

农 用 微 生 物 生 产 技 术



中国科学院微生物研究所
《微生物》编辑组编

科学出版社

S182

111

S182

1

农用微生物生产技术

中国科学院微生物研究所
《微生物》编辑组编

科学出版社

1974

内 容 简 介

本书收集了微生物菌肥、杀虫剂、发酵饲料、疫苗、土霉素钙盐以及微生物酶用于饴糖、白酒生产的工艺、设备和测定方法。可供从事农业微生物及饴糖、白酒行业的工人、贫下中农、科技人员和知识青年参考。

农用微生物生产技术

中国科学院微生物研究所

《微生物》编辑组编

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1974年1月第一版 开本：787×1092 1/32

1974年1月第一次印刷 印张：5 7/8

印数：0001—14,500 字数：132,000

统一书号：13031·169

本社书号：298·13-9

定价：0.48 元

只限国内发行

前 言

无产阶级文化大革命以来，我国群众性应用微生物科学实验活动蓬勃开展，特别是微生物在农业上的应用，形势更加波澜壮阔，在农业生产中起了一定作用。为了满足农业生产对微生物产品的需要，广大工人、贫下中农、干部和科技人员，贯彻“以农业为基础、工业为主导”的发展国民经济总方针，自力更生，艰苦奋斗，因地制宜地办起了一批县、社、队的微生物工厂或车间。这些工厂的规模有大有小，设备可土可洋，产品多少不一，投资少，见效快。有的厂根据农业季节的需要，灵活地安排生产。他们生产出来的产品就地使用，不误农时，方便群众，深受广大群众的欢迎。

微生物产品的工业化生产，有利于提高产品质量，降低生产成本，及时提供农业生产需要的产品，是工业支援农业，巩固和发展微生物在农业上应用成果的有效途径之一。

为了交流农用微生物产品工业生产技术，以适应群众性应用微生物科学实验活动深入开展的需要，在有关科技领导部门、科研单位和工厂的大力支持下，我们汇编了这本书。饴糖和白酒工业采用微生物酶新工艺，为节粮提供了新的途径，也收集在这里。为了保持各类产品生产工艺原来的系统性，个别产品的测定方法略有重复。

由于水平所限，汇编中难免有不妥之处，请批评指正。

编 者

1973 年 3 月

13.616.57
X.5

目 录

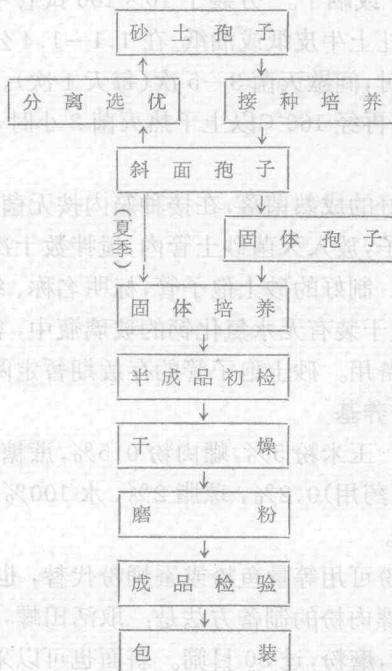
“5406”菌种粉的生产	安徽省涇县微生物农药厂 (1)
“5406”菌粉的生产和使用	山东省曲阜县酿酒厂 (17)
根瘤菌的选种、生产和使用	山东省济宁地区农业科学研究所 (17)
磷细菌肥料的土法生产和应用	湖南省微生物研究所 (26)
.....	山东省桓台县生产指挥部科技办公室 (43)
青虫菌农药的生产	河北省石家庄微生物农药厂 (55)
白僵菌粉剂的应用和土法生产	广东省新会县林业局 (84)
鲁保一号菌剂固体厚层通风培养工艺	
.....	山东省济宁市农工微生物菌种厂 (99)
.....	山东省济宁地区农业科学研究所 (99)
酵母粉发酵饲料	广西壮族自治区玉林地区食杂外贸公司 (110)
猪瘟兔化弱毒疫苗、鸡瘟弱毒疫苗和禽出败 (禽霍乱)弱毒活菌苗的制造和使用	
.....	广东省东莞县牲畜防疫站 (114)
土霉素钙盐的生产和用途	浙江省杭州市种猪试验场制药厂 (128)
酶法饴糖制造初步总结	浙江省杭州粮油化工厂 (139)
纤维素酶混合曲制酒操作方法	黑龙江省轻工工业研究所 (154)
.....	黑龙江省宾县酿酒厂 (154)

“5406”菌种粉的生产

安徽省涇县微生物农药厂

我厂是土法生产农业微生物制剂小厂，主要产品有“5406”菌种粉等12种。现将“5406”菌种粉的生产方法介绍如下。

一、工艺流程



二、斜面培养

1. 菌种 弗氏放线菌种组 (*Streptomyces fradiae*) 的细黄放线菌 (*Actinomyces microflavus*) 代号“5406”。

2. 菌种保存 生产用菌种, 为防止其变异, 应保存于灭菌的砂土管中。制备传代砂土管时, 应从原种出发, 做单孢子分离, 接种于斜面培养基上, 经 30℃ 培养 7—10 天生长成熟, 选取菌落大, 孢子呈橙红色, 菌落上有浅茶色露珠, 生长成熟快的单菌落。制备生产砂土管时应选取良好的斜面菌种。

(1) 砂土孢子管的制备: 取洁净黄砂, 过 40—60 目筛, 用水洗净、烘干或晒干。分装于 10×100 试管中, 每管 1—2 克, 塞好棉塞, 扎上牛皮纸或油纸。在 1.1—1.4 公斤/厘米² 压力下灭菌 1 小时, 间歇灭菌 3—5 次(每天 1 次)。除去包扎的牛皮纸或油纸, 再经 160℃ 以上干热灭菌 2 小时, 间歇灭菌两次(每天 1 次)。

取预先选好的成熟菌落, 在接种箱内按无菌操作方法, 用接种环挑取孢子, 放入灭菌砂土管内, 搅拌数十次, 塞好棉塞。

(2) 保存: 制好的砂土孢子管, 标明名称、编号、代数及制备日期等, 置于装有无水氯化钙的玻璃瓶中, 密闭, 保存于 0—5℃ 冰箱中备用。砂土孢子管的存放期暂定两年。

3. 斜面培养基

(1) 成份: 玉米粉 5%, 螺肉粉 0.5%, 蔗糖 2%, 碳酸钙 0.2%, 酵母片(药用) 0.2%, 琼脂 2%, 水 100%。pH 灭菌前调至 7.5—7.8。

其中螺肉粉可用等量鱼粉或蚕蛹粉代替, 也可用 0.2% 蛋白胨代替。螺肉粉的制备方法是: 取活田螺, 敲碎, 去壳取肉, 小火上炒干, 磨粉, 过 80 目筛。斜面也可以采用常用的马

铃薯-葡萄糖培养基。

(2) 配制：先把玉米粉用少量冷水调开(冷水用量要计算入水的总量中去)，再加入其他成份，然后用开水或热水加足水量。在小火上煮沸，不时搅拌直到琼脂完全融化。用稀氢氧化钠溶液调酸碱度，用6.4—8.0精密试纸测定pH值到7.5—7.8。

把溶化的培养基用试管分装，每支15×150试管装入量为3毫升左右，塞好棉塞。用试管篮盛装，并用两层油纸中央夹一层牛皮纸扎住棉塞部份。盛装时注意使所有试管排齐，不要东倒西歪。

把整篮的培养基试管放进高压灭菌锅，在1.1公斤/厘米²下灭菌半小时。

取出已灭菌的培养基试管，趁热(培养基尚未凝固)整篮地放入无菌箱，倾斜放置成斜面。斜面在试管中的长度应占试管长度的一半左右。

4. 接种

(1) 准备工作

① 无菌水和无菌注射器：取小玻璃瓶，装50毫升清水和30粒左右玻璃珠(也可用碎玻璃，以下各处同)，塞上棉塞，用油纸和牛皮纸扎住棉塞部份。取5毫升玻璃注射器，装25号针头，放进大试管或三角瓶，塞上棉塞，用油纸和牛皮纸扎住棉塞部份。放进高压灭菌锅，1.1公斤/厘米²灭菌半小时。取出后立即送进接种箱，就是无菌水和无菌注射器。每次接种，准备无菌水三瓶，无菌注射器2支，无菌水和无菌注射器应及时使用。若放置超过4小时应重新灭菌。

② 接种箱：接种箱应密闭。每次接种前，要把箱内仔细打扫干净，并用70%酒精、2%来苏尔或0.1%新洁尔灭揩拭灯管，以免灯管失透影响灭菌效果。接种箱两手伸入处的塑

料袖套，也应用灭菌药水揩拭。停用3天以上，应先空箱灭菌。

把原菌种管、新鲜斜面、无菌水、无菌注射器、酒精灯、火柴、接种环、酒精药棉等放入接种箱。密闭接种箱，开紫外光灯灭菌半小时，或用甲醛熏蒸灭菌1小时（每次用甲醛溶液2毫升，加高锰酸钾2克，如甲醛溶液中有过多的白色沉淀，可在熏蒸前加几滴硫酸）。

(2) 接种：用70%酒精药棉仔细揩拭双手，沾涂少量滑石粉，戴上医用乳胶手套，再用酒精药棉揩拭。

点燃酒精灯。以下操作都在酒精灯火焰旁进行。

把砂土孢子管中的菌砂倒0.5克左右加进无菌水中（剩下的菌砂还能再用）。塞上棉塞，摇晃半分钟，使成均匀的菌液。取出注射器吸取5毫升菌液，注意排出注射器中吸菌液时进入的空气。拔去新鲜斜面试管的棉塞，用注射器注入约0.1毫升菌液，塞上棉塞。这样就完成了一支斜面的接种工作。在注入菌液后，右手大拇指应立即离开注射器的推柄，以免菌液下滴。注射菌液过程中，不要触及推柄下部，以免引起污染。

如果原菌种管是斜面，先把接种环用酒精揩拭，再在酒精灯火焰上充分灼烧，等接种环冷却后，用接种环在斜面菌种管中轻刮一环孢子放入无菌水，略略搅动，塞上棉塞。把已刮入孢子的瓶摇晃半分钟。以后的过程和前面完全一样。

我厂用稀释法接种，在接种的同时可进行分离。所以日常生产与菌种选育工作可结合起来同时进行。具体的做法是：在用砂土管接种斜面时，同时进行稀释分离，并从分离所得菌落中选择典型菌株，制备砂土管。我厂生产全部采用砂土管接斜面，不用斜面接斜面。这样就可防止菌种退化现象。

5. 培养 已接种的斜面，放在30℃培养24小时左右，即可见到明显的菌落，伸入培养基内的营养菌丝逐渐呈浅棕褐

色,培养基表面的气生菌丝呈浅黄绿色,72 小时左右,气生菌丝生成白色孢子丝,120 小时后逐步(一般是从上部到底部)呈橙红色孢子,孢子层表面产生浅茶色露珠并放出冰片味。孢子上的露珠在 288 小时左右逐渐消失。

培养成熟的斜面菌种,应及时使用。在室温下放置,不要超过 10 天;在 $0-5^{\circ}\text{C}$ 下放置,也不要超过一个月为好。

6. 分离 稀释分离选优,是保持优良菌种的主要方法。采用稀释接种法时,接种工作和分离工作可同时进行。

稀释接种时,留下 20—30 支新鲜斜面。把稀释接种剩下的菌液,用接种注射器滴 1—5 滴加到另一瓶无菌水中。塞上棉塞,摇晃半分钟,使成均匀的稀释菌液。另取一支无菌注射器,吸取稀释菌液,排除空气,在每支新鲜斜面试管中注入约 0.1 毫升。

30°C 培养 10 天左右。在培养成熟的斜面中,可得到分散的单菌落。分散的单菌落,健壮的在 15×150 试管中,直径可大于 1 厘米(在培养皿中,有的直径可大于 5 厘米)。菌落上孢子层呈橙红色是好的,呈粉红色或白色是较差的。迟迟不长孢子丝的是严重退化的。菌落孢子层没有露珠,或者露珠只聚集在菌落的边缘,都是较差的;优良的菌株,整个孢子层上都应有露珠。

菌落上有梅花形的放射纹路的是一般的普通菌株;如果菌落上有不规则的皱纹,则是退化的表现。优良的菌株应是饱满的,没有纹路和褶皱。

正常的菌落,不应分泌色素入培养基内。如遇菌落,从其他各方面观察仍为“5406”菌,但有色素分泌入培养基内,这是显著的变异现象。对这样的菌株,要经过严格的鉴定才能用于生产,一般就不用于生产。

三、固体培养

1. 固体培养基

(1) 培养基一(饼土培养基): 饼粉 1 份, 细肥土 8 份, 麦麸 0.2 份, 石灰粉 0.5 份(因我处土性偏酸, 他处可酌加或不加)。

把以上成分混合均匀, 并用喷雾器适当加水, 使其“捏得成团, 碰碰能散”, 含水量约 15—20%。

(2) 培养基二(现生产中使用)

碎米粉 70—80% } 100% (也可用玉米粉代替碎米粉),
麦麸 20—30% }

过磷酸钙(农用)0.4%, 石灰粉 1—1.5%, 水 40—60%。

碎米粉和麦麸在存放期间酸性会增加, 再者石灰粉的质量有差别, 因此, 石灰粉的用量可略为变动。

我厂以前曾使用过饼土培养基, 效果也很好, 但产品质量不如现用培养基高。

(3) 配制: 把碎米粉和麦麸混合均匀, 用 3/4 的水溶解石灰粉。其余 1/4 的水溶解过磷酸钙。先把石灰水倒入干料中, 拌均匀, 放置 3 分钟左右, 再倒入过磷酸钙液, 在高压灭菌锅中 0.5 公斤/厘米² 下保持 10 分钟蒸熟。取出后趁热打散, 稍冷后, 用手搓散团块(最好能过筛)。称取 5 克, 加 5 毫升清水充分搅拌, pH 值要求为 7.5—8.0 (用 6.4—8.0 精密 pH 试纸测定)。偏酸, 加少量石灰水, 偏碱, 加少量过磷酸钙液。用盛葡萄糖盐水或农药的 500 毫升小口圆瓶或用方形墨汁瓶分装。作固体孢子的, 每瓶装入量, 按干料计算, 不超过 10 克; 作固体培养的, 每瓶装入量, 不超过瓶容量的 1/3。分装后, 用试管刷刷净瓶口, 塞上棉塞, 用油纸和牛皮纸扎住棉塞部

份。

(4) 灭菌：把装料的玻璃瓶放入高压灭菌锅，开始火力不要过猛，以免玻璃瓶炸裂，打开排气阀，直到热蒸汽冲出阀时，关阀，加大火力。压力表指到 0.8 公斤/厘米²时逐步降低火力，到 1.1 公斤/厘米²时退火，保压 1 小时，同时控制火力，使压力升降不超过 0.1 公斤/厘米²。

结束后，从小到大逐步打开排气阀，让压力表指针缓慢回降，直到压力表指针回降到零，排气阀中不再有蒸气冲出，旋松高压灭菌锅盖，取出灭过菌的物品。压力表指针还未回降到零时，不要旋松高压锅盖，否则，锅底水会上溢冲出，甚至会造成事故。

取出已灭菌的培养基，要立即逐瓶拍动，使瓶中的培养基松开。如果不及时拍动，冷却后瓶中培养基将结块，影响发酵。取一瓶灭菌培养基，称取 5 克，加 5 毫升清水，充分拌匀后，用 6.4—8.0 精密 pH 试纸，测定 pH 值作为生产参考，要求为 7.0—7.2。

2. 接种

(1) 准备工作：用 500 毫升盐水瓶，装玻璃珠数十粒，盛清水 100—200 毫升左右，制备无菌水。小口搪瓷漏斗用牛皮纸包严，放进高压锅 1.1 公斤/厘米²半小时灭菌，取出后，立即送入接种箱。其他准备工作同前。

(2) 接种工作

① 斜面菌种接固体孢子培养基：把接种铲先用酒精药棉揩拭，再放进火焰中充分灼烧，冷却后，把斜面菌种上的孢子刮入无菌水瓶中。一般，每三瓶固体孢子培养基准备一支斜面菌种。把所有斜面菌种的孢子都刮入同一无菌水瓶。振摇数十次，使其成均匀的孢子液。通过无菌漏斗，在每个固体孢子培养基瓶中加入 3 毫升孢子液，塞上棉塞，全部接完后，

取出接种箱,逐瓶摇匀。

② 固体孢子接固体培养基:用酒精药棉仔细揩拭成熟的固体孢子瓶外部,在酒精灯火焰灼烧瓶口,加入无菌水150—200毫升,用在火焰中充分灼烧过的接种铲搅拌均匀的菌液。通过无菌漏斗往每个固体培养基瓶中加入菌液5毫升左右。全部接完后,取出接种箱,逐瓶摇匀。每瓶固体孢子可接固体培养基30瓶左右。

③ 斜面菌种接固体培养基:夏季,从固体孢子接固体培养基,由于固体孢子纯度的关系,往往容易引起杂菌污染。因此,夏季主要是由斜面菌种接固体培养基,春秋冬三季则在斜面菌种和固体培养之间增加固体孢子工序,由固体孢子接到固体培养基中,这样,可以大量节约斜面菌种的用量。斜面菌种接固体培养基,方法同前。

3. 培养 已接种的固体孢子和固体培养瓶,都在30—32℃的温室中培养。24小时后瓶壁有“出汗”现象,48—60小时内,培养基上已有孢子出现,这时应摇瓶一次,让瓶内培养基重新分布均匀,以利于“5406”菌的生长。如果48—60小时内培养基上尚未出现孢子,则必定是以前各步中有差错。120小时后,培养基表面应全部变白,瓶壁有褐色露珠。培养基表面逐步由白转为粉红色。培养168小时左右,即可出料。

摇瓶前,因由菌体的新陈代谢活动使品温升高,所以瓶的堆垒层数不宜太多,一般不超过三层。摇瓶后品温下降,可增加堆垒层数,以充分利用发酵室的空间。

4. 发酵室的管理 每天检查发酵室温度两次,应当保持30—32℃,过高过低都应及时调整。温度控制用微动开关(L×5-11)和乙醚膨胀瓶、电热丝加热。温差控制在上下2℃。室内恒温开关接头,电热丝接头,每月应检查两次,防止接头

松动发生电火花而引起事故。热天应只用一根电热丝维持恒温。在最高气温低于 25°C 时,应用两根电热丝同时加温。

每周应打扫一次,打扫完毕,用 1% 来苏儿或 0.1% 新洁尔灭喷雾,每月用甲醛熏蒸 1 次。

四、产品处理

1. 出料 出料前,应对固体培养成熟物逐瓶进行仔细检查,凡有以下情况都应淘汰:

① “长毛”。“黄粉”、“绿粉”、“黑粉”及毛状,霉菌污染,无论多少;

② “酒味”。“5406”菌在部分或全部未长,这部分培养基烂潮。酵母污染,无论多少;

③ “发臭”或瓶壁有粘稠的菌膜。细菌污染,无论多少;

④ 其他。“5406”菌生长不够理想,无论什么原因。

出料工作最好放在无菌室或操作箱内进行,盛料器皿应用灭菌药水揩拭。

2. 干燥 烘房专用。即专烘“5406”,而不烘其他任何微生物产品。烘房中最好能按装紫外光杀菌灯,每日开灯杀菌 3 次,每次半小时。烘箱温度不超过 50°C 。最好能采用真空干燥或通风干燥。烘箱中铺料要薄,不超过 1.5 厘米。进料后,要求在 24 小时内烘干。干燥后的发酵物应立即粉碎。如不立即粉碎,应即放入密闭容器,以免回潮。烘房保持清洁干燥,每周打扫 1 次。所装紫外光灯,每周打扫后应用酒精棉花揩拭,以免失透影响杀菌效果。

3. 粉碎 充分干燥的发酵物,用人工或机动粉碎机粉碎。粉碎机最好是专用,如果必须兼用时,在磨“5406”前,应当彻底打扫干净。粉碎机因摩擦发热,最高温度应不超过

50℃。如果超过 50℃,可以通过改装皮带盘,放慢粉碎机的转速,以降低机械的温度。粉碎后的产品,应盛放在密闭容器中,并应及时包装。

4. 包装 包装工作应在操作箱或无菌室内进行。每个 60×100 塑料袋分装菌种粉 10 克,装粉后立即用电热(可在电烙铁上装紫铜片)封口。需长途运输的,可用纸版箱集装。也可以用玻璃瓶装盛菌种粉。盛装克数一般为瓶容积毫升数的一半。例如 100 毫升玻璃瓶可装盛菌种粉 50 克。装粉后立即用瓶盖密封。

五、产品检验

1. 细度 100%能过 60 目。

2. 水份 低于 5%。

鉴定方法:准确称取菌种粉 10 克,在 105℃烘箱内烘 2 小时。取出冷却至常温后再称重,损失的克数即为水份的百分数。

3. 活孢子 “5406”活孢子万亿以上/克为一等品;千亿以上/克为二等品。

鉴定方法:稀释平面菌落计数。平面培养基成分同“5406”斜面培养基成分。为减少细菌和真菌的污染,可另加 0.01% 的重铬酸钾(可先配 1% 重铬酸钾溶液)。200 毫升三角瓶中注入 40 毫升平面培养基。共做 5 个,塞上棉塞用油纸和牛皮纸扎住棉塞部分。100 毫升容量瓶 5 个*,内装清水至刻度,用两层牛皮纸扎紧瓶塞部分。1 毫升玻璃注射器,装

* 容量瓶经高温处理后,容积会发生变化。可采用一般制备无菌水的方法制备。——编者注

上针头,放入 500 毫升三角瓶,瓶底垫薄棉花一层,塞上棉塞,用油纸和牛皮纸扎住棉塞部分。500 毫升盐水瓶(干燥的),装干燥玻璃珠 40 粒左右(可用干净碎玻璃代替),塞上橡皮塞,用两层牛皮纸扎紧。小玻璃瓶,内装清水 50 毫升左右,塞上棉塞,用油纸和牛皮纸扎住棉塞部分。以上各件准备齐全后,放入高压锅,1.1 公斤/厘米²灭菌半小时,取出后除盐水瓶及 100 毫升无菌水仍在刻度上的容量瓶外,其他各件都立即送入无菌操作箱(即接种箱)。

准确称取菌种粉 1 克,通过经干热灭菌的清洁玻璃漏斗,迅速倒入前面所说的装有玻璃珠的 500 毫升盐水瓶中,再从容量瓶中迅速倒入 100 毫升无菌水。塞紧橡皮塞。振摇 15—30 分钟。

按无菌操作方法进行。仔细检查操作箱内的 4 个容量瓶,无菌水是否在刻度上,过多的用无菌注射器吸出,过少的用无菌注射器吸取小玻璃瓶中的无菌水加足。再在这四个容量瓶的每一个瓶里都准确吸出 1 毫升无菌水,排在小玻璃瓶中。这时,每个容量瓶中都有 99 毫升无菌水。

仍用第一支无菌注射器,刺穿盐水瓶的橡皮塞,准确吸取菌液 1 毫升,悬空注入第 2 个容量瓶。放下第一支注射器,把第二个容量瓶上下颠倒振摇 1 分钟。取第二支无菌注射器,在第 2 个容量瓶中准确吸取菌液 1 毫升,悬空注入第 3 个容量瓶。放下第二支注射器,把第 3 个容量瓶上下颠倒振摇 1 分钟。以下操作相同。

取第五支无菌注射器,在第五个容量瓶中分四次吸取菌液,往每个盛培养基三角瓶中准确注入 0.2 毫升,摇匀,塞上棉塞。放在 30℃ 培养 5—7 天,培养基上长出“5406”菌落。第 5 个未接种的三角瓶也放在同样条件下培养,其上应无任何菌落出现,如第 5 个瓶中有较多杂菌菌落出现则说明培养

基灭菌不彻底,影响测定结果,必要时需重新测定。

取4个三角瓶中“5406”菌落数的平均值(即把4个三角瓶中“5406”菌落数加在一起再除以4)再乘以五百亿(由于前面5个容量瓶,各稀释了100倍: $100 \times 100 \times 100 \times 100 \times 100 =$ 一百亿,最后注入0.2毫升又是1毫升的 $1/5$,五个一百亿即五百亿),就是每克菌种粉所含“5406”活孢子数。

按照以上方法测定,每个三角瓶中“5406”菌落数平均不少于20个的是一等品;平均在2个与20个之间是二等品。

4. 染杂 杂菌1万以下/克,其检定方法采用稀释平面菌落计数。

(1) 细菌

平面培养基成分:蛋白胨1%,牛肉膏0.5%,琼脂2.5%,水100%,pH灭菌后7.2。

用200毫升三角瓶分装,每次4瓶,装量及灭菌条件同前。按上述方法,用第2支注射器在第2个容量瓶中吸取菌液,在每个三角瓶中准确注入1毫升塞上棉塞。 30°C 培养16小时。至少有一瓶无任何菌落发现才算合格。

(2) 真菌

平面培养基成分:黄豆用水浸泡1夜,放在筐内,上盖湿布,在 20°C 左右发芽,每天冲洗1—2次,弃去腐烂及不能发芽的,至芽长1寸左右即可取用。取一份豆芽,加十份水煮半小时,用纱布过滤,补足水量。按水的用量加蔗糖5%,琼脂2.5%,pH灭菌后为5.0。可添加0.01%四环素以抑制细菌和放线菌。用200毫升三角瓶分装,每次4瓶,装量及灭菌条件同前。

按前述方法,用第2支注射器在第2个容量瓶中吸取菌液,在每个三角瓶中准确注入1毫升,塞上棉塞。 26°C 下培养3天。至少有一瓶无任何菌落发现才算合格。