

吴人坚

(上海复旦大学生物系)

藻状菌纲(Phycomycetes)有200多属、1000多种,其体型与某些藻类很相似。水生藻状菌是指生活在水中或湿土中的属于藻状菌纲的一些低等真菌。由于它们的生活条件和生长发育与其它真菌有些不同,其研究方法也就有不同的地方。本文主要介绍它的采集、分离、培养、观察等方面的研究方法。

### 一、水生藻状菌的采集

采集前首先要熟悉各类藻状菌的生态习性,有目的地采集<sup>[1]</sup>。

#### (一) 壶菌目 (Chytridiales)

在自然条件下,水生壶菌生存在各种不同的基质上。如藻类,其他水生藻状菌,腐朽的植物碎片,微小的动物和它们的卵,以及水生昆虫的外壳和尸体等。对壶菌可能生存的基质或土壤浸出液,还可用以动物为来源的物质作诱饵,如纯化的虾的几丁质,各种形式的角蛋白(如蛇皮)和一些无机物(如赛璐玢)等适合引诱喜几丁质和角质素及分解纤维素的真菌。

#### (二) 芽枝霉目 (Blastocladales)

此类菌有两种习性,一种生长在半浸水的枝条和蔷薇科植物果实上,在上面形成白色较卷曲的颗粒状和半球状的脓疱,如芽枝霉属(*Blastoclada*)。另一种生长在土壤中,如异水霉属(*Allomyces*)的一些种是最普通的陆生型,但在死水内也偶然发现,从湿土或临时湿土中也能分离到。此类菌在水培养时,要将装水的土样瓶灭菌,冷却后,把土(1—2大茶匙)倒入,再把煮过的大麻籽(或苍蝇尸体)倒入作为诱饵,分离异水霉时需要大量水覆盖住沉水的诱饵。

#### (三) 单毛水霉目 (Monoblepharidales)

与芽枝霉相似,也从死水和土壤中采集,单毛水霉属(*Monoblepharid*)一般在清静较冷的

水中浸泡的老枝条上较多,若将浸泡的老枝条放在清水瓶中,11℃保存,此属菌生长茂盛,以至形成密的脓疱,或形成一些纤细的复合体盖住整个枝条。

#### (四) 水霉目 (Saprolegniales)

构造简单的种类如外壶菌科(*Ectrogellaceae*)、破囊壶菌科(*Thraustochytriaceae*)存在于淡水或海藻上。外壶菌属(*Ectrogella*)常在有淡水硅藻渣沫的培养基中生长。破囊壶菌曾在绿藻和红藻上采到。水霉目的腐生种在水中的动、植物残骸上,或煮过的大麻籽上找到。

#### (五) 水节霉目 (Leptomitales)

多存在果实和枝条上,采集方法同于芽枝霉目。而水节霉属(*Leptomit*)常在有机物污染的水(如制糖业污水等)中生长。

#### (六) 链壶菌目 (Lagenidiales)

拟油壶菌属(*Olpidiopsis*)常出现在水霉科藻状菌的茂密水培养物上。一些海生种类常出现在藻类植物上。

#### (七) 腐霉科 (Pythiaceae)

有些种是果实和枝条上的腐生物。轮虫霉(*Zoopagus*)常发现在丝状绿藻或轮藻科植物体上生长。

#### (八) 虫霉目 (Entomophthorales)

新月霉属(*Ancylistes*)菌是鼓藻的寄生物。

### 二、水生藻状菌的分离和培养<sup>[2]</sup>

#### (一) 水和稀盐溶液

用纯蒸馏水培养对菌生长不利。用木炭处理的水或土壤浸出液培养,均不如用灭菌的自来水效果好。也有用过滤的池塘水和蒸馏水按1:2混合、灭菌。为了避免水对培养效果的影响,曾用稀盐溶液:  $10^{-3}M$   $KH_2PO_4$ ,  $10^{-4}M$   $MgCl_2$ ,  $2 \times 10^{-5}M$   $CaCl_2$ , 用KOH调pH 7.0。

## (二) 水培养所用诱饵

1. 大麻籽: 煮过, 使裂开。
2. 青草幼嫩叶片: 切一寸长煮沸 10 分钟。
3. 花粉粒: 针叶树的花粉粒易大量获得, 经氧化丙烯熏蒸过的花粉粒可保存几年。适宜各种壶菌和一些柔弱的水生藻状菌生长。
4. 玻璃纸(赛璐酚): 每片 1 平方寸, 用于引诱分解纤维素的壶菌。

## (三) 培养基

1. 酵母淀粉培养基 (YpSc): 酵母粉 4g, 可溶性淀粉 15g,  $K_2HPO_4$  1g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g, 1000 ml 水, 特别适合异水霉发育。
2. 酵母葡萄糖培养基 (YpG): 以 20 克葡萄糖代替淀粉, 其它成分同前。
3. 酵母葡萄糖培养基 (GY5): 酵母粉 1g, 葡萄糖 3g,  $KH_2PO_4$  1.4g,  $Na_2HPO_4$  0.6g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1g, 0.04% 溴甲酚紫水溶液 5 ml, 加水至 1000 ml。用 0.25 M NaOH 中和培养物, pH 保持在 5.5—6.5。用时加几滴碱液, 使溴甲酚紫开始变黄。
4. 胰蛋白胍葡萄糖培养基 (TG): 胰蛋白胍 10g, 葡萄糖 10g, 水 1000ml。
5. 蛋白胍葡萄糖培养基 (PG): 以蛋白胍代替胰蛋白胍, 其它成分同前。
6. 玉米粉培养基 (BBL): 玉米粉 1—2 茶匙加水至 1000 ml, 60℃ 加热 1 小时, 过滤, 再加

水至 1000ml。

## (四) 分离和培养

从现场采集到的材料有水体、周丛生物(或其遗体)、淤泥三种。培养方法有水培养和固体培养两种。

1. 水培养: 将采到的不同材料分别处理。

(1) 取 20ml 水样放入 100 ml 三角瓶中, 放几粒煮过的大麻籽(或其它诱饵)。

(2) 取 20 毫升灭菌自来水或过滤的池塘水和蒸馏水(1:2)的混合液倒入三角瓶中, 加入周丛生物和诱饵。

(3) 取少量淤泥代替周丛生物, 摇匀后再加诱饵, 其它要求同前。

以上三种材料处理后放 15—20℃ 培养。几天后诱饵上出现丝状体, 镜检。未出现丝状体的诱饵, 三、四天后镜检有无单细胞真菌。以后隔 2—3 天检查一次, 直至接种后 10—15 天。

## 2. 固体培养

在固体培养基中加 2% 琼脂, 融后, 每 ml 加链霉素 30 微克, 凝固后放水样 0.1 ml 放入周丛生物样品少许。几天后, 平板上出现丝状体或不同于细菌的菌落, 镜检。

## 3. 菌种分离纯化

将水培养或固体培养中的菌丝体和单细胞菌体转到固体培养基上, 转接数次后, 纯化的菌株再接斜面保存。

表 1 促使几种水生藻状菌产生游动孢子的方法

菌 名	琼脂培养基	培养温度 (°C)	培养时间 (天)	培 养 液	培养温度 (°C)	培养时间	处理液	温度 (°C)	时间
根前毛菌 ( <i>Rhizidiomyces</i> )	酵母淀粉培养基	25	7	酵母葡萄糖培养液振荡培养	25	24 小时	DS 溶液		8—36 小时
异水霉 ( <i>Allomyces</i> sp.)							DS 溶液 <sup>[3]</sup>		90 分钟
棉霉 ( <i>Achlya</i> sp.)									
根腐丝囊霉 ( <i>Aphanomyces cochlioides</i> )	培养基 A <sup>[4]</sup>	25	2—4	培养基 A (稀释 10 倍的)	25	18—24 小时	灭菌自来水, 再用灭菌蒸馏水	8	2 小时, 12 小时
寄生疫霉 ( <i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotiana</i> .)	燕麦培养基 <sup>[5]</sup>	25	6—20	麦芽糖蛋白胍培养液 <sup>[5]</sup>	25	4 天			25 分钟, 15 分钟
				0.01M KNO <sub>3</sub> 液浸湿孢子囊	25	至少 48 小时			

(下转第 44 页)

(上接第 46 页)

4. 促使产生游动孢子的方法(见表 1): 为使水生藻状菌在实验条件下产生游动孢子, 首先使菌丝在 25℃ 左右较好生长。1—7 天产生孢子囊, 然后取带菌丝的琼脂块, 放入装有蒸馏水或培养液的培养皿内, 25℃ 培养 90 分钟—5 天。用蒸馏水冲洗菌丝丛 3—5 次。有时要放在 40W 荧光灯下照射 24—48 小时诱生孢子囊。还可将带有孢子囊的菌丝丛琼脂块先冷却至 15℃, 15—20 分钟, 待温度恢复到 25℃, 20—30 分钟后开始释放游动孢子。

### 三、水生藻状菌游动孢子染色方法<sup>[7]</sup>

在载玻片上滴一滴游动孢子悬液, 再加一滴 1% 钼酸(杀死孢子), 过夜, 干燥后加几滴媒染剂\*, 经 0.5—1 分钟, 微加热, 然后用水缓缓

冲洗。染色用 4% 龙胆紫的苯胺水溶液(即 2% 苯胺油的水溶液), 加 0.1% NaOH 使成微碱性。染色液使用前均需过滤, 染色时缓缓加热 1—2 分钟, 冷却后冲洗。媒染剂和染色液不超过二星期, 否则看不到茸毛。

### 参 考 文 献

- [1] Sparrow, F. K.: *Aquatic Phycomycetes*, 26—38, 1960.
- [2] Emerson, R.: *Mycol.*, **50**: 589—621, 1958.
- [3] Cooper, D. B.: *Arch. Mikrobiol.*, **78**: 92—98, 1971.
- [4] Barksdale, A. W.: *Mycol.*, **55**: 164—171, 1963.
- [5] Cunningham, J. L.: *Mycol.*, **52**: 652—654, 1960.
- [6] Gooding, G. V.: *Phytopathology*, **49**: 277—281, 1959.
- [7] Couch, J. N.: *Amer. J. Bot.*, **28**: 704—713, 1941

\* 媒染剂的配制: 用 20% 鞣酸水溶液 10 份, 硫酸亚铁在室温下的饱和水溶液 5 份, 饱和的酒精(碱性)品红溶液 1 份, 此剂在用前需重新过滤。