

一、总 则

General Principle

1 范围

本规范规定了化妆品微生物学检验总则。

本规范适用于化妆品样品的采集、保存、供检样品制备。

2 仪器和设备

2.1 天平。

2.2 高压灭菌器。

2.3 振荡器。

2.4 三角瓶。

2.5 玻璃珠。

2.6 玻璃棒。

2.7 刻度吸管。

2.8 研钵。

2.9 均质器。

2.10 恒温水浴箱。

2.11 采样用具：不锈钢勺，剪刀，开罐器等。

3 培养基和试剂

3.1 生理盐水

成分：氯化钠 8.5g

蒸馏水加至 1000 mL

溶解后，分装到加玻璃珠的三角瓶内，每瓶 90mL，103.43kPa(15 lb)20min 高压灭菌。

3.2 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：先将卵磷脂在少量蒸馏水中加温溶解后，再与其它成分混合，加热溶解，调 pH 为 7.2~7.3，分装，103.43kPa(15lb)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，也可用多肽代替。

3.3 灭菌液体石蜡。

3.4 灭菌吐温 80。

4 样品的采集及注意事项

- 4.1 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。包装量小于 20g 的样品，采样量应适量增加，其总量应大于 16g。
- 4.2 供检验样品，应严格保持原有的包装状态，进口产品应为市售包装。容器不应有破裂，在检验前不得打开，防止样品被污染。
- 4.3 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。
- 4.4 若只有一份样品而同时需做多种分析，如微生物、毒理、化学等，应先做微生物检验，再将剩余样品做其它分析。
- 4.5 在检验过程中，从打开包装到全部检验操作结束，均须防止微生物的再污染和扩散，所用采样用具、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。

5 供检样品的制备

5.1 液体样品

5.1.1 水溶性的液体样品，量取 10mL 加到 90mL 灭菌生理盐水中，混匀后，制成 1:10 检液。

5.1.2 油性液体样品，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℃水浴中预热)，在 40℃~44℃水浴中乳化，制成 1:10 的悬液。

5.2 膏、霜、乳剂半固体状样品

5.2.1 亲水性的样品，称取 10g，加到装有玻璃珠及 90mL 灭菌生理盐水的三角瓶中，充分振荡混匀，静置 15min。取其上清液作为 1:10 的检液。

5.2.2 疏水性样品，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，再加入 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 检液。

5.3 固体样品，称取 10g，加到 90mL 灭菌生理盐水中，充分振荡混匀，使其分散混悬，静置后，取上清液作为 1:10 的检液。

如有均质器，上述水溶性膏、霜、粉剂等，可称 10g 样品加入 90mL 灭菌生理盐水，均质 1min~2min；疏水性膏、霜及眉笔、口红等，称 10g 样品，加 10mL 灭菌液体石蜡，10mL 灭菌吐温 80，70mL 灭菌生理盐水，均质 3min~5min。

二、菌落总数

Aerobic Bacterial Count

1 范围

本规范规定了化妆品中菌落总数的检验方法。

本规范适用于化妆品菌落总数的测定。

2 定义

本规范采用下列定义

菌落总数(aerobic bacterial count)是指化妆品检样经过处理,在一定条件下培养后(如培养基成分、培养温度、培养时间、pH 值、需氧性质等),1g(1mL)检样中所含菌落的总数。所得结果只包括一群本方法规定的条件下生长的嗜中温的需氧性菌落总数。

测定菌落总数便于判明样品被细菌污染的程度,是对样品进行卫生学总评价的综合依据。

3 仪器和设备

3.1 三角瓶。

3.2 量筒。

3.3 pH 计或精密 pH 试纸。

3.4 高压灭菌器。

3.5 试管。

3.6 平皿: 直径 9cm。

3.7 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 培养基和试剂

4.1 生理盐水: 见总则中 3.1。

4.2 卵磷脂、吐温 80—营养琼脂培养基

4.2.1 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

4.2.2 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,103.43kPa(15 lb)20min 高压灭菌,储存于冷暗处备用。

4.3 0.5%氯化三苯四氮唑(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride,TTC)

成分: TTC 0.5g

蒸馏水

100mL

溶解后过滤，103.43kPa(15 lb)20min 高压灭菌，装于棕色试剂瓶，置 4℃冰箱备用。

5 操作步骤

5.1 用灭菌吸管吸取 1:10 稀释的检液 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，制成 1:100 检液。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。

5.2 将融化并冷至 45℃~50℃的卵磷脂吐温 80 营养琼脂培养基倾注到平皿内，每皿约 15mL，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。另取一个不加样品的灭菌空平皿，加入约 15mL 卵磷脂吐温 80 营养琼脂培养基，待琼脂凝固后，翻转平皿，置 37℃培养箱内培养 48h，为空白对照。

5.3 为便于区别化妆品中的颗粒与菌落，可在每 100mL 卵磷脂吐温 80 营养琼脂中加入 1mL 0.5% 的 TTC 溶液，如有细菌存在，培养后菌落呈红色，而化妆品的颗粒颜色无变化。

6 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以 2，以代表全皿菌落数。

7 菌落计数及报告方法

7.1 首先选取平均菌落数在 30~300 个之间的平皿，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 1 中例 1)。

7.2 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 则报告其中稀释度较低的平皿的菌落数(见表 1 中例 2 及例 3)。

7.3 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 1 中例 4)。

7.4 若所有稀释度的平均菌落数均小于 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 1 例 5)。

7.5 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 1 中例 6)。

7.6 若所有的稀释度均无菌生长，报告数为每 g 或每 mL 小于 10CFU。

7.7 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(见表 1 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。

表 1 菌落计数结果及报告方式

例 次	不同稀释度平均菌落数 10 ⁻¹ 10 ⁻² 10 ⁻³			两稀释度 菌数之比	菌落总数 CFU/mL 或 CFU/g	报告方式 CFU/mL 或 CFU/g
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
7	0	0	0	—	$< 1 \times 10$	< 10

* CFU：菌落形成单位。

三、粪大肠菌群

Fecal Coliforms

1 范围

本规范规定了化妆品中粪大肠菌群的检验方法。

本规范适用于化妆品中粪大肠菌群的检验。

2 定义

本规范采用下列定义

粪大肠菌群(Fecal coliforms)系一群需氧及兼性厌氧革兰氏阴性无芽胞杆菌,在 44.5℃培养 24h~48h 能发酵乳糖产酸并产气。

该菌来自人和温血动物粪便,是重要的卫生指示菌。

3 仪器

3.1 恒温水浴箱或隔水式恒温箱: 44℃±0.5℃。

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 三角瓶。

3.8 试管。

3.9 小倒管。

3.10 pH 计或 pH 试纸。

3.11 高压灭菌器。

3.12 刻度吸管: 10mL、2mL、1mL。

3.13 平皿。

4 培养基和试剂

4.1 双倍乳糖胆盐培养基

成分:	蛋白胨	40g
	猪胆盐	10g
	乳糖	10g
	0.4%溴甲酚紫水溶液	5mL
	蒸馏水	1000mL

制法: 将蛋白胨、胆盐及乳糖溶解于蒸馏水中,调 pH 到 7.4,加入 0.4%溴甲酚紫水溶液 5mL,混匀,分装试管(每支试管中加一个小倒管)。68.95kPa (10 lb)20min 灭菌。

4.2 伊红美兰(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，分装于三角瓶内，103.43kPa(15 lb)15min 高压灭菌备用。临用时加入乳糖并加热融化琼脂。冷至 60℃左右无菌操作加入灭菌的伊红美蓝溶液，摇匀。倾注平皿备用。

4.3 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：将上述成分加热融化，调 pH 值为 7.0~7.2，分装小试管，103.43kPa(15 lb)15min 高压灭菌。

4.4 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±0.5℃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。

4.5 革兰氏染色液：

4.5.1 染液制备

4.5.1.1 结晶紫染色液：

结晶紫	1g
95%乙醇	20mL
1%草酸铵水溶液	80mL

将结晶紫溶于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

4.5.1.2 革兰氏碘液：

碘	1g
碘化钾	2g
蒸馏水加至	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。

4.5.1.3 脱色液：95%乙醇。

4.5.1.4 复染液：

a. 沙黄复染液：

沙黄	0.25g
95%乙醇	10mL
蒸馏水	90mL

将沙黄溶解于乙醇中，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。

4.5.2 染色法

4.5.2.1 将涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染 1min，水洗。

4.5.2.2 滴加革兰氏碘液，作用 1min，水洗。

4.5.2.3 滴加 95%乙醇脱色，约 30s，或将乙醇滴满整个涂片，立即倾去，再用乙醇滴满整个涂片，脱色 10s，水洗。

4.5.2.4 滴加复染液，复染 1min，水洗，待干，镜检。

4.5.3 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，复染时间仅需 10s。

5 操作步骤

5.1 取 10mL 1:10 稀释的检液，加到 10mL 双倍浓度的乳糖胆盐培养基中，置 $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24h~48h，如不产酸也不产气，则报告为粪大肠菌群阴性。

5.2 如产酸产气，划线接种到伊红美蓝琼脂平板上，置 37°C 培养 18 h~24 h。同时取该培养液 1~2 滴接种到蛋白胨水中，置 $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养 24h。

经培养后，在上述平板上观察有无典型菌落生长。粪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，亦常为粪大肠菌群，应注意挑选。

5.3 挑取上述可疑菌落，涂片作革兰氏染色镜检。

5.4 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。

6 检验结果报告

根据发酵乳糖产酸产气，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。

四、绿脓杆菌

Pseudomonas Aeruginosa

1 范围

本规范规定了化妆品中绿脓杆菌的检验方法。

本规范适用于化妆品中绿脓杆菌的检验。

2 定义

本规范采用下列定义。

绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)属于假单胞菌属，为革兰氏阴性杆菌，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℃条件下能生长。

该菌对人有致病力，可使伤处化脓，引起败血症等。

3 仪器

3.1 恒温培养箱：37℃、42℃。

3.2 三角瓶。

3.3 试管。

3.4 平皿。

3.5 刻度吸管：10mL、2mL、1mL。

3.6 显微镜。

3.7 载玻片。

3.8 接种针、接种环。

3.9 电炉。

3.10 高压灭菌器。

4 培养基和试剂

4.1 SCDLP 液体培养基

见总则中 3.2。

4.2 十六烷基三甲基溴化铵培养基

成分：	牛肉膏	3g
	蛋白胨	10g
	氯化钠	5g
	十六烷基三甲基溴化铵	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，68.95kPa (10 lb)20min 灭菌后，制成平板备用。

4.3 乙酰胺培养基

成分：	乙酰胺	10g
	氯化钠	5g
	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 (1.2%溶液 1mL)
琼脂	20g
蒸馏水	1000mL

制法：除琼脂和酚红外，将其它成分加到蒸馏水中，加热溶解，调 pH 为 7.2，加入琼脂、酚红，103.43kPa(15 lb)20min 高压灭菌后，制成平板备用。

4.4 绿脓菌素测定用培养基

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，加温使其溶解，调 pH 至 7.4，加入琼脂和甘油，加热溶解，分装于试管内，68.95kPa(10 lb)20min 高压灭菌后，制成斜面备用。

4.5 明胶培养基

成分：牛肉膏	3g
蛋白胨	5g
明胶	120g
蒸馏水	1000mL

制法：取各成分加到蒸馏水中浸泡 20min，随时搅拌加温使之溶解，调 pH 至 7.4，分装于试管内，经 68.95kPa(10 lb)20min 灭菌后，直立制成高层备用。

4.6 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，加热使之溶解，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，68.95kPa(10 lb)20min 灭菌后备用。

4.7 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，103.43kPa(15 lb)20min 高压灭菌后，制成斜面备用。

5 操作步骤

5.1 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 18h~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。

5.2 分离培养:从培养液的薄膜处挑取培养物,划线接种在十六烷基三甲基溴化铵琼脂平板上,置 37℃培养 18h~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。

在缺乏十六烷基三甲基溴化铵培养基时也可用乙酰胺培养基进行分离,将菌液划线接种于平板上,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,其它菌不生长。

5.3 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。

5.4 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 15s~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,为氧化酶试验阴性。

5.5 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培养基上,置 37℃培养 24h,加入氯仿 3mL~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 1mol/L 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。

5.6 硝酸盐还原产气试验:挑取可疑的绿脓杆菌纯培养物,接种在硝酸盐蛋白胨水培养基中,置 37℃培养 24h,观察结果。凡在硝酸盐蛋白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。

5.7 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 10min~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。

5.8 42℃生长试验:挑取可疑的绿脓杆菌纯培养物,接种在普通琼脂斜面培养基上,放在 41~42℃培养箱中,培养 24h~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。

6 检验结果报告

被检样品经增菌分离培养后,在分离平板上有典型或可疑菌落生长,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检出绿脓杆菌。

五、金黄色葡萄球菌

Staphylococcus Aureus

1 范围

本规范规定了化妆品中金黄色葡萄球菌的检验方法。
本规范适用于化妆品中金黄色葡萄球菌的检验。

2 定义

本规范采用下列定义

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)为革兰氏阳性球菌，呈葡萄状排列，无芽胞，无荚膜，能分解甘露醇，血浆凝固酶阳性。

该菌是葡萄球菌中对人类致病力最强的一种，能引起人体局部化脓性病灶，严重时可导致败血症。

3 仪器和设备

- 3.1 显微镜。
- 3.2 恒温培养箱。
- 3.3 离心机。
- 3.4 刻度吸管： 1mL、5mL、10mL。
- 3.5 试管。
- 3.6 载玻片。
- 3.7 酒精灯。

4 培养基和试剂

4.1 SCDLP 液体培养基

见总则中 3.2。

4.2 Baird Parker 氏培养基

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·6H ₂ O)	5g
	琼脂	20g
	蒸馏水	950mL
		pH 7.0±0.2

增菌剂的配制：30%卵黄盐水 50mL 与除菌过滤的 1%亚碲酸钾溶液 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，校正 pH。分装每瓶 95mL，103.43kPa 高压灭菌 15min。临用时加热溶化琼脂培养基，每 95mL 加入预热至 50℃的卵黄亚碲酸钾增菌

剂 5mL，摇匀后制成平板。培养基应是致密不透明的。使用前在冰箱贮存不得超过 48h。

4.3 血琼脂培养基

成分： 营养琼脂	100mL
脱纤维羊血(或兔血)	10mL

制法：将营养琼脂加热融化，待冷至 50℃左右无菌操作加入脱纤维羊血，摇匀，制成平板，置冰箱内备用。

4.4 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%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 pH7.4，加入甘露醇和指示剂，混匀后分装试管中，68.95kPa(10 lb) 20min 灭菌备用。

4.5 兔(人)血浆制备

取 3.8% 柠檬酸钠溶液，103.43kPa(15 lb) 30min 高压灭菌，1 份加兔(人)全血 4 份，混匀静置；2000rpm~3000 rpm 离心 3min~5min。血球下沉，取上面血浆。

4.6 无菌液体石蜡。

5 操作步骤

5.1 增菌：取 1:10 稀释的样品 10mL 接种到 90mL SCDLP 液体培养基中，置 37℃培养箱，培养 24h。

5.2 分离：自上述增菌培养液中，取 1~2 接种环，划线接种在 Baird Parker 平板，如无此培养基也可划线接种到血琼脂平板，置 37℃培养 24h~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 平板上为圆形，光滑，凸起，湿润，直径为 2mm~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。

5.3 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 μm~1 μm。

5.4 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，在培养基液面上加入 2mm~3mm 的灭菌液体石蜡，置 37℃培养 24h，金黄色葡萄球菌应能发酵甘露醇产酸。

5.5 血浆凝固酶试验：吸取 1:4 新鲜血浆 0.5mL，放入灭菌小试管中，加入待检菌 24h 肉汤培养物 0.5mL。混匀，放 37℃恒温箱或恒温水浴中，每半小时观察一次，6h 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 1:4 血浆 0.5mL，混匀，作为对照。

6 检验结果报告

经增菌培养后，在分离平板上有典型或可疑菌落生长，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。

六、霉菌和酵母菌

Molds and Yeast Count

1 范围

本规范规定了化妆品中霉菌和酵母菌数的检测方法。

本规范适用于各种化妆品中霉菌和酵母菌的总数测定。

2 定义

本规范采用下列定义。

霉菌和酵母菌总数是指化妆品检样在一定条件下培养后，1g 或 1mL 化妆品中所污染的活的霉菌和酵母菌菌落总数，藉以判明化妆品被霉菌和酵母菌污染程度及其一般卫生状况。

本方法根据霉菌和酵母菌特有的形态和培养特性，在虎红培养基上，置 28℃ 培养 72h，计算所生长的霉菌和酵母菌数。

3 仪器和设备

- 3.1 恒温霉菌培养箱：28℃。
- 3.2 振荡器。
- 3.3 天平。
- 3.4 三角瓶。
- 3.5 试管。
- 3.6 试管架。
- 3.7 平皿：直径 90mm。
- 3.8 刻度吸管：1mL、2mL、10mL。
- 3.9 量筒。
- 3.10 酒精灯。
- 3.11 高压灭菌器。

4 培养基和试剂

4.1 生理盐水 见总则中 3.1。

4.2 虎红(孟加拉红)培养基

成分：	蛋白胨	5g
	葡萄糖	10g
	磷酸二氢钾	1g
	硫酸镁(含 7H ₂ O)	0.5g
	琼脂	20g
	1/3000 虎红溶液	100mL
	(四氯四碘荧光素)	
	蒸馏水	1000mL
	氯霉素	100mg

制法： 将上述前 5 种成分加入蒸馏水中溶解后，再加入虎红溶液。分装后，103.43kPa(15

lb)20min 高压灭菌。另用少量乙醇溶解氯霉素，过滤除菌后，加入培养基中，若无氯霉素，可用链霉素代替，每 1000mL 培养基加链霉素 30mg。

5 操作步骤

5.1 样品稀释 见菌落总数测定中 6.1。

5.2 取 1:10 的检液 2mL 分别注入 2 个灭菌平皿内，每皿 1mL（若菌量较多时可顺序再做 10 倍稀释），另取 1 个灭菌空平皿（作空白对照），每皿分别注入融化并冷至 45℃左右的虎红培养基约 15mL，充分摇匀。凝固后，翻转平板，置 28℃培养箱，培养 72h，计数平板内生长的霉菌和酵母菌数。若有霉菌蔓延生长，为避免影响其它霉菌和酵母菌的计数时，于 48h 应及时将此平板取出计数。

5.3 计算方法：先点数每个平板上生长的霉菌和酵母菌菌落数，求出每个稀释度的平均菌落数。判定结果时，应选取菌落数在 5~50 个范围之内的平皿计数，乘以稀释倍数后，即为每 g(或每 mL)检样中所含的霉菌和酵母菌数。其它范围内的菌落数报告应参照菌落总数的报告方法报告之。

5.4 每 g(或每 mL)化妆品含霉菌和酵母菌数以 CFU/g(mL)表示。



医课汇
公众号
专业医疗器械资讯平台
WECHAT OF
HLONGMED



hlongmed.com
医疗器械咨询服务
MEDICAL DEVICE
CONSULTING
SERVICES



医课培训平台
医疗器械任职培训
WEB TRAINING
CENTER



医械宝
医疗器械知识平台
KNOWLEDG
ECENTEROF
MEDICAL DEVICE



MDCPP.COM
医械云专业平台
KNOWLEDG
ECENTEROF MEDICAL
DEVICE