

文章编号 1000-5013(2006)01-0086-03

从文蛤分离丝状真菌

陈碧娥 欧阳明安 王丽娜

(华侨大学材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

摘要 分离海洋微生物是开发海洋药物的重要内容. 对共附生在双壳贝文蛤的真菌, 采用平板直接分离和液体富集后涂布分离两种方法, 以及 6 种不同的分离培养基, 分离到 23 株丝状真菌, 其中 9 株丝状真菌在淡水及海水培养基中均能生长、繁殖. 对分离菌(W16)的生长特性研究结果表明, 盐浓度、pH 值, 以及海水和淡水的不同环境, 对其生长和代谢有明显的影响.

关键词 丝状真菌, 菌种分离, 文蛤, 海洋微生物

中图分类号 Q 953; Q 178. 53; Q 959. 215

文献标识码 A

海洋包括了高渗、贫营养及低温、无光照或局部高温等复杂而又多样化的生态环境, 造就了海洋微生物独特的代谢类型和生理机能. 已有的研究发现, 海洋微生物能产生在陆栖微生物中所未曾见到的, 结构新颖的有生物活性的化合物^[1]. 海洋微生物是 21 世纪药物开发的重要资源^[2], 而资源微生物的分离是开发海洋药物的重要内容. 海洋真菌常以寄生或腐生的方式, 在海洋或与海洋相关的港湾生态环境中生长. 丝状真菌既具有真核生物典型的特性, 又具有微生物生长快、易培养的特点, 因而近几年来倍受国内外学者的关注. 目前, 已有从海水、海洋植物、海底泥、海绵^[3]、鱼类、贝类和其他海洋生物样品^[4]中分离多种丝状真菌的报道. 本文研究从文蛤分离丝状真菌的方法及分离菌的生长特性.

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 文蛤(*Meretrix meretrix* L.), 鲜活, 福建泉州产. (2) 天然海水, 取自福建泉州洛阳海域.

1.2 培养基

(1) 固体培养基. 用海水配制(盐的质量分数为 0.035), 分为浓配方和稀配方两种. 浓配方为 PDA, YE, CAS 培养基的原配方; 稀配方为原配方培养基用海水稀释 10 倍, 记为 PDA(B), YE(B), CAS(B). (2) 摇瓶液体培养基 A. 10~15 g 葡萄糖, 2 g 蛋白胨, 1 g 酵母膏, 1 g KH_2PO_4 , 1 L 海水, pH 值为自然. (3) 摇瓶液体培养基 B. 用海水将液体培养基 A 稀释 10 倍. (4) 分离培养基. 在所选的培养中加入适量的氯霉素抑制细菌生长.

1.3 真菌的分离

鲜活的文蛤在无菌室开壳后, 立即切成细块. (1) 直接分离. 将小块的文蛤肉与固体分离培养基混合制成平板, 放入 25℃ 恒温培养箱培养. (2) 富集后分离. 将文蛤肉与壳内的液体一起放入摇瓶分离培养基, 在 25℃ 下震荡($150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)培养 2 d 后, 涂布平板. 待平板上有菌落生成, 挑单菌落移种到斜面上, 经纯化后保存.

1.4 分析测定方法

生物量的测定采用恒重法. pH 值测定采用 pH-2 型酸度计测定. 培养液残糖的测定采用 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS 法).

收稿日期 2005-09-09

作者简介 陈碧娥(1946-), 女, 教授, 主要从事应用微生物的研究. E-mail: jfzhang@hqu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(20272015)

1.5 菌种的鉴定

根据显微镜形态观察的结果,初步鉴定到属.

2 结果与讨论

2.1 分离的结果

以文蛤为材料,进行 3 批分离试验,从不同的分离培养基挑取 21 个菌株.这些菌株在平板上的培养时间(t)及生长状况,如表 1 所示.表 1 中固体培养基用稀配方(B),摇瓶液体培养基也用稀配方(B).“+”表示有,“-”表示无.从表 1 可以看出,分离培养基中,CAS 培养基的效果最好,62 % 的分离菌来自

表 1 从文蛤分离的丝状真菌

菌株 编号	分离 培养基	t/h	在液体培养基中的生长情况		菌株 编号	分离 培养基	t/h	在液体培养基中的生长情况	
			菌丝球	形成孢子				菌丝球	形成孢子
W01	CAS	4	+	+	W12	PAD(B)	8	+	+
W02	CAS	4	+	+	W13	CAS(B)	8	+	-
W03	CAS	4	+	+	W14	PAD(B)	8	+	-
W04	CAS(B)	8	+	-	W15	PAD	4	-	-
W05	CAS(B)	4	+	+	W16	CAS	5	+	+
W06	YE(B)	4	+	+	W17	PAD	3	+	-
W07	CAS(B)	8	+	+	W18	CAS	4	-	-
W08	CAS(B)	8	+	-	W19	PAD	3	-	-
W09	YE(B)	8	+	+	W20	PAD	2	-	-
W10	CAS(B)	8	+	-	W21	CAS	12	+	-
W11	CAS(B)	8	+	-					

CAS 培养基,而 YE 培养基的效果最差.由稀、浓配方分离培养基所得的菌株数量接近,说明与文蛤互生(或附生)的丝状真菌对营养的要求不高,在贫营养条件下也能生长,但需要的培养时间较长.在海水的液体培养基中,多数的分离菌能生长,并形成菌丝球,但仅有部分分离菌能进行生长繁殖,形成孢子.这些菌是海洋真菌,其中 W16 菌的生物量最高.下面以 W16 菌为例,进一步探讨分离菌的生长特征.

2.2 W16 菌的形态特征及初步分类鉴定的结果

W16 菌的菌丝为白色,孢子的颜色为绿色,菌落为园形,边缘整齐,在 PDA 培养基上培养 3 d,菌落的大小为 2 mm 左右.根据显微镜菌体形态观察,参照文[5],W16 菌初步鉴定为绵霉菌(*Achlya* sp.).

2.3 W16 菌耐盐性的测定

以淡水($w = 0$)及将盐的质量分数 w 分别调至 0.035,0.050,0.070,0.100 的海水配制摇瓶液体培养基 A.接种后,在 25℃ 下静置 7 d,生物量测定的结果如图 1 所示.从图 1 可知,在同样的培养条件下,W16 菌在盐质量分数 0.05 的培养基中生物量(Q)最高,故最适生长盐的质量分数为 0.05.

2.4 pH 值对 W16 菌生长的影响

将摇瓶培养基 A 的初始 pH 值分别调至 4,5,6,7,8 和 9,接种后在 25℃ 下震荡 6 d.培养基的初始 pH 值对 W16 菌的生长有显著的影响,如表 2 所示(为菌丝球直径).从表 2 可以看出,与多数陆生真

表 2 培养基初始 pH 值对 W16 菌生长的影响

pH	培养液颜色	$/mm$	$Q/g \cdot L^{-1}$	pH	培养液颜色	$/mm$	$Q/g \cdot L^{-1}$
4.0	黄绿色	4~5	7.53	7.0	绿色	3~5	10.10
5.0	绿色	4~6	6.93	8.0	墨绿色	0.8~1.2	17.62
6.0	绿色	4~6	10.10	9.0	黄绿色	3~5	7.19

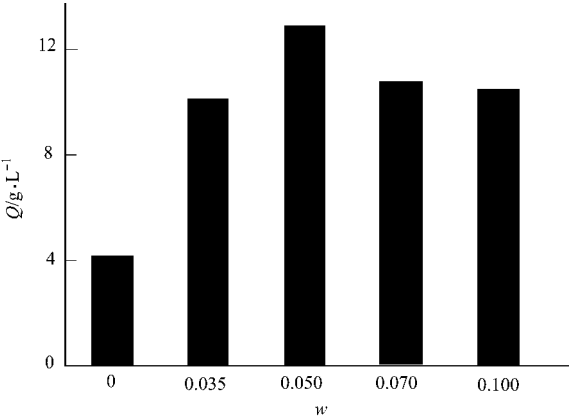


图 1 质量分数对 W16 菌生长的影响

菌喜欢偏酸性的环境不同, W16 菌的最适生长 pH 值为 8.0. 在此培养条件下, 培养液的颜色呈现墨绿色, 菌丝球小、紧且多, 生物量最高.

2.5 W16 菌的生长及代谢状况比较

分别用淡水和将盐质量分数为 0.05 的海水配制摇瓶培养基 A, 初始 pH 值均为 8.0, 接种 W16 的孢子, 在 25℃ 下摇瓶震荡 ($150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养 5 d. 每 24 h 测一次残糖 (M), pH 值及生物量 Q . W16 菌在海水、淡水的生长及代谢过程, 如图 2 所示. 在培养过程中, 观察到 W16 菌在海水培养基中形成小、紧

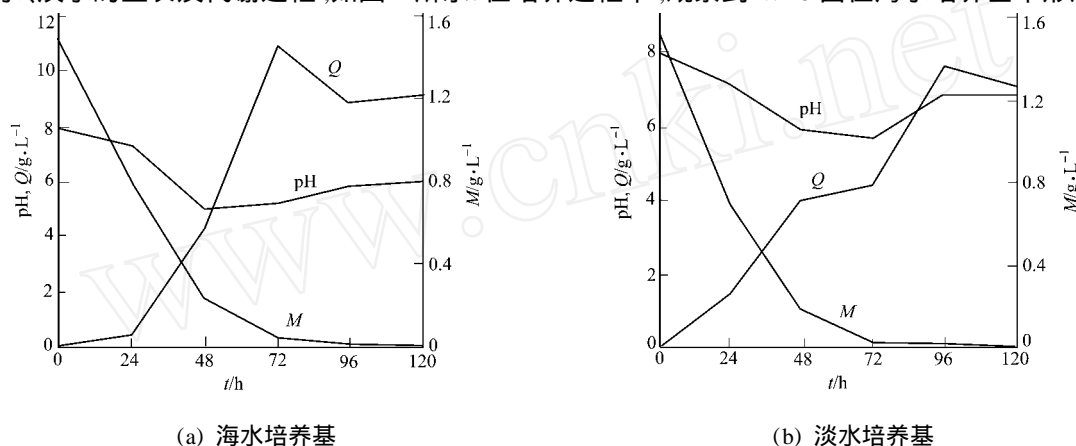


图 2 W16 菌的生长及代谢过程

且数量多的菌丝球, 培养液的颜色为墨绿色; 而在淡水中菌丝球较大, 松且数量少, 许多菌丝贴瓶壁生长, 培养液的颜色为黄绿色. 从图 2 可看出, 海水环境中糖代谢的速率较快, pH 值变化的幅度也较大, 生物量比在淡水高. W16 菌的生长曲线, 在海水环境经 24 h 的调整期后进入对数生长期, 72 h 的生物量达到最高; 而在淡水 96 h 生物量才达到最高. W16 菌在淡水和海水环境均能生长、繁殖, 但更适合海水的环境.

3 结束语

从双壳贝类文蛤分离丝状真菌, 以察氏培养基 (CAS) 为分离培养基效果最好. 虽然分离菌均具有一定的耐盐性, 但仅有部分分离菌能在海水环境生长繁殖. 分离菌 W16 菌株经鉴定为绵霉菌, 其适合生长在偏碱性 (pH = 8), 盐质量分数为 0.05 的环境. 该菌在海水和淡水中均能生长、繁殖, 属兼性海洋真菌.

参 考 文 献

- 林永成, 周世宁. 海洋微生物及其代谢产物[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 2~3
- Mayer A M S, Hamann M T. Marine pharmacology in 2000[J]. Marine Biotechnology, 2004, 6(1): 37~52
- Sponga F, Canaletti L. Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms[J]. Journal of Biotechnology, 1999, (70): 65~69
- 刘晨临, 田黎, 李友光. 分离自青岛海区潮间带海葵的真菌及其产生的抑菌物质[J]. 中国海洋药物, 2001, (6): 1~3
- 邢来君, 李明春. 普通真菌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 294~295

Isolation of Filamentous Fungi from *Meretrix meretrix* L

Chen Bie Ouyang Mingan Wang Lina

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, 362021, Quanzhou, China)

Abstract By adopting direct isolation on plate and spreading plate isolation after liquid enrichment as two methods and six different culture media, the authors obtain nine strains of marine filamentous fungi. As shown by the results from the study on their growth characteristics, salt concentration, pH, different culture situations of seawater and tap water exert significant influence on their growth and metabolism.

Keywords marine microorganism, filamentous fungi, microbe isolation, *Meretrix meretrix* L, marine microorganism