

中 华 人 民 共 和 国 民 政 行 业 标 准

MZ/T 140—2019

殡仪场所致病菌检测技术规范

Technical specifications for examination of pathogenic bacteria in funeral home

2019 - 12 - 12 发布

2019 - 12 - 12 实施

中 华 人 民 共 和 国 民 政 部 发 布

目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 细菌总数.....	2
5 溶血性链球菌.....	3
6 大肠菌群.....	4
7 金黄色葡萄球菌.....	5
8 参考文献.....	8

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国民政部提出。

本标准由全国殡葬标准化技术委员会（SAC/TC 354）归口。

本标准起草单位：民政部一零一研究所、大地人本文化发展集团有限公司、广州市殡葬服务中心、中国殡葬协会、一扫清（上海）环境科技有限公司。

本标准主要起草人：李玉光、周雪媚、高青、李伯森、刘崇、肖成龙、光焕竹、孙树仁、陈霜玲、徐炳达、林涛。

殡仪场所致病菌检测技术规范

1 范围

本标准规定了各类殡仪场所致病菌的采样及检测检验方法。

本标准适用于殡仪馆、火葬场、骨灰堂、公墓、殡仪服务站、殡仪车等固定和流动殡仪场所。

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。凡是注明日期的引用文件，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 23287 殡葬术语

3 术语和定义

GB/T 23287界定的及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

细菌总数 total bacterial count

公共场所空气中采集的样品，或公共用品用具经过采样处理，计数在营养琼脂培养基上经36℃±1℃、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。

3.2

大肠菌群 coliforms

在37℃、24 h培养能发酵乳糖、产酸、产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌。

3.3

金黄色葡萄球菌 staphylococcus aureus

在Baird Parker培养基或血平板培养基上生长良好，分解甘露醇产酸，血浆凝固酶阳性的革兰氏阳性葡萄状球菌。

3.4

溶血性链球菌 streptococcus hemolyticus

属于链球菌属，为革兰氏阳性菌，分解葡萄糖，产酸不产气，血平板上产生溶血圈。

3.5

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总数的测定方法。

3.6

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总数的测定方法。

4 细菌总数

4.1 检测方法

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殡仪场所空气中的细菌总数。

4.2 撞击法

4.2.1 仪器和设备

六级筛孔撞击式空气微生物采样器、高压蒸汽灭菌器、恒温培养箱、冰箱、平皿（直径90 mm）。

4.2.2 培养基

4.2.2.1 营养琼脂培养基成分：

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1000 mL

4.2.2.2 制法：将上述成分混合后，加热溶解，调节 pH 值为 7.2~7.6，定容至 1000 mL，121 °C 高压灭菌 20 min。将灭菌好的营养琼脂以 15 mL 倾注直径为 90 mm 的培养皿，置 4 °C 备用。

4.2.3 采样

4.2.3.1 采样点

按房间的大小和位置设置采样点。采样布点方法为：室内面积≤30 m²时，设内、中、外对角线3点，内、外点布点部位距墙壁1 m处；室内面积>30 m²时，设4角及中央5点，4角的布点部位距墙壁1 m处。采样点距离地面高度1.2 m~1.5 m。

4.2.3.2 采样方法

采样时，将六级筛孔撞击式微生物采样器放在各采样点，流量计设置28.3 L/min，采样时间5 min~15 min，采样结束后，立即盖好平皿盖。

4.2.4 检验步骤

将采集细菌后的营养琼脂平皿放入36 °C±1 °C培养箱，培养48 h后计数菌落。

试验采样完成后，应将未用的同批培养基，与上述试验样本同时进行培养或接种后培养，作为阴性对照。阴性对照组若有菌生长，说明所用培养基有污染，试验无效，更换后按4.2.2、4.2.3、4.2.4步骤重新检测。

4.2.5 结果报告

4.2.5.1 采样点细菌总数结果计算：菌落计数，记录结果并按以下公式计算空气中细菌总数。

$$Q = \frac{N}{L \times T} \times 1000 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- Q ——空气中细菌总数，单位为菌落形成单位每立方米（cfu/m³）；
- N ——平板上菌落总数，单位为菌落形成单位（cfu）；
- L ——每分钟采气量，单位为升每分钟（L/min）；
- T ——采样时间，单位为分钟（min）。

4.2.5.2 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。

4.3 自然沉降法

4.3.1 仪器和设备

高压蒸汽灭菌器、恒温培养箱、平皿（直径90 mm）、采样支架。

4.3.2 培养基

见4.2.2。

4.3.3 采样

4.3.3.1 采样点：见4.2.3.1。

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

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 溶血性链球菌

5.1 检测方法

采用撞击法采样、血琼脂培养基培养计数的方法测定殡仪场所中的β-溶血性链球菌。

5.2 仪器和设备

见4.2.1。

5.3 培养基

5.3.1 血琼脂平板成分：

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	20.0 g
脱纤维羊血	5 mL~10 mL
蒸馏水	1000 mL

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

5.4 采样

见4.2.3。

5.5 检验步骤

5.5.1 培养方法：采样后的血琼脂平板在36 °C±1 °C下培养24 h~48 h。

5.5.2 结果观察：培养后，在血琼脂平板上形成灰白色、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个细胞或几十个细胞之间；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。符合上述特征的为β-溶血性链球菌。

5.6 结果报告

5.6.1 采样点溶血性链球菌结果计算：菌落计数，记录结果并按以下公式计算空气中β-溶血性链球菌菌落总数。

$$A = \frac{N}{L \times T} \times 1000 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- A ——空气中溶血性链球菌菌落总数，单位为菌落形成单位每立方米（cfu/m³）；
- N ——平板上菌落总数，单位为菌落形成单位（cfu）；
- L ——每分钟采气量，单位为升每分钟（L/min）；
- T ——采样时间，单位为分钟（min）。

5.6.2 一个区域溶血性链球菌测定结果：一个区域空气中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 大肠菌群

6.1 检测方法

器具上大肠菌群的测定方法为多管发酵法。

6.2 培养基和试剂

6.2.1 生理盐水

氯化钠	9.0 g
蒸馏水	1000 mL

制法：称取 9.0 g 氯化钠溶于 1000 mL 蒸馏水中，分装到试管内，每管 10 mL，121 ℃高压灭菌 20 min。

6.2.2 营养琼脂

见4.2.2.1。

6.2.3 乳糖胆盐培养液

蛋白胨	20.0 g
猪胆盐	5.0 g
乳糖	5.0 g
0.4%溴甲酚紫水溶液	2.5 mL
蒸馏水	1000 mL

制法：将蛋白胨、猪胆盐及乳糖溶解于 1000 mL 蒸馏水中，调整 pH 为 7.2~7.5 加入指示剂，充分混匀，分装于含有小管（倒管）的试管中。115 ℃高压灭菌 30 min，贮存于冷暗处备用。

6.2.4 伊红美蓝培养基（EMB培养基）

蛋白胨	10.0 g
乳糖	10.0 g
磷酸氢二钾	2.0 g
琼脂	17.0 g
2%伊红水溶液	20 mL
0.5%美蓝水溶液	13 mL
蒸馏水	1000 mL

制法：将琼脂加到 900 mL 蒸馏水中，加热溶解，然后加入磷酸氢二钾和蛋白胨，混匀使溶解，再加入蒸馏水补足至 1000 mL，调整 pH 为 7.2~7.5。趁热用脱脂棉和纱布过滤，再加入乳糖，混匀，定量分装于烧瓶内，115 ℃高压灭菌 30 min，贮存于冷暗处备用。

临用时，加热融化储备培养基，待冷至 60 ℃左右，据烧瓶内培养基的容量，加入一定量的已灭菌的 2%伊红水溶液和 0.5%美蓝水溶液，充分摇匀（防止产生气泡），倾注平皿备用。

6.2.5 乳糖发酵管

蛋白胨	20.0 g
乳糖	10.0 g
0.4%溴甲酚紫水溶液	2.5 mL
蒸馏水	1000 mL

制法：将蛋白胨及乳糖溶解于蒸馏水中，调整 pH 为 7.2~7.5 加入指示剂，分装于含有小管（倒管）的试管中，每管 3 mL，115 °C 高压灭菌 30 min，贮存于冷暗处备用。

6.2.6 革兰氏染色液

购买已配置好的革兰氏染色液，常温阴凉处备用。

6.3 仪器和设备

高压灭菌锅、干热灭菌箱、恒温培养箱、冰箱、电炉、天平、旋涡混合器、无菌试管、平皿、刻度吸管、灭菌棉拭子、pH 计。

6.4 样品采集

随机抽取清洗消毒后准备使用的公共用品，无菌操作，使用灭菌干燥的棉拭子，于 10 mL 灭菌生理盐水内浸润后，在用品用具的适当部位均匀涂抹并进行样品采集，再用灭菌剪刀剪去棉签与手接触的部分，将棉拭子放入剩余的 9 mL 的生理盐水中，4 h 内送检。

采样要求：与人体接触处涂抹采样，采样面积需达到 25 cm² 以上/样品。

6.5 检测分析步骤

6.5.1 样品的稀释

将放有采样后棉拭子的试管充分振摇，制成 1:10 稀释样品。全过程需在无菌操作台中进行。

6.5.2 乳糖胆盐发酵试验

将检样倒入双料乳糖胆盐发酵培养液中，置于 36 °C ±1 °C 培养箱内培养 24 h，观察是否产酸产气，如不产酸、不产气则为大肠菌群阴性。若有变黄和气体产生，则按照下列步骤进行。

6.5.3 分离培养

自产酸、产气发酵管中取一接种环培养液，转种伊红美蓝琼脂平板上，置 36 °C ±1 °C 培养箱内培养 18 h~24 h。然后取出，观察菌落形态，并做革兰氏染色和证实试验。

深紫色、具有金属光泽的菌落；

紫黑色、不带或略带金属光泽的菌落；

淡紫红色、中心较深的菌落。

6.5.4 证实性试验

在上述平板上，挑取可疑大肠菌群菌落 1 个~2 个进行染色镜检；同时接种乳糖发酵管，置 36 °C ±1 °C 培养箱内培养 24 h，做好记录。

6.6 计算与结果

凡乳糖发酵管最终产酸、产气，革兰氏染色为阴性的无芽孢杆菌，即可报告检出大肠菌群。

7 金黄色葡萄球菌

7.1 检测方法

器具上金黄色葡萄球菌的测定方法为平皿鉴定法。

7.2 培养基和试剂

7.2.1 胰酪胨肉汤培养基

胰酪胨(或胰蛋白胨)	17 g
植物蛋白胨(或大豆蛋白胨)	3 g
氯化钠	100 g

磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1000 mL

制法：将上述成分混合溶解后，调节 pH 值为 7.2~7.3，分装，121 °C 高压灭菌 20 min。

7.2.2 氯化钠肉汤培养基

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	75.0 g
蒸馏水	1000 mL

制法：将上述成分加热溶解，调 pH 值为 7.4，分装，121 °C 高压灭菌 20 min。

7.2.3 Baird Parker 平板

胰蛋白胨	10 g
牛肉膏	5 g
酵母浸膏	1 g
丙酮酸钠	10 g
甘氨酸	12 g
氯化锂	5 g
琼脂	20 g
蒸馏水	950 mL

增菌剂的配制：卵黄盐水（30%，体积分数）50 mL，与除菌过滤的硝酸钾（质量浓度为 1%）10 mL 混合，保存于冰箱中。

制法：将各成分加到蒸馏水中，加热煮沸完全溶解，冷却至 25 °C，校正 pH 值 7.0±0.2。分每瓶 95 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。临用时加热融化琼脂，每 95 mL 加入加热到 50 °C 的卵黄亚硝酸钾增菌剂 5 mL，摇匀后倾注平板。培养基应是致密不透明的。使用前在冰箱储存，不得超过 48 h。

7.2.4 血琼脂平板

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	20.0 g
脱纤维羊血	5 mL ~10 mL
蒸馏水	1000 mL

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

7.3 仪器和设备

高压蒸汽灭菌器、恒温水浴锅、冰箱、电炉、天平、平皿（直径 90 mm）、刻度吸管、pH 计或精密 pH 试纸、显微镜、旋涡混合器、离心机。

7.4 检验方法及步骤

7.4.1 采样：对物体的表面进行采样时，用浸有无菌生理盐水的棉拭子，在物体的把手处直接涂抹采样。剪去手接触棉拭子的部分，将棉拭子放入装有 10 mL 已灭菌过的采样液的试管内，采样后 4 h 内检验。

7.4.2 将 1 mL 样品放入 9 mL 氯化钠肉汤或胰酪胨大豆肉汤培养基中，36 °C±1 °C 培养 24 h。

7.5 检测分析步骤

7.5.1 从培养液中取 1 接种环或 2 接种环，划线接种在 Baird-Parker 平板或血平板上，于 36 °C±1 °C 培养 24 h。在 Baird-Parker 平板上菌落为圆形、光滑、凸起湿润，颜色灰或黑色，周围浑浊、外层有一透明带；金黄色葡萄球菌在血平板上呈金黄色菌落，大而凸起，表面光滑，周围有溶血圈。

7.5.2 革兰氏染色，为革兰氏阳性菌，呈葡萄状。

7.5.3 血浆凝固酶试验：吸取 0.5 mL（1:4 稀释）的新鲜血浆放入灭菌小试管中，再加入待检菌 24 h 肉汤培养物 0.5 mL。混匀，放 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱或水浴锅中，每 30 min 观察一次，24 h 内呈现凝块即为阳性。

7.6. 计算与结果

镜检革兰氏染色阳性葡萄状球菌、血平板上菌落周围有透明的溶血圈、血浆凝固酶阳性，符合上述特征的为金黄色葡萄球菌，计算菌落数量，即可报告检出金黄色葡萄球菌菌落总数。

参考文献

- [1] GB/T 18204.3-2013 公共场所卫生检验方法 第3部分：空气微生物
 - [2] GB/T 18204.4-2013 公共场所卫生检验方法 第4部分：公共用品用具微生物
 - [3] GB 19053-2003 殡仪场所致病菌安全限值
-