

T/GDCA

广东省化妆品学会团体标准

T/GDCA XXXX—2024

化妆品中日勾维多细菌源菌的检验方法

Detection method of pluralibacter gergoviae in cosmetics

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

广东省化妆品学会 发布

目 次

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 试验材料 1

5 检验程序 3

6 操作步骤 3

7 注意事项 4

8 记录与计算 4

9 结果与判定 5

化妆品中日勾维多细菌源菌的检验方法

1 范围

本文件规定了化妆品中日勾维多细菌源菌的检验方法，包括试验方法、检验程序、操作步骤、注意事项、记录与计算、结果与判定。

本文件适用于化妆品及化妆品原料中日勾维多细菌源菌的定性检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 19489 实验室 生物安全通用要求
《中华人民共和国药典》（2020年版）
《化妆品安全技术规范》（2015年版）

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 试验材料

4.1 培养基和试剂

4.1.1 SCDLP 液体培养基

称取下列试剂：

酪蛋白胨	17 g；
大豆蛋白胨	3 g；
氯化钠	5 g；
磷酸氢二钾	2.5 g；
葡萄糖	2.5 g；
卵磷脂	1 g；
吐温80	7 g；
蒸馏水	1000 mL。

先将卵磷脂在少量蒸馏水中加温溶解后，再与其它成分混合，加热溶解，调pH为7.2~7.3，分装，每瓶90 mL，121 °C高压灭菌15 min。注意振荡，使沉淀于底部的吐温80充分混合。冷却至25 °C左右使用。

注：如无酪蛋白胨和大豆蛋白胨，也可用多肽代替。

4.1.2 双倍鼠李糖胆盐培养基

称取下列试剂：

蛋白胨	17 g；
大豆木瓜蛋白酶水解物	6 g；
猪胆盐	10 g；
鼠李糖	10 g；
磷酸氢二钾	5 g；
卵磷脂	2 g；
吐温80	14 g；
0.4%溴甲酚紫水溶液	5 mL；
蒸馏水	1000 mL。

先将卵磷脂、吐温80溶解到少量蒸馏水中。将蛋白胨、大豆木瓜蛋白酶水解物、胆盐、磷酸氢二钾及鼠李糖溶解到其余的蒸馏水中，加到一起混匀，调pH为 7.2 ± 0.2 ，加入0.4%溴甲酚紫水溶液，混匀，分装试管，每管10 mL，115 ℃高压灭菌20 min。使用前，用过滤除菌方法加入萘啶酸，使其终浓度为2.5 μg/mL。

4.1.3 卵磷脂吐温 80-七叶苷琼脂培养基

称取下列试剂：

蛋白胨	20 g；
牛肉膏	3 g；
氯化钠	5 g；
琼脂	15 g；
卵磷脂	1 g；
吐温80	7 g；
七叶苷	1 g；
柠檬酸铁	0.5 g；
蒸馏水	1000 mL。

在卵磷脂吐温80-营养琼脂培养基中添加七叶苷和柠檬酸铁（不含水），121 ℃高压灭菌15 min，备用。使用前，用过滤除菌方法加入终浓度为2.5 μg/mL的萘啶酸，混匀，倾注到平无菌平皿内。

- 4.1.4 革兰氏染色液。
- 4.1.5 山梨醇生化鉴定管。
- 4.1.6 氧化酶试验试剂。
- 4.1.7 血琼脂培养基。

4.2 实验仪器

- 4.2.1 恒温水浴箱：45 ℃ $\pm$ 1 ℃。
- 4.2.2 恒温培养箱：36 ℃ $\pm$ 1 ℃。
- 4.2.3 接种环。
- 4.2.4 天平。
- 4.2.5 三角瓶：150 mL。
- 4.2.6 试管。
- 4.2.7 培养皿。
- 4.2.8 显微镜。
- 4.2.9 高压蒸汽灭菌器。

- 4.2.10 生物安全柜。
- 4.2.11 质谱仪或其他相当设备。
- 4.3 标准菌株

标准菌株见表1。

表1 标准菌株表

序号	菌株名称	菌株编号
1	日勾维多细菌源菌	ATCC 33028 或等效菌株
2	大肠埃希菌	CMCC (B) 44102 或等效菌株

5 检验程序

日勾维多细菌源菌检验程序如图1所示。

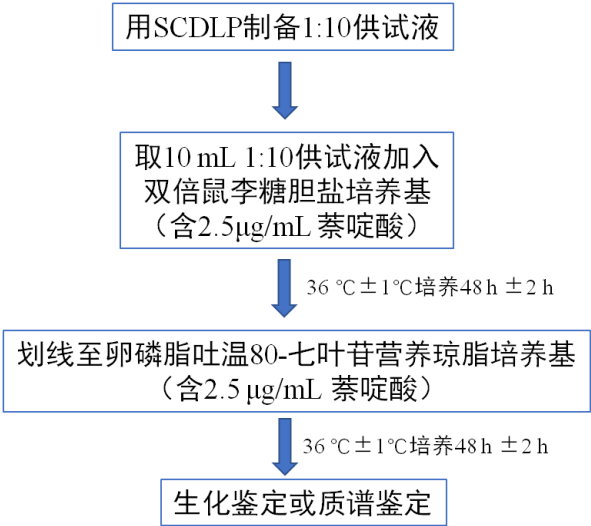


图1 日勾维多细菌源菌检验程序图

6 操作步骤

6.1 选择性增菌培养

以SCDLP液体培养基代替生理盐水，按照《化妆品安全技术规范》进行取样，并制备1:10供试液。取1：10供试液10 mL加到10 mL自制双倍鼠李糖胆盐培养基（含2.5 μg/mL萘啶酸）中，于36 °C±1 °C 培养48 h ±2 h 。日勾维多细菌源菌在双倍鼠李糖胆盐培养基中的典型反应为产酸（产气或不产气），培养液从紫褐色变为黄色。

实验过程应使用无菌器具、设备进行无菌操作。

6.2 分离鉴定培养

用接种环取双倍鼠李糖胆盐培养基增菌液一环，划线接种至卵磷脂吐温80-七叶苷培养基平板（含2.5 μg/mL萘啶酸），于36℃±1℃培养48 h ±2 h，观察平板上菌落的生长情况。日勾维多细菌源菌

典型菌落在卵磷脂吐温80-七叶苷琼脂培养板上为灰色至深灰色，表面光滑，菌落周围培养基为棕色至深褐色。

6.3 阳性对照（样品适用性验证）

取ATCC 33028或等效菌株接种于胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA），于 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养18 h~24 h。挑取平板上的菌落制成菌悬液，用生理盐水制成 $10^2\sim 10^3$ CFU/mL的菌悬液，备用。

取6.1中已加入样品的双倍鼠李糖胆盐混合液10 mL，加入0.1 mL $10^2\sim 10^3$ CFU/mL的ATCC 33028，于 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养18 h~24 h，观察双倍鼠李糖胆盐培养基产酸情况。若产酸，进一步划线接种至卵磷脂吐温80-七叶苷琼脂平板（含 $2.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 萘啶酸）上，于 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养48 h ± 2 h，观察平板上菌落及菌落周围培养基的颜色变化，阳性菌的菌落呈灰色至深灰色，同时菌落周围的培养基为棕色至深褐色。若双倍鼠李糖胆盐培养基不产酸或卵磷脂吐温80-七叶苷琼脂培养板上的菌落颜色存在差异，表明试验结果无效，需重新取样进行中和剂的筛选实验后，再次进行检验。

6.4 阴性对照

取大肠埃希氏菌CMCC 44102按照6.1 和6.2 的步骤进行阴性对照实验，实验结果应不得检出大肠埃希菌。如已有培养基适用性实验则不需要进行该步骤。

6.5 鉴定

6.5.1 革兰氏染色

挑取可疑菌落涂片，进行革兰氏染色。显微镜下观察，日勾维多细菌源菌为革兰氏阴性菌，无芽孢，杆菌。

6.5.2 山梨醇生化鉴定管

吸取0.05 mL~0.08 mL (约1~2滴)的肉汤培养物或菌悬液加入西林瓶内，于 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养48 h ± 2 h，培养基变黄为阳性，阴性则不变色。日勾维多细菌源菌为阴性反应。

6.5.3 氧化酶试验

用玻璃棒或一次性接种针挑取单个菌落，涂布在氧化酶试剂湿润的滤纸条上。日勾维多细菌源菌为氧化酶阳性（蓝色或蓝紫色），反应时间1 min~5 min。

6.5.4 血琼脂培养基

取待检菌24 h ± 2 h肉汤培养物，划线至血琼脂平板上，于 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养48 h ± 2 h，日勾维多细菌源菌不发生溶血现象，也不产色素。

6.5.5 替代试验

可选择质谱仪、全自动或半自动微生物生化鉴定系统或基因组测序，对可疑菌落进行鉴定。

7 注意事项

检验过程中产生的废弃物按照 GB 19489的要求进行处理。

8 记录与计算

根据鉴定结果，记录为日勾维多细菌源菌阴性或者阳性结果。

9 结果与判定

凡在上述选择性和鉴定平板上有特征性反应的可疑菌落，经染色镜检，证明为革兰氏阴性，无芽孢，杆菌，并不能代谢山梨醇，氧化酶阳性，在血平板上无溶血现象，且不产色素，可认为检出日勾维多细菌源菌；或经替代试验鉴定为日勾维多细菌源菌，则结果报告为 1g 或 1mL 样品中检出日勾维多细菌源菌。如果可疑菌落经上述鉴定方法不是日勾维多细菌源菌，则结果报告为 1g 或 1mL 样品中未检出日勾维多细菌源菌。
