附件 13

牙膏中耐热大肠菌群检验方法

Detection of Thermotolerant Coliform Bacteria in Toothpaste

1 范围

 本规范规定了牙膏中耐热大肠菌群的检验方法。

 本规范适用于牙膏中耐热大肠菌群的检验。

2 定义

2.1 耐热大肠菌群 Thermotolerant coliform bacteria

系一群需氧及兼性厌氧革兰氏阴性无芽胞杆菌，在44.5℃培养24 h～48 h能发酵乳糖产酸并产气。

该菌主要来自人和温血动物粪便，可作为粪便污染指标来评价牙膏的卫生质量, 推断牙膏中有否污染肠道致病菌的可能。

3 仪器

3.1 恒温水浴箱或隔水式恒温箱：44.5℃±0.5℃。

3.2 温度计。

3.3 显微镜。

3.4 载玻片。

3.5 接种环。

3.6 电磁炉。

3.7 三角瓶：250 mL。

3.8 试管：18 mm×150 mm。

3.9 小倒管。

3.10 pH计或pH试纸。

3.11 高压灭菌器。

3.12 无菌吸管：1 mL（具0.01 mL刻度）、10 mL（具0.1 mL刻度）或者移液器及吸头。

3.13 灭菌平皿：直径90 mm。

4 培养基和试剂

4.1 SCDLP液体培养基

见总则3.1。

4.2 双倍乳糖胆盐（含中和剂）培养基

 成分：蛋白胨 40 g

 猪胆盐 10 g

 乳糖 10 g

 0.4%溴甲酚紫水溶液 5 mL

 卵磷脂 2 g

 吐温80 14 g

 蒸馏水 1000 mL

 制法：将卵磷脂、吐温80溶解到少量蒸馏水中。将蛋白胨、胆盐及乳糖溶解到其余的蒸馏水中，加到一起混匀，调pH为7.4，加入0.4%溴甲酚紫水溶液，混匀，分装试管，每管10 mL（每支试管中加一个小倒管）。115℃高压灭菌20 min。

4.3 伊红美蓝（EMB）琼脂

 成分：蛋白胨 10 g

 乳糖 10 g

 磷酸氢二钾 2 g

 琼脂 20 g

 2%伊红水溶液 20 mL

 0.5%美蓝水溶液 13 mL

 蒸馏水 1000 mL

 制法：先将琼脂加到900 mL蒸馏水中，加热溶解，然后加入磷酸氢二钾和蛋白胨，混匀，使之溶解。再以蒸馏水补足至1000 mL。调pH值为7.2~7.4，分装于三角瓶内，121℃高压灭菌15 min备用。使用前将琼脂融化，于每100 mL琼脂中无菌操作加入5 mL灭菌的20%乳糖溶液、2 mL 2%伊红水溶液和1.3 mL 0.5%美蓝水溶液，摇匀，冷至45℃~50℃，倾注平皿备用。

4.4 蛋白胨水（靛基质试验用）

 成分：蛋白胨（或胰蛋白胨） 20 g

 氯化钠 5 g

 蒸馏水 1000 mL

 制法：将上述成分加热融化，调pH值为7.0~7.2，分装小试管， 121℃高压灭菌15 min。

4.5 靛基质试剂

 柯凡克试剂：将5 g对二甲氨基苯甲醛溶解于75 mL戊醇中，然后缓慢加入浓盐酸25 mL。

 试验方法：接种细菌于蛋白胨水中，于44.5℃±0.5℃培养24 h±2 h。沿管壁加柯凡克试剂0.3 mL~0.5 mL，轻摇试管。阳性者于试剂层显深玫瑰红色。

 注：蛋白胨应含有丰富的色氨酸，每批蛋白胨买来后，应先用已知菌种鉴定后方可使用。

4.6 革兰氏染色液：

4.6.1 染液制备

4.6.1.1 结晶紫染色液：

 结晶紫 1 g

 95%乙醇 20 mL

 1%草酸铵水溶液 80 mL

将结晶紫溶于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

4.6.1.2 革兰氏碘液：

 碘 1 g

 碘化钾 2 g

 蒸馏水加至 300 mL

 将碘与碘化钾先进行混合，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。

4.6.1.3 脱色液：95%乙醇。

4.6.1.4 复染液：

 （1）沙黄复染液：

 沙黄 0.25 g

 95%乙醇 10 mL

 蒸馏水 90 mL

 将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

 （2）稀石碳酸复红液：称取碱性复红10 g，研细，加95%乙醇100 mL，放置过夜，滤纸过滤。取该液10 mL，加5%石碳酸水溶液90 mL混合，即为石碳酸复红液。再取此液 10 mL加水90 mL，即为稀石碳酸复红液。

4.6.2 染色法

4.6.2.1 将涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染1 min，水洗。

4.6.2.2 滴加革兰氏碘液，作用1 min，水洗。

4.6.2.3 滴加95%乙醇脱色，约30 s，或将乙醇滴满整个涂片，立即倾去，再用乙醇滴满整个涂片，脱色10 s，水洗。

4.6.2.4 滴加复染液，复染1 min，水洗，待干，镜检。

4.6.3 染色结果

 革兰氏阳性菌呈紫色，革兰氏阴性菌呈红色。

注：如用1:10稀释石碳酸复红染色液作复染，复染时间仅需10 s。

5 操作步骤

5.1 取10 mL 1:10的检液，加到10 mL双倍乳糖胆盐（含中和剂）培养基中，置44.5℃±0.5℃培养箱中培养24 h±2 h，如既不产酸也不产气，继续培养至48 h±2 h，如仍既不产酸也不产气，则报告为耐热大肠菌群阴性。

5.2 如产酸产气，划线接种到伊红美蓝琼脂平板上，置36℃±1℃培养18 h~24 h。同时取该培养液1~2滴接种到蛋白胨水中，置44.5℃±0.5℃培养24 h±2 h。

 经培养后，在上述平板上观察有无典型菌落生长。耐热大肠菌群在伊红美蓝琼脂培养基上的典型菌落呈深紫黑色，圆形，边缘整齐，表面光滑湿润，常具有金属光泽。也有的呈紫黑色，不带或略带金属光泽；或粉紫色、中心较深的菌落，亦常为耐热大肠菌群，应注意挑选。

5.3 挑取上述可疑菌落，涂片作革兰氏染色镜检。

5.4 在蛋白胨水培养液中，加入靛基质试剂约0.5 mL，观察靛基质反应。阳性反应液面呈玫瑰红色；阴性反应液面呈试剂本色。

5.5 如选择生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统，可从营养琼脂平板上挑取经纯化的可疑菌落，用无菌稀释液制备成浊度适当的菌悬液，使用生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统进行鉴定。

6 检验结果报告

经上述检验步骤，若发酵乳糖产酸产气，平板上有典型菌落，并经证实为革兰氏阴性无芽胞短杆菌，靛基质试验阳性，则可报告被检样品中检出耐热大肠菌群。