

## ◆ 生物科学 ◆

普通培养基与优化培养基对防城港海域真菌分离效果的影响<sup>\*</sup>刘思远<sup>1</sup>,王巧贞<sup>2</sup>,吴鸿仙<sup>1</sup>,黄庶识<sup>2</sup>,冯洁<sup>1\*\*</sup>

(1. 广西医科大学药学院,广西南宁 530021;2. 广西科学院,广西生物物理与环境科学研究中心,广西南宁 530007)

**摘要:**为建立北部湾海域真菌样品库,研究海洋真菌次生代谢产物及其生物活性,以广西防城港海域海泥为样本,采用普通培养基与含有不同抑制剂的优化培养基,对比研究不同培养基分离效果,为海洋真菌培养提取优化提供方法。样品经无菌水处理后,分别用上述不同培养基进行分离纯化,再将提取到的DNA与NCBI数据库配对进行种属鉴定。用相对多度描述样品真菌组成,用Simpson指数与Jaccard系数描述各种实验培养基对海洋真菌分离结果的均衡性与选择性。共分离并鉴定菌株107株,归属于23属,优势菌属依次为青霉属*Penicillium*、枝孢菌属*Cladosporium*、曲霉属*Aspergillus*。Simpson指数和Jaccard系数显示,SA、MD普通培养基,含青霉素、青霉素+庆大霉素的MD优化培养基,以及含青霉素、孟加拉红的PDA培养基均具有较好的分离效果。总体来看,PA培养基对囊担菌属*Cystobasidium*分离效果最好,YPDA培养基对枝孢属分离效果最好。含青霉素+氯霉素的MD优化培养基对篮状菌属*Talaromyces*的分离效果最好,含孟加拉红的PDA优化培养基对曲霉属分离效果最好。实验表明,不同培养基及抑制剂对海洋真菌的选择性不同,建议在分离纯化海洋真菌时选择合理的培养基及抑制剂以提高分离效果。本文为研究海洋真菌次生代谢产物及其生物活性提供了菌种,也为分离、纯化和鉴定海洋真菌提供了参考。

**关键词:**海洋真菌 培养基 抑制剂 分离效果 Simpson指数 Jaccard系数 多样性 选择性

中图分类号:Q93-33 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2021)01-0065-09

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20210309.007

## 0 引言

海洋真菌是海洋微生物的一个重要分支<sup>[1]</sup>,它们常以寄生或腐生的方式,在海洋或港湾生态环境中生长<sup>[2,3]</sup>,并且参与有机物的分解和无机营养物的再生

过程,是维持海洋生态系统二氧化碳产生与固定之间动态平衡的关键<sup>[4]</sup>。同时,由海浪与河流黏土沉积形成的港湾泥滩,是一种与沙滩不同的独特环境<sup>[5]</sup>,海洋微生物为了适应其特殊环境,往往发展出独特的生命代谢途径,由此能够产生结构特异、生物活性特殊

\* 广西重点研发计划项目(桂科 AB16380071),广西一流药理学学科建设项目(GXFCDP-PS-2018)和广西海洋天然产物及生物合成重点实验室项目(17-259-74)资助。

## 【作者简介】

刘思远(1997-),男,在读硕士研究生,主要从事天然产物活性物质研究,E-mail:Liudapao0809@163.com。

## 【\*\*通信作者】

冯洁(1968-),女,博士,教授,主要从事天然产物活性物质研究,E-mail:ezjiefeng@hotmail.com。

## 【引用本文】

刘思远,王巧贞,吴鸿仙,等.普通培养基与优化培养基对防城港海域真菌分离效果的影响[J].广西科学,2021,28(1):65-73.

LIU S Y,WANG Q Z,WU H X,et al. Effects of Common Medium and Optimized Medium on Fungal Isolation and Diversity in Fangchenggang Sea Area [J]. Guangxi Sciences,2021,28(1):65-73.

的次生代谢产物<sup>[6,7]</sup>。因此,分离、纯化和鉴定海洋微生物,对于揭示当地海域微生物种类,保存菌种,建立样品库,提供研究海洋微生物药物和农药的有效菌种<sup>[8]</sup>,以及进一步研究其次生代谢产物及其生理活性等均有重要意义。目前,已有文献报道常见真菌培养基的配方<sup>[9]</sup>,北部湾海域也发现多种具有生物活性的海洋真菌<sup>[10-12]</sup>,然而针对不同分离培养基及加入不同抑制剂的优化培养基对海洋真菌分离效果及分离多样性的系统研究报道较为少见。本文采用不同培养基对采自广西防城港的海泥样品进行研究,运用相对多度(Relative Abundance)、Simpson 指数、Jaccard 系数考察不同培养基在提取、分离、纯化菌种时的效果,在达到高效分离纯化菌种目标的同时,又可以自主选择分离样品的多样性与特异性,供同仁们参考;此外,分离得到的菌种还可以为后续海洋微生物的应用研究及次生代谢产物研究提供物质基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 海泥样品

2017年12月23日,于防城港市(21°36'57"N, 108°13'47"E)采集海泥样品,采样深度为海滩地面下15 cm处,将海泥样品置于采样袋中,用冰盒转运至广西科学院生物物理与环境科学研究中心,于4℃冰箱中暂存备用。

### 1.2 普通培养基与优化培养基

6种普通培养基(定容1 L)分别是MD普通培养基(葡萄糖10 g,蛋白胨5 g,磷酸二氢钾1 g,七水合硫酸镁0.5 g,琼脂20 g,无菌海水50%)、PDA普通培养基(煮沸去除滤液的马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂14 g,无菌海水50%)、YPD普通培养基(蛋白胨20 g,酵母提取物10 g,葡萄糖2 g,0.2%腺嘌呤溶液15 mL,琼脂20 g,无菌海水50%)、CA普通培养基(硝酸钠3 g,磷酸二氢钾1 g,七水合硫酸镁0.5 g,氯化钾0.5 g,硫酸铁0.01 g,蔗糖30 g,琼脂20 g,无菌海水50%)、SA普通培养基(麦芽糖40 g,蛋白胨10 g,琼脂20 g,无菌海水50%)及PA普通培养基(蛋白胨2 g,七水合硫酸镁0.5 g,琼脂20 g,无菌海水50%)。各培养基使用去离子水配制,封口后在120℃下高温灭菌30 min,冷却至50℃时加入庆大霉素,使之浓度为50 μg/mL,以抑制细菌生长。

优化培养基以MD和PDA作为基础培养基。8种抑制剂如下:青霉素20 μg/mL、链霉素50 μg/mL、氯霉素0.1 mg/mL、孟加拉红1 mg/3 mL、青霉

素20 μg/mL+庆大霉素50 μg/mL、链霉素50 μg/mL+庆大霉素50 μg/mL、青霉素20 μg/mL+氯霉素0.1 mg/mL、链霉素50 μg/mL+氯霉素0.1 mg/mL;后4种复合抑制剂以下简称为青+庆、链+庆、青+氯、链+氯。

### 1.3 仪器与设备

灭菌的离心管及移液器枪头,各量程的移液器。

SW-CJ-1F 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)、LHS-250SC 恒温恒湿箱(上海天呈实验仪器制造有限公司)、1-1SP 小型台式离心机(德国 SIG-MA 公司)、070-851 型热循环仪(德国 Biometra 公司)、美国伯乐电泳仪系统、Omega Fluor 凝胶成像仪(美国 Aplegen 公司)。

10%的 chelex-100 树脂(购自上海伯乐生命医学产品有限公司);胶红(购自 BIOTIUM 公司);引物 ITS1、引物 ITS4、5×loading buffer(购自上海捷瑞生物工程有限公司);Taq PCR Master Mix 酶、ddH<sub>2</sub>O(购自生工生物工程上海股份有限公司);Trans 15K DNA Marker(购自北京全式金生物技术有限公司)。

### 1.4 真菌分离

称取2 g海泥置于装有8 mL无菌水溶液的灭菌离心管中,震荡后取上层悬浊液,用无菌水将其梯度稀释1 000倍,分别取100 μL涂布于各培养基上,每种培养基重复3次,每天观察并记录真菌生长情况,通过菌落形态、颜色、大小来确定真菌种类,并编号留样。

### 1.5 真菌纯化

将所得各菌种接种于相同的培养基上反复纯化,直至得到外观、形态、颜色上一致的无杂菌污染的纯种菌种。采用50%甘油水溶液置于-80℃冰箱中长期保存,采用内装有斜面固体培养基的试管置于4℃冰箱短期保存。

### 1.6 真菌 DNA 提取

在超净工作台上,挑取纯化得到的真菌菌落,按试剂盒操作指南或按传统提取DNA的方法进行操作。试剂盒为Ezup柱式真菌基因组DNA抽提试剂盒,购自生工生物工程(上海)股份有限公司。传统方法即将菌落挑取至1.5 mL离心管中,倒入液氮研磨成粉末状;再加入10%的 chelex-100 树脂50 μL,水浴100℃加热10 min,冷却至室温(25℃以下)后,12 000 r/min离心10 min,保留上清液,即含真菌DNA。

### 1.7 PCR 扩增

取 1  $\mu\text{L}$  1.6 节的上清液与 12  $\mu\text{L}$  Taq 酶、0.5  $\mu\text{L}$  ITS4 引物、0.5  $\mu\text{L}$  ITS1 引物、11  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 混合进行 PCR 扩增。PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$  5 min;94 $^{\circ}\text{C}$  1 min,53 $^{\circ}\text{C}$  1 min,72 $^{\circ}\text{C}$  1.5 min,34 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$  充分延伸 10 min。正向 ITS1 引物序列为 5'-TCCG-TAGGTGAACCTGCGG-3',反向 ITS4 引物序列为 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。

### 1.8 琼脂糖凝胶电泳检测

取 1  $\mu\text{L}$  扩增产物与 DNA Marker 进行凝胶电泳,条件为电压 110 V,电流 400 mA,电泳时间 30 min。随后在 Omega Fluor 凝胶成像仪下观察荧光条带以辨别 DNA 是否提取成功,后将提取成功的 DNA 样品送至生工生物工程上海股份有限公司进行 DNA 测序。

### 1.9 种属鉴定

将测得的 DNA 序列用 Contig Express 软件拼接并在 NCBI 网站(www.ncbi.nlm.nih.gov)进行 BLAST 比对,以序列相似度大于或等于 97% 确定其属(Genus)的分类学依据。

### 1.10 数据分析

本研究采用 SPSS 17.0 软件(Chicago,IL,USA)进行统计学分析,统计检验为卡方检验( $X^2$ ),以  $\alpha = 0.05$  作为检验水准。

本研究采用 Simpson 指数和 Jaccard 系数分析菌种多样性。Simpson 指数是描述生境内物种多样性的指标之一,数值越大说明生境内真菌的均衡性和丰富程度越高;Jaccard 系数是比较两个集合间相似性与差异性的指标,数值越小说明两集合的差异越大<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 防城港海域海泥真菌组成

选取序列相似度 $\geq 97\%$ 的菌株,并将其中相似度等于 100%的菌株去除,最终共得 111 株不同的菌株。其中有 1 株葫芦霉科 Cucurbitariaceae 真菌、3 株子囊菌门 Ascomycota 真菌因未确定种属均不纳入本次分析比较。以属作为分析的基本单位共分析 107 株真菌,不同属的真菌在防城港海域海泥中的构成差异明显,其中优势菌种依次为青霉属 *Penicillium* 39 株,相对丰度 36.45%;其次为枝孢属 *Cladosporium* 21 株,相对丰度 19.63%;然后是曲霉属 *Aspergillus* 11 株,相对丰度 10.28%。掷孢酵母属

*Sporobolomyces*、篮状菌属 *Talaromyces*、*Papiliotrema* 属各 4 株,相对丰度均为 3.74%;棒孢酵母属 *Clavispora* 和囊担菌属 *Cystobasidium* 各 3 株,相对丰度均为 2.80%;柄锈菌属 *Puccinia*、红酵母属 *Rhodotorula* 和 *Krasilnikovozyma* 属各 2 株,相对丰度均为 1.87%;附球菌属 *Epicoccum*、拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis*、假丝酵母属 *Candida*、茎点霉属 *Phoma*、拟青霉属 *Purpureocillium*、球腔菌属 *Mycosphaerella*、镰刀菌属 *Fusarium*、孔韧菌属 *Porostereum*、*Acrodontium* 属、*Geosmithia* 属、*Pezizomycotina* 属和 *Rousoella* 属各 1 株,相对丰度均为 0.93%。

### 2.2 普通培养基的分离结果

6 种普通培养基的分离结果如表 1 所示,PA 普通培养基分离种类最少,为 4 属;SA 普通培养基中分离出的真菌种类最多,为 10 属;其余 4 种普通培养基分离效果之间没有显著差异( $P > 0.05$ )。对比酵母菌和霉菌的分离效果,6 种普通培养基分离得到的酵母菌最少为 3 属,最多为 4 属,分离效果相近;而在霉菌的分离效果上,SA 普通培养基分离出霉菌最多为 7 属,PA、CA 普通培养基只分离出 1 属,其余 3 种普通培养基分离的霉菌属数相近,无显著差异( $P > 0.05$ )。

表 1 从 6 种普通培养基中分离得到的真菌属数

Table 1 Number of fungal genera isolated from six common media

培养基 Media	属数 Number of genus		总计 Total
	酵母菌 Yeast	霉菌 Mould	
PDA	3	4	7
SA	3	7	10
YPDA	3	4	7
MD	4	5	9
CA	4	1	5
PA	3	1	4

6 种普通培养基所分离出的真菌种数如表 2 所示。虽然 PA 普通培养基分离出的真菌属数较少,但是从中分离得到的囊担菌属 *Cystobasidium* 真菌为 41 株,相比于其他的普通培养基具有显著优势( $P < 0.05$ )。YPDA 普通培养基对枝孢属 *Cladosporium* 真菌的分离效果较其他普通培养基具有显著优势( $P < 0.05$ )。此外,柄锈菌属 *Puccinia* 真菌只在

PA、CA 普通培养基分离得到, 拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 真菌也只在 SA、PDA 普通培养基中分离得到。篮状菌属 *Talaromyces*、球腔菌属 *Mycosphaerella* 及 *Geosmithia* 属真菌只在 SA 培养基中分离得到, *Porostereum* 属真菌只在 YPDA 普通培养基分离得到, 茎点霉属 *Phoma*、*Papiliotrema* 属真菌只在 PDA 普通培养基中分离得到, 假丝酵母属 *Candida*、*Acrodontium* 属及 *Roussoella* 属真菌只在 MD 普通培养基中分离得到。说明普通培养基对这些属真菌分离的选择性较高。综上, PDA、MD 和 YPDA 得到的酵母数和霉菌数比较均衡, 结合实际应用考虑, 采用 PDA、MD 培养基进行下一步实验。

表 2 从 6 种普通培养基分离得到的真菌种数

Table 2 Number of fungi species isolated from the six common media

属名 Genera	种数 Number of species					
	PA	CA	SA	YPDA	PDA	MD
<i>Cystobasidium</i>	41	13	12	4	15	10
<i>Penicillium</i>	4		5	4	7	5
<i>Clavispora</i>	2	2	2	1		1
<i>Cladosporium</i>		3	5	14	3	5
<i>Sporobolomyces</i>		3	4	3	2	3
<i>Aspergillus</i>			1	1		1
<i>Puccinia</i>	2	1				
<i>Pestalotiopsis</i>			1		1	
<i>Geosmithia</i>			1			
<i>Talaromyces</i>			4			
<i>Mycosphaerella</i>			1			
<i>Porostereum</i>				1		
<i>Papiliotrema</i>					1	
<i>Phoma</i>					1	
<i>Acrodontium</i>						2
<i>Candida</i>						1
<i>Roussoella</i>						1

### 2.3 含不同抑制剂的优化培养基的分离结果

为了进一步探讨不同抑制剂对海洋真菌生长的

影响, 本研究利用含有不同抑制剂的 PDA、MD 优化培养基进行分离实验。从分离结果可以看出(表 3), PDA 优化培养基共分离得到 244 株霉菌, MD 优化培养基共分离得到 141 株, 株数上 PDA 优化培养基的分离效果明显优于 MD 优化培养基( $P < 0.05$ ); 从属数来看, PDA 优化培养基共分离得到 4 属霉菌, 而 MD 优化培养基共分离得到 8 属霉菌。在 PDA 优化培养基中, 分离霉菌株数最多的前 4 位依次为含链霉素的优化培养基(63 株) > 含链 + 庆的优化培养基(57 株) > 含链 + 氯的优化培养基(46 株) > 含氯霉素的优化培养基(41 株)。在 MD 优化培养基中, 分离菌株数量最多的前 3 位依次为含链 + 庆的优化培养基(44 株) > 含链 + 氯的优化培养基(38 株) > 含氯霉素的优化培养基(21 株)。含链霉素、氯霉素的 PDA 优化培养基分离效果显著优于分别含这两种抑制剂的 MD 优化培养基( $P < 0.05$ )。PDA、MD 优化培养基均分离得到 3 属酵母菌, 与 2.2 节的结果基本一致。

含不同抑制剂的优化培养基分离得到的真菌种类如表 4 所示。其中分别含链霉素、氯霉素、链 + 庆、链 + 氯的 PDA 优化培养基及分别含链 + 庆、链 + 氯的 MD 优化培养基分离得到的真菌株数较多, 这 6 种优化培养基的分离效果明显优于其他 10 种优化培养基( $P < 0.05$ )。青霉属 *Penicillium* 因为适应力较强, 所有优化培养基均可分离得到; 其次为枝孢菌属 *Cladosporium* 及曲霉属 *Aspergillus*, 含孟加拉红的 MD 优化培养基对分离枝孢菌属稍有优势, 含孟加拉红的 PDA 优化培养基对分离曲霉属稍有优势。另外, 含青 + 氯的 MD 优化培养基对分离篮状菌属 *Talaromyces* 具有显著优势( $P < 0.05$ ); 囊担菌属 *Cystobasidium*、拟青霉属 *Purpureocillium*、柄锈菌属 *Puccinia* 以及 *Krasilnikovozyma* 属只在含青霉素的 MD 优化培养基中分离得到; 镰刀菌属 *Fusarium* 真菌只在含青 + 庆的 MD 优化培养基中分离得到; 棒孢酵母属 *Clavispora* 仅在含链 + 庆的 PDA 优化培养基中分离得到; 掷孢酵母属 *Sporobolomyces* 仅在含青 + 氯的 PDA 优化培养基中分离得到。

表 3 优化培养基的分离结果

Table 3 Separation results of optimized medium

PDA 培养基 PDA medium	菌株数 Number of strains		属数 Number of genera		MD 培养基 MD medium	菌株数 Number of strains		属数 Number of genera	
	酵母菌 Yeast	霉菌 Mould	酵母菌 Yeast	霉菌 Mould		酵母菌 Yeast	霉菌 Mould	酵母菌 Yeast	霉菌 Mould
P	0	4	0	3	P	6	6	2	4
SM	0	63	0	3	SM	0	8	0	1
CL	0	41	0	2	CL	1	21	1	3
RB	2	11	1	4	RB	0	8	0	2
P+GM	0	8	0	2	P+GM	0	4	0	4
SM+GM	1	57	1	2	SM+GM	1	44	1	2
P+CL	1	14	1	2	P+CL	1	12	1	3
SM+CL	0	46	0	1	SM+CL	0	38	0	2
Total	4	244	3	4	Total	9	141	3	8

注:P-青霉素,SM-链霉素,CL-氯霉素,RB-孟加拉红,GM-庆大霉素

Note:P-penicillin,SM-streptomycin,CL-chloramphenicol,RB-rose bengal,GM-gentamicin

表 4 优化培养基所分离得到的真菌属及种数

Table 4 The genera and species number of fungi isolated from optimized medium

属名 Genera	种数 Number of species (PDA/MD)							
	P	SM	CL	RB	P+GM	SM+GM	P+CL	SM+CL
<i>Penicillium</i>	1/4	60/8	40/18	4/4	7/1	54/43	12/5	46/36
<i>Cladosporium</i>	—	2/0	1/2	1/4	0/1	2/1	—	0/2
<i>Aspergillus</i>	1/0	1/0	0/1	6/0	—	—	0/1	—
<i>Talaromyces</i>	2/0	—	—	1/0	1/1	—	2/6	—
<i>Papiliotrema</i>	—	—	—	1/0	—	—	0/1	—
<i>Rhodotorula</i>	0/2	—	0/1	—	—	0/1	—	—
<i>Puccinia</i>	0/1	—	—	—	—	—	—	—
<i>Cystobasidium</i>	0/2	—	—	—	—	—	—	—
<i>Krasilnikovozyma</i>	0/3	—	—	—	—	—	—	—
<i>Clavispora</i>	—	—	—	—	—	1/0	—	—
<i>Purpureocillium</i>	0/1	—	—	—	—	—	—	—
<i>Sporobolomyces</i>	—	—	—	—	—	—	1/0	—
<i>Fusarium</i>	—	—	—	—	0/1	—	—	—

注:P-青霉素,SM-链霉素,CL-氯霉素,RB-孟加拉红,GM-庆大霉素;若两类优化培养基均未得到此属真菌即用“—”表示

Note:P-penicillin,SM-streptomycin,CL-chloramphenicol,RB-rose bengal,GM-gentamicin. If neither of the two optimized medium obtained the genus, it was denoted by "—"

## 2.4 多样性分析

从表 5 中可以看出,SA、MD 普通培养基具有良好的均衡性与多样性(Simpson 指数 $>0.8$ ),PA 普通培养基的 Simpson 指数明显低于其他 5 种普通培养基,原因是 PA 普通培养基对真菌的选择性较高。在含不同抑制剂的优化培养基中,含青霉素、孟加拉红的 PDA 优化培养基以及含青霉素、青+庆、青+氯

的 MD 优化培养基均衡性较好(Simpson 指数 70.6),多样性与丰富性也较高;含氯霉素、链霉素、链+庆、链+氯的 PDA 优化培养基与含链霉素、链+庆、链+氯的 MD 优化培养基 Simpson 指数偏低( $<0.2$ ),说明这些优化培养基具有明显的选择性,适用于培养与分离特定种属的真菌。

另外,虽然 MD、PDA 普通培养基具有良好的均

衡性和多样性,但是在加入抑制剂后,其 Simpson 指数均有不同程度的降低。其中,分别含青霉素、孟加拉红的 PDA 优化培养基及分别含青霉素、青+庆、青+氯的 MD 优化培养基, Simpson 指数与其普通培

养基相近,但分别含链霉素、氯霉素、链+庆、链+氯的 PDA 优化培养基,及分别含链霉素、链+庆、链+氯的 MD 优化培养基 Simpson 指数降幅较大,显示出与普通培养基截然不同的选择性。

表 5 普通培养基及优化培养基的 Simpson 指数

Table 5 Simpson index of common medium and optimized medium

普通培养基 Isolated medium	Simpson 指数 Simpson index	PDA 优化培养基 Optimized medium of PDA	Simpson 指数 Simpson index	MD 优化培养基 Optimized medium of MD	Simpson 指数 Simpson index
PA	0.288	P	0.625	P	0.793
CA	0.564	SM	0.092	SM	0.000
SA	0.819	CL	0.048	CL	0.318
YPDA	0.694	RB	0.675	RB	0.500
PDA	0.678	P+GM	0.219	P+GM	0.750
MD	0.801	SM+GM	0.101	SM+GM	0.086
		P+CL	0.338	P+CL	0.627
		SM+CL	0.000	SM+CL	0.010

注:P-青霉素,SM-链霉素,CL-氯霉素,RB-孟加拉红,GM-庆大霉素

Note: P-penicillin, SM-streptomycin, CL-chloramphenicol, RB-rose bengal, GM-gentamicin

从表 6 - 表 8 可以看出,普通培养基的 Jaccard 系数为 0.222 - 0.600,说明它们的分离效果相似度较低,集合内异质性较高。而优化培养基的 Jaccard 系数为 0.111 - 1.000,范围跨度较大。其中,含孟加拉红的 MD 优化培养基与含链+氯的 MD 优化培养基之间 Jaccard 系数为 1.000,说明这两种培养基的分离差异性极小。但对比表 5 可知,二者 Simpson 指数差异较大,含链+氯的 MD 优化培养基对青霉菌属真菌的选择性远高于含孟加拉的 MD 优化培养基。

表 7 PDA 优化培养基的 Jaccard 系数

Table 7 Jaccard index of optimized PDA medium

培养基 Medium	SM	CL	RB	P+GM	SM+GM	SM+CL	P+CL
P	0.500	0.200	0.600	0.667	0.200	0.333	0.500
SM		0.667	0.600	0.250	0.500	0.333	0.200
CL			0.400	0.333	0.667	0.500	0.250
RB				0.400	0.333	0.200	0.333
P+GM					0.250	0.500	0.667
SM+GM						0.333	0.200
SM+CL							0.333

注:P-青霉素,SM-链霉素,CL-氯霉素,RB-孟加拉红,GM-庆大霉素

Note: P-penicillin, SM-streptomycin, CL-chloramphenicol, RB-rose bengal, GM-gentamicin

表 6 普通培养基的 Jaccard

Table 6 Jaccard index of common medium

培养基 Medium	CA	SA	YPDA	PDA	MD
PA	0.500	0.273	0.375	0.222	0.300
CA		0.364	0.500	0.333	0.400
SA			0.545	0.417	0.462
YPDA				0.400	0.600
PDA					0.333

表 8 MD 优化培养基的 Jaccard 系数

Table 8 Jaccard index of optimized MD medium

培养基 Medium	SM	CL	RB	P + GM	SM + GM	SM + CL	P + CL
P	0.167	0.250	0.143	0.111	0.286	0.143	0.111
SM		0.250	0.500	0.250	0.333	0.500	0.250
CL			0.500	0.333	0.600	0.500	0.333
RB				0.500	0.667	1.000	0.200
P + GM					0.400	0.200	0.333
SM + GM						0.667	0.167
SM + CL							0.200

注:P-青霉素,SM-链霉素,CL-氯霉素,RB-孟加拉红,GM-庆大霉素

Note: P-penicillin, SM-streptomycin, CL-chloramphenicol, RB-rose bengal, GM-gentamicin

### 3 讨论

目前国内关于不同培养基和不同抑制剂对海洋微生物分离效果的研究报道尚少,不同培养基由于成分不同,对真菌分离效果的均衡性与选择性具有一定差异。目前学界普遍认为,抗生素作为抑制剂可抑制细菌生长,对真菌生长及分离一般没有显著影响。但是本研究发现,加入不同抑制剂的培养基之间及其与原培养基之间,对同一份样品的真菌分离效果相差甚远,说明选择合理的抑制剂有助于快速分离目标海洋真菌。

本研究所得优势菌属与多地已有报道的海洋真菌构成相似<sup>[14]</sup>。6种普通培养基中,SA培养基分离得到的菌株种数最多,PA普通培养基所得菌株最少,Simpson指数分析结果与这一情况相符。PA普通培养基和YPDA普通培养基对菌株的分离效果表现出明显的选择性,其余4种普通培养基的Simpson指数较为接近;其中,MD普通培养基多样性与均衡性较高,与文献<sup>[12]</sup>结果相似。但在优化培养基的实验中发现,含抑制剂的MD优化培养基Simpson指数均有所下降且程度不一,说明抑制剂在抑制细菌生长的同时可能也会对真菌的生长产生一定的抑制作用,但目前并没有明确研究表明其影响机制、程度及范围。其中,分别含青霉素、青+庆的MD优化培养基的均衡性相对较高,与MD普通培养基的Simpson指数较为接近。其余优化培养基的Simpson指数均小于0.7,而且分别含链霉素、氯霉素、链+氯的PDA优化培养基与分别含链霉素、链+庆、链+氯的MD优化培养基的Simpson指数小于0.1,结合表4可知这5种优化培养基在分离海洋真菌时对青霉属 *Penicillium* 具有较高的选择性。

6种普通培养基之间的Jaccard系数均不超过0.6,说明任意两种普通培养基分离所得的菌种组成相似度都较低。在优化培养基中,MD优化培养基分离的菌属数稍多于PDA优化培养基,但从PDA优化培养基中分离得到的菌株数量明显多于MD优化培养基,产生该数量差异的主要原因是PDA培养基对青霉属真菌具有较高的选择性,这与文献<sup>[9]</sup>的报道一致。但是PDA培养基的这种选择性在6种普通培养基的实验中并没有充分表现,而是表现出对囊担菌属 *Cystobasidium* 的高选择性,故推测优化培养基中的8种抑制剂均可能对青霉属真菌有抑制作用。优化培养基之间的Jaccard系数数值跨度均较大。其中值得注意的是,含孟加拉红的MD优化培养基与链+氯的优化MD培养基之间的Jaccard系数为1.000,是由于这两种培养基所得真菌都为青霉属 *Penicillium* 和枝孢菌属 *Cladosporium* 真菌。结合Simpson指数可以看出,含孟加拉红的MD优化培养基对这两种真菌的分离具有较好的均衡性,而含链+氯的MD优化培养基对青霉属 *Penicillium* 真菌具有较高的选择性。

本研究中除分离得到111株基因序列相似度 $\geq 97\%$ 的真菌外,还发现了9个基因序列相似度小于97%的真菌菌株,其中5个菌株相似度小于94%。通常相似度94%被认为是区分一个新种的最低界限,而相似度96.4%被认为是值得区分一个新属的界限<sup>[15]</sup>,因此小于97%则无法确定这些真菌的种属,未被列入本文研究对象。这9个相似度小于97%的菌株将会在后继研究中根据形态特征和系统发育树确定其归类。

本研究分离得到青霉属真菌7种,包括托姆青霉 *Penicillium thomii*、橘青霉 *P. citrinum*、草酸青霉

*P. oxalicum*、爪哇青霉 *P. javanicum*、产紫青霉 *P. purpurogenum*、筒青霉 *P. simplicissimum*、菌核青霉 *P. sclerotiorum*; 枝孢菌属真菌 7 种, 包括黄色枝孢菌 *Cladosporium xanthochromaticum*、狭枝孢菌 *C. tenuissimum*、芽枝状枝孢菌 *C. cladosporioides*、澳洲枝孢菌 *C. australiense*、尖孢枝孢菌 *C. oxysporum*、*C. Perangustum*、*C. anthropophilum* 等, 这两属真菌具有广泛的药用前景, 包括抗癌<sup>[16,17]</sup>、抗菌<sup>[18]</sup>、抗氧化<sup>[19]</sup>以及合成药用活性化合物的关键前体<sup>[20,21]</sup>。本研究结果有助于建立北部湾海域真菌样品库, 为后续海洋真菌代谢产物分离、结构鉴定及生物活性提供基础资料, 同时也为高效地提取分离海洋真菌提供有价值的参考。

#### 参考文献

- [1] 杜晓娜, 李璞, 尹慧芳, 等. 深圳大鹏湾六种珊瑚共附生真菌多样性研究[J]. 菌物学报, 2019, 38(4): 461-470.
- [2] 祖国仁, 闫磊, 刘阳, 等. 海洋真菌产抗菌物质培养基及其性质研究[J]. 生物技术, 2010, 20(5): 75-78.
- [3] WEBSTER N S, TAYLOR M W. Marine sponges and their microbial symbionts: Love and other relationships [J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(2): 335-346.
- [4] GEETHA R, CHANDRAMOHANAKUMAR N, MATHEWS L. Geochemical reactivity of surficial and core sediment of a tropical mangrove ecosystem [J]. International Journal of Environmental Research, 2008, 2(4): 329-342.
- [5] HEO Y M, LEE H, KIM K, et al. Fungal diversity in intertidal mudflats and abandoned solar salterns as a source for biological resources [J]. Marine Drugs, 2019, 17(11): 601. DOI:10.3390/md17110601.
- [6] 范震, 孙章华, 陈玉婵, 等. *Cladosporium perangustum* FS62 中一个新的二聚萜满酮[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(4): 486-489.
- [7] 卢护木, 詹振宇, 李蜜, 等. 涠洲岛珊瑚礁海洋真菌的分离鉴定及其抗 MRSA 活性筛选[J]. 广西科学, 2020, 27(5): 520-525.
- [8] 黄沁愉, 蒋学建, 苏宏飞, 等. 珊瑚来源群体淬灭活性产菌的筛选与抑菌活性研究[J]. 广西科学, 2020, 27(5): 509-519.
- [9] 朱红梅, 徐红, 温海. 医学真菌常用培养基的制备和应用[J]. 中国真菌学杂志, 2010, 5(5): 296-306.
- [10] 王聪, 苏艳, 高谕康, 等. 广西北部湾来源抗菌活性真菌菌株的分离筛选及活性产物鉴定[J]. 国际药学研究杂志, 2019, 46(4): 270-276.
- [11] 王聪, 刘春娟, 雷福厚, 等. 海洋真菌 *Penicillium* sp. H1 中 1 个新的二萜糖苷类化合物[J]. 中草药, 2018, 49(24): 5746-5750.
- [12] 龚斌, 方怀义, 熊拯, 等. 广西北部湾海洋腐木产孢真菌的分离鉴定和抗菌活性菌株筛选[J]. 应用海洋学学报, 2017, 36(1): 96-102.
- [13] 要元媛, 闫明, 毕润成. 山西霍山植物群落种-面积曲线与物种多样性的关系[J]. 生态学杂志, 2013, 32(1): 39-44.
- [14] PAULINO G V B, FELIX C R, LANDELL M F. Diversity of filamentous fungi associated with coral and sponges in coastal reefs of northeast Brazil [J]. Journal of Basic Microbiology, 2020, 60(2): 103-111.
- [15] GALLEGO S, VILA J, NIETO J M, et al. *Breoghania corrubedonensis* gen. nov. sp. nov., a novel *Alphaproteobacterium* isolated from a Galician beach (NW Spain) after the Prestige fuel oil spill, and emended description of the family Cohaesibacteraceae and the species *Cohaesibacter gelatinilyticus* [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2010, 33(6): 316-321.
- [16] JASANDRADE T, SOMENSI A, LOPES M, et al. Citrinadin A derivatives from *Penicillium citrinum*, an endophyte from the marine red alga *Dichotomaria marginate* [J]. Planta Medica, 2014, 80(10): 776. DOI:10.1055/s-0034-1382419.
- [17] MARCHESE P, GARZOLIB L, GNAVIB G, et al. Diversity and bioactivity of fungi associated with the marine sea cucumber *Holothuria poli*: Disclosing the strains potential for biomedical applications [J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 129(3): 612-625.
- [18] IWATSUKI M, ISHIMORI T, YAMAMOTO T, et al. Biverlactones A-D, new circumventors of arbekacin resistance in MRSA, produced by *Penicillium* sp. FKI-4429 [J]. Tetrahedron, 2011, 67(35): 6644-6648.
- [19] 孙辉, 付子桃, 都鹏, 等. 海洋真菌 *Cladosporium sphaerospermum* 胞外多糖 CS4-1 结构特征和抗氧化活性[J]. 中国海洋药物, 2019, 38(5): 16-20.
- [20] PRINCE L, SAMUEL P. A study on the diversity of marine fungi along the south east coast of Tamilnadu - A statistical analysis [J]. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2015, 4(2): 559-574.
- [21] SILBER J, KRAMER A, LABES A, et al. From discovery to production: Biotechnology of marine fungi for the production of new antibiotics [J]. Marine Drugs, 2016, 14(7): 137. DOI:10.3390/md14070137.



## Effects of Common Medium and Optimized Medium on Fungal Isolation and Diversity in Fangchenggang Sea Area

LIU Siyuan<sup>1</sup>, WANG Qiaozhen<sup>2</sup>, WU Hongxian<sup>1</sup>, HUANG Shushi<sup>2</sup>, FENG Jie<sup>1</sup>

(1. School of Pharmaceutical Science, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China; 2. Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**Abstract:** To establish a sample library of fungi in Beibu Gulf and study the secondary metabolites of marine fungi and their biological activities, the marine mud from Fangchenggang sea area in Guangxi was used as a sample. The common medium and optimized medium containing different inhibitors were used to compare the equilibrium and selectivity of different medium, which provided a cultivation and extraction method for the optimization of marine fungi. After the samples were treated with sterile water, they were separated and purified with the above different medium respectively, and then the extracted DNA were paired with the NCBI database for species identification. The relative abundance was used to describe the fungal composition of the samples, and the Simpson index and Jaccard coefficient were used to describe the equilibrium and selectivity of various experimental medium for the separation of marine fungi. A total of 107 strains were isolated and identified, which belonged to 23 genera. The dominant genera were *Penicillium*, *Cladosporium* and *Aspergillus*. Simpson index and Jaccard coefficient showed that SA and MD common medium, MD optimized medium containing penicillin, penicillin + gentamicin, and PDA medium containing penicillin and Bengal red had good diversity and equilibrium of separation effect. In general, PA medium had the best separation effect on *Cystobasidium*, and YPDA medium had the best separation effect on *Cladosporium*. MD optimized medium containing penicillin and chloramphenicol had the best separation effect on *Talaromyces*, and PDA optimized medium containing Bengal Red had the best separation effect on *Aspergillus*. Experiments showed that different media and inhibitors had different selectivity to marine fungi. It is suggested to select reasonable media and inhibitors to improve the separation effect when separating and purifying marine fungi. This article provides strains for studying the secondary metabolites of marine fungi and their biological activities, and also provides a reference for the isolation, purification and identification of marine fungi.

**Key words:** marine fungi, medium, inhibitors, isolation effect, Simpson index, Jaccard index, diversity, selectivity

责任编辑:符支宏



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxxk@gxas.cn

投稿系统网址:<http://gxxk.ijournal.cn/gxxk/ch>