

畜用抗菌素的制造与应用

国营上海第三制药厂 編著



化学工业出版社

常用抗菌素的制造与应用

国营上海第三制药厂 编著

化学工业出版社

本书着重介绍 畜用金霉素和土样结合法制造固体发酵土霉素的方法，并叙述了畜用抗菌素的检定及其使用方法。可供从事 畜用抗菌素的生产、检定人员及应用畜用抗菌素的工作人员参考。

畜用抗菌素的制造与应用

国营上海第三制药厂 編著

化学工业出版社 出版 北京安定门外和平北路

北京市书刊出版业营业许可出字第092号

化学工业出版社印刷厂印刷 新华书店发行

开本：850×1168毫米 1/32 1960年4月第1版

印张：1¹⁴/₃₂ 1960年4月第1版第1次印刷

字数：44千字 印数：1—3,500

定价：(10) 0.26元 书号：15063·0634

目 录

第一章 緒論	1
第一节 畜用抗菌素的应用及其在国民經济中的价值	1
第二节 畜用抗菌素簡史和我国畜用抗菌素工业的建立	2
第二章 畜用抗菌素的生产工艺	3
第一节 菌种的保藏	3
第二节 土霉菌的孢子培养	5
第三节 土霉菌种子培养	7
第四节 土霉素固体发酵	13
第五节 畜用土霉素钙盐生产工艺	16
第六节 畜用金霉素钙盐生产工艺	18
第三章 畜用抗菌素的檢定	19
第一节 金霉素与土霉素的理化性质	19
第二节 畜用土霉素与畜用金霉素的化学檢定	21
第三节 畜用土霉素与畜用金霉素的生物檢定	25
第四节 畜用土霉素与金霉素的土法生物檢定	29
第四章 畜用抗菌素的应用	32
第一节 抗菌素在畜牧业中的应用	32
第二节 抗菌素在农业中的应用	39
第三节 抗菌素在养殖业中的应用	42
第四节 抗菌素在渔业中的应用	43
第五节 粗制維生素B ₁₂ 的提取方法及其应用	44

第一章 緒 論

第一节 畜用抗菌素的应用及其在國民經濟中的價值

党的八届六中全会关于人民公社若干問題的決議中指出：“随着粮食問題的解决，应当逐步提高棉、麻、蚕絲、大豆、油料、糖料、茶叶、烟叶、药材等工业原料作物在全部农业生产当中所占的比重，并且极大地注意加速林业、畜牧业、副业和漁业的发展。总之，如象在工业战綫一样，一定要在农林牧副漁五业中来一个全綫大革命，彻底改变整个农业战綫的面貌。我国是一个六亿多人口的大国，目前我們正在进行着翻天覆地的社会主义建設，我們的物质文化水平将要不断的提高。如果平均每人一天吃四两肉，一年就需要六百多亿斤，就需要六亿多头体重100斤的猪。如果全国每人穿一双皮鞋，北方各地人民每人穿一件皮衣，合起来就是十多亿件，这样巨大的数字就充分地說明了我們只有坚决响应党的号召，积极地投入工农业战綫上的高产优质运动中，才能迅速地提高广大人民的生活水平，滿足人民的生活需要。值得特别提出的是应用畜用抗菌素后，它对大力发展农业、畜牧业、副业、漁业及蚕业起很大的促进作用。众所周知，自从抗菌素应用到医疗之后，由于它的治疗效果卓越，挽救了很多人的生命，因而，近年来抗菌素工业获得了飞跃的发展，但是，除了作为医用之外，抗菌素更具有广泛的其它用途。如应用到畜牧业上，用它掺入飼料中，以飼养家畜、家禽，可以促进动物的生长，而且能預防牲畜的疾患。在蚕絲工业方面，应用抗菌素后，既能促进蚕的快速生长，产絲量增加，又能提高蚕絲的质量；在农业方面，应用抗菌素，不但能防治植物病害，而且能刺激植物生长；在食品保藏方面，采用抗菌素后，既具有防腐作用，延长食品的保存期限，而且能保存食品的营养价值，使它不致因貯存而降低，故为冷藏魚类、肉类、奶类及水果等的良法。这些应用，对國民經濟來說，有极重大的价

值。因为应用了抗菌素在农业、畜牧业、渔业、养蚕业，既能大大地提高农作物和畜产品的产量，同时也缩短了生产周期，也就是更加速地提高了产量，而且，它可以减少牲畜和农作物的疾病，避免了很多因病死亡和减产的现象，减少了保存时的损坏，同时还能适当地提高质量。如以抗菌素喂猪为例来说，饲喂抗菌素的猪体重增加在20%以上。如按1962年全国养猪3亿头，其中50%（即1亿5千万头）的猪加喂抗菌素，每只猪以50公斤计算，增重20%即增重10公斤，1亿5千万只就能增加猪肉150万吨，而且，每只猪加喂抗菌素后尚可节省饲料约5%。这样，又可养猪750万头，增加猪肉37.5万吨，故共增产187.5万吨，可换回外汇18.75亿元。所以，广泛应用抗菌素，它对大力发展我国农业、畜牧业、养蚕业及渔业有极大的推动作用，而且，从而促进了以畜产、农产品作原料的轻工业，如毛纺工业，肉类、奶类加工工业，皮革工业等等的发展。这充分地说明了它在我国国民经济中的价值是多大。

第二节 畜用抗菌素简史和我国畜用抗菌素工业的建立

自从抗菌素应用于医疗以来，在1946年Moore氏等就发现了链霉素能促进鸡的生长，但当时未能引起重视，到1949年Stokstad等又发现了金霉素对鸡有促进生长的作用，此后，金霉素及其它抗菌素在各种动物饲养上的研究和应用便得到很快的发展；现已肯定，金霉素、土霉素、青霉素、链霉素、枯草杆菌多肽素、生霉素和氯霉素等都能提高家畜和家禽的生长速度，并能预防和减少牲畜的疾病，提高饲料利用率等，其中尤以土霉素与金霉素的促进牲畜生长为最显著。1958年在全面大跃进的新形势之下，我国畜牧业和整个农业生产也出现了新的高潮，猪、羊和大家畜的增长速度大大地超过了第一个五年计划期间平均每年增长的速度；但从全局来看，畜牧业仍然是农业生产中的一个薄弱环节，亟需快速增长，为了大力发展农业、畜牧业的生产，为农业、畜牧业生产大跃进创造条件，化学工业部布置我厂进行畜用抗菌素的研究试制工作，当时鉴于目前医用抗菌素尚不能满足治疗需要，加诸医用抗菌素的生产需要成套设备，技术条件比较复杂，因此成本也高，不适于农村采用；我们认为推广到农村生产的方法，必需简易可行，设备要少，方法要简便，适合农村条件，使每个农业社都能生产，于是采取了土法试

制。虽然当时土霉素固体发酵的技术条件不易掌握，易长霉，同时又缺乏参考资料，但是，工作同志在总路线的光辉照耀下，在党的英明领导与亲切关怀下，与中国医学科学院抗菌素研究所的协助下，坚决克服种种困难，大胆设想，努力钻研，终于在短短的一个多月内研究成功，并到人民公社及其它有关单位去推广；同时接受全国各地试制畜用土霉素单位来厂实习，播散和培养了我国畜用抗菌素生产的种子。现在畜用土霉素的生产，已经遍地开花，如上海的长征人民公社五四农业合作社，在畜用土霉素的生产上，已经积累了丰富的经验，预计在不久的将来，畜用抗菌素的生产，将会进一步的发展；它的应用，也将得到更多的推广，让我们为农业、畜牧业等的大力发展和更多更快地增产而创造条件；在党的英明领导下加倍努力，奋勇前进，为祖国的社会主义建设，作出更大的成绩，更多的贡献。

第二章 畜用抗菌素的生产工艺

第一节 菌种的保藏

菌种保藏的目的是使孢子在缺乏养分的条件下不发芽生长，停留在休眠状态，保持菌种的生产能力不变。保藏的方法很多，一般常用的方法有：砂土法，冷冻干燥法，石蜡油封法，喷雾干燥法等等。主要根据菌种不同要求选用那一种保藏法，其中砂土保藏法，操作较简便，效果也很好，在抗菌素生产上一般均采用此保藏法。兹将砂土孢子管制备法叙述如下：

取消防用之黄砂，除去杂质，并用磁铁吸去其中铁屑，然后用自来水洗滌，直至洗出液澄清为止，将水倒去，置烘箱中烘干，并用60号筛过筛。另取近地面较干净的土（含有机腐敗物质较多的黑土不宜使用），晒干或烘干，磨碎，用80号筛子过筛。然后以1:1的砂和土混合均匀，分装于1×10厘米的小试管中，每一试管内约装1~2克，用纱布棉花塞塞好，并用牛皮纸包扎，以间歇消毒法进行消毒三次，每隔24小时以1.05公斤/平方厘米压力（即15磅/平方吋·121°C）消毒3小时，最后以

160°C 干热消毒 2 小时；使用前作无菌检查，如证明无菌，即可供制备砂土孢子用。

取已生长成熟的土霉菌斜面孢子，以无菌操作倒入适量的灭菌蒸馏水，用接种针经火焰灭菌后将孢子刮下，制成孢子悬浮液，用吸管吸取孢子悬浮液约 0.2~0.5 毫升于砂土管内，置此砂土管于干燥器中真空干燥，待抽干后放在置有无水氯化钙的玻璃瓶中，保存在 0~5°C 的冰箱里，无冰箱者，可保存于阴凉干燥处，使用前需做无菌试验，试验无菌者，即可使用。

砂土孢子管是菌种的所在地，在制备时需要严格的无菌条件及较高的无菌操作技术，不能使杂菌污染。制备砂土管的斜面须挑选孢子生长均匀、纯粹及刚生长成熟的，以孢子悬浮液浓度越浓为宜，这样可接入较少的孢子悬浮液，使砂土管在短时间内抽干。在设备条件差的地方，不宜自己制备时，可向有关单位索取。

菌种的保藏在工业生产中十分重要，很多微生物菌种经过多次移殖或保藏得不好，往往会发生变异，而失掉原有的性能，致使生产能力降低，这里特别值得指出的是，土霉菌较其它抗菌素菌种，如青霉菌，金霉菌容易发生变异，自砂土管接种至斜面培养基时，往往由于接种针上带入少量水分至砂土管内，以致菌种在有少量水分的情况下打破其休眠状态而发芽引起变异，因此，使用时必须尽量防止水分带入砂土管内，最好每次使用后，置真空干燥器内抽 2~3 小时。此外，菌种必须经常进行纯化，当发现在斜面培养基上，菌落颜色、形态不纯时，就必须进行单孢子自然分离，以 Э.Я.Т1001 土霉素菌种而言，一般以孢子量长得较稀，菌落产生的色素较深为佳；孢子长得过多或孢子很少的菌落，生产能力均较低，因此在平板上分离成单个菌落后，挑选孢子量较稀，在培养基内产生色素较深的菌落移殖在斜面上，并分别进行摇瓶发酵试验，视其生产土霉素的能力，再选择生产力最强而又较稳定的菌种制备砂土管，供生产使用。当经过较长时间的使用后，如再发现菌种不纯粹，则必须再进行纯化，这样，才能保证菌种的质量，不致因菌种变异而影响生产很大。

第二节 土霉菌的孢子培养

一、用具

試管：30×200厘米，或茄子瓶，或耐高温的玻璃扁瓶。

接种針(见图1)：用約3寸左右的电热絲，一端弯成圈形，另一端固定在电焊条上，长短以能方便地伸入扁瓶的底部为宜。

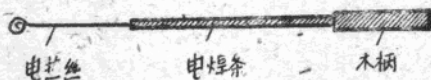


图1 接种針

酒精灯或沼气灯。

孵育箱：

市售有小型电动孵育箱。許多地方如国营上海第三制药厂由自己制造恒温控制箱。系利用电灯泡作为热源，用双金属片控制温度，其設備可取木箱夹层置稻草或棉絮保温，內层放铁皮箱或鉛皮箱，在铁皮箱下部，放有两眼的隔板，灯泡及双金属片即放在隔板下，借以调节温度。如設備条件較差，亦可用下法制备孵育箱。

1. 在缺乏自动控制温度的孵育箱的地方，如果有电气設備亦可自制孵育箱(见图2)，用一空木箱，正面开两扇門，中間四周木壁均垫上棉套，俾使温度不易变动，中間分为几层，在每层的木壁上装有电灯，以灯泡所发热量来控制温度的高低，如温度超过规定时，即适当关闭部

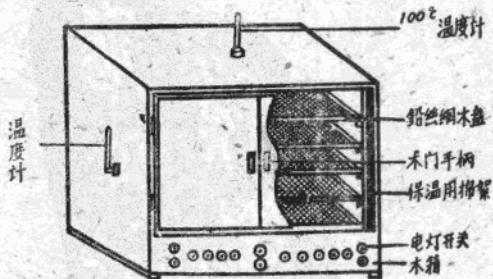


图2 电灯土法保温箱

分或全部灯头，因此，每灯均需装有开关，俾便控制；在木箱頂端及側壁开一小孔，以供插入溫度計之用。

2. 在缺乏电气設備的地方，亦可用下列簡易裝置(见图3)代替孵育箱，即在木箱底部垫以稻草，上鋪棉絮，用耐高溫的扁瓶充滿開水，平放在棉絮上，再复以棉絮，上面平放薄木板，必須水平放置，板上即放入培养物，根据溫度降落，每天調換瓶中開水數次，从而达到保溫的目的。

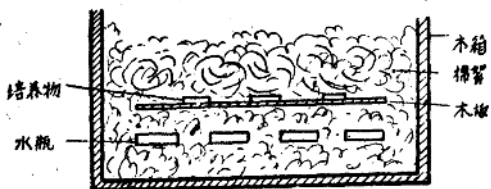


图3 棉絮土法保温箱

二、孢子培养基成分

1. 麸皮……5% (取干净小麦，經洗淨晒干，用石磨磨碎，篩去面粉，即可)。
洋菜……2%
2. 肉膏……0.5%
食盐……0.25%
葡萄糖……1%
蛋白陳……0.1%
酵母膏……0.1%
洋菜……2.5%
pH值……灭菌前7.2~7.4

以上两种培养基以第一种用料简单，成本低，孢子生长得亦很好，目前均采用第一种培养基。

三、方法

取試管或茄子扁瓶，按上述培养基成分秤入瓶內，瓶口以紗布棉花塞塞之，并用牛皮紙包扎，以1.05公斤/厘米²压力(15磅/平方吋·121°C)蒸汽灭菌半小时，如无高压消毒鍋設備的地方，可放在鍋中隔水煮之，至洋菜融化后，再繼續煮30分鐘，取出每隔日以同法操作，如此处理三天，最后趁热斜放在台上，制成斜面，傾斜度以能得到最大斜面为度，但亦勿使培养基接触到棉塞，待冷却后即可接种。

接种斜面均在无菌室內操作，缺乏紫外灯消毒設備的地方，接种前

室内用2%石碳酸喷雾进行消毒。接种针经火焰消毒后，在无菌水中稍冷却，然后从含有土霉菌孢子的砂土管内蘸取少量砂土，种入斜面上，置37°C 孵育箱内培养，在接种后第一、二天斜面上即出现深黄色的土霉菌营养菌丝，以后即生长出白色的气生菌丝，并在培养基内由于色素产生而颜色加深，培养至6~7天，斜面上长满灰白色的土霉菌孢子，即可供使用，或保存在冰箱里备用。

如孢子用量很大，使用洋菜斜面，不能培养得大量孢子，并且目前洋菜供应较紧张，可采用下法以制备大量孢子。

1. 小米培养孢子之制备：

挑选颗粒大小均匀，无破坏及霉坏现象的小米，按干重1:1(小米:水)的比例加水煮之。不断搅拌，至煮沸后继续加热5分钟，直至成干饭状。打碎使不成块，倒在纱布上，包好，俟表面水分均匀地吸至小米内，然后打开使粒粒分散，或将小米用水清洗数次，放在润湿的纱布上，隔水蒸煮，至米身膨胀稍有部分裂开为止。将此小米装入干净之扁瓶中，每瓶约装20克左右(装入量视瓶大小而定)，以棉花纱布塞塞之，并用牛皮纸包扎，置蒸笼内蒸煮一小时，次日再蒸煮一小时。如此连续三天，即可达到无菌。

取已长好的土霉菌斜面孢子试管一支，在接种室内，以无菌操作用灭菌水制成孢子悬浮液，用吸管吸取2~3毫升至小米瓶内，使孢子悬浮液与小米充分混匀，并使小米平铺于瓶内，厚薄均匀。将此瓶平置于37°C 孵育箱内，培养6~7天左右，孢子即生长成熟。

2. 麸皮培养孢子之制备：

取粗麸皮，以一分麸皮加一分水的比例调匀，用纱布包好，放在蒸笼内蒸煮一小时，然后称20克麸皮装于干净的扁瓶中，加棉塞，包扎，与上述相同蒸煮三次，达无菌，待冷却后按上法种入孢子悬浮液2~3毫升，充分混匀平铺后，平置于37°C 孵育箱内培养6~7天，孢子生长成熟，可供使用。

在孢子培养过程中，需经常观察孢子生长情况，如发现生长野霉菌或细菌，即停止继续培养。

第三节 土霉菌种子培养

土霉菌种子培养是土霉素固体发酵的第二步骤，在这步骤中，主要

目的是使孢子在液体培养基中，通入一定量的空气，在一定温度下，使孢子逐渐发芽，生长成菌丝体并使此繁殖获得大量土霉菌菌丝体，俗称种子。

土霉菌种子培养需要有一定量的空气供给，在无菌条件下进行培养。因此除培养基需经消毒外，通入的空气亦必须无菌，如有振荡设备的地方，种子用量不大，可借振荡使培养基与空气接触，以使菌丝获得氧气，而不须再通气。但是，目前一般在农村中特别是在缺乏电气设备的地方，要安装振荡机就比较困难，则可采用以下土法制备种子。

种子培养根据需要量的不同，可分为一级种子培养及二级种子培养。

1. 一级种子培养

用具：(1) 容积2升的玻璃瓶4个及10升的种子培养瓶一个。

(2) 普通用储气罐式喷雾器打气筒一只。

设备装置：

空气过滤器由四个玻璃瓶串联而成。第1个是空瓶，第2、3个瓶内放入5%硫酸铜溶液或食油（食油经煮沸后装入），第4个瓶内放入经消毒过的疏松棉花，打气筒与第1瓶相连，空气通过此法过滤，就能达到无菌。此外，10升种子培养瓶瓶口用橡皮塞塞紧，塞上开两个孔，一孔插入一玻璃管，培养时与空气过滤器第4瓶连接，另一端插入瓶内，靠近瓶底部，管口上紧扎以纱布袋，使进入的空气分布成细小气泡。另一孔亦插入玻管作为排气管。如图4装置所示。

种子培养基成分：

玉米浆	1%
淀粉	3%
食盐	0.5%
硫酸铁	0.4%
磷酸钙	0.5%

由于目前玉米浆供应较少，各地不能普遍得到，因此曾试验过以其它有机氮源来代替，其中以1%花生饼粉，1%黄豆饼粉或1%酵母粉均可代替玉米浆，但在培养基中必需再添加0.02%磷酸二氢钠，才能得到较浓厚的种子培养液。

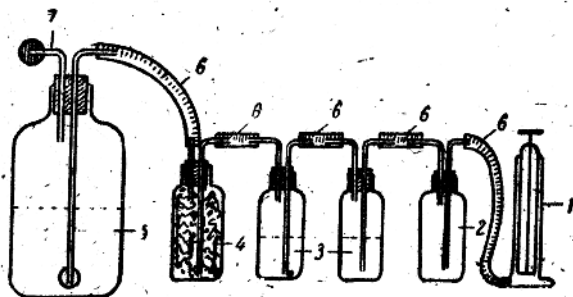


图 4. 种子培养装置

1—打气筒（或用电动打气泵）；2—安全瓶；3—5% 硫酸铜或食油溶液；4—棉花过滤瓶；5—种子培养瓶；6—橡皮管；7—排气管

培养方法：

将种子培养瓶洗净。按照瓶的一半容积，称取上述比例的种子培养基，先用少量水调匀，使淀粉等物成为糊状，并加足水量，煮沸半小时，并不时搅拌，防止溢出，再倒入种子培养瓶内，先用纱布棉花塞塞紧，再用牛皮纸包扎瓶口。瓶塞部分另行严密包扎，然后置蒸桶内，间歇消毒三次，即达无菌，可供应用。

取已生长成熟的土霉菌斜面孢子一瓶，在无菌室内以无菌操作加入无菌水，制成孢子悬浮液，在火焰旁打开瓶塞，种入已灭菌好的种子培养基内，接种量约为 5%，再将瓶塞部分装入，并紧扎瓶口。接种后，将排气管口上的牛皮纸拆去（仅需拆去外层牛皮纸，内层纱布仍需严密包扎），然后置 26~28°C 培养房进行人工通气培养，如缺乏恒温培养房，可将种子培养瓶放在水浴内，经常调换温水，使温度维持在 26~28°C 左右。当培养至 24 小时后，培养液逐渐转变为微黄色，此表示在培养基中已有少量土霉素产生，培养至 36 小时左右，培养液已较粘稠，菌丝量亦较多，颜色亦逐渐加深，此时，即可种入发酵。如有显微镜，则可观察菌丝形态来决定培养时间及种子生长优劣。一般以菌丝原形质充实，主体分节，培养液颜色较深为佳。

如有摇瓶机，则可用三角瓶培养。500 毫升三角瓶可装培养基 50~75 毫升。摇瓶机转速以每分钟 110~120 次往复为宜，冲程 6 厘米左右，

搖速不宜过快，以免打湿瓶塞，此外，土霉菌培养时通入的空气量不宜过大。三角瓶装入已配好的种子培养基后，用8层紗布及牛皮紙包扎瓶口，經消毒后，在无菌室中入孢子悬浮液，每瓶接入1毫升，然后置搖瓶机上進行通气培养，培养温度为 $26\sim 28^{\circ}\text{C}$ ，培养時間亦为36小时左右即可种入发酵。

如有电动打气泵可代替人力噴霧器打气筒，可节省人力，且通气均匀。

2. 二級种子培养

种子需要量較大者，需进行二級种子培养，即以一級培养好的种子再扩大15~20倍，进行二級培养，培养基成分与一級种子培养基相同，培养条件亦与一級种子培养相同。

二級种子培养所需要的設備与一級的相似，唯用具容积根据需量适当增大。

3. 大型种子培养

土霉菌种子生长得幼老，对发酵的影响不太大，一般培养好的种子，如在低温保存一、二天仍可使用，因此在条件差的地方，不能自己制备小量的种子时，可在条件較好的地方或城市設立种子站，由种子站大量培养种子，运送各地，以供土霉素固体培养之用。

(1) 大型种子培养設備：

种子罐最好用密閉式鉄罐，但如缺乏此設備，亦可用木桶培养，如容积为600升，內装培养基約400升。

木桶高与直径之比为 $2\sim 2.5:1$ ，桶內壁以生漆漆三次，以四組三根直管平列之溫度控制管为挡板，內通冷水或热水，以維持培养溫度在 28°C 左右，攪拌軸可用鉄質或木質，上装渦輪式攪拌叶二个。空气分布管为开口式。在桶之中部有取样管，两者均連接蒸汽管，空气先經过滤器。油罐可放在桶盖上，利用位能差使其加入消沫剂。設備裝置如图5所示。

(2) 种子罐的消毒及培养方法：

种子罐如为密閉式鉄罐，則可进行实罐消毒，以1.05公斤/平方厘米压力（即15磅/平方吋 121°C ）消毒半小时即可达到无菌。采用木桶培养时，必須先經空罐消毒，再将培养基輸入，其操作法为：先将木桶

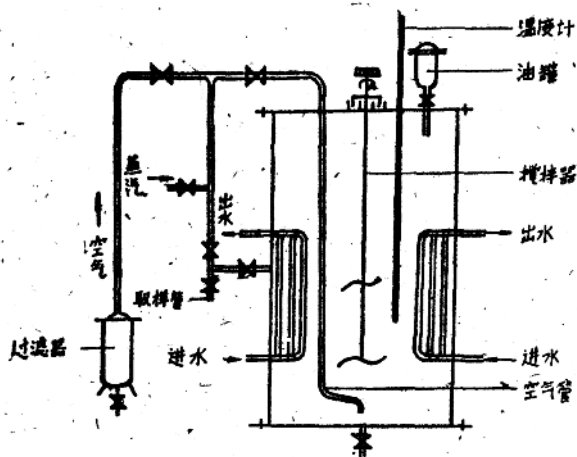


图 5 大型种子培养设备简图

洗净，加入自来水到达空气分布管处，然后加入浓甲醛溶液，加入量视种子罐容积而定，如1吨木桶，可加0.2升浓甲醛溶液，加入后，即打开空气分布管阀，进蒸汽，密闭蒸汽1小时（稍微开排气阀）；然后再继续打开压力表旋塞，进料管蒸汽阀，冲视镜等蒸汽阀，开取样管阀作排气，继续消毒1小时，并保持在 100°C 以上，然后关取样管阀，进料阀，接种阀，最后关空气分布管的蒸汽阀，并立即打开空气阀，使空气进入桶内，并打开温度控制管冷水阀，使降低温度，等待培养基移入。

种子培养基预先以 1.05 公斤/平方厘米压力（ 121°C ）在密闭的铁罐中消毒30分钟后，保持罐压，冷却至 30°C 时，输入木桶，并随即接种，如冷却温度较高在 40°C 左右，再输入木桶冷却，这样，由于放置时间较长，使杂菌获得繁殖的机会，容易引起染菌。

一级种子罐可用铁罐或吹气瓶培养，当将一级种子种入木桶后，即开动搅拌，通入少量空气，缺乏空气流量计，排气量大小可采用手摸经验，经常观察培养液翻动情况而调节空气阀。在培养过程中，定时取样测定pH及做无菌试验，并用显微镜观察菌丝形态。在培养初期尽量少加油或不加油，如果泡沫过多有溢出现象，可暂停搅拌，待泡沫下降后再开动搅拌。当培养至24小时左右，培养液开始变为微黄色，粘稠度逐

漸增大，即菌絲量逐漸增多。培養至 36 小時左右，培養液的顏色已較黃，內含土霉毒素亦較多，每毫升約含土霉毒素 500~800 單位，此時即可轉入固體培養基內進行發酵，如不馬上使用可降溫保存一、二天。

4. 種子製備過程中的注意事項

土霉毒素種子培養在整個土霉毒素固體發酵中亦為一重要的關鍵，種子生長得好壞，直接就影響到發酵過程中土霉毒素的產生，因此，在整個種子培養過程中值得注意的有以下几点：

(1) 首先要防止雜菌的污染，特別在培養的初期，如有雜菌侵入，即能很快的繁殖，致使土霉菌生長不良，而不能再接種於發酵，因而必須隨時注意其生長情況。如設備條件較好的地方，可用顯微鏡觀察菌絲形態，有無雜菌（如桿菌，球菌等）生長，做無菌試驗，按時測定培養液的 pH，在生長正常情況下，一般 pH 波動不大，在 6.0~6.5 左右，如 pH 過低或過高，說明有雜菌侵入的可能。但無菌試驗需時較長，顯微鏡觀察難決定時，亦可取種子培養液，用濾紙過濾，視其過濾速度快慢亦可作為參考其有無染菌，如過濾速度快，而濾液澄清透明，幾無發生渾濁現象，可接入發酵。如發現染有雜菌後，應仔細逐步檢查其染菌原因，如斜面孢子是否生長良好，有無雜菌污染，種子培養基消毒是否徹底，空氣過濾器是否有毛病等等。

(2) 配制種子培養基時，因其中有澱粉等粘稠物質，須調和均勻，避免結團或成塊，以致影響消毒不能徹底。

(3) 在一級種子培養中，培養瓶瓶口應用紗布包紮，或用夾子夾緊，以防止萬一氣量太足，沖開瓶塞，增加染菌的機會，排氣管上包紮的 8 層紗布必需扎牢，避免沖開，管口亦不能堵塞，讓廢氣可排出。

(4) 通氣時，如發現氣量不足，培養液攪動不大，應檢查打氣筒，或電動打氣泵有否故障，其次各空氣過濾裝置及種子培養瓶的瓶塞，是否跳開，各玻璃管與橡皮管接頭處是否緊密；空氣通氣裝置是否有反裝現象，如遇有異樣，應立刻改正。

(5) 通氣裝置中，洗滌瓶內的長玻璃管，應通至底部，使氣體能洗滌完全。

(6) 經常檢查空氣過濾瓶中之棉絮是否疏松，如發現潮濕，則應立即以消毒好的備貨調換，以免染菌。

(7) 在培养过程中，种子培养瓶应经常用人力小心摇动，避免培养基中固体物质沉积太久，液面以上的瓶壁上，如粘有菌丝体及培养基，亦须将它摇下，采用往复式摇瓶机培养时，亦须经常将瓶壁上的粘着物摇下。

(8) 采用人力通气时，亦须保持连续进行，尽量少休息，倘有故障，停止时间，亦勿过长。

第四节 土霉素固体发酵

用具

(1) 蒸煮锅 用普通铁锅，放在土灶上，锅内放水，锅上放一蒸桶，桶底用稀孔竹篾盛之，并铺上二层纱布，培养基即放在此蒸桶内蒸煮灭菌。

(2) 培养房 土霉素固体发酵需在 $26\sim 28^{\circ}\text{C}$ 进行，在缺乏自动控制设备的地方，可用普通房间来代替，以水泥地或地板房为宜，四壁用石灰粉刷。培养房必需打扫干净，室内最好有通风设备，以维持空气新鲜，或南北开窗，使空气能畅通。

(3) 培养盘 用竹盘或木盘，盘底须漏孔，孔的大小约为3平方厘米左右（不宜过小，以免影响通气），每盘能放培养基1~2公斤（干重），盘的数量随产量而定。

(4) 木架 放置培养盘用。

培养房的消毒

培养房在使用前必须进行消毒，消毒的方法很多，如用紫外灯消毒，石碳酸喷雾消毒，甲醛液或硫磺蒸汽消毒等，其中以甲醛液蒸气及硫磺蒸汽消毒最好，操作亦简便。兹将消毒法简单述之如下：

(1) 甲醛液消毒法：

甲醛液是很强的还原剂，市售之甲醛为40%的溶液，常用它的蒸气杀菌。将棉花或纱布浸入甲醛溶液中，再将它悬置在培养房内，或用特别构造的灯使它变为蒸气，熏1~2小时后，打开窗户，使残余气体散去后即可使用；亦可用0.5%的甲醛溶液喷散于要杀菌的地方。

(2) 硫磺消毒法：

将纸片浸在融化的硫磺中，使纸片吸入硫磺，将它悬挂在培养房