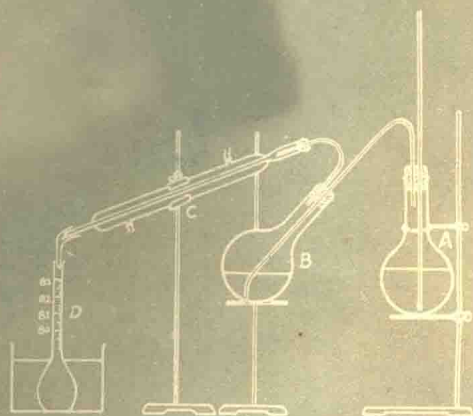


應用微生物學實驗法

第二篇 黴菌實驗法

方 心 芳 著



生活·讀書·新知三聯書店出版

應用微生物學實驗法

第二篇 黴菌實驗法

方 心 芳 著

生活・讀書・新知
三聯書店



版權所有

生活・讀書・新知三聯書店出版

北京西總布胡同29號

*

1951年6月在北京印造初版

317/1 X 437/1/25 • 138定價頁 • 總號767 • 分號Q467

0001—4000冊 • 定價5500元

*

三聯・中華・商務・開明・聯營聯合組織

中國圖書發行公司發行

第二篇 目 次

黴菌實驗I	麴黴青黴之分離	1
黴菌實驗II	酵黴之分離	2
黴菌實驗III	紅米黴 (Monascus) 之分離	4
黴菌實驗IV	毛細管分離 Alternaria 法	6
黴菌實驗V	毛黴及酵黴在各種培養基上生長狀況 ..	7
黴菌實驗VI	接合孢子 (Zygospores)	9
黴菌實驗VII	酵黴形態之觀察	12
黴菌實驗VIII	狗糞毛黴及葡萄狀毛黴 (Mucor Race-	
	mosus)	13
黴菌實驗IX	梨頭黴 (Absidia)	16
黴菌實驗X	二重皿培養青黴之菌苔	18
黴菌實驗XI	青黴之形態	21
黴菌實驗XII	麴黴菌苔及分生子穗	24
黴菌實驗XIII	被子器與菌核	27
黴菌實驗XIV	麴黴之形態	29
黴菌實驗XV	黃麴黴	32

黴菌實驗XVI	黑麴黴類.....35
黴菌實驗XVII	紫色紅米黴(<i>Monascus Purpureus</i>)...37
黴菌實驗XVIII	載片培養 <i>Oospora Lactis</i>39
黴菌實驗XIX	玻璃紙培養 <i>Dematium Pullulans</i> ...40
黴菌實驗XX	<i>Monilia</i>42
黴菌實驗XXI	灰色葡萄黴(<i>Botrytis Cinerea</i>)43
黴菌實驗XXII	<i>Fusarium Roseum</i>45
黴菌實驗XXIII	<i>Cladosporium Herbarum</i>46
黴菌實驗XXIV	酵黴之生長溫度極限.....47
黴菌實驗XXV	酵黴之發酵糖類.....49
黴菌實驗XXVI	毛黴在牛奶及豆漿中之生長發酵現象.....50
黴菌實驗XXVII	毛黴酵黴之氮化合物養料.....52
黴菌實驗XXVIII	黑麴黴之養料.....54
黴菌實驗XXIX	最少量養料限制率.....56
黴菌實驗XXX	酵黴之果膠酶.....58
黴菌實驗XXXI	酵黴之 α 澱粉酶.....59
黴菌實驗XXXII	酵黴之 β 澱粉酶.....61
黴菌實驗XXXIII	黃麴黴之 β 澱粉酶之測定.....63
黴菌實驗XXXIV	麴黴之 α 澱粉酶.....67
黴菌實驗XXXV	麴黴之蛋白酶.....69
黴菌實驗XXXVI	各種黴菌之生酸量.....71
黴菌實驗XXXVII	黴菌生成葡萄糖酸之檢定.....72

黴菌實驗XXXVIII	黴菌生成檸檬酸之檢定	74
黴菌實驗XXXIX	黃麴黴生麴酸之證明	76
黴菌實驗XL	黑麴黴之丹寧酶	77
黴菌實驗XLI	黴菌生長之節制	78
黴菌實驗XLII	黴菌抵抗防腐劑之能力	81
黴菌實驗XLIII	麴黴之鑑定	83

附錄

附錄1	培養基	89
附錄2	製備標本液 (Mounting Fluid)	101
附錄3	緩衝液	102
附錄4	恆濕藥品	104
附錄5	試藥	106
主要參考書		107
名詞解釋表		108

2/8/69 41.

346
0022

黴菌實驗 I

麴黴青黴之分離

1) 引言

一般的說，麴黴、青黴 (*aspergillus* & *penicillium*) 形成固定菌苔，可用分離酵母的盤皿法分離之，下述方法，不過稍加變更。

麴黴等分生子衆多，團聚難散，宜注意之。但是這孢子在含有清淨劑或氣溶劑 (detergent or aerosol) 的溶液中，易散開成單個體，Thom 氏說加萬分之一至十萬分之一的 Na lauryl sulfonate，很有效果云。

2) 材料

1. 無菌水四管，每管 9 毫升。
2. 無菌 1 毫升吸管五支。
3. 無菌二重皿三套，麴汁瓊脂三管，每管 12 毫升。
4. 酒精燈，接種針，瓊脂斜面培養基二管。

5. 預備分離的麴黴或青黴。

3) 操作

(a) 將無菌水管編為 1、2、3、4 號管。二重皿紙包打開，編為 1、2、3 號。

(b) 用接種針，移植預備分離的黴菌孢子一針頭，入第 1 號管，搖勻，使孢子分散，個個獨立。用無菌 1 毫升吸管，移 1 毫升入第 2 號管中。

(c) 將第 2 號管內孢子搖和均勻，用另一無菌吸管，移 1 毫升於第 3 號管，又 1 毫升於第 1 號皿中。

(d) 第 3 號管搖勻，用另一吸管，移 1 毫升於第 4 號管，又 1 毫升於第 2 號皿中。

(e) 第 4 號管搖勻，用另一吸管，移 1 毫升入第 3 號皿中。

(f) 瓊脂培養基融化後，冷至 45°C ，管口殺菌，傾入二重皿內。一管傾入一皿，旋轉搖動，使瓊脂與水和勻，置平處凝固，倒置 25°C 處，三天至一週，打開選擇菌苔不同者，接種於斜面培養基上， 25°C 培養之。

黴菌實驗 II

酵黴之分離

1) 引言

酵黴及毛黴 (*rhizopus & mucor*) 等等蔓延繁殖，不成定形的菌苔(菌叢)。所以，用盤皿分離時，兩菌苔極易蔓延接觸，混合

爲一。因此須注意二點：其一，沖淡度大，使一皿中只生酵黴菌苔數個。其二，提早移植，於培養 24 至 36 小時內，用接種針挑一菌苔之菌絲一條或帶瓊脂一小塊，移入培養管中才行。

2) 材料

1. 甜酒藥 0.5 克。
2. 乳鉢，無菌水，無菌玻棒。
3. 無菌 12 毫升蔗糖豆芽汁瓊脂三管。
4. 無菌二重皿三套。
5. 水盂，溫度表，酒精燈，酒精，接種針。
6. 無菌斜面培養基三管。

3) 操作

(a) 酒精洗乳鉢，燒灼，殺菌。將酒藥入乳鉢中，加無菌水數毫升，研磨極細。

(b) 瓊脂培養基熔化後冷至 45°C (置 45°C 水盂中)，殺菌管口。

(c) 用無菌玻棒將乳鉢內液體攪勻，取一滴，和入第一管瓊脂中，手掌中搓動旋轉，使細胞均勻散布，然後傾注於第一皿中。旋轉皿，使平展，靜置之。將第二管之瓊脂傾入第一管中，再搓旋，使管壁上留下之菌，再爲沖淡，傾注於第二皿中。將第三管中瓊脂又注入第一管中，搓旋均勻後，傾入第三皿中。靜置二三小時，倒置皿於 25°C 保溫箱中。

(d) 24 小時後透過皿蓋觀察，有無菌絲生出。因菌絲細短，且匍匐蔓延，色與培養基近似，不易看出，故宜於光亮處，注意斜

視，才易見到。用培養針挑挖菌絲一段，移植於斜面培養基中即得。可同時自三個菌苔移植三管，俾得到不同的種類。

(e)照上面直接拿酒麴分離，可稱直接分離法，其優點是所得黴類一定存在於酒麴中，缺點則是可能有細菌或酵母附於黴上。假定麴中有前二菌特多的話，爲補救計，待分出之黴生長大後，再行分離數次爲妥。

黴菌實驗 III

紅米黴(*Monascus*)之分離

1)引言

分離已知的微生物，最重要的一步手續，是濃化或集殖及純化。就是利用該菌的物理特性（如溫度，濕度，滲透壓等等）或生化的特性（如pH， O_2 ，有毒藥品，特別養料等等），於特定條件下培養之。雜菌不適合而趨衰滅，該菌則因環境適合，繁殖茂盛，菌體增加，得到純化及濃化的二重結果。若細胞濃度已相當高，也可只行純化工作，如加熱殺死無孢子細胞，以殘留生孢子菌類是。

下面的方法，是純化濃化培養之一例子。利用紅米黴之抵抗酸及酒精力強的特徵，用含乳酸約0.7%，酒精約10%的大米培養基培養之，在這種培養基中，一般的雜菌多不能繁殖，紅米黴則生長不衰，自可達到純化濃化的目的，然後用盤皿法分離，不會生困難了。

2) 材料

1. 無菌紅米黴純化培養基二管, (每管大米飯 5 克, 1% 乳酸 8 毫升, 一大氣壓 15 分鐘殺菌後, 加 50% 的酒精 2.5 毫升)。
2. 紅米二種(紅麴)。
3. 麴汁瓊脂三管, 每管 12 毫升。
4. 無菌二重皿三套, 水盂, 酒精燈, 接種針。
5. 大米培養基三管 (二大氣壓 60 分鐘殺菌), 顯微鏡, 載片, 蓋片。

3) 操作

(a) 加 0.2 克紅米於每一純化培養基中, 25 至 30°C, 培養三週, 即可分離。

(b) 瓊脂培養基加熱熔化, 冷至 45°C, 管口火燒殺菌。二重皿上貼 A B C 標籤, 若冬天氣候冷, 置皿於保溫箱中, 一小時後應用。

(c) 接種純化培養基表面之菌體少許, 入一瓊脂管中。搖打使勻, 傾注瓊脂於 A 二重皿中, 將另一管中瓊脂傾入此已空之管, 再搖打使勻, 傾注於 B 皿中。又將所餘之一管瓊脂, 傾入此管, 再如法和勻, 注於 C 皿。各皿中瓊脂, 即搖旋平展, 靜置凝固。二三小時後, 紙包, 倒置 25 至 30°C 之保溫箱中, 培養一週, 接種不同菌苔的菌於大米培養基中, 25°C 培養繁殖, 數天後米變紅色, 即得紅米黴。

問 題

上舉純化紅米黴的大米培養基殺菌，一大氣壓 15 分鐘就行，理由何在？

黴菌實驗 IV

毛細管分離 *Alternaria* 法

1) 引言

毛細管分離法，對於分離形成體大色深分生子的黴類，甚為便利。如 *alternaria*, *helminthosporium* 等黴可用之。

Alternaria 是常遇到的黴菌之一，在養料豐富的培養基上，多迅速蔓延，菌叢為濃厚的茸毛，色黑綠。養料貧乏的培養基上，茸毛較少，色暗黑，菌絲體內橫膜甚多，時常形成短而膨大的細胞鏈，但不像裂生子。分生子形狀不一，由差不多的橢圓形至大頭棒狀，橫豎隔膜數條，愈老愈多。分生子能成短鏈且常分枝，為綠褐至黑褐色。

2) 材料

1. 用玻管抽成毛細管數條，置無菌之玻板上。
2. 麴汁瓊脂二管，銹子一個，玻杯一個，酒精燈。
3. *Alternaria* sp. 一管，接種針。
4. 顯微鏡，載片，蓋片，測微器。

3) 操作

(a) 將瓊脂培養基一管煮沸，冷至 45°C ，用接種針取 *Alternaria* 菌絲一團入內，搖和均勻，仍置 45°C 水中。

(b) 手持毛細管一端，在火焰上通過，烤殺另一端處之黴菌，冷後，插入已接種菌之瓊脂內，吸入培養基，拿出，平置無菌之玻板上（用酒精抹洗燃燒數次）。同法吸取數管。

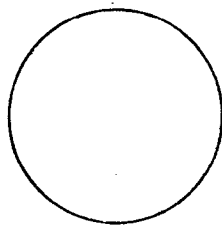
(c) 載片用酒精洗燒殺菌後，置鏡台上，將瓊脂已凝固之毛細管置上，用低倍鏡頭尋找內之孢子。找到單個分生子，且前後別的分生子相距都甚遠時，即用無菌鉗子壓斷毛細管，俾得到一小段只含孢子一個的毛細管。夾入酒精，殺菌管之外部，然後放入培養管內麴汁瓊脂上，待分生子發芽繁殖。

(d) 25°C 培養一週，觀測其菌苔，分生子等等。

Alternaria _____, _____ 培養基, _____ $^{\circ}\text{C}$ _____ 天。

(甲) 形態

(乙) 附圖



黴菌實驗 V

毛黴及酵黴在各種培養基上生長狀況

1) 引言

毛黴科 (*mucoraceae*) 各屬菌在各種培養基上生成之菌叢

(菌苔)概有差別,亦為分類上之一助。應用上,有時也須要這類知識。

2)材料

1. 馬鈴薯條,胡蘿蔔條,豆腐條,豆漿,牛奶,饅頭,麴汁,麥芽汁,麴汁瓊脂,麥芽汁瓊脂,普氏液瓊脂,普氏液等培養基各二管(已殺菌)。

2. 毛黴及酵母各一管。

3. 接種針,酒精燈。

3)操作

(a)培養基上分別貼上菌號簽子,種植毛黴或酵母。25°C 培養一週,取出觀察,有無氣菌絲組成之菌叢?液內潛溺菌絲多否?菌叢高低(以毫米計),其上部中部及下部之色相如何?菌叢組成像亂絲一團嗎,擬似竹林縱直不紋?孢子囊之有無?孢子囊大至易為肉眼看出嗎?孢子囊多集中於菌叢何部?

菌號	潛溺 菌絲	菌 叢				胞 子 囊			
		高低	色相	組成	菌絲強弱	多少	色相	所在	肉眼見到否
毛黴									
酵母									

問 題

毛黴與酵母菌叢之分別何在?

黴菌實驗 VI

接合孢子(Zygospores)

1) 引言

我們常見的真菌 (fungi), 可分為接合菌 (zygomycetes), 子囊菌 (ascomycetes), 担菌 (basidiomycetes) 及不完全菌 (fungi imperfecti)。接合菌之菌絲無橫膜, 但形成接合孢子, 為其重要的特徵。毛黴, 酵黴, 鬚黴 (phycomyces), 梨頭黴 (absidia) 等等都屬接合菌類。

接合孢子是一種有性生殖, 由二條菌絲接合而成。兼性菌由同一孢子囊內之孢子所生菌絲相接合, 單性菌則由“雌雄兩種”菌的菌絲相接合, 如黑酵黴。

要接合的二菌絲頂端接觸後, 諸漸膨大, 以致於接觸處成一橫膜。離此中間橫膜不遠, 二菌絲各生一橫膜, 於是劃出兩個對立的細胞, 稱為接合細胞 (copulation cells) 或配偶子 (gametes)。與配偶子相連的菌絲, 諸漸膨大, 稱配偶子柄 (suspensors)。兩配偶子柄或等大小, 或一大一小, 其上有生枝條者, 可稱保護枝。保護枝有分枝者。二配偶子相接觸處之橫膜溶化後, 變為一個細胞, 即為接合孢子, 或接合子。

2) 材料

1. 黑酵黴 (*rhizopus nigricans*) + 及 -, *zygorhynchus moelleri*, 各一管。

2. 無菌二重皿四套，麥芽汁瓊脂一小瓶，約 50 毫升。
3. 顯微鏡，接種針，載片，蓋片，測微器，酒精燈，乳酸石炭酸液。

3) 操作

(a) 瓊脂溶化後，傾注各二重皿中，待凝固。接種各菌，每皿一菌。但雌雄二種的黑酵黴，再行接種於第四皿中之左右二處， 25°C 培養一週。

(b) 肉眼觀察各皿中菌苔之顏色，組成，接合孢子之所在等。

(c) 用低倍鏡頭觀測接合孢子及配偶子柄之形狀，大小，顏色。二配偶子由同株之二菌絲或異株之二菌絲形成。雄(+)及雌(-)黑酵黴分別培養之皿中，有無接合孢子？二者同培養於一皿中，所生二菌苔之接觸處，產生接合孢子是何道理？

(d) 移接合孢子於載片上，用高倍鏡頭詳察其表皮之文飾，大小，形狀，顏色。有無保護枝？二配偶子柄之形狀及大小是否一律等等。

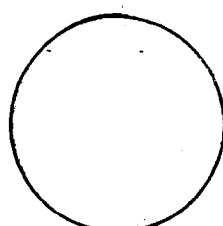
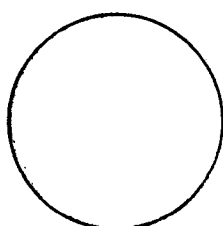
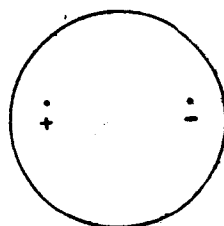
二重皿培養之菌	黑酵黴+	同 前 -	黑酵黴+及-	<i>Z. moelleri</i>
菌苔之顏色及組成				
接合孢子之有無				
接合孢子之所在				
配偶子來自同株或異株菌絲				

接 合 胞 子	形狀				
	大小				
	顏色				
	表面文飾				
配 偶 子 柄	形狀				
	大小				
	顏色				
保護枝有無：					
	長短				
	排列				
	分枝				

黑酵黴+及一所生接合子

黑酵黴之接合孢子

Z. moell. 之接合孢子



問 題

平常分離出的黑酵黴，不能形成接合孢子，原因何在？