



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2206.9—2013

化妆品微生物检验方法 第 9 部分：胆汁酸耐受革兰氏阴性菌

Determination of microbiological in cosmetics—
Part 9: Bile-tolerant gram-negative bacteria

2013-11-06 发布

2014-06-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

SN/T 2206《化妆品微生物检验方法》共分为 13 部分：

- 第 1 部分：沙门氏菌；
- 第 2 部分：需氧芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌；
- 第 3 部分：肺炎克雷伯氏菌；
- 第 4 部分：链球菌；
- 第 5 部分：肠球菌；
- 第 6 部分：破伤风梭菌；
- 第 7 部分：蛋白免疫印迹法检测疯牛病病原；
- 第 8 部分：白色念珠菌；
- 第 9 部分：胆汁酸耐受革兰氏阴性菌；
- 第 10 部分：金黄色葡萄球菌 PCR 法；
- 第 11 部分：金黄色葡萄球菌 多重实时荧光 PCR 法；
- 第 12 部分：绿脓杆菌 PCR 法；
- 第 13 部分：嗜麦芽窄食单胞菌。

本部分为 SN/T 2206 的第 9 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院、中华人民共和国珠海出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：吕敬章、汤慕瑾、万志刚、洪小柳、赵芳、张恒、刘慧玲、王小玉、游淑珠、石建华。

化妆品微生物检验方法

第9部分：胆汁酸耐受革兰氏阴性菌

1 范围

SN/T 2206 的本部分规定了化妆品中胆汁酸耐受革兰氏阴性菌的定性和定量检测方法。

本部分适用于化妆品中胆汁酸耐受革兰氏阴性菌的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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。

SN/T 1538.1 培养基制备指南 第1部分:实验室培养基制备质量保证通则

SN/T 1538.2 培养基制备指南 第2部分:培养基性能测试实用指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

胆汁酸耐受革兰氏阴性菌 **bile-tolerant gram-negative bacteria**

一类能耐受胆汁酸,在结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂(Violet Red Bile Glucose Agar, VRBGA)上生长的革兰氏阴性菌,包括肠杆菌科、假单胞菌属、气单胞菌属的一些细菌。

4 仪器、器具

4.1 水浴箱:45℃±1℃。

4.2 温度计:1℃~55℃,分刻度0.1℃。

4.3 培养箱:36℃±1℃。

4.4 吸管:1 mL、5 mL 和 10 mL。

4.5 拍击式均质器。

4.6 无菌均质杯或无菌均质袋。

4.7 接种环:直径3 mm。

4.8 天平:感量0.1 g。

4.9 锥形瓶:100 mL、250 mL、500 mL。

4.10 培养皿:直径90 mm。

4.11 显微镜。

4.12 高压灭菌器。

5 培养基和试剂

5.1 一般要求

培养基的质量控制应符合 SN/T 1538.1 和 SN/T 1538.2 的要求,也可使用符合 SN/T 1538 要求的商品化培养基。

5.2 主要培养基

5.2.1 大豆酪蛋白卵磷脂吐温 80 液体培养基,也称 SCDLP 液体培养基(SCDLP):见 A.1。

5.2.2 肠杆菌增菌肉汤(EEB):见 A.2。

5.2.3 结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂(VRBGA):见 A.3。

6 检测步骤

6.1 定性检测

6.1.1 样品处理

无菌操作准确取 10 g 或 10 mL 样品,置盛有 90 mL SCDLP 液体培养基的无菌均质杯中,以 8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min,或置于盛有 90 mL SCDLP 液体培养基的无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打 1 min~2 min。无菌操作将样品转至 250 mL 锥形瓶,于室温 20℃~25℃静置 2 h~5 h 后,即为样品混合物。

6.1.2 增菌

轻轻摇动样品混合物,并吸取 10 mL 转种于 100 mL EEB 内,于 36℃±1℃增菌培养 24 h~48 h。

6.1.3 分离

用接种环取增菌液一环,划线接种于 VRBGA 上,于 36℃±1℃培养 18 h~24 h。胆汁酸耐受革兰氏阴性菌在 VRBGA 上通常呈现粉红色至红色的菌落,部分非肠杆菌的菌落可呈现无色至灰白色。

6.1.4 结果报告

分离琼脂 VRBGA 上有菌落生长,则报告 10 g 或 10 mL 样品中检出胆汁酸耐受革兰氏阴性菌;分离琼脂 VRBGA 上无菌落生长,则报告 10 g 或 10 mL 样品中未检出胆汁酸耐受革兰氏阴性菌。

6.2 计数方法(MPN 计数法)

6.2.1 样品处理

见 6.1.1。

6.2.2 稀释

轻轻摇动样品混合物,用无菌吸管吸取 1 mL 样品混合物,沿管壁缓缓注入装有 9 mL SCDLP 的试管中(注意吸管的尖端不要触及 SCDLP 的液面),振摇试管使其混合均匀,制成 1:100 的样品稀释液。换用一支无菌吸管,按上述操作,依次制成 10 倍递增样品稀释液。制备样品稀释液至样品接种完毕,全过程不超过 15 min。

6.2.3 增菌

选择适宜的 3 个连续稀释度的样品稀释液,每个稀释度接种到 3 管 10 mL EEB 中,每管样品稀释液的接种量为 1 mL(如接种量超过 1 mL,则用双料的 EEB),于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 增菌培养 24 h~48 h。

6.2.4 分离

每管分别用接种环取增菌液一环,划线接种于 VRBGA 上,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。在 VRBGA 上有菌落生长者为阳性。

6.2.5 胆汁酸耐受革兰氏阴性菌最可能数(MPN)报告

根据阳性管数,检索 MPN 表,见附录 B,报告每 g(mL)样品中胆汁酸耐受革兰氏阴性菌的 MPN 值。

附 录 A

(规范性附录)

培养基和试剂

A.1 SCDLP 液体培养基(SCDLP)

A.1.1 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
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

先将卵磷脂在少量蒸馏水中加温溶解后,再与其他成分混合,加热溶解,调 pH 至 7.2~7.3 后分装,121 °C 高压灭菌 15 min。注意振荡,使沉淀于底层的吐温 80 充分混合,冷却至 25 °C 左右使用。

A.2 肠杆菌增菌肉汤(EEB)

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钠	8.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
牛胆盐	20.0 g
煌绿	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

应使用纯净的牛胆盐和煌绿,减少对受损伤目标菌生长的抑制。将各成分加入蒸馏水中,加热煮沸,分装每瓶 90 mL。制成的培养基为绿色,可放置 2 °C~8 °C 冷藏,4 周内使用。

A.3 结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂(VRBGA)

A.3.1 成分

蛋白胨	7.0 g
酵母膏	3.0 g

葡萄糖	10.0 g
氯化钠	5.0 g
中性红	0.03 g
3 号胆盐	1.5 g
结晶紫	0.002 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

各成分溶于水,加热煮沸至完全溶解,无需高压灭菌,使用前制备。

附 录 B

(规范性附录)

胆汁酸耐受革兰氏阴性菌最可能数(MPN)检索表

每 g(mL)样品中胆汁酸耐受革兰氏阴性菌最可能数(MPN)检索见表 B.1。

表 B.1 胆汁酸耐受革兰氏阴性菌最可能数(MPN)检索表

阳性管数			MPN	95%可信限		阳性管数			MPN	95%可信限	
0.10	0.01	0.001		下限	上限	0.10	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	<3.0	—	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1 000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1 000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2 000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1 100	180	4 100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1 100	420	—

注 1: 本表采用 3 个稀释度[0.1 g(mL)、0.01 g(mL)和 0.001 g(mL)],每个稀释度接种 3 管。

注 2: 表内所列检样量如改用 1 g(mL)、0.1 g(mL)和 0.01 g(mL)时,表内数字应相应降低 10 倍;如改用 0.01 g(mL)、0.001 g(mL)、0.000 1 g(mL)时,则表内数字应相应增高 10 倍,其余类推。