

高等师范院校生物实验指导用书

XINBIAN
SHENGWU SHIYAN
JISHU SHOUC

新编

生物实验技术手册

下册

主 编 阮期平
副主编 陈希文 游章强 胡进耀



西南交通大学出版社
[Http://press.swjtu.edu.cn](http://press.swjtu.edu.cn)



国家卫生和计划生育委员会规划教材

供临床医学专业
用

新编

生物实验技术手册

第2版

主编 王学军
副主编 王学军 王学军 王学军

高等师范院校生物实验指导用书

新编生物实验技术手册

下册

主 编 阮期平

副主编 陈希文 游章强 胡进耀

西南交通大学出版社

· 成 都 ·

图书在版编目 (C I P) 数据

新编生物实验技术手册 / 阮期平主编, 一成都:
西南交通大学出版社, 2010.9
高等师范院校生物实验指导用书
ISBN 978-7-5643-0887-2

I. ①新… II. ①阮… III. ①生物学—实验—师范大学—教材 IV. ①Q-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 180351 号

高等师范院校生物实验指导用书

新编生物实验技术手册

(上、下册)

主编 阮期平

*

责任编辑 牛 君

特邀编辑 陈慧清 李湘灵

封面设计 本格设计

西南交通大学出版社出版发行

成都二环路北一段 111 号 邮政编码: 610031 发行部电话: 028-87600564

<http://press.swjtu.edu.cn>

成都蓉军广告印务有限责任公司印刷

*

成品尺寸: 185 mm×260 mm 总印张: 38.25

总字数: 950 千字

2010 年 9 月第 1 版 2010 年 9 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-5643-0887-2

套价: 66.00 元

图书如有印装质量问题 本社负责退换
版权所有 盗版必究 举报电话: 028-87600562

目 录

第七章 发酵技术（含无菌操作技术）	333
第一节 基本原理	333
第二节 实验项目	336
第八章 免疫技术	386
第一节 基本原理	386
第二节 实验项目	387
第九章 电泳技术	392
第一节 基本原理	392
第二节 实验项目	406
第十章 层析技术	434
第一节 基本原理	434
第二节 实验项目	463
第十一章 核酸技术	477
第一节 基本原理	477
第二节 实验项目	480
第十二章 养殖与栽培技术（花卉、果树、食用菌等）（杂交）	498
第一节 基本原理	498
第二节 实验项目	501
第十三章 生态环境监测与治理技术	506
第十四章 见习与实习	544
参考文献	598

第七章 发酵技术（含无菌操作技术）

第一节 基本原理

一、概 念

通常所说的发酵，多指生物体对于有机物的某种分解过程。发酵是人类较早接触的一种生物化学反应，如今在食品工业、生物和化学工业中均有广泛应用。其也是生物工程的基本过程，即发酵工程。对于其机理以及过程控制的研究还在继续。

最初发酵是用来描述酵母菌作用于果汁或麦芽汁产生气泡的现象，或者是指酒的生产过程，即原始的发酵。

在食品工业中，是指运用生物体，包括微生物、植物细胞、酵母菌，使有机物分解的生物化学反应过程。相应的发酵技术用于制酒、豆类发酵食品。

在生化和生理学意义上，发酵是指微生物在无氧条件下，分解各种有机物、产生能量的一种方式；或者更严格地说，发酵是以有机物作为电子受体的氧化还原产能反应。如葡萄糖在无氧条件下被微生物利用，产生酒精并放出二氧化碳。

而工业生产上的发酵则是泛指利用微生物制造或生产某些产品的过程，包括：

厌氧培养的生产过程，如酒精、乳酸等。

通气（有氧）培养的生产过程，如抗生素、氨基酸、酶制剂等。

其产品有细胞代谢产物，也包括菌体细胞、酶等。

二、历 史

法国化学家巴斯德是首位发酵学者，早在 1857 年，他将酵母与发酵联系了起来。巴斯德最初将发酵定义为“无需空气的呼吸”，他说“一切发酵过程都是微生物作用的结果”。巴斯德认为，酿酒是发酵，是微生物在起作用；酒变质也是发酵，是另一类微生物在作祟；随着科学技术的发展，可以用加热处理等方法来杀死有害的微生物，防止酒变质。同时，也可以把发酵的微生物分离出来，通过人工培养，根据不同的要求去诱发各种类型的发酵，获得所需的发酵产品。

德国人毕希纳确定了引起发酵的原因在于酵母分泌了一种他定义为“酿酶”的物质，他于 1907 年获得诺贝尔化学奖，其之后的研究则为丹麦嘉士伯的科学家所推动。在获取了足够的关于酵母和发酵的知识后，如今发酵的研究达到了分子生物学水平。

三、反 应

主条目：糖酵解、呼吸作用。

发酵反应的过程依据不同糖的利用与产物的生产而不同。以葡萄糖生产酒精为例，说明酿酒发酵的过程，同时这也是最经典的发酵反应：

化学式： $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \longrightarrow 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 2\text{CO}_2 + 2\text{ATP}$ （放出能量：118 kJ/mol）

文字式：糖（葡萄糖、果糖或蔗糖） $\longrightarrow$ 醇类（乙醇）+ 二氧化碳 + 能量（ATP）

就实际反应的生化途径而言，在厌氧呼吸的初期，往往是糖酵解途径，之后的途径与终产物有关。

四、培 养

在工业上，发酵过程的发生处于严格的控制之下，这种控制称为培养，即分批培养、补料分批培养、半连续培养和连续培养。

1. 分批培养

分批发酵是最为简单的发酵过程，培养基中接入菌种以后，没有物料的加入和取出，除了空气的通入和排气。整个过程中菌的浓度、营养成分的浓度和产物浓度等参数都随时间变化。

微生物生长分为：迟滞期、对数生长期、稳定期和死亡期。在迟滞期，菌体没有分裂只有生长，因为当菌种接种入一个新的环境，细胞内的核酸、酶等稀释，这时细胞不能分裂。当细胞内与细胞分裂相关的物质浓度达到一定程度，细胞开始分裂，这时细胞生长很快，这个时期称为对数生长期。随着细胞生长，培养液中的营养物减少，废物积累，导致细胞生长速率下降，进入减速期和稳定期。最后当细胞死亡速率大于生成速率，进入死亡期。对于初级代谢产物，在对数生长期初期就开始合成并积累，而次级代谢产物则在对数生长期后期和稳定期大量合成。

分批培养的操作简单，周期短，染菌机会少，生产过程和产品质量容易掌握；然而产率低，不适于测定动力学数据。

2. 补料分批培养

补料分批培养是指在分批培养过程中补入新鲜的料液，以克服营养不足而导致的发酵过早结束的缺点。在此过程中只有料液的加入没有料液的取出，所以发酵结束时发酵液体积比发酵开始时有所增加。在工厂的实际生产中采用这种方法很多。

在这样一种系统中可以维持低的基质浓度，避免快速利用碳源的阻遏效应；可以通过补料控制达到最佳的生长和产物合成条件；还可以利用计算机控制合理的补料速率，稳定最佳生产工艺。同时，由于没有物料取出，产物的积累最终导致生产速率的下降。由于有物料的加入增加了染菌机会。

3. 半连续培养

在补料分批培养的基础上间歇放掉部分发酵液（带放）称为半连续培养。某些品种采取这种方式，如四环素发酵。放掉部分发酵液，再补入部分料液，使代谢有害物得以稀释有利于产物合

成,提高了总产量。然而这样做也导致代谢产生的前体物被稀释,提取的总体积增大。

4. 连续培养

在发酵过程中一边补入新鲜料液一边放出等量的发酵液,使发酵罐内的体积维持恒定。达到稳态后,整个过程中菌的浓度、产物浓度、限制性基质浓度都是恒定的。

在连续培养中控制稀释速率可以使发酵过程最优化。发酵周期长,可以得到高的产量。然而假如菌种不稳定的话,长期连续培养会引起菌种退化,降低产量。长时间补料染菌机会大大增加,这样的发酵方式在实际生产中并不常用。

五、应用

食品工业中经常应用发酵过程。应用到淀粉,可以使淀粉分解为较小的片段,同时放出二氧化碳,是制造面包的必须过程;应用到酿酒过程,使糖类分解成酒精并同时放出二氧化碳;应用到制茶工艺,使茶叶中的没食子茶素分解再合成为茶黄素,使茶叶成为红茶;此外像制作丹贝、腐乳、奶酪、酸奶等都需要发酵过程。

在制药工业上,现代发酵工程藉由生物反应器——发酵罐——来进行胰岛素、干扰素、生长激素、抗生素和疫苗等多种医疗保健药物,以及天然杀虫剂、细菌肥料和微生物除草剂等农用生产资料等的生产。现在,利用植物细胞的植物发酵,真菌细胞等发酵生物技术,生产高价的生物性医药产品,例如灵芝发酵也成为追捧的热点。

化学工业上则用于生产氨基酸、香料、生物高分子、酶以及维生素和单细胞蛋白等。

六、发酵工程

发酵已经从过去纯粹经验化的自然过程,发展成为一个包含微生物学、化学工程、基因工程、细胞工程、机械工程和计算机软硬件工程等在内的多学科工程,即发酵工程。

发酵工程是生物工程的一个极其重要的分支,主要研究如何在最适发酵条件下,使发酵罐得以大量培养细胞和高效生产代谢产物的工艺技术。

从广义上讲,发酵工程由三部分组成:上游工程、发酵工程、下游工程。

发酵工程设计的一般过程主要包括:菌种选育、分子育种;发酵培养基的优化与设计;种子扩大培养;发酵过程动力学的设计;反应器中氧传递的控制;发酵过程的工艺控制;发酵工程优化放大。

用于防止微生物进入人体组织或其他无菌范围地操作技术称为无菌操作。如外科手术需防止细菌进入伤口。在各种生物实验中,为了防止微生物的生长和繁殖影响实验的进行,也要在无菌的环境下进行。

无菌操作的要求是:操作前将界面上的细菌和病毒等微生物杀灭;操作过程中是界面与外界隔离,避免微生物的侵入。

无菌操作原则:

- (1) 在执行无菌操作时,必须明确物品的无菌区和非无菌区。
- (2) 执行无菌操作前,先戴帽子、口罩、洗手,并将手擦干,注意空气和环境清洁。

(3) 夹取无菌物品, 必须使用无菌持物钳。

(4) 进行无菌操作时, 凡未经消毒的手、臂、均不可直接接触无菌物品或超过无菌区取物。

(5) 无菌物品必须保存在无菌包或灭菌容器内, 不可暴露在空气中过久。无菌物与非无菌物应分别放置。无菌包一经打开即不能视为绝对无菌, 应尽早使用。凡已取出的无菌物品虽未使用也不可再放回无菌容器内。

(6) 无菌包应按消毒日期顺序放置在固定的柜橱内, 并保持清洁干燥, 与非灭菌包分开放置, 并经常检查无菌包或容器是否过期, 其中用物是否适量。

(7) 无菌盐水及酒精、新洁尔灭棉球罐每周消毒一次, 容器内敷料如干棉球、纱布块等, 不可装得过满, 以免取用时碰在容器外面被污染。

第二节 实验项目

实验一 消毒、灭菌与常用仪器的使用

一、概 念

1. 消 毒

消毒是指杀灭或清除传播媒介上的病原微生物, 使之达到无害化的处理。根据有无已知的传染源可分预防性消毒和疫源性消毒; 根据消毒的时间可分为随时消毒和终末消毒。

2. 灭 菌

灭菌是指杀灭或清除传播媒介上的所有微生物(包括芽孢), 使之达到无菌程度。经过灭菌的物品称“无菌物品”。用于需进入人体内部, 包括进入血液、组织、体腔的医用器材, 如手术器械、注射用具、一切置入体腔的引流管等, 要求绝对无菌。

消毒与灭菌是两个不同的要领。灭菌可包括消毒, 而消毒却不能代替灭菌。消毒多用于卫生防疫方面, 灭菌则主要用于医疗护理。

二、消毒、灭菌的原则

1. 明确消毒的主要对象

应具体分析引起感染的途径、涉及的媒介物及病原微生物的种类, 有针对性地使用消毒剂。

2. 采取适当的消毒方法

根据消毒对象选择简便、有效、不损坏物品、来源丰富、价格适中的消毒方法。

医院诊疗器械按污染后可造成的危害程度和在人体接触部位不同分为三类:

(1) 高度危险的器材 穿过皮肤、黏膜而进入无菌的组织或器官内部, 或与破损的

皮肤黏膜密切接触的器材,如手术器械、注射器、心脏起搏器等,必须选用高效消毒法(灭菌)。

(2) 中度危险的器材仅与皮肤、黏膜密切接触,而不进入无菌组织内,如内窥镜、体温计、氧气管、呼吸机及所属器械、麻醉器械等。应选用中效消毒法,杀灭除芽孢以外的各种微生物。

(3) 低度危险器材和物品 不进入人体组织,不接触黏膜,仅直接或间接地与健康无损的皮肤接触,如果没有足够数量的病原微生物污染,一般并无危害,如口罩、衣被、药杯等,应选用低效消毒法或只作一般卫生处理。只要求去除一般细菌繁殖体和亲脂病毒。

3. 控制影响消毒效果的因素

许多因素会影响消毒剂的作用,而且各种消毒剂对这些因素的敏感性差异很大。

(1) 微生物的种类。

不同类型的病原微生物对消毒剂抵抗力不同,因此,进行消毒时必须区别对待。

① 细菌繁殖体 易被消毒剂消灭,一般革兰氏阳性细菌对消毒剂较敏感,革兰氏阴性杆菌则常有较强的抵抗力。繁殖体对热敏感,消毒方法以热力消毒为主。

② 细菌芽孢 芽孢对消毒因子耐力最强,杀灭细菌芽孢最可靠的方法是热力灭菌,电离辐射和环氧乙烷熏蒸法。在化学消毒剂中,戊二醛、过氧乙酸能杀灭芽孢,但可靠性不如热力灭菌法。

③ 病毒 对消毒因子的耐力因种类不同而有很大差异,亲水病毒的耐力较亲脂病毒强。

④ 真菌 对干燥、日光、紫外线以及多数化学药物耐力较强,但不耐热(60℃ 1 h 杀灭)。

(2) 微生物的数量。

污染的微生物数量越多需要消毒的时间就越长,剂量越大。

(3) 有机物的存在。

① 有机物在微生物的表面形成保护层妨碍消毒剂与微生物的接触或延迟消毒剂的作用,以至于微生物逐渐产生对药物的适应性。② 有机物和消毒剂作用,形成溶解度比原来更低或杀菌作用比原来更弱的化合物。③ 一部分消毒剂与有机物发生了作用,则对微生物的作用浓度降低。④ 有机物可中和一部分消毒剂。消毒剂中重金属类、表面活性剂等受有机物影响较大,对戊二醛影响较小。

(4) 温度。

随着温度的升高,杀菌作用增强,但温度的变化对各种消毒剂影响不同。如甲醛、戊二醛、环氧乙烷的温度升高1倍时,杀菌效果可增加10倍。而酚类和酒精受温度影响小。

(5) pH。

从两方面影响杀菌作用:① 对消毒剂的作用。改变其溶解度和分子结构。② pH过高或过低对微生物的生长均有影响。在酸性条件下,细菌表面负电荷减少,阴离子型消毒剂杀菌效果好。在碱性条件下,细菌表面负电荷增多,有利于阳离子型消毒剂发挥作用。

(6) 处理剂量与监测。

保证消毒、灭菌处理的剂量,加强效果监测,防止再污染。

三、消毒、灭菌的方法

(一) 物理消毒灭菌法

利用物理因子杀灭微生物的方法。包括热力消毒灭菌、辐射消毒、空气净化、超声波消毒和微波消毒等。

1. 热力消毒灭菌

高温能使微生物的蛋白质和酶变性或凝固(结构改变导致功能丧失),新陈代谢受到障碍而死亡,从而达到消毒与灭菌的目的。在消毒中,热可分为湿热与干热两大类。

(1) 干热消毒灭菌。

干热是指相对湿度在 20% 以下的高热。干热消毒灭菌是由空气导热,传热效果较慢。一般繁殖体在干热 80 °C ~ 100 °C 中经 1 h 可以杀死,芽孢需 160 °C ~ 170 °C 经 2 h 方可杀死。

① 燃烧法。

燃烧法是一种简单、迅速、彻底的灭菌方法,因对物品的破坏性大,故应用范围有限。

烧灼法:一些耐高温的器械(金属、搪瓷类),在急用或无条件用其他方法消毒时可采用此法。将器械放在火焰上烧灼 1 ~ 2 min。若为搪瓷容器,可倒少量 95% 乙醇,慢慢转动容器,使乙醇分布均匀,点火燃烧至熄灭约 1 ~ 2 min。采集作细菌培养的标本时,在留取标本前后(即启盖后,闭盖前)都应将试管(瓶)口和盖子置于火焰上烧灼,来回旋转 2 ~ 3 次。

燃烧时要注意安全,须远离易燃易爆物品,如氧气、汽油、乙醚等。燃烧过程不得添加乙醇,以免引起火焰上窜而致灼伤或火灾。锐利刀剪为保护刀锋,不宜用燃烧灭菌法。

焚烧:某些特殊感染,如破伤风、气性坏疽、绿脓杆菌感染的敷料,以及其他已污染且无保留价值的物品,如污纸、垃圾等,应放入焚烧炉内焚烧,使之炭化。

② 干烤法。

电热烤箱:利用烤箱的热空气消毒灭菌。烤箱通电加热后的空气在一定空间不断对流,产生均一效应的热空气直接穿透物体。一般繁殖体在干热 80 °C ~ 100 °C 中经 1 h 可以杀死,芽孢、病毒需 160 °C ~ 170 °C 经 2 h 方可杀死。热空气消毒灭菌法适用于玻璃器皿、瓷器以及明胶海绵、液体石蜡、各种粉剂、软膏等。灭菌后待箱内温度降至 50 °C ~ 40 °C 以下才能开启柜门,以防炸裂。

微波消毒:微波是一种高频电磁波,其杀菌的作用原理,一为热效应,所及之处产生分子内部剧烈运动,使物体里外湿度迅速升高;一为综合效应,诸如化学效应、电磁共振效应和场致力效应。目前已广泛应用于食品、药品的消毒,用微波灭菌手术器械包、微生物实验室用品等亦有报告。若物品先经 1% 过氧乙酸或 0.5% 新洁尔灭湿化处理后,可起协同杀菌作用,照射 2 min,可使杀芽孢率由 98.81% 增加到 99.98% ~ 99.99%。

微波对人体有一定危害性,其热效应可损伤睾丸、眼睛晶状体等,长时间照射还可致神经功能紊乱。使用时可设置不透微波的金属屏障或戴特制防护眼镜等。

(2) 湿热消毒灭菌。

湿热消毒灭菌是由空气和水蒸气导热,传热快,穿透力强,湿热灭菌法比干热灭菌法所需温度低、时间短。

① 煮沸法。

将水煮沸至 100°C ，保持 $5\sim 10\text{ min}$ 可杀灭繁殖体，保持 $1\sim 3\text{ h}$ 可杀灭芽孢。在水中加入碳酸氢钠至 $1\%\sim 2\%$ 浓度时，沸点可达 105°C ，能增强杀菌作用，还可去污防锈。在高原地区气压低、沸点低的情况下，要延长消毒时间(海拔每增高 300 m ，需延长消毒时间 2 min)。此法适用于不怕潮湿耐高温的搪瓷、金属、玻璃、橡胶类物品。

煮沸前物品清洗干净，打开轴节或盖子，将其全部浸入水中。大小相同的碗、盆等均不能重叠，以确保物品各面与水接触。锐利、细小、易损物品用纱布包裹，以免撞击或散落。玻璃、搪瓷类放入冷水或温水中煮，金属、橡胶类则待水煮沸后放入。消毒时间均从水沸后开始计时。若中途再加入物品，则重新计时，消毒后及时取出物品，保持其无菌状态。

经煮沸灭菌的物品，“无菌”有效期不超过 6 h 。

② 高压蒸汽灭菌法。

高压蒸汽灭菌器装置严密，输入蒸汽不外逸，温度随蒸汽压力增高而升高，当压力增至 $103\sim 206\text{ kPa}$ 时，湿度可达 $121.3^{\circ}\text{C}\sim 132^{\circ}\text{C}$ 。高压蒸汽灭菌法就是利用高压和高热释放的潜热进行灭菌，为目前可靠而有效的灭菌方法。适用于耐高温、高压，不怕潮湿的物品，如敷料、手术器械、药品、细菌培养基等。

潜热是指当 $1\text{ g } 100^{\circ}\text{C}$ 的水蒸气变成 $1\text{ g } 100^{\circ}\text{C}$ 水时，释放出 $2\,255.2\text{ J}$ 的热量。

高压蒸汽灭菌的关键问题是为热的传导提供良好条件，而其中最重要的是使冷空气从灭菌器中顺利排出。因为冷空气导热性差，阻碍蒸汽接触欲灭菌物品，并且还可减低蒸汽分压使之不能达到应有的温度。

图 7.1 为手提式高压蒸汽灭菌器：为金属圆筒，分为二层，隔层内盛水，有盖，可以旋紧，加热后产生蒸汽。锅外有压力表，当蒸汽压力升高时，温度也随之相应升高。该灭菌器体积小，可自发蒸汽，便于携带。

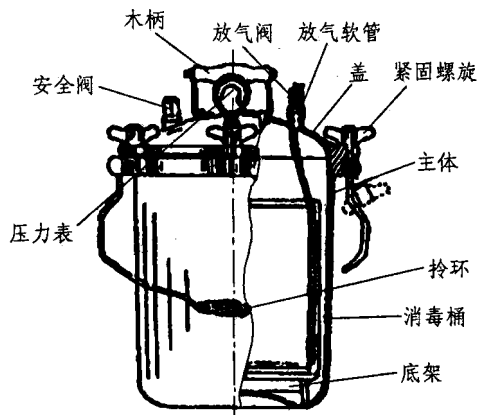


图 7.1

操作方法如下：在灭菌器中盛水 $3\,000\text{ mL}$ ；将拟灭菌的物品随同盛装的桶放入灭菌器内；将盖子上的排气软管插于铝桶内壁的方管中；盖好盖子，拧紧元宝螺丝，勿使漏气；锅下加热，打开排气活门，放出冷空气（一般在水沸后排气 $10\sim 15\text{ min}$ ），关闭排气活门，使压力逐渐上升至 103 kPa ，温度达 121.3°C ，维持 20 min 后，排气至“0”时，慢慢打开盖子。如果突然开盖，冷空气大量进入，蒸汽凝成水滴，使物品潮湿，且玻璃类易发生爆裂。

高压蒸汽灭菌法的注意事项:

第一, 无菌包不宜过大 (小于 $50\text{ cm} \times 30\text{ cm} \times 30\text{ cm}$), 不宜过紧, 各包裹间要有间隙, 使蒸汽能对流易渗透到包裹中央。消毒前, 打开储槽或盒的通气孔, 有利于蒸汽流通。而且排气时使蒸汽能迅速排出, 以保持物品干燥。消毒灭菌完毕, 关闭储槽或盒的通气孔, 以保持物品的无菌状态。

第二, 布类物品应放在金属类物品上, 否则蒸汽遇冷凝聚成水珠, 使包布受潮。阻碍蒸汽进入包裹中央, 严重影响灭菌效果。

第三, 定期检查灭菌效果。经高压蒸汽灭菌的无菌包、无菌容器有效期以 1 周为宜。

2. 国徽消毒灭菌

包括光照消毒和电离国徽。光消毒主要是利用紫外线照射, 使菌体蛋白发生光解、变性, 菌体内的氨基酸、核酸、酶遭到破坏而致细菌死亡。紫外线通过空气时, 可使空气中的氧气电离产生臭氧, 加强了杀菌作用。紫外线穿透性差, 不能透过玻璃, 尘埃, 纸张和固体物质; 透过空气能力较强, 透过液体能力很弱。光照消毒对杆菌杀菌力强, 对球菌较弱, 对霉菌、酵母菌更弱。对生长期细菌敏感, 对芽孢敏感性差。光照消毒因地区、季节、环境的影响, 效果有所差异, 当温度低于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、湿度超过 50% 时, 杀菌能力减弱。因此, 消毒时, 必须提高温度, 延长消毒时间, 一般室温保持在 $10\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为宜。减少空气中的尘埃, 直接照射物品, 可提高消毒的效果。

(1) 日光曝晒法。

日光由于其热、干燥和紫外线作用, 具有一定的杀菌力, 将物品放在直射日光下, 曝晒 6 h, 定时翻动, 使物体各面均受日光照射。此法多用于被褥、床垫、毛毯、书籍等物品的消毒。

(2) 紫外线灯管消毒法。

紫外线因其光谱位于紫色可见光之外, 故称紫外线。紫外线灯管是一种人工制造的低压汞石英灯管, 管内注入压强 $0.4 \sim 0.6\text{ kPa}$ 的氙气和水银数滴, 管子两端用钨丝做成螺旋状电极。通电后, 氙气先电离, 然后冲击水银电离, 发放紫外线。经 $5 \sim 7\text{ min}$ 后受紫外线照射的空气, 才能使氧气产生臭氧。因此消毒时间应从灯亮 $5 \sim 7\text{ min}$ 后计时, 紫外线杀菌能力与其波长有密切关系。最佳杀菌波长为 2537 nm (是细菌对紫外线吸收最快的波长)。

常用的紫外线灯管有 15 W、20 W、30 W、40 W 四种, 可采用悬吊式、移动式灯架照射, 或紫外线消毒箱内照射。紫外线灯配用抛光铝板作反向罩, 可增强消毒效果。

用于物品消毒时, 如选用 30W 紫外线灯管, 有效照射距离为 $25 \sim 60\text{ cm}$, 时间为 $25 \sim 30\text{ min}$ (物品要摊开或挂起, 扩大照射面)。

用空气消毒时, 室内每 10 m^2 安装 30 W 紫外线灯管 1 支, 有效距离不超过 2 m。照射时间为 $30 \sim 60\text{ min}$, 照射前清扫尘埃, 照射时关闭门窗, 停止人员走动。

注意事项: ① 注意眼睛、皮肤的保护, 照射时嘱病人勿直视紫外线光源, 可戴墨镜, 或有用纱布遮盖双眼。用被单遮盖肢体, 以免引起眼炎或皮肤红斑。② 紫外线灯管要保持清洁透亮, 灯管要轻拿轻放, 关灯后应间隔 $3 \sim 4\text{ min}$ 后才能再次开启, 一次可连续使用 4 h。③ 定期监测消毒效果。紫外线的杀菌力取决于紫外线输出量的大小, 灯管的输出强度随使用时间的增加而减弱。故日常消毒多采用紫外线强度计或化学指示卡进行监测, 新管 (30 W) 不低于 $100\text{ }\mu\text{W}/\text{cm}^2$; 使用中的旧管在 $50 \sim 70\text{ }\mu\text{W}/\text{cm}^2$, 则需延长消毒时间; 低于 $50\text{ }\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 者必须更换。定期进行空气细菌培养, 以检查杀菌效果。

(3) 臭氧灭菌灯。

(电子灭菌灯)消毒法 灭菌灯内装有 1~4 支臭氧发生管,在电场作用下,将空气中的氧气转换成高纯臭氧。臭氧主要依靠其强大的氧化作用而杀菌。使用灭菌灯时,关闭门窗,确保消毒效果。用于空气消毒时,人员须离开现场,消毒结束后 20~30 min 方可进入。

(4) 电离辐射灭菌法。

应用放射性同位素 γ 源或直线加速器发生的高能量电子束进行灭菌。适用于忌热物品的常温灭菌方法,又称“冷灭菌”。尤其对一次性应用的医疗器材、密封包装后需长期储存的器材、精密医疗器材和仪器,以及移植和埋植的组织 and 人工器官、节育用品等特别适用。

3. 空气净化

空气本身缺乏细菌维持生活所需的营养物,再加上日光对细菌的影响,故空气中细菌很少。但如果室内光照和通风较差,同时微生物不断地从室内人群的呼吸道、皮肤排出,以及室内物品表面的浮游菌。使室内空气中细菌比室外多。利用通风或空气过滤器可使室内空气中的细菌、尘埃大大降低,达到净化目的。

(1) 自然通风。

定时开放门窗,以通风换气,这样可降低室内空气含菌的密度,短时间内使大气中的新鲜空气替换室内的污浊空气。通风是目前最简便、行之有效的净化空气的方法。通风的时间可根据湿度和空气流通条件而定。夏季应经常开放门窗以通风换气;冬季可选择清晨和晚间开窗,每日通风换气 2 次,每次 20~30 min。

(2) 空气过滤除菌。

空气过滤除菌是医院空气净化措施中采取的现代化设备,即空气通过孔隙小于 0.2 μm 的高效过滤器,利用物理阻留、静电吸附等原理除去介质中的微生物。通过过滤除菌使病室、手术室或无菌药物控制室内的空气达到绝对净化的目的。

凡在送风系统上装备高效空气过滤器的房间,称生物洁净室。适用于无菌护理室、无菌手术室等。空气净化的进展,为重大手术的开展和治疗大面积烧伤病人防止感染,提供了更加有利的条件。

4. 超声波消毒法

超声波消毒法是利用频率在 20~200 kHz 的声波作用下,使细菌细胞机械破裂和原生质迅速游离,达到消毒的目的。如超声洗手器,用于手的消毒;超声洗涤机,用于注射器的清洁和初步的消毒处理。

(二) 化学消毒灭菌法

化学消毒灭菌法利用化学药物渗透到细菌的体内,使菌体蛋白凝固变性,干扰细菌酶的活性,抑制细菌代谢和生长或损害细胞膜的结构,改变其渗透性,破坏其生理功能等,从而起到消毒灭菌作用。所用的药物称化学消毒剂。有的药物杀灭微生物的能力较强,可以达到灭菌的目的,又称为灭菌剂。

凡不适于物理消毒灭菌而耐潮湿的物品，如锐利的金属、刀、剪、缝针和光学仪器（胃镜、膀胱镜等）及皮肤、黏膜，病人的分泌物、排泄物、病室空气等均可采用此法。

1. 化学消毒灭菌剂的使用原则

- (1) 根据物品的性能及病原体的特性，选择合适的消毒剂。
- (2) 严格掌握消毒剂的有效浓度、消毒时间和使用方法。
- (3) 需消毒的物品应洗净擦干，浸泡时打开轴节，将物品浸没于溶液里。
- (4) 消毒剂应定期更换，挥发剂应加盖并定期测定比重，并及时调整浓度。
- (5) 浸泡过的物品，使用前需用无菌等渗盐水冲洗，以免消毒剂刺激人体组织。

2. 常用化学消毒灭菌方法

(1) 浸泡法。选用杀菌谱广、腐蚀性弱、水溶性消毒剂，将物品浸没于消毒剂内，在标准的浓度和时间内，达到消毒灭菌的目的。

(2) 擦拭法。选用易溶于水、穿透性强的消毒剂，擦拭物品表面，在标准的浓度和时间里达到消毒灭菌的目的。

(3) 熏蒸法。加热或加入氧化剂，使消毒剂呈气体，在标准的浓度和时间里达到消毒灭菌的目的。

适用于室内物品及空气消毒或精密贵重仪器和不能蒸、煮、浸泡的物品（血压计、听诊器以及传染病病人用过的票证等），均可用此法消毒。

① 纯乳酸。常用于手术室和病室空气消毒。每 100 m² 空间用乳酸 12 mL 加等量水，放入治疗碗内，密闭门窗，加热熏蒸，待蒸发完毕，移去热源，继续封闭 2 h，随后开窗通风换气。

② 食醋 5~10 mL/m³ 加热水 1~2 m³，闭门加热熏蒸到食醋蒸发完为止。因食醋含 5% 醋酸，可改变细菌酸碱环境而有抑菌作用，可对流感、流脑病室的空气进行消毒。

此外，尚可应用甲醛或过氧乙酸等进行熏蒸灭菌（见表 7.1）。

表 7.1

消毒剂名称	消毒水平	作用原理	使用范围	注 意
乙醇 Alcohol	中效	使菌体蛋白凝固变性，但对肝炎病毒及芽孢无效	以 70%~75% 溶液作为消毒剂，多用于皮肤消毒； 95% 溶液可用于燃烧灭菌	易挥发需加盖保存，并定期调整其浓度，浓度低于 70% 则消毒作用差； 因有刺激性，不宜用于黏膜及创面的消毒
碘 酊 Tr.Iodine	高效	使细菌蛋白氧化、变性； 能杀灭大部分细菌、真菌芽孢和原虫	2% 溶液用于皮肤消毒，擦后 20 s 再用 75% 乙醇脱碘； 2.5% 溶液用于脐带断端的消毒，擦后 20 s 再用 75% 乙醇脱碘	对皮肤有较强的刺激作用，不能用于黏膜消毒，如会阴肛门、阴囊、眼、口鼻部手术消毒，以免引起灼伤； 皮肤过敏者禁用

续表 7.1

消毒剂名称	消毒水平	作用原理	使用范围	注 意
苯扎溴铵 (新洁尔灭) Bromo-geraminum	低效	是阳离子表面活性剂;能吸附带负电的细菌;破坏细菌的细胞膜,最终导致菌体自溶死亡,又可使菌体蛋白变性而沉淀	0.01%~0.05% 溶液用于黏膜消毒; 0.1%~0.2% 溶液用于皮肤消毒; 0.1%~0.2% 溶液用于消毒金属器械,浸泡 15~30 min(加入 0.5% 亚硝酸钠以防锈)	对肥皂、碘、高锰酸钾等阴离子表面活性剂有拮抗作用; 有吸附作用,会降低药效,所以溶液内不可投入纱布、棉花等
苯扎溴铵酞 (新洁尔灭) Tin.Bromogeraminum	中效	同上	用于皮肤黏膜消毒	取苯扎溴铵(新洁尔灭) 1 g + 曙红 0.4 g + 95% 乙醇 700 mL + 蒸馏水至 1 000 mL
洗必太 Hibitane	低效	具有广谱抑菌杀菌作用	0.02% 溶液用于手的消毒,浸泡 3 min; 0.05% 溶液用于创面消毒; 0.1% 溶液用于物体表面的消毒	同苯扎溴铵(新洁尔灭)
福尔马林 Formalin (37%~40%) 的 甲醛溶液	高效	菌体蛋白变性; 酶活性消失,能杀灭细菌、真菌、芽孢和病毒	空气消毒加热法:取福尔马林 12.5 mL/m ³ 加入等量水加热蒸发成气雾,待药蒸发完毕断绝热源,继续封闭 6 h 以上; 熏柜消毒加热法:取福尔马林 40~80 mL/m ³ 柜内置电灯泡通电加热,密封熏蒸 3~24 h; 氧化法:取福尔马林 10 mL + 高锰酸钾 5 g/m ³ ,密封熏蒸 6 h 以上	熏蒸穿透力弱,衣服最好挂起消毒
环氧乙烷 Ethylene Oxide	高效	与菌体蛋白结合,使酶代谢受阻而导致死亡; 能杀灭细菌、真菌、病毒、立克次体和芽孢	用于电子仪器和不耐高温物品,如皮革、皮毛、化纤织物及一次性高分子医疗器材等的灭菌处理; 少量物品可装入塑料袋或丁基橡胶袋中消毒,大量物品则用环氧乙烷灭菌器加温密闭消毒。常用剂量为 0.12%~0.8%,温度为 20℃~37℃,时间为 6~24 h; 投药量为 0.4~0.8 kg/m ³	此药易燃易爆且有一定毒性,必须熟悉使用方法并严格遵守安全操作程序; 放置阴凉通风无火源及电源开关处,严禁放入电冰箱; 储存温度不可超过 40℃,以防爆炸; 灭菌后的物品应清除环氧乙烷残留量后方可使用

续表 7.1

消毒剂名称	消毒水平	作用原理	使用范围	注 意
过氧乙酸 Peracetic Acid (P.A.A.)	高效	能产生新生态氧； 将菌体蛋白质氧化，使细菌死亡，能杀灭细菌、真菌、芽孢和病菌	0.2% 溶液用于手的消毒，浸泡 1~2 min； 0.2%~0.5% 溶液用于物体表面的擦拭或浸泡 10 min； 0.5% 溶液用于餐具消毒，浸泡 30~60 min； 1%~2% 溶液用于室内空气消毒	浓溶液有刺激性及腐蚀性，配制时要戴口罩和橡胶手套，并谨防溅到他处； 因腐蚀性强，不宜用金属器皿盛装； 存于阴处，防高温引起爆炸； 易氧化分解，可降低浓度和杀菌力，故需现配现用
漂白粉 Chloriole of lime	中高效	在水溶液中放出有效氯，破坏细菌酶的活性而致死亡。能杀灭各种致病菌、病毒和芽孢	0.5% 漂白粉澄清液用于餐具消毒，浸泡 30 min； 1%~2% 澄清液用于肝炎患者的餐具消毒，浸泡 1~2 h； 1%~3% 澄清液喷洒（100~300 mL/m ³ ）消毒 30 min 后，通风或擦拭病室物品及厕所； 干粪 5 份加漂白粉 1 份搅烂，放置 2 h；尿液 100 mL 加入漂白粉 1 g，放置 1 h	配制的澄清液性质不稳定，密封保存时间不可超过 1 周； 有腐蚀及褪色作用，不宜用于金属制品、有色衣物及油漆、家具、布类，消毒后应立即清洗，以防被腐蚀
戊二醛 Glutaraldehyde	高效	与菌体蛋白质反应，使之灭活，能杀灭细菌、真菌、病毒和芽孢	2% 溶液用于各种内窥镜消毒，浸泡 1 h； 2% 溶液用于不耐热手术器械、导管注射器、口镜、口腔、器械、透析器械的消毒，浸泡 10 h	消毒后的物品使用前需用无菌生理盐水冲洗； 内窥镜连续使用需间隔消毒 10 min，每天使用前各消毒 30 min，消毒后用冷开水冲洗； 每周过滤 1 次，每 2~3 周更换消毒剂 1 次
碘附 (达尔美净化剂) PVP-I	中高效	碘与表面活性剂的不定型结合物能杀灭细菌芽孢，还有清洁作用	3% 溶液用于体温计消毒，浸泡 30 min； 0.5%~1% 碘附液用于手术前皮肤消毒和手消毒	体温计消毒前应将唾液揩净，浸泡 30 min 后，再用冷开水洗净揩干使用； 皮肤消毒后留有色素可用水清洗
过氧化氢 (双氧水) Hydrogen preoxide	高效	过氧化氢能破坏蛋白质的基础分子结构，从而具有抑菌与杀菌作用	3%~6% 溶液用于烯酸树脂制成的外科体内埋植物的消毒； 10%~25% 溶液用于不耐热的塑料制品消毒	使用前需用无菌生理盐水冲洗； 易氧化分解降低浓度，应存于阴凉处，不宜用金属器皿盛装