cosmetics—Microbiology—Detection of Escherichia coli.
- [11] ISO 22717:2006 Cosmetics—Microbiology—Detection of Pseudomonas aeruginosa.
- [12] ISO 22718:2006 Cosmetics—Microbiology—Detection of Staphylococcus aureus.
- [13] EN 12353 Chemical disinfectants and antiseptics—Preservation of microbial strains used for the determination of bactericidal and fungicidal activity.
- [14] Guidelines on Microbial Quality Management. 1997 published by the European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA).
- [15] ATLAS, R. M. Handbook of Microbiological Media. CRC Press.