

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2206.2—2009

化妆品微生物检验方法
第2部分：需氧芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌

Determination of microbiological in cosmetics—
Part 2: Aerobic spore-former bacteria and *Bacillus cereus*

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 2 部分。

本部分的附录 A 和附录 B 均为资料性附录。

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、中华人民共和国新疆出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：杨捷琳、顾鸣、韩伟、黄玲、许龙岩。

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2部分：需氧芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌

1 范围

SN/T 2206 的本部分规定了化妆品中尤其是水分含量较少的粉类化妆品中需氧芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌的检验方法。

本部分适用于化妆品中需氧芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌的检验。

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

SN/T 0176 出口食品中蜡样芽孢杆菌检验方法

3 材料和设备

- 3.1 三角瓶:250 mL。
- 3.2 玻璃珠。
- 3.3 L形玻璃棒。
- 3.4 刻度吸管:1 mL,10 mL。
- 3.5 均质器。
- 3.6 恒温培养箱:36℃±1℃,30℃±1℃,32℃±2.5℃。
- 3.7 高压灭菌器。
- 3.8 振荡器。

4 培养基和试剂

- 4.1 D/E 中和培养基(Dey/Engley 中和培养基),见附录 A 第 A.1 章。
- 4.2 甘露醇卵黄多粘菌素琼脂培养基(MYP),见附录 A 第 A.2 章。
- 4.3 葡萄糖蛋白胨琼脂(DT 培养基,加中和剂),见附录 A 第 A.3 章。
- 4.4 API 检测试纸条或其他等效产品

注:API 测试条是由法国梅里埃公司提供的产品的商品名,给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的唯一认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

5 检验程序

- 5.1 化妆品中需氧芽孢杆菌检验流程图见图 1。

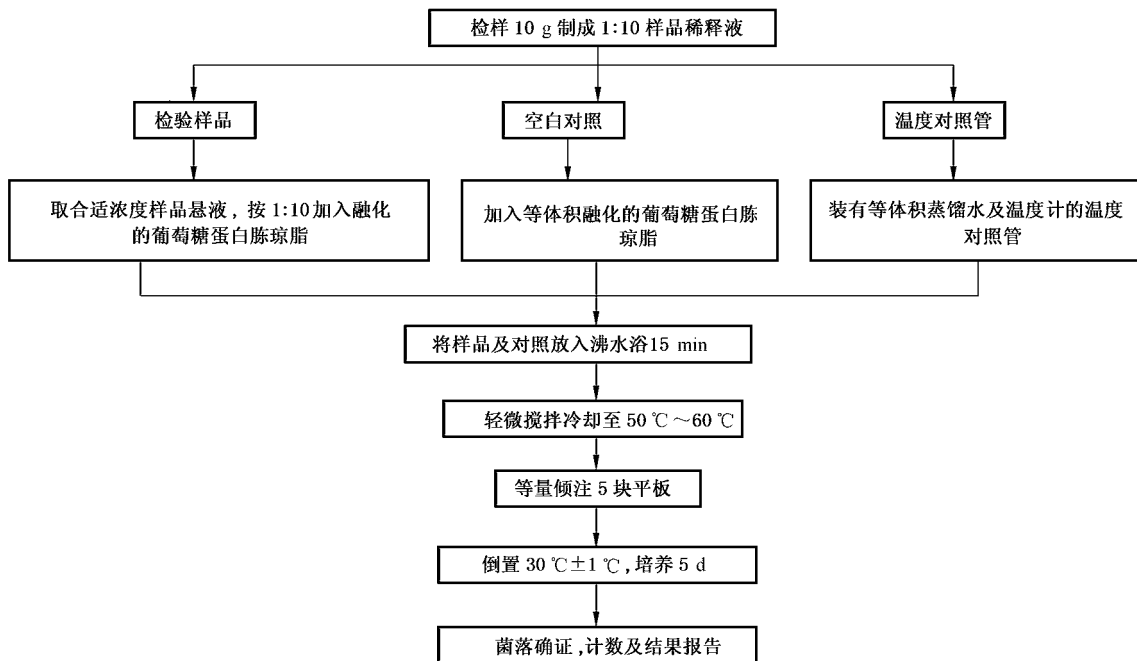


图 1 化妆品中需氧芽孢杆菌检验流程图

5.2 化妆品中蜡样芽孢杆菌检验流程图见图 2。

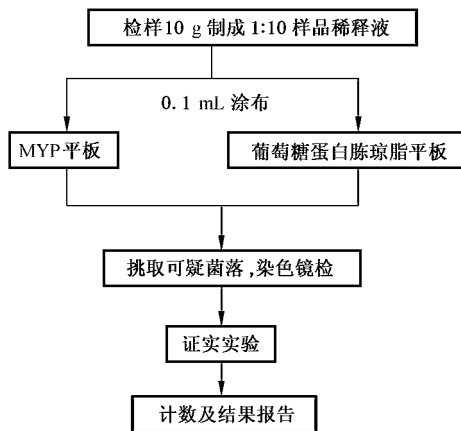


图 2 化妆品中蜡样芽孢杆菌检验流程图

5.3 样品制备

样品参照 GB/T 7918.1 供检样品的制备方法进行。样品制备时，也可参照附录 A 第 A.1 章的 D/E 中和培养基代替生理盐水或 SCDLP 培养基。参照附录 B 中列出的化妆品中常用防腐剂种类及微生物检验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。

5.4 取 1 : 10 稀释液 10.0 mL 加入到含有 90.0 mL 生理盐水的稀释瓶中，置 30℃ ± 1℃ 水浴中 15 min，经常振摇，取出后静置 15 min，取上清液 10.0 mL 制成 1 : 100 的稀释液，每个稀释度换用一支 10.0 mL 无菌吸管，按上述操作程序递增十倍稀释至合适浓度。

5.5 需氧芽孢菌计数

5.5.1 移取合适浓度样品悬液 10 mL，搅拌加入融化的葡萄糖蛋白胨琼脂 100 mL，混合均匀，沸水浴 15 min，轻微搅拌冷却至 50℃ ~ 60℃，再将混合物等量倾注 5 块平板，待凝固后表面覆盖一薄层 2% 灭菌琼脂（防止蔓延型菌落出现），待覆盖琼脂凝固后，倒置 30℃ ± 1℃，培养 5 d。

5.5.2 选取平板上 10 个以上菌落,进行革兰氏染色镜检,芽孢菌应为革兰氏阳性杆菌,有明显芽孢体存在,氧化酶、触酶实验,需氧芽孢菌多为阴性,进一步采用 API 等生化鉴定试剂条进行鉴定。

5.5.3 计数:计数五个平板上的菌落数,相加,乘以稀释倍数,即为每克(毫升)[g(mL)]化妆品中需氧芽孢总数。

5.6 蜡样芽孢杆菌计数

5.6.1 取各稀释液 0.1 mL 分别接种到 MYP 琼脂平板和葡萄糖蛋白胨琼脂平板,用无菌 L 形玻璃棒均匀涂布于整个琼脂表面,每个稀释度各接种两块平板。

5.6.2 平板置于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。

5.6.3 蜡样芽孢杆菌在 MYP 琼脂平板上生成的菌落为微粉红色,环绕产生卵磷脂酶沉淀环,如反应不典型,可继续培养 24 h 再计数。

5.7 革兰氏染色:挑取上述可疑菌落,染色镜检,蜡样芽孢杆菌为革兰氏阳性大杆菌,呈长链或短链,芽孢呈椭圆形位于菌体中央或偏端,不使菌体胀大。

5.8 镜检后,挑取可疑菌落分别接种营养琼脂斜面,于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,按照 SN/T 0176 进行证实实验。

5.9 计数及报告:选取具有 15 个~150 个已确证为蜡样芽孢杆菌菌落的平板进行计数,并计算同一稀释度两个平板的平均菌落数,结果报告。

6 中和剂验证

6.1 微生物菌株

采用蜡样芽孢杆菌(ATCC11778)或其他等同性菌株。

6.2 验证实验

6.2.1 接种物的制备,在测试前,用蜡样芽孢杆菌(ATCC11778)接种葡萄糖琼脂(DT)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。

6.2.2 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。

6.2.3 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。

6.2.4 划线分离于添加中和剂(DT+)和未添加中和剂(DT-)的平板, $32.5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 20 h~24 h。

6.3 验证结果的解释

如果 DT(+)平板上有标准菌株生长,在 DT(-)平板上不生长,中和剂的中和效果得以验证。当 DT(+)和 DT(-)上均有细菌生长,如果 DT(+)生长菌株为添加的标准菌株时,中和剂的中和效果得以验证。在 DT(+)和 DT(-)无细菌生长或仅 DT(-)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
pH7.3 \pm 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 °C 灭菌 15 min,使用时,调节 pH 值至 7.6 \pm 0.2。

A.2 甘露醇卵黄多粘菌素琼脂培养基(MYP)

A.2.1 成分

A 成分	
牛肉膏	1.0 g
蛋白胨	10.0 g
D-甘露醇	10.0 g
氯化钠	10.0 g
琼脂	15.0 g
酚红	0.025 g
蒸馏水	1 000 mL
pH7.2 \pm 0.1	
B 成分:50%卵黄液	50 mL
C 成分:多粘菌素 B	100 IU/mL

A.2.2 制法

将 A 成分中各组分依次称取加入,加热后使之完全溶解,校正 pH 至 pH7.2 \pm 0.1,加入酚红溶液,混匀后分装烧瓶,121 °C 灭菌 15 min,冷却至 50 °C 后每升加入 50 mL 50%卵黄液(B 成分)和 2.5 mL 多粘菌素 B(C 成分)。

A.3 葡萄糖蛋白胨琼脂(DT 培养基,加中和剂)

A.3.1 成分

酪蛋白胨	10 g
------	------

葡萄糖	5 g
2%溴甲酚紫乙醇溶液	2 mL
琼脂	15 g
卵磷脂	1 g
吐温-80	7 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 6.7 ± 0.2	

A.3.2 覆盖琼脂

琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.3 制法

将各组分依次称取加入,加热后使之完全溶解,121 °C灭菌 15 min,使用时,调节 pH 值至 6.7 ± 0.2 。

附 录 B

(资料性附录)

防腐剂对应使用中和剂清单

表 B.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;蛋白胍,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;蛋白胍,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:蛋白胍,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:蛋白胍,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。

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 2 部分：需氧芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌
SN/T 2206.2—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

*

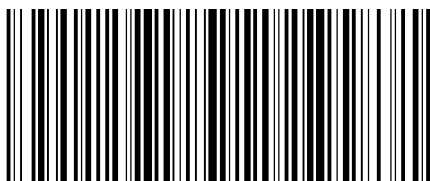
开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 12 千字

2009 年 5 月第一版 2009 年 5 月第一次印刷

印数 1—2 000

*

书号：155066·2-19647 定价 16.00 元



SN/T 2206.2—2009