

成都工学院图书馆
基本馆藏

350753

C. П. 科斯蒂切夫院士

微生物的生理学 生物化学著作集

卷 二



科学出版社

C. П. 科斯蒂切夫院士

微生物的生理学 生物化学著作集

卷 二

周 丰 译

科学出版社

1964

С. П. КОСТЫЧЕВ
ИЗБРАННЫЕ ТРУДЫ ПО ФИЗИОЛОГИИ И
БИОХИМИИ МИКРООРГАНИЗМОВ II

Изд. АН СССР, Москва, 1956

內 容 簡 介

本书是根据苏联科学院1956年出版的科斯蒂切夫院士微生物的生理学生物化学著作集譯出,共分两卷。卷一已出版,本卷包括下面三部分:(1)霉菌生理学与生物化学,計 18 篇,叙述青霉、黑麴霉和毛霉等的試驗和研究結果;(2)微生物学的一般問題,計两大篇,叙述生命的起源和微生物学对人类的意义;(3)土壤細菌与乳酸細菌生理学,計 17 篇,叙述了有关土壤中細菌的試驗和研究結果。

本书可供微生物学、生物化学、土壤学和农学等方面的研究工作者和教学工作参考。

С. П. 科斯蒂切夫院士
微生物的生理学
生物化学著作集

卷 二

周 丰 譯

*

科学出版社出版 (北京朝陽門大街 117 号)

北京市书刊出版业营业許可証出字第 061 号

中国科学院印刷厂印刷 新华书店总經售

*

1964 年 3 月第 一 版 书号: 2862 字数: 601,000

1964 年 3 月第一次印刷 开本: 787×1092 1/18

(京) 0001—2,600 印张: 25 2/9 插頁: 2

定价: [科七] 3.50 元

目 录

霉菌生理学与生物化学

論灰綠青霉 (<i>Penicillium glaucum</i>) 的分子內呼吸	1
营养物質在霉菌缺氧呼吸时的意义	5
論霉菌的呼吸酶	23
关于毛霉的呼吸作用与酒精发酵的研究	30
論缺糖时的正常呼吸与缺氧呼吸	53
論黑麴霉 (<i>Aspergillus niger</i>) 的酒精发酵	73
論无酒精形成时的缺氧呼吸	78
氫气在真菌呼吸时的产生問題	81
霉菌的营养物質在缺氧时的轉化	89
非糖类物質在霉菌体内形成糖类	103
需氧性霉菌在缺氧时引起糖类的轉化	110
霉菌同化分子态氮問題	116
論总状毛霉 (<i>Mucor racemosus</i>) 的轉化酶	119
霉菌使硝酸盐和亚硝酸盐轉化	121
霉菌同化硝酸盐	138
黑麴霉 (<i>Aspergillus niger</i>) 产生柠檬酸和草酸	142
用生物化学方法制造柠檬酸	158
关于查明生物化学方法生产柠檬酸的工厂試驗装置条件方面的实验研究工作 的结果	186

微生物学的一般問題

論生命在地球上的出現	206
微生物学及其对人类的意义	230

土壤細菌与乳酸細菌生理学

大气中的氮的固定作用的产物	329
对固氮細菌还原硝酸盐的进一步的研究	331
土壤生物动态研究: I. 引言	333
土壤生物动态研究: II. 南方土壤的微生物学特征	335
土壤生物动态研究: III. 土壤肥力的生物学因素的統計方法	366

土壤生物动态研究: IV. 克拉斯諾达尔实验烟草栽培研究所在阿秉鎮的試驗

田的土壤的微生物学特征.....	376
对微生物活跃固氮細菌(<i>Azotobacter agile</i>)固定分子态氮的化学研究.....	383
微生物在土壤中的重量含量.....	398
亚硝酸是固氮細菌还原硝酸盐的中間产物.....	402
农业微生物学分部概况.....	404
布哈拉硝石层的土壤中的氮的矿質化和硝化作用.....	410
农业微生物学分部关于土壤动态的研究工作中的农业化学性質的結論.....	417
固氮細菌对固定大气中的氮和形成氨的作用.....	422
論乳酸細菌的呼吸作用.....	430
丙酮酸和丙酮醛是乳酸发酵过程的中間产物.....	432
丙酮酸在乳酸发酵时的形成.....	435
用乳清制造乳酸.....	439
人名对照表.....	449

霉菌生理学与生物化学

論灰綠青霉(*PENICILLIUM GLAUCUM*) 的分子內呼吸¹⁾

在 1893 年出版的“圣彼得堡自然科学家协会論文集”里,刊载了賈柯諾夫 (Н. Дяконов) 的著作“生活基質的典型代表”(Типичные представители жизненного субстрата, 1893)。賈柯諾夫在这个著作里研究霉菌对无氧环境的关系时候,得出了下述的結論:霉菌可以依照其对无氧环境的关系而分成两类:第一类的代表(典型代表是匍枝毛霉 *Mucor stolonifer*)能够在缺乏游离氧时繼續生存相当长的一段时间;第二类的代表(典型代表是灰綠青霉 *Penicillium glaucum* 和黑麴霉 *Aspergillus niger*)則始終不能从正常呼吸轉变成分子內呼吸*;在除去这些有机体的周围空气里的全部氧时候,即使在基質里含有数量充足的糖,它們的生命活动也随着同时停止。

賈柯諾夫的这些結論是有些出于意外的,因为在他的著作发表以前,大家認為一切植物有机体都毫无例外地能够在无氧环境里多少生存一段时间。可是应当指出,虽然有关分子內呼吸方面的文献很丰富,但是我們发现其中关于真菌有机体的研究著作却并不多;在賈柯諾夫的这个著作发表以前,关于这个問題方面总共只有下面几位科学家的研究著作。

巴斯德 (Pasteur, 1872, 1876) 进行了一系列关于青霉(*Penicillium*)、麴霉 (*Aspergillus*) 和毛霉 (*Mucor*) 在糖溶液中的試驗,并且能够确定酒精在一切霉菌受到缺氧的情况下形成。这些試驗是在当时尽可能的精密处理下进行的;巴斯德为了要証明霉菌不可能轉变成酵母菌的目的而着手进行了这些試驗。

布兰斐尔特 (Brefeld, 1876) 研究了糖在各种植物有机体的影响下形成酒精的情形;在这些有机体当中,有真菌的醭酵母 (*Mycoderma*)、毛霉 (*Mucor*)、粉孢霉 (*Oidium*) 和青霉 (*Penicillium*)。所有这些有机体都能够在无氧环境里把某些(有时极其少的)数量的糖轉变成酒精。

繆茨 (Müntz, 1876) 对各种伞菌方面进行了类似的試驗,并且时常能够发现酒精的形成。

賈柯諾夫 (1886) 研究了青霉 (*Penicillium*)、麴霉 (*Aspergillus*) 和毛霉 (*Mucor*) 的分子內呼吸,并且証明:只有在基質含有糖 (葡萄糖) 的情形下,这些有机体才能够在

1) “圣彼得堡自然科学家协会論文集”,會議記錄,第 30 卷,第 1 期,第 120 頁,1899 年。

* 分子內呼吸 (Интрамолекулярное дыхание) 或称缺氧呼吸 (анаэробное дыхание)——譯者注。

缺乏游离氧时生存下去。賈柯諾夫在他的第二篇著作里(參看前面的叙述),承認这些結果是不正确的。

可以看出,所有上述各个学者都得出了一些彼此相符的結論,它們和賈柯諾夫在他的第二篇著作里所断定的說法相矛盾;可是,对賈柯諾夫的后来的結論有利的一点,就是他的研究方法的精确度很高。

因此,問題还是没有搞明白,而且必須再作进一步的实验研究工作,才有解决这个問題的可能;这也激发我依照伊万諾夫斯基教授的建議,去着手重复进行賈柯諾夫的試驗。

我的一切試驗都是用灰綠青霉(*Penicillium glaucum*)来做的,并且得出結論如下:把青霉(*Penicillium*)的純粹培养物密閉在有营养液的烧瓶里;同时,这种霉菌在逐漸地消除去它所能支配的氧以后,就在周围空气的組成无显著变化的情况下轉入缺氧的生活状态。

把这些密閉的培养物放置在恆温箱里,处在固定温度 25° 或 30°C 下;每經一定時間,用气体分析法进行不同培养物的呼吸系数的測定。把那些尚未耗用完自己的含氧量的培养物的呼吸系数,去和这些已經处在无氧环境里一段時間的培养物的呼吸系数作比較;根据这方面的比較結果而作了一些結論。我在这方面应用了碘仿形成反应,只是从定性分析方面发现有酒精的存在。在我的試驗里,所用的营养液是罗林氏盐溶液(liquide Raulin);在第一組試驗里,含糖量相符于罗林氏标准溶液(大約 4.5%);在第二組試驗里,含糖量增加到 9%。借助于庞內(Бонье)与孟純(Манжэн)式仪器,进行了主要的分析工作,因为过去許多次这类分析的結果使我完全相信这种仪器的精确性;不过,为了使所得的資料更加确实可靠起見,对每种气体的分析都进行了几次。

現在开始叙述这次分析的資料时候,我認为只要举出其中少数的数字来就够了,因为它們提供完全一致的結果;同时我又看出,在全部第一組試驗里, CO_2/O_2 的比值在霉菌的正常呼吸时,都显著地小于 1;在第二組試驗里,由于含糖量的增高, CO_2/O_2 的比值对于正常呼吸方面就增加,并且开始等于 1。

現在就举出这些試驗的結果如下。

第一組試驗(含糖量 4.5%)

試 驗 1

培养物在 1898 年 10 月 4 日被密閉。10 月 5 日取出气体作分析。試驗所經時間是 1 天。

气体分析	
CO_2	$= 6.31\%$
O_2	$= 12.68\%$
N_2	$= 81.01\%$
$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$	$= 0.716$

試 驗 6

培养物在 10 月 12 日被密閉。10 月 18 日取出气体作分析。試驗所經時間是 6 天。

$$\begin{array}{l} \text{气体分析} \\ \text{CO}_2 = 28.58\% \\ \text{O}_2 = 1.14\% \\ \text{N}_2 = 70.28\% \\ \hline \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 1.633 \end{array}$$

試 驗 9

培养物在 10 月 27 日被密閉。11 月 7 日取出气体作分析。試驗所經時間是 10 天。

$$\begin{array}{l} \text{气体分析} \\ \text{CO}_2 = 24.35\% \\ \text{O}_2 = 0.0\% \\ \text{N}_2 = 75.65\% \\ \hline \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 1.213 \end{array}$$

第二組試驗(含糖量 9%)

試 驗 15

培养物在 12 月 25 日被密閉。12 月 26 日取出气体作分析。試驗所經時間是 1 天。

$$\begin{array}{l} \text{气体分析} \\ \text{CO}_2 = 7.18\% \\ \text{O}_2 = 13.71\% \\ \text{N}_2 = 79.11\% \\ \hline \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 0.989 \end{array}$$

試 驗 13

培养物在 12 月 6 日被密閉。12 月 9 日取出气体作分析。試驗所經時間是 3 天 (69 小时)。

$$\begin{array}{l} \text{气体分析} \\ \text{CO}_2 = 28.10\% \\ \text{O}_2 = \text{痕迹} \\ \text{N}_2 = 71.90\% \\ \hline \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 1.474 \end{array}$$

試 驗 16

培养物在 12 月 6 日被密閉。12 月 28 日取出气体作分析。試驗所經时间是 22 天。

$$\begin{array}{r} \text{气体分析} \\ \text{CO}_2 = 26.25\% \\ \text{O}_2 = 0.00\% \\ \text{N}_2 = 73.75\% \\ \hline \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 1.345 \end{array}$$

我根据自己的試驗所得出的結論,可以归納如下:

(1) 在缺氧时,灰綠青霉(*Penicillium glaucum*)能够从正常呼吸轉变成分子內呼吸,同时 CO_2/O_2 的数值增加,而在基質里可以發現酒精出現情形。

(2) 青霉(*Penicillium*)在密閉的空間內的不需氧呼吸是微弱的,并且总共只能繼續进行几天;在过了这几天以后, CO_2 就不再分离出来,而这种霉菌就趋于死亡。

(3) 在青霉分子內呼吸时, CO_2/O_2 的数值很显著地依培养物的发育強弱为轉移。

(4) 在还有游离氧存在时,但是当这种气体的分压开始不足以維持青霉的正常呼吸代謝时候,这种霉菌就已經开始进行分子內呼吸。

这些結論和賈柯諾夫的結果不相符的情形是明显可見的,但是我暂时还难以解释这种不相符情形,主要因为賈柯諾夫在“圣彼得堡自然科学家协会論文集”里所发表的报告过于簡短。現在只举出一点如下:我以为,在賈柯諾夫的試驗里, CO_2/O_2 的数值对于青霉的正常呼吸方面(就是 $\text{CO}_2/\text{O}_2 = 1.216$),好象对含糖基質的培养物說来是太大了些。

在結束語里,我認为应当指出,我在这里报告我的上述試驗結果时,希望能用它們来辯护賈柯諾夫在“柏林植物学杂志”(Ber. D. Bot. Ges.) (1886)里所发表的第一个著作的結論,因为这个最卓越的研究著作显然最正确地說明了植物有机体对无氧环境的关系¹⁾。

参 考 文 献

- Диаконов Н. Ber. D. Bot. Ges., Bd. IV, S. 1, 1886; Труды СПб. об-ва естествоисп., стр. 1, 1893.
Brefeld. Über Gährung. Landwirtsch. Jahrb., Bd. 5, S. 687, 1876.
Müntz. C. R. Ac. Sci., t. 80, 1875; Ann. Chim. et Phys., t. 8, p. 56, V sér., 1876.
Pasteur L. C. Ac. Sci., t. 1872; Etudes sur la bière, p. 258, Paris, 1876.

1) 帕拉金(В. Палладин)在高等植物方面的研究結果,已經証实賈柯諾夫的这个著作的結論(“哈尔科夫大学自然科学家协会論文集”,第 11 頁, 1894)。

营养物质在霉菌缺氧呼吸时的意义¹⁾

由于巴斯德的著作发表而在我们面前展现出一幅庄严的厌氧生活图景，从那时候起，对科学研究就出现了完全新的领域。从这时候起，在这方面进行了许多切实的和精密的研究工作；如果要用不多的文字来说明这些研究工作的主导方向，那么就可以用下面的原理来表达出这个说明：氧对生活有机体的意义在逐渐缩小，因为我们可以把氧从生活机能的强大因素的作用贬低到这样一种外界条件的程度，就是氧的多少就只能改变这种有机体或多或少的适应性罢了。

实际上，我们现在已经知道，有许多有机体，它们完全不需游离氧，也能够顺利发育和增殖；不但这样，还存在着一类“专一性的厌氧菌”，氧甚至对它们绝对有害；我们可以看到，从这些具有十分特殊的适应性的有机体起直到那些要靠典型的需氧呼吸来维持自己生存的真正喜氧性有机体为止，中间还有大批逐步过渡的有机体。

如果我们来谈到喜氧性有机体，那么可以看到，氧的缺乏并不引起它们直接死亡；实际上，过去大家所知的一切植物有机体，都能够在无氧环境里生存一段不太长的时间；这段时间有几小时到几天，依从处在这里面的有机体的特性而定。植物处在这种剧烈改变的生存条件下，仍旧继续析出碳酸气，这种情形也就是它们的生活力的标准；最近有人认为，这种所谓“分子内呼吸”的碳酸气析出过程，就是喜氧性有机体在无氧环境里的唯一生活机能。巴斯德第一个认为这种现象具有意义（Pasteur, 1876），并且解释这种现象是第一次还没有完善的、借助于呼吸过程的变更方法而对无氧生存的适应企图。自然可知，这个有兴味的假定引起了科学家们对分子内呼吸过程的注意；在巴斯德以前，这个过程还完全没有被人探究过；结果，现在就有了关于这个问题的研究工作的丰富的文献。

在这里，还不可能对所有这些研究工作进行详细的考察，这会使我这篇论文变得过于冗长；因此，我只限于对其中几个研究工作进行简短的评述，因为它们和我自己在这个使我们感到兴趣的问题方面的研究工作有直接的关系。

巴斯德(1876)和他的学生布兰斐尔特、缪茨(Brefeld, 1876; Müntz, 1876, 1878)等的著作，确定了在植物有机体中间广泛存在着分子内呼吸的事实；还有一些研究工作——主要是威尔生(Wilson, 1882)和普费伊费尔(Pfeffer, 1885)的研究工作——证明，植物在无氧环境里析出碳酸气的情形，并不是偶然的、病理的、和有机体组织的死亡与分解有关的现象；在上述这些科学家的研究以后，就有许多学者极其详细地研究了这个过程的实际方面和它对外界条件的依存关系。我们在把他们所获得的一切

1)“实验农学杂志”(Журн. опытной агрономии), 第5卷, 第580页, 1901年。

結果進行比較以後，就應該承認，分子內呼吸是一種不同于正常的有氧呼吸的過程；因此，正象普費伊費爾所公正地推斷的說法，現在我們還必須去解決下述問題：分子內呼吸是不是完全(sui generis)的過程，就是說這種過程的起因是和缺氧生存的条件有最密切的聯繫，或者是相同的起因在支配着分子內呼吸和正常呼吸兩個過程。顯然可見，為了要順利地達到這個困難問題的解決，就必須尽可能深入認識這兩個過程的化學作用方面的差異；我以為，在同時進行呼吸和營養的研究工作時候，就可以最方便地探究呼吸過程的化學作用。

第一個提出把分子內呼吸的化學作用問題去聯繫營養而進行研究的研究者，就是已故的賈柯諾夫(1886)；他進行了那些處在不同營養源的無氧環境里的霉菌的研究工作。賈柯諾夫的結論如下：只有糖（葡萄糖）才能用來維持喜氧性有機體的分子內呼吸；因此，依照賈柯諾夫的說法，這個過程本身原來是和通常的酒精發酵相同的。在霉菌中間，從典型的喜氧性有機體（例如青霉 *Penicillium*）起，到酵母菌這些專門具有發酵作用的有機體為止，存在着許多逐漸過渡的有機體；這種情形好像証實了這個結論的正確性。除此以外，賈柯諾夫的試驗，是在假定氧的缺乏是引起酒精發酵的因素的情形下進行的，所以賈柯諾夫的結論就好像是巴斯德關於分子內呼吸的作用方面的思想的直接繼續（參閱上面所述）。

不必驚奇，賈柯諾夫的結論很快就傳播開來了；根據這些結論，普費伊費爾所提出的兩者擇一的難題（參閱前面所述），往往就被認為已經可以從它的第一種說法來解決，就是：分子內呼吸是完全(sui generis)的過程，而和需氧過程毫無共同之點。可惜，賈柯諾夫錯過了研究有關分子內呼吸方面的幾種良好的營養物質的機會。

除了這個多少已經公認的理論以外，現在還有第特梅爾(Detmer)的“離解”理論。依照這個理論，分子內呼吸只能靠了蛋白質所分解的無氮產物來進行下去；只有現成的蛋白質化合物才能發生分解；如果同時也發生蛋白質的再生作用，那麼這種作用也很微小，決不能去和蛋白質的分解相平衡，而且我們也不能覺察到它。這種意見已經相當接近於那種以為分子內呼吸是病理過程的見解，就是回復到以前對這種現象的陳舊看法；可是，這種理論是和帕拉金(В. Палладин, 1884)的研究工作發生矛盾的；帕拉金的研究工作，要比這些用來證明第特梅爾的觀點的研究工作進行得更加早。在迄今所作出的一切關於這方面的結論當中，要算帕拉金的結論最能符合於對現象的真實解釋；他的結論可以歸納如下：

(1) 在植物體內還含有碳水化合物時候，不能觀察到蛋白質在無氧環境里的分解情形。如果也發生分解，那麼這種分解就被蛋白質依靠碳水化合物而進行的再生作用來抵消了。

(2) 只有在碳水化合物已經被完全耗用去以後，蛋白質才能開始發生分解；同時不同于有氧時的情形，產生出不同的分解產物來：天門冬酰胺形成得極少，但是產生了大量酪氨酸和白氨酸。我們可以看出，這些結論証實了賈柯諾夫所指出的碳水化合物的作用，但是限定了分子內呼吸專門依賴於三元化合物。

克拉烏遜(Clausen, 1890)的研究工作，尤其是齊根別英(Ziegenbein, 1894)的研

究工作,是用来証明第特梅尔(Detmer, 1892) 的观点的,十分清楚地說明了蛋白質在无氧环境里的分解和酰胺与氨基酸的形成,但是这些研究家沒有証明上述的碳水化合物的作用。可是,帕拉金(1886, 1894)着手进行了这方面的新的研究工作,而且也用这些研究工作来証明了碳水化合物对分子内呼吸方面的意义。这些对高等植物的幼苗方面所做的試驗証明:如果在把黃化叶子放置到无氧环境中以前,預先把它們放在糖溶液里一些時間,那么它們分子内呼吸的能量就大大增高。除此以外,在研究幼根的呼吸时候查明,这种过程是和无氧环境中糖类物質比在通气良好的条件下被消耗得更多的情形有关的;大家知道,发酵过程的特征,正就是糖类物質被大量消耗。

我以为,从全部上述的情形里可以断定,第特梅尔的理论不符合于现实情况,只有在增加許多完全不同于它的原意的限制和补充条件以后才可以被采用。我再回头来講到公認的理论(就是认为酒精发酵是一种严格无氧的、而且主要是在缺氧条件下唯一代替喜氧性有机体的有氧呼吸的过程),同时也应该說明,因为这种見解在它发展的时候就很接近于真实情况,所以当时虽然实际的根据极少,只限于賈柯諾夫的上述研究工作,但是它就已经被人采用了。我在上面所提出的一切其他的研究工作,都不可能用来証实或者限制賈柯諾夫的結論,因为这些研究工作是用高等植物来做的;而这些植物极少依从基質为轉移、含有貯藏物質并且它們体内所发生的过程也很复杂,所以它們对研究呼吸过程和营养的关系方面說来是較不适用的試驗对象。可是,过去差不多还没有那些和賈柯諾夫的試驗目的有相同而且也是用最簡單的有机体来进行的研究工作。只有胡佳柯夫(Н. Худяков, 1894)的試驗才可以被間接归納于这一方面;这些試驗是用酵母来做的,并且証明:在无氧环境里和在缺糖时,酵母完全不析出碳酸气来;因此,酵母的“自体发酵”(Selbstgährung)的情形并不存在。可是,这一类結果是和我们以許多研究工作为根据而构成的关于“自体发酵”的观念相冲突的。除此以外,胡佳柯夫的試驗本身还不足以使人信服,因为在有些情况下已经观察到碳酸气在上述条件下析出的情形,所以也未必可以时常同意这位作者关于这些冲突情形方面的解释。

现在再举出斯密斯(Smith, 1895)对細菌方面所做的試驗工作。这位作者得出結論說,任何細菌,甚至严格的厌氧性細菌,在缺糖的无氧环境里都不能发育下去。

我以为不必再进一步去进行这个結論方面的論断,我举出它来的目的,只是为了要去說明:成見对于占有优势的分子内呼吸理论的采用和传播方面起着多大的影响。

我以为,虽然占有优势的理论的实际根据还不足够,但是賈柯諾夫的試驗是被十分正确地考虑过和提出来的;关于这一点,我不会遇到反駁。賈柯諾夫所确定的碳水化合物的作用,是极有价值的科学成果;因此,他的試驗只能容許我在上面所指出的点批評,就是:他的研究方面所用的营养物質的种数不多。

我把自已亲手做的試驗布置如下:要在这些試驗里研究呼吸过程时候联系到营养方面。起初,我規定了一个范围比較小的目的,就是:去研究营养物質的数量对分子内呼吸的能量的影响。可是,随着我进行自己的研究工作的进度,我确信还必须把决定性質方面的試驗去和它結合起来,因为我看出,这些对我的研究对象占有优势的

观点的基础,变得愈来愈明显地动摇起来。可惜,我决不能认为自己的研究工作是已经完美的,所以也就想来着重指出,在现在这篇论文里,因为后来限于环境而使我不得不中断自己的工作,所以只能举出我已经获得的最主要的结果来;可是,将来我还打算继续进行自己的工作,而它们的目的不仅要进一步去实际证实这篇论文里所已经发表的结论,而且也要去解释那些现在还不能谈到的或者只能以多少可能的假设的形式来谈到的问题。

我选取霉菌作为自己试验的对象,并且只限于黑麴霉(*Aspergillus niger*)和匍枝毛霉(*Mucor stolonifer*)的菌丝体方面。现在我应当承认,第一种有机体选取得不十分成功,因为它对基质的依赖关系,并没有象同类试验中所能期望的那样,而且的确也不能象匍枝毛霉所具有的情形那样充分和专一性。弗列罗夫(А. Флеров, 1899)在一个关于真菌呼吸的重要著作里,把真菌有机体分成两类:第一类真菌完全依赖于基质,毛霉就是其中特别显著的代表;基质的变化就以使人难信的速度对呼吸起影响:在有几次试验里,经过10分钟就起影响。第二类真菌对基质的变化发生缓慢和微弱的反应。其中有黑麴霉(*Aspergillus niger*),它没有被弗列罗夫研究过,但是我却确信,这种有机体好象是这两类真菌的过渡阶段的有机体。这个关于麴霉(*Aspergillus*)的结论,是我在已经进行了大部分自己的试验以后方才得出的;可是,由于所得的结果彼此相合,而且也和那些对毛霉(*Mucor*)的试验方面所获得的结果相符,这就使我不得不认为它具有意义。

在我的试验的布置方面,也象在一切类似的试验的布置方面一样,所发生的最大困难就在于:我以为,不可能去研究不同基质对某一试验对象的影响,因为在这类情况下,试验所需的时间就会太长,因而试验对象在试验开头和结束时刻就会处在极不相同的条件里:大家知道,对于象麴霉这种有机体,只要它处在无氧环境里不多几个小时,就已经会受到伤害。我就努力设法采用下述的预防办法,尽可能去消除这些对不同培养物的实验方面的不方便情形:首先,我设法在尽可能不同的条件下进行自己的试验。我把自己的一切培养物都培养在一种基质里;这种基质就是依照罗林的方法所配制的糖和无机盐的溶液。罗林(Raulin, 1870)改进了自己的溶液里的营养物质的配合方法,达到如下的程度:获得了麴霉的那些在外形上和重量上非常相同的培养物;差不多观察不出它的不同菌丝体有彼此不同的个体上的特征。我时常使用相同数量的营养液(100毫升),使用同样的形状和容量的培养容器,同时还用同一种培养物接种在全部这些容器里,此后又把它们放置在固定温度的恒温箱里,结果总是成功地达到上述的这种效果。自然可知,在接种以前,要先把营养液放在消毒蒸锅里仔细地杀菌;接种手续要在已无菌的环境里和用纯粹培养物来进行;同时,要用那些尽可能同样紧密的棉球瓶塞来封闭已经接种过的烧瓶,以便使培养物处在同样的通气条件下。在遵守一切上述的预防办法以后,我的培养物就完全同时一起萌发、发育并且形成子实体;显然无疑,在上述一切试验里,培养物都是纯粹的。所有上述的情形不仅是关于麴霉方面的,而且也是关于毛霉(*Mucor*)方面的;罗林氏溶液对毛霉是极其适宜的基质。在这里可以顺便指出,在贾柯诺夫的试验里,培养物决不是时常处

在正常状态里的;在閱讀了他的論文以后,就会怀疑到这一点。

我經常遵守的第二个条件,就是要专门根据同时做的平行試驗来作結論;我为了适合于这个目的,就同时設立四个平行試驗。

試驗的进行經過可以归納如下:我选取大型三角瓶作为培养容器,每只三角瓶的容量是 500 毫升。在把所需研究的霉菌的孢子接种在好几只这种三角瓶里以后,我就等待培养物发育,并且选定了那个紧接着孢子形成以前的发育时刻,来进行麴霉 (*Aspergillus*) 的實驗。至于說到那种迅速接近子实形成期而且同时繼續发育下去的毛霉 (*Mucor*), 那么我在全部基質表面都被这种霉菌的菌絲体所布滿的时期,去进行它的實驗。在培养物达到上述的龄期时,我就拣选出 4 瓶或 5 瓶外表上最相同的培养物,并且开始去改变它們的营养液。对于这种和基質有密切联系的匍枝毛霉 (*Mucor stolonifer*) 方面,这种手續毫不复杂;可以使人十分相信,在溶液更新以后經過一小时,就已經显現出它們的影响来。关于黑麴霉 (*Aspergillus niger*) 方面,我还不能有同样的确信,因此在不同的試驗里用三种方法来略为变化地更換溶液:在第一种情形里,在更換溶液以后經過 2 小时或 3 小时,我就去进行試驗;在第二种情形里,在更換溶液以后經過 18—20 小时才进行試驗;最后在第三种情形里,我把培养物放置在蒸餾水里經過不同的時間,此后再用营养液去代替蒸餾水。在倒进新的溶液以前,我在除去旧的溶液以后,就用已經灭菌的蒸餾水冲洗培养物几次。虽然我已經有可能在杀菌过的环境里进行更換溶液和冲洗的工作,但是我以为,不必推广应用这种操作,因为这种預防本身簡直还是多余的:在短暫的試驗時間里,即使有其他有机体的孢子落进培养物里,那么这些有机体也来不及发育起来。

在更換营养液以后經過一定時間,我就开始去把有培养物的三角瓶里的空气中的氧除去。在除氧时,我用双孔橡皮塞去代替棉球瓶塞。在每个橡皮塞的孔里都插进一根玻璃管:其中一根伸进烧瓶中达到将近菌絲体表面的不远处,而另一根則只到橡皮塞的下表面为止,不再伸进瓶內。在橡皮塞上面的相当高度处,把这两根玻璃管弯成直角,达到水平位置;此后,又再把它們向下弯成直角,达到鉛垂方向。在那根伸进瓶中的玻璃管的外端的下弯部分上,套上一根配有弹簧夹的厚橡皮管。这些橡皮塞都配装得可以被推进到三角瓶的瓶頸里去;在橡皮塞上面的瓶頸空間里,我倒进水銀,此后就用橡皮管把所有的三角瓶依次互相联結起来,使通过三角瓶的气流都先从那根伸进瓶內深处的玻璃管里进入瓶內,而經過另一根玻璃管向外流出。

为了使上述的三角瓶內获得无氧的空气,我就把氮流通进这些瓶里去;依照各种見解看来,我以为氮要比通常在这类状况所应用的氫較好些。我从亚硝酸鉀和氯化銨的饱和溶液(按当量比称取它們的重量以后加入)里获得氮;这种溶液被放置在圓底烧瓶里;只要用普通的本生灯的火焰稍微加热它,就会使它开始发生反应。当然,要小心对待反应,因为亚硝酸鉀和氯化銨的混合物有爆炸性;不过在予以应有的注意时候,不仅可以避免剧烈的反应,而且甚至可以依照實驗者的希望去調节气流。为了防备万一发生事故,在我的一切試驗里,都用水銀安全閥配装在这种用来获取氮的烧瓶上。这个方法所获得的氮,此后就通过一組圓管,以便清除其中夹杂的銨盐和氯的痕

迹:起初通过的圓管里装放浸过浓硫酸的浮石,此后則是碱石灰,而最后則通过德烈克謝尔(Drexel)氏煤气洗滌瓶,其中装有硫酸;只有到这时候,才把氮通进那些装放培养物的三角瓶里去;同时,我在全部这一套氮淨化器的最后一根玻璃管上,吹制一个玻璃球,并且把潮湿的滤紙充滿在球內,因为氮在淨化器里已經干透。在上述的条件下,氮就成为純粹的、完全不会含有氧的痕迹。依照賈柯諾夫和其他实验工作者們的說法,要使氮淨化而除去氧有多么大的困难。我还把一根耐火玻璃管連接在这套淨化器上,管内装有銅屑,并且把它們加热到赤紅,以便发现在通过的氮中是否还有氧的痕迹;可是,不久就相信这种預防办法是多余的,因为銅屑的顏色絲毫不发生变化。在我的試驗工作开头时,我曾經把烧瓶之間的橡皮連接管浸沒在水銀里;这个預防办法也是多余的。

氮气流的通入時間,总是要繼續到三角瓶內的空气中的氧的最后痕迹被完全排除为止;我每次用对照的气体分析方法來确信这一点;在停止氮气流通入以后,把每只三角瓶分开,并且用水銀密閉它們;同时,把三角瓶的一根玻璃管浸入水銀容器里,而把另一根和配装弹簧夹的橡皮管相連接的玻璃管浸在水銀里,使它的外露的垂直下弯的部分里充有相当高的一段水銀,然后用弹簧夹把这段水銀紧逼在管内。第一根玻璃管用来測定烧瓶內部的气压,而第二根玻璃管則用来截取气体試样。如果我提示出橡皮塞被水銀所填充,并且还补充說,我通常稍微稀释三角瓶內部的气体,那么就可以明白,我的三角瓶內部是可靠地和周围空气絕緣的。自然可知,在进行上面所述的一切操作时,都不許任何一个空气泡进入瓶中;只要有一种被实践所迅速获得的熟練的操作法,就可以达到这个目的。

在这种密閉的状态下,这些装有培养物的三角瓶就被放置在有固定温度的恆溫箱里;在經過一定時間以后,从所有这些装有培养物的三角瓶里截取气体試样;为了达到这个目的,就使用那根有橡皮管和弹簧夹的玻璃管,它可以极其方便地和气体吸移管連接起来。这种簡單的装置具有一种益处,就是在一次試驗期間里,可以几次截取气体試样,因为在每次从瓶里吸取去所需体积的气体以后,仍旧可以再把弹簧夹紧閉,并且再用水銀密閉玻璃管。借助于庞內与孟純式仪器,把获得的气体試样进行分析;这种仪器在分析工作只限于測定碳酸气的情况下使用,是极其方便的。在知道三角瓶內的全部气体的体积、它所处的压力和它所含有的碳酸气的百分数以后,就不难計算出霉菌的菌絲体在已知期間內所析出的全部碳酸气数量。在試驗結束以后,把霉菌干燥到固定重量,并且在精密天平上称重。从这个方法所获得的資料里,計算出霉菌分子內呼吸的能量,用干重1克的霉菌在0℃和气压760毫米时所析出的碳酸气的毫克数來表明这种能量。我没有用一定的時間单位去表明呼吸能量;首先这些数字恐怕是虛假的,因为大家知道,分子內呼吸并不是均匀地进行的,所以在每个单位時間里这种过程的能量就各有差异。計算出从霉菌被放置在无氧环境的时刻起到截取計算能量用的气体試样时刻为止的全部期間里的能量。在每次試驗里,通常从每只三角瓶里截取两次气体試样:第一次在試驗开始以后經過4—5小时截取;第二次則在經過20—24小时截取。关于黑麴霉(*Aspergillus niger*)方面的結論,差不多是

专门根据第一次气体試样的資料而作出的,因为根据多次初步試驗表明,这种有机体在无氧环境里經過 20 小时以后,已經决不是处在正常的状态,同时不同的培养物就受到程度不同的伤害;后面的数字通常只是被我用作下面一种情况的标准,就是:在截取第一批气体試样时,这种霉菌还是生活着的,而且此后仍旧繼續在析出碳酸气。

至于說到匍枝毛霉(*Mucor stolonifer*),那么初步試驗却相反地表明,这种培养物在被放置在无氧空气里以后几天里,仍旧是完全生活着的;相反地,在試驗开始以后經過几个小时,显然培养物还没有完全适应于新的生存条件,所以析出的碳酸气数量极微,这使結論变得有些动摇起来。可以看出,毛霉(*Mucor*)是一种比麴霉(*Aspergillus*)更加敏感的有机体。

从上述的情形中可以明白,我的各种不同時間的試驗所得的数字不能彼此进行比较,因为在不同情况下,我没有探查出一种使培养物处在氮中的時間完全相等的条件。可是,在我看来,这种不能把数字比較的情形没有任何意义,因为在进行我这类研究工作时,我本来就不要設法从这些不是平行的試驗里作出結論来。

在我的計算方面,唯一的誤差来源就是有一部分碳酸气溶解在培养物的液体基質里,不过已經从这种誤差的最大值的理論上的計算結果方面指出,它的数值不可能是显著的。为了用直接的試驗来确认这一点起見,我有几次去测定了这种溶解在我的培养用的三角瓶里的液体中的碳酸气。为了达到这个目的,把試驗用的液体在真空中沸騰;这种真空是借助于水銀抽气机的稀释作用而获得的。沸騰就用輕微加热三角瓶的方法来达到,并且一直繼續到气压計的压力不再增高的时候为止,不必去管它这时候还有很多气泡在从液体里分泌出来(沸騰的产物通过浓硫酸的表面上)。这些試驗的結果查明,溶解在液体里的碳酸气的数量总是微小,有时差不多还測定不出,而且無論如何决沒有达到那种依照理論計算而可能預料到的数值。因此,我就完全略去了溶解在基質里的碳酸气不計。

现在来叙述試驗的結果;在这里我并没有把全部結果举出来,并且打算把其余的結果留到将来我的研究工作結束时候再发表。可以补充說一下,为了研究营养物質的数量的影响,我把它以不同浓度的溶液状态来供应給我的培养物;我在用新的溶液去代替罗林氏营养基質时候,倒进每只烧瓶里的溶液数量,不是 100 毫升,而是 50 毫升。在研究营养物質的本性的影响时候,我决定只应用不多几种化合物,以便可以更加充分而且可靠地去研究它們。

霉菌的营养已經被极其清楚地研究过;我們知道,霉菌可以依靠各种不同的有机物来营养和呼吸;同时,也可以編出很长的表格,来表明这些物質在維持霉菌的生活机能方面有多少营养价值。我只使用了这种表里的价值最高的四种有机物,就是(依照次序排列):糖、蛋白腴、酒石酸和甘油。我把糖以葡萄糖形态供应給霉菌;我采用了商品蛋白腴,而且在研究它的时候只限于确认缺乏它所含的杂质糖这方面;商品蛋白腴可能含有其他杂质,它們会对我的反証的結論方面造成誤差。我所应用的酒石酸,不是它的游离状态,而是它的鉍盐;虽然霉菌很能忍受酸性反应,但是也有許多理由可以认为,在无氧环境里,这些有机体对毒害因素的感应性会強烈提高起来,因此

很強的酸性反应也会在这种情况下对它們絕對有害。同时,正象賈柯諾夫(1887)所已經指明的,銨盐形态的酒石酸能够被霉菌良好地吸收去;又因为在无氧环境里物质代謝作用較小,而試驗所經的时间也較短,所以基質的反应还来不及轉变成碱性反应。我和賈柯諾夫关于酒石酸对分子內呼吸的作用方面的結論有所不同;我偏愛認為这种不同原因就在于下述情况:賈柯諾夫的試驗里所用的游离的酒石酸,可能对試驗对象发生了有害的影响。

还有一个問題要加以考察,就是:在我的試驗里,营养溶液的改变是否能够对培养物发生影响;还有除了营养以外,例如由于渗透压的变化和与它有联系的涨压的变动,是否也能对培养物发生影响。因为已經有了爱申哈根(Eschenhagen, 1891)的試驗結果,所以我認為可以否認这种情况的意义。讀者們要想知道詳細情形,可以去閱讀爱申哈根的原著;在这里,我只限于提出一个意見,就是:这位作者肯定,霉菌对于渗透压及其变动有极大的忍耐性,因此正象在我的試驗里所发生的情形一样,在把霉菌从已經被培养过的罗林氏溶液中轉移到清水里去的时候,这种手續对它們的影响,比較它們在爱申哈根的試驗里无害地忍受的那些涨压的巨大变动方面看来,是十分微小的。除此以外,在更換溶液以后,到試驗开始时刻至少要經過二个小时;这段时间对于使培养物适应于新的条件方面已經足够,这是我根据下述情形而推断出来的:这些試驗的結果显出是和其他一些試驗的結果是相同的;而在后者的試驗里,更換溶液到試驗开始时所經過的一段時間,却更加长得多(18—20 小时)。

現在来談到試驗的記錄方面;羅馬字的号碼标明那些同时而且平行地进行的試驗。在所有下面那些沒有表明温度的試驗里,都是采用温度 29℃。分子內呼吸的能量(參閱前面所述),用字母 *I* 来表明。

I 匍枝毛霉

培养物在开始試驗以前已被放置在新溶液里 2 小时。温度是 30℃。試驗所經时间是 24 小时。

培养物	营 养 液	<i>I</i>	霉 菌 重 量(克)
1	蒸 餾 水	0 (CO ₂ 痕迹)	0.349
2	5%葡萄糖	165.5	0.339
3	5%蛋白胨	47.9	0.383
4	5%甘 油	0 (CO ₂ 痕迹)	0.374

II 匍枝毛霉

培养物已被放置在新溶液里 2 小时。試驗所經时间是 22 小时。

培养物	营 养 液	<i>I</i>	霉 菌 重 量(克)
5	蒸 餾 水	0 (CO ₂ 痕迹)	0.331
6	2%蛋白胨	44.2	0.365
7	5%蛋白胨	41.2	0.597
8	3%酒石酸銨	26.1	0.342