附件 12

牙膏中菌落总数检验方法

Aerobic Plate Count in Toothpaste

1 范围

 本规范规定了牙膏中菌落总数的检验方法。

本规范适用于牙膏中菌落总数的测定。

2 定义

2.1 菌落总数 Aerobic plate count

牙膏检样经过处理，在一定条件下（如培养基、培养温度、培养时间、pH值、需氧性质等）培养后，1 g检样中形成的微生物菌落总数。所得结果包括本方法规定的条件下生长的嗜中温需氧菌和兼性厌氧菌的菌落总数。

 测定菌落总数便于判明样品被细菌污染的程度，是对样品进行卫生学总评价的综合依据。

3 仪器和设备

3.1 三角瓶：250 mL。

3.2 量筒：200 mL。

3.3 pH计或精密pH试纸。

3.4 高压灭菌器。

3.5 试管：18 mm×150 mm。

3.6 灭菌平皿：直径90 mm。

3.7 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。

3.8 酒精灯。

3.9 恒温培养箱：36℃±1℃。

3.10 放大镜。

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 卵磷脂、吐温80—营养琼脂培养基

成分：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

 蒸馏水 1000 mL

制法：先将卵磷脂加到少量蒸馏水中，加热溶解，加入吐温80，将其他成分（除琼脂外）加到其余的蒸馏水中，溶解。加入已溶解的卵磷脂、吐温80，混匀，调pH值为7.1~7.4，加入琼脂，121℃高压灭菌20 min，储存于冷暗处备用。

4.3 0.5%氯化三苯四氮唑（2,3,5-triphenyl terazolium chloride，TTC）

 成分：TTC 0.5 g

 蒸馏水 100 mL

 制法：溶解后过滤除菌，或115℃高压灭菌20 min，装于棕色试剂瓶，置4℃冰箱备用。

5 操作步骤

5.1 用灭菌吸管吸取1:10的检液2 mL，分别注入到两个灭菌平皿内，每皿1 mL。另取1 mL注入到9 mL SCDLP液体培养基（或经过验证等效或优于SCDLP的稀释液）试管中（注意勿使吸管接触液面），并充分混匀，制成1:100检液，更换一支吸管，吸取2 mL，分别注入到两个灭菌平皿内，每皿1 mL。样品至少需进行1:10和1:100稀释，如样品含菌量高，还可再稀释成1:1000，1:10000，……等，每个稀释度应换1支吸管。

5.2 将融化并冷至45℃~50℃的卵磷脂吐温80营养琼脂培养基倾注到平皿内，每皿约15 mL，随即转动平皿，使检液与培养基充分混合均匀，待琼脂凝固后，翻转平皿，置36℃±1℃培养箱内培养48 h±2 h。同时吸取1 mL空白稀释液加入灭菌空平皿中，加入约15 mL卵磷脂吐温80营养琼脂培养基，待琼脂凝固后，翻转平皿，置36℃±1℃培养箱内培养48 h±2 h，为空白对照。

5.3 为便于区别牙膏中的颗粒与菌落，可在每100 mL卵磷脂吐温80营养琼脂中加入1 mL 0.5%的TTC溶液，如有细菌存在，培养后菌落呈红色，而牙膏的颗粒颜色无变化。

6 菌落计数方法

先用肉眼观察，点数菌落数，然后再用5倍~10倍的放大镜检查，以防遗漏。记下各平皿的菌落数后，求出同一稀释度各平皿生长的平均菌落数。若平皿中有连成片状的菌落或花点样菌落蔓延生长时，该平皿不宜计数。若片状菌落不到平皿中的一半，而其余一半中菌落数分布又很均匀，则可将此半个平皿菌落计数后乘以2，以代表全皿菌落数。

7 菌落计数及报告方法

7.1 首先选取平均菌落数在30~300之间的平皿，作为菌落总数测定的范围。当只有一个稀释度的平均菌落数符合此范围时，即以该平皿菌落数乘其稀释倍数报告之（见表1中例1）。

7.2 若有两个稀释度，其平均菌落数均在30~300之间， 则应求出两菌落总数之比值来决定，若其比值小于或等于2，应报告其平均数，若大于2则以其中稀释度较低的平皿的菌落数报告之（见表1中例2及例3）。

7.3 若所有稀释度的平均菌落数均大于300，则应按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数报告之（见表1中例4）。

7.4 若所有稀释度的平均菌落数均小于30，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数报告之（见表1例5）。

7.5 若所有稀释度的平均菌落数均不在30~300之间，其中一个稀释度大于300，而相邻的另一稀释度小于30时，则以接近30或300的平均菌落数乘以稀释倍数报告之（见表1中例6）。

7.6 若所有的稀释度均无菌生长，报告数为每g小于10 CFU。

7.7 菌落计数的报告，菌落数在10以内时，按实有数值报告之，大于100时，采用二位有效数字，在二位有效数字后面的数值，应以四舍五入法计算。为了缩短数字后面零的个数，可用10的指数来表示（见表1报告方式栏）。在报告菌落数为“不可计”时，应注明样品的稀释度。

表1 细菌计数结果及报告方式

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 例次 | 不同稀释度平均菌落数10-1 10-2  10-3 | 两稀释度菌数之比 | 菌落总数（CFU/g） | 报告方式（CFU/g） |
| 1 | 1365 164 20 | ─ | 16400 | 16000或1.6×104 |
| 2 | 2760 295 46 | 1.6 | 38000 | 38000或3.8×104 |
| 3 | 2890 271 60 | 2.2 | 27100 | 27000或2.7×104 |
| 4 | 不可计 4650 513 | ─ | 513000 | 510000或5.1×105 |
| 5 | 27 11 5 | ─ | 270 | 270或2.7×102 |
| 6 | 不可计 305 12 | ─ | 30500 | 31000或3.1×104 |
| 7 | 0 0 0 | ─ | ＜1×10 | ＜10 |

注：CFU-菌落形成单位。

7.8 以CFU/g 为单位报告。