

应用微生物学实验法

方心芳 著



0-33

中国轻工业出版社

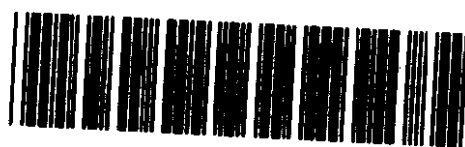
Q 939.9-33

FXF

Y413.2/15

应用微生物学实验法

方心芳 著



A0017783

中国轻工业出版社

(京)新登字034号

内 容 介 绍

本书系根据《应用微生物学实验法》(1962年出版)修订而成。全书共分三篇,第一篇为酵母实验法,包括有酵母实验51个,主要介绍对酵母认识、培养、分离和鉴别方法,以及酵母各种性能的测定和定向培育等。第二篇为霉菌实验法,内有霉菌实验45个,对曲霉、根霉、青霉的分离、鉴别、变异等均有详细介绍。第三篇为细菌实验法,共有细菌实验49个,对细菌的观察法、染色法、氧化作用、各种图形法和菌种保藏等均作扼要介绍。最后,还附有每篇的附录,分叙了培养基、染色液、指示剂、缓冲液等配制法。

本书可供微生物学研究人员、从事发酵工业的工作人员以及有关院校的师生参考。也可作为有关专业培训班的教材参考书。

应用微生物学实验法

方心芳 著

唐是雯 责任编辑

中国轻工业出版社出版

(北京市东长安街6号)

重庆新华印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

各地新华书店经售

850×1168毫米 1/32印张, 9.625字数: 204千字

1993年1月

第1版第1次印刷

印数: 1—5000

定价: 11.20元

ISBN 7-5019-1292-0/TS·0864

方心芳传略

方心芳先生1907年3月16日生于河南省临颖县一个乡村知识分子家庭中。早年就读于河南卫辉府(今河南汲县)法文学校和上海中法工业专科学校附中,1927年考入上海劳动大学农学院农艺化学系,1931年毕业后,到天津塘沽的黄海化学工业研究社发酵与菌学研究室任助理研究员。1935年在比利时鲁文大学的酿造专修科获酿造师称号。1936年分别在荷兰菌种保藏中心和法国巴黎大学研究根霉和酵母菌分类学,1937年在丹麦哥本哈根卡斯堡研究所研究酵母菌的生理学。抗日战争爆发,方心芳先生即中断了国外的学术活动赶回祖国,参加伟大的全民抗日救亡斗争。1938年1月他到重庆,开展了用甘蔗糖蜜生产酒精作为汽车能源的研究。1940年受中央技艺专科学校(乐山)聘请为农产制造科兼任教授,1946年兼任科主任。1947年任教授。1949年任黄海化学工业研究社副社长和研究员,领导该社的发酵研究室。1952年任中国科学院菌种保藏委员会秘书。1957年中国科学院北京微生物研究室成立后任副主任,1958年中国科学院微生物研究所成立,他被任命为副所长兼工业微生物学和地质微生物学两个研究室的主任。1979年他被任命为中国微生物菌种管理保藏委员会主任委员,1980年被选为中国科学院生物学部委员。

方心芳先生毕生从事工业微生物学的科学研究工作,发表论文近百篇,《应用微生物学实验法》是他根据自己亲身实践后编写的,至今仍有重要用途。他是我国最先应用现代微生物学研究传统发酵产品的先驱者之一。写出了关于我国制曲酿酒的第一批科学论文。在酵母菌和毛霉科的分类学、五倍子酸发酵生产、丙酮丁醇发酵研究和烷烃发酵生产长链二元酸等方面做出了突出的贡献。他主持和领导的科学研究成果先后获得国家发明三等奖、全

国科学大会奖、中国科学院重大科技成果奖。他创办过我国第一种发酵微生物学学术期刊《黄海发酵与菌学特刊》。在他的倡议和主持下，在我国微生物学科中，建立了诸如地质微生物学、霉腐微生物学等分支学科，开辟了甾体微生物转化等应用微生物学的新领域。为我国氨基酸工业和抗生素工业的创建及发展付出了辛勤的劳动，培养了一大批高级专业人才，对我国工业微生物学的发展具有深远的意义。他毕生重视微生物菌种的收集、研究、应用和开发，对我国微生物菌种保藏事业做出了卓越的贡献。

方心芳先生始终把国家和人民的急需作为他研究工作的主要出发点。人民的需要就是他的研究方向。他学风严谨、淡于名利，十分重视集体的力量，善于组织集体研究，充分发挥每个成员的特长，尤其注意队伍的稳定和继承。正如我国民族化学工业的拓荒者范旭东所说：“方心芳先生心目中的微生物，决不比一条牛小，他是一个忠实的牧童。”

1992年3月24日，我国现代微生物学的开拓者之一，国内外著名的工业微生物学家方心芳因病在北京逝世，享年85岁。

序

《应用微生物学实验法》曾于1951年和1962年分别由三联书店和中国财政经济出版社出版，由著名化学家曾昭伦先生和著名生物学家戴芳澜先生作了序。当时是微生物学者很受欢迎的一本著作，现都已把它作为珍品来收藏。已时隔近30年，广大读者纷纷要求再版，方老不顾年迈多病，又亲自对原著作了修改和补充，使该书更加完善，以满足微生物学者的需要，促进发酵工业的发展。现由中国轻工业出版社再版印行。

《应用微生物学实验法》受到大家珍视，不是偶然的。书中解说及实验法都是方老几十年来从事工业微生物学的实践经验，经得起重复试验，只要认真操作，定能得到满意的结果。若能把自己掌握的微生物学知识结合起来详加实验，并进行发酵生产，就更有把握成功。

方老是我国工业微生物学的开拓者之一。他是中国科学院生物学部委员，中国微生物菌种管理保藏委员会主任委员。自1931年开始研究发酵微生物学，60余载勤勤恳恳，辛苦耕耘，积累了丰富的经验，有关食品调味品如泡菜、腐乳、酱油、豉、醋、各地名酒等等的发酵微生物，他都潜心研究。他选育出来的生产用菌，全国应用几十年，创造了相当可观的经济效益和社会效益。

方老为河南省临颖县人，时刻惦记家乡建设，为家乡工业发展全力协助，作出了不少成绩。临颖县粮食局科研所成立以来，在方老的指导和关怀下，研究开发了多样工农业技术，特别是微生物发酵技术，粮办工业迅速崛起，产生了相当大的经济效益，很快跨入省市先进行列。实践使我们认识到科学技术是第一生产力，企业要发展，必须大力培养科技人才，进行科研开发，在科

技成果转化为工农生产力上大做文章。相信《应用微生物学实验法》的再版一定会对我们的科研工作有帮助，故乐于促其早日实现。

河南省粮食经济学会理事 张钦楹
河南省临颍县粮食局局长

1992年2月

序

发酵工业，在化学工业中，历史最久。但是几千年来，这方面的工业，始终停滞在一种手工业状态，而且经验成分多，科学成分少，大家墨守成法，知其然而不知其所以然。到了19世纪中叶，发酵工业在欧洲，方始逐渐步上科学化的大路。这方面的科学，便是应用微生物学。这种科学，由欧美传入日本，再由日本传入中国。其在中国工业上的应用，不过是近20年的事。国人精於此学者，寥寥无几。能拾他人糟粕，予以应用者，已算是人才。结果所至，我们连制酱油的新法，还是从日本人那里学来的。发酵工业的产品为人生日用所必需。在积极走上工业化的新中国，应用微生物学的研究，值得特别注意。

方心芳先生，在黄海化学工业研究社从事发酵工业的研究将近20年。对于微生物学，贡献不少。今以其个人经验，参考外国标准书籍，写成《应用微生物学实验法》一书，使有志於此者，得经由实验途径，学习这门学问，这是科学界一本极有价值的书，值得我们欢迎。

曾昭伦

1950年9月8日於北京

序

国人很早在医疗上，在酿造上，就已晓得利用微生物，不过已往单凭经验，知其当然不知其所以然，因此不能将获得经验提高一步，而得到发展。同时因我国长期处于封建制度之下，科学无法发展，也无提高一步的可能。国外自1857年巴斯德对于发酵的研究发表后，微生物学在西方国家工业中日趋重要。在第一及第二次世界大战中，利用微生物以补救营养中蛋白质的缺乏，或产生国防工业中的各种原料等，例子太多，不胜枚举，尤其抗生素的发现，在医疗上起了很大的作用。我国实行新民主主义经济建设，普及及提高微生物学的知识是很重要的。可惜国内关于此类书籍太少，有志于此道的人，简直无从问津。方心芳先生对于我国酿造事业研究有年，颇多创获，近著《应用微生物学实验法》一书。有志于酿造事业的人，从这本书里可以得到很大的帮助，并且对于我国将来酿造事业的发展也是有推动作用的。配合这本实验法，方先生能再写一本应用微生物学，那更是我们所欢迎的。

戴芳澜

北京农大1950年9月14日

目 录

第一篇 酵母实验法

酵母实验一	淀粉粒的观察.....	1
酵母实验二	酵母细胞的观察.....	2
酵母实验三	酵母细胞的染色.....	3
酵母实验四	淀粉粒与酵母细胞的区别.....	4
酵母实验五	酒曲的镜检.....	5
酵母实验六	酵母细胞死活的区别.....	6
酵母实验七	杀菌.....	7
酵母实验八	培养基的制备法.....	9
酵母实验九	红白二种酵母的分离.....	11
酵母实验十	酒曲中酵母的分离.....	12
酵母实验十一	酵母于麦芽汁中生长状况.....	13
酵母实验十二	酵母营养细胞的增殖法.....	15
酵母实验十三	麦芽汁或曲汁中酵母细胞形状及大小.....	16
酵母实验十四	斜面培养的菌落及细胞.....	17
酵母实验十五	酵母的假菌丝体.....	18
酵母实验十六	酵母巨大菌落.....	20
酵母实验十七	酵母细胞核的染色.....	21
酵母实验十八	酵母细胞内油脂的检定.....	22
酵母实验十九	酵母子囊孢子的生成.....	23
酵母实验二十	孢子发芽的观察.....	25
酵母实验二十一	掷孢酵母.....	26
酵母实验二十二	酵母生类胡萝卜色素的检定.....	27
酵母实验二十三	酵母对糖类的发酵.....	28

酵母实验二十四	酵母对糖类的氧化.....	30
酵母实验二十五	酵母对乙醇的利用.....	31
酵母实验二十六	酵母的氮素源营养料.....	32
酵母实验二十七	酵母的无机养料.....	33
酵母实验二十八	糖苷的分解.....	35
酵母实验二十九	明胶的液化.....	36
酵母实验三十	牛奶发酵.....	37
酵母实验三十一	酵母的鉴定.....	38
酵母实验三十二	定向培育.....	46
酵母实验三十三	分离培育法.....	47
酵母实验三十四	氧气与酵母生长的关系.....	49
酵母实验三十五	酵母生长素.....	51
酵母实验三十六	酵母生长温度极限.....	52
酵母实验三十七	酵母的死灭温度.....	53
酵母实验三十八	酵母生长发酵的酸碱值(pH)极限.....	55
酵母实验三十九	酵母活细胞数的测定.....	57
酵母实验四十	酵母的生殖曲线.....	59
酵母实验四十一	酵母培养液中氨基酸量的测定.....	62
酵母实验四十二	酵母的发酵力.....	63
酵母实验四十三	酵母忍耐酒精的浓度.....	66
酵母实验四十四	酵母的生酸量.....	67
酵母实验四十五	发酵最高温度.....	68
酵母实验四十六	酵母忍耐各酸的能力.....	70
酵母实验四十七	酵母忍耐食盐浓度.....	72
酵母实验四十八	酵母抵抗防腐剂的能力.....	73
酵母实验四十九	压榨酵母的发酵力.....	74
酵母实验五十	面包酵母的发面力.....	76
酵母实验五十一	酒曲中酵母的检定.....	77

第二篇 霉菌实验法

霉菌实验一	曲霉和青霉的分离.....	79
霉菌实验二	根霉的分离.....	80
霉菌实验三	红曲霉的分离.....	81
霉菌实验四	毛细管分离链隔孢法.....	83
霉菌实验五	毛霉, 杉样霉或小克银汉及根霉在各种 培养基上生长状况.....	84
霉菌实验六	接合孢子.....	85
霉菌实验七	根霉形态的观察.....	87
霉菌实验八	大毛霉及总状毛霉.....	89
霉菌实验九	梨头霉.....	91
霉菌实验十	二重皿培养青霉的菌落.....	92
霉菌实验十一	青霉的形态.....	94
霉菌实验十二	曲霉菌落及分生子穗.....	97
霉菌实验十三	子囊壳与菌核.....	99
霉菌实验十四	曲霉的形态.....	101
霉菌实验十五	黄曲霉.....	104
霉菌实验十六	黑曲霉类.....	106
霉菌实验十七	红曲霉.....	107
霉菌实验十八	载片培养白地霉.....	109
霉菌实验十九	玻璃纸培养侧芽霉.....	111
霉菌实验二十	链孢霉.....	112
霉菌实验二十一	灰色葡萄霉.....	114
霉菌实验二十二	红镰刀霉.....	115
霉菌实验二十三	绿褐霉.....	116
霉菌实验二十四	根霉的生长温度极限.....	117
霉菌实验二十五	根霉的发酵糖类.....	118
霉菌实验二十六	毛霉在牛奶及豆浆中的生长发酵现象.....	119

霉菌实验二十七	毛霉根霉的氮化合物养料	120
霉菌实验二十八	黑曲霉的养料	122
霉菌实验二十九	最少量养料限制率	124
霉菌实验三十	根霉的果胶酶	126
霉菌实验三十一	根霉的糊精化淀粉酶	126
霉菌实验三十二	根霉的糖化淀粉酶	128
霉菌实验三十三	曲霉的糖化淀粉酶的测定	131
霉菌实验三十四	曲霉的糊精化淀粉酶	135
霉菌实验三十五	曲霉的蛋白酶	136
霉菌实验三十六	各种霉菌生酸的质与量	138
霉菌实验三十七	霉菌生成葡萄糖酸的测定	141
霉菌实验三十八	霉菌生成柠檬酸的测定	142
霉菌实验三十九	黄曲霉生曲酸的证明	143
霉菌实验四十	黑曲霉的单宁酶	144
霉菌实验四十一	霉菌生长的节制	145
霉菌实验四十二	防霉剂的作用	147
霉菌实验四十三	霉菌的变异——有效特性的提高	148
霉菌实验四十四	曲霉的鉴定	149
霉菌实验四十五	小曲质量的测定	153

第三篇 细菌实验法

细菌实验一	植物浸液的观察	156
细菌实验二	一般细菌细胞形状观察法	157
细菌实验三	负染色法	159
细菌实验四	革蓝氏染色法	160
细菌实验五	孢子染色法	162
细菌实验六	荚膜染色法	163
细菌实验七	异染小粒的染色法	164
细菌实验八	细菌运动的观察	165

细菌实验九	鞭毛的染色	166
细菌实验十	缓冲剂	168
细菌实验十一	培养基酸碱值的调整	169
细菌实验十二	酸碱值对微生物的影响	172
细菌实验十三	氧气对细菌生长的影响	173
细菌实验十四	培养液氧化还原值(rH)的测定	175
细菌实验十五	硝酸盐的还原	177
细菌实验十六	渗透压对微生物生长的影响	179
细菌实验十七	表面张力对微生物的影响	181
细菌实验十八	细菌对糖、醇及糖苷的利用	182
细菌实验十九	淀粉被水解的证明	185
细菌实验二十	油脂的分解	187
细菌实验二十一	明胶的利用	188
细菌实验二十二	细菌对牛奶的作用	189
细菌实验二十三	靛基质生成的证明	191
细菌实验二十四	V. P. 反应	192
细菌实验二十五	硫化氢的生成	194
细菌实验二十六	尿素酶	195
细菌实验二十七	过氧化氢酶的生成	196
细菌实验二十八	细菌生色素的观察	197
细菌实验二十九	生长图形法	198
细菌实验三十	细菌的氧化作用	200
细菌实验三十一	氧化图形法测定微生物的氧化作用	203
细菌实验三十二	水解图形法	206
细菌实验三十三	杀菌药	208
细菌实验三十四	重金属的微动作用	211
细菌实验三十五	枯草菌	212
细菌实验三十六	浸麻孢子杆菌生成结晶糊精	213
细菌实验三十七	醋菌	215

细菌实验三十八	海宝	218
细菌实验三十九	葡萄糖酸菌的选种	219
细菌实验四十	清凉茶糖发酵	220
细菌实验四十一	大肠菌群细菌分离法	222
细菌实验四十二	乳酸菌	224
细菌实验四十三	德氏乳杆菌	228
细菌实验四十四	丙酸菌	230
细菌实验四十五	厌氧细菌分离法	232
细菌实验四十六	酪酸菌	234
细菌实验四十七	丙酮丁醇菌的分离与选种	236
细菌实验四十八	果胶分解发酵菌	240
细菌实验四十九	菌种的保藏	242

第一篇 附 录

附录1	显微镜	245
附录2	培养基	248
附录3	染色液	252
附录4	指示剂及缓冲液	254
附录5	相对密度换算表	256

第二篇 附 录

附录1	培养基	257
附录2	制备标本液	266
附录3	缓冲液	267
附录4	恒湿药品	268
附录5	试剂	270

第三篇 附 录

附录1	培养基	272
-----	-----------	-----

附录2	染色液.....	280
附录3	缓冲液.....	283
附录4	指示剂及试剂.....	283
附录5	丁酸钙及乙酸钙溶解度与温度的关系.....	290

第一篇 酵母实验法

酵母实验一

淀粉粒的观察

(一) 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才能看到的生物，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。

(二) 材料

1. 显微镜(Microscope)。2. 载片(Slides)。3. 盖片(Cover glasses)。4. 刘歇氏碘液(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。

(三) 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