

生物学实习指导

生物学实验指导

湖南医学院
教生物学教研组编
1959.9.

週 數	日 期	講 授		實 習		備 註		
		次數	內 容	學時數	次數		內 容	學時數
一	9月3日 9日	1	緒言及形态学	2	1	一、形态学实验 ①特殊构造(示教) ②革兰氏染色法 二、参观灭菌器	3	←实验二 ←" "一 ←" "四
二	10日 16日	2	細菌生理学	2	2	①培养基制备(示教) ②温度对细菌生长的影响 ③分纯接种法及生化反应接种	3	←" "三 ←" "五 ←" "五
三	17日 23日	3	外界环境因素的影响	2	3	①看上次实习结果 ②物理杀菌——热力杀菌 紫外线杀菌(示教)	3 3	←" "八 ←" "八
四	24日 30日	4	外界环境因素影响 噬菌体	2	4	①化学杀菌 ②共生现象 ③药物敏感试验	3	←" "九 ←" "十 (4月~2月同庆放假)
五	10月5日 11日	5	微生物的变异	2 共10时	5	①噬菌体培养器 ②微生物的变异 ③看上次①②③的结果	3 共15时	←" "十一 ←" "十二 ←" "十三
六	12日 18日	6	傳染說 免疫学概說	2	6	看上述①②的结果 傳染說实验 ①实验动物管理法介绍 ②动物实验法(示教) ③致病因素——扩散因子 ④传染条件实验	3	←" "十三 ←" "十四 ←" "十五 ←" "十六
七	19日 25日	7	免疫学概說	2	7	①看传染条件试验结果及感染 动物尸体解剖(示教) ②疫苗制备 ③免疫血清制备 } 示教 ④过敏症(致敏) ⑤吞噬现象(示教)	3	←" "十七 ←" "十八 ←" "十九 ←" "廿四 ←补充材料
八	26日 11月1日	8	抗原抗体 免疫反应	2	8	①毒素抗毒素反应(中和试验) ②凝集反应(试管法, 玻片法)	3	←" "廿 ←" "廿一
九	2日 8日	9	免疫反应	2	9	①看凝集反应结果 ②沉淀反应 ③溶解反应	3	←" "廿二 ←" "廿三
十	9日 15日	10	免疫反应 过敏症及变态反应	2	10	补体结合反应 过敏性休克(示教)	3 共15时	←" "廿三 ←" "廿四
十一	16日 22日	11	过敏症及变态反应	2 共2学时	11	与球菌 } 形态菌落培养特性 链球菌 } 血浆凝固试验 溶纤维蛋白试验 胆汁标本(接种)	3	←" "廿五廿六 ←" "廿七
十二	23日 29日	12	重复讲解各种病原 微生物 化脓菌 肠道菌	2	12	肺炎双球菌: 形态菌落胆汁溶菌 奈氏菌属: 形态培养特性生化 胆汁标本——涂片、接种 绿脓杆菌(示教)	3	←" "廿八 ←" "廿九 ←" "三十 ←" "卅五

軍干班教學進度表

微生物學教研組 1959年9月

週次	日期	講授		實習		備註		
		次數	內容	學時數	次數		內容	學時數
十三	30日 12月6日	13	腸道菌	2	13	看奈氏菌的結果 腸道菌：①形态示教，②培基示教 ③大腸變形布魯氏菌傷寒，付傷寒痢疾培養特性及生化反應觀察 ④大便標本（接種）	3	實驗廿 ... 廿三 ... 廿四
十四	7日 13日	14	嗜血（百日咳） 來自動物（布魯氏）	2	14	①肥達氏反應 ②大便標本——雙料 ③霍亂弧菌 ④嗜血菌尿	3	... 廿四 ... 廿四 ... 廿六 ... 廿七
十五	14日 20日	15	梭狀芽胞桿菌 棒形桿菌	2	15	①鼠疫布魯氏，炭疽 ②厌氧梭狀芽胞桿菌尿 a 厌氧培養法（示教）形态（示教） b 培養及生理特性 ③大便標本（完成）	3	... 廿八 ... 四十一 ... 廿四
十六	21日 27日	16	棒形桿菌 分枝菌尿	2	16	厌氧：①看生化結果 ③产气荚膜小白鼠及破傷風（免示教） 棒形桿菌 ①白喉形态，染色及培養特性 ②米明喉拭子抹片檢查	3	... 四一 ... 四二
十七	28日 1960年1月3日	17	真菌 立氏體	2	17	分枝桿菌尿 ①結核麻風，形态及培養特性 ②集菌法	3 共24學時	... 四三
十八	4日 10日	18	螺旋體 病毒總論	2	18	真菌： ①看大小培養 ②病理標本檢查	3	... 四四
十九	11日 17日	19	病毒總論 病毒各論	2	19	螺旋體： ①形态示教 ②康氏反應 立氏體及病毒形态（示教） 鸡胚接種（示教）	3	... 四五 ... 四六 ... 四七 ... 四八
二十	18日 24日	20	病毒各論	2 共8學時	20	①小白鼠接種（示教） ②組織培養法（示教） ③血凝及血凝抑制試驗	3 共9學時	... 四八 ... 四八 ... 四九

微生物学实习指导目录

前言	P. 1
微生物学实习中的规则	"
油镜使用法及显微镜的保护	" 2
总论:	
实验一 细菌的析观	" 3
甲、塗抹片的製备	
乙、細菌染色法	
单纯染色法	
複合染色法	
实验二 微生物的基本形态及其特殊构造	" 5
(一)、微生物的基本形态	
(二)、細菌的特殊构造	
实验三 培养基的製备	" 6
甲 基础培养基的製备	
乙 固体培养基的製备	
丙 常用的特殊培养基的製备	
丁 常用的鑑別培养基之製备	
附: { 1 PH 矯正法	
2. 各种玻璃器皿灭菌前的准备	
实验四 参观灭菌器、恒温箱及冰箱、无菌操作室	" 10
实验五 細菌的分純接种及繁殖	" 12
实验六 細菌的物质代謝的析查及观察方法	" 14
实验七 自然界中微生物的分佈	" "
实验八 外界因素对微生物的作用	" 15
甲、物理因子对微生物的作用	
(一) 热对芽胞和繁殖体殺菌作用的試驗	
(二) 紫外线的殺菌作用	
① 紫外线殺菌作用及其穿透力	
② 紫外线的空气消毒作用	
实验九 外界因素对于微生物的作用	" 17
乙、化学因子对細菌之作用	
(一)、各种化学消毒劑对細菌之影响	
(二)、乙醇对細菌的作用	

实验十 外界因素对微生物的作用----- P17

丙、生物因素对微生物的作用

(一)、共生现象

(二)、拮抗现象

1. 细菌对氯霉素青霉素之敏感性

试验

2. 细菌对中药之敏感性试验

实验十一 噬菌体及滤菌器----- "18

实验十二 微生物的变异性----- "19

传染及免疫:

实验十三 常用实验动物管理介绍----- "20

实验十四 动物实验感染法----- "21

实验十五 细菌的致病因素试验----- "22

实验十六 传染条件的实验----- "23

实验十七 感染动物尸体解剖观察及细菌学检查----- "24

实验十八 疫苗制备----- "25

实验十九 免疫血清的制备----- "26

实验二十 免疫反应

(一) 毒素抗毒素----- "29

实验廿一 免疫反应----- "30

(二) 凝集反应

实验廿二 免疫反应

(三) 沉淀反应----- "34

实验廿三 免疫反应

(四) 溶解反应及补体结合反应----- "35

实验廿四 动物过敏性实验及传染性变态反应----- "38

各论:

实验廿五 化脓性球菌----- "1

(一)、链球菌

实验廿六 化脓性球菌----- "2

(二)、链球菌 (培养特性、形态学与致病因素有关的酶物质)

实验廿七 化脓性球菌----- 各 P. 4

(三)、脓液标本的检查

(四)、金黄色链球菌咽鼻部带菌者的调查

实验廿八	化脓性球菌	各 P. 5
	(五)、肺炎双球菌 (培养特性形态学 胆汁溶菌)	
实验廿九	化脓性球菌	" " 7
	(六)、奈瑟氏菌属	
实验三十	肠道杆菌	" " 8
	(一)、肠道杆菌的主要鉴别培养基	
实验卅一	肠道杆菌	" " 9
	(二)、大肠杆菌、变形杆菌及肺炎 克雷布氏杆菌	
实验卅二	肠道杆菌	" " 10
	(三)、痢疾杆菌	
实验卅三	肠道杆菌	" " 11
	(四)、沙门氏菌属	
实验卅四	肠道杆菌	" " 12
	(五)、肠道杆菌传染病微生物学检查 材料之採取 分离细菌和生化反应及血清学鑑定 肥达氏反应	
实验卅五	绿脓杆菌	" " 14
实验卅六	霍乱弧菌	" " 15
实验卅七	嗜血杆菌属	" " 18
" " 卅八	鼠疫杆菌	" " 19
" " 卅九	布鲁氏菌属	" " 20
" " 四十	炭疽杆菌	" " 20
" " 四一	梭状芽胞杆菌属	" " 21
" " 四二	棒形杆菌属	" " 24
" " 四三	分枝杆菌属	" " 27
" " 四四	真菌	" " 31
	培养特性	
	鏡析	
	皮肤真菌病患者标本的显微镜检查	
" " 四五	螺旋体	" " 34
	甲、形态学	
	乙、梅毒血清诊断	

实验四十六 立克次氏体-----各 p. 37

实验四十七 病毒-----38

(一) 病毒的形态学

I. 病毒原虫小体的观察

II. 包涵体检查法

III. 病毒所致病变的大体观察

实验四十八 病毒-----39

(二) 病毒的培养法

甲. 病毒的血胚培养

乙. 病毒的动物培养

丙. 病毒的组织培养

实验四十九 病毒

(三) 病毒的血清诊断法

(祇作红血球凝集反应和红血球凝集抑制

试验)

微生物学实习指导

前言

本课程实习的目的在於使同学们巩固与加深的课堂理论学习，加深对微生物的基本研究方法以及在协助传染病诊断上必要的检查方法与技能，以便在今后实际工作中能独立解决一些普通的病原方面或免疫方面的诊断问题。为了达到上述目的，故要求学生在必须做到下列几点：

(一) 每次实验前必须做好预习工作：阅读实验指导及有关理论章节，了解每次实验的目的、方法与步骤。

(二) 实习过程中必须发挥独立工作能力：应遵照老师的指导，独立的进行操作。必须掌握一般的必要的操作技术，並力求正规正确。

(三) 实习结果的观察：认真的观察並记录实验结果。独立分析实验结果，培养自己对待客观事物的科学分析态度。

(四) 每次实验必须搞通原理原则，必须了解每次实验在医学实践上的意义。

微生物学实验室规则：

(1) 进实验室必须穿实验衣。离开时脱下放原处，实验衣不得带出实验室。

(2) 实验室内不准吸烟，不准吃东西，不可带铅笔、圆珠笔、牙签放入室内，不准用手摸头、摸面等。

(3) 实验室内不得高声谈笑，不可随便走动，以免妨碍他人工作以及影响无菌环境。

(4) 如传染性材料染污桌、地、桌、衣物等，应用2%来苏或5%石灰酸处理半小时，然后洗净。

(5) 如有刺破皮肤或吸传染性材料等意外事件必须立即报告辅导员老师进行处理。

(6) 用过的带有传染物的吸管、玻片、弃物等应投入消毒筒或消毒杯中；培养基物必须送到指定地点。须培养之物必须标记菌名、接种日期、班别、组别，然后送到指定地点。

(7) 实验过程必须爱护仪器，避免破损，若有破损必须在破损登记簿上登记。

(8) 实验材料不准带出，实验结束后用具桌面要整理清洁，並

微鏡之油鏡頭必須擦干送還原處，用肥皂洗手后再离开實驗室。

(9) 如作病原性微生物實驗時，在离开實驗室之前要求用 2% 的來蘇洗手，然后再用肥皂及自來水沖洗。

(10) 標記法示例：標本日期——以日/月表示，如 12/II
組別——以組/班表示，如 45/12；菌名——一般只寫
菌名的第一或前兩個字表示，如用菌表示葡萄球菌。

油鏡使用法：

(一) 使用顯微鏡時必須端坐，並微鏡平放直立於桌面；

(二) 于天然光线下觀察時，應用平面反光鏡，在人工燈光或弱光處則應用凹面反光鏡。

(三) 將標本先放在載物台上，用固定器固定，先用低倍鏡弄得適當視野，后再換高倍或油鏡作詳細觀察。

(四) 使用高倍鏡時，須先將鏡筒下降，以旁觀察，直至高倍鏡靠近標本時再使用粗調節器向上調節，能看見模糊輪廓時，再用細調節器，使物像清晰。

(五) 使用油鏡時，需在標本上先滴上柏油或油狀石脂油一滴，以旁觀察，旋動粗調節器使鏡筒下降，將油鏡頭浸入油使靠近標本表面，用粗調節器使鏡筒徐徐向上，至視野中看到標本輪廓為止，然後使用細調節器使物像清晰。

使用油鏡要加柏油或液狀石脂油的原理是因為油鏡放大倍數較大，透鏡很小，從玻片透過的光線，通過空氣因介質密度不同，發生散光現象，射入鏡筒的光線則很少，若滴上柏油或液狀石脂油後，因他們的折光率與玻璃折光率相近，這樣使通過的光線不至產生折射而損失，使物象可被更清楚地觀察到。

顯微鏡的保養：

(1) 當鏡筒向下移動時，必須小心，防止壓破玻片及損壞鏡頭。

(2) 接物鏡接目鏡需保持潔淨，可用綢布揩擦，禁用普通布、紙等物揩擦，以免損壞透鏡。

(3) 油鏡使用后，應立即使用拭鏡紙拭去鏡頭之油，禁止使用布類或普通紙去擦，若油已干，則蘸二甲苯少許揩拭之，隨即用干的拭鏡紙擦干，否則日久鏡頭上的固定膠也將被溶解而使鏡生脫落。

(4) 顯微鏡用畢后擦乾淨，將各部份恢復原位，送還鏡箱。

(5) 显微镜光学部份如镜头、反光镜等应避免阳光的直接照射。

总 论

实验一 细菌的检视

目的：学习并掌握涂抹片的制备法以及各种染色法。

几个有关问题的介绍：

(1) 玻璃片洁法：用肥皂及清水洗净玻片，用洁洁之布擦干，於火焰上掠过数次以杀灭玻片上可能存在的细菌。若塗有污染物则需先放在2%来苏溶液中浸泡数小时后再按上述洗净。

(2) 使用工具介绍：

1. 金床针：直径0.6毫米，长约六厘米，用白金制成，线圈做成，固定於特别的金床棒上，用夹钳取菌落或穿刺培养之用。

2. 金床耳：将接种针顶端弯成直径2-3毫米的圆圈，用以吸取菌落作分离培养或做涂抹片之用。

(3) 细菌培养物之採取方法：

以左手大拇指、食指和中指握持含有细菌培养物的试管下1/3处，以右手手掌及小指将试管上棉花塞压住，在火焰旁掀开棉塞，并将管口迅速通过火焰数次，（或以右手掌托平皿，用左手大拇指、食指、中指揭开平皿盖稍许）用烧红灭菌但已冷却之金床耳伸入管中（或平皿中）採取材料（金床耳不要与管壁接触）随即再将试管口在火焰上灭菌，並將棉塞塞好（或将平皿面盖住），放回试管架上，將所取材料放在玻片上，然后将金床耳烧红灭菌。

甲 塗抹片制备（每个人作）

(1) 用接种耳取菌之金床耳取生理盐水少许於干净玻璃片上，再以烧红灭菌且冷却之金床耳取菌少许置水滴中与汁水混匀塗佈在玻璃片上（若取液体培养物则不必事先加外水，直接取液体培养物塗抹在玻片上即可）。

(2) 标本塗好底，使在室温下风干，或将标本面朝上，放在弱火焰上略烘使其乾燥，但不可放在火焰上使其烧焦。

(3) 标本乾燥后在火焰上迅速通过三次（其玻片之温度有发热感，但不烫手）使细菌固定在玻片上。染色时不致被染液或水

冲掉。

(10) 固定之标本可以用不同方法染色。

乙. 细菌染色法 (每个人作)

(一) 单纯染色法：用一种染料使细菌着色以利观察。常用的有吕氏美兰染色法及石炭酸复红染色法。现以吕氏美兰染色法为代表说明之：

(1) 取上面已做好之涂片加吕氏美兰溶液二滴于抹片上，于室温中染色一分钟。

(2) 用水冲去染液候乾。(可用吸水纸吸乾)后镜检，並绘图。

(二) 复合染色法：用二种以上染料於一抹片上染色，利用各种细菌对各种染色反应不同的情况，可用来鉴别不同细菌，故又称鉴别染色法。常用的有革兰氏染色法及抗酸染色法。现以革兰氏染色法为例说明之：

(1) 按上述法取甲、乙二管菌液分别在同一玻片上作成抹片，在火焰上固定之。

(2) 加碱性结晶紫液於已制好的抹片上，置室温中染色一分钟。

(3) 倾出多余之染料，并用少量水冲洗之，沥去剩水。

(4) 加革兰氏碘液置室温中一分钟。

(5) 倾出革兰氏碘液，用水轻轻冲洗，沥去剩水。

(6) 加 95% 乙醇於抹片上，将抹片稍下震盪助其脱色，通常需 30 秒钟左右。(脱色之时宜依所作抹片之厚薄而定)

(7) 用水将剩餘之乙醇洗去，沥去剩水。

(8) 加复染剂(常用者为番红花红水液)一滴於抹片上，於室温中经 20—30 秒钟，迅即用水轻轻洗去。

(9) 依抹片自乾或用吸水纸吸干后，置油镜下检查、绘图。

[附錄]

吕氏美兰液的配制：

甲液：美兰 (Methylene blue) 0.3 gm
乙醇 (95%) 30 毫升

乙液：氢氧化钾稀释液：(2% 按重量计) 100 毫升

上述甲液、乙液分别配好后再混合置染色滴瓶中备用。

革兰氏染色液之配制：

结晶紫液：甲液：结晶紫饱和醇液，先溶 13.87 克结晶紫于 100 毫升之 95% 乙醇内，然后再加 1:7

的比例以 95% 乙醇稀释。

乙液：1% 鞣酸水溶液。

同时将甲、乙二液以 1:4 之比例配合置玻璃瓶中备用。

革兰氏染色液：
碘化钾 1 gm
碘化钾 2 gm
蒸馏水 300 cc } 溶解后置热瓶之玻璃瓶中

褪色剂：95% 乙醇

复染剂：番红花红 (Safranin) 2.5% 之乙醇 (95%)
溶液 10 cc
蒸馏水 100 cc

实验二 细菌之基本形态及特殊构造

目的：认识细菌的基本形态及特殊构造

一) 细菌之基本形态：〈要求绘图〉 示教

球菌：革兰氏染色

杆菌：革兰氏染色

球菌：革兰氏染色

二) 细菌之特殊构造 〈要求绘图〉 示教

1. 荚膜：菌体中着色较深或着色异于菌体之小颗粒。(用美兰染色法)

2. 荚膜：包被在菌体外的一层多醣。用普通染色法。(美兰一染色法、革兰氏染色法) 菌体呈蓝色，荚膜不着色。用荚膜染色法，则菌体呈紫色，荚膜呈浅蓝色(染色法见附录)

3. 鞭毛：用鞭毛染色法，菌体鞭毛均呈红色。(染色法见附录)

4. 芽胞：用普通染色法(美兰染色或革兰氏染色法)，菌体呈蓝色，芽胞无色。若用芽胞染色法，则菌体呈浅蓝色，芽胞呈蓝色。(染色法见附录)

[附录]

美兰比荚膜染色法：

1. 制好玻片在重压下自干，不要加热固定。

2. 用结晶紫染色 5 分钟

3. 用 20% 硫酸铜溶液洗涤数次，至结晶紫不再脱落为止。

4. 吸干（不可用水洗）。加石炭油镜检。

阿勃托氏并胞染色法：

1. 制好玻片，烘干，加蜡固定。

2. 滴吕氏美兰液加热一分钟，使染色提升，凉后再用水冲洗。

3. 用硝酸、酒精洗数次，至美兰不再脱落为止。

4. 用伊红稀醇液染色五分钟。

5. 用水冲洗干后镜检。

鞭毛染色法：（魏氏二代改良法）

1. 用金库氏液准备好的具有鞭毛的细菌菌液经放在载玻片上，放在酒精中 其自干。

2. 加魏氏染色液染色一分钟，用细水洗去多余染色液，干后镜检。

思考题：细菌的特殊构造与其化学成分，对液体的关系以及在医学上的意义。

实验三 培养基之制备 <示教>

培养基是按照微生物的营养要求（包括 pH），经人工配制而成能繁殖菌的物质，用以分离及培养微生物。在人工培养基上可以研究微生物的生物化学活动，测定微生物的不同营养要求，並可用来繁殖微生物。这有助於传染病病原的诊断以及预防、治疗。

人工培养基包括下列成份：

(1) 氨基酸化合物：氨基酸、蛋白质供给所须的氮源为细菌原生质的建筑材料。

(2) 糖类：供给细菌所须的碳源为能的主要来源。

(3) 无机盐：像 NaCl 、磷酸盐等，其浓度应与微生物体内盐类浓度相近，以维持渗透压平衡。

除上述成份外应有一定的 pH。一般最适 pH 为 7.2—7.6

，培养基可以制成液体或固体。（液体培养基内加琼脂或动物胶而成，若琼脂或动物胶加入量较少则成半固体。

常用培养基有下列几种：

1. 普通培养基：又名基础培养基。为制作更复杂培养基的基础，如营养液、肉浸液等。

2. 特殊培养基：在上述培养基中加入葡萄糖、胨水、血清

或血液等以視其之的营养价值。

3. 鑑別培养基：在培养基中加入某种物质，用来鑑別細菌。
如在水含物的培养基中加入某种抑制剂及指示剂，因不同細菌对各种物质的发酵作用不同而能鑑別。

4. 選擇培养基：在培养基中加入某种物质能抑制大多数細菌的生长发育，而某些种細菌則能生长发育。

普通培养基之制备：有肉汤培养基及麦旦芽培养基两种，現以麦旦芽培养基为說明之：

1. 取麦旦芽，用刀切碎，連根茎及豆种稱其重量。每50克加蒸馏水一百克，置于有盖之容器中，煮沸約一小時半。

2. 稱其重量，补足因蒸发而失去之水分；以紗布或濾紙过滤，去其渣滓。

3. 取麦旦芽之滤液，每100毫升中加食盐（NaCl）0.5克，使其溶解。

4. 測定其pH，調为7.5。（方法見附錄）煮沸一分鐘。（何故？）

5. 如發現凝，可用紗布过滤。

6. 使滤液分裝在試管或大瓶中，迅速蒸氣滅菌。（15磅、20分鐘）

7. 高压滅菌后，还要測定並調节一次pH，使維持7.6—7.8。

【附】肉汤培养基制备：

1. 方法与麦旦芽培养基制备基本相同。

2. 但須用瘦肉，去脂肪及結膜后切碎，加自来水后要置冰箱过夜。煮沸过滤后，每100毫升滤液加食盐1克（0.5%）加热溶化。

乙-普通琼脂平板之制备（为固体培养基）

1. 取琼脂一克，加入50毫升肉汤培养基中，加热溶化。

2. 在未凝前分裝在大試管中，每管約10毫升，加上棉塞，迅速蒸氣滅菌。

3. 滅菌后取出培养基，在琼脂尚未凝固前，先拔出管口棉塞，將管口通过火焰，但勿燒得太焦，再將就开无菌的玻璃平皿，將玻璃管內之培养基傾注入皿內，迅速將蓋蓋上，平放在桌面上稍加搖動，使培养基平鋪在皿底，冷却后凝固成培养基。

8

通琼脂平皿。

4. 将平皿置 37°C 温箱中，继续培养 24 小时后，如无细菌生长，即可应用。

丙、特殊培养基之制备：

常用的特殊培养基有含血琼脂平皿，现介绍其制备方法：

1. 取已灭菌且尚未凝固的琼脂 15 毫升，冷至 45°C 。

2. 加入 0.75 毫升无菌已脱出纤维之血液。（人血、动物血均可，一般多用羊血）混匀，用无菌技术倾注至已灭菌的空平皿内凝固。

3. 置 37°C 温箱中培养 24 小时，以检查有无细菌污染。

丁、现介绍含钼酸钠培养基之制备方法：

1. 基础液之制备：

(1) 加 0.5 克蛋白胨及 0.25 克食盐入 50 毫升蒸馏水中，加热煮沸 5 分钟，并补足失去水量。

(2) 调整 pH 至 7.6。

(3) 用滤纸过滤，待冷，至 50°C 时加入 0.025% 之酚红液 2.5 毫升。

(4) 将溶液分装至有盖汗氏小管的试管中，每管 2.5 毫升。

(5) 高压灭菌待用。

2. 矿液之制备：

(1) 5 毫升蒸馏水中，加 0.5 克葡萄糖粉（或其他糖），作成 10% 矿液液。

(2) 用间歇灭菌法灭菌。把 10% 矿液液之试管放在水浴锅内，每天煮沸一次，每次 30'，共三天。

(3) 用无菌技术补足去水量。

3. 基础液经灭菌后（试管内倒置之盖汗氏小管中，气体必须完全排出）再以无菌技术于每管中加入 10% 矿液液 0.25 毫升，然后置温箱中培养 24 小时，无菌生长即可备用。

“附录”

1. pH 校正法：

(1) 取三支与标准管相同大小的试管，一管内盛蒸馏水 5 毫升，另二管各加欲测定的培养基 5 毫升，其中有一管加入 0.02% 的酚红指示剂 0.25 毫升。

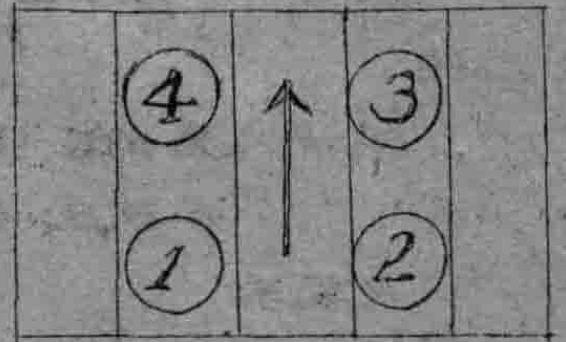
(2) 将上述试管与标准管分别放入比色箱中

管 1 待测培养基之试管

管2 待测培养基加入指示剂之试管

管3 盛蒸馏水之试管

管4 标准比色管



(3) 举起比色管，对光观察二侧颜色是否相等，如不相等则调换标准比色管至二侧颜色相等为止。此时标准管

上所纪录之 pH ，即代表待测培养基之 pH 。

(4) 若待测培养基之 pH 低於 7.8，可用 $N/20$ NaOH 校正之。即先将 pH 7.8 之标准比色管放入“4”中，再用 $N/20$ NaOH 徐徐滴入“2”中，频频振摇试管，使混合均匀，直至二侧颜色相等，纪录所用之 $N/20$ NaOH 量。

(5) 校正全量培养基的 pH 时，可改用 $1N$ NaOH ，计算法如下：

培养基所需之 $1N$ NaOH 量 = x

校正 5 毫升培养基所用 $N/20$ NaOH 之量 = w

$$x = \frac{\text{培养基量(毫升)} \times w}{5 \text{ (毫升)}} \div 20$$

(6) 求出 x 值 按其量加 $1N$ 的 NaOH 溶液於全量培养基内。

2 各种玻璃器皿灭菌前的准备：（不敬）

试管、吸管、玻璃平皿、烧瓶，多用于热灭菌法灭菌（见实验五，电热干燥灭菌器），如此则灭菌后器皿内部仍保持干燥。（湿热灭菌法则不然）。在灭菌前，必须洗滌清洁并干燥（防止干热时破裂）且须做下述包装步骤，例如：

玻璃平皿：一般是用纸包裹好。（有何用处）

吸管：於管口部塞少许棉花，管外用纸包裹之。（有何用处？）

试管及烧瓶：於加棉塞后即可灭菌。

包装后送干燥灭菌器灭菌。

此外，并可先用湿热灭菌法（高压蒸汽灭菌法）然后，再在干燥灭菌器中烤干即可。

思考题：

1. 制备人工培养基有什么原则上的要求。

2. 在人民公社中如何就地取材制作培养基。