

## 实验须知

为了上好微生物学实验课并保证安全,特提出如下注意事项。

(1) 每次实验前必须对实验内容进行充分预习,以了解实验的目的、原理和方法,做到心中有数,思路清楚。

(2) 实验过程中认真及时做好实验记录,对当时不能得到结果而需要连续观察的实验,则需记下每次观察的现象和结果,以便分析。

(3) 应保持实验室内整洁,不准在实验室吃食品。保持室内安静,有问题时举手提问,严禁谈笑喧哗,随便走动和会客。

(4) 实验时须小心仔细,全部操作应严格按操作规程进行。发生盛菌试管或瓶被打破、皮肤破伤或菌液吸入口中等意外情况,应立即报告指导教师,及时处理,切勿隐瞒。

(5) 实验过程中,切勿使乙醇(酒精)、乙醚、丙酮等易燃试剂接近火焰。如遇火险,应先关掉火源,再用湿布或沙土掩盖灭火。必要时应使用灭火器。

(6) 使用显微镜或其他贵重仪器时要细心操作,特别爱护。

(7) 对消耗材料和试剂等要力求节约,在用毕后放回原处。

(8) 每次实验完毕后,必须把所用仪器抹净放妥,将实验室收拾整齐,擦净桌面。如有菌液污染桌面或其他地方,可用3%来苏尔液或5%石炭酸液覆盖其上半小时后擦去,如系芽孢杆菌则应适当延长消毒时间;凡带菌工具(如吸管、玻璃刮棒等)在洗涤前须浸泡在3%来苏尔液中消毒。

(9) 实验应标明培养材料组别及处理方法,放于教师指定的地点培养;未经教师许可,实验室中的菌种和物品等不得携带出室外,离开实验室前应将手洗净。

(10) 应以实事求是的科学态度将每次实验的结果填入报告表格中,力求简明准确。

(11) 值日生要负责清扫地面,收拾实验用品,处理垃圾,关好水、电、门、窗等后再离开。

---

# I 基础实验

---

本书的基础实验以探究性课题(土壤中四大类微生物分离纯化、计数与鉴定)的形式安排实验内容和顺序,使所有的实验连贯起来。其中,放线菌、酵母菌和霉菌的鉴定以形态观察为主。细菌的鉴定包括形态、生长特性(控制)、生理生化特征和 16S rDNA 鉴定。具体实验内容和实验顺序设计思路为:培养基的配制、灭菌物品的准备及灭菌;土壤四大类微生物的培养计数、分离纯化;分离放线菌、酵母菌和霉菌的形态鉴定;分离细菌的形态鉴定、生长曲线、营养需求、生长控制、生理生化特征、16S rDNA 鉴定;微生物菌种保藏。所有实验环环相扣,全部可由学生以科研小组为单位完成,教师可根据不同的专业、不同的课时选做菌种分离纯化后的实验。

在常规教材中,形态或生理生化特征典型的菌种由教师提供。在本书的实验体系中,教师仍然提供这些典型菌作为鉴定科研小组分离菌的标准菌或对照菌。这样既能方便学生掌握不同微生物形态和生理生化特征的多样性,也能方便科研小组成员分配任务。比如,3~4 人的科研小组,可以 1 人操作教师提供的典型菌 A,1 人操作教师提供的典型菌 B,1~2 人操作科研小组的分离菌。这样不仅能将一个个独立的、枯燥的验证性实验变成科研小组的协作探究,激发学生实验探究的兴趣,又能保证每个组员都掌握微生物的基本实验技术,进行独立操作和训练。实验土壤可以是与本地区农业、工业、环保等密切相关且富含四大类微生物的各种土壤,如被 Cd(镉)污染的菜园土壤,某花卉、蔬菜、果园、农作物基地的土壤等。

## 实验一

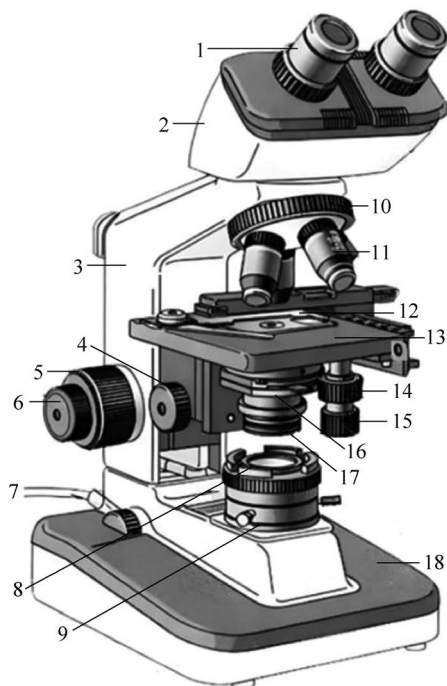
# 光学显微镜的使用

## 一、目的要求

- (1) 熟悉普通光学显微镜的构造和原理。
- (2) 正确掌握光学显微镜的使用方法。

## 二、实验原理

普通光学显微镜由机械装置和光学系统两部分组成(见图 1-1)。



1—目镜；2—镜筒；3—镜臂；4—聚光器升降手轮；5—粗调螺旋；6—细调螺旋；7—电源线；8—光源；9—视场光阑；10—物镜转换器；11—物镜；12—标本夹；13—载物台；14—标本推动器纵向移动旋钮；15—标本推动器横向移动旋钮；16—聚光镜；17—虹彩光圈；18—镜座。

图 1-1 显微镜构造示意图

## 1. 机械装置

显微镜的机械装置包括镜座、镜臂、镜筒、物镜转换器、载物台、标本推动器、粗调螺旋和细调螺旋等部件,各部件的构造与功能见表 1-1。

表 1-1 普通光学显微镜机械部分的构造与功能

| 部 件       | 构造与功能                                                                                                                                  |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 镜座        | 显微镜的基本支架,在显微镜的底部,呈马蹄形、长方形、三角形等                                                                                                         |
| 镜臂        | 连接镜座和镜筒之间的部分,呈圆弧形,是移动显微镜时的握持部分                                                                                                         |
| 镜筒        | 镜筒上接目镜,下接物镜转换器。从镜筒的上缘到物镜转换器螺旋口之间的距离被称为机械筒长。物镜的放大率是与镜筒长度相关的,镜筒长度变化不仅放大率随之变化,成像质量也会受到影响,因此,不能随意改变镜筒长度。国际上将显微镜的标准筒长定为 160mm,此数字会被标在物镜的外壳上 |
| 物镜转换器     | 由两个金属圆盘叠合而成,可安装 3~4 个物镜。转动转换器,可以按需要将其中任何一个物镜和镜筒接通,使物镜与镜筒上面的目镜构成一个放大系统                                                                  |
| 载物台与标本推动器 | 载物台中央有一孔,为光线通路。在台上装有标本夹,标本夹与标本推动器相连,调节标本推动器的横向或纵向移动螺旋可使标本夹做横向或纵向运动                                                                     |
| 调焦螺旋      | 位于镜臂的一旁,分为粗调螺旋和细调螺旋。粗调螺旋用于粗放调节物镜和标本的距离,只能粗放地调节焦距;而细调螺旋则用于进一步调节焦距                                                                       |
| 聚光器升降手轮   | 装在校物台下方,可使聚光器升降,用于调节光源射出来的光线                                                                                                           |

## 2. 光学系统

显微镜的光学系统包括目镜、物镜、聚光器等,光学系统可以使标本物像放大,形成倒立的放大物像,各部件的构造与功能见表 1-2。

表 1-2 普通光学显微镜光学系统的构造与功能

| 部 件 | 构造与功能                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 目镜  | 目镜装在镜筒上端,作用是把被物镜放大的实像再放大一次,并把物像映入观察者的眼中。目镜上刻有表示放大倍数的标志,如 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $16\times$ 。目镜中可安置目镜测微尺,用于测量标本的大小                                                                                                                                       |
| 物镜  | 物镜是显微镜中最重要的部分,其被安装在转换器的螺口上,作用是将被检物像进行第一次放大,形成倒立的实像。物镜成像的质量对分辨率有着决定性的影响,其性能取决于物镜的数值孔径,每个物镜的数值孔径都被标在物镜的外壳上,数值孔径越大,物镜的性能越好。一般物镜包括低倍镜( $4\times$ 、 $10\times$ )、高倍镜( $40\times$ )和油镜( $100\times$ )。使用时可以通过镜头侧面刻有的放大倍数来辨认,一般放大倍数越高的物镜工作距离越小,油镜的工作距离则只有 0.19mm |
| 聚光器 | 聚光器在校物台下面,里面装有聚光镜和虹彩光圈,起汇聚光线的作用。聚光器可根据光线的需要上下调整。一般用低倍镜时需要降低聚光器,用油镜时则需要将其升至最高处。虹彩光圈由十几张金属薄片组成,可放大或缩小,用以调节光强和数值孔径的大小。在观察较透明的标本时,光圈宜缩小些,这时分辨率虽会降低但反差会增强,从而使透明的标本被看得更清楚;但也不宜将光圈关得太小,以免由于光干涉现象而导致成像模糊                                                          |

### 三、实验材料

#### 1. 菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)(染色玻片标本)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和黑根霉(*Rhizopus nigricans*)(水封片)。

#### 2. 试剂

香柏油、二甲苯。

#### 3. 仪器和其他用具

显微镜、擦镜纸等。



水封片

### 四、实验内容

#### 1. 观察前的准备

(1) 显微镜的安置。从显微镜柜或镜箱内拿出显微镜时要用右手紧握镜臂,左手托住镜座,平稳地将显微镜搬到实验台上。镜座离实验台边缘约 10cm,镜检时姿势要端正。

(2) 光源调节。将聚光器上升到最高位置,同时通过调节安装在镜座内的光源灯的电压获得适当的照明亮度。在使用反光镜采集自然光或灯光作为照明光源时,应根据光源的强度及所用物镜的放大倍数选用凹面或凸面反光镜并调节其角度,使视野内的光线均匀,亮度适宜。

**说明:** 适当调节聚光器的高度也可改变视野的照明亮度,但一般情况下聚光器在使用中都是调到最高位置。

(3) 根据使用者的个人情况调节双筒显微镜的目镜。双筒显微镜的目镜间距可以适当调节,左目镜上一般还配有屈光度调节环,可以适应眼距不同或两眼视力有差异的不同观察者。

(4) 聚光器数值孔径值的调节。调节聚光器的虹彩光圈值,使之与物镜的数值孔径值相符或略低。有些显微镜的聚光器只标有最大数值孔径值,而没有具体的光圈数刻度,使用这种显微镜时可在样品聚焦后取下一目镜,从镜筒中一边看着视野一边缩放光圈,调整光圈的边缘与物镜边缘黑圈相切或略小于其边缘。因为各物镜的数值孔径值不同,所以每转换一次物镜都应进行调节。

**说明:** 在聚光器的数值孔径值被确定后,若需改变光照强度则可通过升降聚光器或改变光源的亮度来实现,原则上不应再调节虹彩光圈。当然,虹彩光圈、聚光器高度及照明光源强度的使用原则也不是固定不变的,只要能获得良好的观察效果,有时也可根据不同的情况灵活处理。

#### 2. 显微观察

在目镜保持不变的情况下,使用不同放大倍数的物镜所能达到的分辨率及放大倍率都



显微镜观察方式

是不同的。在显微观察时应根据所观察微生物的大小选用不同的物镜,例如,观察酵母、霉菌等个体较大的微生物形态时,可选择低倍镜或高倍镜(如本实验使用的酿酒酵母和黑根霉),而观察个体相对较小的细菌或微生物的细胞结构时,则应选用油镜(如本实验使用的金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌)。一般情况下(特别是初学者)在进行显微观察时应遵守从低倍镜到高倍镜再到油镜的观察次序,因为低倍物镜视野相对较大,易发现目标及确定观察的位置。

(1) 低倍镜观察。将待检标本玻片置于载物台上,用标本夹夹住,调节标本推动器旋钮使观察对象处在物镜的正下方。下降“10×”物镜使其接近标本,用粗调螺旋慢慢升起镜筒(或下降载物台),使标本在视野中初步聚焦,再调节细调螺旋至图像清晰。通过标本推动器移动标本,找到合适的目标像并将它移到视野中央进行观察。

**说明:** 使用粗调螺旋聚焦物像时,要养成“先从侧面注视,小心调节物镜靠近标本,然后用目镜观察,慢慢调节物镜离开标本进行准焦”的习惯,以免因一时的误操作而损坏镜头及载玻片。

(2) 高倍镜观察。在低倍镜下找到合适的观察目标并将其移至视野中心后,轻轻转动物镜转换器将高倍镜移至工作位置。对聚光器光圈及视野亮度进行适当调节后,用细调螺旋调至物像清晰为止,通过标本推动器移动标本,找到需要观察的目标像,将之移至视野中央进行观察。

**说明:** 在一般情况下,当物像在一种物镜中已清晰聚焦后,转动物镜转换器将其他物镜转到工作位置进行观察时,物像将保持基本准焦的状态,这种现象被称为物镜的同焦(parfocal)。利用这种同焦现象,可以保证在使用高倍镜或油镜等放大倍数高、工作距离短的物镜时仅用细调螺旋即可使物像清晰聚焦,从而避免使用粗调螺旋时可能的误操作损坏镜头或载玻片。

(3) 油镜观察。在低倍镜或高倍镜下找到要观察的区域后,移开镜头,在待观察的样品区域滴上一滴香柏油,将油镜转至工作位置,将聚光器升至最高,放大视场光阑及聚光器上的虹彩光圈(带视场光阑的油镜,开大视场光阑),调节光源使视野的亮度合适,用细调螺旋调至物像清晰为止。

**说明:** 很多显微镜在低倍镜或高倍镜下找到了要观察的区域,换油镜至工作位置后,使用细调螺旋很难找到物像,所以对于油镜观察通常采用下面的方法。

用粗调螺旋下降载物台或升高镜筒,使物镜逐渐远离标本片,在标本观察区域滴上一滴香柏油,然后将油镜转至工作位置,在侧面注视下,调节粗调螺旋使载物台缓缓上升(或使镜筒缓缓下降),使油镜镜头浸在油中并几乎与标本接触,将聚光器升至最高位置,放大视场光阑及聚光器上的虹彩光圈(带视场光阑的油镜,开大视场光阑),调节光源使视野的亮度合适,调节粗调螺旋,使载物台微微下降(或使镜筒微微上升),直至视野中出现一闪而过的物像,改用细调螺旋调至物像清晰。如果镜头已离开油滴但尚未发现物像,可重新按上述步骤操作直到物像清晰为止。

### 3. 观察完毕后显微镜的处理

(1) 下降载物台(或使镜筒上升),将油镜头转出,先用擦镜纸擦去镜头上的油,再用擦

镜纸蘸少许二甲苯溶液(香柏油溶于二甲苯)擦去镜头上残留的油迹,最后再用干净的擦镜纸擦去残留的二甲苯溶液。注意擦镜头时应向一个方向擦拭,切忌用手或其他纸擦拭镜头,以免使镜头沾上污渍或产生划痕而影响观察。

(2) 用擦镜纸清洁其他物镜及目镜,用绸布清洁显微镜的金属部件。

(3) 将各部分还原,将光源灯亮度调至最低后关闭,将反光镜垂直于镜座,将最低放大倍数的物镜转到工作位置,同时将载物台降到最低位置,并降下聚光器。最后将显微镜放回柜内或镜箱中。

#### 注意事项

(1) 不要在下降物镜镜头时用力过猛或调焦时误将粗调螺旋向反方向转动而损坏镜头及载玻片。

(2) 不可以转动高倍镜经过加油镜油的区域。

(3) 二甲苯溶液等清洁剂会对镜头造成损伤,不要使用过量的清洁剂或让其在镜头上停留时间过长,不要让清洁剂在镜头上有残留。此外,切忌用手或其他纸擦拭镜头,以免使镜头沾上汗渍、油污或产生划痕。

## 五、实验报告

分别绘出低倍镜、高倍镜和油镜下观察到的各种微生物的形态,包括三种情况下视野中的变化。同时注明物镜放大倍数和总放大倍数。

## 六、思考题

(1) 试列表比较低倍镜、高倍镜及油镜各方面的差异。

(2) 为什么在使用高倍镜及油镜之前要先用低倍镜进行观察?



习题解答

## 实验二



# 培养基的配制

## 一、目的要求

- (1) 了解培养基的配制原理。
- (2) 了解培养基配制的常规步骤。
- (3) 学习和掌握几种培养基的配制方法。

## 二、实验原理

培养基是根据微生物生长发育的需要用不同组分的营养物质调制而成的营养基质。人工制备培养基的目的在于给微生物创造一个良好的营养条件。把一定的培养基放入特定的器皿中,就成了人工繁殖微生物的环境和场所。自然界中的微生物种类繁多,因为微生物具有不同的营养需求,且实验和研究的目的不同,所以培养基在组成原料上也各有差异。但是,不同种类和不同组成的培养基均应含有满足微生物生长发育的水分、碳源、氮源、无机盐和生长素,以及某些必需的微量元素等。此外,培养基还应具有适宜的酸碱度(pH 值)、一定的缓冲能力、一定的氧化还原电位和合适的渗透压。

培养基可以根据不同的标准分为不同的类型:按成分的不同可以分为天然培养基、合成培养基、半合成培养基;按培养基的物理状态可以分为固体培养基、液体培养基、半固体培养基;按培养基的用途可以分为基础培养基、选择性培养基、加富培养基、鉴别培养基、孢子培养基、种子培养基、发酵培养基等。

固体培养基是在液体培养基中添加凝固剂制成的,常用的凝固剂有琼脂、明胶和硅酸钠。其中以琼脂最为常用,主要成分为多糖类物质,性质较稳定,一般微生物不能将其分解,故用作凝固剂而不致引起培养基化学成分变化。琼脂在 95℃ 的热水中才开始熔化,冷却到 45℃ 又重新凝固,因此用琼脂制成的固体培养基在一般微生物的培养温度范围内(25~37℃)不会熔化而是会保持固体状态。

## 三、实验材料

### 1. 培养基和试剂

牛肉膏、蛋白胨、NaCl、琼脂、可溶性淀粉、葡萄糖、 $K_2HPO_4$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2%去氧胆酸钠、1%链霉素、 $\text{KNO}_3$ 、0.1%孟加拉红、10%苯酚溶液、1mol/L NaOH、1mol/L HCl、柠檬酸钠、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、曲利苯蓝、0.5%  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 、溴百里酚蓝或溴甲酚紫(1.6%酒精溶液)。

## 2. 仪器和其他用具

高压蒸汽灭菌锅、无菌培养皿(80mm)、无菌玻璃涂棒、称量纸、试管架、药勺、棉塞、电子天平、玻璃棒、烧杯、pH试纸(pH5.5~9.0)、电磁炉、量筒、试管、三角烧瓶、牛皮纸(或报纸)、麻绳(或橡皮筋)等。

## 四、实验内容

培养基配制的一般步骤包括称量、熔化或溶解、调pH值、分装、加塞和包扎等。但不同的培养基配方不同、用途不同,具体的操作方法也会略有不同,下面以“实验四 土壤中细菌、放线菌、酵母菌及霉菌的分离纯化与计数”所需配制的培养基(牛肉膏蛋白胨培养基、高氏1号培养基、马丁氏培养基和酵母膏葡萄糖培养基)、“实验十九 常见的生理生化试验II”所需配制的培养基(蛋白胨水培养基、葡萄糖蛋白胨水培养基、糖发酵培养基和柠檬酸盐培养基)、“实验二十三 淀粉酶产生菌的分离、筛选与鉴定”所需配制的培养基(淀粉筛选培养基)为例介绍培养基配制的原理和方法。



培养基配制  
操作视频



培养基配制  
思维导图

### (一) 牛肉膏蛋白胨培养基的制备

#### 1. 实验原理

牛肉膏蛋白胨培养基是细菌学研究最常用的天然培养基,其中的牛肉膏可以为微生物提供碳源、磷酸盐和维生素,而蛋白胨主要提供氮源和维生素,NaCl提供的则是无机盐。不加琼脂的配方被称为肉汤培养基,加入琼脂配制的固体培养基则一般被用于细菌的分离、培养和计数等。

#### 2. 配方及灭菌条件

|         |        |     |       |
|---------|--------|-----|-------|
| 牛肉膏     | 5g     | 蛋白胨 | 10g   |
| NaCl    | 5g     | 琼脂  | 20.0g |
| 蒸馏水     | 1000mL |     |       |
| pH7.0   |        |     |       |
| 121℃,灭菌 | 20min  |     |       |

#### 3. 操作步骤

(1) 称量:按培养基配方比例依次准确地称取各药品放入烧杯中。用玻璃棒挑取牛肉膏,放在小烧杯或表面皿中称量,用热水溶解之后倒入烧杯。也可将之放在称量纸上,称量后直接放入水中,这时如稍微加热牛肉膏便会与称量纸分离。立即取出纸片,蛋白胨很易吸潮,在称取时动作要迅速。另外,称药品时要严防药品混杂,一把药勺只能用于一种药品,或称取一种药品后,洗净、擦干再称取另一种药品,瓶盖也不要盖错。

(2) 熔化或溶解: 在上述烧杯中可先加入少于所需要的水量, 用玻璃棒搅匀再加热使其熔化或溶解。琼脂熔化的过程中需不断搅拌, 以防琼脂烧糊使烧杯破裂。琼脂遇水沸腾导致溢出烧杯时要及时添加少许冷水, 待琼脂完全熔化后再补充水分到所需的总体积。

(3) 调 pH 值: 在未调 pH 值之前, 先用精密 pH 试纸测定培养基的原始 pH 值, 如果 pH 值偏酸, 则需要用滴管向培养基中逐滴加入  $1\text{mol/L}$  NaOH, 边加边搅拌, 并随时用玻璃棒蘸少许液体用 pH 试纸测其 pH 值, 直至 pH 值达 7.0; 反之, 则需要用  $1\text{mol/L}$  HCl 调节。注意, pH 值不要调过头, 以避免回调, 否则将会影响培养基内各离子的浓度。

(4) 分装: 将培养基分装于试管中, 分装的试管数应视后续实验的需要而定, 其余则分装于三角烧瓶中(分装要求见实验三)。

(5) 加塞: 分装培养基完毕后, 在试管口或三角烧瓶口塞上棉塞(也可以用泡沫塑料塞, 试管还可以用试管帽等), 以阻止外界微生物进入培养基内而造成污染。另外, 还需要保证良好的通气性能(棉塞制作方法见实验三)。

(6) 包扎: 试管加塞后, 一般需要将多个试管放在一起, 再在棉塞外包一层牛皮纸(或报纸), 以防止灭菌时冷凝水润湿棉塞, 用一根麻绳将几根试管一起扎好(方便起见, 可用橡皮筋代替)。给三角烧瓶加塞后, 外包牛皮纸(或报纸), 用麻绳以活结形式将之扎好(方便起见, 可用橡皮筋代替)。应注明培养基名称、组别、配制日期。

## (二) 高氏 1 号培养基的制备

### 1. 实验原理

高氏 1 号培养基属于合成培养基, 常被用于分离和培养放线菌, 其以可溶性淀粉作为碳源, 以  $\text{KNO}_3$  作为氮源,  $\text{NaCl}$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  作为无机盐为微生物提供钠、钾、磷、镁、硫等离子, 以  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  作为微量元素为微生物提供铁离子。 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  可以有效地抑制土壤中细菌和真菌的生长, 从而使放线菌在培养过程中更加突出, 方便菌体的分离和纯化。

### 2. 配方及灭菌条件

|                                           |             |                                                    |        |
|-------------------------------------------|-------------|----------------------------------------------------|--------|
| 可溶性淀粉                                     | 20g         | $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ | 0.5g   |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.5g        | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$          | 0.01g  |
| NaCl                                      | 0.5g        | 琼脂                                                 | 20.0g  |
| $\text{KNO}_3$                            | 1g          | 蒸馏水                                                | 1000mL |
| $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (0.5%)  | 10mL(临用前加入) |                                                    |        |
| pH7.2~7.4                                 |             |                                                    |        |
| 121℃, 灭菌 20min                            |             |                                                    |        |

### 3. 操作步骤

量取所需水量, 取少量置于一小烧杯中, 剩余置大烧杯中。将大烧杯在电炉上加热至水沸腾。称量可溶性淀粉置于小烧杯中, 用少量冷水将淀粉调成糊状后加入沸水中, 搅匀, 继续加热, 使可溶性淀粉完全溶化。依次加入其他药品(可先将微量成分  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  配成高浓度的贮备液, 按比例换算后再加入, 方法是先在 100mL 水中加入 1g 的  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 配成 0.01g/mL 的溶液, 再在 1000mL 培养基中加 1mL 的 0.01g/mL 的贮备液即