

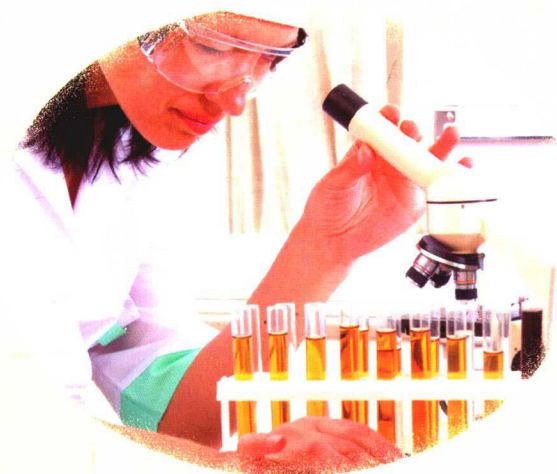
全国普通高等院校
生命科学类“十二五”规划教材



微生物学实验

程水明 刘仁荣 主编

Microbiology Experiments



华中科技大学出版社
<http://www.hustp.com>

全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材

微生物学实验

主 编 程水明 刘仁荣
副主编 王宜磊 方尚玲 贾建波
谢永芳 胡仁火
编 委 (以姓氏笔画为序)
王宜磊 菏泽学院
毛露甜 惠州学院
方尚玲 湖北工业大学
任莹利 新乡医学院
刘仁荣 江西科技师范大学
李俊峰 青岛科技大学
李爱贞 集美大学
何建民 天津医科大学
何晓红 重庆邮电大学
张久明 青岛科技大学
张建新 河南师范大学
张桂香 济南大学
胡仁火 湖北科技学院
贾建波 淮阴工学院
唐文竹 大连工业大学
程水明 广东石油化工学院
谢永芳 重庆邮电大学

华中科技大学出版社

中国·武汉

内 容 简 介

本书是全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材。

本书根据微生物学实验教学的特点,按照循序渐进的原则,将教学内容分为微生物学实验基础知识、微生物学实验基本操作技术、微生物学基础性实验、微生物学应用技术实验、微生物学综合性实验和微生物学实验技能的测评六个部分,在实验内容的编排上,尽量做到与微生物学理论教学同步,并在附录中详细罗列了常见培养基、染色液、试剂、酸碱指示剂和消毒剂的配制和配方,以方便实际使用。

本书可供综合性、师范类、农林、医学等院校相关专业本科生使用,也可供研究生、相关研究及实验技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学实验/程水明,刘仁荣主编. —武汉:华中科技大学出版社,2014.5
ISBN 978-7-5609-9707-0

I. ①微… II. ①程… ②刘… III. ①微生物学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 101499 号

微生物学实验

程水明 刘仁荣 主编

策划编辑:罗 伟

责任编辑:叶丽萍 罗 伟

封面设计:刘 卉

责任校对:何 欢

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321915

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:武汉鑫昶文化有限公司

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:14.75

字 数:382千字

版 次:2015年3月第1版第1次印刷

定 价:38.00元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材

编委会



主任委员

余龙江 华中科技大学教授,生命科学与技术学院副院长,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物工程与生物技术专业教学指导分委员会委员,2013—2017 教育部高等学校生物技术、生物工程类专业教学指导委员会委员

副主任委员(排名不分先后)

胡永红 南京工业大学教授,南京工业大学研究生院副院长

李 钰 哈尔滨工业大学教授,生命科学与技术学院院长

任国栋 河北大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物学基础课程教学指导分委员会委员,河北大学学术委员会副主任

王宜磊 菏泽学院教授,2013—2017 教育部高等学校大学生物学课程教学指导委员会委员

杨艳燕 湖北大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物科学专业教学指导分委员会委员

曾小龙 广东第二师范学院教授,副校长,学校教学指导委员会主任

张士瑾 中国海洋大学教授,2006—2012 教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会生物科学专业教学指导分委员会委员

委员(排名不分先后)

陈爱葵	胡仁火	李学如	刘宗柱	施文正	王元秀	张 峰
程水明	胡位荣	李云玲	陆 胤	石海英	王 云	张 恒
仇雪梅	贾建波	李忠芳	罗 充	舒坤贤	韦鹏霄	张建新
崔韶晖	金松恒	梁士楚	马 宏	宋运贤	卫亚红	张丽霞
段永红	李 峰	刘长海	马金友	孙志宏	吴春红	张 龙
范永山	李朝霞	刘德立	马三梅	涂俊铭	肖厚荣	张美玲
方 俊	李充璧	刘凤珠	马 尧	王端好	徐敬明	张彦文
方尚玲	李 华	刘 虹	马正海	王金亭	薛胜平	郑永良
耿丽晶	李景蕙	刘建福	毛露甜	王伟东	闫春财	周 浓
郭晓农	李 梅	刘 杰	聂呈荣	王秀利	杨广笑	朱宝长
韩曜平	李 宁	刘静雯	彭明春	王永飞	于丽杰	朱长俊
侯典云	李先文	刘仁荣	屈长青	王有武	余晓丽	朱德艳
侯义龙	李晓莉	刘忠虎	邵 晨	王玉江	咎丽霞	宗宪春

全国普通高等院校生命科学类“十二五”规划教材

组编院校

(排名不分先后)

北京理工大学

广西大学

广州大学

哈尔滨工业大学

华东师范大学

重庆邮电大学

滨州学院

河南师范大学

嘉兴学院

武汉轻工大学

长春工业大学

长治学院

常熟理工学院

大连大学

大连工业大学

大连海洋大学

大连民族学院

大庆师范学院

佛山科学技术学院

阜阳师范学院

广东第二师范学院

广东石油化工学院

广西师范大学

贵州师范大学

哈尔滨师范大学

合肥学院

河北大学

河北经贸大学

河北科技大学

河南科技大学

河南科技学院

河南农业大学

菏泽学院

贺州学院

黑龙江八一农垦大学

华中科技大学

华中师范大学

暨南大学

首都师范大学

南京工业大学

湖北大学

湖北第二师范学院

湖北工程学院

湖北工业大学

湖北科技学院

湖北师范学院

湖南农业大学

湖南文理学院

华侨大学

华中科技大学武昌分校

淮北师范大学

淮阴工学院

黄冈师范学院

惠州学院

吉林农业科技学院

集美大学

济南大学

佳木斯大学

江汉大学文理学院

江苏大学

江西科技师范大学

荆楚理工学院

军事经济学院

辽东学院

辽宁医学院

聊城大学

聊城大学东昌学院

牡丹江师范学院

内蒙古民族大学

仲恺农业工程学院

云南大学

西北农林科技大学

中央民族大学

郑州大学

新疆大学

青岛科技大学

青岛农业大学

青岛农业大学海都学院

山西农业大学

陕西科技大学

陕西理工学院

上海海洋大学

塔里木大学

唐山师范学院

天津师范大学

天津医科大学

西北民族大学

西南交通大学

新乡医学院

信阳师范学院

延安大学

盐城工学院

云南农业大学

肇庆学院

浙江农林大学

浙江师范大学

浙江树人大学

浙江中医药大学

郑州轻工业学院

中国海洋大学

中南民族大学

重庆工商大学

重庆三峡学院

重庆文理学院

前 言

微生物学实验技能在微生物学的专业学习中具有十分重要的地位,对于生命科学体系的其他学科来说,也是必不可少的一项专业技能。同时,微生物学实验技能在工业、农业、食品、环境和医学等方面也有着广泛的应用。

本书从提高学生的微生物学实际应用能力和创新能力出发,在微生物的染色、观察、培养、计数、生理生化鉴定、菌种保藏、遗传与变异和诱变育种等经典微生物学基础实验的基础上,设立了食品中细菌总数和大肠菌群的检测、抗生素效价的测定、抗生素抗菌谱的测定及药敏试验、废水中生化需氧量的测定、水体富营养化程度的测定、食用菌的培养、酸奶的制作、啤酒的酿制和免疫学测定等实验,力求涵盖微生物学操作技能在工业、农业、食品、环境和医学等方面的应用,做到基本操作技能与实际应用相结合,训练学生综合运用微生物学知识的能力,提高学生的创新能力。

本书根据微生物学实验教学的特点,按照循序渐进的原则,将教学内容分为微生物学实验基础知识、微生物学实验基本操作技术、微生物学基础性实验、微生物学应用技术实验、微生物学综合性实验和微生物学实验技能的测评六个部分,在实验内容的编排上,尽量做到与微生物学理论教学同步。在附录中详细罗列了常见培养基、染色液、试剂、酸碱指示剂和消毒剂的配制和配方,以方便实际使用。

本书在编排形式上,分为实验目的与内容、实验原理、实验器材、实验步骤、注意事项、实验结果分析、实验报告、思考与探究和参考文献等几部分,注重理论与实际相结合,引导学生从实验过程中加深对理论知识的理解、掌握与思考,激发学生的学习兴趣和学习的主观性,提高学生的动手能力,帮助学生建立系统的微生物学知识体系。

本书的编者都是来自微生物学实验教学一线的教师,有着丰富的教学经验,对微生物学实验教学有着深入的理解,在此向他们表示诚挚的谢意!

我们真诚地希望教师 and 同学们在使用本书的过程中,对发现的不足之处提出宝贵意见,以便今后改进和提高。

编 者

微生物学实验须知

微生物学实验的目的是训练学生掌握微生物学最基本的操作技能,了解微生物学的基本知识,加深理解课堂讲授的某些微生物学理论。同时,通过实验,培养学生观察、思考、分析问题和解决问题的能力,实事求是、严肃认真的科学态度以及勤俭节约、爱护公物的良好作风。

为了上好微生物学实验课,并保证安全,特提出如下注意事项。

(1) 每次实验前必须对实验内容进行充分预习,以了解实验的目的、原理和方法,做到心中有数,思路清楚。

(2) 认真及时做好实验记录,对于当时不能得到结果而需要连续观察的实验,则需记下每次观察的现象和结果,以便分析。

(3) 实验室内应保持整洁,勿高声谈话和随便走动,保持室内安静。

(4) 实验时小心仔细,全部操作应严格按操作规程进行,万一遇到盛菌试管或瓶不慎打破、皮肤破伤或菌液吸入口中等意外情况发生时,应立即报告指导教师,及时处理,切勿隐瞒。

(5) 实验过程中,切勿使酒精、乙醚、丙酮等易燃药品接近火焰。如遇火险,应先关掉火源,再用湿布或沙土掩盖灭火,必要时用灭火器。

(6) 使用显微镜或其他贵重仪器时,要求细心操作,特别爱护。对消耗材料和药品等要力求节约,用毕后仍放回原处。

(7) 每次实验完毕后,必须把所用仪器擦净放妥,将实验室收拾整齐,擦净桌面,如有菌液污染桌面或其他地方时,可用3%来苏尔液或5%石炭酸液覆盖其上半小时后擦去,如是芽孢杆菌,应适当延长消毒时间。凡带菌的工具(如吸管、玻璃刮棒等)在洗涤前须浸泡在3%来苏尔液中进行消毒。

(8) 每次实验需进行培养的材料,应标明自己的组别及处理方法,放于教师指定的地点进行培养。实验室中的菌种和物品等,未经教师许可,不得携出实验室外。

(9) 每次实验的结果,应以实事求是的科学态度填入报告表格中,力求简明准确,连同思考题及时汇总并交教师批阅。

(10) 离开实验室前应将手洗净,注意关闭门窗、灯、火、煤气等。

目 录

第 1 部分 微生物学实验基础知识 /1

- 1.1 常用器皿的种类、要求与应用 /1
- 1.2 微生物实验室操作规程 /3
- 1.3 无菌室使用规程 /3
- 1.4 净化工作台使用规范 /4
- 1.5 手提式高压蒸汽灭菌锅使用规范 /5
- 1.6 全自动高压蒸汽灭菌器使用规程 /5
- 1.7 冰箱使用规程 /6
- 1.8 天平操作规程 /6
- 1.9 光学显微镜使用规范 /7
- 1.10 恒温干燥箱使用规程 /8
- 1.11 恒温培养箱使用规范 /8
- 1.12 霉菌培养箱操作规程 /9
- 1.13 电子恒温水浴锅使用规程 /9
- 1.14 真空干燥箱的使用规程 /10

第 2 部分 微生物学实验基本操作技术 /11

- 2.1 棉塞的制作 /11
- 2.2 玻璃器皿的清洗 /12
- 2.3 玻璃器皿的包装 /16
- 2.4 灭菌设备及操作技术 /17
- 2.5 斜面培养基制备及倒平板技术 /23
- 2.6 微生物接种技术 /25

第 3 部分 微生物学基础性实验 /30

- 实验 1 实验室环境和人体表面微生物的检查 /30
- 实验 2 油镜的使用与细菌简单染色 /33
- 实验 3 细菌革兰氏染色法 /36
- 实验 4 细菌的芽孢染色与荚膜染色 /40
- 实验 5 鞭毛染色法及活细菌运动性的观察 /43
- 实验 6 酵母菌的形态观察与死活鉴定 /45
- 实验 7 放线菌和霉菌的形态观察 /47

- 实验 8 微生物大小测定及显微镜直接计数法 /51
- 实验 9 常见微生物培养基的制备 /55
- 实验 10 微生物平板菌落计数 /60
- 实验 11 土壤中微生物的分离与纯化 /64
- 实验 12 细菌生长曲线的测定 /68
- 实验 13 厌氧微生物的培养 /70
- 实验 14 噬菌体特异性溶菌试验 /75
- 实验 15 物理因素对微生物生长的影响 /77
- 实验 16 消毒剂对微生物生长的影响(石炭酸系数测定) /80
- 实验 17 大分子物质(糖、脂类和蛋白质)的水解实验 /83
- 实验 18 糖发酵实验和 IMViC 实验 /88
- 实验 19 微生物菌种保藏技术 /93
- 实验 20 细菌质粒的提取与鉴定 /100
- 实验 21 微生物的诱变育种 /105
- 实验 22 氨基酸营养缺陷型突变株的筛选实验 /108
- 实验 23 酵母菌单倍体原生质体融合 /110
- 实验 24 紫外线对枯草芽孢杆菌产淀粉酶的诱变效应 /115

第 4 部分 微生物学应用技术实验 /118

- 实验 25 Ames 试验检测化学物质的致突变作用 /118
- 实验 26 水中细菌总数及大肠菌群的检测 /125
- 实验 27 食品中细菌总数及大肠菌群的检测 /132
- 实验 28 抗生素的生物效价测定 /137
- 实验 29 抗生素抗菌谱的测定及药敏试验 /142
- 实验 30 废水中生化需氧量(BOD)的测定 /145
- 实验 31 水体富营养化程度的测定——叶绿素 a 法 /149
- 实验 32 抗血清的制备 /152
- 实验 33 免疫沉淀反应测定 /156
- 实验 34 免疫凝集反应测定 /158
- 实验 35 食用菌的培养 /161

第 5 部分 微生物学综合性实验 /166

- 实验 36 苯酚生物降解菌的筛选 /166
- 实验 37 乳酸菌的分离、鉴定及酸奶制作 /170
- 实验 38 柠檬酸液体深层发酵和提取 /173
- 实验 39 固定化酵母菌的乙醇发酵试验及啤酒的酿制 /177
- 实验 40 发酵培养基的正交试验优化 /181
- 实验 41 蛋白酶产生菌的筛选及测定 /185
- 实验 42 酶联免疫吸附检测方法测定抗体效价 /188

第 6 部分 微生物学实验技能的测评 /192

实验 43 基本实验技能的检测 /192

实验 44 实验设计及实施能力的测评 /194

附录 /196

附录 1 微生物实验室意外事故处理 /196

附录 2 教学常用菌种 /197

附录 3 常见培养基的配方与配制 /198

附录 4 实验室常用染色液配制 /206

附录 5 常见试剂与消毒剂的配制 /213

附录 6 酸碱指示剂的配制 /220

附录 7 大肠杆菌检索表 /220

附录 8 各国主要菌种保藏机构 /224

1.1 常用器皿的种类、要求与应用

微生物学实验室所用的玻璃器皿,大多要进行消毒、灭菌和用来培养微生物,因此对其质量、洗涤和包装方法均有一定的要求。一般,玻璃器皿要求为硬质玻璃,才能承受高温和短暂灼烧而不致破损;器皿的游离碱含量要少,否则会影响培养基的酸碱度;对玻璃器皿的形状和包装方法的要求,以能防止污染杂菌为准;洗涤方法不恰当也会影响实验结果。本节将对这几方面作详细介绍。

1. 试管(test tube)

微生物学实验室所用玻璃试管,其管壁必须比化学实验室用的厚些,这样在塞棉花塞时,管口才不会破损。试管的形状要求没有翻口,不然微生物容易从棉塞与管口的缝隙间进入试管而造成污染。此外,现在有不用棉塞而用铝制或塑料制的试管帽,若用翻口试管也不便于盖试管帽。有的实验要求尽量减少试管内的水分蒸发,则需使用螺口试管,盖以螺口胶木或塑料帽。

试管的大小可根据用途的不同,准备下列三种型号。

(1) 大试管(约 18 mm×180 mm) 可盛培养皿用的培养基,亦可作制备琼脂斜面用(需要大量菌体时用)。

(2) 中试管[(13~15) mm×(100~150) mm] 盛液体培养基或做琼脂斜面用,亦可用于病毒等的稀释和血清学试验。

(3) 小试管[(10~12) mm×100 mm] 一般用于糖发酵试验或血清学试验,和其他需要节省材料的试验。

2. 德汉氏试管(Durham's tube)

观察细菌在糖发酵培养基内产气情况时,一般在小试管内再套一倒置的小套管(约 6 mm×36 mm),此小套管即为德汉氏试管,又称杜氏小管、发酵小套管。

3. 吸管(移液管, pipette)

(1) 玻璃吸管(glass pipette) 微生物学实验室一般要准备 1 mL、5 mL、10 mL 的刻度玻璃吸管。与化学实验室所用的不同,其刻度指示的容量往往包括管尖的液体体积,亦即使用时要注意将所吸液体吹尽,故有时称为“吹出”吸管。市售细菌学用吸管,有的在吸管上端刻有“吹”字。

除有刻度的吸管外,有时需用不计量的毛细吸管,又称滴管,来吸取动物体液和离心上清

液以及滴加少量抗原、抗体等。

(2) 活塞吸管(piston pipette) 主要用来吸取微量液体,故又称微量吸液器或微量加样器。除塑料外壳外,主要部件有按钮、弹簧、活塞和可装卸的吸嘴。按动按钮,通过弹簧使活塞上下活动,从而吸进和放出液体。其特点是容量固定,使用时不用观察刻度,操作方便、迅速。国内产品一般每个活塞吸管固定一种容量,分别有 $5\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{L}$ 、 $20\ \mu\text{L}$ 、 $25\ \mu\text{L}$ 、 $50\ \mu\text{L}$ 、 $100\ \mu\text{L}$ 、 $200\ \mu\text{L}$ 、 $500\ \mu\text{L}$ 、 $1000\ \mu\text{L}$ 等不同容量。而精制的活塞吸管每个在一定的范围内可调节几个容积,例如在 $5\sim 25\ \mu\text{L}$ 的范围内,可调节 $5\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{L}$ 、 $15\ \mu\text{L}$ 、 $20\ \mu\text{L}$ 、 $25\ \mu\text{L}$ 五个不同的量,使用时按需要调节,但当调节固定后,每吸一次,容量仍是固定的。用毕只需调换吸嘴或将吸嘴洗净,消毒后再行使用。

活塞吸管是国外20世纪70年代后半期才开始生产与应用的,近年来国内亦日益广泛应用于免疫学和使用同位素等的科学实验中。

4. 培养皿(petri dish)

常用的培养皿,皿底直径90 mm,高15 mm。培养皿一般均为玻璃皿盖,但有特殊需要时,可使用陶器皿盖,因其能吸收水分,使培养基表面干燥,例如测定抗生素生物效价时,培养皿不能倒置培养,则用陶器皿盖为好。

在培养皿内倒入适量固体培养基制成平板,用于分离、纯化、鉴定菌种,微生物计数以及测定抗生素、噬菌体的效价等。

5. 三角烧瓶(erlenmeyer flask)与烧杯(beaker)

三角烧瓶有100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL等不同的规格,常用来盛无菌水、培养基和摇瓶发酵等。常用的烧杯有50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL等,用来配制培养基与药品。

6. 注射器(injector)

一般有1 mL、2 mL、5 mL、10 mL、20 mL、50 mL等不同容量的注射器。注射抗原于动物体内可根据需要使用1 mL、2 mL和5 mL的;抽取动物心脏血或绵羊静脉血可采用10 mL、20 mL、50 mL的。

微量注射器有 $10\ \mu\text{L}$ 、 $20\ \mu\text{L}$ 、 $50\ \mu\text{L}$ 、 $100\ \mu\text{L}$ 等不同的大小。一般在免疫学或纸层析等实验中滴加微量样品时应用。

7. 载玻片(slide)与盖玻片(cover slip)

普通载玻片大小为 $75\ \text{mm}\times 25\ \text{mm}$,用于微生物涂片、染色、形态观察等。盖玻片为 $18\ \text{mm}\times 18\ \text{mm}$ 。

凹玻片是在一块厚玻片的当中有一圆形凹窝,做悬滴观察活细菌以及微室培养用。

8. 双层瓶(double bottle)

由内、外两个玻璃瓶组成,内层小锥形瓶盛放香柏油,供油镜头观察微生物时使用,外层瓶盛放二甲苯,用以擦净油镜头。

9. 滴瓶(dropper bottle)

用来装各种染料、生理盐水等。

10. 接种工具

接种工具有接种环(inoculating loop)、接种针(inoculating needle)、接种钩(inoculating hook)、接种铲(inoculating shovel)、玻璃涂布器(glass spreader)等。制造环、针、钩、铲的金属可用铂或镍,原则是软硬适度,能经受火焰反复灼烧,又易冷却。接种细菌和酵母菌用接种环

和接种针,其铂丝或镍丝的直径以 0.5 mm 为适当,环的内径约 2 mm,环面应平整。接种某些不易和培养基分离的放线菌和真菌,有时用接种钩或接种铲,其丝的直径要求粗一些,约 1 mm。用涂布法在琼脂平板上分离单个菌落时需用玻璃涂布器,是将玻璃棒弯曲或将玻璃棒一端烧红后压扁而成。

1.2 微生物实验室操作规程

- (1) 工作人员加强有菌观念,无菌操作。
- (2) 每日工作前用紫外线照射实验室半小时以上。
- (3) 入室前应穿工作服,并做好实验前的各项准备工作。
- (4) 实验室内应保持肃静,不准吸烟、吃东西及用手触摸面部。尽量减少室内活动,以免引起风动。无关人员禁入。
- (5) 非必要物品禁止带入实验室,必要资料和书籍带入后,应远离操作台。
- (6) 做好标本的登记、编号及实验记录。未发出报告前,请勿丢弃标本。
- (7) 标本处理及各项实验应在操作间进行,接种环用完后应立即用火焰灭菌,蘸菌吸管、玻片等用后应浸泡在消毒液内。
- (8) 实验时手部污染,应立即用过氧乙酸消毒或浸于 3% 来苏尔溶液中 5~10 min,再用肥皂洗手并冲洗干净;如误入口内,应立即吐出,并用 1:1000 高锰酸钾溶液或 3% 双氧水漱口,根据实际情况服用有关药物。
- (9) 实验过程中,如污染了实验台或地面,应用 3% 来苏尔溶液覆盖其上半小时,然后清洗;如污染工作服,应立即脱下,高压灭菌。
- (10) 使用后的载玻片、盖片、平皿、试管等用消毒液浸泡,经煮沸后清洗或丢弃。
- (11) 所有微生物培养物,不管标本阳性或阴性均用消毒液浸泡后,经煮沸消毒,才能清洗或丢弃。
- (12) 取材最好采用一次性工具,不能采用一次性工具者,每次取材前均应彻底消毒。
- (13) 若出现着火情况,应沉着处理,切勿慌张,立即关闭电闸,积极灭火。易燃物品(如乙醇、二甲苯、乙醚和丙酮等)必须远离火源,妥善保存。
- (14) 工作结束时检查电器、酒精灯等是否关闭,观察记录培养箱、冰箱温度及工作情况,用浸有消毒液的抹布将操作台擦拭干净,并将试剂、用具等放回原处,清理台面,未污染的废弃物扔进污物桶,有菌废弃物应送高压灭菌后处理。
- (15) 离室前工作人员应将双手用消毒液消毒,并用肥皂和清水洗净。
- (16) 爱护仪器设备,遵守仪器使用规范,经常清洁,注意防尘和防潮。每天观察培养箱、冰箱、干燥箱的温度,并做好记录。
- (17) 发出的微生物报告应认真复审,分析报告、评价报告。

1.3 无菌室使用规程

无菌室一般为 4~5 m²、高 2.5 m 的独立小房间(与外间隔离),专辟于微生物实验室内,

可以用板材和玻璃建造。无菌室外要设一个缓冲间,错开门向,以免气流带进杂菌。无菌室和缓冲间都必须密闭,室内装备的换气设备必须有空气过滤装置。在获得了无菌环境和无菌材料后,只有保持无菌状态,才能对某种特定的已知微生物进行研究。所以控菌能力和控菌稳定性是无菌室的核心验收指标。业内通行的验收标准为 100 级洁净区平板杂菌数平均不得超过 1 个菌落,10000 级洁净室平均不得超过 3 个菌落。

(1) 无菌室应严禁放置杂物,无关人员严禁入内。

(2) 无菌室应严格保持整洁,防止污染,定期用甲醛熏蒸消毒(每月一次),使用前用 0.1% 新洁尔灭控式消毒净化工作台。

(3) 实验人员进入无菌室,必须更换无菌衣、帽、鞋等,操作前用 0.1% 新洁尔灭灭菌或 75% 乙醇进行手消毒。

(4) 使用前开启紫外灯照射 60 min,同时打开吹风净化工作台,操作完毕及时清理,再开紫外灯照射 30 min。

(5) 检验过程严格按照无菌操作规程操作,爱惜室内用具,使用完毕,整理检品及各种用具并清洁工作台面。

(6) 接种环在每次使用前后,必须通过火焰灭菌冷却后方可接种培养物。

(7) 所有带菌实验用品,须经有效的消毒灭菌处理后再洗刷。严禁污染下水道。

(8) 无菌室定期进行洁净度测试检查沉降菌(在室内打开肉汤琼脂皿 30 min,经 37 °C 培养 48 h),100 级平均菌落数不得超过 1 个/皿,如超过则应进行清洁消毒。

1.4 净化工作台使用规范

净化工作台又称超净工作台(clean bench)、生物安全柜,是为了适应现代化工业、光电产业、生物制药以及科研试验等领域对局部工作区域洁净度的需求而设计的。其工作原理为:通过风机将空气吸入预过滤器,经由静压箱进入高效过滤器过滤,将过滤后的空气以垂直或水平气流的状态送出,使操作区域达到百级洁净度,保证生产对环境洁净度的要求。超净工作台根据气流的方向分为垂直流超净工作台(vertical flow clean bench)和水平流超净工作台(horizontal flow clean bench),根据操作结构分为单边操作及双边操作两种形式,按其用途又可分为普通超净工作台和生物(医药)超净工作台。

1. 净化工作台操作规程

(1) 使用工作台时,应提前 50 min 开机,同时开启紫外杀菌灯,处理操作区内表面积累的微生物,30 min 后关闭杀菌灯(此时日光灯即开启),启动风机。

(2) 对新安装的或长期未使用的工作台,使用前必须对工作台和周围环境先用超静真空吸尘器或用不产生纤维的工具进行清洁工作,再采用药物灭菌法或紫外线灭菌法进行灭菌处理。

(3) 操作区内不允许存放不必要的物品,保持工作区的洁净气流流型不受干扰。

(4) 操作区内尽量避免做明显扰乱气流流型的动作。

(5) 操作区的使用温度不可以超过 60 °C。

2. 维护规程及维护方法

(1) 根据环境的洁净程度,可定期(一般 2~3 个月)将粗滤布(涤纶无纺布)拆下清洗或给

予更换。

(2) 定期(一般为一周)对环境周围进行灭菌工作,同时经常用纱布蘸乙醇或丙酮等有机溶剂将紫外线杀菌灯表面擦干净,保持表面清洁,否则会影响杀菌效果。

(3) 操作区平均风速保持在 $0.32\sim 0.48$ m/s 范围内。

1.5 手提式高压蒸汽灭菌锅使用规范

一、操作规程

(1) 准备:首先将内层灭菌桶取出,再向外层锅内加入适量的去离子水或蒸馏水,使水面与三角搁架相平为宜。

(2) 放回灭菌桶,并装入待灭菌物品。注意不要装得太挤,以免妨碍蒸汽流通而影响灭菌效果。三角烧瓶与试管口端均不要与桶壁接触,以免冷凝水淋湿包口的纸而透入棉塞。

(3) 加盖,并将盖上的排气软管插入内层灭菌桶的排气槽内。再以两两对称的方式同时旋紧相对的两个螺栓,使螺栓松紧一致,勿使漏气。

(4) 加热,并同时打开排气阀,使水沸腾以排除锅内的冷空气。待冷空气完全排尽后,关上排气阀,让锅内的温度随蒸汽压力增加而逐渐上升。当锅内压力升到所需压力时,控制热源,维持压力至所需时间(在温度或者压力达到所需时,一般为 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0.1 MPa),这时需要切断电源,停止加热。当温度下降时,再开启电源开始加热,使温度维持在恒定的范围之内。

(5) 灭菌所需时间到后,切断电源,让灭菌锅内温度自然下降,当压力表的压力降至“0”位时,打开排气阀,旋松螺栓,打开盖子,取出灭菌物品。

二、注意事项

(1) 灭菌物品不能堆得太满、太紧,以免影响温度均匀上升。

(2) 降温时待温度自然降至 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下再打开箱门取出物品,避免因温度过高而骤然降温导致玻璃器皿炸裂。

(3) 在灭菌过程中,应注意排净锅内冷空气。

(4) 由于高压蒸汽灭菌时,要使用温度高达 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、2 个大气压的过热蒸汽,操作时,必须严格按照操作规程操作,否则容易发生意外事故。

(5) 不同类型的物品不应放在一起进行灭菌。

(6) 在未放气,容器内压力尚未降到“0”位以前,绝对不允许打开容器盖。

1.6 全自动高压蒸汽灭菌器使用规程

一、操作规程

(1) 在设备使用中,应对安全阀加以维护和检查,当设备闲置较长时间重新使用时,应扳动安全阀上的小扳手,检查阀芯是否灵活,防止因弹簧锈蚀影响安全阀起跳。

(2) 设备工作时,当压力表指示超过 0.165 MPa 时,安全阀不开启,应立即关闭电源,打开

放气阀旋钮,当压力表指针回零时,稍等 1~2 min,再打开容器盖并及时更换安全阀。

二、注意事项

- (1) 堆放灭菌物品时,严禁堵塞安全阀的出气孔,必须留出空间保证其畅通放气。
- (2) 每次使用前必须检查外桶内水量是否保持在灭菌桶搁脚处。
- (3) 当灭菌器持续工作,在进行新的灭菌作业时,应留有 5 min 的时间,并打开上盖让设备有时间冷却。
- (4) 灭菌液体时,应将液体罐装在硬质的耐热玻璃瓶中,以不超过 3/4 容积为好,瓶口选用棉花塞,切勿使用未开孔的橡胶或软木塞。特别注意:在灭菌液体结束时不准立即释放蒸汽,必须待压力表指针回复到“0”位后方可排放余气。
- (5) 对不同类型、不同灭菌要求的物品(如敷料和液体),切勿放在一起灭菌,以免顾此失彼,造成损失。
- (6) 取放物品时注意不要被蒸汽烫伤(可戴上线手套)。

1.7 冰箱使用规程

一、操作规程

- (1) 开机:冰箱按说明书要求放好后,插上电源线,确定其在正常供电状态下。
- (2) 物品的放置。
- (3) 将冰箱调节到所需功能。
- (4) 打开冰箱相应功能的箱门,将所需放置/取出的物品,放置/取出在冰箱、冰柜内。
- (5) 物品放置好/取出后,将箱门关严,通过屏幕显示确定其在正常供电情况。

二、安全使用注意事项

- (1) 严禁储存或靠近易燃、易爆、有腐蚀性物品及易挥发的气体、液体,不得在有可燃气体环境中存放或使用。
- (2) 实验室使用冰箱内禁止存放与实验无关的物品。储存在冰箱内的所有容器应当清楚地标明内装物品的科学名称、储存日期和储存者的姓名。未标明的或废旧物品应当高压灭菌并丢弃。
- (3) 放入冰箱内的所有试剂、样品、质控品等必须密封保存。
- (4) 箱体表面请勿放置较重或较热的物体,以免变形。
- (5) 保持冰箱出水口通畅。
- (6) 在清洁/除霜时,切不可使用有机溶剂、开水及洗衣粉等对冰箱有害的物质。

1.8 天平操作规程

- (1) 使用天平前应先观察水准器中气泡是否在圆形水准器正中,如偏离中心,应调节地脚螺栓使气泡保持在水准器正中央,单盘天平(机械式)调整前面的地脚螺栓,电子天平调整后

的地脚螺栓。

(2) 天平使用前应首先调零,电子天平使用前还应用标准砝码校准。

(3) 天平门开关时动作要轻,防止震动影响天平精度和准确读数。

(4) 天平称量时要将天平门关好,严禁开着天平门时读数,防止空气流动对称量结果造成影响。

(5) 电子天平的去皮键使用要慎重,严禁用去皮键使天平回零。

(6) 如发现天平的托盘上有污物要立即擦拭干净。天平要经常擦拭,保持洁净,擦拭天平内部时要用洁净的干布或软毛刷,如干布擦不干净可用95%乙醇擦拭,严禁用水擦拭天平内部。

(7) 同一次分析应用同一台天平,避免系统误差。

(8) 天平载重不得超过最大负荷。

(9) 被称物应放在干燥、清洁的器皿中称量,挥发性、腐蚀性物体必须放在密封加盖的容器中称量。

(10) 电子天平接通电源后应预热2 h才能使用。

(11) 搬动或拆装天平后要检查天平性能。

(12) 称量完毕后将所用称量纸带走。

(13) 称量完毕,保持天平清洁,物品按原样摆放整齐。

1.9 光学显微镜使用规范

1. 取镜和放置

右手紧握镜臂,左手托住镜座取出(特别禁止单手提显微镜,防止目镜从镜筒中滑脱)。放置桌边时动作要轻。一般应在身体的前面,略偏左,镜筒向前,镜臂向后,距桌边7~10 cm处,以便观察和防止掉落。然后安放目镜和物镜。

2. 对光

用拇指和中指移动旋转器,使低倍镜对准镜台的通光孔。打开光圈,上升集光器,并将反光镜转向光源,以左眼在目镜上观察(右眼睁开),同时调节反光镜方向,直到视野内的光线均匀明亮为止。

3. 低倍镜的使用方法

(1) 放置玻片标本 取一玻片标本放在镜台上,一定使有盖玻片的一面朝上,切不可放反,用推片器弹簧夹夹住,然后旋转推片器螺旋,将所要观察的部位调到通光孔的正中。

(2) 调节焦距 以左手按逆时针方向转动粗调节器,使镜台缓慢地上升至物镜距标本片约5 mm处,要从右侧看着镜台上升,以免上升过多造成镜头或标本片的损坏。然后,两眼同时睁开,用左眼在目镜上观察,左手以顺时针方向缓慢转动粗调节器,使镜台缓慢下降,直到视野中出现清晰的物像为止。

4. 高倍镜的使用方法

(1) 选好目标 一定要先在低倍镜下把需进一步观察的部位调到中心,同时把物像调节到最清晰的程度,才能进行高倍镜的观察。

(2) 选择高倍镜 转动转换器,调换上高倍镜头,转换高倍镜时转动速度要慢,并从侧面