

空气中微生物采样方法的比较

王豫林 陈代鸿

(重庆市卫生防疫站)

摘要 为探讨空气中微生物采样方法的实用性和可靠性,在优选出滤膜法、撞击法的最佳采样条件的基础上,与常用的平皿沉降法进行了比较。实验表明:滤膜法在空气流速为 10L/min,采样时间为 3min,膜孔径为 0.3 μ m 时采样效果较好;撞击法在空气流速为 3L/min,时间为 10min,吸收液装量为 5ml 时效果较好。将三种方法配对实验获取的数据,经统计学处理,P 值均大于 0.05,三法之间没有明显差异。因此,作者认为,滤膜法和撞击法能准确计算采样体积,较好地反映出空气中微生物的含量,但需特殊仪器,方法较为复杂,使用上受到一定限制。沉降法简单易行,其采样体积虽为经验公式推算出来,但作为一种粗略地估计空气污染程度的现场调查方法,还是适用的。

关键词 空气;微生物采样方法;最佳条件

空气中微生物的采样方法主要有沉降法、滤膜法和撞击法三种,就其技术难易程度而言,沉降法最为简便易行。日本等国家将平板沉降法作为室内空气卫生细菌学标准方法^[1]。关于三种方法的采样效果,国内这方面的资料报道不多。我们在优选出滤膜法、撞击法最佳条件的基础上,对三种方法进行了比较,现报告如下。

材料和方法

(一) 材料

鞍劳 D-4 型粉尘采样器是沈阳市热工仪

表厂生产。微孔滤膜是上海第十制药厂生产。气体流量计,小流量撞击式采样瓶,6cm 赛氏过滤器,普通营养琼脂均由上海医学化验所生产。高盐察氏培养基按文献[2]配制。

(二) 方法

1. 滤膜法:将滤膜装在滤器托网上,把粗糙面作为截留面,加上垫圈,包装,于 121℃ 30 分钟高压蒸汽灭菌。临用前旋紧螺旋,使滤膜固定,连接采样器。采样后在无菌条件下取出

本文承本站韩显丕主任指导,特此致谢。

滤膜进行细菌培养。

2. 撞击法: 将撞击式采样瓶及连接胶管经 121℃ 30 分钟灭菌后, 在无菌操作下向瓶内加入吸收液(即无菌生理盐水), 连接采样器, 采样后取出 1ml 液体按平皿倾注法进行细菌培养。

3. 沉降法: 把普通营养琼脂平皿暴露在采样地点, 10 分钟后, 置培养箱培养。根据 5 分钟内在 100cm² 面积上降落的细菌数约等于 10L 空气中所含菌数的估计, 按公式计算:

$$\text{每立方米空气中细菌数} = \frac{50000 N}{A t}$$

A: 所用平皿面积 (cm²)

t: 平皿暴露于空气中的时间 (min)

N: 培养后, 平皿上菌落数

4. 菌落计数: 采集的样品在 37℃ 培养 24 小时后计算细菌总数, 霉菌总数是在 25℃ 培养 7 天后计算结果。所获数据均按文献[3]进行统计学处理。

结果与讨论

(一) 滤膜法最佳条件选择

1. 空气流速对采样效果的影响:

根据文献记载^[4] 滤膜法采样时间越长对微

表 1 空气流速对采样效果的影响 (菌落 个/m³)

试验次序	空气流速 L/min		组间差数
	5	10	
1	1440	1840	400
2	880	1260	380
3	200	420	220
4	1520	1520	0
5	2280	2300	20
6	640	760	120
7	800	880	80
8	1120	1860	740
平均	1110	1335	$\Sigma X = 1960$
统计处理			$t = 2.76$ $P < 0.05$ 差异显著

生物的捕获效果越差, 一般不超过 5 分钟, 以免菌体死亡。本试验确定采样时间为 3 分钟, 采

样后将滤膜光滑面直接贴在营养琼脂平皿上培养, 在空气流速为 5 和 10L/min 时, 经 8 次试验比较, 结果两种空气流速有明显差异。以空气流速 10L/min 采样效果最好(表 1)。

2. 滤膜孔径对采样效果的影响: 在空气流速为 10L/min 和采样时间为 3 分钟条件下, 对两种滤膜孔径 0.3 和 0.65μm 进行比较(表 2)。由表 2 结果可见: 滤膜孔径为 0.3 和 0.65μm 时, 对采样效果两者之间没有明显差异, 但从试验结果来看, 0.3μm 组对细菌的阻留效果似乎好些。

表 2 滤膜孔径对采样效果的影响 (菌落 个/m³)

试验次序	孔径 (μm)		组间差数
	0.3	0.65	
1	800	633	167
2	667	367	300
3	300	167	133
4	2100	1833	267
5	1500	1666	-166
6	633	300	333
平均	1000	827	$\Sigma X = 1034$
统计处理			$t = 2.31$ $P > 0.05$ 无显著差异

3. 滤膜采样后不同处理方法对细菌计数的影响: 滤膜采样后用贴膜法和洗膜法处理滤膜进行细菌计数。贴膜法是将滤膜直接贴在琼脂平皿上。洗膜法是将滤膜放在 10ml 生理盐水中洗下细菌, 然后取 1ml 该洗脱液倾注在平皿上进行计数。这两种处理方法对细菌计数的影响没有明显差异(表 3), 但贴膜法比洗膜法简单, 而且洗膜法不可能将细菌全部从膜上洗下, 所以贴膜法较好。

根据上述试验结果, 滤膜法采样的最佳条件是: 空气流速 10L/min、采样时间 3 分钟、滤膜孔径 0.3μm, 采样后尽快将滤膜光滑面直接贴在琼脂平皿上进行培养及菌落计数, 以免因干燥细菌死亡。

表3 滤膜采样后不同处理方法对细菌计数的影响

(菌落 个/m³)

试验次序	处理方法		组间差数
	贴膜法	洗膜法	
1	4300	3333	967
2	2233	1500	733
3	2200	2667	-467
4	1200	667	533
5	967	833	134
6	767	667	100
平均	1944	1611	$\Sigma X = 2000$
统计处理			$t = 1.58$ $P > 0.05$ 无显著差异

(二) 撞击法最佳条件的选择

1. 不同采样时间对采样效果的影响: 微生物以气溶胶的形式存在于空气中^[1], 所以对采样器的选用以撞击式采样瓶为好^[2]。用无菌生理盐水作为吸收液, 以 3L/min 空气流速进行采样, 测定不同采样时间对采样效果的影响(表4)。由表4结果可见: 以10分钟的采样时间效果较佳, 随着采样时间的延长, 效果降低, 20分钟以后维持在一个恒定水平。

表4 采样时间对采样效果的影响

(菌落 个/m³)

菌别	采样时间 (min)		
	10	20	30
细菌	1000	458	532
霉菌	666	333	300
总数	1666	791	832
(%)	(100)	(47.5)	(50.0)

2. 空气流速对采样效果的影响: 在采样时间为10分钟时, 比较空气流速对采样效果的影响(表5)。由表5结果可知: 在空气流速为1和5L/min时, 对空气中微生物的捕获率无明显差异。根据文献[5]报道的气溶胶采样空气流速为3—5L/min和本试验的结果一致, 本试

验确定最佳空气流速为 3L/min。

表5 空气流速对采样效果的影响

(菌落 个/m³)

试验次数	空气流速 (L/min)		组间差数
	1	5	
1	6000	7050	1050
2	2200	3313	1113
3	1250	1200	-50
4	2000	1200	-800
5	1500	1300	-200
6	1000	980	-20
平均	2325	2507	$\Sigma X = 1093$
统计处理			$t = 0.593$ $P > 0.05$ 无显著差异

3. 吸收液不同装量对采样效果的影响:

在空气流速为 3L/min, 采样时间为 10 分钟的条件, 比较了在撞击式采样瓶中吸收液的装量分别为 5 和 10ml 时对细菌的阻挡效果(表6)。由表6结果可知: 所比较的两组无明显差异, 但以 5ml 装量组较好。

表6 吸收液不同装量对采样效果的影响

(菌落 个/m³)

试验次序	吸收液装置 (mL)		组间差数
	5	10	
1	1000	1330	-330
2	2333	1000	1333
3	1033	1833	-750
4	1417	500	917
5	500	666	-106
6	1250	666	584
7	666	1000	-334
8	1083	1333	-250
平均	1166	1041	$\Sigma X = 1004$
统计处理			$t = 0.49$ $P > 0.05$ 无显著差异

从上述试验结果看, 撞击法采样的最佳条件为: 空气流速 3L/min, 采样时间为 10 分

钟,吸收液装量为 5ml。

(三) 沉降法、滤膜法、撞击法对空气中微生物采样效果的比较

按照沉降法、滤膜法和撞击法的各自最佳采样条件进行采样,并进行平行试验,比较三种方法的采样效果(表7)。将 6 次比较试验的数据

经统计学处理,结果三种方法之间没有明显差异。从表 7 结果看,撞击法和滤膜法比较接近,其原因可能是滤膜法与撞击法能准确计算采样体积,较为真实反映微生物在空气中的存在。而沉降法的采样体积是由经验公式推算的,其准确性不及其它两种方法。

表 7 沉降法、滤膜法、撞击法对空气中微生物采样效果比较 (菌落 个/m³)

试验次序	采样方法			组 间 差 数		
	沉降法 (A)	滤膜法 (B)	撞击法 (C)	(A)–(B)	(A)–(C)	(B)–(C)
1	509	133	167	376	342	34
2	2069	977	833	1092	1236	-144
3	1655	1222	1167	433	488	-55
4	732	500	1667	232	-935	1167
5	1783	1000	1333	783	450	333
6	1591	1867	1333	-276	258	-534
平均	1390	950	1083	$\Sigma X = 2595$	$\Sigma X = 1839$	$\Sigma X = 801$
统计处理				$t = 2.21 \quad P > 0.05$ 无显著差异	$t = 1.06 \quad P > 0.05$ 无显著差异	$t = 0.56 \quad P > 0.05$ 无显著差异

采样条件: A 法: 直径 10cm 平皿暴露于空气 10 分钟。
B 法: 滤膜孔径 0.3 μ m, 采样时间 3 分钟。空气流速 10L/min。
C 法: 吸收液 5mL, 采样时间 10 分钟。空气流速 3L/min。

1. 空气中微生物采样有多种方法,除了沉降法、滤膜法、撞击法以外,还有筛孔式采样法、裂隙式采样法等。由于后两种方法需要复杂的设备及装置,很少采用。

2. 滤膜法中所使用的微孔滤膜,采样机理主要是惯性碰撞和扩散沉降,此外,直接阻挡和静电吸附也有一定作用。张宗礼^[4]等认为滤膜孔径为 0.3—0.45 μ m 可减少吸附,出菌率高。本文比较 0.3 与 0.65 μ m 孔径的采样效果,仍可看出 0.3 μ m 组的捕获菌数高于 0.65 μ m 组。关于空气流速,文献[4]比较了空气流速为 35、70 和 110L/min 的采样效果,认为低流速较好。本文通过比较 5 和 10L/min 的空气流速,认为 10L/min 组对细菌的捕获效果较好。

3. 撞击法的采样效果与采样器的选用有密切关系。微生物以气溶胶的形式存在空气中,其直径为 0.1—10 μ m,与空气中的气体成分不

同,气溶胶惯性较大而且颗粒大小不同,不能使用采集气体的采样器。撞击式采样瓶的采样原理是使空气以很快速度冲击到装有吸收液的瓶底部,由瓶中吸收液洗去空气中的微生物,其采样效率取决于采样瓶中尖嘴的大小和尖嘴与瓶底的距离,同时也与气溶胶粒子的直径有关,通过调节抽气流量等方法可提高采样效率^[6-8]。本文在比较空气流速对撞击法采样的影响时,认为 1 与 5L/min 组没有明显差异,可能与气溶胶颗粒大小的不均匀有关,根据文献[5]和本试验比较结果,我们选择 3L/min 为撞击法的最佳流速。

4. 文献[1]认为沉降法测定空气中的细菌数虽欠准确,但方法最简单,因此使用普遍;撞击法被认为是最完善的一种,能测定空气中细菌的准确含量,但需特殊仪器设备;滤膜法较沉降法复杂,但准确性高。从本文的试验结果来

看,结论是一致的。

参 考 文 献

- [1] 郁庆福等: 卫生微生物学, 第一版, 人民卫生出版社, 北京, 第 73 - 84, 140 - 142 页, 1984。
- [2] 中华人民共和国国家标准: 食品卫生检验方法 微生物学部分, 第一版。中国标准出版社, 北京, 第 154 页, 1986。
- [3] 四川医学院主编: 卫生统计学, 第一版。人民卫生出版社, 北京, 第 19 - 22 页, 1978。

- [4] 张宗礼等: 中国环境科学, 5(3): 56, 1985。
- [5] 湖南医学院主编: 卫生学, 第一版。人民卫生出版社: 北京, 第 330 页, 1979。
- [6] 中国预防医学中心卫生研究所编: 大气污染监测技术, 第一版, 化学工业出版社。北京, 第 26 - 38 页, 1984。
- [7] 程振华等译: 环境监测技术(日), 第一版, 中国环境科学出版社, 北京, 第 139 - 140 页, 1985。
- [8] 上海市卫生防疫站编: 环境保护检验, 第一版, 上海人民出版社, 上海, 第 144 - 146 页, 1976。