



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2206.13—2014

化妆品微生物检验方法 第 13 部分：嗜麦芽窄食单胞菌

Determination of microorganism in cosmetics—
Part 13: *Stenotrophomonas maltophilia*

2014-04-09 发布

2014-11-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

SN/T 2206《化妆品微生物检验方法》共分为 13 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；
- 第 6 部分：破伤风梭菌。
- 第 7 部分：蛋白免疫印迹法检测疯牛病病原；
- 第 8 部分：白色念珠菌；
- 第 9 部分：胆汁酸耐受革兰氏阴性菌；
- 第 10 部分：金黄色葡萄球菌 PCR 法；
- 第 11 部分：金黄色葡萄球菌 多重实时荧光 PCR 法；
- 第 12 部分：绿脓杆菌 PCR 法；
- 第 13 部分：嗜麦芽窄食单胞菌。

本部分为 SN/T 2206 的第 13 部分。

本部分按照 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：中华人民共和国威海出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：王静、杨丽君、李兆杰、刘玉敏、胡巧茹、徐成钢、宋晓华。

化妆品微生物检验方法

第 13 部分:嗜麦芽窄食单胞菌

1 范围

SN/T 2206 的本部分规定了进出口化妆品中嗜麦芽窄食单胞菌的检测方法。

本部分适用于进出口各类化妆品中嗜麦芽窄食单胞菌的检测。

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 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本文件。

3.1

嗜麦芽窄食单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia*

嗜麦芽窄食单胞菌是一种革兰氏阴性杆菌,在自然界中分布甚广,广泛存在于各种水源、牛奶、冰冻食品、土壤、植物根系、动物及人体等,是一种条件致病菌。主要寄生在呼吸道,引起呼吸道感染,还可引起心内膜炎、败血症、肺炎、脑膜炎、尿路感染等。其典型生化特征为:非发酵型细菌,不产气,氧化酶阴性,DNA 酶阳性,有动力,水解七叶苷,能液化明胶,还原硝酸盐为亚硝酸盐。另外,嗜麦芽窄食单胞菌对亚胺培南具有天然耐药性。

4 材料和设备

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

- 4.1 恒温培养箱:30℃±1℃。
- 4.2 天平:感量 0.1 g。
- 4.3 均质器。
- 4.4 玻璃珠。
- 4.5 灭菌研钵。
- 4.6 无菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)或微量移液器及吸头。
- 4.7 无菌锥形瓶:容量 500 mL。
- 4.8 无菌培养皿。
- 4.9 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。
- 4.10 全自动微生物鉴定系统或类似设备。

5 培养基和试剂

- 5.1 灭菌生理盐水:见 A.1。
- 5.2 SCDLP 液体培养基:见 A.2。
- 5.3 血琼脂平板:见 A.3。
- 5.4 中国蓝琼脂:见 A.4。
- 5.5 MH 琼脂:见 A.5。
- 5.6 革兰氏染液:见 A.6。
- 5.7 克氏双糖铁琼脂:见 A.7。
- 5.8 氧化酶试剂:见 A.8。
- 5.9 SIM 动力培养基:见 A.9。
- 5.10 DNA 酶琼脂:见 A.10。
- 5.11 明胶培养基:见 A.11。
- 5.12 硝酸盐培养基:见 A.12。
- 5.13 1 mol/L 盐酸:见 A.13。
- 5.14 1 mol/L 氢氧化钠:见 A.14。
- 5.15 七叶苷培养基:见 A.15。
- 5.16 亚胺培南药敏片。
- 5.17 灭菌液体石蜡。
- 5.18 灭菌吐温 80。
- 5.19 生化鉴定试剂条或其他等效产品。

6 检验程序

嗜麦芽窄食单胞菌检验程序见图 1。

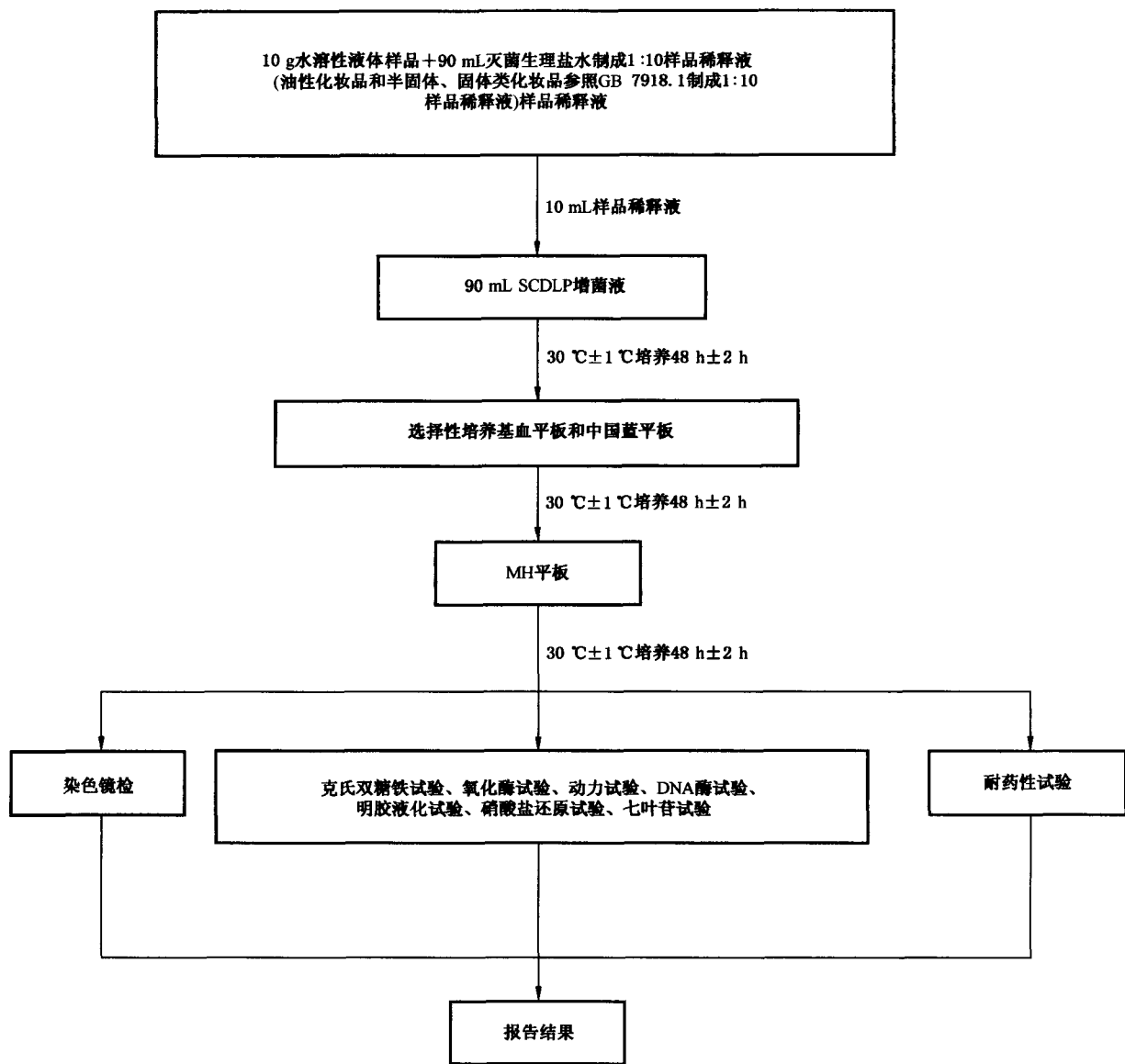


图 1 嗜麦芽窄食单胞菌检验程序

7 样品制备

化妆品中不同类型的检样制备参照 GB 7918.1 进行制样。

8 操作步骤

8.1 增菌培养

取 1:10 样品稀释液 10 mL 加到 90 mL SCDLP 液体培养基中,置 30 °C ± 1 °C,培养 48 h ± 2 h。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 1 000 mL 此培养基中加 1 g 卵磷脂、7 g 吐温 80。

8.2 分离培养

取增菌液一环,分别划线接种血平板、中国蓝平板,置 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。嗜麦芽窄食单胞菌在血平板、中国蓝平板上生长迅速,血平板上菌落呈灰绿色或淡黄色,直径 $1\text{ mm}\sim 2\text{ mm}$,圆形光滑凸起,湿润,边缘整齐,有氨气味。中国蓝平板上菌落呈乳白色,略显淡红色,直径 $2\text{ mm}\sim 3\text{ mm}$,圆形光滑湿润,不透明。

8.3 纯培养

自选择性琼脂平板上挑取典型或可疑菌落,划线接种于 MH 平板, $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。

8.4 鉴定

8.4.1 革兰氏染色:嗜麦芽窄食单胞菌为直或稍弯的革兰氏阴性杆菌。

8.4.2 生化试验:挑取 MH 平板上的可疑菌落,进行克氏双糖铁试验、氧化酶试验、动力试验、DNA 酶试验、明胶液化试验、硝酸盐还原试验和七叶苷水解试验。嗜麦芽窄食单胞菌的主要生化特征见表 1。若选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统,可从 MH 琼脂平板上挑取可疑菌落,用生理盐水制备成浊度适当的菌悬液,使用生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定。

表 1 嗜麦芽窄食单胞菌的生化特征

试验项目	结果
革兰氏染色镜检	阴性
克氏双糖铁	不发酵产酸,不产气
氧化酶	阴性
动力	阳性
DNA 酶	阳性
明胶液化	阳性
硝酸盐还原	还原硝酸盐为亚硝酸盐
七叶苷水解	阳性

8.4.3 耐药性试验:利用嗜麦芽窄食单胞菌对亚胺培南 100%天然耐药,采用 K-B 纸片法,进行耐药性试验,依据这一特点对其进行鉴定。挑取嗜麦芽窄食单胞菌可疑菌落的纯培养物,接种到 10 mL SCDLP 液体培养基中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 后,用棉棒沾取培养液涂布 MH 平板,将亚胺培南药敏片贴在已接种测试菌的琼脂平板上,在纸片周围抑菌浓度范围内测试菌的生长不被抑制,没有形成透明的抑菌圈,表明被检菌对亚胺培南具有耐药性。

9 结果报告

综合以上生化特征和耐药性试验的结果,报告样品中检出或未检出嗜麦芽窄食单胞菌。

附 录 A
(规范性附录)
试剂和培养基

A.1 无菌生理盐水

A.1.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.2 SCDLP 液体培养基

A.2.1 成分

胰蛋白胨	17.0 g
大豆蛋白胨	3.0 g
磷酸氢二钾	5.0 g
葡萄糖	2.5 g
葡萄糖	1.0 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 值为 7.2±0.1 分装,121 ℃ 高压灭菌 15 min。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。

A.3 血琼脂平板

A.3.1 成分

豆粉琼脂(pH 值为 7.4~7.6)	100 mL
脱纤维羊血(或兔血)	5 mL~10 mL

A.3.2 制法

加热溶化琼脂,冷却至 50 ℃,以无菌操作加入脱纤维羊血,摇匀,倾注平板。

A.4 中国蓝琼脂

A.4.1 成分

牛肉粉	5.0 g
-----	-------

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	10.0 g
中国蓝	0.03 g
玫红酸	0.03 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

将上述成分混合后,加热溶解,调 pH 值为 7.3 ± 0.2 分装,115 ℃ 高压灭菌 15 min。冷却至 50 ℃,倾注平板。

A.5 MH 琼脂

A.5.1 成分

牛肉浸出粉	2.0 g
可溶性淀粉	1.5 g
酪蛋白水解物	17.5 g
琼脂	17.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

将上述成分混合后,加热溶解,调 pH 值为 7.3 ± 0.2 分装,121 ℃ 高压灭菌 20 min。冷却至 50 ℃,倾注平板。

A.6 革兰氏染色液

A.6.1 结晶紫染色液

A.6.1.1 成分

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20.0 mL
1%草酸铵水溶液	80.0 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	10.0 mL
蒸馏水	90.0 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。
- 滴加沙黄复染液,复染 1 min,水洗、待干、镜检。

A.7 克氏双糖铁琼脂**A.7.1 成分**

蛋白胨	20.0 g
牛肉膏	3.0 g
葡萄糖	1.0 g
乳糖	10.0 g
氯化钠	5.0 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
硫代硫酸钠	0.5 g
酚红	0.025 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

将除琼脂和酚红以外的各成分溶解于蒸馏水中,调节 pH 值为 7.4。加入琼脂,加热煮沸,以溶化琼脂。加入 0.2%酚红水溶液 12.5 mL,摇匀。分装试管,装量宜多些,以便得到比较高的底层。121 ℃高压灭菌 15 min,放置高层斜面备用。

A.7.3 试验方法

挑取纯培养的单个可疑菌落接种克氏双糖铁琼脂,先在斜面划线,再于底层穿刺,30 ℃±1 ℃培养 48 h±2 h,观察结果。

A.8 氧化酶试剂

A.8.1 成分

<i>N,N,N',N'</i> -四甲基对苯二胺盐酸盐	1.0 g
蒸馏水	100 mL

A.8.2 制法

少量新鲜配制,于冰箱内避光保存,在 7 d 之内使用。

A.8.3 试验方法

用铂/铱接种环挑取在 MH 平板上的可疑菌落,涂于浸湿氧化酶试剂的滤纸上,不要用镍铬环,或将一滴氧化酶试剂直接滴加于 MH 平板上的可疑菌落上。滤纸或平板上菌落的颜色在 10 s 内未变成蓝紫色,则为氧化酶试验阴性,否则即为氧化酶实验阳性。

A.9 SIM 动力培养基

A.9.1 成分

胰胨	20.0 g
多价胨	6.0 g
硫酸铁铵	0.2 g
硫代硫酸钠	0.2 g
琼脂	3.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.9.2 制法

将上述各成分加热混匀,调节 pH 值为 7.2,分装小试管,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.9.3 试验方法

挑取纯培养的单个可疑菌落穿刺接种到 SIM 培养基中,于 30 °C ± 1 °C 培养 48 h ± 2 h,观察结果。

A.10 DNA 酶琼脂

A.10.1 成分

胰酪胨	15.0 g
植物胨	5.0 g
脱氧核糖核酸	2.0 g
氯化钠	5.0 g
氯化钙	0.02 g
琼脂	13.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.10.2 制法

将上述成分混合后,加热溶解,调 pH 值为 7.3 分装,121 °C 高压灭菌 15 min。冷却至 50 °C,倾注平板。

A.10.3 试验方法

在 DNA 琼脂平板上点种可疑菌,30 °C ± 1 °C 培养 48 h ± 2 h,用 1 mol/L 盐酸倾注平板,观察结果。菌落周围有透明区者为阳性,无透明区为阴性。

A.11 明胶培养基

A.11.1 成分

牛肉膏	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
明胶	120.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.11.2 制法

取各成分在蒸馏水中浸泡 20 min,搅拌加温使溶解,调节 pH 值为 7.4,分装于试管内,经 115 °C 高压灭菌 20 min,直立制成高层备用。

A.11.3 试验方法

挑取纯培养的单个可疑菌落穿刺接种在明胶培养基内,于 30 °C ± 1 °C 培养 48 h ± 2 h,取出放冰箱 10 min ~ 30 min,如仍成溶解状时即为明胶液化试验阳性,如凝固不溶者为阴性。

A.12 硝酸盐培养基

A.12.1 成分

硝酸钾	0.2 g
蛋白胨	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.12.2 制法

取各成分溶解,调节 pH 值为 7.4,分装于试管内,每管约 5 mL,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.12.3 试验方法

挑取纯培养的单个可疑菌落接种在硝酸盐培养基中,于 30 °C ± 1 °C 培养 48 h ± 2 h,分别滴加甲液(将对氨基苯磺酸 0.8 g 溶解于 2.5 mol/L 乙酸溶液 100 mL 中)、乙液(将苯萘胺 0.5 g 溶解于 2.5 mol/L 乙酸溶液 100 mL 中)各 2~3 滴,立即观察结果。培养液变红为阳性,不变色为阴性。

A.13 1 mol/L 盐酸

A.13.1 成分

盐酸	90.0 mL
----	---------

蒸馏水	1 000 mL
-----	----------

A.13.2 制法

移取浓盐酸 90 mL,用蒸馏水稀释至 1 000 mL,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.14 1 mol/L 氢氧化钠

A.14.1 成分

氢氧化钠	40.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.14.2 制法

称取 40 g 氢氧化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.15 七叶苷培养基

A.15.1 成分

蛋白胨	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
七叶苷	3.0 g
枸橼酸铁	0.5 g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1.4 mL
蒸馏水	100 mL

A.15.2 制法

将上述成分加入蒸馏水中,加热溶解,121 ℃ 高压灭菌 15 min~20 min。
