

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2206.5—2009

化妆品微生物检验方法 第 5 部分：肠球菌

Determination of microbiological in cosmetics—
Part 5: *Enterococci*

2009-02-20 发布

2009-09-01 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》分为以下部分：

- 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。

本部分为 SN/T 2206 的第 5 部分。

本部分的附录 B 为规范性附录，附录 A、附录 C 和附录 D 为资料性附录。

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：中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：杨捷琳、顾鸣、袁辰刚、李晓虹、朱海。

本部分系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

化妆品微生物检验方法

第5部分:肠球菌

1 范围

SN/T 2206 的本部分规定了化妆品中肠球菌的检验方法。
本部分适用于化妆品中肠球菌的检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 SN/T 2206 的本部分的引用而成为本部分的条款。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部分,然而,鼓励根据本部分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部分。

GB/T 7918.1 化妆品微生物标准检验方法 总则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于 SN/T 2206 的本部分。

3.1

肠球菌 *Enterococci*

一类革兰氏阳性球菌,兼性厌氧,无芽孢和荚膜,可分解胆汁七叶苷。

4 材料和设备

- 4.1 振荡器。
- 4.2 三角瓶:250 mL。
- 4.3 玻璃珠。
- 4.4 玻璃棒。
- 4.5 刻度吸管:1 mL,10 mL。
- 4.6 均质器。
- 4.7 恒温培养箱 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $46\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $32.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.8 天平:感量为 0.001 g。
- 4.9 高压灭菌器。

5 培养基和试剂

- 5.1 D/E 中和培养基(Dey/Engley 中和培养基),参见附录 A 第 A.1 章。
- 5.2 叠氮化钠葡萄糖肉汤,参见附录 A 第 A.2 章。
- 5.3 KF 培养基(加中和剂),参见附录 A 第 A.3 章。
- 5.4 Pfizer 肠球菌选择性琼脂(PSE 琼脂),参见附录 A 第 A.4 章。
- 5.5 3%过氧化氢溶液。
- 5.6 革兰氏染色液。
- 5.7 6.5%氯化钠葡萄糖琼脂,参见附录 A 第 A.5 章。

6 检验程序

6.1 化妆品中肠球菌 MPN 计数法检验流程图见图 1。

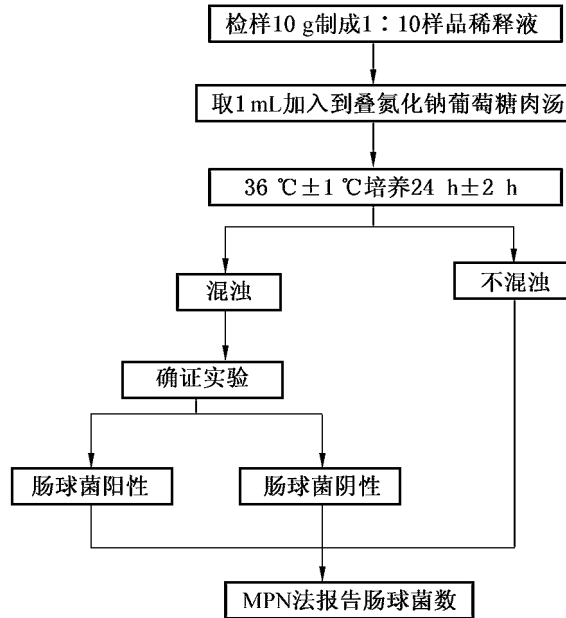


图 1 化妆品中肠球菌 MPN 计数法检验流程图

6.2 化妆品中肠球菌平板计数法流程图见图 2。

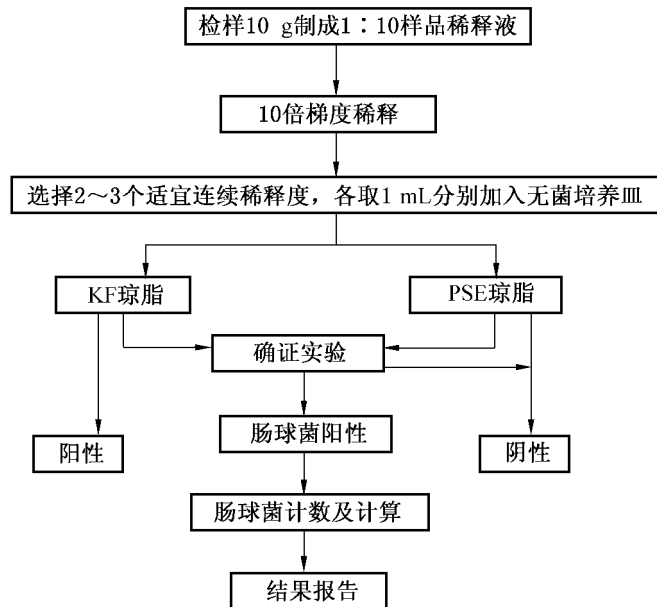


图 2 化妆品中肠球菌平板计数法流程图

6.3 样品制备

样品按照 GB/T 7918.1 供检样品的制备方法进行。样品制备时,也可参见附录 A 第 A.1 章的 D/E中和培养基代替生理盐水或 SCDLP 培养基。参见附录 C 中列出的化妆品中常用防腐剂种类及微生物检测时所使用的中和剂种类和配方,可根据不同产品成分参照使用。

6.4 最大近似数(MPN)法

6.4.1 用适当稀释的样液接种叠氮化钠葡萄糖肉汤管,每个稀释度接种3管,接种量为1 mL或1 mL以下时,使用10 mL单料管;接种量为10 mL时,使用10 mL双料管,接种后的试管置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$,检查各试管浑浊情况,若浑浊不明显,继续培养至48 h后记录。

6.4.2 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 或 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 后,对所有呈现浑浊的叠氮化钠葡萄糖肉汤管进行确证,用接种环将各管培养物划线于Pfizer肠球菌选择性琼脂(PSE琼脂)平板或KF琼脂平板,倒置于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。肠球菌属细菌在肠球菌琼脂平板上形成带棕色环的棕黑色菌落,在KF平板上形成暗红至粉红色菌落,边缘整齐;对典型或可疑菌落至少挑取10个按6.6进行确证实验。每管培养物中有一个菌落确认为肠球菌,则该管视为阳性。

6.4.3 结果报告:根据接种的样品量和确证为肠球菌的管数,查MPN表(见附录B),报告每克(毫升)[g(mL)]样品中肠球菌的MPN值。

6.5 平板计数法

6.5.1 取1 mL适当稀释的检液加入90 mm×15 mm的培养皿内,倾注12 mL~15 mL已融化约 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的KF琼脂或PSE琼脂培养基,转动培养皿使培养基与样液混匀,待平板凝固后倒置于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$,每个稀释度接种两块平板。

6.5.2 菌落形态:肠球菌在KF琼脂平板上形成暗红色至粉红色菌落,在PSE琼脂平板上形成带棕色环的棕黑色菌落为典型或可疑菌落。

6.5.3 菌落计数及结果报告:对典型或可疑菌落挑取10个按6.6进行确证实验。选取25个~250个确证为肠球菌菌落的平板进行计数,计算同一稀释度两个平板的平均菌落数,报告结果。

6.6 确证实验

6.6.1 革兰氏染色:挑取上述可疑菌落,染色镜检,肠球菌为革兰氏阳性球菌,多数成双或呈短链状排列,无芽孢。

6.6.2 过氧化氢酶实验:挑取固体培养基上典型或可疑菌落,置于洁净试管内,或涂于干净的载玻片上,然后分别滴加3%过氧化氢溶液2 mL或一滴观察结果,于0.5 min内产生气泡者为阳性,不产生气泡者为阴性,肠球菌为过氧化氢酶阴性。

6.6.3 6.5%氯化钠葡萄糖培养:挑取单菌落接种6.5%氯化钠葡萄糖琼脂培养基, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$,观察是否生长。过氧化氢酶实验和6.5%氯化钠葡萄糖实验生长符合者判定为肠球菌属,可参照附录D进行进一步确证和分类。

7 中和剂验证

7.1 微生物菌株

采用粪肠球菌(ATCC49452)或其他等同性菌株。

7.2 验证实验

7.2.1 接种物的制备

在测试前,用粪肠球菌(ATCC49452)接种KF琼脂培养基, $32.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养18 h~24 h。收集培养物,调整悬液浓度为 10^8 CFU/mL。

注:在2 h内使用制备的悬液和稀释液。

7.2.2 梯度稀释菌悬液,以获得100 CFU/mL与500 CFU/mL之间的浓度。为了计数调整的菌悬液中的活菌数量,移取1 mL悬液放入平皿内,混血法倾注平板,倒置 $32.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养20 h~24 h计数。

7.2.3 取样品1 g或1 mL,按照GB/T 7918.1供检样品的方法1:10制备样液,无菌方式加入0.1 mL调整好浓度的菌悬液,未添加细菌的样品作为对照。

7.2.4 划线分离于添加中和剂(KF+)和未添加中和剂(KF-)的KF平板, $32.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养

20 h~24 h。

7.3 验证结果的解释

如果 KF(+)平板上有标准菌株生长,在 KF(-)平板上不生长,中和剂的中和效果得以验证。当 KF(+)和 KF(-)上均有细菌生长,如果 KF(+)生长菌株为添加的标准菌株时,中和剂和中和效果得以验证。在 KF(+)和 KF(-)无细菌生长或仅 KF(-)有杂菌生长均表明抗菌活性仍然存在,应改变样品与培养基稀释比例,或改变中和剂配方,进一步选择合适的中和剂配方,验证中和效果。

附 录 A
(资料性附录)
培养基

A.1 D/E 中和培养基(Dey/Engley 中和培养基)

A.1.1 成分

葡萄糖	10.0 g
大豆磷脂	7.0 g
五水硫代硫酸钠	6.0 g
聚山梨醇酯 80	805.0 g
胰化酪蛋白	5.0 g
亚硫酸氢钠	2.5 g
酵母膏	2.5 g
β -巯基乙醇	1.0 g
溴甲酚紫	0.02 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.3±0.1	

A.1.2 制法

将各组分依次称取加入,加热后使之完全溶解,121℃灭菌 15 min,使用时,调节 pH 值至7.6±0.2。

A.2 叠氮化钠葡萄糖肉汤

A.2.1 成分

牛肉浸膏	4.5 g
胰蛋白胨	15.0 g
葡萄糖	7.5 g
氯化钠	7.5 g
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2	

A.2.2 制法

以上各成分混匀,不断加热搅拌溶解,用适当大小试管分装,每管 10 mL,121℃灭菌 15 min,若制备双料浓度,上述配方中蒸馏水改为 500 mL。

A.3 KF 培养基(加中和剂)

A.3.1 成分

三号胨或多胨	10.0 g
酵母浸膏	10.0 g
氯化钠	5.0 g
甘油磷酸钠	10.0 g

麦芽糖	20.0 g
乳糖	1.0 g
叠氮化钠	0.4 g
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL
卵磷脂	1 g
Tween 80	7 g
pH 7.0±0.2	

A.3.2 制法

将各成分加热溶解,用10%碳酸钠调整pH值至7.2,121℃灭菌15 min,冷却至50℃~60℃时加入无菌1%氯化三苯四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)水溶液10 mL。培养基于45℃~50℃倾注平板,凝固后保存于冰箱备用。

A.4 Pfizer 肠球菌选择性琼脂(PSE 琼脂)

A.4.1 成分

蛋白胨	20.0 g
酵母浸膏	5.0 g
细菌学用胆汁	10.0 g
氯化钠	5.0 g
柠檬酸钠	1.0 g
七叶苷(Esculin)	1.0 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
叠氮化钠	0.25 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

121℃灭菌15 min,灭菌后pH 7.1,冷却后倾注平板。

A.5 6.5%氯化钠葡萄糖琼脂

A.5.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
酵母浸膏	1.5 g
葡萄糖	10.0 g
氯化钠	5.0 g
溴甲酚紫	0.015 g
琼脂	15 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

各成分溶解后,调节pH值为7.0,分装于13 mm×130 mm 试管,121℃灭菌15 min,斜置试管使成斜面。

附 录 B
(规范性附录)
MPN 表

B.1 1 g 样品中最可能数(MPN)表

使用三管法,接种量为 0.1,0.01,0.001(mL),见表 B.1。

表 B.1 MPN 表

阳 性 管 数			
0.1	0.01	0.001	MPN
0	0	0	<3
0	0	0	3
0	0	2	6
0	0	3	9
0	1	0	3
0	1	1	6.1
0	1	2	9.2
0	1	3	12
0	2	0	6.2
0	2	1	9.3
0	2	2	12
0	2	3	16
0	3	0	9.4
0	3	1	13
0	3	2	16
0	3	3	19
1	0	0	3.6
1	0	1	7.2
1	0	2	11
1	1	2	15
1	1	0	7.3
1	1	1	11
1	1	2	15
1	1	3	19
1	2	0	11
1	2	1	15
1	2	2	20
1	2	3	24

表 B.1 (续)

阳 性 管 数			
0.1	0.01	0.001	MPN
1	3	0	16
1	3	1	20
1	3	2	24
1	3	3	29
2	0	0	9.1
2	0	1	14
2	0	2	20
2	0	3	26
2	1	0	15
2	1	1	20
2	1	2	27
2	1	3	34
2	2	0	21
2	2	1	28
2	2	2	35
2	2	3	42
2	3	0	29
2	3	1	36
2	3	2	44
2	3	3	53
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	0	3	95
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	1	3	160
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	2	3	290
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1 100
3	3	3	>1 100

注：表内所列样品量如改为 1,0.1,0.01 g(mL)时,表内数字应相应降低 10 倍;如改为 0.01,0.001,0.000 1 g(mL)时,则表内数字相应增加 10 倍,其余可类推。

附 录 C

(资料性附录)

防腐剂对应使用中和剂清单

表 C.1 防腐剂对应使用中和剂清单

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,聚山梨醇酯 80,脂 肪酸环氧乙烷聚合物,非离子 型表面活性剂	聚山梨醇酯 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+聚山梨 醇酯 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;聚山梨醇 酯 80,5 g/L。
季胺类化合物,阳 离子表面活性剂	卵磷脂,皂角苷,聚山梨醇 酯 80,十二烷基硫酸钠,脂肪 酸环氧乙烷聚合物	聚山梨醇酯 80,30 g/L+十二烷基硫酸钠,4 g/L+卵磷脂, 3 g/L。 聚山梨醇酯 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;聚山梨醇 酯 80,5 g/L。
甲醛 乙醛	甘氨酸,组氨酸	卵磷脂,3 g/L+聚山梨醇酯 80,30 g/L+ L-组氨酸,1 g/L。 聚山梨醇酯 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:聚山梨醇酯 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	聚山梨醇酯 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;聚山梨醇酯 80,5 g/L。
双胍	卵磷脂,皂角苷,聚山梨醇 酯 80	聚山梨醇酯 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;聚山梨醇 酯 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。

附 录 D
(资料性附录)
肠球菌属主要生化特性

表 D.1 肠球菌属主要生化特性

	甘露醇	山梨醇	阿拉伯糖	蔗糖	棉子糖	精氨酸 水解	色素	动力	溶血性
鸟肠球菌	+	+	+	+	-	-	-	-	α, r
粪肠球菌	+	-	-	+	-	+	-	-	β, r
屎肠球菌	(+)	-	+	+	-	+	-	-	α
鸡肠球菌	+	-	+	+	+	+	-	+	β
棉糖肠球菌	+	+	+	+	+	-	-	-	?
恶臭肠球菌	+	+	-	+	+	-	-	-	r
假鸟肠球菌	+	+	-	+	-	-	-	-	?
孤立肠球菌	+	-	-	+	V	+	+	-	?
酪黄肠球菌	+	-	+	+	V	(+)	+	+	α
芒地肠球菌	+	-	+	+	V	+	+	-	?
坚忍肠球菌	(-)	-	-	-	+	+	-	-	?
希啦肠球菌	-	-	-	+	+	+	-	-	r

注:(+)大多数菌株阳性,(-)大多数菌株阴性,V为不定,?为不明。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
化妆品微生物检验方法
第 5 部分：肠球菌
SN/T 2206.5—2009

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街 16 号
邮政编码：100045

网址 www.spc.net.cn

电话：68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 20 千字
2009 年 5 月第一版 2009 年 5 月第一次印刷
印数 1—2 000

*

书号：155066·2-19650 定价 18.00 元



SN/T 2206.5—2009