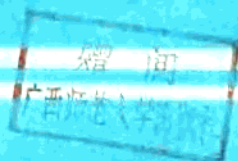


医学微生物学与免疫学

实验教程

熊平源 王建军 边藏丽 丁建中 主编



广西师范大学出版社

编写说明

医学微生物学与免疫学是一门理论性与实践性较强的医学基础课。为了更好地适应医学专科教育事业的发展,满足医学微生物学与免疫学实验教学的需要,培养学生的实际动手能力,为四化建设培养更多更好的实用型医学人才,我们在总结以往实验教学经验的基础上,结合自己的教学条件和特点,联合编写了这本更能体现专科特色的《医学微生物学与免疫学实验教程》。

本教程每项实验均按目的、原理、材料、方法、结果的顺序编写,力求条理清楚,言简意明。部分实验后留有思考题供学生复习思考,以提高学生分析问题解决问题的能力。实验内容的安排既保留了传统的经典实验项目又适量编入了部分新的实验内容,如F'质粒消除试验,放射免疫测定,细菌DNA中G+Cmol%测定等,并在附录中编排了免疫生物工程新技术简介及微生物学检验新技术简介等,其目的在于要求学生掌握基本技能,引导学生了解新的科研进展。

本实验教程由熊平源(武汉冶金高等医专)、王建军(洛阳高等医专)、边藏丽、丁建中(湖北省卫生职工医学院)主持编写。参加编写的还有李宝泉(洛阳高等医专)、唐跃华、李坤珍(武汉冶金高等医专)、王法权、王露(山东临沂医专)、殷长甫、盖宝华(石家庄高等医专)、李庆(华东煤炭医专)、李文智(桂林卫生防疫站)参加编写的同志均是从事多年医学微生物学与免疫学教学工作的具有丰富教学与实践经验的骨干教师。

本实验教程是集体智慧的结晶,集中反映了各校在教学、科研及微生物学与免疫学临床检验和实验教学的经验,同时在编写过程中也参考了有关文献和兄弟院校的实验教材,故实验结果的重现性及实验方法的可行性均较好。

由于编者水平有限,经验不足,加上编写时间仓促,而且又是分头编写,虽几经修改,但缺点错误难免,恳请兄弟院校同道及读者批评指正。

编 者

1992年10月

目 录

医学微生物学与免疫学实验的目的和要求	(1)
实验室规则	(1)
显微镜油镜的使用和保护	(2)

微生物学实验部分

实验一 细菌不染色标本检查法	(7)
实验二 细菌基本形态和特殊构造的观察	(8)
实验三 细菌标本片制作及革兰氏染色法	(9)
实验四 细菌的特殊染色法	(10)
实验五 基础培养基的制备	(12)
实验六 细菌的培养方法	(14)
实验七 常用的细菌生化反应实验	(18)
实验八 细菌呼吸酶的检查	(22)
实验九 细菌DNA 中G+Cmol% 的测定	(24)
实验十 细菌在自然界及人体的分布	(26)
实验十一 物理因素对细菌的影响	(28)
实验十二 化学因素对细菌的影响	(32)
实验十三 生物因素对细菌的影响	(33)
实验十四 细菌的变异性	(36)
实验十五 细菌质粒试验	(39)
实验十六 细菌的粘附试验	(44)
实验十七 细菌的致病性实验	(45)
实验十八 感染动物的尸体解剖及细菌学检查	(49)
实验十九 病原性球菌	(51)
实验二十 大肠杆菌	(56)
实验二十一 沙门氏菌属	(58)
实验二十二 霍乱弧菌	(62)
实验二十三 厌氧性细菌	(64)
实验二十四 白喉杆菌	(70)
实验二十五 结核杆菌	(74)
实验二十六 泌尿道感染的细菌学检查	(79)
实验二十七 军团菌的细菌学检查	(81)
实验二十八 病毒的形态与培养	(84)

实验二十九	病毒血凝和血凝抑制试验	(88)
实验三十	病毒中和试验	(90)
实验三十一	流感病毒的分离与鉴定	(94)
实验三十二	脊髓灰质炎病毒的分离与鉴定	(96)
实验三十三	流行性乙型脑炎病毒的分离与鉴定	(99)
实验三十四	乙型肝炎病毒抗原抗体系统的检测	(102)
实验三十五	衣原体和支原体	(108)
实验三十六	立克次氏体	(110)
实验三十七	病原性螺旋体	(112)
实验三十八	病原性真菌	(114)

免疫学实验部分

实验一	溶菌酶杀菌试验	(119)
实验二	吞噬细胞功能试验	(120)
实验三	免疫血清的制备	(123)
实验四	溶血素的制备	(125)
实验五	总补体活性测定 (CH ₅₀ 测定)	(126)
实验六	淋巴细胞分离技术	(128)
实验七	单克隆抗体的制备	(131)
实验八	直接凝集反应	(133)
实验九	反向间接血凝试验	(135)
实验十	间接凝集抑制试验	(137)
实验十一	SPA协同凝集试验	(138)
实验十二	琼脂扩散试验	(140)
实验十三	对流免疫电泳	(142)
实验十四	火箭电泳	(143)
实验十五	免疫电泳	(144)
实验十六	补体结合试验	(145)
实验十七	免疫酶技术—ELISA	(150)
实验十八	放射免疫测定法—— ¹²⁵ I标记技术	(151)
实验十九	循环免疫复合物的检测——抗补体法	(152)
实验二十	类风湿因子乳胶凝集试验	(154)
实验二十一	SPA花环试验	(155)
实验二十二	E花环试验	(156)
实验二十三	淋巴细胞转化试验	(158)
实验二十四	单克隆抗体检测T细胞亚群试验——间接免疫荧光法	(160)
实验二十五	白细胞移动抑制试验	(162)
实验二十六	抗体介导的细胞毒试验	(163)
实验二十七	微量淋巴细胞毒试验	(164)

实验二十八 混合淋巴细胞培养法..... (166)
实验二十九 植物血凝素皮肤试验..... (167)

〔附录〕

一、电子显微镜工作原理简介..... (168)
二、免疫生物工程新技术简介..... (168)
三、微生物学检验新技术简介..... (169)
四、核酸探针技术简介..... (170)

医学微生物学与免疫学

实验的目的和要求

医学微生物学与免疫学是一门理论性和实践性较强的医学基础课，其实验课是理论课的重要组成部分，学习本实验课的目的旨在：

1. 帮助学生理解并验证医学微生物学与免疫学的理论知识，学习和掌握本课程的基本操作技术。

2. 培养学生先感性、后理性；先宏观、后微观；先动脑、后动手的学习技巧。

3. 培养学生观察事物和分析问题的能力；独立思考和独立工作的能力以及严谨求实的科学态度和周密细致的工作作风。

4. 提高学生的动手能力，为四化建设培养实用型医学人才打下良好基础。

5. 培养学生树立正确的医学道德观念和吃苦耐劳的奉献精神。

为了达到上述目的，提高实验课效率，特提出下列要求：

1. 严格遵守实验室规则，牢固树立“无菌观念”，熟练掌握无菌操作技术。

2. 实验前根据老师的布置做好预习，并做好必要的准备工作。

3. 实验时要认真仔细地操作，对较复杂的实验项目应按要求分工协作，以求达到实验目的，获得预期效果。

4. 实事求是的记录实验结果，对与理论不符的实验结果，要加以分析讨论，找出原因，必要时重复实验。

5. 严格遵守操作规程，避免发生各种事故。

实验室规则

在进行微生物学实验时应严肃认真、小心细致，因为微生物学实验的对象大多是病原微生物，如果不注意，可能发生感染甚至造成传播。因此，防止实验中的自身感染和环境污染是微生物学实验室的最重要原则。

1. 书包、衣物等勿带入实验室，必要的用品带入后，应放置于远离实验的操作部位或抽屉内。

2. 实验室内应保持安静、整洁和良好的秩序，不得高声谈笑或随便走动，以免影响他人实验。

3. 进入实验室应穿白大衣，离室时脱下，反折叠好。

4. 实验室严禁吸烟进食, 不要用嘴湿润铅笔和标签等。

5. 实验时若不慎吸入活菌或发生病原菌污染衣物、桌面等事故, 应立即报告指导教师进行处理:

如吸入病原菌液, 应立即吐出(注意: 应吐入盛有消毒剂的容器内)并以大量清水或1:1000高锰酸钾漱口, 必要时根据菌类不同, 服用有关药物以资预防。

如将菌液污染外环境, 如地面、桌面应立即在局部倒2~3%来苏尔或5%石炭酸浸泡半小时后抹去。若手上沾有活菌, 应浸泡于上述消毒液10~20min后, 再用肥皂及清水洗净。

若细菌污染衣物, 应立即脱下, 放入3%来苏尔或3%氯胺液内浸泡0.5h或仔细经高压蒸气消毒, 然后清洗。

6. 用过的吸管、滴管、试管、玻片等物品应放在指定的污物缸及吸管筒内, 不得放在桌面上、灯架上或水池内。

7. 爱护公物, 节约使用实验材料, 器材如有损坏, 应立即向指导教师报告、等候处理。

8. 每次实验完毕, 应及时清理实验室, 将欲培养的物品放在指定地点, 值日生打扫室内卫生, 关好门窗水电, 洗手后方可离室。

显微镜油镜的使用和保护

显微镜是一种贵重仪器, 而油镜头又是显微镜的最精密部分, 是观察细菌的重要工具。因此, 必须熟练地掌握显微镜的使用和保护, 尤其是油镜的使用和保护, 避免不应有的损失。

一、识别油镜

普通光学显微镜的构造见图检查微生物时常用油镜。油镜常见的标志是: 有放大倍数90×或95×或100×的标记; 镜头前有黑、白或红色的圆圈, 刻有“HI”或“OeL”等字样; 透镜直径最小。

二、对光

用低倍镜对光, 调节反光镜, 天然光源用平面反光镜, 人工光源或光线较弱时用凹面反光镜。检查染色标本用强光, 应将聚光器升到最高, 光圈完全放开。检查未染色的活标本时用弱光, 聚光器适当下降, 光圈适当缩小。

三、调节焦距

将标本置载物台上, 用弹簧夹或标本推进器固定, 于标本片上加镜油一滴, 移待检部位于接物镜下。

1. 转动粗调节器(粗螺旋), 使油镜头徐徐下降, 用眼从侧面观察, 到油镜头浸入油中接近玻片为止(注意: 下降油镜头时不要用力过猛过急, 以免压碎玻片或损坏镜头)。

2. 用左眼从接目镜观察, 徐徐向上转动粗螺旋, 见模糊物象后, 再用细螺旋调节, 直到物象清晰为止。如果油镜末端已离开油面, 应按上述过程重复操作。

四、显微镜的保护

1. 所有光学部分都不能用手指、普通布擦拭,用过的油镜头应立即用擦镜纸将油擦去,若镜头有干固油污,可用擦镜纸蘸取二甲苯少许擦拭,然后用于擦镜纸拭干,因二甲苯能溶解镜头上的固定胶以致使镜片脱落。

2. 显微镜的光学部分应避免日光直射。

3. 强酸、强碱、氯仿、乙醚和酒精等均能去漆或损坏机件,应避免与显微镜接触。

4. 显微镜用毕,将接物镜转成“品”字形并下降集光器或镜筒,用软绸拭净各部件后覆盖于接目镜上,双手端平送入镜箱或罩内,置于干燥处,以防受潮。

五、油镜的原理

光线从标本片经空气进入镜头时,由于介质密度不同而发生折射现象,因此,进入物镜中的光线很少,结果视野很暗,物象不清晰。如在玻片上滴加折射率和玻片($n=1.52$)相近的香柏油($n=1.515$)就可避免光线的散失,加强视野亮度,获得清晰物象(图2)。

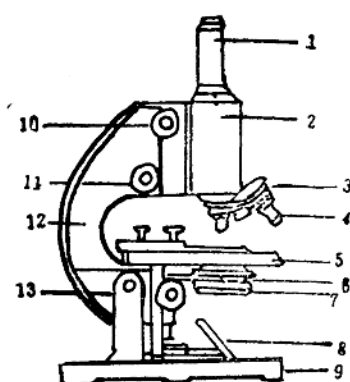


图1 显微镜的构造

1. 目镜 2. 镜筒 3. 镜头转换器 4. 接物镜 5. 载物台 6. 光圈
7. 聚光器 8. 反光镜 9. 镜座 10. 粗调节器 11. 细调节器 12. 镜臂
13. 聚光器调节器

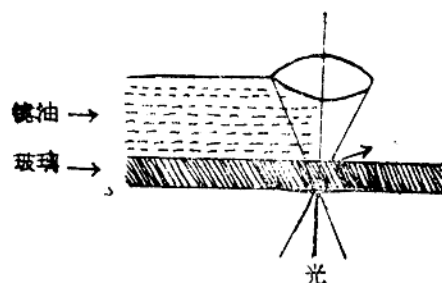


图2 油镜工作原理示意图

微生物学实验部分

实验一 细菌不染色标本检查法

〔目的〕

观察活细菌的形态，了解细菌动力检查法及其意义。

〔原理〕

细菌标本不经染色直接镜检，可以看到生活状态下细菌大致的外表轮廓和有无动力。有鞭毛的细菌能运动，无鞭毛的细菌亦有分子运动，前者是方向性的位置移动，而后者只在原位颤动，又称布朗氏运动 (Brownian movement)，须注意区别。

〔材料〕

变形杆菌，葡萄球菌幼龄 (8~12h) 肉汤培养物、载玻片、盖玻片、凹玻片、凡士林 (或浆糊)、镊子等。

〔方法〕

(一) 悬滴法

1. 取凹玻片一张，在凹窝周围涂抹凡士林 (或浆糊) 少许。
2. 取一接种环变形杆菌或葡萄球菌幼龄肉汤培养物，放于盖玻片中央。
3. 将凹玻片反转，使凹窝对准盖玻片中心，复于其上，粘住盖玻片后再反转。以接种环柄轻压盖玻片，使其与凹窝边粘紧。
4. 先用低倍镜找到悬滴的边缘后，再换用高倍镜观察 (因凹玻片较厚而油镜焦距很短，故一般不用油镜观察)。

(二) 压滴法

1. 用接种环取变形杆菌或葡萄球菌菌液 2~3 环，置于载玻片中央。
2. 用镊子夹住盖玻片，覆盖于菌液上。放置时，先使盖玻片一边接触菌液，缓缓放下，以不发生气泡为佳。
3. 先用低倍镜找好位置，再换高倍镜观察。

〔问题〕

1. 鞭毛是细菌的运动器官，为什么在光学显微镜下只看到细菌运动而看不到鞭毛？
2. 悬滴法和压滴法观察细菌动力各有何优缺点？

(山东临沂医专 王法权)

实验二 细菌基本形态和特殊构造的观察

〔目的〕

认识细菌的基本形态和特殊结构。明确细菌特殊结构的实际意义。

〔材料〕

葡萄球菌、链球菌、肺炎双球菌、大肠杆菌、霍乱弧菌革兰氏染色标本片，细菌荚膜、鞭毛、芽胞特殊结构染色片。

〔方法〕

（一）观察细菌的基本形态

用油镜观察葡萄球菌、链球菌、肺炎双球菌、大肠杆菌、霍乱弧菌革兰氏染色标本片，认识细菌的三种基本形态。观察时注意细菌的形态、大小、排列及染色特性。

（二）观察细菌的特殊结构

1. 荚膜：肺炎双球菌经荚膜染色，菌体周围的淡染区即是荚膜所在处。
2. 鞭毛：伤寒杆菌经鞭毛染色，菌体四周有细长呈波状弯曲的丝状物即是鞭毛，伤寒杆菌是周毛菌。观察细菌鞭毛时注意鞭毛的数目及在菌体上的位置。
3. 芽胞：破伤风杆菌经芽胞染色，菌体顶端有一圆形芽胞，芽胞大于菌体，使细菌呈鼓槌状。观察芽胞时注意菌体与芽胞的形态、大小及芽胞的位置。

〔问题〕

1. 细菌的特殊结构各有什么作用和意义？
2. 芽胞的抵抗力及意义如何？

（王法权）

实验三 细菌标本片制作及革兰氏染色法

〔目的〕

掌握细菌涂片标本制作及革兰氏染色法。

〔原理〕

革兰氏染色法是细菌学中最广泛使用的一种鉴别染色法。细菌先经硷性染料结晶紫着色，并用媒染剂碘处理，以95%酒精脱色，最后用稀释石炭酸复红复染。若细菌仍保持原来的紫色，称革兰氏阳性（G⁺）；如被脱色，被复染成红色，则叫革兰氏阴性（G⁻）。以此可将所有细菌区分为革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌两大类。

革兰氏染色法原理尚不完全清楚，可能有两方面因素：①G⁺菌细胞壁结构比较致密，粘肽层厚，脂质含量少，酒精不易透入，反而可使细胞壁脱水而形成一道屏障，阻止染料由细胞内渗出。G⁻菌的细胞壁较疏松，粘肽层薄，脂质含量大，酒精易透入，结晶紫—碘复合物被溶解而脱色。②G⁺菌等电点（pH 2~3）比G⁻菌（pH 4~5）低，在同样pH条件下，G⁺菌所带负电荷比G⁻菌多，故与带正电荷的结晶紫染料结合牢固，不易脱色。

〔材料〕

葡萄球菌、大肠杆菌 18~24h 琼脂斜面培养物各一支，革兰氏染色液一套（结晶紫染液、碘液、95%酒精、稀释石炭酸复红液），生理盐水、载玻片、接种环、酒精灯。

〔方法〕

（一）细菌标本片的制作

1. 涂片：取洁净的载玻片一张，取1~2接种环生理盐水置载玻片的一端。左手握菌种管，右手持接种环，将接种环灭菌后，挑取少许葡萄球菌或大肠杆菌培养物与盐水混匀，涂成直径约1cm的薄膜，接种环再经火焰灭菌后，才能放下。

若用液体培养物、痰、脓汁等材料制作涂片时，则不必先加生理盐水，可直接取材涂片，接种环使用前后均需灭菌。

2. 干燥：涂片最好在室温中自然干燥。必要时可将标本面向上，小心地断续地在酒精灯火焰高处弱火略烘使干，切勿紧靠火焰，以免标本烤枯，细菌变形，难以检视。

3. 固定：手执玻片的一端，标本面向上，在酒精灯火焰上快速地来回通过三次，共约2~3s，温度不可太高，以玻片反面触及皮肤不觉过烫为度。放置待冷后，进行染色。固定的目的是杀死细菌，使细菌与玻片粘附较牢以及改变对染料的通透性易被着色。

（二）革兰氏染色法

1. 初染：滴加结晶紫液于涂片上，以全面覆盖涂膜为度，1min后水洗，并将玻片上的积水轻轻洒净。

2. 媒染：加媒染剂碘液，1min后水洗，并将玻片上积水轻轻洒净。

3. 脱色：加95%酒精数滴于玻片上，频频摇晃数秒钟后斜持玻片，使酒精流去，再滴加酒精，如此反复2~3次，直到流下的酒精无色或稍呈淡紫色为止，立刻水洗，轻轻洒净

玻片上积水。

4. 复染: 加稀释石炭酸复红液30s后, 水洗, 洒去积水, 待干或吸水纸吸干, 油镜检查。

〔结果〕

G⁺菌呈紫色, G⁻菌呈红色。

〔问题〕

1. 观察细菌形态学的细菌涂片, 为何必须制作得薄而均匀?
2. 细菌经革兰氏染色法染色后, 为什么有的呈紫色, 有的呈红色?
3. 应为革兰氏阳性的细菌, 若染成了阴性, 可能有哪些原因?

〔附录〕

革兰氏染色液的配制:

1. 结晶紫染液: 结晶紫14g, 溶于95%酒精100ml中, 配成结晶紫酒精饱和液。取此饱和液20ml与1%草酸铵水溶液80ml混匀即成。

2. 碘液: 碘化钾20g溶于100ml蒸馏水中, 再加碘1g, 溶解后, 徐徐加蒸馏水至300ml即成。

3. 石炭酸复红稀释液: ①硷性复红4g, 溶于95%酒精100ml中, 配成硷性复红饱和液; ②取此饱和液10ml与5%石炭酸水溶液90ml混匀, 配成石炭酸复红液; ③石炭酸复红液10ml加入蒸馏水90ml中混匀, 即成石炭酸复红稀释液。

(山东临沂医专 王法权)

实验四 细菌的特殊染色法

〔目的〕

了解细菌特殊结构的染色方法。

细菌的荚膜、鞭毛、芽胞等结构, 用普通的简单染色法或鉴别染色法均不易着色, 须用各种特殊染色法, 这些仅在必要时应用。

一、荚膜染色法

1. 黑斯(Hiss)氏法

〔材料〕

结晶紫酒精饱和液, 20%硫酸铜水溶液, 肺炎球菌液, 小白鼠, 2.5%碘酒, 75%酒精, 载玻片, 无菌注射器(1ml), 解剖刀, 剪刀, 镊子, 小动物解剖板。

〔方法〕

(1) 制备标本片: 用无菌注射器吸取肺炎球菌液0.5ml接种于小白鼠腹腔中, 待小白鼠死亡后, 立刻用碘酒、酒精消毒皮肤进行解剖, 取腹腔液涂片。涂片干燥后, 经热固定。

(2) 染色: 滴加结晶紫酒精饱和液, 弱火略加热, 使冒蒸气止。用20%硫酸铜将涂片上的染液洗去, 切勿用流水冲洗, 吸水纸吸干, 油镜观察。

〔结果〕

背景及菌体呈紫色, 菌体周围有一圈淡蓝色或无色的区域即为荚膜。

2. 密尔 (Muir) 氏法

〔材料〕

石炭酸复红液, 硷性美蓝液, 特殊媒染剂 (升汞饱和液 2 份, 20% 鞣酸液 2 份, 钾明矾饱和液 5 份混合而成)。

〔方法〕

(1) 制备有荚膜菌涂片, 自然干燥, 经热固定。

(2) 滴加石炭酸复红液染 1 min, 并微加热, 水洗, 加特殊媒染剂染 20s, 水洗, 硷性美蓝液染 30s~1 min, 水洗, 镜检。

〔结果〕菌体呈鲜红色, 荚膜呈蓝色。

附: 墨汁涂片法

墨汁涂片法即墨汁负染色法, 可观察细菌的荚膜。将肺炎球菌菌液与精细墨汁混合后, 置载玻片上, 再压上一张盖玻片即可镜检, 由于荚膜不着色, 在黑色背景下可看到透明的空圈即是荚膜。或者将菌液与墨汁混合后推片, 干后再用美蓝或复红作单染色, 镜下观察, 在黑色背景下, 菌体呈蓝色或红色, 荚膜不着色, 包绕在菌体周围成为一层透明的空圈。

二、鞭毛染色法

1. 魏曦—张颖悟法

〔材料〕

菌种: 变形杆菌或伤寒杆菌, 肉汤培养基, 琼脂斜面培养基。

染液: 甲液: 饱和明矾液 2 ml, 5% 石炭酸 5 ml, 20% 鞣酸液 2 ml, 相互混合。乙液: 硷性复红或龙胆紫酒精饱和液。使用前, 将甲液 9 份、乙液 1 份混合过滤, 滤后以第三天使用最佳。

〔方法〕

(1) 细菌准备与涂片: 先将变形杆菌或伤寒杆菌每日在肉汤中移种一次, 共 7 次。取出琼脂斜面培养基中的凝结水, 换以无菌生理盐水 2 ml, 接种一接种环菌液至琼脂斜面与液体交界处, 再自该处向上划线。37℃ 孵育 7~16h, 以接种环自该交界处取出一环菌液, 轻轻放在盛有 3~4 ml 蒸馏水的小碟表面, 令菌自由分散, 浮在液体表面, 静置 4~5 min。用接种环以上述菌液面轻轻挑取一环菌液, 放在高度洁净无油的玻片上, 切忌研磨或振荡, 将玻片放 37℃ 孵箱内待其自干, 勿用火焰固定。

(2) 染色: 滴加染液 1~5 min 后, 水洗, 37℃ 孵箱烘干, 油镜观察。

〔结果〕

菌体和鞭毛呈红色或紫色。

2. 复红—美蓝法

〔材料〕

甲液: 明矾饱和液 20 ml, 20% 鞣酸 10 ml, 95% 酒精 15 ml, 蒸馏水 10 ml, 复红酒精饱和液 3 ml 混合而成。

乙液: 靛砂 1 g、美蓝 0.1 g 溶于 200 ml 蒸馏水中。

〔方法〕

(1) 制备标本片。

(2) 以甲液染 3~5 min, 水洗, 再用乙液复染 1~2 min, 水洗, 干后油镜观察。

〔结果〕 菌体呈蓝色，鞭毛呈红色。

三、芽胞染色法

〔材料〕

枯草杆菌斜面培养物，载玻片，生理盐水，接种环，酒精灯。

石炭酸复红液，硷性美蓝液，95%酒精。

〔方法〕

(1) 制备枯草杆菌涂片，干燥，固定。

(2) 染色：滴加石炭酸复红液于涂片上，并弱火加温，使染液冒蒸气，持续5 min，冷水水洗，并用95%酒精脱色2 min，水洗，硷性美蓝染液复染1 min，水洗，干后油镜下观察。

〔结果〕 菌体为蓝色，芽胞为红色。

(山东临沂医专 王法权)

实验五 基础培养基的制备

培养基是人工合成的一种混合营养料，用以分离细菌。常用的有基础培养基、营养培养基、鉴别培养基、选择培养基等。

基础培养基中含有大多数常见菌生长繁殖所需要的营养物质，并可制成液体、半固体、固体三种不同的性状以供选用。

〔目的〕

了解基础培养基制备原则、方法及用途。

〔材料〕

牛肉膏，蛋白胨，氯化钠，蒸馏水，琼脂，1 mol NaOH及1/10 mol NaOH，0.02%酚红指示剂，pH比色架，标准比色管，三角烧瓶，量筒，天平，中试管，吸管。

〔方法〕

一、液体培养基的制备：

1. 称取牛肉膏3 g，蛋白胨10 g，氯化钠5 g加入1000 ml蒸馏水中，加热溶化。

2. 待冷至40~50℃时，测定并矫正酸碱度为pH7.6。方法如下(按图3所示)，取pH7.6酚红标准比色管及蒸馏水管，分别插入比色架的③、②孔内；取管径管壁与标准比色管相同的试管两支，各加入待测的培养基5 ml，一管插入比色架的①孔内另一管加0.02%酚红指示剂0.25 ml摇匀后插入④孔内；举起比色架对光观察，酚红在酸性中呈黄色，在碱性中呈红色。如果①③及②④两侧颜色相同时，即表示所测培养基的酸碱度与标准比色管所示者相同；若两侧颜色不一致时，可滴加NaOH或HCL于试管④中，以矫正达到所要求的pH。通常未矫正前的肉膏汤均呈酸性，故常用1/10 mol NaOH溶液进行矫正，使②④两管与pH7.6标准比色管③及①管对光观察的颜色相同时为止，同时记录用去的1/10 mol的NaOH溶液量，然后由此计算出矫正全量培养基为pH7.6时所需之1/10 mol NaOH量，再换算成1 mol NaOH