

建筑科学研究报告

REPORT OF BUILDING RESEARCH

1988

No. 04

Ⅱ级—A型生物安全工作台的研制

Advanced Development of a Biological Safety Cabinet

中国建筑科学研究院
CHINESE ACADEMY OF BUILDING RESEARCH

提 要

Ⅱ级A型生物安全工作台是一种局部防护设施,其通风设计应能保护人体和实验用材料不受室内空气污染,工作台的特点是有一个前开口,并在此处有一股内向气流,以保护人体和经过高效过滤器过滤后的大量循环空气以保护研究材料。工作台排出的气体是高效过滤器(HEPA)过滤的。

Ⅱ级A型生物安全工作台有一个固定尺寸的工作开口,由于设计提供的循环风量占总风量的70%,故通过此工作开口的内向气流计算平均最小面风速必须是0.38米/秒。A型工作台不能用于可燃性溶剂、有毒试剂或放射性物质。

Ⅱ级A型工作台适用于国家疾病控制中心所规定的1、2类和3类病源体,低度和中度危险的肿瘤病毒,以及要求 $P_1 \sim P_3$ 人体防护的遗传子改编等科学实验工作。

本文介绍了Ⅱ级A型工作台的设计原理、构造以及实验方法,实验结果表明其性能是先进的。

参 加 单 位 及 主 要 人 员

中国建筑科学研究院空气调节研究所

李贵文、朱培康

中国科学院北京建筑设计院

钟延冠

中国科学院遗传研究所

彭德兴

安徽省蚌埠净化设备厂

王克健等

执 笔 李贵文、朱培康

本项目得到了中国军事医学科学院戴景林、于玺华同志大力帮助和中国科学院遗传研究所841组同志的热情支援。

Advanced Development of a Biological Safety Cabinet

Institute of Air Conditioning, Chinese Academy of Building Research

Institute of Architectural Design, Chinese Academy of Sciences

Institute of Genepics, Chinese Academy of Sciences

An Hui BangBu Cleaning Equipment Plant

Abstract

A class II, Type A cabinet is a localized protection, protecting personnel and research materials against ubiquitous contaminants in room air. The cabinet features an open front with inward air flow for personnel protection and HEPA-filtered, recirculated mass air flow for protection of research materials. The cabinet exhaust is filtered through a HEPA filter.

A class II, Type A cabinet has a fixed-size work opening. The calculated air velocity through the work opening must have a minimum average value of 0.38m/s. Because the design provides for recirculation of about 70% of the total cabinet air, the Type A cabinet should not be used with flammable solvents, toxic agents or radioactive materials.

The class II, Type A cabinet is suitable for research work with CDC classes of etiologic agents 1, 2, and 3; low and moderate risk oncogenic viruses; and recombinant DNA materials requiring physical containment levels $P_1 \sim P_3$.

In this paper the design, construction and experimental methods of the class II, Type A cabinet are introduced. Experimental results show that the performances of this cabinet are excellent.

目 录

一、生物隔离设备的分类.....	(1)
二、Ⅱ级A型生物安全工作台的工作原理和组成.....	(3)
三、性能测试.....	(5)
四、对人、产品及交叉污染(生物)的保护试验.....	(12)
五、结 论.....	(16)
附 录 性能试验比较表.....	(18)

Ⅱ级—A型生物安全工作台的研制

各种类型的生物安全工作台（国外称生物安全柜）是在处理危险性细菌、病毒的实验加工过程中保护操作者不被毒害，和保护所加工的物质不被其它杂质污染，即保证生物安全操作的生物隔离设备中的一种新的机械设备，在进行改编DNA（脱氧核糖酸）分子以及危害人体的微生物等实验中，世界各国都规定它是一种必备的机电设备。最近我们研制的这一设备，正是为了满足有关科研、微生物制品、医疗卫生等部门的需要。

一、生物隔离设备的分类

所谓生物隔离，其对象有三：（1）一般病原体；（2）肿瘤病毒；（3）改编遗传子。对此，美国中央病院（CDC—Center for Disease Control）、美国国立癌症研究所（NCI—National Cancer Institute）、美国国立卫生研究所（NIH—National Institute of Health）分别对一般病原体、肿瘤病毒，改编遗传子进行了危险度分类。它们的大致对应关系如表1。日本国立预防卫生研究所也对危险度进行了划分，如表2。

危险度分类对应关系 表1

一般病原体 (CDC)	肿瘤病毒 (NCI)	改编遗传子 (NIH)
1 级		P ₁
2 级	低危险度	P ₂
3 级	中危险度	P ₃
4 级	高危险度	P ₄
5 级		
6 级		

危险度分类表（日本）

表2

序号	定 义	病 毒	细 菌	寄 生 虫
1	认为几乎没有危险性，适宜实习用和生物控制用	噬菌体 小儿麻痹（弱毒）	枯草菌灵菌 抗酸菌	丝状虫类
2a	几乎没有实验感染的机会，极少发病，即使发病，症状很轻	流行性感冒		
2b	以通常的微生物操作程序，可防止实验室感染。反之即使感染，发病的可能性非常小	麻疹、风疹 小儿麻痹		
3a	实验感染的机会少。即使感染，多数限于轻症，得重症的也可能有，但愈后一般良好	日本脑炎 登革热 霍乱	破伤风菌 肉毒杆菌 霍乱	赤痢阿米巴
3b	实验室感染的机会较多。感染时有得重症的可能性，靠有效的预防可防止实验室感染，日本国内不常有	肝炎（A、B型） 麻疹伤寒Q热	鼠疫菌 结核菌	
4a	实验室感染机会多，感染时有时也因重症而致命。用有效的预防法，可先使实验者免疫	天 花		
4b	实验室感染机会多，且感染时有因重症而致命的可能性，缺少有效的预防方法	病毒性急性热传染病 马尔堡氏热		

关于危险度分类标准各国不完全一样。根据各领域中使用的病毒,细菌等致害程度而有所不同。根据不同分类采取相应措施并制定各类危险度的设备标准。例如在改编遗传子领域中最为常用的P₁级实验室,各国设备标准见表3。

各国 P₁ 级实验室设备标准

表 3

	美	英	德	法
建筑物隔离、建筑物的位置(与公共区隔离)	0	0	0	0
限制进入方式	气闸、二重门、利用走廊	—	利用二重门、前室	同 类
闲人莫入	0	0	0	0
气 闸	—	简单结构	—	—
空调负压	—	7 毫米水柱	0 附警报装置	—
一定方向气流	0	0	0	0
排气灭菌	仅采用回风时	高效过滤器	细菌通不过的过滤器	高效过滤器
实验室灭菌消毒	表面消毒为主	封闭灭菌(气体灭菌)	封闭灭菌(气体灭菌)	表面消毒
排水灭菌	—	0	(室内设有上水道时)	—
建筑材料	适于表面消毒	—	—	适于表面消毒
设备: I 级安全工作台 高压灭菌器 两面高压灭菌器	气溶胶发生实验 尽量设于室内 —	安 全 罩 — 任 意	— —	气溶胶发生实验 — 0

目前国外对生物安全工作台的分类基本相同。产品型号及主要技术参数相互沿用,现将美国NIH对生物安全工作台分类列于表4,结构原理见图1。其中具有代表性的,用途较广的是II级A型生物安全工作台。II级生物安全工作台又分为A、B两种型号,现将其不同点列入表5。

生物安全工作台分类 (NIH)

表 4

分 类	操作口封闭程度	面板开口结构	危 险 度			防 护 对 象
			肿瘤病毒	一般病原体	改编DNA	
I	部分的	开 放 式	低、中	1~3	P ₁ ~P ₃	使 用 者
I—A	部分的	开放固定式	低、中	1~3	P ₁ ~P ₃	使用者和制品
I—B	部分的	开放滑动式	低、中	1~3	P ₁ ~P ₃	使用者和制品
II	完 全	密 闭 式	低、中、高	1~4	P ₁ ~P ₄	使用者第一,有时也对产品

II—A、II—B型生物安全工作台比较表

表 5

序 号	项 目	I—A型	I—B型
1	前面开口吸入风速	0.375米/秒以上	0.5米/秒以上
2	排 风 量	处理风量30%排走	处理风量70%排走
3	送风气流	空气层流	湍 流
4	前 面 板	开启固定式	开放滑动式
5	50毫米水柱检漏	要素检漏试验	因为箱内为负压,不要要素检漏试验

鉴于目前国内这一领域的研究实验技术尚属新兴,与其相应的安全措施及设备尚无统一标准,主要还是参照或沿用国外资料,再加上考虑到与国外同类产品便于比较,我们在研制时直接参照国外同类产品技术要求,性能检测也力求用相同方法(如实验装置、方法、评价),并以美国国家卫生基金会(NSF)标准№49的规定作为主要依据。

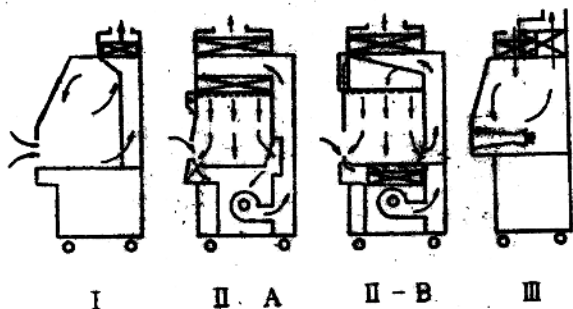


图1 生物安全工作台原理图

二、Ⅱ级A型生物安全工作台工作原理和组成

1. Ⅱ级A型生物安全工作台由完全层流造成的气流并使操作区保持洁净度为100级(≥ 0.5 微米的尘粒3.5个/升)的完全无菌无尘状态。它有一个前开口,在前开口形成一道气幕,既阻止污染粒子从柜内飞出,也阻止柜外污染粒子进入操作区,确保制品和人的安全,气幕构成:(1)未经过滤的房间空气进入操作口就被吸入操作平台前沿的吸风格栅,向内气流速度约为0.375米/秒。(2)经高效过滤器的空气通过台顶的均压孔板往下送至操作区,其中由台前区回风口吸回的部分空气(是总风量的70%)亦形成气幕阻止室内污染的空气经前开口进入操作区。另30%的风量经台后回风口吸回,经排气过滤器排至工作台外。详见图2。

2. 工作台有足够的整体性,台面振幅不大于5微米。噪声不大于65分贝(A声级)并有足够照度。工作台所用材料应耐磨耐压、耐气体,液体,清洗剂、去污剂和工作过程中的腐蚀,结构便于清洗消毒。因此操作箱内表面全部采用不锈钢板,拐角处作成圆角,台底设可调支脚和橡胶轮以便移动。其外形见图3。

3. 设备选择:

(1) 循环风量。操作区横断面积 1150×600 毫米,设计风速0.4米/秒,循环风量

$$L_{\text{循}} = 3600 \times 1.15 \times 0.6 \times 0.4 = 993.6$$

(米³/时)

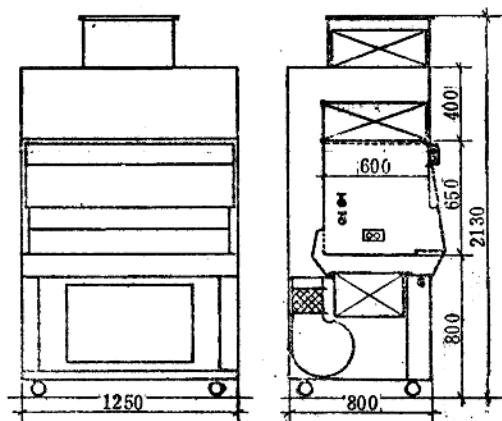


图2 Ⅱ级A型生物安全工作台

(2) 排风量(即从操作区前开口进入台内的风量)。操作区前开口面积 1150×200 毫米,设计风速0.4米/秒,排风量

$$L_{\text{排}} = 3600 \times 1.15 \times 0.25 \times 0.4 = 414 \text{ (米}^3\text{/时)}$$

(3) 高效过滤器。送风选用两台尺寸为 $570 \times 550 \times 220$ 毫米的高效过滤器,排风选用一台尺寸为 $570 \times 460 \times 220$ 毫米的高效过滤器,高效过滤器的性能参数见表6及图4。

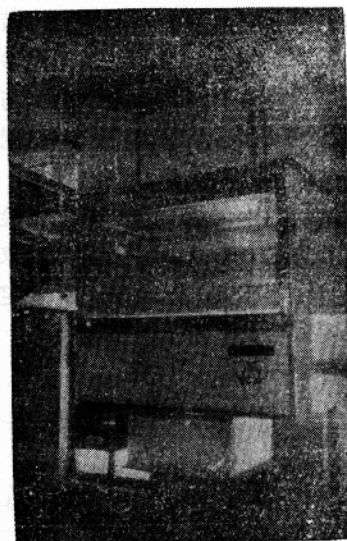
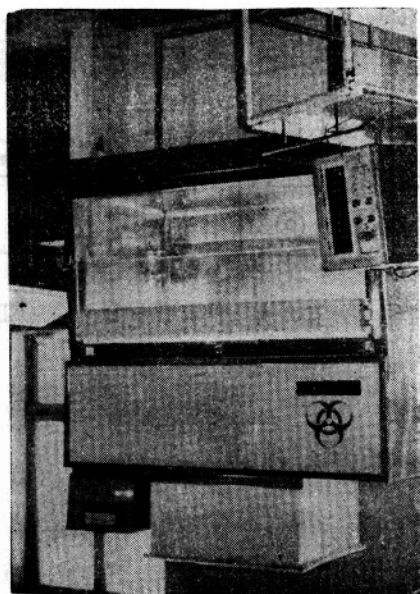


图3 生物安全工作台外形图片

高效过滤器过滤效率测定结果

表 6

外形尺寸 (毫米)	风 量 (米 ³ /时)	油 雾 效 率 (%)	备 注
570 × 550 × 220	500	99.9998	1. 仪器: J—674型光电浊度计。 2. 油雾浓度: 200~300毫米/米 ³ 。 3. 系统最小风量为125米 ³ /时。
	125	99.9995	
570 × 460 × 220	370	99.9998	
	125	99.9993	

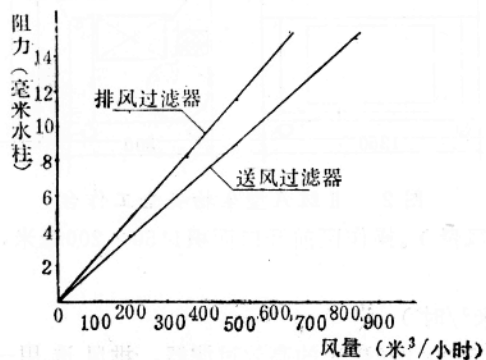


图4 高效过滤器风量阻力曲线

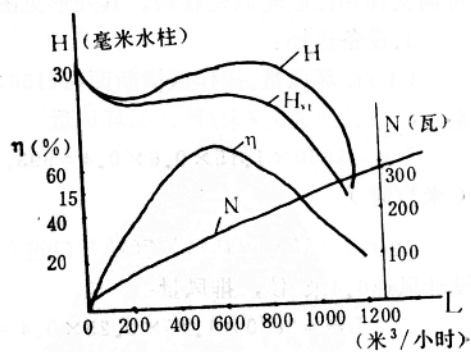


图5 1#单进(叶宽100毫米)离心通风
机性能曲线

由图4可知,送、排风高效过滤器的风量为500米³/时和400米³/时的阻力分别为9毫米水柱和9.3毫米水柱。

(4)预过滤器选用厚10毫米的无纺布为滤料,做成波形状。当风量为1400米³/时,其阻力为14毫米水柱。过滤效率见表7。

预过滤器的大气尘计数效率

表7

风量 (米 ³ /时)	粒径 (μ)	含尘浓度(粒/升)		效率 (%)	备 注
		滤 前	滤 后		
1500	≥0.5	55298	47550	15	测试仪器 Y091型粒子计数器
	≥1.0	13296	8362	35	

(5)风机。

风量: $L = L_{\text{循}} + L_{\text{排}} = 994 + 414 = 1408$ (米³/时)

系统阻力: $H_{\text{高}} = 9.3$ (毫米水柱), $H_{\text{预}} = 14.0$ (毫米水柱)

工作台结构阻力: $H_{\text{结}} = 4$ (毫米水柱)

$H_{\text{系}} = H_{\text{高}} + H_{\text{预}} + H_{\text{结}} = 9.3 + 14 + 4 = 27.3$ (毫米水柱)

选用两台叶轮宽100毫米的1*单进小型多翼前向离心通风机,两台风机由一台电机带动,风机性能见图5。

电机选用J₃型振器减振。风机出口和箱体采用软接头联接。

(6)其他。台前设置30瓦日光灯管两支,台内设置3/8英寸铜制球形阀两个以~~及~~220V、5A的电插座两个。

(7)回风口。回风口为条状,布置在操作区后壁下侧及台前,宽150毫米,用不锈钢板冲制而成,其开孔比为50%。回风口面积 $2 \times 1150 \times 150$ 毫米,回风口风速

$$v_{\text{回}} = \frac{1400}{3600 \times 2 \times 1.15 \times 0.15 \times 0.5} = 2.25 \text{ (米/秒)}$$

三、性能测试

1、肥皂泡、卤素渗漏试验

(1)本试验是在生物安全工作台的外表面上进行,以便确定焊接、垫圈以及整个台体是否漏气。

(2)把工作台准备成一个封闭系统。把它的前窗开口、排风口用钢板堵死(亦可用塑料薄膜和胶带),将所有阀门关紧。

(3)将台上的一个阀门接压缩机,另一个阀门接斜管微压计。

(4)用压缩机将台内加压到50毫米水柱压力之后关闭压缩机。

在30分钟内压力降不应超过10% (5毫米),如超过则沿工作台气室的外表面上的焊缝、垫圈、穿管处等边刷上肥皂液,检查是否有将肥皂液吹开或形成皂泡,发现有漏处,即采取措施将漏堵住。检测时曾在排气口、前盖板的垫圈处发现有漏,将螺母拧紧后即不漏了。其他再也没有发现有漏处。再次用压缩机将台内空气加到50毫米水柱后,停止所有动

力, 对压力、温度进行测定, 测定结果见表 8。

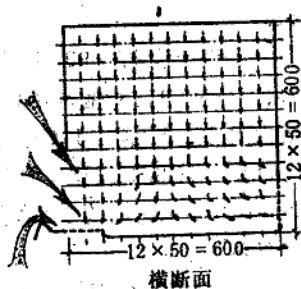
由表 8 可知, 加压至 50 毫米水柱, 经过 48 分钟, 箱体压力变化甚微 (在允许范围内)。

(5) 将台内压力释放掉, 改用氟里昂 (F_{12}) 钢瓶将试验区压到 50 毫米水柱 (做此试验时, 室内禁止吸烟, 室内空气运动要减少到最小程度, 试验前先用卤素渗漏仪检测室内空气, 确认室内空气中无卤素污染时才开始进行试验)。用灵敏度为 0.5 克/年的卤素检漏仪进行检测, 探头距试验区表面约 10 毫米, 大约以 10 毫米/秒速度沿台的焊接接头、设备穿孔、垫圈处的上方巡检, 若表头指针摆动, 即该处有漏。本试验仅在阀门处有一处表头指针摆动, 用 704 硅橡胶涂后, 漏洞随即堵住。因此, 说明此台为有渗漏, 若有漏, 其渗漏量也小于 0.5 克/年。

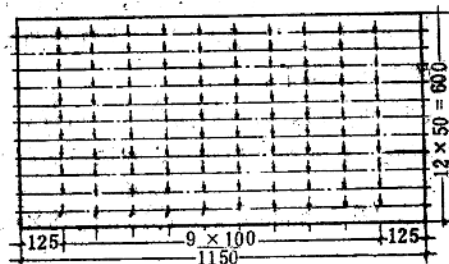
空气打压测定结果 表 8

时 间	室 温 ($^{\circ}C$)	读值 (毫米水柱)	正压值 (毫米水柱)
8:12	29.0	99	49.5
8:20	29.0	99	49.5
8:30	29.0	99	49.5
8:40	29.0	99	49.5
8:50	29.1	100	50.0
8:53	29.1	100	50.0
4:00	29.1	100	50.0

注: 斜管微压计的比例选用 1/2。



横断面



纵断面

图 6 气流流型图

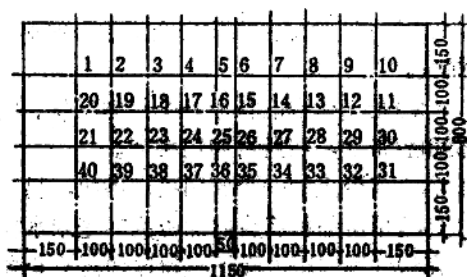


图 7 速度场测点布置图

2. 高效过滤器的检测

(1) 高效过滤器在出厂前已检漏, 本试验主要检查高效过滤器的封头胶及安装边框经运输后是否有渗漏。

(2) 在回风口燃巴兰香三支, 台内的含尘浓度约为 100000 粒/升。

(3) 用 J-75 型粒子计数器的采样管头约距过滤器表面 10 毫米, 以大约 10 毫米/秒的速度沿高效过滤器封头胶及压框边缘巡检, 当出现 0.5 μm 粒子时即用 704 硅橡胶进行堵漏, 直到不出现为止。

3. 气流组织

气流流型采用单丝线和巴兰香进行观察记录, 测定结果见图 6。

由图 6 横断面图可见, 台内气流垂直平行, 在接近台面处, 气流转向回风口, 气流分界面在距台壁 330 毫米处。台外接近台口的气流, 用巴兰香可明显的看到烟气流流向台内,

$$v_{表} = \frac{445}{3600 \times 0.25 \times 1.15} = 0.43 \text{ (米/秒)}$$

5. 洁 净 度

台内洁净度测点布置见图9。台内洁净度达到100级要求，测定结果见表11—1、11—2。室内含尘浓度测定结果见表12。

排气高效过滤器出口的洁净度测点布置见图10。洁净度达到100级要求测定结果见表13。

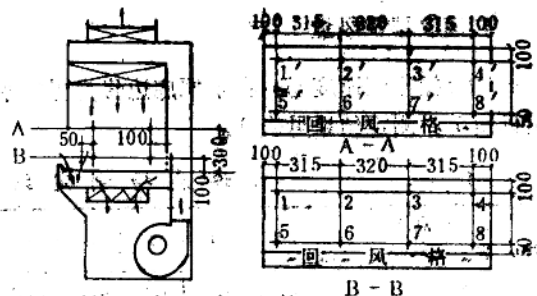


图9 台内洁净度测点布置示意图

台内洁净度测定结果(标高100毫米)

表11—1

测点号	流 量 (毫升/秒)	时 间 (秒)	采 样 量 (升)	含 尘 浓 度 (粒/升)				清 净 度 (粒/升) (≥0.5μm的颗粒数)
				≥0.3	≥0.5	≥1.0	≥5.0	
1	5	200	1	0	0	0	0	0
	5	200	1	0	0	0	0	
	5	200	1	0	0	0	0	
2	5	200	1	0	0	0	0	0
	5	200	1	0	0	0	0	
	5	200	1	0	0	0	0	
3	5	200	1	0	0	0	0	0
	5	200	1	0	0	0	0	
	5	200	1	0	0	0	0	
4	5	200	1	0	0	0	0	0
	5	200	1	0	0	0	0	
	5	200	1	0	0	0	0	
5	5	200	1	0	0	0	0	0
	5	200	1	0	0	0	0	
	5	200	1	0	0	0	0	
6	5	200	1	0	0	0	0	0.33
	5	200	1	1	1	1	0	
	5	200	1	0	0	0	0	
7	5	200	1	0	0	0	0	0
	5	200	1	0	0	0	0	
	5	200	1	0	0	0	0	
8	5	200	1	0	0	0	0	0
	5	200	1	0	0	0	0	
	5	200	1	0	0	0	0	

台内洁净度测定结果(标高300毫米)

续表11-2

测点号	流量 (毫升/秒)	时间 (秒)	采样量 (升)	含尘浓度(粒/升)				洁净度(粒/升) (≥0.5μm的颗粒数)
				≥0.3	≥0.5	≥1.0	≥5.0	
1'	5	200	1	0	0	0	0	0
	5	200	1	0	0	0	0	
	5	200	1	0	0	0	0	
2'	5	200	1	0	0	0	0	0
	5	200	1	0	0	0	0	
	5	200	1	0	0	0	0	
3'	5	200	1	0	0	0	0	0
	5	200	1	0	0	0	0	
	5	200	1	0	0	0	0	
4'	5	200	1	0	0	0	0	0
	5	200	1	1	0	0	0	
	5	200	1	0	0	0	0	
5'	5	200	1	0	0	0	0	0
	5	200	1	0	0	0	0	
	5	200	1	0	0	0	0	
6'	5	200	1	0	0	0	0	0
	5	200	1	0	0	0	0	
	5	200	1	0	0	0	0	
7'	5	200	1	0	0	0	0	0
	5	200	1	0	0	0	0	
	5	200	1	0	0	0	0	
8'	5	200	1	0	0	0	0	0
	5	200	1	0	0	0	0	
	5	200	1	0	0	0	0	

室内含尘浓度测定结果

表12

测定次数	流量 (毫升/秒)	时间 (秒)	采样量 (升)	含尘浓度(粒/升)				室内含尘浓度(粒/升)
				≥0.3	≥0.5	≥1.0	≥5.0	
1	5	20	0.1	80780	10000	1510	9.0	13620
2	5	20	0.1	82540	14350	1450	10	
3	5	20	0.1	87890	13800	1350	10	

测点号	流量 (毫升/秒)	时间 (秒)	采样量 (升)	含尘浓度 (粒/升)				洁净度 (粒/升) ($\geq 0.5\mu$ 的颗粒数)
				≥ 0.3	≥ 0.5	≥ 1.0	≥ 5.0	
1	5	200	1	15	0	0	0	0
	5	200	1	4	0	0	0	
	5	200	1	6	0	0	0	
2	5	200	1	1	1	1	0	0.33
	5	200	1	0	0	0	0	
	5	200	1	0	0	0	0	
3	5	200	1	1	0	0	0	0
	5	200	1	0	0	0	0	
	5	200	1	0	0	0	0	
4	5	200	1	8	0	0	0	0
	5	200	1	1	0	0	0	
	5	200	1	1	0	0	0	
5	5	200	1	2	0	0	0	0
	5	200	1	0	0	0	0	
	5	200	1	1	0	0	0	

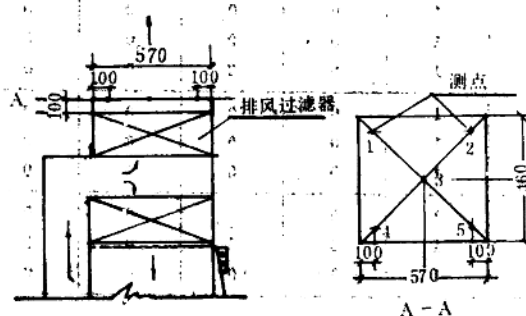


图10 排气高效过滤器出口洁净度测点示意图

照度的测点布置及测定结果见图11

勒克司							
310	370	420	430	415	370	315	
150	150	150	150	150	150	150	150

图11 照度测定结果 平均照度375.5勒克司
单个测点照度310~430勒克司

平均照度为375.7勒克司，单个测点处照度为310~430勒克司。

7. 振 动

振动是在照明、风机全开时进行测定，测定结果见表14。

8. 噪 声

测定是在台内风机及照明灯全开的条件下进行。测定结果见表15。

振动测定结果 表14

测 点 位 置		振幅(微米)
垂 直	工作面的几何中点处	4
水 平	工作面前边缘的中点处	1
	工作面边缘的中点处	1

噪 声 测 定 结 果 表15

测 点 位 置	噪声(分贝)		
	A	B	C
台前300毫米，工作面中心上方381毫米点处	60	64	66
台前1000毫米，工作面中心上方381毫米点处	57	60	63
本 底 噪 声	33	33.5	38

9. 温 升

本试验目的是确定当风机、照明灯全开动时台内的最大温升。把一支1/10分度的干球温度计挂在台外距前面工作开口中心上流的76毫米处，以测量周围温度。把另一支1/10分度干球温度计挂在台上工作面中心上方的305毫米处，以测量台内的温度。在照明灯及风机全开动情况下，温升测定结果见表16。

运行了6小时零5分钟，台内温升2.4℃。

温 升 测 定 结 果 表16

测 定 时 间	台内温度 (°C)	周围温度 (°C)
8 : 30	28.2	28.6
10 : 45	30.3	28.6
14 : 35	30.6	29.5

10. 稳定性试验

为了便于搬运，台底设置了四个可转动的胶轮，当台子就位后可调节四个支脚的高度，以保证台子牢固、稳定地就位在固定地点。台子固定后，当用力在台后部及左、右边的顶部推时，台子有良好的稳定性。在工作面中心处施加和撤走22.7公斤(254×254毫米)荷载后，工作面不发生永久性变形。

从以上测定结果可以看出，台内的气流不能外溢，台外的气流进不到台内的操作区。台内操作区的气流为均匀的垂直平行流，不会形成交叉污染。台内洁净度达到了100级。台体有良好的稳定性，其振动、噪声、温升等性能全达到了设计的要求。但此台主要用于微生物的试验，为了考核其实际使用效果，我们又以枯草芽孢杆菌作为尘源进行了对人、产品及生物交叉污染的保护试验。

四、对人、产品及交叉污染(生物)的保护试验

1. 实验材料和方法

(1) 实验菌株: 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus Subtilis*) ki—2—132Smr (抗链霉素菌株)。

(2) 培养基及孢子液的制备:

① 肉汤培养基: 牛肉膏 1%, 蛋白 1%, 酵母膏 0.3%, 氯化钠 0.5%, PH7.2, 121℃ 灭菌 30 分钟。如需固体培养基则加入 1.5% 的琼脂。

② 0.005M 磷酸缓冲液, 保存芽孢用: KH_2PO_4 0.184g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.307g, 蒸馏水 1000ml, PH7.2, 121℃ 灭菌 30 分钟。

③ 无菌稀释液: 明胶 2g, Na_2HPO_4 4g, 蒸馏水 1000ml, PH7.2, 121℃ 灭菌 30 分钟。

④ 孢子液的制备: 将少量已活化的细菌接入装有 1000ml 肉汤培养基的 500ml 三角瓶内, 37℃ 摇床振荡培养 24 或 36 小时, 取样涂片镜检观察孢子是否符合要求, 将菌液瓶放入 48℃ 恒温水浴中, 保温 24 小时, 促使细菌孢子迅速游离出来, 再放入 65℃ 水浴中灭活 30 分钟, 杀灭营养细胞。将菌液置于 K₁₀ 型冷冻离心机离心 4000 转/分, 20 分钟, 去掉上清液加入等体积 0.005M 磷酸缓冲液, 重新再次离心 (速度同上) 洗涤沉淀一次, 再加入 0.005M 磷酸缓冲液, 按离心前菌体溶液的十分之一体积, 使其悬浮均匀, 放于冰箱中保存备用。

⑤ 含链霉素肉汤琼脂培养基的制备: 将链霉素加入肉汤琼脂培养基, 使其最终浓度为 50μg/ml。将此培养基倒入 90×15 毫米的培养皿内, 待凝固后实验时用。

⑥ 喷雾时用的孢子液配制: 首先用稀释计数法, 测定孢子液浓度。根据计算结果, 配制出当天所用的菌浓度和用量, 备好后放入冰箱待用。作完实验后再次进行计数, 校正当天喷雾时所用的孢子浓度, 得出配制孢子的准确数据。

⑦ 发菌喷雾装置: 发菌选用医用喷雾器, 喷嘴内径 0.4 毫米。根据所喷菌液的浓度不同, 将喷雾压力调至 0.14~0.22 公斤/厘米², 使喷雾量控制在每分钟 0.2 毫升。喷雾装置见图 12。

在实验前先用无菌稀释液倒入喷雾器中洗雾 2~3 次, 然后再将已配制好的菌液倒入喷雾器中开始正式试验。

2. 实验结果

(1) 生物安全工作台内和室内空白对照:

在未发菌前先作台内和室内的带菌情况实验。实验室内先开紫外线灯杀菌一小时, 工作台开机自净 30 分钟, 然后将营养培养皿放在工作台面和室内的五个不同位置 (培养皿位置见图 13), 打开盖放 30 分钟后将培养皿盖好, 置 37℃ 保温 40 小时观察实验结果。三次实验结果见表 17。实验结果证明台内清洁无菌, 室内第 I 次无菌, 第 II、第 III 次室内的 1 号培养皿内各有一个菌落, 说明室内已在第 I 次实验发菌时被污染了。

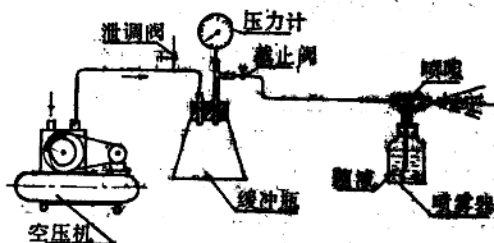


图 12 喷雾器装置示意图

(2) 排气高效过滤器的滤菌效果:

排风高效过滤器能否滤阻细菌, 这是关系到对环境污染的重要问题, 为此我们作了四次实验, 共18个平皿, 最长采样时间为六小时。试验是将制备好的营养培养基皿开盖扣在台外顶部风口处, 在生物安全工作台内喷射大量细菌, 最高浓度多达几亿到百亿个细菌。分别在不同时间取样后放37℃温室内培养40小时, 观察结果列于表18, 没有任何平皿长菌落。

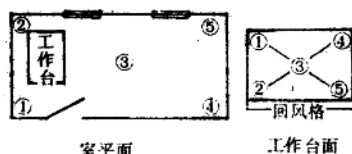


图13 空白对照培养基布点示意图

空白对照实验结果 表17

实验次数	培养基号	台内每皿菌数 (个)	室内每皿菌数 (个)
I	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0
	5	0	0
II	1	0	1
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0
	5	0	0

排风高效过滤器出口处菌落数 表18

时间次数	5°	10°	15°	20°	25°	30°	2小时	5小时	6小时
I	0	0	0	0	0	0			
II						0,0,0,	0,0,0,		
III								0,0,	
IV									0,0,0,0,

正常操作实验结果 表19

实验次数	测定时间 (分)	A 组		B 组	
I	5	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	15	0	0	0	0
	20	0	0	0	0
II	5	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	15	0	0	0	0
	20	0	0	0	0
III	10	0	0	0	0
	20	0	0	0	0
	30	1	0	0	0

(3) 台内正常操作:

在工作台内从事正常操作, 进行菌液的稀释计数, 检定在正常操作时是否有细菌外溢。操作人员坐在台前正中间进行操作, 在操作人员的两侧, 下侧齐台口, 距台150毫米处垂直放置营养培养基皿, 分别于不同时间取样, 将A(左侧) B(右侧) 两组平皿都在37℃下培养40小时后, 观察实验结果(见表19), 从5分钟~30分钟, 共采样44个培养基皿中只有一个细菌, 证明生物安全工作台在正常操作情况下是可靠的。

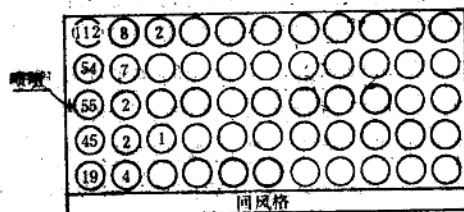
(4) 交叉污染试验:

为检验台内产生的颗粒是否会污染柜内放的其他设备特做此试验。把制备好的琼脂平皿从边墙成行排列(如图14), 将工作面成行地盖起来, 把喷雾器喷嘴置于台左端中心距台面76毫米处, 喷嘴垂直台面向上喷射5分钟, 喷菌液1毫升, 共喷菌55000个。喷雾停止后, 使工

作台继续运行15分钟，将敞开的平皿盖好在37℃下培养40小时，观察其结果列于图14。结果表明，距左边墙大于300毫米的平皿内均没有菌落。

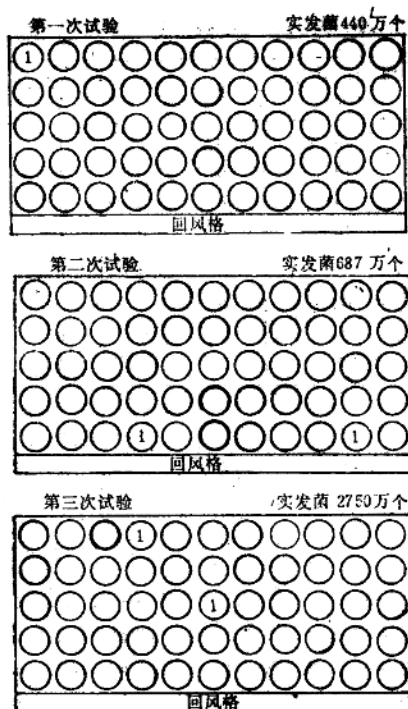
(5) 对产品的保护实验：

验证在室内细菌高度污染的条件下，对生物安全工作台内是否受到污染。将工作面用敞开的琼脂平皿全复盖上。喷雾器的喷轴平行工作面，距开口处100毫米，在工作台的两端各对另一端方向。为了模拟人臂的操作，用一根外径为63.5毫米端部封闭的不锈钢管放在工作台中心处，其一端抵在工作台后墙上，另一端通过前窗伸到房间约200毫米，钢管的轴在工作面之上70毫米（见图15）。在喷雾器下大约150毫米处放2~3个阳性取皿（当取皿内包含多于300个枯草孢子杆菌群落时，称为“阳性的”）。在



④——代表培养皿，数码即菌落数，无数数码者菌落为零。

图14 交叉污染测定结果



结果：1. 每个○代表培养平皿，数字即菌落数，无数者即为零。
2. 三次实测，菌落都未超过5个/次，阳性皿未少于300个/皿（美国NSF标准规定值）。

图16 对产品保护试验结果

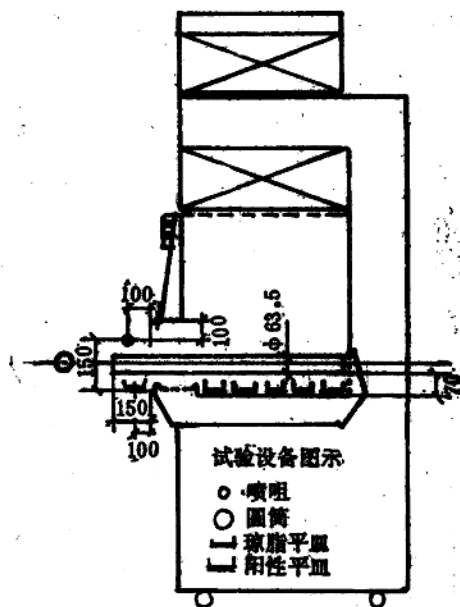


图15 对产品保护试验

两侧各喷2.5分钟后，使工作台继续运行5分钟，即将敞开的平皿盖好，并使之在37℃条件下培养40小时检测实验结果。本实验重复三次，实验结果见图16。每次实验都放置2~3个阳性皿，在所有的阳性皿中都长出了300~1000个以上的菌落。从以上三实验结果表明，在台前喷雾440万~2750万个细菌的情况下，台内仅个别皿中出现1个菌落，证明台内污染甚微（在允许范围内）。

(6) 对人的保护试验：

验证在生物安全工作台内喷雾大量细菌