

来源于大兴安岭多年冻土可培养真菌及其发酵物的生物活性

李泽宇,张 志,邱天艺,刘振伟,张哲栋,高思禹,徐利剑*

黑龙江大学现代农业与生态环境学院,哈尔滨 150080

摘要:本研究目的是分离大兴安岭多年冻土中的可培养真菌并测试它们产生的天然产物的生物活性。首先利用颗粒法在冻土中得到 66 株可培养真菌,通过内部转录间隔区序列对它们进行分子鉴定,发现它们隶属于 55 个分类单元,有 8 株真菌的 ITS 相似性 $\leq 97\%$ 。其中 5 株真菌属于耐冷真菌。研究结果发现 6 株真菌的提取物具有抗菌活性,其中外担子菌 FSF028 号菌株活性最强,同时具有抗真菌与抗细菌活性;柄孢壳菌 FSF042 号菌株具有较好的抗氧化活性;镰刀菌 FSF029 号菌株有较好的降解纤维素能力;此外还首次发现了 *Seltsamia* 属真菌具有抗氧化与产纤维素酶活性。

关键词:多年冻土;可培养真菌;大兴安岭;次级代谢物;抗菌活性

中图分类号:Q939.96

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)3-0453-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.3.015

Culturable fungi from permafrost of Greater Khingan Mountains and biological activities of their fermented products

LI Ze-yu, ZHANG Zhi, QIU Tian-yi, LIU Zhen-wei, ZHANG Zhe-dong, GAO Si-yu, XU Li-jian *

College of Agricultural Resource and Environment of Heilongjiang University, Harbin 150080, China

Abstract: Sixty-six culturable fungi were isolated from the permafrost in Greater Khingan Mountains by particle isolation method and their natural products were screened for the biological activities. These fungi belonged to 55 taxa using the sequences of Internal Transcribed Spacer (ITS) and of them, the ITS similarities of 8 fungal strains were less than 97%. In those 8 fungal strains, six fungal strains exhibited antimicrobial activities and of them, *Exobasidium* sp. FSF028 was the strongest one. *Podospora* sp. FSF042 exhibited the strongest antioxidant activity and *Fusarium* sp. FSF029 exhibited a significant producing cellulase activity. In addition, this is the also first report that *Seltsamia* had antioxidant and producing cellulase activities.

Key words: permafrost; culturable fungus; Greater Khingan Mountains; secondary metabolite; antimicrobial activity

极端环境微生物是新颖天然产物的重要来源^[1,2],近年来对低温环境真菌的研究也越来越多^[3,4]。低温环境真菌可以分为嗜冷真菌与耐冷真菌。嗜冷真菌是指 0℃以下可以生长,最适生长温度低于 15℃、但 20℃不能生长的真菌;耐冷真菌是在低温下可以生长繁殖,最适生长温度高于 20℃的菌株^[5,6]。研究发现,这两类来自低温环境的真菌可以产生独特的天然产物。例如, Dalsgaard 等^[7]从低温地区分离得到的一株青霉菌耐冷真菌,可以产

生独特的代谢产物并对 P338 细胞表现出中度抑制活性。Lu 等^[8]从南极嗜冷真菌 *Chryso sporium* sp. C3438 中首次分离得到化合物高铁色素 (ferri-chrome); Li 等^[9]从南极洲地区分离得到耐冷真菌 *Geomyces* sp.^[10],并成功分离得到 8 个曲地酸 (asteric acid) 衍生物,其中有 5 个是新化合物。Ren 等^[11]从南极企鹅岛海洋沉积物中分离得到木霉属真菌 *Trichoderma asperellum*,成功分离得到 6 个新的 peptaibols 类化合物。Zhang 等^[12]报道了低温型真菌抗肿瘤活性次级代谢产物研究进展,许多真菌的次级代谢物具有成药潜力。由此可见,低温环境真菌是一类重要的天然产物来源。

本研究尝试研究大兴安岭多年冻土中的可培养真菌。多年冻土又称永久冻土,指那些持续两年或

收稿日期:2019-10-11 接受日期:2020-04-01

基金项目:国家自然科学基金(31870528);黑龙江省博士后科研启动金(LBH-Q15123);黑龙江大学创新训练省级指导项目(201910212175)

*通信作者 Tel:86-451-86609487;E-mail:xulijian@hlju.edu.cn

者两年以上的冻结不融化的土层^[13],是研究低温环境真菌的相对稳定的材料,我国的多年冻土主要分布于青藏高原与大兴安岭^[14]。因为多年冻土区采样不方便,真菌分离困难,目前对我国多年冻土中可培养真菌的研究较少,主要集中在青藏高原多年冻土区^[15];尚未发现对大兴安岭多年冻土真菌的相关报道。本研究以大兴安岭多年冻土为研究材料,尝试分离其中可培养的真菌,测试它们产生的天然产

物的活性,筛选到具有开发潜力的可培养真菌,为进一步利用冻土真菌产生的天然产物资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

在大兴安岭多年冻土区进行采样,一共分为8个地点(见表1),采样深度为2 m,每10 cm为一个样品,冻土取出后立即放入灭菌采样盒中,待采样结束后将样品带回实验室,保藏于-80℃冰箱中。

表1 大兴安岭采样地点

Table 1 Sampling sites of Greater Khingan Mountains

样地号 Sample no.	生境 Habitat	海拔 Altitude (m)	东经 East longitude (E)	北纬 Northern latitude (N)
1#	森林	546	124°12.134'	51°14.529'
2#	森林	621	123°14.483'	52°48.443'
3#	森林	440	122°21.662'	53°05.219'
4#	湿地	736	122°24.594'	53°18.884'
5#	湿地	637	120°40.248'	50°22.435'
6#	农田	612	120°40.321'	50°21.049'
7#	森林	818	121°29.166'	51°16.382'
8#	湿地	451	125°13.536'	51°13.465'

1.2 仪器和试剂

仪器:超净工作台(苏州净化设备公司、SW-CJ-ID)、立式压力蒸汽灭菌器(上海东亚压力容器制造有限公司、YXQ-LS-100A)、恒温全培养摇床(上海新苗医疗器械制造有限公司、QYC-2102)、PCR仪(Applied Biosystems、Veriti96)、生化培养箱(上海博讯有限公司、BIC-250)、紫外分析仪(上海文锦仪器有限公司、ZF-105)、冷却水循环装置(上海爱朗科技有限公司、CA-1115A)、真空水式循环泵(郑州博科仪器有限公司、SHZ-D)、旋转蒸发器(上海亚荣仪器公司、RE-52AA)、高效薄层板(Merck公司)。

试剂:硫酸链霉素、盐酸金霉素、两性霉素B、烟酰胺、二甲基亚砷、乙酸乙酯、甲醇、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼、刚果红(抗生素均为USP级、化学试剂为分析纯)。

1.3 供试培养基

马铃薯葡萄糖培养基(potato dextrose agar, PDA):马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g,加水定容至1 L,(分离真菌时加入200 mg硫酸链霉素)。马铃薯葡萄糖液体培养基(potato dextrose broth, PDB):马铃薯200 g、葡萄糖20 g、加水定容至1 L。LB琼脂培养基(luria bertani agar, LB):氯化钠5 g、

蛋白胨10 g、酵母浸粉5 g、琼脂15 g,加水定容至1 L。小麦固体培养基:甘油2 g、酵母浸粉2 g、酒石酸钠10 g、磷酸二氢钾1 g、七水硫酸镁1 g、七水硫酸亚铁0.05 g。酵母浸提物蔗糖培养基(yeast extract sucrose medium, YES):酵母浸粉20 g、七水硫酸镁0.5 g、蔗糖150 g、七水硫酸锌0.01 g、五水硫酸铜0.005 g;水琼脂培养基:琼脂30 g,加水定容至1 L。羧甲基纤维素钠培养基(CMC-Na):羧甲基纤维素钠15 g、氯化钠5 g、磷酸二氢钾1 g、七水硫酸镁0.2 g、蛋白胨10 g、酵母浸粉5 g、琼脂20 g,定容至1 L。

1.4 真菌的分离与纯化

分离方法采用改良的颗粒涂布平板法^[16]:在室温下将冻土融化,称取10 g冻土,粉碎后过筛,称取1 g冻土颗粒加入到10 mL离心管中,加入灭菌水,定容至10 mL。用移液枪分别吸取25至600 μL不同量的冻土悬浮液,加入到稀释4倍的PDA分离平板上,将颗粒用三角棒均匀涂抹在分离培养基上。室温下培养,待孢子萌发后挑出,转移到PDA培养基下纯化,得到纯化菌株后,用打孔器打菌饼,放入盛有20%甘油溶液的冻存管中,分别保存于-20℃和-80℃冰箱中。

1.5 真菌的分子鉴定

采用 CTAB 法^[16] 提取真菌的总 DNA, 保存于 -20 °C。真菌的分子鉴定选用内部转录间隔区 (Internal Transcribed Spacer, ITS)^[17]。扩增引物分别是 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 扩增体系和扩增条件^[18] 见表 2、表 3。

表 2 PCR 扩增体系

Table 2 PCR amplification system

试剂 Reagent	50 μ L 反应体系 50 μ L Reaction system (μ L)	终浓度 Final concentration
PCR 预混液 2 \times Es Taq MasterMix	25	-
正向引物 Forward primer (10 μ M)	2	0.4 μ M
反向引物 Reverse primer (10 μ M)	2	0.4 μ M
模版 Template	1	-
双蒸水 ddH ₂ O	20	-

表 3 PCR 扩增条件

Table 3 PCR amplification conditions

步骤 Procedure	温度 Temperature (°C)	时间 Time (s)	循环 Cycle (次)
预变性 Initial denaturation	94	120	1
变性 Denaturation	94	30	30
退火 Anneal	55 ~ 65	30	30
延伸 Extension	72	30	30
终延伸 Final extension	72	120	1

将所得的真菌 ITS 序列的 PCR 原液进行测序, 测序选用 ITS1 与 ITS4 两个引物。比对两个引物的测序结果并进行修正, 删除不可信序列, 得到可信的序列, 然后利用 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 与 GenBank 中的序列进行比对。

1.6 提取物的制备

将待发酵的菌株用灭菌打孔器打 3 个菌饼放入 20 mL 种子发酵培养基中, 在 25 °C 下, 转速 180 rpm, 培养 3 天。固体发酵: 将 1 mL 的种子发酵液, 加入至含有 100 mL 固体培养基的 500 mL 的三角瓶中, 室温下培养 14 天。液体发酵: 将 0.5 mL 的种子发酵液加入至含有 50 mL 液体培养基的 250 mL 的三角瓶中, 转移至摇床中培养, 设置摇床条件为 25 °C、180 rpm, 培养周期 14 天。发酵培养基分别为

PDB 培养基、PDB 烟酰胺 (100 mg/L) 培养基、小麦固体培养基、YES 培养基四种。发酵结束后分别加入 2 倍体积乙酸乙酯并充分摇匀, 静置 1 天后, 减压浓缩得到提取物。加入 2 mL 的 DMSO, 制备成提取物溶液, 放置于 4 °C 冰箱备用。

1.7 生长速率测定

将 8 株相似性 $\leq 97\%$ 的菌株活化, 分别取 6 mm 菌饼接入 PDA 培养基中, 分别在 4、15、25 °C 条件下培养观察 (每个温度下 3 次重复), 利用十字交叉法测量菌落直径并记录, 周期 14 天。

1.8 活性测定

1.8.1 抗菌活性测定

针对细菌和酵母类真菌采用双层平板打孔药剂扩散法, 针对丝状真菌采用单层平板打孔药剂扩散法^[19]。双层平板打孔药剂扩散法操作步骤为: 在无菌培养皿中倒入 30 g/L 的水琼脂 25 mL, 待下层培养基凝固后, 倒入含有病原菌的培养基 25 mL, 待上层培养基凝固后, 用无菌打孔器在上层平板均匀打 5 个孔, 分别加入对照和真菌 100 mg/L 提取物溶液。按照数字顺序依次加入相对应的粗取物, 并在培养皿上标明病原菌名称和时间, 放入 25 °C 培养箱中观察, 测量抑菌圈大小并做好数据记录。单层平板打孔药剂扩散法操作步骤为: 在 PDA 培养基上均匀打 6 孔, 标记方法同上, 依次加入真菌 100 mg/L 提取物溶液, 然后将病原菌菌饼接入到培养皿正中心, 放入 25 °C 培养箱中观察, 测量真菌的生长情况并记录。

1.8.2 抗氧化活性测定

参照 Han 等^[20] 方法采用 DPPH-TLC 法活性测定对真菌的提取物抗氧化活性进行了初步测定, 具体操作如下: 称取 0.1 g 的 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH), 溶解于 50 mL 的甲醇中, 配置成 DPPH 甲醇溶液, 同时用甲醇溶液配制 5 mg/mL 的真菌提取物溶液, 裁剪合适的薄层铝板, 用铅笔轻轻划出 1 cm \times 1 cm 网格线, 用移液枪吸取 5 μ L 发酵液点样, 待薄层板干燥后在 254 和 365 nm 的紫外灯下观察, 随后喷洒 DPPH 进行抗氧化活性测定, 显色后立即拍照并记录。

1.8.3 产纤维素酶菌株的筛选

参照 Zhang 等^[21] 对产纤维素酶低温真菌的方法, 用打孔器将活化后的菌株打孔成 5 mm 菌饼, 接

种于 CMC-Na 平板中央,在 25 °C 培养箱中培养四天,用 1 mg/mL 刚果红染液铺满整个培养皿染色 1 小时,弃去刚果红染液,用无菌水清洗至无色,再加入 1 mol/L NaCl 溶液脱色 1 小时。观察菌落附近是否有脱色圈,记录脱色圈直径以及菌株的菌落直径。将脱色圈直径记为 D,菌株直径记为 d,用 D/d 数值表明该菌株的降解效果。

1.9 统计学方法

菌落直径、抑菌圈大小、脱色圈大小来自三次试验重复。应用 Excel 2019 进行平均值与标准差计算,利用 SPSS 25.0 计算单因素方差分析及利用 Duncan 检验法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 冻土真菌鉴定结果

在冻土样品中分离到 66 株真菌,对它们的 ITS 序列进行分析(表 4)。这 66 株真菌隶属于 3 个门 (Ascomycota、Basidiomycota、Mucoromycota)、29 个科 (Aspergillaceae、Bionectriaceae、Cladosporiaceae、Clavicipitaceae、Cordycipitaceae、Cucurbitariaceae、Debaryomycetaceae、Dermateaceae、Didymosphaeriaceae、Exobasidiaceae、Gjaerumiaceae、Gloeotinia、Hyaloscyphaceae、Lasiosphaeriaceae、Lipomycetaceae、Mycosphaerellaceae、Myxotrichaceae、Nectriaceae、Ophiocordycipitaceae、Phaeosphaeriaceae、Plectosphaerellaceae、Polyporaceae、Pseudeurotiaceae、Sarocladiaceae、Schizophyllaceae、Stachybotryaceae、Trichocomaceae、

Umbelopsidaceae、Ustilaginaceae),其中优势科 Cordycipitaceae 和 Nectriaceae 占 15.2%。这 66 株真菌隶属于 55 个分类单元。菌株 ITS 相似性在 99% 及以上的有 56 株,菌株相似性在 98% 的有 2 株;另外有 8 株相似性 $\leq 97\%$,分别是菌株 FSF006、FSF015、FSF021、FSF025、FSF028、FSF029、FSF042 与 FSF065;它们 ITS 序列的 GenBank 登录号分别是 MK192899、MK192902、MN491895、MK192903、MN491896、MN491897、MN491898 与 MN491899;它们的菌落图片见图 1。Cai^[10] 研究了中国寒冷高原地带的土壤样品中的真菌,发现主要优势菌株是 *Geomyces* 和 *Pseudogymnoascus* 这两个属真菌。本次研究也分离得到了 *Pseudogymnoascus* 属真菌,证明不同地区的冻土真菌类群存在着一定的相似性。本研究中,大兴安岭多年冻土中分离得到多株真菌,研究中发现的 8 株真菌的菌丝都不发达,可是能适应低温环境的一种表现。

2.2 抗菌活性测定结果

以 8 株相似性 $\leq 97\%$ 菌株的四种不同培养基提取物为研究对象,进行了抗菌活性测定。供试细菌为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、水稻黄单胞菌 (*Xanthomonas oryzae*)、青枯劳尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*),供试真菌为隐球菌 (*Cryptococcus* sp.)、胶红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*)、串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)。测定结果见表 5a 和 5b。

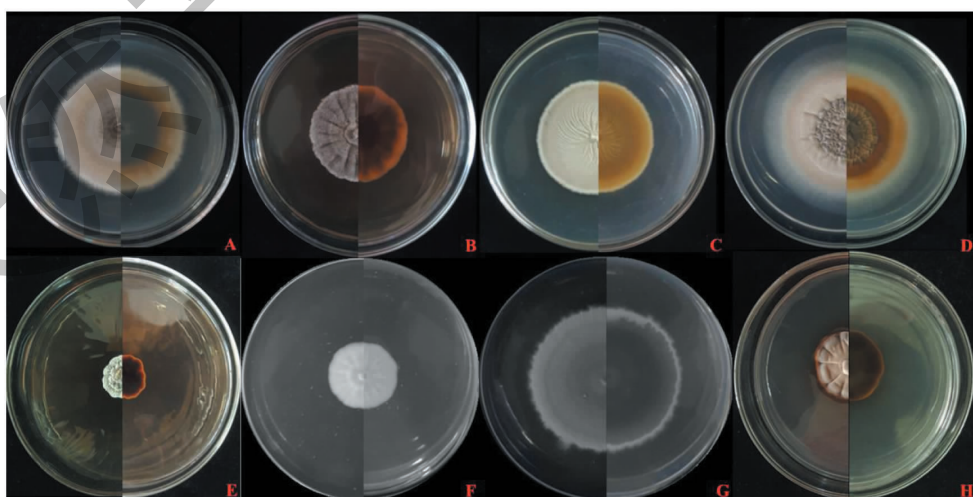


图 1 大兴安岭多年冻土筛选到的真菌菌落照片

Fig. 1 Colonies of fungal strains from permafrost in Greater Khingan Mountains

注:A~H 分别代表菌株 FSF006、FSF015、FSF021、FSF025、FSF028、FSF029、FSF042、FSF065 菌落正反面照片。Note:A-H mean front and reverse fungal colonies of FSF006,FSF015,FSF021,FSF025,FSF028,FSF029,FSF042 and FSF065,respectively.

表4 多年冻土真菌 ITS 序列相似性分析

Table 4 ITS sequence similarity analyses of fungi from permafrost

编号 No.	菌株号 Strain no.	最相近菌种 Closest strain	登录号* Accession*	覆盖度* Cover* (%)	相似性* Similarity* (%)
1	FSF001	<i>Verticillium nubilum</i>	LT560383	96	99
2	FSF002	<i>Lenzites betulinus</i>	KY313640	99	99
3	FSF003	<i>Clonostachys rosea</i>	KY810806	100	99
4	FSF004	<i>Umbelopsis angularis</i>	KC816010	99	99
5	FSF005	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KX664389	99	100
6	FSF006	<i>Seltsamia ulmi</i>	NR_156634	99	96
7	FSF007	<i>Umbelopsis isabelline</i>	KU847883	99	99
8	FSF008	<i>Verticillium nubilum</i>	LT560383	95	99
9	FSF009	<i>Lenzites betulinus</i>	AB811866	99	99
10	FSF010	<i>Pseudeurotium hygrophilum</i>	MF375774	99	99
11	FSF011	<i>Humicolopsis cephalosporioides</i>	KY065162	99	99
12	FSF012	<i>Meliniomyces variabilis</i>	EF093178	96	99
13	FSF013	<i>Penidiella</i> sp.	KP269064	98	99
14	FSF014	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	LC085196	99	100
15	FSF015	<i>Trimmatostroma</i> sp.	KJ542320	90	97
16	FSF016	<i>Sarocladium strictum</i>	AY138845	99	99
17	FSF017	<i>Pochonia bulbilosa</i>	AB378554	100	99
18	FSF018	<i>Metarhizium anisopliae</i>	MH104862	99	100
19	FSF019	<i>Myrothecium gramineum</i>	GQ373154	99	99
20	FSF020	<i>Pseudeurotium hygrophilum</i>	MF375774	97	99
21	FSF021	<i>Pseudozyma</i> sp.	EF643577	96	97
22	FSF022	<i>Parengyodontium album</i>	LC092887	94	100
23	FSF023	<i>Pezizomycotina</i> sp.	AB968620	99	99
24	FSF024	<i>Phaeosphaeria fockelii</i>	EF151447	98	99
25	FSF025	<i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i>	JX496041	100	95
26	FSF026	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	MH855800	100	99
27	FSF027	<i>Verticillium</i> sp.	KY471668	100	99
28	FSF028	<i>Exobasidium japonicum</i>	EU692768	96	92
29	FSF029	<i>Fusarium domesticum</i>	NR_145050	100	96
30	FSF030	<i>Aspergillus versicolor</i>	MG827180	100	100
31	FSF031	<i>Parastagonospora nodorum</i>	KF512822	97	100
32	FSF032	<i>Talaromyces purpureogenus</i>	MH865647	100	99
33	FSF033	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	MG664765	100	100
34	FSF034	<i>Talaromyces variabilis</i>	KU216713	100	100
35	FSF035	<i>Tolypocladium cylindrosporium</i>	MG228381	100	100
36	FSF036	<i>Fusarium domesticum</i>	MH855596	100	98
37	FSF037	<i>Pseudeurotium hygrophilum</i>	MF375774	100	100
38	FSF038	<i>Cercospora physalidis</i>	KC776163	100	100

续表 4(Continued Tab. 4)

编号 No.	菌株号 Strain no.	最相近菌种 Closest strain	登录号* Accession*	覆盖度* Cover*(%)	相似性* Similarity*(%)
39	FSF039	<i>Beauveria bassiana</i>	MG554286	100	100
40	FSF040	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>	KT878334	100	100
41	FSF041	<i>Phoma herbarum</i>	MH858359	100	100
42	FSF042	<i>Podospora glutinans</i>	KT224860	100	96
43	FSF043	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	JX431888	100	99
44	FSF044	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	MH858202	100	100
45	FSF045	<i>Phaeosphaeria oryzae</i>	MG813229	100	99
46	FSF046	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	MK012416	100	100
47	FSF047	<i>Fusarium avenaceum</i>	MK204577	100	100
48	FSF048	<i>Neosetophoma guiyangensis</i>	MH018134	100	100
49	FSF049	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	MH856395	100	100
50	FSF050	<i>Acremonium fusidioides</i>	MF077220	100	100
51	FSF051	<i>Schizophyllum commune</i>	MG916999	100	100
52	FSF052	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MK267756	100	100
53	FSF053	<i>Aspergillus versicolor</i>	MG309695	100	100
54	FSF054	<i>Tolypocladium cylindrosporium</i>	MG228381	100	100
55	FSF055	<i>Gloeotinia</i> sp.	MK267767	100	100
56	FSF056	<i>Cadophora malorum</i>	MF782737	93	99
57	FSF057	<i>Nectria</i> sp.	MK461033	100	99
58	FSF058	<i>Verticillium</i> sp.	KY471669	100	100
59	FSF059	<i>Simplicillium cylindrosporium</i>	MK367728	100	100
60	FSF060	<i>Cistella albidolutea</i>	JN033429	100	98
61	FSF061	<i>Cadophora orchidicola</i>	KX440156	100	100
62	FSF062	<i>Talaromyces verruculosus</i>	MK367753	100	100
63	FSF063	<i>Cosmospora stegonsporii</i>	NR_159868	100	99
64	FSF064	<i>Tolypocladium inflatum</i>	MH864439	100	100
65	FSF065	<i>Ophiopogon</i> sp.	MK205294	100	90
66	FSF066	<i>Cordyceps farinose</i>	MH864784	100	100

注: * 最相近菌株的 GenBank 的登录号。

Note: * means the closest fungal strain's GenBank accession numbers.

表 5a 冻土真菌发酵提取物的抗菌活性

Table 5a Antimicrobial activities of fungal extracts from permafrost

菌株号 Strain no.	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter(cm)															
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>				水稻黄单胞菌 <i>X. oryzae</i>				青枯劳尔氏菌 <i>R. solanacearum</i>				隐球菌 <i>Cryptococcus</i> sp.			
	P	NI	W	Y	P	NI	W	Y	P	NI	W	Y	P	NI	W	Y
FSF006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FSF015	0.73 ± 0.03 ^m	-	-	1.10 ± 0.06 ^{ijkl}	-	-	-	-	-	-	-	1.13 ± 0.03 ^{jk}	-	-	-	-
FSF021	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

续表 5a(Continued Tab. 5a)

菌株号 Strain no.	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter(cm)															
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>				水稻黄单胞菌 <i>X. oryzae</i>				青枯劳尔氏菌 <i>R. solanacearum</i>				隐球菌 <i>Cryptococcus</i> sp.			
	P	NI	W	Y	P	NI	W	Y	P	NI	W	Y	P	NI	W	Y
FSF025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FSF028	2.63 ± 0.03 ^e	2.63 ± 0.03 ^e	-	2.07 ± 0.03 ^g	3.43 ± 0.03 ^b	3.53 ± 0.03 ^a	-	3.07 ± 0.03 ^c	3.03 ± 0.03 ^c	3.06 ± 0.03 ^c	-	2.50 ± 0.00 ^f	-	-	-	-
FSF029	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FSF042	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FSF065	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注:“-”:无活性;P;PDB 发酵;NI;PDB 中加入烟酰胺发酵;W;小麦固体发酵;Y;YES 发酵;数据为抑菌圈平均值(平均值 ± 标准差, $P < 0.05$),不同字母表示差异显著,下同。

Note:“-”:inactivity;P;PDB medium;NI;PDB medium with nicotinamide;W;wheat solid medium;Y;YES medium;the data are the average diameters of inhibition zones (Mean ± SD, $P < 0.05$), different letters mean significant difference, the same below.

表 5b 冻土真菌发酵提取物的抗菌活性

Table 5b Antimicrobial activities of fungal extracts from permafrost

菌株号 Strain no.	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter(cm)											
	胶红酵母 <i>R. mucilaginosa</i>				串珠镰刀菌 <i>F. moniliforme</i>				立枯丝核菌 <i>R. solani</i>			
	P	NI	W	Y	P	NI	W	Y	P	NI	W	Y
FSF006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FSF015	-	-	-	-	0.50 ± 0.00 ⁿ	-	-	-	-	-	-	-
FSF021	-	-	-	-	0.33 ± 0.03 ^u	0.10 ± 0.00 ^q	-	-	0.77 ± 0.03 ^m	-	-	-
FSF025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FSF028	1.27 ± 0.03 ^l	1.16 ± 0.03 ^l	-	-	1.07 ± 0.03 ^{kl}	0.43 ± 0.03 ^o	-	-	2.53 ± 0.03 ^f	2.86 ± 0.03 ^d	-	-
FSF029	-	-	-	-	-	-	-	-	0.50 ± 0.00 ^o	-	-	-
FSF042	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FSF065	-	-	-	-	1.03 ± 0.03 ^l	-	-	-	0.60 ± 0.00 ⁿ	-	-	-

以上 8 株真菌中,菌株 FSF025 和 FSF042 对供试病原菌未见明显抑菌活性。其它 6 株真菌(FSF006、FSF015、FSF021、FSF028、FSF029 和 FSF065)表现了不同的抗菌活性,并针对每一种病原菌都至少有一株具有抗菌活性的真菌。菌株 FSF028 对除隐球菌外的其他 6 株病原菌都出现了肉眼可见抑菌圈(0.43 ~ 3.53 cm)。而且对金黄色葡萄球菌、青枯劳尔氏菌、水稻黄单胞菌和立枯丝核菌的活性较强(图 2-4)。

2.3 抗氧化活性测定结果

选用清除 DPPH 自由基法测定了 8 株相似性 ≤

97% 菌株的四种培养基发酵提取物的活性。在紫外 254 和 365 nm 的显色效果如图 3a 和 3b, 菌株 FSF042 的 4 种培养基发酵物都具有一定的 DPPH 自由基清除能力,各菌株对自由基的清除能力强弱如图 3c,详细结果见表 6。

实验结果显示 8 株真菌的小麦固体培养基提取物都有活性,但活性强弱表现了一定差异。发现该对照提取物(不加真菌的小麦固体培养基)具有较弱的抗氧化活性,不排除是所用小麦有农药或抗氧化剂的残留。其它三种培养基对照提取物没有表现抗氧化活性,根据这三种培养基发酵的结果,确定具

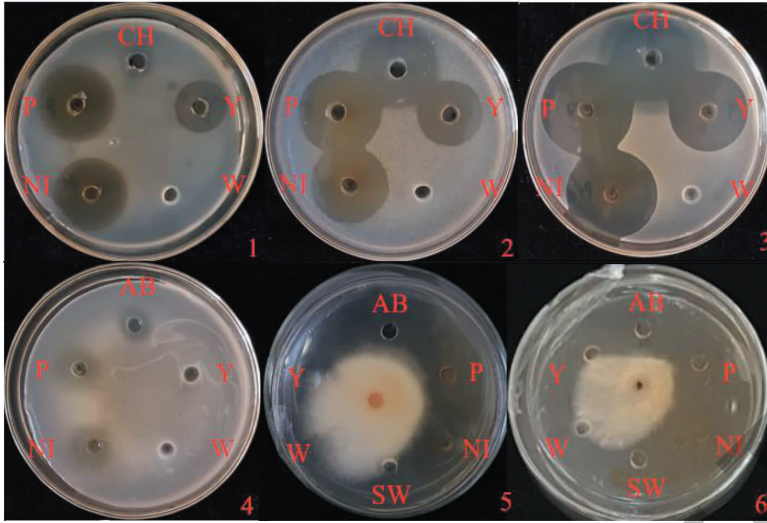


图2 菌株 FSF028 的抗菌活性

Fig. 2 Antimicrobial activities of fungal strain No. FSF028

注:1:金黄色葡萄球菌;2:青枯劳尔氏菌;3:水稻黄单胞菌;4:胶红酵母;5:串珠镰刀菌;6:立枯丝核菌。CH:盐酸金霉素;AB:两性霉素 B;SW:无菌水;P:PDB 发酵;NI:PDB 中加入烟酰胺发酵;W:小麦固体发酵;Y:YES 发酵。Note:1:*S. aureus*; 2:*R. solanacearum*; 3:*X. oryzae*; 4:*R. mucilaginosa*; 5:*F. moniliforme*; 6:*R. solani*. CH:Chlortetracycline hydrochloride; AB:Amphotericin B; SW: Sterile water; P:PDB medium; NI:PDB medium with nicotinamide; W:Wheat solid medium; Y:YES medium.

有抗氧化活性的菌株是 FSF006、FSF015、FSF021、FSF029、FSF042、FSF065,其中菌株 FSF042(最相近菌为 *Podospora glutinans*) 有较强的抗氧化活性。FSF006 菌株的抗氧化活性的发现,首次揭示 *Seltsamia* 属真菌具有抗氧化活性的能力。*Seltsamia* 属是在 2017 年建立的新属^[22],*Seltsamia* sp. FSF006 菌株的发现,对 *Seltsamia* 属进一步深入研究提供了

备选菌株。

2.4 生长速率测定结果

通过在 4、15、25 °C 三种温度下^[10],利用交叉法测量 8 株真菌菌落的生长情况,筛选到 5 株耐冷真菌(4 °C 可以生长),分别是 FSF006、FSF015、FSF025、FSF029、FSF042。它们在三种温度下的生长速度见表 7。这 5 株真菌在 25 °C 生长速率最快,

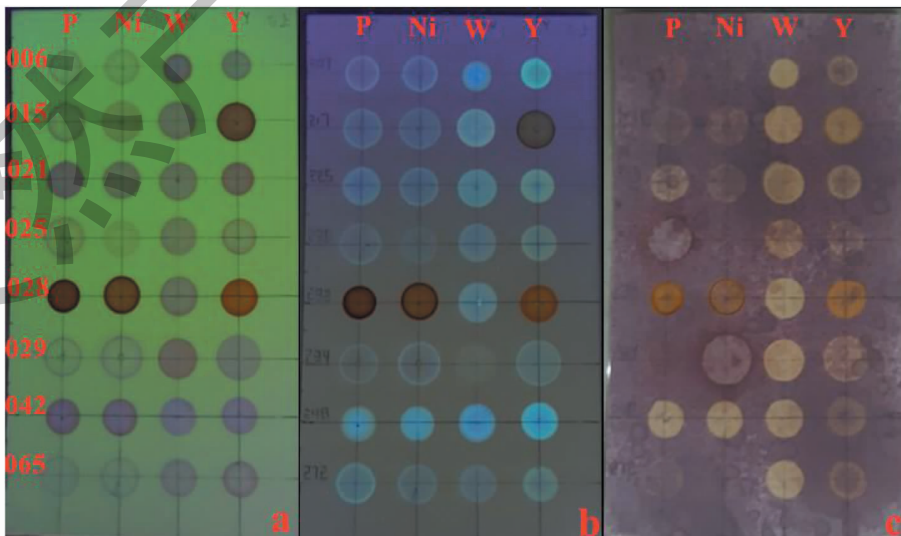


图3 冻土真菌提取物的抗氧化活性

Fig. 3 Antioxidant activities of fungal extracts from permafrost

注:a:紫外 254 nm;b:紫外 365 nm;c:DPPH 显色结果。Note:a:UV 254 nm;b:UV 365 nm;c:DPPH results.

表 6 冻土真菌发酵提取物的抗氧化活性

Table 6 Antioxidant activities of fungal extracts from permafrost

菌株号 Strain no.	PDB 培养基 PDB medium	PDB 烟酰胺培养基 PDB with nicotinamide	小麦固体培养基 Wheat medium	YES 培养基 YES medium
FSF006	-	-	++	+
FSF015	-	-	+++	+++
FSF021	++	-	++	++
FSF025	-	-	+	-
FSF028	-	-	+++	-
FSF029	-	-	+++	+
FSF042	+++	+++	+++	+
FSF065	-	-	++	+
对照 Control	-	-	++	-

注:“+”的个数代表抗氧化活性的强弱,“+++”代表全部褪色、“++”代表部分褪色、“+”代表微弱可见褪色、“-”代表无活性。

Note: The number of “+” represents fading situation, “+++” represents complete fading, “++” represents partial fading, “+” represents weak and visible fading, “-” represents inactivity.

15 ℃生长速率次之,4 ℃生长速率最慢。这 5 株耐冷真菌的最相近菌属中,有 3 个属是首次在冻土中分离得到,分别是 *Seltsamia* (ITS 相似性 97%)、*Pa-*

raphaeosphaeria (95%)、*Podospora* (96%)。研究发现这 5 株耐冷真菌在抗菌、抗氧化及降解纤维素方面分别表现出了活性。

表 7 不同温度下耐冷真菌的生长

Table 7 Growth of cold-tolerant fungi at different temperatures

菌株号 Strain no.	不同温度下的生长速率 Growth rates at different temperatures(mm/d)		
	4 ℃	15 ℃	25 ℃
FSF006	0.55 ± 0.02 ^a	1.49 ± 0.02 ^a	2.31 ± 0.02 ^b
FSF015	0.07 ± 0.00 ^e	0.37 ± 0.02 ^e	0.53 ± 0.00 ^e
FSF025	0.33 ± 0.00 ^b	1.44 ± 0.02 ^a	2.62 ± 0.22 ^a
FSF029	0.56 ± 0.02 ^a	1.46 ± 0.04 ^a	1.89 ± 0.22 ^c
FSF042	0.51 ± 0.02 ^a	1.29 ± 0.02 ^b	1.64 ± 0.22 ^d

注:数据为菌落生长速率平均值(平均值 ± 标准差, $P < 0.05$),同列不同字母表示差异显著,下同。

Note: The data are the average growth rates of fungi (mean ± SD, $P < 0.05$), the different letters in the same column mean significant difference, the same below.

2.5 产纤维素酶菌株初筛结果

利用刚果红染色法对 8 株相似性 ≤ 97% 的菌株进行了降解纤维素的分析,筛选到 4 株具有降解纤维素能力的菌株(图 3),分别是 FSF006、FSF015、FSF025、FSF029,菌株脱色圈和菌落直径大小如表 8,其中菌株 FSF029 降解纤维素的能力较强。这 4 株菌的菌落形态特点如下:菌株 FSF006 菌落正面成轮纹状,颜色从内到外由灰色变为白色,菌落背面也成轮纹状,颜色从内到外由黑色变为白色;菌株 FSF015 正面褐色有褶皱,菌丝不发达,背面黑色;菌株 FSF025 菌落正面成轮纹状,内圈粉色外圈白色,最中心有明显的褶皱,菌丝较发达,背面从内到外依次是褐色、黄色和白色;菌株 FSF029 正面背面都是

雪白色,中心有轻微的褶皱,菌丝较发达。

本次研究发现的 4 株具有降解纤维素能力的真菌,都属于耐冷真菌,其中三株在 15 ℃ 下的生长速率都超过 1.2 mm/d。它们的最相近菌属分别为镰刀属(*Fusarium*)、*Seltsamia* 属、*Trimmatostroma* 属与 *Paraphaeosphaeria* 属。其中镰刀属、*Trimmatostroma* 属与 *Paraphaeosphaeria* 属真菌曾经被报道过具有纤维素降解活性^[23-25],而尚未发现 *Seltsamia* 属真菌具有纤维素降解能力。目前降解纤维素酶的最适温度是 45 ~ 65 ℃,而低温降解纤维素酶的最适温度是 15 ~ 25 ℃^[26];因此发现具有纤维素降解能力的低温真菌,可能具有一定的应用前景。

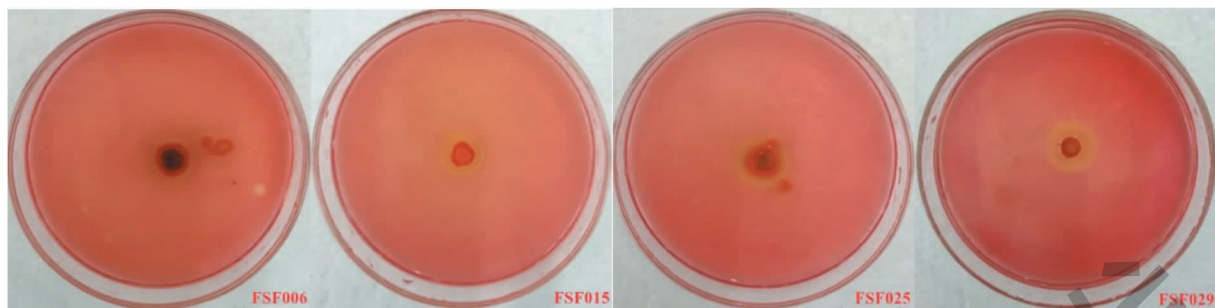


图4 产纤维素酶菌株的筛选

Fig. 4 Screening of cellulase producing fungal strains

表8 产纤维素酶菌株的筛选

Table 8 Screening of cellulase producing fungal strains

指标 Indicator	FSF006	FSF015	FSF025	FSF029
脱色圈直径 Diameter of transparent zone(D) (cm)	2.00 ± 0.00 ^a	1.53 ± 0.03 ^c	2.00 ± 0.00 ^a	1.77 ± 0.03 ^b
菌落直径 Diameter of colony(d) (cm)	1.27 ± 0.03 ^a	0.80 ± 0.00 ^b	1.27 ± 0.03 ^a	0.70 ± 0.00 ^c
直径比 Diameter ratio(D/d)	1.58 ± 0.04 ^c	1.92 ± 0.04 ^b	1.58 ± 0.04 ^c	2.52 ± 0.05 ^a

注:脱色圈、菌落直径及直径比(平均值 ± 标准差, $P < 0.05$)。

Note: D, d and D/d (mean ± SD, $P < 0.05$).

3 讨论与结论

外担子菌 FSF028 号菌株代谢物具有较好的抗菌活性,在外担子菌属 (*Exobasidium*) 真菌中曾被分离到 2 个抗菌化合物 cryptosporin 和 2-hydroxy-3-phenylpropanoic acid^[27,28],但 FSF028 菌的最相近菌 *E. japonicum* 尚未见有关抗菌化合物的报道。

柄孢壳菌 FSF042 号菌株代谢物具有较好的抗氧化活性,目前在柄孢壳菌属 (*Podospira*) 真菌中已经分离了 34 个天然产物,其中不乏抗菌化合物^[29-31],例如 decipinin A、curvicollides A、appenolide B 等。尚未见该属单体化合物的清除自由活性的报道。但 Dong 等^[32]分离培养的柄孢壳菌 S29、S32 与 S66 (*Podospira* sp. S29, *Podospira* sp. S32 与 *Podospira* sp. S66) 的提取物具有 DPPH 自由基清除的能力,证明柄孢壳菌属真菌具有抗氧化活性。

镰刀菌 FSF029 号菌株具有较好的纤维素降解活性,目前在镰刀菌属真菌中分离到 600 多个化合物;降解纤维素方面,尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*)、茄镰刀菌 (*F. solani*)、厚垣镰刀菌 (*F. chlamydosporum*) 与串珠镰刀菌 (*F. moniliforme*) 曾经被报道过具有降解纤维素活性^[33-36],且发现尖孢镰刀菌对植物的致病性可能与其纤维素降解酶有关^[37]。FSF029 的最相近菌为 *F. domesticum*,尚未见有关 *F. domesticum* 降解纤维素的报道。

本研究首次对大兴安岭多年冻土中的可培养真

菌进行了天然产物活性的研究,分离得到 66 株可培养真菌,其中含有 8 株相似性 ≤ 97% 的菌株,其中 FSF028 号菌株、FSF042 号菌株与 FSF029 号菌株分别表现了较强的生物活性。此外,本研究还首次发现了 *Seltsamia* 属真菌具有纤维素降解活性,其代谢物具有抗氧化活性。综上所述,本研究为进一步开发利用多年冻土的真菌资源打下了基础。

参考文献

- Rothschild LJ, Mancinelli RL. Life in extreme environments [J]. Nature, 2001, 409: 1092-1101.
- Wilson ZE, Brimble MA. Molecules derived from the extremes of life [J]. Nat Prod Rep, 2009, 26: 44-71.
- Dalsgaard PW, Larsen TO, Frydenvang K, et al. Psychrophilin A and cycloaspeptide D, novel cyclic peptides from the psychrotolerant fungus *Penicillium ribeum* [J]. J Nat Prod, 2004, 67: 878-881.
- Dalsgaard PW, Blunt JW, Munro MHG, et al. Communesins G and H, new alkaloids from the psychrotolerant fungus *Penicillium rivulum* [J]. J Nat Prod, 2005, 68: 258-261.
- Huo LQ. Sequencing and analyses of mitochondrial genome of cold-adapted fungi [D]. Taiyuan: Shanxi University (山西大学), 2015.
- Smith D, Coulson GE, Morris GJ. A comparative study of the morphology and viability of hyphae of *Penicillium expansum* and *Phytophthora nicotianae* during freezing and thawing [J]. J Gen Appl Microbiol, 1986, 132: 2013-2021.

- 7 Dalsgaard PW, Larsen TO, Christophersen C. Bioactive cyclic peptides from the psychrotolerant fungus *Penicillium algidum* [J]. J Cheminformatics, 2005, 36: 141-144.
- 8 Lu M, Wang WX, Wang LP, et al. Isolation and structure identification of bioactive metabolite C₃₄₃₈ A of psychrophilic fungi *Chrysosporium* sp. C₃₄₃₈ isolated from soil of south pole [J]. Chin J Antibio (中国抗生素杂志), 2002, 27(1): 11-12.
- 9 Li Y, Sun BD, Liu SC, et al. Bioactive asterric acid derivatives from the antarctic Ascomycete fungus *Geomyces* sp. [J]. J Nat Prod, 2008, 71: 1643-1646.
- 10 Cai WJ. Classification of psychrotrophic *Geomyces* and population genetics of *Geomyces pannorum* [D]. Nanning: Guangxi University (广西大学), 2014.
- 11 Ren JW, Xue CM, Tian L, et al. Asperelines A-F, peptaibols from the marine-derived fungus *Trichoderma asperellum* [J]. J Nat Prod, 2009, 72(6): 1036-1044.
- 12 Zhang Y, Liu RM, Xiao JH. Research progress on antitumor secondary metabolites from cold-adapted fungi [J]. Mycosystema (菌物学报), 2016, 35(5): 9-24.
- 13 Qin DH. Glossary of Cryosphere Science [M]. Beijing: China Meteorological Press (气象出版社), 2016.
- 14 Zhou YW, Guo DX. Principal characteristics of permafrost in China [J]. J Glaciol Geocryol (冰川冻土), 1982, 4(1): 1-19.
- 15 Li DY. Diversity and physiological characteristics of culturable microbes in Qinghai-Tibet Plateau permafrost region [D]. Lanzhou: Lanzhou University (兰州大学), 2014.
- 16 Liang J, Liu BY, Li ZY, et al. *Myxotrichum albicans*, a new slowly-growing species isolated from forest litter in China [J]. Mycoscience, 2019, 60: 232-236.
- 17 Chen JS, Zheng FC. Application of ITS sequences in fungi classification and identification [J]. J Anhui Agr Sci (安徽农业科学), 2007, 35: 3785-3786.
- 18 Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species [J]. J Bacteriol, 1990, 172: 4238-4246.
- 19 Zhou LG. Plant Antimicrobial Compounds [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press (中国农业科学技术出版社), 2005.
- 20 Han X, Sun XM, Wang LW, et al. An examination of the bioactivities of seven wood-rotting fungi [J]. Chin Agr Sci Bull (中国农学通报), 2015, 31: 141-145.
- 21 Zhang MJ, Qiu CH, Chai LW, et al. Screening, identification and fermentation optimization of cold-adapted fungi with high efficiency of cellulose degradation [J]. Microbiol China (微生物学通报), 2019, 46: 2494-2503.
- 22 Jaklitsch WM, Checa J, Blanco MN, et al. A preliminary account of the Cucurbitariaceae [J]. Stud Myco, 2018, 90: 71-118.
- 23 Zerva I, Remmas N, Ntougias S. Biocatalyst potential of cellulose-degrading microorganisms isolated from orange juice processing waste [J]. Beverages, 2019, 5(1): 1-11.
- 24 Abdel-Hafez SH. Cellulose-decomposing fungi of desert soils in Saudi Arabia [J]. Mycopathologia, 1982, 78(2): 73-78.
- 25 Zheng JH, Yu JP. Separation and purification of cellulase in culture medium of *Fusarium* [J]. Chem Bioeng (化学与生物工程), 2010, 27(12): 65-68.
- 26 Akila G, Chandra TS. A novel cold-tolerant *Clostridium* strain PXYL1 isolated from a psychrophilic cattle manure digester that secretes thermolabile xylanase and cellulase [J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 219(1): 63-67.
- 27 Gupta RB, Franck RW. The total synthesis of (-)-cryptosporin [J]. J Am Chem Soc, 1989, 111: 7668-7670.
- 28 Breuning M, Hauser T, Tanzer EM. A novel one-pot procedure for the stereoselective synthesis of α -hydroxy esters from ortho esters [J]. Org Lett, 2009, 11: 4032-4035.
- 29 Che YS, Gloer JB, Koster B, et al. Decipin A and Decipinolides A and B; new bioactive metabolites from the coprophilous fungus *Podospora decipiens* [J]. J Nat Prod, 2002, 65: 916-919.
- 30 Che YS, Gloer JB, Wicklow DT. Curvicollides A-C; new polyketide-derived lactones from a sclerotium-colonizing isolate of *Podospora curvicolla* (NRRL 25778) [J]. Org Lett, 2004, 6: 1249-1252.
- 31 Wang Y, Gloer JB, Scott JA, et al. Appenolides A-C; three new antifungal furanones from the coprophilous fungus *Podospora appendiculata* [J]. J Nat Prod, 1993, 56: 341-344.
- 32 Dong LH, Fan SW, Ling QZ, et al. Study on huperzine A-producing endophytic fungi isolated from *Huperzia serrata* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2014, 26: 650-655.
- 33 Qin YL, He HY, Li N, et al. Isolation and characterization of a thermostable cellulase-producing *Fusarium chlamydosporum* [J]. World J Microb Biot, 2010, 26: 1991-1997.
- 34 Yuan L, Wang W, Pei YY, et al. Screening and identification of cellulase-producing strain of *Fusarium oxysporum* [J]. Procedia Environ Sci, 2012, 12: 1213-1219.
- 35 Matsumoto K, Endo Y, Tamiya N, et al. Studies on cellulase produced by the phytopathogens. Purification and enzymatic properties of cellulase of *Fusarium moniliforme* [J]. J Biochem, 1974, 76: 563-572.
- 36 Wood TM. The cellulase of *Fusarium solani*. Purification and specificity of the β -(1 \rightarrow 4)-glucanase and the β -D-glucosidase components [J]. Biochem J, 1971, 121: 353-362.
- 37 Gao XM, Wang JG, Ma LG, et al. Research advances on the mechanism of pathogenesis and allelopathy of *Fusarium oxysporum* [J]. Microbiol China (微生物学通报), 2014, 41: 2143-2148.