

隔离病房隔离效果的微生物学实验方法

中国建筑科学研究院 赵力[☆] 许钟麟

中国人民解放军第 302 医院 于玺华

中国建筑科学研究院 王清勤 张益昭 温风 刘华

狄彦强 王荣 赵辉

摘要 采用枯草杆菌黑色芽孢变种作为实验菌种,介绍了菌液的配制、发菌系统原理、沉降菌和浮游菌的采样方法、细菌的培养与计数方法,以及隔离病房回风过滤器对细菌过滤效果检测、病人微生物气溶胶污染范围测定、隔离病房开关门隔离效果测定等的具体实验方法。

关键词 隔离病房 隔离效果 微生物气溶胶 实验方法

Microbiology experimental method for insulation effect of isolation wards

By Zhao Li[★], Xu Zhonglin, Yu Xihua, Wang Qingqin, Zhang Yizhao,
Wen Feng, Liu Hua, Di Yanqiang, Wang Rong and Zhao Hui

Abstract Takes the black gemma mutant of *Bacillus subtilis* as an experimental culture. Presents the preparation of bacterial solution, the principle of bacteria dispensing system, the sampling methods of sediment bacteria and floating bacteria, the culture and counting methods of bacteria, and the specific experimental methods for the testing of filtering effect of return air filter on bacteria, the pollution area of microbe aerosol from patients and the insulation effect of isolation ward when opening and closing door.

Keywords isolation ward, insulation effect, microbe aerosol, experimental method

★ Institute of Air Conditioning, China Academy of Building Research, Beijing, China

①

微生物气溶胶对人类的生命健康有极大的影响,全球约有 500 多种致病菌,经气溶胶传播的就有 100 多种,包括通过食道传播的霍乱弧菌、经皮肤及接触传播的出血热等。恐怖主义者也以气溶胶的形式释放生物战剂。我国医院内的感染也以呼吸道感染为主。特别是 SARS 病毒的传播,是最典型的气溶胶传播。研究微生物气溶胶在隔离病房的扩散规律,可以为高效隔离病房的建造及正确使用提供科学依据。

1 实验目的

隔离病房可通过定向气流、负压差和缓冲室,阻隔室内含致病微生物的气溶胶向室外传播。为

了验证这些措施的隔离效果,通常可采用大气尘气溶胶和微生物气溶胶进行实验。但前者的不稳定性、不易网格多点采样的特点,使其在研究气溶胶浓度场方面有不足之处,而一些措施的优劣与其对浓度场的影响很有关。微生物气溶胶用于实验研究可克服上述缺点,同时要隔离的正是微生物气溶

①[☆] 赵力,男,1973 年 5 月生,工学硕士,工程师
100013 北京市北三环东路 30 号建研院空调所
(010) 84278377-819
E-mail: zhaolicabr@163.com

收稿日期:2006-01-09

一次修回:2006-05-18

二次修回:2006-11-22

胶,因此,直接给出微生物浓度场的数据更有直观说服力。这就是采用微生物学方法研究隔离病房隔离效果的目的。

2 实验方案

2.1 回风口发菌,送风口采样,测定高效过滤器的过滤效果,为隔离病房能否采用回风提供依据。

2.2 模拟病人发菌,隔离病房在不同因素(如换气次数、风口位置等)影响下污染范围的测定。

2.3 模拟病人发菌,通过缓冲室进出隔离病房,研究不同温差、压差情况下缓冲室的隔离效果。

3 实验材料

3.1 菌种的选择

实验菌种的选择对实验结果的可信性起关键作用,因为空气中有大量的细菌,如果采用空气中已有的细菌,在实验前要进行长时间的自净,并且在实验前需进行本底实验,在实验结果中减去本底菌量,即便如此仍不能彻底消除实验方法本身的误差。实验采用的菌种不能对实验人员有伤害,这是实验的最基本要求。

本次实验采用的菌种为枯草杆菌黑色芽孢变种,菌号 ATCC:15442,1.3343,由中国科学院菌种保藏中心提供。采用此菌种的原因是此菌种培养出来后是有颜色的,呈淡黄色(见图 1,白色菌为空气中的杂菌),与空气中的杂菌有明显的颜色差别,这样就克服了空气中其他杂菌对实验结果计数的影响。采用此菌种,实验前不需要自净。

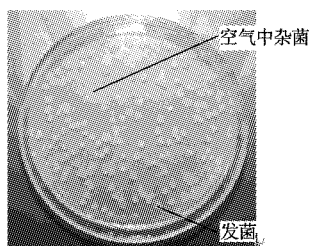


图 1 枯草杆菌黑色芽孢变种培养结果

3.2 发菌浓度的确定

在发菌实验中发菌浓度对实验数据的采集有重大的影响,发菌浓度过高,会造成培养皿或采样器采集到的菌量过大,从而无法计数;发菌浓度过小,培养皿或采样器采集不到,不能说明问题。发菌浓度需预先估计,通过反复实验再找到最佳的发菌浓度。通过实验,在发菌空气流量为 7 L/min 左右的条件下,在病人口部发菌,测定室内细菌的分布情况时,菌液浓度为 $10^6 \sim 10^8$ cfu/mL 较合适;测过过滤器的排风效率时,菌液浓度为 $10^9 \sim 10^{11}$ cfu/mL 较合适;测试缓冲室隔离效果时,菌液浓度为 $10^{11} \sim$

10^{13} cfu/mL 较合适。

3.3 菌液的配制

该菌种的培养方法与常规菌种相同,但经过几代培养后会出现部分细菌的颜色变浅或变白,从而不能与空气中的杂菌区分,为了不影响实验效果,细菌的连续培养次数不应过多,培养几代后就应用原始菌种重新培养。

在培养完细菌后可以测定菌液的浓度。由于培养菌液浓度太大,在显微镜下无法对细菌进行计数,所以需要进行稀释。稀释方法是取 0.1 mL 菌液,加入 0.9 mL 无菌生理盐水中,依次 10 倍稀释,再取 0.1 mL 稀释后的菌液在平板上培养数菌。根据稀释的倍率推算出原菌液的浓度。

实验中的细菌浓度为发菌量除以发菌过程中通过过滤器的空气量。发菌量 = 菌液浓度 × 随气流引射出的菌液量,在一定发菌时间内所消耗的菌液量用量瓶测量,发菌时间用秒表测量。

4 发菌系统

发菌系统如图 2 所示,打气机(如图 3 所示)供气的压力稳定,供气量通过打气机后的调节阀来

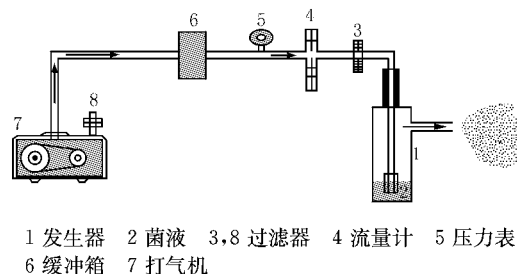


图 2 微生物气溶胶发生系统示意图



图 3 打气机

调节,在发菌前先通过流量计来调节气体的流量到发生器所需的流量。发生器宜略向上倾斜,这样可以使发菌时所带出的较大的液珠撞击喷口时,凝结产生的液滴流回发生器内。同时注意观察发生器内的液量,始终保持发生器金属柱的小孔处于液面之下,以保持发菌的连续性。

发生器采用 302 医院研发的专用发生器(如图 4 所示)。实验中发生器的气流出口速度在 0.35 m/s 左右,发菌粒径(菌液雾滴的直径)为 1~18 μm ,一般常用 1.0~5.0 μm 。该发生器是通过气流的高速引流作用,使菌液充分雾化,其工作原理类似喷雾器,但由于其特殊的结构,使粒径呈单分散相且均匀,易于在室内扩散(已为大量实验所证明)。在实验中发生器产生的雾滴不能太大,并且要均匀,如果雾滴太大会造成采样、培养完成后细菌过于集中,从而难于计数;如果菌液雾滴不均匀会使实验的结果不准确。



图 4 发生器

在排风效率(即排风过滤器对细菌的过滤效率)实验中,为防止菌雾未通过过滤器而直接从边框泄漏,在排风口做了套管(如图 5 所示),套管的尺寸小于过滤器的尺寸,同时套管有一定的长度,在套管内发菌,使菌雾与排风充分混合。为了给隔离病房能否用回风提供实验数据,在实验中全部采用回风。在实验中回、排风管上设有阀门,可以任意调节回、排风比例,病房中的回风口也是排风口,在使用时通过调节回、排风阀来切换。

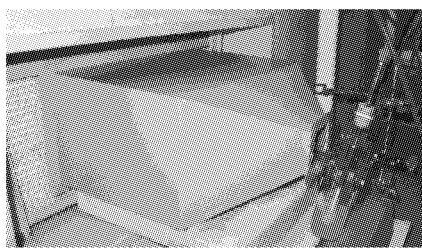


图 5 排风套管

5 沉降菌的采样

沉降菌的采集用于病人气溶胶污染范围测定和隔离病房开、关门隔离效果的测定实验。

5.1 模拟病人口部发菌的装置如图 6 所示。在实验过程中发生器出口气流的角度尽量与人呼吸气流的角度一致,但发生器的倾角不能过高(一般不超过 15°),气泵的气压要稳定。对于整个病房来讲,细菌浓度基本是稳定的,所以在作实验时,没有模拟人吸气的过程,而是简化为病人连续呼出细菌的情况,这并不影响实验效果。



图 6 发生器模拟病人口部发菌

5.2 培养皿可以灵活布置,采用培养皿来测量沉降菌。在研究不同送、排风方式情况下室内的污染情况时,应尽量多地布置培养皿,在医护人员的工作区应密布,工作区沉降菌的多少也是送风方式优劣的主要评价指标。培养皿的布置方式见图 7。培养皿布置高度:床位置的布置在床上,其他的布置在地面上。

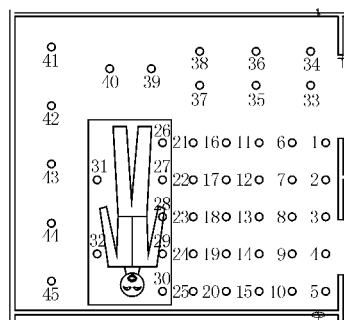


图 7 室内培养皿的布局

为了方便布置,并没有在医护人员的呼吸区布置采样点,这是考虑到主要研究的是缓冲室的隔离效果,是要得出在不同条件下病房、缓冲室、走廊平均浓度的对比,并不是研究人员呼吸区的影响,所以,可以用地面培养皿细菌数的对比来研究三个区域的细菌浓度对比,从而研究隔离效果。

5.3 在研究不同温差、压差条件下缓冲室的作用时,培养皿的布置方式见图 8。开关门动作的时间要与医护人员进出的时间基本一致,不超过 2 s,尽量模拟实际情况。也可增加在缓冲室停留的时间,以研究缓冲室的自净影响。

6 浮游菌的采样

在排风过滤器对细菌的过滤效率实验中,不适合测量沉降菌,而是通过测量送风口浮游菌来计算送风的细菌浓度,通过发菌时间、消耗的菌液量、回风量来计算回风口处回风的细菌浓度。浮游菌的

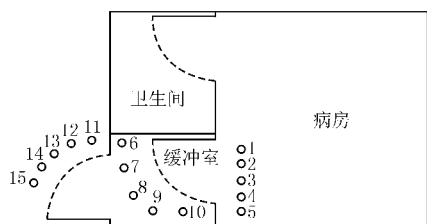


图 8 研究缓冲室隔离效果时培养皿的布局

采集采用 Andersen 采样器。

6.1 Andersen 采样器的流量要求

Andersen 采样器流量为 28.3 L/min (1 ft³/min)。这种流量用一般抽气泵均可达到。用一个 0~35 L/min 的转子流量计即可进行校对。确保流量准确无误是使用该采样器的关键操作步骤。流量影响流速,流速又影响撞击效率,因此流量不准确或未经校对的采样器不可使用。

6.2 Andersen 采样器的真空度要求

Andersen 采样器在使用时,另一个关键是各节之间的密封度,如果密封度不够,也就是说它的真空度不够,从表面上看,它的流量仍然合乎要求,但这实际是一种假象。因真空度不够亦可影响气流速度,进而影响采样效率。因此流量和真空度是该采样器操作时的关键。在采样器出口处用一个螺旋来调节真空度,达到 13.4 Pa 即可。

6.3 Andersen 采样器的消毒

在采样前,除要求平皿及培养基消毒外,采样器本身也要进行消毒处理,其方法有 3 种,体积分数 75% 的乙醇消毒、高压蒸汽消毒、环氧乙烷消毒。在消毒方面应该注意,虽然该型采样器的铝制部分都进行了阳极化处理,有抗腐蚀的功能,但亦不能用有腐蚀性的消毒液消毒,因为长期使用仍可能被腐蚀。

6.4 Andersen 采样器的采样方法

$$\text{浮游菌浓度}(\text{cfu}/\text{m}^3) = \frac{\text{培养皿中总菌数}(\text{cfu})}{28.3(\text{L}/\text{min}) \times \text{采样时间}(\text{min})} \times 1000(\text{L}/\text{m}^3)$$

8 实验方法

实验室的风口布置如图 9 所示。具体的实验方法说明见表 1。

9 实验室消毒方法

取甲醛溶液 25~50 mL,再按 1:1 的比例加水,用加热法蒸发(一定要在室外控制电源)。关好门,并用纸条(胶布)将门缝封严。封闭 24 h 后,用体积分数为 25% 的氨水来中和甲醛,中和量为甲

制作好的培养基应先进行预培养,当确认无菌时,方可使用。另外在倒平皿时,要确保足量、水平,否则不能保证 400 个喷口的撞击距离一样,避免因培养基太厚将喷口孔堵塞,或因培养基太薄增加了撞击距离,减少了捕获率。

由于是浮游菌采样,采样人员要远离采样头,以避免将操作者自身散发到环境中去的微生物气溶胶粒子采到。

采样时还要对现场的空气微生物浓度进行大体估计,以便设计采样的时间。因为如果环境微生物浓度太高,采样时间又长,则会使许多微生物在撞击点处重叠,产生较大误差;如果环境微生物浓度过低,采样时间又太短,以至于采到的微生物粒子太少或没有采到,就不能准确评价。

操作时先将平皿连盖放到采样器里,并保持水平,然后迅速打开盖,立即放上采样器的顶盖。这样可保证将实际误差降到最小。

7 细菌的培养与计数

将采好样的培养皿立即盖上盖,在 36~37 °C 温度下培养细菌 2 d。

培养皿中细菌的计数方法很多,常规方法如下:

1) 分段计数法。当采到的菌落很多,在它们长大汇合之前,用解剖镜及早观察,将培养皿划出许多相等的部分,抽出一部分细菌,然后乘以划分份数,即可得出每皿总菌数。如菌数不多,可直接数菌落数。

2) 菌落计数器。目前已研制出一种可以直接计数的菌落计数器,其原理是用光照射培养皿,细菌遮光产生脉冲来计数。该仪器计数速度快,只要将培养皿放上,即可读出数,误差不大于 2%。

求出培养皿中的总菌数后,按下式计算浮游菌浓度:

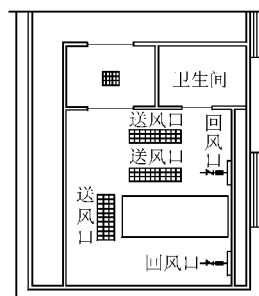


图 9 实验室的风口布置

表 1 实验方法

检测项目	实验方法	检测仪器
隔离病房回风过滤器对细菌的过滤效果检测	通过含尘浓度的测试,从室内 3 个送风口中选定气流分布最好的一个送风口送风。换气次数为 12 h^{-1} ,采用部分循环风。在回风口(有高效过滤器)不断从发菌装置喷洒芽孢(菌液浓度为 10^{10} cfu/mL),在送风口采样	90 mm 直径平皿, Andersen 采样器
病人气溶胶污染范围测定 1	通过含尘浓度的测试,从 3 个送风口中选定气流分布最好的一个送风口送风。换气次数为 12 h^{-1} ,采用全新风。送排风口设高效过滤器。在病床上放置模拟病人,不断从病人口部发菌装置喷洒芽孢(菌液浓度为 10^{10} cfu/mL)。在室内布置培养皿,检测沉降菌	90mm 直径平皿
病人气溶胶污染范围测定 2	通过含尘浓度的测试,从 3 个送风口中选定气流分布最差的一个送风口送风。其余同病人气溶胶污染范围测定 1	90 mm 直径平皿
隔离病房开、关门隔离效果的测定 1	通过含尘浓度的测试,从 3 个送风口中选定气流分布最好的一个送风口送风。换气次数为 12 h^{-1} ,采用全新风。缓冲室相对病房及外间均无压差。不断从病人口部发菌装置中喷洒芽孢。在隔离病房和缓冲室开、关门,进出 1 人时测定缓冲室的隔离效果	90 mm 直径平皿
隔离病房开、关门隔离效果的测定 2	缓冲室相对病房及外间相对缓冲室均有正压差,无温差,其余同隔离病房开、关门隔离效果的测定 1	90 mm 直径平皿
隔离病房开、关门隔离效果的测定 3	缓冲室相对病房及外间相对缓冲室均有正压差,改变送风温度,有温差,其余同隔离病房开、关门隔离效果的测定 1	90 mm 直径平皿

醛溶液的一半。人在整个操作过程中不能直接进入消毒间,消毒后进入时应注意防护。因甲醛气体有可燃性,熏蒸时不能开风机,防明火。

10 结论

- 10.1 微生物气溶胶实验比大气尘实验更接近于实际情况,增加了实验的可靠性。
- 10.2 研究隔离效果时采用微生物气溶胶实验可克服大气发尘实验中尘源的干扰。

10.3 枯草杆菌黑色芽孢变种有颜色,避免了空气中杂菌对实验的影响。

10.4 在发菌空气流量为 7 L/min 左右的条件下,在全室发菌测定室内细菌分布情况时,菌液浓度为 $10^6\sim 10^8\text{ cfu/mL}$ 较合适;测排风过滤器的效率时,菌液浓度为 $10^9\sim 10^{11}\text{ cfu/mL}$ 较合适;测定缓冲室隔离效果时菌液浓度为 $10^{11}\sim 10^{13}\text{ cfu/mL}$ 较合适。

(上接第 51 页)

分析表 5 知, $\theta=0.27$ 时方案 B 节省总费用 2 380 万元,其中节省初投资 1 148 万元,节省运行费用 50.2 万元/a; $\theta=0.18$ 时方案 B 节省总费用 3 028 万元,其中节省初投资 1 090.3 万元,节省运行费用 79 万元/a; $\theta=0.09$ 时方案 B 节省总费用 2 650 万元,其中节省初投资 599.3 万元,节省运行费用 83.6 万元/a。

4 结论及展望

二级调峰方案无论对于新建项目还是需要增加供热能力的既有项目,都具有节能、环保及经济上的优势。对于以燃煤锅炉房为热源的集中供热系统,二级调峰方案从设计的角度上延长了燃煤锅炉在设计热效率下运行的时间,具有明显的节能效果。在本文提到的供热项目中,当 $\theta=0.27$ 时,二级调峰方案年节省燃煤 7.3%,20 年累计节省总费用 2 380 万元;当 $\theta=0.18$ 时,二级调峰方案年节

省燃煤 4.0%,20 年累计节省总费用 3 028 万元;当 $\theta=0.09$ 时,二级调峰方案年节省燃煤 2.0%,20 年累计节省总费用 2 650 万元。

参考文献

[1] 韩伟国,江亿,郭非. 多种供热供暖方式的能耗分析[J]. 暖通空调,2005,35(11):106-110

[2] 贺平,孙刚. 供热工程[M]. 3 版. 北京:中国建筑工程出版社,1993

[3] 秦冰,付林,江亿. 利用系统热惯性的热电联产电力调峰[J]. 煤气与热力,2005,25(10): 6-8

[4] 李善化,康慧. 集中供热设计手册[M]. 北京:中国电力出版社,1996

[5] 杨向劲,由世俊,刘晶. 单纯供热负荷下热电联产与分产的能耗比较[J]. 煤气与热力,2003,23(2): 76-79

[6] 洪静,张文胜,张卫忠. 燃煤锅炉运行热效率的估算[J]. 区域供热,2003(5):34-36