

化妆品微生物检验系列干燥培养基的研制和质量控制

梁 君 谋

(北京市卫生防疫站)

摘要 为贯彻执行国家对化妆品的卫生监督管理,作者按国标检验方法研制成功适用于化妆品细菌总数和特定菌检验的系列干燥培养基。通过标准实验菌株灵敏度测定并与常规培养基对比,表明该培养基质量符合质控技术指标要求,性能稳定,简便易行,提高工效,有实用推广价值。

关键词 干燥培养基

随着预防医学和临床医学事业的发展,在防病治病工作中进行卫生防疫和临床检验时,无论是对疾病的流行因素调查、病因的确定,或是对食品、医药品和化妆品的卫生监督与评价,都需以微生物学检验提供科学依据。为了保证数据的准确性,检验的操作程序和培养基的统一是做好临床、卫生检验的重要关键。鉴于培养基质量的优劣对微生物的生理活性和代谢能力有很大影响,直接关系到检菌效果的准确^[1]。因此,保证培养基质量、统一培养基的基准、做到干燥化和商品化,是当前迫切需要解决的课

题^[2]。希望通过本文的介绍,能在进行卫生监督管理严格要求的同时,对相应环节的卫生监测手段也提出更高要求的今天,对培养基的干燥化、规格化、标准化和商品化更引起重视。现将化妆品微生物检验系列干燥培养基的研制和质量控制介绍如下。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

大肠杆菌 44102(简称大肠),宋内氏志贺氏菌 51334(简称宋内),福氏志贺氏菌 51572

(简称福氏),鼠伤寒沙门氏菌 50115(简称鼠伤寒),金黄色葡萄球菌 26003(简称金葡),甲型溶血性链球菌 32209(简称甲链),乙型溶血性链球菌 32172(简称乙链),绿脓杆菌 10104(简称绿脓)。以上菌种均由中国药品生物制品检定所供应。

(二) 培养基

SCDLP 液体培养基(Soybean Casein deject lecithin polysorbate 80),卵磷脂吐温 80 营养琼脂培养基,乳糖胆盐培养基,伊红美蓝琼脂培养基,蛋白胨水培养基,十六烷三甲基溴化铵培养基,乙酰胺琼脂培养基,绿脓菌色素测定用培养基,硝酸盐蛋白胨水培养基,普通营养琼脂培养基,Baird-parker 琼脂培养基,甘露醇发酵培养基。以上 12 种培养基均按《化妆品微生物标准检验方法》^[3]的配方组成分别制成干燥培养基,并与常规方法制备的培养基进行比较。

(三) 试验方法

1. 干燥培养基理化质控指标的测定:将 12 种干燥培养基分别按使用方法要求加水溶解,观察溶解状态、透明度、pH 值、色泽和凝固力等。

2. 干燥培养基的微生物学检定:取第三代菌种新鲜培养物进行试验。

(1) 阳性菌株质控试验:

① 菌落生长率:将定量已知阳性质控菌株活菌量控制在 100 个范围内,经 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 18—24 小时培养,观察待检培养基中菌落生长情况(固体培养基采用此法进行质控)。

预备试验:取大肠、宋内、福氏、鼠伤寒、金葡和绿脓等 6 株实验菌的 16—18 小时肉汤培养物,分别制成相当标准比浊管浓度 10 亿/ml 的菌悬液,10 倍递增稀释至 10^{-7} ,取 10^{-6} 和 10^{-7} 两个稀释度各 0.1ml,涂布于普通营养琼脂平板上,经 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 18—24 小时培养,观察菌落形态、数目和直径大小。从而确定 10^{-6} 为正式试验时的菌液稀释度。

正式试验:将以上 6 株实验菌分别稀释至 10^{-6} ,并各取出 0.1ml 涂布于普通营养琼脂平板上,经 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 18—24 小时培养,观察并记

录实验菌在平板上的菌落形态、数目和直径大小。

② 敏感性试验:将定量已知阳性质控菌株活菌量控制在 50—100 个范围内,经 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 18—24 小时培养,观察待检培养基中细菌生长情况(液体培养基采用此法进行质控)。

取以上 6 株实验菌分别接种于 SCDLP 液体培养基中,活菌量控制在 50—100 个范围内,经 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 18—24 小时,观察 6 株实验菌在液体培养基中的生长情况。然后,按 10 倍递增稀释法稀释至 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} ,分别取 0.1ml,用普通营养琼脂作倾注培养,观察各株实验菌在平板上菌落生长情况。并记录菌落形态和直径大小。

(2) 阳性质控菌株与阴性质控菌株对照试验:用已知阳性和阴性的质控菌株分别接种于相应的培养基中,经 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 18—24 小时培养,进行质控。将乳糖胆盐胨水、蛋白胨水、硝酸盐胨水、甘露醇发酵、十六烷三甲基溴化铵、乙酰胺、Baird-parker 和绿脓菌色素等 8 种干燥培养基分别按使用方法要求加水溶解,经 115°C 20 分高压灭菌后,接种相应的阳性和阴性质控菌株,经 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 18—24 小时培养后,观察实验菌在相应培养基中的菌落特征和生物学性状。

(3) 实用效果考核:本试验选取膏霜类和护发类化妆品,按《化妆品微生物标准检验方法》^[3]中规定的不同类型样品的检样制备方法制成稀释液,分别加入大肠、金葡和绿脓 3 株实验菌,然后将其接种在 12 种干燥培养基中,进行培养基的灵敏度观察。

结果和讨论

(一) 干燥培养基微生物检定结果

1. 在普通营养琼脂平板上,接种大肠、宋内、福氏、鼠伤寒、金葡和绿脓等 6 株实验菌,经 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 18—24 小时培养后,菌落生长率在 80% 以上,菌落典型,直径 2mm。与常规方法制备的培养基进行 10 次比较试验,其结果经统计学处理($P > 0.05$)无显著性差异。接种金

菌与绿脓杆菌的平板上有明显的色素产生,前者菌落呈金黄色,后者菌落呈绿色,全部符合质控指标要求。

2. 在 SCDLP 增菌液中接种大肠、宋内、福氏、鼠伤寒、金葡和绿脓等 6 株实验菌,经 36 ± 1℃ 18—24 小时培养后,生长良好,绿脓菌在培养基中形成菌膜,液面呈现出绿色。经稀释后用普通营养琼脂作平板倾注培养,菌落典型,直径 2mm。通过敏感性试验证明,在 SCDLP 培养基中,含有 50—100 个活菌时,经 18—24 小时培养,均能得出满意的结果。证明此培养

基灵敏度较高,增菌效果良好。

3. 在进行乳糖胆盐胨水、蛋白胨水、硝酸盐胨水、甘露醇发酵、十六烷三甲基溴化铵、乙酰胺、Baird-parker 和绿脓菌色素质控时,采用质控阳性菌株与质控阴性菌株相结合的对照试验,实验结果全部符合质控指标要求(表 1)。另外,在进行伊红美蓝质控时,以大肠杆菌在该培养基中发酵乳糖使伊红美蓝结合,菌落呈深紫黑色,有金属光泽的特征,与呈无色透明或半透明的致病菌菌落相区别。在此培养基上接种大肠、福氏和鼠伤寒 3 株实验菌,经 36 ± 1℃ 18—

表 1 化妆品微生物检验系列干燥培养基部分质控标准

培养基	质控阳性菌	实验结果	质控阴性菌	实验结果
乳糖胆盐胨水	大肠	产酸产气,变黄	鼠伤寒、福氏	不变色
蛋白胨水	大肠	加试剂变红	鼠伤寒、宋内	加试剂,不变红
硝酸盐胨水	绿脓	产气	金葡	不产气
甘露醇发酵	金葡	产酸不产气,变黄	绿脓	不产气,不变黄
十六烷三甲基溴化铵琼脂	绿脓	菌落扁平,灰白色,湿润有色素扩散	大肠、宋内、鼠伤寒、金葡	不生长
乙酰胺琼脂	绿脓	菌落扁平,周围培养基略带粉红色	大肠、宋内、鼠伤寒、金葡	不生长
Baird-parker 琼脂	金葡	菌落圆形光滑、湿润灰色至黑色,菌落周围色淡,呈混浊状,在其外层有一透明带	大肠、宋内、鼠伤寒、绿脓	不生长
绿脓菌色素测定	绿脓	上层呈现红色	金葡	上层无色

表 2 伊红美蓝琼脂干燥培养基质控标准

大肠杆菌	福氏光贺氏菌,鼠伤寒沙门氏菌
黑紫色菌落有金属光泽	无色透明,半透明菌落

24 小时培养,结果比较理想(表 2)。

4. 在普通营养琼脂中按 5% 加入羊血制成血平板,接种金葡、绿脓、甲链和乙链四株实验菌进行溶血试验。其结果全部符合质控指标规定(表 3)。

表 3 血琼脂平板质控标准溶血试验

金葡(26003)	绿脓 10104	甲链(32209)	乙链(52172)
菌落周围有明显的透明溶血环	菌落之间互相融合,呈绿色草绿色溶血(甲型溶血)属光泽	菌落周围有透明溶血环(乙型溶血)	菌落周围有透明溶血环

5. 在实用效果考核中,选用抗皱增白奶、增白香粉蜜、滋养霜和美发香波四种类型的化妆品,以大肠、金葡和绿脓作为指示菌,按《化妆品微生物标准方法》进行细菌总数和三种指示菌

表 4 十二种干燥培养基在四种类型化妆品中实用效果考核

培养基	实验菌株	结果
SCDLP	大肠、金葡、绿脓	阳性
卵磷脂吐温琼脂	大肠、金葡、绿脓	阳性
乳糖胆盐胨水	大肠	阳性
伊红美蓝琼脂	大肠	阳性
蛋白胨水	大肠	阳性
十六烷三甲基溴化铵琼脂	绿脓	阳性
乙酰胺琼脂	绿脓	阳性
硝酸盐胨水	绿脓	阳性
绿脓菌色素测定	绿脓	阳性
Baird-parker 琼脂	金葡	阳性
甘露醇发酵	金葡	阳性
普通营养琼脂	大肠、金葡、绿脓	阳性

的监测检验。实验证明,在 12 种干燥培养基中,接种相应的指示菌均能得出阳性检出结果(表 4)。

(二) 干燥培养基的各项理化质控指标

1. 外观:干燥培养基为疏松颗粒状或粉末

状。

2. 透明度: 溶化后清彻透明, 无沉淀。

3. pH: 7.2 ± 0.2

4. 熔化温度: 70°C 左右。

5. 凝固温度(含琼脂): 40°C 左右。

(三) 干燥培养基的生产工艺流程

原材料选择→脱水→粉碎→调节比例→二次脱水→质控检验→成品→包装。

参 考 文 献

- [1] Madden, J.M.: 化妆品的微生物学检验方法, 轻工业出版社, 北京, p.340—350, 1986。
- [2] Marvin, L. Speck 主编: 食品微生物学检验方法提要, 人民卫生出版社, 北京, p. 21—22, 1982。
- [3] 周淑玉等: 化妆品微生物标准检验方法, 中国标准出版社, 北京, p.1—2, 1987。
- [4] 宣卿华: 细菌检验用培养基手册, 人民卫生出版社, 北