

专栏 深海资源

DOI:10.14188/j.ajsh.20260036

深海高抗菌活性真菌的分离筛选及优势菌株的初步鉴定

刘群娣^{1,2}, 陶韦新¹, 朱冬青¹, 洪葵^{1*}

(1. 武汉大学 药学院, 湖北 武汉 430072;

2. 广东江门中医药职业学院南药学院, 广东 江门 529000)

摘要: 微生物耐药性已成为全球公共卫生领域的重大挑战, 极端生境真菌是挖掘新型抗菌先导化合物的核心潜力资源。本研究旨在建立并验证一套“形态排重-抗菌活性双法复筛-HPLC 化学多样性评估”的3级逐级筛选策略, 并将其应用于深海可培养真菌的系统性挖掘。采用梯度稀释涂布法结合4种选择性培养基, 从30份深海沉积物样品中分离获得138株独立纯培养菌株; 建立固液双路发酵策略制备代谢粗提物, 以3种临床常见病原菌为指示菌, 通过平板打孔法初筛与96孔板-酶标仪法复筛完成抗菌活性评价, 结合HPLC化学多样性分析获得目标菌株WHU10116, 并对其开展形态学显微鉴别与ITS rDNA分子系统发育鉴定。结果显示, 138株菌株对大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、白念珠菌(*Candida albicans*)的抗菌活性阳性率分别为96.4%、58.0%、16.7%; 基于ITS rDNA序列的最大似然法系统发育分析将菌株WHU10116置于曲霉属曲霉组内, 与谢瓦曲霉(*A. chevalieri*)、中间曲霉(*A. intermedius*)及肋状曲霉(*A. costiformis*)共同构成一个分支(bootstrap=96%), 其中WHU10116与谢瓦曲霉在该分支内相邻聚类, 亲缘关系最近; 但其种级水平的准确鉴定仍需多基因系统发育分析的进一步验证。目标菌株WHU10116兼具特殊生境来源、广谱抗菌活性与丰富代谢特征, 是后续代谢产物分离鉴定与基因组挖掘的优先候选株。本研究为深海来源可培养真菌的药源挖掘提供了方法学参考。

关键词: 真菌分离; 抗菌活性; 曲霉属曲霉组; 内转录间隔区核糖体DNA; 代谢产物多样性; 高效液相色谱

中图分类号: Q939.5

文献标志码: A

文章编号: 2096-3491(2026)04-0352-09

Isolation and screening of deep-sea fungi with high antimicrobial activity and its dominant strain preliminary identification

LIU Qundi^{1,2}, TAO Weixin¹, ZHU Dongqing¹, HONG Kui^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei, China;

2. School of Southern Medicinal Resources, Guangdong Jiangmen Chinese Medicine College, Jiangmen 529000, Guangdong, China)

Abstract: Microbial drug resistance poses a critical global public health challenge, and fungi in extreme habitats are core potential resources for exploring new antimicrobial lead compounds. This study aimed to establish and validate a three-level stepwise screening strategy including morphological de-replication, dual-method antimicrobial activity re-screening, and HPLC chemical diversity assessment, and to apply it to the systematic exploration of deep-sea culturable fungi. A total of 138 independent pure culture strains were isolated from 30 deep-sea sediment samples using gradient dilution plating combined with four selective media. Crude extracts were prepared via dual solid-liquid fermentation. Antimicrobial activity evaluation of crude extracts was completed through preliminary screening by plate punch method and re-screening by 96-well plate-microplate reader. Further HPLC chemical diversity analysis was used to screen the candidate strain. The

收稿日期: 2026-07-03 修回日期: 2026-08-12 接受日期: 2026-08-24

作者简介: 刘群娣(1985-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事药理学教学工作, E-mail: ph04lqd@alumni.sysu.edu.cn

* 通信作者: 洪葵(1966-), 女, 博士, 教授, 研究方向为海洋新药创制, E-mail: kuihong31@whu.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划(2024YFC2815900)

引用格式: 刘群娣, 陶韦新, 朱冬青, 等. 深海高抗菌活性真菌的分离筛选及优势菌株的初步鉴定[J]. 生物资源, 2026, 48(4): 352-360.

Liu Q D, Tao W X, Zhu D Q, et al. Isolation and screening of deep-sea fungi with high antimicrobial activity and its dominant strain preliminary identification [J]. Biotic Resources, 2026, 48(4): 352-360.

candidate strain WHU10116 was selected and subjected to morphological microscopy and ITS rDNA phylogenetic identification. Results showed that the positive rates of antimicrobial activity of 138 strains against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans* were 96.4%, 58.0%, and 16.7%, respectively. ITS rDNA phylogenetic analysis (maximum likelihood) placed strain WHU10116 within *Aspergillus* section *Aspergillus*, forming a clade with *A. chevalieri*, *A. intermedius*, and *A. costiformis* (bootstrap=96%), within which WHU10116 is most closely related to *A. chevalieri*; however, its species-level assignment still requires multi-gene phylogenetic analysis. The strain WHU10116, with a unique habitat origin, broad-spectrum antimicrobial activity, and abundant metabolic characteristics, is a priority candidate for subsequent metabolite isolation, identification, and genome mining. This study provides a methodological reference for the pharmaceutical exploration of deep-sea culturable fungi.

Key words: fungal isolation; antimicrobial activity; *Aspergillus* section *Aspergillus*; ITS rDNA; metabolite diversity; HPLC

0 引言

抗微生物药物耐药性(antimicrobial resistance, AMR)已被世界卫生组织列为21世纪全球公共卫生领域最严峻的安全威胁之一,耐药病原菌的广泛传播极大地削弱了传统抗感染药物的治疗效果,严重制约现代临床医学发展^[1]。全球耐药负担数据显示,2019年全球细菌耐药相关死亡超495万,其中大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌等常见临床耐药菌是主要致死诱因,致死规模已远超获得性免疫缺陷综合征与疟疾^[2]。随着耐药菌株不断变异扩散,多重耐药、泛耐药病原菌感染频发,新型抗菌药物匮乏的问题日益凸显,形成严峻的临床治疗困境^[3]。

当前新型抗菌药物研发面临显著瓶颈,传统陆生微生物资源经数十年大规模筛选,活性产物重复发现率高,全新骨架先导化合物的挖掘难度持续加大^[4]。极端生境微生物因长期适应低温、寡营养、高渗透压等胁迫环境,进化出独特的次级代谢调控机制,基因组中富集大量沉默生物合成基因簇(biosynthetic gene clusters, BGCs),是新型天然抗菌产物的核心资源宝库^[5-6]。其中,海洋真菌已逐渐被证实为连接天然产物发现与抗菌药物研发的重要纽带^[7-8],极端生境中分离的海洋真菌可合成结构新颖、活性优异的抗菌代谢物^[9-10]。

本研究以深海沉积物可培养真菌为对象,构建并验证“形态排重-抗菌活性双法复筛-HPLC化学多样性评估”的逐级集成筛选策略,从大量可培养真菌中高效锁定兼具活性广度与化学新颖性的优质药源菌株;并进一步比较固体与液体双路发酵对抗菌活性代谢产物检出的互补性。本研究通过整合多培养基分离、固液双路发酵、针对革兰氏阴性/阳性菌及真菌的指示菌抗菌筛选,以及HPLC化学多样性评价,成功建立了3级逐级筛选体系,并以候选菌株WHU10116的分离鉴定与多维度表征作为该策略

的示范性产出,为深海药源真菌的高效挖掘与新型天然抗菌药物研发提供了方法学参考与菌种资源。

1 材料与方法

1.1 样品来源与采集

实验样品来自西太平洋深海平原沉积环境9个采样点(D15、D16、D24、D31、D34、D红、MPCW、Q75、U-3),采样深度介于4 862~5 966 m之间,采样时间为2019年6月。样品为柱状取样器所取的沉积物柱体深层样本,9个采样点共采集30个子样本(表1)。

1.2 培养基

选用4种真菌分离培养基。各培养基灭菌(115℃, 30 min)冷却至50℃~60℃后,加入氯霉素和硫酸链霉素(终浓度均为100 μg/mL),混匀后制备平板。

GPY培养基:葡萄糖20 g,蛋白胨10 g,酵母浸粉10 g,海盐15 g,琼脂20 g,双蒸水1 L, pH 7.5。

PDA培养基:马铃薯葡萄糖水25 g,海盐15 g,琼脂20 g,双蒸水1 L, pH 6.0。

Martin培养基:葡萄糖10 g,蛋白胨5 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄ 0.5 g,孟加拉红0.03 g,海盐15 g,琼脂20 g,双蒸水1 L。

MEA培养基:麦芽浸粉20 g,蛋白胨3 g,海盐15 g,琼脂20 g,双蒸水1 L。

1.3 试剂与仪器

本研究所用的主要试剂如下。硫酸链霉素(货号为S8290,北京索莱宝科技有限公司),氯霉素(货号为SC9060,北京索莱宝科技有限公司),硫酸卡那霉素(货号为A600286,上海生工生物工程技术有限公司),氟康唑(货号为S17039,上海源叶生物科技有限公司),乳酸石炭酸棉蓝染液(货号为SJ1074,武汉卡诺斯科技有限公司),乙腈(货号为A104440,上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

表 1 深海沉积物样本信息
Table 1 The information of deep-sea sediment samples

序号	采样点编号	经度	纬度	采样深度/m	存储条件/℃	子样本
1	D15	127°47.32'E	18°10.79'N	5 088	—80	D15-1-1A,D15-1-1B,D15-1-2A, D15-1-2B,D15-1-6A,D15-1-6B
2	D16	129°34.15'E	16°52.69'N	5 298	—80	D16-3A,D16-3B
3	D24	131°20.98'E	15°34.63'N	5 741	—80	D24-4-4A,D24-4-4B
4	D31	132°37.47'E	12°42.30'N	5 966	—80	D31-2A,D31-2B,D31-3A,D31-3B, D31-4B,D31-5B
5	D34	133°13.59'E	12°41.92'N	5 737	—80	D34-4-1A,D34-4-1B,D34-4-7A, D34-4-7B,D34-4-8A,D34-4-8B
6	D红	133°41.24'E	12°41.57'N	5 468	—80	D红-4A
7	MPCW	122°26.65'E	22°05.08'N	4 862	—80	MPCWA,MPCWB
8	Q75	124°13.72'E	20°46.93'N	5 688	—80	Q75-5A,Q75-5B,Q75-7A
9	U-3	126°00.55'E	19°28.78'N	5 407	—80	U3-A,U3-B

本研究所用的主要仪器如下。光学显微镜(型号为Axio Scope. A1,德国卡尔蔡司股份公司)、96孔板(型号为costar 3599,美国康宁公司)、色谱柱(型号为Venusil MP C18,天津博纳艾杰尔科技有限公司)、高效液相色谱仪(型号为LC-20AT,日本岛津公司)、酶标仪(型号为M200PRO,瑞士帝肯公司)。

1.4 真菌的分离纯化、发酵培养与代谢产物提取

采用稀释涂布平板法对土壤样品进行真菌分离:称取1 g样品于含9 mL无菌3%人工海水的试管内,涡旋振荡混匀,30℃水浴振荡50 min,65℃水浴15 min,依次梯度稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 。每梯度取100 μL涂布于各培养基平板(3个重复),28℃培养,定期观察并挑取形态各异的单菌落,在Martin培养基上进行划线纯化。根据菌落颜色、质地、大小等形态特征进行初步排重,甘油冻存(−40℃)。最终获得138株形态互异的培养真菌。

(1)固体发酵:采用3点接种法将活化菌株接种至90 mm PDA平板,28℃静止倒置培养7 d。

(2)液体发酵:将菌株接种至15 mL PDA液体培养基,28℃摇床(220 r/min)培养7 d。

(3)代谢产物提取:固体发酵产物切碎后加入2倍体积甲醇浸泡过夜,液体发酵产物直接加入2倍体积甲醇;超声提取30 min,取上清液4℃保存,用于后续抗菌活性检测。

1.5 抗菌活性检测

选用3种标准指示菌:白念珠菌(*Candida albicans*,CCTCCAY 206001,氟康唑敏感标准株)、大肠

埃希菌(*Escherichia coli*,CCTCCAB 93154,卡那霉素敏感标准株)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,CCTCCAB 91093,对苯唑西林/甲氧西林敏感表型,对卡那霉素敏感),均为中国典型培养物保藏中心(CCTCC)保藏的标准参考菌株。

分别取菌株液体发酵、固体发酵的粗提液,用0.22 μm滤膜过滤后制得样品液。阳性对照:白念珠菌,以氟康唑为阳性对照药物;金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌,以卡那霉素为阳性对照药物。溶剂对照:采用甲醇-无菌水(体积比2:1)混合溶液作为溶剂空白对照。

初筛采用平板抑菌圈法:将活化后的指示菌制备成浓度约为 1×10^6 CFU/mL的菌悬液,分别取100 μL均匀涂布于对应固体培养基表面(细菌采用LB琼脂培养基,真菌采用YPD琼脂培养基)。使用打孔器在含菌平板上均匀打孔,每孔加入70 μL菌株发酵粗提液,置于恒温培养箱中倒置培养(细菌于37℃培养12~16 h,真菌于28℃培养17~24 h)。

复筛采用96孔板-酶标仪法:取100 μL菌株发酵粗提液加入96孔板中,室温下吹干溶剂后,每孔加入4 μL二甲基亚砷复溶样品,再加入96 μL对应液体培养基(细菌采用LB培养基,真菌采用YPD培养基),充分混匀后加入100 μL浓度约为 1×10^6 CFU/mL的指示菌悬液。每个待测样品设置3次平行重复,同步设置无菌培养基空白对照、仅加菌液的阴性对照及标准抗生素阳性对照。细菌于37℃、真菌于28℃培养12~16 h,采用酶标仪于570 nm波长处测定各孔吸光度值。

抗菌活性按半定量分级,以阳性药物为标准,按样品吸光度相当于阳性药物在4、8、16、32、64 μg/mL时吸光度对应的抑制强度判定抗菌活性,并由弱到强记为+、++、+++、++++、+++++。

1.6 HPLC 化学多样性筛选

为检测含共轭体系的次级代谢产物,评估活性菌株次级代谢产物的丰富度,对初筛、复筛抗菌活性阳性的发酵粗提物进行HPLC-DAD分析。样品经甲醇稀释、0.22 μm滤膜过滤后上样。色谱条件:流动相A为超纯水,B为乙腈;DAD检测器全波长扫描(190~800 nm);进样量10 μL;流速1.0 mL/min。梯度洗脱:0 min,90%A/10%B;30 min,0%A/100%B;35 min,0%A/100%B;36 min,90%A/10%B;40 min,90%A/10%B。

1.7 形态学与分子鉴定

形态学鉴定:采用三点接种法观察菌落形态(PDA平板,28℃),记录菌落颜色、质地、纹理等;采用插片培养法制备显微样本,乳酸石炭酸棉蓝染色后光学显微镜观察分生孢子梗和分生孢子形态。

分子鉴定:提取基因组DNA,ITS1/ITS4引物PCR扩增,产物测序后在NCBI GenBank进行BLASTn比对。采用MEGA 11软件基于最大似然法(maximum likelihood)构建系统发育进化树,bootstrap重复次数为500次。

1.8 数据统计与分析

所有数据采用Python 3.9进行统计与可视化。

2 结 果

2.1 深海真菌分离

本研究从9个采样点共分离获得138株形态互异的药源真菌(表2)。各采样点分离菌株数差异较大,D31(30株)分离获得最多,其次是D15、Q75(各26株),D16(3株)最少。培养基分离效率方面,GPY培养基分离菌株数最多(42株),其次为PDA(37株)和Martin(32株),MEA最少(27株)。稀释梯度方面,10⁻²稀释度获得菌株最多(59株),10⁻³次之(41株),10⁻¹最少(38株)。

2.2 深海真菌发酵提取物抗菌活性评价

平板抑菌圈法抗菌活性初筛结果表明,所分离的深海真菌发酵提取物对大肠埃希菌的抗菌活性最为突出,液体发酵阳性率达92.0%(127/138),合并两种发酵方式总阳性率达96.4%(133/138)。对金黄色葡萄球菌的抗菌活性次之,液体发酵阳性率为18.8%,固体发酵阳性率为43.5%,合并阳性率达58.0%。对白念珠菌的抗菌活性最低,液体发酵仅

表2 真菌分离概况
Table 2 Overview of fungal isolation

分类	项目	分离菌株数/株	占比/%
采样点	D31	30	21.7
	D15	26	18.8
	Q75	26	18.8
	D34	17	12.3
	U-3	13	9.4
	D24	12	8.7
	MPCW	7	5.1
	D红	4	2.9
	D16	3	2.2
培养基	GPY	42	30.4
	PDA	37	26.8
	Martin	32	23.2
	MEA	27	19.6
稀释梯度	10 ⁻²	59	42.8
	10 ⁻³	41	29.7
	10 ⁻¹	38	27.5
合计	—	138	100.0

5株阳性(3.6%),固体发酵20株阳性(14.5%),合并阳性率为16.7%,如图1所示。固体发酵对白念珠菌和金黄色葡萄球菌的抗菌阳性率显著高于液体发酵(Wilcoxon检验, $P<0.001$),而液体发酵对大肠埃希菌的抗菌阳性率显著强于固体发酵(Wilcoxon检验, $P<0.001$),如图2所示,比较结果进一步验证了两种发酵方式在抗菌活性代谢产物生产上的互补性。

2.3 目标菌株的筛选

本研究采用3级筛选策略,从138株纯培养真菌中逐步锁定高抗菌活性的目标菌株。首先,通过平板抑菌圈法初筛与96孔板-酶标仪法复筛,完成全部菌株的抗菌活性评价(涵盖大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌及白念珠菌3种指示菌),筛选出抗大肠埃希菌活性强(抗菌活性等级 $\geq$ +++),且对其他指示菌也具有较强抗菌活性的菌株25株(表3)。在此基础上,对初筛、复筛均有高抗菌活性菌株的固体发酵样品、液体发酵样品进行HPLC-DAD化学多样性分析,以色谱吸收峰数量及保留时间分布评估菌株次级代谢产物丰富度。在25株高活性候选株的HPLC化学多样性分析中,菌株WHU10116虽非单一指示菌抗菌活性最佳者,但其固体发酵液在254 nm(指示芳香共轭结构)和280 nm(指示含氮杂芳环及酚类结构)处的色谱图呈现出最丰富的特征吸收峰,且其保留时间分布更均匀(图3)。综合抗菌活性与

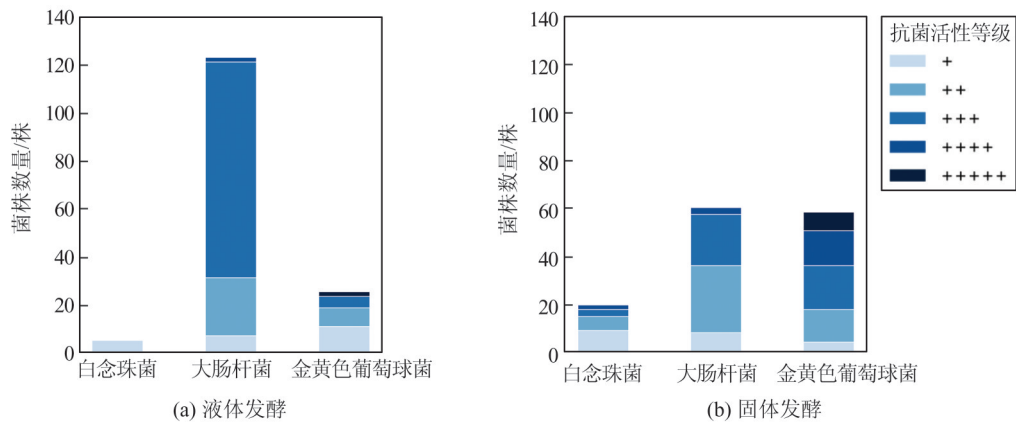


图 1 液体发酵(a)与固体发酵(b)提取物的抗菌活性等级分布

Figure 1 Distribution of antimicrobial activity grades of extracts from liquid fermentation(a) and solid fermentation(b)

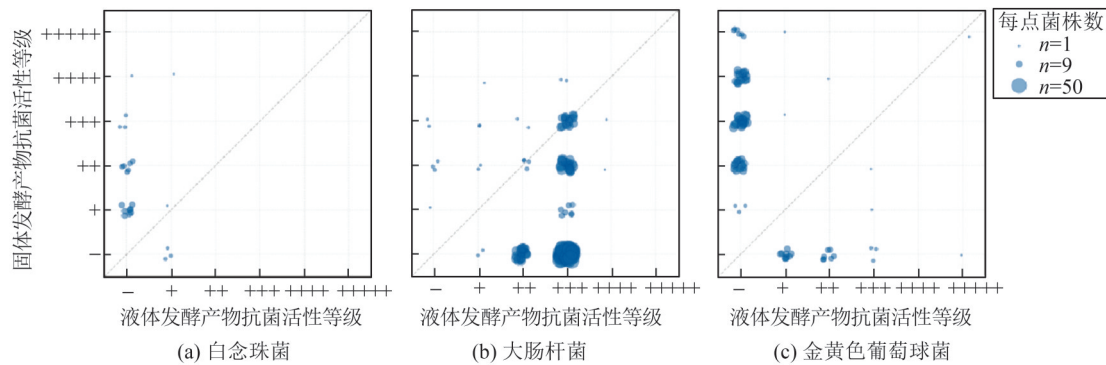


图 2 深海真菌固体发酵与液体发酵产品的抗菌活性对比

Figure 2 Comparison of antimicrobial activity between solid and liquid fermentation products of deep-sea fungi

活性先导物资源丰富度,最终选定 WHU10116 为目标菌株。

2.4 候选菌株 WHU10116 的鉴定

将菌株 WHU10116 以三点接种法接种于 PDA 培养基,28℃恒温培养 7 d 后,如图 4(a)、4(b)所示,可观察菌落直径达 25~30 mm,整体呈土黄色至浅黄褐色,中央可见明显的暗褐至近黑色区域。菌落边缘整齐规则,表面具放射状沟纹。在光学显微镜($\times 400$)下可观察到分生孢子梗光滑无色、呈直立,顶端膨大为球形顶囊,顶囊表面着生单层瓶形小梗,小梗顶端产生链状分生孢子。分生孢子头呈典型放射状,如图 4(c)所示。

候选菌株 WHU10116 的分子鉴定结果显示,其 ITS rDNA 片段序列与谢瓦曲霉(NR 135340.1)的序列一致性达 100%(E -value=0),与中间曲霉及肋状曲霉的一致性均为 99.81%(E -value=0)。采用 MEGA 11 软件以最大似然法构建系统发育树,结果表明 WHU10116 与谢瓦曲霉,中间曲霉及肋状曲霉共同聚为同一分支(bootstrap=96%),其中 WHU10116 与谢瓦曲霉在该分支内相邻聚类(图 5)。

综上,WHU10116 被鉴定为曲霉属曲霉组(section *Aspergillus*,原 *Eurotium* 属)成员,与谢瓦曲霉亲缘关系最为密切,确切的种级鉴定尚需多基因系统发育分析进行确证。

3 讨论

本研究结果表明,来自 9 个不同采样点深海沉积物的 138 株真菌展现出丰富的抗菌活性多样性,按菌株统计,抗大肠埃希菌活性阳性率最高,达 96.4%。这一差异可能与样品来源沉积物的理化性质及内生微生物群落结构的不同有关。

各采样点间菌株分离数量差异显著,反映了海洋环境中真菌群落分布的高度异质性。子样本数较多的采样点(如 D15、D31 各 6 个子样本)分离菌株总数较高,表明增加子样本采集数有助于更全面地挖掘生境中的真菌多样性。而 Q75 虽仅采集 3 个子样本,平均每子样本分离 8.7 株,提示该处生境真菌负载量本身较高。因此,在保证子样本数的前提下,兼顾生境差异的采样策略有助于提高药源真菌的分离覆盖度,为后续抗菌活性物筛选提供更丰富的菌株资源。

表3 初筛、复筛获得的候选菌株及其抗菌活性

Table 3 Candidate strains obtained from the initial screening and re-screening and their antimicrobial activities

菌株编号	液体发酵			固体发酵		
	抗白念珠菌	抗大肠埃希菌	抗金黄色葡萄球菌	抗白念珠菌	抗大肠埃希菌	抗金黄色葡萄球菌
WHU10001	—	+++	+	—	++	—
WHU10002	—	+++	+	—	—	—
WHU10005	—	+++	—	—	+++	+++
WHU10007	—	+++	—	+++	++++	++++
WHU10009	—	+++	+	—	++++	++++
WHU10013	—	+++	++	—	++	—
WHU10015	—	+++	+++	—	—	—
WHU10025	—	+++	—	++++	++	++++
WHU10030	—	+++	—	+	++	—
WHU10033	—	+++	—	—	—	++++
WHU10042	—	—	—	+++	+++	+++
WHU10050	—	+++	+	—	++	—
WHU10053	—	+++	++	—	++	—
WHU10054	—	+++	++	—	++	—
WHU10068	—	++	—	—	+++	++++
WHU10069	—	+++	—	—	++	++
WHU10070	—	+	—	—	+++	+++
WHU10079	—	+++	—	—	+++	+++
WHU10082	—	++++	++	—	++	—
WHU10103	—	+++	++++	+	++	—
WHU10116	—	+++	—	—	++	++++
WHU10118	+	+++	—	+	+++	—
WHU10121	—	+++	—	—	—	++++
WHU10139	—	++	—	++	+++	+++
WHU10140	—	+++	—	—	+++	++++

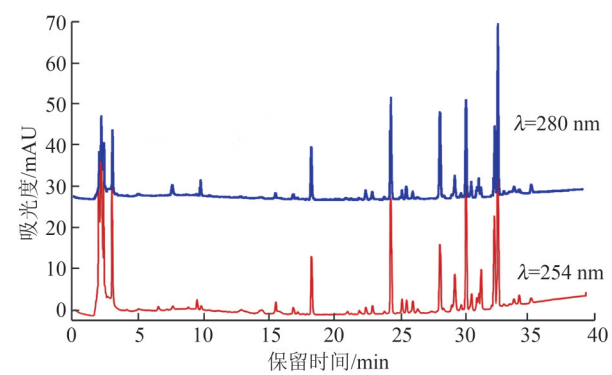


图3 WHU10116固体发酵产物的高效液相色谱图
Figure 3 HPLC chromatogram of solid fermentation product of strain WHU10116

培养基筛选结果显示,GPY培养基(高营养型)在菌株多样性上占优,Martin培养基(含孟加拉红,低营养选择型)则更有利于筛选到生产特异性次级代谢产物的真菌,这与以往文献报道一致^[11]。未来研究可在实验中补充CA、SDA等更多选择性培养

基,以扩大真菌多样性覆盖面。本研究中 10^{-1} 稀释度菌株记录数(38)低于 10^{-2} (59)与 10^{-3} (41),该差异主要与不同稀释度下菌落密度及可挑取性有关, 10^{-1} 平板菌落过密、菌丝蔓延,可识别挑取的种类反而受限。

本研究采用“形态排重-抗菌活性双法复筛-HPLC化学多样性评估”的逐级筛选策略(图6),从138株纯培养真菌中锁定目标菌株WHU10116。与单一抗菌活性筛选相比,该策略的优势在于单维度抗菌活性筛选虽能获得阳性株,但难以挖掘天然产物的发现潜力,易陷入“高活性但结构重复”的陷阱。在平板抑菌圈法初筛与96孔板-酶标仪法复筛的基础上,引入HPLC-DAD化学多样性评估作为第3级筛选维度,以190~800 nm全波长扫描下的吸收峰数量及保留时间分布均匀度为次级代谢产物丰富度的量化指标,将候选范围由“活性阳性”进一步收窄至“活性-化学”双优,提升后续活性先导物挖掘的命

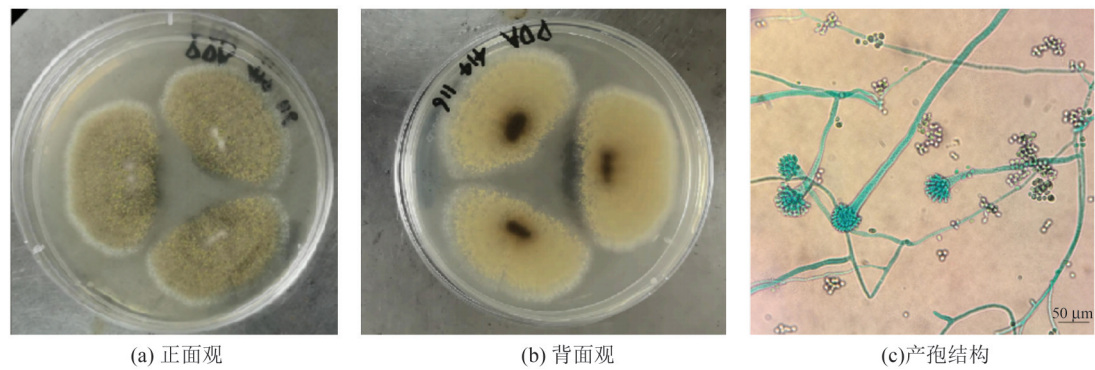


图4 菌株 WHU10116 的形态观察
Figure 4 Morphological observation of strain WHU10116

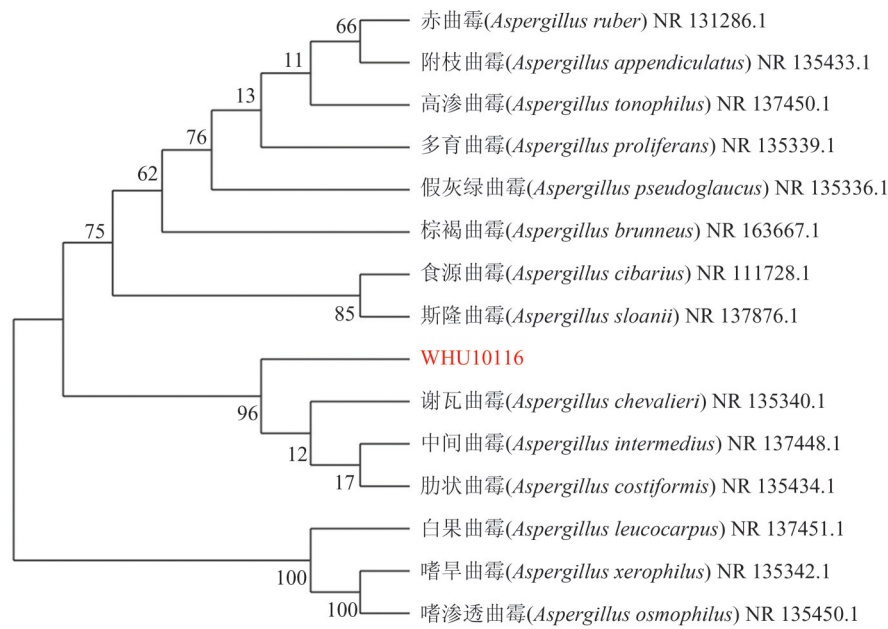


图5 基于 ITS rDNA 序列构建的 WHU10116 系统发育树
Figure 5 Phylogenetic tree of strain WHU10116 based on ITS rDNA sequences

中率。3 级方法互补验证,使最终入选的 WHU10116 兼具广谱抗菌活性和丰富的代谢特征。本文筛选策略可为其他生境来源真菌的高效筛选提供方法学参考。

本文筛选的目标菌株 WHU10116 兼具三重优势:(1)曲霉属丰富的次级代谢基因资源,曲霉组(section *Aspergillus*)物种已知可产生曲酸、烟曲霉素等多种活性化合物^[12-13];(2)深海特殊生境的代谢



图6 筛选流程图
Figure 6 Flowchart of screening

独特性,极端环境微生物基因组中存在大量沉默孤儿基因簇,具有产生新颖骨架活性分子的潜力;(3)初步验证的广谱抗菌活性,对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌均具有中等以上抗菌活性。后续研究将对WHU10116开展基因组挖掘、大规模发酵及代谢产物分离鉴定,并检测其对其他耐药病原菌的广谱抗菌活性,以充分发掘其药源潜力。

本研究在抗菌活性筛选中观察到,同一株真菌在固体发酵与液体发酵条件下表现出明显不同的抗菌性能,提示发酵方式对真菌次级代谢具有显著调控作用。固体发酵更接近丝状真菌在自然环境(如沉积物颗粒表面)中的生长状态——低水分活度、高氧传递、附着生长模式,这些条件可触发不同的基因表达程序^[14]。已有研究系统综述了固体发酵对微生物次级代谢产物生产的影响,指出固体发酵条件下微生物更容易激活在液体深层发酵中沉默的生物合成基因簇(BGCs),且部分次级代谢物在固体发酵下的产量远高于液体发酵^[14]。从分子调控层面看,真菌次级代谢受全局性调控因子(如Velvet复合体)、途径特异性转录因子以及表观遗传修饰(组蛋白乙酰化/甲基化)等多层次网络控制^[15-16]。培养条件的改变(碳氮比、盐度、水活度等)可通过影响这些调控网络,导致不同BGCs的选择性表达^[17]。对真菌次级代谢表观遗传调控机制的研究发现,环境信号可通过染色质重塑激活沉默BGCs^[16]。因此,固体发酵与液体发酵造成的理化微环境差异,可通过多层次调控网络驱动代谢流向不同方向,产生差异化的次级代谢产物谱。此现象也与OSMAC(one strain many compounds,单菌株多产物)策略的科学基础高度一致^[17]。在曲霉属真菌中应用OSMAC策略进行的系统代谢产物筛选,进一步证实了培养条件改变对曲霉属次级代谢产物谱的显著调控作用^[17-18]。

曲霉属曲霉组(section *Aspergillus*,原 *Eurotium* 属)真菌以代谢产物结构多样而著称,标志性产物涵盖蒽醌类(antraquinones)、苯甲醛衍生物(benzaldehyde derivatives)和吲哚二酮哌嗪生物碱(indole diketopiperazine alkaloids)3大类,多数兼具抗菌与抗氧化活性^[19]。对海洋曲霉属抗菌活性代谢产物的系统梳理^[19],以及对散囊菌属次级代谢产物的全面综述^[20],共同指向该类群作为抗菌先导化合物来源的巨大潜力。本研究中的WHU10116发酵粗提物对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌均表现出中等以上抗菌活性,与上述文献中散囊菌类群蒽醌类与苯甲醛衍生物的广谱抗菌特征相符,提示其可能存在类似结构类型的活性成分,值得未来进一步分离鉴定。

作为海洋药源真菌的初步筛选工作,本研究仍存在若干局限性:(1)抗菌活性评价基于粗提物,未分离纯化得到单体化合物,无法确定具体活性成分及构效关系;(2)优势菌株WHU10116的鉴定仅依据ITS序列,未进行全基因组测序,无法系统预测BGCs的潜在编码能力;(3)指示菌种类有限,未涵盖临床耐药菌株。

未来研究可从以下几个方向深入:(1)完成WHU10116的全基因组测序与生物信息学分析,利用antiSMASH等工具挖掘其BGCs;(2)基于OSMAC策略^[17-18],系统优化培养条件以诱导WHU10116沉默BGCs的表达,结合LC-MS/MS分子网络技术进行代谢组学导向的活性成分追踪;(3)将抗菌谱扩展至临床多重耐药菌株,以评估其作为新型抗菌先导化合物来源的应用价值^[21]。

4 结 论

本研究建立并验证了一套“形态排重-抗菌活性双法复筛-HPLC化学多样性评估”的3级逐级筛选策略,并将其应用于深海沉积物可培养真菌的系统性挖掘。基于9个深海沉积物采样点(30份样品)分离获得的138株纯培养真菌,系统评估表明:(1)所分离的深海来源真菌对3类指示菌均表现出抗菌活性,按大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、白念珠菌(分别代表 G^- , G^+ 及真菌)统计的拮抗阳性率分别为96.4%、58.0%及16.7%;(2)固体与液体双路发酵在抗菌活性代谢产物检出上呈互补关系,共同提升了检出的完整性;(3)经该3级策略优选出的目标菌株WHU10116,其ITS rDNA鉴定结果显示属于曲霉属曲霉组,兼具较强的抗菌活性、丰富的代谢产物与特殊的深海生境来源特征,是后续开展代谢产物分离鉴定和基因组挖掘的优先候选株。

参考文献

- [1] 徐雪松,王瑶. 微生物耐药全球现状及治疗策略[J]. 协和医学杂志, 2025, 16(5): 1073-1081.
Xu X S, Wang Y. Global status of antimicrobial resistance and corresponding therapeutic strategies[J]. Medical Journal of Peking Union Medical College Hospital, 2025, 16(5): 1073-1081.
- [2] Murray C, Ikuta K S, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis [J]. The Lancet, 2022, 399 (10325): 629-655.
- [3] Nass N M, Zaher K A. Beyond the resistome: molecular insights, emerging therapies, and environmental drivers

- of antibiotic resistance [J]. *Antibiotics*, 2025, 14(10): 995.
- [4] 杜瑞, 王梦歌, 彭金金, 等. 环境未培养微生物中新型抗生素的发掘研究进展[J]. *生物加工过程*, 2022, 20(2): 172-181.
- Du R, Wang M G, Peng J J, et al. Advances in discovery of new antibiotics in uncultured microorganisms [J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2022, 20(2): 172-181.
- [5] Arrieche D, Cabrera-Pardo J R, San-Martin A, et al. Natural products from Chilean and Antarctic marine fungi and their biomedical relevance[J]. *Marine Drugs*, 2023, 21(2): 98.
- [6] 赵肖肖, 白世博, 吕磊, 等. 极端环境微生物分离策略及其活性物质研究进展[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(10): 3407-3426.
- Zhao X X, Bai S B, Lü L, et al. Research progress in isolation strategies and bioactive substances of microorganisms in extreme environments[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(10): 3407-3426.
- [7] 曲晏良, 刘永铮, 潘美芳, 等. 一株海洋来源真菌 *Verticillium* sp. SN-1 的次级代谢产物研究[J]. *药学报*, 2026, 61(7): 2603-2610.
- Qu Y L, Liu Y Z, Pan M F, et al. Studies on the secondary metabolites of a marine-derived fungus *Verticillium* sp. SN-1 [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2026, 61(7): 2603-2610.
- [8] 熊定米, 于云霞, 马青云, 等. 海洋真菌 *Penicillium* sp. MDKFD-160 次级代谢产物的研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2026, 51(5): 605-612.
- Xiong D M, Yu Y X, Ma Q Y, et al. Study on the secondary metabolites of marine fungus *Penicillium* sp. MDKFD-160 [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2026, 51(5): 605-612.
- [9] Maharjan S, Lesjø J M, Isaksson J, et al. *Parafenestella varangrensis* sp. nov., a phomenin producing fungus from the Arctic [J]. *Scientific Reports*, 2026, 16: 3221.
- [10] Huo R Y, Zi G R, Shi D X, et al. Antibacterial activity and mechanism of polyketides from the marine-derived fungus *Talaromyces* sp [J]. *Phytochemistry*, 2025, 239: 114606.
- [11] 董治统, 闫晶晶, 彭方, 等. 红树林、海洋沉积物及北极 3 种不同生境真菌的分离及代谢产物活性筛选[J]. *中国抗生素杂志*, 2017, 42(4): 277-283.
- Dong Z T, Yan J J, Peng F, et al. Isolation and bioactivity screening of metabolites of fungi from three different habitats of mangrove, marine sediments and Arctic region[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2017, 42(4): 277-283.
- [12] Chen W C, Song X, Wu J, et al. Aculeapyridones A-Q, pyranopyridone alkaloids with protective effects against acetaminophen-induced acute liver injury discovered from a coculture of *Aspergillus aculeatinus* WHUF0198 and a *Penicillium* sp. [J]. *Journal of Natural Products*, 2025, 88(2): 336-348.
- [13] Gui P Y, Fan J, Zhu T H, et al. Sesquiterpenoids from the mangrove-derived *Aspergillus ustus* 094102 [J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(7): 408.
- [14] Kumar V, Ahluwalia V, Saran S, et al. Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: challenges and solutions [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 323: 124566.
- [15] Keller N P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17: 167-180.
- [16] Zhang Y F, Yu W B, Lu Y, et al. Epigenetic regulation of fungal secondary metabolism[J]. *Journal of Fungi*, 2024, 10(9): 648.
- [17] Pan R, Bai X L, Chen J W, et al. Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: a literature review[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 294.
- [18] 梁△爻, 韩颜欣, 岳昌武. 基因组深度挖掘驱动天然萜类化合物高效发现[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2026, 42(6): 1073-1090.
- Liang S Y, Han Y X, Yue C W. Genome mining drives efficient discovery of natural terpenoid compounds [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2026, 42(6): 1073-1090.
- [19] Li H H, Fu Y Q, Song F H. Marine *Aspergillus*: a treasure trove of antimicrobial compounds [J]. *Marine Drugs*, 2023, 21(5): 277.
- [20] Deng J T Y, Li Y L, Yuan Y, et al. Secondary metabolites from the genus *Eurotium* and their biological activities [J]. *Foods*, 2023, 12(24): 4452.
- [21] Pan C Q, Hassan S S U, Muhammad I, et al. Marine fungi as a goldmine for novel antibiotics: a 2024 perspective [J]. *Frontiers in Marine Science*, 2025, 11: 1538136.