附件 14

牙膏中铜绿假单胞菌检验方法

Detection of Pseudomonas Aeruginosa in Toothpaste

1 范围

本规范规定了牙膏中铜绿假单胞菌的检验方法。

本规范适用于牙膏中铜绿假单胞菌的检验。

2 定义

铜绿假单胞菌*Pseudomonas aeruginosa*

属于假单胞菌属，为革兰氏阴性杆菌，氧化酶阳性，大部分能产生绿脓菌素。

3 仪器

3.1 恒温培养箱：36℃±1℃、42℃±1℃。

3.2 三角瓶：250 mL。

3.3 试管：18 mm×150 mm。

3.4 灭菌平皿：直径90 mm。

3.5 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。

3.6 显微镜。

3.7 载玻片。

3.8 接种针、接种环。

3.9 电磁炉。

3.10 高压灭菌器。

3.11 恒温水浴箱。

4 培养基和试剂

4.1 SCDLP液体培养基

见总则3.1。

4.2 十六烷基三甲基溴化铵培养基

 成分：牛肉膏 3 g

 蛋白胨 10 g

 氯化钠 5 g

 十六烷基三甲基溴化铵 0.3 g

 琼脂 20 g

 蒸馏水 1000 mL

制法：除琼脂外，将上述成分混合加热溶解，调pH为7.4~7.6，加入琼脂，115℃高压灭菌20 min后，制成平板备用。

4.3 乙酰胺培养基

 成分：乙酰胺 10.0 g

 氯化钠 5.0 g

 无水磷酸氢二钾 1.39 g

 无水磷酸二氢钾 0.73 g

 硫酸镁（MgSO4.7H2O） 0.5 g

 酚红 0.012 g

 琼脂 20 g

 蒸馏水 1000 mL

制法：除琼脂和酚红外，将其他成分加到蒸馏水中，加热溶解，调pH为7.2，加入琼脂、酚红，121℃高压灭菌20 min后，制成平板备用。

4.4 绿脓菌素测定用培养基

 成分：蛋白胨 20 g

 氯化镁 1.4 g

 硫酸钾 10 g

 琼脂 18 g

 甘油（化学纯） 10 g

 蒸馏水 1000 mL

制法：将蛋白胨、氯化镁和硫酸钾加到蒸馏水中，加热使其溶解，调pH至7.4，加入琼脂和甘油，加热溶解，分装于试管内， 115℃高压灭菌20 min后，制成斜面备用。

4.5 明胶培养基

 成分：牛肉膏 3 g

 蛋白胨 5 g

 明胶 120 g

 蒸馏水 1000 mL

制法：取各成分加到蒸馏水中浸泡20 min，随时搅拌加热使之溶解，调pH至7.4，分装于试管内，经115℃高压灭菌20 min后，直立制成高层备用。

4.6 硝酸盐蛋白胨水培养基

 成分：蛋白胨 10 g

 酵母浸膏 3 g

 硝酸钾 2 g

 亚硝酸钠 0.5 g

 蒸馏水 1000 mL

制法：将蛋白胨和酵母浸膏加到蒸馏水中，加热使之溶解，调pH为7.2，煮沸过滤后补足液量，加入硝酸钾和亚硝酸钠，溶解混匀，分装到加有小倒管的试管中，115℃高压灭菌20 min后备用。

4.7 普通琼脂斜面培养基

 成分：蛋白胨 10 g

 牛肉膏 3 g

 氯化钠 5 g

 琼脂 15 g

 蒸馏水 1000 mL

制法：除琼脂外，将其余成分溶解于蒸馏水中，调pH为7.2~7.4，加入琼脂，加热溶解，分装试管，121℃高压灭菌20 min后，制成斜面备用。

5 操作步骤

5.1 增菌培养：取1:10检液10 mL加到90 mL SCDLP液体培养基中，置36℃±1℃培养18 h~24 h。如有铜绿假单胞菌生长，培养液表面多有一层薄菌膜，培养液常呈黄绿色或蓝绿色。

5.2 分离培养：将增菌后的培养物，划线接种在十六烷三甲基溴化铵琼脂平板上，置36℃±1℃培养18 h~24 h。凡铜绿假单胞菌在此培养基上，其菌落扁平无定型，向周边扩散或略有蔓延，表面湿润，菌落呈灰白色，菌落周围培养基常扩散有水溶性色素。

在缺乏十六烷三甲基溴化铵琼脂时也可用乙酰胺培养基进行分离，将增菌后的培养物划线接种于平板上，置36℃±1℃培养24 h±2 h，铜绿假单胞菌在此培养基上生长良好，菌落扁平，边缘不整，菌落周围培养基呈红色，其他菌不生长。

5.3 纯化：挑取可疑菌落划线接种于营养琼脂平板上纯化，于36℃±1℃培养18 h~24 h。

5.4 染色镜检：挑取可疑的菌落，涂片，革兰氏染色（见牙膏中耐热大肠菌群检验方法4.6.2），镜检为革兰氏阴性者应进行氧化酶试验。

5.5 氧化酶试验：取一小块洁净的白色滤纸片置于灭菌平皿内，用无菌玻璃棒挑取铜绿假单胞菌可疑菌落涂在滤纸片上，然后在其上滴加一滴新配制的1%二盐酸二甲基对苯二胺试液，在15 s~30 s之内，出现粉红色或紫红色时，为氧化酶试验阳性；若培养物不变色，为氧化酶试验阴性。

5.6 绿脓菌素试验：取可疑菌落2个~3个，分别接种在绿脓菌素测定用培养基上，置36℃±1℃培养24 h±2 h，加入三氯甲烷3 mL~5 mL，充分振荡使培养物中的绿脓菌素溶解于三氯甲烷液内，待三氯甲烷提取液呈蓝色时，用吸管将三氯甲烷移到另一试管中并加入1 mol/L的盐酸1 mL左右，振荡后，静置片刻。如上层盐酸液内出现粉红色到紫红色时为阳性，表示被检物中有绿脓菌素存在。

5.7 硝酸盐还原产气试验：挑取可疑的铜绿假单胞菌纯培养物，接种在硝酸盐胨水培养基中，置36℃±1℃培养24 h±2 h，观察结果。凡在硝酸盐胨水培养基内的小倒管中有气体者，即为阳性，表明该菌能还原硝酸盐，并将亚硝酸盐分解产生氮气。

5.8 明胶液化试验：挑取可疑的铜绿假单胞菌纯培养物，穿刺接种在明胶培养基内，置36℃±1℃培养24 h±2 h，取出放置于4℃±2℃冰箱10 min~30 min，如仍呈溶液状或表面液化时即为明胶液化试验阳性；如凝固不溶者为阴性。

5.9 42℃生长试验：挑取可疑的铜绿假单胞菌纯培养物，接种在普通琼脂斜面培养基上，置于42℃±1℃培养箱中，培养24 h~48 h，铜绿假单胞菌能生长，为阳性，而近似的荧光假单胞菌则不能生长。

5.10 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

被检样品经增菌分离培养后，平板上有可疑菌落，并经证实为革兰氏阴性杆菌、氧化酶及绿脓菌素试验皆为阳性，即可报告被检样品中检出铜绿假单胞菌；如绿脓菌素试验阴性而明胶液化、硝酸盐还原产气和42℃生长试验三者皆为阳性时，仍可报告被检样品中检出铜绿假单胞菌。