

研究报告

粤北一种虫草分离菌的抗酵母现象

王伟* 陈湛昌 钟英长 杨博 蔡世亮

(中山大学生命科学学院 广州 510275)

摘要: CR-9512 是一株分离自粤北一种虫草的无孢丝状真菌, 经培养初步鉴定为无孢菌目 (Agonomycetales) 的丝核菌属 (*Rhizoctonia*)。对包括革兰氏阳性及阴性细菌、放线菌、丝状真菌和酵母菌在内的 26 株致敏菌株的抗性测定表明, CR-9512 对包括红酵母属 (*Rhodotorula*)、酵母属 (*Saccharomyces*)、毕赤氏酵母属 (*Pichia*) 和隐球酵母属 (*Cryptococcus*) 等多个属的酵母菌具有显著的抑菌能力, 而对假丝酵母属 (*Candida*) 的抑菌作用稍弱。这种专一的抗酵母特性可望使 CR-9512 在抗酵母真菌的基础研究和应用领域中成为极有价值的新资源菌种。

关键词: 虫草属, 丝核菌属, 抗酵母

中图分类号: Q939.92 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0001-04

ANTI-YEAST PHENOMENON OF A FUNGUS ISOLATED FROM
CORDYCEPS SP. FROM THE NORTH OF GUANGDONG

WANG Wei CHEN Zhen-Chang ZHONG Ying-Chang YANG Bo CAI Shi-Liang

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract: A non-spore fungal strain designated as CR-9512 was isolated from a species of *Cordyceps*, found in Northern Guangdong of China. The growth characteristics and the morphology of the organism were studied. It was initially identified as *Rhizoctonia* sp., Agonomycetales. Its antimicrobial tests, against 26 strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria, actinomycetes, filamentous fungi and yeast, showed strong inhibition to some yeast of *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Pichia* and *Cryptococcus*, and weak inhibition to yeast of *Candida*. The speciality on a limited-spectrum anti-yeast of the organism will show an enormous value for researches and applications.

Key words: *Cordyceps* sp., *Rhizoctonia* sp., Anti-yeast

以各种昆虫为寄主的虫生病原真菌, 是一个种类繁多、形态和生活史复杂多变的菌物类群, 其中子囊菌类的虫草属 (*Cordyceps* (Fr.) Link) 在生活史上具有复性特征, 加之其广泛的寄主范围与生活空间, 使得其中相关联的真菌、昆虫及虫菌体三者的种群更为繁杂, 因而在形态结构、繁殖方式、生活史、侵染机制、代谢类型以至代谢产物诸方面均呈现出多型性与多样化的特点^[1, 2]。这种多样性构成了一个蕴藏丰富的生物资源宝库, 为多用途的开发利用提供了广阔的遴选空间。近年来, 对虫草属真菌的研究正由传统的形态鉴定, 逐渐转向其特殊的生物活性及具有生理活性的次生代谢产物方面^[3, 4]。我们在粤北发现的一个虫草上, 分离到一株编号为 CR-9512 的无孢伴生真菌, 具有独特专一的抗酵母性能, 简报如下。

* 联系人 Tel: 020-84113799, E-mail: ls30@zsu.edu.cn

收稿日期: 2002-03-11, 修回日期: 2002-04-30

1 材料与方法

1.1 菌种来源

供试虫草采自粤北天井山主峰下坡度距离约 100m ~ 200m 的混交林地, 海拔 1, 180m。寄主是一种体形较大的枯叶蛾 (*Lasiocampidae*) 或灯蛾 (*Arctiidae*) 的幼虫。全身披毛丛且有瘤状簇生的次生刚毛, 体长达 80mm, 直径 8mm ~ 11mm。虫草的可孕孢子座由虫体周身直立长出, 丛生, 大小子座多达 120 余个, 通体呈金黄色、狼牙棒状, 不分枝, 长约 4mm ~ 6mm (其中柄部长约 2mm ~ 4mm, 柱状或向外端渐细, 直径 0.5mm ~ 1.5mm, 栗刺状头部呈圆形或椭圆形, 1.5mm ~ 3mm), 子囊壳表生。初步鉴定为虫草属的一个新种 (*Cordyceps ruyuanensis* sp. nov.) (鉴定结果另报)。

供试菌种分离自虫草的子座和虫体组织, 经重复分离得到的一株不产生分生孢子结构的菌株, 编号为 CR-9512。

抗异性测定的细菌、放线菌、丝状真菌和酵母等 26 株致敏菌株均为本室保存。

1.2 培养基

PDA、查氏 (Czapek's)、萨氏 (Sabouraud's)、高氏一号 (Gause's 1^{*}) 琼脂培养基和葡萄糖牛肉膏蛋白胨培养基, 常规方法配制并 1×10^5 Pa 灭菌处理。

1.3 抗异性测定

CR-9512 菌丝点种于 PDA 平板, 22℃ ~ 24℃ 下避光培养 7 ~ 9d 后供试。

各致敏待测菌的斜面试管菌种先用无菌水洗脱之后吸取 0.2mL 菌液 (孢子悬浮液) 分别涂布平板, 最后移入直径约 5mm 的 CR-9512 菌丝琼脂块, 适宜温度下培养观察, 记录拮抗情况, 测量比较抗菌圈大小。

2 结果

2.1 CR-9512 的菌丝形态

在 PDA 和查氏培养基上, 菌丝无色。载片培养观察, 菌丝有不规则的横隔膜且在分隔处常缢缩。菌丝为粗细两型, 细菌丝直径 $1.5\mu\text{m} \sim 1.8\mu\text{m}$, 粗菌丝直径 $2.9\mu\text{m} \sim 3.7$ (7.4) μm , 并在气生菌丝向外端或分隔处的向内端呈球形膨大, 使部分菌丝呈藕节状。显微镜下可以看见方形或 4 面体形的晶体颗粒, 直径约 $3.5\mu\text{m} \sim 5.6$ (7.45) μm (尤以 PDA 培养基中为多), 但无明显的产分生孢子结构。初步鉴定结果, CR-9512 为无孢目 (*Agonomycetales*) 的丝核菌属 (*Rhizoctonia* sp.)。

2.2 CR-9512 的菌落特征和培养性状

在 PDA、查氏和萨氏培养基平板上, CR-9512 表面均呈细绒毛薄毡状, 厚约 1.5mm ~ 3mm, 生长初期以菌丝束方式放射状或树枝状扩散, 而后以正圆形方式均匀向四周扩展, 边缘整齐, 中央形成一直径约 6mm ~ 8mm 的圆形凸起, 乳头状, 凸起部分与周围菌落间有一浅沟。菌落正面在 PDA 中呈灰褐色或灰黄绿色, 外缘灰色, 在查氏和萨氏培养基上呈白色, 老熟后亦转为灰褐色。背部中央呈深色或墨绿色, 外围浅色, 其颜色深度依查氏、PDA 和萨氏培养基的顺序由浅入深。

生长速度在 PDA 中最快; 查氏培养基中次之; 而萨氏培养基中生长最慢, 但菌丝致密度显著提高。22℃ 下 PDA 上 5d 平均菌落直径 18mm, 9d 已达 36mm, 12d 达 48mm, 17d 62mm, 20d 72mm。查氏培养基中 12d 直径为 34mm, 而萨氏培养基中 12d 直径仅为

22mm。

2.3 CR-9512 的抗异性能

见表 1。CR-9512 对包括革兰氏阳性及阴性细菌、放线菌、丝状真菌和酵母菌在内的 26 株致敏菌株的抗性测定表明, 该菌株对放线菌和丝状真菌无拮抗性, 对细菌抗性不明显, 而对酵母菌则抗性显著。实验表明, CR-9512 对包括红酵母属 (*Rhodotorula*)、酵母属 (*Saccharomyces*)、毕赤氏酵母属 (*Pichia*) 和隐球酵母属 (*Cryptococcus*) 等多个属的酵母菌具有显著的抑菌能力, 而对假丝酵母属 (*Candida*) 的抑菌作用稍弱。这种专一的抗酵母特性有望在抗酵母真菌的基础研究和应用领域中发挥更大的作用。

表 1 CR-9512 对细菌、丝状真菌、酵母菌和放线菌的抗菌效果

细菌 (G ⁺)、放线菌	抗菌效果	细菌 (G ⁻)	抗菌效果	丝状真菌	抗菌效果	酵母菌	抗菌效果
枯草杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	±	产气杆菌 (<i>Aerobacter aerogenes</i>)	-	黄曲霉 (<i>Aspergillus flavus</i>)	-	热带假丝酵母 (<i>Candida tropicalis</i>)	+
苏云金杆菌 (<i>Bacillus thuringiensis</i>)	-	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	-	串珠镰孢霉 (<i>Fusarium moniliforme</i>)	-	白色假丝酵母 (<i>Candida albicans</i>)	+
肺炎双球菌 (<i>Diplococcus pneumoniae</i>)	-	普通变形杆菌 (<i>Proteus vulgaris</i>)	-	球孢毛霉 (<i>Mucor globosus</i>)	-	膜膜毕赤酵母 (<i>Pichia membranaefaciens</i>)	+++
四联球菌 (<i>Micrococcus tetragenus</i>)	±	伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhi</i>)	±	黄绿青霉 (<i>Penicillium citreo-viride</i>)	-	深红酵母 (<i>Rhodotorula rubra</i>)	+++
白色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus albus</i>)	-	沙门氏菌 (<i>Salmonella sp.</i>)	±	黑根霉 (<i>Rhizopus nigricans</i>)	-	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	+++
金黄葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	-	灵杆菌 (<i>Serratia marcescens</i>)	±	绿色木霉 (<i>Trichoderma viride</i>)	-	新型隐球菌 (<i>Cryptococcus neoformans</i>)	+++
细黄放线菌 (<i>Actinomyces microflavus</i>)	-			宛氏拟青霉 (<i>Paecilomyces variotii</i>)	-		

注: “+”表示抑菌, “-”表示没有抑菌或抑菌表现不明显

3 讨论

关于虫草类真菌的抗菌物质, 1951 年 Cunningham 等首次报道从蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) 培养滤液的提取物中发现虫草菌素 (cordycepin), 对枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 有抑菌效果, 其中 45 株枯草杆菌中有 43 株被抑制, 但此虫草菌素并不抑制金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、藤黄八叠球菌 (*Sar. lutea*)、大肠杆菌 (*E. coli*)、魏氏芽孢杆菌 (*B. welchii*)、变形芽孢杆菌 (*B. proteus*) (又名普通变形杆菌 *Proteus vulgaris*)、溶血链球菌 (*Strep. hemolyticus*)、*S. flexneri*、粪链球菌 (*Strep. faecalis*) 或败血巴斯德氏菌 (*Pasteurella septic*) 等细菌的生长。枯草杆菌成为虫草菌素的测定指示菌^[5]。此后, Kredich 和 Guarino 于 20 世纪 60 年代从蛹虫草菌丝培养物中又陆续分离到另外 3 个腺苷类抗菌素, 即高瓜氨酰氨基腺苷、3'-氨基-3'-脱氧腺苷及赖氨酰氨基腺苷, 其中 3'-氨基-3'-脱氧腺苷抑制新隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans* 4806) 和白色假丝酵母 (*Candida albicans*), 对酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* LK2G12) 的原生质体只呈现部分抑制, 对细菌则没有抑制; 尤其引人注目的是它对包括艾氏腹水瘤和 S3A 腺癌 (腹水型) 在内的多种肿瘤细胞有强抑制作用^[6]。1988 年李兆兰等^[7]报道从冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) 分离菌中国弯颈霉 (*Tolypocladium sinense*) 的发酵液中获得环孢菌素 (cyclosporin) 粗提品, 对黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、新月弯孢霉 (*Curvularia lunata*) 和蠕孢霉 (*Drechslera sorokiniana*) 等 3 株丝状真菌有抑制作用, 对热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 则抑菌不明显。环孢菌素可拮抗某些丝状真菌和酵母菌, 以丝状真

菌为主,其中以检测指示菌黑曲霉最为敏感,对细菌则无拮抗作用,抗菌谱较窄。进一步研究中国弯颈霉的乙酸乙酯萃取物发现其抑菌效果仍以丝状半知菌为主^[8]。本实验中 CR-9512 菌株所分泌的抗菌物质,具有相对限定的抗酵母特性,与上述虫草菌素和环孢菌素显著不同。迄今,自然界中此类真菌的专一广谱抗酵母现象尚未见报道。

另外,经过 30d 不间断观察,未见 CR-9512 有产孢结构,据此可能不是宿主的原发病原菌(但显然与该虫草关系密切),属共生抑或寄生待研究。

CR-9512 菌株抗酵母的原因、抗酵母物质的成分和结构尚待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 梁宗琦. 生物多样性, 1996, 4 (4): 235 ~ 241.
- [2] 王 伟, 钟英长, 周世宁, 等. 中山大学学报(自然科学版), 1997, 36 (1): 126 ~ 128.
- [3] 李兆兰, 孙云汉. 真菌学报, 1988, 7 (1): 23 ~ 28.
- [4] 黄建忠, 梁宗琦, 刘爱英. 西南农业学报, 1992, 5 (2): 63 ~ 67.
- [5] Cunningham K G, Hutchinson S A, Manson W, et al. J Chem Soc, 1951, 2299 ~ 2300.
- [6] R.) 苏哈道尼克著, 谢其明, 王恕蓉译. 核苷类抗菌素. 北京: 科学出版社, 1982. 88 ~ 109.
- [7] 李兆兰. 真菌学报, 1988, 7 (2): 93 ~ 98.
- [8] 李兆兰, 席运官. 真菌学报, 1994, 13 (2): 127 ~ 138.