

真菌单孢子分离的一种简易方法

周德庆 祖若夫

(复旦大学生物系, 上海)

菌种的分离纯化技术, 被广泛应用于微生物的遗传、生理的研究和分类鉴定、育种及菌种保藏等工作中。现有的单细胞或单孢子分离方法虽然很多^[1-6], 但操作还不够简便, 影响因素也较多, 有些还需要特殊的仪器设备^[5, 6], 因而工作效率较低, 有的方法甚至还难以着手。

我们在对米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) AS 3.951 进行分离纯化的过程中, 参考和比较了文献上介绍的方法, 设计了一种简便有效的方法, 此法对其它真菌单孢子或单细胞的分离也有参考价值。现将方法简介如下。

一、实验材料

(一) 菌种

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) AS 3.951 (即米曲霉 3.042): 由上海酿造一厂提供。

(二) 培养基

用固体和液体察氏培养基。

分离单孢子的培养基制法是: 在温度较高的无菌培养皿内倒入少量融化的培养基使成薄层, 凝固后用小刀切成 25 平方毫米的薄片。

(三) 厚壁磨口毛细滴管

厚壁磨口毛细滴管是把稀释了的萌发孢子悬液点在分离小室皿盖上的一种工具。可用一般玻璃管自行烧制, 滴管的尖端要烧得较细, 制成具有厚壁的毛细管状 (一般的薄壁毛细管因管口不平, 无法均匀地快速点样, 故不适用), 然后用小砂轮或金刚砂仔细湿磨, 务使管口平整 (如图 1, A、B)。使用前, 尾端塞上棉花, 用纸包扎后灭菌备用。用这种毛细滴管点样, 每 1 微升孢子悬液大约可点 50 小滴。

(四) 分离小室

在直径 9 厘米的无菌培养皿的皿盖上, 先用黑墨水笔整齐地画上 49 个或 56 个直径约 3

毫米的小圈, 在皿底倒入 8—10 毫升 4% 水琼脂作保湿剂。皿盖的内壁用于点样。

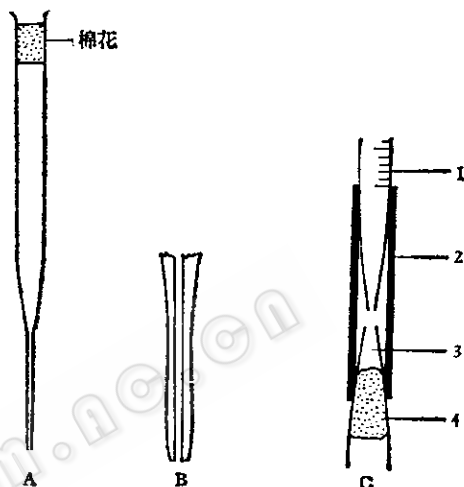


图 1 厚壁磨口毛细滴管

A. 毛细滴管 B. 厚壁管口部分(放大)
C. 简易孢子过滤装置: 1. 吸管 2. 乳胶管 3. 简易玻璃滤嘴 4. 脱脂棉

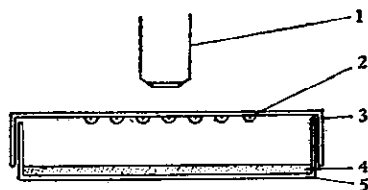


图 2 单孢子分离小室

1. 接种环 2. 单孢子悬液 3. 皿盖
4. 水琼脂 5. 皿底

二、分离方法

(一) 萌发孢子悬液的制备

萌发孢子悬液的制备方法是: 用接种环挑取在斜面上生长良好的米曲霉 AS 3.951 分生孢子若干环, 移到盛有 10 毫升察氏培养液和玻璃珠的灭菌三角瓶中, 振荡 5—10 分钟, 使孢子充分散开。然后在 10 毫升吸管口上套上一个

简易的孢子过滤装置(如图 1, C), 从三角瓶中吸取孢子悬液若干毫升, 移到无菌试管中, 经血球计数器准确计数后, 再加入适量灭菌的察氏培养液调节浓度, 使每毫升中含有 5—15 万个孢子, 最后, 置 28℃ 保温箱中培育 8 小时左右, 使其适当发芽。

(二) 点样

先检查分离小室的皿盖上有无冷凝水, 若有, 就用微火加热将其除去。然后用厚壁磨口毛细滴管吸取上述萌发孢子悬液数微升, 快速轻巧地点在皿盖内壁的相应位置上, 每皿可点 49 或 56 个点。要求每点液滴的面积略小于低倍镜的视野。

(三) 检出

把点样后的分离小室放在显微镜的载物台上, 随即用低倍镜依次检查皿盖内壁上的液滴, 如果发现某液滴内只有一个萌发的孢子, 立即用黑墨水笔在皿盖上作上标记。

(四) 盖片

用微型刀挑取一小块前述察氏培养基薄片, 放在画有记号的单孢子液滴上, 盖完后, 把“分离小室——培养皿”放在 28℃ 温箱中培育 24 小时, 使其在培养基薄片上发育成单孢子的微菌落。

(五) 移种

用微型刀小心挑取上述长有微菌落的琼脂薄片, 并把它移种到新鲜的察氏培养基斜面的中央, 经培养 4—7 天后, 即可获得由单孢子发育成的生长良好的菌株斜面。

三、问题和讨论

在应用本法作单孢子分离时, 若孢子悬液的浓度和点样液滴大小控制适宜, 则液滴内出现单孢子的机率是很高的。

我们认为此法可能有以下几个优点:

1. 由于待分离的孢子经预先萌发, 故在显微镜下极易检出, 并保证了该孢子具有较强的生活力。

2. 由于使用了厚壁磨口毛细滴管点样, 就

可大大提高点样速度和防止漏点, 同时还保证了每一液滴的面积和形状基本一致, 因而有利于在低倍镜下提高检出速度。这在采用其它点样工具或方法时就难以达到。

3. 本法是把萌发的孢子直接以液滴的形式点在皿盖内壁上, 避免了文献中普遍采用的在琼脂表面进行单孢子分离的技术。而要使用琼脂, 就必须对它进行一系列复杂的处理^[6,7], 以除去其中会严重干扰单孢子分离的大量杂质微粒(包括死菌、活菌或其孢子)。

4. 由于在分离室的底部倒上一薄层 4% 水琼脂(这种琼脂不必经过任何处理), 使它不仅保持了原有的透光性和可以防止污染, 而且还可维持必不可少的湿度, 以避免含有单孢子的液滴挥发干燥, 同时还有利于单孢子的培育。

5. 由于对检出后的萌发单孢子液滴采取了盖上营养琼脂薄片的措施, 就可保证该纯种微生物的菌丝获得预先大量发育的机会, 从而方便了移种操作和提高了移种的效率。

在本法中, 用作分离小室的是一套培养皿, 皿盖的玻璃较厚, 因而无法使用高倍镜或油镜对细菌等小型微生物进行单细胞分离。我们设想, 如果改用盖玻片放在有凹孔的载玻片上以组成小型的分离小室的话, 用这一方法也可以分离细菌。

参 考 文 献

- [1] 方中达: 植病研究方法, 高等教育出版社, 1957, 第 151—153 页。
- [2] 俞大绂: 植物病理学和真菌学技术汇编, 第 1 卷, 人民教育出版社, 1959, 第 361—366 页。
- [3] 陈祥照: 真菌单孢子分离的简易方法, 生物学通报, 1957 年 第 7 期, 281 页。
- [4] 方心芳: 应用微生物学实验法, 财政经济出版社, 1962, 第 92 页。
- [5] 施履吉、吴琼发: 微生物学报, 6 (2): 266—272, 1958。
- [6] Johnstone, K. I.: The Isolation and Cultivation of Single Organism, *Methods in Microbiology* (ed. by Norris, J. R. et al.), Vol. 1, Academic Press, London and New York, p. 455—471, 1969。
- [7] Feinberg, J. G.: *Nature*, 178(4547): 1406, 1956。