西瓜霜发酵菌种的分离及鉴定

匡海学，李 斌，曹 琦，苏 阳，辛 萍，杨素清*
黑龙江中医药大学 教育部共建北药基础与应用研究重点实验室，黑龙江省中药天然药物药效物质基础研究重点实验室，黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要：目的 对西瓜霜中的发酵菌种进行分离、鉴定，探讨西瓜霜发酵炮制的内涵，为西瓜霜的规范化生产和质量控制方法的建立提供依据。**方法** 模拟传统工艺生产西瓜霜的温度、湿度等条件，以西瓜为培养基，发酵制备西瓜霜，分别用 PDA、CZA 及 Sabourand 等培养基，采用平板划线法，分离、纯化西瓜霜发酵液中的微生物。采用形态学鉴定及 DNA 的 ITS 序列对比法鉴定分离出的菌种。**结果** 西瓜霜炮制发酵中共分离鉴定出 6 种真菌，分别为镰孢霉属 *Fusarium* 的 WF-1，青霉属 *Penicillium* 的 WF-2，毛霉属 *Mucor* 的 WF-3，交链孢霉属 *Alternaria* 的 WF-4、WF-5、WF-6。**结论** 西瓜霜的制备是以西瓜为培养基，在特定的环境条件，尤其是高盐条件下，通过耐高盐自然真菌发酵炮制而成，而不是传统上认为的渗析制成的芒硝的细小结晶。

关键词：西瓜霜；发酵；菌株分离；菌株鉴定；镰孢霉属；青霉属；毛霉属；交链孢霉属
中图分类号：R282.1 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2014)19 - 2834 - 05
DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.19.020

Isolation and identification of bacteria in fermentation broth of *Mirabilitum Praeparatum*

KUANG Hai-xue, LI Bin, CAO Qi, SU Yang, XIN Ping, YANG Su-qing
Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Ministry of Education Key Laboratory of TCM Pharmacodynamic Material Bases, Harbin 150040, China

Abstract: Objective In order to provide the standardization of production and quality control method of *Mirabilitum Praeparatum*, the fungi from fermentation broth of *Mirabilitum Praeparatum* were isolated and identificated, and the fermentation and processing of *Mirabilitum Praeparatum* were investigated. **Methods** The traditional fermentation conditions of *Mirabilitum Praeparatum* such as temperature and humidity were imitated, using watermelon as culture media. Separation and purification of fungi in fermentation broth of *Mirabilitum Praeparatum* were carried out on PDA, CZA, and Sabourand media, using plate streaking method. The fungi isolated from fermentation broth of *Mirabilitum Praeparatum* were identified by morphological observation, microstructure observation, and comparison on DNA ITS sequences. **Results** Six fungi were isolated from the fermentation broth of *Mirabilitum Praeparatum* and identified as WF-1 (*Fusarium*); WF-2 (*Penicillium*), WF-3 (*Mucor*); WF-4, WF-5, and WF-6 (*Alternaria*). **Conclusion** *Mirabilitum Praeparatum* is produced by salt-tolerant fungi in fermentation broth of watermelon, rather than the traditional view that it is the small crystallization seeping from the watermelon.

Key words: *Mirabilitum Praeparatum*; fermentation; isolation of fungi; identificated of fungi; *Fusarium*; *Penicillium*; *Mucor*; *Alternaria*

西瓜霜 *Mirabilitum Praeparatum* 又名西瓜硝、西瓜白霜，为葫芦科植物西瓜 *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsumu. et Nakai 的成熟新鲜果实与芒硝 *Natrii Sulfas* 经炮制加工制成。西瓜霜性味咸、寒，归肺、胃、大肠经，具有清热泻火、消肿止痛的功效；用于咽喉肿痛、口舌热疮、牙疳等。

一直以来，人们认为西瓜霜为西瓜中析出的细小的芒硝结晶，并将其归属为炮制分类的制霜法。

收稿日期：2014-02-28
基金项目：国家自然科学基金资助项目（81073049）；黑龙江省留学归国科学基金项目《基于传统炮制（发酵）工艺的西瓜霜有效成分研究》（1）（LC2012C15）；黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”科研项目《西瓜霜炮制原理及基于微生物次生代谢产物的药效物质基础》（2012RCD05）；中国博士后科学基金项目《基于微生物次生代谢产物的西瓜霜炮制原理研究》（1）（20110491126）
作者简介：匡海学（1955—），男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事中药性味理论研究、中药及复方药效物质基础及其作用机制研究。Tel: (0451)82193001 E-mail: hxkuang56@163.com
***通信作者** 杨素清（1964—），女，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事中医药防治疑难性皮肤病研究。Tel: 13304817266 E-mail: ysq_6410@163.com

但根据观察，传统西瓜霜制备中，西瓜与芒硝混合后，第 2、3 天即开始出现西瓜酸败及真菌生长的现象，西瓜霜的加工生产时间长达月余，而收集的粉霜中除芒硝结晶外，更有大量的菌丝。由此推断耐高盐菌株以西瓜为培养基进行发酵应当是炮制制备西瓜霜的内涵实质，而发酵产物应为西瓜霜发挥药效作用的物质基础。本课题组前期进行西瓜霜抗菌有效物质的化学研究，本研究继续对西瓜霜传统制备工艺中的发酵微生物进行分离、鉴定。

1 材料

1.1 原料

自制西瓜霜发酵液[1]。将带皮西瓜与芒硝按照质量比 100∶15，放入不带釉瓦罐（购自哈尔滨陶瓷公司）内，一层西瓜一层芒硝，在秋季放置于通风阴凉处，发酵 15～45 d。

1.2 培养基

自制 PDA 培养基[2]、CZA 培养基[3]、Sabourand 培养基。

2 方法

2.1 发酵菌的分离纯化

取不同天数的发酵液 10 mL，制成 0.1 倍稀释液[4]。然后连续稀释制成 10^{-2}～10^{-9} 倍浓度的稀释菌液备用。取 0.2 mL 各浓度的稀释液，采用常规平板涂抹法，将各梯度的稀释液涂布在 4 种分离培养基 PDA、CZA、Sabourand 和牛肉膏蛋白胨上，28 ℃恒温培养。菌落出现后，根据菌落形态、颜色的差异以及出现时间的不同，再分别接于新的平板上进行分离培养，并逐步纯化。

2.2 西瓜霜发酵真菌的形态学鉴定

2.2.1 菌落形态观察 用接种针从斜面上蘸取极少量孢子，接种于 PDA 培养基平板中心，培养观察菌落形态与生长情况。

2.2.2 显微结构观察 盖玻片经 160 ℃干热灭菌 2 h 后，以倾角 40°插入已倒好的 PDA 平板中，每皿插 5 片。将待观察真菌接种于盖玻片与培养基交界处，使其菌丝在生长过程中能够附着在盖玻片上，每日取盖玻片，经乳酸-棉兰染液染色，显微镜观察真菌结构。

2.3 分子鉴定

2.3.1 发酵真菌基因组 DNA 的提取 将菌体接入 PDA 液体培养基中，摇床培养，滤过清洗得菌体；将菌体放入研钵加液氮研磨；置离心管中，加缓冲液，混匀离心，取上清液加等体积酚-氯仿，混匀，取上清液；DNA 提取缓冲液加等体积氯仿，混匀离心，取上清液；加 2 倍体积冰乙醇，−20 ℃过夜；离心，去上清液，加 70%乙醇，离心；去上清液，挥干，加入 50 μL 1×TAE 溶解沉淀，为 DNA 模板。置−20 ℃保存备用[5]。

2.3.2 发酵真菌基因组 DNA 的检测 取少量 DNA 模板，采用分光光度法测定吸光度值 A_{260}/A_{280}，检测 DNA 模板纯度，并计算 DNA 浓度。采用 1×TAE 作为电泳缓冲液，0.8%琼脂糖凝胶电泳检测真菌基因组 DNA 模板。加样量为 6 μL，电场强度为 5 V/cm，电泳时间 1.5 h。紫外灯检测真菌基因组 DNA 提取结果[6]。

2.3.3 发酵菌 ITS 序列的扩增 采用真菌鉴定通用引物 V9D 与 LS266，对真菌进行 ITS 序列扩增，50 μL 反应体系：模板 DNA 1 μL，5 U/μL TaqDNA 聚合酶 0.35 μL，10×PCR 缓冲液 7 μL，2.5 mmol/L dNTP 4 μL，10 μmol/L 引物 V9D 2 μL，10 μmol/L 引物 LS266 2 μL，灭菌去离子水 33.65 μL。

循环参数：94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环，最后 72 ℃延伸 10 min。反应结束后，取扩增产物 5 μL，经 0.8%琼脂糖凝胶电泳，鉴定目的条带与预期大小是否相符。

2.3.4 PCR 扩增产物的序列测定与数据处理 将 PCR 扩增产物测序。将测序结果与 Genbank 中已知序列进行比较分析，从 Genbank 数据库中获得相关种属的 ITS 序列信息，应用 DNAStar100 软件进行多序列比对，并计算结果。

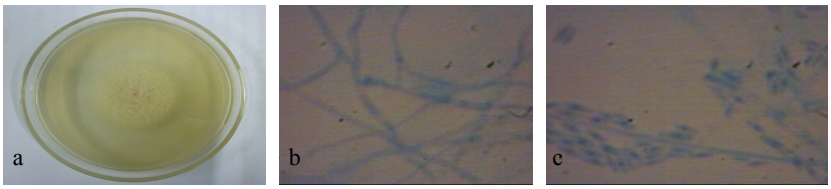
3 结果与分析

3.1 西瓜霜发酵菌种的分离

从 15～45 d 的发酵菌液中均分离得到以下 6 种真菌（图 1～6）。

菌 WF-1 在 PDA 培养基中生长迅速，菌落圆形，边缘整齐，菌落中部淡橙色，边缘白色，质地疏松，气生菌丝不发达，绒毛状。显微观察分生孢子梗分枝不规则，成群分布，孢子单生，无色，多细胞，长圆形，微弯曲（图 1）。根据镰霉孢属的特征，初步鉴定菌 WF-1 为镰孢霉属 *Fusarium*。

菌 WF-2 在 PDA 养基中，菌落圆形，绿色，边缘白色，中部有较大的疣状突起，菌落周围培养基显棕红色环，背面浅棕色。显微观察分生孢子梗单生，顶端生排列成帚状的间枝，分生孢子串呈不分枝的链状，单个孢子球形，光滑（图 2）。根据青霉属的特征，初步鉴定菌 WF-2 为青霉属 *Penicillium*。



a-菌种在 PDA 中培养基中的菌落形态　b-菌丝形态　c-分生孢，下同

a-colony morphology in PDA medium　b-mycelial morphology　c-conidia　same as below

图 1　WF-1 菌落形态和显微结构

Fig. 1　Colony morphology and microstructure of WF-1

图 2　WF-2 菌落形态和显微结构

Fig. 2　Colony morphology and microstructure of WF-2

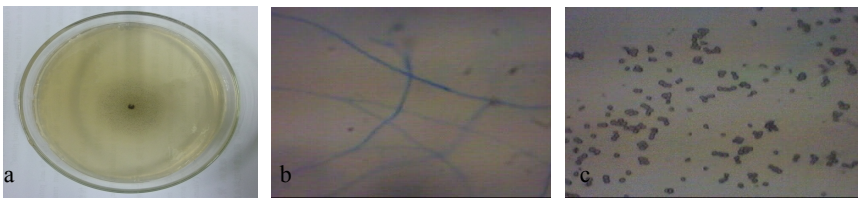


图 3　WF-3 菌落形态和显微结构

Fig. 3　Colony morphology and microstructure of WF-3

图 4　WF-4 菌落形态和显微结构

Fig. 4　Colony morphology and microstructure of WF-4

图 5　WF-5 菌落形态和显微结构

Fig. 5　Colony morphology and microstructure of WF-5

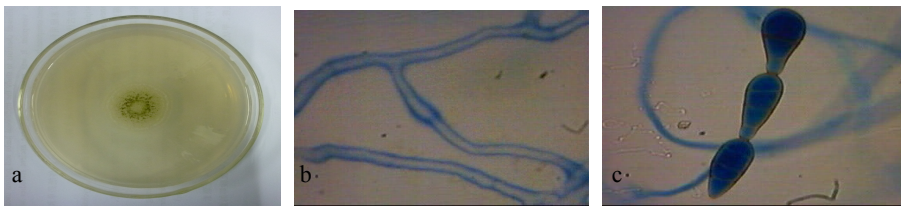


图 6　WF-6 菌落形态和显微结构

Fig. 6　Colony morphology and microstructure of WF-6

菌 WF-3 在 PDA 养基中生长迅速，菌落圆形，黑色，绒毛状，气生菌丝不发达。显微观察孢囊梗单轴状分枝，分枝不规则；孢子囊球形，壁易破裂；单个孢子球形，黄色。厚垣孢子在菌丝和孢囊梗中大量形成，无色乃至黄色（图 3）。根据毛霉属的特征，初步鉴定菌 WF-3 为毛霉属 *Mucor*[4]。

菌 WF-4 在 PDA 培养基上菌落蔓延迅速，菌落圆形，初为白色，后变成鲜黄色直至黑色，背面中央略带黄褐色。显微观察分生孢子梗分枝，淡榄褐色，分生孢子单生，形成的孢子链，褐色，倒棒形或卵形，表面光滑，横隔明显，并且 1～2 个隔膜增厚，有喙（图 4）。根据交链孢霉属的特征，初步鉴定菌 WF-4 为交链孢霉属 *Alternaria*。

菌 WF-5 在 PDA 养基中生长迅速，菌落等径生长，圆形，墨绿色，边缘整齐，呈白色，偶见由分泌物形成的透明液滴。显微观察分生孢子梗直立，分枝，分生孢子单生，倒棒形，链状排列，分隔明显且无规律，喙较长，约占孢子总长度的一半（图 5）。根据交链孢霉属的特征，初步鉴定菌 WF-5 为交链孢霉属 *Alternaria*。

菌 WF-6 在 PDA 养基中生长迅速，菌落圆形，初期白色，渐变为黄绿色，菌落外圈有两个同心环，气生菌丝色淡，白色。显微观察菌丝有疣状突起，2 天即可产生分生孢子，分生孢子卵形或倒棒形，表面平滑，形成不分枝的长链，具横隔，有喙[7]（图 6）。根据交链孢霉属的特征，初步鉴定菌 WF-6 为交链孢霉属 *Alternaria*。

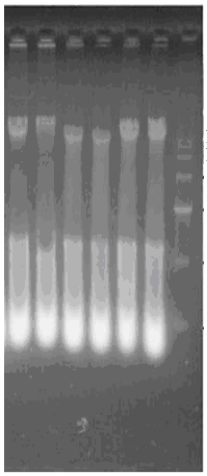
3.2 内生真菌基因组 DNA 提取结果

所提取基因组 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值均介于 1.8～2.0，非特异性 RNA 杂质导致部分比值偏高，并不影响 ITS 序列的 PCR 扩增。由图 7 可以看出，各真菌 DNA 模板均有一清晰条带，且均无拖尾现象，证明所得基因组 DNA 完整，符合进行下一步 PCR 扩增条件。

3.3 发酵真菌 ITS 序列 PCR 扩增结果

由图 8 可见，西瓜霜发酵真菌 ITS 序列的 PCR 扩增产物在约 1 000 bp 的位置有清晰条带，相对分子质量大小范围与文献报道[8]一致，无其他杂质，证明 PCR 产物为预期产物。

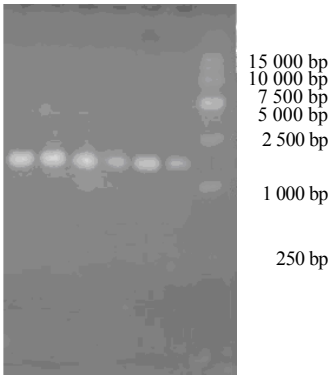
PCR 测定结果显示，各菌种 ITS 扩增片段长度在 516～609 bp，整个序列包括部分 18 S 序列，全部 ITS1、5.8 S、ITS2 序列，以及部分 28 S 序列。将所得序列提交至美国国立生物技术信息中心



1-WF-1 2-WF-2 3-WF-3 4-WF-4 5-WF-5 6-WF-6 M-Marker

图 7 内生真菌基因组 DNA 电泳图谱

Fig. 7 Electrophoretogram of genomic DNA extracted from endophytic fungi



1-WF-1 2-WF-2 3-WF-3 4-WF-4 5-WF-5 6-WF-6 M-Marker

图 8 PCR 电泳结果

Fig. 8 Electrophoretogram of PCR

（NCBI）网页，通过 Blast 搜索相关序列，选取相似性高（一般要求大于 98%，个别种大于 95%）且种属地位明确的序列，应用 DNAStar100 进行多序列比对，并计算结果。结果显示，所有待鉴定菌株不同种，其中 WF-1、3、5、6 分别与其参考株聚为一簇，即与其参考株同属。所以 WF-2、WF-4 通过形态和显微结构分别鉴定为青霉属、交链孢霉属；通过进一步的分子鉴定得出 WF-1 为镰孢霉属；WF-3 为毛霉属；WF-5、WF-6 鉴定为交链孢霉属。

4 讨论

本研究共从西瓜霜的发酵液中分离出 6 株菌株，均为真菌，其颜色呈现白、黄、绿、灰，与西瓜霜在自然情况下传统炮制中呈现的颜色是一致

的，说明西瓜霜的炮制加工过程确实有微生物的发酵过程，微生物发酵应当为西瓜霜炮制加工的内涵实质。

在本课题组的前期研究中，笔者对西瓜霜提取物的抗菌活性进行了研究，发现其提取物对口腔致病菌、常见致病菌具有较强的抑菌、杀菌活性，抑菌作用应当为其发挥药效作用的主要机制。但对有效发酵菌种的确定，还需要进行纯种或混合菌种发酵，并结合发酵产物的抗菌活性来予以确定。

本研究揭示出西瓜霜的炮制过程为发酵过程，可为对西瓜霜药效物质基础的研究提供新的思路，即基于微生物代谢产物的药效物质基础的崭新认识，区别于以往认为的仅仅是芒硝的细小结晶和少量的氨基酸[9]等物质基础的认识，将为西瓜霜规范化的炮制生产、质量控制提供依据。

本研究选择通用的 PDA 培养基，选择适合青霉、曲霉的 CZA 培养基及适合真菌生长的 Sabourand 培养基进行菌种的分离。结果发现，所分离的真菌均可在 PDA 培养基中正常培养，形态、颜色与其他培养基培养的结果相同，简单、易得的 PDA 培养基可用于西瓜霜菌种分离鉴定。

参考文献

[1] 龚千峰. 中药炮制学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012.

[2] 张文娟, 王 贞, 魏少鹏. NYS-4 菌株发酵液抑菌活性成分的分离及初步结构鉴定 [J]. 农药学学报, 2012, 14(4): 372.

[3] 冉淦侨, 王 楠, 戴佳锟, 等. 枯草芽孢杆菌 BS24 在苹果叶面的定殖及其对叶面菌群的影响 [J]. 生物技术通报, 2013, 10(10): 131-136.

[4] 王 鸿, 倪建良, 曹小吉, 等. 海洋毛霉属真菌 *Mucor* sp. MNP801 转化天然香豆素后的挥发性成分研究 [J]. 中国海洋药物, 2010, 29(5): 10-13.

[5] 冯广达, 陈美标, 羊宋贞, 等. 用于 PCR 扩增的细菌 DNA 提取方法比较 [J]. 华南农业大学学报, 2013, 34(3): 165-168.

[6] 谢丽源, 张 勇, 邓科君. 基于 rDNA ITS 序列分析的桑黄真菌菌株分子鉴定 [J]. 食品科学, 2010, 31(9): 182-184.

[7] 朱富春. 食用菌链孢霉的发生特点, 原因与综合防治方法 [J]. 食药用菌, 2013, 21(20): 126-128.

[8] 王国芬, 彭 军, 代 鹏. 香蕉枯萎病镰刀菌 ITS 序列的 PCR 扩增及其分子检测 [J]. 华南热带农业大学学报, 2007, 13(3): 2-3.

[9] 邹节明, 李 昆, 祝长青. 西瓜霜化学成分分析 [J]. 中成药研究, 1988(6): 30-31.