

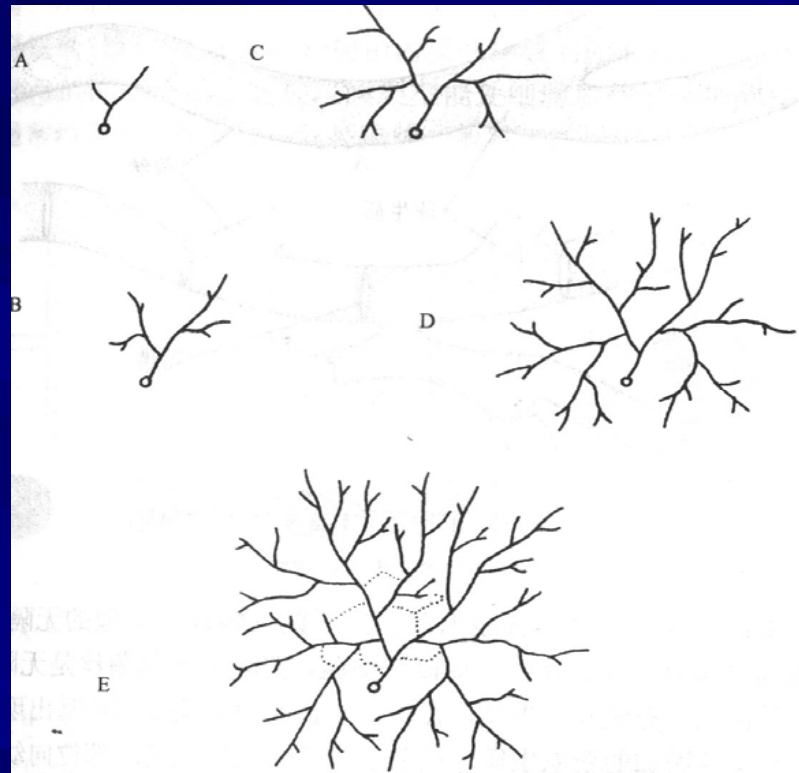
## 实验六 丝状真菌生长的测定

### 一、实验目的

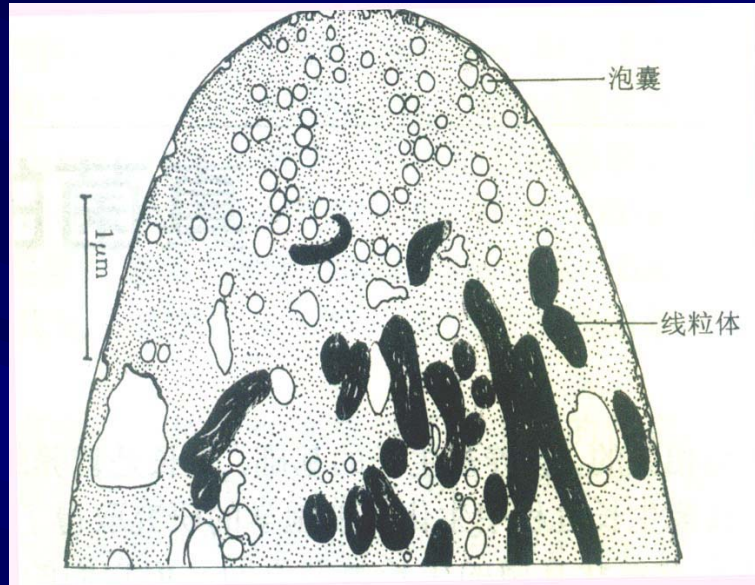
学习和掌握丝状真菌生长测定的三种方法。

### 二、实验原理

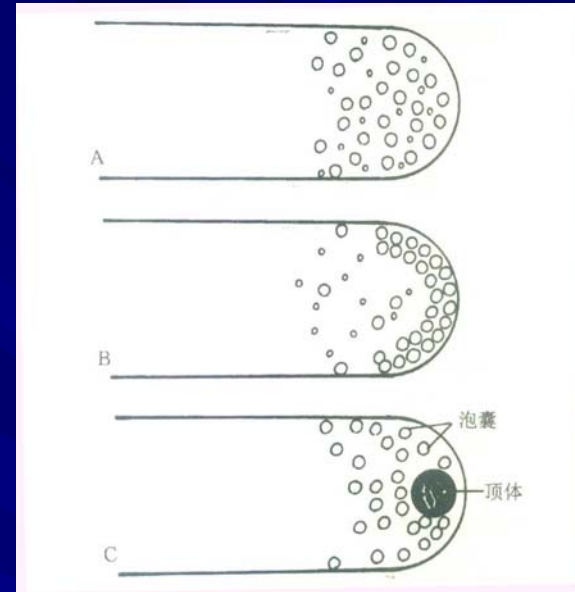
通过三种测定方法观察丝状真菌的生长，验证丝状真菌顶端延长生长的机理。



## 一、菌丝顶端生长的泡囊学说



蜜环菌菌丝顶端区域，顶端原生质膜凹入部位，即为泡囊与原生质膜的融合



卵菌纲

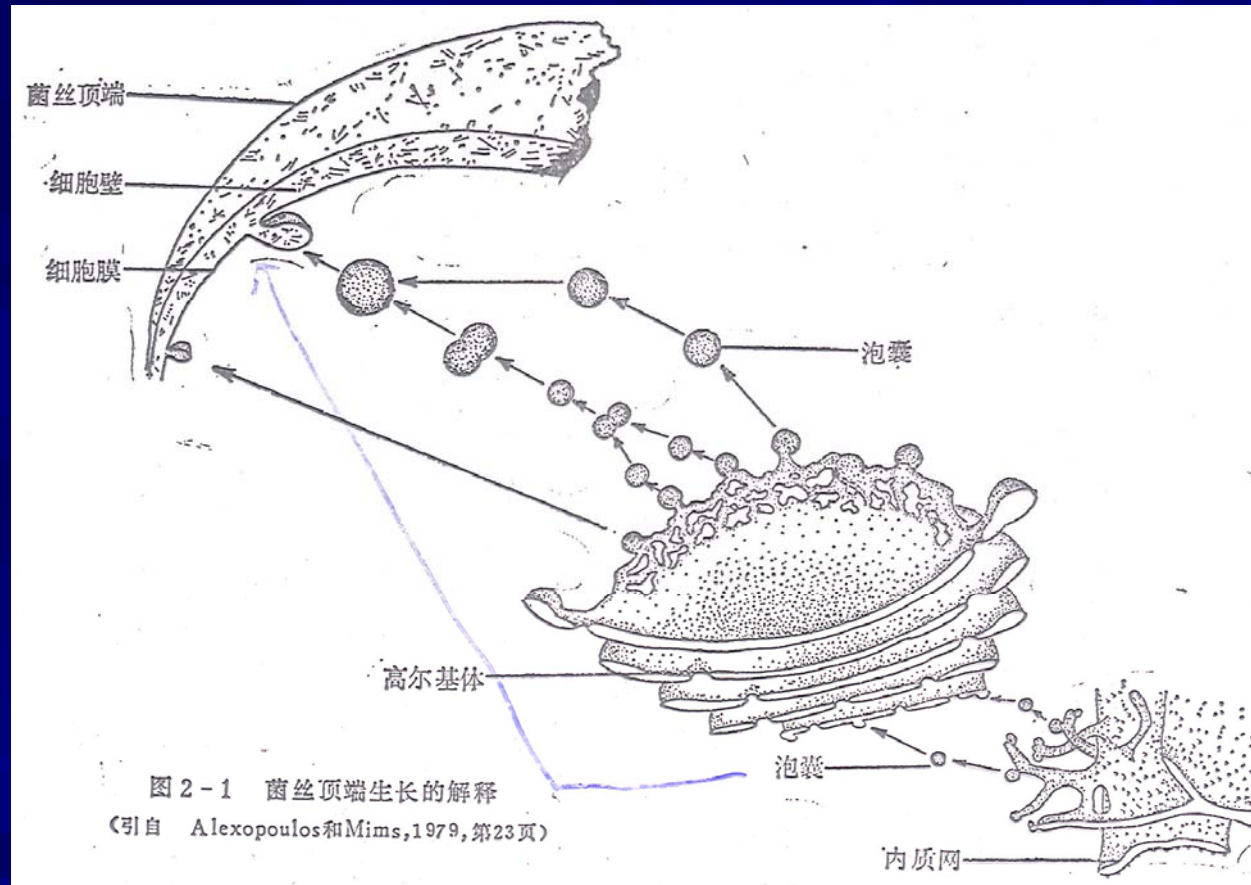
接合菌纲

有隔真菌

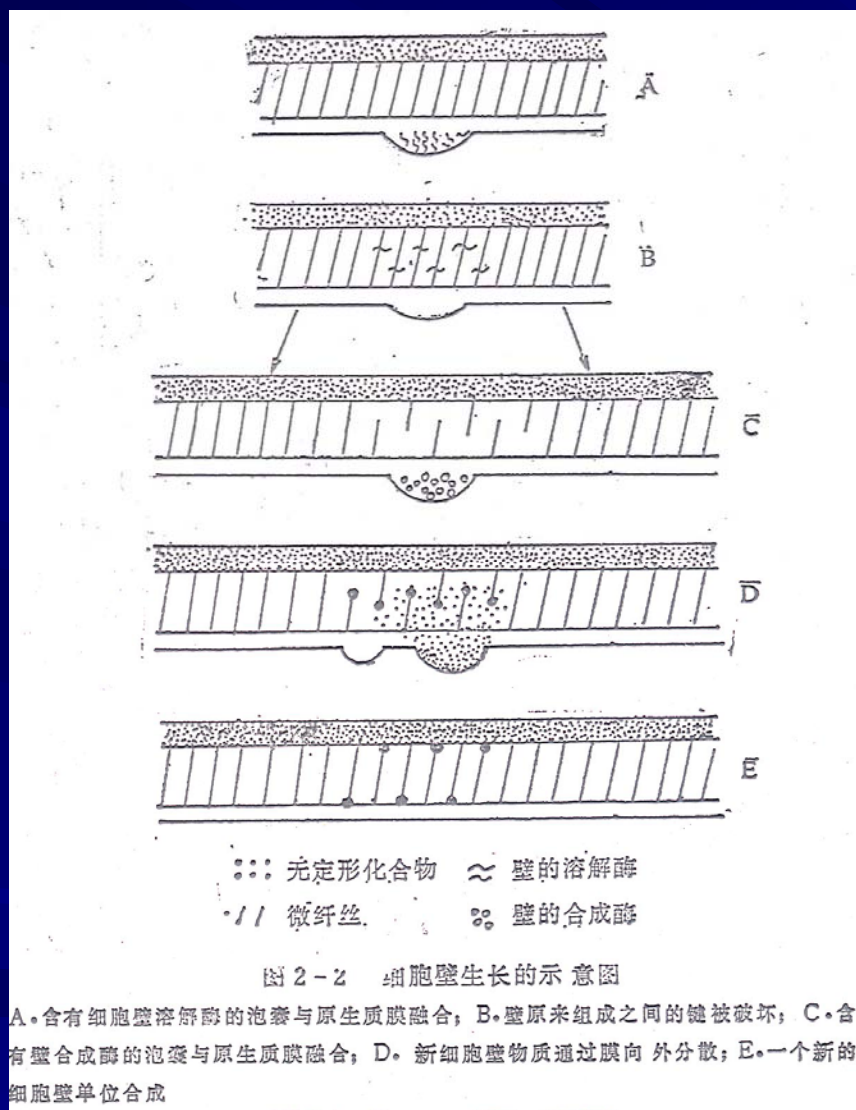
菌丝顶端泡囊排列的主要类型

细胞质的泡囊起源于高尔基体，高尔基体、核、内质网一起存在于亚顶端部位。

1970年，Grove等人提出了菌丝顶端生长的泡囊假说：



## 二、菌丝顶端生长的机制



泡囊作用的三重性:

1. 运输细胞壁溶解酶去破坏原来壁组成之间的键;
2. 运输新的壁物质, 并在壁合成酶的作用下并入细胞壁中, 增加了壁的面积;
3. 在生长期增加了原生质膜的表面积

顶端生长被认为是细胞壁水解、壁的合成和壁的膨压之间的动力平衡



### 三、顶端生长的驱动力

对细胞质流、微管和电位势梯度的研究都支持和解释了泡囊移动现象。

第一，细胞质的流动驱使和带动泡囊移向顶端；

第二，泡囊借助于顶端和亚顶端区域之间水的电位势梯度而驱动；

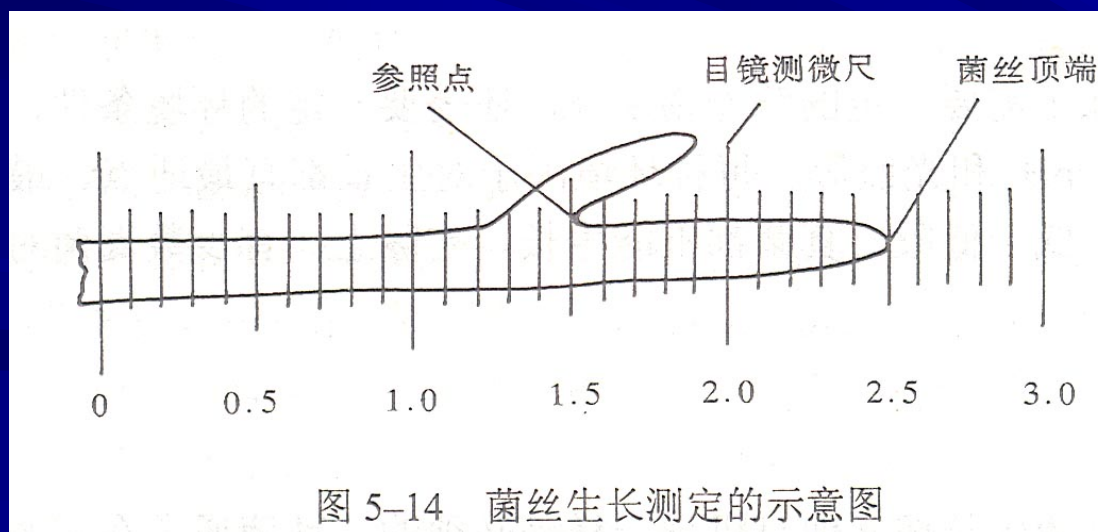
第三，在菌丝细胞中，微管与菌丝生长方向平行，因此，可能微管运输泡囊到菌丝顶端，如果菌丝顶端细胞有顶体的话，可能先运输到顶体部位，然后由顶体直接运动这些泡囊到质膜。

## 一、直线生长的测定

直线生长的测定目前主要应用下述三种方法：

### (一) 菌丝生长的测定

这一方法是将待测菌株点于培养基平板的中心，生长一定时间后，将平板置于显微镜台上，同时校对所用显微镜的目镜测微尺，并计算每一格的长度。在菌落边缘选择单根菌丝的顶端在低倍镜下聚焦。然后将目镜测微尺与菌丝平行，并选择菌丝开始出现侧枝的部位与目镜测微尺上的一条划线重合，这个点即为“参照点”。每隔一定时间测量一次菌丝生长的长度，观察数次后，根据时间和顶端延长生长的长度划一条生长曲线，并求出增长速度(毫米/小时)。



## （二）菌落生长速度的测定

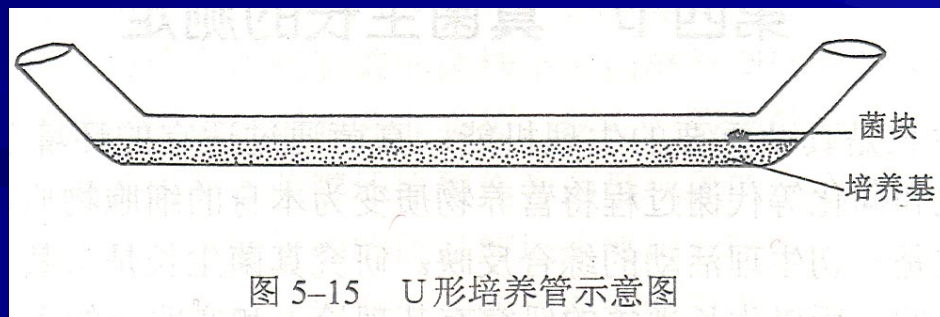
测定菌落的半径或直径来表示生长的快慢是比较简便的方法。定期测量一个菌落，能够看出真菌生长的过程 and 变化。因为它不是一种很准确的方法，目前常用来作为初步测定。

常用的方法是将待测菌株点种于培养基平板上，每隔一定时间测量菌落的半径或直径。如以时间和生长量作曲线，在一定限度内生长量与时间成直线关系。

## （三）直线生长速率的测定

这一方法使用并不广泛。它是在“U”形培养管中进行的。培养管长40厘米，内径约1.3厘米，在两端5厘米处弯成45°角，如图所示。

在培养管中加入适量的溶化的琼脂培养基，达到培养管直径的一半，两端加棉塞后灭菌。凝固后从一端接种，然后按时测定生长距离，并计算生长率。





## 二、测定菌丝干重法

**菌体干重法：**液体培养真菌的生长期完成后，过滤菌丝、洗涤、离心、烘干、称量干重。这种测定法比较直接而可靠，但仅适用于菌体浓度较高的样品，而且要求样品中不含有菌体以外的其它干物质。

**菌体湿重法：**也可以采用测定菌丝湿重法，把烘干步骤省去。但无论测定干重或湿重，大都用于工业发酵过程的检测。

真菌的生长还可用**间接的方法**测定，如**全氮量**和**核糖核酸**的分析，一般干的菌丝体含氮量是4.5-8.5%，核糖核酸是2.0-4.0%。另外，还可以分析培养基中**糖的消耗量**、**氧的吸收量**等作为测定生长量的指标。这些方法大都是工业生产中所采用的方法。

#### 四、实验内容：菌丝顶端延长生长的测定

1. 配制 PDA培养基，高压灭菌备用
2. 制备PDA培养基平板，在平板中心点接黑根霉，于28℃培养15h左右。
3. 用显微镜的镜台测微尺来校对目镜测微尺。镜台测微尺100格共长1mm，每格为10 μ m，标定目镜测微尺上每小格表示多少 μ m。
4. 将黑根霉平板放置于显微镜台上，在菌落边缘选择单根菌丝边缘，在低倍镜下聚焦。
5. 将目镜测微尺与菌丝平行，并选择菌丝开始出现侧枝的位置与目镜测微尺上的一条划线重合，这个点即为“参照点”。
6. 每隔一定时间（分钟）测量一次菌的生长长度。
7. 观察五次后，根据时间和延长生长的长度绘制延长生长曲线，并求出增长速度（mm/h）：

$$S = \frac{L \times 10^{-3} \times 60}{t} = \text{mm/h}$$

S: 速度      L: 长度（μ m）      t: 时间（min）

## 五、实验报告

上述方法要求严格按操作规程及时观察，认真记录，在报告中分别绘制生长曲线，计算出增长速度。

## 六、思考题

1. 丝状真菌生长量的测定与细菌、酵母菌单细胞生物生长量的测定有何不同？
2. 工业上常用菌丝干重法或湿重法来测定丝状真菌的生长情况，请简述之。
3. 除了实验中的方法外，还有哪些间接方法来测定丝状真菌的生长？
4. 丝状真菌顶端延长生长的机理是什么？