

黔南州茶园土壤中优势菌株烟曲霉的分离·纯化及鉴定

周小露¹, 宋丽莎², 王利荣³, 罗学尹², 刘丽明², 马媛², 周才碧^{2*} (1. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南长沙 410000;

2. 黔南民族师范学院生物科学与农学院, 贵州都匀 558000; 3. 黔南州广播电视大学物理系, 贵州都匀 558000)

摘要 [目的] 分离一株适于开发茶园专用有机肥的菌株。[方法] 以黔南州茶园优质土壤为材料, 进行微生物分离、纯化、形态鉴定及分子鉴定。[结果] 通过优质土壤的分离、纯化得到优势菌株 S2; 该菌株边缘薄, 中心有不规则状的条纹, 表面呈绒毛状, 灰白色, 背面淡青色; 提取菌株 S2 DNA, 进行凝胶电泳及 PCR 扩增, 经 BLAST 比对后发现, 病原真菌的 rDNA-ITS 序列与 *Aspergillus fumigatus* (JQ268555.1) 的序列相似度高达 100%。[结论] 结合形态学与分子生物学鉴定, 确定从茶园土壤中分离、纯化得到的菌株为烟曲霉菌。

关键词 烟曲霉; 菌体形态; 形态鉴定; 分子鉴定

中图分类号 S154.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)22-0115-04

Isolation, Purification and Identification of Dominant Strains of *Aspergillus fumigatus* from Tea Garden Soil in Qiannan Prefecture

ZHOU Xiao-lu¹, SONG Li-sha², WANG Li-rong³ et al (1. College of Horticulture and Gardening, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410000; 2. College of Biological Sciences and Agriculture, Qiannan Normal College for Nationalities, Duyun, Guizhou 558000; 3. Department of Physics, Qiannan Radio and TV University, Duyun, Guizhou 558000)

Abstract [Objective] To isolate a strain suitable for the development of organic fertilizers for tea gardens. [Method] The high-quality soil of tea gardens in Qiannan Prefecture was used as the material for microbial isolation, purification, morphological identification and molecular identification. [Result] The superior strain S2 was obtained through the separation and purification of high-quality soil. The strain had a thin edge, irregular stripes at the center, and the surface was villous, grayish white and light blue on the back; the strain S2 DNA was extracted and subjected to gel electrophoresis and PCR amplification. After BLAST comparison, the sequence similarity of the rDNA-ITS sequence of pathogenic fungi to *Aspergillus fumigatus* (JQ268555.1) was as high as 100%. [Conclusion] According to the morphological and molecular biological identification, the strain isolated and purified from the tea garden soil was identified as *Aspergillus fumigatus*.

Key words *Aspergillus fumigatus*; Cell morphology; Morphological identification; Molecular identification

在贵州农业中, 茶叶占重要经济地位, 截至 2018 年茶园面积积达 46 万~67 万 hm^2 ; 其中黔南州种植面积为 10 万 hm^2 , 占贵州省茶园总面积的 21%, 是重要茶区之一。黔南州《关于进一步加快推进茶产业发展的意见》明确提出有机茶的发展目标, 在有机茶园建设过程中, 必须提高无害化有机肥的投入, 构建茶园动态植保体系。然而大量使用化学肥料会带来土壤酸化、重金属超标、农药残留等问题。研究表明, 贵州茶区如都匀茶区^[1-2] pH 为 3.00~4.00; 湄潭和凤冈 pH 为 4.00~4.50; 正安 pH 为 4.00~5.00, 土壤大面积酸化。茶树缺少大量元素, 植株矮小, 产量降低。目前, 可用于茶树的生物有机肥较少, 但使用化肥已对茶园造成严重危害, 研制可供茶树使用的生物有机肥迫在眉睫。

秸秆内含有大量有机物, 不仅可以增加土壤有机质含量, 补充大量元素, 而且是最常见的生物有机肥原料之一。

生物有机肥的制造过程需大量使用秸秆, 不仅可以使秸秆重归田间, 而且通过对秸秆的回收, 有效避免了秸秆燃烧造成的大气污染。生物有机肥制作大多采用秸秆、微生物、腐殖质等天然原料, 具有无毒、无害、成本低、见效好等优点, 有机肥有效地利用天然原料, 循环利用, 变废为宝。使用生物有机肥不仅不会造成土壤环境的危害, 利用微生物还可以大大改善因大量使用化肥而造成的土壤酸化、重金属超标等问题。生物有机肥中有效菌种发酵产生的多种可溶性生理活性物质, 如有机酸、维生素等能被植物迅速吸收。施用有机肥^[3-7]可降低土壤的酸化程度, 有利于加快土壤中氮、磷等元素循环^[8-11], 有助于缓解土壤酸化趋势^[12-14], 减少 Cd 等^[15]重金属的累积; 促进茶树提早萌发^[16], 茶叶长势良好, 芽叶密度大, 芽质量明显提高, 增加了茶鲜叶中茶多酚、咖啡碱、水浸出物、可溶性糖的含量, 茶叶氟含量明显下降。

土壤是植物吸收养分的主要来源之一, 通过给茶树施肥能改良茶树因缺少大量元素造成的叶片发黄等问题。茶树专用有机肥既可做基肥也可做追肥, 速效与缓效养分协调, 肥料利用率高, 可减轻氮肥造成的硝酸盐积累以及磷钾肥造成的重金属污染, 因此都匀毛尖茶区专用有机肥的研制迫在眉睫。笔者以黔南州茶园优质土壤为材料, 分离、纯化得到优势菌株, 通过形态鉴定和分子鉴定, 明确优势菌株的背景, 以期为其茶园专用有机肥的研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料 土样: 采集于都匀三江堰茶园; 蔗糖: 化学纯, 天津市密欧化学试剂有限公司; 琼脂粉: 北京鼎国昌盛生物技术责任有限公司; 磷酸二氢钾: 分析纯, 天津市致远化学试剂有限公司; 葡萄糖: 分析纯, 天津市化学试剂公司; 氯化

基金项目 贵州省教育厅科研创新团队项目(黔教合人才团队字[2014]45); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合KY字[2017]336); 国家自然科学基金项目(31270725); 贵州省重点学科建设项目(黔学位合字ZDXK[2016]23号); 贵州省教育厅项目(2016SBJ0408, 黔教高发[2015]337号); 贵州省教育厅科研创新团队项目(黔教合人才团队字[2015]68); 市科技星火项目(匀市科合2017字05号、06号); 黔南民族师范学院重点科研项目(qnsy201607); 贵州省教育厅大学生创新创业计划训练项目(201710670054, 201710670066, 201710670067, 201710670070, 201710670072, 201710670068, 201710670069, 201710670071, 201710670073, 201710670056)。

作者简介 周小露(1991—), 女, 湖北荆州人, 硕士研究生, 研究方向: 茶叶功能性和安全性, 以及茶叶无公害生产技术。* 通讯作者, 讲师, 从事茶叶生化、深加工、功能性和安全性, 以及茶叶无公害生产技术等研究。

收稿日期 2018-04-14; **修回日期** 2018-05-09

钾:分析纯,汕头市光华化学厂;硫酸镁:分析纯,重庆茂业化学试剂有限公司;其他材料:硝酸钠,乙醇,氯霉素,硫酸铁,蒸馏水,马铃薯,KAC,异丙醇,溴酚蓝,液氮。

1.2 试验仪器 电子显微镜:XSP-8C,德卡精密量仪(深圳)有限公司;超净工作台:SW-CJ1FDA,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;高压蒸汽灭菌锅:GI54DS,致微(厦门)仪器有限公司;恒温培养箱:BIC-250,上海博迅实业有限公司;冰箱:BCD-251WBSV,上海帝览实业有限公司;电子天平:LTI000B,常熟市天量仪器有限公司;其他仪器:保鲜膜,滤纸,酒精灯,取样袋,盖玻片,载玻片,玻璃棒,烧杯,纱布,量筒,镊子,接种环,涂布棒,记号笔,铲子,药匙,报纸,橡皮筋,培养皿,试管,三角瓶,一次性手套,标签纸。

1.3 试验方法

1.3.1 预处理。为了减少土壤样品中的杂物,防止其他物质菌体的干扰,用灭菌过后的菌镊子夹出草、石头等物质,再把处理好的土壤放入 -5°C 冰箱中保存备用。

1.3.2 培养基配制。①PDA:洋芋200 g,葡萄糖20 g,琼脂20 g,蒸馏水1 000 mL,自然pH,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌20 min。②PSA:洋芋200 g,蔗糖20 g,琼脂20 g,蒸馏水1 000 mL,自然pH,

121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌20 min。③WA:琼脂粉13 g,蒸馏水1 000 mL。④察氏培养基:蔗糖30 g,七水合硫酸镁0.5 g,硝酸钠2 g,氯化钾0.5 g,七水合硫酸亚铁0.01 g,磷酸二氢钾1.0 g,琼脂粉15 g,蒸馏水1 000 mL。

1.3.3 菌株分离。①取土样。在都匀三江堰茶园中,挑选优质土壤,用铲子挖出,装入密封袋中,用标签纸贴好并编号,带入实验室以便制作菌种悬液。②材料消毒。防止带回土壤被周围环境中的菌种污染,试验操作要求在无菌条件下进行。提前2 h将制备的培养基、试验所用工具和蒸馏水(制备稀释浓度梯度的无菌水)放入高压灭菌锅中灭菌,以使用。③土样稀释。取20 g土壤放入三角瓶中,装入80 mL无菌水,摇晃20 min,制备菌种原悬液;再依次稀释得到 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 浓度梯度的菌种悬液(图1)。④涂布接种。在酒精灯周围,用接种环蘸取1~2滴菌种悬浮液,使用涂布法在已制备的培养基中接种,并将接种浓度用标签纸在培养皿上记录。试验完成后,整理并关闭超净工作台,把已接种的培养基放入25 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,培养6~7 d。直至有菌落形成时,即可对菌株进行纯化。

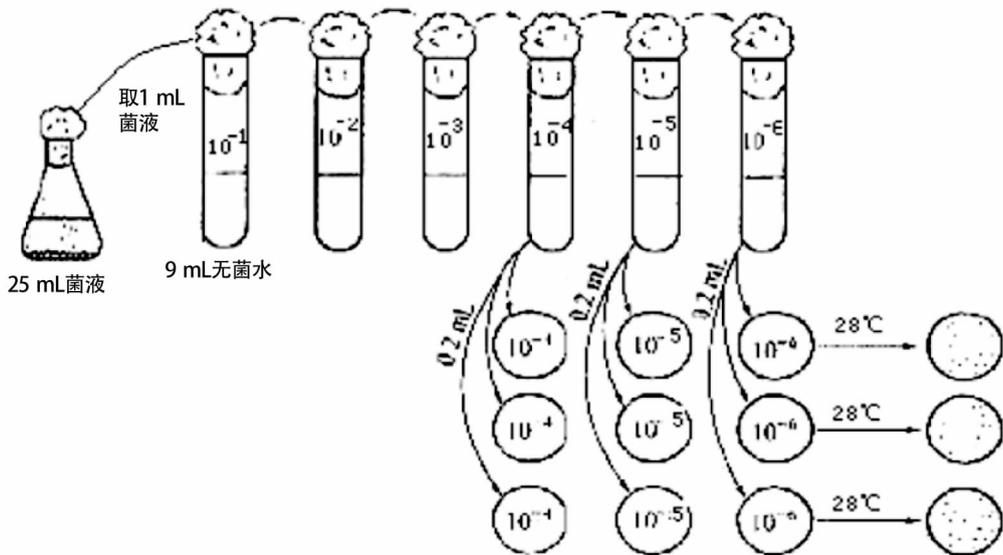


图1 梯度稀释法分离菌种

Fig.1 Isolation of strains by gradient dilution method

1.3.4 菌株纯化。①准备。培养至第6天,在培养基上可明显观察到菌落。挑选培养基上生长旺盛的菌落,使用涂布平板划线法进一步纯化处理。②接种。首先在培养皿底部用记号笔画出等边的顶点3个点,并标号。落点时注意在酒精灯周围操作,先把接种环在酒精灯上灼烧2~3 s,待接种环温度降低,即可把接种环放入培养基中降温,防止较高温杀死菌种。用接种环沾取菌,从标记的第1个点开始落点后,继续朝第2个点,接着再朝第3个区域点,以此类推。③培养。将接种优势菌的PDA培养基置于28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养中培养3~5 d。经培养后,每个皿形成3个菌落。④观察。待优势菌长出菌落后,观察优势菌长势是否良好,如果有杂菌需要再进行分离、纯化,直到获得纯培养。

1.3.5 菌株鉴定。

1.3.5.1 形态学鉴定。①镜检鉴定。在察氏或PDA培养基中培养菌株,待菌株产生孢子结构时,在菌落边缘和中间挑取少许菌落,制成标本,并固定好,利用电子显微镜在40倍和100倍显微镜下对菌种进行观察,并记录菌种的相关特征,根据菌落的形状、大小、颜色、表面特征来鉴定,初步判断该菌种的种类。②生长速率的测定。在无菌环境下,把优势菌株打成直径5 mm的菌饼,转移至25 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,培养7 d后,量取优势菌饼直径的大小,比较其变化,即可计算优势菌的生长速率,并记录优势菌的生长特征。

1.3.5.2 分子鉴定。

(1)DNA的提取。①研磨菌丝,加入500 μL 裂解液,放置

10 min;②加入浓度 3 mol/L 的 KAC 150 μ L, 12 000 r/min 离心 15 min, 取其上清;③重复②, 取上清液并加入异丙醇, 在 12 000 r/min 下离心 15 min;④取其上清, 加 300 μ L 70%乙醇沉淀 DNA, 在 12 000 r/min 下离心 10 min, 洗涤 2~3 次;⑤等待水分散失, 加 0.1 \times TE 30 μ L, 最终获得液体状态下的 DNA。

(2) PCR 扩增。以 ITS2 的 5'- TCCT CCGC TTAT TGAT ATGC-3' 作为引物 (5'- TCCT CCGC TTAT TGAT ATGC-3', 由华大基因生物技术有限公司合成), 扩增体系总体积为 25.000 μ L (DNA 模板 1.000 μ L, 10 \times buffer 缓冲液体 2.500 μ L, dNTPs 2.000 μ L, 正向引物 1.000 μ L, 反向引物 1.000 μ L, Ex Taq DNA 聚合酶 0.125 μ L, ddH₂O 17.400 μ L), 以体系中不加菌株 DNA 提取物作为阴性对照, 进行 PCR 扩增, 扩增完成取出产物保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 备用。

(3) 电泳。①制胶。称 0.2 g 琼脂糖, 加 20 mL 0.5 TBE 缓冲液 (pH 8.0), 用微波炉加热 1.5 min, 拿出琼脂糖溶液, 静置一段时间后, 加入 1 μ L Goldview 指示剂, 摇匀; 插好梳子, 稳定模具, 把凝胶倒入制胶模具。②电泳。将制胶板置于电泳槽中。取 5.0 μ L 扩增产物加入 2.5 μ L 溴酚蓝, 混匀后点样。开启设备, 设定电压 (120 V) 和时间 (30 min)。

试验结束后采用凝胶成像系统拍照并将 PCR 扩增产物送至华大基因生物技术有限公司 (广州部) 测序。

(4) 序列分析。把测序得到的序列放到 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 核酸数据库进行 Blast 检测, 下载优势菌株的序列。将优势菌株的序列导入 MEGA 6.0 软件, 使用多序列比对分析, 构建系统发育树, 鉴定菌株种别。

2 结果与分析

2.1 优势菌分离 以优质土壤 (图 2) 为材料, 利用稀释涂布分离得到 5 种菌; 进一步利用 3 点接种法, 纯化该菌株, 最终得到优势菌株 S2 (图 3), 该菌株在 PDA 培养基上 25 $^{\circ}$ C 下培养 4~6 d 长势旺盛, 同时该菌株生长周期较长。

2.2 优势菌鉴定

2.2.1 形态鉴定。 利用传统形态学鉴定方法, 对“2.1”分离、纯化得到的优势菌株 S2 进行观察。利用电子显微镜观察, 优势菌种 S2 边缘薄, 中心有不规则状的条纹, 生长表面呈绒毛状, 灰白色或乳白色, 培养基为浅绿色到灰白色, 背面淡青色; 向上突起的菌丝在球形顶囊上分生出粗糙的孢子梗, 孢

子梗中长出许多分生孢子, 顶囊为半球状, 在 1/2 或 1/3 处有双层小梗; 分生孢子头呈放射状, 大小为 1.5~2.5 nm。小梗双层, 梗基 0.5~1.0 nm, 小梗 1.0~1.5 nm, 分生孢子球形, 粗糙, 直径 1.0~1.5 nm 或稍大。菌落大小为 4.0~8.6 nm。根据优势菌株 S2 的形态特征, 初步确定该菌属为曲霉属真菌 (图 4)。



图 2 土壤及其环境

Fig.2 Soil and its environment

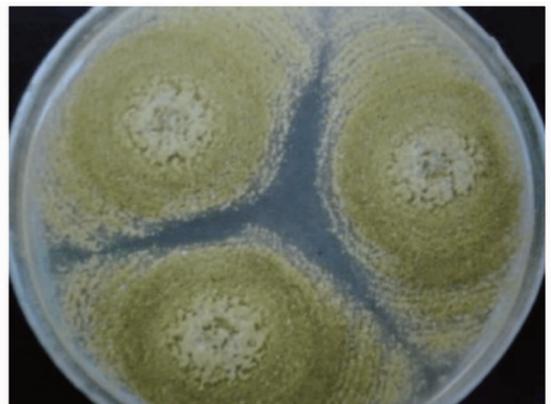


图 3 优势菌株 S2

Fig.3 The dominant strain S2

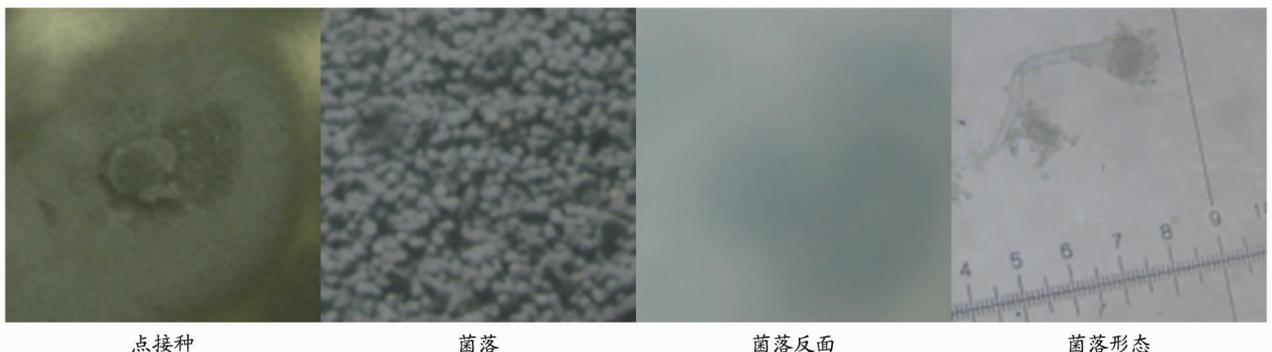


图 4 S2 形态特征

Fig.4 Morphological features of S2

2.2.2 分子鉴定。提取菌株 S2 DNA,进行凝胶电泳及 PCR 扩增得到 1 条 946 bp 的清晰条带(图 5),将此 PCR 产物测序后提交至 GenBank 中,经 BLAST 比对后发现,病原真菌的 rDNA-ITS 序列与 *Aspergillus fumigatus* (JQ268555.1) 的序列相似度高达 100%。依据比对结果构建系统进化树(图 6),表明该菌应为 *Aspergillus Caesiellus*。

再结合形态学与分子生物学鉴定,确定从茶远土中分离纯化出的菌为曲霉属烟曲霉菌 *Aspergillus fumigatus*。其属于真菌界 Mycota 真菌门 Eumycophyta 半知菌亚门 Deuteromycotina 半知菌纲 Sphaeropsidales 壳霉目 Discellaceae 杯霉科 *Aspergillus niveus* 曲霉属 *Aspergillus* 烟曲霉 *Aspergillus fumigatus*。

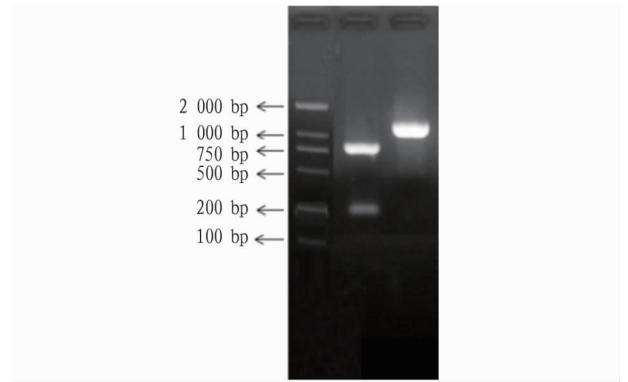


图 5 曲霉属真菌 ITS 扩增产物电泳图谱

Fig.5 Electrophoretic map of ITS amplification products of *Aspergillus* species

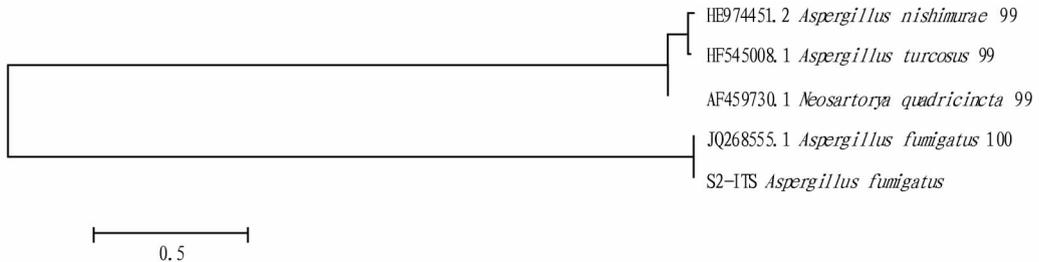


图 6 曲霉属真菌的系统发育树

Fig.6 Phylogeny tree of *Aspergillus*

3 结论与讨论

(1) 该研究取黔南州茶园优质土壤为材料,对其进行稀释,将其样品悬液涂布于培养皿培养得到多种菌种,并对菌种进行分离,再挑取菌种纯化得到优势菌株 S2。为了明确优势菌株的背景,对优势菌株 S2 的鉴定主要采用传统的生物形态学鉴定法,利用电子显微镜进行观察,初步确定该优势菌株 S2 为 *Aspergillus* 曲霉属。生物形态鉴定法鉴定品种的形态特征很有限,同时还受观察时段的影响,并且这些性状适用于某些品种间差异明显的样品鉴定,因此在实用中存在一定的局限性。为了更好地明确优势菌株的背景,再采用分子鉴定法对优势菌株 S2 进行鉴定,分子鉴定法的优点: ITS 序列的保守性大体上表现为与其种属相对一致,ITS 的种间差异较明显,能精确地反映种间及菌株间的碱基对差异; ITS 序列的片段较小,更有利于分析真菌种属之间的发育; ITS 序列分析在很大程度上弥补形态学特征分析的很多不足。结合形态鉴定和分子鉴定可确认优势菌株 S2 为曲霉属烟曲霉菌 *Aspergillus fumigatus*。

(2) 微生物是土壤的重要组成部分,在土壤中起着至关重要的作用,该研究烟曲霉参与茶树特制有机肥研发,可调节肥料的养分,提高肥料利用率,还可减缓硝酸盐的积累和重金属污染。关于用曲霉属真菌作为生物有机肥的研究很少,曲霉属真菌对于茶树有无益处还有待进一步研究。虽然在根系土壤中含有的大量曲霉目前尚未有相关的益、弊研究,可以确定的是相关曲霉可以改善土壤,今后可在曲霉方

面进一步研究。

参考文献

- [1] 张小琴,陈娟,高秀兵,等.贵州重点茶区茶园土壤 pH 值和主要养分分析[J].西南农业学报,2015,28(1):286-291.
- [2] 刘红,张清海,林绍霞,等.贵州主要茶区土壤重金属含量比较与评价[J].中国农学通报,2014,30(4):210-214.
- [3] 唐颢,唐劲驰,刘奋安,等.新型茶园专用有机肥改良土壤酸化的综合效果[J].广东农业科学,2013,40(12):57-59.
- [4] WATANABE K, SAKAI J, HAYANO K. Bacterial extracellular protease activities in field soils under different fertilizer managements[J]. Can J Microbiol, 2003, 49(5):305-312.
- [5] 蔡燕飞,廖宗文,章家恩,等.生态有机肥对番茄青枯病及土壤微生物多样性的影响[J].应用生态学报,2003,14(3):349-353.
- [6] 李磊.不同肥料处理对茶树生长和茶叶品质的影响[D].泰安:山东农业大学,2010.
- [7] 沈星荣.有机肥料对茶树生长、茶叶品质及经济效益的影响[D].北京:中国农业科学院,2014.
- [8] 王利民,李卫华,范平,等.长期培肥下红黄壤区茶园土壤酶活性的变化[J].茶叶科学,2012,32(4):347-352.
- [9] OGI L VIE L A, HIRSCH P R, JOHNSTON A W B. Bacterial diversity of the broadbalk 'classical' winter wheat experiment in relation to long-term fertilizer inputs[J]. Microb Ecol, 2008, 56(3):525-537.
- [10] WU C S. Controlled release evaluation of bacterial fertilizer using polymer composites as matrix[J]. J Control Release, 2008, 132(1):42-48.
- [11] 常单娜.我国主要绿肥种植体系中土壤可溶性有机物特性研究[D].北京:中国农业科学院,2015.
- [12] 唐颢,唐劲驰,黎健龙,等.茶树型有机肥的土壤养分及促产提质效应[J].广东农业科学,2015(23):91-95.
- [13] 张惠.典型绿茶茶园土壤养分和重金属的空间变异特性分析及肥力质量评价[D].北京:中国农业科学院,2015.
- [14] 李继福.秸秆还田供钾效果与调控土壤供钾的机制研究[D].武汉:华中农业大学,2015.
- [15] 孔樟良,谢国雄.杭州市典型茶园土壤与茶叶中重金属的积累与来源分析[J].中国农学通报,2015,31(10):226-231.
- [16] 林芳,钟灼仔,雷忠涌,等.茶园施用新型缓释复合肥效果比较试验[J].南方农业,2015,9(3):36-39.