

基于甲醛发生的生物安全实验室终末灭菌设备灭菌效果测试^{*}

王 伟 李昌文 周 宇 张 伟 刘怀然 陈洪岩 夏长友

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 动物疫病防控全国重点实验室, 黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室, 哈尔滨 150069)

摘要: **目的** 测试并评价自主研发的甲醛发生型生物安全实验室终末灭菌设备的灭菌效果, 为设备应用与推广提供科学依据。 **方法** 以嗜热脂肪地芽孢杆菌或枯草杆菌黑色变种芽孢为生物指示剂, 采用单因素变量法系统测试多聚甲醛用量、灭菌作用时间、环境相对湿度 3 个关键参数对生物安全实验室隔离器灭菌效果的影响。 **结果** 在每立方米空间投加 3、1.5、0.75 g 多聚甲醛且灭菌 6 h, 均可实现完全灭菌效果; 固定多聚甲醛投加量 0.75 g/m³, 作用 2、4、6 h 均灭菌合格; 固定投加量与灭菌时间, 环境相对湿度 70%、75%、80% 条件下灭菌效果合格。 **结论** 自主研发的甲醛发生型终末灭菌设备在优化参数下对生物安全实验室隔离器具有优良、可靠的灭菌效果, 可以用于生物安全实验室终末消毒灭菌。

关键词: 生物安全; 终末灭菌; 甲醛发生; 灭菌效果

中图分类号: Q95-3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1006-6179(2026)03-0015-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2026.03.003

Test on the Sterilization Efficacy of a Terminal Sterilization Equipment for Biosafety Laboratories Based on Formaldehyde Generation

Wang Wei, Li Changwen, Zhou Yu, Zhang Wei, Liu Huairan, Chen Hongyan, Xia Changyou
(Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Laboratory Animal and Comparative Medicine, State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China)

Abstract: Objective To test and evaluate the sterilization efficacy of a self-developed formaldehyde-generating terminal sterilization equipment for biosafety laboratories, and to provide scientific support for its application and promotion. **Methods** Using *Geobacillus stearothermophilus* or *Bacillus subtilis* var. *niger* spores as biological indicators, the single-factor variable method was applied to systematically investigate the effects of three key parameters—paraformaldehyde dosage, sterilization duration, and ambient relative humidity—on the sterilization efficacy of isolators in biosafety laboratories. **Results** Complete sterilization was achieved with paraformaldehyde dosages of 3, 1.5, and 0.75 g/m³ for 6 h of sterilization. With a fixed dosage of 0.75 g/m³, valid sterilization was attained after 2, 4, and 6 h of exposure. Under the fixed dosage and duration, qualified sterilization efficacy was obtained at relative humidity levels of 70%, 75%, and 80%. **Conclusion** The self-developed formaldehyde generating terminal sterilization equipment exhibits excellent and reliable sterilization efficacy for isolators in biosafety laboratories under optimized parameters, and can be used for terminal disinfection and sterilization in biosafety laboratories.

收稿日期: 2026-03-23

^{*} 基金项目: 国家重点研发计划(2022YFF0711200); 中央引导地方科技发展专项(ZY25JD15); 中国农业科学院基本科研业务费专项(1610302022018)。

作者简介: 王 伟(1979—), 男, 副研究员, 研究方向为实验动物与比较医学。E-mail: wangwei02@caas.cn。

通信作者: 夏长友(1972—), 男, 研究员, 研究方向为实验动物与比较医学。E-mail: xiachangyou@caas.cn。

Key words: biosafety; terminal sterilization; formaldehyde generation; sterilization efficacy

生物安全实验室是探索细菌和病毒等病原微生物致病性、免疫机制,以及开发药物和疫苗等生物制品等活动的核心设施,是现代生物科学研究的重要基础设施,更是国家生物安全体系的关键环节^[1]。它通过配备实验室设施设备、个人防护装备等物理屏障,并建立良好的操作规程和严格的管理措施控制生物危害,达到保障实验人员、实验动物和环境安全,防止病原微生物造成危害性污染的目的^[2]。生物安全实验室在科研、医疗及公共卫生等领域具有不可替代的重要作用。由于实验活动涉及高致病性病原微生物操作,生物安全实验室内部环境易形成污染,因此对终末消毒灭菌的可靠性提出了极高的要求。环境终末灭菌是指在实验活动结束后、设施设备年度维护、检测或发生生物安全意外事件后,对实验室内部环境进行全面、彻底的消毒灭菌处理,以消除潜在的病原微生物污染^[3-4],是生物安全实验室防止病原微生物扩散、保障实验室生物安全的关键环节之一。

生物安全实验室常用的化学消毒灭菌方式包括液体消毒剂(如次氯酸钠溶液、过氧乙酸等)擦拭和气体熏蒸消毒(如戊二醛、二氧化氯、过氧化氢、臭氧、甲醛等)^[5]。然而现有的终末灭菌方式仍然存在不足,部分化学消毒剂对人员和环境存在潜在危害。甲醛熏蒸消毒因其广谱杀菌能力和较低成本而被广泛应用,但其操作过程复杂且耗时较长,此外其刺激性气味及致癌风险对操作人员构成威胁。因此,开发一种更加高效、安全且环保的终末灭菌设备成为生物安全实验室建设中的重要课题。

针对我国生物安全实验室的需求,本团队自主研发了一种基于甲醛发生的生物安全实验室终末灭菌设备。本研究将该环境终末灭菌设备应用于生物安全实验室内的隔离器进行消毒灭菌,通过多因素条件优化试验,评价该灭菌设备的性能和灭菌效果,明确运行参数,为本设备的示范应用和推广提供数据支撑。

1 材料和方法

1.1 试验材料与检测仪器

1.1.1 试验对象:自主研发的生物安全实验室终末灭菌设备。

1.1.2 生物指示剂:采用嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*, ATCC 7953)或枯草杆菌黑色变种芽孢(*Bacillus subtilis* var. *niger*)作为生物指示剂。

1.1.3 仪器设备:手持式温湿度计(HM41,芬兰vaisala, $\pm 1.5\%$ RH, $\pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$)、气体检测仪(MS400, Eranntex)。以上设备为黑龙江省实验动物质量监督检验站所有,均经过检定校准。

1.1.4 试验环境:生物安全实验室配套的隔离器。

1.2 生物指示剂的布放

按照灭菌效果最不利点布点原则,将生物指示剂布放于隔离器内操作区、高效过滤器送风口最远端、传递窗,每个点位放置1支,统一编号并记录位置,确保覆盖气体最难到达区域。

1.3 试验设计

本试验采用单因素变量法,依次考察多聚甲醛投加量、灭菌作用时间、环境相对湿度3个关键因素对灭菌效果的影响,每个条件均独立重复试验3次,以生物指示剂全部无菌生长为灭菌合格判定依据。

1.3.1 多聚甲醛投加量对灭菌效果的影响 (1)固定条件:灭菌时间6 h,环境相对湿度70%。(2)试验组设置:按隔离器空间体积计算,设置4个投加量:3、1.5、0.75、0.375 g/m³。(3)操作流程:将对应质量多聚甲醛加入设备发生器,启动设备运行灭菌,达到设定时间后终止,回收生物指示剂进行培养检测。

1.3.2 灭菌作用时间对灭菌效果的影响 (1)固定条件:多聚甲醛投加量0.75 g/m³(由1.3.1确定的有效低剂量),环境相对湿度70%。(2)试验组设置:设置4个作用时间,1、2、4、6 h。(3)操作流程:保持甲醛发生与灭菌模式一致,仅改变作用时长,到达设定时间后停止灭菌,取样培养。

1.3.3 环境相对湿度对灭菌效果的影响 (1)固定条件:多聚甲醛0.75 g/m³,灭菌时间2 h(由前述试验确定的最优组合)。(2)试验组设置:设置6个湿度梯度,60%、65%、70%、75%、80%、85%。(3)操作流程:通过设备加湿系统调节隔离器内湿度,稳定后启动灭菌,全程记录温湿度,灭菌结束后取样培养。

1.3.4 验证试验:在上述单因素试验确定的最优参

数组合下,连续重复验证 3 次,确认灭菌效果的稳定性、可靠性与重现性。

1.4 灭菌效果判定

灭菌处理后,将所有生物指示剂置于规定条件下恒温培养 48 h,同时设置未灭菌阳性对照。灭菌合格:指示剂培养液保持原有蓝色,无菌生长;阳性对照:培养液变为黄色,指示菌生长正常。所有生物指示剂均合格,判定该组条件灭菌有效。

2 结果

2.1 多聚甲醛用量对灭菌效果的影响

在灭菌时间固定为 6 h、环境相对湿度固定为 70%的条件下,投加 3、1.5、0.75 g/m³ 多聚甲醛,经过灭菌处理并培养 48 h 后,所有布放的生物指示剂培养液均保持原有蓝色,未出现任何变色现象,表明芽孢完全被杀灭,灭菌合格率为 100%;当投加量降至 0.375 g/m³ 时,部分生物指示剂培养液由蓝色变为黄色,与阳性对照结果一致,表明芽孢未被完全杀灭,灭菌不合格(图 1,表 1)。结果表明多聚甲醛投加量 0.75 g/m³ 为满足灭菌要求的最低有效用量。

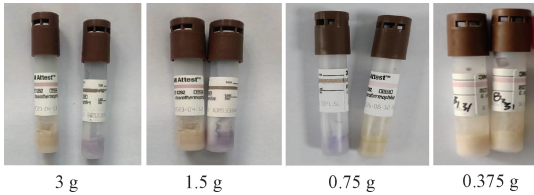


图 1 多聚甲醛用量对灭菌效果的影响
Fig.1 Influence of polyformaldehyde amounts on sterilization efficiency

表 1 多聚甲醛不同用量灭菌效果

Table 1 Sterilization effect of different amounts of polyformaldehyde				
试验编号	多聚甲醛质量/g	作用时间/h	湿度/%	灭菌效果
1	3	6	70	合格
2	1.5	6	70	合格
3	0.75	6	70	合格
4	0.375	6	70	不合格

2.2 灭菌时间对灭菌效果的影响

在多聚甲醛投加量固定为 0.75 g/m³、环境相对湿度固定为 70%的条件下,不同灭菌时间对灭菌效果影响显著。当灭菌时间为 2、4、6 h 时,所有生物指示剂培养后均未变色,灭菌合格;当灭菌时间缩短至 1 h 时,生物指示剂出现明显变色,灭菌不合格

(图 2,表 2)。结果表明,在本设备条件下,2 h 即可达到灭菌效果,显著短于传统甲醛熏蒸所需时长。

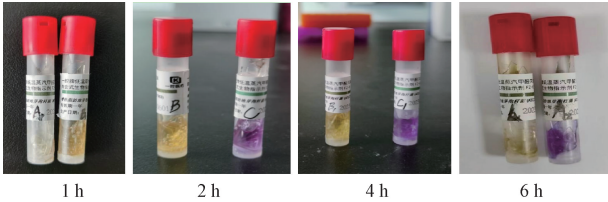


图 2 灭菌时间对灭菌效果的影响
Fig.2 Influence of sterilization times on sterilization efficiency

表 2 不同灭菌时间的灭菌效果

Table 2 Sterilization effect at different sterilization times				
试验编号	作用时间/h	多聚甲醛质量/g	相对湿度/%	灭菌效果
5	1	0.75	70	不合格
6	2	0.75	70	合格
7	4	0.75	70	合格
8	6	0.75	70	合格

2.3 环境湿度对灭菌效果的影响

在多聚甲醛投加量 0.75 g/m³、灭菌时间 2 h 的固定条件下,当相对湿度为 70%、75%、80%时,所有生物指示剂均无菌生长,灭菌合格。当相对湿度偏低(60%、65%)时,甲醛气体穿透力不足,灭菌不合格。当相对湿度偏高(85%)时,甲醛气体易在物体表面冷凝,导致灭菌失败(表 3)。结果表明,本设备灭菌的适宜湿度区间为 70%~80%。

表 3 不同环境湿度灭菌效果

Table 3 Sterilization effect under different environmental humidity conditions				
试验编号	湿度/%	多聚甲醛质量/g	作用时间/h	灭菌效果
9	60	0.75	2	不合格
10	65	0.75	2	不合格
11	70	0.75	2	合格
12	75	0.75	2	合格
13	80	0.75	2	合格
14	85	0.75	2	不合格

2.4 验证试验结果

为确认最优参数的可靠性与稳定性,采用多聚甲醛 0.75 g/m³、灭菌时间 2 h、相对湿度 70%组合参数,连续进行 3 次独立重复验证试验。结果显示,3 次验证试验中,所有布放的生物指示剂灭菌合格率均为 100%。表明该组合参数稳定、可靠、可重复,可作为该设备的标准运行参数。

3 讨论

生物安全实验室必须确保足够的安全条件,以避免与生物材料处理、基因操作、耐药菌传播等相关的潜在危险^[6]。在动物实验、实验操作、样品处理、动物残体和危废物处理等多个环节均存在病原污染风险,因此需要建立规范、可验证、可追溯的终末灭菌程序。实验结束后,对实验室屏障房间、隔离器、IVC 等环境进行安全、有效的灭菌措施,建立客观、科学的灭菌效果评价方法,对于保障生物安全实验室安全、保护实验人员和外部环境是十分必要的。蒸汽和气体消毒剂是生物安全实验室消毒灭菌常用的消毒技术^[7],气体灭菌因穿透力强、覆盖全面,成为隔离器、屏障环境终末处理的首选方式。当前,用于生物安全实验室空气净化主要的气体消毒剂包括甲醛、二氧化氯气体及汽化过氧化氢等^[8]。

在众多消毒灭菌方案中,甲醛对生物安全实验室空间环境的消毒灭菌效果最为理想。甲醛消毒包括熏蒸消毒、降解、通风排放甲醛 3 个阶段,完成消毒和排放一般需要 12 h 以上。甲醛对环境进行消毒灭菌的优点有杀菌谱较广、消毒灭菌效果好、性质稳定、价格低廉^[9-10],因此被广泛用于制药厂、实验动物饲养设施和动物实验设施等。但甲醛毒性和刺激性较强,并且甲醛消毒灭菌后的残留会对环境造成污染,对人员来说有致癌风险,因此逐渐被使用者淘汰。本团队研发的环境终末灭菌设备利用物理和化学方法回收多余的甲醛,解决了甲醛的二次污染问题。

甲醛消毒灭菌是依靠多聚甲醛或甲醛溶液挥发的甲醛气体使微生物蛋白质烷基化、变性凝固进行的,但其消毒灭菌效果受到温度、湿度、压力等多种因素的影响。温度过低可能使甲醛聚合而失去作用;湿度过大影响甲醛气体的流动,并且增加设施设备内表面对甲醛气体的吸附作用而影响消毒效果,但湿度过小会影响甲醛气体的吸附而影响消毒效果。本研究采用单因素变量与重复验证的规范实验设计,依次确定了多聚甲醛投加量、灭菌时间、环境湿度的最优范围。本研究结果显示,在发生器中添加每立方米添加 3、1.5、0.75 g 多聚甲醛生物指示剂的杀菌率为 100%;发生器中添加 0.75 g 多聚甲醛,消毒灭菌时间为 2、4、6 h,生物指示剂的杀菌率

为 100%;发生器中添加 0.75 g 多聚甲醛,消毒灭菌时间为 2 h,环境湿度为 70%、75%、80%,生物指示剂的杀菌率为 100%,均能达到灭菌效果。本团队自主研发的甲醛发生设备在 0.75 g/m³、≥ 2 h、70%~80% 湿度条件下,可实现隔离器完全灭菌,表明该环境终末灭菌设备适合应用于生物安全实验室。

生物指示剂通过芽孢存活状况验证消毒灭菌的彻底性^[11],本研究仅利用嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)或枯草杆菌黑色变种芽孢(*Bacillus subtilis* var. *niger*)作为生物指示剂对自主研发的设备进行消毒效果的测试。不同生物安全实验室操作的病原微生物种类不同,对消毒剂的抵抗力也存在差异^[12],后续可进一步开展对不同细菌和病毒的消毒灭菌效果的研究。

本研究通过对生物安全实验室隔离器内的环境进行消毒灭菌,证明了本团队自主研发的生物安全型环境终末灭菌设备消毒灭菌效果良好。在此基础上,建议在产品升级与产业化时可增加甲醛浓度检测传感器,以实时监测甲醛浓度,保证消毒效果和安全排放;同时在与环境连接的管道增加加热功能,以避免甲醛在管道内附着;此外,还可以引入智能气流控制技术,提高甲醛气体在环境空间内的均匀性。

参考文献

- [1] 郝天腾,周俊廷,徐新喜,等. 实验室智能化技术与智能化生物安全实验室研究进展[J]. 中国公共卫生,2026,42(6): 749-754.
- [2] 赵焱. 高级别生物安全实验室降低高致病性病毒实验生物安全防护水平的科研策略[J]. 病毒学报,2021,37(3): 755-757.
- [3] 曹国庆,李晓斌,党宇. 高等级生物安全实验室空间消毒模式风险评估分析[J]. 暖通空调,2017,47(3): 51-56.
- [4] 陈阳阳,陶明,万浩强,等. 4.4.2 类生物安全三级实验室废弃物处理、终末消毒与关键设备分析[J/OL]. 兰州大学学报(医学版),2025-12-12. <https://link.cnki.net/urlid/62.1194.R.20251210.1938.002>.
- [5] 黄翠,汤华山,梁慧刚,等. 高等级生物安全实验室消毒灭菌关键技术与设备[J]. 实验室研究与探索,2022,41(4): 308-312.
- [6] 高婉莹,吴宗震,左鲲鹏,等. 生物安全与科技进步:中国生物安全实验室发展研究[J]. 中国生物工程杂志,2025,45(2/3): 164-175.

(下转至第 26 页)