

松花江底泥真菌的分离培养及分子鉴定

刘 杰, 丁艳丽, 冯 伟, 王婧妍, 毛冠男, 王莹莹*

(南开大学环境科学与工程学院, 环境污染过程与基准教育部重点实验室, 天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室, 天津 300071)

摘 要:筛选出合适的培养基对底泥真菌进行计数, 分析不同培养基的真菌数量与理化环境的差异性, 并对典型真菌进行分离鉴定, 探讨其解决环境问题的可能性。选用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基、察氏琼脂(CA)培养基和沙保氏琼脂(SDA)培养基3种真菌培养基对底泥真菌进行分离培养, 通过方差分析和主成分分析比较了各培养基之间可培养真菌数量的差别及其与环境因子的关系, 并对代表性真菌分离纯化, 进行真菌核糖体基因转录间隔区(ITS)序列的测序和进化树分析。在同一采样点之间, 3种不同培养基的可培养真菌在数量上没有显著差别, 而在环境因子的关联上, PDA培养基的可培养真菌数量与沉积物有机质浓度、硝氮、总氮显著相关, CA培养基的可培养真菌数量与硝氮显著相关, SDA培养基的可培养真菌数量与总氮相关, PDA培养基的可培养真菌数量与环境因子的相关性优于其他两种培养基; 分离纯化得到20株代表性真菌, 系统进化树表明所有的菌株能得到鉴定, 实验结果显示ITS序列能很好地应用于真菌的鉴定及生态分析。

关键词:松花江; 底泥; 真菌; 分离培养; 核糖体基因转录间隔区

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号 1672-2043(2013)02-0354-09 doi:10.11654/jaes.2013.02.021

Isolation and Molecular Identification of Fungi from the Sediment of Songhua River, China

LIU Jie, DING Yan-li, FENG Wei, WANG Jing-yan, MAO Guan-nan, WANG Ying-ying*

(Ministry of Education Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: The current study aims to select proper media to determine the concentration of sediment fungi in the Songhua River, analyze the differences in environmental factors, identify the representative fungi, and explore their potential environmental applications. Different media [i.e. Potato Dextrose agar (PDA), Czapek agar (CA) and Sabouraud's agar (SDA)] were used to determine the concentration of sediment fungi, and the results were compared using Analysis of Variance and Principal Component Analysis. The internal transcribed spacer (ITS) of isolated fungi was sequenced and a phylogenetic analysis was carried out. There were no significant differences among the fungal concentrations at the same sampling point when cultivated using three kinds of different media. However, there were clear differences in their correlation to environmental factors. The number of fungi cultivated on PDA medium exhibited a significant correlation with organic matter, nitrate nitrogen and total nitrogen, while the fungi cultivated on CA medium showed correlation only with nitrate nitrogen. In contrast, fungi cultivated on SDA medium were significantly associated with the total nitrogen content. The number of fungi cultivated on PDA medium was more closely related with environmental variables than that cultivated on the other two media. Hence, PDA was a more suitable medium in the term of environmental monitoring. 20 representative fungi were isolated and subsequent phylogenetic analysis showed that all of the strains could be identified. The results also demonstrated that the ITS region is a reliable element for fungal identification and ecological analysis.

Keywords: Songhua River; sediment; fungi; isolation and cultivation; internal transcribed spacer (ITS)

作为水域生态系统的重要组成部分, 真菌是非常重要的分解者之一, 它们在生态系统中的物质循环、

能量流动以及在维持生态平衡和环境净化等方面发挥着十分重要的作用^[1-4]。与水体相比, 水体中悬浮颗粒物质、动植物遗骸腐烂所产生的各种有机物, 通过沉积、沉淀作用使得底泥沉积物成为有机物的富集区^[5], 并且污染物被水体颗粒物吸附、络合、絮凝、沉降而沉积在底泥中。在河流生态系统中, 底泥微生物对促进底泥沉积物中有机质的分解、减少有机质

收稿日期: 2012-07-26

基金项目: 国家水专项项目(2008ZX07526-002-01); 国家自然科学基金项目(31000247)

作者简介: 刘 杰(1987—), 男, 湖南益阳人, 博士研究生, 研究方向为环境微生物学。E-mail: liujiebaiya@mail.nankai.edu.cn

* 通信作者: 王莹莹 E-mail: wangyy@nankai.edu.cn

的积累、保持良好水质有着重要的作用^[6],真菌通过吸附于有机物质上进行渗透营养,底泥微粒物质成为其良好的基质^[7],真菌多样性和群落结构是河流底泥微生物生态学研究的重要内容之一。松花江流经黑龙江、吉林两省及内蒙古东部地区,作为我国七大主要河流之一,其水体污染防治问题已经引起了国家的高度重视,“十一五”期间被列入了重点污染治理河流。

稀释平板法是进行微生物分离培养的常用方法,在培养一段时间后,每一个活化的孢子或菌丝片段都可以生长成一个真菌菌落,然后直接计数和后续鉴定^[8-9],该方法简便易行,一直以来被广泛应用于从样品中寻找真菌并培养为菌落用于鉴定。真菌核糖体基因转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS),又叫内转录间隔区,是位于真菌核糖体DNA(rDNA)上18S rDNA与5.8S rDNA之间的内转录间隔区1(ITS1)和5.8S rDNA与28S rDNA基因之间的内转录间隔区2(ITS2)^[10-11]。研究表明真菌rDNA上的5.8S、18S和28S rRNA基因有极大的保守性,即存在着广泛的异种同源性^[12-13],ITS作为非编码区不加入成熟核糖体,在进化过程中承受的自然选择压力非常小,相对变化比较大,在不同形态的真菌物种之间表现出较高的差异性^[14],Anderson等研究证实ITS与18S rDNA在分析环境样品真菌多样性时是十分有效的,但是仍然存在一些局限^[15],Leblond-Bourget等研究表明ITS的进化速率是18S rDNA的10倍^[16]。ITS1和ITS2是中度保守区域,其保守性基本上表现为种内相对一致,种间差异比较明显^[17-18]。此外,由于ITS基因序列一般在600~800 bp之间,使得很容易用通用引物扩增^[19],rDNA重复的多拷贝性质使得ITS序列容易从小片段、浓度低或严重降解的DNA样品中进行扩增,这些特点使得ITS序列广泛应用于真菌物种分子鉴定和群落分析的研究^[20-25]。

开展松花江流域水生态功能分区研究,建立水生

态系统分区指标体系和基础数据库,筛选出合适的培养基以及真菌引物,旨在为研究松花江流域底泥真菌数量分布、群落结构及多样性提供依据。本文研究了佳木斯市至桦川县境内松花江段的底泥真菌,采用稀释平板法,通过数学统计方法分析了不同培养基之间可培养真菌数量及其与环境因子之间的相互关系,同时,结合分子生物学的方法,利用ITS序列对代表性的真菌进行了分离鉴定,并分析了部分真菌在环境污染治理和修复中的可能应用。

1 材料与方法

1.1 样品的采集及预处理

采样点属于松花江流域下游地区的三江平原地区,河流沉积物采样方法按照《水质、河流采样技术指导》(GB 12998—1991)进行。采样时间为2010年6月,属于松花江的丰水季节。样品均于常温下采集储存于50 mL离心管中,4℃冰盒保存,运回实验室,于4℃保存。采样点的地理位置信息见表1。沉积物中有机质、总氮、总磷等环境因子的测定方法参照鲁如坤^[26]和金相灿^[27]等方法。

称取底泥泥样2.00 g于干净灭菌的试管中,加灭菌生理盐水18 mL按1:10比例进行稀释,加入终浓度1/20 000的吐温80,室温下涡旋振荡2 min混匀,然后用无菌生理盐水依次稀释10、10²倍,共制成3个浓度梯度(10⁻¹、10⁻²、10⁻³)的样品悬浮液。

1.2 底泥真菌分离计数、纯化

1.2.1 培养基

实验中3种真菌培养基的配方如下:

(1)马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato dextrose agar, PDA):马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g、抗生素0.100 g(氯霉素、硫酸链霉素各0.050 g)、蒸馏水1000 mL。将新鲜的马铃薯去皮,切块(1 cm³大小),称200 g加1000 mL蒸馏水,煮沸30 min,用4层医用脱脂棉纱布过滤,待滤液不再滴出时,补加蒸馏水至

表1 采样点地理位置信息

Table 1 The location information of sampling point

采样点	采样时间	经度/°	纬度/°	海拔/m
佳木斯市莲江口大桥(1#)	2012年6月19日	130.780	47.131	103
佳木斯市敖其镇(2#)	2012年6月20日	130.620	47.047	100
佳木斯市中兴村(3#)	2012年6月20日	130.771	47.111	74
佳木斯城东(4#)	2012年6月20日	130.986	47.148	80
桦川县悦来镇江沿(5#)	2012年6月20日	131.217	47.331	68
桦川县江川农场马库力村(6#)	2012年6月20日	131.285	47.391	73

1000 mL,再加入 20.0 g 葡萄糖和 20.0 g 琼脂,加热溶化,分装, 1×10^5 Pa 高压灭菌 30 min。抗生素在灭菌后加入(紫外灭菌)。

(2)察氏琼脂培养基(Czapek agar, CA):硝酸钠 3 g、硝酸氢二钾 1 g、硫酸镁 0.5 g、硫酸亚铁 0.01 g、蔗糖 30 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1000 mL, 1×10^5 Pa 高压灭菌 30 min。

(3)沙保氏琼脂培养基(Sabouraud's agar, SDA):蛋白胨 10 g、葡萄糖 40 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1000 mL, 1×10^5 Pa 高压灭菌 30 min。

1.2.2 真菌分离计数、纯化

将上述各种培养基配制灭菌后,适量倒入培养皿(15 mL),待其凝固,每个梯度取 50 μ L 菌悬液涂布在固体培养基上,设 3 个平行,泥样涂布结束后,于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中倒置培养,培养过程中每隔 24 h 观察一次菌落的生长情况。培养 5 d 后计数培养基上的菌落数。对平板上的代表性菌种进行纯化,将其划线接种在相同的培养基平板上,分离纯化。挑出来的单菌落接种在固体培养基上置于 28 $^{\circ}$ C 继续培养 3~7 d。若菌落不纯含有其他杂菌,则继续划线纯化,直至菌落为纯菌落。

1.3 不同培养基真菌浓度及与环境因子的分析

通过 R (Version 2.14.2) 软件和 Canoco (Canoco for Windows 4.5) 软件进行双因素方差分析 (Two-way ANOVA) 和主成分分析 (PCA), 比较马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基、察氏琼脂 (CA) 培养基、沙保氏琼脂 (SDA) 培养基之间真菌生长数量的差异性, 并分析其与环境因子的关系。

1.4 纯化真菌的鉴定

1.4.1 纯化真菌 DNA 的提取

单菌落真菌分离纯化培养 3~7 d 后,用镊子夹取新鲜真菌样品 100 mg, 使用 E.Z.N.A.™ Fungal DNA Mini Kit (OMEGA, USA) 直接提取真菌基因 DNA, 其中 DNA 提取采用真菌 DNA 提取试剂盒中新鲜/冷冻样品的提取步骤, 最后得到 200 μ L DNA 溶液。取 5 μ L DNA 提取样品, 用含有 EB 的 1.0% (质量与体积比) 的琼脂糖凝胶在 1 $\times$ TAE 缓冲液 (40 mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris, 20 mmol $\cdot$ L⁻¹ HAc, 50 mmol $\cdot$ L⁻¹ EDTA, pH 8.0) 中进行电泳检测。在紫外灯下观察 DNA 条带, 用 15 Kbp DNA Marker 作为 DNA 分子标量观察实验结果, 检测样品中的 DNA 是否提取成功。提取的 DNA 样品放置于 4 $^{\circ}$ C 用于下游分子生物实验 (PCR) 或于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4.2 纯化真菌基因测序

使用引物 ITS1-F (5'-CTT GGT CAT TTA GA GGA AGT AA-3')/ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')^[10,19] 扩增真菌 ITS 区域, 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。PCR 采用 50 μ L 反应体系: Go Taq[®] Master Mix (Promega, USA) 25 μ L, 引物 ITS1-F/ITS4 各 0.5 μ L (10 mmol $\cdot$ L⁻¹), 无菌水 (0.22 μ m, Millipore) 23 μ L, DNA 模板 1 μ L。PCR 反应采用降落程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 前 10 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min、65~55 $^{\circ}$ C 退火 1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min (每循环一次退火温度降低 1 $^{\circ}$ C), 后 25 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min、55 $^{\circ}$ C 退火 1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物用含有 EB 的 1.2% (质量与体积比) 的琼脂糖凝胶在 1 $\times$ TAE 缓冲液中电泳检测, 在紫外灯下观察 DNA 条带, 用 DGL 2000 DNA Marker 作为 DNA 分子标量。PCR 产物 -20 $^{\circ}$ C 保存, 用于后续试验。

纯化真菌 PCR 产物送天津生物芯片技术有限责任公司进行基因测序。将得到的基因序列在 NCBI 数据库中用 BLAST 工具进行同源序列搜索, 使用 MEGA Version 5.0 软件中的 Alignment 程序对所得到的 ITS 序列进行多重对位排列 (Multiple alignments), 并进行系统发育分析和进化树的构建。采用邻位相连法 (Neighbor-Joining) 进行距离分析, 用 Maximum Composite Likelihood 模式计算遗传距离, 系统树的每个分支统计学显著性分析以自展法 (Bootstrap method) 进行检验, 重复次数为 1000 次。

2 结果与分析

2.1 底泥真菌稀释平板法

实验选用了 3 种培养基并采用了 3 种稀释梯度 (10⁻¹、10⁻²、10⁻³), 根据真菌生长数量、形态、种类及平板有效计数原则选取 100 倍稀释梯度, 对 6 个采样点 (1#、2#、3#、4#、5#、6#) 进行分离计数, 最后计算得到底泥真菌数量, 用每克底泥样中所含的真菌菌落数 (CFU $\cdot$ g⁻¹) 表示。各采样点不同培养基可培养真菌数量如图 1。

从单一采样点的实验结果表明, 不同采样点的可培养真菌数量有明显的差异, 其中第一组 (1# 和 2#) 为 CA>SDA>PDA; 第二组 (3# 和 4#) 为 PDA>CA>SDA; 第三组 (5# 和 6#) 为 SDA>CA>PDA。

2.2 不同培养基的真菌浓度及其与环境因子的分析

实验采用 Canoco 软件对不同培养基 (CA、PDA、

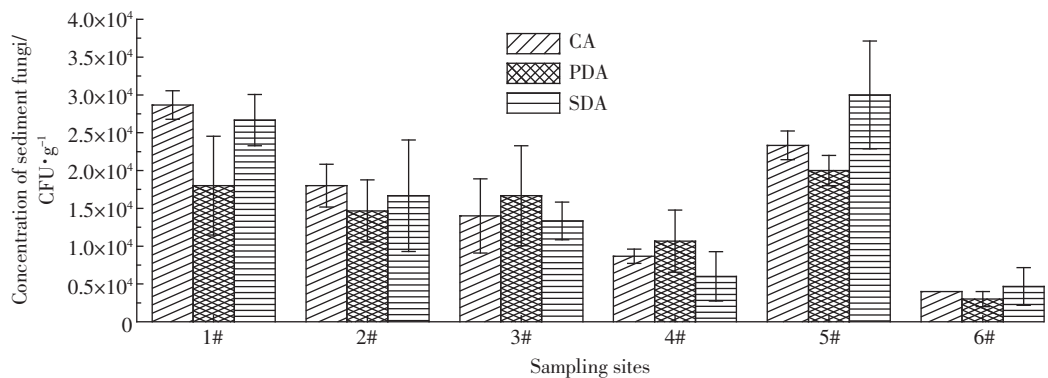


图 1 不同培养基可培养真菌数量

Figure 1 Fungal concentration cultivated on different media

SDA)的可培养真菌浓度进行了主成分分析。主成分分析结果表明 3 种培养基可显著地分成两类主成分因子,其累积贡献率为 98.92%:第一主成分贡献率为 88.96%,其与 CA、PDA 和 SDA 相关系数分别为-0.603、-0.550 和-0.578;第二主成分贡献率为 9.96%,其与 CA、PDA 和 SDA 相关系数分别为 0.188、-0.803 和 0.566。表明 3 种培养基的真菌数量大部分可由第一主成分所解释。同时,相关性也表明 CA 培养基与 PDA 培养基和 SDA 培养基之间可培养真菌浓度具有明显的相关性,Pearson 相关系数分别为 0.833 ($P=0.039$)、0.948($P=0.004$)。3 种不同培养基可培养真菌数量的双因素方差分析结果(图 2,表 2)显示,3 种培养基的可培养真菌在数量上没有显著的差异($P=0.326>0.05$),而不同样品之间存在着明显的差异性($P=0.0006<0.01$)。

为了分析真菌浓度环境因子(表 3)之间的关系,实验对不同培养基的可培养真菌浓度与底泥沉积物中的有机质(Organic mater, OM)、总磷(Total phospho-

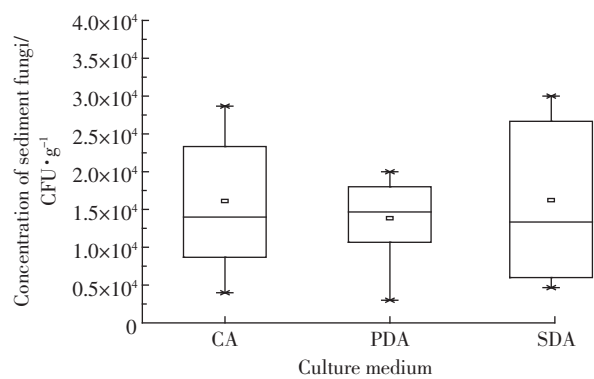


图 2 不同培养基可培养真菌浓度分布的线箱图

Figure 2 The boxplot of fungal concentration cultivated on different media

rus, TP)、氧化还原电位(Redox potential, Eh)、pH 值、氨氮(Nitrate nitrogen, NON)、硝氮(Ammonia nitrogen, AON)、总氮(Total nitrogen, TN)、速效磷(Quickly available phosphorus, QAP)以及采样点的地理位置经度(Longitude, LO)、纬度(Latitude, LA)和海拔(Eleva-

表 2 不同培养基之间真菌浓度的双因子方差分析结果

Table 2 Two-way analysis of variance of fungal concentration cultivated on different media

差异源	平方和/SS	自由度/df	均方/MS	F	P-value	F crit
样品	9.497×10 ⁸	5	1.899×10 ⁸	11.499	0.000 6	3.326
培养基	4.157×10 ⁷	2	2.078×10 ⁷	1.258	0.326	4.102

表 3 采样点河流底泥沉积物的理化性质

Table 3 Physical and chemical properties of sampling points

采样点	有机质/g·kg ⁻¹	总磷/mg·kg ⁻¹	氧化还原电位/mV	pH	氨氮/mg·kg ⁻¹	硝氮/mg·kg ⁻¹	总氮/g·kg ⁻¹	速效磷/mg·kg ⁻¹
1	9.287	142.189	80.1	5.62	23.252	0.190	0.865	59.480
2	10.163	92.446	35.6	6.44	40.696	0.412	0.712	37.111
3	9.826	162.278	14.2	6.65	212.878	0.253	0.917	123.077
4	8.562	91.011	13.6	6.83	16.048	0.743	0.592	36.535
5	6.978	113.491	2.7	6.97	51.484	0.381	1.002	96.096
6	4.888	294.289	96.8	5.33	4.210	1.083	0.298	101.878

tion, HE)进行了相关性分析。3种培养基可培养真菌浓度和环境因子的主成分排序图如图3所示, PDA培养基的可培养真菌浓度与沉积物有机质浓度的Pearsom相关系数为0.817($P=0.047$), 与硝氮浓度的Pearsom相关系数为-0.990($P<0.01$), 与总氮浓度的Pearsom相关系数为0.911($P=0.012$); CA培养基的可培养真菌浓度与硝氮浓度的Pearsom相关系数为-0.852($P=0.031$); SDA培养基的可培养真菌浓度与总氮浓度的Pearsom相关系数为0.817($P=0.047$)。

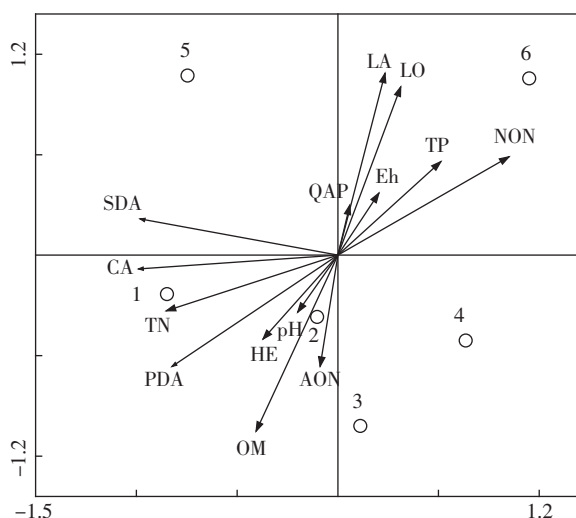


图3 培养基真菌浓度与环境因子的主成分分析

Figure 3 Principal component analysis between the fungal concentration and different environmental factors

2.3 纯化真菌的鉴定结果

在分离计数的过程中,选取具有代表性的真菌进行划线接种纯化、鉴定,对于在纯化过程中,仍有杂菌生长的菌落继续划线纯化,最终得到纯化菌种。纯化真菌提取DNA后,进行ITS序列的基因扩增,将扩增的序列送交生物芯片公司进行测序。将ITS基因序列在NCBI GenBank进行Blast,筛选出相似性高的物种,为了准确鉴定ITS序列,用MEGA构建基因进化树,如图4。结果显示,F4、F6、F10、F11、F22、F25、F34属于肉座菌属(*Hypocrea*),序列相似性为99%;F18属于支顶孢属(*Acremonium*),序列相似性为100%;F27属于镰刀菌属(*Fusarium*),序列相似性为100%;F9属于青霉菌属(*Penicillium*),序列相似性为96%;F23、F32属于曲霉属(*Aspergillus*),序列相似性为100%;F13、F21属于发菌科(*Trichocomaceae*),序列相似性分别为99%和100%;F3、F31属于Davidiellaceae科的枝孢属(*Cladosporium*),序列相似性为

100%;F14属于链格孢属(*Alternaria*),序列相似性为100%;F19属于被孢霉属(*Mortierella*),相似性为99%;F8、F16属于毛霉科(*Mucoraceae*),相似性为100%。所得基因序列在NCBI GenBank的接受号为JQ988815-JQ988834。

3 讨论

3.1 真菌培养基计数

方差分析表明3种培养基在数量上没有显著的差异性,尽管在部分采样点上PDA可培养真菌数量略小于CA和SDA可培养真菌的数量,但是其3种培养基在真菌计数上仍处于一个数量级上,而且双因子分析表明这种差异性在统计学上不是很显著(图2)。此外,基于稀释平板法计数本身的原因,这种数量上的不显著差异可忽略,在底泥真菌数量的检测时不会因为培养基的不同而存在误差,同时主成分分析显示3种培养基的第一主成分即可解释3种培养基的数量,因此可以筛选出一种具有代表性的培养基进行计数。不同培养基的可培养真菌浓度与环境因子的相关性分析结果表明,与CA和SDA培养基相比,PDA培养基的可培养真菌数量与较多的环境因子显著相关,与底泥环境中的有机质、总氮和硝氮等有机物、氮等污染指标紧密相连,能更加凸显出环境因子变化。Rousk等用磷脂脂酸分析了氮肥对草地土壤细菌和真菌的生长,结果表明氮肥的施加能微量地影响真菌的生长^[28],Henriksen等研究指出氮能抑制真菌的生长^[29],显然不同形态的氮元素对真菌生长有不同影响。本研究分析了不同形态的氮(氨氮、硝氮、总氮)对真菌生长的作用,结果表明:真菌的生长数量与总氮成显著正相关,而与硝氮成显著负相关,PDA培养基在用于分析真菌数量与环境因子的相互关系时可以作为优先选择培养基,适合于开展松花江流域底泥真菌数量的分布特征及数据库建立的研究。

3.2 真菌鉴定及其在环境中的应用

本研究在底泥真菌计数时,对代表性真菌进行了纯化,对ITS序列的系统进化树分析显示,实验所分离得到的17个菌株属于盘菌亚门(*Pezizomycotina*),其中:9个菌株属于肉座菌目(*Hypocreales*),5个菌株属于发菌科(*Trichocomaceae*),3个菌株属于分类地位不确定的真菌(*Fungi incertae sedis*)中的被孢霉属和毛霉科。进化树分析结果表明,在ITS序列进行真菌种属鉴定具有较强的优势,能鉴定环境中的大部分菌。

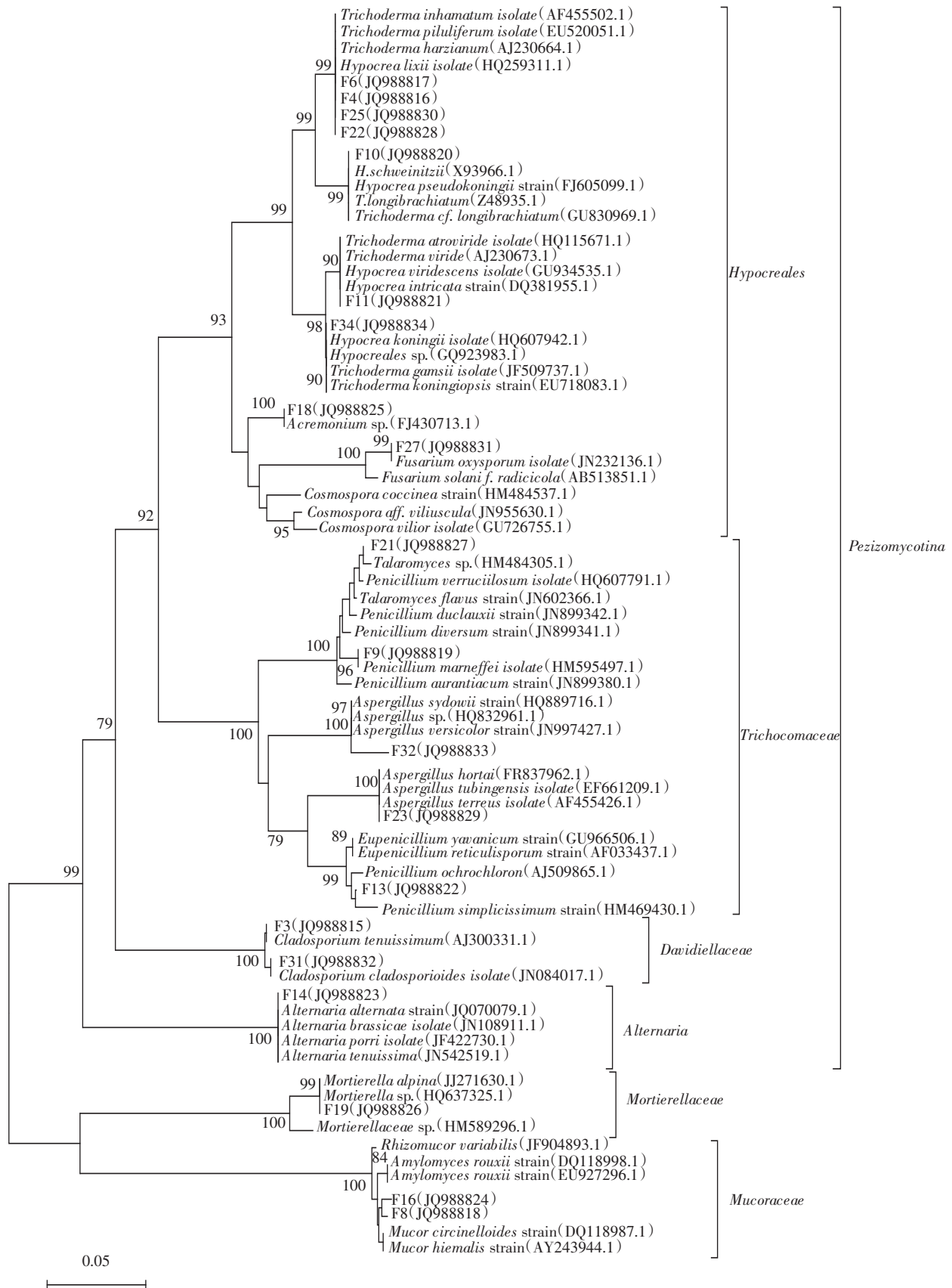


图 4 纯化真菌基因系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of purified fungi

利用 ITS 序列对真菌进行鉴定和分子检测,能弥补传统微生物鉴定和检测方法的不足^[30],由于 ITS 序列在不同的菌种之间具有较大的变异,在进行真菌分子鉴定和多样性研究时具有广阔的应用前景^[31-33]。实验结果表明,结合其他分子生物技术 ITS 序列可以用于分析松花江流域底泥真菌的生物多样性,Yuriko Nagano 等^[34]采用 PCR-ITS 序列克隆技术对不同深度和采样点深海底泥中的真菌进行研究,发现在深海生活没有被开发的真菌;Lai 等^[35]通过 ITS-DNA 限制性分析(ARDRA)第一次研究报道了中国南海深海处含甲烷水化物深海底泥的真菌多样性;Viaud 等^[36]运用 ITS 序列的限制性片段长度多态性技术(RFLP)研究了土壤真菌的多样性,共分离得到 58 种代表性的 ITS 序列并进行了基因进化分析,结果表明在生态研究和评价真菌多样性时 ITS 的 PCR-RFLP 技术是一种有效的独立于培养方法的分子分析工具;Ulfig 研究发现 *Chrysosporium keratinophilum* 对工业污染物和盐具有较高的耐性,可作为水污染的一种生物指示物^[37-38]。

随着生物技术的发展,作为生物界的一种重要资源,真菌在环境污染治理和修复中有着重要的作用,在重金属环境监测、有机物降解等方面潜力巨大。通过测定重金属在真菌体内的含量可研究环境中重金属的污染状况^[39],真菌可通过细胞外富集或沉淀、细胞表面吸附以及细胞内富集等吸附重金属^[40-41],良好的重金属吸附性能或矿化能力使得真菌在生物冶金、环境中重金属污染治理和修复等方面具有广阔的应用前景。另外,有研究报道显示真菌对农药等有机污染物也具有较高的降解能力^[42-43],本研究分离出的菌种 F3 和 F31,属于 Davidiellaceae 科中的枝孢属 *Cladosporium*,陈少华等^[42]研究发现 *Cladosporium* sp. HU 对氯氰菊酯农药的降解效率可达到 90%,赵川等^[44]通过紫外诱变毒死蜱降解菌枝孢霉菌 *Cladosporium cladosporioides* Hu-01 可使其降解速率增加 11.73%,其快速、高效降解氯氰菊酯和较强环境适应性特点证明该菌属具有处理环境中残留农药的潜力。

4 结论

双因子方差分析、相关性分析、主成分分析显示马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基、察氏琼脂(CA)培养基和沙保氏琼脂(SDA)培养基的可培养真菌浓度在数量上没有显著的差异,但与 CA 培养基和 SDA 培养基相比,PDA 培养基的可培养真菌浓度与环境

因子的关系更加紧密。基于环境相关性的考虑,在用稀释平板法研究松花江底泥真菌时可优先考虑使用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基。

传统的分离方法虽然在反映环境中真实菌落结构存在一定的缺陷,但是由于能得到活化的真菌,结合真菌 ITS 序列分析可弥补其不足。基因进化树分析结果显示,本研究中所有的纯化真菌能鉴定到种属,ITS 序列能很好地应用于真菌的鉴定及生态分析,而且所分离出来的真菌可能在重金属、农药等环境污染治理和修复中有着广阔的应用前景。

致谢:本工作由国家水体污染控制与治理科技重大专项子课题(2008ZX07526-002-01)以及国家自然科学基金项目(31000247)资助。在此特别感谢中国科学院沈阳应用生态研究所和东北农业大学对本研究所提供的帮助,包括样品的采集和底泥物理化学性质数据的提供。

参考文献:

- [1] 李 娟. 几种主要分子生物学技术在真菌生态学研究中的应用[J]. 菌物研究, 2005, 3(1): 58-62.
LI Juan. Application of some main molecular biological techniques in studies on fungal ecology[J]. *Journal of Fungal Research*, 2005, 3(1): 58-62.
- [2] Arrigo K R. Marine microorganisms and global nutrient cycles[J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 349-355.
- [3] Damare S, Raghukumar C, Raghukumar S. Fungi in deep-sea sediments of the Central Indian Basin[J]. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2006, 53(1): 14-27.
- [4] Mohamed D J, Martiny J B H. Patterns of fungal diversity and composition along a salinity gradient[J]. *Isme Journal*, 2011, 5(3): 379-388.
- [5] 周启星, 朱荫渭. 西湖底泥不同供氧条件下有机质降解及 CO₂ 与 CH₄ 释放速率的模拟研究[J]. 环境科学学报, 1999, 19(1): 13-17.
ZHOU qi-xing, ZHU yin-mei. Simulated studies on degradation of organic matter and release of CO₂ and CH₄ in sediment from the West Lake under various oxygen supply conditions[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1999, 19(1): 13-17.
- [6] 林 亮, 李卓佳, 郭志勋, 等. 施用芽孢杆菌对虾池底泥细菌群落的影响[J]. 生态学杂志, 2005, 24(1): 26-29.
LIN Liang, LI Zhuo-jia, GUO Zhi-xun, et al. Influence of *Bacillus* on the bacterial communities in the sediment of shrimp ponds[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2005, 24(1): 26-29.
- [7] 杨远航, 许忠能, 林小涛, 等. 人工湖底泥与水体真菌培养基的筛选[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2008, 29(5): 510-515.
YANG Yuan-hang, XU Zhong-neng, LIN Xiao-tao, et al. Culture screening for waters and sediment fungi growing in artificial lake[J]. *Journal of Jinan University(Natural Science Edition)*, 2008, 29(5): 510-515.
- [8] Warcup J H. The ecology of soil fungi[J]. *Transactions of the British Mycological Society*, 1951, 34(3): 376-399.
- [9] Warcup J H. Isolation of fungi from hyphae present in soil[J]. *Nature*,

- 1955, 175(4465):953-954.
- [10] Gardes M, Bruns T D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. *Molecular Ecology*, 1993, 2(2):113-118.
- [11] Monchy S, Sancier G, Jobard M, et al. Exploring and quantifying fungal diversity in freshwater lake ecosystems using rDNA cloning/sequencing and SSU tag pyrosequencing[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(6):1433-1453.
- [12] Ranjard L, Poly F, Lata J C, et al. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: Biological and methodological variability[J]. *Allied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(10):4479-4487.
- [13] Lord N S, Kaplan C W, Shank P, et al. Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment (TRF) pattern analysis: Comparison of 18S and ITS ribosomal regions[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2002, 42(3):327-337.
- [14] 陈剑山, 郑服丛. ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(13):3785-3786.
CHEN Jian-shan, ZHENG Fu-cong. Application of ITS sequences in fungi classification and identification[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(13):3785-3786.
- [15] Anderson I C, Campbell C D, Prosser J I. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(1):36-47.
- [16] Leblond-Bourget N, Philippe H, Mangin I, et al. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(1):102-111.
- [17] Anderson J B, Stasovski E. Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*[J]. *Mycologia*, 1992, 84(4):505-516.
- [18] Lee S B, Taylor J W. Phylogeny of five fungus-like protist *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1992, 9(4):636-653.
- [19] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]// Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR protocols a guide to methods and applications. New York: Academic Press, 1990:315-322.
- [20] Curlevski N, Xu Z, Anderson I, et al. Diversity of soil and rhizosphere fungi under *Araucaria bidwillii* (Bunya pine) at an Australian tropical montane rainforest site[J]. *Fungal Diversity*, 2010, 40(1):12-22.
- [21] Anderson I C, Campbell C D, Prosser J I. Diversity of fungi in organic soils under a moorland-Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(11):1121-1132.
- [22] Jansa J, Mozafar A, Anken T, et al. Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil[J]. *Mycorrhiza*, 2002, 12(5):225-234.
- [23] Buchan A, Newell S Y, Moreta J I L, et al. Analysis of internal transcribed spacer (ITS) regions of rRNA genes in fungal communities in a southeastern U. S. salt marsh[J]. *Microbial Ecology*, 2002, 43(3):329-340.
- [24] 陈今朝, 王剑锋, 李江, 等. 煤附生真菌产漆酶菌株的分离鉴定及产酶特性研究[J]. *菌物学报*, 2010, 29(3):389-396.
CHEN Jin-zhao, WANG Jian-feng, LI Jiang, et al. Identification and production of laccase-producing fungal strain isolated from coal[J]. *Mycosystema*, 2010, 29(3):389-396.
- [25] Unterseher M, Schnittler M. Species richness analysis and ITS rDNA phylogeny revealed the majority of cultivable foliar endophytes from beech (*Fagus sylvatica*)[J]. *Fungal Ecology*, 2010, 3(4):366-378.
- [26] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科学技术出版, 1999:108-110.
LU Ru-kun. Methods of soil and agriculture chemical analysis[M]. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 1999:108-110.
- [27] 金相灿, 屠清英. 湖泊富营养化调查规范[M]. 第2版. 北京: 中国环境科学出版社, 1990:218-229.
JIN Xiang-can, TU Qing-ying. Investigation handbook of lake eutrophication[M]. 2nd Ed. Beijing: Chinese Environmental Science Press, 1990:218-229.
- [28] Rousk J, Brookes P C, Baath E. Fungal and bacterial growth responses to N fertilization and pH in the 150-year 'Park Grass' UK grassland experiment[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2011, 76(1):89-99.
- [29] Henriksen T M, Breland T A. Nitrogen availability effects on carbon mineralization, fungal and bacterial growth, and enzyme activities during decomposition of wheat straw in soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31(8):1121-1134.
- [30] Pereira V J, Fernandes D, Carvalho G, et al. Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods[J]. *Water Research*, 2010, 44(17):4850-4859.
- [31] Bonito G M, Gryganskyi A P, Trappe J M, et al. A global meta-analysis of Tuber ITS rDNA sequences: Species diversity, host associations and long-distance dispersal[J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19(22):4994-5008.
- [32] Izzo A D, Mazzola M. Hybridization of an ITS-based microarray with ITS community probes for characterization of complex communities of fungi and fungal-like protists[J]. *Mycological Research*, 2009, 113(6-7):802-812.
- [33] Gao Z, Li B, Zheng C, et al. Molecular detection of fungal communities in the Hawaiian Marine Sponges *Suberites zeteki* and *Mycale armata*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(19):6091-6101.
- [34] Nagano Y, Nagahama T, Hatada Y, et al. Fungal diversity in deep-sea sediments: The presence of novel fungal groups[J]. *Fungal Ecology*, 2010, 3(4):316-325.
- [35] Lai X T, Cao L X, Tan H M, et al. Fungal communities from methane hydrate-bearing deep-sea marine sediments in South China Sea[J]. *Isme Journal*, 2007, 1(8):756-762.
- [36] Viaud M, Pasquier A, Brygoo Y. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS[J]. *Mycological Research*, 2000, 104(9):1027-1032.
- [37] Ulfing K, Ukasik W, Guarro J, et al. The seasonal changes of keratinolytic fungi in sediments of Catalanian rivers (Spain)[J]. *Water, Air, and*

- Soil Pollution*, 1997, 96(1):269–290.
- [38] Singh C J. Optimization of an extracellular protease of *Chrysosporium keratinophilum* and its potential in bioremediation of keratinic wastes [J]. *Mycopathologia*, 2003, 156(3):151–156.
- [39] Berthelsen B O, Olsen R A, Steinnes E. Ectomycorrhizal heavy metal accumulation as a contributing factor to heavy metal levels in organic surface soils[J]. *Science of the Total Environment*, 1995, 170(1–2):141–149.
- [40] 潘 蓉, 曹理想, 张仁铎. 青霉菌和镰刀菌对重金属 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 的吸附特性[J]. 环境科学学报, 2010, 30(3):477–484.
PAN Rong, CAO Li-xiang, ZHANG Ren-duo. Biosorption characteristics of heavy metals cadmium, copper, zinc, lead by *Penicillium* and *Fusarium* fungi[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(3):477–484.
- [41] 何义超, 刘云国, 樊 霆, 等. 棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*) 对 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 的吸附特征[J]. 环境工程学报, 2010, 4(1):137–141.
HE Yi-chao, LIU Yun-guo, FAN Ting, et al. Characters of Pb^{2+} and Cd^{2+} biosorption by *Aspergillus aculeatus*[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2010, 4(1):137–141.
- [42] 陈少华, 耿 鹏, 胡美英, 等. 枝孢霉菌 HU 降解氯氰菊酯的特性及其降解产物分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(3):443–451.
CHEN Shao-hua, GENG Peng, HU Mei-ying, et al. Degradation characteristics and products of cypermethrin by *Cladosporium* sp. HU [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(3):443–451.
- [43] 李 芳, 黄素芳, 刘 波. 淡紫拟青霉对辛硫磷的降解效应[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(1):104–107.
LI Fang, HUANG Su-fang, LIU Bo. Degradation of phoxim by *Pae-cilomyces lilaciuns*[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2006, 12(1):104–107.
- [44] 赵 川, 林庆胜, 杨 柳, 等. 毒死蜱降解菌枝孢霉菌的紫外诱变和筛选[J]. 华南农业大学学报, 2010, 31(4):44–48.
ZHAO Chuan, LIN Qing-sheng, YANG Liu, et al. Breeding and screening of chlorpyrifos-degrading strain *Cladosporium cladosporioides* by ultraviolet ray mutation[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2010, 31(4):44–48.