毛木耳 958 对 4 种抗生素的敏感性研究

杜春梅[1,2],柏广波[1],董锡文[1,2],薛春梅[1,2]*

(1. 佳木斯大学生命科学学院,黑龙江佳木斯 154007;2. 佳木斯大学应用微生物研究所,黑龙江佳木斯 154007)

摘要 [目的]检测毛木耳 958 对青霉素、硫酸链霉素、制霉菌素和卡那霉素 4 种抗生素的敏感性,以寻找适合原生质体融合育种的抗性筛选标记。[方法]以毛木耳 958 为试验材料,在 PDA 培养基中加入不同浓度的抗生素,测定菌丝生长速率、菌落形态特征和锁状联合菌丝数量。[结果]适宜浓度的青霉素和硫酸链霉素对毛木耳 958 菌丝生长都有显著的促进作用,而制霉菌素和高浓度的卡那霉素对菌丝生长有明显的抑制作用;4 种抗生素对毛木耳 958 菌落形态特征影响较小;青霉素、制霉菌素和卡那霉素高于 300 μg/mL 时,毛木耳 958 锁状联合菌丝比率呈明显的下降趋势,硫酸链霉素对其无显著作用。[结论]毛木耳 958 对制霉菌素和高浓度的卡那霉素具有较强的敏感性,做筛选标记时控制好抗生素的浓度,尽量减少其对锁状联合菌丝比率的影响。

关键词 毛木耳 958;抗生素;敏感性;菌丝;锁状联合

中图分类号 S646.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)23-0033-02

Study on the Sensitivity of *Auricularia polytricha* 958 to Four Kinds of Antibiotics

DU Chun-mei[1,2], BAI Guang-bo[1], DONG Xi-wen[1,2] et al (1. College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007; 2. Institute of Applied Microbiology, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract [Objective] To study the sensitivity of *Auricularia polytricha* 958 to penicillin, streptomycin sulfate, nystatin and kanamycin, as well as to find the resistance screening markers suitable for protoplast fusion breeding. [Method] Taking *Auricularia polytricha* 958 as the material, growth rate of mycelia, morphological features of colony and clamp connection amount of mycelia were determined by adding different concentrations of four kinds of antibiotics in PDA media. [Result] Growth rate of mycelia were promoted significantly by a proper concentration of ampicillin and streptomycin sulfate. But growth rate of mycelia were inhibited significantly by nystatin and the higher concentration of kanamycin. The effects of four antibiotics on the colonial morphological characteristics of the stain were not significantly. The ratios of hyphal clamp connection of *Auricularia polytricha* 958 were decreased when the concentration of penicillin, nystatin and kanamycin were higher than 300 μg/mL. The effect of streptomycin sulphate on forming of clamp connection was not significant. [Conclusion] The sensitivities of *Auricularia polytricha* 958 to nystatin and the higher concentration of kanamycin were obvious. Thus, the concentration of antibiotics should be controlled when it was used to screening marker, and minimize the effect of the antibiotic on ratio of hyphal clamp connection.

Key words *Auricularia polytricha* 958; Antibiotics; Sensitivity; Mycelia; Clamp connection

毛木耳属于木耳目,木耳科,木耳属中的毛木耳种(*Auricularia polytricha*)[1],是世界性的重要栽培品种之一,主要生长在中国的南方和一些东南亚国家[2-3]。毛木耳含有丰富的镁元素,其抗逆性强、产量高、价格低廉,但品性差、质地硬而脆[4-5]。对毛木耳和嫩滑、味好、铁元素含量较高、商品性好的黑木耳进行原生质体融合,有可能筛选出具有双亲优良性状的木耳新种。但利用哪种筛选标记来筛选融合子是育种工作者面临的瓶颈。抗药性标记是筛选融合子的较好手段,微生物抗药性由菌种遗传物质决定,遗传上十分稳定[6]。用抗药性差异选择融合子时要把握好药物的浓度,过高或过低都会影响融合子的检出。毛木耳 958 是山东省广泛栽培的一个毛木耳品种,其出耳温度 20~36 ℃,具有极强的抗霉能力,耳片大且肉厚,总产量高,用纯玉米心种植 0.5 kg 干料可以产出干耳 90~125 g,是用于融合育种的重要备选菌种之一。鉴于此,笔者初步测定了毛木耳 958 对 4 种不同浓度梯度抗生素的敏感性,以期找到合适的遗传筛选标记,为木耳的原生质体融合育种研究提供理论依据。

基金项目 黑龙江省自然科学基金面上项目(C2017064);黑龙江省教育厅基本科研业务费基础研究项目(2016-KYYWF-0581);佳木斯大学基础研究类(自然类)面上项目(JMSUJCMS2016-065);佳木斯大学校长创新创业基金项目(XZYF2018-12)。

作者简介 杜春梅(1978—),女,黑龙江佳木斯人,讲师,硕士,从事微生物的教学与科研工作。*通讯作者,副教授,硕士,硕士生导师,从事微生物的教学与科研工作。

收稿日期 2018-04-23

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株。毛木耳 958 斜面菌种购于山东省济宁市永腾食用菌研究所。

1.1.2 培养基。PDA 培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 18 g,水 1 000 mL,pH 5.8[7]。

抗生素-PDA 培养基:在 PDA 培养基中加入不同浓度抗生素,包括青霉素-PDA 培养基,硫酸链霉素-PDA 培养基,制霉菌素-PDA 培养基和卡那霉素-PDA 培养基等。

1.1.3 试剂。青霉素(80 万单位,国药准字 H31020929,华北制药股份有限公司),硫酸链霉素(10 万单位,国药准字 H37022586,瑞阳制药有限公司),制霉菌素片(50 万单位,国药准字 H330211393,浙江震元制药有限公司),卡那霉素(20 万单位,国药准字 H37020562,齐鲁制药有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 抗生素母液的配制。将 4 种抗生素制备成 50 mg/mL 抗生素母液,用 0.45 μm 微孔滤膜进行过滤除菌后于 4 ℃冰箱储存备用。

1.2.2 培养基的制备。PDA 培养基按常规方法制备。抗生素-PDA 培养基是在 PDA 培养基中加入不同体积的抗生素母液,使其终浓度分别为 50、100、200、300、400 和 500 μg/mL。

1.2.3 菌种的活化及接种。将供试斜面菌种放入 25 ℃的培养箱中活化培养 24 h 后,用接种铲接种到 PDA 平板上进

行扩大培养 8 d。在菌落周边取直径为 0.65 cm 健壮的菌丝块,用接种铲转接到制备好的抗生素-PDA 培养基平板中央。同时用镊子夹取洁净的已灭菌的盖玻片倾斜 45°插入培养基中,盖玻片距离接种块 2 cm,每个平板插入 3 个盖玻片,置于 25 ℃培养箱中避光培养。每个变量设 6 个重复,其中 3 个重复观察菌丝体生长速率及外观特征,另外 3 个重复用于显微镜下观察,以上均以无抗生素的 PDA 培养基作空白对照。

1.3 观察及测定

1.3.1 菌丝体外观特征。每天用游标卡尺测量培养中的毛木耳 958 的菌落直径,连续测量 9 d,计算平均日长速及抑制率。菌丝平均日长速(cm/d)=(菌落直径-接种块直径)/(2×天数)。抑制率(%)=[(对照菌丝生长速率-抗生素处理菌丝生长速率)/对照菌丝生长速率]×100[8]。同时观察菌丝组织外观特征,包括萌发时间,菌丝色泽、密度、长势,菌落边缘,褐变程度,隆起状况等。

1.3.2 显微观察。待毛木耳 958 菌丝长满盖玻片,在无菌操作台内取出,置于 10×40 倍显微镜下观察记录菌丝锁状联合形成情况,计算锁状联合菌丝比率。菌丝锁状联合比率=锁状联合个数/菌丝数[9]。

1.4 数据分析

试验数据用 SPSS 17.0 进行统计分析,用 Origin 8.0 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 不同抗生素培养基对毛木耳 958 菌丝平均日长速的影响 由表 1 可知,在试验浓度范围内,青霉素对毛木耳 958 菌丝生长具有显著促进作用($P<0.05$)。随着青霉素浓度的升高,促进作用先强后弱。当青霉素浓度为 100 μg/mL 时,促进作用最强,生长速率与对照相比提高了 13.00%;浓度为 100~300 μg/mL 时,硫酸链霉素对毛木耳 958 的生长促进作用最强且无差异显著性($P>0.05$);浓度大于 300 μg/mL 时,出现了明显的抑制作用,但抑制率不超过 5%;制霉菌素对毛木耳 958 有明显的抑制作用,并且浓度越高抑制作用越强,抑制率高达 40%;浓度在 300 μg/mL 范围内,卡那霉素对毛木耳 958 的生长影响不显著,高于此浓度开始出现抑制作用,且抑制作用显著增强。

表 1 不同抗生素培养基对毛木耳 958 菌丝平均日涨速的影响

Table 1 Effects of different antibiotics on mycelia average daily growth rate of *A. polytricha* 958

抗生素浓度 Antibiotics concentration μg/mL	青霉素-PDA Penicillin-PDA		硫酸链霉素-PDA Streptomycin sulphate-PDA		制霉菌素-PDA Nystatin-PDA		卡那霉素-PDA Kanamycin-PDA	
	菌丝平均日涨速 Average daily growth rate mm/d	抑制率 Inhibition rate %	菌丝平均日涨速 Average daily growth rate mm/d	抑制率 Inhibition rate %	菌丝平均日涨速 Average daily growth rate mm/d	抑制率 Inhibition rate %	菌丝平均日涨速 Average daily growth rate mm/d	抑制率 Inhibition rate %
0	3.770±0.046 d	—	3.770±0.045 c	—	3.770±0.045 a	—	3.770±0.045 ab	—
50	3.950±0.135 c	-4.77	4.100±0.040 b	-8.75	3.490±0.037 b	7.42	3.830±0.036 ab	-1.59
100	4.260±0.021 a	-13.00	4.230±0.053 a	-12.20	3.420±0.070 bc	9.28	3.890±0.064 a	-3.18
200	4.200±0.017 ab	-11.41	4.270±0.048 a	-13.26	3.350±0.074 c	11.14	3.840±0.051 ab	-1.86
300	4.140±0.035 b	-9.81	4.250±0.071 a	-12.73	2.850±0.125 d	24.40	3.740±0.056 b	0.80
400	4.000±0.056 c	-6.10	3.820±0.031 c	-1.33	2.760±0.029 d	26.79	3.200±0.042 c	15.11
500	3.910±0.027 c	-3.71	3.630±0.069 d	3.71	2.280±0.077 e	39.52	2.360±0.170 d	37.40

注:同列数字后不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著

Note: Different lowercase letters after data in the same column indicated significant differences at 0.05 level

2.2 不同抗生素培养基对毛木耳 958 菌落形态特征的影响 在试验浓度范围内,各培养基培养的毛木耳 958 菌丝的萌发时间大多数为 48 h。含青霉素和制霉菌素的 PDA 培养基培养的菌丝体外观形态特征与对照菌株相比无显著变化,但色素产量略有增加;硫酸链霉素-PDA 培养基上菌丝体较稀疏,色素产量较对照菌株有显著增加;卡那霉素-PDA 培养基上菌丝体较稀疏,其他特征无明显区别。

2.3 不同抗生素培养基对毛木耳 958 锁状联合菌丝比率的影响 从图 1 可以看出,随着硫酸链霉素浓度的升高,毛木耳 958 锁状联合菌丝比率不显著的增加趋势($P>0.05$);青霉素、制霉菌素和卡那霉素在低浓度时,该比率略高于不加抗生素培养的对照菌株,且差异不显著。高于 300 μg/mL 时,该比率呈明显的下降趋势($P<0.05$)。

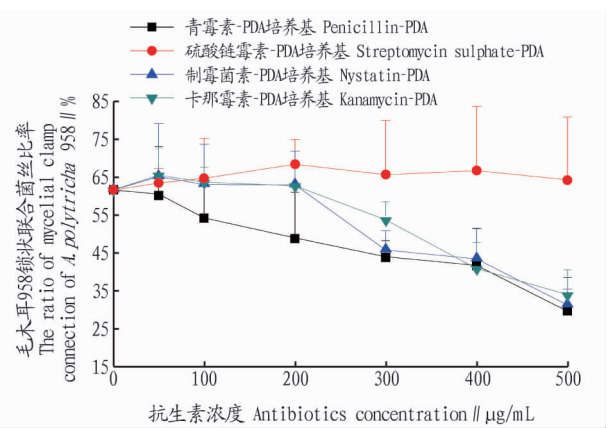

图 1 不同抗生素培养基对毛木耳 958 锁状联合菌丝比率的影响

Fig. 1 Effects of different antibiotics on the ratio of mycelial clamp connection of *A. polytricha* 958

3 结论与讨论

自从 1972 年 Devriers 等人对裂褶菌原生质体制备成功开始,原生质体融合技术已运用到食用菌研究领域[10]。原生质体融合育种遗传信息传递量大,不需详细了解双亲的遗传背景,可实现远缘杂交;该方法操作方便,适用性强,为食用菌新种的选育提供了广阔的发展前景[11]。近年来,融合

(下转第 51 页)

3　结论

该试验利用热沉积法制备石墨烯-玻璃珠复合材料,并用其开展了动态吸附磺胺嘧啶类抗生素的试验研究,得到以下结论:pH、背景液种类、进水流速以及磺胺嘧啶初始浓度的变化均会影响石墨烯复合材料吸附磺胺嘧啶的动态穿透过程,其中 pH 的提高使穿透曲线左移,耗竭时间缩短,动态吸附量减小;Ca^{2+}会提高背景溶液的离子强度,通过压缩双电层以及与污染物竞争吸附位点,减小污染物的吸附容量;提高流速,污染物更容易穿透吸附柱,吸附容量减小;提高污染物的浓度,单位时间内与吸附剂接触的污染物增多,吸附位点快速达到饱和,提高了吸附剂的饱和容量。用 Thomas 方程和 Yan 模型对试验数据进行拟合,发现模型拟合的结果与试验得到的结果非常接近,相关系数均不小于 0.97,说明 Thomas 模型和 Yan 模型可以较好地描述石墨烯复合材料对磺胺嘧啶的动态吸附过程。

参考文献

[1] 吴春来,樊静. 石墨烯材料在重金属废水吸附净化中的应用[J]. 化工进展,2013,32(11):2668-2674,2694.

[2] GRENNI P,ANCONA V,CARACCIOLO A B. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems:A review [J]. Microchemical journal,2018,136:25-39.

[3] ZHANG Q Q,YING G G,PAN C G,et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China:Source analysis,multimedia modeling,and linkage to bacterial resistance[J]. Environmental science & technology,2015,49(11):6772-6782.

[4] 祁彦洁,刘菲. 地下水中抗生素污染检测分析研究进展[J]. 岩矿测试,2014,33(1):1-11.

[5] PRIETO-RODRÍGUEZ L,OLLER I,KLAMERTH N,et al. Application of solar AOPs and ozonation for elimination of micropollutants in municipal wastewater treatment plant effluents[J]. Water research,2013,47(4):1521-1528.

[6] TAMBOSI J L,DE SENA R F,FAVIER M,et al. Removal of pharmaceutical compounds in membrane bioreactors (MBR) applying submerged membranes[J]. Desalination,2010,261(1):148-156.

[7] STASINAKIS A S. Review on the fate of emerging contaminants during sludge anaerobic digestion[J]. Bioresource technology,2012,121:432-440.

[8] XU Y G,YU W T,MA Q,et al. Interactive effects of sulfadiazine and Cu (II) on their sorption and desorption on two soils with different characteristics[J]. Chemosphere,2015,138:701-707.

[9] PERREAULT F,DE FARIA A F,ELIMELECH M. Environmental applications of graphene-based nanomaterials[J]. Chemical society reviews,2015,44(16):5861-5896.

[10] 崔智慧. 磁性氧化石墨烯负载砂子对水中 As(v)的动态吸附研究[D]. 长沙:湖南大学,2014.

[11] 李亚娟,赵传起,洪沛东,等. 磁性还原石墨烯的制备及其对抗生素的吸附性能[J]. 环境工程学报,2018,12(1):15-24.

[12] 胡奇,李玉立,潘红玉,等. 改性木屑对水中苯胺的动态吸附[J]. 环境工程学报,2016,10(9):4663-4667.

[13] CHU K H. Fixed bed sorption:Setting the record straight on the Bohart-Adams and Thomas models[J]. Journal of hazardous materials,2010,177(1/2/3):1006-1012.

[14] MAITI S K,BERA D,CHATTOPADHYAY P,et al. Determination of kinetic parameters in the biosorption of Cr (VI) on immobilized *Bacillus cereus*,M_{16}^{1} in a continuous packed bed column reactor[J]. Applied biochemistry & biotechnology,2009,159(2):488-504.

(上接第 34 页)

子筛选方法不断涌现,如利用抗药性选择融合子,马玉银等[12]采用一定浓度的 $NaNO_3$ 选择再生培养基对佛罗里达侧耳与姬菇融合后代进行筛选得到一株双亲融合菌株。王淑珍等[13]利用食用菌对潮霉素的自然抗性筛选香菇和松茸的融合子。用抗药性差异选择融合子时要控制药物的浓度,浓度过低则亲本生长过快,影响融合子的检出;浓度过高则融合频率降低[6]。该研究结果显示,一定浓度的青霉素和硫酸链霉素对毛木耳 958 菌丝生长有明显的促进作用,菌落外观特征与对照菌株相比没有发生明显的变化;在试验浓度范围内,毛木耳 958 对制霉菌素和高浓度的卡那霉素有极强的敏感性,菌丝生长受到显著抑制,这与笔者前期对黑木耳的研究结果类似[14]。锁状联合是黑木耳菌丝生长发育过程中明显的指示特征,可作为自然遗传标记。肖在勤等[15]利用双亲都具有锁状联合的双核异核菌丝体为亲本,进行凤尾菇与金针菇科间的原生质体融合,并结合融合核分裂技术筛选融合子。该研究结果显示,青霉素、制霉菌素和卡那霉素高于 300 μg/mL 时,都能显著降低锁状联合菌丝的比率。经统计学分析显示,菌丝日生长速率与锁状联合菌丝比率之间呈极显著的正相关性。由此可以得出,制霉菌素或高浓度的卡那霉素能抑制毛木耳 958 的生长速率,可考虑作为育种的抗性筛选标记,但做筛选标记时应控制好抗生素的浓度,尽量减少其对锁状联合菌丝比率的影响。

参考文献

[1] 张丹,郑有良. 毛木耳(*Auricularia polytricha*)的研究进展[J]. 西南农业学报,2004,17(5):668-673.

[2] 赵爽,布达,刘宇,等. 毛木耳菌丝体营养优势菌株的筛选研究[J]. 中国食用菌,2011,30(5):8-9.

[3] VEERALAKSHMI S,AHILA DEVI P,PRAKASAM V,et al. Molecular characterization and standardization of cultivation for wood ear mushroom [*Auricularia polytricha* (Mont.)] Sacc. [J]. International journal of biotechnology research,2014,2(5):60-64.

[4] 杨新美. 关于进一步发展我国食用菌事业的商讨[J]. 中国食用菌,1991(1):3-5.

[5] 吕文英. 黑木耳和毛木耳中无机营养元素含量的测定与研究[J]. 微量元素与健康研究,2007,24(4):30-31.

[6] 曹文芩,郭顺星,徐锦堂. 大型真菌原生质体融合技术研究进展[J]. 生物学通报,1998,33(10):2-4.

[7] 李秀霞. 生物学综合实验:下册[M]. 沈阳:东北大学出版社,2013.

[8] 张国广,黄家福,陈丽萍,等. 灵芝菌丝体对 4 种抗生素的敏感性研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(14):7701-7702,7719.

[9] 王妍,杜春梅,姜忠元,等. 不同培养基对黑木耳锁状联合菌丝比率的影响[J]. 安徽农业科学,2016,44(35):49-50.

[10] 张甜甜,张治中,张墨楠,等. 食用菌原生质体融合育种技术的研究进展(综述)[J]. 浙江食用菌,2009,17(3):29-31.

[11] 王春晖. 食用菌领域原生质体技术研究应用浅析[J]. 中国食用菌,2011,30(3):3-5.

[12] 马玉银,顾庆龙. 侧耳属种间原生质体融合杂种选育的研究[J]. 食用菌学报,1994,1(1):17-21.

[13] 王淑珍,白晨,高雁,等. 松茸与香菇原生质体融合的研究[J]. 食用菌,2003,25(2):9-10.

[14] 甄文爽,董锡文,杜春梅,等. 4 种抗生素对黑木耳黑 29 菌丝生长的影响[J]. 安徽农业科学,2017,45(33):57-59.

[15] 马玉银,李霖. 原生质体技术在食用菌遗传育种中的应用[J]. 中国野生植物资源,2000,19(6):1-4.