



三种方法保藏毛霉目菌种 效果的评定

朱丽钊 郭芳 马春沅 从兆海 马德江

(中国科学院微生物研究所,北京)

续表 1

藻状菌类,特别是其中毛霉目的一些属种,多用于科研和生产,因而研究保藏这些菌种的方法和效果有较大的现实意义。本文是采用矿油封藏法、麸皮保藏法和冷冻真空干燥法保存 18 属 120 种 548 株毛霉目菌种(另外有霜霉目腐霉属 7 种 11 株)的结果。

材料和方法

一、菌种

19 属, 127 种, 559 株(表 1)。

表 1 三种方法保藏毛霉目菌种存活结果

菌名	保藏方法		
	矿油	麸皮	冷干
	B/A**	B/A	B/A
<i>Abidia coerulea</i>	1/4	3/5	7/7
<i>A. corymbifera</i>	0/3	1/1	7/7
<i>A. cristata</i>	0/1*	1/1	
<i>A. cylindrospora</i>	0/2	0/1	3/3
<i>A. glauca</i>	0/1*	0/1	4/4
<i>A. glauca</i> var. <i>paradoxa</i>	0/1	1/1	1/1
<i>A. hyalospora</i>	0/1*	1/1	1/1
<i>A. meridiana</i>	0/1*	0/1	
<i>A. ramosa</i>	0/1*	0/1	6/6
<i>A. spinosa</i>	1/1*	0/1	
<i>A. spinosa</i> var. <i>biappendiculata</i>	1/1*	0/1	
<i>Abidia</i> sp.	0/1		1/1
<i>Actinomucor elegans</i>	6/11	0/1	43/43
<i>Actinomucor</i> sp.			1/1
<i>Chaetocladium brejeldii</i>	0/1*	0/1	
<i>Chaetostylum tresenii</i>	0/1*	0/1	
<i>Circinella angarensis</i>	0/1*	0/1	
<i>C. aspera</i>	0/1	1/1	1/1
<i>C. mucoroides</i>	0/1		1/1
<i>C. muscae</i>	0/1	0/1	1/1
<i>C. sydowii</i>	0/1		1/1
<i>C. umbellata</i>	1/4	0/1	2/2
<i>Cunninghamella echinulata</i>	0/6	0/1	52/54
<i>C. blakeslecana</i>	0/1	0/2	6/7

菌名	保藏方法		
	矿油	麸皮	冷干
	B/A**	B/A	B/A
<i>C. elegans</i>	1/6	0/1	26/33
<i>Gilbertella hainanensis</i>	0/1*	1/1	
<i>G. persicaria</i>	0/1*	0/1	1/1
<i>Gongronella butleri</i>	1/1*	0/1	
<i>Helicostylum piriforme</i>	0/3*	0/3	1/1
<i>Mortierella humicola</i>	0/1*	0/1	0/1
<i>M. isabellina</i>	1/1*	0/1	1/1
<i>M. minutissima</i>	1/1*	0/1	0/1
<i>M. polycephala</i>	0/1*		0/2
<i>M. ramanniana</i>		1/1	1/1
<i>M. vinacea</i>	0/1*	1/1	1/1
<i>Mucor abundans</i>	5/13	0/1	10/10
<i>M. adventitius</i>	1/1	1/1	1/1
<i>M. adventitus</i> var. <i>auratiacus</i>	1/1		1/1
<i>M. albo-uter</i>	0/1*	0/1	
<i>M. alpinus</i>	1/1		1/1
<i>M. alternans</i>	1/2	0/1	1/1
<i>M. aromaticus</i>	0/1*		
<i>M. bacilliformis</i>	6/9	0/1	4/6
<i>M. botryoides</i>	0/1		1/1
<i>M. christianiensis</i>	0/1		0/1
<i>M. circinelloides</i>	3/7	1/1	4/4
<i>M. corticolus</i>	2/2	0/1	
<i>M. dimorphosporus</i>	0/2	1/1	1/1
<i>M. dispersus</i>	0/1		1/1
<i>M. dubius</i>	0/2		2/2
<i>M. erectus</i>	0/2		1/1
<i>M. flavus</i>	0/1*	1/1	
<i>M. joenicola</i>	4/8	1/1	5/5
<i>M. fragilis</i>	5/10	1/1	6/6
<i>M. fumosus</i>	1/1*	1/1	
<i>M. genevensis</i>	1/4	0/1	2/2
<i>M. globosus</i>	0/1*	0/1	
<i>M. glomerula</i>	0/1		1/1
<i>M. griseo-cyanus</i>	2/2	1/1	2/2
<i>M. griseo-lilacinus</i>	2/6	1/1	5/5

李钟庆、郑儒永同志审阅文稿,特此致谢。

续表 1

菌名	保藏方法		
	矿油	麸皮	冷干
	B/A**	B/A	B/A
<i>M. hiemalis</i>	6/18	0/1	16/16
<i>M. hiemalis</i> var. <i>albus</i>	0/1		1/1
<i>M. hiemalis</i> var. <i>toundrae</i>			1/1
<i>M. hygrophilus</i>	0/1		1/1
<i>M. janssenii</i>	0/2	1/1	2/2
<i>M. jauchae</i>	0/1		1/1
<i>M. javanicus</i>	2/7	1/1	7/7
<i>M. lamprosporus</i>	0/1	1/1	1/1
<i>M. lausannensis</i>	0/3	1/1	2/2
<i>M. lusitanicus</i>	0/1		1/1
<i>M. mandshuricus</i>	0/1		1/1
<i>M. mediterraneus</i>	4/7	0/1	7/7
<i>M. microsporus</i>	1/3		3/3
<i>M. mucedo</i>	0/2	0/1	3/3
<i>M. obloghisporus</i>	0/1*	0/1	
<i>M. parvispora</i>	3/4	1/1	4/4
<i>M. petrinularis</i>	0/1	0/1	1/1
<i>M. piriformis</i>	0/1*	0/1	
<i>M. plumbeus</i>	0/2		2/2
<i>M. polymorphosporus</i>	1/1*	1/1	
<i>M. prainii</i>	2/5	0/1	5/5
<i>M. pusillus</i>	0/1	1/1	1/1
<i>M. racemosus</i>	16/54	1/1	51/54
<i>M. rouxianus</i>	1/1	0/1	1/1
<i>M. rufescens</i>	0/1*	1/1	
<i>M. saturninus</i>	0/1		1/1
<i>M. silvaticus</i>	4/10	0/1	10/10
<i>M. sphaerosporus</i>	0/1		1/1
<i>M. spinosus</i>	0/4		4/4
<i>M. strictus</i>	0/1	0/1	1/1
<i>M. subtilissimus</i>	3/8	0/1	7/7
<i>M. varians</i>	2/9	0/1	5/6
<i>M. wosnessenskii</i>	0/1*	0/1	
<i>M. wutughkiao</i>			1/1
<i>M. sp.</i>			5/5
<i>Phycomyces nitens</i>	0/1*		1/1
<i>Piptocephalis tieghemiana</i>	0/1	1/1	2/2
<i>Pythium dissotocum</i>	0/2*	0/1	
<i>P. irregulare</i>	0/1*	0/2	
<i>P. kunmighense</i>	0/1*		
<i>P. monospermum</i>	0/1*	0/1	
<i>P. paroecandrum</i>	0/1*		
<i>P. spinosum</i>	0/1*	0/1	
<i>P. torulosum</i>	0/1*	0/1	
<i>Pythium</i> sp.	0/3*		1/2
<i>Rhizopus acidus</i>	0/1		1/1

续表 1

菌名	保藏方法		
	矿油	麸皮	冷干
	B/A**	B/A	B/A
<i>R. arrhizus</i>	0/7		9/9
<i>R. astocarpi</i>	0/1		
<i>R. batatas</i>			1/1
<i>R. chinensis</i>	2/2*	3/3	17/17
<i>R. chinensis</i> var. <i>rugosporus</i>	0/1		1/1
<i>R. chlamydosporus</i>	0/2	1/1	1/2
<i>R. circinans</i>	0/1*	0/1	
<i>R. cohnii</i>	2/11	2/2	10/11
<i>R. delemar</i>	0/1		6/6
<i>R. formosensis</i>	0/1		1/1
<i>R. hangchow</i>			1/1
<i>R. japonicus</i>	0/1	3/3	13/23
<i>R. javanicus</i>	1/1		1/1
<i>R. microsporus</i>	1/2	1/1	2/2
<i>R. stolonifer</i>	3/140		151/154
<i>R. oryzae</i>	5/22	8/8	52/53
<i>R. reflexus</i>			1/1
<i>R. tonkinensis</i>	0/2	5/5	40/45
<i>Rhizopus</i> sp.		33/34	2/2
<i>Sporodinia grandis</i>	1/1		1/1
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	0/10	1/1	10/10
<i>Thamnidium elegans</i>	0/1*	0/1	0/2
<i>Zygorhynchus exponens</i>	1/1*	0/1	1/1
<i>Z. heterogamus</i>	1/1*	1/1	
<i>Z. macrocarpus</i>	1/1*	0/1	1/1
<i>Z. moelleri</i>	0/1	1/1	1/2

* 保藏 10 年,其余均为 20 年。

** A: 保藏株数; B: 存活株数。麸皮保藏法均为 8 年,冷冻真空干燥法均为 11 年。

二、保藏方法

矿油封藏法^[1,2],麸皮保藏法^[3],冷冻真空干燥法^[4]。

三、酶活力测定

1. 糖化酶、蛋白酶液的制备^[5]。2. 糖化酶活力测定用次亚碘酸法^[5]。3. 蛋白酶活力测定用 Folin-phenol 法^[6]。

4. 脂肪酶液的制备用液体培养法。培养基成份(%)：豆饼粉 3，糊精 0.5，磷酸氢二钾 0.5，硫酸铵 0.2，花生油 0.5。接种后置 28°C 振荡培养 (288 rpm) 3 天，用脱脂棉过滤即得酶液。酶活力测定参照 Ota 和 Yamada 法^[7]。

结 果

一、存活情况

三种方法保藏结果列于表1。用矿油封藏10—20年,存活率为20.03%,其中保藏10年的50株,存活率为24%。保藏20年的509株,存活率为19.64%。用麸皮保藏8年的142株,存活率为59.85%。真空冷冻干燥保藏11年的462株,存活率为92.85%。

二、生理特性

1. 糖化酶活力: 测定了河内根霉 (*Rhizopus tonkinensis*) AS 3.851、AS 3.866、AS 3.867、AS 3.1175; 日本根霉 (*R. japonicus*) AS 3.849、AS 3.852、AS 3.868; 华根霉 (*R. chinensis*) AS 3.2746 等8株菌的糖化酶活力。从表2中可

看出,冷冻干燥、麸皮保藏与定期移植的斜面菌株对照,酶活力没有显著差异。

2. 蛋白酶活力: 测定了五通桥毛霉 (*Mucor wutunghiao*) AS 3.25; 总状毛霉 (*M. racemosus*) AS 3.34、AS 3.50 AS 3.54 卷枝毛霉 (*M. circinelloides*) AS 3.49 雅致放射毛霉 (*Actinomyces elegans*) AS 3.2778、AS 3.2891、AS 3.2927 等8株菌的蛋白酶活力,结果表明(表3),冷冻干燥保藏与定期移植保藏的菌种蛋白酶活力无明显差异。

3. 脂肪酶活力: 测定了匍枝根霉 (*Rhizopus stolonifer*) AS 3.2392、AS 3.2394 米根霉 (*R. oryzae*) AS 3.2692、AS 3.3462 等5株菌的脂肪酶活力,结果(表4)表明三种保藏方法对菌株的脂肪酶活力没有明显影响。

表2 糖化酶活力测定结果

酶活力* / 菌株 / 保藏方法	AS3.849	AS3.851	AS3.852	AS3.866	AS3.867	AS3.868	AS3.1175	AS3.2746
	冷冻干燥	60.05	62.72	86.74	73.40	70.73	73.40	58.72
麸皮	58.72	66.73	93.42	71.73	72.06	74.73	58.72	40.04
斜面	61.39	62.72	88.08	72.06	69.39	72.06	61.39	36.03

* 以每 ml 糖化液中含葡萄糖 mg 数表示

表3 蛋白酶活力测定结果

酶活力* / 菌株 / 保藏方法	AS3.25	AS3.34	AS3.49	AS3.50	AS3.54	AS3.2778	AS3.2891	AS3.2927
	冷冻干燥	90	80	80	105	140	174	—
麸皮	—	—	—	—	—	—	190	210
矿油	—	—	—	—	—	—	175	—
斜面	80	85	75	100	150	149	195	195

* 以 μg 酪氨酸/ml·min 表示

表4 脂肪酶活力测定结果

酶活力* / 菌株 / 保藏方法	AS3.2392	AS3.2394	AS3.2692	AS3.2752	AS3.3462
	冷冻干燥	10.3	13.0	9.0	9.0
麸皮	—	—	—	—	17.7
矿油	8.7	16.3	9.3	—	18.3
斜面	9.7	15.0	10.3	9.7	19.3

* 以 μg 脂肪酸/ml·min 表示

实验结果表明,对于藻状菌菌种的保藏来说,冷冻真空干燥方法是比较理想的,保藏11年,存活率达93.97%。麸皮法效果欠佳,保藏8年,存活率仅为59.85%。矿油封藏法大部分菌株不能存活,保藏10年的存活率为24%,保藏20年后,仅存活19.64%。此结果与 Hesse-ltine^[6] 的报道近似。但就个别种而言,如蓝色犁头霉、伞卷霉、雅致小克银汉霉、多量毛霉、外来毛霉、互生毛霉、杆状毛霉、灰蓝毛霉、鲁毛霉、爪哇毛霉、小孢根霉,每种仅1至2株,用矿油封存了20年却生存了下来,又是难能可贵的。

从生理特性测定结果来看,虽然三种方法保藏的菌株,其糖化酶、蛋白酶、脂肪酶活力都无明显差别,但用矿油和麸皮保藏的菌株,生长能力减弱,因此,此两种方法对一些菌株的保藏是不适宜的。

参 考 文 献

- [1] 李钟庆等: 微生物学报, **20**: 373—384, 1980。
- [2] 李钟庆、陈燕妍: 微生物学报, **21**: 45—52, 1981。
- [3] 中国科学院微生物研究所《菌种保藏手册》编著组: 菌种保藏手册, 科学出版社, 北京, 1980年, 第619—620页。
- [4] 中国科学院微生物研究所菌种保藏组: 微生物学报, **15**: 57—71, 1975。
- [5] 方心芳: 应用微生物学实验法, 中国财政经济出版社, 北京, 1962年, 第72—74, 137—144页。
- [6] Lowy, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951。
- [7] Ota, Y. and K. Yamata: *Agr. Biol. Chem.*, **30**: 351, 1966。
- [8] Hesseltine, C. W. et al.: *Mycologia*, **52**: 762—774, 1960。