

几种不同介质保藏蛙粪霉菌等真菌效果的比较研究

黄庆华 白锦霞 叶嗣颖

(同济医科大学基础医学院微生物教研室 武汉 430030)

郑 岳 臣

(同济医科大学附属协和医院皮肤科 武汉 430022)

摘要 本文采用 0.005% 碳酸钙盐水、0.85% 生理盐水、1% 葡萄糖液以及沙氏液体培养基四种不同的保存介质, 保藏蛙粪霉菌、黑曲霉菌、产黄青霉菌、红色毛癣菌、犬小孢子菌(异名羊毛状小孢子菌)、石膏样小孢子菌和许兰氏毛癣菌。每种菌的同一保存介质分别置 4℃ 冰箱、室温及 22℃ 温箱贮藏。结果表明, 蛙粪霉菌只适于 22℃ 温箱贮藏, 经统计学处理, 22℃ 与室温和 4℃ 贮藏对存活时间的影响有高度显著性差异 ($P < 0.01$)。除许兰氏毛癣菌外, 其它各真菌在 0.005% 的碳酸钙盐水中的存活时间最长, 达 3~4 年之久, 其次为生理盐水。0.005% 碳酸钙盐水与生理盐水、1% 葡萄糖液和沙氏液体培养基间对存活效果影响的差异有高度显著性 ($P < 0.01$)。

关键词 蛙粪霉菌, 保存介质, 温度

蛙粪霉菌因为对低温极敏感, 故目前常用的各种菌种保存法都不太适用于该菌的保存。本室根据长期的工作实践, 摸索出一种简易且又能较长期保存蛙粪霉菌及其它真菌种的方法, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌种

蛙粪霉菌 F95 和产黄青霉菌 F94 各 1 株为上海华山医院真菌室 1985 年惠赠, 其中蛙粪霉菌在本实验前贮藏于 22℃ 温箱, 每 20d 左右转种一次。红色毛癣菌 W116、犬小孢子菌 W144、石膏样小孢子菌 W158、许兰氏毛癣菌 W83 和黑曲霉菌 W45 各 1 株, 均为本室从临床病原材料分离。

1.2 保存方法

1.2.1 几种介质的制备: 0.005% 碳酸钙盐水、0.85% 生理盐水分别分装于中试管, 每管 10ml 高压灭菌 1×10^5 Pa 维持 15min; 1% 葡萄糖液、沙氏液体培养基分别分装于中试管, 每管 10ml,

高压灭菌 0.7×10^5 Pa 维持 20min。

1.2.2 培养及培养物悬液: 各真菌种均接种沙氏斜面培养基试管中, 25℃ 温箱培养 7~14d。用接种棒将斜面培养物(菌丝和孢子)挑起转至组织研磨器中, 分别将各菌种培养物注入上述不同的介质 10ml, 并充分研磨成匀浆悬液。然后再将匀浆悬液装至 9 只无菌康氏管内, 每只约 3ml, 用橡皮塞塞紧, 管口外再缠以胶布。

1.2.3 贮藏温度: 将已分别盛有相同介质制成匀浆悬液的康氏管分别置 4℃ 冰箱、室温和 22℃ 温箱贮藏。每种菌的同一保存介质分别于不同贮藏温度各存放 3 只, 以观察各管间存活时间的差异。

1.3 恢复培养及形态特征的检查

每月用定量接种环(约 0.01ml)挑起一环蛙粪霉菌匀浆悬液至沙氏斜面培养基, 25℃ 温箱培养后观察其存活力, 其余真菌每两月观察一次存活力。肉眼观察转种到沙氏斜面培养基上菌落的性状, 包括菌落外形、气生菌丝是否发

达，菌落表面有无放射状沟纹及凹陷、培养基正反面色泽等，并取培养物压片于显微镜下观察菌丝及孢子生长特征。

1.4 统计学分析

采用方差分析，多组均数间的两两比较及其显著性检验。

2 保存结果

2.1 蛙粪霉菌的贮藏效果

分别于四种不同保存介质中保藏置 3 种不同温度下贮藏的蛙粪霉菌的存活时间，见表 1。

由附表可见 0.005% 碳酸钙盐水作为保藏介质效果最佳，贮藏温度以 22℃ 为宜。采用各组均数间的两两比较统计，生理盐水与沙氏液体培养基和 1% 葡萄糖的差异有高度显著性 ($q>5.64$ 和 4.75 , $P<0.01$)，而 0.005% 碳酸钙盐水与生理盐水间的差异也有高度显著性 ($q>4.89$, $p<0.01$)。22℃ 作为贮藏温度对于蛙粪霉菌的存活效果明显优于室温 (4~37℃) 及 4℃ 冰箱，经各组均数间的两两比较统计证明，贮藏效果有高度显著性差异 ($q>6.33$, $p<0.01$)。恢复培养与斜面定期转种保存的蛙粪霉菌相比，除随着保存时间延长，生长速度

表1 蛙粪霉菌等真菌于不同保藏介质及不同温度下贮藏的存活时间(月)

菌 名	0.85%生理盐水			1%葡萄糖液			沙氏液体培养基			0.005%碳酸钙盐水		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
蛙粪霉菌 <i>Basidiobolus</i> sp.	<1	3~4	21	<1	3~4	7	<1	3~4	9	<1	3~4	39
黑曲霉菌 <i>Aspergillus niger</i>	26	26	26	26	26	26	31	31	31	>48	>48	>48
产黄青霉菌 <i>Penicillium chrysogenum</i>	31	31	31	26	26	26	26	26	26	>48	>48	>48
红色毛癣菌 <i>Trichophyton simii</i>	26	26	26	6	6	6	6	6	6	>48	>48	>48
犬小孢子菌 <i>Microsporum canis</i>	31	31	31	6	6	6	6	6	6	40	40	40
石膏样小孢子菌 <i>Microsporum gypsum</i>	26	26	26	8	8	8	8	8	8	>48	>48	>48
许兰氏毛癣菌 <i>Trichophyton schoenleinii</i>	6	12	12	6	12	12	6	12	12	6	12	12

A=4℃ 冰箱 B=室温 C=22℃ 温箱

略有减慢外(一般为 2~6d 即可见生长现象)，菌落外观、色泽不规则皱褶等及显微镜下形态均无明显改变。

2.2 常见污染真菌的保藏效果

各保藏温度对黑曲霉菌和产黄青霉菌的贮藏无明显影响，见附表。由附表还可见 4 种保藏介质中，黑曲霉菌、产黄青霉菌在 0.005% 的碳酸钙盐水中存活时间最长，达 4 年之久，经各组均数间的两两比较统计表明，0.005%

碳酸钙盐水与生理盐水、沙氏液体培养基和 1% 葡萄糖液间的差异有高度显著性 ($q>4.64$, $p<0.01$)。恢复培养的黑曲霉菌和产黄青霉菌，其生成速度、菌落外观及显微镜下形态与原种相比无明显改变。

2.3 几种皮肤癣菌的保藏效果

3 种贮藏温度对皮肤癣菌保藏的存活时间无明显影响(除许兰氏毛癣菌外)。0.005% 碳酸钙盐水作为保藏介质效果明显优于另外 3 种介

质(见表1)。经各组均数间的两两比较统计表明, 0.005% 碳酸钙盐水与另外3种介质有高度显著性差异($q > 4.37$, $p < 0.01$)。4种介质均可用于许兰氏毛癣菌的保藏, 但4℃冰箱贮藏效果欠佳(见表1)。恢复培养的各皮肤癣菌其生长速度、菌落外观、色泽等及显微镜下形态与保存前无明显改变。

本实验各菌种在不同保藏管之间的存活时间无明显差异。

3 讨论

众所周知的冷冻干燥法和液态氮冻结法是认为保存各类菌种最好的方法, 但由于蛙粪霉菌不耐寒冷而不宜用该类方法保藏。本研究在冬夏两季分别进行的观察证明, 在该实验环境下, 随着室温的变化, 当温度接近4℃时(约12份)以及室温过高时(约37℃), 发现蛙粪霉菌很快死亡。此外, 本室还采用砂石、甘油等作为保藏介质保藏蛙粪霉菌, 其效果也不甚理想。本实验采用0.005% 碳酸钙盐水、生理盐水、沙氏液体培养基和1% 葡萄糖液四种介质保藏该菌, 结果表明: 于22℃贮藏0.005% 的碳酸钙盐水作为保藏介质其存活时间最长(39个月), 其次为生理盐水。本实验基本解决了保藏蛙粪霉菌须每20d左右传代保种的麻烦。

本文选用黑曲霉菌和产黄青霉菌作为常见

污染真菌的代表种, 实验结果显示, 这两种真菌的保藏不受温度的影响, 四种保藏介质亦均可用于这两种真菌的保藏。0.005% 的碳酸钙盐水作为保藏介质效果最好, 两菌均存活4年之久。本实验为该菌种提供了一种简便、实用且易推广的保藏方法。

前人已总结有许多保藏菌种的方法^[1], 尤其是冷冻真空干燥法, 在保藏效果上已得到充分肯定, 但由于该法需要一定的设备条件, 而不适宜基层单位使用。本文通过对四种保藏介质的比较证实, 对于用一般方法较难保藏的皮肤癣菌——许氏毛癣菌的保藏效果的观察发现: 四种保藏介质均可用于该菌的保藏, 但贮藏温度以室温和22℃为宜。对于红色毛癣菌、犬小孢子菌、石膏样小孢子菌的皮肤癣菌保藏, 虽然不受三种贮藏温度的影响, 但0.005% 碳酸钙盐水和生理盐水作为保藏介质, 其效果明显优于沙氏液体培养基和1% 葡萄糖液, 与上述污染真菌不完全相同(见表1)。

本文保藏真菌种的方法简便实用, 保藏时间较长, 值得基层单位试用。本实验结果还提示, 保藏介质和贮藏温度是各类不同菌种长期保藏的极为重要的因素, 值得我们进一步探讨和研究。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所主编. 菌种保藏手册, 北京: 科学出版社, 1980年。

COMPARRISON OF PRESERVATION EFFECT OF *BASIDIOLUS* SP. ETC. FUNGAL SPECIES BY SEVERAL PROTECTORS

Huang Qinghua Bai Jinxia Zheng Yuechen Ye Siying

(Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Tongji Medical University, Wuhan 430030)

Abstract *Basidiobolus* sp., *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichophyton simii*, *Microsporum gypseum* and *Trichophyton schoenleinii* were preserved with 4 different protectors that 0.005% calcium carbonate, 0.85% normal saline, 1% glucose liquid and Sabouraud's liquid medium. Every Fungal species was preserved with the same protector stored at 4℃, room temperature and 22℃, respectively. The results showed that *Basidiobolus* sp. only can stored at

22℃. There were very significant difference between 22℃ and room temperature as well as 4℃ on the survival time of *Fuagal* species ($p<0.01$). The preservation time were the more long with 0.005% calcium carbonate than the other protectors except *Trichophyton schoenleinii*, as long as 3~4 years. There were very significant difference between calcium carbonate vs normal saline and glucose liquid and sabouraud's liquid medium ($p<0.01$).

Key words *Basidiobolus* sp., Protector, Temperature