

水体中水霉游动孢子数定量测定的几种方法

梁 枝 荣

(中国科学院微生物研究所, 北京)

随着生态环境与人类关系的重要性逐渐为人们所认识,水生鞭毛真菌的主要类群之一——水霉科的生态研究也日益引起重视。下面介绍两种在水霉科生态研究中定量测定水体中水霉游动孢子数的方法。

一、琼脂块菌落计数法

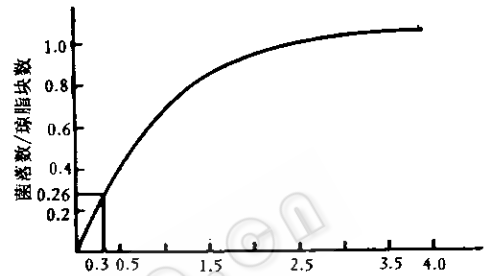
1. 采样: 一般从水体的边缘或中心 3—5 cm 深处采集 500 ml 左右, 装入无菌容器。

2. 分离: 采回的水样摇匀后立即分离。取 4 ml (如果水样内游动孢子较多, 则酌情少加, 用无菌水补到 4 ml, 一般需控制到阳性反应的琼脂块不超过 50%)。倒入加有冷至 42℃ 的 20ml CMA 培养基的培养皿中(平皿直径 9cm); 边倒边旋转摇动, 使培养基与水样充分混匀。每一水样可做 5—10 个重复。冷却后, 将平板均匀地切成 8 块, 分置于 4 个平皿内, 每个平皿加无菌水约 15 ml, 以刚淹没琼脂块为限, 要严防琼脂块重叠或紧靠在一起。

3. 培养: 一般在 20℃ 左右培养 4—6 天后, 即可在琼脂块边缘直接看到水霉菌丝。一个琼脂块上的菌丝往往由一个游动孢子(也可能是菌丝片断或芽孢等, 但绝大多数是游动孢子)形成。由于琼脂块被水淹没, 故一般水霉的竞争能力较强, 生长较快。为减少细菌等杂菌对水霉的影响, 可在培养 2—3 天后, 换水继续培养。

4. 计数: 水霉科的菌丝无分隔, 较粗(直径一般在 8μ 以上)、较直、分枝少, 一般从菌丝形态即可确定, 如没有把握, 则须培养到长出孢子囊。凡长出水霉科菌丝的琼脂块, 均按含一个游动孢子计数, 当然也有可能由 2 个以上的游动孢子形成, 水样内水霉游动孢子含量愈高, 这

种可能性就愈大, 由此造成的误差可参照 Wiloughby^[1] 的方法校正(图 1)。



实际游动孢子数/琼脂块数

图 1 定量测定水霉游动孢子数的校正曲线

例: 水样总量=40 ml

琼脂块数=80 块

出现菌落的琼脂块数=21 块

近似值: $21 \times \frac{1000 \text{ ml}}{40 \text{ ml}} = 525$ 个游动孢子/1 水样

琼脂块上的菌落平均数: $21/80=0.26$

根据校正曲线中相对应的实际值=0.3, 琼脂块中游动孢子实际数: $0.3 \times 80=24$, 故每 1000 ml 中含有 $24 \times$

$\frac{1000 \text{ ml}}{40 \text{ ml}} = 600$ 个游动孢子。

二、麻籽菌落计数法

根据 Ho^[2] 的研究,水霉游动孢子在水样内能主动地游向大麻籽(*Cannabis sativa* L.) 饵料。我们在工作中也发现, 仅一个游动孢子在 36—48 小时之内即可在一片大麻籽碎片上形成一个肉眼可看到的菌落。因此, 如利用游动孢子对麻籽饵料的趋向性, 一个平皿内只要有足够量的麻籽碎片并使它们分布均匀, 水样内的游动孢子就可分别在麻籽上形成菌落。根据这个设想, 我们试用了麻籽菌落计数法, 具体步骤如下:

1. 水样采回后, 根据对水样内含菌量的估

本工作承余永年先生指导, 唐雯同志绘图, 谨致谢忱。

测,在直径 9 cm 的平皿内,定量加入 10—30 ml 水样,并用无菌水补加到 30 ml,然后加入 10 片左右沸水煮过的大麻籽,并使之均匀分布,每一水样重复做 5 个平皿。

2. 20℃ 左右培养 36 小时后,连续 5 天每 12 小时观察 1 次,形成菌落的麻籽立即挑出、计数,如菌落上已有孢子囊形成并已释放,则此平皿内 36 小时后形成的与此属相同的菌落均看作第二代而不计数。水样内的游动孢子大多在 4 天内即形成菌落,仅有极少数 4 天后形成。因此,凡第 4 天以后形成的菌落,如此平皿内已有同属菌落形成,则均看作第二代而不计数。

3. 挑出的菌落转入另一平皿,加水培养,待形成游动孢子囊并释放后即可鉴定到属。必要时可继续培养鉴定到种。将 5 个平皿内计数的各属菌落数分别相加,参照图 1 求出校正后值,按照下列公式换算成 1000 ml 水样内游动孢子总数。

$$\frac{5 \text{ 个平皿内游动孢子总数}}{5 \text{ 个平皿内水样总 ml 数}} \times 1000 \text{ ml}$$

为了证实这种方法的准确性和可靠性,我们分别用绵霉属(*Achlya*)和水霉属(*Saprolegnia*)的纯孢子悬液进行了初步验证:

取 5 个平皿各加入 5 ml 1% 的绵霉属游动孢子悬液,另取 7 个平皿各加入 5 ml 0.5% 的水霉属游动孢子悬液,均用无菌水补加到 30 ml,再各加入 10 片左右大麻籽碎片,按上法培养计

数,结果:绵霉属各皿菌落数分别为:3、7、4、5、3 个,菌落总数 22 个,理论值为 25 个,校正值为 28 个。水霉属各皿菌落数分别为 3、3、3、2、3、3、0 个,菌落总数 17 个,理论值为 18 个,校正值为 19 个。

两个属的实验结果表明,此法所得结果与孢子悬液内游动孢子数的理论值接近,数值略为偏高的原因可能是制取孢子悬液和计数时造成的误差。

三、讨论

迄今还没有一种理想的对水霉进行定量测定的方法^[3]。本文所介绍的两种方法也各有利弊。采用琼脂块菌落计数法测定清洁水体里水霉游动孢子数时,由于培养基能与水霉繁殖体充分接触而有利于萌发,并且便于准确计数,但用此法测定污水里水霉游动孢子的数量时,往往由于杂菌的严重污染而不易成功。而且此法的最大缺陷是工作量太大,不易进行大量的水样分析。麻籽菌落计数法的最大优点是较简便,能进行大量的水样分析,但在观察计数时极易造成误差,稍一疏忽,不能将形成孢子囊的菌落即时挑出,孢子囊一旦释放后,就会造成下一步计数的困难,影响结果的准确性。

参 考 文 献

- [1] Willoughby, L. G.: *J. Ecol.* 50: 733—759, 1962.
- [2] Ho, H. H.: *Mycologia* 67: 425, 1975.
- [3] 余永年,梁校荣: *真菌学报*, 2(3): 179—186, 1983.