



耐热真菌 HS1-1 的生理特性和抗菌活性

黄晓欣^{1,2}, 谈嘉莉^{1,2}, 杨永星^{1,2}, 顾哲铭^{1,2}, 李雪琰^{1,2}, 雷晓凌^{1,2}

(1. 广东海洋大学 食品科技学院/广东省水产品加工与安全重点实验室/广东省海洋食品工程技术研究中心/广东省海洋生物制品工程实验室/水产品深加工广东普通高等学校重点实验室, 广东 湛江 524088;

2. 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心/大连工业大学, 辽宁 大连 116034)

摘要: 湖光岩玛珥湖(Huguangyan Maar Lake)地理环境特殊, 对于挖掘特殊生境耐热真菌资源具有较大潜力。对1株来源于湖光岩玛珥湖的耐热真菌 HS1-1 进行了形态观察, 分子鉴定和生理特性、产酶能力、抗菌活性的测定。结果表明, 该真菌为烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*), 菌株在 15~50℃ 和 pH3~12 均能生长, 最适生长条件是温度 40℃, 盐浓度 1%~2%, pH6~7; 经4种产酶培养基筛选确定菌株对可溶性淀粉、乳糖、羧甲基纤维素有较强的利用能力, 对5种指示菌有一定抑制效果。说明真菌 HS1-1 具有较强耐热特性、酸碱耐受性和一定的抗菌活性。本研究对深入了解湖光岩玛珥湖耐热真菌并对其进一步开发利用提供理论基础。

关键词: 耐热真菌; 分子鉴定; 生理生长; 活性研究; 湖光岩

中图分类号: Q93-331 文献标志码: A 文章编号: 1674-7054(2023)05-0552-08

黄晓欣, 谈嘉莉, 杨永星, 等. 耐热真菌 HS1-1 的生理特性和抗菌活性 [J]. 热带生物学报, 2023, 14(5): 552-559. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20220047

微生物生长环境多样, 在生物进化过程中形成了自己独特的生长代谢机制。耐热真菌是一类最高生长温度在 50℃ 左右(通常为 40℃ 或 40℃ 以上), 最低生长温度在 20℃ 以下的特殊真菌类群^[1], 极端环境(高温、低温、强酸、强碱、高盐等)微生物有自己特定的代谢方式、独特基因类型及特殊生理机制, 耐热真菌是可以在高温条件下生长的适应极端环境的真核微生物, 其特殊生长代谢机制使产生特殊代谢产物、获取新生物技术手段成为可能^[2]。耐热真菌的分布范围广泛, 世界上已描述和报道的耐热真菌有 89 种, 我国报道的有 23 种^[3]。Salar 等^[4] 从印度北部的温带土壤中分离出 19 种嗜热和耐热真菌。Michele 等^[5] 从番石榴叶中分离得到 1 株耐热真菌拟青霉(*Paecilomyces variotii*), 并从拟青霉中分离出以 55℃ 为最适反应温度, pH 为 5.0 的热稳定性糖化酶。詹发强等^[6]

从新疆棉花秸秆高温堆肥中分离得到的耐热真菌 Z1、Z2 在降解农作物废弃秸秆中具有较高的应用价值。耐热真菌的生理生长特点是耐热性(最高温度、最适温度、最低温度), 这是区分耐热真菌与非耐热真菌的重要依据^[2]。另外, 通过菌株分离经形态学鉴定等手段对耐热真菌的种类鉴别意义重大。目前对于耐热真菌的研究国内外把重心放在菌种鉴定和生理特性研究上, 而对产物活性研究报道不多。由于生长环境的不同, 来源各异的耐热菌存在特有的生长温度、pH 值、盐浓度等的耐受性和其发酵产物的抗菌活性之间会有较大不同, 深入研究可丰富相关基础理论。

我国国土面积辽阔, 气候类型丰富多样, 为耐热真菌提供良好生长环境。湖光岩玛珥湖位于广东省湛江市湖光岩风景区内, 是经火山喷发而形成的独特湖泊, 其受外界干扰小, 特殊的生境为生

收稿日期: 2022-03-01 修回日期: 2022-10-10

基金项目: 深圳市科创委基础研究面上项目(JCYJ20190813105005619); 广东省普通高校重点领域专项(生物医药与健康)(2021ZDZX2064); 广东省科技专项资金-基础与应用基础研究专题(2021A50114)

第一作者: 黄晓欣(1998-), 女, 广东海洋大学 2021 级硕士研究生. 研究方向: 海洋微生物学、海洋微塑料检测. E-mail: 2486126987@qq.com

通信作者: 雷晓凌(1963-), 女, 博士, 教授. 研究方向: 海洋微生物学及其活性物质. E-mail: leixl-19@126.com

物进化形成新菌种提供可能。秦青英等^[7]研究湖光岩玛珉湖游细菌组成时发现其菌落结构较为独特,微生物资源丰富且新颖。刘颖等^[8]分离了湖光岩土壤放线菌,并测定了其抗菌活性,分离出23株菌,且其中60.9%有抗菌活性。耐热真菌的来源多种多样,这表明极有可能从湖光岩独特的地理环境中发现耐热真菌。耐热真菌有产酶等方面潜力,故以湖光岩玛珉湖为开发来源的菌株的特殊功能和活性值得探究和开发。本研究以广东省湛江市湖光岩玛珉湖分离得到1株耐热真菌HS1-1为出发菌株,对该菌进行形态学及分子水平鉴定,研究其生理特性,产酶能力及抗菌活性,以期为该菌的进一步研究与开发提供基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 2020年11月3日从湛江市湖光岩风景区距离湖面1~2m的岸上5~15cm深度采集的土壤中分离获得菌株,经44℃初筛和19℃复筛^[9-10],确定为耐热真菌。在取样分离中

以耐热真菌条件共分离4株耐热真菌,选择其中的HS1-1菌株为供试菌株。

抗菌活性指示菌:交替假单胞菌属SL-1(*Pseudoalteromonas* sp., 登录号:FJ404757.1)、吉氏库特氏菌属SL-2(*Kurthia gibsonii* strain, 登录号:EF032685.1)均为笔者所在的课题组从冷冻虾仁中分离鉴定保存的优势腐败菌;大肠杆菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)均为笔者所在实验室保存的菌。

1.2 培养基来源 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):广东环凯微生物科技有限公司;马铃薯葡萄糖肉汤(PDB):杭州微生物试剂有限公司;改良马丁琼脂培养基:广东环凯微生物科技有限公司;改良马丁培养基:北京陆桥技术股份有限公司;营养琼脂:北京陆桥技术股份有限公司。淀粉酶培养基^[11]、糖苷酶培养基^[12]、纤维素酶培养基^[13]、壳聚糖酶培养基^[14]4种产酶筛选培养基配制方法参照文献并稍作修改,具体配方见表1。

表1 产酶培养基

| 产酶培养基 | 配方 |
|---------|--|
| 淀粉酶培养基 | 可溶性淀粉20.0 g·L ⁻¹ , KCl 0.5 g·L ⁻¹ , NaNO ₃ 2.0 g·L ⁻¹ , K ₃ PO ₄ 1.0 g·L ⁻¹ , MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g·L ⁻¹ , 琼脂18.0 g·L ⁻¹ , 海水晶30.0 g·L ⁻¹ , ddH ₂ O 1000 mL |
| 糖苷酶培养基 | 乳糖 10.0 g·L ⁻¹ , K ₂ HPO ₄ 1.0 g·L ⁻¹ , FeSO ₄ 0.01 g·L ⁻¹ , NaNO ₃ 3.0 g·L ⁻¹ , KCl 0.5 g·L ⁻¹ , MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g·L ⁻¹ , 琼脂15.0 g·L ⁻¹ , dd H ₂ O 1000 mL |
| 纤维素酶培养基 | 羧甲基纤维素8.0 g·L ⁻¹ , KCl 0.5 g·L ⁻¹ , NaNO ₃ 3.0 g·L ⁻¹ , FeSO ₄ 0.01 g·L ⁻¹ , K ₂ HPO ₄ 1.0 g·L ⁻¹ , MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g·L ⁻¹ , 氯霉素0.05 g·L ⁻¹ , 琼脂20.0 g·L ⁻¹ , ddH ₂ O 1000 mL, pH6.0 |
| 壳聚糖酶培养基 | 壳聚糖10.0 g·L ⁻¹ , CaCO ₃ 6.0 g·L ⁻¹ , MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.25 g·L ⁻¹ , (NH ₄) ₂ SO ₄ 2.5 g·L ⁻¹ , K ₂ HPO ₄ 0.02 g·L ⁻¹ , NaCl 4.0 g·L ⁻¹ , 琼脂20.0 g·L ⁻¹ , pH6.0 |

1.3 耐热真菌 HS1-1 的鉴定 用点植法将菌株HS1-1分别接种于PDA和改良马丁琼脂培养基中,于35℃恒温培养箱中培养2~5d,观察菌落形态特征。

从培养基挑取少许菌丝,用乳酸石炭酸绵蓝染液染色,压片法镜检,初步鉴定菌株^[15]并完成的个体形态观察。

将活化到第三代的菌株HS1-1送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行PCR扩增、测序,完成分子鉴定。分子鉴定的具体内容:分子生物学鉴定即采用内部转录间隔区(ITS)测序的方法,选用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'),采用菌落PCR的方法对筛选得到的耐热真菌

HS1-1的ITS序列进行扩增。PCR扩增体系:引物ITS1和ITS4各1μL,10X PCR Buffer、dNTP(each 10 mmol·L⁻¹)、Taq Plus DNA Polymerase(5 U·μL⁻¹)共12.5 μL,50 mmol·L⁻¹ MgSO₄和Template(DNA)各1 μL,ddH₂O 9.5 μL,总体积为25 μL;PCR扩增条件:95℃ 5 min;94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 90 s,共30次循环;72℃ 10 min。将PCR产物的测序结果用NCBI数据库进行BLAST对比分析,查找亲缘性近、相似性高的菌株基因序列。采用MEGA 7软件中N-J法(neighbor-joining method)自举1000次,确定菌种属并建立系统发育树。

1.4 耐热真菌 HS1-1 的生理特性研究

1.4.1 温度对菌株生长的影响 采用点植法将菌

株接种于改良马丁琼脂培养基中,倒置于 15、20、25、30、35、40、45、50℃ 恒温培养箱培养 7 d,于 HH.S11-2 电热恒温水浴锅 55℃ 培养 7 d,每个温度条件设置 3 个平行,采用交叉法测量菌落直径并观察菌落形态。

1.4.2 盐浓度对菌株生长的影响 在改良马丁琼脂培养基中分别加入 0、1%、2%、3%、4%、5%、6%、8%、10% 的 NaCl,用点植法接种菌株于培养基上,并置于 35℃ 下培养,每个盐浓度设置 3 个平行,测量菌落直径并观察菌落形态。

1.4.3 pH 对菌株生长的影响 调节改良马丁琼脂培养基的 pH 为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0。用点植法接种菌株于培养基上,并置于 35℃ 下培养,每个梯度设置 3 个平行重复,测量菌落直径及观察菌落形态。

1.5 耐热真菌 HS1-1 的产酶特性研究 将菌株 HS1-1 分别接种到 4 种产酶筛选培养基中,倒置于恒温培养箱中 35℃ 培养 3~7 d,每种产酶培养基做 3 个平行。壳聚糖酶培养基能力的确定是通过观察菌落周围是否产生透明圈^[14],淀粉酶结果通过碘液染色观察水解圈的大小来确定;检测糖苷酶以菌落周围有无蓝色产生为依据,有则说明有产糖苷酶的能力,反之,则无。纤维素酶培养基需要用 95% 乙醇配制的 0.1% 刚果红染色液染色,再用 1 mol·L⁻¹ 氯化钠脱色,染色和脱色时间均为 1 h^[16],观察是否出现脱色圈。

1.6 耐热真菌 HS1-1 的抗菌活性测定 将活化好的菌株 HS1-1 挑取一环分别接种到装有 100 mL PDB 和改良马丁培养基的 250 mL 三角瓶中,35℃,135 r·min⁻¹ 摇床(HZQ-F160 振荡培养箱)培养 7 d,经真空抽滤和微孔滤膜过滤后,取部分发酵液,用 N-1100D-WB 旋转蒸发器浓缩 5 倍,发酵原液和浓缩液均用于抗菌活性测定。

抗菌活性测定:挑取活化好的指示菌,接种到生理盐水中,振荡均匀并稀释不同倍数,制备成 OD₆₀₀ 值为 0.6 的菌悬液^[17]。在提前制备好的琼脂平板中放好无菌牛津杯,倒入含有 1:100 比例菌悬液的营养琼脂,待凝固后拔出牛津杯并注入 100 μL 发酵液或发酵浓缩液,于 4℃ 冰箱中扩散 3~4 h^[18],置于 37℃ 培养 24 h 并测量抑菌圈直径,抑菌圈直径算上牛津杯直径(牛津杯直径为 7.8 mm),无抑菌圈以牛津杯直径计。

1.7 数据处理 对菌落直径、抑菌圈直径等数据均利用 JMP Pro 软件进行显著性差异分析。取显著性水平 α 为 0.05,通过单因素方差分析,用所有对 Tukey HSD 来比较均值, $P < 0.05$ 表示有显著性差异,用不同英文字母表示具有显著性差异,最后采用 Origin 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 耐热真菌 HS1-1 的形态学及分子鉴定

2.1.1 菌落形态观察 耐热真菌 HS1-1 在 PDA 和改良马丁琼脂培养基上均能生长,且在改良马丁琼脂培养基上生长较为良好,因而用改良马丁琼脂培养基作为菌株培养的最适固体培养基。从图 1 可见,35℃ 培养 2~3 d 的菌落形态观察中发现菌落圆形平坦,菌丝自中央向外周延展,由致密到疏松,菌丝发达呈米黄色,有放射性皱褶和晕圈。随着不同培养天数、pH、温度和盐浓度变化,菌落呈现轻微颜色差别,或烟绿色或米黄色。

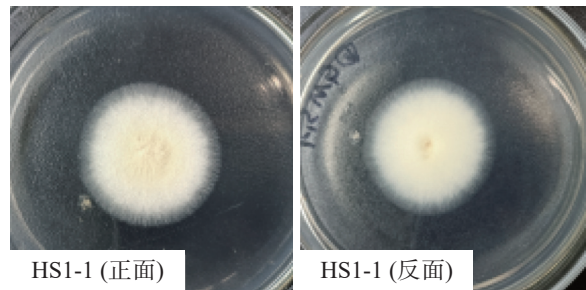


图 1 改良马丁琼脂培养基 2 d 菌落形态

2.1.2 个体形态观察 经显微镜观察(图 2)发现,菌株 HS1-1 培养 2 d 后菌丝透明且显青色,有分生孢子梗和分生孢子头,顶囊成烧瓶状,直径约 20 μm,小梗单层排列,成木栅状,孢子为球型,直径约 2.5 μm。初步鉴定菌株 HS1-1 为曲霉属。王世苗等^[19]观察烟曲霉呈绒状,颜色为暗烟绿色;电子显微镜结果观察到球形、绿色的分生孢子,分生孢子梗光滑,顶囊呈烧瓶状,与本研究菌株相似。

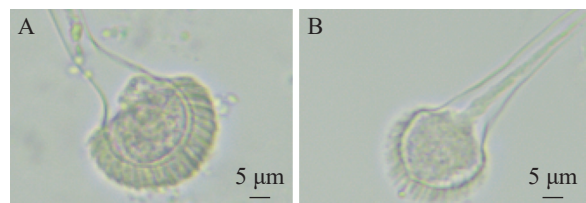


图 2 菌株 HS1-1 分生孢子头形态(10×40)

A: 成熟的分生孢子头和分生孢子, B: 刚形成的分生孢子头。

2.1.3 分子鉴定 经基因组 DNA 提取, PCR 扩增和凝胶电泳观察, 菌株 HS1-1 在 500 ~ 600 bp 有清晰条带。提交 ITS 序列至 GenBank 获得登录号, 利用 BLAST 进行同源性对比分析, 构建系统

发育树(图 3)。HS1-1(登录号为 MZ413293)与 *Aspergillus fumigatus* IR-SGS-Y5 聚在同一分支上, 遗传进化距离相近。结合形态学观察和分子鉴定, 确定该耐热真菌为烟曲霉。

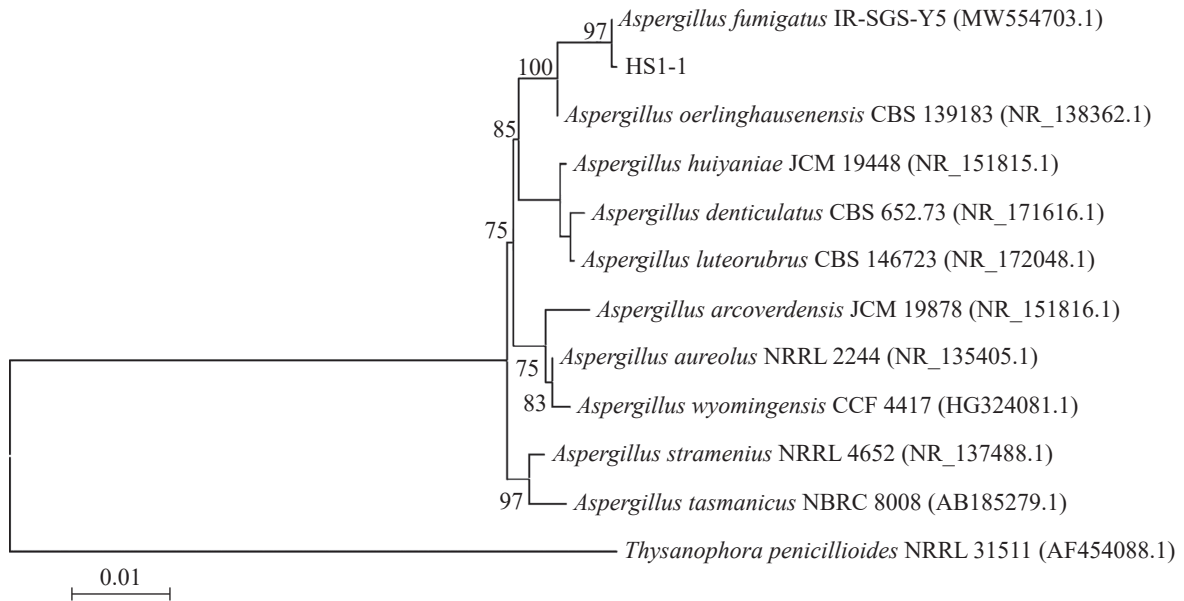


图 3 NJ法构建 HS1-1 的 ITS 序列系统发育树

2.2 耐热真菌 HS1-1 的生理特性研究

2.2.1 生长温度特性 不同温度条件下菌株生长情况见图 4。菌株 HS1-1 在 15 ~ 50℃ 的温度范围内均能生长, 15℃ 生长最缓慢, 55℃ 则无法生长。从 1 ~ 3 d 可看出, 40℃ 时生长速度明显高于其他温度, 其次是 35℃, 因此该菌最适生长温度为 40℃, 该菌在生长温度范围内的生长能力强弱顺序为 40℃、35℃、45℃、30℃、25℃、50℃、20℃、15℃。最适温度是 40℃, 50℃ 仍能生长, 具有明显耐热性, 为耐热真菌。烟曲霉最适生长温度一般为 37℃^[20], 有研究发现烟曲霉在 37℃ 培养时菌落直径最大, 且在 50℃、55℃ 仍能生长^[21],

这与本研究生长情况相似。观察不同温度菌落形态, 在设置的温度范围内, 较高或者较低温度条件下菌丝附着能力减弱, 孢子易脱落, 菌落沟纹加深, 颜色较浅。

2.2.2 不同盐浓度对菌株 HS1-1 的影响 菌株 HS1-1 在不同盐浓度的生长情况见表 2。在 35℃ 时菌株在 0 ~ 10% 的盐浓度范围内均能生长, 2 ~ 3 d 时 1% ~ 2% 盐浓度明显优于其他组, 4 d 时盐浓度 0 ~ 4% 的菌落直径均大于 84.3 mm, 接近平板直径。故该菌适宜盐浓度范围为 0 ~ 4%, 最佳生长盐浓度是 1% ~ 2%, 具备一定耐盐性。观察菌株第 7 天的生长形态发现, 不同盐浓度的菌落形态差异不大, 菌落中央向外周扩散呈现黄色由深变浅。

2.2.3 不同 pH 对菌株 HS1-1 的影响 不同 pH 条件下菌株生长情况见表 3。该菌在 pH 为 3 ~ 12 的范围内均能生长, pH 在 6 ~ 9 时长势良好, pH2 时菌株不生长。1 ~ 4 d 时 pH 为 6 和 7 时菌落直径显著大于其他 pH ($P < 0.05$), 表明该菌最适宜 pH 范围为 6 ~ 7, 且适应酸碱范围广, 具有极强耐酸碱能力。对比酸性条件(pH2 ~ pH3), 菌株在较碱性条件(pH11 ~ pH12)生长更具优势, 说明耐强碱能力强。不同 pH 菌落形态各异(图 5),

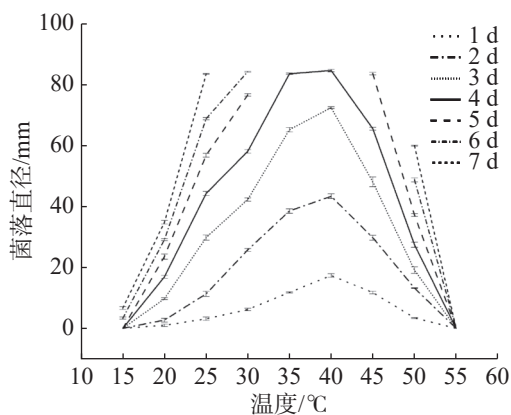


图 4 不同温度条件对菌株 HS1-1 生长的影响

表 2 不同盐浓度对菌株 HS1-1 生长的影响

| 盐浓度/% | 菌落直径/ mm | | | | | | |
|-------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | 1 d | 2 d | 3 d | 4 d | 5 d | 6 d | 7 d |
| 0 | 11.60±0.21a | 37.75±0.20d | 63.50±0.30c | 84.56±0.31a | | | |
| 1 | 10.89±0.45ab | 44.91±0.53a | 70.36±0.37a | 84.92±0.19a | | | |
| 2 | 10.53±0.73b | 43.74±0.03b | 69.69±0.76a | 84.58±0.40a | | | |
| 3 | 10.95±0.14ab | 41.09±0.30c | 65.78±0.19b | 84.33±0.11a | | | |
| 4 | 10.40±0.49b | 37.83±0.25d | 60.40±0.95d | 84.79±0.15a | | | |
| 5 | 9.05±0.07c | 34.31±0.25e | 55.98±0.52e | 79.38±0.83b | 84.30±0.28a | | |
| 6 | 7.43±0.04d | 27.54±0.46f | 49.24±0.19f | 70.60±0.52c | 81.74±0.58b | 83.16±0.19a | |
| 8 | 4.80±0.21e | 22.37±0.29g | 39.63±0.36g | 61.37±0.26d | 74.93±0.90c | 83.66±0.29a | |
| 10 | 2.07±0.30f | 13.93±0.45h | 26.18±0.07h | 40.31±0.06e | 52.31±0.66d | 63.38±0.38b | 76.20±0.52 |

注: 标记不同字母表示具有显著性差异($P<0.05$); 空白表示该天数菌株长满平板(下同)。

表 3 不同 pH 条件对菌株 HS1-1 生长的影响

| pH | 菌落直径/ mm | | | | | | |
|----|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 1 d | 2 d | 3 d | 4 d | 5 d | 6 d | 7 d |
| 2 | 0.00±0.00f | 0.00±0.00h | 0.00±0.00g | 0.00±0.00j | 0.00±0.00h | 0.00±0.00f | 0.00±0.00d |
| 3 | 1.95±0.27e | 7.89±0.60f | 14.28±0.72f | 19.95±0.19i | 25.49±0.67g | 30.22±0.51e | 35.57±0.46d |
| 4 | 9.67±0.22ab | 28.38±0.28c | 48.43±0.49c | 63.49±0.21d | 79.83±0.15b | 85.26±0.88a | |
| 5 | 9.27±0.79bc | 24.68±0.89d | 36.87±0.48d | 45.82±0.97f | 59.47±0.72d | 66.27±0.89c | 76.93±0.65b |
| 6 | 10.45±0.15ab | 39.57±0.06a | 61.31±0.30a | 82.45±0.31a | 84.64±0.11a | | |
| 7 | 10.84±0.36a | 39.62±0.70a | 60.96±0.78a | 81.11±0.44a | 84.69±0.19a | | |
| 8 | 8.02±0.95c | 30.81±0.58b | 52.84±0.78b | 76.25±0.79b | 84.25±0.10a | | |
| 9 | 5.97±0.34d | 27.78±0.59c | 49.75±0.60c | 73.82±0.59c | 84.23±0.13a | | |
| 10 | 1.92±0.28e | 9.69±0.88e | 28.00±0.46e | 50.98±0.46e | 71.29±0.59c | 83.50±0.44a | |
| 11 | 1.26±0.15e | 2.29±0.35g | 15.25±0.72f | 36.34±0.5g | 56.58±0.28e | 76.42±0.83b | 83.44±0.24a |
| 12 | 0.95±0.14ef | 1.75±0.19g | 6.57±0.31g | 25.30±0.15h | 41.80±0.23f | 46.75±0.67d | 53.12±0.54c |

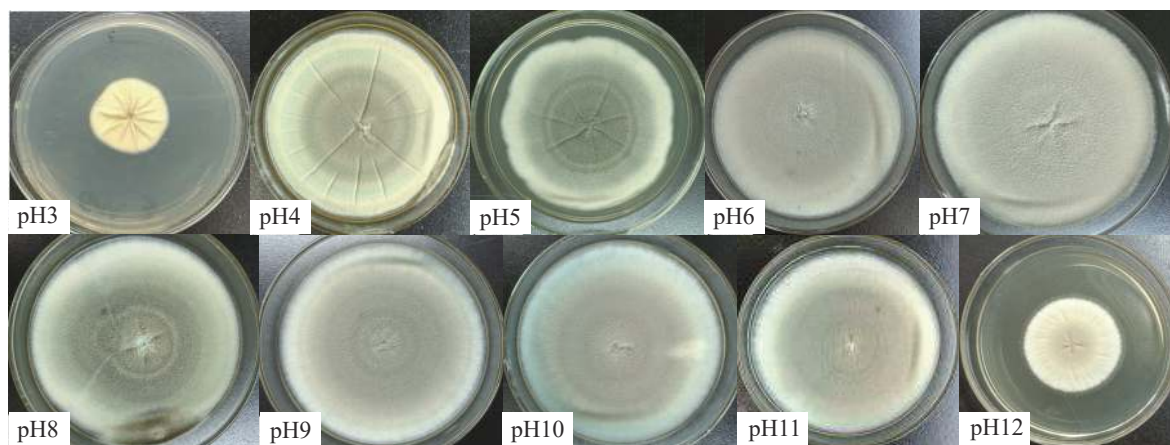


图 5 HS1-1 在不同 pH 条件下第 7 天菌落形态

pH3 倒置培养时观察到菌落中央向下生长,呈突起状。pH 为 3~5 时,菌落颜色较深,褶皱明显,菌落边缘不规整;pH \geq 6 时,菌落颜色较浅,褶皱较少或无褶皱,菌落多呈圆形。

2.3 耐热真菌 HS1-1 的产酶特性 耐热真菌 HS1-1 在不同产酶筛选培养基的菌落生长情况见图 6。微生物不能直接利用淀粉、蛋白质和脂肪等大分子,必须依靠产生的胞外酶将大分子物质分解后才能利用。菌株在 4 种产酶培养基上均能生长,说明该菌能产生相应的酶并以可溶性淀粉、乳糖、羧甲基纤维素和壳聚糖作为唯一碳源供自身生长,且利用可溶性淀粉、乳糖和羧甲基纤维素的能力较强,利用壳聚糖的能力较弱。

2.4 耐热真菌 HS1-1 的抗菌活性 菌株 HS1-1 在 PDB 和改良马丁培养基上所得的发酵液及发酵浓缩液(5 倍浓缩)的抗菌情况见表 4。该菌的 PDB 发酵产物对 5 种革兰氏阴性和革兰氏阳性菌均无明显抑制效果;PDB 发酵液经 5 倍浓缩后均产生抑菌圈,推断可能由于抑菌活性物质富集而

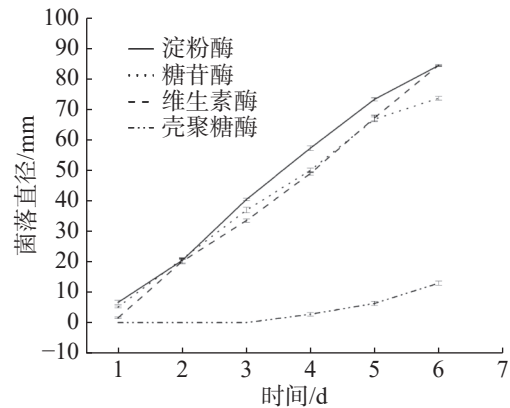


图 6 HS1-1 在不同产酶筛选培养基生长情况

出现明显抑菌效果;在改良马丁培养基所得的发酵液对 SL-1、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、SL-2 均有抗菌活性,而对金黄色葡萄球菌无明显抗菌活性;改良马丁培养基发酵液经 5 倍浓缩后,以 SL-1 为指示菌时抑菌效果减弱,可能是在旋转蒸发过程中高温(50℃)破坏了部分抑制 SL-1 指示菌的活性成分,但其他指示菌的结果显示抑菌效果都增强了。

表 4 不同培养基发酵液与发酵浓缩液抗菌活性比较

| 指示菌 | 在 PDB 上的抑菌圈直径/mm | | 在改良马丁培养基上的抑菌圈直径/mm | |
|---------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | 发酵液 | 发酵浓缩液 | 发酵液 | 发酵浓缩液 |
| SL-1 | 7.80 \pm 0.00a | 15.05 \pm 0.99a | 14.26 \pm 0.63c | 12.40 \pm 0.40d |
| 大肠杆菌 | 7.80 \pm 0.00a | 13.21 \pm 0.56a | 20.83 \pm 0.59a | 21.29 \pm 0.08b |
| 铜绿假单胞菌 | 7.80 \pm 0.00a | 14.15 \pm 0.51a | 13.51 \pm 0.24c | 18.23 \pm 0.73c |
| SL-2 | 7.80 \pm 0.00a | 12.97 \pm 0.19a | 15.40 \pm 0.29b | 24.82 \pm 0.18a |
| 金黄色葡萄球菌 | 7.80 \pm 0.00a | 13.16 \pm 0.35a | 7.80 \pm 0.00d | 11.00 \pm 0.58e |

3 讨论

本研究以 1 株湖光岩玛珉湖来源的耐热真菌 HS1-1 为研究对象,观察其菌落特征,以菌丝形态、孢子、顶囊等特征初步判断该菌为烟曲霉,结合分子水平鉴定确定该菌为烟曲霉。不同温度、盐浓度、pH 条件下菌株的生长研究结果表明,耐热烟曲霉 HS1-1 温度生长范围较广,15~50℃ 均能生长,有学者研究发现烟曲霉在 30~42℃ 都能较好生长^[22],这与本研究结果相符合,后续实验可以继续补充探究 15℃ 以下温度条件以探究该菌的最低生长温度。张晋卿等^[23]发现烟曲霉 AF293 在酵母浸膏培养基中的最适宜生长温度是 37℃,

而在改良马丁琼脂培养基中耐热烟曲霉 HS1-1 的最适生长温度在 40℃,说明湖光岩玛珉湖来源的烟曲霉在特定适宜培养基上有更高的最适生长温度,且在高温条件下更具生长优势。菌株 HS1-1 的最适盐浓度范围在 1%~2%,根据其对于盐浓度的适应性,说明该菌属于弱嗜盐微生物。吴嘉鑫等^[17]对 1 株海洋耐热真菌 C051 进行研究,发现菌株 C051 在 pH 为 3~9 范围内均可以生长,而耐热真菌 HS1-1 在 pH 为 3~12 的范围内均能生长,相比之下湖光岩来源菌株 HS1-1 能适应较广的酸碱环境,有较强抗逆性,并且对碱性环境的抗性更强,这可能是由于湖光岩特殊的环境所造就的,生

物的特性更具有多样化。有研究人员从不同碱性生境分离出多株真菌,并从其次生代谢产物中发现多种新颖结构化合物^[24],HS1-1在 pH 为 12 时仍能生长,说明耐热真菌 HS1-1可以适应碱性生境,研究其次级代谢产物将有希望发现新颖结构的化合物。

产酶研究发现该菌株周围无产生水解圈和特定颜色变化,这可能与该菌株酶的分泌能力和生理特性有关。郭潇等^[25]在研究湖光岩细菌的纤维素酶降解活性也出现了这一现象。猜测该方法测定下菌株产生水解酶的量不多,在菌株生长的同时培养基的透明圈现象已被菌体生长所覆盖。后续如做进一步研究,可以考虑浓缩粗酶液于特定产酶培养基中,具体参照 Chirom 等^[26]的方法稍加修改来更加明确该菌的产酶特性。

抗菌活性是微生物研究的热点,近年来研究人员致力于为抗菌物质开发提供新手段和新渠道,倪孟祥等^[27]从北极海泥中分离得到的其中 1 株菌株 H5 被鉴定为烟曲霉属且其发酵液对细菌、真菌和耐药菌有不同抑制活性。本研究也探究了对几种常见革兰氏阳性和阴性菌的拮抗性,耐热真菌具有生长快的特点,下一步拟对菌株 HS1-1 的其他抗菌活性及生物活性进行研究,为该菌的开发利用提供基础。

参考文献:

- [1] 张勇,李多川.耐热真菌五个中国新记录种[J].菌物学报,2013,32(1):142-149.
- [2] 张勇.耐热真菌多样性及分子系统学研究[D].泰安:山东农业大学,2012.
- [3] 梁茵,李多川.耐热真菌的分类及系统学研究[C]//2010年中国菌物学会学术年会论文摘要集.湖南:中国菌物学会,2010,228-229.
- [4] SALAR R K, ANEJA K R. Thermophilous fungi from temperate soils of northern India [J]. Journal of Agriculture Technology, 2006, 2(1): 49-58.
- [5] MICHELE M, ROBERTO R, RICHARD J W, et al. Purification and biochemical characterization of a thermostable extracellular glucoamylase produced by the thermotolerant fungus *Paecilomyces variotii* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(1): 17-25.
- [6] 詹发强,崔卫东,周亚飞,等.降解棉秸秆耐热菌株的鉴定及降解条件优化[J].微生物学通报,2012,39(1):44-54.
- [7] 秦青英,曾永辉,郭倩茹,等.环境 16S rDNA 和 16S rcDNA 序列分析湖光岩玛珉湖的浮游细菌组成[J].广东海洋大学学报,2013,33(3):1-9.
- [8] 刘颖,陈倩娜.湛江湖光岩土壤放线菌分离与抗菌活性测定[J].热带农业工程,2009,33(1):1-4.
- [9] COONEY, D G, EMERSON R. Thermophilic fungi: an account of their biology, activities, and classification [J]. The Quarterly Review of Biology, 1965, 40(3): 292.
- [10] MOUCHACCA J. Thermophilic fungi-biodiversity and taxonomic status [J]. Cryptogamie Mycologie, 1997, 18(1): 19-69.
- [11] 周茂洪,赵肖为,周林,等.产淀粉酶的海洋曲霉菌的分离及酶学特性初步研究[J].海洋学研究,2007(3):59-65.
- [12] 李德荣,郑海艳,谢庆武.β-半乳糖苷酶产生真菌的筛选及酶学性质研究[J].广西轻工业,2010,26(5):3-4.
- [13] 殷亚兰.新疆吐鲁番地区耐热真菌多样性及其产酶活性初步研究[D].乌鲁木齐:新疆大学,2016.
- [14] 朱利平,黄惠莉.产壳聚糖酶的海洋青霉菌筛选及其寡营养发酵的探究[J].食品工业科技,2011,32(5):212-214.
- [15] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979:487-534.
- [16] 曲均革,金基益,饶静.杭州湾海域产纤维素酶海洋真菌的分离筛选及鉴定[J].安徽农业科学,2012,40(16):8816-8817.
- [17] 吴嘉鑫,陈虹,赵程琳,等.近江牡蛎共附生耐热真菌 C051 的鉴定、生理学特性及抗菌活性研究[J].微生物学杂志,2020,4(40):34-39.
- [18] 刘冬梅,李理,杨晓泉,等.用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J].食品研究与开发,2006(3):110-111.
- [19] 王世苗,陈天意,冯亚萍,等.伊犁野生郁金香内生烟曲霉的分离鉴定及活性[J/OL].微生物学通报:1-17[2022-08-11]. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.220432.
- [20] SUGUI J A, KWON-CHUNG K J, JUVVADI P R, et al. *Aspergillus fumigatus* and related species [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015, 5(2): a019786.
- [21] 王东或.功能蛋白质组方法研究 *Aspergillus fumigatus* 生长偏好性与环境适应性[D].济南:山东大学,2016.
- [22] BEFFA T, STAIB F, LOTT F J, et al. Mycological control and surveillance of biological waste and compost [J]. Med Mycol, 1998, 36(Suppl 1): 137-145.
- [23] 张晋卿,刘伟,谭静文,等.烟曲霉在不同温度和营养条件下的生长特性初探[J].中国真菌学杂志,2013,8(1):6-9.
- [24] 淳于纬训.四株碱性生境真菌次生代谢产物及其抑菌活性的研究[D].昆明:云南大学,2017.
- [25] 郭潇,雷晓凌.湖光岩水域细菌的纤维素降解活性及抑菌活性的研究[J].现代食品科技,2009,25(10):1166-1169.
- [26] CHIROM AARTI, AMEER KHUSRO, PAUL

AGASTIAN, et al. Molecular diversity and hydrolytic enzymes production abilities of soil bacteria [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2020, 27: 3235 – 3248.

[27] 倪孟祥, 胡颖. 北极海泥来源抗菌活性真菌的筛选及菌株 H5 的初步研究 [J]. *化学与生物工程*, 2013, 30(5): 61 – 64.

Physiological properties and antibacterial activity of a thermotolerant fungus HS1-1

HUANG Xiaoxin^{1,2}, TAN Jiali^{1,2}, YANG Yongxing^{1,2}, GU Zheming^{1,2}, LI Xueting^{1,2}, LEI Xiaoling^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology/ Guangdong Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety/ Guangdong Engineering and Technology Research Center for Marine Food/ Guangdong Engineering Laboratory for Marine Biological Products/ Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088;

2. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

Abstract: Huguangyan Maar Lake is endowed with a special geographical environment and has a great potential for exploring thermotolerant fungal resources in special habitats. A thermotolerant fungus HS1-1 was collected from Huguangyan Maar Lake, observed morphologically and identified molecularly, and its physiological properties, enzyme production capacity and antibacterial activity were determined. The results showed that the strain of this fungus is identified as *Aspergillus fumigatus*. This fungus can grow at the temperatures of 15-50°C and pH3-pH12, and has an optimum growth at the temperature of 40°C, a salt concentration of 1%-2%, and pH6-pH7. The fungus has a strong ability to utilize soluble starch, lactose and carboxymethyl cellulose, and has a certain inhibitory effect on five indicator bacteria, as determined by screening on four enzyme-producing media. This indicates that the fungus HS1-1 is high in thermotolerance and acid and base tolerance with some antibacterial activities. This study provides a theoretical basis for an in-depth understanding of the thermotolerant fungi of Huguangyan Marr Lake and their further development and utilization.

Keywords: thermotolerant fungi; molecular identification; physiological growth; activity research; Huguangyan

(责任编辑:叶 静)