

应用微生物学实验法

方 心 芳 著

中国财政经济出版社

內 容 介 紹

建国以来，我国酿造工业蓬勃发展，对工业微生物的应用与研究，已較广泛，但有关介紹这方面的基本知識和实验技术的書籍却很少，远不能满足生产发展的要求。为此，特将“应用微生物学实验法”一書加以修改补充，并繼續出版，以应讀者需要。

全書共分三篇，第一篇为酵母实验法，包括有酵母实验51个，主要介紹对酵母認識、培养、分离和鉴别方法，以及酵母各种性能的測定和定向培育等；第二篇为霉菌实验法，內有霉菌实验45个，对曲霉、青霉的分离、形态，根霉的分离，曲霉的养料、鉴别，霉菌的变异和曲霉、根霉糊化酶和糖化酶等均有詳細的介紹；第三篇为細菌实验法，共有細菌实验49个，对細菌的觀察法、染色法、氧化作用、各种图形法和菌种保藏等均有扼要的介紹。最后，还附有每篇的附录，分叙了培养基、染色液、指示剂、緩冲液等配制法，也很切合实用。研究微生物学的人員、有关院校的师生、从事于酿造工业的人員以及菌肥厂、医疗室、菌种站等的工作人員，在工作中，可以从这本书里得到帮助。

应用微生物学实验法

方心芳 著

中国财政经济出版社

1962年·北京

編 者 的 話

“应用微生物学实验法”一書曾于1951年由生活·讀書·新知三联書店分三冊出版。該書店結束后，此書版权已移交給人民出版社。几年来，作者对該書做了較大的修改和补充。現已征得人民出版社同意，將此書并为一冊，由我社繼續出版。

目 次

第一篇 酵母实验法

酵母实验 一	淀粉粒的观察	9
酵母实验 二	酵母细胞的观察	10
酵母实验 三	酵母细胞的染色	11
酵母实验 四	淀粉粒与酵母细胞的区别	12
酵母实验 五	酒曲的镜检	13
酵母实验 六	酵母细胞死活的区别	14
酵母实验 七	杀菌	15
酵母实验 八	培养基的制备法	17
酵母实验 九	红白二种酵母的分离	19
酵母实验一〇	酒曲中酵母的分离	20
酵母实验一一	酵母于麦芽汁中生长状况	21
酵母实验一二	酵母营养细胞的增殖法	23
酵母实验一三	麦芽汁或曲汁中酵母细胞形状及大小	24
酵母实验一四	斜面培养的菌落及细胞	25
酵母实验一五	酵母的假菌丝体	26
酵母实验一六	酵母巨大菌落	28
酵母实验一七	酵母细胞核的染色	30
酵母实验一八	酵母细胞内油脂的检定	31
酵母实验一九	酵母子囊孢子的生成	32
酵母实验二〇	孢子发芽的观察	33
酵母实验二一	掷孢酵母	34
酵母实验二二	酵母生类胡萝卜素的颜色检定	35
酵母实验二三	酵母对糖类的发酵	37

酵母实验二四	酵母对糖类的氧化	38
酵母实验二五	酵母对乙醇的利用	40
酵母实验二六	酵母的氮素源营养料	41
酵母实验二七	酵母的无机养料	42
酵母实验二八	甾甘的分解	43
酵母实验二九	明胶的液化	44
酵母实验三〇	牛奶发酵	46
酵母实验三一	酵母的鉴定	47
酵母实验三二	定向培育	54
酵母实验三三	分离培育法	56
酵母实验三四	氧气与酵母生长的关系	58
酵母实验三五	酵母生长素	60
酵母实验三六	酵母生长温度极限	61
酵母实验三七	酵母的死灭温度	62
酵母实验三八	酵母生长发酵的酸碱值 (pH) 极限	63
酵母实验三九	酵母活细胞数的测定	65
酵母实验四〇	酵母的生殖曲线	67
酵母实验四一	酵母培养液中氨基酸量的测定	70
酵母实验四二	酵母的发酵力	72
酵母实验四三	酵母忍耐酒精的浓度	75
酵母实验四四	酵母的生酸量	76
酵母实验四五	发酵最高温度	77
酵母实验四六	酵母忍耐各酸的能力	79
酵母实验四七	酵母忍耐食盐浓度	81
酵母实验四八	酵母抵抗防腐剂的能力	82
酵母实验四九	压榨酵母的发酵力	83
酵母实验五〇	面包酵母的发面力	85
酵母实验五一	酒曲中酵母的检定	86

第二篇 霉菌实验法

霉菌实验 一	曲霉和青霉的分离	88
--------	----------------	----

霉菌实验 二	根霉的分离	89
霉菌实验 三	红曲霉的分离	90
霉菌实验 四	毛细管分离互隔孢霉法	92
霉菌实验 五	毛霉, 杉样霉及根霉在各种培养基上生长状况	93
霉菌实验 六	接合孢子	94
霉菌实验 七	根霉形态的观察	96
霉菌实验 八	狗粪毛霉及串柄毛霉	98
霉菌实验 九	梨头霉 (<i>Absidia</i>)	100
霉菌实验一〇	二重皿培养青霉的菌落	102
霉菌实验一一	青霉的形态	104
霉菌实验一二	曲霉菌落及分生子穗	107
霉菌实验一三	被子器与菌核	109
霉菌实验一四	曲霉的形态	111
霉菌实验一五	黄曲霉	114
霉菌实验一六	黑曲霉类	116
霉菌实验一七	红曲霉	117
霉菌实验一八	载片培养白地霉	119
霉菌实验一九	玻璃纸培养侧芽霉 (<i>Dematium pullulans</i>)	121
霉菌实验二〇	链孢霉	122
霉菌实验二一	灰色葡萄霉 (<i>Botrytis cinerea</i>)	124
霉菌实验二二	红镰刀霉	125
霉菌实验二三	绿褐霉	126
霉菌实验二四	根霉的生长温度极限	127
霉菌实验二五	根霉的发酵糖类	128
霉菌实验二六	毛霉在牛奶及豆浆中的生长发酵现象	129
霉菌实验二七	毛霉根霉的氮化合物养料	130
霉菌实验二八	黑曲霉的养料	132
霉菌实验二九	最少量养料限制率	134
霉菌实验三〇	根霉的果胶酶	135
霉菌实验三一	根霉的糊精化淀粉酶	136
霉菌实验三二	根霉的糖化淀粉酶	137
霉菌实验三三	曲霉的糖化淀粉酶的测定	140

霉菌实验三四	曲霉的糊精化淀粉酶.....	145
霉菌实验三五	曲霉的蛋白酶.....	146
霉菌实验三六	各种霉菌生酸的质与量.....	148
霉菌实验三七	霉菌生成葡萄糖酸的检定.....	151
霉菌实验三八	霉菌生成柠檬酸的检定.....	152
霉菌实验三九	黄曲霉生曲酸的证明	154
霉菌实验四〇	黑曲霉的丹宁酶.....	155
霉菌实验四一	霉菌生长的节制.....	156
霉菌实验四二	防霉剂的作用.....	158
霉菌实验四三	霉菌的变异——有效特性的提高.....	159
霉菌实验四四	曲霉的鉴定.....	161
霉菌实验四五	小曲质量的测定.....	164

第三篇 細菌实验法

細菌实验 一	植物浸液的观察.....	167
細菌实验 二	一般細菌細胞形状观察法.....	168
細菌实验 三	負染色法.....	170
細菌实验 四	革蓝氏染色法.....	171
細菌实验 五	孢子染色法.....	173
細菌实验 六	荚膜染色法.....	174
細菌实验 七	异染小粒的染色法.....	175
細菌实验 八	細菌运动的观察.....	176
細菌实验 九	鞭毛的染色.....	177
細菌实验一〇	緩冲剂	178
細菌实验一一	培养基酸碱值的調整	179
細菌实验一二	酸碱值对微生物的影响	182
細菌实验一三	氧气对細菌生长的影响	184
細菌实验一四	培养液氧化还原值 (rH) 的測定	186
細菌实验一五	硝酸盐的还原	188
細菌实验一六	渗透压对微生物生长的影响	190
細菌实验一七	表面张力对微生物的影响	191

細菌實驗一八	細菌对糖、醇及醇甘的利用	193
細菌實驗一九	淀粉被水解的証明	196
細菌實驗二〇	油脂的分解	197
細菌實驗二一	明胶的利用	199
細菌實驗二二	細菌对牛奶的作用	200
細菌實驗二三	靛基質生成的証明	201
細菌實驗二四	V.P. 反应	203
細菌實驗二五	硫化氢的生成	205
細菌實驗二六	尿素酶	206
細菌實驗二七	过氧化氢酶的生成	207
細菌實驗二八	細菌生色素的观察	208
細菌實驗二九	生长图形法	209
細菌實驗三〇	細菌的氧化作用	211
細菌實驗三一	氧化图形法測定微生物的氧化作用	215
細菌實驗三二	水解图形法	217
細菌實驗三三	杀菌药	219
細菌實驗三四	重金属的微动作用	222
細菌實驗三五	枯草菌	223
細菌實驗三六	Bs. macerans 生成結晶糊精	224
細菌實驗三七	醋菌	226
細菌實驗三八	海宝	229
細菌實驗三九	葡萄糖酸菌的选种	230
細菌實驗四〇	清凉茶糖 (Sorbose) 发酵	232
細菌實驗四一	大腸菌群細菌分离法	234
細菌實驗四二	乳酸菌	236
細菌實驗四三	德氏乳杆菌	239
細菌實驗四四	丙酸菌	241
細菌實驗四五	厌氧細菌分离法	244
細菌實驗四六	醋酸菌	246
細菌實驗四七	丙酮丁醇菌的分离与选种	248
細菌實驗四八	果胶分解发酵菌	252
細菌實驗四九	菌种的保藏	254

第一篇 附 录

附录 1 显微镜.....	257	附录 4 指示剂及缓冲液.....	266
附录 2 培养基.....	260	附录 5 水汽压力与温度换算表.....	268
附录 3 染色液.....	265	附录 6 比重换算表.....	270
主要参考書.....	270		

第二篇 附 录

附录 1 培养基.....	272	附录 3 缓冲液.....	282
附录 2 制备标本液 (Mounting Fluid)	281	附录 4 恒湿药品.....	284
主要参考書.....	286	附录 5 试药.....	285

第三篇 附 录

附录 1 培养基.....	288	附录 4 指示药及试药.....	299
附录 2 染色液.....	296	附录 5 丁酸钙及乙酸钙溶解度与温度的关系.....	306
附录 3 缓冲液.....	299		
主要参考書.....	307		

第一篇 酵母实验法

酵母实验一

淀粉粒的观察

(1) 引言

酵母细胞适于在显微镜下观察，生理培养也容易着手，所以这个实验，由酵母开始。

开始的几个实验，目的在练习显微镜的操作。因为微生物是显微镜下的生物，若不熟悉显微镜的使用，怎能研究微生物呢？

淀粉易得到，且有些淀粉粒的形状大小近于酵母细胞，可是加碘液后，彼此极易分别，所以先观察淀粉粒。

(2) 材料

1. 显微镜 (Microscope)。2. 载片 (Slides)。3. 盖片 (Cover glasses)。4. 刘歌氏碘液 (Lugol's iodine solution) (碘 2%，碘化钾 4% 之水溶液)。5. 马铃薯或红薯，小麦，大米或玉米等等或其他淀粉。6. 小刀一把。

(3) 操作

取一片干净的载片，平置在一白纸上。取无土尘的麦、米等一粒，在载片上切断，用刀尖挖白粉少许，积于片的中央，反复压碎。加上蒸馏水一滴，和匀，先将盖片一边接触载片，然后慢慢盖上，以避免片中集聚气泡。用吸水纸将多余的水吸去，可使盖片稳固。置载片于显微镜台中央，先用低倍镜头 (16mm) 寻找，且观察目的物。然后用高倍镜头 (4mm) 观察，用铅笔绘形象于记录簿内。将载片平移取下，在盖片一边，滴刘歌氏

液一小滴，又平移置于鏡台上，即行觀察碘液流到之處，淀粉粒即起何種現象？再繪記淀粉粒的形色于記錄簿內前圖之下，并標明“淀粉加碘”。用同一方法，觀察他種淀粉粒。同樣繪記形色。下課后用毛筆將各圖形描成黑色，以便久存。

問 題

1. 各淀粉粒的形狀如何？外表有何文飾？
2. 各淀粉粒遇碘液都變何色？

酵母實驗二

酵母細胞的觀察

(1) 引 言

酵母細胞，由細胞膜包圍，內有原形質、細胞核、空泡 (Vacuole)、顆粒 (Granules) 等物。細胞膜有厚有薄，在顯微鏡下容易看出，因其吸減光綫較強，現出較黑的顏色。

原形質的減光率 (Extinction) 較細胞膜弱，細胞核的減光率近于原形質，鏡下不易分出。

空泡的減光率較原形質弱，形圓，體大，易于看出。

顆粒為減光率極強的小粒體，現光輝，數目多，能作布朗氏運動 (Brownian movement)，散布于細胞內各處。

(2) 材 料

1. 曲汁培養48小時的釀酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 一管。2. 接種針，酒精燈。3. 顯微鏡，載片，蓋片。

(3) 操 作

1) 載片中央，置蒸餾水一滴，用接種針取酵母少許，和入，加蓋片，吸去余水。放在鏡台上觀察。

2) 先用低倍鏡頭對光及尋找酵母細胞，再用高倍的鏡頭詳細觀察細胞膜、空泡及顆粒。

繪圖于記錄簿上，並指明細胞膜(m)、空泡(v)及顆粒(g)。

酵母實驗三

酵母細胞的染色

(1) 引言

染色目的在使全體或一部分的物質，顯明的呈現出來，以便觀察。

用碘液染酵母細胞，則原形質成淺黃色，肝糖顆粒成紅褐色；用美藍 (Methylene blue) 液染，則顆粒成深藍或紫色或紅色，原形質成淺藍色。

細胞內顆粒有些是中性脂肪，故用鐵酸，或 sudan III 液染色，則成黑褐色或赤色。

(2) 材料

1. 劉歌氏碘液，千分之一的美藍液，1% 鐵酸，石碳酸復紅液 (Carbol fuchsin)。2. 曲汁琼脂 (Agar)，培養48小時的釀酒酵母菌一管。3. 顯微鏡，接種針，酒精燈，載片，蓋片。

(3) 操作

1) 滴碘液一滴于載片中央，接植酵母少許，抹勻，加蓋片，鏡下觀察。

2) 滴美藍液一滴于載片中央，抹酵母少許，加蓋片觀察。

3) 滴鐵酸一滴于載片中央，加酵母少許，鏡下觀察。

4) 載片中央加水一滴，和酵母少許，抹成薄層，風干後在火焰上通過一二次，加以固定，加石碳酸復紅液三滴，通

过火焰加热，三分鐘后用水洗，再用吸水紙吸干，置鏡下觀察，可見显明的紅色酵母細胞。

以上觀察，均繪圖于記錄簿內。

关于細胞染色的詳細手續，請參考細菌篇。

問 題

1. 酵母細胞染色时，如加热过度，細胞将变形，为什么？
2. 用美蓝液染色，是否細胞着色一律？

酵母实验四

淀粉粒与酵母細胞的区别

(1) 引 言

大米、馬鈴薯等淀粉，有特別形象，容易和酵母区别。大麦、小麦等淀粉則相反。不过加碘液后，所有淀粉都变成深藍或深紫色，酵母細胞变为浅黄色，絕對不会認錯。

(2) 材 料

1. 显微鏡。2. 載片及盖片。3. 刘歌氏碘液。4. 酿酒酵母菌曲汁琼脂培养一管。5. 酒精灯。6. 接种針。7. 小麦、大米及馬鈴薯的淀粉少許。

(3) 操 作

取淀粉少許，置載片中央，加水一滴。將接种針燒紅，自酵母培养管中，取出酵母极少一点，和入淀粉中。如法加盖片，去余水，置显微鏡台上，用高倍鏡頭視察。繪形象于記錄簿內，且于酵母旁記一Y字，淀粉旁記一S字。如前法加碘液后，再繪記形色，以Y及S分別記明酵母及淀粉。

問 題

說明酵母細胞與淀粉粒的區別。

酵母實驗五

酒曲的鏡檢

(1) 引 言

一般的白酒藥（不加草藥）內所含的東西，最重要的是大米淀粉、霉菌（Molds）及酵母（Yeasts）。霉菌都生長條形菌絲（Hypha），酒藥中可常見到，但本實驗可不加注意。所應注意的，是檢出酒藥中的酵母細胞及其與淀粉多少的比例大致的情形。黑酒藥中加有草藥，大曲由小麥或大麥、豌豆、小豆等製成，應先知道清楚。

(2) 材 料

1. 顯微鏡，載片及蓋片。2. 小刀一把，酒精。3. 劉歌氏碘液。4. 白酒藥一粒或黑酒藥或大曲一小塊。

(3) 操 作

用酒精擦洗小刀，然後燒去刀上殘酒，如此反復三、四次，以消滅刀上的細菌。用刀將酒曲切開，以刀尖挖取曲肉少許，放載片上，加水一滴，用刀研磨曲肉，使粉碎，撥去大粒，加蓋片觀察。認出那些是酵母細胞。加碘液一小滴於蓋片一邊，再觀察，繪記視野中的各物形色，並記物名。每一視野中酵母細胞及其他物體的顆粒數目的比例，繪記時不應更改。

問 題

1. 酒曲原料能在鏡下看出嗎？
2. 酵母細胞占酒曲中物粒的百分率如何？

酵母實驗六

酵母細胞死活的區別

(1) 引言

活的微生物，由于新陳代謝不停的在進行着，所以細胞內氧化還原值（rH）頗小，而還原力強，若無毒的染料進入活的細胞，即被還原脫色，但死細胞及代謝緩慢的老細胞，無此還原力。美藍無毒，且能為活細胞還原成無色，故多用以區別細胞的死活。但美藍濃度、作用、時間等都有影響，應加注意。

(2) 材料

1. 顯微鏡，載片及蓋片。2. 培養一個月以上之釀酒酵母菌一管。3. 濃度千分之一的美藍液一瓶。4. 酒精燈及接種針，5%蔗糖液。

(3) 操作

1) 美藍液一滴，置載片中央。取酵母少許，入美藍液中，攪和均勻，加蓋片，在顯微鏡下檢查。數已變藍色的細胞及未變色的細胞。統計死細胞占總細胞的百分率。

2) 20分鐘后，再行檢視，死細胞的百分率增減了沒有？

3) 美藍液一滴加蒸餾水一滴（沖淡一倍），和入酵母再觀察，死細胞%增減了沒有？

4) 美藍液一滴加5%蔗糖液一滴，和入酵母后檢查，死細胞%有沒有增減？

問題

為什麼被染成藍色的細胞在蒸餾水內比在糖液中的多？

酵母实验七

杀 菌

(1) 引 言

我們作实验所用的菌，都是純种，不可参杂其他菌，所以一切盛器以及可能传染杂菌进去的东西，都須預先杀菌，使成无菌状态。

金属物品，象接种針环、小刀、鉗子等，小玻璃器如载片、盖片等，都可于酒精灯火焰上杀菌。接种針环可以烧紅，但小刀等則不必烧紅，以免减失硬度，但須在火中烧后再放入酒精中，取出再烧，二、三次后，烧去酒精，即可应用。

若用致病菌作实验时，桌上应置一瓶杀菌葯水，如2%的来沙尔，或5%的石碳酸，或0.1%的升汞。所有的吸管、载片等等用过后即放入以杀菌。

玻璃器等可用高热空气杀菌。 $160\sim 170^{\circ}\text{C}$ ，二小时。

易起化学变化的液体，可于常压水汽中，热至百度，15分鐘以上可杀死营养細胞，置 25°C 温暖处24小时，使孢子发芽，再加热至百度15分鐘以上，杀死已发芽的孢子。如此三天至五天，可以杀灭所有的生物（間断杀菌法）。

一般的培养基，可于 $0.8\sim 1.0$ 大气压（仪表压力，約 $0.8\sim 1.0$ 公斤）的加压水汽內，蒸15至60分鐘，培养基的容积越大其酸度越小，則需要压力及時間也越大越久。酸性大的培养基，压力可减，蒸至半个大气压左右，1至2分鐘即可。

不能加热的液体，可用不上釉的瓷管（Chamberland）、硅藻土（Berkefeld or Mandler）、石棉（Leitz）等特制器滤过。

(2) 材 料