

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 1 ml 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。