

大型实验动物屏障设施环境微生物和尘埃粒子的动态监控

王 晶^{1,2}, 刘 伟³, 袁水娟³, 谈小倩³, 谢 恩³, 徐 平², 芮 荣¹

(1. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095; 2. 中国科学院上海实验动物中心,
3. 上海斯莱克实验动物有限责任公司, 上海 201615)

【摘要】 目的 本实验以大型实验动物屏障设施为研究对象, 分析屏障设施的环境微生物及尘埃粒子的动态变化规律及其相关影响因素。**方法** 测定屏障设施各功能区域不同时间及不同工作状态下空气落下菌和直径 $\geq 0.3 \mu\text{m}$ 尘埃粒子的数量变化。**结果** 屏障系统落下菌与尘埃粒子变化规律如下: 屏障系统内空气落下菌与尘埃粒子在饲养工作后显著升高, 喷雾消毒后明显降低; 大、小鼠饲养室空气落下菌与尘埃数在凌晨时明显升高, 而兔饲养室在凌晨时间段则较低; 清洁走廊和污染走廊在工作状态时细菌含量明显上升, 非工作状态时细菌含量一直处于较低的水平。**结论** 实验动物屏障系统的环境微生物与尘埃粒子的动态数量变化与动物品种、空气消毒、人员进出及动物室内的饲养操作等有关。

【关键词】 落下菌; 屏障系统; 尘埃粒子; 实验动物

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)02-0061-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.012.014

Dynamic Monitoring of Bacteria and Dust Particles in Barrier Animal Facilities

WANG Jing^{1,2}, LIU Wei³, YUAN Shui-juan³, Tan Xiao-qian³, XIE En³, XU Ping², RUI Rong¹

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
2. Shanghai Laboratory Animal Center, CAS, Shanghai 201615; 3. Shanghai Slac Experimental Animals Co. Ltd.)

【Abstract】 Objective To study the dynamic changes of bacteria and the dust particles in barrier animal facilities. **Methods** To measure the quantity of falling bacteria and dust particles of larger than or equal $0.3 \mu\text{m}$ in diameter at different times and in the different functional areas of the barrier animal facilities. **Results** The quantity of falling bacteria and dust particles were significantly increased in barrier animal room after breeding operation, and was the lowest after spray disinfection. There was a high quantity of bacteria and dust at 00:00 in the mice and rats breeding room, but was a valley value in the rabbits breeding room at the same time. The quantity of falling bacteria and dust particles was significantly increased in the clean and semi-clean corridor at working time, and was kept a relatively stable level at non-working times. **Conclusions** There are regular changes of the quantity of falling bacteria and dust particles in barrier animal facilities, and these changes are related with animal species, spray disinfection, mobility of persons and materials

【基金项目】 国家科技支撑项目 2006BAI23B04, 上海市科研计划项目 08140900800。

【作者简介】 王晶(1984-), 男, 硕士, E-mail: himrwang@163.com。

【通讯作者】 徐平(1964-), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物低温生物学和实验动物遗传性疾病; 芮荣, 男, 博士生导师, 研究方向: 动物生殖调控及生殖疾病控制。

and operation of animal care.

【Key words】 Falling bacteria; Barrier animal facilities; Dust; Laboratory animal

大型实验动物屏障系统环境的稳定是保障实验动物规模化生产、供应和动物质量的基本条件。屏障系统内的环境微生物控制与其生产种群的来源、空气洁净度、物品的消毒或灭菌以及人员的进出和操作等有关。在现行的实验动物设施与环境国家标准(GB14925—2001)中,只规定了静态状况下屏障系统应该达到的基本条件或标准^[1],而对动态运行中的屏障系统没有作出明确的规定。在生产型屏障系统中,屏障内落下菌与尘埃粒子的变化会因动物饲养种类,密度,饲养工作的不同而呈现不同的变化规律。本实验选择两个饲养不同品种动物的屏障系统,在不同时间段对屏障系统进行空气落下菌与尘埃粒子的测定,研究生产型屏障系统动态环境下微生物和尘埃粒子的变化规律,并分析生产活动对环境指标的影响,为实验动物屏障系统动态环境的质量标准制定提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验仪器与试剂

直径 9 cm 的塑料培养皿,超净工作台,显微镜,生化培养箱,高压蒸汽灭菌锅,电子天平,恒温水浴锅,FLUKE983 激光粒子计数器,不锈钢传递罐,冰箱,无菌工作衣及无菌手套等。营养肉汤培养基(上海康润生物科技有限公司);琼脂粉(上海盛思生化科技有限公司)。

1.2 试验场所环境及饲养方式

1.2.1 屏障系统等级及环境:清洁级屏障系统[Ⅰ]:小鼠饲养屏障,全部饲养小鼠,测定地点选择该屏障小鼠饲养室及洁净走廊和污物走廊。清洁级屏障系统[Ⅱ]:大鼠和兔饲养屏障,其中有兔饲养室,和大鼠饲养室,分别测定兔饲养室和大鼠饲养室。

屏障系统[Ⅰ]和[Ⅱ],单个饲养室容积 172 m³,房间顶部进风口 6 个,四角回风口 4 个。屏障设施保持环境条件为:温度(22 ± 2)℃,湿度(50 ± 10)%,照明为昼夜交替各 12 h。通风换气次数为 15 次/h 左右。

1.2.2 饲养方式:饲养生产工作时间为 7:00 ~ 15:00,实验期间喷雾消毒^[2]时间为 13:00。大小鼠采用塑料笼具饲养,颗粒饲料饲喂,单独水瓶饮水,每

日更换部分笼具。添加饲料及更换水瓶。小鼠笼底板面积 0.042 m²,笼内高度 0.13 m,室内采用饲养架多层放置,小鼠房间放置小鼠笼 1 728 个,小鼠饲养密度 10 笼/m³,大鼠笼底板面积 0.09 m² 笼内高度 0.18 m,大鼠房间放置大鼠笼 600 个,饲养密度约为 3.5 笼/m³,兔采用双层铁笼饲养,底板面积 0.45 m²,笼内高度 0.42 m,兔房放置兔笼 288 个,饲养密度约为 1.67 笼/m³。

1.3 落下菌与尘埃粒子的采集

普通琼脂培养皿和激光粒子计数器于超净台紫外线照射 20 min 后,用无菌密封袋密封,用酒精喷雾消毒后从传递窗传入。采样人员经过沐浴后穿着无菌隔离衣,无菌隔离脚套,戴无菌口罩和无菌手套后进入。

培养皿放置位置:动物房一条对角线上取 3 点,正中一处,两边距墙 1 m 各放一个,清洁走廊,污染走廊等间距放置 3 个。放置方法:放置于地面,平板盖打开,扣放于平板旁,计时 30 min。尘埃粒子采样方法:使用激光粒子计数器测定粒子浓度直径 ≥ 0.3 μm 粒子浓度,采样器放置高度 1 m,采集空气体积设定 1 L。

放置时间:00:00,06:00,11:00,16:00,样品重复采集 3 次。

1.4 样品处理

1.4.1 动物房落下菌数量分析:采集好的培养皿放入 37℃ 生化培养箱,培养 24 ~ 48 h,取出于超净台中计录菌落数,属于相同房间的培养皿加权取平均值为平均菌落数。采用 SPSS 分析软件^[3]分析统计结果。

1.4.2 空气尘埃粒子数统计:从激光粒子计数器读取空气中直径 ≥ 0.3 μm 尘埃粒子数量,采用 SPSS 分析软件分析统计结果。

2 结果

2.1 落下菌落数量分析

屏障系统 1 内清洁走廊、污物走廊工作日落下菌数量在 11:00 时均显著高于其余时间($P < 0.05$),在其它三个时间差异不显著($P > 0.05$)。小鼠饲养室工作日落下菌数量在 11:00 时显著高于 06:00 时和 16:00 时($P < 0.05$),与 00:00 时差异不显著($P > 0.05$),小鼠饲养室工作日落下菌数量在

00:00 时、06:00 时和 16:00 时三个时间差异都不显著($P>0.05$)。

屏障系统 1 内清洁走廊、污物走廊休息日落下菌数量在各时间段差异均不显著($P>0.05$)。小鼠饲养室在休息日落下菌数量各时间点差异均不显著($P>0.05$)。(表 1)。

屏障系统 2 兔饲养室工作日落下菌数量在 11:00 时均显著高于其余时间($P<0.05$)，在其它三个时间差异不显著($P>0.05$)。大鼠饲养室工作日落下菌数量在 11:00 时显著高于 06:00 时和 16:00 时($P<0.05$)，在 16:00 时显著低于 00:00 时和 06:00 时($P<0.05$)，00:00 时与 06:00 之间差异不显著($P>0.05$)。

屏障系统 2 兔饲养室休息日落下菌数量在各时间段差异均不显著($P>0.05$)。大鼠饲养室休息日落下菌数量在各时间段差异均不显著($P>0.05$)。(表 2)。

2.2 直径 $\geq 0.3\ \mu\text{m}$ 尘埃粒子数量分析

屏障系统 1 内清洁走廊、污物走廊工作日尘埃粒子数在 11:00 时均显著高于其余时间($P<0.05$)，在其它三个时间差异不显著($P>0.05$)。小

鼠饲养室工作日尘埃粒子数在 11:00 时显著高于其余时间($P<0.05$)，在 00:00 时显著高于 06:00 时和 16:00 时($P<0.05$)。

屏障系统 1 内清洁走廊、污物走廊休息日尘埃粒子数在各时间段差异均不显著($P>0.05$)。小鼠饲养室休息日尘埃粒子数在 00:00 时显著高于其余时间($P<0.05$)，在 06:00 时显著高于 11:00 时($P<0.05$)，11:00 时和 16:00 时差异不显著($P>0.05$) (表 3)。

屏障系统 2 兔饲养室工作日尘埃粒子数在 11:00 时均显著高于其余时间($P<0.05$)，在 16:00 时显著高于 00:00 时($P<0.05$)，00:00 时与 06:00 时差异不显著($P>0.05$)。大鼠饲养室工作日尘埃粒子数在 16:00 时显著低于其余时间($P<0.05$)，在其它三个时间差异不显著($P>0.05$)。

屏障系统 2 大鼠饲养室休息日尘埃粒子数在各时间段差异均不显著($P>0.05$)兔饲养室休息日尘埃粒子数在 11:00 时均显著高于其余时间($P<0.05$)，在 16:00 时显著高于 00:00 和 06:00 时($P<0.05$)，00:00 时与 06:00 时差异不显著($P>0.05$)。(表 4)。

表 1 屏障系统 1 内小鼠饲养室和洁净与污物走廊落下菌的检测结果字典
Tab.1 Detection of airfall bacteria in the mice room and corridor of barrier system I

区域 Area	工作状态 Working state	时间 Time			
		00:00	06:00	11:00	16:00
小鼠屏障洁净走廊 Clean corridor in mice barrier	工作 work	1.00 ± 0.87	1.44 ± 1.01	6.56 ± 2.74	0.67 ± 0.87
	休息 rest	1.33 ± 1.22	0.89 ± 1.05	1.11 ± 1.05	1.22 ± 1.09
小鼠屏障污物走廊 Pollution corridor in mice barrier	工作 work	12.00 ± 2.83	11.89 ± 4.20	33.33 ± 9.72	9.33 ± 3.39
	休息 rest	15.78 ± 4.92	13.22 ± 5.17	12.22 ± 5.26	11.11 ± 5.40
小鼠房 Mice room	工作 work	73.67 ± 24.50	53.33 ± 25.78	87.22 ± 34.20	46.78 ± 24.45
	休息 rest	76.89 ± 34.56	55.00 ± 23.17	52.67 ± 23.02	53.56 ± 22.48

单位:个/皿(直径 9 cm, 30 min);Note: Unit: cfu/dish, Φ9 cm,30 min)
注:房间及走廊休息日无饲喂及生产活动,工作日为星期一,休息日为星期日,该清洁及污染走廊是饲养小鼠的屏障系统走廊。
Note: Unit: cfu/dish, Φ9 cm,30 min). Monday is working day and Sunday is rest day. There is no feeding and production activities in the mouse barrier system on the rest day.

表 2 屏障系统 2 内大鼠饲养室与兔饲养室落下菌的检测结果字典
Tab.2 Detection of airfall bacteria in the rat room and rabbit room of barrier system II

区域 Area	工作状态 Working state	时间 Time			
		00:00	06:00	11:00	16:00
大鼠房 Rat room	工作 Work	211.89 ± 34.22	185.67 ± 35.10	226.00 ± 46.00	103.55 ± 26.21
	休息 Rest	209.33 ± 37.02	181.78 ± 43.23	177.11 ± 28.22	186.22 ± 33.92
兔房 Rabbit room	工作 Work	27.67 ± 8.09	44.44 ± 13.31	87.78 ± 24.42	36.11 ± 13.03
	休息 Rest	28.89 ± 11.08	43.56 ± 16.94	44.11 ± 19.03	40.67 ± 20.63

单位:个/皿(直径 9 cm, 30 min);注:兔房休息日仅正常饲喂,无生产活动,大鼠房间休息日无饲喂及生产活动,工作日为星期一,休息日为星期日。
Note: Unit: cfu/dish, Φ9 cm,30 min). Monday is working day, and Sunday is rest day. There is only normal feeding but no production activity in the rabbit room on the rest day. There is no feeding and production activities in the rat room on rest day.

表 3 屏障系统 I 内小鼠饲养室和洁净与污物走廊尘埃粒子的检测结果

Tab. 3 Detection of dust in the mice room and corridor of barrier system I

区域 Area	工作状态 Working state	时间 Time			
		00:00	06:00	11:00	16:00
小鼠屏障洁净走廊 Clean corridor in mice barrier	工作 Work	225.78 ± 70.55	236.56 ± 64.41	330.67 ± 76.53	259.33 ± 50.55
	休息 Rest	228.00 ± 63.08	220.89 ± 53.78	231.78 ± 46.98	224.11 ± 61.81
小鼠屏障污物走廊 Pollution corridor in mice barrier	工作 Work	317.22 ± 41.27	304.00 ± 38.10	969.22 ± 100.04	299.89 ± 39.43
	休息 Rest	293.22 ± 99.36	313.11 ± 43.36	288.67 ± 34.60	291.44 ± 34.58
小鼠房 Mice room	工作 Work	623.11 ± 83.70	516.89 ± 79.90	766.22 ± 116.35	531.66 ± 61.41
	休息 Rest	644.00 ± 53.56	528.78 ± 48.89	464.33 ± 38.35	487.89 ± 43.58

单位:个/升(直径 $\geq 0.3 \mu\text{m}$)

注:房间及走廊休息日无饲喂及生产活动,工作日为星期一,休息日为星期日,该清洁及污染走廊是饲养小鼠的屏障系统走廊。

Note: Unit: pc/L, ($\Phi \geq 0.3 \mu\text{m}$). Monday is working day, and Sunday is rest day. There are clean and pollution corridors in the mouse barrier system. There is no feeding and production activity in the mice room on the rest day.

表 4 屏障系统 2 内大鼠饲养室与兔饲养室尘埃粒子的检测结果

Tab. 4 Detection of dust in the rat room and rabbit room of barrier system II

区域 Area	工作状态 Working state	时间 Time			
		00:00	06:00	11:00	16:00
大鼠房 Mice room	工作 Work	2624.22 ± 443.75	2336.22 ± 651.30	2511.33 ± 487.11	1911.89 ± 392.34
	休息 Rest	2656.78 ± 484.58	2344.11 ± 444.15	2263.44 ± 469.40	2285.56 ± 373.61
兔房 Rabbit room	工作 Work	326.44 ± 89.46	358.67 ± 84.24	784.56 ± 130.82	433.00 ± 86.27
	休息 Rest	348.78 ± 77.95	362.56 ± 79.55	724.11 ± 80.64	497.89 ± 44.81

单位:个/升(直径 $\geq 0.3 \mu\text{m}$) Unit: No/L, ($\Phi \geq 0.3 \mu\text{m}$)

注:兔房休息日仅正常饲喂,无生产活动,大鼠房间休息日无饲喂及生产活动,工作日为星期一,休息日为星期日。

Note: Unit: pc/L, ($\Phi \geq 0.3 \mu\text{m}$). Monday is working day and Sunday is rest day. There is only normal feeding but no production activities in the rabbit room, and no feeding and production activities in the rat room on rest day.

3 讨论

在符合国家标准的静态实验动物屏障系统引入实验动物繁育群后,屏障系统内各项环境和空气微生物指标均会发生明显的变化。洁净走廊,污物走廊和动物饲养室内落下菌和尘埃粒子数量均会升高,但由于动物生产的周期性和动物生活习性的相对固定,落下菌和尘埃粒子又随着昼夜和不同生产时间产生规律性的变化。

屏障系统[I]内洁净走廊、污物走廊和小鼠饲养室和屏障系统[II]内大鼠饲养室和兔饲养室内在工作日落下菌数量 11:00 时均显著高于 06:00 时和 16:00 时,表明饲养活动可使屏障内落下菌与尘埃粒子数明显升高,人的饲养管理操作,如更换笼器具、配种、离乳、添加饲料等工作,可以增加落下菌与尘埃粒子的数量,这与实验型屏障系统变化规律不同,实验型屏障生产系统工作量较小,落下菌数量相对较低^[4]。而洁净走廊、污物走廊、小鼠饲养室、大鼠饲养室和兔饲养室内落下菌数量在 16:00 时明显降低,表明饲养结束后喷雾消毒可使屏障内落下菌与尘埃粒子数明显下降,喷雾形成的大量液

滴在空气中会黏附大量尘埃粒子,由于重力作用很快降落到地面上,减少了空气中落下菌与尘埃粒子的数量。大小鼠饲养室在 00:00 时落下菌和尘埃粒子数量较高,表明屏障内大、小鼠夜间活动较多,这与大、小鼠属于夜行性动物的行为特征有关。屏障系统[I]内污物走廊内落下菌与尘埃粒子数始终高于洁净走廊,主要原因是洁净走廊由于其空气压力梯度最高,排风能力强,细菌和尘埃含量始终保持在一个较低的水平。污物走廊在工作日则由于开门、门缝及压差等缘故,使饲养室内的细菌与尘埃粒子进入,造成污物走廊细菌和尘埃粒子数量升高。

屏障系统[II]中大鼠饲养室内的空气落下菌和尘埃粒子数量都远远高于兔饲养室和屏障系统 I 中小鼠饲养室。其原因在于:大、小鼠均为塑料饲养笼内铺设木屑垫料笼养,但大鼠的体型和活动量均大于小鼠,且饲料、饮水和排泄物都多于小鼠,大鼠的活动可以使饲养笼中的细菌和尘埃更多的漂浮在空气中。

在屏障系统[I]和[II]中,污物走廊、小鼠饲养室、兔和大鼠饲养室内落下菌和尘埃粒子数量均高于国家标准 GB14925—2001 对静态实验动物环

境设施的要求,

其中大鼠饲养室都在 100 个/皿以上,而小鼠和兔饲养室在 100 个/皿以下,其中小鼠饲养室与张华琼等报道的结果动物饲养间空气落下菌数可控制在 100 个/皿以下一致^[5]。而洁净走廊除工作日 11:00 外,落下菌数量均在 3 个/皿以下。可见,动态屏障系统内各功能区域落下菌与尘埃粒子数量与区域功能,工作状态和动物品种有关。因此,在实际生产和环境监测中,应根据饲养的动物种类、密度和饲养方式和不同功能区域来分别制定相应的落下菌和尘埃粒子监控指标。

空气中的尘埃粒子的数量多少可以直接反映空气的洁净程度,在屏障系统中,空气经过预初效,初效,中效,高效四级过滤后进入,对于直径 $\geq 0.3\ \mu\text{m}$ 的尘埃,可达到 99.97% 的过滤效果^[6,7]。屏障中尘埃粒子主要来源为动物和人的活动,通过对空气中尘埃粒子的监测,可以间接反映动物与人的活动情况,而空气中的微生物一般附着在尘埃粒子上,尘埃粒子浓度的变化可以间接反映饲养室内空气细菌量的变化。尘埃粒子对动物和人的影响大部分是通过呼吸道引起的,少量是通过皮肤、眼及粘膜。直径小于 $2.5\ \mu\text{m}$ 的尘埃粒子可以直接进入肺部导致疾病发生。空气中悬浮的尘埃粒子数量分布又呈现一定的规律,在动态屏障系统空气中直径 $\geq 0.3\ \mu\text{m}$ 的尘埃粒子数最多,且变化较明显,故本研究选择直接 $\geq 0.3\ \mu\text{m}$ 尘埃粒子作为空气洁净度指标来评价屏障系统空气洁净变化程度。

屏障系统[I]和[II]中各功能区域直径 $\leq 0.3\ \mu\text{m}$ 尘埃粒子数量都显著高于静态屏障,且不同功

能区域与不同饲养室之间尘埃粒子浓度不同。

本实验通过对生产型实验动物屏障设施内的空气落下菌与尘埃粒子进行实时监控,发现屏障系统各功能区域空气落下菌与尘埃粒子变化有一定规律性,且变化在一定范围内,在实际生产中,如果细菌数量或者尘埃粒子远远高于平均值,则有可能发生了管理上的问题,动物微生物控制质量下降或者设备运转出现故障等,这对于评价实验动物屏障设施的动态运行,制定屏障设施动态环境控制参数以及屏障设施的维护,实验动物微生物质量的监控都有积极的参考意义。

参考文献:

- [1] 国家质量技术监督局. GB14925—2001,实验动物环境及设施[S]. 2001. 26—28.
- [2] 宗阿南,董婉维,张艳华,等. 动物实验室房间消毒方法的研究[J]. 中国比较医学杂志,2003,13(6):381—384.
- [3] 翟青新,沈黎,瞿叶清,等. 实验动物设施静态与动态空气落下菌数检测结果分析[J]. 实验动物科学,2008,25(3):39—41.
- [4] 柯贤福,周莎桑,楼琦,等. 实验动物屏障系统微生物动态状况[J]. 中国比较医学杂志,2010,20(3):47—50.
- [5] 张华琼,黄麟,夏爽,等. 动物繁育设施空气落下菌数观察与分析[J]. 实验动物与比较医学,2007,27(3):195—197.
- [6] 徐平. 实验动物管理与使用操作技术手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,2007:335—336.
- [7] 宗阿南,史晓萍,福山侑荣,等. 屏障系统动物室单向流与乱流空气净化方式的细菌比较分析[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(8):476—477.

[修回日期] 2011-08-22