

大學叢書

實用微生物學實驗

陳 騷 聲 著

商務印書館出版

74

大學叢書

實用微生物學實驗

陳駒聲著

商務印書館出版

命(353724.5)

大學叢書 實用微生物學實驗

★版權所有★

著 作 者 陳 駒 聲

出 版 者 商 務 印 書 館

上海河南中路二一一號

發 行 者 中國圖書發行公司

三聯 中華 商務 開明 聯受聯合組織

北京說線胡同六十六號

發 行 所 三聯書店 中華書局
商務印書館 開明書店
聯管書店 各地分店

印 刷 者 商務印書館印刷廠

1951年11月初版 定價人民幣17,000元

(滬)1-2000

自序

微生物之發酵作用，至爲微妙，可以生成各種化合物，以供工業上之用途；而其發酵效率如何，則與微生物之種類，極有關係。換言之，微生物之選取，實爲發酵工業最重要之工作。其選取方法：第一步，爲培養基之調製；第二步，爲微生物之分離培養；第三步，爲微生物之鏡檢及生理研究。然後方能確定其名稱，及其功用。本書即就上述次序，編成實驗八十一種，可供大學教程及一般從事實用微生物學者之實習指導。惟倉卒付梓，謬誤在所不免，惟希海內同志，予以批評指正！

本書之編輯，承王逸卿、馮鎮二君校閱一遍，馬奔、胡元吉、顧善揚諸君熱心協助，附此誌謝。

一九五一年八月陳駒聲(陶心)於江南大學

目 錄

自序

編輯凡例

微生物實驗室內應注意事項	1
第一章 滅菌及培養基	3
實驗一 滅菌	3
實驗二 麥芽汁及麥芽汁瓊脂之製備	6
實驗三 酵母水之製備	7
實驗四 肉羹之製備	8
實驗五 培養液 pH 值之調節方法	9
第二章 微生物之鏡檢	11
實驗六 顯微鏡	11
實驗七 染色的死細菌之鏡檢	13
實驗八 生活的細菌之鏡檢	15
實驗九 酵母之鏡檢	18
實驗十 酵母發芽之觀察	20
實驗十一 酵母芽胞產生之檢視	22
實驗十二 Gorodkova 氏酵母芽胞之產生法	24
實驗十三 酵母生長速度之觀察	25
實驗十四 生活的絲菌之鏡檢	26
實驗十五 絲菌菌絲體之研究	28
實驗十六 絲菌芽胞的發芽之試驗	29
實驗十七 孢子器及菌核之觀察	30
實驗十八 接合芽胞之觀察	32
實驗十九 絲菌永久標本之製備	34
實驗二十 微生物細胞大小之觀察	35
第三章 微生物染色鏡檢	37
實驗二十一 細菌之染色鏡檢及格蘭氏染色法	37

實驗二十二	荚膜之染色	40
實驗二十三	芽胞之染色	41
實驗二十四	鞭毛之染色	42
實驗二十五	釀母細胞及其內容物之染色	44
實驗二十六	死釀母及活釀母之辨識	46
第四章	微生物之培養特徵	47
實驗二十七	細菌之培養特徵	47
實驗二十八	釀母之培養特徵	48
第五章	微生物之生理	51
實驗二十九	色素之產生	51
實驗三十	酒精之生成	53
實驗三十一	明膠之液化	54
實驗三十二	微生物對於牛乳之作用	55
實驗三十三	澱粉之水化	58
實驗三十四	由含醣培養基之生酸及氣體	59
實驗三十五	鹼基質之生成	61
實驗三十六	尿素及蛋白質之氨化	62
實驗三十七	氨之氧化為亞硝酸鹽及硝酸鹽	64
實驗三十八	硝酸鹽之還原為亞硝酸鹽	67
實驗三十九	硫酸鹽之還原為硫化氫	69
實驗四十	Lindner 氏法試驗醣類之發酵性	71
實驗四十一	應用 Durham 發酵管試驗醣之發酵性	73
實驗四十二	釀母對於可溶性醣之發酵	75
實驗四十三	釀母對於各種培養基之繁殖速度	77
實驗四十四	光對於微生物之影響	78
實驗四十五	冷凍對於微生物之影響	80
實驗四十六	熱對於微生物之影響	83
實驗四十七	<i>Bacillus subtilis</i> 熱的死亡點之測定	86
實驗四十八	濃糖漿對於釀母熱的抵抗力之影響	90
實驗四十九	乾燥對於微生物之影響	92
實驗五十	濕度對於絲菌生長之影響	95
實驗五十一	氧對於微生物之影響	97
實驗五十二	釀母繁殖及發酵與水分及氧之關係	98
實驗五十三	物質成分與其所遭遇的發酵形式之關係	100

實驗五十四	反應對於微生物之影響	103
實驗五十五	消毒劑對於細菌之影響	106
實驗五十六	香料對於微生物之影響	107
第六章	微生物之純粹培養	109
實驗五十七	由淡乳, 自來水, 空氣, 指尖等分離各種微生物	109
實驗五十八	純粹細菌之分離	111
實驗五十九	Lindner 氏純粹培養法	113
實驗六十	單一芽胞分離法	114
第七章	微生物之分離法	117
實驗六十一	醋酸菌之分離	117
實驗六十二	乳酸菌之分離(一)	119
實驗六十三	乳酸菌之分離(二)	121
實驗六十四	<i>Streptococcus lactis</i> 之分離	123
實驗六十五	葡萄糖酸菌之分離	124
實驗六十六	產生芽胞菌之分離	126
實驗六十七	釋氮細菌之分離	129
實驗六十八	硝化菌之分離	131
實驗六十九	生成硫化氫細菌之分離	132
實驗七十	根瘤菌之分離	134
實驗七十一	<i>Saccharomyces Apiculatus</i> 之分離	139
實驗七十二	酒精釀母之分離	140
實驗七十三	麵包釀母中混存產膜釀母及其類似微生物之檢出	142
實驗七十四	<i>Rhizopus Nigricans</i> 之分離	144
實驗七十五	<i>Mucor Sp.</i> 之分離	145
實驗七十六	<i>Aspergillus Oryzae</i> 之分離	146
實驗七十七	<i>Oidium Lactis</i> 之分離	148
實驗七十八	紅麴菌之分離	149
第八章	微生物之鑑定	151
實驗七十九	細菌之鑑定	151
實驗八十	酵母菌之鑑定	163
實驗八十一	絲菌之鑑定	164
附錄		166
I.	石炭酸復紅	168

II. 英藍染液	166
III. Lugol 氏碘溶液	166
IVa. 葡萄糖瓊脂或明膠	166
IVb. 瓊脂培養基或明膠培養基	166
V. 葡萄糖或乳糖肉羹	167
VI. 石蕊牛乳	167
VII. 澱粉瓊脂	167
VIII. Andrade 葡萄糖肉羹	167
Andrade 乳糖肉羹	167
Andrade 蔗糖肉羹	167
IX. 乳糖瓊脂	168
X. 石蕊溶液	168
XI. Dunham 的消化蛋白質溶液	166
XII. Nessler 氏劑: 氨之試驗法	168
XIII. 乾酪素溶液	169
XIV. Trommsdorf 劑: 亞硝酸鹽之試驗法	169
XV. 二苯胺劑: 硝酸鹽試驗法	169
XVI. 葡萄糖釀母水及葡萄糖釀母水瓊脂	170
XVII. 肉羹消化蛋白質葡萄糖瓊脂	170
XVIII. 各種藥品的恆溫度	170
XIX. 氯化鈣之各種濃度的恆溫度	172
XX. 葡萄糖磷酸鹽瓊脂(不含氮培養基)	173
XXI. 黃酒瓊脂或明膠	173
XXII. 石蕊乳糖瓊脂	173
XXIII. 百路新劑: 硝酸鹽試驗法	173
補錄	174

實用微生物學實驗

微生物實驗室內應注意事項

諸生於開始實驗之先，除應遵守普通實驗室規程外，宜細讀下述應注意事項：

(1) 桌面及手之消毒：施行平面培養，或接種微生物時，桌面宜用 1:1000 氯化汞溶液（註）塗沫，兩手宜用酒精遍擦，或用肥皂洗淨亦可。

(2) 微生物之移種：當移種時，握在掌中之待種試管，以橫向為宜，培養物之開放，以避免在氣流處為要。

(3) 保溫箱之溫度：除特別說明外，保溫箱之溫度，均為 28°C 。

(4) 用具之處理：顯微鏡既應用後，油浸物鏡宜用二甲苯 (xylol) 擦淨，其他各部分，亦用軟布擦淨後，置於箱內。

所有固體物質，如瓊脂，棉花或濾紙等，必須置於廢物缸內，不可擲於水盆。

實驗既畢，將各種裝盛化學藥品或染料之瓶，置於原架上，一切用具均歸於櫥內。煤氣燈已否關閉，尤宜檢視。未離實驗室之先，宜將桌面擦淨。

（註）氯化汞溶液：先製原液 (stock solution)，再沖稀至所須要之濃度。

一份氯化汞，先加於 2.5 份粗鹽酸中（在 HCl 中之 HgCl_2 為 40%），作為原液。當製備 1:1000 溶液時，以 2.5 c.c. 原液，沖稀至 1,000 c.c.，再略加染料，使呈顏色，並標明「毒物」二字。

(5)玻璃具之清潔：一切玻璃具，應用之先，必須洗淨。試管培養皿，瓶及其他同類用具，可在5%鹼水中煮沸。或用熱皂水洗之，藉以除去附着之有機物。如需極清淨之玻璃具，可浸於重鉻酸鹽溶液(註)，十分鐘以後，取出，以蒸餾水洗之。

污濁之蓋玻璃及載玻璃，可用同一方法處理，將其擲入重鉻酸鹽溶液數小時後，取出，洗淨，以清淨的軟布擦乾。

蓋玻璃上如有油脂，可以通過火焰。如欲用極淨之蓋玻璃及載玻璃，可將其先在水中加熱，再在50%硫酸中加熱，嗣用蒸餾水洗淨，再用酒精洗淨，最後用淨布擦乾，而放於有蓋之皿中。

(6)實驗報告：

(a)按照本書規定的記錄格式，另紙報告。

(b)各實驗問題，應詳細解答。

(c)圖畫應繪於報告紙左邊，而解釋應寫在同一頁之右邊。

(d)頁數應於學期開始之第一實驗為第一頁，以後繼續載之。

(e)各種記載，僅可寫在每頁之一面。

(f)實驗報告放於特製信封內，交與教授或助教批改後，次星期交還。

(註)重鉻酸鹽溶液

重鉻酸鉀或重鉻酸鈉	40 公分
水	150 c.c.
硫酸	230 c.c.

將重鉻酸鹽溶於溫水中，當其冷卻時，緩緩加入濃硫酸，如製備得當，溶液質厚而有小結晶之存在。此溶液如含結晶則可以反復應用。

第一章 滅菌及培養基

本章實驗之目的：(一)濕熱及乾熱滅菌；(二)麥芽汁，釀母水，肉羹等液體及固體培養基之製備；及(三)培養基 pH 值之調節。

實驗一 滅菌

目的：本實驗之目的，乃證明棉塞及高壓滅菌之效力。

器具：(1) 8 個空培養管，(2) 2 個無菌的加棉塞培養管，(3) 水鍋。

材料：(1) 肉羹培養基（實驗四），(2) 去脂乳，(3) 石炭酸復紅（附錄 I），(4) 美藍(methylene blue)染液（附錄 II）。

手續：(1) 將八個空培養管及二個無菌的加棉塞培養管（注意：不可將棉塞拔去），分為 A 與 B 兩組，每組有無菌培養管一個，及空培養管四個。A 組編號，以無菌加棉塞培養管為 A No. 1，其餘四個空培養管，依次編成 A No. 2, A No. 3, A No. 4 及 A No. 5。

(2) 同法以 B 組編號，以無菌加棉塞培養管為 B No. 1，其餘依次編成 B No. 2, B No. 3, B No. 4 及 B No. 5。

(3) A 組以肉羹作培養基，每管盛入培養基約達全管三分之一，並依下述方法，分別處理之：

A No. 1 盛入培養基後，立即再加棉塞。

A No. 2 盛入培養基後，不加棉塞。

A No. 3 盛入培養基，加棉塞後，置水鍋中，水面與管內液面相等，

加熱，使水緩緩沸騰，以達 100°C ；保持十分鐘，取出冷卻。

A No. 4 盛入培養基，加棉塞後，入高壓滅菌器中，以 $15\text{ lb}/\text{sq}$ 保持三十分鐘。

A No. 5 與 A No. 4 同樣處理，惟待冷後，移種一白金圈之土或自來水。

(4) B 組以去脂乳為培養基，各管之處理與 A 組同號各管相同。

(5) 將已經處理之 A, B 兩組各管，置於 28°C 保溫箱中。

(6) 兩星期內，隨時檢查各管，而將結果詳細記錄之。

(7) 在試驗之末期，將 A, B 兩組之第四，第五號分別染色。肉羹培養基用石炭酸復紅染色，須染半分鐘。去脂乳培養基用美藍染色，則須三分鐘。

記錄：

A 組肉羹之滅菌

管號	肉羹之處理	二日後之外觀	一週後之外觀	二週後之外觀
1				
2				
3				
4				
5				

B 組去脂乳之滅菌

管號	去脂乳之處理	二日後之外觀	一週後之外觀	二週後之外觀
1				
2				
3				
4				
5				

問題：(1)由上述結果，肉羹及牛乳培養基之有效滅菌法如何？

(2)肉羹或牛乳如非無菌，其外表如何？顯微鏡下現象如何？

(3)無菌之意義如何？何管乃無菌的？

(4)何以高壓滅菌器內之 120°C . 較熱空氣中爐內之 160°C . 為較有效力？

(5)水，牛乳，培養皿，房屋之有效滅菌法如何？

(6)何種儀器應用乾熱滅菌？

(7)乾熱與濕熱在同一溫度其滅菌效力以何者為高？

(8)為何加壓滅菌較常壓滅菌為有效？

(9)加壓滅菌為何需先將空氣放去？

參考：釀造學總論 440—443 頁。

實驗二 麥芽汁及麥芽汁瓊脂之製備

目的：本實驗之目的，乃以大麥自製麥芽，並以麥芽製備麥芽汁及麥芽汁瓊脂，以備將來實驗之用。

器具：(1)竹籬，(2)試管，(3)棉花。

材料：(1)大麥，(2)瓊脂，(3)雞蛋。

手續：(1)將一公斤大麥洗淨，按釀造學分論第 264—289 頁所述地板式發芽法，先用清水浸漬至含適當水分時，置竹籬內，任其發芽，如太乾，則噴以清水，溫度超過 30°C ，則攤成薄層，至麥根合麥粒長之一倍半為度。

(2)按照釀造學總論第 430 頁所述方法，以粉碎麥芽一公斤，加水 5—6 公斤，保持 $58-60^{\circ}\text{C}$ ，時加攪拌數小時，使其完全糖化 俟以碘液試驗無呈色反應時，煮沸，濾過，濾液加少許蛋白，攪勻煮沸，濾過，調節濃度使呈 12 度勃立克司(Brix)。

(3)分裝各試管，每管 5—10 c.c，按照總論第 422—423 頁及第 441—442 頁所述高壓滅菌法，將各試管置於高壓滅菌器內，以 15 lb/□ 維持 15 分鐘即可。

(4)另以餘剩之麥芽汁，加 1.5—2.0% 之瓊脂，溶化，濾過，分盛各試管，滅菌，備用。

問題：(1)麥芽汁濃度何以用 12 度勃立克司？

(2)瓊脂之成分如何？

(3)瓊脂與明膠性質比較如何？

參考：釀造學總論 419—439 頁，釀造學分論 264—289 頁。

實驗三 釀母水之製備

目的：本實驗之目的，乃以乾或濕釀母製備釀母水，以供以後實驗之用。

器具：(1) 2 公升燒瓶，(2) Koch 滅菌器，(3) 試管。

材料：(1) 乾釀母或濕釀母，(2) 瓊脂。

手續：(1) 將市售乾釀母（不含澱粉者）25 公分，或濕釀母 100 公分，加以 1,000 c.c. 之水。

(2) 按釀造學總論第 431 頁所述方法，在 Koch 滅菌器（總論 406—407 頁）內，加熱 3—4 小時，常加攪拌。

(3) 靜置一星期後，吸取上面清澄液，調節 pH 值，至 6.6—6.8，再按間斷滅菌法滅菌。

(4) 製備固體培養基時，可加 1.5% 之瓊脂。

問題：(1) 釀母水何以爲優良培養基？

(2) 含澱粉之釀母所製之釀母水，外觀如何？

(3) 含澱粉之釀母水，如何可以檢出之？

參考：釀造學總論 431 頁。

實驗四 肉羹之製備

目的：本實驗之目的，乃以牛肉製備液體及固體肉羹培養基，以備將來實驗之用。

器具：(1)碎肉器，(2)水鍋，(3)2公升燒瓶，(4)試管。

材料：(1)無脂牛肉，(2)消化蛋白質，(3)食鹽，(4)碳酸鈉溶液，(5)瓊脂。

手續：(1)按照釀造學總論第425頁所述方法，將500公分無脂牛肉，細切，混以1,000 c.c. 之水。

(2)置冰箱中24小時(或在水鍋中保溫50°C. 30分鐘至一小時)。

(3)在 Koch 滅菌器內加熱一小時(或直接火30分鐘)。

(4)過濾，所得濾液，與殘渣用榨器榨出之液，相混合後，添加1%消化蛋白質(peptone)及0.5%食鹽。

(5)溶液如為酸性，可以用碳酸鈉溶液中和之。

(6)分裝管中，按間斷滅菌法，每日加熱30分鐘，連續三日即可。

(7)如製固體肉羹培養基可加1.5%瓊脂，按法裝管，加棉塞並滅菌。

問題：(1)肉羹之主要成分為何？

(2)肉羹含有微量醣類如何可以除去？

(3)肉羹以培養何種微生物為宜？

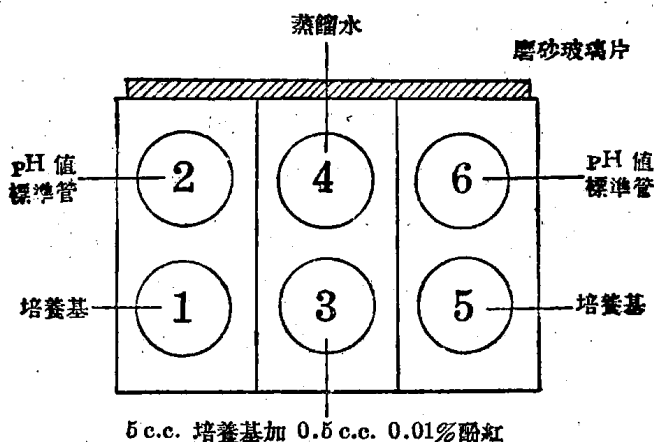
參考：釀造學總論425頁及491頁。

實驗五 培養液 pH 值之調節方法

目的：本實驗之目的，乃以肉羹加鹼或酸調節其 pH 值。

器具：(1)一套 pH 值標準溶液管，管內含有緩衝液（一定比例之 $N/15 Na_2HPO_4$ 及 $N/15 KH_2PO_4$ ），及指示藥，其 pH 範圍為 6.8—8.4。

(2)一付比較器（如圖 1）。



圖一 比較器

(3) Cordite 管，管壁及大小，與標準管，完全相同。

(4) 微量滴管，刻度至 0.01 c.c.，管頭接以橡皮管，此橡皮管再接以尖頭玻璃管。橡皮管中間，以鉗子鉗之。

材料：(1)一管蒸餾水，內含 0.01% 酚紅 (phenol red)。

(2) $N/20 NaOH$ 之製法如次：

500 c.c. $N/10 NaOH$ 及 91 c.c. 0.01% 酚紅，添加蒸餾水至 1,000 c.c.。

(3) 肉羹培養基。