

前 言

为贯彻执行《公共场所卫生管理条例》和 GB 9663~9673—1996、GB 16153—1996《公共场所卫生标准》，加强对公共场所卫生监督管理，特制定本标准。本标准中的方法是与 GB 9663~9673—1996，GB 16153—1996 相配套的监测检验方法。

本标准为首次发布。

本标准由中华人民共和国卫生部提出。

本标准起草单位：北京市卫生防疫站、江苏省卫生防疫站、中国预防医学科学院环境卫生监测所。

本标准主要起草人：高晖、封幼玲、周淑玉、符晓梅、韩秀媛。

中华人民共和国国家标准

公共场所拖鞋微生物检验方法 霉菌和酵母菌测定

GB/T 18204.8—2000

Methods of microbiological examination for slippers in public places
—Determination of molds and yeasts count

1 范围

本标准规定了公共场所公用拖鞋霉菌和酵母菌的检验方法。
本标准适用于公共场所公用拖鞋霉菌和酵母菌的测定。

2 定义

本标准采用下列定义。

霉菌和酵母菌测定 determination of molds and yeasts count

指在一定条件培养后,50 cm² 面积检样中所含有的霉菌和酵母菌落数。霉菌和酵母菌主要作为判定被检样品被霉菌和酵母菌污染程度的标志,以便对被检样进行卫生学评价时提供依据。

3 仪器和材料

- 3.1 恒温箱:25~28℃。
- 3.2 显微镜。
- 3.3 高压蒸汽灭菌器。
- 3.4 酒精灯。
- 3.5 接种针。
- 3.6 平皿:直径9 cm。
- 3.7 试管架。
- 3.8 试管。
- 3.9 玻璃珠。
- 3.10 无菌棉拭子。

4 培养基和试剂

4.1 生理盐水

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

溶解后,分装到加玻璃珠的试管内,10 mL 和 9 mL,121℃ 20 min 高压灭菌。

4.2 霉菌培养基

成分:蛋白胨	5 g
酵母浸出粉	2 g

葡萄糖	20 g
磷酸氢二钾	1 g
硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.5 g
琼脂	20 g
氯霉素	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL

制法:除葡萄糖外,取上述成分加入水内,微温溶解,调pH为6.8,煮沸,加葡萄糖溶解后,过滤调pH,使灭菌后pH为 6.4 ± 0.2 ,115℃20 min 高压灭菌。

4.3 虎红(孟加拉红)培养基

成分:蛋白胨	5 g
葡萄糖	10 g
磷酸二氢钾	1 g
硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.5 g
琼脂	20 g
1:3 000 虎红水溶液	100 mL
氯霉素	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL

制法:将上述各成分(除虎红外)加入蒸馏水中溶解后,再加入虎红溶液,分装后,高压灭菌121℃20 min。

4.4 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)

成分:马铃薯(去皮切块)	300 g
葡萄糖	20 g
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL

制法:将马铃薯去皮切块,加1 000 mL 蒸馏水,煮沸10~20 min。用纱布过滤,补加蒸馏水至1 000 mL。加入葡萄糖和琼脂,加热溶化,分装,121℃高压灭菌20 min。

5 操作步骤

5.1 将无菌棉拭子蘸取无菌生理盐水,在每只拖鞋鞋面与脚趾接触处5 cm×5 cm 面积上,有顺序地均匀涂抹3次(一双拖鞋为一份样品)后,用灭菌剪刀将棉拭子手执部分剪断,将棉拭子放入10 mL 装有玻璃珠的无菌盐水管中。

5.2 将盛有棉拭子的盐水管在手心用力振荡100次,再用带橡皮乳头的1 mL 灭菌吸管反复吹吸50次,使霉菌孢子充分散开。此液为1:10 稀释液。

5.3 用灭菌吸管吸取1:10 检液2 mL,分别注入到2个灭菌平皿内,每皿1 mL。另取1 mL 注入9 mL 加有玻璃珠的灭菌盐水管中,换1支1 mL 灭菌吸管吹吸5次,此液为1:100 稀释液。

5.4 按上述操作顺序作10倍递增稀释液,每稀释一次,换一支1 mL 灭菌吸管,根据样品的污染情况,选择3个合适的稀释度。

5.5 将溶化并冷却至45℃左右的培养基注入灭菌的平皿中,待琼脂凝固后,倒置于25~28℃温箱中,3天后开始观察,共培养观察一周。

5.6 计算方法:通常选择菌落数在30~100之间的平皿进行计数,同稀释度的两个平皿的菌落平均数乘以稀释倍数,即为每毫升检样中所含真菌数。若有两个稀释度的菌落数皆在规定范围之内或三个稀释度皆不在此范围时,应参照细菌总数的报告方式报告。

5.7 结果报告:见式(1)。

$$m = n \cdot k \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中： m ——真菌菌落数，cfu/50 cm²；
 n ——每皿的平均真菌菌落数；
 k ——稀释倍数。

注：一只拖鞋的涂抹面积是 25 cm²(5 cm×5 cm)；一双拖鞋的涂抹面积则为 50 cm²(25 cm²×2)。
