

揭阳职业技术学院

Jieyang Polytechnic

教 案

系（部）： 化学工程系

讲授课程： 化妆品微生物及检验技术

任课教师： 陈敏杰

专业班级： 化妆品技术 241、（3+）241

授课学期： 2025-2026 学年第一学期

揭阳职业技术学院化学工程系

2025 年 9 月

“化妆品微生物及检验技术”课程综述

一、本课程的主要内容

化妆品微生物与检测技术是一门学习和研究微生物的形态结构、生理生化、生长繁殖、遗传变异、生态分布、传染免疫、分类鉴定以及微生物在化妆品行业中应用和检验的一科自然基础应用学科。本课程具有较强的实用性，其主要任务是学习微生物检验的基础知识，包括微生物的生理特性、形态结构及微生物检验在化妆品生产和质量检验中的意义和作用；掌握微生物检验的常规技术，包括培养基配制、微生物的分离与培养、接种等；结合微生物检验的实际，重点掌握化妆品方面的微生物检测综合技能。

二、本课程与其他课程的关系

化妆品微生物检验是一门重要的专业应用基础学科和技能，可为其它专业课程提供必要的基础知识和实操技能，有利于更好地学习其它相关课程，同时也是构成本专业知识和技术体系的一部分。

三、本课程的现状

本课程具有很强的实用性，同时又有严密、系统的理论，是理论与实际密切结合的课程。学习本课程有利于培养学生严谨的科学态度和实事求是的作风，使学生初步掌握科学研究的技能并初步具备科学研究的综合素质。本课程是研究化妆品微生物的特点、性质、生理特性、生长规律及如何防止微生物对化妆品产品污染的一门科学，它是进行各化妆品生产和质量控制的微生物检测，保证化妆品行业生产质量的重要依据。

四、本课程的发展

本课程应注重微生物学的基础知识的学习，与其它学科和日常生活生产实况相结合，引导学生解决实际问题；同时，通过课前引入，介绍前沿科技的发展，使学生了解学科的发展动态，看到基础知识的延伸及与其他相关学科的密切联系，满足和激发学生的求知欲和主动学习的兴趣，为将来从事相关专业及行业的工作打下一定的专业基础。

化妆品微生物及检验技术是一门实践性很强的学科，实验技术是该学科的重要内容。通过学习，学生应掌握微生物学的基本实践操作方法与技术，掌握对化妆品中微生物的检验技术和污染防止措施。

五、课程思政目标

当前，国家对人才的要求不仅要有较强的专业知识和技能，更要有高尚的职业理想和职业道德。结合课程内容挖掘思政元素，实施思政教育于专业课程教学中，化妆品微生物及检验技术课程主要内容包括微生物发展简史、微生物筛选和培养等内容，这些内容涉及到很多思政元素可融入教育教学中，如思政元素“文化自信”、“爱国主义”、“国家情怀”、“爱岗敬业”、“工匠精神”等。将这些思政元素融入到课程教学中，有利于培养学生爱国爱党、爱岗敬业精神，认真严谨的工作作风，追求卓越的“工匠精神”，提升学生的综合素质和职业认同感，增强学生的就业能力。

课程名称	化妆品微生物及检验技术	专业班级	化妆品 241、化妆品 (3+) 241
教材名称	化妆品微生物检验技术		
授课题目	绪论		
授课学时	2 节 (√) ; 3 节 () ; 其它 ()		
课 型	理论 (√) ; 实验 () ; 见习 () ; 实训 () ; 其它 ()		
教学目的	1. 了解课程的地位、学习、考核方法。 2. 了解《化妆品卫生规范》、《化妆品安全技术规范》等法规的基本知识。 3. 掌握微生物的定义、特点、分类。 4. 了解微生物学的发展简史, 融入课程思政元素, 引导学生践行社会主义核心价值观, 养成严谨的科学态度, 追求卓越的“工匠精神”; 掌握化妆品微生物学的发展简史。 5. 掌握化妆品微生物检验的卫生学意义。		
思政目标	通过讲述有关“爱国主义”、“国家情怀”、“工匠精神”等思政元素的事例, 培养学生追求卓越的“工匠精神”, 提升学生的综合素质和职业认同感, 增强学生的就业能力。		
教学重点	1. 微生物的定义、特点、分类。 2. 化妆品微生物学的发展简史。		
教学难点	1. 分辨能正确引起化妆品污染的微生物主要种类。 2. 了解各类化妆品的微生物污染情况。		
教学方法	讲授 (√) ; 讨论 () ; 指导 () ; 示教 () ; 其它 ()		
电子教案	有 (√)	Microsoft PowerPoint (√) ; Author ware () ; 其它 ()	
	无 ()		
教学资源	多媒体 (√) ; 模型 () ; 标本 () ; 实物 () ; 音像 () ; 其它 ()		
教学过程 时间安排	1. 微生物的定义、特点、分类 (1 学时) 2. 化妆品微生物学的发展简史 (1 学时)		
思考题	1. 简述引起化妆品污染的微生物主要种类? 2. 化妆品微生物检验的卫生学意义。		
作 业	1. 微生物的定义、特点、分类是什么? 2. 请谈谈各类化妆品的微生物污染情况?		
教学后记	开学第一次课, 主要引导学生做好学习计划, 认识课程的学习任务及学习方式, 教学速度稍微有点放慢。		

教学内容

绪论

(一) 基础知识点:

1. 微生物学定义、特点、分类。
2. 微生物发展简史中划分时期、代表人物及主要贡献。
3. 引起化妆品污染的微生物主要种类。
4. 化妆品微生物检验的卫生学意义。

(二) 教学主要内容:

1. 本学期的教学安排。
2. 微生物的概念、特点及其分类。
3. 微生物发展简史。
4. 微生物在自然界中的作用。
5. 化妆品微生物学的发展简史，引入我国古代先民利用微生物的故事和我国微生物学家汤非凡先生事迹，培养学生“文化自信”、爱国爱党、爱岗敬业精神，认真严谨的工作作风，追求卓越的“工匠精神”。
6. 引起化妆品污染的微生物主要种类。
7. 化妆品微生物检验的卫生学意义。

一、微生物的含义：微生物是指存在于自然界的一群个体微小（一般 $\Phi < 0.1\text{mm}$ ）、结构简单、肉眼看不见或看不清楚，必须借助光学或电子显微镜才能观察到的低等生物的总称。

*杰出微生物学家

列文虎克、巴斯特和柯赫

二、微生物的特点

生物基本特征：具新陈代谢和生命周期。

微生物特征：1、个体微小，分布广泛。2、繁殖快速，易于培养。3、种类繁多，代谢旺盛。4 容易变异，适应力强。

二、微生物的分类

微生物类群十分庞杂，按有无细胞结构分为：

1 原核细胞型微生物 单细胞结构，包括古菌、蓝细菌、放线菌、立克次氏体、衣原体等。

2 真核细胞型微生物 单细胞或多细胞结构 包括真菌的酵母菌和霉菌，单细胞藻类、原生动物等。

3 非细胞结构型微生物 没有细胞膜、细胞结构。包括的病毒、类病毒、拟病毒等。

三、微生物在自然界中的作用

（一）物质循环中的作用

自然界中分解者，促进各种元素的循环。

（二）工业生产中的应用

医药方面（生产抗生素、维生素等）；食品方面（食品添加剂、调味剂、保健品等）；工业方面（工程菌、污水处理等）。

（三）农业和畜牧业中应用

农用抗生素、微生物农药、发酵饲料、生产菌体蛋白质饲料等。

(四) 微生物的危害

- 1.引起食品腐败变质、材料发霉腐烂。
- 2.引起动植物和人类的疾病。

四、微生物学的发展简史

(一) 微生物学的经验时期

古人利用微生物进行农业生产和疾病防治。我国 8000 年以前出现酿酒生产，公元六世纪《齐民要术》记载酿酱、酿醋。

教师组织学生分享我国古代先民利用微生物的故事，引导学生深入结合我国古代文献记载书籍、文学、历史等人文知识，介绍在中国源远流长的历史文化中，就有很多关于中国古代先民利用微生物酿酒、制醋、制曲等记载。公元前 5000 至公元前 3000 年的“仰韶”时期，公元前 2500 至公元前 2000 年的“龙山”时期，我国拥有的饮酒文化就已超前于当时世界上绝大多数地区；北魏贾思勰所著《齐民要术》中也详细记载了我国古代祖先已接近工业标准制备的酿造方法。说明在几千年前，中国先民已经做出类似于今天的微生物工程工业化生产流程。引导学生总结，提出中国古代先民很有智慧，创造了优秀的中华文化，我们要树立“文化自信”精神，尊重历史，发扬科学精神。

(二) 微生物的形态学时期

1676 年荷兰人安东尼·列文虎克发明放大镜，并首次描述了细菌的形态。

列文虎克，(1632—1723)荷兰显微镜学家、微生物学的开拓者，其一生磨制了 400 多个透镜，有一架简单的透镜，其放大率竟达 270 倍。1676

年首次观察到细菌细胞，被誉为“微生物学的先驱者”。

（三）实验微生物学时期

19世纪中期，巴斯德和柯赫为代表，推动微生物学生理生化水平研究。

教师组织学生分享我国微生物学家汤飞凡先生事迹；①汤飞凡先生努力奋斗的求学经历：1914年，他考入湖南湘雅医学专门学校，尽管未学过英语，但在主考官美国牧师胡美的帮助下，被破格录取。他通过刻苦学习，最终克服了英语障碍。②留美深造学成归国，忠诚爱国：1925年，汤飞凡被推荐到美国哈佛大学医学院学习。1929年，他学成回国，先后担任上海中央大学副教授和上海医学院教授，多次拒绝国外的高薪工作和优越的研究环境，坚持留在国内，为中国的微生物科学和医学事业做出了巨大贡献。他在新中国成立前夕拒绝了前往台湾的邀请，选择了留在大陆。③爱岗敬业致力沙眼病原体的研究：汤飞凡长期从事微生物学、病毒学和免疫学的研究。他通过对沙眼病原体的深入研究，最终在1956年成功分离出了沙眼病毒，被称为世界上第一个分离出沙眼病毒的人，沙眼病毒被称为“汤氏病毒”。④坚持“工匠精神”研制青霉素：在抗战时期，汤飞凡成功从霉菌中分离出了能产生青霉素的菌种，制造出了中国的第一支青霉素，打破了国际垄断，1943年，指导研究人员用自己分离的中国菌种，生产中国首批5万单位一瓶的青霉素。

通过分享故事、科学家事迹，让学生加深对微生物发展简史的历程、科学家精神的认识，培养他们的批判性思维和解决问题的能力。

（四）现代微生物学时期（20世纪以后）

19世纪中-20世纪初微生物研究已成为一门独立的学科。生物化学、遗

传学等学科发展，以及显微技术、分析检测技术、计算机技术等技术的进步，共同促进微生物学发展！

巴斯德研究了微生物的类型、习性、营养、繁殖、作用等，奠定了工业微生物学和医学微生物学的基础，并开创了微生物生理学，以倡导疾病细菌学说、发明预防接种方法最为闻名，被誉为“微生物学之父”。

柯赫（Robert Koch, 1843~1910）德国细菌学家，曾做过医生、大学教授、研究所所长，近代微生物学（细菌学）的奠基人，因对结核菌的一系列研究获 1905 年诺贝尔生理学或医学奖。

科赫法则基本内容

1.病原体应在所有患同一种疾病的动物中发现，而在健康个体中不存在。

2.应能在患病动物中分离获得该病原体的纯培养。

3.将纯培养物接种健康敏感动物后能引起同样的疾病。

4.应在人为感染的动物体内重新分离出该病原体。

五、化妆品微生物学的发展简史

（一）20 世纪 30 年代

化妆品学和微生物学的结合，始于 20 世纪 30 年代。防腐剂研究，解决化妆品中霉菌污染问题，尼泊金酯抗菌研究为代表。

（二）20 世纪 40 年代

新防腐剂研究，将细菌列入防腐剂试验，关注化妆品毒性和环境污染问题。

（三）20 世纪 50 年代

抗生素发展，促进含抗菌性能的化妆品。尼新抗生素的效能和新防腐剂的研究为代表。

（四）20 世纪 60 年代

开启化妆品行业监管，美国成立微生物品质保证委员会，建立化妆品工业的技术指导方针。

（五）20 世纪 70 年代

美国出版《化妆品关于良好操作规范和微生物实践操作的技术指南》，开展防腐剂的效能试验。

（六）20 世纪 80 年代

开展防腐效能体外试验，美国成立微生物品质保证委员会，建立化妆品工业的技术指导方针。

（七）20 世纪 90 年代至今

美国进行标准的防腐效能试验。

注重化妆品安全性，卫生情况。

六、化妆品微生物污染的来源

1.植物性原料及辅料

2. 动物性原料及辅料

3. 乳汁

4. 蛋品

5. 加工机械、设备和包装材料

七、常见化妆品微生物污染情况

1.膏霜：微生物污染率最高。（有一定水分、有可供微生物生长的油脂、

胶质蛋白质、多元醇、适宜的 pH 等)

2.洗护类产品：微生物污染率较高。（主要产品为洗发水、护发素、浴液、液体香皂、洗面奶等）

3.粉类产品：微生物污染率较低。（产品通常处于干燥状态。主要产品香粉、爽身粉、粉饼等）

4.美容化妆品：很少受微生物污染。（主要产品为唇膏、胭脂、眼影膏等，含有香精香料等原料具有杀菌作用）

八、化妆品微生物检测的意义

1.按《化妆品安全技术规范》进行检验，避免化妆品受微生物污染而变质，确保使用者身体健康。

2.检验原料和产品中微生物数量是否达标，如细菌总数、耐热大肠菌群、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌等，确保产品卫生安全。

3.检验用于化妆品的防腐剂的防腐效能。

【思考题】

试根据微生物的特点，谈谈为什么说微生物既是人类的敌人，更是人类的朋友。

课程名称	化妆品微生物及检验技术	专业班级	化妆品 241、化妆品 (3+) 241
教材名称	化妆品微生物检验技术		
授课题目	第一章 微生物概论		
授课学时	2 节 () ; 3 节 () ; 其它 (8 学时)		
课 型	理论 (<input checked="" type="checkbox"/>); 实验 () ; 见习 () ; 实训 () ; 其它 ()		
教学目的	1. 了解细菌、放线菌、酵母菌、霉菌、病毒的大小和形态。 2. 掌握细菌、放线菌、酵母菌、霉菌、病毒的结构及其功能。 3. 掌握几类主要微生物检验的繁殖方式和群体形态。		
思政目标	根据教材, 结合事例融入“爱国主义”、“国家情怀”、“爱岗敬业”、“工匠精神”等思政元素, 培育学生爱党爱国, 养成爱岗敬业、精益求精的工匠精神。		
教学重点	1. 根据微生物的结构特点理解其功能特点, 理解结构与功能的对应性。 2. 掌握识别、区分产品中几类主要微生物的能力。		
教学难点	1. 理解微生物结构特点与功能的对应性。 2. 理解化妆品生境特征与微生物污染的关系。		
教学方法	讲授 (<input checked="" type="checkbox"/>); 讨论 () ; 指导 () ; 示教 () ; 其它 ()		
电子教案	有 (<input checked="" type="checkbox"/>)	Microsoft PowerPoint (<input checked="" type="checkbox"/>); Author ware () ; 其它 ()	
	无 ()		
教学资源	多媒体 (<input checked="" type="checkbox"/>); 模型 () ; 标本 () ; 实物 () ; 音像 () ; 其它 ()		
教学过程 时间安排	第一节 细菌 (4 学时) 第二节 真菌 (2 学时) 第三节 病毒 (2 学时)		
思考题	1. 试根据细菌细胞结构的特点, 分析并举例说明为什么它们能在自然界中分布广泛。		
作 业	1. 细菌的基本形态有哪些? 测量单位是什么? 2. 试比较 G+细菌与 G-细菌细胞壁肽聚糖结构的差别?		
教学后记			

教学内容:

第一章：微生物概论

第一节 细菌

一、细菌

细菌(bacterium)是属原核生物界(prokaryotae)的一类个体微小、结构简单的单细胞微生物。

广义:指所有的原核生物。

狭义:指一类细胞细短(Φ :0.5 μ m, L:0.5~5 μ m)、结构简单、胞壁坚韧、多以二分裂方式繁殖和水生性较强的原核生物。

细菌结构图

举出生活中常见的细菌现象

1.1 细菌的形态

1.个体形态。球菌(单球菌,双球菌,四联球菌,八叠球菌,链球菌,葡萄球菌),

杆菌(单杆菌,双杆,链杆,球杆菌),

不同杆菌的大小、长短、粗细很不一致。

杆菌的形态多样(课件附图片)

螺旋菌(弧菌,菌体只有一个弯曲,其程度不足一圈,犹如"C"字;螺旋菌,菌体回转如螺旋状,并呈现较多的螺旋和弯曲;螺旋体(spirochaete)>6圈)。

螺旋菌

电镜下的螺旋菌

细菌的其它形态：

柄杆菌：细胞上有柄（stalk）、菌丝（hyphae）、附器（appendages）等细胞质伸出物，细胞呈杆状或梭状，并有特征性的细柄。

球衣菌：能形成衣鞘（sheath），杆状的细胞呈链状排列在衣鞘内而成为丝状。

支原体：由于只有细胞膜，没有细胞壁，故细胞柔软，形态多变，具有高度多形性。

细菌形态若干共性：细菌的形态明显地受环境条件的影响，如培养温度、培养时间、培养基的组成与浓度等发生改变，均可能引起细菌形态的改变。

细菌形态若干共性：一般处于幼龄阶段和生长条件适宜时，细菌形态正常、整齐，表现出特定的形态。在较老的培养物中，或不正常的条件下，细胞常出现不正常形态，尤其是杆菌，有的细胞膨大，有的出现梨形，有的产生分枝，有时菌体显著伸长以至呈丝状等，这些不规则的形态统称为异常形态。它们转移到新鲜培养基中或适宜的培养条件下可恢复原来的形态。

1.2 细菌细胞的大小

表示：细菌细胞的大小一般用显微测微尺测量，并以多个菌体的平均值或变化范围表示。

球菌大小以直径表示；杆菌以宽×长表示；螺旋菌以宽×菌体两 endpoint 间长度表示。

单位：um，亚细胞构造单位 nm。

细胞的大小是细菌分类特征，不同细菌细胞大小不同，同一细菌的不同菌龄细胞大小不同，细菌细胞大小还与营养等因素相关，细胞大小的测量结果只是近似值或平均值。

球菌直径多为 0.2~1.25 微米；杆菌直径与球菌相似，长度约为直径的一倍或几倍。螺旋菌为 0.3~1×1~50 微米。

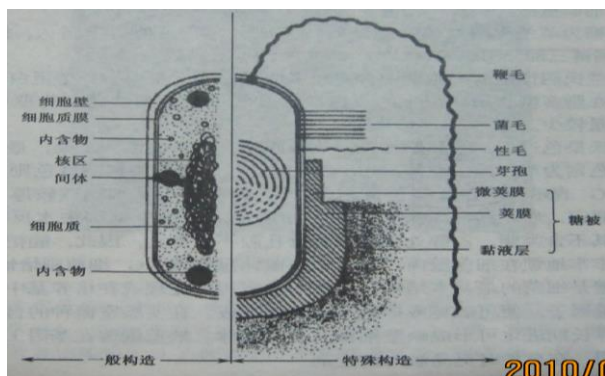
目前最小的细菌只 0.05 微米，但一般不超过几微米。

1.3 细菌的观察法

活体观察：压滴法、悬滴法、菌丝埋片法。

染色观察

1.4 细菌的细胞结构



1.4.2 细胞壁(cell wall)

位于细胞表面，内侧紧贴细胞膜的一层较为坚韧、略具弹性的结构。占细胞干重的 10-25%。

功能：固定细胞外形和提高机械强度，保护细菌抵抗低渗环境，为细胞的生长、分裂和鞭毛运动所需，参与菌体内外的物质交换，阻挡大分子有害物质（如水解酶）进入细胞，具特定的抗原性、致病性和对噬菌体的敏感性。

革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌细胞壁的化学组成和结构不同（课

件附图)

G⁺和 G⁻细胞壁的比较

细胞壁	革兰阳性菌	革兰阴性菌
强 度	较坚韧	较疏松
厚 度	20-80nm	10-15nm
肽聚糖层数	可多达 560 层	1-2 层
肽聚糖含量	占细胞壁干重 50%-80%	占细胞壁干重 5%-20%
磷 壁 酸	有	无
脂多糖	无	有

1.4.2 细胞膜(cell membrane)

细胞膜是一层紧贴在细胞壁内侧，包围着细胞质的柔软、脆弱、富有弹性的半透性薄膜，厚度约 7-8nm，磷脂和蛋白质组成，也称细胞质膜。

细胞膜的功能：选择性控制细胞内、外物质的运送、交换，维持细胞内正常渗透压以保证屏障作用，合成细胞壁和糖被的各种组分的场所，进行氧化磷酸化或光合磷酸化的产能基地，鞭毛着生点和提供其运动所需的能量，许多酶和电子传递链组分的所在部位等。

1.4.3 细胞质(cytoplasm)和内含物(inclusion body)

细胞质：被细胞膜包围着的除核质体外的一切透明、胶状体、颗粒状物质的总称。

主要成分：水、蛋白、核酸、脂类、少量糖和无机盐、富含核糖核酸。

内含物：指细胞质内一些形状较大的颗粒状结构。

主要成分：贮藏物：营养贮存；磁小体：导向；羧酶体：CO₂固定；气泡：调节细胞相对密度；核糖体：合成蛋白质；质粒：环状 DNA。

聚-β-羟丁酸 (PHB)

磁小体

细胞质和内含物功能：具有生命物质所有的各种特征，含有丰富的酶系，是营养物质合成、转化、代谢的场所，其不断地更新细胞内的结构和成分，使细菌细胞与周围环境不断的进行新陈代谢。

1.4.4 核质体

又称核质体、原核、核区、核基因组，指原核生物所特有的无核膜包裹、无固定形态的原始细胞核。

特点：无核膜、核仁、固定形态，结构简单，细胞分裂前核分裂。一般为单倍体。

形态特征：呈球状、棒状或哑铃状，在电镜下呈透明区域。

成分：DNA--环状双链，超线圈结构。

功能：是负载遗传信息的物质基础。

1.4.5 质粒 (plasmid)

存在于细胞质中，能进行自我复制的且游离的小型双股环状 DNA 分子，每个细菌细胞可含有一至数个，能控制细菌产生菌毛、毒素、耐药性等遗传性状。

1.5 细菌细胞的附加（特殊）结构

1.5.1 芽孢(endospore/spore)

某些细菌在其生长发育后期，在细胞内形成一个圆形或椭圆形、厚壁、含水量极低、抗逆性极强的休眠体。成分：含水量低、壁致密、结构复杂。

形态：呈梭状、棒槌状等。芽孢有较厚的壁和高度折光性，在显微镜下观察为透明体。

1.5.2 鞭毛(Flagellum)

运动性微生物细胞表面具有的一根或数根由细胞内伸出的细长、波曲、毛发状的丝状体结构即为鞭毛，它是细菌的“运动器官”。功能：运动。

观察：鞭毛用电子显微镜观察；经特殊染色法在光镜下；根据运动方式，半固体穿刺培养，观其是否有浑浊扩散区；根据菌落外形，若形状较大，薄而不规则，边缘极不圆整则具极强运动能力。

类型：单端单生、两端单生、单端丛生、两端丛生、周生。

1.5.3 糖被(glycocalyx)

包被于某些细菌细胞壁外的一层厚度不定的透明胶状物质。

功能：保护细菌免受干旱损伤；加强致病力，保护病原菌免受宿主吞噬细胞的吞噬；贮藏养料，以备营养缺乏时重新利用；堆积某些代谢产物；通过荚膜或其有关构造可使菌体附着于适当的物体表面；作为透性屏障和离子交换系统，以保护细菌免受重金属离子的毒害；细菌间的信息识别作用；是细菌的分类依据之一。

1.5.4 伴孢晶体

少数芽孢杆菌产生的糖蛋白昆虫毒素，也称 δ 内毒素，对鳞翅目、双翅目和鞘翅目等 200 多种昆虫和动、植物线虫有毒杀作用，可作为生物农药。不同菌株产生的伴孢晶体，有不同的对宿主致毒范围。

苏云菌农药

1.5.5 菌毛 (pilus)

普通菌毛

吸附作用

性菌毛

传递 DNA

1.6 细菌的繁殖方式

简单的无性的二均裂殖是细菌最普遍、最主要的繁殖方式，通常表现为横分裂。

电子显微镜表明，细菌分裂大致经过细胞核和细胞质的分裂、横隔壁的形成、子细胞分离等过程。

1.7 细菌的菌落特征

菌落：在适宜的培养条件下，微生物在固体培养基表面（有时为内部）生长繁殖，形成以母细胞为中心的一堆肉眼可见的、有一定形态构造的子细胞集团。

菌苔：将某一纯种的大量细胞密集地接种到固体培养基表面，结果长出的大量“菌落”互相连成一片，这就是菌苔。（课件附图片）

菌落特征参数：大小、形状(圆形、假根状、不规则状等)、隆起形状(扩展、台状、低凸、凸面、乳头状等)、边缘情况(整齐、波状、裂叶状、锯齿状等)、表面状态(光滑、皱褶、颗粒状、龟裂状、同心环状等)、表面光泽(闪光、金属光泽、无光泽等)、质地(油脂状、膜状、粘、脆等)、颜色，透明程度等。（课件附图片）

菌落形态是个体形态的集中表现。

个体球状体，群体小、圆、隆起；个体杆状，群体大、圆、隆起大、扁平；个体鞭毛，群体很大、不规则；个体芽孢，群体透明度差，皮肤状皱褶；荚膜个体，群体 透明度高，鼻涕状，菌落大。

细菌菌落特征：菌落湿润，较光滑，较透明，较粘稠，易挑取，小而

突起或大而平坦，菌落正反面或边缘与中央部位的颜色一致，一般有臭味。

常见细菌菌落特征：球菌：菌落小而突起，边缘极其圆整。

长有鞭毛的细菌：菌落大而扁平，形状不规则。

有荚膜的细菌：菌落十分光滑，并呈透明的蛋清状。

产芽孢的细菌：菌落表面粗糙、多褶、不透明、外形及边缘不规则。

菌落培养特征，在固体培养基上，多生于培养基表面，光滑或粗糙、干燥或湿润，有不同气味，但菌落菌苔易于被挑起。（课件附图片）

在液体培养基上，1.多数细菌呈现均匀浑浊（表现均匀生长）。2.部分形成菌膜(专性需氧菌)，在液体培养基表面上形成菌膜，液体透明或者稍浑浊。3.形成菌环，在液体中间形成一圈环状物形成沉淀。4.在液体底部形成沉淀。

在半固体培养基上，用穿刺接种方法，如该细菌有鞭毛，能运动则沿穿刺线扩散生长，若无鞭毛不能运动，只在穿刺线处生长。

菌落意义

各种细菌，在一定条件下形成的菌落特征具有一定的稳定性和专一性，这是衡量菌种纯度，辨认和鉴定菌种的重要依据。不同形态、生理类型的细菌，在其菌落形态、构造等特征上也有许多明显的反映。

第二节 真菌

二、放线菌

是一类主要呈菌丝状生长和以孢子繁殖的陆生性较强的介于细菌和真菌之间的原核微生物。

2.1 放线菌的形态、结构

放线菌的形态比细菌复杂些，但仍属于单细胞。在显微镜下，放线菌呈分枝丝状，我们把这些细丝一样的结构叫做菌丝。

根据菌丝的着生部位、形态和功能的不同，放线菌菌丝可分为基内菌丝、气生菌丝和孢子丝三种，其中只有典型的放线菌(如链霉菌)具有气生菌丝，原始的放线菌则没有。

放线菌细胞的结构与细菌相似，都具备细胞壁、细胞膜、细胞质、拟核等基本结构。个别种类的放线菌也具有细菌鞭毛样的丝状体，但一般不形成荚膜、菌毛等特殊结构。放线菌的孢子在某些方面与细菌的芽孢有相似之处，都属于内源性孢子，但细菌的芽孢仅是休眠体，不具有繁殖作用，而放线菌产生孢子则是一种繁殖方式。

2.2 放线菌的生长特性

放线菌中除致病类型外，一般为需氧菌，生长的最适温度为 28-30℃，最适 PH 为 7.5-8.0.自然环境中的放线菌多数为腐生型异养菌，容易吸收和利用的碳源主要是葡萄糖、麦芽糖、淀粉和糊精。

2.3 放线菌的菌落

放线菌的菌落由菌丝体组成。一般圆形、光平或有许多皱褶，光学显微镜下观察，菌落周围具辐射状菌丝。总的特征介于霉菌与细菌之间，因种类不同可分为两类：

一类是由产生大量分枝和气生菌丝的菌种所形成的菌落。

另一类菌落由不产生大量菌丝体的种类形成，如诺卡氏放线菌的菌落，粘着力差，结构呈粉质状，用针挑起则粉碎。若将放线菌接种于液体培养基内静置培养，能在瓶壁液面处形成斑状或膜状菌落，或沉降于瓶底而不

使培养基混浊;如以震荡培养,常形成由短的菌丝体所构成的球状颗粒。

2.4 放线菌的繁殖

放线菌主要通过形成无性孢子的方式进行繁殖,也可借菌体分裂片段繁殖。放线菌长到一定阶段,一部分气生菌丝形成孢子丝,孢子丝成熟便分化形成许多孢子,称为分生孢子。

孢子的产生有以下几种方式:凝聚分裂形成凝聚孢子;横隔分裂形成横隔孢子;有些放线菌首先在菌丝上形成孢子囊(sporangium),在孢子囊内形成孢子,孢子囊成熟后,破裂,释放出大量的孢囊孢子;小单孢菌科中多数种的孢子形成是在营养菌线上作单轴分枝,基上再生出直而短(5-10微米)的特殊分枝,分枝还可再分枝杈,每个枝杈顶端形成一个球形、椭圆形或长圆形孢子,它们聚集在一起,很象一串葡萄,这些孢子亦称分生孢子;某些放线菌偶尔也产生厚壁孢子。

三、酵母菌

酵母是一种单细胞真菌,并非系统演化分类的单元。一种肉眼看不见的微小单细胞微生物,能将糖发酵成酒精和二氧化碳,分布于整个自然界,是一种典型的异养兼性厌氧微生物,在有氧和无氧条件下都能够存活,是一种天然发酵剂。

一般泛指能发酵糖类的各种单细胞真菌,可用于酿造生产,也可为致病菌--遗传工程和细胞周期研究的模式生物。酵母菌是人类文明史中被应用得最早的微生物。

3.1 酵母菌的形态、结构

酵母菌细胞宽度(直径)约 2~6 μm , 长度 5~30 μm , 有的则更长, 个体

形态有球状、卵圆、椭圆、柱状和香肠状等。酵母菌是单细胞真核微生物，无鞭毛，不能游动。

3.2 酵母菌的生长特性

酵母菌同其它活的有机体一样需要相似的营养物质，像细菌一样它有一套胞内和胞外酶系统，用以将大分子物质分解成细胞新陈代谢易利用的小分子物质，属于异养生物。

3.3 酵母菌的菌落

酵母菌的菌落形态特征与细菌相似，但比细菌菌落大而厚，湿润，表面光滑，不透明，黏稠；菌落质地均匀，正、反面及中央与边缘的颜色一致，多数呈乳白色，少数红色，个别黑色。

3.4 酵母菌的繁殖

酵母菌的生殖方式分无性繁殖和有性繁殖两大类。

无性繁殖包括：芽殖，裂殖，芽裂。

有性繁殖方式：子囊孢子。

四、霉菌

霉菌是真菌的一部分，其特点是菌丝体较发达，无较大的子实体。同其他真菌一样，也有细胞壁，寄生或腐生方式生存。霉菌有的使食品转变为有毒物质，有的可能在食品中产生毒素，即霉菌毒素。自从发现黄曲霉毒素以来，霉菌与霉菌毒素对食品的污染日益引起重视。对人体健康造成的危害极大，主要表现为慢性中毒、致癌、致畸、致突变作用。

4.1 霉菌的形态、结构

霉菌是形成分枝菌丝的真菌的统称。不是分类学的名词，在分类上属

于真菌门的各个亚门。构成霉菌体的基本单位称为菌丝，呈长管状，宽度2~10微米，可不断自前端生长并分枝。无隔或有隔，具1至多个细胞核。

4.2 霉菌的生长特性

霉菌能在pH3.0-8.5的环境中生长，多数喜欢酸性环境，一般需要氧气，对干燥的耐受性比细菌强。

4.3 霉菌的菌落

霉菌是丝状真菌的俗称，意即"发霉的真菌"，它们往往能形成分枝繁茂的菌丝体，但又不象蘑菇那样产生大型的子实体。在潮湿温暖的地方，很多物品上长出一些。肉眼可见的绒毛状、絮状或蛛网状的菌落，那就是霉菌。

霉菌菌落的特征:

- A、形态较大，质地疏松，外观干燥，不透明，呈现或松或紧的形状。
- B、菌落和培养基间的连接紧密，不易挑取，菌落正面与反面的颜色、构造，以及边缘与中心的颜色、构造常不一致。
- C、霉菌的菌丝有营养菌丝和气生菌丝的分化，而气生菌丝没有毛细管水，故它们的菌落必然与细菌或酵母菌的不同，较接近放线菌。

4.4 霉菌的繁殖

霉菌有着极强的繁殖能力，而且繁殖方式也是多种多样的。虽然霉菌菌丝体上任一片段在适宜条件下都能发展成新个体，但在自然界中，霉菌主要依靠产生形形色色的无性或有性孢子进行繁殖。孢子有点像植物的种子，不过数量特别多，特别小。

第三节 病毒

五、病毒

病毒是颗粒很小、以纳米为测量单位、结构简单、寄生性严格，以复制进行繁殖的一类非细胞型微生物。病毒是比细菌还小、没有细胞结构、只能在细胞中增殖的微生物。由蛋白质和核酸组成。大部分要用电子显微镜才能观察到。

5.1 病毒的形态、结构

病毒的形态

(1)球状病毒;(2)杆状病毒;(3)砖形病毒;(4)冠状病毒;(5)丝状病毒(6)链状病毒;(7)有包膜的球状病毒;(8)具有球状头部的病毒;(9)封于包含体内的昆虫病毒。

病毒的大小

多数病毒直径在 100nm(20~200nm)，较大的病毒直径为 300-450 纳米(nm)，较小的病毒直径仅为 18-22 纳米。

病毒的基本结构

有核心和衣壳，二者形成核衣壳。核心位于病毒体的中心，为核酸，为病毒的复制、遗传和变异提供遗传信息;衣壳是包围在核酸外面的蛋白质外壳。

衣壳的功能:①具有抗原性;②保护核酸;③介导病毒与宿主细胞结合。

病毒的辅助结构

有些病毒核衣壳外还有一层脂蛋白双层膜状结构，是病毒以出芽方式释放，穿过宿主细胞膜或核膜时获得的，称之为包膜。在包膜表面有病毒编码的糖蛋白，镶嵌成钉状突起，称为刺突。有包膜病毒对有机溶剂敏感。

包膜功能:①保护核衣壳;②促进病毒与宿主细胞的吸附;③具有抗原性。

5.2 病毒的复制

病毒复制指病毒粒入侵宿主细胞到最后细胞释放子代毒粒的全过程,包括吸附、进入与脱壳、病毒早期基因表达、核酸复制、晚期基因表达、装配和释放等步骤。各步的细节因病毒而异。

课程名称	化妆品微生物及检验技术	专业班级	化妆品 241、化妆品 (3+) 241
教材名称	化妆品微生物检验技术		
授课题目	第二章 微生物的人工培养与鉴别		
授课学时	2 节 () ; 3 节 () ; 其它 (6 学时)		
课 型	理论 (<input checked="" type="checkbox"/>) ; 实验 () ; 见习 () ; 实训 () ; 其它 ()		
教学目的	1. 了解微生物细胞的化学组成, 理解和掌握微生物的营养物质及其生理功能, 微生物的营养类型等概念。 2. 掌握微生物的生长与繁殖, 掌握微生物生长的规律、生长曲线各时期的主要特点。 3. 了解微生物新陈代谢的有关基本概念及主要代谢产物。 4. 了解培养基的种类及不同培养基的用途。 5. 掌握培养基的配制原则、要求和注意事项。 6. 根据工作目标选择合适的培养基。		
思政目标	根据教材, 结合事例融入“爱国主义”、“国家情怀”、“爱岗敬业”、“工匠精神”等思政元素, 培育学生爱党爱国, 养成爱岗敬业、精益求精的工匠精神。		
教学重点	1. 微生物的营养需求、微生物的营养类型、代谢主要产物。 2. 微生物的人工培养、生长控制、保存及鉴定等方面的技术原理。 3. 正确配制微生物检验中的常用的培养基。		
教学难点	1. 理解和掌握微生物的营养物质及其生理功能。 2. 掌握培养基的配制原则、要求和注意事项, 根据工作目标选择合适的培养基。		
教学方法	讲授 (<input checked="" type="checkbox"/>) ; 讨论 () ; 指导 () ; 示教 () ; 其它 ()		
电子教案	有 (<input checked="" type="checkbox"/>)	Microsoft PowerPoint (<input checked="" type="checkbox"/>) ; Author ware () ; 其它 ()	
	无 ()		
教学资源	多媒体 (<input checked="" type="checkbox"/>) ; 模型 () ; 标本 () ; 实物 () ; 音像 () ; 其它 ()		
教学过程 时间安排	第一节 微生物的营养 (2 学时) 第二节 微生物的人工培养 (2 学时) 第三节 微生物鉴别的一般方法 (2 学时)		
思考题	1. 简述微生物的营养物质。		
作 业	1. 微生物典型生长曲线可分几期, 各期的主要特点是什么? 实践意义? 2. 简述培养基的必备条件。 3. 简述微生物鉴别的一般方法。		
教学后记			

教学内容

第二章 微生物的人工培养与鉴别

第一节 微生物的营养

(一) 基础知识点:

1. 微生物所需的六类营养要素，营养物质进入细胞的运输方式。
2. 微生物生长发的测定方法，微生物的生长规律。
3. 微生物代谢类型的特点。

(二) 教学主要内容:

1. 微生物的6类营养物质。碳源，氮源，能源，生长因子，无机盐，水。
2. 微生物的营养类型。
3. 营养物质进入细胞的方式。单纯扩散，促进扩散，主动运送，基因移位。
4. 测定微生物生长繁殖的方法。测生长量，计繁殖数。
5. 微生物的生长规律。微生物的个体生长和同步生长，单细胞微生物的典型生长曲线，微生物的连续培养，微生物的高密度培养。
6. 影响微生物生长的主要因素。温度，氧气，PH。
7. 微生物培养法概论。实验室培养法，生产实践中培养微生物的装置。
8. 有害微生物的控制。几个基本概念，物理灭菌因素的代表—高温，化学杀菌剂，消毒剂，治疗剂。
9. 微生物的能量代谢。化能异养微生物的生物氧化和产能，自养微生物

产 ATP 和产还原力。

10.分解代谢和合成代谢的联系。两用代谢途径，代谢物回补顺序。

11.微生物独特合成代谢途径举例。自养微生物的 CO_2 固定，生物固氮，微生物结构大分子----肽聚糖的生物合成，微生物次生代谢物的合成。

12.微生物的代谢调节与发酵生产。

一、微生物的营养

微生物从外界环境中摄取和利用营养物质的过程称为营养。营养是微生物维持和延续其生命形式的一种生理过程。凡是能够满足微生物生长、繁殖等各种生理活动所需的物质统称微生物营养物质。

(一) 微生物细胞的化学组成

分析微生物细胞的化学成分，发现微生物细胞与其他生物细胞的化学组成并没有本质上的差异。微生物细胞平均含水分 80%左右。其余 20%左右为干物质，在干物质中有蛋白质，核酸，碳水化合物，脂类和矿物质等。这些干物质是由碳，氢，氧，氮，磷，硫，钾，钙，镁，铁等主要化学元素组成，其中碳，氢，氧，氮是组成有机物质的四大元素，大约占干物质的 90%~97%.其余的 3%~10%是矿物质元素，这些矿质元素对微生物的生长也起着重要的作用。

(二) 微生物的营养物质及其生理功能

微生物对营养的要求无论是在元素水平上还是在营养要素水平上，都与动物和植物十分接近，它们之间存在着“营养上的统一性”。在元素水平上需要 20 种左右，其中以碳、氢、氧、氮、磷、硫六种元素为主。在营养要素水平上则主要为碳源、氮源、能源、生长因子、矿质元素和水六大

类。

1、碳源

碳是微生物细胞需要量最大的元素，占细胞干重的 50%。能提供微生物营养所需碳（元）素或碳架的营养物质称为碳源。能被微生物用作碳源的物质种类极其广泛。简单的无机含碳化合物（ CO_2 、 NaHCO_3 和 CaCO_3 等）、比较复杂的有机物（烃类、醇、羧酸、脂肪酸、糖及其衍生物、杂环化合物、氨基酸和核苷酸等）、复杂的有机大分子（蛋白质、脂质和核酸等），乃至复杂的天然含碳物质（牛肉膏、蛋白胨、花生饼粉、糖蜜、石油等）都可以被不同的微生物利用。甚至像二甲苯、酚等有毒的物质都可以被少数微生物用作碳源。

不同营养类型的微生物利用不同的碳源。异养微生物常利用某一类有机物中的一种或几种作为它们的碳源，其中糖类是微生物利用最广泛的碳源。其他微生物或是利用 CO_2 或碳酸盐作为唯一的或主要的碳源，或是利用 CO_2 及简单有机物作为主要碳源。不同微生物利用碳源的范围差异很大，有的微生物范围很广，有的则范围很窄。例如，洋葱伯克霍尔德氏菌可利用 90 多种不同类型的有机物作为碳源，而产甲烷菌绝大多数利用 CO_2 作为碳源，有些也利用甲酸、甲醇和乙酸等作为碳源。

对于为数众多的化能异养微生物来说，碳源是兼有能源功能的双功能营养物。

2、能源

能源是提供微生物生命活动所需能量的物质。绝大多数微生物的能源物质是化学物质（有机物和无机物），只有光合细菌利用光作为能源。对

于绝大多数细菌和全部真核微生物来说，它们所利用的有机碳源在被微生物细胞分解代谢的过程中不仅提供微生物细胞的碳素和碳架，而且还提供微生物生命活动所需的能量。有的微生物所需的能源与碳源不同。如光能自养微生物的能源是光，而碳源为 CO_2 ；化能自养微生物的能源为 NH_4 、 NO_2 、 S 、 H_2 和 Fe 等还原态无机化合物，而碳源是 CO_2 。

3、氮源

氮是微生物细胞需要量仅次于碳的元素，是构成蛋白质和核酸的主要元素，占细菌干重的 12%~15%。能提供微生物所需氮素的营养物质称为氮源。能被微生物用作氮源的物质种类也很广泛。有分子态氮、氨、铵盐和硝酸盐等无机含氮化合物；尿素、氨基酸、嘌呤和嘧啶等有机氮化合物。多数微生物利用无机氮化物，如 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KNO_3 等作为氮源，但它们也可利用有机含氮化合物作为氮源，只有少数固氮微生物（固氮菌、根瘤菌和蓝细菌等）能利用分子态氮（ N_2 ）作为氮源。实验室中常用的氮源有牛肉膏、蛋白胨和酵母膏等。生产上常用的有鱼粉、玉米浆、饼粉（黄豆饼粉和花生饼粉）和蚕蛹粉等。

氮源的主要功能是提供细胞原生质和其他结构物质中的氮素，一般不作为能源使用。但化能自养细菌中的亚硝化细菌和硝化细菌能从 NH_3 和 NO_2 的氧化过程中获得能量，所以对于它们来说， NH_3 和 NO_2 是兼有氮源和能源的双功能营养物质。对于异养微生物而言，含有 C、H、O、N 的有机物是具有碳源、能源和氮源的多功能营养物质。

4、矿质元素

微生物除了需要碳源、能源和氮源之外，还需要磷、硫、镁、钙、钾、

钠、铁、锌、钴、钼、铜、锰、镍和钨等元素。其中元素需要浓度在 10^{-4} ~ 10^{-3} mol/L 范围内的称大量元素；需要浓度在 10^{-8} ~ 10^{-6} mol/L 范围内的称微量元素。前者如磷、硫、镁、钙、钾、钠和铁等；后者如锌、钴、钼、铜、锰、镍和钨等。上述元素大多是以无机盐的形式提供的，故称无机盐或矿物质元素。

无机盐的需要量虽远比 C、N 少，但微生物的生长代谢同样重要。它们的生理功能包括：① 是微生物细胞化学组成中的重要元素之一，如 P 和 S 分别为核酸与含硫氨基酸（半胱氨酸和甲硫氨酸）的重要组成元素；② 与酶的组成和活力有关，如 Fe 是细胞色素氧化酶的必要组分，Mg、Cu 和 Zn 等是许多酶的激活剂；③ 调节和维持微生物的渗透压、氢离子浓度和氧化还原电位等生长条件，如 Na 和 K 有调节细胞渗透压的作用，由磷酸盐组成的缓冲剂能保持微生物生长过程中 pH 值的稳定：谷胱甘肽可降低氧化还原电位；④ 作为某些化能自养细菌的能量物质；⑤ 作为呼吸链末端的氢受体。

5、生长因子

有些微生物的生长除了需要上述营养物之外，还必须补充微量的有机物质才能生长或者生长良好，这些微生物生长必不可少的微量有机物质称为生长因子。通常包括维生素、氨基酸、碱基、卟啉及其衍生物、固醇、胺类等。能提供生长因子的天然物质有酵母膏、蛋白胨、麦芽汁、玉米浆、动植物组织或细胞浸液以及微生物生长环境的提取液等。

生长因子的主要功能是提供微生物细胞重要化学物质（蛋白质、核酸和脂质）、辅助因子（辅酶和辅基）的组分和参与代谢。

多数真菌、放线菌和部分细菌在其生长过程中不需要从环境中获取任何生长因子。而有的微生物需要从环境中获取一种或几种生长因子才能维持正常生长，如乳酸细菌补充需要多种维生素、氨基酸和碱基。少数微生物可合成并大量分泌某些维生素，因此，可用作维生素生产菌，例如，利用阿舒假囊酵母和棉阿舒囊霉生产维生素 B₂。

6、水

实际上水本身并不是营养物质，但水是微生物营养中不可缺少的一种物质。因为水是微生物细胞的主要化学成分；水是营养物质和代谢产物的好溶剂，营养物质与代谢产物都是通过溶解于水中而进出细胞的；水是细胞中各种生物化学反应得以进行的介质，并参与许多生化反应：水还可维持各种生物大分子结构的稳定性；此外，水的比热高，汽化热高，是热的好导体，能有效地吸收代谢过程中产生的热量并将热迅速散发到体外，这保证了细胞内的温度不会剧烈变化。

（三）微生物对营养物质的吸收

微生物和外界的物质交换过程都是在细胞表面进行的，可以说，绝大多数微生物是以整个个体或细胞直接接触营养物质。

微生物细胞表面有细胞壁和细胞膜。利用生物膜的结构特点及其半渗透性，营养物质通过质膜的方式有以下 4 种；

1. 单纯扩散

利用细胞内外溶液浓度差，溶质通过细胞膜上的含水小孔由浓度高的膜外扩散到浓度低的膜内。当膜内外的浓度差相等时，扩散即停止，但膜内的营养物质被不断消耗使膜内外始终存在浓度差。单纯扩散无需消耗能

量，没有载体蛋白参与，没有特异性，不能选择必需的营养物质，扩散速度慢。单纯扩散只限于小分子的物质（膜上的含水小孔的大小决定），如水，容易水的气体—氧气，二氧化碳等。及小极性分子，如尿素，乙醇等。单纯扩散不是微生物吸收营养物质的主要方式。大肠杆菌对钠离子的吸收。

2. 促进扩散

同样利用细胞内外的溶液浓度差，从浓度高的膜外扩散到浓度低的膜内。但不同之处在于溶质的转运需要细胞膜上的载体蛋白参与。载体蛋白通过与溶质的相互作用结合，在膜外时蛋白与溶质的亲和力高，进入细胞后，由于载体蛋白的构型发生改变，使得亲和力降低，从而释放溶质。载体蛋白有高度特异性，每种载体蛋白只运输相应的物质。大多数的载体蛋白为诱导酶，只有外界存在机体生长所需某种营养物质时，运输此物质的诱导酶才合成。同样，促进扩散不需要代谢能量。通过此方法运输的营养物质主要有氨基酸，单糖，维生素，无机盐。多见于真核微生物，在好氧微生物中这种运输机制不太重要。

3. 主动运输

是微生物吸收营养物质的主要方式。不受细胞内外浓度差的限制。需要载体蛋白参与，也是由于载体蛋白构型变化来结合及释放营养物质，不同的是此构型变化需要消耗能量。主要吸收的物质有糖类（乳糖等），氨基酸，核苷，钾离子。

4. 基团转位

前三种吸收方式，营养物质都不发生化学变化。此方法却是使糖类发生磷酸化作用，并以磷酸糖形式存在于细胞质中，可立即进入细胞的合成

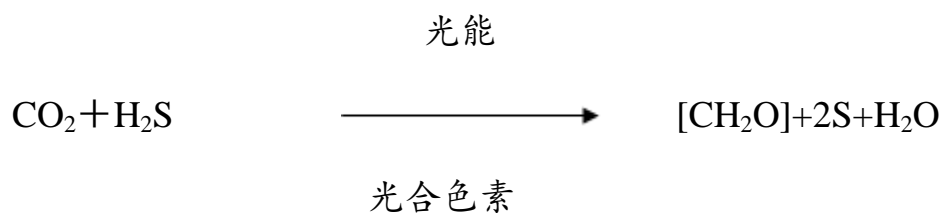
分解。磷酸糖的磷酸来自磷酸烯醇式丙酮酸 PEP。此运输方式由 4 种蛋白构成：EI， EII， EIII， HPr。EI， EIII 与 HPr 存在于细胞质中，（EIII 只有在少数细菌中发现，）EII 存在于细胞膜中。EII， EIII 对糖具有特异性，EI 与 HPr 为非专一性成分，起能量传递作用。在糖的运输中，PEP 的磷酸以高能共价键结合到 EI 的组氨酸上，EI 携带的磷酸又转移到 HPr 上，从 HPr 上又转移到 EIII 上（无 EIII 则略过），磷酸在 EII 的作用下转移到糖上，完成糖类的磷酸化进入细胞质中。此方式需消耗能量，需载体蛋白参与。细胞膜对大多数磷酸化化合物都有高度不渗透性，磷酸糖一旦形成就不会渗透出细胞。多存在于厌氧及兼性厌氧微生物中。运输糖及糖的衍生物，核苷，脂肪酸。

（四）微生物的营养类型

微生物在长期进化过程中，由于生态环境的影响，逐渐分化成各种营养类型。根据微生物要求碳源的性质和能量来源不同将微生物分为光能自养型、光能异养型、化能自养型和化能异养型。

1.光能自养型微生物

以 CO₂ 作为唯一碳源或主要碳源，并利用光能，以无机物如硫化氢、硫代硫酸钠或其他无机硫化物作为供氢体将 CO₂ 还原成细胞物质，同时产生元素硫

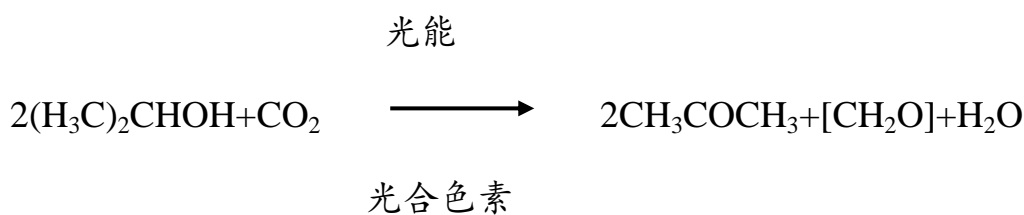


光能自养型微生物包括蓝细菌（含叶绿素）、红硫细菌和绿硫细菌等

少数微生物（含细菌叶绿素），由于含有光合色素，因而能使先能转变成化学能（ATP），供机体直接利用。

2. 光能异养型微生物

以 CO₂ 为主要碳源或唯一碳源，以有机物（如异丙醇）作为供氢体，利用光能将 CO₂ 还原成细胞物质，红螺菌属中的一些细菌属于此种营养类型。



光能异养型细菌在生长时大多数采要外源的生长因子。

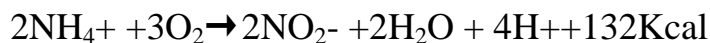
3. 化能自养型微生物

以 CO₂ 或碳酸盐作为唯一或主要碳源，以无机物氧化释放的化学能为能源，，利用电子供体如氢气、硫化氢、二价铁离子或亚硝酸盐等使 CO₂ 还原成细胞物质。

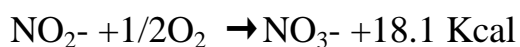
这类微生物主要有硫化细菌、硝化细菌、氢细菌与铁细菌。它们在自然界物质转换过程中起着重要的作用。

1. 硝化细菌:

亚硝化细菌



硝化细菌



4. 化能异养型微生物

多数微生物属于化能异养型，其生长所需要能量和碳源通常来自同一种有机物。

根据化能异养型微生物利用有机物的特性，又可以将其分为下列类型：

- 1、腐生型微生物：利用无生命活性的有机物作为生长的碳源。
- 2、寄生型微生物：寄生在生活的细胞内，从寄生体内获得生长所需要的营养物质。
- 3、存在于寄生与腐生之间的中间过渡类型微生物，称为兼性腐生型或兼性寄生型。

二、微生物的生长

（一）微生物的生长规律

微生物的生长规律和大生物有些不同，大生物通常是以一个个体为对象，而微生物的生长通常指细胞数目的增加。如果把单细胞的微生物接种到体积一定的液体营养液中，在适宜的培养条件下进行培养，这些单细胞微生物就会不断增殖，细胞数目会不断增加，如果把这种增加情况画一个对数曲线，就呈现出一定的规律，叫做单细胞微生物的生长曲线。其纵坐标为每毫升培养液中微生物细胞数目的对数，横坐标为培养时间。

生长曲线代表细菌在一个新的适宜的环境中生长繁殖以至衰老死亡的全部过程的动态。

微生物生长曲线

在细菌的对数生长期，有几个重要的指标用来反映微生物生长的情况。
分裂的次数：以 n 表示，即一个单细胞微生物一分为二的次数。生长速率常数：以 R 表示，指每小时细胞分裂的次数。代时：以 G 表示，指细胞每

分裂一次所需要的时间。

微生物典型生长曲线可分为以下4个时期：

(1) 延滞期：细菌一般不分裂，代谢活跃，大量合成细胞分裂所需的酶类、ATP及其他细胞成分

(2) 对数期：快速分裂(2^n)，代谢旺盛，形态及生理特性比较稳定，常作为生产菌种和科研的材料

(3) 稳定期：繁殖速率与死亡速率相等(营养消耗、有害代谢产物积累、PH变化)活菌数目最多，代谢产物尤其是次级代谢产物积累，某些细菌开始形成芽孢

(4) 衰亡期：死亡速率大于繁殖速率，细胞会出现多种形态，有些细菌开始解体，释放出代谢产物等

第二节 微生物的人工培养

影响微生物生长的理化因素

生长是微生物与外界环境因素共同作用的结果。在一定限度内环境因子变化会引起微生物形态、生理或遗传特性发生变化。但超过一定限度的环境因子变化，常常导致微生物死亡。反之，微生物在一定程度上也能通过自身活动，改变环境条件，以适合于它们的生存和发展。影响微生物生长的环境条件主要有物理、化学和生物因子。

1. 温度

温度是影响微生物生长与存活的最重要环境因素之一。它对生活机体

的影响表现在两方面：一方面随着温度的上升，细胞中的生物化学反应速率和生长速率加快。在一般情况下，温度每升高 10°C ，生化反应速率增加一倍；另一方面，机体的重要组成如蛋白质、核酸等对温度都较敏感，随着温度的增高而可能遭受不可逆的破坏。因此，只有在一定范围内，机体的代谢活动与生长繁殖才随着温度的上升而增加，当温度上升到一定程度，开始对机体产生不利影响，如再继续升高，则细胞功能急剧下降以至死亡。就总体而言，微生物生长的温度范围较广，已知的微生物在零下 $12-100^{\circ}\text{C}$ （或更高）均可生长。而每一种微生物只能在一定的温度范围内生长。各种微生物都有其生长繁殖的最低温度、最适温度、最高温度和致死温度。

最低生长温度：是指微生物进行繁殖的最低温度界限，如果低于此温度，则生长完全停止。

最适生长温度：能够使微生物迅速生长繁殖的温度叫做最适生长温度，在此温度下，微生物群体生长繁殖速度最快，代时最短。不同微生物的最适生长温度是不一样的。

最高生长温度：是指微生物生长繁殖的最高温度界限。

致死温度：最高生长温度若进一步升高，便可杀死微生物，这种致死微生物的最低温度界限即为致死温度，致死温度与处理时间有关。

根据不同微生物对温度的要求和适应能力，按其生长温度范围可分为低温微生物、中温微生物和高温微生物三类。

2. 氢离子浓度

环境中的酸碱度通常以氢离子浓度的负对数即 pH 值来表示。

环境中的 pH 值对微生物的生命活动影响很大，主要作用在于：

①起细胞膜电荷的变化，从而影响了微生物对营养物质的吸收；如在酸性环境中，乙酸能进入细胞，而在中性或碱性环境中，乙酸离子化，不能进入细胞。②影响代谢过程中酶的活性；③改变生长环境中营养物质的可给性以及有害物质的毒性。

每种微生物都有其最适 pH 值和一定的 pH 范围，因此环境的酸碱度对微生物生长也有重要影响。就总体而言，微生物能在 pH1~11 的范围内生长，但不同种类微生物的适应能力各异。每一种微生物都有其最适 pH 值和能适应的 pH 范围。在最适 pH 范围内酶活性最高，如果其他条件适合，微生物的生长速率也最高。已知大多数细菌、藻类和原生动物的最适 pH 为 6.5-7.5，在 pH4-10 之间也可以生长（即适宜范围为 pH4.0~10.0；）；放线菌一般在中性至微碱性为宜即 pH7.0-8.0 最适合；酵母菌、霉菌等真菌则适合于 pH5.0-6.0 的酸性环境，但生存范围在 pH1.5-10 之间。有些细菌甚至可在强酸性或强碱性环境中生活。不管微生物对环境 pH 的适应性多么不同，任何生物细胞内的 pH 值都近于中性，这就不难理解为什么胞内酶的最适 pH 要近于中性而胞外酶要近于环境了。

3.氧化还原电位

氧化还原电位 (E_h) 对微生物生长有明显影响。环境中 E_h 值与氧分压有关，也受 pH 的影响。pH 值低时，氧化还原电位高；pH 值高时，氧化还原电位低。

各种微生物生长所要求的 E_h 值不一样。一般好氧性微生物在 E_h 值 +0.1 伏以上均可生长，以 E_h 值为 +0.3 伏~+0.4 伏时为适。厌氧性微生物只能在 E_h 值低于 +0.1 伏以下生长。兼性厌氧微生物在 +0.1 伏以上时进行好氧呼

吸，在+0.1 伏以下时进行发酵。

4. 水分

水分是微生物的正常生命活动必不可少的。干燥会导致细胞失水而造成代谢停止以至死亡。微生物的种类，环境条件，干燥的程度等均影响干燥对微生物的效果。休眠孢子抗干燥能力也很强，在干燥条件下可长期不死，这一特性已用于菌种保藏，如用砂土管来保藏有孢子的菌种。在日常生活中也常用烘干、晒干和熏干等方法来保存食物。

渗透压

水或其他溶剂经过半透性膜而进行扩散的现象就是渗透。在渗透时溶剂通过半透性膜时的压力即谓渗透压。其大小与溶液浓度成正比。微生物细胞通常具有比环境高的渗透压，因而很容易从环境中吸收水分。除极端的生态条件以外，适合于微生物生长的渗透压范围较广，而且它们往往对渗透压有一定的适应能力。突然改变渗透压会使微生物失去活性，逐渐改变渗透压，微生物常能适应这种改变。低渗溶液除能破坏去壁的细胞原生质体的稳定性以外，一般不对微生物的生存带来威胁。对一般微生物来说，它们的细胞若置于高渗溶液中，高渗环境会使细胞原生质脱水而发生质壁分离，因而能抑制大多数微生物的生长，甚至使细胞不能生长而死亡。

5. 辐射

辐射是以电磁波的方式通过空间传递的一种能量形式。电磁波携带的能量与波长有关，波长愈短，能量愈高。不同波长的辐射对微生物生长的影响不同。它们或是离子或是电磁波。电磁辐射包括可见光、红外线、紫外线、X射线等。

(1) 紫外线(UV)

紫外辐射:紫外线的波长范围是 136~397nm,系非电离辐射。紫外线有较强的杀菌和诱变作用,其最强作用波段为 265~266nm,这也是核酸的最大吸收峰波段。紫外辐射对微生物有明显的致死作用,是强杀菌剂,紫外杀菌灯管在医疗卫生和无菌操作中广泛应用。紫外线的主要作用:使细胞核酸和原生质发生光化学反应,导致相邻的胸腺嘧啶(T)形成二聚体,形成嘧啶水合物和使 DNA 发生断裂和交联,从而干扰核酸的复制。进而导致微生物的变异和死亡。紫外线的作用效果也取决于微生物类群、生理状态和照射剂量。一般多倍体、有色细胞、干燥细胞、分生孢子或芽孢比单倍体、无色细胞、湿细胞和营养细胞的抗性要强。紫外线的穿透能力很弱,多用作空气或器皿的表面灭菌及微生物育种的诱变剂。在照射后为避免发生光复活现象,紫外线照射及随之要进行的分离培养工作应在黑暗条件下进行。

(2) 电离辐射:包括 X 射线、 α 射线、 β 射线和 γ 射线等。在足够剂量时,对各种细菌均有致死作用。它们的共同特点是波长短、能量大,能使被照射的物质分子发生电离作用产生自由基,自由基能与细胞内的大分子化合物作用使之变性失活。 α 射线是带正电的氦核流,有很强的电离作用,但穿透能力很弱。 β 射线是带负电荷的电子流,穿透力虽大,但电离辐射作用弱。放射性同位素 ^{60}Co 能产生 γ 射线杀菌,可用于不耐热食品、塑料制品及草炭吸附剂等的灭菌。

6. 超声波

超声波是振动频率超过 2 万 Hz 的声波。超声波具有强烈的生物学作用。超声波的作用是通过强烈的振动使细胞破裂,所以几乎所有的微生物都能

受其破坏，致使细胞内含物外泄而死亡。超声波的破碎效果与处理功率、频率、次数、时间、微生物类型、细胞大小、形状数量及其生理状态等因素均有关系。一般球菌的抗性比杆菌强，病毒由于颗粒小结构简单，对超声波也有较强的抗性。芽孢的抗逆性强，几乎不受超声波处理的影响。在实验和研究工作中我们常用超声波来破碎细胞以分离细胞成分或用于免疫化学研究，由于超声波处理的同时会产生大量的热，为防止细胞蛋白质等成分的变性，超声波处理一般应在冰浴上进行，并作短时间的多次处理。

7. 化学药剂

能直接干扰病原微生物的生长繁殖并可用于治疗感染性疾病的化学药物即为化学药剂。它能选择性地作用于病原微生物新陈代谢的某个环节，使其生长受到抑制或致死。但对人体细胞毒性较小，故常用于口服或注射。化学药剂种类很多，按其作用与性质又分为抗代谢物和抗生素等。

二、培养基的概念及其分类

培养基的概念

培养基是指人工配制的、适合于微生物生长繁殖或累积代谢产物所需的各种营养物的混合基质。

培养基的分类

由于各类微生物对营养的要求不同，培养目的和检测需要不同，因而培养基的种类很多。我们可以根据某种标准，将种类繁多的培养基划分为若干类型。

(一) 根据培养基营养成分的来源划分

1. 天然培养基

它是利用各种动物、植物、微生物或其他天然成分为营养基质而制成的，常用的原料有牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、米曲汁、麦芽汁、玉米粉、麸皮、马铃薯、血清、各种饼粉等。

实验室常用的有：麦芽汁培养基、牛肉膏蛋白胨培养基等。

2.合成培养基

合成培养基是用已知成分和数量的化学药品配制而成的培养基。

实验室常用的有：高氏1号培养基、查氏培养基等。

3.半合成培养基

以天然有机物作为碳、氮等主要营养源，用化学试剂补充无机盐配制而成的培养基称为半合成培养基。

如马铃薯蔗糖培养基。

(二) 根据培养基的物理状态划分

1、液体培养基：把各种营养物质定量溶解于水中，调节适宜的 pH，即制成了液体培养基。特点：营养成分均匀分布。如营养肉汤培养基。

2、固体培养基：在液体培养基的基础上加入适量凝固剂而制成的，其中琼脂是应用最为广泛、最优良的凝固剂。

3、半固体培养基：如果在液体培养基只加入少量的凝固剂如 0.2%~1% 琼脂，就制成了半固体培养基。

(三) 根据培养基的用途划分

根据微生物培养过程中的增菌、选择、鉴别、运输、保存、复苏等工作目标不同，可选用相应的培养基。

1、增菌培养基：能够给微生物提供较适当的生长环境从而使微生物大

量繁殖的培养基称为增菌培养基。

2、选择培养基：在培养基中加入抑制剂以杀死或抑制不需要的菌种，分离对象因对改抑制剂有抗性而正常生长繁殖的培养基，称之为选择培养基。

3、鉴别培养基：在培养基中加入指示剂或化学药品，目的菌经培养后其代谢产物与化学试剂发生显色反应，因而用肉眼可快速鉴别出目的菌，这样的培养基称之为鉴别培养基。如：伊红美蓝培养基（EMB）就是一种常用的鉴别性培养基。

4、活体培养基：病毒、立克次体等专性寄生微生物不能在一般培养基上生长，常用鸡胚、活细胞和动物培养。

5、其他用途的培养基：根据培养基的营养成分是否“完全”，可以分为基本培养基、完全培养基和补充培养基。此外，还有用于一定期限内保护和维持微生物活力的保存培养基；能够使受损或应激的微生物恢复正常生长能力，但不一定促进微生物繁殖的复苏培养基等。

二、选用或设计培养基的基本原则

（一）符合工作目标的要求

根据不同的菌种及其不同的培养目的从现成的培养基配方选用，或有的放矢地设计搭配营养成分及营养比例。

（二）符合微生物的营养特点

培养基中各种营养成分及比例关系主要是依据微生物细胞的化学组成分析而确定。

（三）符合菌种对理化环境的要求

除营养成分外，培养基的 pH 值、渗透压等理化条件也直接影响微生物的生长和代谢，在配制培养基时也不能忽视这些因素。

1、pH 值

微生物都有它们生长适宜的 pH 范围，一般细菌在 pH7~8，酵母菌为 pH3.8~6.0，霉菌为 pH4.0~5.8。

2、渗透压

环境中的渗透压与微生物细胞原生质的渗透压在等渗条件下最适宜微生物的生长。

(四) 符合物美价廉的原则

在所选培养基成分能够满足微生物培养要求的前提下，尽可能选用价格低廉、资源丰富、运输方便、无毒性的材料作培养基成分。

思考题

- 1、固体培养基加入琼脂后加热熔化时要注意哪些问题？
- 2、培养基配制好后，为什么要立即灭菌？如何检查灭菌是否彻底？

第三节 微生物鉴别的一般方法

微生物鉴别的一般方法

- 1.个体形态结构
- 2.群体培养特征
- 3.生理生化试验
- 4.血清学检测

一、个体形态结构

细胞形态在显微镜下观察细胞外形大小、形状、排列等；

细胞构造；革兰氏染色；能否运动、鞭毛着生部位和数目；有无芽孢和荚膜、芽孢的大小和位置；

真菌的繁殖器官的形状、构造；孢子的数目、形状、大小、颜色和表面特征等。

1.染色技术

强化观察对象与背景的反差

细菌透明，染色后才易于观察。

细菌等电点较低，pH 值大约在 2-5 之间，故在中性、碱性或弱酸性溶液中，菌体蛋白质电离后带阴电荷；而碱性染料电离时染料离子带阳电。因此，带阴电的细菌常和带阳电的碱性染料进行结合。所以，在细菌学上常用碱性染料进行染色。

单染色法：只用一种染料染色，也称普通染色法。用于微生物形态的观察。

复染色法：用两种或多种染料染色，也称鉴别染色法。用于微生物鉴别。

另外，分为简单染色、革兰氏染色、抗酸染色法、特殊染色法、芽孢染色、荚膜染色、鞭毛染色、酵母菌的活菌染色

2.显微技术

显微镜的构造

显微镜的基本构造包括两大部分，光学系统和机械系统，机械系统有镜座，镜臂，镜筒，物镜，转换器，载物台，调焦螺旋，聚光器调节螺旋。

光学系统有物镜，目镜，反光镜，聚光器，光圈。

物镜是决定显微镜质量好坏的重要部件，放大倍数有 4，10，40，油镜 100 倍，目镜放大倍数有 5，10，16 倍。

在一定的固体培养基上生长的菌落特征，包括外形、大小、光泽、粘稠度、透明度、边缘、隆起情况、正反面颜色、质地、气味、是否分泌水溶性色素等；

在一定的斜面培养基上生长的菌苔特征，例如半固体培养基上经穿刺接种后的生长情况；

在液体培养基中生长情况，包括是否产生菌膜、均匀混浊、还是发生沉淀？有无气泡、培养基的颜色等。

1、利用物质的能力

对各种碳源利用的能力(能否以 CO_2 为唯一碳源、各种糖类的利用情况等)

对各种氮源的利用能力（能否固氮、硝酸盐和铵盐利用情况等）

能源的要求（光能还是化能、氧化无机物还是氧化有机物等）

对生长因子的要求（是否需要生长因子以及需要什么生长因子等）。

2、代谢产物的特殊性

例如是否产生 H_2S 、吲哚、 CO_2 、醇、有机酸、能否还原硝酸盐、能否使牛奶凝固、冻化等等。

3、与温度和氧气的关系

测出适合某种微生物生长的温度范围以及它的最适温度、最低温度和最高温度。

对氧气的关系，是看它好氧、微量好氧、兼性好氧、耐氧还是专性厌氧。

鉴别肠道细菌的常用生化反应。绝大多数细菌都能利用糖类作为碳源和能源，但是它们在分解糖的能力上有很大的差异，例如大肠杆菌能分解乳糖和葡萄糖产酸并产气；普通变形杆菌分解葡萄糖产酸产气，不能分解乳糖。

大肠杆菌：产酸产气

大肠杆菌分解糖类产生多种有机酸，使培养液呈酸性；产生的甲酸在酸性条件下可进一步裂解生成 H_2 和 CO_2 ，发酵产酸时，溴甲酚紫指示剂由紫色(pH6.8)变为黄色(pH5.2)；气体的产生可由倒置的德汗氏小管中有无气泡来证明。

IMViC 试验

IMViC 是吲哚试验 (indol test)、甲基红试验 (methyl red test)、伏-普试验 (Voges-Prokauer test) 和柠檬酸盐试验 (citrate test) 四个试验的缩写。这四个试验主要用来鉴别大肠杆菌与产气肠杆菌，而且主要是用于水的细菌学检查，因为大肠杆菌是条件致病菌，但在饮水中若大肠杆菌超过一定数量则表示受粪便污染，而产气肠杆菌则广泛存在于自然界中，因此，检查水时要将二者区分开来。

吲哚试验：用来检测细菌对色氨酸的利用能力。有些细菌能产生色氨酸酶，分解蛋白胨中的色氨酸产生吲哚和丙酮酸，吲哚本身无色，不能直接观察到，当加入对二甲基氨基苯甲醛试剂时，可形成红色的玫瑰吲哚。

甲基红试验：用来检测细菌发酵葡萄糖的产酸能力。当细菌代谢糖大

量产酸时，就会使加入培养基中的甲基红指示剂由橘黄色（pH6.3）变为红色（pH4.2），即甲基红反应阳性。

伏-普试验

柠檬酸盐试验：用来检测细菌利用柠檬酸的能力。有些细菌能分解柠檬酸形成 CO_2 ，由于培养基中钠离子的存在而形成碳酸钠，使 pH 升高，当用溴麝香草酚蓝作为指示剂时，培养基颜色发生变化。溴麝香草酚蓝变色范围为，pH6.0-7.6 呈绿色，pH>7.6 时呈蓝色。

同种不同型的微生物，需借助血清学技术，即利用抗原与抗体的高度敏感特异性反应，来进行鉴别，从而划分不同血清型菌株或毒株抗原与相应抗体结合形成复合物，在有电解质存在下，相互凝聚形成肉眼可见的凝聚小块或沉淀物，根据是否产生凝聚现象来判定相应抗体或抗原，称为凝聚性试验根据参与反应的抗原性质不同，分为由颗粒性抗原参与的凝集试验和由可溶性抗原参与的沉淀试验两大类。

课程名称	化妆品微生物及检验技术	专业班级	化妆品 241、化妆品 (3+) 241
教材名称	化妆品微生物检验技术		
授课题目	第三章 消毒与灭菌		
授课学时	2 节 () ; 3 节 () ; 其它 (6 学时)		
课 型	理论 (<input checked="" type="checkbox"/>) ; 实验 () ; 见习 () ; 实训 () ; 其它 ()		
教学目的	1. 掌握消毒、灭菌等概念、原理及工作条件。 2. 了解消毒灭菌的不同方法及其适用范围。 3. 掌握几种常用的消毒灭菌技术。 4. 具有高度的责任心、注重细节、严谨认真的职业素养。		
思政目标	根据教材, 分享事例“丢失一个钉子, 亡了一个帝国”的故事, 强调消毒与灭菌技术在于注意细节, 培育学生养成注重工作细节, 增强敬业精神和责任感。		
教学重点	1. 掌握消毒、灭菌等概念。 2. 掌握物理、化学消毒灭菌法。		
教学难点	1. 熟悉物理、化学消毒灭菌的种类、方法。 2. 高压蒸汽灭菌法的原理。		
教学方法	讲授 (<input checked="" type="checkbox"/>) ; 讨论 () ; 指导 () ; 示教 () ; 其它 ()		
电子教案	有 (<input checked="" type="checkbox"/>)	Microsoft PowerPoint (<input checked="" type="checkbox"/>) ; Author ware () ; 其它 ()	
	无 ()		
教学资源	多媒体 (<input checked="" type="checkbox"/>) ; 模型 () ; 标本 () ; 实物 () ; 音像 () ; 其它 ()		
教学过程 时间安排	第一节 物理消毒灭菌法 (2 学时) 第二节 化学消毒灭菌法 (2 学时) 第三节 高压蒸汽灭菌法的灭菌效能验证 (2 学时)		
思考题	1. 化学消毒剂在化妆品生产中的应用。		
作 业	1. 高压蒸汽灭菌法原理与步骤 2. 在同一温度下, 为什么湿热的杀菌效力比干热大?		
教学后记			

第三章 消毒与灭菌

教学内容：

借助于不同的消毒和灭菌技术手段，可不同程度地减少或完全杀灭环境中的微生物，这是从事微生物工作的基础。

消毒灭菌的相关概念

1. 灭菌 应用物理或化学的方法杀死或除去物品上或环境中的所有微生物称为灭菌。

2. 消毒 应用物理或化学的方法杀死物体上或环境中绝大部分微生物(特别是病原微生物)。

3. 无菌 指没有具有生命力的微生物存在的意思。

第一节 物理消毒灭菌法

一、热力消毒灭菌法

物理灭菌温度的代表——高温

高温杀菌的机理

高温对微生物有明显的致死作用，高温可直接破坏菌体蛋白、核酸及酶系统，导致菌体死亡。所以，高温常用于消毒灭菌。

高温灭菌分为干热灭菌和湿热灭菌两类方法。

(一) 干热灭菌法

1、火焰灭菌法

用火焰直接烧死物体中的全部微生物,是一种最彻底的灭菌法。

烧灼

只能用于耐烧物品,如接种环、金属器具、试管口、瓶口等。

焚烧

可用于烧毁患传染病的动物尸体、病畜的垫料及其它污染废弃物等。

2、热空气灭菌法

又称干烤灭菌,是在干烤箱中用热空气灭菌。该法以辐射传热,穿透性差,需用较高温度及较长时间。

主要用于玻璃器皿、瓷器、金属器械等的灭菌。

通常用 160~170℃维持 2h,能杀死一切微生物及芽孢。

(二) 湿热灭菌(消毒)法

煮沸

高压蒸汽灭菌法

巴氏消毒法

间歇灭菌法

流通蒸汽灭菌法

1、煮沸

煮沸 15~20min 可杀死细菌的繁殖体、真菌和病毒,但杀不死芽孢。

此法常用于刀剪、注射

器、针头及橡胶制品的消毒。

2、高压蒸汽灭菌法

即利用高压蒸汽灭菌器(高压锅)灭菌,是应用最广、最有效的灭菌

法。

用 103.4kPa (温度为 121.3°C) 维持 15~20min, 可杀死一切微生物及芽孢。

一切耐高温的物品均可用此法灭菌。

3、巴氏消毒法

用于液态食品的一种消毒方法, 主要用于牛奶、啤酒、果酒、葡萄酒和一些饮料。

特点:

是尽可能利用较低的温度和较短的时间, 最大限度的杀死食品中的病原菌和一般杂菌, 同时又不致严重损害其营养成分和风味。

巴氏消毒的三种方法:

①低温维持法

62~65°C 维持 30min

②高温瞬时法

71~72°C 保持 15s

③超高温瞬时法

132°C 保持 1~2s

二、辐射灭菌法

(一) 非电离辐射

包括:

紫外线

红外线

微波

1、紫外线

波长 200~300nm 的紫外线具有杀菌作用，其中 254 ~ 256nm 杀菌力最强。

杀菌机理：

主要是破坏菌体细胞内 DNA 的构型，使 DNA 分子中间形成胸腺嘧啶二聚体，干扰 DNA 的复制过程，造成微生物的死亡，此外，紫外线也能破坏菌体蛋白和酶。

缺点：穿透力差，普通玻璃、尘埃等均可阻挡紫外线，所以，紫外线只适合空间及物体表面的消毒，如无菌室、手术室等空间、墙壁及实验台表面的消毒。

(二) 电离辐射

包括放射性同位素的射线（ α 、 β 、 γ 射线）、X 射线等。

α 、 β 、 γ 射线及 X 射线照射，小计量可诱发微生物变异，大计量具有抑菌及杀菌作用。

在实际工作中主要是用 X、 β 、 γ 射线，用于消毒、食品保鲜和微生物育种等方面。

三、超声波

超声波几乎对所有的微生物都有杀灭作用，主要是以机械作用和氧化作用破坏菌体细胞壁、细胞膜，使内容物逸出。因此，可用超声波裂解菌体细胞，研究菌体的构造、化学组成、核酸、抗原、酶等。也可用超声波从组织中提取病毒。

四、滤过除菌

是通过机械阻留作用除去液体及气体中的细菌，所用装置叫滤器。滤器上含有很多微细小孔，可使液体及气体通过，细菌等大于孔径的物体不能通过，借以获得无菌液体及气体。

用途：

滤过除菌主要用于不耐高温的物体，如血清、毒素、抗毒素、酶、抗生素、维生素、氨基酸及特殊培养基等的除菌。

滤器不能除去病毒、支原体和 L 型细菌。

滤器的种类与型号：

滤器的种类很多，每种又有许多不同的型号，型号的区别主要是滤膜孔径大小不同。

除菌滤器的孔径一般为 $0.2\sim 0.22\ \mu\text{m}$ ，实验室常用耐酸玻璃滤器、可更换滤膜的滤器和微孔滤膜。

五、低温抑菌法

大多数微生物对低温有很强的抵抗力，在低温条件下微生物的代谢活动降低到最低水平，生长繁殖停止，但仍可长时间保持活力。所以，低温主要用于保存微生物

如： $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 保存细菌

-20°C 以下保存病毒

低温保存微生物要注意以下三点：

1、有少数细菌和病毒对低温特别敏感，如淋球菌、巴氏杆菌在 4°C 保存比室温保存死亡更快，疱疹病毒在 -20°C 保存比 4°C 死亡更快。

2、反复冻融容易引起微生物死亡。

3、冷冻保存细菌时，温度必须迅速降低，以免菌体内的水分形成结晶冰而损伤细胞膜。

第二节 化学消毒灭菌法

一、化学消毒剂及防腐剂

消毒剂 用于杀灭病原微生物的化学药物

防腐剂 也称抑菌剂，是用于抑制微生物生长繁殖的化学药物

二者统称消毒防腐剂

化学消毒防腐剂的种类：

根据对菌体的作用大致可分为：

- ①使菌体蛋白变性或凝固的，如酚类（高浓度）、醇类、重金属盐类（高浓度）、酸碱类、醛类
- ②损伤细胞膜的，如酚类（低浓度）、表面活性剂、醇类等脂溶剂
- ③干扰细菌酶系统和代谢的，如某些氧化剂、重金属盐类（低浓度）
- ④改变核酸功能的，如染料、烷化剂等

使用方法：

化学消毒剂于防腐剂不仅可杀死病原菌，同时对动物的组织细胞也有损害作用，所以它只能外用，用于体表、环境及物体的消毒。

浸泡

擦拭

气体熏蒸

喷雾及喷洒等

选药原则:

在实际工作中应根据用途与消毒剂的特点来选择药品、使用方法和浓度。最理想的消毒剂应是杀菌力强、价格低、无腐蚀性、能长期保存、对动物无毒性或毒性较小、无残留或对环境无污染的化学药品。

二、影响消毒剂作用的因素

影响消毒剂作用的因素主要有四个方面:

- 1、消毒剂的性质
- 2、消毒剂的浓度
- 3、作用时间与其他环境条件
- 4、微生物的种类

三、化学治疗剂

用于消除动物体内病原微生物或其他寄生物的化学药品称化学治疗剂(chemo-therapeutic agent)。如磺胺类药物、呋喃类药物和其他抗代谢药物。

这些药物的作用有较强的选择性,主要作用于病原微生物,而对机体毒副作用较小,主要用于临床治疗。

关于化学性试剂的药效和毒性的指标

1、最低抑制浓度:评定某化学药物药效强弱的指标。指在一定的条件下,某化学药剂抑制特定微生物的最低浓度。

2、半致死量:评定某药物毒性强弱的指标。指在一定条件下,某化学药剂能杀死 50% 实验动物时的剂量。

3、最低致死量:评定某药物毒性强弱的另一指标。指在一定条件下,

某化学药剂能引起实验动物群体 100%死亡率的最低剂量。

第三节 高压蒸汽灭菌法的灭菌效能验证

高压蒸汽灭菌法是从事微生物相关工作最常用的灭菌方法，其灭菌效果直接影响到微生物试验的成败及化妆品的卫生质量，为此实践中除了定期对高压蒸汽灭菌器各仪器物理参数进行验证外，还要进行灭菌效能验证。

灭菌效能验证的基本原理是采用灭菌指示剂法测定在设定的灭菌参数下经过一个灭菌周期，灭菌对象是否达到无菌要求，以此评价其灭菌效能是否符合规定。

一、试验器材

高压蒸汽灭菌法灭菌指示剂

1.化学指示剂：121℃高压蒸气灭菌化学指示卡，灭菌前黄色，灭菌后黑色；或 121℃灭菌指示管，管内装苯甲酸（熔点 121~133℃），灭菌前后苯甲酸的形状发生改变。化学指示剂不够准确，主要用于日常监控。

2.生物指示剂：嗜热脂肪杆菌芽胞（ATCC 7953）菌片，含菌量为 $1.0\sim 5.0\times 10^6$ CFU / 片。生物指示剂能真实反映灭菌是否彻底，用于灭菌效能验证或日常监控。

培养基

溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨水培养基，用于压力蒸汽消毒过程检测指示菌（嗜热脂肪杆菌芽胞）的培养及消毒效果测定。

二、确定灭菌参数

基准被灭菌物品、装载方式（达满载要求）、生物指示剂放置数量和

方式、灭菌参数（灭菌温度、压力、时间）。

三、验证步骤

装料

——满载

按设定的装载方式放置基准被灭菌物品，同时放置灭菌指示剂，单层灭菌器放 5 份，每份含 1 片嗜热脂肪杆菌芽胞菌片，分别在上、中、下、左、右位置各放一份；双层的则放 10 份，靠近蒸汽出口、出水口、底部排气口，灭菌物品最难达到灭菌条件的位置可以视情况增加放置点。

灭菌

按高压蒸汽灭菌器的说明或设定的参数（包括装载方式、装载量、灭菌温度、压力和时间）及操作规程操作，运行一个灭菌周期。

灭菌结果检查

灭菌结束后，降压至 0 即可取出物品，收集指示芽胞片。将芽胞片分别接种于含溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨水培养基管中，置 56℃培养 48h 至 5d。

培养基紫色未变，且未灭菌阳性对照菌片的回收菌量达 $1.0\sim 5.0\times 10^6\text{CFU/片}$ ，只含培养基的阴性对照无菌生长，说明培养基中无菌生长，芽孢已完全杀灭，在设定条件下灭菌器灭菌效果符合要求。

若培养基由紫色变黄色，说明培养基中有菌生长，芽孢未完全杀灭，灭菌效果不符合要求。

验证结果评价

若各芽胞片培养结果均无菌生长，说明设定的灭菌参数下灭菌器灭菌

效能符合规定。若任一芽孢片培养结果有菌生长则说明该灭菌参数下灭菌器的灭菌效能不符合规定

高压灭菌器属于强检仪器，但强检只是对仪器物理参数的考核。所以做过强检的灭菌器还必须进行灭菌效果的验证。

思考题：高压蒸汽灭菌法原理与步骤

课程名称	化妆品微生物及检验技术	专业班级	化妆品 241、化妆品 (3+) 241
教材名称	化妆品微生物检验技术		
授课题目	第四章 化妆品生产环节的微生物监控		
授课学时	2 节 () ; 3 节 () ; 其它 (6 学时)		
课 型	理论 (<input checked="" type="checkbox"/>) ; 实验 () ; 见习 () ; 实训 () ; 其它 ()		
教学目的	<ol style="list-style-type: none"> 1. 了解化妆品微生物防控的重要意义。 2. 掌握化妆品生产过程的微生物防控要素。 3. 掌握化妆品生产过程环境洁净度要求。 4. 掌握化妆品生产过程微生物监测通则。 5. 掌握化妆品微生物防控的基本原则。 		
思政目标	根据教材, 介绍生产环节洁净度等级要求, 强调 10 万级洁净区标准不仅是技术指标, 更是对消费者皮肤健康的庄严承诺, 培育学生养成精益求精的工匠精神。		
教学重点	<ol style="list-style-type: none"> 1. 化妆品生产过程的微生物防控涉及的 4 要素 5 对象。 2. 化妆品生产过程环境洁净度要求。 3. 化妆品生产过程微生物监测通则。 4. 化妆品微生物防控的基本原则。 		
教学难点	<ol style="list-style-type: none"> 1. 掌握化妆品生产过程的微生物防控涉及的 4 要素 5 对象。 2. 理解化妆品生产过程环境洁净度要求。 3. 熟悉化妆品生产过程微生物监测通则。 		
教学方法	讲授 (<input checked="" type="checkbox"/>) ; 讨论 () ; 指导 () ; 示教 () ; 其它 ()		
电子教案	有 (<input checked="" type="checkbox"/>)	Microsoft PowerPoint (<input checked="" type="checkbox"/>) ; Author ware () ; 其它 ()	
	无 ()		
教学资源	多媒体 (<input checked="" type="checkbox"/>) ; 模型 () ; 标本 () ; 实物 () ; 音像 () ; 其它 ()		
教学过程 时间安排	第一节 化妆品的微生物防控概述 第二节 化妆品生产过程的微生物控制 (2 学时) 第三节 化妆品生产过程的微生物监测 (2 学时) 第四节 化妆品的微生物防控实务 (2 学时)		
思考题	1. 简述化妆品生产过程微生物监测通则主要内容。		
作 业	<ol style="list-style-type: none"> 1. 简述化妆品微生物防控的重要意义。 2. 化妆品生产过程环境洁净度要求是什么? 3. 简述化妆品的消毒灭菌方法。 		
教学后记			

第四章 微生物监控

第一节 微生物防控概述

一、化妆品生境特征

化妆品在生产、贮藏和使用过程中均可能受到微生物的污染。

由于微生物的作用可引起化妆品的变质、变色和产生异味，降低或失去了其价值。

如有病原微生物或条件致病微生物的污染还可对人体健康产生危害，如化脓性细菌污染可引起皮肤和眼部的感染。

水：大多数化妆品如膏霜、奶液和香波等都含有一定比例的水分，有利于微生物的生长。

营养成分：天然的动物脏器，各种酶类，花粉，蜂王浆，天然或合成的胶质、蛋白质、氨基酸、淀粉、维生素等，这些成分为微生物的生长和繁殖提供了必须的碳源、氮源、矿物质和维生素。

pH 值：化妆品的 pH 在 4~7 之间，最适宜微生物生长。多数细菌适宜生长在中性及微碱性(pH6~8)环境,酵母菌和霉菌可在中性及酸性环境(pH4~6)条件下生长。

温度：化妆品的生产、贮藏和使用的温度大多在 20~30℃之间，正是多数环境微生物的适宜生长温度。

二、化妆品微生物污染的来源

化妆品中微生物的污染，按其来源分为一次污染和二次污染

一次污染是指化妆品在生产、储存过程中导致的污染；

二次污染是指化妆品在使用过程中造成的污染。

(一)化妆品的一次污染

在生产过程中，从原料到产品的污染称为一次污染，包括原料污染和生产过程污染。

(二)化妆品的二次污染

化妆品的二次污染是指产品在使用过程中被微生物污染，主要是消费者使用不当造成的。但包装设计的不科学，防腐剂使用不当也给化妆品的二次污染造成了机会。

例如，用不洁净的手涂抹化妆品时，手指上大量的微生物就会污染化妆品；涂抹用的海绵、小刷子、粉扑等反复使用会将皮肤上的微生物带到化妆品上；另外，容器敞开时，空气中的微生物也会进入到化妆品中。

二次污染有许多实例报道

曾有报道眼影粉、眼线液、眉黛等细菌污染水平为 $10^2 \sim 10^3 \text{cfu/g}$ ，金黄色葡萄球菌和枯草杆菌的检出率较高。

研究证明睫毛油在使用前污染率仅为 1.5%，使用中污染率则急剧增加到 60%。

在海绵、刷子等化妆品用具污染也相当严重。

对人体健康的危害

化妆品污染致病性和条件致病性微生物，可对人体健康造成较大的危害。

化妆品受污染后可产生腐败酸解产物，后者能直接刺激皮肤发生炎症；葡萄球菌和溶血性链球菌等可引起毛囊炎、疖、痈、脓肿乃至败血症，铜

绿假单胞菌感染如不及时治疗则也可发生全身扩散，严重感染可危及生命。

三、GMPC 化妆品良好操作规范

GMP 即良好生产规范，最早是美国为了规范药品生产而于 1963 年颁布的，这也是世界上第一部 GMP。FDA 即美国食品药品监督管理局于 1980 年颁布了食品 GMP 以规范食品的生产。1992 年，FDA 颁布了化妆品 GMP 指引以引导化妆品生产企业规范其化妆品的生产，从而保证化妆品的卫生和安全。

欧盟为了保证在其境内生产的和销售的化妆品（包括从欧盟境外输入）不会对消费者的健康造成伤害于 1976 年 7 月 26 日颁布了化妆品指令 76/768/EE，2003 年 2 月 27 日颁布该指令的第七版，该指令要求生产化妆品的工厂需要符合良好操作规范。

国际标准化组织（ISO）2007 年 11 月制定发布的针对化妆品行业的质量管理体系标准 ISO 22716-2007 《化妆品良好生产规范》

《化妆品生产质量管理规范》于 2022 年 1 月 7 日发布，并于 2022 年 7 月 1 日正式实施。

GMP 是通过

选用符合规定要求的原料（MATERIALS）

以合乎标准的厂房设备（MACHINES）

由胜任的人员（MAN）

按照既定的方法（METHODS）

——制造出品质既稳定而又安全卫生的产品的一种质量保证制度。

化妆品良好生产规范的内容包括：

人员

厂房和设施

卫生和虫害控制

设备

过程的控制

质量控制和质量保证

产品的追踪性和回收

第二节 微生物控制

一、生产现场管理的六大要素

- 1.人((操作者、管理者)
- 2.机 (设备、工艺装备、工器具)
- 3.料 (原料、辅料、内外包材)
- 4.法 (工艺指导书、操作规程)
- 5.环境
- 6.测量

二、微生物控制涉及至少 4 要素

4 要素：原料、包装材料、生产设备、生产环境和生产人员。

三、厂房设施及环境的微生物控制

(一) 厂房选址及厂区环境

选址

工厂适宜的厂址选择是？ ()

A. 周围有粉尘、烟雾

- B. 与居民区有一定距离
- C. 周围有垃圾处理厂
- D. 周围有放射性污染物

(二) 厂房的布局与设施

建筑设施

工艺的连续性

清洁级别布局

人物分流、成品、半成品、废品分开

三区（生产区、生活区、厂前区）

(三) 设备

生产设备的设计及选型必须满足产品特性要求，不得对产品质量产生影响。设备的设计与安装应易于操作，方便清洁消毒。

所有与原料、产品直接接触的设备、工器具、管道等的材质应得到确认，确保不带入化学污染、物理污染和微生物污染。与产品直接接触的生产设备（包括生产所需的辅助设备）表面应平整、光洁、无死角、易清洗、易消毒、耐腐蚀。

清洁与消毒所选用的润滑剂、清洁剂、消毒剂不得对产品或容器造成污染。应制定生产设备的清洁、消毒操作规程，规定清洁方法、清洁用具、清洁剂的名称与配制方法、已清洁（消毒）设备的有效期等。

二、空气的微生物控制

空气充满生产车间的每一个角落，虽然空气不是微生物生长繁殖的良好环境，但仍有不少细菌、霉菌和酵母菌，主要来自于尘埃颗粒、皮肤、

衣服和飞沫。室内空气中微生物种类、数量与室内清洁度、温度、湿度有关，同时空气中设施材料、人员活动过程也会产生大量的尘粒。生产环境的尘粒和微生物分布会直接影响产品的质量控制不当会引起整个生产区污染，造成严重后果和极大的经济损失。

（一）洁净度等级

规定对尘粒及微生物污染需进行环境控制的房间（区域）称为洁净室（区）。根据化妆品生产环境的不同要求，将化妆品生产洁净室（区）的洁净度划分为 100、1 万、10 万、30 万四个等级（表 4-1）。洁净度是指洁净环境内单位体积空气中含大于或等于某一粒径的悬浮粒子和微生物最大允许统计数。净化车间的洁净度指标应符合国家有关标准、规范的规定。

（二）洁净室（区）

洁净室（区）应能有效控制尘粒及微生物数量，洁净室（区）的建筑结构、装备及其作用均具有减少对该房间（区域）内污染源的介入、产生和滞留的功能。根据运行情况不同又可分为静态洁净室（区）和动态洁净室（区）。静态指洁净室（区）指所有生产设备均已安装就绪，但没有生产活动且无操作人员在场的状态。动态指洁净室（区）指生产设备按预定的工艺模式运行并有规定数量的操作人员在现场操作的状态。

1. 洁净室（区）特点

（1）控制尘埃等非生命微粒污染物微粒是微生物的载体，落入产品中会导致产品变质和对使用者造成过敏、发炎等危害。

（2）控制细菌、真菌、放线菌等微生物微生物比非生命微粒的危害更

大，数量激增。因为，它们是"活的粒子"，在温度、湿度条件适宜的情况下，它们可大量繁殖，

2. 洁净室（区）要求

①洁净度符合相应等级的要求。

②洁净室（区）内的设备设施应按生产工艺流程合理布局，流程尽可能短，与本岗位无关的人员或物料不得通过该区域。人流、物流要分开，且走向合理，减少交叉污染。应分别设物料净化房和人员净化房，物料净化房和洁净室之间、人员净化房与洁净室之间均应设气闸室，气流从洁净室吹向净化房。向易产生污染的区域。

③空气的流向：从洁净度要求高的区域流向低的，从不易产生污染的区域流

④压差：洁净区非洁净区之间、不同洁净等级的洁净室之间的空气压差 $\geq 10\text{Pa}$ 。必要时，相同洁净度级别的不同功能区域（操作间）之间也应当保持适当的压差，的压差，产品洁净度要求相对高的气压高一些，防止外来污染及交叉污染。易产生粉尘的洁净室与其他区域应保持一定的负压差。

⑤温度、湿度控制：洁净室（区）温、湿度以操作人员感觉舒适，微生物不易滋长为宜，10万级、30万级洁净室（区）一般控制温度 $18\sim 26^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 $45\%\sim 65\%$ ；100级、1万级洁净室（区）一般控制温度 $20\sim 24^{\circ}\text{C}$ ；相对湿度 $45\%\sim 60\%$ 。温度过高、湿度过大有利于微生物生长繁殖。

⑥洁净室（区）内使用的设备、工具，其结构型式与材料有防止尘埃产生和扩散的作用，建材要光洁、耐腐蚀、易清洁，不易脱粒，发尘量少、

并经得起反复多次消毒、清洁和冲洗。墙壁和顶棚常用彩钢板，地板常用环氧树脂、PVC、水磨石等材料。洁净室（区）内地面、墙面、顶棚及使用的设备、工艺装备、管道表面、操作台应平整、光洁、无裂缝、无霉迹，墙面与地面、顶棚交界处呈凹弧形，无死角、无颗粒脱落，不积尘，易于清洁和消毒。

洁净室（区）内设备结构简单，易于清洁和消毒，生产前后都要进行清洗和消毒。生产使用的设备，因材料和结构不同，消毒方法应有区别。大型容器类可用高压水枪冲洗后，再用热水、蒸汽、含氯消毒剂处理；而液体、气体传输管道、过滤除菌的过滤器、供水系统等密闭型设备可用高压蒸汽灭菌；塑料制品可用化学消毒剂擦拭或浸泡；工作台面可用紫外线照射或者用化学消毒剂擦拭。

一般情况下，洁净室（区）内所采用消毒剂的种类应当多于一种，不得用紫外线消毒替代化学消毒，100级洁净室（区）使用的消毒剂和清洁剂要用注射用水（指纯化水经过蒸馏法或超滤法制备的同等要求的水）配制，必须无菌或经无菌处理。

洁净室（区）内设备所用的润滑剂、冷却剂、清洗剂等要确保不会对产品造成污染。

⑦有防尘、防虫、防鼠等设施。

（三）化妆品生产环境的洁净度要求

不同功能的化妆品车间，对环境洁净度的要求不同。不同应用途径、企业对环境洁净度的要求也不同。化妆品生产所需洁净室（区）在现行法规、标准要求上，仅对眼部和儿童用化妆品的生产车间有30万级的要求。

其他类别的化妆品产品在洁净度上暂无明确要求。但是在实践中，现在的绝大部分企业在厂房装修时，其半成品储存间、洁材储存间、灌装间，甚至制作间（有的称为配料车间）均按照静态 10 万级的标准来设计。车间的空气洁净度高，则料体和接触料体的设备、器具和包材等污染微生物的风险就相对更低。

（四）空气卫生控制

- 1.利用空气净化系统除尘除菌
- 2.定期消毒灭菌
- 3.使用能减少发尘量的材料
- 4.做好生产人员的管理

三、生产人员的微生物控制

（一）人员要求

- 1.化妆品生产人员基本要求
- 2.洁净室（区）工作人员要求

（二）人员进出洁净区的净化程序

（三）手部消毒和工作服消毒

四、原料的微生物控制

化妆品原料

化妆品原料根据其用途和性能来划分，大致上可以分为基质原料和辅助原料。

基质组成化妆品的主体，是具主要功能的物质，常用的有油脂、蜡、粉类、胶质类、溶

剂类（水、醇、酯、酮等）

辅料赋予化妆品成型、稳定或色香和其他特定作用，如表面活性剂、香料和香精、色素、

防腐剂、抗氧化剂、生化制品和其他添加剂（保湿剂、收敛剂、特殊功效添加剂）等。

五、工艺用水的微生物控制

（一）工艺用水的种类

（二）工艺用水的卫生控制

1.制水设备及输送系统要定期清洗消毒

2.水体消毒

六、包装材料的微生物控制

（一）内包装材料的要求

（二）外包装材料的要求

七、化妆品的消毒灭菌

为了控制微生物的污染，许多化妆品生产的工艺流程设计中包含消毒灭菌环节。如制造乳剂时，通常采用将水加热到 90℃维持 20min，先进行加热灭菌，冷却后再与油进行乳化，同时，在配方设计时也加入数种防腐剂防止微生物的二次污染。一个有效、稳定的化学防腐剂体系的存在是保证产品保存期质量的重要因素，但必须明确它不能代替良好、严格的生产操作工艺。原材料质量、包装设计、货架期以及消费者的使用等因素都对化妆品微生物学的完整性起着重要作用。正确控制和完善这些因素是维持产品微生物学质量的良好策略。

第三节 微生物监测

化妆品生产过程应严格按照《化妆品安全技术规范》和《化妆品生产质量管理规范》的要求加强管理，采取有效的措施防止微生物污染，同时应做好各个环节的卫生监测。

一、化妆品生产过程微生物监测对象

化妆品生产过程微生物监测对象与控制对象基本一致，根据表 4-1 的 4 要素 5 对象，按照是否与化妆品产品料体直接接触归类（表 4-4）。在实践中需要对表中所列“重点”对象予以关注。

表 4-4 生产过程微生物监测对象归类表

对象类别	直接组成	直接接触	间接接触	其他
对象	各种化妆品原料(含纯水),内包材的内壁	盛料工具、器具、乳化 / 搅拌锅的内壁、抽料 / 出料的管道、伸入料体里的各种器具、制水设备的闭环系统、压缩空气	设备外表、工作台面、清洁器具、内包材的外壁	洁净区的空气、作业人员的手部及其着装

二、化妆品生产过程微生物监测频率

确定科学合理、可行性高的监测频率，明确各对象的取样量和取样注意事项，是保证检测准确性、达成监测目的的关键。

目前化妆品的生产过程微生物监测，暂无明晰的周期规定。在《化妆

品生产许可检查要点》中提到"证明生产环境条件符合需求的检测报告，检测报告应当是由经过国家相关部门认可的检验机构出具的 1 年内的报告"并进一步明确。

①生产用水卫生质量检测报告，水质至少达到生活饮用水卫生标准的要求(pH 值除外)。

②车间空气细菌总数检测报告，空气和物表消毒应采取安全、有效的方法，如采用紫外线消毒的，使用中紫外线灯的辐照强度不小于 $70\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ，并按照 $30\text{W}/10\text{m}^2$ 设置。

③生产车间和检验场所工作面混合照度的检测报告，工作面混合照度不得小于 220Lx ，检验场所工作面混合照度不得小于 450Lx 。

④生产眼部用护肤类、婴儿和儿童用护肤类化妆品的，其生产车间的灌装间、清洁容器储存间空气洁净度应达到 30 万级要求，并提供空气净化系统竣工验收文件，参考 GB50457《医药工业洁净厂房设计规范》30 万级标准。

课程名称	化妆品微生物及检验技术	专业班级	化妆品 241、化妆品 (3+) 241
教材名称	化妆品微生物检验技术		
授课题目	第五章 化妆品的微生物检验		
授课学时	2 节 () ; 3 节 () ; 其它 (4 学时)		
课 型	理论 (<input checked="" type="checkbox"/>) ; 实验 () ; 见习 () ; 实训 () ; 其它 ()		
教学目的	1. 了解化妆品微生物检验的意义、特殊性和要求。 2. 掌握化妆品常规微生物检验方法。		
思政目标	根据教材, 通过《化妆品安全技术规范》中微生物限量标准解读, 强化每份检测报告关乎消费者皮肤健康的职业使命感, 培育学生养成认真负责的职业精神。		
教学重点	1. 化妆品微生物检验的特殊性和要求。 2. 掌握化妆品细菌菌落总数检验方法。 3. 掌握菌落总数统计及菌落数量报告方法。		
教学难点	1. 掌握化妆品细菌菌落总数检验方法。 2. 掌握菌落总数统计及菌落数量报告方法。		
教学方法	讲授 (<input checked="" type="checkbox"/>) ; 讨论 () ; 指导 () ; 示教 () ; 其它 ()		
电子教案	有 (<input checked="" type="checkbox"/>)	Microsoft PowerPoint (<input checked="" type="checkbox"/>) ; Author ware () ; 其它 ()	
	无 ()		
教学资源	多媒体 (<input checked="" type="checkbox"/>) ; 模型 () ; 标本 () ; 实物 () ; 音像 () ; 其它 ()		
教学过程 时间安排	第一节 概述 (2 学时) 第二节 化妆品常规微生物检验 (2 学时)		
思考题	1. 简述化妆品微生物检验供检样品的预处理。		
作 业	1. 化妆品微生物检验的特殊性。 2. 微生物检验菌落计数方法及报告注意事项。 3. 化妆品微生物检验样品采集及注意事项。		
教学后记			

教学内容:

第五章：化妆品微生物检验

第一节 概述

一、微生物对化妆品的污染影响

- 1.可引起化妆品变色、产气或形成臭味，使化妆品变质。
- 2.可引起使用者感染，特别是眼部区域使用的化妆品，如角膜极易被感染而伤害甚至损伤。
- 3.污染化妆品的微生物主要是腐败菌，但也可能有病原性微生物可条件致病性微生物存在。

二、化妆品微生物学检验内容

- 1.检验原料和产品中微生物数量是否达标。
- 2.检验用于化妆品和药品中的防腐剂的防腐效验，以确定所需的最低抗菌防腐剂的浓度。

三、化妆品微生物检测方法

1.微生物检测方法

1.好氧平板计数法（APC）

使样品在标准化培养基上进行培养以测定样品中的活细菌数。

平板计数法操作或视频

1.1 好氧平板计数法（APC）优缺点

优点：APC 是一种重实效和实际的实验方法，具有经济、简单和易行的特点

缺点：但该方法仅能检测出好氧、中温、在合成培养基上易生长等一般性微生物的存在。

1.2 好氧平板计数法（APC）的可靠性

APC 的可靠性依赖于培养基对防腐剂抑制作用的中和能力。

如检测含水化妆品的微生物常用 TSALT（水解大豆卵磷脂吐温 80）培养基，它能很好中和化妆品中防腐剂，使微生物在有防腐剂存在的体系中很好地生长，便于检测。

2.原料与成品的检测

2.1 产品和原料的检验

以无菌方式取适量样品进行稀释，然后进行 APC 培养，观察结果。

2.2 包装材料的检验

向包装容器注入一定量无菌溶液，充分摇均，以稀释液进行 APC 培养。

2.3 环境检验和监测

常以生产车间及设备与产品接触面上的微生物为检测对象，常利用 LB 肉汤湿润的无菌棉签涂抹设备，将涂抹棉签放入无菌溶液作稀释，进行 APC 培养。

2.4 微生物的鉴定

对经 APC 培养产生的微生物进行鉴定，以确定污染的微生物，并制定有效防治措施。

3.我国化妆品卫生标准

微生物	限值	备注
菌落总数 (CFU/g 或 CFU/ml)	≤500	眼部化妆品、口唇化妆品和儿童化妆品
	≤1000	其他化妆品
霉菌和酵母菌总数 (CFU/g 或 CFU/ml)	≤500	
耐热大肠菌群/g(或 ml)	不得检出	
金黄色葡萄球菌/g(或 ml)	不得检出	
铜绿假单胞菌/g(或 ml)	不得检出	

4.我国化妆品微生物标准检验方法

总则:GB7918.1-87

细菌总数测定: GB7918.2-87

粪大肠菌群测定: GB7918.3-87

绿脓杆菌测定: GB7918.4-87

金黄色葡萄球菌测定:GB7918.5-87

4.1 细菌总数测定 (GB7918.2-87)

细菌总数: 指 1g 或 1ml 化妆品中所含的活菌数量。

测定细菌总数可用来判明化妆品被细菌污染的程度, 以及生产单位所用的原料、工具设备、工艺流程、操作者的卫生状况, 是对化妆品进行卫生学评价的综合依据。

本标准采用标准平板计数法。

四、化妆品微生物检验的意义

(一) 控制化妆品的质量通过化妆品的微生物检查, 可了解化妆品是否受微生物污染及其污染程度, 查明污染的来源, 并采取适当的控制措施, 确保化妆品的质量符合要求。

(二) 保证化妆品的有效性和安全性微生物污染化妆品, 会破坏其成

分，影响其功效，甚至带来安全隐患。国内外由于微生物污染化妆品进而引起疾病的事件时有发生，化妆品微生物检查是保证化妆品安全有效的重要措施之一。

(三) 可作为衡量化妆品生产全过程卫生管理水平的依据之一化妆品生产的每个环节都可能带来微生物污染，生产企业应严格按照《化妆品生产许可工作规范》(2015版)要求加强管理，保证化妆品生产的环境卫生、物料卫生、工艺卫生、厂房卫生和人员卫生，严防污染。微生物检查结果可以反映生产企业的卫生管理水平，管理到位则微生物污染概率小，反之则大。对产品而言，生产管理比检验更为重要，一种合格的产品依靠科学、严格的管理，检验只是起督促、反馈和放行把关的作用。

五、化妆品微生物检验的特殊性

化妆品质量检查都是抽取一定量的样品进行检测，由此推断整批化妆品的质量。微生物检查对象是微生物，不同于一般的理化检查，有其自身的特点和难度，它具有以下四个方面的特殊性。

- (一) 活体性和不稳定性
- (二) 分布的不均匀性
- (三) 多数处于受损伤状态
- (四) 生态环境的多样性及复杂性

六、化妆品微生物检验的要求

我国规定的化妆品微生物检验方法是《化妆品安全技术规范》(2015年版)中的"第五章微生物检验方法"。为保证检查方法的科学性和规范性、检查结果的准确性和可重复性，对化妆品微生物检查的环境、检验人员、方

法适用性、培养基的质量、试验用菌等应有严格要求。

（一）化妆品微生物学实验室

微生物检查操作要在洁净度符合要求的单向流空气区域内（即无菌室）或隔离系统中进行。其全过程必须严格遵守无菌操作，防止微生物污染。单向流空气区、工作台面及环境应定期按 GB/T 16294、GB/T 16292、GB/T 16293 现行国家标准进行洁净度验证。隔离系统按相关的要求进行验证，其内部环境的洁净度须符合检查的要求。化妆品微生物检查在洁净度背景不低于 10 万级局部 100 万级的无菌室中进行。阳性对照试验不得与供试品检查共用无菌室，要设专门的阳性菌对照室。因此，化妆品微生物实验室应至少配置一般实验室、无菌室及阳性菌实验室三个独立的工作空间。

1. 一般实验室

可划分为试验物品准备区、样品接收及存放区、灭菌室、灭菌物品存放区、培养室、试验结果观察区、污染物处理区及文档处理区等不同功能区域。

2. 无菌室

无菌室布局无菌室面积一般在 6~10m²，高度 2.4~2.8m，由无菌操作间和缓冲间组成，无菌室与一般实验室之间配传递窗，用于传送检验用物品。无菌操作间。具有空气净化系统，配备洁净度符合要求的层流超净工作台。

（二）微生物检查人员

（三）微生物污染物品及污染事故的处理

（四）化妆品微生物检验试验用菌

第二节 菌落总数项目、霉菌和酵母菌总数项目

化妆品中污染的细菌种类不同，每种细菌都有它一定的生理特性，培养时对营养要求，培养温度、培养时间、pH 值、需氧性质等均有所不同。

在实际工作中，不可能做到满足所有菌的要求。

所测定的结果，只包括在本方法所使用的条件下（卵磷脂、吐温 80 营养琼脂上，37℃培养 48h）生长的一群嗜中温的需氧及兼性厌氧的细菌总数。

制法：将各成份分别加到少量蒸馏水中，（加热）溶解，将各溶液混匀，调 pH 值为 7.1~7.2，加入琼脂。121℃20min 高压灭菌，储存于冷暗处备用。

一、细菌菌落总数检验

细菌总数系指 1g 或 1mL 化妆品样品中所含的活细菌数量。测定细菌菌落总数可用来判明化妆品被污染的程度，以及生产单位所用的原料、工具设备、工艺流程、操作者的卫生状况，是对化妆品进行卫生学评价的综合依据。

（一）检验方法

《化妆品安全技术规范》（2015 版）规定细菌、真菌菌落总数采用平板计数法测定。

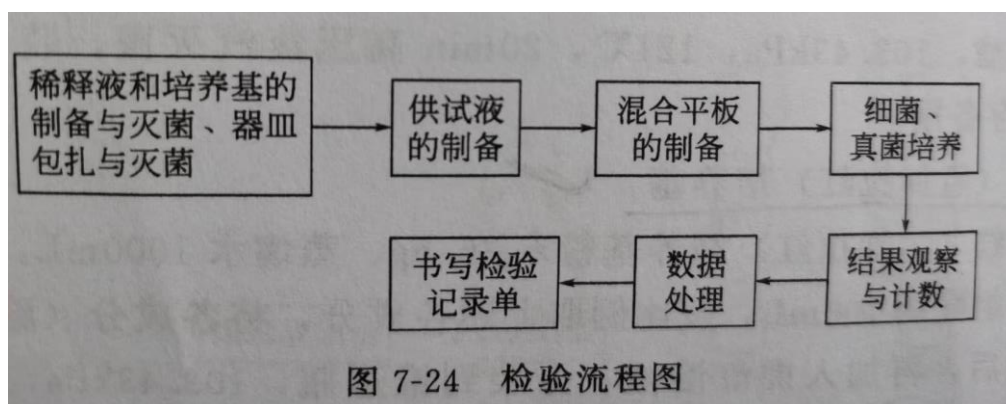
平板计数法：以无菌操作方法，用灭菌吸管吸取 1mL 充分混匀的待检化妆品稀释液，注入无菌培养皿内，倾注已融化并冷却到 45℃~50℃左右的卵磷脂、吐温-80 营养琼脂（测定细菌），并立即旋摇平板，使化妆品与培养基充分混匀。每种培养基的每个稀释级应倾注两个平板，同时用另

一只倾注培养基的平板作为空白对照。待琼脂冷却凝固后，倒置平板，使底面向上，营养琼脂平板置 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，培养 $48\text{h}\pm 2\text{h}$ ，进行菌落计数。平板上的菌落数(每个菌落代表一个原始菌)乘以稀释倍数即为 1g 或 1mL 化妆品样品中所含的活菌数，以菌落数目的多少判断化妆品被污染的程度。

化妆品中污染的微生物种类不同，每种微生物都有它一定的生理特性，培养时对营养要求、培养温度、培养时间、pH 值、需氧性质等均有所不同。在实际工作中，不可能做到一种培养条件都能满足所有菌的培养要求，因此所测定的结果，只包括在本方法使用的条件下（细菌：卵磷脂、吐温-80 营养琼脂上，于 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，培养 $48\text{h}\pm 2\text{h}$ ）能生长的菌数。

（二）检验程序

检验程序如下图



（三）检验主要步骤

1. 配制稀释液、培养基及包扎相关器具

（1）稀释液-生理盐水

成分：氯化钠 8.5g 蒸馏水 1000mL

制法：每组配制 120mL。按比例取上述各成分混合，溶解后，分装到加玻璃珠的三角瓶内，90mL/瓶，另分装 2 支试管，9mL/支，包扎，103.43kPa，

121°C20min, 高压蒸汽灭菌。

(2) 卵磷脂、吐温 80-营养琼脂培养基

成分：卵磷脂、吐温 80-营养琼脂粉末 48g 蒸馏水 1000mL

制法：每组配制 100mL。按比例取上述各成分，加热溶解后补水调 pH 值为 7.1~7.4，分装到锥形瓶，103.43kPa，121°C20min 高压蒸汽灭菌，备用。

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

成分：TTC 0.5g 蒸馏水 100mL

溶解后过滤，103.43kPa，121°C 20min 高压蒸汽灭菌，装于棕色试剂瓶，置 4°C 冰箱保存备用。

(4) 虎红 (孟加拉红) 培养基

成分：虎红 (孟加拉红) 培养基粉末 36.5g，蒸馏水 1000mL

制法：每组配制 100mL。按比例取上述各成分，将各成分 (除虎红外) 加入蒸馏水中溶解后，再加入虎红溶液。分装到锥形瓶，103.43kPa，121°C 20min 高压蒸汽灭菌。另用少量乙醇溶解氯霉素，过滤溶解后加入培养基中，若无氯霉素，使用时每 1000mL 加链霉素 30mg。

(5) 仪器包扎

培养皿 13 套、1.0mL 吸量管 11 支、10mL 吸量管 1 支。

包扎好的物品、稀释液和培养基，写上记号，统一灭菌，备用。

2. 化妆品细菌菌落总数测定-平板计数法

(1) 制备供试液

无菌操作吸取供试品 10mL 加到 90mL 生理盐水中，充分振荡，使之溶

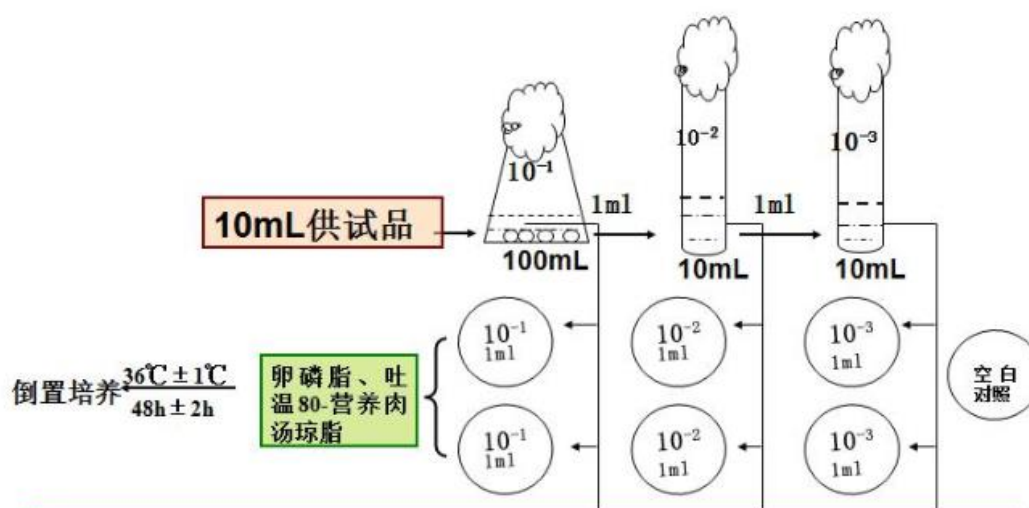
解并混匀，即为 10⁻¹ 供试液。取 10⁻¹ 供试液 1mL，加入装有 9mL 无菌生理盐水的试管中，充分混匀，即为 10⁻² 供试液，以此类推可制得 10⁻³ 供试液。取 10⁻¹、10⁻² 和 10⁻³ 三个稀释级的供试液进行菌数测定。

(2) 制备混合平板

用灭菌吸量管分别吸取 10⁻¹、10⁻² 和 10⁻³ 的供试液各 1mL，置直径 90mm 的无菌培养皿中，注入约 15mL 融化并冷却至 45℃~50℃的卵磷脂、吐温 80—营养琼脂培养基（细菌计数），混匀，待琼脂凝固后，细菌倒置于 36℃±1℃恒温培养箱内，培养 48h±2h，进行菌落计数。每种培养基的每个稀释级至少制备 2 个平板，每种稀释度应更换 1 支吸量管。

(3) 空白对照

另取一个灭菌空培养皿，加入约 15mL 卵磷脂、吐温 80-营养琼脂培养基，倒置于 36℃±1℃恒温培养箱内，培养 48h±2h，作为空白对照。



化妆品细菌菌落总数检验示意图

3. 菌落计数与结果判定

(1) 菌落计数

细菌培养 48 h±2h, 真菌培养 5d 计数, 先用肉眼观察, 点数菌落数, 然后再用放大 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。

(2) 结果计算 (P142)

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。

①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 5-03 中例 1)。

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均菌落数报告之(见表 5-03 中例 2 及例 3)。

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 5-03 中例 4)。

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 5-03 例 5)。

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 5-03 中例 6)。

⑥若所有的稀释度均无菌生长, 报告数为每 g 或每 mL 小于 10CFU。

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 5-03 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5-03 细菌计数结果及报告方式

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

注：CFU-菌落形成单位。按重量取样的样品以 CFU/g 为单位报告；按体积取样的样品以 CFU/mL 为单位报告。

二、粪大肠菌群检查

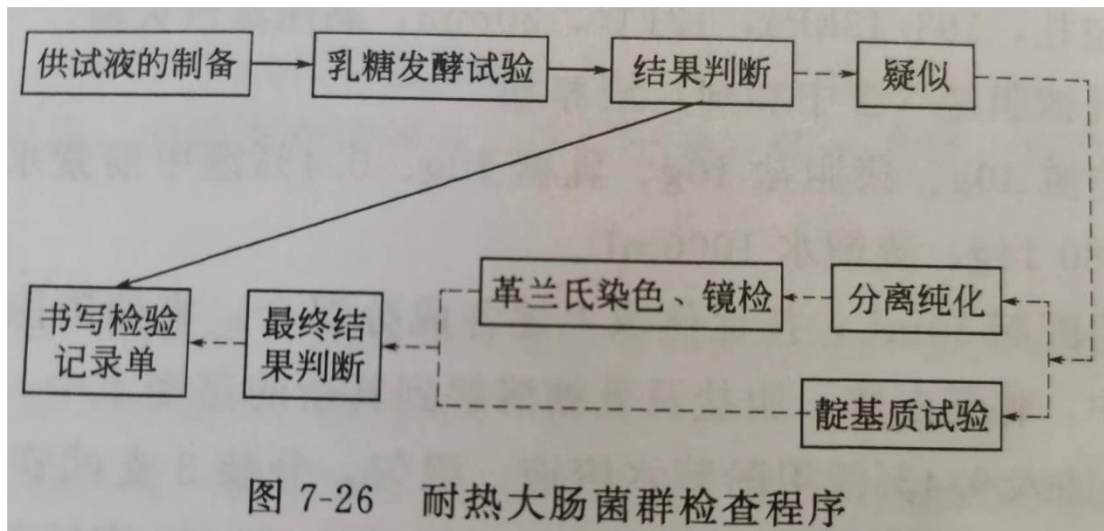
粪大肠菌群系一群需氧及兼性厌氧革兰氏阴性无芽胞杆菌，在 $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养 24h~48h 能发酵乳糖产酸并产气。

（一）粪大肠菌群检查意义

粪大肠菌群主要存在于温血动物粪便中，随粪便排出体外后可直接污染化妆品，若产品中检出该菌群，表明该产品受到粪便污染，可能存在肠道致病菌并引起疾病，是评价化妆品卫生质量的重要指标之一。

耐热大肠菌群细菌主要来源于人和温血动物的粪便，随粪便排出体外，可直接或间接污染环境、食物、饮用水、化妆品及药品。若化妆品中检出耐热大肠菌群，表明该化妆品已被粪便污染，有可能存在其他肠道致病菌或

寄生虫等病原体。因此耐热大肠菌群被列为化妆品卫生质量的重要的卫生指标菌。《化妆品安全技术规范》(2015年版)中规定每克或每毫升化妆品中不得检出耐热大肠菌群。耐热大肠菌群检查程序,见下图。



(二) 检验操作步骤

1. 配制稀释液、培养基及包扎相关器皿

(1) 稀释液 -- 生理盐水

成分: 氯化钠 8.5g、蒸馏水 1000mL。

制法: 每组配制 90mL, 按比例取上述各成分混合, 溶解后, 分装到加玻璃珠的三角瓶内, 包扎, 103.43kPa, 121°C, 20min, 高压蒸汽灭菌。

(2) 双倍乳糖胆盐(含中和剂)培养基

成分: 蛋白胨 40g、猪胆盐 10g、乳糖 10g、0.4% 溴甲酚紫水溶液 5mL、卵磷脂 2g、吐温 80 14g、蒸馏水 1000mL。

制法: 每组配制 30mL, 按比例取上述各成分混合, 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 到 7.4, 加入 0.4% 溴甲酚紫水溶液, 混匀, 分装 3 支

试管, 10mL / 支 (每支试管中加一个小倒管), 包扎。68.95kPa, 115°C, 20min 高压蒸汽灭菌。

(3) 伊红-亚甲蓝 (EMB) 琼脂培养基

成分: 蛋白胨 10g、乳糖 10g、磷酸氢二钾 2g、琼脂 20g、2%伊红水溶液 20mL、0.5%亚甲蓝水溶液 13mL、蒸馏水 1000mL。

制法: 每组配制 60mL, 按比例取上述各成分混合, 先将琼脂加到蒸馏水中, 加热溶解, 然后加入磷酸氢二钾、蛋白胨, 混匀, 使之溶解。校正 pH 值为 7.2~7.4, 分装于锥形瓶内, 103.43kPa, 121°C, 15min 高压蒸汽灭菌备用。临用时加入乳糖并加热融化琼脂。冷至 60°C 左右无菌操作加入灭菌的伊红-亚甲蓝溶液, 摇匀。倾注培养皿备用。

(4) 蛋白胨水培养基 (作靛基质试验用)

成分: 蛋白胨 (或胰蛋白胨) 20g、氯化钠 5g、蒸馏水 1000mL。

制法: 每组配制 15mL, 按比例取上述各成分混合, 加热融化, 调 pH 值为 7.0~7.2, 分装小试管, 5mL / 支, 103.43kPa, 121°C, 15min 高压蒸汽灭菌。

(5) 靛基质试剂

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

(6) 革兰氏染色液

① 结晶紫染色液: 结晶紫 1g、95%乙醇 20mL、1%草酸铵水溶液 80mL。将结晶紫溶于乙醇中, 然后与草酸铵溶液混合。

② 革兰氏碘液: 碘 1g、碘化钾 2g, 蒸馏水加至 300mL。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

300mL。

③脱色液：95%乙醇。

④复染液：沙黄复染液或稀石炭酸复红液。

沙黄复染液：沙黄 0.25g、95%乙醇 10mL、蒸馏水 90mL。将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

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

(7) 包扎其他物品与准备

每组包扎 1.0mL、10mL 吸量管各 1 支，培养皿 3 个。包扎好的物品、稀释液和培养基，做好记号，统一灭菌，备用。

2. 供试品检验

(1) 制备 10-1 供试液

无菌操作吸取供试品 10mL 加到 90mL 生理盐水中，充分振荡，使之溶解并混匀，即为 10-1 供试液。

(2) 乳糖发酵试验

取 10mL 10-1 供试液，加到 10mL 双倍乳糖胆盐（含中和剂）培养基中，置 $(44.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 24h，如不产酸也不产气，则报告为化妆品未检出耐热大肠菌群。

① 阳性对照

取 10mL 10-1 供试液和大肠埃希菌对照菌液 1.0mL 加到 10mL 双倍乳糖胆盐培养基中，做阳性对照。阳性对照试验应长菌。

②阴性对照取生理盐水稀释液 10mL 加入 10mL 双倍乳糖胆盐培养基中，做阴性对照。阴性对照试验应不长菌。

(3) 分离培养

如乳糖发酵试验产酸产气，则将上述培养液划线接种到伊红-亚甲蓝琼脂平板上，置 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 18~24h。同时取该培养液 1~2 滴接种到蛋白陈水培养基中，置 $(44.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 培养 $(24 \pm 2)\text{h}$ 。同时进行阳性对照试验和阴性对照试验。

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-亚甲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。

(4) 革兰氏染色

挑取上述疑菌落，涂片后进行革兰氏染色镜检。耐热大肠菌群为革兰氏阴性无芽孢杆菌。

(5) 靛基质试验

在蛋白陈水培养液中，加入靛基质试剂约 0.5mL，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。

3. 检验结果报告

根据发酵乳糖产酸产气，平板上有典型菌落，并经证实为革兰氏阴性短杆菌，靛基质试验阳性，则可报告化妆品中检出耐热大肠菌群。填写检查原始记录单。

课程名称	化妆品微生物及检验技术	专业班级	化妆品 241、化妆品 (3+) 241
教材名称	化妆品微生物检验技术		
授课题目	第六章 化妆品的防腐效能试验		
授课学时	2 节 () ; 3 节 () ; 其它 (4 学时)		
课 型	理论 (<input checked="" type="checkbox"/>) ; 实验 () ; 见习 () ; 实训 () ; 其它 ()		
教学目的	1. 了解防腐剂的定义、防腐剂的作用等。 2. 掌握常见防腐剂的种类及其作用机理。 3. 掌握化妆品防腐效能试验方法及要点。		
思政目标	根据教材, 介绍防腐效能直接关系到产品安全性, 不合格的防腐系统可能导致微生物污染, 引发皮肤感染等健康问题, 通过标准操作流程(SOP)训练培养规范意识, 强化国内外标准体系(如 ISO 11930-2019、中国药典)的严格执行体现法治精神, 培育学生养成认真负责的行业规范意识。		
教学重点	1. 常见防腐剂的种类及其作用机理。 2. 化妆品防腐效能试验方法。		
教学难点	1. 掌握常见防腐剂的种类及其作用机理。 2. 掌握化妆品防腐效能试验方法的操作。		
教学方法	讲授 (<input checked="" type="checkbox"/>) ; 讨论 () ; 指导 () ; 示教 () ; 其它 ()		
电子教案	有 (<input checked="" type="checkbox"/>)	Microsoft PowerPoint (<input checked="" type="checkbox"/>) ; Author ware () ; 其它 ()	
	无 ()		
教学资源	多媒体 (<input checked="" type="checkbox"/>) ; 模型 () ; 标本 () ; 实物 () ; 音像 () ; 其它 ()		
教学过程 时间安排	第一节 化妆品中防腐剂 (2 学时) 第二节 防腐效能试验 (2 学时)		
思考题	1. 简述化妆品防腐效能试验方法要点。		
作 业	1. 阐述常见防腐剂的种类及其作用机理。 2. 滤纸法检验化妆品单一防腐效能操作要点。 3. 化妆品防腐效能试验概念。		
教学后记			

教学内容:

第六章 化妆品的防腐效能试验

第一节 化妆品中的防腐剂

化妆品变质的主要原因是微生物的污染，生产过程带来一次污染，使用过程中带来二次污染，加上如今化妆品的原料来源越来越趋向于天然且具营养，其添加的蛋白质、可溶性胶原、芦荟和其他一些植物提取物，这些都为微生物的生长、繁殖提供了良好的条件。因此，微生物是化妆品卫生质量的重要指标，为防止微生物污染，在化妆品中加入防腐剂成为控制化妆品卫生质量的关键要素之一。化妆品受到微生物污染引起的变质，从外观就能反映出来。如产品污染霉菌容易在包装边缘等地出现霉点，液体溶液易出现混浊、沉淀、变色、发泡等，乳化产品会出现破乳、成块等，理化检测出现 pH 值改变、气味异常等。使用微生物污染的化妆品可能危害消费者健康，轻者导致皮肤发炎、溃烂，重者可能产生全身性疾病，甚至危及生命。因此，一个好的防腐体系，对于化妆品产品来说是必不可少的，在配方设计中扮演越来越重要的角色。能长久保持产品安全性、稳定性的防腐剂是一个成功化妆品不可缺少的组分，构建安全高效的防腐体系是化妆品研发成功的关键。

一、防腐剂的概述

1. 定义与要求

防腐剂是以抑制微生物在化妆品中的生长繁殖为目的而在化妆品中加入的化学物质。其目的：一为保护产品，使之免受微生物污染，延长产品的货架寿命，防止使用过程中的二次污染；二为确保产品的安全性，减少

或防止消费者因使用受到微生物污染的产品而引起可能的感染。许多化学物质都具有抗菌效果，但应用于化妆品的种类并不多，理想的防腐剂应该具备以下条件：

(1) 安全性高对人体无毒害、无刺激，不会产生过敏、光毒性和变异性等。

(2) 抑菌谱广对自然界中多种微生物都能有较好的抑制甚至杀灭作用。

(3) MIC 低即最小抑菌浓度在较低浓度下，能保持显著的活性。

(3) 溶解性好分散性优良，不影响产品的基本性能、色泽和气味。

(4) 有良好的配伍性有合适的油水配比，不会因 pH 或其他成分的影响而降低效果。

(5) 性价比高使用方便，价格合理。

(6) 稳定性好在生产、贮存、流通、使用过程中应保持稳定。目前，我国《化妆品安全技术规范》(2015 年版)规定的准用防腐剂只有 51 种（某些具有抗微生物作用的醇类和精油未列入规范），同时规定了这些防腐剂在化妆品中的最大允许浓度、使用范围和限制条件。

1. 防腐剂的作用

(1) 抑菌作用

防腐剂的功效是抑制微生物滋生，有效地增加产品的保质期，保证产品在保质期和应用期内微生物数量不超标。

(2) 保证产品安全

防止消费者因使用受微生物污染的产品而引起可能的感染。多数含有纯天然的有机化学物质如碳水化合物、蛋白质、糖原、维生素、植物胶等，

无一不是病菌、微生物滋生的养分。微生物生长过程中会分解各种大分子化合物，分泌各种代谢物和毒素，降低 pH 值，影响产品外观，损坏产品质量，等。因此，添加防腐剂可以保证产品的质量、提升产品品质。

二、不同类型化妆品对防腐剂安全性能的要求

不同类型化妆品对防腐剂安全性能的要求如表 6-1 所示。

表 6-1 不同类型化妆品对防腐体系的要求

化妆品类型	产品示例	产品特点	安全性能要求
淋洗类	洗面奶、沐浴露等	与皮肤接触时间短，大多含有大量表面活性剂，营养成分少，成本较低	对刺激性无明显要求，一般广谱抗菌防腐剂即可，成本低
驻留类	面霜、精华等	在皮肤上的停留时间长	长时间停留皮肤时应安全无刺激
眼部护理	眼霜、眼膜、眼部精华等	眼部皮肤较为脆弱，对刺激敏感，对甲醛、酚类等挥发物质敏感，容易受到伤害	避免使用挥发刺激性防腐剂。对眼睛轻刺激性，对皮肤无刺激性或轻刺激性
面膜	无纺布面膜、泥膜等	面膜的停留时间一般为 10~30min，与面部接触面积大，使用量较大，部分产品中含有大量粉剂	对皮肤轻刺激性
儿童产品	膏、霜、乳液等	儿童皮肤薄嫩，脂质分泌较少，对外界刺激敏感	对皮肤无刺激性，用量少

三、常用防腐剂的种类及其作用机制

1. 对羟基苯甲酸酯

这类防腐剂的商品名称为尼泊金酯，主要破坏微生物的细胞膜，使细胞内的蛋白质变性，并抑制细胞呼吸酶和传递酶系统的活性，阻断用于 ATP 合成的细胞膜通透性来抑制微生物的生长。

尼泊金酯抗菌活性广泛，对霉菌和酵母菌的抗菌作用较强，对细菌的作用主要体现于对革兰氏阳性菌的活性，毒性相对较低。复配常用的尼泊金酯有尼泊金甲酯（MP）、尼泊金乙酯（EP）、尼泊金丙酯（PP）、尼泊金丁酯（BP）、尼泊金异丙酯和尼泊金异丁酯等。尼泊金甲酯水溶性最好，

可以直接添加在水相；而尼泊金乙酯、尼泊金丙酯和尼泊金丁酯则倾向于溶解在油相中。这类防腐剂复合使用时有良好的增效性和协同性，增加抑菌能力，同时又降低使用含量，减少对皮肤刺激，所以产品配方中常看到多种尼泊金酯复配使用。尼泊金甲酯是适用于酸性体系的防腐剂，当 pH 5 时，本身具有 77% 的最高抑菌活性，pH 7 时为 63%，当 pH 8.5 时接近 50%。所以，体系中尼泊金酯的活性可以主要通过降低体系的 pH 值得到改善，通常是 7.0~6.5 或更低。尼泊金酯类防腐剂是使用最广泛的防腐剂，刺激性不高，但也有导致过敏的风险。

2. 甲基异噻唑啉酮（MIT）及其衍生物

这类化合物具有较广谱的抗菌活性，极低浓度（0.001% 左右）就可以抑制细菌、真菌及霉菌的生长，一直作为高效防腐剂被广泛使用。常用其单体或甲基氯异噻唑啉酮（CMIT）或甲基异噻唑啉酮与氯化镁及硝酸镁的混合物（凯松 CG）。CMIT 和凯松 CG 不能和甲基异噻唑啉酮同时使用。

异噻唑啉酮类防腐剂主要是通过阻碍微生物的呼吸、破坏细胞壁、干扰核酸合成等起到杀菌作用。该类防腐剂有很好的 pH 和热稳定性，可以在 pH 2~10 的配方体系中使用，但抗菌活性在 pH 4~8 时较为明显。其中凯松 CG 在酸性环境中防腐效能较好，而在碱性环境中容易失去防腐性能。此外，胺类、硫醇、硫化物、亚硫酸盐、漂白剂等也会使之失活。此类防腐剂会造成肌肤刺激性皮炎，容易出现过敏反应。严重可引起红肿、起水泡、皮肤裂开、组织坏死等症状。目前欧盟化妆品标准中规定，甲基异噻唑啉酮作为化妆品防腐剂使用时，仅可用于淋洗类化妆品。我国《化妆品

安全技术规范》(2015 年版) 规定化妆品使用时 MIT 最大允许浓度为 0.01%, 凯松 CG 最大允许浓度为 0.0015%, 只用于淋洗类产品中, 凯松 CG 不能和甲基异噻唑啉酮同时使用。

3. 甲醛及甲醛缓释体类

甲醛溶液在化妆品中用作防腐剂较少, 化妆品中使用较多的是能缓慢释放少量游离甲醛分子, 进一步发挥甲醛高效杀菌作用的甲醛衍生物, 也称为甲醛缓释剂或用醛供体。甲醛及甲醛衍生物广谱杀菌的原因主要在于, 甲醛能使蛋白质的氨基和巯基及核酸的嘌呤碱基的氮杂环烷基化, 从而使蛋白质和核酸变性。

第二节 防腐效能试验

防腐效能试验又称“挑战性试验”, 它是用来测定防腐剂有效抗菌的最低浓度。

在化妆品中常添加不同种类的防腐剂来防止微生物的大量繁殖。

通过防腐效能试验, 可以选择既能有效抑菌又可以使产品安全、稳定, 且使用起来愉快舒适的化妆品中防腐剂的最低浓度。

目前化妆品生产制造企业或研究机构所使用的防腐检测方法主要有 CTFA (美国化妆品香料香精协会)、ASTM (美国检验方法及材料协会), USP (美国药典) 和英国药理学

方法; 我国使用中华人民共和国化妆品微生物标准检验方法 (GB7978.1-87)。

目前, 国内外普遍采用的防腐剂有效性评价方法是 CTFA 推荐的一次

加菌防腐挑战性试验。

该方法能够模拟化妆品生产和使用过程中受到高强度的微生物污染的潜在可能性和自然界中微生物生长的最适条件，使测试结果更接近现实。

在待测样本中人为地接种若干种类、一定数量的微生物，在适当的温度下培养，定期（0 天，7 天，14 天，28 天）分离样本的微生物，并根据微生物的数量变化情况评价样本的抗菌效能。

微生物挑战性实验可采用单一培养或混合培养方式。

单一培养即分别接种每种实验菌株的菌悬液于测试化妆品中，在接种后的一定时间内对化妆品进行平板计数（APC），以此判断防腐剂的防腐效能。

混合培养为将几种细菌或真菌的混合液接种于化妆品中，在接种后一定时间内，测定化妆品的 APC，以此判断防腐效能。

可根据实际情况选择培养方式

挑战性实验测试菌株的选用原则为：尽量覆盖革兰氏阳性、阴性细菌，酵母菌和霉菌至少各一种，并且对各防腐剂抵抗性较高，能代表化妆品中可能污染的微生物对防腐剂的抵抗性的菌株。可根据化妆品的性质，生产、使用环境等增加菌株。

评价标准为：细菌于加标的第 7 天时菌落总数下降 99.9%，至第 28 天时无增长，真菌于第 14 天下降 99.0%，至 28 天时无增长，判断为防腐效果合格。其中细菌和真菌有一项不能达到以上标准判断为化妆品的防腐效果不合格。

化妆品微生物及检验技术实训教案

项目名称	一、普通光学显微镜的使用及微生物的形态观察			
教学目的	1.掌握普通光学显微镜的构造及使用方法； 2.了解油浸系物镜的基本原理和使用方法； 3.掌握对微生物标本的形态观察。			
教学学时	3 学时			
思政目标	培养细致耐心、勇于探索科学精神。			
教学设计	教学要点	训练要点与要求	训练方法	备注
	显微镜的构造	认识和了解普通光学显微镜的结构构造。	实物观察与操作。	
	粗调节器和细调节器的使用	掌握粗调节器和细调节器的功能、使用方法和注意事项。	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	载物台和推动器的使用	掌握载物台和推动器的功能、使用方法和注意事项。	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	油浸系物镜的基本原理和使用方法	掌握油浸系物镜的使用方法	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	观察使用	1. 显微镜的放置。 2. 光线的采集与调节。 3. 标本的安装。 4. 观察、寻找观察对象过程 5. 油镜的使用 6. 观察结束后的养护。	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。		课后完成
考核方法	实践考核。			
考核标准	1、 实践操作（50分）； 2、 实验报告（40分）； 3、 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10分）。			
分组要求	独立操作。			
其它要求				

《普通光学显微镜的使用及微生物的形态观察》项目实验 教学过程设计

一、实验目的：

1. 掌握的构造及使用方法；
2. 了解油浸系物镜的基本原理和使用方法；
3. 掌握对微生物标本的形态观察。

二、实验材料：

普通光学显微镜、微生物染色装片标本、香柏油、二甲苯、擦镜纸，面巾纸

三、实验步骤：

1. 实验室安全教育：

进入实验室禁止喧哗、追逐；

食品、零食、水杯禁止带进实验室；严禁在实验室内玩火；

禁止未经许可乱动实验药品和实验器材，严禁将实验药品带出实验室，严禁将多余或实验之后的可食用性实验材料进行食用；

进实验室后，禁止随意移动实验台上的一切药品及用具，对他人的实验结果（如培养物）只看不动；

实验完毕，应将所有用具清洗干净，放回原位，保持刚进实验室的状况；

结束时，注意做好卫生值日工作，离开时，确保关水关电及锁门。

2. 显微镜、油浸系物镜的使用

2.1 讲述、演示普通光学显微镜的结构和性能

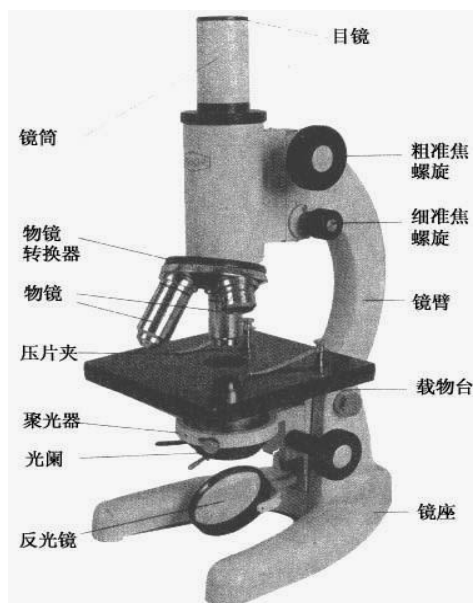


图 7-1 普通光学显微镜结构图

注意：变更物镜（转动器的转动）和调焦时的镜筒变化方向（逐渐上升）。

观察顺序：装片——低倍镜到视野——高倍镜观察。

2.2 低倍镜观察染色装片

上升镜筒 → 放置装片 → 下降物镜至距装片 0.5cm 处 → 调光 → 用粗调节器调焦距（徐徐上升） 用细调节器细调焦距 观察

2.3 高倍镜观察染色装片

低倍镜观察后换高倍镜（注意避免镜头与玻片相撞） → 调节光度 → 细调节器校正焦距 观察。→

2.4 讲述油浸系物镜的工作原理与使用方法

2.4.1 油镜的辨认：

油镜上有 OI 或 HI 字样，或一圈红或黑线标记，要物镜中，油镜的放大倍数和数值孔径最大，工作距离最短。

2.4.2 工作原理：

油镜在物镜与装片之间的介质为香柏油，其折射率与玻璃相近，光线经载玻片后可直接通过香柏油进入物镜而不发生折射，可通过增加数值孔径而提高分辨率，同时增加视野的亮度。

2.5 油镜观察装片

高倍镜观察后提起镜筒、换油镜至正下方 → 玻片的镜检部位加一滴香柏油 → 下降油镜浸于油中（以油圈不扩大为止，镜头不可压及装片） 调光 → 上升镜筒调焦距 → 观察

3. 微生物的形态观察

将各种微生物的染色装片放于显微镜下观察。

4. 镜检完毕后的工作

4.1 移开物镜镜头

4.2 取出装片

4.3 清洁油镜，用擦镜纸擦去香柏油，再沾少许二甲苯擦去残留的香柏油，再擦净残留的二甲苯。

4.4 擦净显微镜，将各部分还原。

四、作业

1. 绘制观察到的标本形态。

2. 为什么在使用高倍镜和油镜观察标本之前要先用低倍镜进行观察？

项目名称	二、培养基的配制及灭菌技术			
教学目的	1. 掌握培养基配制的原理与方法； 2. 熟悉和掌握牛肉膏蛋白胨培养基培养基的配制； 3. 了解高压蒸汽灭菌锅的构造与正确使用方法。			
教学学时	3 学时			
思政目标	树立科学世界观和科技服务生活的意识。			
教学设计	教学要点	训练要点与要求	训练方法	备注
	培养基的配制方法	掌握培养基配制的基本方法与技能	实物观察与操作。	
	高压蒸汽灭菌锅的工作原理	了解并掌握高压蒸汽灭菌锅的工作原理	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	高压蒸汽灭菌锅的使用方法	掌握高压蒸汽灭菌锅的使用方法	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	掌握斜面培养基的制作	掌握斜面培养基的制作	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	掌握灭菌培养基的无菌检验技术	掌握灭菌培养基的无菌检验技术	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。		课后完成
考核方法	实践考核。			
考核标准	1、 实践操作（50分）； 2、 实验报告（40分）； 3、 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10分）。			
分组要求	独立操作。			
其它要求				

《培养基的配制及灭菌技术》项目实验教学过程设计

一、实验目的：

1. 掌握培养基配制的原理与方法；
2. 熟悉和掌握牛肉膏蛋白胨琼脂培养基的配制；
3. 了解高压蒸汽灭菌锅的构造与正确使用方法。

二、实验材料：

高压蒸汽灭菌锅、电炉、烧杯、三角瓶（300ml）、试管、三角瓶塞、玻棒、牛皮纸、棉绳、长颈漏斗、勺子、牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、电子称、量筒、PH试纸等。

三、实验步骤：

1. 培养基的配制方法

称药品 → 加热溶解 → 调 PH → 过滤 → 分装 → 加棉塞 → 包扎 → 灭菌
摆斜面 → 无菌检查

2. 培养基配制的方法与步骤

2.1 培养基配方：

牛肉膏 3g，蛋白胨 10g，NaCl 5g，琼脂 15~20g，水 1000ml，pH7.0~7.2。

2.2. 配制步骤：

- ①称药品。按配方称取各成分，放入已加适量水的烧杯中。
- ②加热溶解。烧杯于石棉网上加热，并用玻棒搅拌，将琼脂加入已溶解药品中，继续加热并不断搅拌，最后补足水分。
- ③调 PH。若 PH 偏酸，用 1mol/L 的 NaOH 调；偏碱，用 1mol/L 的 HCl 调。PH 的调整通常放在加琼脂前。
- ④分装。将熬成的培养基趁热分装。培养基高度约为试管长度的 1/5~1/4，约 10~15ml，注意避免将培养基沾于试管口内外。分装后的试管，在培养基凝固前必须立放。
- ④制棉塞。用叠放式将未脱脂棉做成棉球，塞入试管口，管口内棉塞底部要求光滑，棉塞侧面要求无褶皱，棉塞长度的 2/3 在管口内。棉塞的松紧以手提棉塞轻晃试管不滑出为度。
- ⑤捆把。

包扎，贴上标签，准备灭菌。

3. 高压蒸汽灭菌锅的结构、工作原理与使用方法。

3.1 结构：实体认识。

包括锅体、压力表、安全阀、排气阀、灭菌锅腔、筛架、锅盖、胶垫圈、紧固螺栓等。

3.2 原理：利用高压产生的高蒸汽温度杀灭微生物的方法。

3.3 使用方法：装锅 → 加热排气 → 升压 → 保压灭菌 → 降压出锅

关键：排净冷空气

注意：灭菌时间和压力因培养基而异。

升降压力要稳

灭菌时间从保压时算起

压力降至“0”才能开盖

4. 培养基的灭菌

加水→培养基入锅→上盖→对称、均匀地扭紧螺栓→加热升温→冒热气 3-5min, 以排冷空气→关闭排气阀, 继续升温, 压力升至 1 kg/cm², 温度过到 121℃时, 开始稳压 25~30min→熄火, 自然降压至压力为 0 (若降压太快, 试管中的培养基易沸腾浸湿棉塞)→锅盖半开, 让锅内多余蒸汽逸出, 锅内的余热烘干棉塞→开盖, 取物→摆斜面→斜面试管上可覆盖洁净和厚毛巾或几层纱布, 防止试管内产生过多的冷凝水。

5. 无菌检验

制作斜面培养基, 室温或 37℃培养 48 小时, 观察培养结果。

四、作业

1. 如何检验培养基灭菌是否彻底?
2. 高压蒸汽灭菌时, 为什么要排尽锅内的冷空气?

项目名称	三、斜面培养基的制作及微生物的接种技术			
教学目的	1.帮助学生建立无菌操作概念 2.学习、掌握无菌操作技术 3.学习、掌握斜面培养基的制作技术 4.学习、掌握微生物的斜面接种技术			
教学学时	3 学时			
思政目标	培养认识问题、分析问题和解决问题的科学能力。			
教学设计	教学要点	训练要点与要求	训练方法	备注
	斜面培养基的制作技术	无菌操作 灭菌后立即取出，摆置成适当斜面，斜面长度以试管长度的 1/2~2/3 为宜，待其自然凝固	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	无菌操作技术	1.接种空间一定要彻底的消毒灭菌； 2.操作人员双手要用 75%的酒精消毒，不戴口罩操作时要尽量少说话，工作台面必须经酒精擦抹消毒； 3.各种操作（接种，倒培养基，加样品，涂布等）需在火焰区内进行； 4.整个操作过程中，动作必须准确迅速无误，时时刻刻树立无菌观念。 5.各种接种工具和菌种接触前应该经火焰灼烧灭菌，冷却后现接菌种，以免烫死或烫伤菌种。	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	转管、斜面接种技术	注意无菌操作	教师讲授并示范，学生实践操作。	
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。		课后完成
考核方法	实践考核。			
考核标准	1、 实践操作（50分）； 2、 实验报告（40分）； 3、 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10分）。			
分组要求	独立操作。			
其它要求				

《斜面培养基的制作及微生物的接种技术》项目实验教学 过程设计

一、实验目的：

- 1.帮助学生建立无菌操作概念
- 2.学习、掌握无菌操作技术
- 3.学习、掌握斜面培养基的制作技术
- 4.学习、掌握微生物的斜面接种技术

二、实验材料：

无菌试管培养基，超净工作台，酒精灯，接种环，酒精棉球、酵母菌、枯草杆菌、大肠杆菌等。

三、实验步骤：

1. 无菌操作

将微生物分离、转接及培养时防止被其他微生物污染的技术称为无菌技术。

无菌操作技术要点

接种空间一定要彻底的消毒灭菌；

菌中所暴露或通过的空间必须是无菌区；

菌种管口、瓶口的部分必须用酒精灯火焰封闭；

各种接种工具在和菌种接触前应该经火焰灼烧灭菌，冷却后再接触菌种，以免烫死或烫伤菌种；

棉塞塞入管口或瓶口的部分，拔出后不要与未经灭菌的物体接触；

每次接种的时间不宜过长，以免空气中杂菌的基数积累太多，影响转管、接种效果；

操作人员应换消毒的工作服、戴口罩，双手要用 70-75%的酒精消毒；

不戴口罩操作时应尽量少说话；

整个操作过程中，动作必须准确迅速无误，时时刻刻树立无菌观念。

2. 斜面培养基的制作

2.1 对工作台面进行全面消毒

2.2 培养基灭菌后，如制作斜面培养基和平板培养基，须趁培养基未凝固时进行。

在实验台上放 1 支长 0.5~1 米左右的木条，厚度为 1 厘米左右。将试管头部枕在木条上，使管内培养基自然倾斜。

2.3 待冷却凝固后即成斜面培养基。

3. 斜面接种技术

3.1 接种前的准备

3.1.1 检查接种工具，进行环境消毒；

3.1.2 在欲接种的培养基试管或平板上贴好标签，标上接种的菌名、操作者、接种日期等。

3.1.3 将培养基、接种工具和其他用品全部放在实验台上摆好，进行环境消毒。

3.2 接种方法

3.2.1 将菌种试管与待接种的试管培养基依次排列，挟于左手的拇指与其他四指之间，用右手的无名指与小指和手掌边拔出棉塞并挟住。

3.2.2 置试管口于酒精火焰附近。

3.2.3 将接种工具垂直插入酒精火焰中烧红，再横过火焰 3 次，然后再放入有菌试管内，在管壁上停留片刻待其冷却。

3.2.4 取少许菌种置于另一支试管中，用接种环在菌种中沾取少量菌样，在培养基斜面上作“之”字形划线，把菌种接种到新的培养基上。

3.2.5 取出接种工具，试管口和棉塞进行火焰灭菌。

3.2.6 重新塞上棉塞。

3.2.7 烧死接种工具上的残余菌，把试管和接种工具放回原处。

注意：划线过程不能划破培养基表面。

4. 培养

斜面接种后于 37℃ 恒温培养 48h，观察。

四、作业

- 1、为什么从事微生物实验工作的基本要求是无菌操作？
- 2、平板培养基制作过程要注意哪些方面？
- 3、斜面接种操作时需要注意什么？

项目名称	四、平板培养基的制作与划线分离、涂布接种技术			
教学目的	1.帮助学生进一步建立无菌操作概念 2.学习、掌握平板培养基的制作技术 3.学习、掌握微生物的平板划线分离技术 4.学习、掌握微生物的平板涂布接种技术			
教学学时	3 学时			
思政目标	培养实事求是，求真务实的科学精神。			
教学设计	教学要点	训练要点与要求	训练方法	备注
	平板培养基制作技术	无菌操作 厚度适宜、厚薄均匀	教师讲授并示范， 学生实践操作。	
	涂布接种技术	涂布均匀 不涂破培养基面	教师讲授并示范， 学生实践操作。	
	划线分离技术	划线均匀 不划破培养基面	教师讲授并示范， 学生实践操作。	
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。		课后完成
考核方法	实践考核。			
考核标准	1、 实践操作（50分）； 2、 实验报告（40分）； 3、 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10分）。			
分组要求	独立操作。			
其它要求				

《平板培养基的制作与划线分离和涂布接种技术》项目实验教学过程设计

一、实验目的：

- 1.帮助学生建立无菌操作概念
- 2.学习、掌握平板培养基的制作技术
- 3.学习、掌握微生物的平板划线分离技术
- 4.学习、掌握微生物的平板涂布接种技术

二、实验材料：

无菌牛肉膏蛋白胨培养基，无菌培养皿、三角瓶，玻璃珠，滴管，超净工作台，酒精灯，接种环，无菌涂布棒、酒精棉球、枯草杆菌，记号笔，标签纸等。

三、实验步骤：

1. 平板培养基的制作

- 1.1 对工作台面进行全面消毒
- 1.2 在火焰区内将约 50℃的融化培养基倒向无菌培养皿，每皿约倒 15-20ml 培养基。
- 1.3 将已倒入培养基培养皿水平摊放，待冷却凝固。

2. 涂布接种

- 2.1 将菌种或样品进行适当稀释。
- 2.2 用无菌滴管或取液器，取少量菌种液或样品液，并滴一滴于平板上。
- 2.3 用灭菌涂布棒将平板上的菌种液或样品液涂抹均匀。
- 2.4 将用过的涂布棒灼烧灭菌。
- 2.5 将涂布好的平板平放 20-30min，然后倒置保温培养。

3. 划线分离技术

- 3.1 在无菌条件下，将菌种或样品进行适当稀释。
- 3.2 用接种环取一环样品或菌种。
- 3.3 在近火焰处，左手拿平板并稍抬皿盖，右手将取有样品或菌种的接种环伸入皿内，在培养基表面轻轻划线。
- 3.4 划线完毕后，用火焰快速灼烧皿盖打开处，并盖回。将接种环灼烧灭菌。
- 3.5 将划好线的平板平放 20-30min，然后倒置保温培养。

四、作业

1. 涂布接种时应注意什么？
2. 划线分离时应注意什么？

项目名称	五、微生物的显微镜直接计数法			
教学目的	1.进一步掌握普通光学显微镜使用方法； 2.掌握对微生物菌体的计数方法。			
教学学时	3 学时			
思政目标	培养一丝不苟、精益求精的工匠精神。			
教学设计	教学要点	训练要点与要求	训练方法	备注
	血球计数板的结构	认识和了解血球计数板的结构和特征。	实物观察与操作。	
	血球计数计数的原理	了解和掌握计数室的构造与特征； 掌握菌体的计数方法与原则； 掌握计数板的计算公式。	教师讲授并示范， 学生实践操作。	
	菌悬液的稀释与制备	掌握菌悬液的 10 倍系列梯度稀释方法	教师讲授并示范， 学生实践操作。	
	菌液滴加过程	掌握菌液的滴加过程——毛细渗透作用	教师讲授并示范， 学生实践操作。	
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。		课后完成
考核方法	实践考核。			
考核标准	1、实践操作（50 分）； 2、实验报告（40 分）； 3、实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10 分）。			
分组要求	独立操作。			
其它要求				

《微生物显微镜的直接计数法》项目实验教学过程设计

一、实验目的：

1. 进一步掌握普通光学显微镜使用方法；
2. 掌握对微生物菌体的计数方法。

二、实验材料：

普通光学显微镜、血球计数板、酵母菌、盖玻片，二甲苯、擦镜纸、面巾纸、三角瓶，滴管等。

三、实验步骤：

1. 血球计数板的构造

由3个平台组成，每平台有含9个大格的方格网，中间大格为计数室。

计数室：长和宽各为1mm，中间平台下陷0.1mm，故计数室体积为0.1mm³。

2. 细菌数量的测定

制备稀释菌液 → 镜检计数室 → 计数

2.2.1 菌悬液的制备

采用10倍系列稀释法，稀释度以每小格内含5-10个酵母为宜。

2.2.2 镜检计数室

加样前，先对计数板的计数室进行镜检，确保清洁。如有污物，清洗，用电吹风吹干后使用。

2.2.3 加样品

向血球计数板盖上盖片，再用无菌毛细滴管将菌悬液沿盖片边缘的缝隙以毛细渗透作用自动进入计数室，用吸水纸吸去多余水液，样品要均匀充满计数室，注意避免气泡的产生。

2.2.4 计数

静置5min，先用低倍镜找出计数室所在位置，后用高倍镜进行计数。

为容易看清计数室的方格线，光线要暗些。

对于位于线上的细胞计数原则：查上不查下，查左不查右。当酵母菌芽体达到母细胞大小1/2时可计为两个细胞。

将计数结果填写于课本P114表8-1之中。

3. 镜检完毕后的工作

擦净显微镜，清洗计数板，将各部分还原。

四、作业

1. 为什么计数室内不能有气泡？
2. 为什么计数前需先静置5分钟？

项目名称	六、微生物的平板菌落计数法			
教学目的	1. 了解平板菌落计数的原理 2. 掌握样品稀释液的制备方法 3. 掌握涂布平板培养法和倾注平板培养法的操作技术 4. 掌握菌落计数的原则 5. 掌握总菌落的计算方法			
教学学时	3 学时			
思政目标	培养实事求是、认真负责的工作作风。			
教学设计	教学要点	训练要点与要求	训练方法	备注
	样品稀释操作	无菌操作 10 倍系列梯度稀释	教师讲授并示范， 学生实践操作。	
	倾注平板制作	加菌液时培养基温度在 50℃ 左右 菌液与培养基混合应均匀	教师讲授并示范， 学生实践操作。	
	菌落的计数	菌落特征的认识 单菌落的识别与计数 菌落与菌苔的区别 菌落数的统计方法与公式	教师讲授并示范， 学生实践操作。	
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正 确、清晰。		课后完成
考核方法	实践考核。			
考核标准	4、实践操作（50 分）； 5、实验报告（40 分）； 6、实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10 分）。			
分组要求	分组操作。 单独计数。			
其它要求				

《微生物的平板菌落计数法》项目实验教学过程设计

一、实验目的：

- 1.了解平板菌落计数的原理
- 2.掌握样品稀释液的制备方法
- 3.掌握涂布平板培养法和倾注平板培养法的操作技术
- 4.掌握菌落计数的原则
- 5.掌握总菌落的计算方法

二、实验材料：

无菌牛肉膏蛋白胨培养基，无菌培养皿、三角瓶，无菌水，无菌试管、玻璃珠，滴管，超净工作台，酒精灯，无菌涂布棒、酒精棉球、枯草杆菌（菌悬液），记号笔，标签纸等。

三、实验步骤：

1.样品稀释液的制备

于试管中制备枯草杆菌的 10 倍系列梯度稀释液，可制至 10^{-9} 浓度，具体应根据样品而定。注意避免吸取菌液时的交叉感染。

2.平板接种培养法

2.1 涂布平板接种法

将已融化并冷却至 $45-50^{\circ}\text{C}$ 的培养基倒入培养皿中，静置凝固，后编号；

用无菌吸管吸取 0.1ml 菌液滴在相应编号的平板培养基面上，用无菌涂布棒（刮铲）将菌液在平板上涂抹均匀。注意每个浓度用一个涂布棒。

涂布好的平板平放静置 $10-20\text{min}$ ，使菌液渗透入培养基内，后将平板倒转， 37°C 保温培养，至长出菌落后即可计数。

2.2 倾注平板培养法

对无菌平板编号，向相应的平板吸入 1ml 的稀释菌液，再向其倒入约 50°C 的融化培养基，轻转动平板，混均菌液和培养基，静置凝固， 37°C 倒置培养，至长出菌落后即可计数。

3.计数（计数方法见 P63）

当菌落形成时即可计数。计算每个平板上的菌落数，求出同稀释度的各平板平均菌落数，现乘以稀释倍数，算出原始样品中的菌落数。完成课本 P113 的表 8-2。

统计公式：

倾注平板培养法：每 ml 样品的菌数=同一稀释度几次重复的菌落平均数×稀释倍数

涂布平板培养法：每 ml 样品的菌数=同一稀释度几次重复的菌落平均数×10×稀释倍数

合适的稀释度有如下标准：

(1) 同一稀释度各个重复的菌数相差不太悬殊。

(2) 细菌、放线菌和酵母菌以每皿 30-300 个菌落为宜，霉菌以每皿 10-100 个菌落为宜。

四、作业

1. 平板菌落计数法的原理是什么？

2. 平板菌落计数法与显微镜直接计数法相比，各有何优缺点？

项目名称	七、细菌涂片制作及革兰染色技术		
教学目的	1.掌握微生物涂片基本技术 2.掌握微生物的染色基本技术 3.掌握微生物的革兰氏染色技术 4.初步认识细菌的形态特征		
教学学时	3 学时		
思政目标	培养勇攀技能高峰、探索求真的科学精神。		
教学设计	技能点	训练要求与标准	训练方法
	细菌的涂片技术	菌液涂散应尽可能的薄。 涂片完毕后，取种器应经火焰灭菌。 固定时，加热程度以玻片不烫手为宜。	教师讲授并示范，向学生强调注意事项，由学生具体操作
	革兰氏染色的原理		教师讲授
	实验数据的记录及结果处理，实验总结		对学生操作过程中出现的不规范操作进行强调并纠正，总结各项技能点的掌握要点
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。	课后完成
考核方法	过程考核：操作（80分）+ 报告（20分）		
考核标准	1、细菌的革兰氏染色（70分）； 2、实验报告（20分）； 3、实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10分）。		
分组要求	独立完成		
场地要求	微生物室		
设备仪器	接种针、显微镜、酒精灯、载玻片		

《细菌涂片制作及革兰染色技术》项目实验教学过程设计

一、实验目的：

1. 掌握微生物涂片基本技术
2. 掌握微生物的染色基本技术
3. 掌握微生物的革兰氏染色技术
4. 初步认识细菌的形态特征

二、实验材料：

培养 24 小时左右的大肠杆菌（G⁻）和培养 12 小时左右的金黄杆菌（G⁺）、革兰氏染色试剂、香柏油、二甲苯、显微镜、载玻片、盖玻片、吸水纸、擦镜纸、接种环、酒精灯等。

三、实验步骤：

1. 细菌的革兰氏染色原理

1.1 细菌细胞常带有电荷，可与相关酸碱性染料结合而使细菌着色，易于观察。

1.2 在革兰氏染色中，由于细菌细胞壁的化学组成及结构不同而产生不同的染色结果。

①革兰氏阳性细菌：细胞壁较厚、肽聚糖含量较高和其分子交联度较紧密，用乙醇洗脱时，肽聚糖网孔会因脱水而明显收缩，加上它基本不含类脂，故经乙醇处理不能在壁上溶出缝隙，因此，结晶紫与碘复合物仍牢牢阻留在细胞壁内，使其呈现紫色。

②革兰氏阴性细菌：壁薄、肽聚糖含量低和交联松散，故遇乙醇后，肽聚糖网孔不易收缩，加上它类脂含量高，所以当乙醇把类脂溶解后，细胞壁上出现较大缝隙，复合物容易溶出细胞壁，因此经乙醇脱色后，细胞又成无色。再用红色染料进行复染，革兰氏阴性细菌获得一层新的颜色—红色。

2. 细胞的涂片技术

在玻片中央滴一滴清水，取一环菌体，轻涂于滴水中，并涂散成适当大小的薄层，用火焰进行干燥和固定。

3. 革兰氏染色的方法与步骤

3.1 简单涂片染色法

涂片 → 干燥 → 固定 → 染色 → 水洗 → 干燥 → 镜检观察

1) 涂片。取清洁干净载玻片一块，于中央加一滴蒸馏水，按无菌操作作用接种环取一环菌物，然后在水滴中均匀地涂成薄涂片。涂布后须将接种环烧灼灭菌。

2) 干燥。涂片放室温自然干燥；也可将标本面向上，在离火焰约 15 cm 高处微微加热烘干，切勿靠近火焰；或用电风吹干。

3) 固定。手执玻片一端，让涂菌的一面朝上，通过火焰 2-3 次（以不烫手为宜）。

4) 染色。将玻片平放于台面上，滴加 1 滴或 2 滴染液于涂片上（以染液刚好覆盖涂片薄膜为宜），1-2 分钟。

5) 水洗。倾去染液，用蒸馏水从载玻片的一端轻轻进行冲洗，直到从涂片上流下的水无色为止。水洗时，不要让水流直接冲洗涂面，水流不宜过急、过大，以免涂片薄膜脱落。

6) 干燥。自然干燥。

7) 镜检。将涂片置于显微镜下进行形态观察。

3.2 革兰氏染色法

涂片 → 干燥 → 固定 → 初染 → 媒染 → 脱色 → 复染 → 镜检观察

- 1) 涂片。同简单涂片染色法。
- 2) 干燥。同简单涂片染色法。
- 3) 固定。同简单涂片染色法。
- 4) 初染。将玻片平放于台面，加适量的结晶紫染色液，染色 1min。
- 5) 水洗。倾去染色液，用水冲洗，直到从涂片上流下的水无色为止。
- 6) 媒染。滴加碘液，染色 1 min。
- 7) 水洗。倾去染色液，用水冲洗。
- 8) 脱色。将玻片倾斜，连续滴加 95%乙醇脱色 20-30S, 至流出液无色，立即水洗。
- 9) 水洗。用水冲洗。
- 10) 复染。滴加蕃红复染 5min。
- 11) 水洗。倾去染色液，用水冲洗。
- 12) 干燥。自然风干。
- 13) 镜检。将涂片置于显微镜下进行形态观察。
- 14) 实验完毕后的处理

先用擦镜纸将浸过油的油镜头上的油擦去，再用擦镜纸蘸少许无水乙醇将镜头擦 2-3 次，再用干净的擦镜纸擦 2-3 次。

观察后的染色玻片用无水乙醇将油擦干净。

4. 注意事项

4.1 革兰氏染色成败的关键是酒精脱色。如脱色过度，革兰阳性菌可被脱色而染成阴性菌；如脱色时间过短，革兰阴性菌会被染成革兰阳性菌。脱色时间的长短还受涂片厚薄及乙醇用量多少等因素的影响，难以严格规定。

4.2 染色过程中勿使染色液干涸。用水冲洗后，应吸去玻片上的残水，以免染色液被稀释而影响染色效果。

4.3 选用幼龄细菌。若菌龄太老，由于菌体死亡或自溶常革兰阳性菌转呈阴性反应。

四、作业

1. 做革兰氏染色涂片时为什么不能过于浓厚？其染色成败的关键一步是什么？

项目名称	八、化妆品中细菌菌落总数的测定		
教学目的	1. 掌握化妆品中细菌菌落总数检验的程序与方法 2. 了解化妆品中细菌菌落总数检验的实际意义 3. 学习、掌握细菌菌落总数平板计数方法		
教学学时	3 学时		
思政目标	培养细致严谨、求真务实的科研思维。		
教学设计	技能点	训练要求与标准	训练方法
	检验原理	细菌总数系指 1g 或 1mL 化妆品样品中所含的活细菌数量。测定细菌菌落总数可用来判明化妆品被污染的程度, 以及生产单位所用的原料、工具设备、工艺流程、操作者的卫生状况, 是对化妆品进行卫生学评价的综合依据。	教师讲授
	样品的稀释	训练在无菌条件下利用玻璃吸管稀释样品至一系列浓度的方法	教师讲授并示范, 学生实践操作
	倾注法	掌握在无菌条件下进行样品与培养基倾注混匀的方法	教师讲授并示范, 学生实践操作
	菌落总数的计算方法	掌握菌落总数的计数原则 (P140-143), 计算 1g 或 1mo 化妆品中所污染的活的细菌的数量。	教师讲授, 学生根据实验结果编制实验报告
	实验报告的书写	能正确编制报告, 内容完整、书写正确、清晰。	
考核方法	实践考核		
考核标准	实践操作 (50 分); 实验报告 (40 分); 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯 (10 分)。		
分组要求	分组实验		
场地要求	微生物室		
设备仪器	酒精灯、灭菌培养基和培养皿, 超净工作台		

化妆品中细菌菌落总数的测定

一、实验目的

- 1.掌握化妆品中细菌菌落总数检验的程序与方法
- 2.了解化妆品中细菌菌落总数检验的实际意义
- 3.学习、掌握细菌菌落总数平板计数方法

二、实验原理

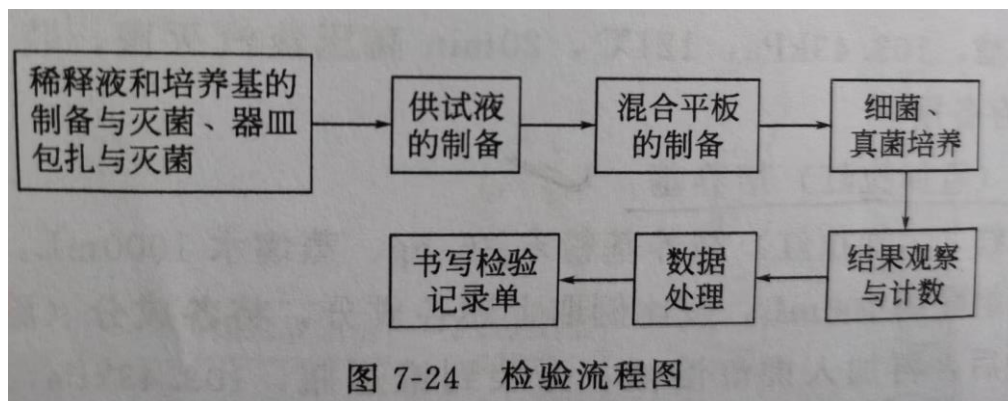
细菌总数系指 1g 或 1mL 化妆品样品中所含的活细菌数量。测定细菌菌落总数可用于判明化妆品被污染的程度，以及生产单位所用的原料、工具设备、工艺流程、操作者的卫生状况，是对化妆品进行卫生学评价的综合依据。

《化妆品安全技术规范》(2015 版)规定细菌、真菌菌落总数采用平板计数法测定。

平板计数法：以无菌操作方法，用灭菌吸管吸取 1mL 充分混匀的待检化妆品稀释液，注入无菌培养皿内，倾注已融化并冷却到 45℃~50℃左右的卵磷脂、吐温-80 营养琼脂（测定细菌），并立即旋摇平板，使化妆品与培养基充分混匀。每种培养基的每个稀释级应倾注两个平板，同时用另一只倾注培养基的平板作为空白对照。待琼脂冷却凝固后，倒置平板，使底面向上，营养琼脂平板置 36℃±1℃，培养 48h±2h，进行菌落计数。平板上的菌落数(每个菌落代表一个原始菌)乘以稀释倍数即为 1g 或 1mL 化妆品样品中所含的活菌数，以菌落数目的多少判断化妆品被污染的程度。

化妆品中污染的微生物种类不同，每种微生物都有它一定的生理特性，培养时对营养要求、培养温度、培养时间、pH 值、需氧性质等均有所不同。在实际工作中，不可能做到一种培养条件都能满足所有菌的培养要求，因此所测定的结果，只包括在本方法使用的条件下（细菌：卵磷脂、吐温-80 营养琼脂上，于 36℃±1℃，培养 48h±2h）能生长的菌数。

检验程序如下图



三、实验材料

1. 仪器与设备

锥形瓶、100mL 量筒、15×150mm 试管、直径 9cm 培养皿、10mL、1.0mL 吸量管、酒精灯、玻棒、精密 pH 试纸、放大镜、天平、棉塞、棉绳、牛皮纸、电热套、记号笔、火柴、高压蒸汽灭菌器、恒温培养箱。

2. 培养基与试剂

卵磷脂吐温 80-营养琼脂培养基、0.5%氯化三苯四氮唑（2,3,5-triphenyl terazoliumchloride, TTC）、虎红培养基、氯化钠、氯霉素、1.0mol/L 氢氧化钠、1.0mol/L 盐酸、蒸馏水，以上涉及化学试剂

剂均用化学纯规格。

3. 供试品

化妆水。

四、实验步骤

1. 配制稀释液、培养基及包扎相关器具

(1) 稀释液-生理盐水

成分：氯化钠 8.5g 蒸馏水 1000mL

制法：每组配制 120mL。按比例取上述各成分混合，溶解后，分装到加玻璃珠的三角瓶内，90mL/瓶，另分装 2 支试管，9mL/支，包扎，103.43kPa，121℃20min，高压蒸汽灭菌。

(2) 卵磷脂、吐温 80-营养琼脂培养基

成分：卵磷脂、吐温 80-营养琼脂粉末 48g 蒸馏水 1000mL

制法：每组配制 100mL。按比例取上述各成分，加热溶解后补水调 pH 值为 7.1~7.4，分装到锥形瓶，103.43kPa，121℃20min 高压蒸汽灭菌，备用。

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

成分：TTC 0.5g 蒸馏水 100mL

溶解后过滤，103.43kPa，121℃ 20min 高压蒸汽灭菌，装于棕色试剂瓶，置 4℃冰箱保存备用。

(4) 虎红（孟加拉红）培养基

成分：虎红（孟加拉红）培养基粉末 36.5g，蒸馏水 1000mL

制法：每组配制 100mL。按比例取上述各成分，将各成分（除虎红外）加入蒸馏水中溶解后，再加入虎红溶液。分装到锥形瓶，103.43kPa，121℃20min 高压蒸汽灭菌。另用少量乙醇溶解氯霉素，过滤溶解后加入培养基中，若无氯霉素，使用时每 1000mL 加链霉素 30mg。

(5) 仪器包扎

培养皿 13 套、1.0mL 吸量管 11 支、10mL 吸量管 1 支。

包扎好的物品、稀释液和培养基，写上记号，统一灭菌，备用。

2. 化妆品细菌菌落总数测定-平板计数法

(1) 制备供试液

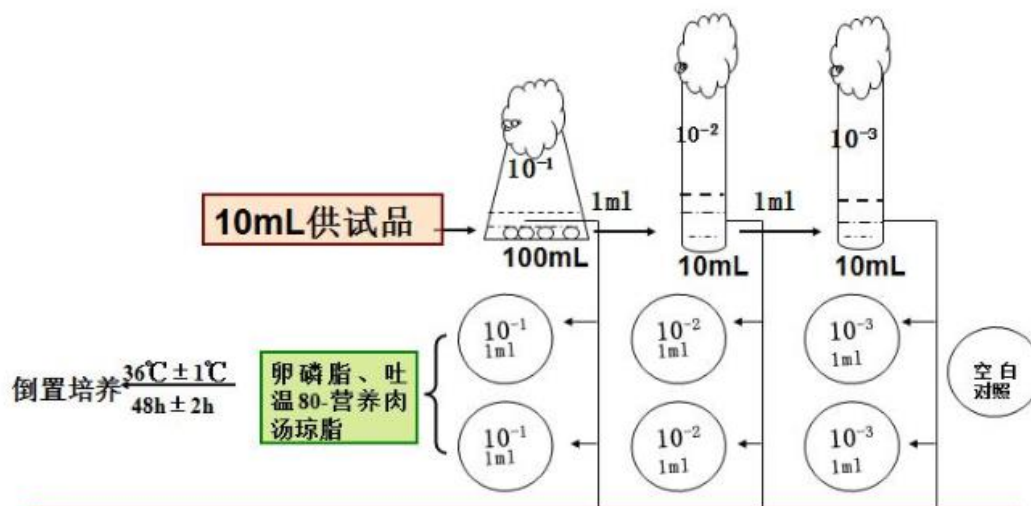
无菌操作吸取供试品 10mL 加到 90mL 生理盐水中，充分振荡，使之溶解并混匀，即为 10^{-1} 供试液。取 10^{-1} 供试液 1mL，加入装有 9mL 无菌生理盐水的试管中，充分混匀，即为 10^{-2} 供试液，以此类推可制得 10^{-3} 供试液。取 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 三个稀释级的供试液进行菌数测定。

(2) 制备混合平板

用灭菌吸量管分别吸取 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 的供试液各 1mL，置直径 90mm 的无菌培养皿中，注入约 15mL 融化并冷却至 45℃~50℃的卵磷脂、吐温 80-营养琼脂培养基（细菌计数），混匀，待琼脂凝固后，细菌倒置于 36℃±1℃恒温培养箱内，培养 48h±2h，进行菌落计数。每种培养基的每个稀释级至少制备 2 个平板，每种稀释度应更换 1 支吸量管。

(3) 空白对照

另取一个灭菌空培养皿，加入约 15mL 卵磷脂、吐温 80-营养琼脂培养基，倒置于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内，培养 $48\text{h} \pm 2\text{h}$ ，作为空白对照。



化妆品细菌菌落总数检验示意图

3. 菌落计数与结果判定

(1) 菌落计数

细菌培养 $48\text{h} \pm 2\text{h}$ ，真菌培养 5d 计数，先用肉眼观察，点数菌落数，然后再用放大 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。

(2) 结果计算 (P142)

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。

①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 5-03 中例 1）。

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得来决定，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 5-03 中例 2 及例 3）。

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 5-03 中例 4）。

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 5-03 例 5）。

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 5-03 中例 6）。

⑥若所有的稀释度均无菌生长，报告数为每 g 或每 mL 小于 10CFU。

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 5-03 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5-03 细菌计数结果及报告方式

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

注：CFU-菌落形成单位。按重量取样的样品以 CFU/g 为单位报告；按体积取样的样品以 CFU/mL 为单位报告。

五、思考题

1. 在含化妆品稀释液的培养皿中加培养基时，培养基的温度为什么需要控制在 45°C ？
2. 为什么要测定化妆品中的细菌总数？

项目名称	九、空气中微生物的测定		
教学目的	1. 掌握沉降法检测空气中微生物的方法 2. 能够计算空气中的微生物数量 3. 能够根据试验结果分析空气质量		
教学学时	3 学时		
思政目标	培养爱护环境、爱护卫生的意识。		
教学设计	技能点	训练要求与标准	训练方法
	沉降法	细菌的暴露取样方法	教师讲授并示范, 学生实践操作
	过滤法	细菌的抽滤取样方法	教师讲授并示范, 学生实践操作
	奥氏公式 (沉降法)	$C=1000/10 \div (t/5 \times A/100)N=50000N/At$ C: 1m ³ 空气所含菌数, (个) 菌/m ³ ; N: 平板上的菌落数; A: 平板面积 (cm) ² ; t: 时间 (min);	教师讲授并示范, 学生实践操作
	实验报告的书写	能正确编制报告, 内容完整、书写正确、清晰。	课后完成
考核方法	实践考核		
考核标准	实践操作 (50 分); 实验报告 (40 分); 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯 (10 分)。		
分组要求	分组		
场地要求	微生物室		
设备仪器	超净工作台、酒精灯等		

九 《空气中微生物的测定》项目实验教学过程设计

一、实验目的：

1. 掌握沉降法检测空气中微生物的方法
2. 掌握空气中微生物的过滤检测方法
3. 能够计算空气中的微生物数量
4. 能够根据试验结果分析空气质量

二、实验材料：

无菌牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、无菌马铃薯蔗糖培养基、无菌高氏一号培养基、重铬酸钾溶液、超净工作台、无菌三角瓶、1mL 无菌吸管、10ml 无菌吸管、无菌试管、无菌水、酒精灯、标签纸、无菌培养皿、5L 蒸馏水瓶、具 50ml 无菌水的三角瓶等。

三、实验步骤：P197-198

沉降法 1. 制作平板培养基

每种培养基各制作 2 皿平板培养基。

制作马铃薯蔗糖平板（真菌）时，先在培养皿内加入适量的链霉素，再倒入培养基，混匀；

制作高氏一号培养基（放线菌）时，先在培养皿内加入适量的重铬酸钾溶液，再倒入培养基，混匀。

2. 暴露取样 在指定的地点取三种平板培养基打开皿盖，在空气中暴露 5min，合上皿盖。
3. 培养 倒置 30℃ 恒温培养。细菌培养 48 小时，真菌和放线菌培养 4-6 天。
4. 观察计数 计数平板上的菌落，观察各种菌落的形态、大小、颜色等特征。
5. 计算 1m³ 空气中微生物数量

根据奥氏公式计算 1m³ 空气中微生物数量。

$$C=1000/10 \div (t/5 \times A/100) N=50000N/At$$

C: 1m³ 空气所含菌数，（个）菌/m³；

N: 平板上的菌落数；

A: 平板面积（cm）²；

t: 时间（min）；

6. 数据记录

菌落数	培养皿			
	1	2	3	4
细菌数（（个）菌/m ³ ）				

四、作业

1. 过滤法测定空气中微生物数量时，水龙头的水流为什么不宜过快？
2. 在化妆品生产及检查的哪些环境需要进行空气沉降菌测定？

项目名称	十、水中大肠菌群的初步检验（乳糖胆盐培养基发酵试验）		
教学目的	1. 能熟悉样品中粪大肠菌群的检测程序及操作要点 2. 能进行粪大肠菌群发酵产酸产气的生物学特性鉴定		
教学学时	3 学时		
思政目标	培养科学严谨、实事求是的工作作风。		
教学设计	技能点	训练要求与标准	训练方法
	检验原理	在乳糖胆盐发酵培养基中，大肠杆菌能产酸和产气。	教师讲授
	产酸判断	在乳糖胆盐发酵培养基中，大肠杆菌能利用乳糖产酸，使培养基从紫色变为黄色；	教师讲授并示范，学生实践操作
	产气判断	经培养后，大肠杆菌产气，能使培养液内倒置杜氏小管顶部有气体，或液面有小泡，或试管壁上有小气泡。	教师讲授并示范，学生实践操作
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。	
考核方法	实践考核		
考核标准	4、 实践操作（50分）； 5、 实验报告（40分）； 6、 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10分）。		
分组要求	分组实验，7人一组		
场地要求	微生物室		
设备仪器	酒精灯、灭菌培养基和培养皿，超净工作台		

十 《水中大肠菌群的初步检验（乳糖胆盐培养基发酵试验）》

一、实验目的：

1. 能熟悉样品中大肠菌群的检测程序及操作要点
2. 能进行大肠菌群发酵产酸产气的生物学特性鉴定

二、实验材料：

无菌乳糖胆盐发酵管、大肠杆菌（无毒素型）、超净工作台、接种环、试管、1mL 无菌吸管、10ml 无菌吸管、无菌水、酒精灯、标签纸、培养箱等。

三、实验步骤：

大肠杆菌：指一群能发酵乳糖、产酸产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌。

1. 样品稀释

用 1ml 无菌移液管从样品中吸取 1ml，吹入 9ml 无菌水中，吹吸二次，使溶液充分混匀，制成浓度为 10^{-1} 的溶液；反复重复此操作，制成 10^{-1} 、 10^{-2} 两个浓度的溶液。

2. 阳性样品制作

取一环大肠杆菌菌，充分混匀于 10ml 无菌水中制成原液。

3. 空白发酵管制作

倒 3 管无菌乳糖胆盐发酵管向作为空白组。

4. 阳性对照发酵管制作

从阳性样品原液试管中各吸取 1ml 溶液加入无菌乳糖胆盐发酵管中，接种 3 管。

5. 检验样品发酵管制作

分别从样品原液、 10^{-1} 、 10^{-10} 三个浓度的试管中各吸取 1ml 溶液加入无菌乳糖胆盐发酵管中，各 3 管。

6. 培养

于 37°C 培养 24 小时。

7. 观察

7.1 如乳糖胆盐发酵管都不产气，则可报告为大肠杆菌阴性，记录。

7.2 如乳糖胆盐发酵管产酸产气，初步报告为大肠杆菌阳性，记录。

8. 结果记录

大肠杆菌的乳糖胆盐发酵试验

	空白对照			阳性对照			样品原液			样品 10^{-1}			样品 10^{-2}		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
产酸															
产气															
结果 (阳性或阴性)															

四、思考题：

1. 简述乳糖胆盐发酵法检测大肠杆菌的原理。

项目名称	十一、水中大肠菌群的进一步检验（伊红美蓝平板试验）		
教学目的	1. 能熟悉样品中大肠菌群的检测程序及操作要点 2. 能进行大肠菌群在伊红美蓝培养基上的生物学特性鉴定		
教学学时	3 学时		
思政目标	培养细心、谨慎、规范、专业的科学思维。		
教学设计	技能点	训练要求与标准	训练方法
	检验原理	在伊红美蓝培养基中，大肠杆菌能因产酸而染上伊红和美蓝染料而呈深紫色，并形成带核心、具金属光泽的特征性菌落	教师讲授
	阳性判断	菌落深紫黑色，带金属光泽； 紫黑色，略有或无金属光泽； 淡紫黑色，中心颜色较深； 粉紫色，中心颜色较深。	教师讲授并示范，学生实践操作
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。	
考核方法	实践考核		
考核标准	实践操作（50分）； 实验报告（40分）； 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10分）。		
分组要求	分组实验		
场地要求	微生物室		
设备仪器	酒精灯、灭菌培养基和培养皿，超净工作台		

《水中大肠菌群的进一步检验（伊红美蓝平板试验）》项目实验教学过程设计

一、实验目的：

1. 能熟悉样品中大肠菌群的检测程序及操作要点
2. 能进行大肠菌群在伊红美蓝培养基上的生物学特性鉴定

二、实验材料：

无菌伊红美蓝平板培养基、大肠杆菌（无毒素型）、超净工作台、接种环、涂布棒、试管、1mL 无菌吸管、10ml 无菌吸管、无菌水、酒精灯、标签纸、培养箱等。

三、实验步骤：

将经乳糖胆盐发酵试验中产气的发酵管转接种（划线或涂布）到伊红美蓝平板培养基上，37℃培养 18-24 小时。

观察菌落形态。在伊红美蓝平板培养基上，大肠杆菌菌落一般呈深紫黑色，带金属光泽；紫黑色，略有或无金属光泽；淡紫黑色，中心颜色较深；粉紫色，中心颜色较深。

四、记录与总结（本次实验结果记录、实验完成情况、实验过程中出现问题、自我解决问题的记录、所吸取经验、心得体会及建议等）

五、思考题：

1. 伊红美蓝培养基是鉴别培养基，简述其鉴别原理。

项目名称	十二、防腐剂的抑菌试验		
教学目的	1. 了解不同防腐剂对不同微生物的抑菌作用； 2. 学习纸片法和液体培养基稀释法测定防腐剂防腐效能的操作方法。		
教学学时	3 学时		
思政目标	培养规范、严谨、求真、务实的科学态度。		
教学设计	技能点	训练要求与标准	训练方法
	样品的取样和处理	无菌操作、防腐剂试液制备、试验菌液的制备、接种	教师讲授并示范，学生具体操作
	倾注培养基的制作	加菌液时培养基温度在 50℃左右 菌液与培养基混合应均匀	教师讲授并示范，学生具体操作
	放置防腐剂滤纸片	用无菌镊子取滤纸片，轻轻放在已凝固的混菌平板上，使滤纸与平板紧密接触，每个平板上均匀放置四种不同供试药液滤纸片各一片	教师讲授并示范，学生具体操作
	实验报告的书写	能正确编制报告，内容完整、书写正确、清晰。	课后完成
考核方法	过程考核：操作（80分）+ 报告（20分）		
考核标准	实践操作（50分）； 实验报告（40分）； 实验过程及实验结束后良好的工作习惯和卫生习惯（10分）。		
分组要求	独立完成		
场地要求	微生物室		
设备仪器	超净工作台、酒精灯等		

《防腐剂的抑菌试验》项目实验教学过程设计

一、实验目的：

1. 了解不同防腐剂对不同微生物的抑菌作用；
2. 学习纸片法和液体培养基稀释法测定防腐剂防腐效能的操作方法。
3. 掌握用纸片法测定防腐剂抑菌作用的定性实验。

二、实验原理：

用于测定防腐剂抑制微生物生长效力的试验称为抑菌试验，也称为防腐效能试验。通过抑菌试验，可以测定一种防腐剂的最低抑菌浓度，用以评价该防腐剂的抑菌性能。主要方法有定性测定的扩散法（如抑菌圈试验）和定量测定的稀释法（如最低抑菌浓度试验）。

扩散法中最常用的是纸片法，该方法是以一定直径的无菌滤纸片，沾取一定浓度被检防腐剂，干燥后，将它紧贴在含试验菌平板上，滤纸上含有的防腐剂会向琼脂中扩散，若对该试验菌有抑制作用，经培养后，可在滤纸片周围出现不长菌的透明圈称为抑菌圈。抑菌圈越大说明抑制作用越强。本法用于考查多种防腐剂对同一类微生物的抑制情况。

液体培养基连续稀释法是常用的定量测定方法。在一系列的试管中，用液体培养基稀释防腐剂，使各管的防腐剂浓度成系列递减，然后在每管中加入一定量的试验菌，培养后用肉眼观察试管的混浊度，肉眼观察无菌生长的最低浓度即为防腐剂的最低抑菌浓度（MIC：指防腐剂完全抑制微生物生长的最低浓度），也可用分光光度计观察终点。将未见长菌的试管内培养物进一步转接营养肉汤琼脂平板，观察是否有菌生长，如果有菌生长，表明该浓度为抑菌浓度，如果确实无菌生长，则该浓度为杀菌浓度，据此可测定防腐剂的最低杀菌浓度（MBC）（如图7-22）。

本实验中使用的防腐剂均为化妆品中常用的防腐剂。

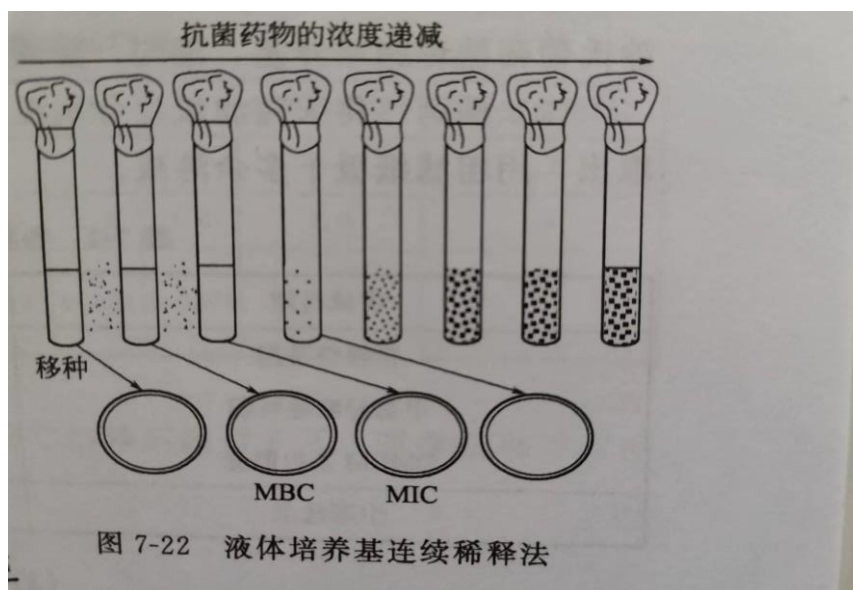


图 7-22 液体培养基连续稀释法

三、实验材料：

1. 仪器及用具高压蒸汽灭菌锅、恒温培养箱、培养皿、吸量管、试管（13mmx100mm）、镊子、酒精灯、棉球、直径 0.6cm 的无菌滤纸片。

2. 试剂 75%酒精、3.6%和 1.8%的咪唑烷基脲、0.2%和 0.05%的甲基异噻唑啉酮（凯松）、9.6%和 4.8%的 DMDM 乙内酰脲（1,3 - 二羟甲基 - 5,5 - 二甲基乙内酰脲）、胰酪大豆陈液体培养基、胰酪大豆陈琼脂培养基、沙氏葡萄糖液体培养基、沙氏葡萄糖琼脂培养基。

3. 试验菌液金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌 30~35℃下 18~24h 胰酪大豆陈液体培养物、酵母菌 20~25℃下 24~48h 沙氏葡萄糖液体培养物。

四、实验方法

1. 纸片法

(1) 混菌平板的制备

分别取 1mL 的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌胰酪大豆陈液体培养物、酵母菌沙氏葡萄糖液体培养物置于无菌培养皿中，每种试验菌株各两个培养皿。然后在含金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌的培养皿加入已熔化好的 50℃左右胰酪大豆陈琼脂培养基；在含酵母菌的培养皿中加入熔化好的 50℃左右沙氏葡萄糖琼脂培养基，混匀，凝固后备用。

(2) 浸药

将灭菌滤纸片分别浸入表 7-2 所示的各种不同浓度防腐剂溶液中，取出，用粗滤纸吸干多余溶液。

表 7-2 各种不同浓度供试药液

供试药液	浓度	
咪唑烷基脲	3.6%	1.8%
甲基异噻咪唑啉酮	0.2%	0.05%
DMDM 乙内酰脲	9.6%	4.8%
生理盐水	0.9%	

(3) 放置防腐剂滤纸片

用无菌镊子取滤纸片，轻轻放在已凝固的混菌平板上，使滤纸与平板紧密接触，每个平板上均匀放置四种不同供试药液滤纸片各一片（如图 7-23）。

(4) 培养

金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌混合平板置于 30~35℃培养不超过 3 天，酵母菌置 20~25℃培养不超过 5 天，观察滤纸片周围微生物生长情况，测量抑菌圈大小（mm），比较不同防腐剂的防腐效力。

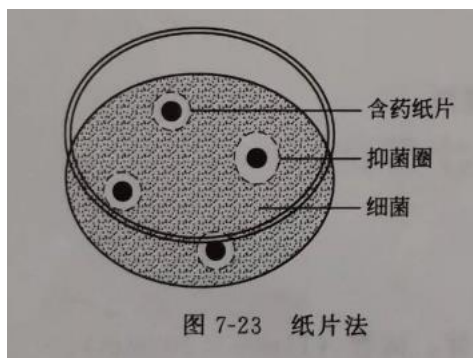


图 7-23 纸片法

图 7-23 纸片法

2. 液体培养基连续稀释法

(1) 防腐剂试液制备

取适量的 DMDM 乙内酰脲加蒸馏水配制成浓度是 9.6% 的防腐剂原液，备用。

(2) 试验菌液的制备

取金黄色葡萄球菌 30~35℃ 下 18~24h 胰酪大豆陈液体培养物，用 pH7.0 无菌氯化钠 - 蛋白陈缓冲液稀释成 $\leq 100\text{CFU}/\text{mL}$ ，即为试验菌液。

(3) 防腐剂稀释液的制备及菌液接种

取无菌试管 (13mmx100mm) 10 支，编号排成一排，1~9 管每管加入试验菌液 1.0mL，第 10 管加入无菌胰酪大豆陈液体培养基 1.0mL 作为空白对照管。

在第 1 管内再加入 1.0mL 9.6% DMDM 乙内酰脲药物原液，混匀；从第 1 管吸取 1.0mL 溶液至第 2 管，混匀；再从第 2 管吸取 1.0mL 至第 3 管，如此连续两倍稀释至第 8 管，并从第 8 管中吸取 1.0mL 弃去。第 9 管为不加防腐剂的生长对照。

第 1 管至第 9 管防腐剂浓度分别为 4.8%、2.4%、1.2%、0.6%、0.3%、0.15%、0.075%、0.0375%、0 (表 7-3)。

表 7-3 液体培养基连续稀释法

试管编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9 (生长对照)	10 (空白对照)
无菌培养基 / mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0
试验菌液 / mL	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	-
DMDM 乙内酰脲浓度 / %	4.8	2.4	1.2	0.6	0.3	0.15	0.075	0.0375	0	0

注：特别注意第 1、第 8 管的加液。

(4) 培养

将上述所有试管置于 20~25℃ 培养不超过 5 天，观察结果并求出 DMDM 乙内酰脲的 MIC。

五、注意事项

1. 每次取防腐剂滤纸片前，一定要清洗镊子并适当灼烧灭菌。
2. 在含菌平板上放置纸片要紧密贴紧，避免孔隙和卷边，但注意不要压破培养基。
3. 进行防腐剂溶液稀释时，每进行一次稀释要更换吸量管，以免影响防腐剂浓度。

六、思考题

1. 化妆品中常用的防腐剂有哪些？
2. 影响抑菌试验的因素有哪些？