



中华人民共和国国家标准

GB/T 38517—2020

颗粒 生物气溶胶采样和分析 通则

Particulate—Bioaerosols sampling and analysis—General principles

2020-03-06 发布

2020-06-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	I
引言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 生物气溶胶采样	3
4.1 概述	3
4.2 生物气溶胶采样方法	3
4.3 生物气溶胶采样方法的选择	4
4.4 生物气溶胶采样器的选择	5
4.5 采样辅助器材	5
4.6 采样程序	6
5 生物气溶胶分析	8
5.1 生物气溶胶的定性分析	8
5.2 生物气溶胶的定量分析	9
附录 A (资料性附录) 生物气溶胶采样器的性能和选择原则	12
附录 B (资料性附录) 生物气溶胶采样和定量分析(培养分析法)记录	13
参考文献	18

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国颗粒表征与分检及筛网标准化技术委员会(SAC/TC 168)提出并归口。

本标准起草单位:军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所、青岛众瑞智能仪器有限公司、中国科学院过程工程研究所、中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、中国检验检疫科学研究院、山东农业大学、复旦大学、安徽宾肯电气股份有限公司、北京拓普天成科技发展有限公司、天津市春信净化制冷设备有限公司。

本标准主要起草人:李劲松、李娜、何春雷、李兆军、周兰、胡凌飞、杨文慧、刘凡、胡孔星、柴同杰、隋国栋、张柯、靳爱军、叶佳、王洋、李秋实。



引 言

本标准对环境空气中细菌、病毒、真菌和毒素等不同特性的生物气溶胶(也称为空气微生物)的采样提供了采样方法和生物气溶胶的分析,其中,采样方法包括采样原理、采样器的选择和采样过程中应关注的问题;分析方法包括分析方法的类型、方法的适用性、分析结果的表达方式。在附录 A 中提供采样器性能和选择的原则;在附录 B 中提供生物气溶胶采样全过程的记录表格。



颗粒 生物气溶胶采样和分析 通则

警示——在使用本标准过程中可能涉及有危害性的生物成分、操作和设备。本标准没有包含使用本标准时应注意的生物安全问题,使用者在使用本标准前应当根据采样目的和采样环境的生物危害风险,采取适当的生物安全防护措施。

1 范围

本标准规定了环境空气中细菌、病毒、真菌和毒素等不同特性的生物气溶胶的采样和分析方法的通用原则。

本标准适用于环境空气中的生物气溶胶的采样和分析。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 16293 医药工业洁净室(区)浮游菌的测试方法

GB/T 16294 医药工业洁净室(区)沉降菌的测试方法

GB/T 18203 室内空气中溶血性链球菌卫生标准

GB/T 18204.3 公共场所卫生检验方法 第3部分:空气微生物

GB 50591 洁净室施工及验收规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

微生物 microorganism

个体难以用肉眼观察的一切微小生物统称。

注1:引自全国科学技术名词审定委员会公布的《微生物学名词》(第二版)。

注2:本标准所指微生物仅包括细菌、真菌、病毒。

3.2

细菌 bacteria

以细胞壁含胞壁酸,膜脂为酯键脂、RNA聚合酶无II型启动子等为主要特征的原核生物的总称。

注:引自全国科学技术名词审定委员会公布的《微生物学名词》(第二版)。

3.3

病毒 virus

由RNA或DNA及蛋白质等组成的,专营细胞内感染和复制的一大类结构简单的微生物。

注:引自全国科学技术名词审定委员会公布的《微生物学名词》(第二版)。

3.4

真菌 fungi

无叶绿素、有细胞壁、营吸收营养的真核生物。普遍以有性和无性两种方式产生孢子进行繁殖,通

常为丝状且有分枝的体细胞结构,一般都有细胞壁。

注:引自全国科学技术名词审定委员会公布的《微生物学名词》(第二版)。

3.5

孢子 spore

真菌或细菌中能直接发育成新个体的微小繁殖单元。

注:引自全国科学技术名词审定委员会公布的《微生物学名词》(第二版)。

3.6

毒素 toxin

生物产生的、对他种生物体有毒性的产物。

注1:改写自全国科学技术名词审定委员会公布的《微生物学名词》(第二版)。

注2:毒素从来源分有微生物毒素、植物毒素和动物毒素三类。

3.7

生物气溶胶 bioaerosol

含有生物性成分的固体或液体微粒悬浮于气体介质中形成的稳定分散系。

注:生物性成分包括细菌、病毒、真菌、孢子、毒素等。生物气溶胶粒子粒径在 $0.01\ \mu\text{m}\sim 100\ \mu\text{m}$ 之间。

3.8

粒子空气动力学粒径 particle aerodynamic diameter

某一种粒子,无论其形状、大小和密度如何,在空气中的沉降速度与一种密度为 $1\ \text{g}/\text{cm}^3$ 的球形粒子的沉降速度一致时的该粒子的直径。

3.9

采样介质 collection media

用来捕获、承载生物气溶胶粒子的物质。

注:采样介质一般具有稳定性、粘附性、无毒性、抗蒸发、水溶性等基本性能。

3.10

菌落 colony

在固体基质表面或内部形成的紧密生活在一起肉眼可见的同一微生物物种的群体,或来源于同一细胞的一群细胞。

注:引自全国科学技术名词审定委员会公布的《微生物学名词》(第二版)。

3.11

菌落形成单位 colony forming unit; CFU

根据固体培养基上形成的菌落数,测定样品中活菌浓度的单位。

注1:引自全国科学技术名词审定委员会公布的《微生物学名词》(第二版)。

注2:一个菌落形成单位能从单个微生物形成,也可以是多个微生物的聚集体或者是一个或者多个微生物黏附在一个粒子上。

注3:生长出的菌落数量跟培养条件有关。

3.12

菌落总数 colonies number

菌落生长总数

在一定条件下(如需氧情况、营养条件、pH、培养温度和时间等)单位质量或单位体积样本所生长出来的、能被肉眼识别的微生物生长物数量。

3.13

噬斑 plaque

病毒感染人工培养的单层细胞后由单个病毒粒子所产生的细胞裂解区。

注:引自全国科学技术名词审定委员会公布的《微生物学名词》(第二版)。

3.14

噬斑形成单位 plaque forming unit; PFU

每单位体积或重量的病毒悬液所能形成的噬斑数。

注：引自全国科学技术名词审定委员会公布的《微生物学名词》(第二版)。

4 生物气溶胶采样

4.1 概述

生物气溶胶的浓度、粒径、活性等具有不确定性和不稳定性,不同的生物成分对采样过程的耐受力差异很大,生物成分的分析方法也不相同。因此,在充分考虑生物气溶胶上述特点外,结合采样环境和采样目的,决定采样方法和选用采样器种类。生物气溶胶采样器的性能和选择原则参见附录 A。

4.2 生物气溶胶采样方法

4.2.1 撞击式采样

利用惯性作用,通过喷嘴、喷口或裂隙的加速作用把生物气溶胶粒子采集到固体介质表面的气溶胶采集方式。

4.2.2 冲击式采样

能够使具有足够大惯性的生物气溶胶粒子撞击液体并进入液体介质中的气溶胶采集方式。

4.2.3 滤膜采样

生物气溶胶粒子通过各种滤材时,滤材小孔对粒子的阻留或/和滤材对粒子的静电吸引阻留作用,将粒子捕获在滤材上的采集方式。

4.2.4 离心式采样

一种让气体以高速旋转所产生的离心力将生物气溶胶粒子与气流分开并撞击到固体介质表面上或富集到液体介质里的采集方式。

注：液体介质的离心采样也称之为气旋式采样。

4.2.5 大流量采样

以 200 L/min 以上的采样流量把生物气溶胶采集到液体里或固体介质上的采样方式。

4.2.6 静电吸附采样

用多种方法使生物气溶胶粒子带上电荷,在电场的作用下通过静电吸附收集生物气溶胶粒子的采集方法。

4.2.7 自然沉降采样

生物气溶胶粒子在重力作用下自然下沉降落到采样面(即微生物营养琼脂平皿表面)的采集方式。

4.3 生物气溶胶采样方法的选择

4.3.1 细菌气溶胶采样方法

4.3.1.1 细菌气溶胶定性分析采样方法

细菌气溶胶的定性分析,即细菌生物学特性分析。可选择撞击式采样、冲击式采样、滤膜采样、离心式采样、静电吸附采样等方法。

4.3.1.2 细菌气溶胶定量分析采样方法

细菌气溶胶的定量分析,即细菌气溶胶的细菌总数分析。可选择撞击式采样、冲击式采样、离心式采样、静电吸附采样、自然沉降采样等方法。其中,自然沉降采样法仅限于洁净环境或外界干扰小的环境采样。

4.3.2 真菌气溶胶采样方法

4.3.2.1 真菌气溶胶定性分析采样方法

真菌气溶胶的定性分析,即真菌生物学特性分析。可选择撞击式采样、冲击式采样、滤膜采样、离心式采样等方法。

4.3.2.2 真菌气溶胶定量分析采样方法

真菌气溶胶的定量分析,即真菌总数分析。可选择撞击式采样、冲击式采样、滤膜采样、离心式采样、自然沉降采样等方法。

4.3.3 病毒气溶胶采样方法

4.3.3.1 病毒气溶胶定性分析采样方法

病毒气溶胶的定性分析,即病毒生物学特性分析。可选择冲击式采样、滤膜采样、离心式采样(液体介质)、静电吸附采样、撞击式采样等方法。选择撞击式采样时,应在琼脂表面涂抹一层薄的水溶性粘质层。

4.3.3.2 病毒气溶胶定量分析采样方法

病毒气溶胶的定量分析,即病毒总数分析。可选择冲击式采样、滤膜采样、离心式采样(液体介质)、静电吸附采样、撞击式采样等方法。选择撞击式采样时,应在琼脂表面涂抹一层薄的水溶性粘质层。

4.3.4 毒素气溶胶采样方法

4.3.4.1 毒素气溶胶定性分析采样方法

毒素气溶胶的定性分析,即毒素生物学特性分析。可选择冲击式采样、离心式采样(液体介质)、滤膜采样等方法。选择撞击式采样时,应在琼脂表面涂抹一层薄的水溶性粘质层。

4.3.4.2 毒素气溶胶定量分析采样方法

毒素气溶胶的定量分析,即毒素质量分析。可选择冲击式采样、离心式采样(液体介质)、滤膜采样、撞击式采样等方法。选择撞击式采样时,应在琼脂表面涂抹一层薄的水溶性粘质层。

4.4 生物气溶胶采样器的选择

4.4.1 采样器的要求

采样器应有明确的物理采样效率、生物采样效率,以及采集生物气溶胶的粒子空气动力学粒径范围,应说明采样介质类型及其对微生物存活的影响。

4.4.2 采样器类型

4.4.2.1 撞击式采样器

通过喷嘴、喷口或裂隙的加速作用把生物气溶胶粒子采集到固体或半固体介质表面的采样器。通常分为筛孔式、狭缝式的撞击式采样器。测量生物气溶胶粒径分布宜选择六级撞击式采样器等。

4.4.2.2 冲击式采样器

基于用气流对液体的冲击、清洗或雾化等原理,经空气中的生物气溶胶粒子捕获在液体介质中的采样器。通常可以选择全玻璃液体冲击式采样器、气旋冲击式采样器等。这类采样器采样流量小,适用于高浓度的生物气溶胶采样;对浓度特别低的生物气溶胶还可以选择大流量采样器。

4.4.2.3 过滤式采样器

把生物气溶胶粒子捕获在滤膜上的采样器。根据后续样本分析方法的需要选择滤膜。

4.4.2.4 离心式采样器

通过气体高速旋转所产生的离心力将生物气溶胶粒子与气流分开并撞击到固体介质表面上或富集到液体介质里的采集装置。

4.4.2.5 大流量采样器

用较大采样流量将目标粒子分离、浓缩到采样介质中的采样装置。这种采样器适用于环境空气中低浓度目标生物气溶胶的采集。

4.4.2.6 静电吸附采样器

用多种方法使生物气溶胶粒子带上电荷,利用静电吸附原理,在电场的作用下收集生物气溶胶粒子的采样装置。这类采样器适用于病毒气溶胶的采集,对病毒气溶胶存活力无明显降低;大流量静电吸附采样器适用于低浓度病毒气溶胶的采集。

4.4.2.7 自然沉降采样

粗略测量空气微生物粒子沉降量的方法,测量细菌总数一般用营养琼脂平皿采集,测量真菌总数一般用沙氏培养基平皿采集。

4.5 采样辅助器材

4.5.1 概述

采样辅助器材包括采样过程中所需的无菌采样介质、容器、器材等。

4.5.2 采样介质

4.5.2.1 在生物气溶胶采样过程中使用无菌采样介质。

4.5.2.2 固体采样介质包括各种固体营养琼脂、半固体营养琼脂和各种滤膜。

4.5.2.3 液体采样介质包括生理盐水、磷酸缓冲液、营养液等各种液体。

4.5.2.4 采样时,考虑生物气溶胶粒子中生物成分的活性,采用介质应选固体或半固体培养基、含有营养成分的液体、中性液体等。

采样时,不考虑生物气溶胶粒子中生物成分的活性,仅考虑生物气溶胶粒子采样效率,可选择多种采样介质,如固体或半固体培养基、含有营养成分的液体、中性液体、滤膜等。

4.5.3 样品包装器材

4.5.3.1 普通生物气溶胶采集样品包装器材应满足防污染、防破碎、防溢洒的要求。

4.5.3.2 生物气溶胶样品含有病原微生物,采集样品包装(器材)应符合国家或部委有关病原微生物样品的包装要求。

4.5.4 人员防护装备

4.5.4.1 采集含有病原微生物的生物气溶胶时,采样人员应按照国家或部委的病原微生物危害等级的防护要求穿戴相应防护等级的个人防护装备。

4.5.4.2 普通环境的生物气溶胶采样时,采样人员应穿戴一般个人防护用品。

4.5.4.3 特定环境(如洁净环境)的生物气溶胶采样,采样人员应按照 GB/T 16293、GB/T 16294 等国家相关标准或采样环境要求穿戴个人防护装备。

4.5.5 消毒与灭菌器材

4.5.5.1 消毒剂应选用符合卫生消毒技术规范要求的方法与技术,应有时效性。

4.5.5.2 采样前,采样器的采样头、相关器材等应进行灭菌处理,操作人员手应进行消毒。

4.5.5.3 采样后,采样器的采样头、样品包装容器等应进行灭菌处理,操作人员手等应进行消毒。

4.6 采样程序

4.6.1 采样前准备

4.6.1.1 根据采样任务和采样计划确定采样器类型、配件、辅助器材及其相应的数量。

4.6.1.2 生物气溶胶采样使用器材应是无菌状态。

4.6.1.3 采样前应考虑环境湿度、环境温度,以及所采菌落类型等影响因素,确定采样时间。

注:影响生物采样效率的主要因素是环境因素。

4.6.2 采样器核查

4.6.2.1 应根据使用说明书对采样器进行检查与维护。

4.6.2.2 使用前应检查采样器运行正常,保证采样流量在允许的误差范围内。

4.6.3 采样点设置

4.6.3.1 室外环境普通生物气溶胶采样,应根据生物气溶胶的来源位置、风向、风速和周边环境特点设置相应的采样点和采样点数量。

4.6.3.2 特定环境(如洁净环境)应按照 GB/T 16293、GB/T 16294、GB/T 18203、GB/T 18204.3、GB 50591 等国家或其他相关标准要求设置采样点。

4.6.3.3 采集病原微生物的生物气溶胶时,应根据采样的目的和现场环境特点,设置采样点位置和数量。

4.6.3.4 一般环境监测时,生物气溶胶采样器的采样入口安装高度宜为 1.2 m~1.6 m。

注:疑似出现人为故意施放生物危害或意外泄露现场,可直接选择疑似生物气溶胶危害源最靠近的位置安装采样器。

4.6.4 采样时间设定

4.6.4.1 采样时间设定一般要求

设定采样时间时应充分考虑采集的生物气溶胶类型、采样方法、采样器类型、采样介质类型、采样环境因素、后续分析方法等,设定合理的采样时间。

4.6.4.2 固体采样介质

撞击式采样器采样时间宜 ≤ 15 min,离心式采样器采样时间 ≤ 8 min。

4.6.4.3 液体采样介质

冲击式采样器采样时间宜 ≤ 30 min,干燥环境采样时间 ≤ 20 min。

4.6.4.4 滤膜采样介质

过滤式采样器采样时间宜 ≤ 10 min,若采集样本仅用核酸方法进行分析,采样时间不限。

4.6.4.5 沉降采样

一般室内采样时间宜 ≤ 30 min,洁净环境采样时间宜 ≤ 24 h。

4.6.4.6 按生物气溶胶类型设定采样时间

通常细菌气溶胶一次采样时间为 5 min~15 min,病毒气溶胶一次采样时间为 15 min~30 min,真菌及孢子气溶胶一次采样时间为 0.5 h~24 h。

4.6.5 对照设置

4.6.5.1 概述

设置相应分析空白对照样本和现场空白对照样本。

4.6.5.2 分析空白对照

为在全部分析过程中不会有显著的污染出现,应设置一个覆盖分析全过程的阴性对照样品,阴性样品包含分析步骤,包括高压、平板制备、悬浮和提取、稀释、培养、计数等过程。

4.6.5.3 现场空白对照

为在全部测试步骤中不会出现显著污染,应以核查操作者能够承担任务的量化水准,由一个空白样品决定,空白样品包含全部测试步骤,包括准备、采样、运输和分析。

注:现场空白样品是在采样过程中同时采样,但不通过采样器吸取空气。现场空白对照结果代表在采样过程中通过操作采样介质进入样本中微生物的数量。现场空白对照值不用来校正测试结果,但用于检查采样误差。

4.6.6 采样过程

4.6.6.1 将采用介质装入采样器,操作应避免污染。

4.6.6.2 启动采样器,避免采样器周围有人为因素的气流干扰。

4.6.6.3 采样完毕后,取回采样介质时,应检查其完整状态,之后将其密封,以避免二次污染。

4.6.7 样本包装和运输

4.6.7.1 采集的样本应在 10 h 内送到分析实验室。

4.6.7.2 应当保护采集样本免受各种干扰(如光照、潮湿、干燥、受热、沾尘等)。一次性平皿采集样本在运输过程中应保持采样面朝下,液体采集样本在运输过程中应保持容器口朝上,滤膜采集样本在运输过程中应保持采样面朝上。

注:不同的采集样本在密封容器内的放置状态也不相同。

4.6.7.3 包装好样本应在 0 °C~10 °C 条件下保存。应记录保存条件。

4.6.7.4 运输过程中的温度 ≤ 10 °C。应记录运输过程的各项参数(温度、湿度、持续时间)。

4.6.8 采样记录

4.6.8.1 在采样之前和采样过程中,应填写采样记录,记录应对测试地点的环境应有相应的描述(采样报告的范例参见附录 B)。

4.6.8.2 采用记录包括但不限于以下内容:

- a) 每个样本的唯一标识。
- b) 采样日期与时间。
- c) 采样人员姓名。
- d) 采样内容和采样点位置(地理坐标)。
- e) 设备名称、型号、状态等。
- f) 采样过程记录以及环境干扰情况(例如交通工具经过而引起扬尘等)。
- g) 环境气象参数:气温、相对湿度、太阳辐射、风速、风向及气压。
- h) 样本保管人员姓名。

5 生物气溶胶分析

5.1 生物气溶胶的定性分析

注:生物气溶胶的定性分析是指通过微生物的形态学、生化反应、血清学、PCR 和基因序列测序等分析方法对采集的生物气溶胶样本中的微生物种类进行分析。

5.1.1 形态学分析

通过染色和显微镜观察,确定细菌和真菌的形态特征,对其进行归类。形态学分析适用于生物气溶胶颗粒中培养出来的细菌和真菌的定性分析。参照国家或行业标准执行。

5.1.2 生化反应分析

生化反应分析适用于生物气溶胶颗粒中培养出来的各种细菌鉴定分析。参照国家、行业标准或现行有效的成熟方法执行。

5.1.3 血清学分析

血清学分析适用于生物气溶胶颗粒中培养出来的各种细菌和病毒的定性分析。参照国家、行业标准或现行有效的成熟方法执行。

5.1.4 PCR 分析

PCR 分析适用于生物气溶胶颗粒中细菌、病毒和真菌的定性分析。参照国家、行业标准或现行有效的成熟方法执行。

5.1.5 基因序列测序分析

基因序列测序分析适用于生物气溶胶颗粒中细菌、病毒和真菌的定性分析。参照国家、行业标准或现行有效的成熟方法执行。

5.2 生物气溶胶的定量分析

注：生物气溶胶的定量分析是通过活微生物培养和增殖对样本中微生物进行分析。

5.2.1 不同采样介质的样本定量分析要求

5.2.1.1 用固体或半固体培养基作为采样介质

用固体或半固体培养基作为采样介质，主要适用于可培养的细菌、真菌直接计数或鉴定。可把采集的样本直接放入恒温培养箱中，按细菌和真菌的培养的温度、湿度、培养时间等进行培养、观察、计数。

5.2.1.2 用滤膜作为采样介质

用滤膜作为采样介质，可直接将滤膜采样面朝下贴在固体培养基或半固体培养基上，放入恒温培养箱中培养，按细菌和真菌的培养温度、湿度、培养时间等进行培养、观察、计数。也可先把滤膜上附着的微生物洗脱下来，进行预处理，除去杂质，然后将悬液进行梯度稀释，每一个稀释度接种到固体或半固体培养基上，放入恒温培养箱中培养，按细菌和真菌的培养温度、湿度、培养时间等进行培养、观察、计数。

5.2.1.3 用液体作为采样介质的样本

用液体作为采样介质的样本，开展细菌真菌培养检测时，在涂布平皿培养前，应对采集的样本进行预处理，除去杂质，再对菌悬液进行梯度稀释，每一个稀释接种到固体或半固体培养基上，放入恒温培养箱中培养，按细菌和真菌的培养温度、湿度、培养时间等进行培养、观察、计数；其他检测按照具体采用的检测方法需要开展样本处理。开展病毒培养检测时，将采集的液体样本进行预处理，除去干扰培养的杂质，再接种到敏感细胞或敏感实验动物体内进行病毒分离、培养，进行定量分析。病毒培养以外的其他检测或分析，则按照具体采用的检测方法需要开展样本处理。

5.2.2 培养观察

5.2.2.1 营养培养基

营养培养基适合于细菌的培养、菌落计数和定性鉴定，也能培养某些放线菌、酵母菌等真菌。实验人员应经过专业培训，能从菌落形态来直接区分细菌与真菌，细菌可以鉴定到属或者种。

5.2.2.2 沙氏培养基

沙氏培养基适合于真菌的培养、菌落计数和定性鉴定，也能培养某些放线菌、酵母菌和其他细菌。实验人员应经过专业培训，能从菌落形态来直接区分真菌与细菌，真菌可以鉴定到属或者种。

5.2.2.3 细胞培养病毒

在显微镜下观察到有细胞特异性死亡，且没有污染，应按照病毒分离鉴定的程序继续培养、分离和

鉴定。

实验人员应经过专业培训,能识别病毒的生长、分析、鉴定。

5.2.2.4 动物培养病毒

在病毒接种敏感动物后,应每天观察动物的状态和行为,如观察到有舞动异常行为(如反应迟钝、行动缓慢等)或异常特征(如耸毛、萎靡等)时,可以初步判断为病毒感染发病,应及时收取发病动物,解剖取组织、器官、血液等样本进行检测或显微镜观察。如无异常行为或异常特征,一般饲养 21 d 后,全部处死,并进行无害化处理。

5.2.3 菌落计数

5.2.3.1 细菌菌落计数

使用直径 90 mm 的标准培养皿时,细菌菌落计数的最佳范围为 30 CFU/皿~300 CFU/皿。而有效的计数结果,每皿应大于 10 CFU,小于约 100 CFU。在培养后 24 h 后开始首次检查平皿,之后每隔 12 h 检查一次,直至培养 48 h 结束。记录下每个稀释梯度 48 h 内生长的最多菌落数。若无菌落生长也同样需要记录。菌落计数的操作应在二级生物安全柜中进行,避免污染。

5.2.3.2 真菌菌落计数

使用直径 90 mm 的标准培养皿时,真菌菌落计数的最佳范围为 40 CFU/皿~60 CFU/皿。而有效的计数结果,每皿应大于 10 CFU,小于约 100 CFU。在培养后的第 2 天开始首次检查平皿,之后定期检查(最好每天检查),直至培养 7 d 结束。记录下每个稀释梯度 7 d 内生长的最多菌落数。若无菌落生长也同样需要记录。菌落计数应在二级生物安全柜中进行,尽可能轻,避免导致真菌孢子播散,引起子代菌落定殖。

5.2.3.3 病毒的噬斑形成单位(PFU)计数

使用标准细胞培养瓶培养时,病毒噬斑形成单位(PFU)计数的最佳范围是 6 PFU/cm²~8 PFU/cm²。在培养后的第 1 天开始首次检查平皿,之后定期检查(最好每天检查),不同的病毒形成空斑的时间不一样,一般培养至 72 h 结束。记录下每个稀释梯度 4 d 内生长的最多空斑数。对照样本也同样需要记录。操作培养瓶应在二级生物安全柜中进行,尽可能轻,避免污染影响细胞生长。

5.2.4 结果计算和表达

5.2.4.1 应选用菌落分散良好、分辨型好且菌落大小清晰可数的培养平皿进行结果计算。

5.2.4.2 对于用固体介质撞击式采样的空气样本中微生物浓度的计算。

空气中的微生物浓度按式(1)计算。

$$C_F = \frac{n_{CFU}}{V \times t} \times 1\,000 \dots\dots\dots(1)$$

式中:

C_F ——空气样本中的微生物浓度,单位为菌落形成单位每立方米(CFU/m³);

n_{CFU} ——采样平皿菌落生长总数,单位为菌落形成单位(CFU);

V ——采样流量,单位为升每分(L/min);

t ——采样时间,单位为分(min)。

5.2.4.3 对于用液体介质冲击式采样、滤膜采样采集的空气样本中的微生物浓度的计算。通常只有一个稀释梯度的平皿能够进行有效计算,有时也可以计算两个稀释梯度(特别是稀释倍数为 1:2 时)。

空气微生物浓度计算,即原菌液浓度的计算根据式(2),从平皿菌落数换算而来。

$$C_s = \frac{n_{\text{CFU}}}{V_s} \times 1\,000 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

C_s ——原菌液浓度,单位为菌落形成单位每毫升(CFU/mL);

n_{CFU} ——某稀释梯度下的菌落生长总数,单位为菌落形成单位(CFU);

V_s ——计算的总体积,单位为毫升(mL),指该稀释梯度下的原样品含量,见式(3)。

$$V_s = n_p V_t f_d \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

n_p ——用于计数的平皿数量;

V_t ——涂布平皿上的菌液的体积,单位为毫升(mL);

f_d ——该稀释梯度的倍数(原代菌液 $f_d=1$;当稀释倍数 1:10 时 $f_d=0.1$,以此类推)。

5.2.4.4 病毒噬斑形成单位数按照 5.2.4.2 和 5.2.4.3 计算。



附 录 A
(资料性附录)

生物气溶胶采样器的性能和选择原则

A.1 概述

要了解生物气溶胶的特性和潜在危害,需要了解气溶胶采样、微生物活性、微生物培养与分析等原理。在采集生物气溶胶样本时,采样设备能够最大量地捕获空气中的生物粒子,同时尽量减少对所采集粒子生物活性的影响。有时这两个目的不能同时达到,尤其是捕获具有生物活性的微生物颗粒。在评价生物气溶胶危害时,最理想的采样状态是能知道空气中的总粒子浓度、粒子分布情况以及空气中具有活性的微生物粒子浓度。

A.2 生物气溶胶采样器的采样效率和空气动力学性能

不同采样原理的生物气溶胶采样器其采样效率是不同的,基于采样后的分析方法和采集的生物气溶胶类型(细菌、病毒、真菌、毒素等)的考虑,在选择生物气溶胶采样器时,应考虑充分了解生物气溶胶采样器的采样效率等性能参数,包括总采样效率、生物采样效率、采样流量、采样介质。

A.3 微生物经采样后的生物活性

用于采集空气中液体或者固体颗粒物的采样器通常并不适用于生物气溶胶的采样。剪切力,静电力,以及脱水作用可以造成生物气溶胶的损失,使用剪切力低的采样器可以降低微生物活性的损伤,但是这种采样器通常其物理采样效率也较低。

附 录 B
(资料性附录)

生物气溶胶采样和定量分析(培养分析法)记录

生物气溶胶采样全过程的记录表格见表 B.1~表 B.6。

表 B.1 生物气溶胶采样记录表

委托人：						任务号：				
目标：						采样器类型和序列号：				
采样地点：						日期：				
样本号	采样开始 时间	采样量 m ³	采样时间 min	源距离 m	温度 ℃	相对湿度 %	气压 Pa	风向	风速 m/s	气象条件
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										

地理概况应记录在草图中。

观察情况：

实验室负责人：

采样人签字：

日期：

表 B.2 采样期间活动和干扰情况记录表

委托人：		任务号：
目标：		采样器类型和序列号：
采样地点：		日期：
样本号	采样期间的活动或干扰 (潜在的二次激发源、气味感觉、再悬浮粒子概况)	
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		

实验室负责人：

采样人签字：

日期：

表 B.3 生物气溶胶样本接收记录表

采样人姓名/实验室	
采集空气量	
采样日期	
样本接收日期	
样本接收人姓名	
运输后样本状态	
样本储存温度	
样本接收处理措施	
其他：	

表 B.4 培养基的特性

生产商/类型：	
商用琼脂平板：	
自制琼脂平板：	
培养开始时间：	
培养温度：	
样本储存温度：	

实验室负责人：

采样人签字：

日期：

表 B.5 样本培养菌落计数数据清单

培养温度							
菌落计数起始时间							
菌落计数结束时间							
稀释度	平板号	计数日的菌落数					备注
		1	2	3	4	5	
A ₁ mL (10 ⁰)	1						
A ₁ mL (10 ⁰)	1						
A (10 ⁰)	1						
	2						
B (10 ⁻¹)	1						
	2						
C (10 ⁻²)	1						
	2						
D (10 ⁻³)	1						
	2						
E (10 ⁻⁴)	1						
	2						
F (10 ⁻⁵)	1						
	2						
G (10 ⁻⁶)	1						
	2						
H (10 ⁻⁷)	1						
	2						

记录人：

备注：

表 B.6 生物气溶胶培养分析方案

记录清单资料 (实验室/样品 名称/编号)	稀释度或平板 (如 A1、B 等)	菌落数	记录日期	菌落数平均值	采集空气量 m^3	结果 CFU/m^3

计算结果记录人：



参 考 文 献

- [1] 全国科学技术名词审定委员会.微生物学名词(第二版)[M].北京:科学出版社,2012.
- [2] 车凤翔,于玺华.空气微生物采检理论及其技术应用[M].北京:中国大百科全书出版社,1998.
- [3] 于玺华,车凤翔.现代空气微生物学即采检鉴技术[M].北京:军事医学科学出版社,1998.
- [4] 车凤翔,李劲松.空气生物学原理及应用[M].北京:科学出版社,2004.
- [5] 保罗 A·巴伦.气溶胶测量 原理、技术和应用[M].白志鹏,张灿等译.北京:化学工业出版社,2007.
- [6] ISO 7708:1995 Air quality—Particle size fraction definitions for health-related sampling
- [7] ISO 8199:2005 Water quality—General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture
- [8] ISO 16000-16:2008 Indoor air—Part 16: Detection and enumeration of moulds—Sampling by filtration
- [9] ISO 16000-17:2008 Indoor air—Part 17: Detection and enumeration of moulds—Culture-based method
- [10] EN 13098:2000 Workplace atmospheres—Guidelines for measurement of airborne micro-organisms and endotoxin
- [11] EN ISO 14698-1:2003 Clean rooms and associated controlled environments—Biocontamination control—Part 1: General principles and methods