

The Application of Public Health Microbiological Detection Methods in Environmental Monitoring Field

Xudong Ma¹ Liang Luo²

1. Shaanxi Fengkang Mingyu Technology Service Co., Ltd., Ankang, Shaanxi, 725000, China

2. Shaanxi Huakang Inspection and Testing Co., Ltd., Ankang, Shaanxi, 725000, China

Abstract

Environmental monitoring involves the surveillance and measurement of indicators reflecting environmental quality to determine the status of environmental pollution and the level of environmental quality. It mainly includes the monitoring of physical, chemical, and ecological system indicators. Public place hygiene inspection, by regularly testing the hygiene level of public places, can identify potential health hazards such as air pollution early on. Timely implementation of effective measures can help reduce the occurrence of infectious diseases and safeguard public health. At the same time, it promotes the improvement of hygiene management levels by public place operators and enhances public satisfaction with the hygiene conditions of public places. As the most important areas for people's daily work and life, the environmental quality of public places plays a crucial role in ensuring people's health. Based on this, the author of this article, through extensive experimental operations, attempts to apply the *Legionella pneumophila* detection method, which is mainly used in public place hygiene inspection, to the field of environmental monitoring.

Keywords

Environmental monitoring, Public place hygiene inspection, Microorganisms, *Legionella pneumophila*

公共卫生微生物检测方法在环境监测领域的应用

马旭东¹ 罗亮²

1. 陕西沣康明宇科技服务有限责任公司, 中国·陕西 安康 725000

2. 陕西华康检验检测有限责任公司, 中国·陕西 安康 725000

摘 要

环境监测是通过对反映环境质量的指标进行监视和测定, 以确定环境污染状况和环境质量的高低, 其主要包括物理指标、化学指标和生态系统的监测; 而公共场所卫生检测通过定期对公共场所的卫生水平进行检测, 可以及早发现潜在的健康危害, 如空气污染等, 及时采取有效措施将有助于减少传染病的发生, 保障公众的身体健康; 同时促进公共场所经营者提高卫生管理水平, 提高公众对公共场所卫生状况的满意度。公共场所作为人们日常工作、生活最重要的区域, 其环境质量对于保障人们的身体健康发挥着举足轻重的作用。基于此, 本文作者在通过大量实验操作的基础上尝试将使用主要应用于公共场所卫生检验中的嗜肺军团菌检测方法应用于环境检测领域。

关键词

环境检测; 公共场所卫生检测; 微生物; 嗜肺军团菌

1 概述

嗜肺军团菌属于军团菌属, 是一种革兰氏阴性需氧杆菌, 主要引起军团菌病, 包括严重的肺炎型(军团病)和非肺炎的庞蒂亚克热。对生长环境要求苛刻, 需在含铁和半胱氨酸的特殊培养基(如 BCYE 培养基)中培养。其最适生存温度为 25-42℃, 在自然水体或人工储水系统中可长期存活。它通过吸入含菌气溶胶传播, 常见于温水环境(如空调系统、热水器), 目前已发现 16 个血清型, 其中 Lp1 型是导致人类疾病的主要亚型。空调、尤其是中央空调几乎已

经成为现代人工作生活的必需品, 而空调的风管和空调产生的冷凝水就成为了嗜肺军团菌滋生的重灾区。

2 检测原理

采用液体冲击法采集空调送风中的气溶胶, 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 BCYE-CYE 琼脂平板上不生长, 进一步经生化实验和血清学实验鉴定确认的菌落为嗜肺军团菌。

3 试剂和设备

使用仪器情况登记见表 1。实验用试剂登记见表 2。

【作者简介】马旭东(1988-), 男, 回族, 中国陕西安康人, 本科, 工程师, 从事环境保护研究。

表 1 使用仪器情况登记表

仪器名称	仪器厂家	规格型号	性能 状况
CO ₂ 培养箱	上海一恒科学仪器有限公司	BPN-80CH(UV)	良好
立式高压蒸汽灭菌器	上海中交医疗器械厂	LDZM-60L-II	良好
微生物气溶胶浓缩器	常州康华仪器制造厂	FA-4	良好
液体冲击式微生物气溶胶采样器	常州康华仪器制造厂	FA-5	良好

表 2 实验用试剂登记表

名称	厂家	纯度 / 浓度
GVPC 平板	广东环凯微生物科技有限公司	生化试剂
BCYE 平板	广东环凯微生物科技有限公司	生化试剂
酵母浸出粉	广东环凯微生物科技有限公司	生化试剂
L- 半光氨酸缺失的 BCYE 平板	广东环凯微生物科技有限公司	生化试剂
GVPC 添加剂	广东环凯微生物科技有限公司	生化试剂
BCYE 添加剂	广东环凯微生物科技有限公司	生化试剂
盐酸	天津科密欧	GR
氯化钾	天津科密欧	GR
氢氧化钾	天津科密欧	GR
马尿酸生化反应管	广东环凯微生物科技有限公司	生化试剂
军团菌分型血清试剂	上海科马嘉生物技术有限公司	生化试剂
嗜肺军团菌标准菌株（菌株编号：GDMCC1.1266 ATCC33152）	广东环凯微生物科技有限公司	标准菌株

4 吸收液的配制

4.1 采样吸收液一

取活性炭 2g、酵母浸出粉 10g 加水至 1000ml，121℃ 下高压灭菌 15min。另取广东环凯微生物科技有限公司生产的 GVPC 添加剂、内含多粘菌素 B 硫酸盐 10mg，万古霉素 0.5mg，放线菌酮 80mg；和 BCYE 添加剂、内含 α - 酮戊二酸 1.0g，N-2 酰胺基 -2 胺基乙烷磺酸 10.0g，氢氧化钾 2.88g，L- 半胱氨酸盐酸盐 0.4g，焦磷酸铁 0.25g，分装于灭菌后的离心管中备用。

4.2 采样吸收液二

取酵母浸出粉 12g 溶解于 10000ml 蒸馏水中，121℃ 下高压灭菌 15min，分装于灭菌后的离心管中备用。

5 实验流程：

5.1 将采样吸收液

20ml 倒入微生物气溶胶采样器中，然后用吸管加入矿物油 1 滴。将微生物气溶胶浓缩器与微生物气溶胶采样器连接，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。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 1.08m³；将采样吸收液二 20ml 倒入微生物气溶胶采样器中，然后用吸管加入矿物油 1 滴，在相同采样点重复上述步骤。采集的样品直接送实验室分析检测。

5.2 样品的酸处理

对采样后的吸收液一和吸收液二原液各取 1ml，分别加入盐酸氯化钾溶液充分混合，调 pH 至 2.2，静置 15min。在酸处理后的两种样品中分别加入 1mol/L 氢氧化钾溶液，中和至 pH 为 6.9，各取悬液 0.2ml 分别接种 GVPC 平板。将接种平板静置于浓度为 5%、温度为 36℃ 的 CO₂ 培养箱中，孵育 10 天。

5.3 标准菌株与实际样品的培养

本试验选取广东环凯生物科技有限公司生产的嗜肺军团菌标准菌株（标准菌株编号为 GDMCC1.1266 ATCC33152）与实验室实际样品 23020378GW0101、23020378GW0201、23020378GW0301 共同培养，以证实本实验室具备检测该种菌株的能力。

5.4 菌落的观察与验证

从孵育的第三天开始观察菌落。军团菌的颜色多样，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。

从平皿上挑取 2 个可疑菌落，接种 BCYE 琼脂平板和 L- 半光氨酸缺失的 BCYE 琼脂平板，36℃ 培养 2 天，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。

5.5 菌型确定

5.5.1 生化试验

将标准菌株平板上生长的新鲜菌苔用 0.85% 无菌生理盐水稀释至 10⁸cfu/ml 的菌悬液。

葡萄糖、乳糖及麦芽糖：分别取 2 滴菌悬液分别加入上述西林瓶内 37℃ 培养 18-24h 后观察颜色变化。

硝酸盐：分别取 2 滴菌悬液分别加入硝酸盐生化反应西林瓶中，37℃ 培养 18-24h 后，加入硝酸盐还原试剂甲、乙液各 2 滴，混匀，立即观察结果。

尿素：先向尿素西林瓶中加入 1.5ml 无菌水，充分溶解。再用接种针挑取新鲜菌苔直接接种于西林瓶内。接种后，置于 35-37 摄氏度培养箱中培养 12-24h，观察结果。

明胶：用接种针挑取新鲜军团菌穿刺接种，37℃ 培养后置 4℃ 冰箱中 10 分钟后观察结果。

马尿酸：用接种环挑取 3-4 环菌苔接种后，35-37℃ 培养箱中培养 24h 后，加入茚三酮试剂 0.2ml 观察结果。

5.6 结果报告

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，即该采样点嗜肺军团菌阳性，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，

即该区域中嗜肺军团菌阳性。

本公司于 2023 年 2 月 14-21 日，完全按照标准 GB/T 18204.3-2013（5）要求开展了公共场所空气中实际样品中嗜肺军团菌以及嗜肺军团菌标准菌株的测定，通过培养广东环凯微生物科技有限公司生产的嗜肺军团菌标准菌株（标准菌株编号为 GDMCC1.1266 ATCC33152），标准菌株生长正常，从孵育的第三天开始观察菌落。军团菌的主要呈白色、灰色；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。

生化试验：分别从培养标准菌株和培养实际样品的 GVPC 平板上挑取菌落，分别进行葡萄糖、乳糖、麦芽糖、

硝酸盐还原、尿素、明胶、马尿酸盐等生化试验，其结果见表 3 和表 4。

生化试验结果与产品说明书上对嗜肺军团菌阳性菌株的描述一致，即可认为本次嗜肺军团菌标准菌株测试一切正常。

血清学试验：血清学多价分型试剂与标准菌株培养平板上的菌悬液产生凝集反应，因而能确定该标准菌株的抗原为阳性；血清学多价分型试剂与实际样品 23020378GW0101-23020378GW0301 中的菌悬液均不产生凝集反应，因而能确定该实际样品 23020470GW0101 中未检出嗜肺军团菌。见附件 5。

表 3 标准菌株的生化反应结果：

生化反应类型	反应结果	典型嗜肺军团菌应有的生化反应结果结果	结果判定
葡萄糖	-	葡萄糖 -	符合生化反应特征
乳糖	-	乳糖 -	符合生化反应特征
麦芽糖	-	麦芽糖 -	符合生化反应特征
硝酸盐还原	-	硝酸盐还原 -	符合生化反应特征
尿素	-	尿素 -	符合生化反应特征
明胶	+	明胶 +	符合生化反应特征
马尿酸盐	+	马尿酸盐 +	符合生化反应特征

备注：1、“+、-”表示嗜肺军团菌的典型菌落生化反应为阴性或阳性；
2、如“葡萄糖 -”表示葡萄糖生化反应应为阴性，“明胶 +”表示明胶生化反应应为阳性。

表 4 实际样品的生化反应结果：

生化反应类型	反应结果	典型嗜肺军团菌应有的生化反应结果结果	结果判定
葡萄糖	+	葡萄糖 -	不符合生化反应特征
乳糖	+	乳糖 -	不符合生化反应特征
麦芽糖	+	麦芽糖 -	不符合生化反应特征
硝酸盐还原	+	硝酸盐还原 -	不符合生化反应特征
尿素	+	尿素 -	不符合生化反应特征
明胶	-	明胶 +	不符合生化反应特征
马尿酸盐	-	马尿酸盐 +	不符合生化反应特征

备注：1、“+、-”表示嗜肺军团菌的典型菌落生化反应为阴性或阳性；
2、如“葡萄糖 -”表示葡萄糖生化反应应为阴性，“明胶 +”表示明胶生化反应应为阳性。

6 结论

本次实验检测所用试剂均在有效期内、仪器设备均在检定有效期内，所得实验结果尤其是标准菌株的实验结果与生化鉴定说明书一致。本次实验是我公司在 2023 年基于《公共场所卫生检验方法第 5 部分：集中空调通风系统》（GB/T18204.5-2013）对于微生物领域检测的一次尝试，实验在一定程度上证明了我公司具备进行微生物检测的能力。实验结果为我公司立足环境监测领域，充分发挥自身专业能力和

素养与其他领域交叉融合发展打下了坚实的基础。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会.公共场所卫生检验方法第5部分：集中空调通风系统[Z].2013-12-31
[2] 沈萍,陈向东.微生物学实验(第5版)[M].高等教育出版社出版,2018
[3] 刘云国.食品卫生微生物学标准鉴定图谱[M].科学出版社, 2009
[4] 纪绍梅.微生物培养基质控与图解[M].北京科学技术出版社 2006