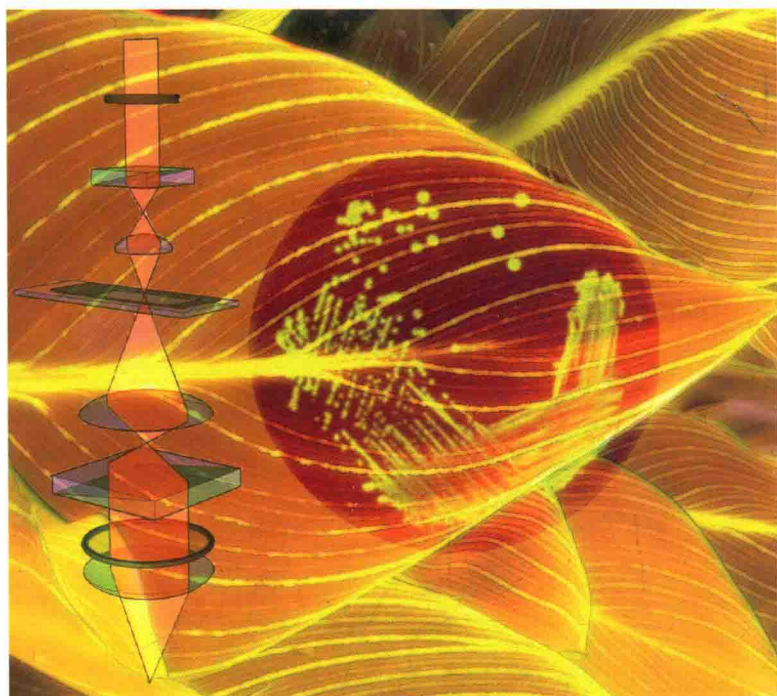


生物工程
生物技术
系列

普通高等教育“十三五”规划教材



应用微生物学实验

叶蕊芳 张晓彦 | 主 编
郑一涛 | 副主编



化学工业出版社

普通高等教育“十三五”规划教材

应用微生物学实验

叶蕊芳 张晓彦 主编

郑一涛 副主编



化学工业出版社

· 北京 ·

全书分为概述、微生物实验和附录三部分。概述主要讲述微生物实验课程开设的目的与意义、相关实验记录与报告的规范、实验室规则及安全注意事项、生物安全等内容。实验部分精选了微生物实验的无菌环境和操作,微生物实验的重要仪器,显微镜使用和形态学观察,微生物的培养、分离及生长,微生物遗传学技术,分子生物学技术,微生物检测和鉴定,微生物技术的应用等相关内容的实验。附录内容包括常用染色液的配制、常用培养基配方、常用缓冲液的配制。

本书以综合性大学、师范、医药和农林院校有关专业的大学本科生为对象,也可供其他微生物实验技术工作者参考。

应用微生物学实验

主编 赵玉清 叶蕊芳

副主编 袁一联

图书在版编目(CIP)数据

应用微生物学实验/叶蕊芳, 张晓彦主编.——北京:
化学工业出版社, 2015.9
普通高等教育“十三五”规划教材
ISBN 978-7-122-24720-9

I. ①应… II. ①叶… ②张… III. ①微生物学-应用-
实验-高等学校-教材 IV. ①Q939.9-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 171023 号

责任编辑: 赵玉清
责任校对: 宋 玮

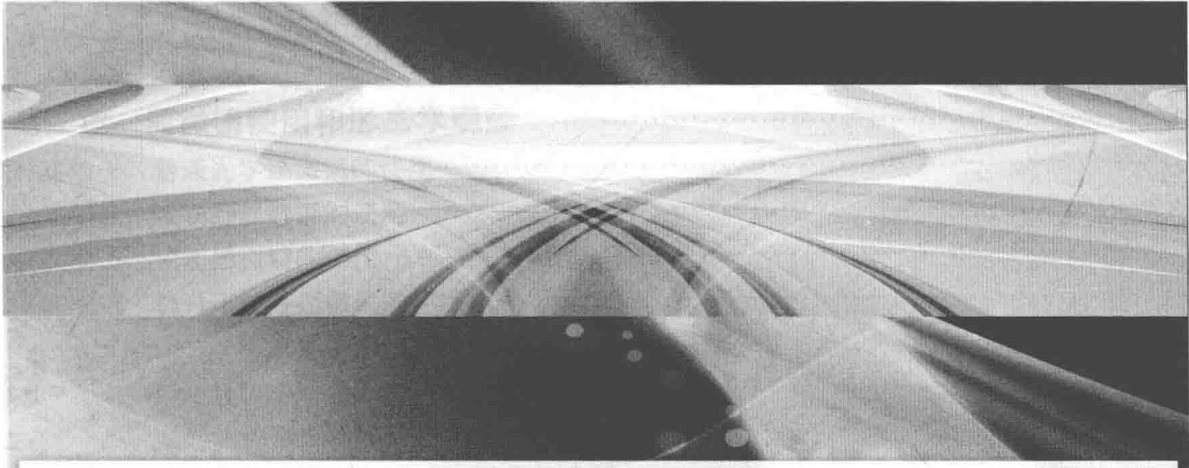
文字编辑: 周 侗
装帧设计: 张 辉

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)
印 装: 三河市延风印装有限公司
787mm×1092mm 1/16 印张 11½ 字数 284 千字 2015 年 10 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899
网 址: <http://www.cip.com.cn>
凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 28.00 元

版权所有 违者必究



前言

全书分为概述、微生物实验和附录三部分。概述主要讲述微生物实验课程开设的目的与意义、相关实验记录与报告的规范、实验室规则及安全注意事项、生物安全等内容。实验部分精选了微生物实验的无菌环境和操作,微生物实验的重要仪器,显微镜使用和形态学观察,微生物的培养、分离及生长,微生物遗传学技术,分子生物学技术,微生物检测和鉴定,微生物技术的应用等相关内容的实验。既有涉及对加强学生微生物实验基本操作和技能的传统实验,也有一些设计型和综合型实验。这些实验既可以单独进行,也可以组合起来成为综合型实验,便于安排教学。附录内容包括常用染色液的配制、常用培养基配方、常用缓冲液的配制,可供读者参考。

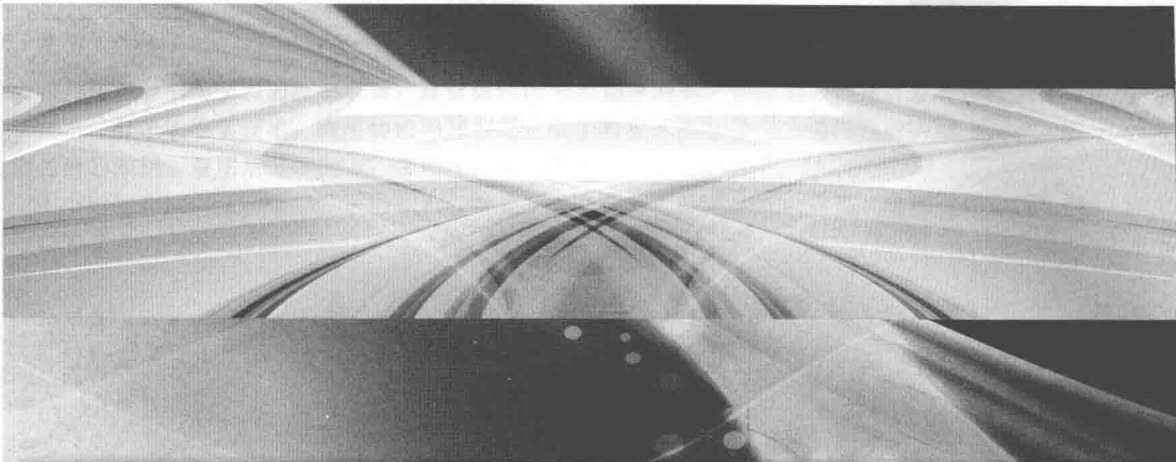
本书以综合性大学、师范、医药和农林院校有关专业的大学本科生为对象,在编写的时候总结了编者三十多年的微生物实验教学经验及学生参加工作后的反馈建议,注重操作细节的描述,以实现操作的可重复性。本书也可供其他微生物实验技术工作者参考。同时本书在每个实验中都设计了预习思考题,以帮助学生将对理论课上学到的知识进行总结归纳,将实验知识与理论教学更好地联系在一起。本书可作为微生物实验课程的教材,也可以作为微生物实验技术的工具书。

本书第一章、第四章(实验九、十、十三、十六、十七)、第五章、第八章(实验三十三、三十四)由叶蕊芳编写,概述、第二章由邱勇隽编写,第三章、第六章由郑一涛编写,第四章(实验十一、十二、十四、十五)、第七章、第八章(实验三十、三十一、三十二)由张晓彦编写。

本书内容不妥之处,敬请读者批评指正。

编者

于华东理工大学



目 录

概 述	1
第一章 微生物实验的无菌环境和操作	5
第一节 微生物实验的无菌环境	5
一、无菌室	5
二、超净工作台	6
三、环境无菌检测的方法	8
第二节 微生物实验的无菌操作	14
一、无菌操作前的准备工作	14
二、灭菌和消毒方法	14
第二章 微生物实验的重要仪器	23
一、普通光学显微镜	23
二、高压蒸汽灭菌锅	24
三、移液器	25
四、电子天平	27
五、pH 计	28
六、分光光度计	29
七、超净工作台	30
八、恒温培养箱	30
九、摇瓶培养设备	30
十、冰箱及超低温冰箱	31
十一、离心机	32
十二、真空冷冻干燥机	33
十三、PCR 仪	34
十四、厌氧培养箱	35

十五、生物安全柜	36
十六、电热恒温干燥箱	37
第三章 显微镜使用和形态学观察	39
实验一 普通光学显微镜的使用	41
实验二 暗视野显微镜的使用	47
实验三 相差显微镜的使用	50
实验四 微分干涉差显微镜的使用	53
实验五 荧光显微镜的使用	56
实验六 微生物大小测定	59
实验七 微生物的形态观察	63
实验八 微生物染色技术	66
第四章 微生物的培养、分离及生长	72
实验九 培养基的配制和高压蒸汽灭菌	73
实验十 微生物的接种分离和纯培养	78
实验十一 亨盖特法厌氧培养基的制备	82
实验十二 厌氧微生物的分离培养	86
实验十三 噬菌体的分离纯化和效价测定	90
实验十四 微生物的计数——血细胞计数法	93
实验十五 微生物的计数——平板活菌计数法	96
实验十六 比浊法测定细菌生长曲线	99
实验十七 干重和湿重法测定微生物的生长量	102
第五章 微生物遗传学技术	104
实验十八 微生物的诱变和突变株的筛选	105
实验十九 营养缺陷型突变株的选育	108
实验二十 菌种保藏技术	112
第六章 分子生物学技术	119
一、目的基因的获得	119
二、载体系统的选择	119
三、目的基因与载体的重组	119
四、重组载体引入受体细胞	120
五、重组受体细胞的筛选和鉴定	120
六、目的基因在受体细胞内的表达	120
实验二十一 细菌总 DNA 的提取和琼脂糖凝胶电泳	121
实验二十二 基本 PCR 技术扩增 DNA 片段	124
实验二十三 碱裂解法和试剂盒法提取质粒 DNA	126
实验二十四 DNA 分子的限制性内切酶消化、片段纯化、连接	130
实验二十五 感受态细胞的制备	133
实验二十六 重组 DNA 转化宿主细胞	135

第七章 微生物检测和鉴定	137
实验二十七 微生物的营养及生理生化反应	138
实验二十八 应用 API-20E 细菌鉴定系统鉴定肠杆菌科和部分其他革兰氏阴性杆菌	142
实验二十九 以细菌 16S rRNA 序列和真菌 ITS 序列为基础的菌种鉴定	146
第八章 微生物技术的应用	150
实验三十 土壤中纤维素分解菌的分离	151
实验三十一 食品样品中菌落总数的测定	159
实验三十二 食品样品中大肠菌群 MPN 值的测定	161
实验三十三 原生质体的制备	167
实验三十四 原生质体的融合	169
附录 I 常用染色液的配制	171
附录 II 常用培养基配方	173
附录 III 常用缓冲液的配制	176
参考文献	178

概 述

1. 微生物实验课程开设的目的与意义

微生物学是生命科学的重要组成部分，是研究生命科学基础理论的主要学科，也是应用广泛的重要学科，微生物学的实验技术和方法已广泛应用于生命科学研究的各个方面和农业、工业、医药、环保等国民经济的各个领域。

微生物实验是培养相关专业学生独立研发能力的重要起点，通过微生物实验课程的学习，训练学生牢固树立无菌操作的概念，正确熟练地掌握微生物实验基本操作技能，在深入学习微生物学基本理论的基础上加深理解，培养学生发现问题、分析问题、解决问题的能力，实事求是、严肃认真的科学态度，独立思考、勇于创新的开拓精神，以及认真负责、团结协作、勤俭节约、爱护设备的优良作风，建立良好的实验习惯（实验前认真预习准备，实验中仔细观察记录，实验后定量分析总结）。

2. 微生物实验的特点

随着生物技术的飞速发展，微生物所涉及的领域也愈加广泛，包括生物制药、农业微生物、环境微生物、生物燃料、海洋微生物开发、微生物采油和食品微生物等领域。研究这些生物技术领域的基础是微生物技术，因此微生物技术在生物技术领域中有着不可替代的重要作用。纵观微生物技术的发展，从最初的酿造工业到现代发酵工业，从显微镜发明到电子显微镜的问世，从纯培养技术的创立到莱德伯格的细菌接合实验，从微生物的细胞水平到分子生物学水平，可以肯定微生物技术是在实践中发展起来的。微生物实验技术包括微生物的形态观察、微生物的纯培养技术、微生物的生长及对微生物生长的控制、微生物遗传育种和菌种保藏、微生物的细胞融合和基因工程，而贯穿微生物实验始终的是无菌操作。

微生物实验是一门操作性很强的课程，注重动手能力的培养，如无菌操作技术、微生物染色与显微镜观察技术、培养基制备与微生物的分离纯化技术，这些操作在不同实验中不断重复与强化，以期望学生能对这些基本操作达到正确无误、运用熟练的要求。

微生物实验是一门实用性很强的课程，是生命科学其他课程实验的基础，基因工程、细

胞生物学、组织工程、发酵工程等专业课程实验都需要使用到微生物实验的无菌操作概念和基本操作技能,通过微生物实验将这些基本操作熟记于心,对于今后专业课程的理论学习和实践操作都有很大的帮助。

微生物实验是一门观察性很强的课程,微生物实验过程需要对微生物进行培养和分析,微生物的培养过程时间长,过程控制对于最终的结果有很大的影响,并且这些影响可以根据相关理论对其结果进行预期,因此需要认真操作,仔细观察,以确认对过程进行了正确的控制。

3. 基本要求

(1) 知识基础和实验操作技能

想要做好微生物实验,无机化学、有机化学、分析化学等先修课程的基础知识和实验操作技能是必需的,玻璃器皿及其他实验用具的洗涤、化学试剂的称量、危险化学品的使用注意事项、各类分析设备的使用、原始数据有效数字的正确记录及处理、实验误差的控制、实验结果的分析及正确表述等,都是在微生物实验中同样需要注重的。

由于微生物培养过程同化学过程相比更复杂、影响因素更多、试验周期更长,如微生物的培养基成分、培养基灭菌的条件、种子的质量与数量、微生物的培养条件等都有可能对实验结果造成影响,带来误差,因此微生物实验要注重操作细节的正确描述,合理设计实验操作方法,减少各类操作的差异性,保证实验操作的可重复性,减少平行实验的误差。

(2) 微生物实验室规则

① 实验前必须认真预习,充分阅读实验教材并复习微生物学教材相关理论知识,明确实验的目的、原理、操作步骤,懂得每一步操作的意义,清楚每一个所需记录的原始数据,了解所用仪器的使用方法,否则不得开始实验。

② 每个同学在进入实验室开始正式实验之前,应该了解实验室相关安全设备的位置,包括电的总闸、水的总开关、煤气的总擎、消防设施(消防龙头、灭火器、砂箱、防火毯、防毒面具等)所在位置,知道逃生通道所在。

③ 每个同学在开始实验之前,应该了解实验室用电、用水、用煤气的安全注意事项,阅读过实验过程中所需使用到的化学试剂的化学安全说明书(material safety data sheet, MSDS),并按要求进行相关试剂的使用操作和安全防护准备。

④ 实验室要保持整洁,与实验无关的物品请勿带入实验室;进入实验室进行实验应该穿干净的白大褂,着不露趾的软底鞋(不得穿拖鞋、凉鞋),女同学要把长头发束好,确保束发的绳子不会松开。

⑤ 每个同学都应自觉遵守实验室纪律,不迟到、不早退,在实验室内不大声谈笑,更不得奔跑、玩耍及打闹;在实验室内不准饮食,不得将饮料、食品带入实验室,不准用嘴湿润铅笔、标签等物品,切勿以手指或其他物品接触面部,避免感染。

⑥ 实验过程中要听从指挥,严格按照操作规程进行实验,并把实验数据、过程现象和结果及时、如实地记录在实验记录本上,文字要简练、准确,完成实验记录经老师检查签字确认后,方可离开实验室。

⑦ 使用仪器时,应小心仔细,严格按照操作规程操作使用,防止损坏仪器,仪器一旦发生故障,应立即停止运行,切断电源后报修,不得自行动手检修。

⑧ 实验室内严禁吸烟!煤气灯应随用随关,乙醇、丙酮、乙醚等有机溶剂不能用明火

直接加热并应远离火源操作和放置。

⑨ 所有仪器，特别是玻璃器皿，必须稳妥地放在实验桌的中央位置。如有打破仪器，应第一时间通知老师，碎玻璃应用硬壳容器包装后丢弃，不能直接投入垃圾桶。

⑩ 实验完毕，要清洁仪器，将实验台面打扫干净，实验台面应保持整洁，仪器、药品摆放整齐，公用试剂使用完毕，要立即将瓶盖盖严后归还原处；洗净双手；检查煤气开关、水龙头，关闭门窗及电灯，拉下电闸后方可离开实验室。离开实验室前应认真、仔细、负责地检查水、电、煤气情况，防止发生安全事故。

⑪ 对于当时不能得到结果而需要连续观察的实验，需要在样品上做好标签，注明样品的名称（what）、制备人（who）以及时间（when），同时每次观察都要做好相应的记录，以便于最后的汇总分析。

⑫ 实验室内的物品，未经许可，严禁带出室外，如果借用物品应办理登记手续。

⑬ 在实验室内嗅到煤气，应立即通知老师，关上煤气总掣，打开所有窗门，灭掉附近明火，若气味持续，立刻疏散到安全地方，千万不能开关电器，如排风扇、开关电灯、摁门铃、打手机！

（3）实验记录及报告规范

① 实验报告本是专门用于记录实验相关事宜的本子，不能用于其他用途。

② 实验报告本的封面应该包含至少以下基本信息：使用人的姓名，该报告本使用的起始-终止日期，实验报告本的每一页都应该有编号，在使用完毕时，不得缺页。

③ 实验报告分为实验目的、实验原理、实验器材、实验步骤、实验记录、结果与讨论六部分，实验前要做好相关实验的预习工作，在实验报告本上完成实验目的、实验原理、实验器材、实验步骤四部分内容以及实验记录表格的设计，实验过程中将实验记录记入报告本，再完成相关的结果与讨论，就完成了一份实验报告。

④ 实验记录基本要求是字迹书写清晰，数据记录明了，如需修改，不得使用修正液或笔涂改，而应该用笔划一条删除线，标明需要删除的错误内容，然后在其旁边写出正确的结果，并且本人在修改处签名确认。

⑤ 实验中的每一个操作，在实验记录本中都可以找到原始记录。

⑥ 实验中使用的仪器设备需要记录具体的生产厂家、型号、规格及使用条件等信息。

⑦ 在每次完成实验后，实验记录要经过任课教师当场签字确认后方可离开实验室。

4. 生物安全

（1）生物安全的概念

生物安全（biological safety, bio-safety）——是指安全转移、处理和使用那些利用现代生物技术而获得的遗传修饰生物体，避免其对生物多样性和人类健康可能产生的潜在影响。该影响狭义指现代生物技术研究、开发、应用以及转基因生物的跨国越境转移可能对生物多样性、生态环境和人类健康产生潜在的不利影响；广义指与生物有关的各种因素对社会、经济、人类健康及生态系统所产生的危害或潜在风险。生物类实验室需要进行生物安全管理，这不仅直接关系到实验室工作人员的健康和安全，而且关系到公众安全、环境安全和社会稳定。

（2）生物因子的分类（级）

生物因子的分类（级）规定是根据病原微生物的传染性、感染后对个体或者群体的危害

程度分类。我国将病原微生物分为四类：第一类病原微生物，是指能够引起人类或者动物非常严重疾病的微生物，以及我国尚未发现或者已经宣布消灭的微生物；第二类病原微生物，是指能够引起人类或者动物严重疾病，比较容易直接或者间接在人与人、动物与人、动物与动物之间传播的微生物；第三类病原微生物，是指能够引起人类或者动物疾病，但一般情况下对人、动物或者环境不构成严重危害，传播风险有限，实验室感染后很少引起严重疾病，并且具备有效治疗和预防措施的微生物；第四类病原微生物，是指在通常情况下不会引起人类或者动物疾病的微生物。第一类、第二类病原微生物统称为高致病性病原微生物。

生物安全实验室是通过实验室设计建造、实验设施的配置、个人防护装备的使用，通过严格遵守预先制定的安全操作程序和管理规范等综合措施，确保操作生物危险因子的工作人员不受实验对象的伤害，确保周围环境不受其污染的实验室。2004 年，我国发布了 GB19489《实验室生物安全通用要求》（2008 年重新修订），规定了我国生物安全实验室的使用规范：生物安全防护水平为一级的实验室（BSL-1/ABSL-1），适用于第四类病原微生物；生物安全防护水平为二级的实验室（BSL-2/ABSL-2），适用于第三类病原微生物；生物安全防护水平为三级的实验室（BSL-3/ABSL-3），适用于第二类病原微生物；生物安全防护水平为四级的实验室（BSL-4/ABSL-4），适用于第一类病原微生物。

(3) 相关的法律法规

2004 年实验室 SARS 感染事件发生后，我国对于实验室生物安全越来越重视，相关法律法规不断出台，2004 年 8 月 28 日第十届全国人民代表大会常务委员会第十一次会议修订通过的《中华人民共和国传染病防治法》于 2004 年 12 月 1 日起开始实施，2006 年《中华人民共和国刑法修正案》明确规定：在生产、作业中违反有关安全管理、强令他人违章冒险作业、安全生产设施或者安全生产条件不符合国家规定，因而发生重大伤亡事故或者造成其他严重后果的，对直接责任人和其他直接责任人，追究刑事责任。国务院 2003 年及 2004 年也颁布了《突发公共卫生事件应急条例》、《医疗废物管理条例》以及《病原微生物实验室生物安全管理条例》条例。中华人民共和国卫生部 2006 年也制定了《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定》、《人间传染的病原微生物名录》、《人间传染的高致病性病原微生物实验室和实验活动生物安全审批管理办法》等一系列管理规定。

(4) 微生物实验中生物安全的实施

在微生物实验中要注重生物安全，一方面要注意保重自身健康，在实验前先要明确所使用菌种的生物安全等级，根据其生物安全等级选择合适的实验室条件及采取适当的防护措施；另一方面要注意避免因为操作不当导致环境污染，及时将各种使用后的带菌液体采用适当的方式进行灭活，避免各类病原微生物、质粒、抗性基因片段在环境中传播。

第一章

微生物实验的无菌环境和操作

微生物是人肉眼看不见的微小生物，而且微生物的营养类型多、繁殖快，因此无论是土壤、水还是空气中都有微生物的存在。我们在微生物的研究或应用中，要进行微生物的分离、接种和培养的操作，在这些微生物技术操作中要注意防止环境中的“杂菌”污染我们研究的纯培养物、接种物之间的交叉污染和接种物污染到环境中，这就是微生物的无菌操作技术。它是保证微生物研究和应用正常进行的关键，因此在进行微生物实验时，一定要牢固树立无菌操作这一概念。

第一节 微生物实验的无菌环境

无菌环境是人们利用物理或化学方法，使微生物数量在一可控制空间内降低到最低限度。无菌环境是相对而言的。常见的无菌环境有无菌室、超净工作台等。

一、无菌室

无菌室通常由更衣间、缓冲间、操作间三部分组成。其面积不能过大，一般在 10m^2 左右。无菌室的建立应远离交通主干道，以减少因人、汽车等的运动而使空气中尘土飞扬对环境质量的影响。内部装修则应平整、光滑，尽量减少棱角，除照明灯外，还需安装用于消毒无菌室的紫外线杀菌灯（一般为 30W ）；门窗密封好，为减少空气的流动，无菌室的门一般使用拉门。室内应装有调温设备和净化空气输入装置，最好还安装一个专用于物品进出的传递窗。

1. 无菌室的消毒

新建的无菌室，初次使用前可采用甲醛熏蒸，具体操作如下：用不锈钢杯按无菌室体积装一定量的高锰酸钾（ $2\sim 3\text{g}/\text{m}^3$ ），用双层纱布盖住杯口，然后缓缓加入 $36\%\sim 40\%$ 的甲醛溶液（ $30\sim 35\text{ml}/\text{m}^3$ ），人立刻离开，密闭 12h 后备用。为了减少甲醛的刺激，在使用无菌室 $1\sim 2\text{h}$ 之前，用相同量的氨水挥发中和。以后可用紫外线杀菌灯照射，即在使用无菌室之前，用紫外线灯照射 30min ，进行杀菌。

为保持无菌室的无菌状态，无菌室必须经常消毒，一般在每天使用前用 0.1% 新洁尔灭

溶液（溴化二甲基十二烷基苄铵，简称苯扎溴铵）或 70% 的乙醇溶液擦拭操作台面、地面，并用紫外线照射 0.5~1h，每月用甲醛或过氧乙酸熏蒸 2h。

此外，无菌室内物品应力求简洁，凡与无菌室工作无直接关系的物品一律不能放入，以利保持无菌状态，避免因物品长期堆放形成死角。室内的空气与外界空气必须绝对隔绝，预留的通气孔道也应尽量密闭。通气孔道一般设有上下气窗，气窗面积宜稍大，并覆盖 4 层纱布以起到简单滤尘的作用。

由于有时实际情况往往不易全面做到理想的状态，因此只要严格无菌操作手续，在门窗敞开的室内，有一超净台的保护，接种的污染率是可以满足实验或生产的无菌要求的。

2. 无菌室的空气系统

微生物是活的粒子，某些产孢子或芽孢的微生物在不利的状态下会变成孢子或芽孢，它们有很强的抵抗不良环境的能力和很长的潜伏期，是一种持续的潜在隐患。微生物会在空调系统中不断积存，一旦条件合适，就会大量繁殖。而不论普通空调系统还是工业净化空调系统都很容易在局部产生积尘和水分（或高湿度），形成一次污染。这一次污染（尘埃与水分的积累）恰恰为微生物的繁殖提供了必要条件，有可能导致细菌大量定殖、繁殖，产生大量有害的代谢物，形成了所谓的二次污染。尤其在空调箱整个系统停机期间（如下班或放假），会由于室外空气渗入、箱内温度回升以及冷凝水的积水不断蒸发，箱内的空间成为细菌繁殖的理想场所。因此一般的无菌室可不安装空调系统，一定要安装通风空调系统的无菌室，应按要求安装并定期清洁。

二、超净工作台

它是一种无菌操作设备，有垂直层流和水平层流两种气流形式。通过两级过滤吹出洁净气流，并将尘埃粒子和生物颗粒带走，形成无尘无菌的工作环境，也就是说超净工作台创造了一个无菌的小环境。超净工作台操作方便，比较舒适，工作效率较高，一般开机 10min 以上即可使用。在企业的生产中，如果接种工作量较大，需要经常长久地工作时，超净工作台是一个理想的设备。如需要严格的无菌操作要求时，在超净工作台上还要放置酒精灯，并在酒精灯的火焰旁操作。当然将超净工作台放在无菌室中效果更好。

1. 超净工作台的结构

超净工作台主要由鼓风机和空气过滤介质组成，另外附加工作台。

它由三相电机作鼓风动力，功率 145~260W，将空气通过由特制的微孔泡沫塑料片层叠组成的“超级滤清器”后吹送出来，经过“超级滤清器”，除去了大于 0.3 μ m 的尘埃、真菌和细菌孢子等，从而形成连续不断的无尘无菌的超净空气层流。超净空气的流速为一般为 24~30m/min，这样的空气流速已足够防止附近空气可能袭扰而引起的污染，也不会妨碍采用酒精灯对器械等的灼烧消毒。

超净工作台进风口在背面或正面的下方，金属网罩内有一普通泡沫塑料片或无纺布（粗过滤），用以阻拦大颗粒尘埃，而工作台正面的金属网罩内是超级滤清器（精过滤），即所谓的二级过滤。对于“粗过滤”应常检查、拆洗，如发现泡沫塑料老化，要及时更换。超级滤清器如因使用年久，尘粒堵塞，风速减小，不能保证无菌操作时，应进行更换。

有些超净工作台上还装有紫外线灯，但应安装在照明灯罩之外，因为紫外线不能穿透普通玻璃，并错开照明灯平行排列。

2. 超净工作台的操作

超净工作台电源多采用三相四线制，其中有一零线，连通机器外壳，应接牢在地线上，另外三线都是相线，工作电压是 380V。三线接入电路中有一定的顺序，如线头接错了，风机会反转，虽然风机无明显不正常情况，但超净工作台正面无风（可用酒精灯火焰观察动静），此时应及时切断电源，并将其中任何两相的线头交换一下位置再接上，就可解决。三相线如只接入两相，或三相中有一相接触不良，则机器声音很不正常，应立即切断电源仔细检修，否则会烧毁电机。

超净工作台使用寿命的长短与空气的洁净程度有关，因此一定要保持房间的清洁。一般情况下，为延长其使用寿命，超净工作台的进风罩不要对着敞开的门或窗。

3. 超净工作台的种类

根据超净工作台的结构和气流形式，将其分为水平层流超净工作台和垂直层流超净工作台（图 1-1）。水平层流超净工作台，其气流方向为自前往后水平送风；垂直层流超净工作

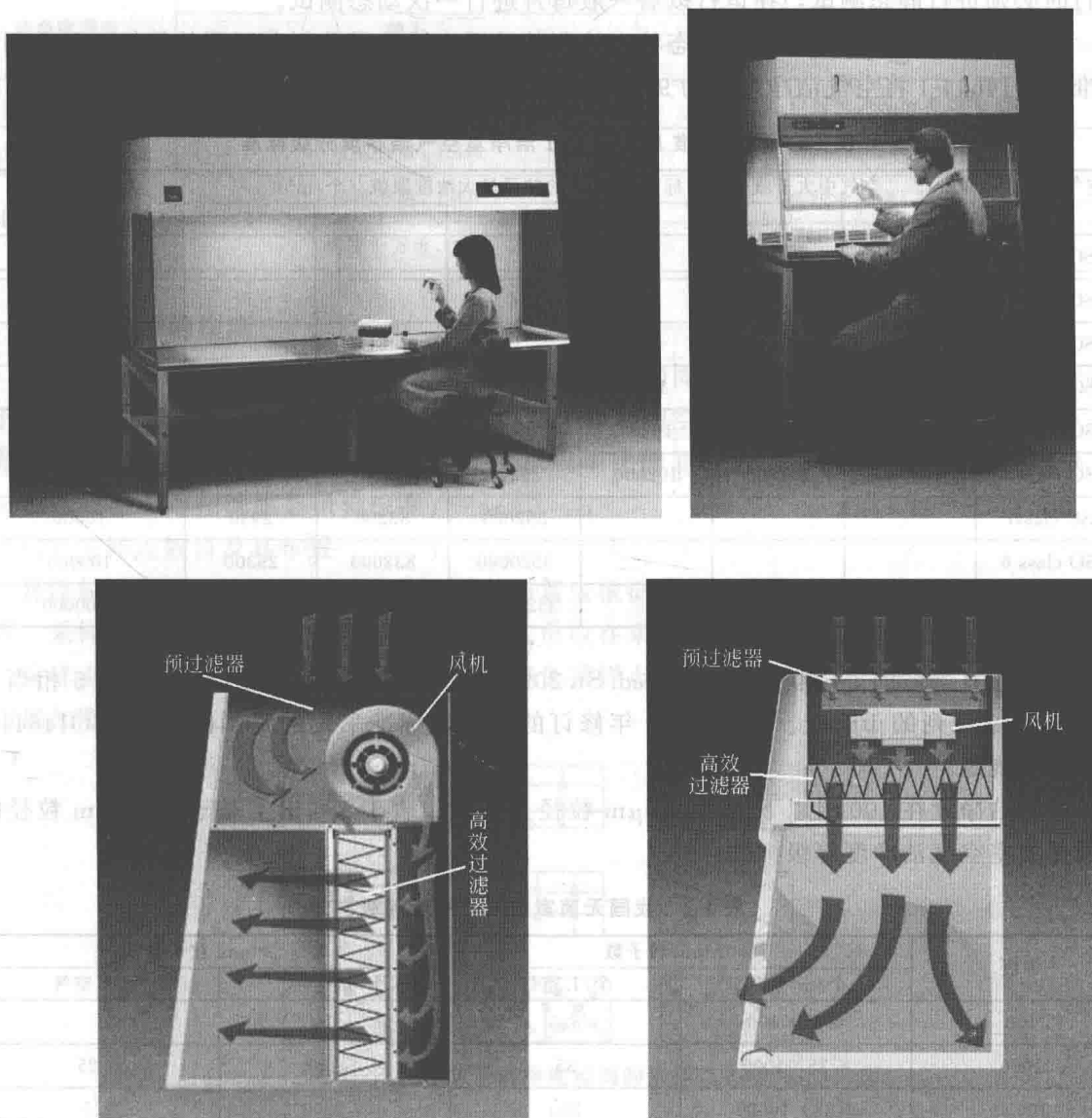


图 1-1 超净工作台

台，其气流方向自上往下垂直送风。这两种都能满足实验的需要，一般选择时看哪种送风形式对实验影响最小。通常都选用垂直层流超净工作台，因为气流为垂直流形，准封闭式台面，可有效防止操作异味对人体的刺激。如果在超净工作台里要放显微镜，那垂直送风的气流会被显微镜阻挡，此时选择水平层流超净工作台比较好。

三、环境无菌检测的方法

无菌室必须定期检查其灭菌效果和操作过程中空气的污染程度。环境的无菌检测主要是检测无菌室的尘埃粒子和微生物（浮游菌和沉降菌），有静态测试和动态测试两个指标。

静态测试：无菌环境的工艺设备已安装完毕，净化空气调节系统已处于正常运行状态，但还未交付使用的情况下进行的测试。

动态测试：无菌环境已处于正常工作状态下进行的测试。

一般无菌环境的空气洁净度等级以静态控制为先决条件。在无菌室调试结束，即将开始运行时必须进行静态测试，在运行以后一般每月进行一次动态测试。

无菌室的洁净度根据静态和动态状态检测其悬浮尘埃粒子数划分不同的等级。目前国际标准 ISO14644-1 将空气洁净度分为 9 个等级（表 1-1）。

表 1-1 国际标准 ISO14644-1 洁净室空气洁净度分级标准

空气洁净度等级	空气中大于或等于所标粒径(μm)的粒子最大浓度限值/(个/m³)						美国联邦标准 (Fed. St. 209 系列)
	0.1	0.2	0.3	0.5	1	5	
ISO class 1	10	2					
ISO class 2	100	24	10	4			
ISO class 3	1000	237	102	35	8		1
ISO class 4	10000	2370	1020	352	83		10
ISO class 5	100000	23700	10200	3520	832	29	100
ISO class 6	100000	237000	102000	35200	8320	293	1000
ISO class7				352000	83200	2930	10000
ISO class 8				3520000	832000	29300	100000
ISO class 9				35200000	8320000	293000	1000000

另外还有著名的美国联邦标准（Fed. St. 209 系列），ISO14644-1 的 ISO class 5 相当于 Fed. St. 209 系列的 100 级。我国 2001 年修订的洁净室标准采用的是国际标准 ISO14644-1 中的相关规定。

一般洁净度在 100 级以下的用 0.5μm 粒径为标准。表 1-2 列出了基于≥0.5μm 粒径的我国无菌室空气洁净度等级标准。

表 1-2 我国无菌室空气洁净度等级

等级	≥0.5μm 粒子数		≥5μm 粒子数	
	个/m³空气	个/L 空气	个/m³空气	个/L 空气
100	≤35×100	3.5		
1000	≤35×1000	35	≤250	0.25
10000	≤35×10000	350	≤2500	2.5
100000	≤35×100000	3500	≤25000	25

现在 2010 年版 GMP 标准采用 ABCD 四个等级（表 1-3），传统标准和 2010 年版 GMP 标准的比较见表 1-4。

表 1-3 2010 年版 GMP 标准

洁净度等级	悬浮粒子最大允许数/(个/m³)			
	静态		动态	
	≥0.5μm	≥5μm	≥0.5μm	≥5μm
A	3520	20	3520	20
B	3520	29	352000	2900
C	352000	2900	3520000	29000
D	3520000	29000	无规定	无规定

表 1-4 空气洁净度传统标准和 2010 年版 GMP 标准的比较

洁净度等级	悬浮粒子最大允许数/(个/m³)			
	静态		动态	
	≥0.5μm	≥5μm	≥0.5μm	≥5μm
A	传统百级,以粒径≥5μm 考虑为 ISO4.8		传统百级,以粒径≥5μm 考虑为 ISO4.8	
B	传统百级, ISO5		传统万级, ISO7	
C	传统万级, ISO7		传统十万级, ISO8	
D	传统十万级, ISO8		无规定	

1. 尘埃粒子的检测

检测的尘埃粒子一般颗粒直径为 0.001~1000μm 的固态和液态物质。对于粒径大于或等于 0.5μm 的悬浮粒子可用光散射粒子计数器，即利用空气中的悬浮粒子在光的照射下产生光散射现象，散射光的强度与粒子的表面积成正比的原理来检测。对于粒径大于或等于 5μm 的悬浮粒子可用滤膜显微镜检测。

(1) 采样点数目及其布置

悬浮粒子洁净度监测的采样点数目及其布置应根据实验或产品的生产及工艺关键操作区设置。采样点应避开回风口，采样时，测试人员应在采样口的下风侧。

采样点的布局：采样点布置力求均匀，避免采样点在某局部区域过于稀疏。通常的采样点布局如图 1-2。

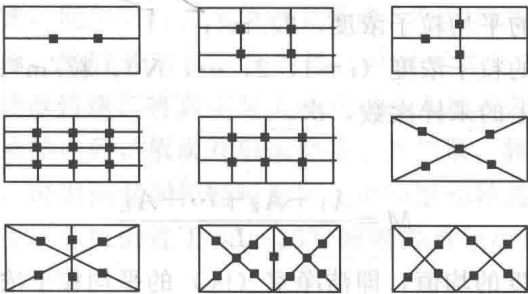


图 1-2 悬浮粒子洁净度监测的采样点布局

最少采样点数目见表 1-5。

表 1-5 悬浮粒子洁净度监测最少采样点数目

面积/m ²	洁 净 度 级 别		
	100	10000	100000
<10	2~3	2	2
≥10~<20	4	2	2
≥20~<40	8	2	2
≥40~<100	16	4	2
≥100~<200	40	10	3
≥200~<400	80	20	6
≥400~<1000	160	40	13
≥1000~<2000	400	100	32
2000	800	200	63

注：表中的面积，对于单向流洁净室，指的是送风面积；对于非单向流洁净室，指的是房间面积。单向流即层流，指气流沿着平行流线，以一定流速、单一通路、单一方向流动。非单向流指气流有多个通路循环特性或气流方向不平行。

采样点的位置：采样点一般在离地面 0.8m 高度的水平面上均匀布置。如采样点大于 5，可以在离地面 0.8~1.5m 高度的区域内分层布置，但每层至少 5 个取样点。

对任何小洁净室或局部空气净化区域，采样点的数目不得少于 2 个，总采样次数不得小于 5 次。每个采样点的采样次数可以多于 1 次，且不同采样点的采样次数可以不同。

采样量：不同洁净度级别每次最小的采样量见表 1-6。

表 1-6 悬浮粒子洁净度监测最小采样量

洁净度级别	采样量/(L/次)	
	≥0.5μm	≥5μm
100	5.66	—
10000	2.83	8.5
100000	2.83	8.5

(2) 结果计算

悬浮粒子浓度的采样数据可按下列步骤进行统计计算。

采样点的平均粒子浓度：

$$A = \frac{C_1 + C_2 + \cdots + C_N}{N} \tag{1-1}$$

式中 A——某一采样点的平均粒子浓度，粒/m³；

C_i——某一采样点的粒子浓度 (i=1, 2, …, N)，粒/m³；

N——某一采样点上的采样次数，次。

平均粒子浓度的均值：

$$M = \frac{A_1 + A_2 + \cdots + A_L}{L} \tag{1-2}$$

式中 M——平均粒子浓度的均值，即洁净室（区）的平均粒子浓度，粒/m³；

A_i——某一采样点的平均粒子浓度 (i=1, 2, …, L)，粒/m³；

L——某一洁净室（区）内的总采样点数，个。

标准误差：