

中华人民共和国国家标准

化妆品微生物标准检验方法 金黄色葡萄球菌

UDC 668.58 : 576
.85.07

GB 7918.5—87

Standard methods of microbiological
examination for cosmetics
Staphylococcus aureus

金黄色葡萄球菌在外界分布较广,抵抗力也较强,能引起人体局部化脓性病灶,严重时可导致败血症,因此化妆品中检验金黄色葡萄球菌有重要意义。

1 方法提要

根据本菌特有的形态及培养特性,应用 Baird Parker 平板进行分离,该平板中的氯化锂可抑制革兰氏阴性细菌生长,丙酮酸钠可刺激金黄色葡萄球菌生长,以提高检出率,并利用分解甘露醇和血浆凝固酶等特征,以兹鉴别。

2 培养基和试剂

2.1 培养基

2.1.1 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》。

2.1.2 7.5%的氯化钠肉汤

成分:	蛋白胨	10g
	牛肉膏	3g
	氯化钠	75g
	蒸馏水	1000ml

制法:将上述成分加热溶解,调 pH 为 7.4,分装,121℃(15 lb)15 min 高压灭菌。

2.1.3 Baird Parker 平板

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 · 6 H ₂ O)	5g
	琼脂	20g
	蒸馏水	950ml
		pH7.0±0.2

增菌剂的配制:30%卵黄盐水 50ml 与除菌过滤的 1%亚硝酸钾溶液 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,冷至 25℃校正 pH。分装每瓶 95ml,121℃高压

灭菌 15min。临用时加热溶化琼脂，每 95ml 加入预热至 50℃ 的卵黄亚碲酸钾增菌剂 5ml，摇匀后倾注平板。培养基应是致密不透明的。使用前在冰箱储存不得超过 48h。

2.1.4 血琼脂培养基

成分： 营养琼脂	100ml
脱纤维羊血(或兔血)	10ml

制法：将营养琼脂加热溶化，待冷至 50℃ 左右以无菌手续加入脱纤维羊血，摇匀，制成平板，置冰箱内备用。

2.1.5 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% 溴麝香草酚蓝溶液	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 pH 7.4，加入甘露醇和指示剂，混匀后分装试管中，115℃ (10 lb) 20 min 灭菌备用。

2.1.6 兔(人)血浆制备

取 3.8% 柠檬酸钠溶液 [121℃ (15 lb) 30 min 灭菌] 1 份加兔(人)全血 4 份，混匀静置，2000~3000 r/min 离心 3~5min。血球下沉，取上面血浆。

3 设备和材料

- 3.1 显微镜。
- 3.2 培养箱。
- 3.3 离心机。
- 3.4 灭菌吸管：1ml, 5ml, 10ml。
- 3.5 灭菌试管。
- 3.6 载玻片。
- 3.7 酒精灯。

4 操作步骤

4.1 增菌：取 1:10 稀释的样品 10ml 接种到 90ml SCDLP 液体培养基中（如无此培养基也可用 7.5% 氯化钠肉汤），置 37℃ 培养箱，培养 24h。

注：如无此培养基也可用 7.5% 氯化钠肉汤，检验含防腐剂的化妆品时，可在 1000 ml 此培养基中加 1g 卵磷脂、7g 吐温 80。

4.2 分离：自上述增菌培养液中，取 1~2 接种环，划线接种在 Baird Parker 氏培养基，如无此培养基也可划线接种到血琼脂平板，置 37℃ 培养 24~48h。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 氏培养基上为圆形，光滑，凸起，湿润，直径为 2~3mm，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。

4.3 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 0.5~1μm。

4.4 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，置 37℃ 培养 24h，金黄色葡萄球菌应能发酵甘露醇产酸。

4.5 血浆凝固酶试验

4.5.1 玻片法：取清洁干燥载玻片，一端滴加一滴灭菌生理盐水，另一端滴加一滴血浆，用接种环挑取待检菌落，分别在生理盐水及血浆中充分研磨混合。血浆与菌苔混悬液在5min内出现团块或颗粒状凝块时，而盐水滴仍呈均匀混浊无凝固现象者为阳性，如两者均无凝固现象则为阴性。凡玻片试验呈阴性反应或盐水滴与血浆滴均有凝固现象，再进行试管凝固酶试验。

4.5.2 试管法：吸取1:4新鲜血浆0.5ml，放入灭菌小试管中，再加入待检菌24h肉汤培养物0.5ml。混匀，放37℃温箱或水浴中，每半小时观察一次，24h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，分别加入灭菌小试管内0.5ml 1:4血浆混匀，做为对照。

5 检验结果报告

凡在上述选择平板上有可疑菌落生长，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。

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。

本标准主要起草人刘以贤。

本标准由中国预防医学科学院环境卫生监测所负责解释。