

ICS
Z



中华人民共和国国家标准

GB XXXX-2006

病原微生物实验室 污染物排放标准

Discharge standard of pollutants for laboratory of pathogenic
microorganisms

(征求意见稿)

2006 - - 发布

2007 - - 实施

国家环境保护总局
国家质量监督检验检疫总局

发布

目 录

前 言	I
1 适用范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	2
4 排放限值和控制要求.....	3
4.1 污水排放限值和控制要求.....	3
4.2 废气排放限值和控制要求.....	5
4.3 固体废物和污泥控制要求.....	6
5 取样与监测.....	6
5.1 污水取样与监测.....	6
5.2 废气取样与监测.....	8
5.3 固体废物、污泥取样与监测.....	8
6 标准的实施与监督.....	9
附录 A.....	10
附录 B.....	11
附录 C.....	12
附录 D.....	17
附录 E.....	18
附录 F.....	20

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》、《中华人民共和国水污染防治法》、《中华人民共和国海洋环境保护法》、《中华人民共和国大气污染防治法》、《中华人民共和国固体废物污染环境防治法》、《中华人民共和国传染病防治法》、《中华人民共和国动物防疫法》和《病原微生物实验室生物安全管理条例》，加强对病原微生物实验室污水、废气、固体废物和污泥排放的控制和管理，预防和控制传染病的发生和流行，保障人体健康和动物安全，维护良好的生态环境，制定本标准。

本标准规定了病原微生物实验室污水、废气、固体废物和污泥排放的污染物排放限值、处理、处置与消毒要求，取样与监测和标准的实施与监督等。

本标准首次发布。

按有关法律的规定，本标准具有强制执行的效力。

本标准起草单位：北京市环境保护科学研究院、中国军事医学科学院、中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、中国动物疫病预防控制中心。

本标准国家环境保护总局 2006 年 XX 月 XX 日批准。

本标准自 XX 年 XX 月 XX 日起实施。

本标准由国家环境保护总局解释。

病原微生物实验室污染物排放标准

1 适用范围

本标准规定了病原微生物实验室污水、废气、固体废物和污泥排放的污染物控制项目及其限值，处理、处置与消毒要求，取样与监测和标准的实施与监督。

本标准适用于病原微生物实验室污水、废气、固体废物、污泥的处置和排放控制，病原微生物实验室建设项目的环境影响评价、环境保护设施设计、竣工环境保护验收及验收后的污染防治与管理。

本标准适用于法律允许的污染物排放行为，新设立病原微生物实验室的选址和特殊保护区域内现有病原微生物实验室的管理，按《中华人民共和国大气污染防治法》第十六条、《中华人民共和国水污染防治法》第二十条和第二十七条、《中华人民共和国海洋环境保护法》第三十条、《饮用水水源保护区污染防治管理规定》的相关规定执行。

2 规范性引用文件

下列标准和本标准表 6、表 8 所列分析方法标准及规范所含条文在本标准中被引用即构成本标准的条文，与本标准同效。当上述标准和规范被修订时，应使用其最新版本。

GB13554	高效空气过滤器
GB14554	恶臭污染物排放标准
GB18466	医疗机构水污染物排放标准
GB18484	危险废物焚烧污染控制标准
GB19489	实验室 生物安全通用要求
GB50346	生物安全实验室建筑技术规范

3 术语和定义

本标准采用下列术语和定义。

3.1 病原微生物 pathogenic microorganisms

指能使人或者动物致病的微生物。根据 GB19489，病原微生物对个体和群体的危害程度分为 4 级：危害等级 I（低个体危害，低群体危害）、危害等级 II（中等个体危害，有限群体危害）、危害等级 III（高个体危害，低群体危害）、危害等级 IV（高个体危害，高群体危害）。

3.2 病原微生物实验室 laboratory of pathogenic microorganisms

指从事与病原微生物菌（毒）种、样本有关的研究、教学、检测、诊断等活动的实验室。包括生物安全实验室和动物安全实验室。

根据实验室对病原微生物的生物安全防护水平，并依照实验室生物安全国家标准的规定，将实验室分为一级、二级、三级、四级，各级实验室实验对象（病原微生物）的危害程度等级分别为 I、II、III、IV 级。

3.3 高效空气过滤器 high efficiency particulate air filter (HEPA)

指 GB13554 中定义的高效空气过滤器。

3.4 污染区 contamination zone

指可能受到实验病原微生物污染风险最高的区域，包括：二级、三级、四级病原微生物的主实验室。

3.5 半污染区 semi-contamination zone

生物安全实验室中具有被病原微生物轻微污染风险的区域，是污染区和清洁区的过渡区。

3.6 清洁区 non-contamination zone

指病原微生物实验室中无被病原微生物污染风险的区域。

3.7 指示微生物 microbiological indicator

放置于适当的载体（水、空气、固体物质）中用于指示消毒灭菌或过滤除菌的效果的特定微生物。本标准特指粘质沙雷氏菌（*Serratia marcescens* ATCC.8039）、枯草芽胞杆菌黑色变种（*Bacillus subtilis* ATCC.9372）芽孢。

3.8 目标微生物 target- microorganisms

病原微生物实验室中一定时期内操作的特定微生物。

3.9 主实验室 main room

是指二级、三级、四级病原微生物实验室中污染风险最高的房间，通常是指生物安全柜或动物隔离器等所在的房间。

4 排放限值和控制要求

4.1 污水排放限值和控制要求

4.1.1 三级、四级病原微生物实验室污染区和半污染区污水，二级病原微生物主实验室污水必须按 4.1.4 的要求设置专用的灭菌设备进行消毒灭菌，达到表 1 的规定。

4.1.2 含有害污染物的污水应在实验室就地收集处理，并设置专门的采样监测点，达到表 2 的规定。

4.1.3 单位外排污水应达到表 3 的规定。其中直接或间接排入地表水体和海域的污水执行表 3 的排放标准，排入终端已建有正常运行的城镇污水处理厂的下水道污水执行表 3 的预处理标准。

表 1 污水生物学指标排放限值

序号	控制项目	限值
1	指示微生物（枯草芽胞杆菌黑色变种芽孢）	不得检出
2	目标微生物	不得检出

表 2 重金属的排放限值（日均值）

序号	控制项目	限值
1	总汞（mg/L）	0.05
2	总镉（mg/L）	0.1
3	总铬（mg/L）	1.5
4	六价铬（mg/L）	0.5
5	总砷（mg/L）	0.5
6	总铅（mg/L）	1.0

表3 单位外排口污染物排放限值（日均值）

序号	控制项目	排放标准	预处理标准
1	粪大肠菌群数（MPN/L）	500	5000
2	pH	6~9	6~9
3	化学需氧量（COD）	60	250
4	生化需氧量（BOD）	20	100
5	悬浮物（mg/L）	20	60
6	氨氮（mg/L）	15	-
7	石油类（mg/L）	5	20
8	阴离子表面活性剂（mg/L）	5	10
9	色度（稀释倍数）	30	-
10	挥发酚（mg/L）	0.5	1.0
11	总氰化物（mg/L）	0.5	0.5
12	总余氯 ¹⁾²⁾ （mg/L）（直接排入水体要求脱氯）	0.5	-

注：1）采用含氯消毒剂消毒的工艺控制要求为：

排放标准：消毒接触池的接触时间≥1h，接触池出口总余氯 3~10 mg/L。

预处理标准：消毒接触池的接触时间≥1h，接触池出口总余氯 2~8 mg/L。

2）采用其他消毒剂对余氯不作要求。

4.1.4 污水处理与消毒要求

4.1.4.1 病原微生物主实验室（三级、四级和部分二级）污水收集处理系统的设计和建造应符合 GB50346 第 6 章要求。

4.1.4.2 三级、四级病原微生物实验室污染区和半污染区的污水应通过专门的管道收集至独立的装置中进行消毒灭菌处理。灭菌装置应设置两套以供备用。

4.1.4.3 污水灭菌处理应按目标微生物的灭菌条件进行，对灭菌的工艺条件应实施在线实时监测，采用高温高压处理工艺的部分目标微生物灭菌条件与参数见附录 A。

4.1.4.4 含有特定感染因子（如疯牛病（prion））的污水应使用化学和物理消毒灭活方式联用处理。

4.1.4.5 实验室产生的低放射性污水应采用衰变池处理，其他含有毒重金属和化学品的污水可分别采用有效的物理化学处理后，再与其他污水混合进一步处理。

4.1.4.6 混合后的综合污水宜采用二级处理+消毒工艺或深度处理+消毒工艺。消毒剂可采用二氧化氯、次氯酸钠、臭氧，物理消毒可采用高温热消毒和紫外线消毒，其投加量或工艺应根据水质情况和处理要求及相关规范资料确定或通过试验确定。高温消毒后排放时应将水温降至室温。

4.2 废气排放限值和控制要求

4.2.1 三级、四级病原微生物实验室、直排式生物安全柜、动物负压隔离设备的废气必须通过高效过滤器过滤除菌，排出口生物学指标应达到表 4 的规定。

4.2.2 动物生物安全实验室和动物负压隔离设备的废气中恶臭污染物排放应达到 GB14554 的规定。

表 4 废气生物学指标排放限值

序号	控制项目	限值
1	指示微生物（粘质沙雷氏菌）	不得检出
2	目标微生物	不得检出

4.2.3 废气处理与消毒要求

4.2.3.1 病原微生物实验室气体排放系统的设计和建造应符合 GB50346 第 5 章要求。

4.2.3.2 三级病原微生物实验室排风应设置一道或两道 B 类以上高效过滤器；四级病原微生物实验室在排风口处应设置两道 B 类以上高效过滤器。

4.2.3.3 三级、四级病原微生物实验室排风系统应设置过滤器检漏口，定期由具备检测资质机构对高效过滤器和活性炭吸附装置进行现场检测。更换的高效过滤器和活性炭吸附装置应按照危险废物处理方式妥善收集，并做灭活处理。

4.2.3.4 三级、四级病原微生物室外排风口的位置应高于所在建筑屋顶 2m 以上。

4.2.3.5 三级、四级病原微生物实验室污染区和半污染区排水管上的放气口应安装高效过滤器。

4.2.3.6 动物负压隔离设备排风管道应在高效过滤器的外侧安装有效的活性炭吸附装置。

4.3 固体废物和污泥控制要求

4.3.1 三级、四级病原微生物实验室污染区和半污染区产生的固体废物和二级病原微生物实验室产生的含病原微生物的固体废物应在实验室内进行消毒灭菌处理，并经检测达到表 5 的规定后，方可移出实验室进行焚烧处理，或根据就近集中处置的原则交具备医疗废物集中处置资质的单位处置。

表 5 病原微生物实验室固废排放限值

序号	控制项目	限值
1	指示微生物（枯草芽胞杆菌黑色变种芽孢）	不得检出
2	目标微生物	不得检出

4.3.2 本单位对灭菌后固体废物进行焚烧处理时应达到 GB18484 规定。

4.3.3 污水处理站污泥清淘前应进行消毒和监测，粪大肠菌群数应达到 $\leq 100\text{MNP/g}$ 。

5 取样与监测

5.1 污水取样与监测

5.1.1 灭菌设备或灭菌罐的生物学指标取样与监测

5.1.1.1 取样点

在灭菌设备或灭菌罐采样点采样。或在设施排放口取样。

5.1.1.2 监测频率

生物学指标监测每季度监测不得少于 1 次。

5.1.2 重金属污染物取样与监测

5.1.2.1 取样

在实验室排出口取样。在排放时段内以等时间间隔采集 2~4 个样品，取均值。

5.1.2.2 监测频率

每年监测不得少于 1 次。

5.1.3 外排口污水取样与监测

5.1.3.1 取样

单位外排口取样。每 4 小时采样 1 次，一日至少采样 3 次，测定结果以日均值计。

5.1.3.2 监测频率

理化指标中 pH、总余氯每日监测不少于一次，COD 和 SS 每周监测一次，粪大肠菌群数每月监测一次，其他指标每季度监测不少于一次。

5.1.4 监测分析方法见表 6。

表 6 水污染物监测分析方法

序号	控制项目	测定方法	测定下限 (mg/L)	方法来源
1	指示微生物 (枯草芽胞杆菌黑色变种芽孢)			见附录 B
2	目标微生物	自定		
3	粪大肠菌群数	多管发酵法		GB18466
4	总余氯	N,N-二乙基-1,4-苯二胺分光光度法 N,N-二乙基-1,4-苯二胺滴定法		GB11898 GB11897
5	化学需氧量(COD)	重铬酸盐法	30	GB11914
6	生化需氧量(BOD)	稀释与接种法	2	GB7488
7	悬浮物(SS)	重量法		GB11901
8	氨氮	蒸馏和滴定法 比色法	0.2 0.05	GB7478 GB7479
9	石油类	红外光度法	0.1	GB/T16488
10	阴离子表面活性剂	亚甲蓝分光光度法	0.05	GB7494
11	色度	稀释倍数法		GB11903
12	pH 值	玻璃电极法		GB6920
13	挥发酚	蒸馏后 4-氨基安替比林分光光度法	0.002	GB7490
14	总氰化物	硝酸银滴定法 异烟酸-吡唑啉酮比色法 吡啶-巴比妥酸比色法	0.25 0.004 0.002	GB7486 GB7486 GB7486
15	总汞	冷原子吸收分光光度法 双硫腺分光光度法	0.0001 0.002	GB7468 GB7469
16	总镉	原子吸收分光光度法 (螯合萃取法) 双硫腺分光光度法	0.001 0.001	GB7475 GB7471
17	总铬	高锰酸钾氧化 - 二苯碳酰二肼分光光度法	0.004	GB7466
18	六价铬	二苯碳酰二肼分光光度法	0.004	GB7467
19	总砷	二乙基二硫代氨基甲酸银分光光度法	0.007	GB7485
20	总铅	原子吸收分光光度法 (螯合萃取法)	0.01	GB7475

序号	控制项目	测定方法	测定下限 (mg/L)	方法来源
		双硫脲分光光度法	0.01	GB7470

5.2 废气取样与监测

5.2.1 实验室、直排式生物安全柜和动物负压饲养设备废气排放取样与监测。

5.2.1.1 取样

取样点：排风管道高效过滤器后侧采检口、直排式生物安全柜排风口。

取样频率：在排放时段内以等时间间隔采集 2~4 个样品，取最大测定值。

5.2.1.2 监测频率

每年监测不得少于 1 次。

5.2.1.3 监测分析方法见表 7

表 7 废气监测分析方法

序号	项目	监测方法	方法来源
1	指示微生物（粘质沙雷氏菌）		附录 C、附录 E
2	目标微生物	自定	

5.3 固体废物、污泥取样与监测

5.3.1 固体废物灭菌效果监测

高压灭菌器的工艺条件（温度和压力）实时监测。指示微生物（枯草芽胞杆菌黑色变种芽孢）的监测每季度不得少于 1 次。

5.3.2 污泥取样和监测

污泥取样和监测参照 GB18466 进行。

5.3.3 固体废物、污泥的监测方法见表 8。

表 8 固体废物监测分析方法

序号	项目	监测方法	方法来源
1	指示微生物（枯草芽胞杆菌黑色变种芽孢）		见附录 F
2	目标微生物	自定	
3	粪大肠菌群数	多管发酵法	GB18466

6 标准的实施与监督

本标准由市级以上人民政府环境保护行政主管部门负责监督实施。

附录 A

(规范性附录)

部分目标微生物消毒灭菌条件

消毒灭菌条件	病原微生物名称
134 、30 分钟, 138 、20 分钟高温灭菌	疯牛病毒 (Prion)
121 、20 分钟压力蒸气灭菌	炭疽杆菌芽孢、枯草杆菌芽孢、结核分枝杆菌、龟分枝杆菌、甲型肝炎病毒、脊髓灰质炎病毒、真菌、乙型肝炎病毒、流感病毒

附录 B

(规范性附录)

污水中指示微生物(枯草芽胞杆菌黑色变种芽孢)监测方法

B.1 目的：用于病原微生物实验室污染区/半污染区污水的生物学检测，实验室污水收集罐排放口排出污水的消毒灭菌是否合格。

B.2 设备和材料

- 枯草芽胞杆菌黑色变种(*Bacillus subtilis* ATCC.9372)芽孢悬液：配制方法见附录 C；
- 胰大豆琼脂平皿(100×15 mm)：培养基配制方法见附录 C；
- 微孔滤膜(孔径 0.45μm，直径 47mm)和滤器；
- PBS 缓冲液：配制方法见附录 C；
- 操作人员个人防护用具：防护服、口罩等。

B.3 检测方法

- 1) 按照罐内污水终浓度 $(2 \sim 8) \times 10^4/\text{ml}$ 取适量粘质枯草杆菌芽孢悬液，混于收集罐中。
- 2) 按照污水处理程序依次进行化学消毒和物理消毒。
- 3) 将滤膜在蒸馏水中煮沸消毒 3 次，每次 15min；滤器用压力蒸汽灭菌(121℃, 20min)。
- 4) 检测采样：消毒处理完毕后，用分度吸量管从污水收集罐的采样口吸取 100ML 待排放的污水，在无菌的条件下用微孔滤膜过滤。
- 5) 滤膜用 50ml PB 缓冲液洗涤，除去残留消毒剂。
- 6) 收集洗涤液，在无菌的条件下用微孔滤膜过滤。
- 7) 将微孔滤膜在无菌条件下移放置胰大豆琼脂平皿上进行细菌培养。滤膜应与培养基完全紧贴，当中不得留有气泡。
- 8) 采样平皿倒置于温箱中 35 ± 0.5 ℃ 培养 24 ± 2 h 后，进行枯草杆菌菌落计数。

B.4 判定标准

菌落浓度以个/ml 表示，指示菌浓度必须为 0。

附录 C

(规范性附录)

HEPA 排风过滤器过滤效率的生物学检测方法

C.1 目的：检测实验室、直排式生物安全柜、负压动物饲养设备的 HEPA 排风过滤器对空气微生物的过滤作用是否合格。

C.2 设备和材料

- 粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens* ATCC.8039) 悬液：配制方法见 C-1 附件；
- PBS 稀释液：配制方法见 C-1 附件；
- 空气压缩机，滤油装置，压力表，流量计、连接软管、支架等；
- 气溶胶发生器 1 个，性能见 C-2 附件；
- 普通营养琼脂平板 (100×15 mm)：培养基配制方法见 C-1 附件；
- 裂隙式空气采样器 3 个，性能见 C-3 附件；
- 计时器 1 个；
- 操作人员个人防护用具：防护服、口罩、防护镜等。

C.3 检测方法

1) 进行检测之前，应确保实验室及内部排风设备处于额定功率下稳定运行状态。用安装了琼脂平板的裂隙式空气采样器在排风过滤器前、一级过滤器后、二级过滤器后采样，过滤器前采样时间 0.5min，检测指示微生物的本底浓度。一级、二级过滤器后采样时间 10min，均重复 3 次，采样点在各过滤器面中央点或过滤器后预留的采样口。

2) 用管道连接空气压缩机、滤油装置、压力计、流量计、气溶胶发生器。将粘质沙雷氏菌悬液用 PBS 稀释液稀释后，冰浴放置，连接到气溶胶发生器上。在 $\leq 20\text{m}^2$ 的房间内，指示菌液稀释至 $(1 \sim 8) \times 10^8/\text{ml}$ ，用支架将气溶胶发生器固定在中央排风口下，喷射轴距地面 1.5m，平行地面，喷口与排风口成 90° ；在 $> 20\text{m}^2$ 的房间内，指示菌液稀释至 $(1 \sim 8) \times 10^7/\text{ml}$ ，用支架将气溶胶发生器固定在所测的排风口前 60cm，喷射轴距地面 1.2m，平行地面，喷口朝向排风口；检测生物安全柜和负压动物饲养设备时应在设备内部操作台面或饲养箱中发生气溶胶。

3) 操作人员穿戴好个人防护用具，在室内发生气溶胶 20min 后，开始检测采样。排风过滤器前采样 0.5min，紧挨过滤器纵轴中线上、中、下三点各采一次；一级、二级过滤器后采样 10min，采样点在各过滤器面中央点或过滤器后预留的的采样口，各重复 3 次，采样器流量 28.3L/min。

4) 每个房间检测结束后，应进行空气消毒。消毒方式可参见 C-4 附件。

5) 采样平板置于温箱中 35 ± 0.5 培养 24 ± 2 h 后，进行粘质沙雷氏菌菌落计数。

注：

a 粘质沙雷氏菌菌落为玫瑰红色，微凸，光滑湿润，边缘整齐。

b 房间空气消毒后 30min 内，不宜在共用同一排风管道内的过滤器后进行监测采样工作。若是实验室有多个房间有共用的通风管道情况，应将各房间检测工作交错安排。

c 一级和/或二级过滤器采样如果在装有滤材的管道内进行，监测人员应在整个采样过程中始终留在风管内，避免频繁开启管道检修门造成压力波动。

d 指示微生物也可选用枯草芽孢杆菌黑色变种 (*Bacillus subtilis* ATCC.9372) 芽孢、f2 噬菌体或耻垢分枝杆菌噬菌体。

C.4 判定标准

菌落浓度以 CFU/m³ 表示，本底中指示菌浓度应为 0，滤器前平均菌浓度应大于 10000 CFU/m³，一级滤器后平均菌浓度必须小于滤器前菌浓度的 0.01%，二级滤器后平均菌浓度必须为 0。

C-1 附件:常用空气指示微生物悬液和培养基的配制方法

C-1.1 磷酸盐缓冲液(PBS,0.03mol/L,PH7.2)

无水磷酸氢二钠 2.83 克，磷酸二氢钾 1.36 克，蒸馏水加至 1000ml.调 Ph 至 7.2-7.4，于 121 压力蒸汽灭菌 20min 备用。

C-1.2 普通琼脂培养基

成分：503 胨 15 克
干酪素 2 克
酵母粉 2.8 克
葡萄糖 1.0 克
NaCl 5.6 克
NaOH 0.45 克
琼脂粉 13 克

制法：除琼脂粉外，将 1000ml 含 10%的土豆水加入上列成分，混合加热熔解。冷却后校正 PH 为 7.2~7.4。加入琼脂粉混匀，10 磅高压灭菌 20min。

C-1.3 普通肉汤培养基

成分：牛肉膏 3 克
蛋白胨 10 克
氯化钠 5 克

制法：加水至 1000ml，校正 PH 为 7.2~7.4，10 磅高压灭菌 20min。

C-1.4 粘质沙雷氏菌悬液制备

1) 在无菌条件下将粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens* ATCC.8039) 菌种划线接种到普通琼脂培养基平皿 (100×15 mm) 上。

2) 35±0.5 培养 24±2 h。

3) 在无菌条件下从特征性菌落 (玫瑰红色，微凸，光滑湿润，边缘整齐) 表面上挑取一接种环细菌转移到装有 5ml 肉汤液体培养基的试管中。

4) 37±0.5 摇床 (160rpm/min) 培养 48±2 h。

5) 4 保存。使用前用平皿稀释计数法确定菌液浓度。按上述方法制备的菌液，其平均浓度应为 $1 \times 10^{10} \sim 4 \times 10^{10}$ /ml。

6) 用 PBS 稀释液将细菌原液按适当比例稀释后即可应用。

C-1.5 枯草芽孢杆菌芽孢悬液制备

1) 将枯草芽孢杆菌黑色变种 (*Bacillus subtilis* ATCC.9372) 第 3-5 代培养物接种到肉汤培养基中，37 震荡培养 24 小时。

2) 用 10.0ml 吸管吸取 5.0ml ~ 10.0ml 18h ~ 24h 肉汤培养物，接种于罗氏瓶中营养琼脂培养基表面，将其摇动使菌液布满营养琼脂培养基的表面，再将多余肉汤培养物吸出，将罗氏瓶置于 37 温箱内，培养 5d ~ 7d。

3) 用接种环取菌样少许涂于玻片上，固定后以改良芽孢染色法染色，并在显微镜 (油镜) 下进行镜检。当芽孢形成率达 95%以上时，即可进行以下处理。否则，应继续在室温下放置一定时间，直至达到上述芽孢形成率后再进行以下处理。

改良芽孢染色法：用接种环取菌样涂布于玻片上，待自然干燥。而后通过火焰加热将

菌固定于玻片上。将涂片放入平皿内，片上放两层滤纸，滴加足量的 5.0%孔雀绿水溶液。将平皿盖好，放 54 ~ 56 条件下，加热 30min。取出，去滤纸，用自来水冲洗残留孔雀绿水溶液。加 0.5%沙黄水溶液，染 1min。水洗，待干后镜检。芽孢呈绿色，菌体呈红色。

4) 罗氏瓶培养物，用 10.0ml 吸管加 10.0ml 无菌蒸馏水于每一罗氏瓶中，以 L 棒轻轻推刮下菌苔。吸出第一批洗下的菌悬液，再向瓶内吸加 5.0ml 无菌蒸馏水，重复洗菌一遍。将第一和第二批洗下的菌悬液集中于一含玻璃珠的无菌三角烧瓶中，振摇 5min，打碎菌块，使成均匀的芽孢悬液。

5) 必要时，将盛装菌悬液的三角烧瓶置 45 水浴中 24h，使菌自溶断链，分散成单个芽孢。

6) 用无菌棉花或纱布过滤芽孢悬液，清除其中的琼脂凝块。

7) 将过滤后的芽孢悬液，置无菌离心管内，以 3000 r/min 速度离心 30min。弃上清液，加蒸馏水吹吸使芽孢重新悬浮。再离心和重新悬浮清洗，先后共 3 遍。

8) 将洗净的芽孢悬浮于三角烧瓶内蒸馏水中，并加入适量小玻璃珠。

9) 将芽孢液放于 80 水浴中 10min (或 60 , 30min)，以杀灭残余的细菌繁殖体。待冷至室温后，保存于 4 冰箱中备用。有效使用期为半年。

C-1.6 f2 噬菌体悬液制备和使用方法：

1) 宿主菌菌液的制备：

将在普通琼脂培养基上生长 1 周的 E.coli285 接种于肉汤液体培养基，37 150rpm 振荡培养 8h，4 保存备用。

2) f2 噬菌体的增殖：

采用半固体双层琼脂平皿法。下层用含 1.5%琼脂的普通琼脂培养基 7ml 铺皿；上层培养基 4ml (琼脂含量 0.7%)，在 50 时加入 E.coli285 和噬菌体混合悬液 0.4ml (1:1 混合)，铺皿，37 培养 48 小时，加入 9mlPBS 液 37 孵育 1 小时，吸取液体，用 0.2 μ m 滤膜过滤，所得扩增液效价检查应为 $10^8 \sim 10^9$ pfu/ml，4 保存。(如效价不足，可重复增殖数次)

3) 指示平板的制备和使用：

双层平皿法。下层铺皿方式同上，放入采样器中进行噬菌体采样后取出，在无菌条件下倒入 48 混有 1ml 宿主菌的上层琼脂 4ml。放在台面上摇匀，使上层培养基铺满平板。待凝固后，37 培养 24h，计数噬菌斑。

C-1.7 耻垢分枝杆菌噬菌体悬液制备和使用方法：

1) 宿主菌菌液的制备：

将在改良 L-J 培养基上生长 1 周的耻垢分枝杆菌 (M.Smegmatis ATCC.19420) 接种于 7H9 (另加 10%OADC+1mmol/L Cacl₂) 液体培养基，37 150rpm 振荡培养 48h，菌液麦氏比浊法应 5mg/ml,4 保存备用。

2) 分枝杆菌噬菌体的增殖：

采用半固体双层琼脂平皿法。下层用含 1.5%琼脂的 7H9(50 时加 10%OADC+1mmol/L Cacl₂) 7ml 铺皿；上层培养基 4ml (琼脂含量 0.7%)，在 50 时加入耻垢分枝杆菌和噬菌体混合悬液 (1:1 混合) 1ml 铺皿，37 培养 48 小时，加入 9mlSM 液 37 孵育 1 小时，吸取液体，用 0.2 μ m 滤膜过滤，所得扩增液效价检查应为 $10^8 \sim 10^9$ pfu/ml，4 保存。(如效价不足，可重复增殖数次)

3) 指示平板的制备和使用：

双层平皿法。下层铺皿方式同上，放入采样器中进行噬菌体采样后取出，在无菌条件下倒入 48 混有 1ml 宿主菌的上层琼脂 5ml。摇匀，使上层培养基铺满平板。待凝固后，37 培养 24h，计数噬菌斑。

C-2 附件：气溶胶发生器的选择和校准

C-2.1 选择标准

气溶胶发生器应满足下列条件：

- 气喷、回流式发生器；
- 额定工作流量下每分钟气溶胶化粘质沙雷氏菌液 $\geq 0.2\text{ml}$ ；
- 释放的粘质沙雷氏菌气溶胶中粒径 $2\mu\text{m}$ 以下的活粒子比例 $\geq 80\%$ ；
- 微生物气溶胶的释放速度为 $30\pm 3\text{ m/min}$ ；
- 对粘质沙雷氏菌（PBS 稀释液）的回收率应 $\geq 20\%$ 。

C-2.2 校准方法

1) 测量气溶胶发生器喷雾口的面积 (m^2)，计算以 0.5 m/s 的速度喷出气溶胶时，气溶胶发生器的气流量 (m^3/s)。

2) 向气溶胶发生器中加入一定体积的粘质沙雷氏菌悬液，悬液菌落浓度用平板稀释法计算。

3) 用导管连接气溶胶发生器与流量表和压力计，打开喷雾器（控制气流量，使气溶胶喷出速度为 0.5 m/s ）和 6 级 Andersen 式采样器（见附录 E）。气溶胶发生器工作后分流回流液，准确测量体积后用平板稀释法计算其菌落浓度。采样 20min。采样后准确测量并记录剩余菌液体积。

4) 结果计算

- 气溶胶发生量 = (菌液原体积 - 喷雾 20min 后菌液体积 - 回流液体积) / 20；
- 气溶胶喷出速度 = 气流流量 (m^3/s) / 喷雾口面积 (m^2)；
- 气溶胶中粒径 $2\mu\text{m}$ 以下活粒子比例 = Andersen 式采样器 5、6 级平皿菌落数 / 各级平皿菌落数之和
- 粘质沙雷氏菌（PBS 稀释液）的回收率 = 回流液菌落浓度 / 菌液原浓度。

C-3 附件：空气微生物采样器的选择

C-3.1 选择标准

气溶胶发生器应满足下列条件：

- 采样流量 $\geq 10\text{L/min}$ ；
- 采集粒谱应在 $0.2 \sim 10\mu\text{m}$ ；
- 对 $5\mu\text{m}$ 以下生物粒子的采样效率 $\geq 50\%$ ；
- 具有增湿功能，以降低生物失活率，增长允许采样时间；
- 对所采集粒子具有按粒径分级功能。

注：Andersen 式 6 级采样器和 AGI 型采样器是第一届国际空气微生物学大会推荐的标准采样器。

Andersen 式采样器是筛孔式固体撞击采样器；AGI 型采样器液体冲击式采样器，在进气管上连接前置冲击采样器后，具有两级粒径分级功能。均符合上述条件。

它们的校准方式参见相关文献。

C-4 附件：病原微生物实验室日常清洁维护要求

病原微生物实验室日常清洁维护时以及用指示微生物进行性能测试后，应进行空气消毒。在进行空气消毒之前，应对地面、墙壁、设备表面进行消毒：用含量为 $0.1 \sim 0.2\%$ 的过氧乙酸溶液喷洒，作用 $15 \sim 30\text{min}$ 。也可用含量为 0.1% 的过氧乙酸溶液拖地。空气消毒可使用过氧乙酸按下述方法操作：将试验室门关闭，送、排风风机关闭，用过氧乙酸含量为 $0.1 \sim 0.2\%$ 的消毒剂溶液，按每立方米 20ml 的量，使用气溶胶喷雾器进行喷雾消毒，作用 1 小时后开启风机通风。

过氧乙酸对金属腐蚀性较强，使用不当会腐蚀实验室内设备，消毒后应用清水将易腐蚀设备表面擦拭干净。喷雾消毒时要注意防火。

过氧乙酸在制备中必须注意安全，防止溅入眼内或皮肤、衣物上，配制时应戴防护手套、口罩和护目镜，不慎溅上，立即用大量流动清水冲洗。配制比例要准确，使用浓度要适当，浓度过高会产生危害。因过氧乙酸遇水可发生强烈的化学反应，配制时应将过氧乙酸慢慢倒入水中，切勿将水倒入过氧乙酸中，否则会发生强烈的反应，产生高热，溶液飞溅，引起事故。配制宜在搪瓷或塑料容器或抗腐蚀的金属容器中进行。对于直接用 A、B 液（过氧化氢和冰醋酸）配制时，应按产品说明书要求进行。

在清除慢病毒等特殊危害型因子时可采用特殊消毒方法。实验室清洁消毒方法应由实验室管理人员和检测认证机构协商确定。

附录 D

(规范性附录)

实验室污水收集罐 HEPA 过滤器性能生物学检测方法

D.1 目的：实验室污水收集罐排气口 HEPA 过滤器对微生物气溶胶的过滤作用是否合格。

D.2 设备和材料

——粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens* ATCC.8039) 悬液：配制方法见附录 C；

——普通营养琼脂平皿 (100×15 mm)：培养基配制方法见附录 C；

——裂隙式空气采样器 3 个，性能见附录 C；

——计时器 1 个；

——操作人员个人防护用具：防护服、口罩、防护镜等。

D.3 检测方法

1) 本底采样：使用 ANDERSON 式采样器在排气 HEPA 滤器外侧采样 10min，重复 3 次，采样器流量 28.3L/min。

2) 将粘质沙雷氏菌悬液用按照罐内污水中浓度 $(2 \sim 8) \times 10^4/\text{ml}$ 取适量，混于收集罐中。

3) 检测采样。使用 ANDERSON 式采样器在排气 HEPA 滤器外侧采样 10min，重复 3 次，采样器流量 28.3L/min。

4) 采样平皿置于温箱中 35 ± 0.5 培养 24 ± 2 h 后，进行粘质沙雷氏菌菌落计数。

D.4 判定标准

菌落浓度以 CFU/m³ 表示，指示菌浓度必须为 0。

附录 E

(规范性附录)

动物饲养隔离器 HEPA 过滤器性能生物学检测方法

E.1 目的

以生物学方法测试动物饲养隔离器系统送风 HEPA 过滤器 (正压型) /排风 HEPA 过滤器 (负压型)、过滤器外壳以及固定框架的完整性;

接受检测的动物饲养隔离器送、排风机在整个测试期间应以标称转速稳定运行。

E.2 仪器和试剂

- 粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens* ATCC.8039) 悬液;
- 指示微生物也可以选用耻垢分枝杆菌噬菌体悬液;
- 空气压缩机, 气体过滤装置, 压力表, 流量计、连接软管、支架等;
- 气溶胶发生器, 性能见附录 B;
- 裂隙式空气采样器, 流量为 28 ± 1.4 L/min;
- 操作人员个人防护用具: 防护服、口罩、防护镜等。

E.3 检测方法

a) 打开动物饲养隔离器系统的风机, 将各饲养箱正常连接安装在箱架上, 饲养箱内饮水瓶正常安放, 不放置饲料和垫料, 箱盖与箱体以正常方式扣合。如动物饲养隔离器采用集中式通风系统, 需在通风管道上过滤器外侧的位置安装检测开口。

b) 对于正压动物饲养隔离器系统, 在送风 HEPA 过滤器上游进风侧安放气溶胶发生器, 喷口前安置一个空气生物采样器, 在动物饲养隔离器箱架中部安放试验型饲养箱, 箱内布满采样平皿。

检测流程如下:

0min	在箱内布置采样平皿并启动 HEPA 上游侧的空气采样器
1min	停止 HEPA 上游的空气采样器, 取出其中和箱内的平皿进行培养 (阴性本底)
2 min	重新在箱内和空气采样器内布置平皿
3min	启动气溶胶发生器
5min	启动空气采样器
6min	停止空气采样器, 停止气溶胶发生器
10 min	取出采样器内 (阳性本底) 和饲养箱内的平皿进行培养

C) 对于负压动物饲养隔离器系统, 将气溶胶发生器由饮水瓶开孔连接到饲养箱内, 开孔周围缝隙密封, 在排风过滤器后侧安放采样器, 并在与试验型饲养箱内和相邻的饲养箱内分别布满采样平皿。

使用空气生物采样器检测动物饲养隔离器系统 HEPA 过滤器对排出气体的过滤清除作用。

用一只无菌湿棉签沿饲养箱体与箱盖扣合边缘 (包括箱盖过滤器外侧面) 擦拭后, 将棉签用 1ml PBS 缓冲液充分洗涤, 取 0.2ml 进行平皿涂布计数菌落, 检测动物饲养隔离器系统的负压防护性能。

通过对污染箱相邻箱体内部的气体采样, 检测动物饲养隔离器系统的交叉污染防护性能。

检测流程如下:

0min	在试验型箱内和两侧箱内布置平皿并启动HEPA下游侧的空气采样器
1min	停止HEPA下游侧的空气采样器，取出其中和箱内的平皿培养，对箱体边缘拭子培养（阴性本底）
2min	重新在箱内和空气采样器内布置平皿
3min	启动气溶胶发生器
5min	启动空气采样器
6min	停止气溶胶发生器和空气采样器
10min	取出采样器内和试验型饲养箱和相邻箱内（阳性本底）的平皿进行培养对箱体边缘（包括箱盖过滤器外侧面）拭子培养

注：1) 空气采样器的流量设置为28.3L/min。

2) 将指示微生物浓度稀释至 10^6 /ml，装入气溶胶发生器，在8L/min流量下发生气溶胶。

3) 取出的培养皿在37℃培养24h、进行菌落/嗜菌斑计数。

附录 F

(规范性附录)

固体废物指示微生物(枯草芽胞杆菌黑色变种芽孢)监测方法

F.1 目的:检测实验室污染区/半污染区固体废物的消毒灭菌是否合格。

F.2 设备和材料

——枯草芽胞杆菌黑色变种(*Bacillus subtilis* ATCC.9372)芽孢菌片:含菌量为 5.0×10^5 cfu/片 ~ 5.0×10^6 cfu/片;

——胰大豆肉汤培养基(5ml);

——胰大豆琼脂平皿(100×15 mm):培养基配制方法见附录 C;

——实验测试包;

——操作人员个人防护用具:防护服、口罩等。

F.3 检测方法

1) 制作标准试验包:取 16 条全面手术巾每条 41cm×66cm,将每条手术巾的长边先折成 3 层,短边折成 2 层然后叠放,做成 23cm×23cm×15cm 大小的测试包。

2) 将两个枯草芽胞杆菌菌片分别装入灭菌小纸袋内,至于标准试验包中心部位。

3) 按照固废处理程序依次对标准测试包进行化学消毒和物理消毒。

4) 检测采样:消毒处理完毕后,无菌环境取出菌片。在胰大豆肉汤培养基中 35 ± 0.5 培养 24h 增菌后涂布于琼脂平皿,置于温箱中 35 ± 0.5 培养 24 ± 2 h,进行枯草杆菌菌落计数。

F.4 判定标准

菌落浓度以个/ml 表示,指示菌浓度必须为 0。