



中华人民共和国国家标准

GB/T 18204.3—2013
代替 GB/T 18204.1—2000
部分代替 GB/T 17220—1998

公共场所卫生检验方法 第3部分:空气微生物

Examination methods for public places—
Part 3: Airborne microorganism

2013-12-31 发布

2014-12-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

目 次

前言 III

1 范围 1

2 术语和定义 1

3 细菌总数 1

4 真菌总数 3

5 β -溶血性链球菌 4

6 嗜肺军团菌 5

附录 A（规范性附录） 现场采样检测布点要求 8

前 言

GB/T 18204《公共场所卫生检验方法》分为六个部分：

- 第1部分：物理因素；
- 第2部分：化学污染物；
- 第3部分：空气微生物；
- 第4部分：公共用品用具微生物；
- 第5部分：集中空调通风系统；
- 第6部分：卫生监测技术规范。

本部分为 GB/T 18204 的第3部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分代替 GB/T 18204.1—2000《公共场所空气微生物检验方法 细菌总数测定》，部分代替 GB/T 17220—1998《公共场所卫生监测技术规范》中的空气微生物采样要求。

本标准与 GB/T 18204.1—2000 和 GB/T 17220—1998 相比，主要变化如下：

- 增加了真菌总数检验方法；
- 增加了 β -溶血性链球菌检验方法；
- 增加了嗜肺军团菌检验方法。

本部分由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本部分由中华人民共和国卫生部负责解释。

本部分负责起草单位：中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所。

本部分参加起草单位：江苏省疾病预防控制中心、深圳市疾病预防控制中心、马鞍山市卫生局卫生监督所。

本部分主要起草人：金银龙、刘凡、王俊起、陈晓东、余淑苑、潘力军、陈健、张宝莹、张琦、周连、赵至荣。

本部分参加起草人：孙群露、林弈芝、张大伟、董坤、刘洋。

自本部分实施之日起，GB/T 18204.1—2000 全部内容和 GB/T 17220—1998 中相应内容同时废止。

GB/T 18204.1—2000 的历次版本发布情况为：

- GB/T 18204.1—2000。

GB/T 17220—1998 的历次版本发布情况为：

- GB/T 17220—1998。

公共场所卫生检验方法

第3部分:空气微生物

1 范围

GB/T 18204 的本部分规定了公共场所空气中细菌总数、真菌总数、 β -溶血性链球菌和嗜肺军团菌的现场采样与实验室培养方法。

本部分适用于公共场所空气中细菌总数、真菌总数、 β -溶血性链球菌以及嗜肺军团菌的测定,其他场所可参照执行。

注:本部分中同一个指标如果有2个或2个以上检验方法时,可根据技术条件选择使用。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

细菌总数 **total bacterial count**

公共场所空气中采集的样品,计数在营养琼脂培养基上经35℃~37℃、48 h培养所生长发育的嗜中温性需氧和兼性厌氧菌落的总数。

2.2

真菌总数 **total fungi count**

公共场所空气中采集的样品,计数在沙氏琼脂培养基上经28℃、5 d培养所形成的菌落数。

2.3

β -溶血性链球菌 **β -hemolytic streptococcus**

公共场所空气中采集的样品,经35℃~37℃、24 h~48 h培养,在血琼脂平板上形成的典型菌落。

2.4

嗜肺军团菌 **legionella pneumophila**

样品经培养在GVPC琼脂平板上生成典型菌落,并在BCYE琼脂平板上生长而在L-半光氨酸缺失的BCYE琼脂平板不生长,进一步经生化实验和血清学实验鉴定确认的菌落。

2.5

撞击法 **impacting method**

采用撞击式空气微生物采样器,使空气通过狭缝或小孔产生高速气流,从而将悬浮在空气中的微生物采集到营养琼脂平板上,经实验室培养后得到菌落数的测定方法。

2.6

自然沉降法 **natural sinking method**

将营养琼脂平板暴露在空气中,微生物根据重力作用自然沉降到平板上,经实验室培养后得到菌落数的测定方法。

3 细菌总数

3.1 原理

采用撞击法或自然沉降法采样、营养琼脂培养基培养计数的方法测定公共场所空气中的细菌总数。

3.2 撞击法

3.2.1 仪器和设备

3.2.1.1 六级筛孔撞击式微生物采样器。

3.2.1.2 高压蒸汽灭菌器。

3.2.1.3 恒温培养箱。

3.2.1.4 平皿: $\phi 90$ mm。

3.2.2 培养基

3.2.2.1 营养琼脂培养基成分:

蛋白胨	10 g
氯化钠	5 g
肉膏	5 g
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL

3.2.2.2 制法:将蛋白胨、氯化钠、肉膏溶于蒸馏水中,校正 pH 为 7.2~7.6,加入琼脂,121 °C,20 min 灭菌备用。

3.2.3 采样

3.2.3.1 采样点:见附录 A。

3.2.3.2 采样环境条件:采样时关闭门窗 15 min~30 min,记录室内人员数量、温湿度与天气状况等。

3.2.3.3 采样方法:以无菌操作,使用撞击式微生物采样器(3.2.1.1)以 28.3 L/min 流量采集 5 min ~ 15 min。采样器使用按照说明书要求进行。

3.2.4 检验步骤

将采集细菌后的营养琼脂平皿置 35 °C~37 °C 培养 48 h,菌落计数。

3.2.5 结果报告

3.2.5.1 采样点细菌总数结果计算:菌落计数,记录结果并按稀释比与采气体积换算成 CFU/m³(每立方米空气中菌落形成单位)。

3.2.5.2 一个区域细菌总数测定结果:一个区域空气中细菌总数的测定结果按该区域全部采样点中细菌总数测定值中的最大值给出。

3.3 自然沉降法

3.3.1 仪器和设备

3.3.1.1 高压蒸汽灭菌器。

3.3.1.2 恒温培养箱。

3.3.1.3 平皿: $\phi 90$ mm。

3.3.1.4 采样支架。

3.3.2 培养基

见 3.2.2。

3.3.3 采样

3.3.3.1 采样点:见附录 A。

3.3.3.2 采样环境条件:见 3.2.3.2。

3.3.3.3 采样方法:将营养琼脂平板置于采样点处,打开皿盖,暴露 5 min。

3.3.4 检验步骤

见 3.2.4。

3.3.5 结果报告

计数每块平板上生长的菌落数,求出全部采样点的平均菌落数,检验结果以每平皿菌落数(CFU/皿)给出。

4 真菌总数

4.1 原理

采用撞击法或自然沉降法采样、沙氏琼脂培养基培养计数的方法测定公共场所空气中的真菌总数。

4.2 撞击法

4.2.1 仪器和设备

见 3.2.1。

4.2.2 培养基

4.2.2.1 沙氏琼脂培养基成分:

蛋白胨	10 g
葡萄糖	40 g
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL

4.2.2.2 制法:将蛋白胨、葡萄糖溶于蒸馏水中,校正 pH 为 5.5~6.0,加入琼脂,115 ℃,15 min 灭菌备用。

4.2.3 采样

见 3.2.3。

4.2.4 检验步骤

将采集真菌后的沙氏琼脂培养基平皿置 28 ℃培养,逐日观察并于第 5 天记录结果。若真菌数量过多可于第 3 天计数结果,并记录培养时间。

4.2.5 结果报告

4.2.5.1 采样点真菌总数结果计算:菌落计数,记录结果并按稀释比与采气体积换算成 CFU/m³(每立方米空气中菌落形成单位)。

4.2.5.2 一个区域真菌总数测定结果:一个区域空气中真菌总数的测定结果按该区域全部采样点中真菌总数测定值中的最大值给出。

4.3 自然沉降法

4.3.1 仪器和设备

见 3.3.1。

4.3.2 培养基

见 4.2.2。

4.3.3 采样

见 3.3.3。

4.3.4 检验步骤

见 4.2.4。

4.3.5 结果报告

计数每块平板上生长的菌落数,求出全部采样点的平均菌落数,检验结果以每平皿菌落数(CFU/皿)给出。

5 β -溶血性链球菌

5.1 原理

采用撞击法采样、血琼脂培养基培养计数的方法测定公共场所空气中的 β -溶血性链球菌。

5.2 撞击法

5.2.1 仪器和设备

见 3.2.1。

5.2.2 培养基

5.2.2.1 血琼脂平板成分:

蛋白胨	10 g
氯化钠	5 g
琼脂	20 g
脱纤维羊血	5 mL~10 mL
蒸馏水	1 000 mL

5.2.2.2 制法:将蛋白胨、氯化钠、肉膏加热溶化于蒸馏水中,校正 pH 为 7.4~7.6,加入琼脂,121 ℃, 20 min 灭菌。待冷却至 50 ℃左右,以无菌操作加入脱纤维羊血,摇匀倾皿。

5.2.3 采样

见 3.2.3。

5.2.4 检验步骤

5.2.4.1 培养方法:采样后的血琼脂平板在 35℃~37℃ 下培养 24 h~48 h。

5.2.4.2 结果观察:培养后,在血琼脂平板上形成呈灰白色、表面突起、直径 0.5 mm~0.7 mm 的细小菌落,菌落透明或半透明,表面光滑有乳光;镜检为革兰氏阳性无芽孢球菌,圆形或卵圆形,呈链状排列,受培养与操作条件影响,链的长度在 4 个~8 个细胞至几十个细胞之间;菌落周围有明显的 2 mm~4 mm 界限分明、完全透明的无色溶血环。符合上述特征的菌落为 β -溶血性链球菌。

5.2.5 结果报告

5.2.5.1 采样点 β -溶血性链球菌结果计算:菌落计数,记录结果并按稀释比与采气体积换算成 CFU/m³ (每立方米空气中菌落形成单位)。

5.2.5.2 一个区域 β -溶血性链球菌测定结果:一个区域空气中 β -溶血性链球菌的测定结果按该区域全部采样点中 β -溶血性链球菌测定值中的最大值给出。

6 嗜肺军团菌

6.1 原理

采用液体冲击法采样、培养法定性测定公共场所空气中的嗜肺军团菌。

6.2 仪器和设备

6.2.1 微生物气溶胶浓缩器:采样流量 ≥ 100 L/min,对于直径 3.0 μ m 以上粒子的捕集效率应 $\geq 80\%$ (或浓缩比 ≥ 8)。

6.2.2 液体冲击式微生物气溶胶采样器:采样流量 7 L/min~15 L/min,对于 0.5 μ m 以上粒子的捕集效率应 $\geq 90\%$ 。

6.2.3 离心管:容积 50 mL。

6.2.4 平皿: $\phi 90$ mm。

6.2.5 CO₂ 培养箱:35℃~37℃。

6.2.6 紫外灯:波长 360 nm $\pm$ 2 nm。

6.2.7 涡旋振荡器。

6.2.8 普通光学显微镜、荧光显微镜。

6.2.9 水浴箱。

6.3 试剂和培养基

6.3.1 采样吸收液 1——GVPC 液体培养基

6.3.1.1 GVPC 添加剂成分:

多黏菌素 B 硫酸盐	10 mg
万古霉素	0.5 mg
放线菌酮	80 mg

6.3.1.2 BCYE 添加剂成分:

α -酮戊二酸	1.0 g
N-2 酰氨基-2 氨基乙烷磺酸(ACES)	10.0 g

氢氧化钾	2.88 g
L-半胱氨酸盐酸盐	0.4 g
焦磷酸铁	0.25 g

6.3.1.3 吸收液成分:

活性炭	2 g
酵母浸出粉	10 g
GVPC 添加剂	
BCYE 添加剂	
蒸馏水	1 000 mL

6.3.1.4 制法:将活性炭、酵母浸出粉加水至 1 000 mL,121 °C 下高压灭菌 15 min,加入 GVPC 添加剂(6.3.1.1)和 BCYE 添加剂(6.3.1.2),分装于灭菌后的离心管(6.2.3)中备用。

6.3.2 采样吸收液 2——酵母提取液

6.3.2.1 吸收液成分:

酵母浸出粉	12 g
蒸馏水	1 000 mL

6.3.2.2 制法:将酵母浸出粉加水至 1 000 mL,121 °C 下高压灭菌 15 min,分装于灭菌后的离心管(6.2.3)中备用。

6.3.3 盐酸氯化钾溶液[$c(\text{HCl} \cdot \text{KCl}) = 0.01 \text{ mol/L}$]

6.3.3.1 成分:

盐酸(0.2 mol/L)	3.9 mL
氯化钾(0.2 mol/L)	25 mL

6.3.3.2 制法:将上述成分混合,用 1 mol/L 氢氧化钾调整 $\text{pH} = 2.2 \pm 0.2$,121 °C 下高压灭菌 15 min 备用。

6.3.4 GVPC 琼脂平板。

6.3.5 BCYE 琼脂平板。

6.3.6 BCYE-CYE 琼脂平板。

6.3.7 革兰氏染色液。

6.3.8 马尿酸盐生化反应管。

6.3.9 军团菌分型血清试剂。

6.4 采样

6.4.1 采样点:见附录 A。

6.4.2 将采样吸收液 1(6.3.1)20 mL 倒入微生物气溶胶采样器(6.2.2)中,然后用吸管加入矿物油 1 滴~2 滴。

6.4.3 将微生物气溶胶浓缩器(6.2.1)与微生物气溶胶采样器(6.2.2)连接,按照微生物气溶胶浓缩器和微生物气溶胶采样器的流量要求调整主流量和浓缩流量。

6.4.4 按浓缩器和采样器说明书操作,每个气溶胶样品采集空气量 $1 \text{ m}^3 \sim 2 \text{ m}^3$ 。

6.4.5 将采样吸收液 2(6.3.2)20 mL 倒入微生物气溶胶采样器(6.2.2)中,然后用吸管加入矿物油 1 滴~2 滴;在相同采样点重复 6.4.3、6.4.4 步骤。

6.4.6 采集的样品不必冷冻,但要避光和防止受热,4 h 内送实验室检验。

6.5 检验步骤

6.5.1 样品的酸处理:对采样后的吸收液 1(6.3.1)和吸收液 2(6.3.2)原液各取 1 mL,分别加入盐酸氯化钾溶液(6.3.3)充分混合,调 pH 至 2.2,静置 15 min。

6.5.2 样品的接种:在酸处理后的两种样品(6.5.1)中分别加入 1 mol/L 氢氧化钾溶液,中和至 pH 为 6.9,各取悬液 0.2 mL~0.3 mL 分别接种 GVPC 平板(6.3.4)。

6.5.3 样品的培养:将接种平板静置于浓度为 5%、温度为 35℃~37℃的 CO₂ 培养箱(6.2.5)中,孵育 10 d。

6.5.4 菌落观察:从孵育第 3 天开始观察菌落。军团菌的菌落颜色多样,通常呈白色、灰色、蓝色或紫色,也能显深褐色、灰绿色、深红色;菌落整齐,表面光滑,呈典型毛玻璃状,在紫外灯下,部分菌落有荧光。

6.5.5 菌落验证:从平皿上挑取 2 个可疑菌落,接种 BCYE 琼脂平板(6.3.5)和 L-半光氨酸缺失的 BCYE 琼脂平板(6.3.6),35℃~37℃培养 2 d,凡在 BCYE 琼脂平板上生长而在 L-半光氨酸缺失的 BCYE 琼脂平板不生长的则为军团菌菌落。

6.5.6 菌型确定:应进行生化培养与血清学实验确定嗜肺军团菌。生化培养:氧化酶(一/弱+),硝酸盐还原(一),尿素酶(一),明胶液化(+),水解马尿酸。血清学实验:用嗜肺军团菌诊断血清进行分型。

6.6 结果报告

6.6.1 采样点测定结果:两种采样吸收液中至少有一种吸收液培养出嗜肺军团菌,即为该采样点嗜肺军团菌阳性。

6.6.2 一个区域测定结果:一个区域中任意一个采样点嗜肺军团菌阳性,即该区域空气中嗜肺军团菌的测定结果为阳性。

附 录 A
(规范性附录)
现场采样检测布点要求

A.1 范围

本附录规定了公共场所空气中微生物撞击法和自然沉降法现场采样点布置的基本要求。

A.2 撞击法采样布点要求

A.2.1 室内面积不足 50 m^2 的设置 1 个采样点, $50\text{ m}^2 \sim 200\text{ m}^2$ 的设置 2 个采样点, 200 m^2 以上的设置 3 个~5 个采样点。

A.2.2 采样点按均匀布点原则布置, 室内 1 个采样点的设置在中央, 2 个采样点的设置在室内对称点上, 3 个采样点的设置在室内对角线四等分的 3 个等分点上, 5 个采样点的按梅花布点, 其他的按均匀布点原则布置。

A.2.3 采样点距离地面高度 $1.2\text{ m} \sim 1.5\text{ m}$, 距离墙壁不小于 1 m 。

A.2.4 采样点应避开通风口、通风道等。

A.3 自然沉降法采样布点要求

A.3.1 室内面积不足 50 m^2 的设置 3 个采样点, 50 m^2 以上的设置 5 个采样点。

A.3.2 采样点按均匀布点原则布置, 室内 3 个采样点的设置在室内对角线四等分的 3 个等分点上, 5 个采样点的按梅花布点。

A.3.3 采样点距离地面高度 $1.2\text{ m} \sim 1.5\text{ m}$, 距离墙壁不小于 1 m 。

A.3.4 采样点应避开通风口、通风道等。
