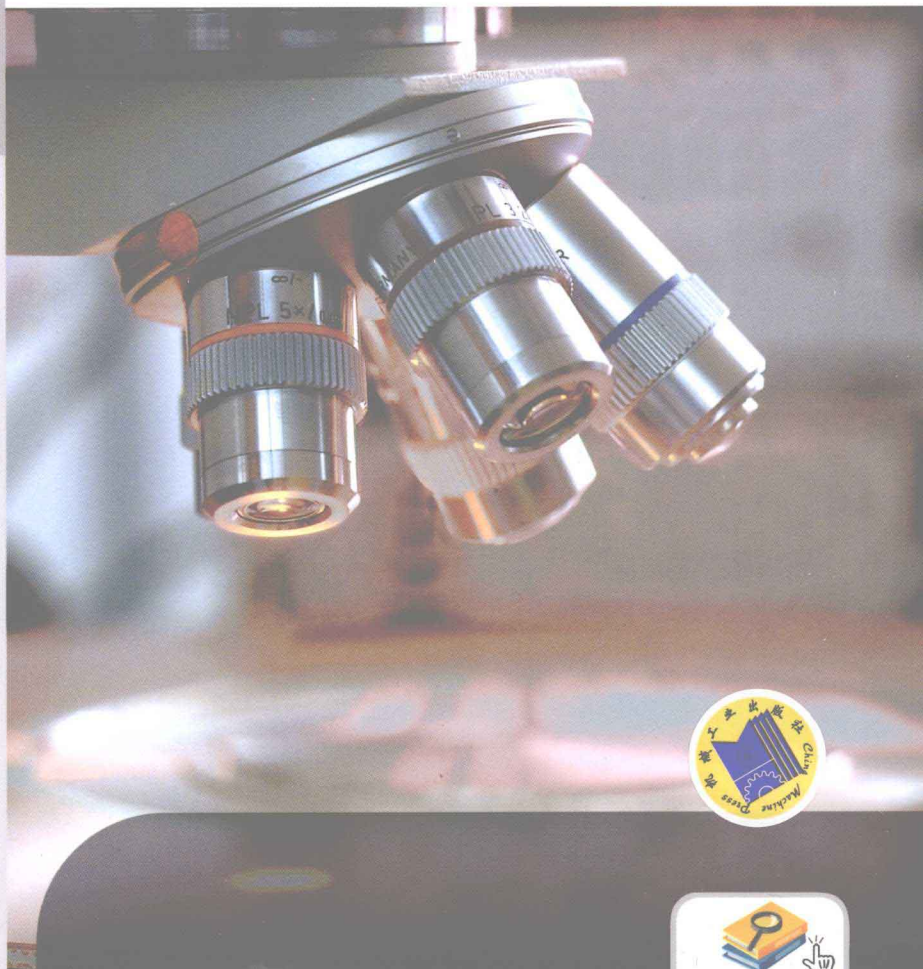


高等职业教育项目课程改革规划教材

微生物检定技术

WEISHENGWU JIANDING JISHU

任茜 主编



机械工业出版社
CHINA MACHINE PRESS



赠 电子教案

高等职业教育项目课程改革规划教材

微生物检定技术

主 编 任 茜

参 编 余展旺 吴九玲



机械工业出版社

本教材为高等职业教育项目课程改革规划教材之一,结合“微生物检定工考核大纲”和《中华人民共和国药典》(2010年版)和《中国药品检验标准操作规范》(2010年版),参照现行的《化妆品卫生规范》(2007年版)、“食品微生物学检验”系列标准,以及“医药工业洁净室(区)悬浮粒子、浮游菌、沉降菌的测试方法标准”等,选取典型工作任务,从简单到复杂设置了10个教学项目。通过本教材的引导学习,学生可以学会一般药品和生物制品微生物限度检查,食品和化妆品卫生微生物检验,以及工艺用水和洁净区洁净度的日常监测。同时,本教材配有对应的原始记录(电子版),方便教学使用。

本教材适用于高职院校和技工院校应用生物技术、生物化工等与微生物检定工相关的专业全日制教学和微生物检定工业余培训班。

图书在版编目(CIP)数据

微生物检定技术 / 任茜主编. —北京:机械工业出版社, 2011.9

ISBN 978-7-111-34639-5

I. ①微… II. ①任… III. ①微生物检定—高等职业教育—教材 IV. ①Q93-331

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第188014号

机械工业出版社(北京市百万庄大街22号 邮政编码100037)

策划编辑:边萌

责任编辑:边萌 李秀玲

责任印制:李妍

北京诚信伟业印刷有限公司印刷

2011年10月第1版第1次印刷

184mm×260mm·11.75印张·289千字

0001—3000册

标准书号:ISBN 978-7-111-34639-5

定价:23.00元

凡购本书,如有缺页、倒页、脱页,由本社发行部调换

电话服务

网络服务

社服务中心:(010) 88361066

门户网:<http://www.cmpbook.com>

销售一部:(010) 68326294

销售二部:(010) 88379649

教材网:<http://www.cmpedu.com>

读者购书热线:(010) 88379203

封面无防伪标均为盗版

序

中国的职业教育正在经历课程改革的重要阶段。传统的学科型课程被彻底解构，以岗位实际工作能力的培养为导向的课程正在逐步建构起来。在这一转型过程中，出现了两种看似很接近，人们也并不注意区分，而实际上却存在重大理论基础差别的课程模式，即任务驱动型课程和项目化课程。二者的表面很接近，是因为它们都强调以岗位实际工作内容为课程内容。国际上已就如何获得岗位实际工作内容取得了完全相同的基本认识，那就是以任务分析为方法。这可能是二者最为接近之处，也是人们容易混淆二者关系的关键所在。

然而极少有人意识到，岗位上实际存在两种任务，即概括的任务和具体的任务。例如对商务专业而言，联系客户是概括的任务，而联系某个特定业务的特定客户则是具体的任务。工业类专业同样存在这一明显区分，如汽车专业判断发动机故障是概括的任务，而判断一辆特定汽车的发动机故障则是具体的任务。当然，许多有见识的课程专家还是敏锐地觉察到了这一区别，如我国的姜大源教授，他使用了写意的任务和写实的任务这两个概念。美国也有课程专家意识到了这一区别并为之困惑。他们提出的问题是：“我们强调教给学生任务，可现实中的任务是非常具体的，我们该教给学生哪件任务呢？显然我们是没有时间教给他们所有具体任务的”。

意识到存在这两种类型的任务是职业教育课程研究的巨大进步，而对这一问题的有效处理，将大大推进以岗位实际工作能力的培养为导向的课程模式在职业院校的实施，项目课程就是为解决这一矛盾而产生的课程理论。姜大源教授主张在课程设计中区分两个概念，即课程内容和教学载体。课程内容即要教给学生的知识、技能和态度，它们是形成职业能力的条件（不是职业能力本身），课程内容的获得要以概括的任务为分析对象。教学载体即学习课程内容的具体依托，它要解决的问题是如何在具体活动中实现知识、技能和态度向职业能力的转化，它的获得要以具体的任务为分析对象。实现课程内容和教学载体的有机统一，就是项目课程设计的关键环节。

这套教材设计的理论基础就是项目课程。教材是课程的重要构成要素。作为一门完整的课程，我们需要课程标准、授课方案、教学资源和评价方案等，但教材是其中非常重要的构成要素，它是连接课程理念与教学行为的重要桥梁，是综合体现各种课程要素的教学工具。一本好的教材既要能体现课程标准，又要能为寻找所需教学资源提供清晰索引，还要能有效地引导学生对教材进行学习和评价。可见，教材开发是项非常复杂的工程，对项目课程的教材开发来说更是如此，因为它没有成熟的模式可循，即使在国外我们也几乎找不到成熟的项目课程教材。然而，除这些困难外，项目教材的开发还担负着一项艰巨任务，那就是如何实现教材内容的突破，如何把现实中非常实用的工作知识有机地组织到教材中去。

这套教材在以上这些方面都进行了谨慎而又积极的尝试，其开发经历了一个较长过程（约4年时间）。首先，教材开发者们组织企业的专家，以专业为单位对相应职业岗位上的工作任务与职业能力进行了细致而有逻辑的分析，并以此为基础重新进行了课程设置，撰写了专业教学标准，以使课程结构与工作结构更好地吻合，最大限度地实现职业能力的培养。



其次，教材开发者们以每门课程为单位，进行了课程标准与教学方案的开发，在这一环节中尤其突出了教学载体的选择和课程内容的重构。教学载体的选择要求具有典型性，符合课程目标要求，并体现该门课程的学习逻辑。课程内容则要求真正描绘出实施项目所需要的专业知识，尤其是现实中的工作知识。在取得以上课程开发基础研究的完整成果后，教材开发者们才着手进行了这套教材的编写。

经过模式定型、初稿、试用、定稿等一系列复杂阶段，这套教材终于得以诞生。它的诞生是目前我国项目课程改革中的重要事件。因为它很好地体现了项目课程思想，无论在结构还是内容方面都达到了高质量教材的要求；它所覆盖专业之广，涉及课程之多，在以往类似教材中少见，其系统性将极大地方便教师对项目课程的实施；对其开发遵循了以课程研究为先导的教材开发范式。对一个国家而言，一个专业、一门课程，其教材建设水平其实体现的是课程研究水平，而最终又要直接影响其教育和教学水平。

当然，这套教材也不是十全十美的，我想教材开发者们也会认同这一点。来美国之前我就抱有一个强烈愿望，希望看看美国的职业教育教材是什么样子，因此每到学校考察必首先关注其教材，然而往往也是失望而回。在美国确实有许多优秀教材，尤其是普通教育的教材，设计得非常严密，其考虑之精细令人赞叹，但职业教育教材却往往只是一些参考书。美国教授对传统职业教育教材也多有批评，有教授认为这种教材只是信息的堆砌，而非真正的教材。真正的教材应体现教与学的过程。如此看来，职业教育教材建设是全球所面临的共同任务。这套教材的开发者们一定会继续为圆满完成这一任务而努力，因此他们也一定会欢迎老师和同学对教材的不足之处不吝赐教。



徐国庆

2010年9月25日于美国俄亥俄州立大学

前 言

本教材为高等职业教育项目课程改革规划教材之一。本教材为适应职业教育项目课程教学的需求,结合“微生物检定工考核大纲”和《中华人民共和国药典》(2010年版)和《中国药品检验标准操作规范》(2010年版),参照现行的“化妆品卫生规范”(2007年版)、“食品微生物学检验标准”(2010年版),以及“医药工业洁净室(区)悬浮粒子、浮游菌、沉降菌的测试方法”(2010年版)等,选取典型工作任务,从简单到复杂设置了10个教学项目。通过本教材的引导学习,学生可以学会一般药品和生物制品微生物限度检查,食品和化妆品卫生微生物检验,以及工艺用水和洁净室(区)洁净度的日常监测。检查项目包括细菌数、霉菌数、酵母菌数及规定控制菌检查。同时,本教材配有对应的原始记录(电子版),方便教学使用。

本教材是在2004年编写的一体化校本讲义的基础上,经过多年校内全日制教学和社会化培训的试用,根据专业工作过程导向项目课程改革教学大纲,进行了结构性的调整后形成的。

微生物限度检查应在规定的环境里,使用规定的设备和仪器,按照规定的操作程序进行,方能取得可信的结果。本教材按项目教学设计,项目一至六分单项任务进行,项目七至九为综合项目,即多个任务同步进行,项目十为拓展项目,由学生自由组合在规定的时间内完成自选项目。

本教材中每个项目包含项目描述、教学目标、教学要求和1~4个教学任务,每个任务有任务描述和任务执行过程(接受指令、查阅依据、制订计划、实施操作和结果报告),其间按需要插入“练习”、“训练”和“思考”供学习者提高学习效果;为一些重点操作环节设有“提示注意”,将安全注意事项和一些操作经验提供给初学者;将“知识链接”放在学习者方便阅读的相关环节。

本教材由任茜任主编并统稿。所有的编写人员有多年的医药行业和企业质量检验工作经验,长期从事医药生物专业教学工作,并在教学大纲的基础上研讨、收集素材。

在本教材的编写过程中,聘请了深圳技师学院生物技术专业顾问委员会委员和药品、食品以及化妆品检验的一线专业人员,对教材内容和体例进行了多次研讨,给予宝贵的指导意见和建议,并提供了部分素材,在此表示衷心感谢。

由于编者水平有限,教材内容难免有疏漏和不当之处,恳请各位专家、师生以及广大读者阅读和使用后提出批评指正。

技术要求

一、设施

1. 无菌室

微生物限度检查应有单独的无菌室，每个无菌室应有独立的净化空气系统。

(1) 结构和要求 具体内容见现行版《中国药品检验标准操作规范》(2010年版)无菌检查法。

(2) 操作间 操作间应安装空气除菌过滤层流装置。环境洁净度不应低于10000级，局部洁净度为100级(或放置同等级净化工作台)。操作间的净化工作台洁净空气应保持对环境形成正压，不低于4.9Pa。操作台上备有电子天平，乙醇灯，火柴，乙醇棉球，大、小橡胶乳头等。

(3) 缓冲间 缓冲间内应有洗手盆，无菌衣、帽、口罩、拖鞋等。缓冲间内不得放置培养箱和其他杂物。

(4) 洁净级别以及检查方法 通常采用尘粒数以及浮游菌数或沉降菌数测定法，参照《医药工业洁净室(区)悬浮粒子、浮游菌和沉降菌的测试方法》(2010年版)等现行国家标准，进行洁净度验证，具体内容如下表所示。

洁净级别	尘粒数/ (个/m ³)		浮游菌数/ (cfu/m ³)	沉降菌数/ (cfu/Φ90mm·0.5h)
	微粒直径≥0.5μm	微粒直径≥5μm		
100级	≤3 500	≤0	≤5	≤1
10 000级	≤350 000	≤2 000	≤100	≤3
100 000级	≤3 500 000	≤20 000	≤500	≤10

2. 沉降菌数测定(11法)

消毒擦拭无菌室操作台后，先启动层流净化装置30min，将备妥的营养琼脂平板3个(经30~35℃预培养48h，证明无菌落生长)，以无菌方式(或经传递箱)移入操作间，置净化台左、中、右各1个，开盖，暴露30min后将盖盖上，在30~35℃培养箱内倒置培养48h，取出检查。3个平板生长的平均菌落数不超过1个。

如果有条件，同时应检查无菌操作架和净化工作台上的浮游菌数和尘粒数，分别应达到10 000级和100级。如果菌落数或尘粒数超标，则应清洗过滤系统中的过滤器，必要时予以更换。

在每次操作前、后，用0.1%苯扎溴铵溶液或其他消毒液擦拭操作台以及可能污染的死角。然后启动层流净化装置，同时用紫外杀菌灯照射30min。

3. 阳性菌试验

阳性菌试验应另设单独的净化工作台，不得在供试品检验用的无菌室内或简化工作台上操作。



微生物检定技术

4. 配套设施

无菌室与洗刷、灭菌消毒、培养、结果观察以及办公间等配套设施应相对集中，布局合理，避免污染，便于管理。

二、仪器

1. 培养箱

恒温培养箱（30~35℃）、生化培养箱（23~28℃）、微波炉、匀浆仪（3 000~8 000r/min）或康氏振荡器、恒温水浴、电热干燥箱（250~300℃）、电冰箱、离心机、离心管、0.45 μm 滤膜及薄膜过滤器、蒸汽灭菌器（使用时要进行生物指示剂灭菌效果检查并应定期请有关部门检定）。

2. 其他仪器

菌落计数器、显微镜（1500X）、电子天平或天平（感量 0.1g），pH 系列比色计。

三、规定

（1）检查供试品时，如果使用了表面活性剂、中和剂或灭活剂，应证明其有效性以及对微生物无毒性。

（2）除另有规定外，本检查法中细菌以及控制菌培养温度为 30~35℃；霉菌和酵母菌培养温度为 23~28℃。

（3）检验结果以 1g、1ml、10g、10ml、10cm² 为单位报告，特殊品种可以最小包装单位报告。

（4）关于“毫升”和“菌落形成单位”，《中华人民共和国药典》采用“ml”和“cfu”，国家标准采用“mL”和“CFU”，本书统一采用“ml”和“cfu”。

高等职业教育项目课程改革规划教材编审委员会

主 任 黎德良

副 主 任 王 德

委 员 侯勇志 王晓沛 汪立极 周蔚红 徐伟雄

朱爱群 郑志军 李勋贵 赵玉林 成亚萍

汤湘林 朱文韬 任 茜 陈耕夫 宋 强

冯兆凯 吴 军 程 森 王秀峰 许 惠

杨国兰

专 家 顾 问 徐国庆

目 录

序	
前言	
技术要求	
项目一 纯化水微生物计数	1
任务一 细菌计数	1
任务二 霉菌计数	12
项目二 口服制剂 原辅料霉菌和酵母菌计数	18
任务一 合并计数	18
任务二 分别计数	24
项目三 饮用水大肠菌群检查	28
任务一 依据药典法检查	28
任务二 依据国标法检查	32
项目四 口服制剂中间产品控制菌检查	37
任务一 大肠埃希菌检查	37
任务二 沙门菌检查	50
项目五 局部给药制剂原辅包装材料控制菌检查	61
任务一 铜绿假单胞菌检查	61
任务二 金黄色葡萄球菌检查	70
项目六 洁净区洁净度检测	77
任务一 悬浮粒子检测	78
任务二 浮游菌检测	83
任务三 沉降菌检测	90
项目七 口服液体制剂微生物限度检查	95
任务 枇杷止咳糖浆微生物限度检查	96
项目八 口服固体制剂微生物限度检查	101
任务 中风回春片微生物限度检查	102
项目九 局部给药制剂微生物限度检查	106
任务 三九皮炎平软膏微生物限度检查	107



微生物检定技术

项目十 拓展项目	112
任务一 药品微生物限度检查	112
任务二 食品卫生微生物检验	122
任务三 化妆品卫生微生物检验	148
附录	150
附录 A 药品微生物限度检查原始记录参考范本	150
附录 B 试药、试液、培养基	152
附录 C 药品微生物限度标准	166
附录 D 微生物限度检查法应用指导原则	169
附录 E 药品微生物实验室规范指导原则	171
参考文献	177



项目一 纯化水微生物计数

纯化水 (Purified Water) 是药品生产工艺用水。为了保证药品生产质量的安全, 纯化水微生物 (Microorganism, 简称 Microbe) 应控制在标准规定的范围内。按照微生物计数方法中供试液的制备, 纯化水作为液体水溶性供试品, 其供试液的制备方法是最简单的。通过本项目的学习, 能够掌握采用直接接种法进行细菌 (Germs, Bacteria)、霉菌 (Molds) 和酵母菌 (Yeast) 的计数。

细菌、霉菌和酵母菌计数是检测非规定灭菌制剂以及原、辅料受微生物污染程度的方法, 也是评价生产企业的药用原料、辅料、设备、器具、工艺流程、环境和操作者卫生状况的重要手段和依据。

细菌、霉菌和酵母菌计数除另有规定外, 一般可采用平板菌落计数法。这是活菌计数的方法之一, 也是目前国际上常用的一种方法, 它以琼脂平板上的细菌、霉菌和酵母菌形成的一个独立可见的菌落为计数依据。该法测定结果只反映在规定条件下所生长的细菌 (嗜中温、需氧和兼性厌氧菌)、霉菌和酵母菌的菌落数, 不包括对营养、氧气、温度、pH 值和其他因素有特殊要求的细菌、霉菌和酵母菌。

一个细菌、霉菌和酵母菌的菌落可由一个或多个菌细胞生长繁殖而成。因此供试品中所测得的菌落数, 实际为菌落形成单位数 (Colony Forming Unity, 简称 cfu), 不应理解为细菌、霉菌和酵母菌的个数。

在用本法进行测定时, 必须严格按本法所规定的条件操作, 以免产生实验误差。

学习目标与要求

1. 项目目标

按照纯化水微生物计数规定工作程序和检验操作程序, 得到可靠的纯化水微生物计数结果, 并填写操作记录, 依据执行标准判定结果是否符合规定。

2. 项目要求

- (1) 能正确接受工作指令、查阅执行标准、操作程序和相关文件, 并做好工作计划。
- (2) 能按规定确定纯化水取样点和取样量, 准备取样用具, 并正确取样。
- (3) 能按规定的微生物计数方法和样品量准备细菌、霉菌计数器皿和培养基等。
- (4) 能按规定方法对纯化水样品进行稀释、接种、培养、观察和记录。
- (5) 能正确填写细菌和霉菌计数操作记录, 按菌数报告规则报告结果, 并判定结果是否符合规定。

任务一 细菌计数

细菌计数也称为菌落总数测定 (Aerobic Bacterial Count), 是指检样经过处理, 在一



微生物检定技术

定条件下培养后（如培养基成分、培养温度、培养时间、pH 值、需氧性质等），1g（1ml）检样中所含菌落的总数。此法所得结果只包括一群本方法规定的条件下生长的嗜中温的需氧性菌落总数。

测定菌落总数便于判明样品被细菌污染的程度，是对样品进行卫生学总评价的综合依据。

一、接受指令

1. 指令

指令是指规定计算机操作类型以及相关操作数的一组字符。制药企业借用指令一词，泛指管理人员下达给工作人员的工作任务以及具体内容。纯化水质量检验中的微生物计数是由质量控制（QC）部检验人员完成的，检验人员的检验是从接受取样指令开始的。工艺用水取样指令如表 1-1 所示。

表 1-1 取样指令

工艺用水取样指令			
取样点	第一周所有取样点		
水质	纯化水		
取样方法	执行 SOP—××		
取样地点	各取样点现场		
取样份数	1		
取样量	1. ——	2. 100ml	
样品容器	塑料瓶	三角瓶	
指令下达日期		××月××日	
指令下达人		×××	
执行人		×××	
备注	目的：细菌计数		

工艺用水取样指令			
取样点	第一周所有取样点		
水质	纯化水		
取样方法	执行 SOP—		
取样地点	各取样点现场	取样份数	1
取样量	1. ——	2. 100ml	
样品容器	塑料瓶	三角瓶	
指令下达日期、时间		××××年××月××日××时××分	
指令下达人		×××	执行人 ×××
注意事项	☒ 1. 需灭菌工具、容器		
	☒ 2. 注意无菌操作		
	☒ 3. 请在 24h 内取样		
	☒ 4. 取样后 3h 内接种检验		
	☒ 5. 目的：细菌计数		
取样记录	1. 操作与指令有无偏差 ☐ 无 ☐ 有 2. 偏差情况及说明：		
取样日期		取样人	

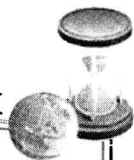
注：此表由 QC 部负责人填写，左联留底，右联交检验人员执行，QC 部取样人员作为取样的依据。

2. 指令分析

（1）取样 取样就是用一定的方法从大批物料中取出少量有代表性物料的过程。取样所取出的这部分物料叫做试样或供试品（如为若干份之和则叫平均试样）。为了保证试样的代表性，取样件数和取出的试样量都是愈多愈好。但这样的结果是不经济的，也没有必要。在实际工作中，总是要确定一个有代表性的取样件数和最小试样量。

（2）取样点的范围 指令中指定的每月第一周所有取样点，需要在企业药品生产质量管理规范（GMP）有关纯化水的检验周期文件中查阅。

（3）取样准备



1) 取样用容器具

①饮用水取样用容器具(数量是指一个取样点所需)为600ml塑料瓶1个、500ml三角瓶1个和棉塞(配三角瓶)1个。

②纯化水取样用容器具如下:酒精棉球适量;根据取样点数,每点需600ml塑料瓶、100ml三角瓶和棉塞各1个;电导率仪1台。

2) 取样用容器具的清洗 执行规定的清洗程序。

3) 取样用容器具的灭菌 微生物限度检查用水样取样容器灭菌,湿热 124~126℃, 30min。

(4) 取样点的选取

1) 饮用水 纯化水水源(冷冻水泵房)。

2) 纯化水 送水口、回水口、贮罐和各使用点。

(5) 取样量 每个取样点按所检测项目需要样品量之和乘以3取样,即一次检验量的3倍。

(6) 进入取样地点 现场取样时,各取样点应按该区域洁净级别所规定的人员、物料净化程序进入。

(7) 取样方法

1) 取样前测试 取样前打开水龙头,放水2~5min,其间测电导率3次以上,至所测值稳定,并符合规定,即可取样。

2) 取样

①用塑料瓶接取水样约600ml,加盖(此样用于理化检测),关闭水龙头。

②用酒精棉球擦拭出水口外周,再打开水龙头,放水数秒,迅速打开已灭菌的三角瓶棉塞,接取水样约100ml,迅速加塞及包口纸(此样用于微生物检测),用棉绳扎紧。关闭水龙头,取样完毕。

(8) 取样标志 在已取好水样的瓶上贴上标签,注明取样点、取样时间和取样人等,送化验室。

(9) 异常情况 取样过程中如果发现预测指标不符合规定及管道漏水等异常情况,应在取样签上注明,并及时通知工程(ED)部和质量保证(QA)部。

【思考】从指令中还读到什么?要开展指令给定的工作还有什么问题?需要哪些依据?

【训练】确定一个纯化水取样点,并按规定进行取样。

二、查阅依据

1. 依据

依据是指规范取样和检验过程行为的管理和操作文件,以及判定检验结果的标准文件。

2. 本项目相关依据

本项目执行中,除纯化水取样指令外,还涉及工艺用水监控管理规程、工艺用水取样标准操作程序、工艺用水取样记录、取样仪器管理规程、取样器具清洁消毒标准操作程序、取样器具清洁消毒记录、微生物限度检查标准操作程序以及纯化水检验原始记录和检验报告书





等。以上依据应查阅企业现行 GMP 文件。

三、制订计划

1. 工作流程

细菌计数工作流程为：准备→取样→供试液制备→接种→培养→观察→记录→报告。

2. 工作进度

细菌计数具体进程安排参考范本，如表 1-2 所示。

表 1-2 工作进程计划表

项目一 纯化水微生物计数 （任务一 细菌计数）				
序 号	日 期	工 作 内 容	责 任 人	备 注
1	第一天	1. 接受工作指令、查阅工作依据、制订工作计划、实施检验操作 2. 检验操作准备内容 (1) 细菌计数（取样和接种的准备） 器皿：清洗→干燥→包裹→灭菌→存放 稀释剂：配制→包口→灭菌→存放 培养基：配制→包口→灭菌→存放 (2) 细菌计数（操作和记录）：取样→接种→培养	A、B	
2	第二天	细菌计数（观察和记录）：观察培养结果，初步点计菌落数	A、B	
3	第三天	细菌计数（观察和记录）：观察培养结果，点计菌落数 填写操作记录，报告检验结果	A 或 B	

注：此进程表按 2 人一组，分 A 角和 B 角。

【练习】参考表 1-2，每个小组结合教学课程表，制定本小组完成项目一之任务一的学习进程（包含课内和课外时间）。

四、实施操作

1. 准备

(1) 玻璃器皿 锥形瓶（250~300ml，内装玻璃珠若干；500ml，1000ml）、培养皿（直径 9cm）、量筒（100ml，500ml）、试管（18mm×180mm、28mm×198mm）以及塞、吸管（1ml，分度 0.01，10ml，分度 0.1）、注射器（20ml，30ml 等）、注射针头、载玻片、盖玻片、玻璃消毒缸（带盖）、不锈钢桶（带盖）。

玻璃器皿用前应洗涤干净；吸管、量筒不挂水滴，无残留抗菌物质。吸管口上端距 0.5cm 处塞入长约 2cm 疏松适宜的棉花，置于吸管筒内或牛皮纸袋中。锥形瓶、量筒、试管均应加硅胶塞或棉塞，若用振荡器制备混悬液时，还需用玻璃纸包裹瓶塞，以免振荡时供试液污染瓶塞，再用牛皮纸包扎。对于玻璃器皿，均须于高压蒸汽 121℃灭菌 30min，烘干或 160℃干热灭菌 2h，备用。

(2) 用具 用具包括大、小橡胶乳头（放于干净带盖的容器中，并应定期用 70%~75% 的乙醇溶液浸泡）。无菌衣、帽、口罩、手套（洗净后配套，用牛皮纸包严）灭菌，备用。也可用一次性无菌衣、帽、口罩、手套。

另外，还有接种环（白铍金或镍铬合金，环径 4~5mm、长度 6~10cm）、乙醇灯、乙

醇棉球或碘伏棉球、灭菌剪刀或灭菌手术刀和灭菌镊子、灭菌钢锥、灭菌称样纸、不锈钢药匙、试管架、火柴、记号笔、白瓷盘、洗手盆、陶瓦盖（12cm）、检验记录表等。

（3）试液、稀释剂和试剂

1）试液

①0.1%苯扎溴铵溶液或其他适宜的消毒液（供洗手、擦拭操作台面用）。

②5%石炭酸溶液或其他适宜的消毒液（配好后装入玻璃消毒缸内，作消毒带菌吸管之用）。

③75%乙醇溶液。

④碘酊或碘伏溶液。

2）稀释剂和试剂 配制稀释剂后，用高压蒸汽灭菌法灭菌。

①0.9%无菌氯化钠溶液（如附录 B3.1 所述）。

②pH7.0 无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液（如附录 B3.2 所述）。

【训练】为了保证被检品在取样后规定的时间内完成检验，取样前应准备好取样和检验需要的各种器皿（清洗→干燥→包裹）、培养基和稀释剂等（配制→分装→包裹），并灭菌备用。请填写备料单（如表 1-3 所示）。

表 1-3 备料单

项目一 纯化水微生物计数 （任务一 细菌计数）

序 号	品 名	规 格	数 量	备 注
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

3）培养基 营养琼脂培养基（详见附录 B5.2）。培养基制备注意事项如下：

①采用干燥培养基，按说明配制，应对灭菌后培养基的 pH 值进行校验。若为自配培养基，则应挑选原料，应测定琼脂凝固力，以确定配制时琼脂用量。试剂规格应为化学纯以上。

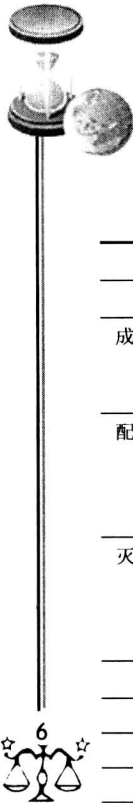
②配制的培养基不应有沉淀。如有沉淀，应于溶化后趁热过滤，灭菌后使用。

③培养基的分装量不得超过容器的 2/3，以免灭菌时溢出。包装时，塞子必须塞紧，以免松动或脱落造成染菌。

④培养基配制后应在 2h 内灭菌，避免细菌繁殖。

⑤灭菌后的培养基应保存在 2～25℃，防止被污染，可在三周内用毕；保存于密闭容器中，可在一年内使用。制备好的培养基放置时间不宜过长，以免水分散失或染菌。

⑥用水浴或微波炉加热溶化琼脂培养基，勿用电炉直接溶化琼脂培养基，以免营养成分过度受热而破坏。已溶化的培养基应一次用完，剩余培养基不宜再用。培养基不能反复加热溶化。



【训练】配制培养基并填写配制和使用记录表（见表 1-4）。

表 1-4 培养基配制和使用记录

培养基名称		生产单位			
批 号		配制日期		配制量	
成分：					
操作人： 复核人：					
配制：					
操作人： 复核人：					
灭菌：					
操作人： 复核人：					
使用日期	使用数量	被测产品	使用人	备 注	

【训练】对所有器皿、培养基和稀释剂等按规定条件灭菌，并填写灭菌器使用记录表（见表 1-5）。

表 1-5 灭菌器使用记录表

仪器型号：		仪器编号：		安放地点：	
序 号	日 期	灭 菌 内 容	灭 菌 时 间	灭菌条件/℃	备 注
1			: ~ :		
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

(4) 试验准备

- 1) 将供试品以及所有已灭菌的平皿、锥形瓶、匀浆杯、试管、吸管（1ml、10ml）、量筒和稀释剂等经传递窗移至无菌室内。每次试验所用物品必须事先做好计划，准备足够用量，避免操作过程中出入无菌间。编号后将全部外包装（牛皮纸）去掉。
- 2) 开启无菌室紫外杀菌灯和空气过滤装置，并使其工作不少于 30 min。
- 3) 关闭紫外杀菌灯后，操作人员用肥皂洗手，进入缓冲间，换工作鞋。再用 0.1% 苯扎