

# SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4032—2014

---

## 进出口化妆品中弗氏柠檬酸杆菌 检测方法

Determination of *Citrobacter freundii* in cosmetics for import and export

2014-11-19 发布

2015-05-01 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

本标准按照 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。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国珠海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：王小玉、游淑珠、李碧霞、唐食明、冯家望、成晓维。

# 进出口化妆品中弗氏柠檬酸杆菌 检测方法

## 1 范围

本标准规定了化妆品中弗氏柠檬酸杆菌的检测方法。  
本标准适用于各类型化妆品中弗氏柠檬酸杆菌的检测。

## 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。

GB/T 7918.1 化妆品微生物标准检验方法 总则

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 培养基和试剂

除有特殊说明外,所有实验用试剂均为分析纯,实验用水应符合相关要求。为保证培养基的质量,宜按照 SN/T 1538.1 和 SN/T 1538.2 对培养基进行质量控制,也可使用符合 SN/T 1538 质量要求的商品化培养基。

- 3.1 生理盐水:见 A.1。
- 3.2 灭菌液体石蜡。
- 3.3 灭菌吐温 80。
- 3.4 大豆酪蛋白葡萄糖卵磷脂吐温 80(SCDLP)液体培养基:见 A.2。
- 3.5 亚硫酸铋(BS)琼脂:见 A.3。
- 3.6 SS 琼脂:见 A.4。
- 3.7 氧化酶试剂或试纸条:见 A.5。
- 3.8 革兰氏染色液:见 A.6。
- 3.9 三糖铁(TSI)琼脂:见 A.7。
- 3.10 胰酪胨大豆琼脂(TSA):见 A.8。
- 3.11 ONPG 培养基:见 A.9。
- 3.12 缓冲葡萄糖蛋白胨水:见 A.10。
- 3.13 糖发酵生化鉴定管:见 A.11。
- 3.14 赖氨酸铁琼脂(LIA):见 A.12。
- 3.15 动力吡啶鸟氨酸(MIO)培养基:见 A.13。

## 4 设备和材料

- 4.1 天平:感量 0.1 g。

- 4.2 高压灭菌器。
- 4.3 旋涡混匀振荡器。
- 4.4 三角瓶:250 mL,带盖或塞。
- 4.5 试管:带盖或塞。
- 4.6 无菌吸管或移液器和配套吸头:1 mL、5 mL及10 mL。
- 4.7 无菌器具:镊子、剪刀、小刀和药匙。
- 4.8 培养皿:已灭菌,直径90 mm~100 mm。
- 4.9 接种针、接种环。
- 4.10 载玻片、盖玻片。
- 4.11 研钵或均质器。
- 4.12 恒温培养箱: $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

## 5 检验程序

化妆品中弗氏柠檬酸杆菌的检验程序见图1。

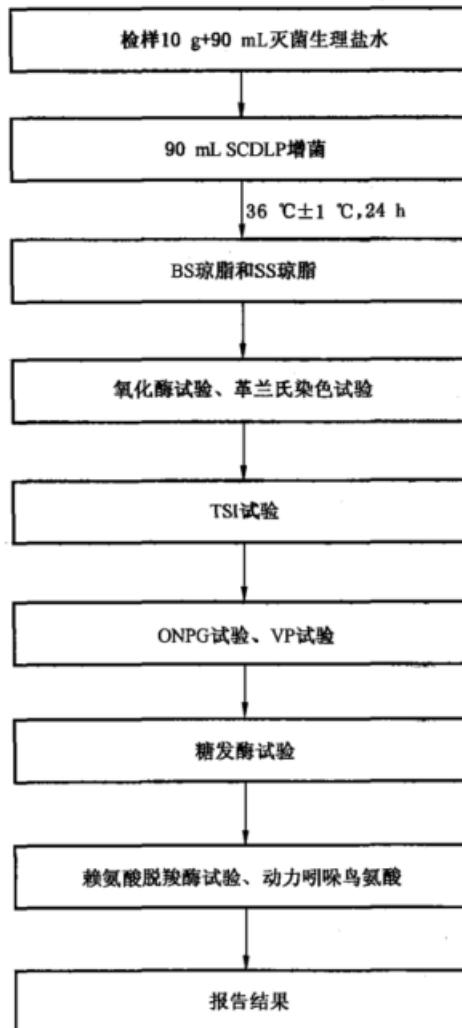


图1 化妆品中弗氏柠檬酸杆菌的检验程序

## 6 样品制备

化妆品中不同类型的检样采用 GB/T 7918.1 中的方法制备成 1:10 的样品稀释液。

## 7 检验步骤

### 7.1 增菌

取 1:10 样品稀释液 10 mL 接种到 90 mL SCDLP 液体培养基中,置  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 18 h~24 h。

### 7.2 分离培养

自上述培养液中,取 1~2 接种环,划线接种于 BS 琼脂和 SS 琼脂平板,BS 琼脂平板置  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 40 h~48 h,SS 琼脂平板置  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 18 h~24 h。弗氏柠檬酸杆菌在 BS 琼脂平板上为棕绿色或棕黑色菌落,在 SS 琼脂平板菌落呈圆形,粉红色、黑色、无色菌落,或粉红色、黑色中心菌落。从 BS 琼脂和 SS 琼脂平板上分别挑取 3~5 个可疑菌落,在 TSA 琼脂上进行纯化培养。

### 7.3 鉴定

#### 7.3.1 氧化酶试验

取可疑菌落接种于 TSA,  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 18 h~24 h,进行氧化酶试验,弗氏柠檬酸杆菌氧化酶试验为阴性。

#### 7.3.2 革兰氏染色

将可疑菌落的纯培养物进行革兰氏染色,弗氏柠檬酸杆菌为革兰氏阴性无芽胞杆菌。

#### 7.3.3 生化鉴定

##### 7.3.3.1 一般要求

氧化酶试验阴性的革兰氏阴性无芽胞杆菌,转接至 TSA,  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 18 h~24 h 后,按 7.3.3.2~7.3.3.7 给出方法进行生化鉴定。经验证符合使用要求的微生物鉴定试剂盒或微生物自动鉴定仪也可用于生化鉴定。附录 B 和附录 C 给出了弗氏柠檬酸杆菌与其他相似菌的生化鉴别。

##### 7.3.3.2 TSI 试验

将可疑菌落纯培养物接种于 TSI,置于  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 18 h~24 h,多数弗氏柠檬酸杆菌在 TSI 底层产酸且产  $\text{H}_2\text{S}$ 。

##### 7.3.3.3 ONPG 试验

将可疑菌落纯培养物接种至 ONPG,置于  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 1 h~3 h 和 24 h 观察结果。如果  $\beta$ -半乳糖苷酶产生,则于 1 h~3 h 变黄色,如无此酶则 24 h 不变色。弗氏柠檬酸杆菌 ONPG 试验阳性。

##### 7.3.3.4 VP 试验

将纯培养物接种至缓冲葡萄糖蛋白胨水,  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 48 h,弗氏柠檬酸杆菌 VP 试验阴性。

#### 7.3.3.5 糖发酵产酸试验

将纯培养物接种至葡萄糖、鼠李糖、甘露醇、山梨醇、阿拉伯糖、蔗糖、侧金盏花醇、D-阿拉伯(糖)醇、水杨苷发酵管,36℃±1℃培养18h~24h,弗氏柠檬酸杆菌发酵葡萄糖、鼠李糖、甘露醇、山梨醇、阿拉伯糖、蔗糖、产酸试验阳性,侧金盏花醇、D-阿拉伯(糖)醇、水杨苷发酵产酸试验为阴性。

#### 7.3.3.6 赖氨酸脱羧酶试验

将纯培养物接种至赖氨酸铁琼脂斜面培养基,36℃±1℃培养18h~24h,弗氏柠檬酸杆菌无赖氨酸脱羧酶在赖氨酸铁琼脂斜面培养基斜面仍为紫色,底层变黄,多数菌株产H<sub>2</sub>S。

#### 7.3.3.7 鸟氨酸脱羧酶试验

将纯培养物穿刺接种至动力吲哚鸟氨酸培养基,36℃±1℃培养18h~24h,弗氏柠檬酸杆菌无鸟氨酸脱羧酶,培养基表层为紫色底层变黄、有动力能沿穿刺呈扩散生长、多数菌株不产吲哚,靛基质试验阴性。

### 8 结果报告

检验结果报告为样品中检出或未检出弗氏柠檬酸杆菌。

**附录 A**  
**(规范性附录)**  
**培养基和试剂**

**A.1 生理盐水****A.1.1 成分**

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

**A.1.2 制法**

溶解后,分装到加玻璃珠的三角瓶内,每瓶 90 mL,121 °C 高压灭菌 20 min。

**A.2 大豆酪蛋白葡萄糖卵磷脂吐温 80(SCDLP)液体培养基****A.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
蒸馏水	1 000 mL

**A.2.2 制法**

将上述成分混合后,加热溶解。调 pH 为  $7.2 \pm 0.2$  分装,121 °C 高压灭菌 20 min。注意振荡,使沉淀于底层的吐温 80 充分混合,待冷却至 25 °C 左右使用。

**A.3 亚硫酸铋(BS)琼脂****A.3.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸粉	5.0 g
硫酸亚铁	0.3 g
亚硫酸铋	8.0 g
磷酸氢二钠	4.0 g
葡萄糖	5.0 g
煌绿	0.025 g
琼脂	18.0 g~20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

### A.3.2 制法

将前三种成分加入 300 mL 蒸馏水(制作基础液),硫酸亚铁和磷酸氢二钠分别加入 20 mL 和 30 mL 蒸馏水中,柠檬酸铋铵和亚硫酸钠分别加入另一 20 mL 和 30 mL 蒸馏水中,琼脂加入 600 mL 蒸馏水中。然后分别搅拌均匀,煮沸溶解。冷至 80 ℃左右时,先将硫酸亚铁和磷酸氢二钠混匀,倒入基础液中,混匀。将柠檬酸铋铵和亚硫酸钠混匀,倒入基础液中,再混匀。调节 pH 值至  $7.5 \pm 0.2$ ,随即倾入琼脂液中,混合均匀,冷至 50 ℃~55 ℃。加入煌绿溶液,充分混匀后立即倾注平皿。

注:本培养基不需要高压灭菌,在制备过程中不宜过分加热,避免降低其选择性,贮于室温暗处,超过 48 h 会降低其选择性(培养基此时变绿),本培养基宜于当天制备,第二天使用。

## A.4 SS 琼脂

### A.4.1 基础培养基

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	5.0 g
三号胆盐	3.5 g
琼脂	17.0 g
蒸馏水	1 000 mL

### A.4.2 完全培养基

基础培养基	1 000 mL
乳糖	10.0 g
柠檬酸钠	8.5 g
硫代硫酸钠	8.5 g
10%柠檬酸铁溶液	10 mL
1%中性红溶液	2.5 mL
0.1%煌绿溶液	0.33 mL

### A.4.3 制法

加热溶化基础培养基,按比例加入上述染料以外之各成分,充分混合均匀,校正至 pH 值为 7.0,加入中性红和煌绿溶液,倾注平板。

注 1:制好的培养基宜当日使用,或保存于冰箱内于 48 h 内使用。

注 2:煌绿溶液配好后应在 10 d 以内使用。

注 3:可以购用 SS 琼脂的干燥培养基。

## A.5 氧化酶试剂

### A.5.1 成分

四甲基对苯二胺	1.0 g
蒸馏水	100 mL

### A.5.2 制法

将四甲基对苯二胺溶于蒸馏水即可,现配现用。若装入棕色瓶中,放置于 2 ℃~8 ℃冰箱保存,可在配制后 7 d 内使用。



## A.6 革兰氏染色试剂

### A.6.1 结晶紫染色液

#### A.6.1.1 成分

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

#### A.6.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

### A.6.2 革兰氏碘液

#### A.6.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

#### A.6.2.2 制法

将碘与碘化钾先行混合,加入蒸馏水少许充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

### A.6.3 沙黄复染液

#### A.6.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

#### A.6.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

### A.6.4 染色法

涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染液,染 1 min,水洗。滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。滴加 95%乙醇脱色约 15 s~30 s,直至染色液被洗掉,不要过分脱色,水洗。滴加复染液,复染 1 min,水洗、待干、镜检。

## A.7 三糖铁(TSI)琼脂

### A.7.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g

葡萄糖	1.0 g
硫酸亚铁铵(含 6 个结晶水)	0.2 g
酚红	0.25 g 或 5.0 g/L 溶液 5.0 mL
硫代硫酸钠	0.3 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

#### A.7.2 制法

除酚红和琼脂外,将其他成分加入 400 mL 蒸馏水中,煮沸溶解,调节 pH,使灭菌后的培养基在 25 ℃ 时 pH 值为  $7.4 \pm 0.2$ 。另将琼脂加入 600 mL 蒸馏水中,煮沸溶解。

将上述两溶液混合均匀后,再加入指示剂,混匀,分装试管,每管约 2 mL~4 mL,高压灭菌 121 ℃ 10 min 或 115 ℃ 15 min,灭菌后置成高层斜面,呈桔红色。

### A.8 胰酪胨大豆琼脂(TSA)

#### A.8.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
植物蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

#### A.8.2 制法

用水溶解各成分或脱水合成培养基,煮沸。必要时调整 pH 值,使灭菌后的培养基在 25 ℃ 时 pH 值为  $7.3 \pm 0.2$ 。将培养基分装到容量合适的三角烧瓶或瓶中。放入高压灭菌器中,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

### A.9 ONPG 培养基

#### A.9.1 成分

邻硝基酚 $\beta$ -D-半乳糖昔(ONPG)	60 mg
0.01 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH 值为 7.5)	10 mL
1% 蛋白胨水	30 mL

#### A.9.2 制法

将 ONPG 溶于缓冲液内,加入蛋白胨水,以过滤法除菌,分装于 10 mm  $\times$  75 mm 试管,每管 0.5 mL,用塞塞紧。

### A.10 缓冲葡萄糖蛋白胨水

#### A.10.1 成分

葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钾( $K_2HPO_4$ )	5.0 g

蒸馏水 1 000 mL

#### A.10.2 制法

将上述成分溶解于蒸馏水中,调节 pH,分装试管,每管 1 mL,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

#### A.10.3 V-P 试剂

##### A.10.3.1 6% $\alpha$ -萘酚-乙醇溶液

成分及制法:取  $\alpha$ -萘酚 6.0 g,加无水乙醇溶解,定容至 100 mL。

##### A.10.3.2 40%氢氧化钾溶液

成分及制法:取氢氧化钾 40 g,加蒸馏水溶解,定容至 100 mL。

#### A.10.4 试验方法

取适量琼脂培养物接种于缓冲葡萄糖蛋白胨水,36 °C $\pm$ 1 °C 培养 2 d~4 d。加入 6% $\alpha$ -萘酚-乙醇溶液 0.5 mL 和 40%氢氧化钾溶液 0.2 mL,充分振摇试管,观察结果。阳性反应立刻或于数分钟内出现红色,如为阴性,应放在 36 °C $\pm$ 1 °C 继续培养 4 h 再进行观察。

#### A.11 糖发酵生化鉴定管

##### A.11.1 成分

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	3.0 g
磷酸氢二钠(含 12 个结晶水)	2.0 g
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

##### A.11.2 制法

糖发酵管按上述成分配好后,调节 pH。按 0.5% 加入糖,分装于有一个倒置小管的小试管内,121 °C 高压灭菌 15 min。其他各种糖发酵管可按上述成分配好后,分装每瓶 100 mL,121 °C 高压灭菌 15 min。另将各种糖类分别配好 10% 溶液,同时高压灭菌。将 5 mL 糖溶液加入于 100 mL 培养基内,以无菌操作分装小试管。

注:蔗糖不纯,加热后会自行水解者,应采用过滤法除菌。

A.11.3 试验方法:从琼脂斜面上挑取少量培养物接种,于 36 °C $\pm$ 1 °C 培养,一般 2 d~3 d。迟缓反应需观察 14 d~30 d。

#### A.12 赖氨酸铁琼脂(LIA)

##### A.12.1 成分

蛋白胨	5.0 g
葡萄糖	1.0 g
酵母浸粉	3.0 g
L-赖氨酸盐酸盐	10.0 g
硫代硫酸钠	0.04 g
柠檬酸铁铵	0.5 g

溴甲酚紫	0.02 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

#### A.12.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH,使灭菌后的培养基在 25 ℃时 pH 值为  $6.7 \pm 0.2$ 。分装于 13 mm×100 mm 试管中,每管分装 4 mL,121 ℃高压 12 min,制成斜面,斜面长 2.5 cm,底部长 4 cm。

#### A.13 动力吡啉鸟氨酸(M10)培养基

##### A.13.1 成分

酵母浸粉	3.0 g
蛋白胨	10.0 g
酪蛋白胨	10.0 g
L-鸟氨酸盐酸盐	5.0 g
葡萄糖	1.0 g
溴甲酚紫	0.02 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

##### A.13.2 制法

将各成分加热溶解,必要时调节 pH,使灭菌后的培养基在 25 ℃时 pH 值为  $6.5 \pm 0.2$ 。分装于 13 mm×100 mm 试管中,每管分装 4 mL,121 ℃高压 15 min。

## 附录 B

(资料性附录)

产 H<sub>2</sub>S 阳性柠檬酸杆菌的生化鉴别表 B.1 产 H<sub>2</sub>S 阳性柠檬酸杆菌的生化鉴别

生化反应	柠檬酸杆菌	沙门氏菌	大肠埃希氏菌
产吡啶	d	—	+
柠檬酸盐利用	+	+	—
KCN 生长	+	—	—
赖氨酸脱羧酶	—	+	—
鸟氨酸脱羧酶	d	+	d
蔗糖	d	—	d
纤维二糖	d	—	—
ONPG	+	+	+
产 H <sub>2</sub> S(克氏双糖铁琼脂或三糖铁琼脂)	+	+	+
注：+：≥90%阳性； d：11%~89%阳性； —：≥90%阴性。			

附 录 C  
(规范性附录)  
柠檬酸杆菌属细菌的生化鉴别

表 C.1 柠檬酸杆菌属细菌的生化鉴别

生化反应	弗氏柠檬酸杆菌	无丙二酸盐柠檬酸杆菌	布氏柠檬酸杆菌	法氏柠檬酸杆菌	吉氏柠檬酸杆菌	柯氏柠檬酸杆菌	啮齿柠檬酸杆菌	鼠类柠檬酸杆菌	塞氏柠檬酸杆菌	魏氏柠檬酸杆菌	杨氏柠檬酸杆菌
产吲哚	d	+	d	+	-	+	+	-	+	-	d
西蒙氏柠檬酸盐	d	+	d	d	d	+	+	-	d	-	d
TSI 产 H <sub>2</sub> S	d	d	d	-	d	-	d	-	-	+	d
鸟氨酸脱羧酶	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
KCN 生长	d	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
丙二酸盐利用	d	d	-	-	+	+	-	+	+	+	-
蔗糖	+	d	-	+	d	d	d	-	-	-	d
蜜二糖	+	-	d	+	d	-	d	-	+	-	-
棉子糖	d	-	-	+	-	-	d	-	-	-	-
卫矛醇	d	-	d	-	-	d	+	-	+	-	d
侧金盏花醇	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D-阿拉伯糖醇	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

注：+：≥90%阳性；  
d：11%~89%阳性；  
-：≥90%阴性。