

内蒙古鄂尔多斯一古盐湖真菌多样性及其功能酶的初步筛选

郭庆兰¹ 刘开辉^{1,2} 丁小维^{1,2} 邓百万^{1,2*} 陈文强^{1,2} 曲佳¹ 涂敏³

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院 陕西 汉中 723001)

(2. 陕西省食药菌工程技术研究中心 陕西 汉中 723001)

(3. 陕西省汉中市第八中学 陕西 汉中 723001)

摘要：【目的】探索内蒙古鄂尔多斯一古盐湖土壤沉积物和湖水样品中的真菌多样性，并初步筛选出产功能酶的活性菌株。【方法】采用含有 2.5%、5%、10%及 15% NaCl 的 3 种分离培养基，利用稀释平板法分离可培养真菌，基于形态学和 ITS 序列分析对获得菌株进行系统分类学分析。利用 6 种筛选培养基定性检测盐湖真菌的产酶活性。【结果】共分离到 2 121 株真菌，共 45 个形态种，根据形态学研究和 ITS 序列的系统分类学分析将其归类为 27 个属，优势属为曲霉属(*Aspergillus*)。功能酶筛选结果表明，45 个形态种中有 22 个形态种具有产酶活性，其中 6 个形态种只产蛋白酶，6 个只产纤维素酶，2 个只产复合酶，1 个只产淀粉酶。有 4 个形态种可同时产 3 种酶，有 3 个可同时产 2 种酶。【结论】内蒙古鄂尔多斯地区盐湖中真菌多样性丰富，产酶特性良好，研究作为耐(嗜)盐真菌资源的进一步开发和利用提供依据。

关键词：盐湖，真菌，多样性，功能酶

Preliminary investigation of diversity and functional enzymes of fungi from Erdos a paleo salt lake in Inner Mongolia

GUO Qing-Lan¹ LIU Kai-Hui^{1,2} DING Xiao-Wei^{1,2} DENG Bai-Wan^{1,2*}
CHEN Wen-Qiang^{1,2} QU Jia¹ TU Min³

(1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001, China)

(2. Shaanxi Engineering Research Center of Edible and Medicated Fungi, Hanzhong, Shaanxi 723001, China)

(3. The Eighth Middle School, Hanzhong, Shaanxi 723001, China)

Abstract: [Objective] The diversity of fungi in soils and sediments of Erdos paleo salt lake in Inner Mongolia and the strains containing functional enzymes were identified. [Methods] Three isolation media containing designed concentrations of NaCl were used to separate and cultivate fungi. Based on analysis of morphology and ITS sequences, the phylogenetic of tested bacterial strains was performed. The enzyme activity in the salt lake fungi was qualitatively determined using 6 kinds of screened media. [Results] Total 2 121 strains of fungi were separated from the salt lake. These

基金项目：国家自然科学基金项目(No. 31100017)；陕西省青年科技新星计划项目(No. 2013KJXX-76)；陕西省教育厅科研计划项目(No. 11JK0616)；陕西理工学院项目(No. SLGKY10-12)

*通讯作者：✉: 2210309868@qq.com

收稿日期：2013-10-24；接受日期：2013-12-06；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2013-12-11

strains were divided into 45 morphospecies and 27 genera based on the analysis of morphology and ITS sequences. The dominant genus was *Aspergillus*. Twenty-two of 45 morphospecies produced enzyme, six produced protease(s), six produced cellulase(s), two produced compound enzyme, one produced amylase enzymes and one produced lipase. Meanwhile, four morphospecies could simultaneously produce three. **[Conclusion]** The fungi from the Erdos salt lake in Inner Mongolia are rich in diversity and can produce various enzymes. This study provides a basis for the further characterization and utilization of halophilic microbes.

Keywords: Salt lake, Fungi, Diversity, Extreme enzyme

盐湖是湖水中总含盐量大于 50 g/L 的一类湖泊,在我国主要集中分布于西藏、青海、新疆和内蒙古等地区^[1]。在盐湖极端高盐环境中存在适应该极端环境的嗜盐古菌、细菌及真菌等微生物群体。这些微生物在生命的进化历程中,由于适应局部极端盐环境的结果,具有独特的群体分布格局、物种多样性及特殊的生理代谢类型。近年来,有关极端耐(嗜)盐微生物日益受到国内外研究者的广泛关注,成为微生物研究的热点领域之一^[2-3]。目前,有关盐湖微生物的研究主要集中在对新疆、青海盐湖中的嗜盐古菌^[4-5]、嗜盐细菌^[6-7]和嗜盐放线菌^[8-9]方面;有关耐(嗜)盐真菌的报道主要来自于海洋环境,对盐湖沉积物耐(嗜)盐真菌的研究报道甚少。研究古盐湖沉积物中真菌群体格局将对于认识生物多样性的形成及维持机制,揭示生命极限及其与环境的相互作用规律和资源利用方面等都具有重要的科学意义^[10]。

内蒙古自治区是中国盐湖分布最多的地区之一,据统计,该区总共有盐湖 375 个,盐湖总面积达 1 441 km²^[11]。鄂尔多斯盐湖区(多为古河谷侵蚀和风蚀作用形成的现代内陆盐湖)位于内蒙古自治区的南部,属于风沙区、戈壁区和黄土区的过渡地带。该地区气候冬季寒冷漫长,夏季温热短暂,寒暑变化剧烈,气温日、年变化较大(最低气温为-31℃,最高气温为 36.7℃),日照强烈,降水少,蒸发量很大^[12]。因此,鄂尔多斯盐湖区具有高盐碱、大温差、高寒、高热、干燥及强辐射等极端环境特征,是研究极端微生物多样性及其活性的理想区域之一。

本文对内蒙古鄂尔多斯—古盐湖湖水和高盐沉积物真菌多样性进行研究,并对其产蛋白酶、纤维素酶、壳聚糖酶、复合酶、淀粉酶和产脂肪酶的活性进行初步筛选,本研究将进一步丰富我国盐湖真菌菌种资源库和基因库,为耐(嗜)盐真菌的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 2012 年 7 月采于内蒙古自治区鄂尔多斯市鄂托克前旗—古盐湖土壤沉积物和湖水样品。在盐湖区每隔 50 m 取一个样品,共采集 10 个样点(编号 1-10)。盐湖土壤和湖水分别取自距地表 10 cm 处的沉积物和湖水 10 cm 深处的水样,样品装入无菌塑料瓶,4℃保存备用。

1.1.2 酶活性筛选培养基: (1) 纤维素酶筛选培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 2.0, MgSO₄ 0.5, K₂HPO₄ 1.0, CMC-Na 2.0, 刚果红 0.4, 琼脂 22.0, pH 自然。(2) 淀粉酶筛选培养基(g/L): 淀粉 20.0, KCl 0.5, NaNO₃ 2.0, K₃PO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, 琼脂 18.0, pH 自然。(3) 脂肪酶筛选培养基(g/L): K₂HPO₄ 0.2, MgSO₄ 0.05, PVA 乳化液 2.0 mL, 酵母粉 0.2, 蛋白胨 1.0, 琼脂 2.7, pH 自然。灭菌冷却 60℃加 10 mL 0.2% 罗丹明 B 溶液(无菌)。(4) 壳聚糖酶筛选培养基(g/L): 壳聚糖 10.0, (NH₄)₂SO₄ 2.5, MgSO₄·7H₂O 0.25, K₂HPO₄ 0.02, CaCO₃ 6.0, 琼脂 20.0, pH 6.0。(5) 蛋白酶筛选培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 葡萄糖 1.0, CaCl₂ 0.1, 酪氨酸 0.1, 酪素 5.0, 琼脂 22.0, pH 7.0。(6) 复合酶筛选培养基(g/L): NaNO₃ 3.0, KCl 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.01,

K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, 蔗糖 30.0, 干酪素 10.0, 琼脂 15.0, pH 6.0–6.5。上述培养基均添加 2.5%的 NaCl。

1.1.3 主要试剂和仪器：DNA marker (DL2000)、2×Taq PCR Mix, 上海生工；全自动化学发光和荧光凝胶成像系统(Alliance 4.7), 英国 UVItec 公司；PCR 扩增仪(Mycycler), 美国 Bio-Rad；高级研究显微镜(E600), 日本 Nikon 公司；组织研磨机(MM400), 德国 Retsch。

1.2 菌株分离

在无菌条件下将样品稀释成 10¹ 菌悬液, 取 100 μL 分别均匀涂布于添加 2.5%、5%、10%及 15% NaCl 的 CPDA、MEA 和 YPD 三种分离培养基上, 28 °C 恒温培养 3–7 d, 待菌落长出后, 根据菌落大小、形态、颜色进行初步筛选, 纯化菌株于 4 °C 保藏备用。

1.3 盐湖真菌的分类鉴定

采用形态学及分子生物学相结合的方法进行初步鉴定。根据菌落特征、菌丝、孢子和产孢结构等特征对菌株进行形态学鉴定。采用 CTAB 法提取盐湖真菌基因组 DNA^[13]。利用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对盐湖真菌基因组 ITS 基因片段进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (25 μL): 超纯无菌水 9 μL, 2×PCR Mix 11 μL, 引物 ITS1 (10 μmol/L)和引物 ITS4 (10 μmol/L)各 2 μL, 基因组 DNA 1 μL。PCR 扩增反应条件: 95 °C 4 min; 94 °C 1 min, 55 °C 40 s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。PCR 产物交上海生工生物科技有限公司进行正向测序, 对所测序列用 ClustalW 软件对所得序列进行人工校正及比对分析, 提交到 GenBank 并进行 BLAST 检索, 下载同源性较高的序列, 利用 MEGA 5.02, 按照 Neighbor-Joining 法聚类构建系统进化树。

1.4 统计分析

依照公式 $H' = -\sum P_i \ln P_i$ 、 $Ma = (S-1)/\ln N$ 和 $J = H'/H'_{\max}$ 分别计算物种多样性指数(H')、丰富度

指数(Ma)和均匀度指数(J), 其中 $P_i = n_i/N$, $H'_{\max} = \log_2 S$, S 是种数, N 是菌株数, n_i 是第 i 个种的个体数目。

1.5 功能酶的初步筛选

采用透明圈法, 将真菌单菌落于筛选培养基上, 28 °C 恒温培养 7 d, 待菌落长成后, 在产淀粉酶的筛选培养基上加碘液, 筛选出现透明圈的菌株; 纤维素酶只需在纤维素酶筛选培养基上测量其菌落直径即可; 其余 4 种酶分别在其筛选培养基上待菌落长成后, 测量透明圈直径与菌落直径, 根据二者差值的大小可初步判断产酶活性大小。

2 结果与分析

2.1 盐湖真菌的多样性

2.1.1 盐湖真菌的分离及鉴定：从盐湖 10 个样品中共分离得到 2 121 株真菌, 其中 7 号样品分离得到的真菌最多, 占总数的 20%; 3 号样品分离得到的真菌最少, 仅占总数的 4.2%。根据形态学特征(表 1), 2 121 株真菌共 45 个形态种, 初步鉴定到 27 个属。其中, 曲霉属(*Aspergillus*)为优势菌属, 有 11 个形态种, 占总数的 24.4%, 其次为青霉属(*Penicillium*)有 4 个, 占总数的 8.9%, 隔孢伏革属(*Peniophora*)有 3 个, 占总数的 6.7%, 拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)、支顶孢属(*Acremonium*)、裂褶菌属(*Schizophyllum*)每个属各包含 2 个形态种, 占总数的 13.3%, 其余 21 个属均只包含 1 个形态种, 占总数的 46.7%。通过对分离频率的统计, 31a 的分离频率最高, 为 11.6%, 15a 和 29a 的分离频率最低, 仅为 0.2%, 其余 36 株菌的分离频率在 0.1%–0.3%之间。内蒙古鄂尔多斯—古盐湖真菌 ITS 序列同 NCBI 数据库中相关 ITS 序列相似性为 88%–100%之间(表 1)。菌株登录号见表 1。

2.1.2 基于 ITS 基因序列的系统发育分析：通过 PCR 扩增 ITS-rDNA 基因片段, 所得序列长度在 473–615 bp 之间, 对所测序列用 ClustalW 比对后构建近邻(N-J)树(图 1)。结果表明 45 个形态种隶属于 2 门, 分别是子囊菌门(Ascomycota)分离得到的菌株占总数的 66.7%, 其中散囊菌纲

表 1 内蒙古鄂尔多斯—古盐湖真菌形态学及其 ITS 多样性						
Table 1 The morphology and ITS diversity of fungi strains from a paleo salt lake in Ordos, Inner Mongolia						
菌株号 Serial number	分离频率 Isolation frequency (%)	来源 Source	GenBank 登录号 GenBank accession number	ITS 相似率 Closest match in NCBI (ITS identify, %)	形态描述 Morphological characteristics	分类地位 Taxonomic status
1a	1.11	Saline soil	KC834749	<i>Alternaria quercus</i> (100)	Rod, Dissepiment, Brown; Gray round, Big	<i>Alternaria quercus</i>
2a	0.82	Saline soil	KC834750	<i>Aspergillus candidus</i> (99)	Coccoid; White round, Big	<i>Aspergillus candidus</i>
6a	0.26	Saline soil	KC834752	<i>Pestalotiopsis heterocornis</i> (99)	Long spindle; White round, Big	<i>Pestalotiopsis heterocornis</i>
10a	2.97	Saline soil	KC834753	<i>Acremonium potronii</i> (99)	Ellipse, Dissepiment; Milk white round, Big	<i>Acremonium potronii</i>
12b	6.58	Saline soil	KC890772	<i>Aspergillus versicolor</i> (99)	Coccoid, Conidium spore loose radial head; Cyan round, Medium	<i>Aspergillus versicolor</i>
13a	2.97	Saline soil	KC890773	<i>Aspergillus versicolor</i> (99)	Coccoid, Conidial head loose radial; Yellow-gray, Medium	<i>Aspergillus versicolor</i>
14a	0.83	Saline soil	KC834754	<i>Penicillium glabrum</i> (99)	Coccoid, Penicillus; Green-gray, Medium	<i>Penicillium glabrum</i>
15a	0.24	Saline soil	KC890774	<i>Aspergillus versicolor</i> (100)	Coccoid, Conidial head loose radial; Yellow-gray, Medium	<i>Aspergillus versicolor</i>
19a	0.78	Saline soil	KC834755	<i>Aspergillus sydowii</i> (100)	Coccoid, Conidial heads are radiate; Atrovirens, Medium	<i>Aspergillus sydowii</i>
20a	0.41	Saline soil	KC834756	<i>Aspergillus oryzae</i> (100)	Coccoid, Conidial heads are radiate; Yellow-gray, Medium	<i>Aspergillus oryzae</i>
22b	0.52	Saline soil	KC890775	<i>Aspergillus sydowii</i> (99)	Coccoid, Conidial heads are radiate; Atrovirens, Medium	<i>Aspergillus sydowii</i>
23a	1.32	Saline soil	KC890776	<i>Penicillium polonicum</i> (100)	Coccoid, Alutaceous; Turquoise, Medium	<i>Penicillium polonicum</i>
25b	0.44	Saline soil	KC834757	<i>Eurotium amstelodami</i> (99)	Coccoid; Yellow, Medium	<i>Eurotium amstelodami</i>
27a	4.10	Saline soil	KC834758	<i>Penicillium steckii</i> (99)	Coccoid, Conidial heads are radiate; Celadon, Medium	<i>Penicillium steckii</i>
28b	1.32	Saline soil	KC890778	<i>Aspergillus versicolor</i> (100)	Coccoid, Conidial head loose radial; Celadon, Medium	<i>Aspergillus versicolor</i>
29a	0.24	Saline soil	KC834759	<i>Aspergillus ochraceus</i> (99)	Coccoid, Brown; Yellow, Medium	<i>Aspergillus ochraceus</i>
31a	11.57	Saline soil	KC834760	<i>Aspergillus westerdijkiae</i> (99)	Coccoid, Brown; Celadon, Medium	<i>Aspergillus westerdijkiae</i>
33b	0.65	Salt lake of water	KC834761	<i>Aspergillus restrictus</i> (99)	Oblong; Darkcyan, Small	<i>Aspergillus restrictus</i>
36a	4.76	Salt lake of water	KC834762	<i>Wallemia sebi</i> (98)	Coccoid, Sandy beige; Tenne, Small	<i>Wallemia sebi</i>
38a	3.57	Salt lake of water	KC890780	<i>Schizophyllum commune</i> (99)	Sporeless; White, Big	<i>Schizophyllum commune</i>
						(待续)

(续表)						
40a	8.33	Salt lake of water	KC890781	<i>Cladosporium cladosporioies</i> (100)	Oval; Breen, Small	<i>Cladosporium cladosporioies</i>
42b	0.65	Salt lake of water	KC834763	<i>Nigrospora oryzae</i> (99)	Coccoid, Brown; White, Big	<i>Nigrospora oryzae</i>
46a	0.65	Salt lake of water	KC890783	<i>Dokmaia monthadangii</i> (88)	Coccoid; Hoary, Small	<i>Dokmaia</i> sp.
48b	0.65	Salt lake of water	KC890784	<i>Exobasidium vexans</i> (99)	Sporeless; Milk white, Small	<i>Exobasidium vexans</i>
50c	0.39	Saline soil	KC834765	<i>Debaryomyces hansenii</i> (100)	Oval; Milk white, Small	<i>Debaryomyces hansenii</i>
51b	0.65	Salt lake of water	KC834766	<i>Glomerella glycines</i> (99)	Sporeless; Light pink, Medium	<i>Glomerella glycines</i>
53c	1.29	Salt lake of water	KC834767	<i>Bionectria epichloe</i> (99)	Coccoid; White, Small	<i>Bionectria epichloe</i>
54d	0.65	Salt lake of water	KC890785	<i>Peniophora incarnata</i> (99)	Sporeless; White, Small	<i>Peniophora incarnate</i>
55a	0.65	Salt lake of water	KC890786	<i>Peniophora laxitexta</i> (95)	Sporeless; Translucency, Small	<i>Peniophora</i> sp.
57a	0.65	Salt lake of water	KC834769	<i>Schizophyllum commune</i> (99)	Sporeless; White, Big	<i>Schizophyllum commune</i>
59a	1.29	Salt lake of water	KC834770	<i>Peniophora laxitexta</i> (96)	Sporeless; Cream, Medium	<i>Peniophora</i> sp.
61a	0.65	Salt lake of water	KC834771	<i>Acremonium fusidioides</i> (99)	Oval; Pink white, Small	<i>Acremonium fusidioides</i>
62b	2.50	Saline soil	KC834772	<i>Myrmecridium schulzeri</i> (99)	Sporeless; Translucency, Small	<i>Myrmecridium schulzeri</i>
64c	2.33	Saline soil	KC834773	<i>Rhodotorula slooffiae</i> (100)	Oval; Rose hermosa, Small	<i>Rhodotorula slooffiae</i>
67c	0.65	Salt lake of water	KC834774	<i>Phoma destructiva</i> (99)	Sporeless; Khaki, Medium	<i>Phoma destructiva</i>
A1	2.58	Salt lake of water	KC834775	<i>Leptosphaeria microscopica</i> (99)	Sporeless; Hoary, Small	<i>Leptosphaeria microscopica</i>
D1	2.50	Saline soil	KC834776	<i>Amanita tenuifolia</i> (98)	Sporeless; White, Big	<i>Amanita tenuifolia</i>
F1	2.50	Saline soil	KC834778	<i>Porostereum spadiceum</i> (98)	Sporeless; White, Medium	<i>Porostereum spadiceum</i>
G1	0.65	Salt lake of water	KC834779	<i>Tilletiopsis washingtonensis</i> (99)	Oval; Milk tea brown, Small	<i>Tilletiopsis washingtonensis</i>
H1	2.50	Saline soil	KC834780	<i>Epacris pulchella</i> (94)	Sporeless; Brown, Small	<i>Epacris</i> sp.
L1	0.65	Salt lake of water	KC890787	<i>Subulicystidium longisporum</i> (99)	Sporeless; Translucency, Big	<i>Subulicystidium longisporum</i>
M1	2.50	Saline soil	KC834781	<i>Penicillium marneffei</i> (99)	Coccoid, Penicillus; Celadon, Small	<i>Penicillium marneffei</i>
S2	2.22	Saline soil	KC834782	<i>Ceriporia lacerata</i> (100)	Sporeless; White, Medium	<i>Ceriporia lacerata</i>
U2	2.97	Saline soil	KC834783	<i>Coprinellus xanthothrix</i> (91)	Coccoid, Conidial head loose radial; White, Big	<i>Coprinellus</i> sp.
Q2	1.11	Saline soil	KC834751	<i>Pestalotiopsis foedans</i> (99)	Sporeless; White, Big	<i>Pestalotiopsis foedans</i>

Note: Purpose of strains rate=Total purpose of strains/Samples of the total number.

(Eurotiomycetes)包含 16 个形态种，占 35.6%，粪壳菌纲(Sordariomycetes)包含 8 个，占 17.8%，座囊菌纲(Dothideomycetes)包含 4 个，占 8.9%，酵母纲(Saccharomycetes)和子囊菌纲(Ascomycetes)均只包含 1 个；担子菌门(Basidiomycota)分离得到的菌株占总数的 31.1%，其中伞菌纲(Agaricomycetes)包含 10 个形态种，占 22.2%，外担菌纲(Exobasidiomycetes)包含 2 个，微球黑粉菌纲(Microbotryomycetes)和节担菌纲(Wallemiomycetes)均只包含 1 个。

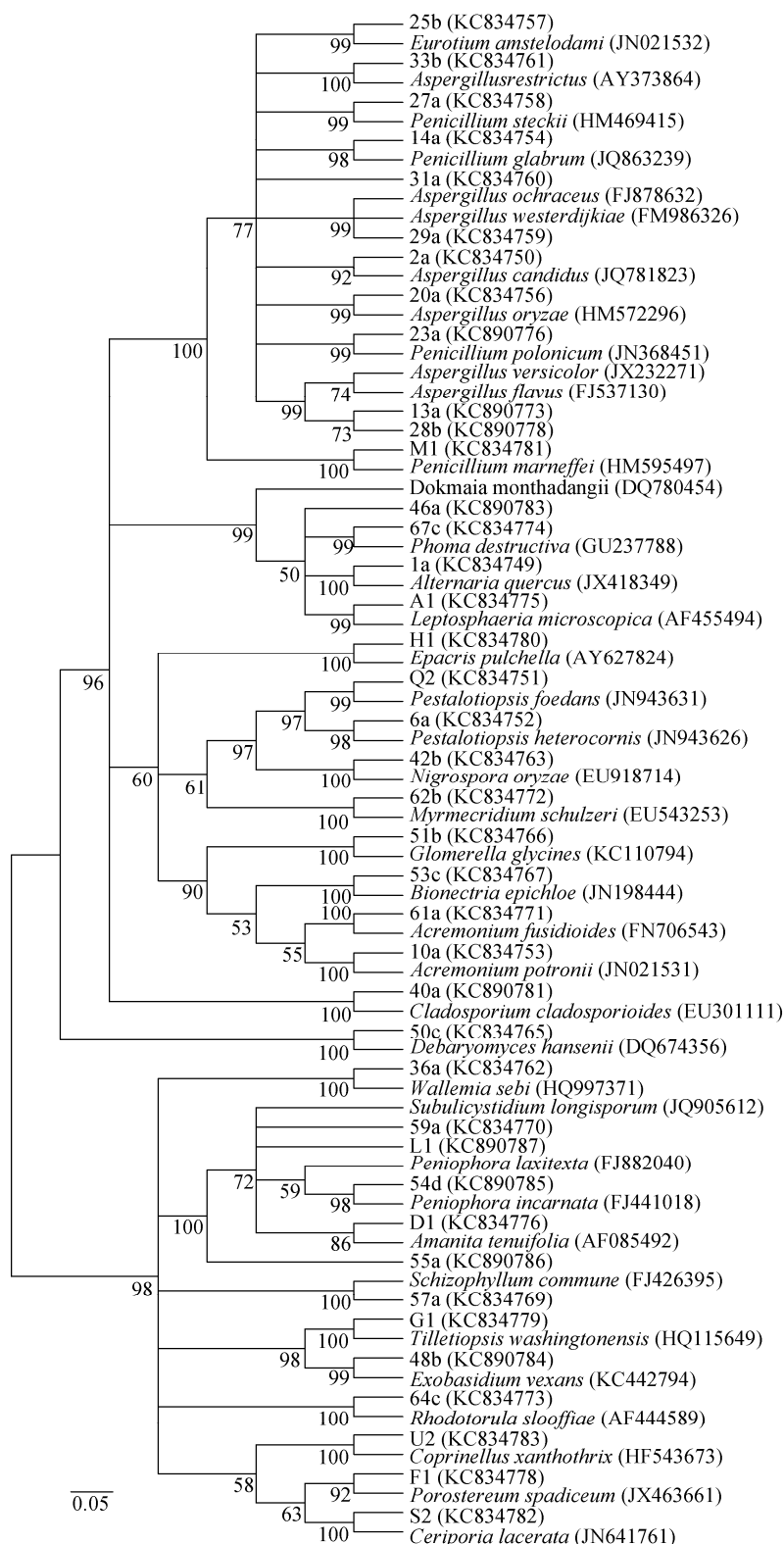


图1 内蒙古鄂尔多斯一古盐湖真菌系统发育进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of fungi strains at a paleo salt lake in Ordos, Inner Mongolia

Note: Phylogenetic tree based on ITS gene sequences using the Neighbour-Joining methods. Numbers at branching points refer to bootstrap values (1 000 resamplings, the valued above 50% are shown). Bar: 5% sequence divergence .

菌株 46a 与 *Dokmaia* 相似仅为 88%，并形成独立分支；菌株 H1 与顶花属(*Epacris*)相似性为 94%，并形成独立分支；菌株 55a 和 59a 与隔孢伏革属(*Peniophora*)相似性分别为 95%和 96%。上述菌株在表型上同已发表的真菌物种差异较大，可能为潜在新种。

- 2.1.3 不同盐浓度培养基真菌多样性比较：**对从 2.5%、5%、10%和 15% NaCl 浓度的盐度下分离得到的菌株进行分析，发现从 10%浓度下分离得到的菌株最多(30.7%)，15%浓度下分离得到的菌株最少(17.8%)。从 2.5% NaCl 浓度下分离得到的耐(嗜)盐真菌其均匀度指数(*J*)、丰富度指数(*Ma*)和多样性指数(*H'*)均比 5%、10%和 15%浓度下的高(表 2)。
- 2.1.4 不同培养基真菌多样性比较：**对从 CPDA、YPD 和 MEA 的 3 种分离培养基得到的菌株进行分析，发现从 CPDA 中分离得到的菌株最多(42.8%)，YPD 和 MEA 分别为 26.9%和 30.3%。从 MEA 培养基分离到的耐(嗜)盐真菌其丰富度指数(*Ma*)和多样性指数(*H'*)均比 CPDA 和 YPD 的高(表 3)。

2.2 产酶活性菌株的筛选

功能酶筛选结果表明(表 4)，45 个形态种中有

22 个形态种具有产酶活性，其中有 6 个形态种只产蛋白酶，6 个只产纤维素酶，2 个只产复合酶，1 个只产淀粉酶。有 4 个形态种可同时产 3 种酶，有 3 个可同时产 2 种酶(表 4 后 7 行)。

3 讨论

本文较系统的研究了内蒙古鄂尔多斯一古盐湖土壤沉积物和湖水样品中耐(嗜)盐真菌的多样性，采用传统的培养方法从内蒙古鄂尔多斯一古盐湖中共分离得到 2 121 株耐(嗜)盐真菌，根据形态学研究 and ITS 序列的系统分类学分析将其归类为 27 个属，谢占玲等(2012)^[10]从青海湖的样品中共分离得到 18 个属的耐盐真菌，陈雷(2009)^[14]从盐场晒盐池采集的底泥样品中共分离得到 2 个属的嗜盐真菌，黄菁菁等(2008)^[15]从晋江、福建厦门及诏安等 4 种生境采集到的样品中分离出 9 个属的耐(嗜)盐真菌，这表明鄂尔多斯古盐湖耐(嗜)盐真菌具有丰富的物种多样性，充分展示了该区丰富的耐(嗜)盐真菌资源。分离得到的青霉属和曲霉属的菌株，在其他的盐环境研究中也发现且为优势属^[14-15]，可能是因青霉属和曲霉属以其较强的产孢能力使得其在高盐生境中得以生存并占据优势。谢占玲等(2012)^[10]和陈雷(2009)^[14]的试验结果表明在上述

表 2 不同盐浓度培养基真菌多样性比较			
Table 2 Comparisons of fungal diversity on different salinity media			
NaCl 浓度 Salinity (%)	丰富度指数 <i>Ma</i>	多样性指数 <i>H'</i>	均匀度指数 <i>J</i>
2.5 NaCl	1.95	1.53	0.61
5 NaCl	1.23	1.41	0.59
10 NaCl	0.61	0.65	0.41
15 NaCl	0.75	0.57	0.57

表 3 不同培养基真菌多样性比较			
Table 3 Comparisons of fungal diversity on different media			
培养基 Medium	丰富度指数 <i>Ma</i>	多样性指数 <i>H'</i>	均匀度指数 <i>J</i>
YPD	1.47	1.09	0.42
MEA	1.48	1.39	0.54
CPDA	0.43	0.68	0.68

表 4 内蒙古鄂尔多斯一古盐湖真菌产酶特征						
Table 4 Enzyme-producing characteristics of a paleo salt lake fungal in Ordos, Inner Mongolia						
菌株编号 Strains No.	蛋白酶 Protease	复合酶 Compound enzyme	壳聚糖酶 Chitosan enzyme	淀粉酶 Amylase	纤维素酶 Cellulase	脂肪酶 Lipase
<i>Alternaria</i> sp. 1a	—	—	—	—	+++	—
<i>Aspergillus</i> sp. 2a	—	—	—	—	++	—
<i>Acremonium</i> sp.10a	—	—	—	—	++++	—
<i>Aspergillus</i> sp. 13a	++++	—	—	—	—	—
<i>Aspergillus</i> sp. 22b	++++	—	—	—	—	—
<i>Penicillium</i> sp. 23a	—	—	—	—	++	—
<i>Penicillium</i> sp. 27a	—	—	—	—	+++	—
<i>Schizophyllum</i> sp. 38a	+++	—	—	—	—	—
<i>Glomerella</i> sp. 51b	+++	—	—	—	—	—
<i>Schizophyllum</i> sp. 57a	—	—	—	—	+++	—
<i>Acremonium</i> sp. 61a	++++	—	—	—	—	—
<i>Phoma</i> sp. 67c	+	—	—	—	—	—
<i>Porostereum</i> sp. F1	—	++	—	—	—	—
<i>Epacris</i> sp. H1	—	+++	—	—	—	—
<i>Penicillium</i> sp. M1	—	—	—	++	—	—
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 6a	—	+	—	++	++++	—
<i>Cladosporium</i> sp. 40a	+++	—	—	+	++++	++
<i>Dokmaia</i> sp. 46a	++++	—	—	—	++	—
<i>Bionectria</i> sp. 53c	+++	—	—	—	++	—
<i>Myrmecridium</i> sp. 62b	++++	+++	—	—	++	—
<i>Leptosphaeria</i> sp. A1	+++	+++	—	++	—	—
<i>Tilletiopsis</i> sp. G1	+++++	—	++	—	—	—

Note: +: 0–5 mm; ++: 5–10 mm; +++: 10–15 mm; ++++: 15–20 mm; +++++: 20–25 mm; —: Negative.

两种盐环境中的优势属为枝孢属(*Cladosporium*)和青霉属(*Penicillium*)，然而鄂尔多斯一古盐湖的真菌优势属为曲霉属(*Aspergillus*)，通过与陈雷^[14]、黄菁菁等^[15]、谢占玲等^[10]的研究结果进行比较，发现本研究分离得到的裂褶菌属(*Schizophyllum*)、得巴利酵母属(*Debaryomyces*)、节担菌属(*Wallemia*)、蜡质菌属(*Ceriporia*)、鬼伞属(*Coprinellus*)、小球腔菌属(*Leptosphaeria*)、鹅膏属(*Amanita*)、*Myrmecridium*、*Porostereum* 和 *Subulicystidium* 等其它盐环境中未发现的真菌；并发现了 *Dokmaia*、顶花属(*Epacris*)和隔孢伏革属(*Peniophora*)的潜在新种；说明盐湖真菌对盐度的适应性可能具有种属的特性，盐湖真

菌的分布可能与地域环境有关，各个地域环境的光照，日夜温差，海拔高度以及湖水的 pH 等都是导致盐湖真菌分布差异的重要原因^[3,16-18]。

功能酶的筛选结果表明，共有 22 个形态种的真菌具有产酶活性，有 15 个形态种的耐(嗜)盐真菌能够产一种酶；有 4 个菌株可同时产 3 种酶，有 3 个菌株同时产两种酶。产蛋白酶的真菌主要有毛霉属(*Mucor*)^[19]、曲霉属(*Aspergillus*)^[20]，新发现的裂褶菌属(*Schizophyllum*)、支顶孢属(*Acremonium*)、*Myrmecridium*、*Dokmaia* 及铁艾酵母属(*Tilletiopsis*)都具有较强的产蛋白酶的能力，透明圈直径与菌落直径差值的最大值可达 22.3 mm。国内外研究较多

的产纤维素酶是木霉属(*Trichoderma*)^[21]、曲霉属(*Aspergillus*)^[22]和青霉属(*Penicillium*)^[23], 本研究发现的枝孢属(*Cladosporium*)、拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)和支顶孢属(*Acremonium*)都具有较强的产纤维素酶能力。产脂肪酶的研究主要集中在曲霉属和细菌方面, 同时还发现枝孢属也有一定的产脂肪酶能力, 顶花属(*Epacris*)、*Myrmecridium* 和小球腔菌属(*Leptosphaeria*)也有较强的产复合酶能力。然而盐湖真菌产淀粉酶和壳聚糖酶的能力较弱, 透明圈直径与菌落直径的差值均小于 10 mm。研究结果表明盐湖自然环境虽然恶劣, 但盐湖耐(嗜)盐真菌的产酶能力较强, 为进一步开发和利用功能酶提供良好的研究材料。

参 考 文 献

- [1] 宋彭生, 李武, 孙柏, 等. 盐湖资源开发利用进展[J]. 无机化学学报, 2011, 27(5): 801-815.
- [2] Hollister EB, Engledow AS, Hammett AJ, et al. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments[J]. International Society for Microbial Ecology, 2010, 4(6): 829-838.
- [3] Xiong J, Liu Y, Lin X, et al. Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau[J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(9): 2457-2466.
- [4] 朱莉, 杨红梅, 王芸, 等. 新疆顿巴斯他乌盐湖沉积物免培养古菌多样性[J]. 微生物学报, 2012, 52(6): 769-775.
- [5] 刘冰冰, 唐蜀昆, 明红, 等. 新疆罗布泊地区可培养嗜盐古菌多样性及其功能酶筛选[J]. 微生物学报, 2011, 51(9): 1222-1231.
- [6] 陈超. 新疆七角井盐湖可培养细菌多样性及其功能酶筛选[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2011.
- [7] 朱德锐, 刘建, 韩睿, 等. 青海湖嗜盐微生物系统发育与种群多样性[J]. 生物多样性, 2012, 20(4): 495-504.
- [8] 贾晓宇. 天山山间盆地两大盐湖放线菌多样性及聚酮合酶基因多样性研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2012.
- [9] 陈正军, 关统伟, 张利莉. 新疆硝尔库勒盐湖放线菌分离方法的初步研究[J]. 塔里木大学学报, 2012, 24(2): 50-55.
- [10] 谢占玲, 王欢, 赵朋, 等. 分离自青海湖可培养耐盐真菌的多样性研究[J]. 菌物学报, 2012, 31(2): 187-195.
- [11] 李博生, 张宏斌. 鄂尔多斯高原盐碱湖持续利用与其螺旋藻产业的崛起[J]. 盐湖研究, 2010, 18(4): 43-47.
- [12] 巩东辉. 鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻对低温、强光的响应[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2013.
- [13] 易润华, 朱西儒, 周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA[J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23(6): 72-73.
- [14] 陈雷. 嗜盐微生物的多样性分析及其抗菌与抗肿瘤活性研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2009.
- [15] 黄菁菁, 鲁春华, 钱晓鸣, 等. 台湾海峡海洋耐(嗜)盐真菌及其抗菌活性的初步研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2008, 47(5): 723-727.
- [16] Zinger L, Shahnava B, Baptist F, et al. Microbial diversity in alpine tundra soils correlates with snow cover dynamics[J]. The ISME Journal, 2009, 3(7): 850-859.
- [17] Lage MD, Reed HE, Weihe C, et al. Nitrogen and phosphorus enrichment alter the composition of ammonia-oxidizing bacteria in salt marsh sediments[J]. The ISME Journal, 2010, 4(7): 933-944.
- [18] Zinger L, Lejon DP, Baptist F, et al. Contrasting diversity patterns of crenarchaeal, bacterial and fungal soil communities in an Alpine Landscape[J]. PLoS One, 2011, 6(5): 1-7.
- [19] 张蓓蓓, 宋萍, 王柱, 等. 产蛋白酶优良腐乳生产菌毛霉的分离筛选与鉴定[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(4): 92-94, 106.
- [20] 王栋, 冯杰, 郑志永, 等. 酱油发酵用2种米曲霉中性蛋白酶的酶学性质比较[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(5): 479-485.
- [21] 宋贤冲, 唐健, 邓小军, 等. 产纤维素酶真菌的分离筛选、鉴定及其酶学性质分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(3): 372-378.
- [22] 严芬, 李源涛, 李丽芬, 等. 一株产高温纤维素酶真菌的筛选、鉴定及酶学性质研究[J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2013, 41(3): 397-402.
- [23] 穆春雷, 武晓森, 李术娜, 等. 低温产纤维素酶菌株的筛选、鉴定及纤维素酶学性质[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1193-1201.